



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE POLI – ϵ – CAPROLACTONA
HIPERRAMIFICADA UTILIZANDO LA LIPASA B DE *Candida antarctica*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

EDGAR AXEL DONJUAN GUERRERO



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: **AGUSTÍN LÓPEZ MUNGUÍA CANALES**

VOCAL: Profesor: **OSCAR HERNÁNDEZ MELENDEZ**

SECRETARIO: Profesor: **MIQUEL GIMENO SECO**

1er. SUPLENTE: Profesor: **CAROLINA PEÑA MONTES**

2° SUPLENTE: Profesor: **CARMINA MONTIEL PACHECO**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, LABORATORIO 314
CONJUNTO E, FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Miquel Gimeno Seco

SUPERVISOR TECNICO:

Dra. Carmina Montiel Pacheco

SUSTENTANTE:

Edgar Axel Donjuan Guerrero

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1. POLICAPROLACTONA	3
3.2. POLIMERIZACIÓN POR APERTURA DE ANILLO	3
3.3. ENZIMAS.....	5
3.4. LIPASAS.....	6
3.5. LIPASA B DE <i>CANDIDA ANTÁRCTICA</i>	6
3.6. MECANISMO DE POLIMERIZACIÓN POR APERTURA DE ANILLO ENZIMÁTICO	7
3.7. POLÍMEROS HIPERRAMIFICADOS.....	8
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	12
4.1. HIPÓTESIS	12
4.2. OBJETIVO GENERAL.....	12
4.3. OBJETIVOS PARTICULARES	12
5. METODOLOGÍA	13
5.1. ACONDICIONAMIENTO DE LOS REACTIVOS	13
5.2. CONDICIONES DE REACCIÓN.....	13
5.3. PURIFICACIÓN	14
5.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES OBTENIDOS.....	15
5.4.1. <i>Resonancia Magnética Nuclear de Protón H¹- RMN</i>	15
5.4.2. <i>Cromatografía de Exclusión de Tamaño (SEC)</i>	16
5.5. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	16
5.6. CUANTIFICACIÓN DE LA CAPROLACTONA.....	17
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
6.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA INICIAL	19
6.2. SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE POLI (CL-CO-BHP)	20
6.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES OBTENIDOS.....	23
6.3.1. <i>Resonancia Magnética Nuclear</i>	23
6.3.2. <i>Discusión de los resultados de la SEC</i>	30
6.4. INHIBICIÓN ENZIMÁTICA	32
6.5. CUANTIFICACIÓN DE LA CL EN EL MEDIO DE REACCIÓN	33
6.6. EFECTO DE LA AGITACIÓN EN LA HIPERRAMIFICACIÓN	36
7. CONCLUSIONES	40
8. REFERENCIAS	41

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. MECANISMO DE PAA CATIÓNICO. ⁴	4
FIGURA 2. MECANISMO DE PAA ANIÓNICA. 1)ATAQUE NUCLEOFÍLICO AL METILO ADYACENTE Y 2)ATAQUE NUCLEOFÍLICO AL CARBONO CARBONILO. ⁴	4
FIGURA 3. MECANISMO DE PPA VÍA COORDINACIÓN-INSERCIÓN ⁴	4
FIGURA 4. MECANISMO DE PAA POR MONÓMERO ACTIVADO. ⁵	5
FIGURA 5. IMAGEN DE LA ESTRUCTURA DE LA CALB. EL SITIO ACTIVO SE MUESTRA: SER105 EN VERDE, HIS224 EN ROJO Y ASP187EN AZUL. REALIZADO EN PYMOL®	7
FIGURA 6. MECANISMO DE POLIMERIZACIÓN ENZIMÁTICA POR APERTURA DE ANILLO. ¹⁴	8
FIGURA 7. ESTRUCTURA DE LOS POLÍMEROS DENDRITICOSA) DENDRÍMEROS Y B) POLIMEROS HIPERRAMIFICADOS. ¹⁷	9
FIGURA 8. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL BHP.....	10
FIGURA 9. ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTON DE LA PCL.....	23
FIGURA 10. H-RMN POLI (CL-CO-BHP).....	24
FIGURA 11. ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE LAS DOS INCORPORACIONES DEL BHP ENCONTRADAS EN EL POLÍMERO HIPERRAMIFICADO.....	25
FIGURA 12. ESQUEMA DE REACCIÓN DE LA SÍNTESIS DE POLI(CL- CO- BHP) EN MASA.	25
FIGURA 13. AMPLIACIÓN DE LA REGIÓN METÍLICA DE LOS ESPECTROS DE H-RMN DE LOS POLÍMEROS HIPERRAMIFICADOS SINTETIZADOS CON 3% DE BHP.....	27

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. ALGUNAS LIPASAS UTILIZADAS EN LA POLIMERIZACIÓN DE CL.....	6
TABLA 2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	14
TABLA 3. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.	20
TABLA 4. RELACIÓN DEL PORCENTAJE DE INCORPORACIÓN LINEAL Y DENDRIMERICO, CON RESPECTO AL TIEMPO.....	28

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1. CURVA PATRÓN DE P-NITROFENOL.	19
GRÁFICA 2. RENDIMIENTO DE REACCIÓN DE LA SÍNTESIS DEL CO-POLÍMERO A) REACCIÓN ENZIMÁTICA B) REACCIÓN QUÍMICA.....	21
GRÁFICA 3. PORCENTAJE DE INCORPORACIÓN MOLAR DE BHP EN LOS POLÍMEROS HIPERRAMIFICADOS.	26
GRÁFICA 4. GRADO DE RAMIFICACIÓN DE LOS POLÍMEROS HRIPERRAMIFICADOS.	29
GRÁFICA 5.PESOS MOLECULARES DE LA SÍNTESIS DEL CO-POLÍMERO A) REACCIÓN ENZIMÁTICA B) REACCIÓN QUÍMICA.	31
GRÁFICA 6. DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL BHP EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.	33
GRÁFICA 7. CURVA PATRÓN CL.....	34
GRÁFICA 8. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA CL DURANTE EL TRANSCURSO DE LA REACCIÓN.....	35
GRÁFICA 9. RENDIMIENTO DE LA REACCIÓN OCUPANDO DISTINTAS FORMAS DE AGITACIÓN.	37
GRÁFICA 10. COMPARACIÓN DEL PESO MOLECULAR ALCANZADO CAMBIANDO EL TIPO DE AGITACIÓN..	38
GRÁFICA 11. PORCENTAJE DE INCORPORACIÓN CAMBIANDO TIPO DE AGITACIÓN.	38
GRÁFICA 12. GRADO DE RAMIFICACIÓN. CAMBIANDO TIPO DE AGITACIÓN.....	39

1. RESUMEN

La presente tesis de licenciatura contribuye al estudio de la síntesis de polímeros hiperramificados, a partir de la reacción enzimática de apertura de anillo de la ϵ - caprolactona (CL) y centro de ramificación polifuncional el ácido 2,2-bis (hidroximetil) propiónico (BHP), se probaron tres concentraciones del mismo en el medio de reacción (3, 5 y 10 %molar con respecto a la CL), en un medio de reacción en masa, para producir estructuras moleculares tipo poliésteres hiperramificados los cuales son termoplásticos, biodegradables y biocompatibles. La caracterización del polímero obtenido se realizó mediante ^1H -RMN y SEC. La mejor concentración de BHP probada para la obtención del polímero hiperramificado fue la de 3% molar; obteniendo un rendimiento de 56%, un peso molecular de 5 131 g/mol y un grado de ramificación (DB) de 0.057.

Adicionalmente en este trabajo se aborda el efecto de inhibición por parte del centro de ramificación sobre la enzima, el efecto de la viscosidad del medio de reacción y la influencia de la concentración del monómero CL presente en el medio durante el transcurso de la reacción.

Para la inhibición enzimática se analizó la actividad de la enzima mediante el método de hidrólisis de p-nitrofenil acetato agregando las concentraciones de BHP probadas a la determinación, para el efecto de la viscosidad del medio de reacción se probó usar una agitación empleando una propela y para la concentración de la CL en el transcurso de la reacción se realizó mediante cromatografía de gases, mediante un muestreo de la reacción en tiempos determinados.

2. INTRODUCCIÓN

La reciente preocupación social por el cuidado de medio ambiente exige el desarrollo de materiales ambientalmente amigables que presenten un mayor grado de degradación y que las tecnologías con las que se producen también lo sean.

La policaprolactona (PCL) es un polímero biodegradable y biocompatible ampliamente estudiado, utilizado por ejemplo en implantes de liberación de fármacos de larga duración.

Se obtiene mediante polimerización por apertura de anillo (PAA) del monómero cíclico ϵ -Caprolactona (CL) catalizada por diferentes compuestos organometálicos como el Octanoato de estaño, este tipo de catalizadores requieren ser removidos por completo debido a que son tóxicos para el ser humano lo cual limita su aplicación en biomedicina.

La catálisis enzimática se ha convertido en una opción viable y atractiva para la producción de materiales mediante un proceso limpio (sin residuos tóxicos), ideal para aplicaciones biomédicas y alimentarias, además presenta la ventaja de que las enzimas catalizan reacciones en condiciones suaves de reacción, como son el pH, presión y temperatura.

Una forma de obtener materiales novedosos es mediante la hiperramificación. Los polímeros hiperramificados son macromoléculas altamente ramificadas que en los últimos años han cobrado especial interés debido a sus propiedades químicas y físicas, así como sus posibles aplicaciones en recubrimientos, nanotecnología y biomedicina.

En este proyecto se desea obtener un material hiperramificado, altamente biodegradable, fácil de obtener mediante un proceso amigable con el medio ambiente y que además sea industrialmente útil.

3. ANTECEDENTES

3.1. Policaprolactona

La PCL es un poliéster alifático lineal semicristalino ampliamente estudiado. Posee un bajo punto de fusión (55-60) °C, una temperatura de transición vítrea de -60 °C.¹

Es uno de los poliésteres alifáticos más atractivos para aplicaciones biomédicas debido a que es un polímero biodegradable y biocompatible. Su degradación radica en la presencia de enlaces éster hidrolíticamente lábiles, su tasa de degradación es de 2 a 3 años. Debido a esto se ha empleado como biomaterial por ejemplo en el desarrollo de dispositivos de liberación de fármacos de larga duración y andamios biomédicos para la ingeniería de tejidos.^{1,2}

Se obtiene mediante PAA del monómero cíclico CL catalizada por diferentes compuestos organometálicos como el Octanoato de estaño,³ que requieren ser removidos en su totalidad debido a su toxicidad en el cuerpo humano.

3.2. Polimerización por apertura de anillo

Los poliésteres son una clase de polímeros muy atractivos debido a sus posibles aplicaciones biomédicas y farmacéuticas.

Las polilactonas se pueden obtener por dos rutas una es la policondensación de ácidos hidroxicarboxílicos y la otra es la PAA de ésteres cíclicos como lo es la CL. En la policondensación se ve desfavorecido el alcanzar altos pesos moleculares, por otro lado en la PAA presenta la ventaja que en menores tiempos de reacción se pueden alcanzar altos pesos moleculares, además de que se puede realizar en distintos medios de reacción como puede ser una dispersión, una emulsión, en solución y en masa.

Se proponen mecanismos principales mediante los cuales se puede llevar a cabo la PAA, catiónica, aniónica y coordinación-inserción a demás de la PAA vía monómero activado que no es muy empleada.

