



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA

FACULTAD DE QUÍMICA

"SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE POLI(LACTIDA-CO-GLICÓLIDO)S Y ESTUDIO
DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN INGENIERÍA

INGENIERÍA QUÍMICA – POLÍMEROS

P R E S E N T A :

PAMELA BARRIOS LÓPEZ

TUTOR:

DR. MIQUEL GIMENO SECO

2011





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 Dra. María Josefa Bernad Bernad

Vocal Dra. Keiko Shirai Matsumoto

1er. Suplente M. C. Baldomero Esquivel Rodríguez

2do. Suplente Dr. Miquel Gimeno Seco

Lugar donde se realizó la tesis:

El trabajo se realizó en el Laboratorio 314 del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Edificio E, Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. Miquel Gimeno Seco

Tutor de Tesis

I. Q. Pamela Barrios López

Sustentante

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por las becas, nacional y mixta, otorgadas durante los estudios de maestría.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.

Al Departamento de Alimentos y Biotecnología, Edificio E, Laboratorio 314, de la Universidad Nacional Autónoma de México por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

Al presupuesto del proyecto PAPIIT IN200109 y CONACyT 48641.

A la USAI, Facultad de Química, UNAM, Edificio B, PB, Posgrado.

A la Universidad de California Davis, Departamento de Química.

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

Al Dr. Neil E. Schore.

For Mari and Jeff.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE CONTENIDO	ii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi

ABREVIATURAS

$^1\text{H-RMN}$	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
CDCl_3	Cloroformo Deuterado
Lipasa PS	Lipasa de <i>Pseudomonas Species</i>
CF_3COOD	Acido Trifluoroacético Deuterado
CCM	Concentración Critica Micelar
CO_2	Dióxido de Carbono
COV	Compuestos Orgánicos Volátiles
LLA	L-Lactida
DLLA	D,L-lactida
CDB	Calorimetría Diferencial de Barrido
FSC	Fluidos Supercríticos
GA	Glicólido
CPG	Cromatografía de Permeación en Gel
AM	Azul de Metileno
PAA	Polimerización por Apertura de Anillo
PDLGA	Poli(D, L-láctido-co-glicólico)
PGA	Poliglicólido
PLGA	Poli(lactida-co-glicólico)
PLLGA	Poli(L-lactida-co-glicólido)
CO_2sc	Dióxido de Carbono Supercrítico
CET	Cromatografía de Exclusión de Tamaño
MEB	Microscopia Electrónica de Barrido
SLF	Sistemas de Liberación de Fármacos
ATG	Análisis Termogravimétrico
THF	Tetrahidrofurano

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. Introducción	3
2. Objetivos	7
2.1. Objetivo General	7
2.2. Objetivos Específicos	7
3. Antecedentes	8
3.1. Enzimas	8
3.1.1. Lipasas	9
3.1.1.1. Lipasa PS	11
3.2. Polimerización de Apertura de Anillo (PAA) catalizada por enzimas	13
3.3. Ventajas de la polimerización enzimática	15
3.3.1. Lipasas como catalizadores en PAA	16
3.3.1.1. Lactidas	17
3.3.1.1.1. Mecanismo de PAA catalizado por lipasas	17
3.4. Extracción con CO ₂ supercrítico	18
3.5. Sistemas de liberación de fármacos	19
3.5.1. Clasificación de sistemas poliméricos de liberación de fármacos	20
3.6. PLGA en sistemas de liberación controlada de fármacos	21
3.6.1. Azul de Metileno como “compuesto modelo” de un fármaco	21
3.5.2. Compuestos modelos en matrices de PDLGA	21
4. Metodología	23
4.1. Materiales	23
4.2. Copolimerización en masa catalizada por Lipasa PS	23
4.3. Actividad Enzimática	24
4.3.1. Medición de la actividad enzimática mediante la hidrólisis p-nitrofenil acetato por espectroscopía UV-visible	24
4.4. Síntesis a escala mayor	24
4.5. Purificación con CO ₂ supercrítico	25

4.6. Caracterización de productos	27
4.6.1. Determinación de pesos moleculares y distribución de pesos moleculares mediante Cromatografía de Permeación en Gel y de Exclusión de Tamaño	27
4.6.2. Determinación de la composición mediante ¹ H-RMN	27
4.6.3. Análisis Termogravimétrico y Calorimetría Diferencial de Barrido	28
4.6.4. Determinación de cristalinidad mediante Rayos X en polvo	28
4.7. Liberación controlada del pigmento	29
4.7.1. Preparación del polímero con pigmento	29
4.7.2. Efecto en la intensidad de señal de la concentración de Azul de Metileno en la curva de calibración de espectroscopia de fluorescencia	30
4.7.3. Determinación de la cantidad de Azul de Metileno liberado del polímero	30
4.7.4. Caracterización del polímero que contiene Azul de Metileno	31
4.7.5. Eficiencia de encapsulación	31
4.7.6. Efecto del surfactante, concentración del surfactante y tiempo de emulsión en la preparación del polímero con pigmento	31
5. Resultados	33
5.1. Copolimerización en masa catalizada por Lipasa PS	33
5.2. Actividad Enzimática	37
5.2.1. Medición de la actividad enzimática mediante la hidrólisis p-nitrofenil acetato por espectroscopía UV-visible	37
5.3. Síntesis a escala mayor y purificación con CO ₂ supercrítico	39
5.4. Caracterización de productos	40
5.4.1. Determinación de la composición mediante ¹ H-RMN	40
5.4.2. Análisis Termogravimétrico y Calorimetría Diferencial de Barrido	44
5.4.3. Determinación de cristalinidad mediante difracción de Rayos X en polvo	46
5.5. Liberación controlada del pigmento	49
5.5.1. Preparación del polímero con pigmento	49
5.5.2. Efecto en la intensidad de señal de la concentración de Azul de	50

Metileno en la curva de calibración de espectroscopia de fluorescencia	
5.5.3. Determinación de la cantidad de Azul de Metileno liberado del polímero	52
5.5.4. Caracterización del polímero que contiene Azul de Metileno	53
5.5.5. Eficiencia de encapsulación	55
5.5.6. Efecto del tipo de surfactante, concentración del surfactante y tiempo de emulsión en la preparación del polímero con pigmento	55
6. CONCLUSIONES	57
7. TRABAJO FUTURO	58
8. REFERENCIAS	59

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Campos de aplicación de las enzimas	8
Tabla 2. Lipasas comerciales de origen fúngico y bacteriano	10
Tabla 3. Síntesis de polímeros catalizadas por Lipasa PS	13
Tabla 4. Concentración de surfactante	32
Tabla 5. Copolimerización en masa variando el porcentaje en peso de Lipasa PS	34
Tabla 6. Copolimerización enzimática a 90 °C con 50/50 DLLA/GA adicionando 4% en peso de lipasa en intervalos de 12 h	35
Tabla 7. Copolimerización enzimática aplicando vacío al medio de reacción	37
Tabla 8. Actividad enzimática	39
Tabla 9. Resultados de los análisis de ¹ H-RMN para las muestras en las cuales se llevaron a cabo variaciones de temperatura y porcentaje de enzima	42
Tabla 10. Propiedades térmicas de las muestras de la cinética de PDLGA	46
Tabla 11. Grado de cristalinidad para las muestras de la cinética de PDLGA	48
Tabla 12. Cristalinidad para las muestras de PDLGA purificadas con CO ₂ supercrítico	49

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Síntesis de PDLGA mediante una reacción de policondensación del DLLA y GA empleando Lipasa PS como catalizador.	3
Figura 2. Lipasa PS. La triada catalítica está formada por tres residuos (Ser87, His286 y Asp264). El ión calcio se muestra como una esfera de color amarillo.	12
Figura 3. Mecanismo de PAA catalizada por Lipasa PS.	18
Figura 4. Diseño del equipo de extracción de CO ₂ supercrítico.	26
Figura 5. Estructura molecular del Azul de Metileno.	29
Figura 6. (A) Tween 20. (B) Triton X-100.	32
Figura 7. Rendimiento de la reacción de copolimerización de D, L-lactida y glicólido para las diferentes relaciones de alimentación a 130 °C.	34
Figura 8. Curva de calibración de UV-Visible para p-nitrofenol.	38
Figura 9. Espectro de ¹ H-RMN de PDLGA 50/50.	41
Figura 10. Distribución molar por ¹ H-RMN de PDLGA 50/50, 65/35, 85/15 con Lipasa PS a diferentes tiempos de reacción.	43
Figura 11. TGA's para las diferentes relaciones de alimentación de los monómeros.	45
Figura 12. Patrón de difracción de Rayos para un espécimen amorfo de PDLGA enzimático 65/35 5 días.	47
Figura 13. Patrón de difracción de Rayos para un espécimen semicristalino de PDLGA no enzimático 50/50 12 h.	47
Figura 14. Efecto de la concentración de AM en la intensidad de fluorescencia en la curva patrón.	51
Figura 15. Liberación acumulativa de AM cargado en PDLGA (enzimático y no enzimático).	53
Figura 16. Fotografías de Microscopia Electrónica de Barrido para las	54

partículas de PDLGA.

Figura 17. Determinación de la concentración crítica micelar.

56

RESUMEN

La copolimerización en masa de DLLA (D, L-lactida) y GA (glicólido), empleando la Lipasa PS (PS: *Pseudonomas Species*) como biocatalizador, fue estudiada para generar un material con aplicaciones biomédicas. La purificación del material sintetizado, el PDLGA (poli(D, L-lactida-co-glicólido)), se realizó utilizando dióxido de carbono supercrítico, para evitar el uso de disolventes orgánicos tóxicos. Los materiales candidatos se emplearon en estudios de administración controlada de fármacos. Para ello, se evaluó la velocidad de liberación de un compuesto modelo como fármaco, cargado en las partículas poliméricas de PDLGA (enzimático y otro control, sintetizado sin biocatalizador).

Las mejores condiciones para la copolimerización en masa fueron con una relación de monómeros 1:1 DLLA:GA (peso), con 20% en peso de Lipasa PS a 90 °C por 24 h, obteniéndose un rendimiento del 71% en peso. El producto se purificó mediante CO₂ en estado supercrítico como medio de extracción a 70 °C y 400 bar, en un equipo SFT-250 SFE (modelo SFR, Supercritical Fluid Technology). La estructura molecular analizada por resonancia magnética nuclear de protón de la muestra candidata indicó un 43.1% de unidades lactilo. Las micropartículas de PDLGA fueron preparadas por el método de fundido y el compuesto modelo empleado fue el pigmento catiónico azul de metileno (AM). El material control de PDLGA, sintetizado en masa sin la adición de biocatalizador, mostró alta degradabilidad y vida corta en gaveta, por lo que no se consideró un buen agente liberador de fármacos.

La liberación de azul de metileno cargado en el PDLGA enzimático siguió una respuesta hiperbólica, donde el AM fue liberado rápidamente dentro de las primeras 12 h (primera fase de liberación); después el pigmento se liberó lentamente y de forma continua durante las siguientes 96 h (segunda fase de liberación). El método de fundido dio lugar a partículas que muestran diferentes morfologías, constando de formas esféricas y aglomerados.

ABSTRACT

Copolymerization of DLLA (D, L-lactide) and GA (glycolide) in bulk using Lipase PS as a biocatalyst was studied to produce a suitable material for biomedical applications. scCO₂ (supercritical carbon dioxide) was used for the purification of the synthesized material, PDLGA (poly(D, L-lactide-co-glycolide)), thus avoiding the use of toxic organic solvents. Candidate materials were employed for controlled drug delivery assays. The rate of release of a model compound, methylene blue (MB), was determined using fluorescence spectroscopy, loaded in either biocatalytic or noncatalytically synthesized PLDGA.

The best conditions for the copolymerization was found with a ratio of 1:1 (wt) of monomers DLLA and GA, with 20 %wt of Lipase PS at 90 °C for 24 h to give 71%wt PDLGA yield. The product was purified using scCO₂ at 70 °C and 400 bar with a supercritical extractor SFT-250 SFE (SFR model, Supercritical Fluid Technology). The molecular structure of the candidate PDLGA material for biomedical applications was analyzed by ¹H-NMR showing 43.1% of lactyl units in the polymer backbone. The melting method resulted in particles that exhibited different morphologies, consisting of spherical shapes and agglomerates.

The loaded PDLGA microparticles with MB were prepared by the melting method. The noncatalytically synthesized PDLGA control showed rapid degradability and short storage life, therefore it was disregarded as a suitable drug-delivery agent. The release of MB loaded in the PDLGA enzyme followed a hyperbolic response, where the MB was released rapidly within the first 12 h (initial release stage); then was released slowly and continuously over the next 96 h (second release stage).

1. Introducción

De todos los materiales orgánicos disponibles, los polímeros son los que han tenido el mayor impacto en nuestras vidas diarias durante las últimas décadas, ya que muchas y muy variadas son sus aplicaciones. En cuanto al campo de la biomedicina, la fusión de la ciencia de los polímeros con la ciencia farmacéutica ha dado como resultado diseños novedosos y el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos (SLF). La introducción de los SLF a base de polímeros, llevó a un mayor interés de los investigadores en cuanto al diseño y síntesis de materiales biodegradables novedosos, que fueran capaces de suprimir la necesidad de eliminar la matriz polimérica del organismo una vez cumplida su función.¹

Con el fin de mejorar la biodisponibilidad de los fármacos convencionales con un mínimo de efectos secundarios, nuevos SLF siguen atrayendo la atención en este campo. Los polímeros a base de lactida y glicólido, especialmente el PDLGA (poli(D, L-lactida-co-glicólido)) (Figura 1) han sido señalados como materiales adecuados para desarrollar sistemas biodegradables capaces de proporcionar una liberación adecuada de fármacos, entre algunas de sus aplicaciones biomédicas. Además estos materiales son termoplásticos y pueden ser procesados en la industria.

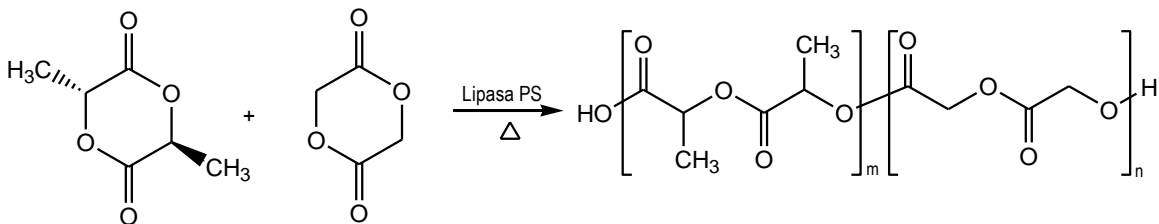


Figura 1. Síntesis de PDLGA mediante una reacción de policondensación del DLLA y GA empleando Lipasa PS como catalizador.

Los PDLGAs pueden ser hidrolizados *in vivo* y los productos de degradación son fácilmente metabolizados por el organismo. Los PDLGAs son bien tolerados por el cuerpo humano con una respuesta inflamatoria mínima siendo eventualmente

absorbidos sin acumulación en órganos vitales. Por otra parte, las tasas de degradación pueden ser reguladas por medio de los pesos moleculares, composiciones químicas, o cristalinidad.² De acuerdo a estas características, los polímeros a base de unidades de repetición lactilo o glicolilo, se han utilizado durante mucho tiempo en una variedad de aplicaciones tales como suturas reabsorbibles, prótesis vasculares, en matrices para fármacos y en la microencapsulación de fármacos.³ Aunque las condiciones óptimas en las tasas de liberación de fármacos se puede lograr mediante variaciones del peso molecular, composición química, el tamaño de las partículas y la concentración del fármaco; el diseño de un polímero que se degrade de forma óptima para la entrega controlada de fármacos entra en el campo del diseño de ingeniería biomédica⁴, que es la disciplina encargada de conjuntar las ciencias exactas con la medicina y la fisiología para lograr avances en los problemas del sector salud.