La PAA catiónica (Figura 1) es un proceso tipo SN₂, que implica la formación de una especie con carga positiva, que posteriormente es atacada por el

monómero cíclico, lo que genera la apertura del anillo de la especie cargada positivamente.^{4,5}

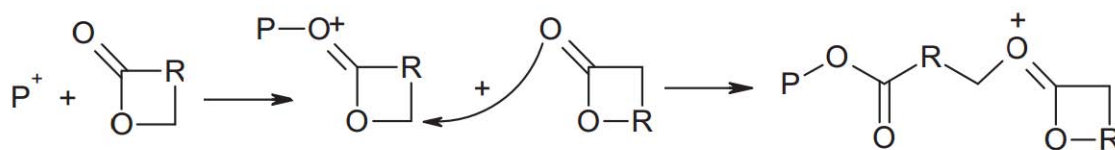


Figura 1. Mecanismo de PAA catiónico.⁴

La PAA aniónica (Figura 2) ocurre cuando un iniciador con carga negativa realiza un ataque nucleofílico ya sea al carbono carbonilo o al carbono adyacente al oxígeno lo que resulta en un poliéster lineal. Se ha encontrado que para la CL el ataque nucleofílico se da al carbono carbonilo.^{4,5}

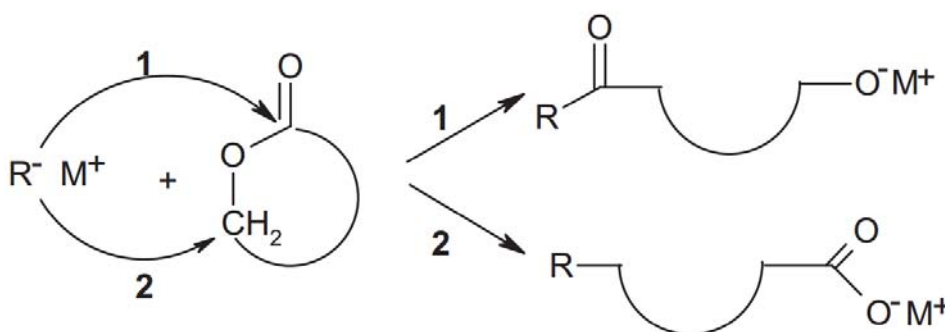


Figura 2. Mecanismo de PAA aniónica. 1)Ataque nucleofílico al metilo adyacente y 2)Ataque nucleofílico al carbono carbonilo.⁴

La PAA vía coordinación-inserción (Figura 3) es el mecanismo más común, es una pseudo apertura de anillo catiónica, la propagación se cree que ocurre con la coordinación del monómero al catalizador posteriormente una inserción del monómero al oxígeno metálico enlazado al catalizador. Durante la propagación, la cadena en crecimiento es unido al metal a través de un enlace alcóxido.^{4,5}

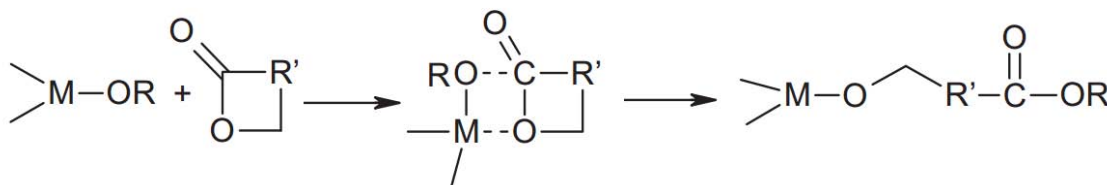


Figura 3. Mecanismo de PPA vía coordinación-inserción⁴

Finalmente monómero activado (Figura 4), en este mecanismo implica la activación del monómero por el catalizador, seguido por el ataque del monómero activado en el extremo de la cadena de polímero.⁵

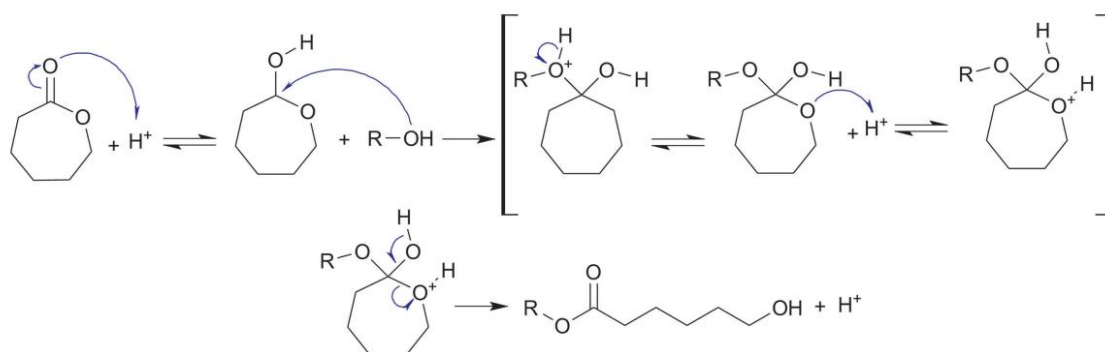


Figura 4. Mecanismo de PAA por monómero activado.⁵

En 1993 dos grupos independientes uno el de Kobayashi en la Universidad de Kyoto y el grupo de Matsumura en la Universidad de Tokyo ambos de Japón, descubrieron que la PAA podía llevarse a cabo vía enzimática, lo que generó un nuevo campo de conocimiento y la posibilidad de producir materiales en ausencia de residuos tóxicos.⁶

3.3. Enzimas

Las enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. En la actualidad el empleo de la catálisis enzimática en la síntesis orgánica está teniendo un gran desarrollo debido a que son altamente específicas, presentan alta actividad catalítica, su origen se encuentra en fuentes renovables, no son tóxicas, utilizan condiciones suaves de reacción (temperatura, presión y el pH), catalizan reacciones en medios no acuosos.⁷

El uso de la catálisis enzimática ofrece la posibilidad de obtener compuestos y materiales en ausencia de residuos tóxicos en un proceso enmarcado dentro de la química verde.

Un ejemplo de enzimas empleadas en la síntesis orgánica son las lipasas ya que han demostrado ser útiles en reacciones hidrolíticas y de síntesis de interés industrial.⁸

3.4. Lipasas

Las lipasas son enzimas que pertenecen a la familia de las hidrolasas, su función principal es la de catalizar la hidrólisis de triacilglicéridos en glicerol y ácidos grasos libres.

De manera general, la estructura de las lipasas presenta un plegamiento α/β , compuesto por hojas β y rodeado por hélices α , característico de las hidrolasas.

Todo esto es estabilizado por un puente de hidrógeno en el enlace con histidina y aspartato o glutamato.⁹

Como se mencionó anteriormente, en 1993 se encontró que las lipasas son capaces de realizar la polimerización por apertura de anillo. En ese experimento encontraron que la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* catalizó la PAA de la CL.¹⁰

Este descubrimiento llevó a probar lipasas de diferentes orígenes para la síntesis in vitro de poliésteres. A continuación se muestran algunas lipasas que se han empleado en la PAA de la CL.^{10,11}

Tabla 1. Algunas lipasas utilizadas en la polimerización de CL

Origen de la lipasa	Abreviatura
<i>Candida cylindracea</i>	Lipasa CC
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipasa PF
Lipasa de páncreas porcino	PPL
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Lipasa PC
<i>Rhizopus japonicus</i>	Lipasa RJ
<i>Candida antarctica</i>	Lipasa CA
Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	CALB

3.5. Lipasa B de *Candida antártica*

Entre las lipasas destaca la isoenzima B de la lipasa de *Candida antártica* CALB. Esta enzima es eficaz para la hidrólisis en agua y en medios orgánicos

para la esterificación. Es empleada en diversos procesos industriales por su amplia gama de sustratos, alta enantioselectividad, estabilidad en disolventes orgánicos y su termoestabilidad, además de tener una tapa o lid prácticamente inexistente por lo que no requiere de activación interfacial.¹²

Su estructura (Figura 5) consta de 317 amino ácidos, peso molecular de 33 kDa, su sitio activo está formado por la triada catalítica serina(Ser105)-histidina(His224) -ácido aspártico(ASP187).^{9,10}

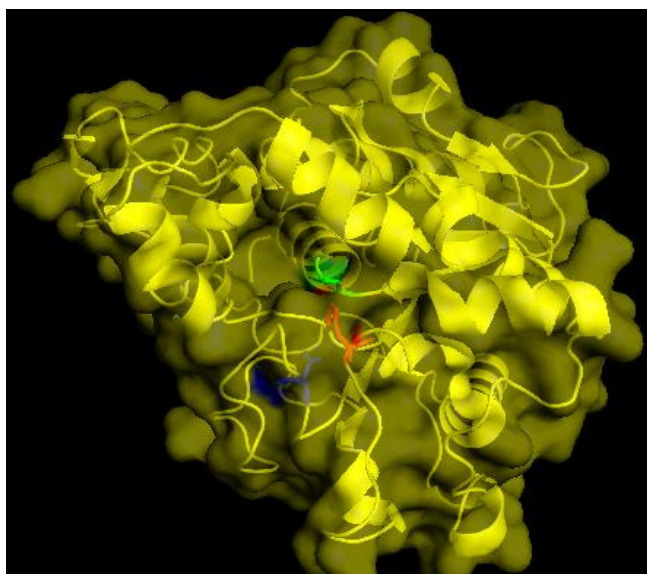


Figura 5. Imagen de la estructura de la CALB. El sitio activo se muestra: Ser105 en verde, His224 en rojo y Asp187 en azul. Realizado en Pymol®

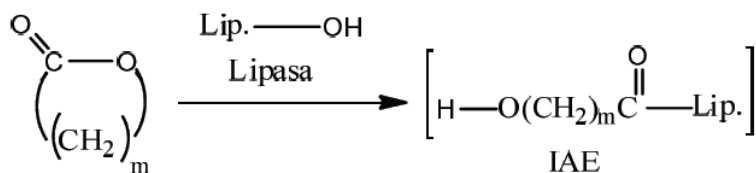
Comercialmente la CALB se encuentra tanto libre como inmovilizada principalmente vía adsorción en un soporte macroporoso esférico de aproximadamente de 1 mm de diámetro de polimetacrilato (Lewatit VPOC 1600). Se ha comprobado que la inmovilización de la enzima en un soporte sólido, ha mejorado la estabilidad (a un mayor intervalo de temperatura y pH) y permite la reutilización comparada a la enzima libre.¹³

3.6. Mecanismo de polimerización por apertura de anillo enzimático

El mecanismo de PAA enzimática (Figura 6) se lleva a cabo en dos pasos que son la iniciación, en la que se da el reconocimiento enzimático del monómero cíclico formando así el complejo enzima-sustrato; una vez formado el complejo

enzima-sustrato se produce la transformación química en el sitio activo, donde se lleva a cabo un ataque nucleofílico proveniente de un residuo de serina del sitio activo de la enzima (desprotonado parcialmente por puentes de hidrógeno vecinales con la histidina y aspartato) al carbono carbonilo de la lactona; seguidamente, el anillo imidazol de la histidina se protona y se carga positivamente, estabilizado por la carga negativa de los ácidos aspártico y glutámico del sitio activo. Posteriormente se forma un intermediario tetraédrico; es entonces cuando un rompimiento en el enlace carbono-oxígeno causa la liberación de una molécula de agua, formando así el intermediario acil enzima (IAE), la formación de estos es el paso limitante de la reacción, la iniciación continua cuando se da un ataque nucleofílico ya sea de una molécula de agua o alguna otra molécula con carácter nucleofílico por ejemplo alcoholes primarios o cadenas de monómero abierto al carbonilo del IAE produciendo la desacilación de la enzima. La propagación toma lugar cuando al carbonilo del complejo IAE sufre el ataque de grupos hidroxilo terminales de cadenas crecientes de forma sucesiva, generando el crecimiento del polímero y a su vez regenerándose la enzima.^{14,15}