Las rutas de síntesis convencional para los PLGAs se basan en reacciones de policondensación o polimerización por apertura de anillo (PAA) ya sea de los monómeros lineales o de los dímeros cíclicos, respectivamente. El primer método requiere condiciones experimentales severas, tales como altas temperaturas y altos tiempos de reacción para obtener pesos moleculares adecuados y con elevada polidispersidad; mientras que la PAA se lleva a cabo en condiciones menos extremas para producir polímeros de alto peso molecular con estructuras más controladas. La producción comercial de estos materiales actualmente implica el uso de catalizadores metálicos y organometálicos que contienen Sn, Zn, Al o Ge. Estas rutas de síntesis requieren la eliminación de los residuos de catalizador del poliéster, y la presencia de remanentes de estos metales representa una desventaja en cuanto a las aplicaciones biomédicas. En contraparte, las enzimas pueden ser una solución viable para evitar el uso de catalizadores metálicos debido a que la poliesterificación enzimática ha demostrado ser un proceso benigno en condiciones moderadas.⁵

Las diferentes publicaciones sobre policondensaciones enzimáticas mediante PAA de lactidas y glicólidos son escasas. Huijser y colaboradores⁶ publicaron la síntesis de PDLGA y PLLGA utilizando Lipasa PS a temperaturas relativamente altas (100-130 °C); en esta investigación se prestó especial atención a dilucidar las estructuras del PLGA y su topología, obteniendo pesos moleculares de hasta 20.6×10^3 g/mol, sin embargo los rendimientos del polímero no fueron reportados. También en ese trabajo, se detectó copolimerización significativa en las muestras control (sin enzima), la cual fue atribuida al mecanismo de polimerización catiónica inducida por residuos de hidroxiaácidos presentes en la reacción y generados térmicamente a partir de los monómeros cíclicos.^{6,7}

Por otro lado, los fluidos supercríticos (FSC) son medios de extracción prometedores para la purificación de polímeros. Existen publicaciones disponibles de la purificación de polímeros biodegradables utilizando métodos de extracción con FSC. El poder de solubilidad selectiva del FSC promueve la separación de un determinado componente de una mezcla. Por lo que, los FSC se han utilizado para fines de purificación y separación en el procesamiento de alimentos y en la industria de la destilación. Entre ellos, el CO₂ supercrítico es el más comúnmente usado debido a sus bajos parámetros críticos (T_c=31.1 °C, P_c=73.8 bar), lo que atrae el interés para el procesamiento de alimentos, aplicaciones en la industria farmacéutica y de la producción de lípidos, entre otros. Además, el CO₂ es no tóxico comparado con solventes orgánicos, no inflamable y tiene un poder disolvente relativamente alto en su estado supercrítico. El CO₂ supercrítico (CO₂sc) también presenta muy baja viscosidad y un alto coeficiente de difusión, además de poseer una densidad inferior a los disolventes comunes. Una de las ventajas reportadas del CO₂sc en procesos de extracción, es la rápida difusión del fluido comprimido a través de matrices sólidas, por lo que se ha propuesto como la sustitución ecológica de los compuestos orgánicos volátiles (COV) en la ingeniería y diversos procesos sintéticos.⁸⁻¹⁰

En el presente proyecto se investigó de forma novedosa la síntesis enzimática de PDLGA y su purificación usando CO_2sc , además el material resultante se evaluó como sistema de liberación controlada de fármacos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Copolimerización en masa de DLLA y GA empleando Lipasa PS como biocatalizador junto con el uso de CO₂sc para la purificación y aplicación del material en sistemas de liberación controlada de fármacos.

2.2. Objetivos Específicos

- Síntesis enzimática a pequeña escala de PDLGA con diferentes composiciones de alimentación de los monómeros empleando Lipasa PS.
- Determinación de la actividad enzimática residual de la Lipasa PS antes y después de la reacción.
- Reproducción a una escala mayor de dos PDLGA (enzimático y control) bajo las mejores condiciones encontradas a pequeña escala.
- Purificación del material producido (a una escala mayor) mediante CO₂sc usando el sistema extractor SFT-250.
- Caracterización de las muestras por cromatografía de permeación en gel y de exclusión de tamaño (CPG/CET), espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN), Difracción de Rayos X en polvo, análisis termogravimétricos y calorimetría diferencial de barrido.
- Preparación de las micropartículas de PDLGA cargadas con el “compuesto modelo”, mediante la técnica de fundido.
- Evaluación de la velocidad de liberación del “compuesto modelo”.
- Caracterización de los sistemas de liberación mediante microscopia electrónica de barrido.

3. Antecedentes

3.1. Enzimas

La mayoría de las enzimas de uso industrial son de origen microbiano. La presencia de enzimas en la industrial se debe a los avances en la bioquímica, y a la mejora en los procesos de fermentación y de recuperación, lo que ha hecho procesos económicamente factibles. Las enzimas de uso industrial (incluyendo a las lipasas) presentan actividad hidrolítica. Los principales campos de aplicación de las enzimas están resumidos en la Tabla 1, las lipasas se encuentran presentes en la mayoría de éstos.¹¹

Tabla 1. Campos de aplicación de las enzimas

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

3.1.1. Lipasas

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas) son enzimas que poseen un importante potencial fisiológico e industrial. Uno de sus principales usos es la hidrólisis de triacilglicerol a glicerol y a ácidos grasos libres. Las lipasas son activas únicamente cuando se encuentran adsorbidas a una interfase agua-aceite y no son capaces de disolver los sustratos en el seno del fluido. Las lipasas presentan poca actividad en soluciones acuosas que contienen sustratos solubles. En los eucariontes, las lipasas tienen funciones a diferentes niveles, principalmente en la metabolización de lípidos incluyendo la digestión de grasas, absorción, reconstitución y metabolismos grasoprotéicos; en las plantas, las lipasas se encuentran en los tejidos de reserva de energía.¹¹

Debido a su importancia, las lipasas son objeto de estudios intensivos. Las investigaciones en lipasas se enfocan particularmente en la caracterización de su estructura, elucidación de su mecanismo de acción, cinética, secuencia y en su actividad.¹¹

Las lipasas comerciales son frecuentemente obtenidas a partir de microorganismos que producen una amplia variedad de lipasas extracelulares (Tabla 2).¹¹ Independientemente del tipo de organismo del cual ha sido aislada la lipasa y de la variación de los pesos moleculares, todas las lipasas muestran funcionalidad y estructura similar. Un rasgo estructural único y común en la mayoría de las lipasas es la presencia de una “tapa” compuesta de una secuencia anfifílica α -hexil péptida, la cual es una conformación cerrada que previene el acceso del sustrato al sitio catalítico; una vez que la “tapa” se abre, una amplia superficie hidrofóbica queda expuesta, en la cual el sustrato (también hidrofóbico) quedará unido. El sitio activo se compone de un residuo de serina nucleofílica (Ser); la activación se debe al puente de hidrógeno con la triada catalítica, con histidina (His), aspartato (Asp) o glutamato (Ser105-His224-Asp187). Todas las lipasas son miembros de la familia del doblamiento “ α/β -hidrolasa”, familia con una arquitectura común compuesta de una secuencia

específica de α -hélices y láminas- β ; el núcleo está compuesto de láminas- β paralelas rodeadas de α -hélices. El sitio activo de residuo de serina nucleofílica reposa en una curva muy cerrada entre una α -hélice y una lámina- β .¹²

Tabla 2. Lipasas comerciales de origen fúngico y bacteriano

Tipo	Fuente	Aplicación	Compañía productora
Fúngico	<i>Candida rugosa</i>	Síntesis orgánica	Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma
	<i>Candida antarctica</i>	Síntesis orgánica	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Aditivo para detergentes	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
Bacteriano	<i>Rhizomucor miehei</i>	Procesamiento de alimentos	Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano
	<i>Pseudomonas Cepacia</i>	Síntesis orgánica	Amano, fluka, Boehringer Mannheim
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Aditivo para detergentes	Genencor
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Aditivo para detergentes	Genencor
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Síntesis orgánica	Asahi, Biocatalysts

Muchas lipasas son activas en disolventes orgánicos, en los cuales pueden catalizar un amplio número de reacciones incluyendo esterificaciones, transesterificaciones, acilación regioselectiva de glicoles y mentoles, así como, síntesis de péptidos. Se espera que las lipasas sean tan importantes a nivel industrial como actualmente son las proteasas y las carbohidrasas.¹¹

Las lipasas tienen aplicaciones promisorias en procesos químicos orgánicos, formulación de detergentes, síntesis de biosurfactantes, en la industria oleoquímica, en la de lácteos, en la agroquímica, en la manufactura de papel, nutrición, cosméticos y procesos farmacéuticos. El desarrollo de tecnologías basadas en lipasas para la síntesis de compuestos nuevos se está expandiendo

rápidamente. La mayor aplicación comercial para lipasas hidrolíticas se ha expandido rápidamente siendo los detergentes su mayor aplicación comercial.¹¹

Las lipasas son usadas para catalizar una amplia variedad de transformaciones regio y estereoselectivas. Estas enzimas trabajan en interfaces hidrofílicas-lipofílicas y toleran disolventes orgánicos en el medio de reacción. Bajo condiciones de reacción establecidas, la cantidad de agua en la mezcla de reacción determinará la reacción enzima-catalizada; cuando no hay agua o muy poca esta presente en el medio, únicamente la reacción de esterificación y de transesterificación estará favorecida. La hidrólisis será la reacción favorecida cuando hay exceso de agua en el medio.¹¹

3.1.1.1. Lipasa PS

La Lipasa PS (PS: *Pseudomonas Species*) proveniente de *Pseudomonas cepacia*, la cual fue reclasificada como *Burkholderia cepacia* en 1995, en honor a su descubridor el Dr. Burkholder de la Universidad de Cornell en Estados Unidos de Norteamérica, quien la descubrió en 1949 en las catáfilas de cebolla y en sus epidermis radiculares. Esta es una lipasa que tiene su origen en un grupo de bacterias gram-negativas, no fermentadoras y aerobias.^{12, 13} La cadena polipeptídica consta de 320 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 33 KDa.¹² La estructura cristalina de la Lipasa PS muestra que la enzima se compone de tres dominios, el mayor de los cuales es miembros de la familia del doblamiento “ α/β -hidrolasa” y un sitio de unión con un ión de calcio; es una enzima globular con dimensiones aproximadas de 30x50x50 Å (Figura 2). La triada catalítica está formada por tres residuos (Ser87, His286 y Asp264); el nucleófilo Ser87, está situado en una curva cerrada, lo que permite a la His286 y al sustrato tener acceso. En el sitio de unión de calcio, los iones de calcio son dos grupos carboxilato de Asp242 y Asp288, dos grupos carbonilo de Gln292 y Val296 y dos moléculas de agua.¹³

El sitio activo de la Lipasa PS muestra características similares a otras lipasas. Esta enzima es ampliamente utilizada para la síntesis orgánica e hidrólisis de triglicéridos de cadena larga debido a su enantioselectividad.¹³

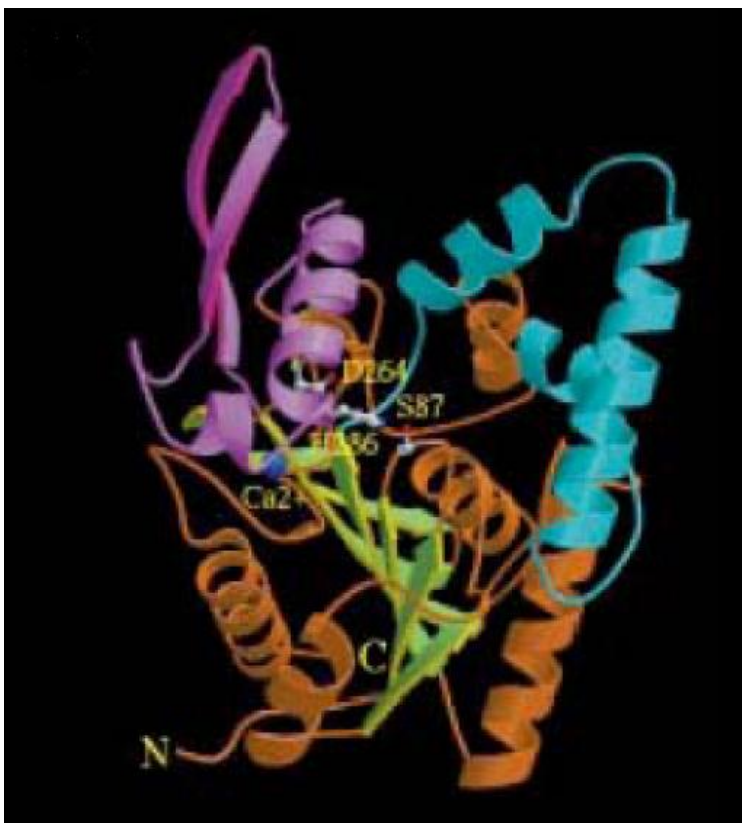


Figura 2. Lipasa PS. La triada catalítica está formada por tres residuos (Ser87, His286 y Asp264). El ión calcio se muestra como una esfera de color amarillo.

Se han reportado diferentes síntesis de polímeros empleando Lipasa PS (en estado libre) y a continuación se presenta un resumen¹² (Tabla 3).

Tabla 3. Síntesis de polímeros catalizadas por Lipasa PS¹²

Monómero	T (°C)	Tiempo (h)	Medio de reacción	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	Conversión o Rendimiento
β-PL	60	120	Masa	290	---	60
β-BL	45	480	Masa	7700	---	85
	60	480	Masa	7000	---	85
γ-BL	45	480	Masa	800	---	8
γ-VL	60	480	Masa	800	---	<5
	60	240	Masa	6100	---	84
CL	45	480	Masa	8800	---	100
	60	480	Masa	10200	---	98
γ-CL	60	480	Masa	1000	---	<10
OL	75	240	Isooctano	16000	22000	85
δ-DL	45	480	Masa	6900	---	87
	60	480	Masa	9000	---	87
UDL	60	71	Agua	1300	---	79
	60	120	Masa	5700	---	100
	60	72	Agua	1100	---	77
DDL	60	120	Masa	5600	---	100
	75	120	Masa	16400	---	100
Δ-DDL	45	480	Masa	5900	---	78
	60	480	Masa	7900	---	78
	60	240	Masa	2400	---	90
PDL	45	480	Masa	3600	---	64
	80	72	Masa	34400	---	92
	60	72	c-hexano	---	21300	100
HDL	75	120	Masa	5800	---	100
LLA	100	168	Masa	---	48000	82
DLA	100	168	Masa	---	59000	96
DLLA	130	168	Masa	---	12600	100

CL: ε-Caprolactona; UDL: 11-undecanólida; DDL: 12-dodecanólida; β-BL: β-butilolactona; DLA: D-lactida; β-PL: β-poliilactona; γ-BL: γ-caprolactona; HDL: 16-hexadecanólida; γ-CL: γ-Caprolactona; LLA: L-lactida; γ-VL: γ-valerolactona; OL: 8-octanólida; δ-CL: δ-Caprolactona; PDL: 15-pentadecanólida; δ-DDL: δ-dodecalactona

3.2. Polimerización por Apertura de Anillo (PAA) catalizada por enzimas

El desarrollo de macromoléculas con una estructura y propiedades definidas, específicamente para materiales con aplicaciones biomédicas, ha resultado en la síntesis de diversos polímeros biodegradables con arquitecturas avanzadas. Entre ellos, poliésteres alifáticos y policarbonatos sintetizados mediante PAA de lactonas y lactidas debido a sus propiedades mecánicas, a que son susceptibles

a hidrolizarse y a su biocompatibilidad. Para lograr propiedades y arquitecturas controladas, la técnica de PAA para lactonas, lactidas y carbonatos cíclicos ha sido continuamente refinada. Muchas posibles combinaciones de iniciadores y catalizadores han sido evaluadas para lograr las propiedades y arquitecturas deseadas. PAA catalizada por enzimas es actualmente una de las herramientas más promisorias, debido a que evita el uso de catalizadores organometálicos dando un sentido de “química verde”.¹²