Iniciación



Propagación

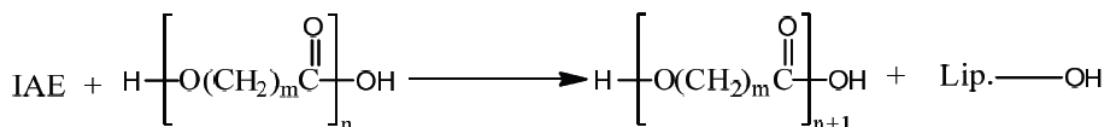


Figura 6. Mecanismo de polimerización enzimática por apertura de anillo.¹⁴

3.7. Polímeros hiperramificados

Como se mencionó anteriormente la PCL ha recibido especial atención por sus aplicaciones biomédicas y farmacéuticas, sin embargo, estas aplicaciones a

menudo requieren materiales con propiedades específicas, esto abrió un campo de investigación para la modificación y mejora de estos materiales. Una estrategia para cambiar las propiedades de un polímero es cambiando su arquitectura molecular.¹⁶

En este sentido los polímeros dendríticos son moléculas globulares altamente ramificadas que pueden dividirse en dendrímeros y polímeros hiperramificados (Figura 7).¹⁷

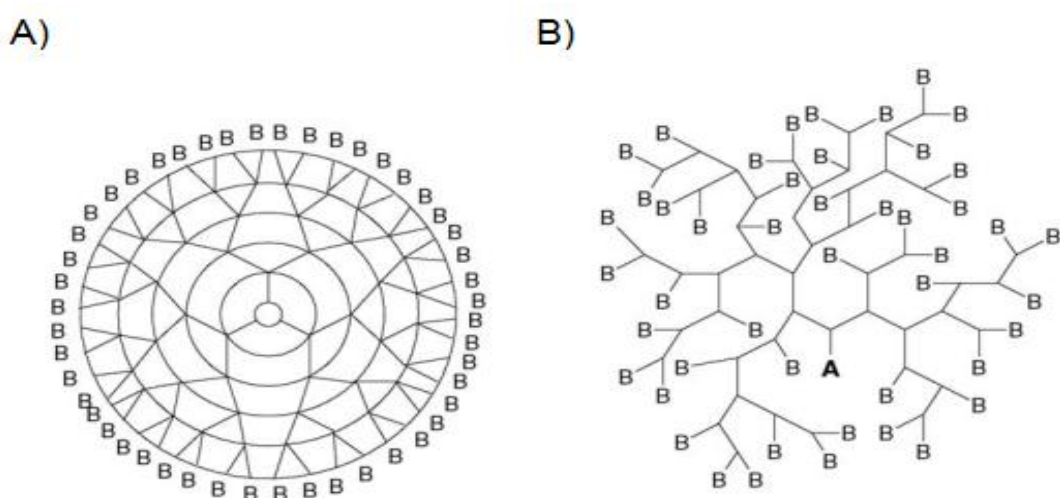


Figura 7. Estructura de los polímeros dendríticos A) dendrímeros y B) polímeros hiperramificados.¹⁷

Los dendrímeros son moléculas con forma de árbol, uniformes y monodispersos; estos se sintetizan con múltiples pasos de reacción y purificación, lo que vuelve la síntesis de estos materiales costosa en materiales y recursos.^{17,18}

Por otra parte los polímeros hiperramificados son moléculas altamente ramificadas, son polidispersos tanto en términos de peso molecular como en los centros de ramificación, es decir, las ramificaciones de estos materiales son azarosas; sin embargo se obtienen en un solo paso de polimerización, lo que los convierte en una opción económicamente viable.^{19,20}

Por su estructura, los polímeros hiperramificados poseen propiedades físicas y químicas únicas, como son una baja viscosidad y un gran número de grupos terminales.²¹

Para conseguir este tipo de materiales se necesita emplear moléculas monómeras multifuncionales. Ej. en este trabajo se emplea como centro de ramificación al ácido 2,2-bis (hidroximetil) propiónico (BHP), que por su estructura se clasifica como un monómero del tipo AB₂ ya que posee un grupo carboxilo (A=COOH) y dos hidroxilo (B=OH).

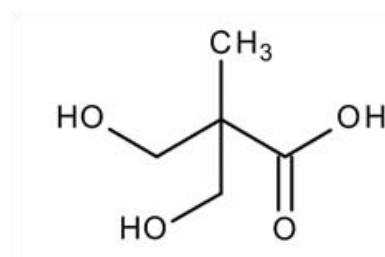


Figura 8. Estructura química del BHP.

Además está documentado, su uso como bloque de construcción junto con la CL en la síntesis de polímeros hiperramificados todos estos por síntesis química.^{16,22,23}

En la literatura científica encontramos que en 1998 Trollså et al.²² generaron un polímero hiperramificado empleando CL y BHP sintetizado mediante polimerización por apertura de anillo usando como iniciador bencilóxido de aluminio; el grupo carbonilo de la CL y los grupos hidroxilo del BHP fueron protegidos con un bencil éster. La reacción se lleva a cabo en tres pasos, la primera reacción se da entre los dos monómeros protegidos, después una desprotección del grupo protector bencil éster y finalmente la polimerización utilizando 4-toluen sulfonato y 4-(dimetilamino) piridina. Obtuvieron pesos moleculares entre 13,000 y 74,000 g/mol y un grado de ramificación de 0.37.

En 1998 nuevamente Trollså et al.²³ sintetizaron un polímero hiperramificado basado en CL y BHP protegido con un bencil éster en masa utilizando octanoato de estaño como catalizador y una temperatura de 100° C seguida de una desprotección del grupo carbonilo del BHP mediante una hidrogenación catalítica empleando paladio; después de la desprotección la polimerización se llevó a cabo en cloruro de metileno utilizando 4-toluen sulfonato y 4-(dimetilamino) piridina. Obtuvieron un polímero hiperramificado con pesos moleculares de entre 37, 000 a 93, 000 g/mol, no reporta grado de ramificación.

Velthoen y colaboradores en 2009 ¹⁶ obtuvieron un poliéster hiperramificado de PCL empleando como iniciador al BHP y un catalizador de octanoato de estaño en una reacción de 7 h a 110 °C obteniendo pesos moleculares entre 1000 y 6000 g/mol y un rendimiento de la reacción de 93%, sin reportar grado de ramificación.

Por otro lado se ha estudiado con anterioridad la síntesis enzimática de polímeros hiperramificados, el grupo del Dr. Frey de la Universidad de Mainz en Alemania, realizó la síntesis de un poliéster hiperramificado basado en CL y ácido 2,2-bis (hidroximetil) butírico (BHB) empleando la CALB inmovilizada, en su experimento realiza la polimerización variando la concentración de BHB, obteniendo polímeros hiperramificados con diferentes grados de ramificación (DB).²⁴

En nuestro grupo de investigación en la Facultad de Química López-Luna y col. (2010), estudiaron la síntesis de co-polímeros hiperramificados de BHB con los monómeros CL y δ -valerolactona (VL) en el medio R-134a comprimido usando la CALB inmovilizada; en este reporte se obtuvieron, en el caso de la VL y BHB, M_n entre 0.9 y 2.0×10^3 g/mol y grados de ramificación de hasta 0.09 y en el caso de la CL M_n de hasta 2.7×10^3 g/mol con un rango de DB de 0.02 a 0.11. ²⁵

Igualmente en nuestro grupo de trabajo la Dra. Mena-Martínez en su tesis de doctorado realizó la síntesis enzimática de poliláctido hiperramificado utilizando como centro de ramificación al BHB, realizó la síntesis en líquido iónico, donde se alcanzaron rendimientos de hasta el 25%, DB de 0.21 y M_n de hasta de 3.6×10^3 g/mol, también estudió un medio basado en la mezcla de líquido iónico y R-134a comprimido; en este experimento encontró que solo mejora el peso molecular alcanzando hasta un máximo 11.2×10^3 g/mol.

En el presente estudio se muestra una alternativa de síntesis de un polímero hiperramificado basado en CL y BHP en un solo paso de reacción catalizado por la CALB sin el empleo de compuestos que dejen trazas de residuos tóxicos en un proceso englobado dentro de la química verde.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

La CALB inmovilizada reconocerá al BHP como centro de ramificación y la CL como sustratos, obteniendo así la integración de estos al polímero, dando como resultado un poliéster hiperramificado.

4.2. Objetivo general

Llevar a cabo la síntesis enzimática de estructuras poliméricas basadas en CL utilizando como co-monómero el BHP.

4.3. Objetivos particulares

- Determinar las mejores condiciones de reacción, variando la concentración de BHP en el medio de reacción para la síntesis de poliésteres hiperramificados.
- Caracterizar los materiales obtenidos mediante técnicas analíticas ^1H -RMN y GPC-SEC.

5. METODOLOGÍA

5.1. Acondicionamiento de los reactivos

Caprolactona

L-ε-CL (Sigma Aldrich, 97%) se colocó en agitación por 12h en un matraz de bola en presencia de hidruro de calcio (Sigma Aldrich, 95%), posteriormente se destiló al vacío para eliminar los inhibidores de síntesis, el destilado se almacenó a 5°C con tamiz molecular (Sigma Aldrich, 3 Å) hasta su uso.

Ácido 2,2-bis (hidroximetil) propiónico

El BHP (Sigma Aldrich, 98%) se almacenó a 5°C, previo a su uso en la reacción se congeló (Ultracongelador REVCO -78 °C), después se liofilizó.

Enzima

La CALB inmovilizada sobre soporte acrílico esférico fue suministrada por C-LEcta (Alemania), con una actividad específica de 6,000 PLU/g (µmoles de laurato de n-propilo producidos por minuto por gramo de catalizador empleado). Se almacenó a 5°C hasta su uso. Antes de llevar a cabo la reacción se congeló (Ultracongelador REVCO -78 °C) y se liofilizó.

5.2. Condiciones de Reacción

Las reacciones se llevaron a cabo en masa por duplicado; en un matraz de bola de 25 mL ubicado en un baño de glicerina sobre una parrilla de agitación y temperatura (75°C) controlada (IKA labortechnik, Alemania).

Se adicionaron 15 mL de CL, los cuales se mantuvieron constantes en todas las reacciones; se cambiaron las concentraciones de BHP alimentadas, el tiempo de reacción y la agitación. La agitación se llevó a cabo con dos metodologías, un agitador magnético cuyas revoluciones por minuto eran controladas por la parrilla de calentamiento y la otra mediante una propela con un control de revoluciones por minuto independiente.

El tiempo de reacción comenzaba a correr cuando se adicionaba la enzima (10% m/m respecto a la CL y BHP).

El diseño experimental se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Diseño experimental.

ENZIMA (%m/m)	Tiempo de reacción (h)	BHP (% molar, respecto a la CL)	Tipo de agitación (rpm)
10	12, 24, 36, 48, 72	3	Magnética 1000 rpm
		5	
		10	
S/E	12, 24, 36, 48, 72	3	Magnética 1000 rpm
		5	
		10	
10	12, 24, 36, 48, 72	3	Propela 2000 rpm

S/E: sin enzima.