Un vasto número de enzimas catalizan reacciones metabólicas vía reacciones de biosíntesis en células vivas. Los polímeros naturales como son los polisacáridos, proteínas y poliésteres entre otros, son sintetizados de manera natural mediante enzimas. Aproximadamente 1×10^{12} toneladas de celulosa, almidón y biomateriales relacionados son generados en nuestro planeta cada año mediante procesos naturales.¹² El uso anual de polímeros sintéticos derivados del petróleo es de cuatro a cinco órdenes de magnitud menor que aquellos que tienen su origen en fuentes renovables. La necesidad de desarrollar procesos y productos ecológicamente benignos ha culminado en rutas alternativas para la generación de polímeros sintéticos nuevos y la catálisis enzimática *in-vitro* es una de las opciones más prometedoras. Hace más de 100 años, Emil Fisher propuso el mecanismo “llave-cerradura” para explicar la selectividad específica de cada sustrato y enzima, el cual en la actualidad es entendido como el reconocimiento molecular del sustrato por la enzima a través de interacciones supramoleculares. Si la reacción enzimática toma lugar *in-vivo*, el reconocimiento del sustrato por la enzima es siempre complicado. Esto se cumple también para reacciones enzimáticas *in-vitro*. Sin embargo, la relación enzima-sustrato no es tan estricta como el modelo “llave-cerradura”, las enzimas son dinámicas y muchas veces muy generosas en reconocer sustratos *in-vitro*. Esta situación permite a las enzimas catalizar la síntesis de no únicamente algunos polímeros naturales sino también de una amplia variedad de polímeros sintéticos.¹²

El uso de enzimas *in-vitro* para la síntesis de polímeros ha sido activamente explotado durante la última década. La polimerización enzimática es una polimerización *in-vitro* catalizada por una enzima aislada. Este enfoque fue encontrado como efectivo y de gran uso para la síntesis de celulosa y un camino para producir polímeros de origen natural con estructuras complicadas, que de otra manera serían muy difíciles de sintetizar. El punto clave para la polimerización enzimática recae en la combinación del monómero (sustrato) y de la enzima. La catálisis enzimática provee una nueva estrategia la síntesis de polímeros, los cuales presentan dificultades en los procesos convencionales mediante catálisis química. Esta nueva estrategia se ha expandido a la síntesis de polímeros biodegradables como poliésteres alifáticos, policarbonatos, polifosfatos, también para poliaromáticos y polivinilos. Estos polímeros biodegradables han sido usados para aplicaciones biomédicas tales como dispositivos ortopédicos, tejidos de ingeniería y dispositivos para la liberación controlada de fármacos. Todas estas aplicaciones biomédicas tienen que cumplir con requerimientos específicos como altos pesos moleculares, entre otros.¹²

3.3. Ventajas de la polimerización enzimática

La catálisis enzimática provee una nueva estrategia sintética para la producción de polímeros. La catálisis química empleada en la PAA utiliza catalizadores organometálicos basados en Zn, Al, Sn y Ge, los cuales son tóxicos. La presencia de este tipo de catalizadores para aplicaciones biomédicas representa una desventaja debido a que es difícil la remoción de los residuos catalíticos, los cuales llegarán a concentrarse en la matriz del material una vez que éste comience a degradarse. En contraposición, las enzimas son catalizadores naturales, por lo que son mejores candidatos para la PAA. Los beneficios de la polimerización enzimática se enumeran en las siguientes viñetas¹²:

- Las reacciones catalizadas por enzimas se llevan a cabo a condiciones moderadas de temperatura, presión y pH, y presentan una alta enantio- y regio-selectividad.

- Las enzimas son derivadas de fuentes renovables. Son materiales reciclables y ambientalmente benignos que pueden ser separados fácilmente de los polímeros sintetizados.
- Las enzimas pueden ser empleadas en masa, en medios orgánicos, acuosos y en diferentes interfases.
- Diversos polímeros, con estructuras bien definidas, pueden ser sintetizados a partir de procesos catalizados por enzimas.
- Las lipasas no requieren de la eliminación de agua y de aire cuando son usadas como catalizadores para la síntesis de poliésteres. Esto, en contraste con el uso de catalizadores organometálicos, ya que en este tipo de reacciones se debe excluir al agua y aire del sistema.
- Lactonas cíclicas pequeñas (de 4 a 7 miembros) polimerizan fácilmente con el uso de catalizadores organometálicos, sin embargo la polimerización de anillos mas grandes es lenta, obteniéndose productos con bajo peso molecular. Las enzimas han demostrado tener la capacidad de polimerizar dichos anillos bajo condiciones normales de polimerización.

3.3.1. Lipasas como catalizadores en PAA

Actualmente existe un incremento amplio en la investigación en el área de polimerizaciones catalizadas enzimáticamente. Muchas familias de enzimas pueden ser utilizadas para la transformación de no únicamente sustratos naturales, sino también de un amplio rango de compuestos sintéticos. Las lipasas, un miembro de la familia de las hidrolasas, son enzimas que pueden catalizar la hidrólisis de ésteres de ácidos grasos presentes normalmente en sistemas acuosos en seres vivos. Por otra parte, algunas lipasas son estables en disolventes orgánicos y pueden ser usadas como catalizadores para reacciones de esterificación y transesterificación. Estos catalizadores tan específicos, promueven la producción de poliésteres y policarbonatos mediante diferentes tipos reacciones de polimerización. Las lipasas catalizan la PAA de lactonas

(ciclos de pocos o muchos miembros), de lactidas y de carbonatos cíclicos para producir poliésteres alifáticos o policarbonatos. El potencial de algunas lipasas comerciales como catalizadores se debe en gran parte al hecho, en contraste con otro tipo de enzimas, de que aceptan un gran número de sustratos, que son particularmente estables en medios orgánicos, y debido a esto, dependiendo del disolvente usado en el sistema, pueden ser usadas para reacciones de hidrólisis o para la síntesis de ésteres y poliésteres.¹²

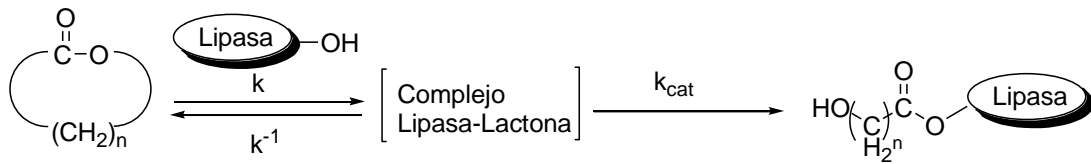
3.3.1.1. Lactidas

Huijser y colaboradores⁶ realizaron la PAA enzimática de DLLA, LLA y GA usando Lipasa PS a 130 °C durante 2 días; reportando un copolímero con M_w (peso molecular número promedio) de 20,600 g/mol cuando LLA fue copolimerizada con glicólido; mientras que la copolimerización de DLLA con GA resultó en un polímero con M_w de 13,500 g/mol.

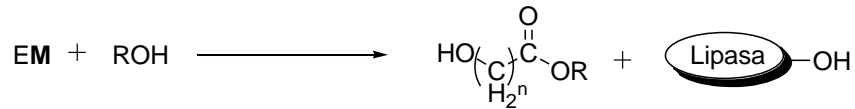
3.3.1.1.1. Mecanismo de PAA catalizado por lipasas

El mecanismo generalmente aceptado para la PAA de monómeros lactónicos se muestra en la Figura 3. El sitio catalítico es un residuo de serina y las reacciones se llevan a cabo mediante un intermediario acil-enzima (monómero activado por la enzima). La polimerización enzimática por PAA tiene pasos de iniciación y de propagación. El paso determinante es la reacción del éster cíclico con la lipasa, ya que implica la apertura del anillo para dar el intermediario acil-enzima. La iniciación es un ataque nucleofílico del agua contenida parcialmente en la enzima, sobre el carbono acilo del intermediario para producir un ácido ω -hidroxicarboxílico, que es una especie de propagación corta. Otros nucleófilos como alcoholes o aminas pueden participar en esta reacción. Durante la propagación, el intermediario sufre un ataque nucleofílico del grupo terminal hidroxilo de una cadena polimérica que se está propagando, o bien una forma ácido ω -hidroxicarboxílico, para producir unidades de cadena mas largas (mecanismo de activación del monómero).¹⁴

ACILACION DE LA ENZIMA



INICIACION



PROPAGACION

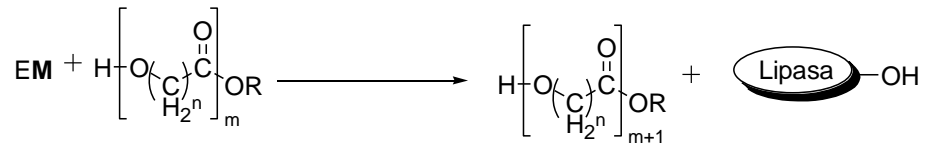


Figura 3. Mecanismo de PAA catalizada por Lipasa PS.

3.4. Extracción con CO₂ supercrítico

La extracción con CO₂ supercrítico representa un método alternativo para reemplazar procesos tradicionales de extracción empleado disolventes orgánicos. El CO₂ es una sustancia económica, no tóxica comparada con disolventes orgánicos, inflamable, el cual se puede remover fácilmente debido a su alta volatilidad y que posee una interpenetración alta con matrices sólidas.¹⁵

El CO₂ es considerado una vía alternativa para evitar el uso de disolventes tradicionales debido a sus prácticas propiedades físicas y químicas¹⁶:

- Es un disolvente para los monómeros y un no solvente para los polímeros, lo que permite una separación fácil. Algunos polímeros son solubles en gases supercríticos en una medida muy limitada a menos que presiones muy altas sean aplicadas.
- Es una fuente sustentable en el ciclo del carbono.

- El uso del CO₂ como medio de extracción contribuye a disminuir el agotamiento de los combustibles fósiles.

3.5. Sistemas de liberación de fármacos

El interés en los sistemas de liberación de fármacos se debe a los problemas en la liberación de las dosis. Mucho de los métodos actualmente usados para la liberación de compuestos bioactivos requieren que las dosis sean frecuentes y repetitivas. La curva de concentración del nivel de fármaco en el plasma de la sangre en función del tiempo se caracteriza por un periodo inicial de incremento en la concentración, determinado por la velocidad a la cual el agente activo está disponible para el sistema, seguido por un periodo de decrecimiento en la concentración, determinado por la velocidad en la cual el agente activo ya no está disponible, esto provocado por el metabolismo, la degradación o simplemente por el transporte del fármaco fuera del área de interés. Los problemas surgen cuando niveles mínimos efectivos y/o niveles máximos seguros existen. En este caso cualquier porción por arriba o por debajo de la curva de concentración fármaco-plasma representa un desperdicio del material y lo más importante es que las concentraciones de fármaco por debajo del nivel efectivo y/o por arriba del nivel tóxico representan altos riesgos para la salud. Debido a estos problemas, enfoques diferentes para disminuir la velocidad de liberación fueron desarrollados. Estas formas de “liberación prolongada” fueron popularizadas en forma de cápsulas, administradas por vía oral; las técnicas usadas para frenar la velocidad de liberación del fármaco incluyen en uso de recubrimientos de celulosa y otros materiales, el uso de tabletas comprimidas, el uso de emulsiones y suspensiones. Sin embargo, la cantidad de fármaco liberado está fuertemente influenciada por las variaciones entre paciente y paciente, y otros efectos ambientales, por lo que la administración repetida es necesaria.

En la década de los 50's comenzó el desarrollo tecnológico de la incorporación de fármacos en polímeros sólidos, los cuales se limitaron a productos para uso animal. A mediados de los 60's estos desarrollos se extendieron a la medicina

también. En sus inicios, los fármacos eran colocados dentro de tubos de silicón o a lo largo de matrices de polietileno. En los 70's, las investigaciones se centraron en desarrollar polímeros sólidos capaces de soportar la liberación continua de fármacos de alto peso molecular (mayor a 600 Dalton), siendo los mas exitosos copolímeros de vinilacetato y diferentes hidrogeles.

En décadas recientes, los sistemas de liberación polímero-fármaco han tenido gran éxito debido a que los fármacos pueden ser continuamente liberados por periodos muy largos de tiempo (mayores a un año para algunos casos) y a que las variaciones entre paciente y paciente han sido disminuidas porque el paso limitante para la liberación del fármaco es su remoción del polímero.

3.5.1. Clasificación de sistemas poliméricos de liberación de fármacos

Una clasificación útil de los sistemas poliméricos de liberación de fármacos basada en el mecanismo de control de la liberación de la droga incorporada, se muestra a continuación:

- a) Sistemas de difusión controlada: Se divide en reservorios y matrices. Los reservorios son dispositivos formados por una membrana que rodea al fármaco, mientras que las matrices son sistemas monolíticos. El paso limitante en el proceso de liberación es por mera difusión del fármaco de acuerdo a la Ley de Fick.
- b) Sistemas químicamente controlados: En los cuales se lleva a cabo una reacción química interfacial entre el polímero y el medio de disolución.
- c) Sistemas de hinchamiento controlado: En los cuales se presenta difusión en contracorriente o una constante velocidad de penetración del medio de disolución hacia el polímero.
- d) Sistemas controlados magnéticamente: En los cuales controles externos son responsables de la liberación.

3.6. PLGA en sistemas de liberación controlada de fármacos

PLGAs son polímeros biocompatibles que se degradan a productos no tóxicos como lo son el ácido glicólico y el ácido láctico. Sistemas de liberación controlada de fármacos (LCF) a base de PLGA han sido ampliamente investigados durante las últimas décadas. Muchos factores influyen en la liberación y en la degradación de las matrices de PLGA; estos factores incluyen la composición del polímero, el peso molecular, la interacción del polímero con el fármaco y las propiedades del fármaco.¹⁷

3.6.1. Azul de Metelino como “compuesto modelo” de un fármaco

El azul de metileno es un colorante catiónico hidrofílico que ha sido utilizado en aplicaciones medicinales tradicionales, debido a sus propiedades antisépticas. En los últimos años, ha sido estudiado como un sistema modelo para LCF. Para estos estudios se emplean compuestos modelos en vez de los fármacos, debido a la toxicidad que representa el manejo de dichas sustancias y a los altos costos de los ensayos.¹⁸

3.6.2. Compuestos modelos en matrices de PDLGA.

Matrices a base de PDLGA pueden ser preparadas por diferentes métodos como evaporación o extracción del disolvente de la emulsión, deposición interfacial, secado por aspersion y el método de fundido.

El método de fundido cuenta con dos ventajas: evita el uso de disolventes orgánicos clorados, por lo que elimina todos los problemas relacionados con la toxicidad de los disolventes y las micromatrices preparadas son más homogéneas en tamaño, y con menos variabilidad entre lotes, que los obtenidos por los métodos inicialmente mencionados; los cuales requieren el uso de disolventes orgánicos, como el cloruro de metileno, cloroformo, acetonitrilo y tetrahidrofurano. Los procedimientos consisten en la disolución del polímero en un disolvente volátil y fármaco que se desea incorporar puede ser disuelto o

suspendido en la misma solución, la mezcla resultante se emulsiona en una fase acuosa que no solubiliza al polímero y contiene un emulsificante. Luego, el solvente se evapora o es extraído. Todas las técnicas de preparación de micromatrices se pueden considerar como una modificación del método de evaporación del disolvente en la emulsión.^{3, 4}

4. Metodología.

4.1. Materiales.

DLLA (Sigma Aldrich) fue disuelta en metanol (Química Barsa, grado analítico), recristalizado y secado en una bomba de vacío (30 mmHg) previo a su uso. GA (Sigma Aldrich) se empleo tal y como se obtuvo. Lipasa PS (Burkholderia cepacia de Amano Enzymes, Japón) fue comprada a Sigma Aldrich. Tanque de dióxido de carbono grado reactivo fue suministrado por Infra S. A. de C. V.

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

4.2. Copolimerización en masa catalizada por Lipasa PS.

Diferentes relaciones en peso de DLA y GA (masa total de la reacción 4 g) junto con Lipasa PS al 8% en peso (0.32 g) se hicieron reaccionar en un matraz bola abierto de 10 mL con agitación constante por acción de un núcleo magnético, dentro de un baño de calentamiento de aceite a diferentes temperaturas y tiempos de reacción.⁶ Donde se indique, la adición de la lipasa fue fraccionada a diferentes intervalos de tiempo. Todas las reacciones se hicieron por duplicado y con controles (sin enzima presente en la reacción). El tiempo final para cada reacción se estableció como el tiempo en que se solidificó el medio de reacción (la barra de agitación se detuvo). Las reacciones control se detuvieron de acuerdo al tiempo máximo que alcanzó la reacción con lipasa. La mezcla sólida resultado de la reacción de copolimerización en masa fue disuelta en cloroformo frío aproximadamente a 5 °C y el polímero se precipitó en metanol frío a 5 °C en una relación de 1:10vol. cloroformo:metanol. Posteriormente se filtró a vacío empleando membranas de filtración de nylon de 0.45 µm de tamaño de poro (Millipore). El polímero fue obtenido como un polvo amarillento (por la presencia de la enzima), fue secado en una bomba de vacío (30 mmHg) durante 2 horas. El rendimiento de la reacción (en peso) se determinó por diferencia de pesos entre la masa total de monómeros y el peso del polímero obtenido.

4.3. Actividad Enzimática

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

Para la construcción de la curva patrón, se prepararon diferentes soluciones de p-nitrofenol en acetonitrilo a concentraciones de 0, 10, 20, 40, 80 y 100 mM en matraces aforados de 10 mL con solución tampón de fosfatos (50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7.0) y 0.2% de emulsificante (Triton X-100). La intensidad

de la absorbancia del p-nitrofenol contenido en las muestras se midió con un espectrómetro de UV-Visible (Perkin Elmer Lambda 2S) a 410 nm. La determinación de la actividad enzimática se realizó a muestras de enzima empleadas después de reacciones a 130 y a 90 °C, y a enzima nueva.

1.9 mL de una solución de buffer de fosfatos (50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7.0) con 0.2% de emulsificante (Triton X-100) fueron adicionados a una celda de vidrio de UV-Visible junto con 100 μ L de una solución de p-nitrofenil acetato en acetonitrilo (100 μ M). La solución de p-nitrofenil acetato en acetonitrilo fue adicionada uniformemente a la celda de UV-Visible. La absorbancia fue determinada a 410 nm en el espectrofotómetro, a temperatura ambiente. Para evaluar la actividad hidrolítica inicial, cuando la actividad enzimática tiene un comportamiento lineal respecto al producto formado y el tiempo, la absorbancia fue medida a un intervalo inicial de 0 a 2 minutos, con puntos intermedios. Posteriormente la señal de absorbancia fue convertida a unidades de concentración de producto formado (mM) contra tiempo de reacción (min) en base a la curva de calibración de p-nitrofenol en buffer de fosfatos con emulsificante.¹⁹

4.4. Síntesis a escala mayor

De acuerdo a los resultados de copolimerización en masa catalizada por Lipasa PS, la experimentación con las variables del sistema (temperatura, porcentaje en peso de la lipasa y relación de monómeros) y la caracterización de los productos obtenidos, los mejores resultados se obtuvieron a una relación de 1:1 (peso) de monómeros, por lo que la síntesis a una escala mayor se realizó con una masa total de 20g a 90 °C y con 20% de Lipasa PS (4 g). La reacción anterior se llevó a cabo junto con su control (sin enzima presente).

4.5. Purificación con CO₂ supercrítico

Los PDLGAs obtenidos de la síntesis anterior se purificaron mediante CO_2 . La extracción con CO_2 supercrítico se llevó a cabo a $70\text{ }^\circ\text{C}$ y 400 bar en un reactor de alta presión de acero inoxidable con una capacidad de 0.5 L (Supercritical Fluid Technology, Modelo: SFT-250 SFE/SFR, Newark, DE, USA). El reactor es un reactor enchaquetado y la temperatura es monitoreada mediante dos termopares independientes, localizados en el interior del reactor y en la chaqueta de calentamiento. La temperatura de operación y la presión de operación para la extracción de los monómeros remanentes en la matriz polimérica fueron fijadas en el panel de control de la unidad de extracción. La temperatura de la válvula de restricción exterior fue fijada a $90\text{ }^\circ\text{C}$, para evitar la solidificación de los compuestos extraídos al momento de la despresurización del sistema. El CO_2 procedente del tanque de almacenamiento fue licuado mediante enfriamiento empleando un recirculador (Julabo EC12, USA) y posteriormente bombeado dentro del reactor. La Figura 4 muestra el diseño del equipo de extracción.

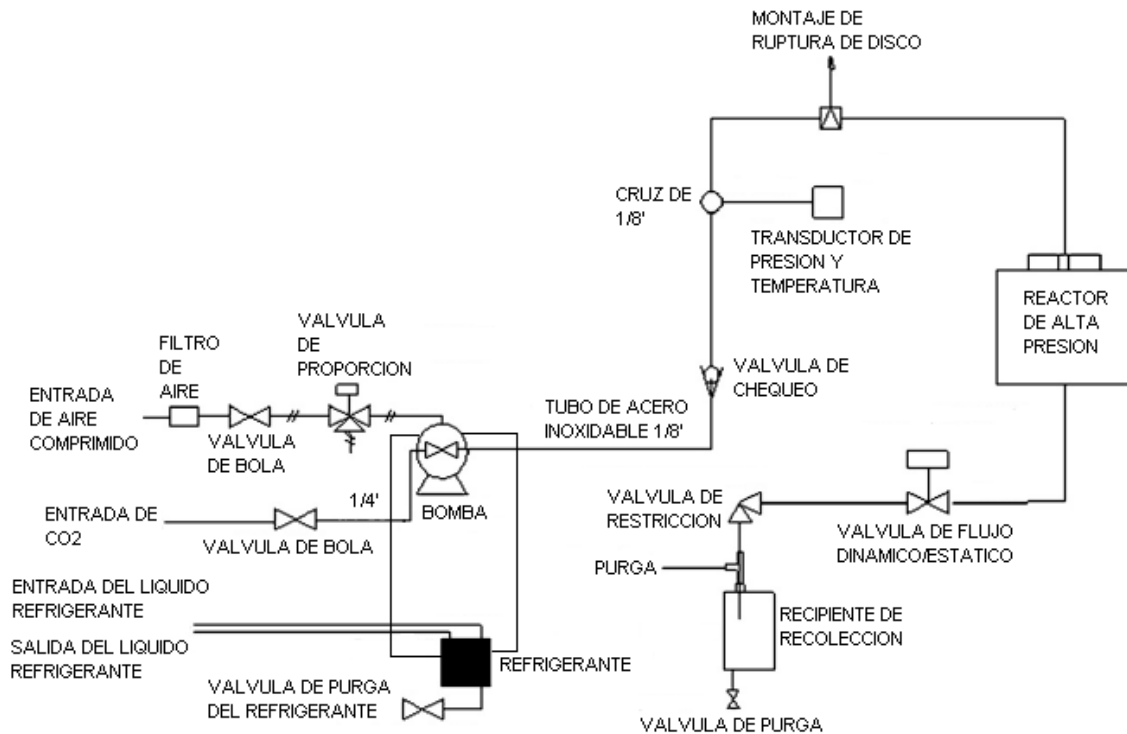


Figura 4. Diseño del equipo de extracción de CO_2 supercrítico.

Las muestras obtenidas del escalamiento fueron pulverizadas para obtener una mejor superficie de contacto entre el CO_2 y el polímero, y colocadas dentro de

cartuchos Soxhlet para posteriormente ser introducidas dentro del reactor de alta presión. La extracción se llevó a cabo por lotes y por procesos continuos. El tiempo de extracción fue fijado hasta no obtener más producto después de la extracción. En el proceso por lotes, el CO₂ fue cargado dentro del reactor por 2h con la finalidad de tener un tiempo de residencia considerable para la disolución de las sustancias solubles en el solvente supercrítico. Inmediatamente después de la extracción por lotes, le siguió la extracción continua; en la cual un flujo constante de 1.375 lb/h de CO₂ fue alimentado al reactor. La velocidad de flujo de CO₂ alimentado fue estimada monitoreando la diferencia de peso del cilindro después de una hora de extracción con la válvula de restricción ajustada a un flujo de salida constante de CO₂. Después de la extracción por lotes (2 h) y de la extracción continua (1 h), el sistema fue purgado en su totalidad y las sustancias extraídas fueron recolectadas en un recipiente exterior de recolección de sólidos.

4.6. Caracterización de productos

4.6.1. Determinación de pesos moleculares y distribución de pesos moleculares mediante Cromatografía de Permeación en Gel y de Exclusión de Tamaño

Las distribuciones de pesos moleculares fueron determinadas por cromatografía de permeación en gel y de exclusión de tamaño mediante un sistema formado por una bomba isocrática (HPLC Hewlett Packard HP1050S, USA), un automuestreador (HP1100S, USA) y un detector de dispersión de luz (Polymer Labs, PL-1000, USA), empleando 2 columnas en serie PLGEL 10 cm MIXED-B 300 x 7.5 mm (1106-6100 LS, Varian, USA) montadas en un termostato a 25 °C (1200-G1316, Agilent, USA).

Las condiciones de operación del detector de dispersión de luz fueron fijadas a una temperatura de evaporación (T_{ev}) de 80 °C, la temperatura del nebulizador (T_{neb}) se fijó a 40 °C y un flujo de gas acarreador (nitrógeno) de 1.0 mL/min. La fase móvil fue Tetrahidrofurano (THF), a la temperatura del termostato y a una

velocidad de flujo de 1 mL/min. Se escogió este eluyente como fase móvil, ya que en diferentes pruebas de solubilidad mostró ser en disolvente adecuado debido a que en él, mayor muestra de polímero era disuelta.

La concentración de las muestras fue de máximo 5 mg de polímero en 2 mL de THF y los volúmenes de inyección de 10 μ L. Todas las soluciones fueron filtradas a través de filtros de 0.22 μ m de tamaño de poro previamente al análisis. Las distribuciones de pesos moleculares fueron comparadas contra estándares calibrados de poliestireno, en un rango de 2,900 a 591,000 g/mol con una polidispersidad de 1 a 1.23 (Varian, USA).

4.6.2. Determinación de la composición mediante ^1H -RMN

La espectroscopía de ^1H -RMN se usó para obtener la relación de unidades de repetición lactilo/glicolilo en las muestras, en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear (Varian Unity Inova, modelo VNMRS y MR a 400 MHz). Los desplazamientos químicos en partes por millón (ppm) para los espectros ^1H -RMN fueron relacionadas con respecto al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Para obtener los espectros de ^1H -RMN, las muestras (50mg) fueron disueltas en cloroformo deuterado (CDCl_3) y ácido trifluoroacético deuterado (CF_3COOD) en una relación 3:1vol. hasta un volumen de 0.8 mL. Los monómeros DLLA y GA son homólogos, por lo que el grupo metilo (CH_3 -) presente en DLLA fue tomado como punto de referencia para el análisis.²⁰

4.6.3. Análisis de Termogravimétrico y Calorimetría Diferencial de Barrido

Las pruebas de análisis termogravimétrico y calorimetría diferencia de barrido fueron realizadas en un calorímetro Mettler Toledo (Modelo 821 $^\circ$). Aproximadamente 1 mg de muestra fue encapsulada en un plato de aluminio de 40 μ L. La velocidad de calentamiento de la muestra fue de 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$, en un rango de 20 a 300 $^\circ\text{C}$, bajo atmósfera de nitrógeno. La estabilidad térmica de las muestras fue evaluada por análisis termogravimétrico empleando un equipo TG

Mettler Toledo (modelo TGA/SDTA851^e). La velocidad de calentamiento de la muestra fue de 10 °C/min, en un rango de 25 a 300 °C, bajo atmósfera de nitrógeno. Los termogramas se obtuvieron y se analizaron empleando el programa STAR^e versión 8.1.

4.6.4. Determinación de cristalinidad mediante Rayos X en polvo

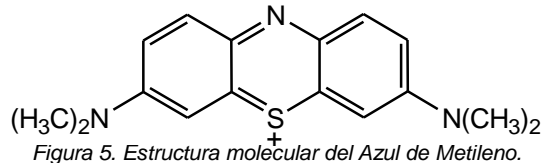
La difracción de Rayos X de las muestras en polvo fueron llevadas a cabo mediante un difractómetro Siemens (Modelo D5000) compuesto por una fuente $K\alpha$ de cobre ($\lambda=1.5406 \text{ \AA}$). La cristalinidad de las muestras expresada en porcentaje fue determinada mediante la relación de áreas cristalinas y total.

4.7. Liberación controlada del pigmento

4.7.1. Preparación del polímero con pigmento

El azul de metileno (Hartman Eddon Company), (Figura 5) y PDLGA fueron pulverizados. Los polvos se mezclaron en una proporción de 1:100 (peso), respectivamente. El PDLGA y el pigmento fueron fundidos a una temperatura superior al punto de fusión del polímero, durante 5 minutos bajo agitación manual continua. La masa fundida fue enfriada rápidamente a 20 °C. 0.1 g de la mezcla fría fueron añadidos a 20 mL de una solución tampón de fosfatos K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7.4, K_2HPO_4 (Mallinckrodt) y KH_2PO_4 (EMD Chemicals) con 0.05% de Triton X-100 o Tween 20 (Sigma). Esta solución fue calentada previamente a 80 °C por un baño de agua. La emulsificación del PDLGA fundido con el pigmento y la solución tampón con emulsificante, se llevó a cabo por un mezclador de laboratorio a 200 y 2000 rpm durante 2 min. Posterior a esto, las partículas se aislaron por centrifugación; la emulsión caliente fue colocada en 100 mL de agua con hielo. Después de 15 minutos, la suspensión fue centrifugada durante 10 minutos a 1550 rpm. Las micropartículas fueron filtradas

y lavadas con una solución tampón de fosfatos (pH 7.4) sin tensoactivo. Las partículas secas fueron almacenadas a temperatura ambiente hasta su uso. Este procedimiento se realizó para el polímero enzimático y el control, y fue repetido para los diferentes lotes empleados.^{21, 22}



4.7.2. Efecto en la intensidad de señal de la concentración de Azul de Metileno en la curva de calibración de espectroscopia de fluorescencia

La curva de calibración estándar fue preparada agregando 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mL de una solución patrón de Azul de Metileno (AZ) (12500 nM) en matraces aforados de 10 mL. Las soluciones resultantes tienen una concentración de pigmento de 0, 250, 500, 750, 1,000 y 1,250 nM. Cada una de las soluciones en los matraces aforados fue diluida a 10 mL con solución tampón de fosfatos (pH 7.4). La intensidad de la fluorescencia del pigmento contenido en las muestras se midió con un espectrómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse, en un rango de 630-690 nm, con longitud de onda de excitación a 630 nm y de emisión a 680 nm. La señal del pigmento fue determinada a las diferentes longitudes de onda hasta establecer linealidad entre la intensidad de la fluorescencia y la concentración del pigmento. Todos los ensayos de fluorescencia se realizaron por triplicado.¹⁸

4.7.3. Determinación de la cantidad de Azul de Metileno liberado del polímero

Para los experimentos de liberación *in vitro*, 0.1 g de partículas de PDLGA cargadas con azul de metileno se colocaron en 20 mL de solución tampón de fosfatos (pH 7.4) en un baño de calentamiento a 37 ± 1 °C con agitación continua. 1 mL de la muestra fue retirado a los 30 minutos, 1 h, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 30, 36, 48 y 72 horas, respectivamente. El volumen retirado fue sustituido por el mismo volumen de solución fresca. La cantidad acumulada de pigmento en la solución tampón fue detectada con espectroscopia de fluorescencia a 690 nm. Los datos reportados son los valores medios de tres experimentos independientes para el polímero enzimático y no enzimático.

4.7.4. Caracterización del polímero que contiene Azul de Metileno

La morfología de las partículas de PDLGA fue observada por microscopía electrónica de barrido (Hitachi S-800 Turbo FE-SEM) a 25 kV.

4.7.5. Eficiencia de encapsulación

El porcentaje de azul de metileno cargado en las partículas de PDLGA se calculó dividiendo la cantidad total del pigmentos liberado en el medio (solución tampón) entre la cantidad de las partículas (en masa) colocadas al inicio del experimento.