5.3. Purificación

Finalizado el tiempo de reacción se agregó cloroformo al matraz y se agitó hasta la disolución total del polímero, se filtró la enzima a través de una rejilla de 80 micras y se hicieron dos lavados con cloroformo al recipiente y al catalizador filtrado para recuperar la mayor cantidad de material posible. Posteriormente se precipitó el polímero goteando la mezcla de reacción en metanol a 5 ° C en una relación 1:10 (CHCl₃/MeOH), el precipitado se filtró usando papel filtro Watman número 1, finalmente se secó por 3h con una bomba de alto vacío a 30°C.

Después de la purificación los materiales obtenidos fueron pesados y se obtuvo el rendimiento en masa de la fracción insoluble en metanol empleando la siguiente ecuación:

Ecuación 1. Rendimiento de reacción.

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

5.4. Caracterización de los materiales obtenidos

5.4.1. Resonancia Magnética Nuclear de Protón H¹- RMN

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

5.4.1.1. Porcentaje de Incorporación

Una vez que se determinaron las señales características de los segmentos lineales (CL) de los puntos de ramificación (BHP) en el espectro de H-RMN se calculó el porcentaje de incorporación a través de la integración de dichas señales ocupando la siguiente ecuación:

Ecuación 2. Porcentaje de incorporación.

$$\% \text{Inserción}_{\text{BHP}} = \frac{\frac{\int \text{BHP}_{1.2}}{n\text{H}_{\text{BHP}}}}{\frac{\int \text{BHP}_{\text{total}}}{n\text{H}_{\text{BHP}}} + \frac{\int \text{CL}_{2.2}}{n\text{H}_{\text{CL}}}} * 100$$

Dónde: $\int \text{BHP}_{1.2}$ es la integral de las dos señales de BHP en 1.2 ppm, $\int \text{CL}_{2.2}$ es la integral de la señal de la PCL, $n\text{H}_{\text{BHP}}$ es el número de hidrógenos correspondientes a la señal del BHP en 1.2 ppm y $n\text{H}_{\text{CL}}$ es el número de hidrógenos correspondientes a la señal de PCL en 2.2 ppm.

Ya cuando se identificó que el BHP se incorporaba al polímero de dos maneras distintas, lineal y dendrímica, se calculó su respectivo porcentaje de incorporación mediante la misma ecuación, sustituyendo la integral de la señal dendrímica ubicada en 1.27 ppm y la ubicada en 1.24 ppm correspondiente al residuo lineal.

5.4.1.2. Grado de Ramificación

Así mismo se calculó el grado de ramificación o “DB” por sus siglas en inglés “D g o B chi g”. La cual es una función estadística que relaciona los segmentos lineales y las ramificaciones de una macromolécula, dicha función toma valores entre 0 y 1, siendo 0 un polímero lineal y 1 un polímero con estructura dendrímica perfecta.

De acuerdo a la ecuación descrita por H.Frey y D.Hölter²⁶, el DB se calcula de la siguiente manera:

Ecuación 3. Grado de ramificación.

$$DB_{AB/AB_2}^{stat} = 2 \frac{1 - X_{AB}}{(2 - X_{AB})^2}$$

Dónde: X_{AB} es la fracción molar de los segmentos lineales presentes en el polímero hiperramificado, determinados por la señal en 2.2 ppm de la PCL.

5.4.2. Cromatografía de Exclusión de Tamaño (SEC)

La Cromatografía de permeación en gel se realizó en un equipo GPC con un detector de índice de refracción y dos columnas en serie PLGEL 10 cm MIXED-B 300 x 7.5 mm (1106-6100 LS, Varian, USA) montadas en un termostato a 25 °C (1200-G1316, Agilent, USA). La fase móvil fue cloroformo grado HPLC, a la temperatura del termostato y a un flujo de 1mL/min, el volumen de inyección fue de 10µL. Las muestras se prepararon disolviendo 5 mg de polímero en 2 ml de cloroformo grado HPLC y se filtraron empleando acrodiscos de 0.45 µm, previo al análisis por el cromatógrafo.

Se compararon las distribuciones de peso molecular de las muestras contra estándares calibrados de poliestireno de pesos moleculares entre 150 y 24600 g/mol utilizando el software Cirrus versión 2005.

5.5. Actividad Enzimática

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

Para la determinación de la actividad se realizó una curva de calibración (concentración contra absorbancia) con soluciones patrón de PNP. Se prepararon soluciones con concentraciones de 25, 50, 100, 250 y 500 µM en matraces aforados de 10 ml con buffer de fosfatos (50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄,

pH 7.0) y 0.2% de emulsificante (Tritón X-100). Para la reacción en una celda de UV-visible se agregan 100 µl de una solución con una concentración 100 µmolar de p-nitrofenil acetato y 1.9 ml de buffer de fosfatos, finalmente se añaden 2 miligramos de enzima soportada. El espectrofotómetro registra el cambio de la absorbancia con respecto al tiempo durante un periodo de 2 minutos, durante este periodo de tiempo la actividad enzimática presenta un comportamiento lineal en relación al producto de la hidrólisis.

El ensayo se midió en una longitud de onda de 410 nm a 25 °C, pH 7 y una presión atmosférica de 585mmHg

Para obtener la actividad enzimática se emplea la siguiente ecuación:

Ecuación 4. Ecuación para el calcular la actividad enzimática.

$$Actividad \left[\frac{\mu mol}{min * g} \right] = \left(\frac{X \left[\frac{Abs}{min} \right]}{m \left[\frac{Abs}{\mu M} \right]} \right) * \left(\frac{V[L]}{E[g]} \right)$$

Dónde: **X** es el cambio de absorbancia con respecto al tiempo, **m** es la pendiente de la curva patrón, **V** es el volumen en el que se realizó el ensayo y **E** es la masa de enzima empleada.

5.6. Cuantificación de la Caprolactona

La cuantificación de la ε-CL se llevó a cabo mediante cromatografía de gases utilizando un cromatógrafo (HP 5890 SERIES II) y una columna Crompack capillary column (HP, WCOT Fused silica, fase estacionaria CP-Wax-52 CB, largo de la columna 30m, diámetro interno 0.25mm y diámetro externo)

Para la cuantificación se elaboró una curva patrón (concentración contra área) de la CL, se prepararon soluciones con concentraciones de 0.1%, 0.5%, 1% y 5% v/v en matraces aforados de 1 mL utilizando cloroformo grado HPLC como disolvente. Se tomaron alícuotas del seno de la reacción (100µL) a las 12, 24, 36, 48 y 72h, las muestras se disolvieron en 2 mL de cloroformo grado HPLC y se filtraron utilizando acrodiscos de 0.45µm de tamaño de poro.

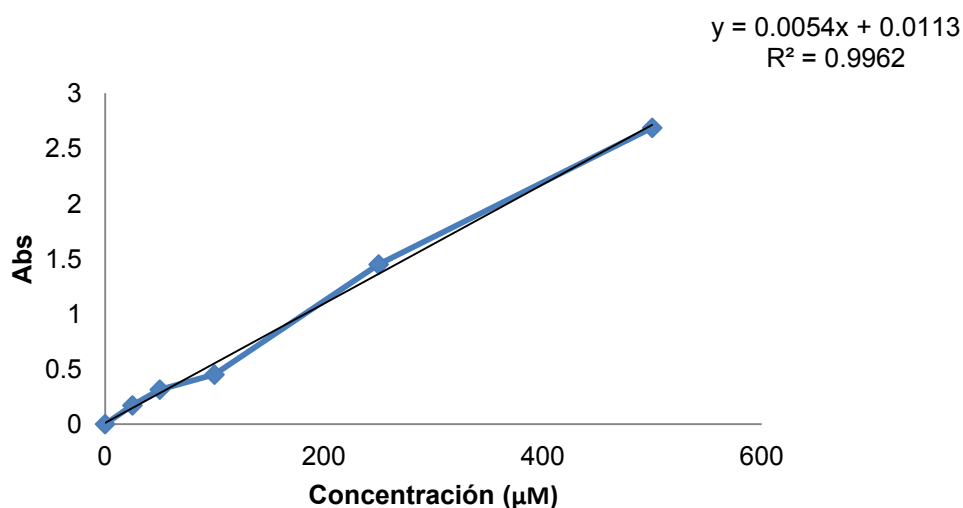
Las condiciones del análisis fueron las siguientes:

Gas acarreador N₂ (Infra, 99.998%), H₂ (Infra, 99,998%) y aire comprimido (Praxair), temperatura inicial de 40°C, se mantiene constante por 3 min, posteriormente inicia una rampa de calentamiento 10°C/min hasta alcanzar 250°C, temperatura del detector 270°C y temperatura del inyector 250°C, el volumen de inyección fue de 1µL. Bajo estas condiciones la CL tiene un tiempo de retención de 10min.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Actividad enzimática inicial.

Con la finalidad de establecer un parámetro de la actividad enzimática de la CALB utilizada, se determinó la actividad enzimática inicial empleando la reacción de hidrólisis de PNPA. Se realizó una curva patrón de PNP (Gráfica 1) el cual es el producto de la hidrólisis del PNPA y que en disolución acuosa presenta coloración amarilla; esta es una técnica espectrofotométrica.



Gráfica 1. Curva patrón de p-Nitrofenol.

La reacción se realizó por quintuplicado y los resultados de dicha determinación se muestran en la Tabla 3; cabe resaltar que la enzima se encuentra inmovilizada sobre un soporte acrílico esférico (3.4% de proteína). En la Tabla 3 se presentan los gramos de enzima soportada, el cambio de absorbancia con el tiempo y finalmente el dato numérico de la actividad de cada uno de los ensayos que se calculó mediante la Ecuación 4, así como el valor promedio de la actividad. Como se puede observar, la actividad enzimática que se manejó es de $5081.8 \mu\text{mol}/\text{min} * \text{g}$.

Tabla 3. Resultados de la determinación de la actividad enzimática.

Enzima(g)	dAbs/dt	Actividad ($\mu\text{mol}/\text{min} * \text{g}$)	Promedio($\mu\text{mol}/\text{min} * \text{g}$)
0.0000748	1.0015	4958.9	5081.8±717.1
0.0000646	0.8351	4787.9	
0.000085	0.9482	4131.6	
0.0000612	0.9928	6008.2	
0.000068	1.0139	5522.3	

6.2. Síntesis enzimática de Poli (CL-co-BHP)

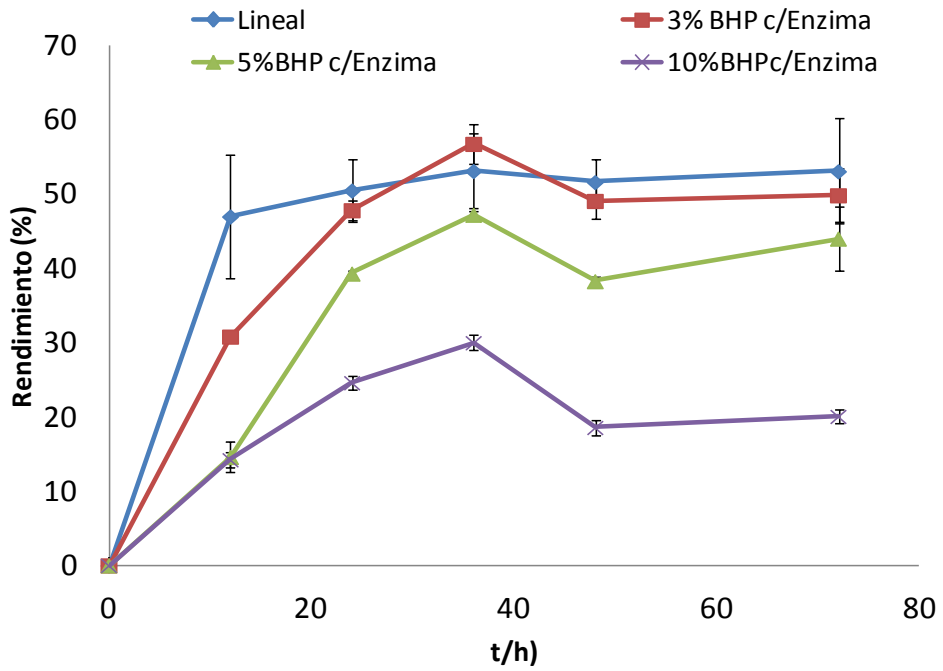
En este proyecto se realizó la síntesis de un polímero hiperramificado empleando como monómeros la CL y el BHP. La síntesis se llevó a cabo a una temperatura de 75 °C y por duplicado, en un medio de reacción en masa en la que la CL servía como monómero y a su vez como medio de reacción.