4.7.6. Efecto del surfactante, concentración del surfactante y tiempo de emulsificación en la preparación del polímero con pigmento

Las mediciones espectroscópicas de concentración crítica micelar (CCM) se realizaron en un espectrofotómetro de UV visible HP 8452A de arreglo de diodos con software HP 89532A. Los experimentos se llevaron a cabo mediante la

preparación de soluciones a diferentes concentraciones de surfactante (Tabla 4) en un rango de 0.0002-0.006M a partir de una solución patrón de tensoactivo (0.02 M), diluyendo un volumen de 0.5 mL de solución patrón de azul de metileno (80 μ M). Los solutos se disolvieron en una solución tampón de fosfatos (pH 7.4) a un volumen final de 10 mL. El rango de concentraciones para cada tensoactivo se varió con el fin de obtener los suficientes puntos antes y después del cambio de pendiente en las gráficas de la concentración del surfactante contra absorbancia. Todos los espectros se registraron por triplicado. Dos surfactante diferentes se utilizaron para la emulsificación durante el proceso de preparación de las matrices, Tween 20 (Sigma) y Triton X-100 (Figura 6), a tres diferentes velocidades de emulsificación (2, 10, 15 min) y a una concentración por encima de la CCM.²³

Tabla 4. Concentración de surfactante

<i>Triton X-100 (M)</i>	<i>Tween 20(M)</i>
0.0003	0.0002
0.0004	0.0003
0.0005	0.0005
0.0006	0.0010
0.0007	0.0020
0.0008	0.0030
0.0009	0.0040
0.0010	

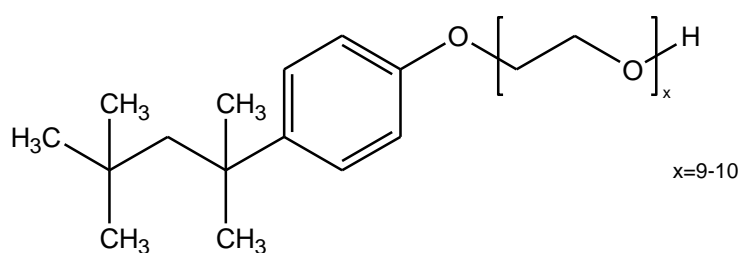
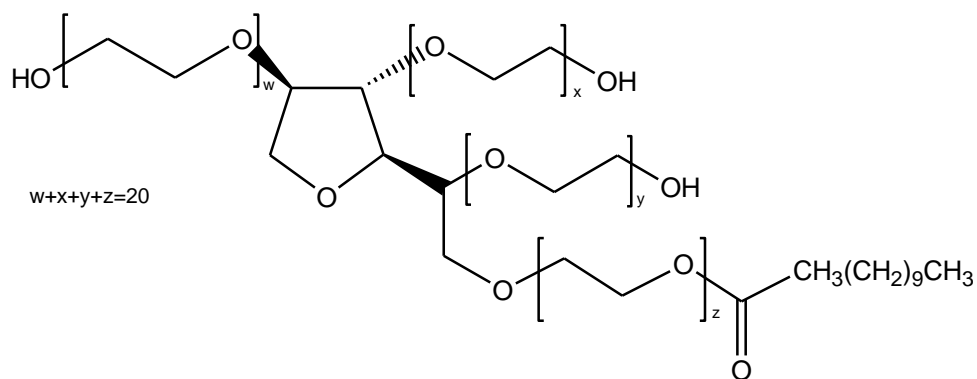


Figura 6. (A) Tween 20. (B) Triton X-100.

5. Resultados

5.1. Copolimerización en masa catalizada por Lipasa PS

Los experimentos iniciales se basaron en mezclas de diferentes relaciones porcentuales en peso (50/50, 65/35 y 85/15) de DLLA y GA con un peso total de monómeros de 4 g a las que se adicionaron Lipasa PS al 8% en peso (0.32 g) con respecto a los monómeros. Las reacciones tuvieron lugar a 130 °C.⁶ El tiempo máximo de reacción para la condición de 50/50 se estableció como el

tiempo en el que la barra de agitación colocada en la mezcla, se detuvo debido al incremento de viscosidad del medio; este fenómeno físico se debió a la solidificación del medio de reacción. Para las dos relaciones de alimentación restantes, este efecto no se observó y las reacciones se llevaron a tiempos máximos de 7 días. Los experimentos control o blanco se llevaron a cabo a las mismas condiciones pero sin la presencia de la enzima. En la Figura 7, se esquematizan los resultados de rendimiento obtenidos para las tres relaciones de alimentación. Para la reacción 50/50, se obtuvo el mayor rendimiento con un máximo de 45% en 36 h. La reacción 65/35 tuvo un rendimiento del 30% alcanzado al tercer día, rendimiento que presentó un comportamiento asintótico hasta el séptimo día. Para el caso de la reacción 85/15, el rendimiento máximo obtenido fue del 3% al séptimo día. Por otra parte, para las reacciones control se obtuvieron rendimientos máximos menores, del 35% y del 34% para las relaciones de alimentación de 50/50 y 65/35, respectivamente. Para el control con una relación de alimentación del 85/15, el rendimiento máximo obtenido fue de tan solo 1%. Los resultados experimentales indican claramente que los rendimientos obtenidos muestran mayores valores para las reacciones en las cuales la Lipasa PS estuvo presente.

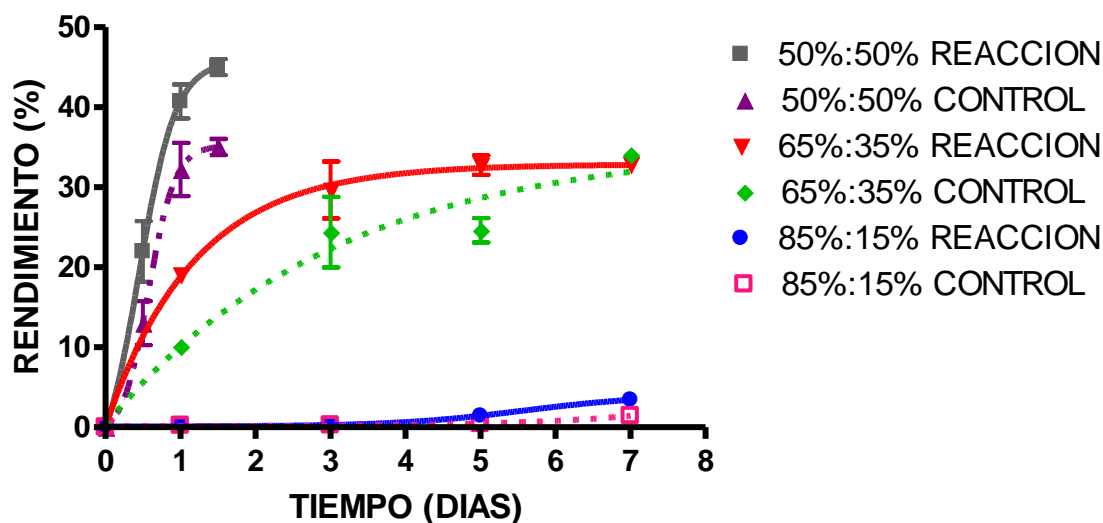


Figura 7. Rendimiento de la reacción de copolimerización de DLLA y GA para las diferentes relaciones de alimentación a 130 °C.

Posteriormente y con el fin de elevar el rendimiento, se estudió el efecto de la temperatura y cantidad de enzima presente en la reacción. Se realizaron pruebas a la mínima temperatura en la cual funde la mezcla de monómeros iniciales, con diferentes cantidades de enzima presente, desde 8 hasta un 20% en peso. Por los resultados obtenidos anteriormente y mostrados en la Figura 7, sólo se trabajó con dos relaciones de alimentación de monómeros: 50:50, 65:35. La Tabla 5 muestra los resultados del estudio de las variables mencionadas, los tiempos mostrados son los tiempos máximos de reacción, en los cuales el medio de reacción se solidificó.

Tabla 5.
Copolimerización en masa variando el porcentaje en peso de Lipasa PS

Relación DLLA/GA	T (°C)	% peso de enzima	t (h)	Rendimiento (%)
50:50	90	8	72	51
50:50	90	14	48	51
50:50	90	20	24	58
65:35	110	8	168	35
65:35	110	14	48	49
65:35	110	20	48	43

Las variaciones de temperatura y porcentaje de enzima permitieron incrementar el rendimiento, esto puede ser atribuido a las extremas condiciones de temperatura a las cuales la lipasa fue sometida en los experimentos previos. Aunque esta misma reacción a 130 °C fue reportada con buenos resultados para la Lipasa PS,⁶ dicha temperatura se encuentra 80 °C por encima de la temperatura óptima reportada para la Lipasa PS,²⁴ lo que pudo haber inducido la desactivación térmica de la enzima. El mayor rendimiento (58.42%) se obtuvo con una relación DLLA/GA del 50/50, a una temperatura de reacción de 90 °C y 20% en peso de enzima. Con la finalidad de evaluar el efecto de la alimentación de la enzima a la reacción, fracciones de 4% en peso de enzima fueron adicionadas a la reacción en intervalos de 12 h y hasta completar un total de 20% en peso. Por los resultados mostrados en la Tabla 5, sólo se trabajó con la relación de alimentación de la cual se obtuvieron los mejores resultados (DLLA/GA: 50/50, T=90 °C y 20% en peso de enzima). Sin embargo, los resultados de este experimento (Tabla 6) no muestran ninguna mejora en el rendimiento.

Tabla 6.
Copolimerización enzimática a 90 °C con 50/50 DLLA/GA adicionando 4% en peso de lipasa en intervalos de 12h

Tiempo de adición de Enzima (h)	Fracción total (%)	Rendimiento (%)
12	4	30
24	8	24
36	12	33
48	16	48
72	20	55

En el mecanismo de copolimerización enzimática entre DLLA y GA, y de forma general en la PAA enzimática de lactonas, interviene el agua, la cual es necesaria para asegurar la conformación tridimensional de la enzima y por ende su actividad. Las moléculas de agua favorecen la hidrólisis inicial de los monómeros cíclicos y regeneran a la enzima libre en cada paso de condensación o liberación de formas no cíclicas. Por otro lado, en la formación

de productos por condensación, entre grupos alcohol terminales de las cadenas de copolímero e intermediarios enzima-sustratos, se liberan moléculas de agua. Es comúnmente aceptado que cada una de estas etapas se encuentran en equilibrio, a excepción de la primera etapa de hidrólisis de la forma cíclica, donde algunos autores apuntan a que pueda ser reversible, sin embargo, el agotamiento de los monómeros en la mayoría de reportes de este tipo de reacciones, indica lo contrario.⁹ Debido a lo anterior, se puede generalizar que este tipo de reacciones de equilibrio son dinámicas en cuanto a la participación de moléculas de agua.²⁵ Las reacciones de esterificación o poliesterificación enzimática con lipasas se realizan en medios de reacción no acuosos y altamente hidrofóbicos para evitar, por un lado la hidrólisis de los grupos éster que se pudieran formar, y por otro lado, la desnaturalización de la enzima por arrastre de las moléculas de agua del sitio catalítico, lo que en inglés se conoce como efecto “stripping”. Por ejemplo, los solventes más usados en PAA enzimática de lactonas son hexano o tolueno. En aquellas en que se requieren disolventes más hidrofílicos como dioxano o acetonitrilo, pequeños porcentajes de agua deben ser adicionados para mantener una correcta hidratación del sitio catalítico de la proteína. La imposibilidad de encontrar un disolvente hidrofóbico para estos monómeros es una limitante para evaluar efectivamente la pérdida o no de actividad catalítica en este medio. Resultados experimentales anteriores en el grupo de trabajo, mostraron que el uso de disolventes convencionales de estos monómeros en estudio, como puede ser acetonitrilo, dimetilsulfóxido o cloroformo no dieron polimerización, incluso con la adición de porcentajes volumétricos de agua al medio.

Sin embargo, en el presente estudio fue de interés llevar a cabo un experimento exploratorio con enzima liofilizada previamente, debido a que el medio de reacción en masa en este caso es relativamente hidrofílico, para estudiar este efecto del agua en nuestra reacción. Se realizó un experimento en donde la enzima fue sometida a alto vacío (4×10^{-4} mbar), a fin de eliminar la mayor cantidad de agua inicial de ésta. La Tabla 7 muestra las condiciones a las cuales

se llevó a cabo dicha reacción y tal y como se observa no hubo incremento en el rendimiento con respecto a la misma reacción sin el secado a vacío.

Tabla 7.
Copolimerización enzimática aplicando vacío al medio de reacción

Relación DLLA/GA	T (°C)	% enzima	t (h)	Rendimiento (%)
50/50	90	8	72	41

Esto se puede explicar debido a que el agua presente en el sitio catalítico de la enzima, que es donde se lleva a cabo las subsiguientes policondensaciones, está fuertemente enlazada por puentes de hidrógeno inertes al vacío aplicado. Esas moléculas de agua son suficientes para el requerimiento de la acción catalítica de la proteína y todo parece indicar que el efecto “stripping” mencionado del sitio catalítico de la lipasa en estudio está restringido en este medio de reacción.

5.2. Actividad Enzimática

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

La Figura 8 muestra la curva de calibración empleada para determinar la concentración de p-nitrofenol procedente de la reacción de hidrólisis del p-nitrofenil acetato.

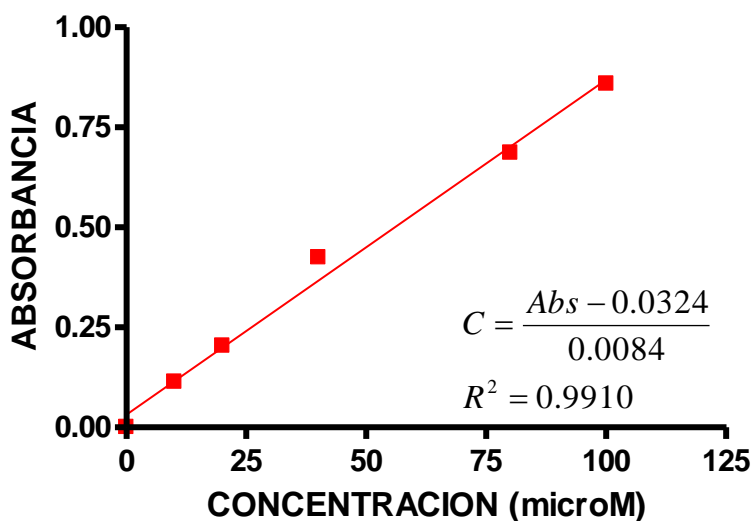


Figura 8. Curva de calibración de UV-Visible para p-nitrofenol.

Empleando diferentes muestras de la lipasa (Tabla 8), la señal de absorbancia producida por el p-nitrofenol formado fue convertida a unidades de actividad (U, $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$) mediante la curva de calibración.

Se puede observar en los resultados que la actividad enzimática coincide con la obtenida por Futurani et al¹⁹ para el mismo método; sin embargo esta actividad no pudo ser directamente comparada con la reportada por el fabricante²⁴ ya que la medición de actividad fue calculada por otro método.

Por otro lado, la actividad de la enzima después de la reacción de copolimerización a 130 °C, disminuyó aproximadamente 7 veces respecto a la muestra de enzima en uso, lo que comprueba que la enzima fue sometida a condiciones extremas de reacción e inequívocamente se demuestra inactivación térmica parcial a las condiciones de 130 °C. Por el contrario, la enzima sometida a una temperatura de reacción 90 °C, muestra que su actividad residual es aproximadamente el doble que la encontrada después de la reacción a 130 °C.

Tabla 8. Actividad enzimática

Lipasa PS	Actividad ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$)
En uso	1556.13
Furutani et al ¹⁹	2182
Después de la reacción a 130 °C ^a	230.45
Después de la reacción a 90 °C ^b	517.03

a y b: lipasas empleadas en un reacción durante 72 horas

5.3. Síntesis a escala mayor y purificación de los productos con CO₂ supercrítico

Para el escalamiento, la reacción de copolimerización en masa catalizada por Lipasa PS se llevó a cabo a una relación porcentual de 50:50 en peso de monómeros DLLA (10 g) / GA (10 g), a 90 °C y con 20% (4 g) de Lipasa PS. La reacción anterior se llevó a cabo junto con su control.

Después de la purificación de las muestras escaladas por CO₂sc, usando el reactor-extractor de alta presión descrito en la sección experimental, el rendimiento obtenido para la reacción y su control fue del 86% y 69%, respectivamente. La reacción con biocatalizador bloqueó el movimiento de la barra magnética 18 horas después de su inicio, mientras que su control lo hizo después de 36 h. Estos valores de rendimiento son mayores a los obtenidos por purificación con disolventes orgánicos, debido a que con la capacidad solvatante y polaridad del CO₂sc es posible remover únicamente los monómeros o productos de bajo peso molecular, a diferencia de la purificación por precipitación con disolventes orgánicos cloroformo (solvente) / metanol (antisolvente) donde oligómeros de diferente tamaño de cadena son solubles en el medio alcohólico y luego son removidos del polímero. Por otro lado, cabe mencionar que la proteína no fue removida debido a la insolubilidad de la misma en CO₂sc. La remoción de la misma por lavados con agua se descartó debido a la posibilidad de hidrolizar del material y a la pérdida de sus características. El material candidato para los estudios de liberación controlada contuvo la proteína,

lo cual no presenta riesgo debido a su inocuidad toxicológica. El material no enzimático fue de aspecto ceroso, lo cual se atribuye al amplio rango de pesos moleculares presentes en la muestra. En cuanto a la diferencia de masa extraída del reactor extractor de CO₂sc, este fue menor para el caso de la reacción con enzima (2 g), mientras que para el control, la masa extraída fue de 3 g.

5.4. Caracterización de productos

5.4.1. Determinación de la composición mediante ¹H-RMN

Es importante recalcar que los resultados obtenidos inicialmente mediante la caracterización por cromatografía no fueron representativos debido a que no toda la muestra se disolvió en la fase móvil empleada (THF). Debido a esto fue imposible la determinación de las distribuciones de pesos moleculares de las muestras por esta técnica. Sin embargo, la ¹H-RMN fue una buena herramienta para elucidar la estructura molecular de los productos. Los monómeros DLLA y GA son homólogos, por lo que el grupo metilo (CH₃-) presente en DLLA, y ausente en GA, fue tomado como punto de referencia para distinguir las señales entre ellos y cuantificar las proporciones de cada uno en las unidades de repetición de los copolímeros. De esta forma, las señales presentes en el desplazamiento químico (δ) respecto al estándar interno de referencia (TMS) para el CH₂- fue tomado a 4.9 ppm y para el CHCH₃- a 5.21 ppm. La integración de la señal del metileno de las unidades glicolilo fue dividida entre 2 debido a la integración de dos hidrógenos y la de 5.2 ppm corresponde a la del hidrógeno del lactilo.²⁰ La Figura 9 muestra a modo de ejemplo el espectro del copolímero obtenido a partir de la reacción enzimática en masa para una relación 50/50 durante 12 h a 130 °C. Este espectro indica la presencia de ambas unidades de repetición en la estructura molecular del copolímero (unidades lactilo y glicolilo).

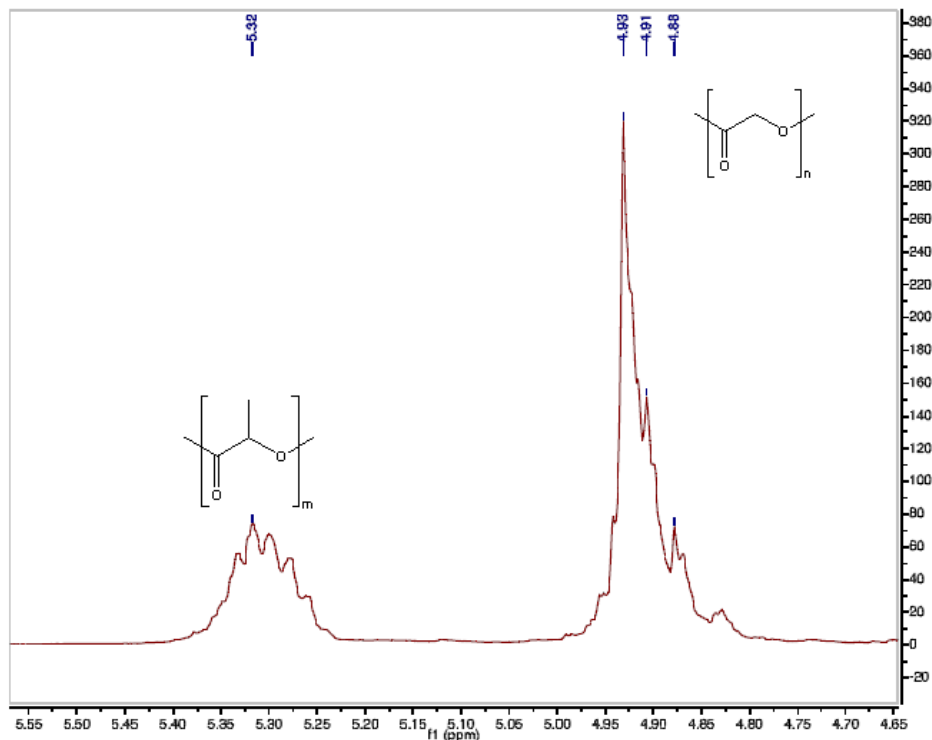


Figura 9. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ de PDLGA 50/50.

La Figura 10 muestra la distribución molar obtenida del análisis de resonancia magnética de protón de unidades de repetición lactilo dentro de la cadena polimérica del PDLGA sintetizado, para la cinética de las reacciones en masa con relaciones de alimentación de 50/50, 65/35 y 85/15 de DLLA/GA, respectivamente, con 8% en peso de Lipasa PS a 130 °C (barras de color azul) y sus respectivos blancos a las mismas condiciones sin biocatalizador (barras de color rojo); en esta figura se puede observar que no hay un incremento significativo en la inserción de DLLA dentro de la cadena polimérica fomentado por la presencia de la lipasa, entre las reacciones en masa catalizadas y sus respectivos controles; esta situación se puede atribuir a las extremas condiciones de temperatura a las cuales la lipasa fue sometida. Aunque la reacción a estas condiciones fue reportada con buenos resultados para la Lipasa PS,⁶ estudios de actividad residual demuestran que hubo poca actividad, por lo que la polimerización pudo haberse dado por mecanismos no enzimáticos.²⁴ Diversos autores, como se mencionó anteriormente, atribuyen esta

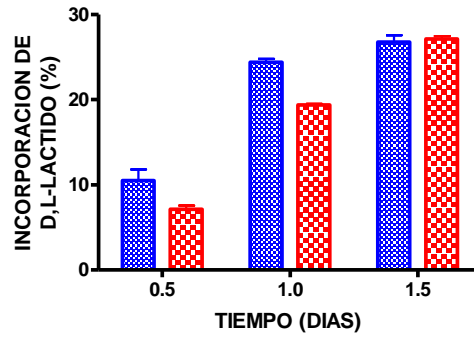
polimerización no enzimática a mecanismos de polimerización catiónicos promovidos por trazas de hidroxiacidos formados a partir de los monómeros en el seno de la reacción.^{6,9} De esta forma, esta polimerización no enzimática está más presente al aumentar la temperatura, puesto que se debe a un efecto térmico. La Tabla 9 muestra los resultados de ¹H-RMN para las muestras en las cuales se llevaron a cabo variaciones de temperatura y porcentaje de enzima. En esta, se puede observar que la actividad de la enzima al disminuir la temperatura, no mejoró la inserción de unidad lactilo de la cadena polimérica.

Tabla 9
Resultados de los análisis de ¹H-NMR para las muestras en las cuales se llevaron a cabo variaciones de temperatura y porcentaje de enzima

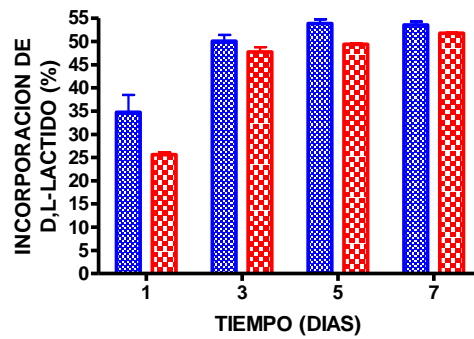
Relación DLLA/GA	Tr (°C)	% de enzima	t (h)	Lac (%)	Gli (%)
50:50	90	8	72	16	84
50:50	90	14	48	18	82
50:50	90	20	24	20	80
65:35	110	8	168	39	61
65:35	110	14	48	37	63
65:35	110	20	48	35	65

Para el caso de las reacciones que se llevaron a cabo alimentando la enzima de manera fraccionada, la inserción de la unidad lactilo fue del 11%, valor que osciló $\pm 2\%$.

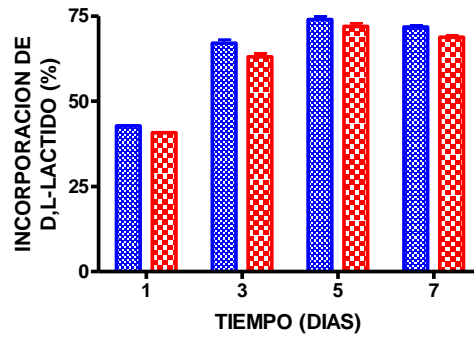
ALIMENTACION INICIAL DE MONOMEROS 50%:50%



ALIMENTACION INICIAL DE MONOMEROS 65%:35%



ALIMENTACION INICIAL DE MONOMEROS 85%:15%



REACCION CON LIPASA PS
BLANCO

Figura 10. Distribución molar por 1H-NMR de PDLGA 50/50, 65/35, 85/15 con Lipasa PS a diferentes tiempos de reacción.

Estos resultados coinciden con datos encontrados para la polimerización de GA, en donde este monómero polimeriza sin catalizador para dar materiales muy insolubles y de peso molecular absoluto desconocido. Sin embargo, generalmente el PGA de alta cristalinidad es asociado a altos pesos moleculares. El uso de catalizadores en la síntesis de PGA da lugar a materiales con diversas características pero la intratabilidad del PGA lo hace poco viable para aplicaciones biomédicas o de otra índole. Por otro lado, las muestras escaladas después de la purificación por CO₂sc, mostraron una composición de unidad lactilo del 18% y 9%, para la reacción con biocatalizador y el control, respectivamente.

5.4.2. Análisis Termogravimétrico y Calorimetría Diferencial de Barrido

En la Figura 11 se muestran los termogramas obtenidos del análisis termogravimétrico de las muestras. Se puede observar que a mayor presencia de unidades glicolilo la temperatura inicial de degradación es más alta (muestras 65/35), alrededor del 90% de la muestra se conserva a una temperatura mayor a 280 °C, mientras que las muestras con una relación inicial de alimentación 50/50 pierden el 10% en masa a una temperatura alrededor de 250 °C. Todas las muestras perdieron el 90% de su masa alrededor de los 300 °C. No se obtuvo suficiente muestra para analizar las reacciones con una relación de alimentación de 85:15.

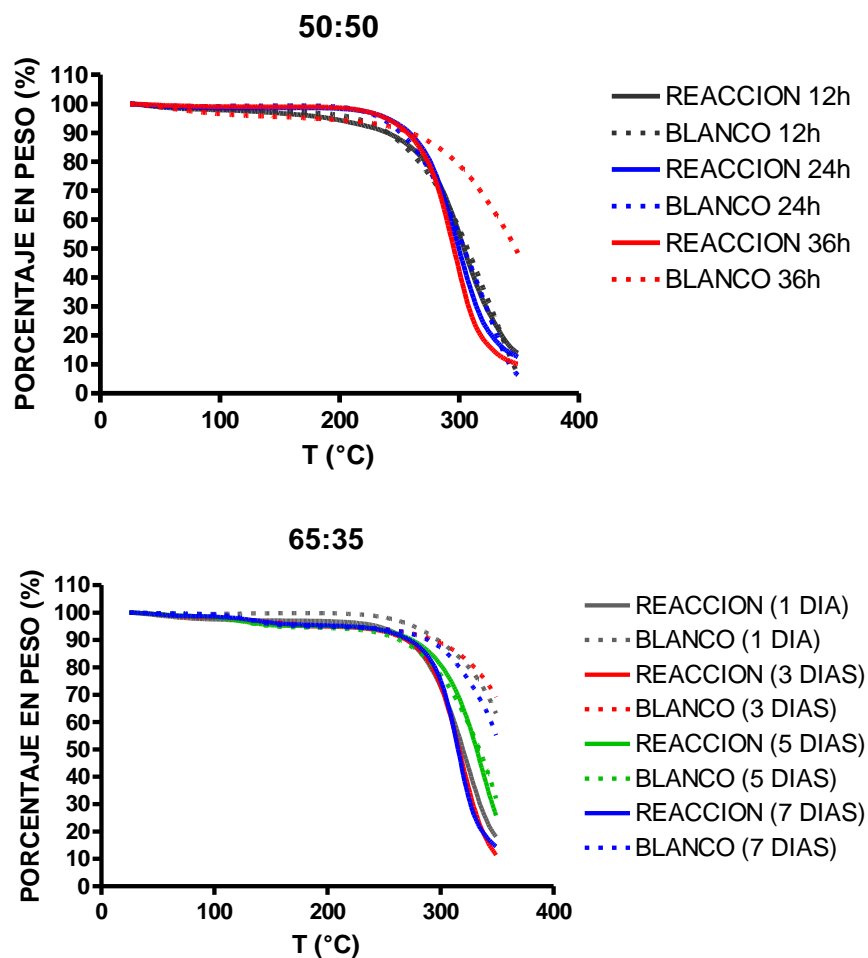


Figura 11. TGAs para las diferentes relaciones de alimentación de los monómeros

La calorimetría diferencial de barrido permite observar cambios térmicos, procesos endotérmicos y procesos exotérmicos que sufren las diferentes muestras. La relación de glicolilo/lactilo presente en la muestra de polímero afecta sus propiedades térmicas, e. g. la temperatura de fusión (T_f) y la temperatura de transición vítrea (T_g), que es la temperatura en la cual ciertos polímeros amorfos o semi-cristalinos pasan de un comportamiento rígido a elástico. En nuestro caso, ésta se vio afectada por la estructura molecular de los PDLGA sintetizados. En general, en las reacciones de copolimerización se ve disminuida la T_f , excepto en circunstancias en las cuales las unidades de los diferentes tipos de monómeros son capaces de reemplazarse unas a otras de

forma aleatoria en un entramado semi-cristalino.²⁶ La Tabla 10 muestra los efectos de la copolimerización en las propiedades térmicas, obtenidos mediante la caracterización por calorimetría diferencial de barrido; de acuerdo a estos resultados se puede observar que para la mayoría de las muestras, la copolimerización de los sustratos resulta en un decremento en la T_g , a medida que la concentración de unidades lactilo en la muestra disminuye.