En la polimerización la cantidad de CL se mantenía constante (15 mL). Se evaluó la influencia de la concentración en porcentaje molar del BHP (3%, 5% y 10%) en el seno de la reacción y el efecto catalítico de la CALB; para lo cual se montaron una serie de reacciones en presencia de la enzima (10% m/m con respecto a los monómeros) y una serie de reacciones sin enzima, con el objetivo de evaluar una posible reacción química.

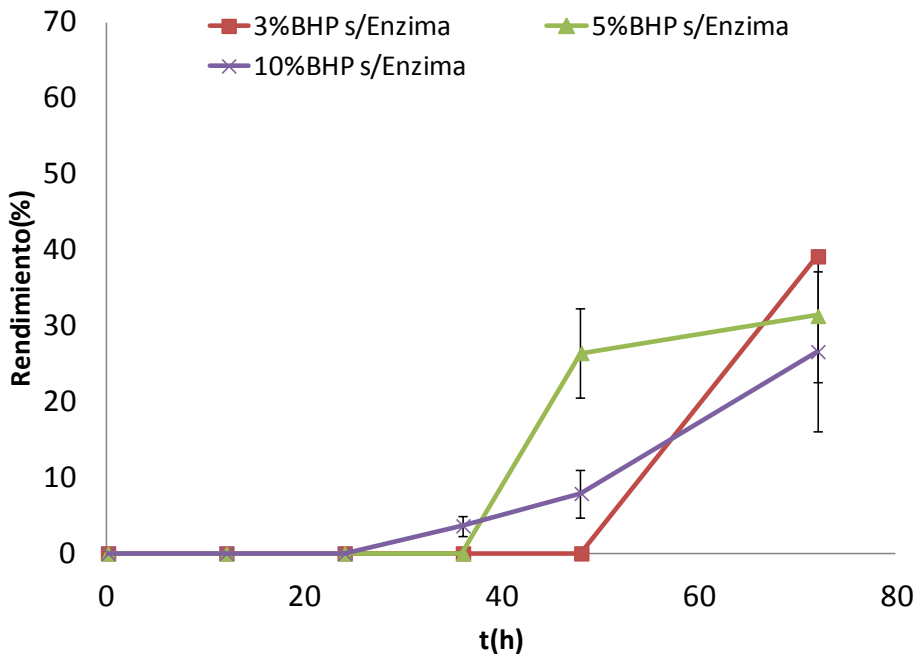
Adicionalmente se realizó la síntesis del polímero lineal para poder comparar el polímero hiperramificado sintetizado con el polímero lineal de la CL.

El primer parámetro obtenido de la reacción es el rendimiento de la misma, el cual se calculó por el porcentaje en peso del producto ya purificado y seco. En la Gráfica 2 se observa la relación rendimiento contra tiempo de las reacciones de copolimerización de las diferentes concentraciones de BHP alimentadas. La gráfica 2A presenta los rendimientos de las reacciones enzimáticas, mientras que la gráfica 2B presenta los rendimientos de las reacciones realizadas en ausencia de la CALB.

A)



B)



Gráfica 2. Rendimiento de reacción de la síntesis del co-polímero A) Reacción enzimática B) Reacción química.

Comparando las reacciones realizadas en presencia de CALB y las reacciones que se llevaron a cabo sin enzima, se puede apreciar el efecto catalítico de la

enzima, ya que se observa una disminución en los tiempos de reacción, obteniendo rendimiento desde las 12h de reacción, mientras que para el producto en la reacción química se aprecia rendimiento hasta las 36h de reacción y en todos los casos evaluados se obtiene un mejor rendimiento en los polímeros que se sintetizaron en presencia de la enzima. Cabe resaltar que para la reacción en ausencia de enzima y BHP no se obtuvieron rendimientos.

Analizando los rendimientos obtenidos enzimáticamente pero con distintas concentraciones de BHP en el medio de reacción, encontramos que a mayor concentración se presenta una disminución general del rendimiento obtenido comparado con el polímero lineal y que para las tres concentraciones evaluadas de BHP se observa la misma tendencia, se encuentra un máximo de rendimiento a las 36h de reacción seguido de un descenso del rendimiento a las 48h, que podría deberse a la hidrólisis enzimática del polímero y una estabilización a las 72h.

Como se mencionó anteriormente, se observa que en las reacciones control que se montaron en ausencia de enzima, ocurre reacción química en presencia de BHP y que a mayor concentración de éste en el medio de reacción se obtienen rendimientos a menores tiempos de reacción. Esto se supone puede deberse a la hidrólisis ácida de la CL por efecto de BHP y posterior policondensación⁴ entre el grupo carboxilo presente en la CL y los grupos hidroxilo presentes en el BHP, una condensación entre el hidroxilo terminal de la cadena abierta de la lactona y el carboxilo del BHP. Aunque también como se ha descrito en la introducción puede ocurrir una PAA por activación de monómero. Lo que resulta evidente por las observaciones experimentales es que la presencia del ácido afecta a la polimerización no enzimática puesto que no se obtuvo producto en la reacción control en ausencia de BHP y enzima.

6.3. Caracterización de los materiales obtenidos

6.3.1. Resonancia Magnética Nuclear

Con el fin de conocer la estructura del polímero sintetizado y determinar si el BHP se estaba incorporando a la cadena polimérica, se caracterizaron los materiales mediante resonancia magnética de protón $^1\text{H-RMN}$.

En primer lugar se caracterizó la PCL obtenida (Figura 9), para conocer las señales características de los hidrógenos medibles del polímero lineal y posteriormente compararlo con las señales del polímero hiperramificado.

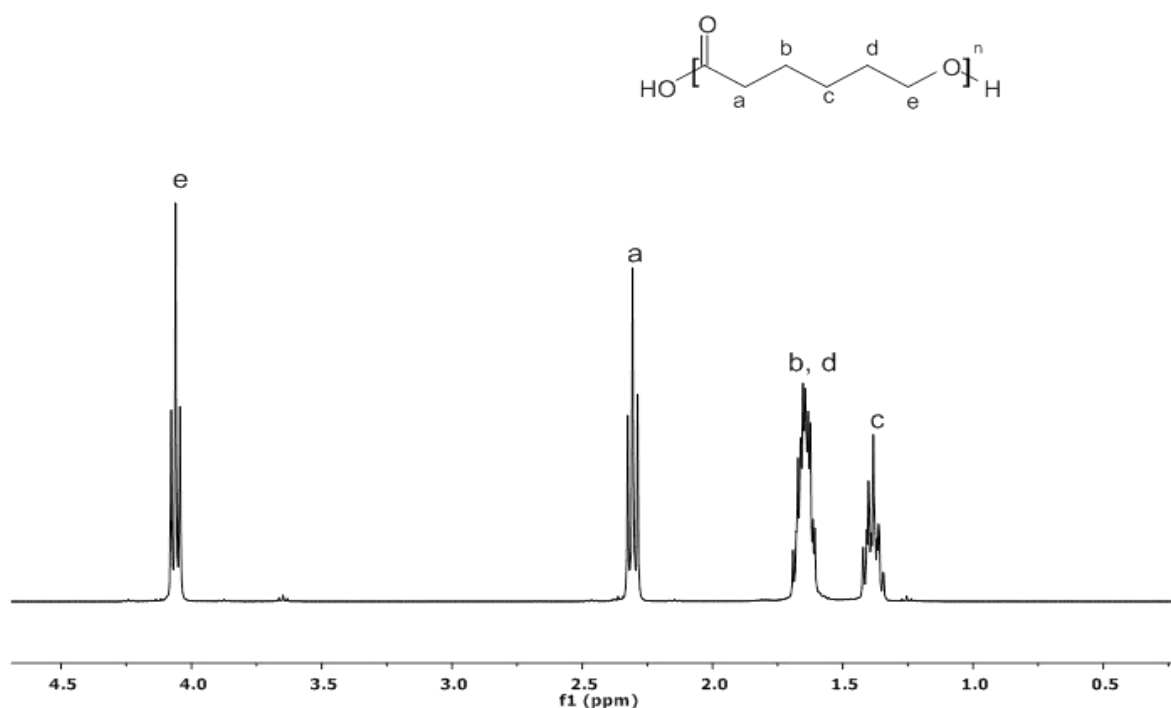


Figura 9. Espectro de resonancia magnética nuclear de protón de la PCL.

Se asignaron las siguientes señales de hidrógenos medibles al espectro obtenido: H **a** (triplete, 2.30 ppm $-\text{COCH}_2-$), H **b** y **d** (multiplete, 1.62 ppm $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), H **c** (multiplete, 1.38 ppm $-\text{CH}_2-$) y H **e** (triplete 4.06 ppm $-\text{CH}_2\text{OH}$).

Posteriormente se caracterizaron los poliésteres obtenidos de las reacciones en presencia de BHP. En la Figura 10 se presenta el espectro de protón del copolímero sintetizado, el cual confirma la incorporación del co-monómero AB_2 ,

ya que se observan otras señales diferentes a los desplazamientos químicos característicos de los protones de la PCL representadas con las letras **a**, **b**, **c**, **d** y **e** señaladas anteriormente.

El ^1H -RMN del poliéster hiperramificado además presenta un aumento de intensidad de la señal en 3.64 ppm representada con la letra **e'**, lo que indica un aumento en el número de grupos $-\text{CH}_2\text{OH}$ terminales, este dato representa un buen indicativo de que la hiperramificación se está llevando a cabo, ya que implicaría el aumento de grupos hidroxilo terminales.