Tabla 10. Propiedades térmicas de las muestras de la cinética de PDLGA

Relación inicial de alimentación	Blanco/Reacción	T	H-RMN %lactilo	Tg (°C)
50/50	Reacción	12 h	11	122.1
50/50	Reacción	24 h	25	82.6
50/50	Reacción	36 h	27	73.6
50/50	Blanco	12 h	7	n. p.
50/50	Blanco	24 h	19	93.1
50/50	Blanco	36 h	27	107.9
65/35	Reacción	1 día	25	78
65/35	Reacción	3 días	50	74.5
65/35	Reacción	5 días	54	69.5
65/35	Reacción	7 días	54	69
65/35	Blanco	1 día	26	87.8
65/35	Blanco	3 días	48	75.9
65/35	Blanco	5 días	50	142.5
65/35	Blanco	7 días	52	73.7

5.4.3. Determinación de cristalinidad mediante difracción de Rayos X en polvo

El grado de cristalinidad de un polímero semicristalino se puede determinar mediante el análisis de la intensidad de la radiación de Rayos X difractada por la muestra. Las intensidades debidas a los átomos de un cristal dan lugar a picos definidos. En las zonas amorfas, la dispersión tiene lugar en todas direcciones, la intensidad de estas dispersiones es muy débil dando lugar a un pico muy difuso. Patrones típicos de difracción para especímenes amorfos y semi-cristalinos sintetizados en este proyecto, son mostrados en las Figuras 12 y 13, respectivamente; debido a las interferencias ya sean fuertes o débiles, todos los

patrones de difracción constan de una zona amorfa difusa y unos picos debidos a las zonas cristalinas.²⁷

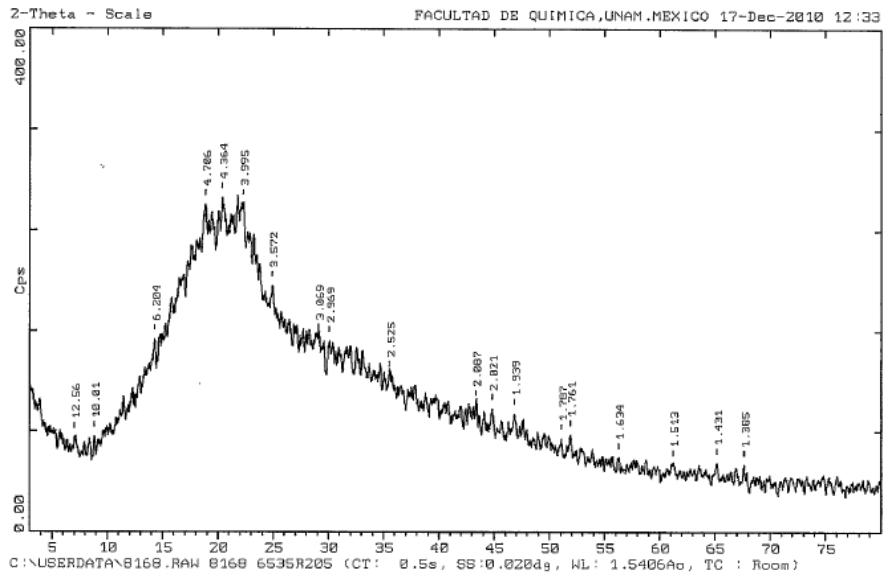


Figura 12. Patrón de difracción de Rayos para un espécimen amorfo de PDLGA enzimático 65/35 5 días.

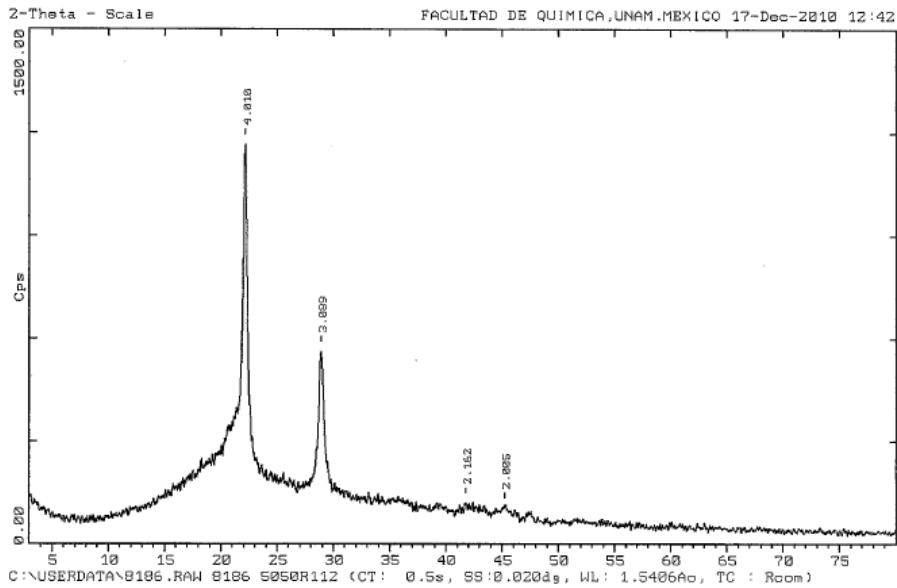


Figura 13. Patrón de difracción de Rayos para un espécimen semicristalino de PDLGA no enzimático 50/50 12 h.

Los patrones de los experimentos de difracción de Rayos X muestran picos entre 10 y 30° 2θ con 2 picos principales alrededor de 22° 2θ y 29° 2θ probando la presencia de dominios semicristalinos en los especímenes²⁰. El más alto grado de cristalinidad fue obtenido para el PDLGA no enzimático 50/50 con un tiempo de reacción de 12 h con 2320 conteos en 22° 2θ. El pico 22° 2θ fue tomado como referencia para el cálculo del grado de cristalinidad. Los resultados experimentales indican que no hay ninguna relación entre la acción de la enzima y la cristalinidad del material.

El grado de cristalinidad puede entonces relacionarse con las dos zonas del diagrama de difracción, suponiendo que la relación entre la cantidad de material cristalino y amorfo es igual a la relación de la intensidad total (integrada) de la parte cristalina y amorfa del diagrama. Así, la fracción de cristalinidad, x_C , viene dada por la ecuación: $x_C = I_C / (I_C + I_A)$, donde I_C es la intensidad correspondiente a las zonas cristalinas e I_A , la de las zonas amorfas.²⁷ La Tabla 11 muestra los resultados de grado de cristalinidad para las diferentes muestras de copolímero, en la cual se puede observar que la cristalinidad aumenta a medida que el contenido de unidades glicolilo en la muestra aumentan.

Tabla 11. Grado de cristalinidad para las muestras de la cinética de PDLGA

<i>Relación inicial</i>	<i>Blanco/Reacción</i>	<i>Tiempo</i>	<i>H-RMN %glicolilo</i>	<i>X_C</i>
50/50	Reacción	12 h	89	0.82
50/50	Reacción	24 h	75	0.79
50/50	Reacción	36 h	73	0.78
50/50	Blanco	12 h	93	0.85
50/50	Blanco	24 h	81	0.81
50/50	Blanco	36 h	73	0.76
65/35	Reacción	1 día	65	0.66
65/35	Reacción	3 días	50	0.51
65/35	Reacción	5 días	46	0.47
65/35	Reacción	7 días	46	0.45
65/35	Blanco	1 día	74	0.79
65/35	Blanco	3 días	52	0.57
65/35	Blanco	5 días	50	0.57
65/35	Blanco	7 días	48	0.54

Los resultados para los especímenes obtenidos por purificación con FSC se muestran en la Tabla 12, tanto para el blanco como para la reacción enzimática, se observa que estas muestras tienen un mayor grado de cristalinidad que los valores obtenidos para las muestras purificadas por disolventes orgánicos, esto se puede explicar debido a que en ellas las cadenas del polímero están mezcladas con moléculas de menor peso molecular, siendo estas más cristalinas, las cuales no les permiten un acomodo lineal, por otro lado la presencia de proteína podría incidir en este aspecto.

Tabla 12. Cristalinidad para las muestras de PDLGA purificadas con CO₂ supercrítico

Blanco/Enzima	Purificación con CO₂sc	Xc
Reacción	No purificado	0.55
Reacción	Purificado	0.81
Blanco	No purificado	0.59
Blanco	Purificado	0.85

5.5. Liberación controlada del pigmento

5.5.1. Preparación del polímero con pigmento

El método de fundido fue seleccionado con el fin de prevenir los problemas causados por los residuos tóxicos de los disolventes orgánicos en las diferentes técnicas de preparación de micropartículas, y además de que con este se evita el uso de disolventes orgánicos, especialmente disolventes clorados, ya que para usos biomédicos estos deben ser completamente eliminados de las formas de dosificación. Cabe mencionar aquí que el uso de disolventes considerados tóxicos o no GRAS es extensamente empleada en procesos de las industrias farmacéuticas, alimentarias o aquellas relacionadas con la biomedicina, pero estas prácticas incluyen altos grados de tratamiento pos-síntesis para llegar a la inocuidad y por ende la elevación de los costos de producción.

En este proyecto el PDLGA no enzimático mostró un tiempo muy corto de gaveta a condiciones ambientales y después de un mes de almacenamiento, sufriendo autodegradación, la cual se atribuyó a una hidrólisis debido a la humedad ambiental, lo que resultó como una limitación en sus aplicaciones experimentales futuras. Esta degradación puede ser una indicación de pesos moleculares bajos del copolímero, sin embargo su estimación por cromatografía resultó comprometida debido a la baja solubilidad del material en los disolventes comúnmente empleados en esta técnica. Con esto, se pudo observar experimentalmente que el copolímero obtenido mediante la acción de la enzima tuvo mejores características para el presente estudio. El PDLGA no enzimático presentó una textura cerosa, lo que indica la presencia de material de bajo peso molecular, por lo que no pudo ser transferido a una emulsión estable. Por otro lado, con el fin de lograr una morfología más uniforme, el proceso de emulsificación se llevó a cabo a 2,000 rpm.

5.5.2. Efecto en la intensidad de señal de la concentración del Azul de Metileno en la curva de calibración de espectroscopia de fluorescencia

La absorbancia o intensidad de fluorescencia de pigmentos orgánicos en soluciones acuosas se desvía de la ley de Lambert-Beer y el azul de metileno, no es una excepción. Esta desviación se debe a la agregación reversible que presenta el pigmento para formar oligómeros.

En un rango de concentraciones entre 10^{-3} a 10^{-9} M, la agregación del azul de metileno es limitada a un equilibrio monómero-dímero de corta vida, fluorescencias máximas en el espectro visible a 660 y 610 nm para el monómero y las especies dímeras, respectivamente.²⁸

La Figura 14 muestra una comparación de los espectros de fluorescencia de soluciones a diferentes concentraciones de azul de metileno, medidos inmediatamente después de que las soluciones fueron preparadas, con los

espectros a tiempo infinito (una vez que el sistema alcanzó el equilibrio y ningún cambio adicional fue observado en el espectro) de 610 a 690 nm. Mediante regresiones lineales a los datos de intensidad de fluorescencia, se determinó a que longitud de onda, la concentración de azul de metileno muestra una dependencia de carácter lineal acorde a la ley de Lambert-Beer. La curva de calibración que mejor se aproxima a una línea recta se encuentra a 690 nm y su regresión lineal se utilizó para la medición directa del azul de metileno liberado en la fase acuosa.

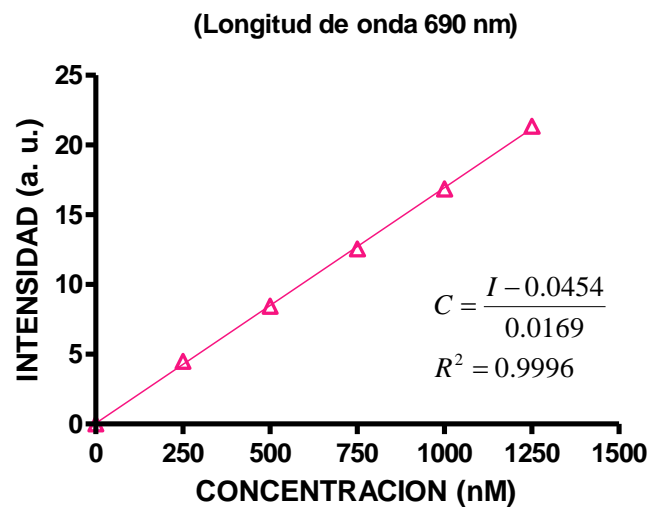
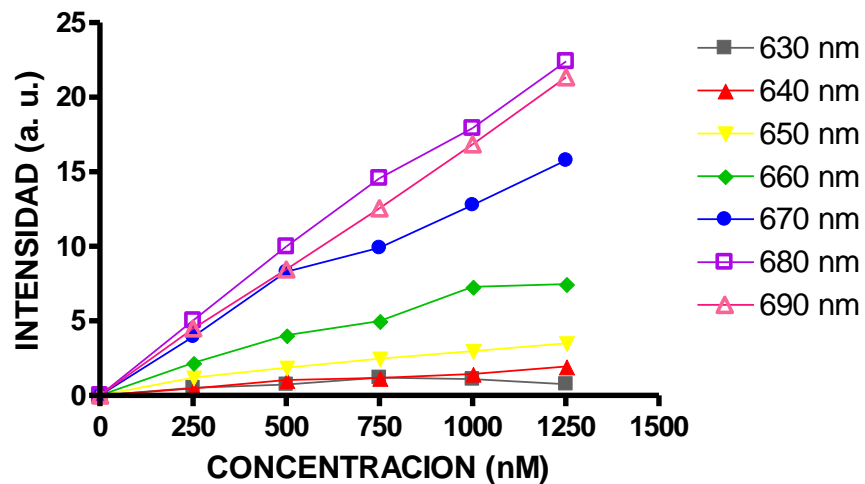


Figura 14. Efecto de la concentración de AM en la intensidad de fluorescencia en la curva patrón.

5.5.3. Determinación de la cantidad de Azul de Metileno liberado del polímero

El azul de metileno muestra una solubilidad muy alta en fases acuosas. La liberación del pigmento, tanto del PDLGA enzimático y no enzimático, cargado en el polímero siguió una respuesta de dosis hiperbólica, constando de dos fases de liberación.²⁹

Durante la primera fase de liberación, el AM fue liberado hacia la fase acuosa rápidamente dentro de las primeras 12 h. Durante la segunda fase de liberación, sólo una baja cantidad del pigmento salió de la fase interna hasta la saturación de la fase acuosa, la cual fue alcanzada 96 h después.

Aunque las características de liberación de las muestra de PDLGA enzimática y no enzimática, no muestran diferencias considerables, presentando perfiles de liberación similares (Figura 15), ambos con una liberación completa del pigmento después de alcanzar 96 h, el PDLGA sintetizado sin la presencia de la lipasa sufrió degradación después de aproximadamente un mes de ser purificado con CO₂sc, por lo que lotes nuevos no pudieron ser sometidos a nuevos experimentos de liberación. Cabe decir que el PDLGA pudiera mostrar características ideales de liberación para el uso oral: una liberación lenta durante el tiempo que la matriz polimérica se encuentra en el tránsito intestinal, alcanzando una la liberación completa después de 96 h.

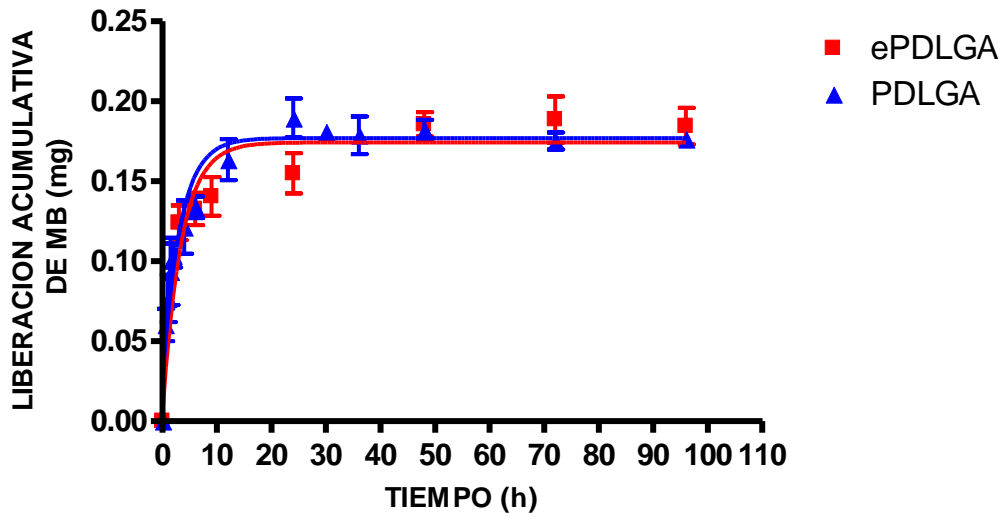


Figura 15. Liberación acumulativa de AM cargado en PDLGA (enzimático y no enzimático).

5.5.4. Caracterización del polímero que contiene Azul de Metileno

La Figura 16 muestra partículas de PDLGA secas después de una semana de almacenamiento a temperatura ambiente. Para la caracterización de las micropartículas por microscopía electrónica de barrido, el polvo se lavó con agua destilada para eliminar todo rastro de cristales de fosfatos provenientes de la solución buffer y del emulsificante.

Las muestras secas fueron montadas directamente sobre los portamuestras de silicio para su análisis. Únicamente agregados de polímero cargado con pigmento fueron observados cuando la encapsulación se realizó empleando una solución tampón al 0.05% de Triton X-100 (Figura 16.A, 16.B y 16.C).