Aparecen dos señales nuevas en 1.24 y 1.26 ppm representadas con la letra **g** y **g'** ausentes en el espectro del polímero lineal, dichas señales pertenecen al $-\text{CH}_3$ terminal del BHP, una señal en 4.2 ppm $-\text{CH}_2\text{O}-$ sustituido de acuerdo con Trollsas et al.²²

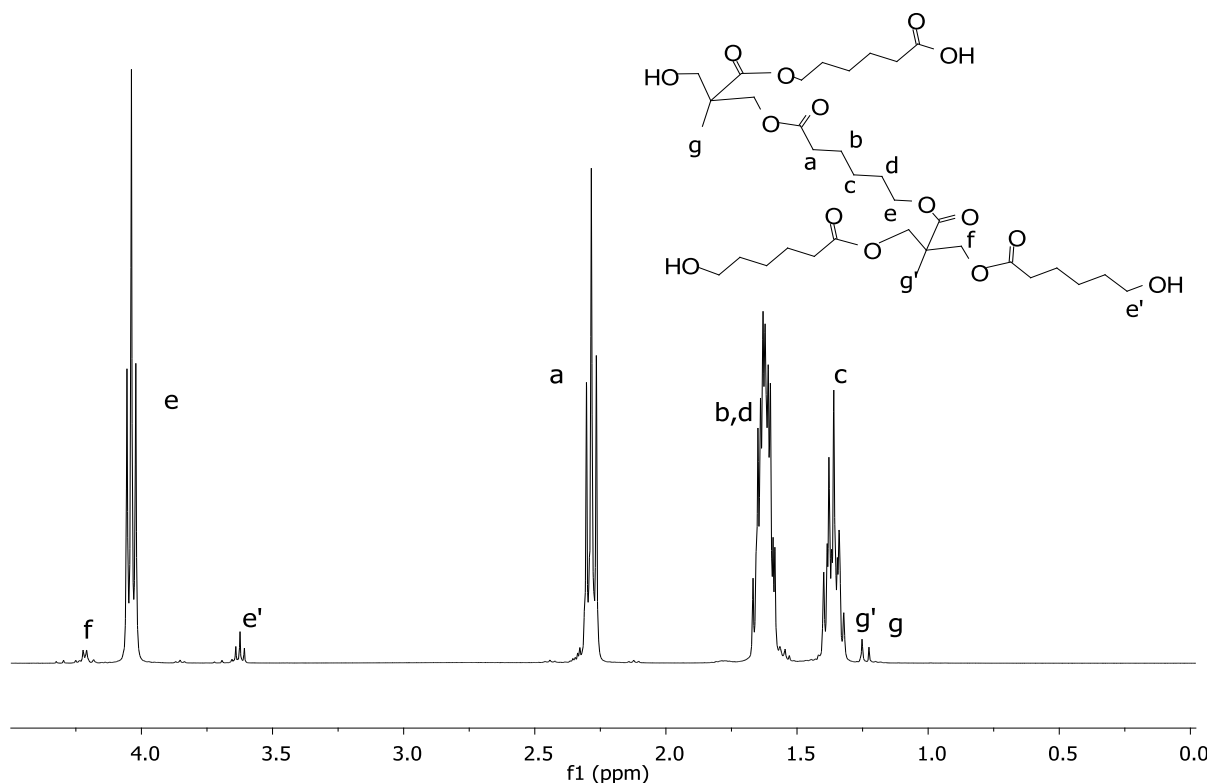


Figura 10. ^1H -RMN Poli (CL-co-BHP)

De acuerdo con el espectro del polímero hiperramificado, el BHP se está incorporando al polímero de dos maneras, lineal (señal en 1.24 ppm), sustituido

en el grupo carboxilo y en un grupo hidroxilo y dendrímica (señal en 1.26 ppm), sustitución completa de los grupos funcionales del BHP, en su grupo carboxilo y los dos hidroxilo (Figura 11). Lo cual coincide con lo reportado previamente por Trollsas et al.²²

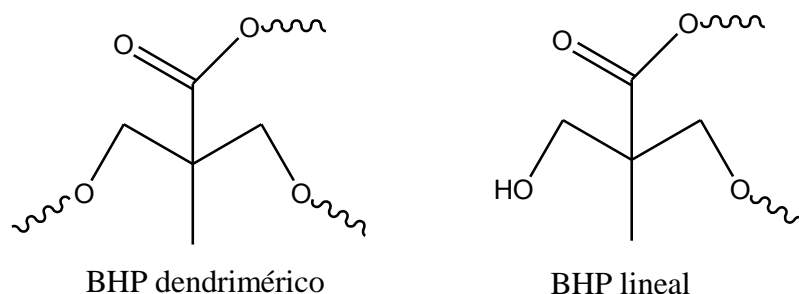


Figura 11. Estructuras químicas de las dos incorporaciones del BHP encontradas en el polímero hiperramificado.

Ya que se confirmó que se estaba dando la incorporación del co-monómero BHP a la cadena polimérica se propone el siguiente esquema de reacción (Figura 12).

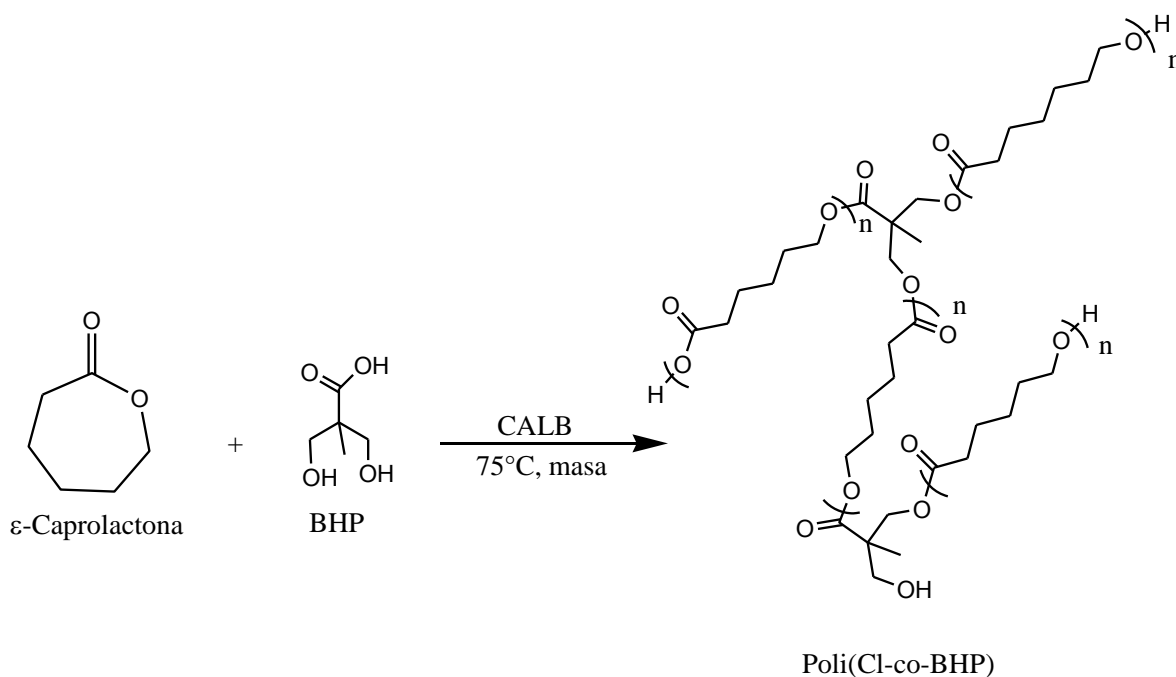


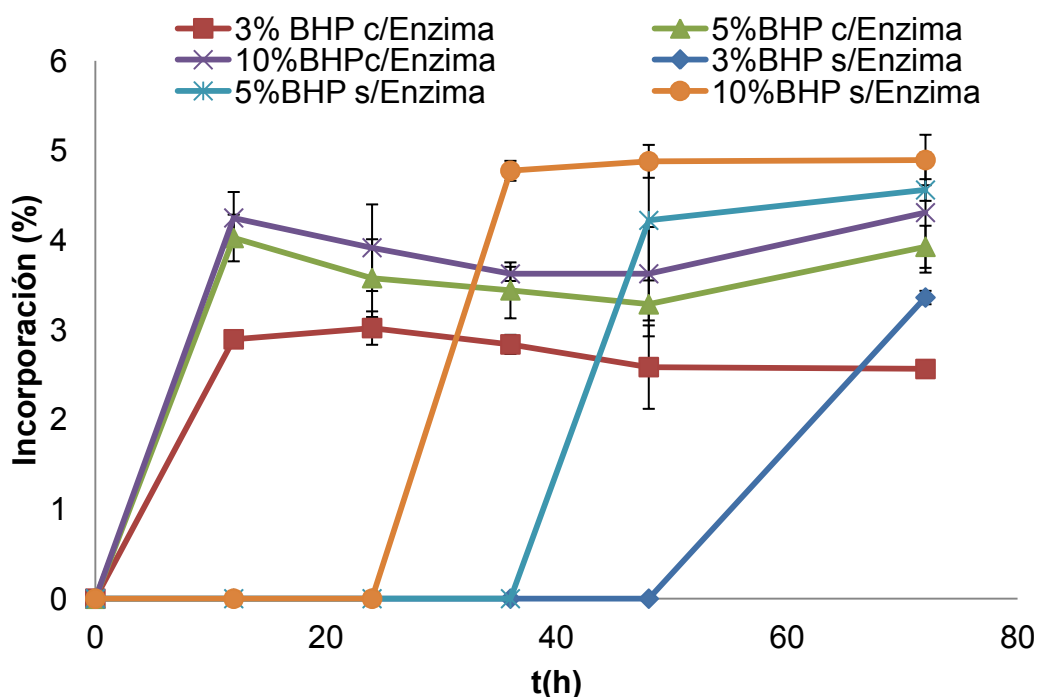
Figura 12. Esquema de reacción de la síntesis de Poli(CL-co-BHP) en masa.

Se analizaron los espectros de cada uno de los materiales obtenidos calculando el porcentaje de incorporación y el DB con el fin de determinar si

dichos parámetros varían con respecto al tiempo de reacción y observar la influencia de la concentración de BHP alimentada.

Los resultados del porcentaje de incorporación se presentan en la Gráfica 3. Para los materiales obtenidos enzimáticamente la incorporación del BHP aumenta con respecto al porcentaje de BHP en el seno de la reacción, obteniendo una mayor incorporación para los materiales sintetizados con 10% molar de BHP alimentado. También observamos que el porcentaje de incorporación se mantiene constante con respecto al tiempo.

Por otra parte los materiales sintetizados en ausencia de enzima presentan una mayor incorporación de BHP, que los obtenidos enzimáticamente y para el caso de 10% molar de BHP que es la condición probada en la que se tienen rendimientos a menores tiempos de reacción, podemos apreciar que el porcentaje de incorporación se mantiene constante con respecto al tiempo, al igual que en la síntesis enzimática.



Gráfica 3. Porcentaje de incorporación molar de BHP en los polímeros hiperramificados.

Analizando los espectros de RMN se observó que a pesar de que el porcentaje de incorporación de BHP es constante con respecto al tiempo, la relación entre

BHP lineal y dendrimérico incorporado a la cadena polimérica varía con respecto a éste para los materiales obtenidos enzimáticamente.

La Figura 13 muestra una ampliación de la región metílica del espectro de los polímeros hiperramificados obtenidos con 3% molar de BHP en el medio de reacción, con el fin de exponer de manera gráfica el cambio en la relación de BHP incorporado en los materiales obtenidos enzimáticamente.

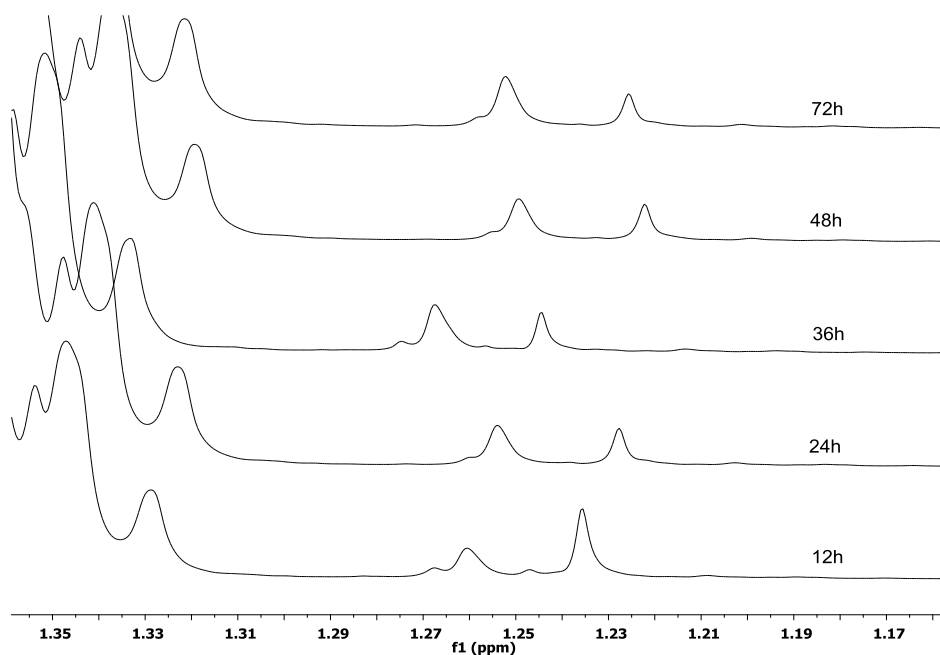


Figura 13. Ampliación de la región metílica de los espectros de H-RMN de los polímeros hiperramificados sintetizados con 3% de BHP.

Cabe destacar que para la síntesis enzimática de las tres concentraciones de BHP alimentada se obtuvo la misma tendencia.

Los resultados numéricos del análisis del tipo de inserción se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Relación del porcentaje de incorporación lineal y dendrimerico, con respecto al tiempo

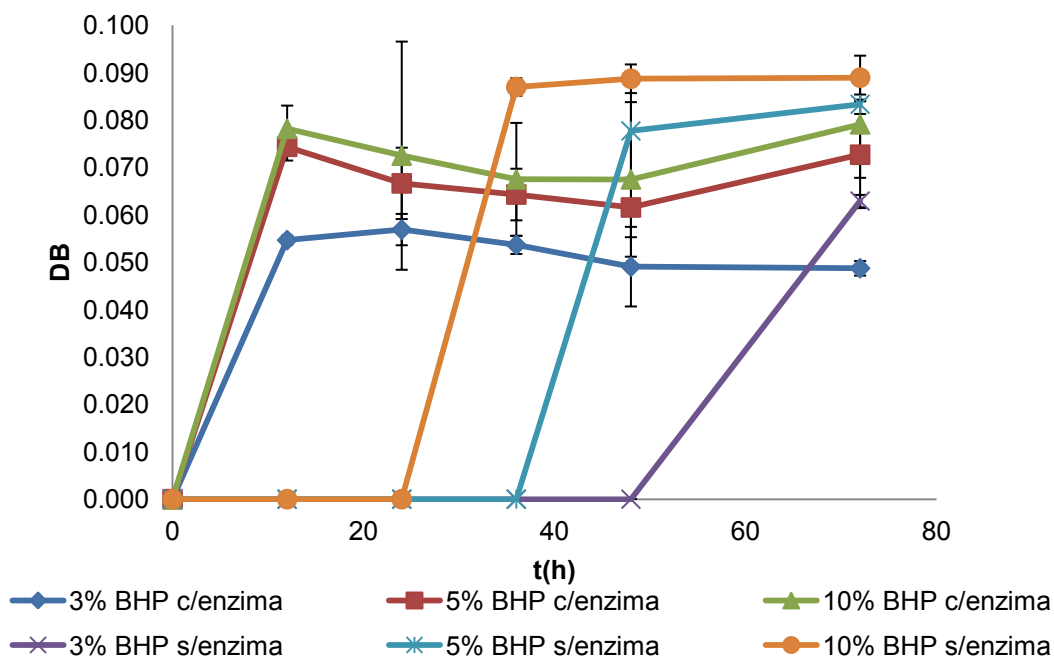
% molar BHP	Tiempo de reacción (h)	Con enzima			Sin enzima		
		% Total	% Dendrítico	% Lineal	% Total	% Dendrítico	% Lineal
3	12	2.9	1.14	1.75	-	-	-
	24	3.0	1.87	1.15	-	-	-
	36	2.8	1.86	0.97	-	-	-
	48	2.6	1.63	0.95	-	-	-
	72	2.6	1.73	0.83	3.4	2.6	0.7
5	12	4.0	1.85	2.17	-	-	-
	24	3.6	2.30	1.28	-	-	-
	36	3.4	2.34	1.10	-	-	-
	48	3.3	2.02	1.27	4.2	3.5	0.7
	72	3.9	2.49	1.44	4.6	3.8	0.8
10	12	4.2	1.93	2.32	-	-	-
	24	3.9	2.39	1.52	-	-	-
	36	3.6	2.11	1.51	4.8	3.6	1.1
	48	3.6	2.16	1.47	4.9	3.7	1.2
	72	4.3	2.53	1.77	4.9	3.8	1.1

Se puede observar que para los materiales sintetizados en ausencia de CALB, la incorporación del BHP desde que se obtienen rendimientos es dendrimerica principalmente.

Se puede observar que para la reacción enzimática a las 12 h de reacción la mayor parte del BHP incorporado se encuentra de forma lineal, de las 24 h de reacción en adelante se invierte la relación de BHP incorporado, aumentando la presencia de BHP dendrimerico en el polímero hiperramificado al final de la reacción. Estos datos podrían indicar que hay un posible reconocimiento enzimático de los grupos hidroxilo del BHP, y que estos estén funcionando como el nucleófilo que ataca al intermediario acil enzima formado entre la CL y la CALB. Sin embargo, no se puede concluir que dicho comportamiento se deba únicamente a la vía enzimática ya que no es posible comparar los datos de las primeras horas de reacción enzimática con las primeras horas de la reacción química, ya que en estas últimas se obtienen rendimientos hasta las

36 h de reacción en el mejor de los casos y a este tiempo en la reacción enzimática ya se ha dado la inflexión del BHP incorporado.

Otro parámetro calculado de los espectros de H-RMN fue el DB, los resultados obtenidos se muestran en la Gráfica 4.



Gráfica 4. Grado de ramificación de los polímeros hriperramificados.

El grado de ramificación es un parámetro que ayuda a explicar la estructura de los polímeros hiperramificados; en los polímeros hiperramificados existen tres unidades de repetición: dendrítica; lineal y terminal, la distribución de éstas dentro del polímero depende de los grupos B sin reaccionar de los monómeros (tipo AB_x).

Como se comentó anteriormente la ecuación para calcular el DB es una función estadística que toma en cuenta la distribución de las tres unidades de repetición en el polímero hiperramificado. En la Gráfica 4 se observa que el mayor DB es alcanzado por los materiales obtenidos en ausencia de la enzima y que aumenta con respecto a la concentración de BHP alimentada; el DB se mantiene constante con respecto al tiempo para todos los materiales al igual que el porcentaje de incorporación

El hecho de que tanto el DB y el porcentaje de incorporación sigan patrones parecidos, es decir, se mantengan constantes con respecto al tiempo y que los

materiales que presentaron el mayor valor de estos parámetros sean los obtenidos en ausencia de enzima, hace suponer que la incorporación al polímero del BHP como centro de ramificación, es decir, que se forme un enlace entre el grupo carboxilo del BHP y el hidroxilo de la lactona se dé vía química; no tanto así de los grupo hidroxilo del BHP en los que se podría suponer un reconocimiento enzimático como nucleófilo que ataque a los complejos acil enzima.

6.3.2. Discusión de los resultados de la SEC

La SEC permite determinar distribución de pesos moleculares de los polímeros obtenidos debido a la diferencia de volumen hidrodinámico de las moléculas. Las moléculas de menor tamaño son retenidas por más tiempo dentro de los poros de la columna, debido a la mayor permeación por estos, en comparación con las moléculas de mayor tamaño que no tienen acceso a los poros de la columna y son eludidos a menor tiempo de retención en columna.

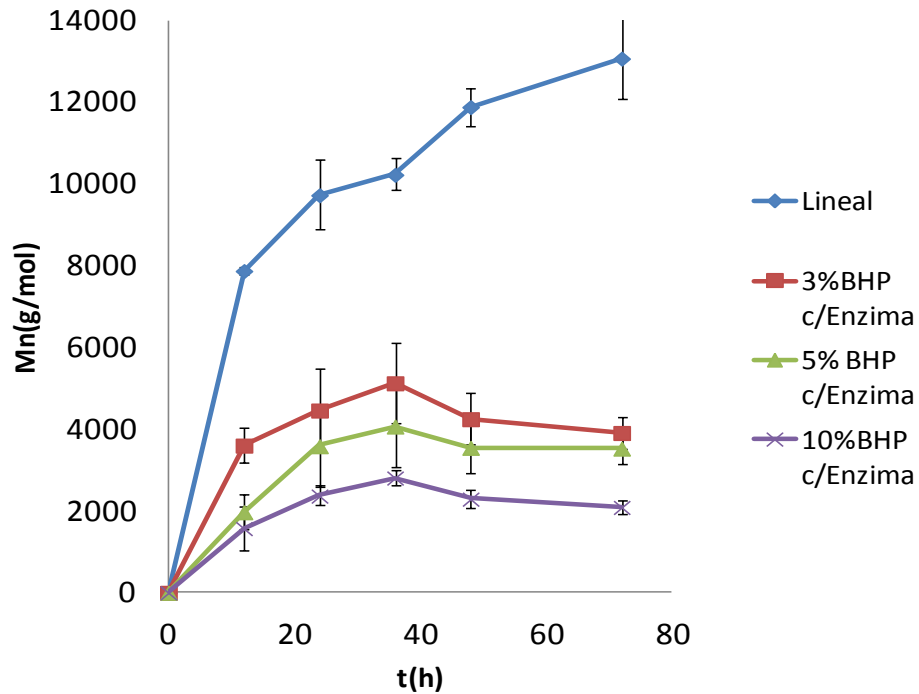
En esta determinación se comparan los tiempos de retención de los polímeros sintetizados contra los tiempos de retención de estándares de poliestireno con pesos moleculares conocidos. Ésto produce cierto error al comparar con tiempos de retención de estándares lineales de diferente estructura molecular, y este error es mayor cuando se analizan hiperramificaciones. Éste último debido a que el volumen hidrodinámico en una molécula estructuralmente más esférica está más alejado del peso molecular real o absoluto al compararlo con los estándares.

Los datos obtenidos de este análisis son el peso molecular numeral (M_n), el peso moléculas promedio (M_w) y la polidispersidad (PDI) que es el cociente entre los dos primeros.