Para asegurar la formación de microesferas, la emulsificación se llevó a cabo por encima de la CCM del emulsificante en el buffer de fosfatos. Sin embargo, una morfología uniforme no fue obtenida; esferas mezcladas con agregados se observan en las imágenes de microscopía, pero únicamente cuando Triton X-100 fue empleado como emulsificante (Figura 16.D, 16.E y 16.F).

El método de fundido para la microencapsulación, dio como resultado estructuras que constan de formas esféricas y aglomerados, irregulares en tamaño (en un rango de 100 a 3 micras) y con superficies rugosas y esponjosas. No se observó ningún cambio en la morfología de las partículas antes y después de los experimentos de la liberación del colorante, como por ejemplo el colapso de las esferas después de los experimentos de liberación. La velocidad de agitación fue variada en el proceso de emulsificación, con el fin de lograr una mejor morfología, sin embargo dichos resultados no fueron obtenidos.

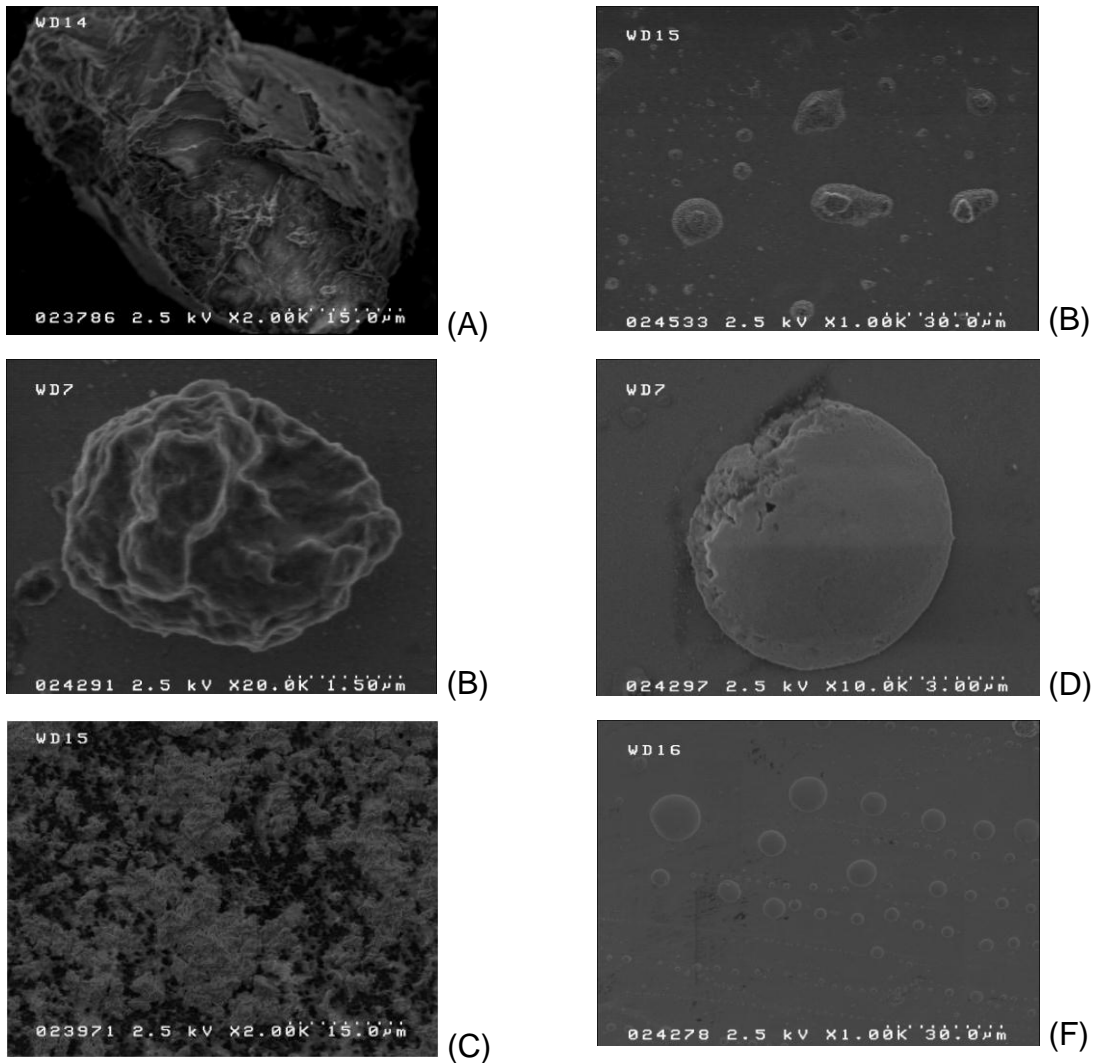


Figura 16. Fotografías de microscopía electrónica de barrido para las partículas de PDLGA.

5.5.5. Eficiencia de encapsulación

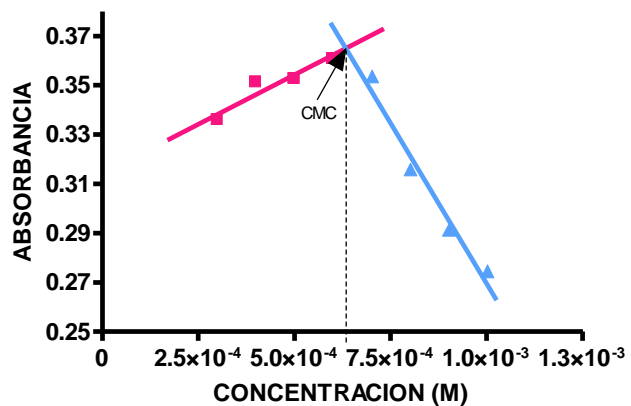
El azul de metileno presenta una solubilidad muy alta en fases acuosas, la cual es incrementada debido a la presencia de un emulsificante, esto es traducido como un rendimiento de encapsulación bajo, ya que el pigmento es lavado de la superficie mientras la emulsión esta siendo formada. La comparación de la cantidad inicial de pigmento cargado en el polímero y el presente en la fase acuosa después de los experimentos de liberación para el PDLGA enzimático fue de 64 ± 5 , mientras que para el PDLGA no enzimático fue del 62 ± 3 .

5.5.6. Efecto del tipo de surfactante, concentración del surfactante y tiempo de emulsificación en la preparación del encapsulado

Las imágenes obtenidas por microscopia, cuando la emulsificación se realizó empleando 0.05% de Triton X-100 muestran únicamente agregados del polímero cargado con pigmento. Para asegurar la formación de microesferas, se calculó la CCM para dos diferentes emulsificantes (Figura 17), la cual fue establecida cuando las propiedades de absorbancia de la solución cambiaron.

La emulsificación se llevó a cabo a una concentración de tensoactivo 0.00005M por enzima del valor obtenido de CCM a 3 diferentes tiempos de emulsificación, pero únicamente en el caso en el cual Triton X-100 fue empleado a un tiempo de emulsificación de 30 minutos, esferas, junto con cierta proporción de aglomerados fueron observadas. Ninguna mejora en cuanto al rendimiento en la formación de esferas fue observada cuando se trabajó a diferentes concentraciones por encima de la CCM.

Triton X-100
(660 nm)
CMC=0.0006M



Tween-20
(660 nm)
CMC=0.0005M

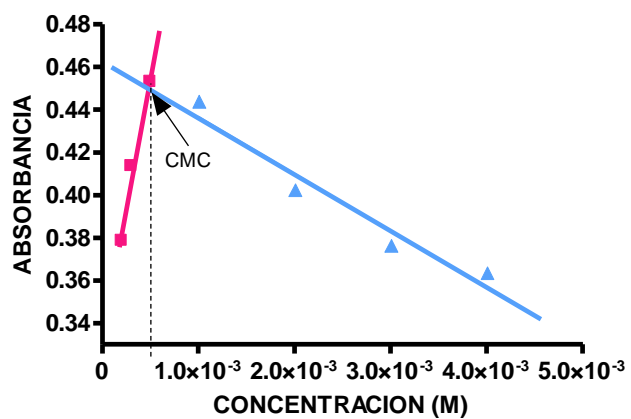


Figura 17. Determinación de la concentración crítica micelar.

6. CONCLUSIONES

El presente trabajo muestra la síntesis enzimática de copolímeros de DLLA y GA mediante PAA empleando Lipasa PS como biocatalizador. Dicha síntesis fue realizada con éxito, evaluando factores como tiempo de reacción, temperatura y relación de sustratos/enzima. Los materiales fueron insolubles en disolventes orgánicos y fueron caracterizados estructuralmente por espectroscopía de resonancia magnética nuclear, difracción de Rayos X, así como análisis térmicos. La purificación mediante el uso de dióxido de carbono en estado supercrítico fue efectiva en cuanto a obtener un material adecuado para estudios de liberación controlada de fármaco por un proceso no tóxico. La misma PAA se llevó a cabo en reacciones control, en las cuales PDLGA fue obtenido e igualmente caracterizado.

Aunque la liberación de AM cargado en ambos PDLGAs, el material control y el producido enzimáticamente, siguió la misma respuesta de dosis-hiperbólica, el PDLGA no enzimático mostró corto tiempo de gaveta (menos de dos meses), lo que limitó su aplicación en nuevos experimentos de liberación. Los estudios de liberación controlada de AM de la muestra sintetizada enzimáticamente y purificada en el reactor-extractor dieron un patrón de liberación adecuada para una vía de administración inicialmente rápida y más dosificada después de las primeras 12 h. Las diferentes variables que tienen lugar en la preparación de la emulsión (concentración del emulsionante, velocidad de agitación y tiempo) se estudiaron con el fin de obtener partículas homogéneas; sin embargo, no se logró uniformidad en su morfología. Las micropartículas resultantes consistieron en formas esféricas y los aglomerados.

7. TRABAJO FUTURO

Esta ruta verde hacia la producción de PDLGA presenta zonas de oportunidad en cuanto a la optimización del proceso de purificación con CO₂sc evaluando los tiempos, la temperatura y la presión de extracción.

En cuanto a los experimentos de liberación, es necesario lograr una uniformidad en la morfología de las partículas obtenidas con el fin de tener una mayor homogeneidad en la liberación acumulativa del pigmento. Una vez logrado esto, el sistema se podrá transferir a una solución tampón de fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés), el cual es más comúnmente usado en estudios biológicos. Ya que se tenga completamente conocido el comportamiento del pigmento en este nuevo medio, se podrá ahora si emplear un fármaco de interés, para posteriormente llevar a cabo pruebas *in vivo*.

8. REFERENCIAS

1. Omathanu P. and Panchagnula R., 2001, Polymers in drug delivery. Next generation therapeutics, 5, 447-451.
2. Hyon, Suong-Hyu, 2000, Biodegradable Poly (lactic acid) microspheres for drug delivery systems. Yonsei Medical Journal, 41 (6), 720-734.
3. Conti, B., Pavanetto F. and Genta I., 1992, Use of polylactic acid for the preparation of microparticulate drug delivery systems. Journal of Microencapsulation, 9 (2), 153-166.
4. Langer R., 2000, Biomaterial in drug delivery and tissue engineering: One laboratory's experience. Accounts of Chemical Research, 33 (2), 94-101.
5. Lassalle V. and Barrera Galland G., 2008, Lipase-catalysed copolymerization of lactic and glycolic acid with potential as drug delivery devices. Bioprocess and Biosystems Engineering, 31, 499-508.
6. Huiser S., Bastiaan B. P., Huang J. Duchateau R. and Koning C. E., 2006, Topology characterization by MALDI-ToF-MS of enzymatically synthesized poly(lactide-co-glycolide). Biomacromolecules, 7 (9), 2465-2469.
7. Chanfreau S., Mena M., Porrás-Domínguez J., Ramírez-Gilly M., Gimeno M., Roquero P., Tecante A. and Bárzana E., 2010, Enzymatic synthesis of poly-L-lactide and poly-L-lactide-co-glycolide in an ionic liquid. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33, 629-638.
8. Ghaderi R. Artursson P. and Carlfors J., 2000, A new method for preparing biodegradable microparticles and entrapment of hydrocortisone in D,L-PLG microparticles using supercritical fluids. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 10, 1-9
9. García-Arrazola R., López-Guerrero D. A., Gimeno M. and Bárzana E., 2009, Lipase-catalyzed synthesis of poly-L-lactide using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 51, 197-201.
10. Herberger J., Murphy K., Munyai L., Cordia J. and Westhaus E., 2003, Carbon dioxide extraction of residual solvents in poly(lactide-co-glycolide) microparticles. *Journal of controlled release*, 90, 181-195.

11. Sharma R., Chisti Y. and Chand Banerjee U. 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. 19: 627-662.
12. Albertsson A. C. and R. K. Srivastava. 2008. Recent developments in enzyme-catalyzed ring-opening polymerization. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60: 1077-1093.
13. Kim K., Shin D., Hwang K. and Suh S. 1997. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure*. 5(2): 173-185.
14. Kobayashi S. 2010. Lipase-catalyzed polyester synthesis- A green polymer chemistry. *Proceedings of the Japan Academy. Ser. B*. 86: 338-365.
15. Ixtaina V., Vega A., Nolasco S., Tomás M. Gimeno M., Bárzana E. and Tecante A. 2010. Supercritical carbon dioxide extraction of oil from Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.): Characterization and process optimization. *Journal of Supercritical Fluids*. 55: 192-199.
16. Kemmere M. and T. Meyer (Editors). *Supercritical carbon dioxide in polymer reaction engineering*. E. U. A. Wiley-VCH. 2005.
17. Feng Y., Zhang S., Zhang L., Guo J. and Y. Xu. 2009. Release of Aspirin from Biodegradable Polyesterurethane Networks. *Advance Materials Research*. 78-82: 1431-1434.
18. Gupta, U., Mohan D., Ghosha S. K. and V. Nasa. 2009. Dual fluorescence of Methylene Blue encapsulated in silica matrix. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 209, 7-11.
19. Furutani T. Ronghui S., Ooshima H. and J. Kato. 1995. Simple screening method for lipase for transesterification in organic solvent. *Enzyme and Microbial Technology*. 17: 1067-1072.
20. Engwicht A., Girreser U. and B. W. Muller. 2000. Characterization of copolymers of lactic and glycolid acid for supercritical fluid processing. *Biomaterial*. 21:1587-1593.

21. Burkhard W. and P. Rohdewald. 1990. A new method for the preparation of drug containing polylactic acid microparticles without using organic solvents. *Journal of Controlled Release*, 14, 269-283.
22. Lin W. J. and W. W. Kang. 2002. Comparison of chitosan and gelatin coated microparticles: prepared by hot-melt method. *Journal of Microencapsulation*, 20 (2) 169-177.
23. Fuguet E., Rafols C., Roses M. and E. Bosch. 2005. Critical micelle concentration of surfactants in aqueous buffered and unbuffered systems. *Analytica Chimica Acta*, 548, 95-100.
24. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/DataSheetPage.do?brandKey=ALDRICH&symbol=534641>
25. Dong H., Cao S., Li Z., Han S., You D. and J. Shen. 1998. Study on the Enzymatic Polymerization Mechanism of Lactone and the Strategy for Improving the Degree of Polymerization. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*. 37: 1265-1275.
26. Lan P., Zhang Y., Gao Q., Shao H. and X. Hu. 2003. Studies on the Synthesis and Thermal Properties of Copoly(L-lactic acid/glycolic acid) by Direct Melt Polycondensation. *Journal of Applied Polymer Science*. 92: 2163-2168.
27. Albella, J.M.; Cintas, A.M.; Miranda, T. y Serratosa, J.M. "Introducción a la Ciencia de Materiales: Técnicas de preparación y caracterización". *Textos Universitarios No. 20, C.S.I.C., Madrid 1993*.
28. Zanocco A., Gunther G., Lemp E. and E. Lissi. 1998. Release of Methylene Blue from dioctadecyldimethylammonium chloride vesicle. *Journal of Chemical Society. Perkin Trans. 2*: 318-323.
29. Ishihara K., Muramoto N. and I. Shinohara. 1984. Controlled release of Organic Substances Using Polymer Membrane with Responsive Function for Amino Compounds. *Journal of Applied Polymer Science*. 29: 211-217.