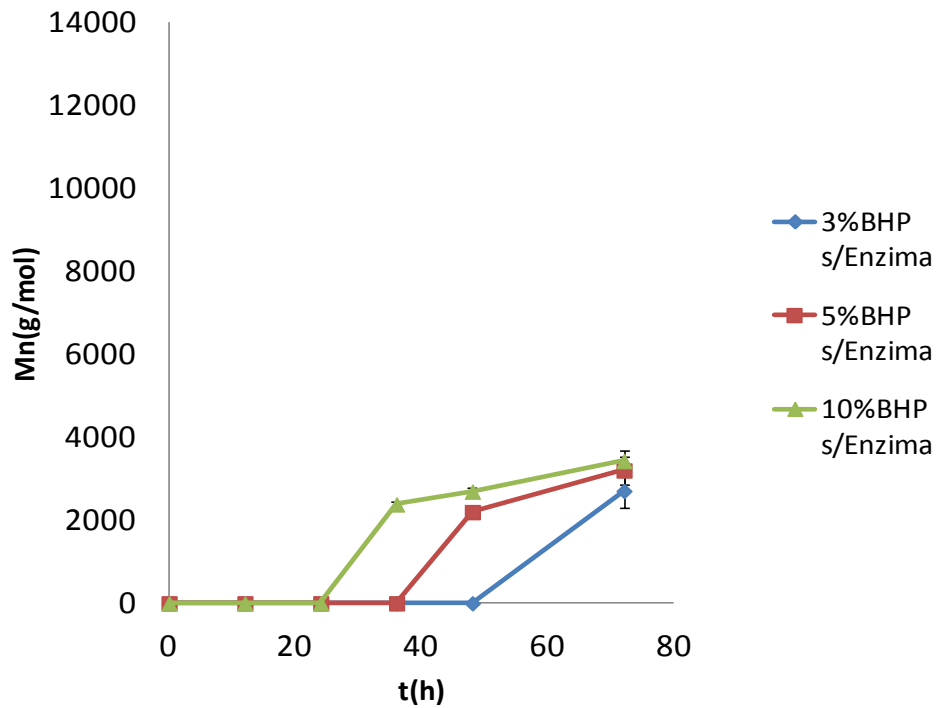
Para el polímero lineal se obtuvieron PDI de entre 1.7 y 2.9, para los polímeros hiperramificados sintetizados enzimáticamente se obtuvieron PDI de entre 1.5 y 2.4 y para los polímeros sintetizados en ausencia de CALB se alcanzaron PDI de 1.4 y 2.0. Estos valores no se pudieron correlacionar con el rendimiento, con el M_n o él concentración de BHP alimentado.

En la Gráfica 5 se presentan la distribución de pesos moleculares obtenidos para los polímeros sintetizados.

A)



B)



Gráfica 5. Pesos moleculares de la síntesis del co-polímero A) Reacción enzimática B) Reacción química.

Analizando los pesos moleculares tenemos que por vía enzimática hay una disminución de los pesos moleculares a medida que la concentración de BHP fue aumentada en el seno de la reacción, alcanzando mayores pesos moleculares para el polímero lineal (Gráfica 5A), conjuntando estos resultados con los rendimientos conseguidos puede ser posible que el BHP tenga un efecto inhibitorio en la CALB. Teniendo en cuenta que estos valores son matizables por el efecto hidrodinámico del analito-fase móvil antes descrita.

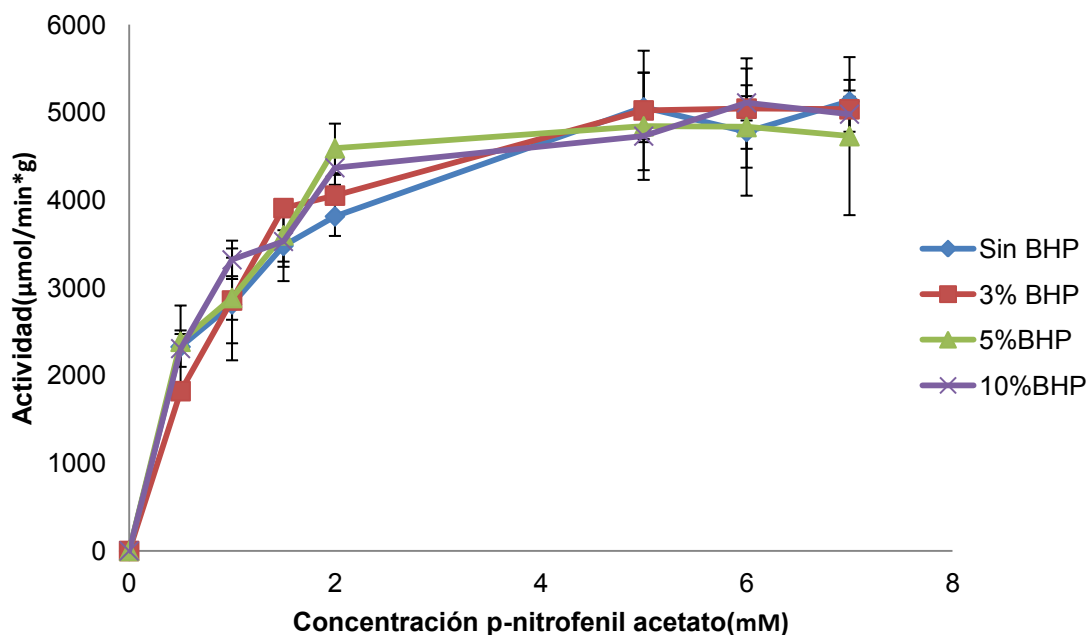
De igual manera, para el peso molecular se observó la misma tendencia que se obtuvo en los rendimientos de los polímeros hiperramificados, un máximo de peso molecular a las 36h seguido de un descenso del peso molecular a las 48h, que probablemente se deba a la hidrólisis enzimática del polímero y finalmente una meseta a las 72h, que puede deberse a que se alcanzó un equilibrio entre la polimerización y la hidrólisis del polímero.

Por otra parte, en las reacciones no enzimáticas (Gráfica 5B) los pesos moleculares alcanzados a 72 h son similares para las tres condiciones estudiadas pero aumentan a medida que la relación de BHP alimentada incrementó, en el caso de 10% molar de BHP, los pesos moleculares alcanzados son mayores que los obtenidos enzimáticamente. Probablemente el mecanismo de reacción por el que se lleva a cabo es la policondensación lo cual podría explicar los bajos pesos moleculares obtenidos, ya que por esta vía es desfavorable alcanzar altos pesos moleculares.⁴

6.4. Inhibición Enzimática

Debido a los resultados obtenidos en la síntesis de la PCL hiperramificada, donde se observa que, entre mayor es la concentración de BHP en el seno de la reacción se da una disminución tanto del rendimiento de la reacción como en el peso molecular del polímero hiperramificado, surgió la hipótesis de una probable inhibición de la CALB por el ácido.

Se realizó una prueba de inhibición en la que se usó la técnica para la determinación de actividad enzimática referida en la metodología (**apartado 5.5**) adicionando a la celda la concentración de BHP a probar (3,5 y 10% molar con respecto al PNPA).



Gráfica 6. Determinación de la inhibición del BHP en la actividad enzimática.

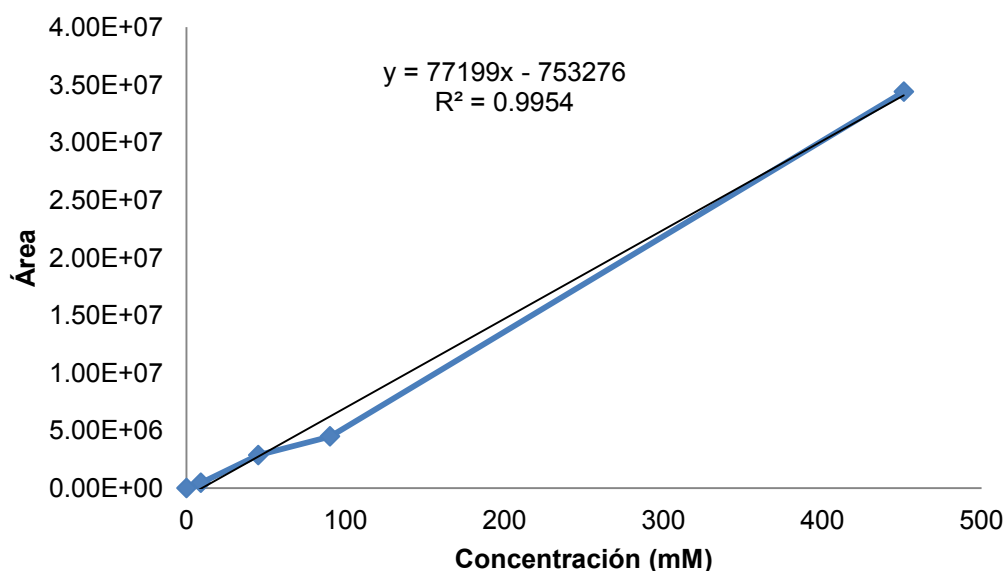
En la Gráfica 6 se observa que el BHP en las condiciones probadas no inhibe a la enzima. El hecho que no se observe una inhibición por parte del BHP a la actividad enzimática de la CALB puede deberse por un lado a que esta técnica se conduce en medio acuoso y no orgánico como la CL, pero por otro lado puede deberse a que el BHP no esté siendo reconocido como sustrato de la enzima, lo que quiere decir que no está entrando al sitio activo a formar el IAE, lo que estaría en concordancia con los resultados de RMN en donde hay indicios, que la integración al polímero del BHP como centro de ramificación, es decir, que se esté formando un enlace entre el carboxilo del BHP y el grupo hidroxilo del poliéster se da vía química. Así mismo la incorporación como comonomero lineal al polímero, es decir, el enlace éster formado entre los grupos hidroxilo de BHP y el grupo carboxilo de las formas lineales pueda darse vía enzimática, además de condensación química.

6.5. Cuantificación de la CL en el medio de reacción

Con el fin de realizar un monitoreo de la reacción y ayudar a comprender el descenso de rendimiento y peso molecular debido a la concentración BHP en la reacción enzimática, se decidió cuantificar la concentración de la CL

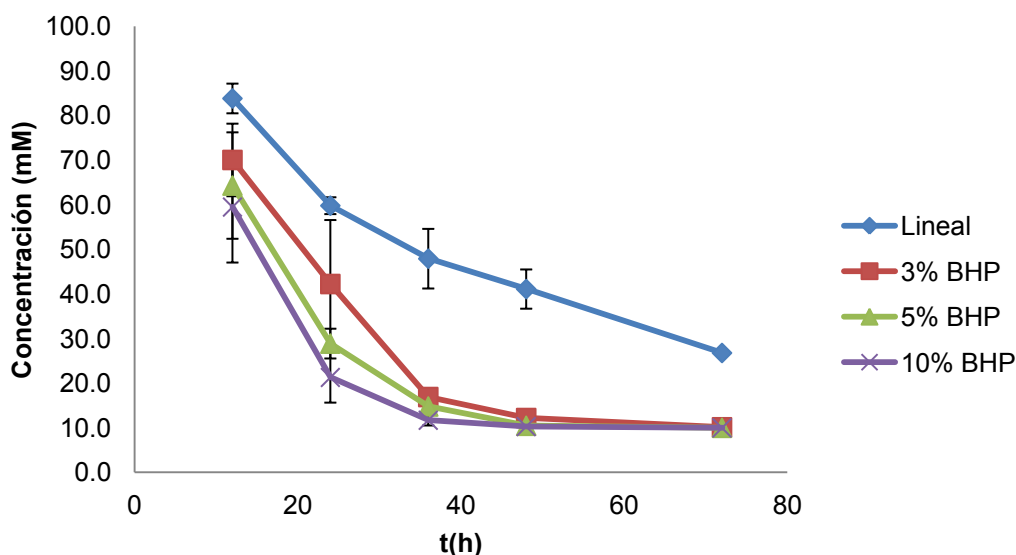
(monómero cíclico) y observar su cambio con respecto al tiempo de reacción. La determinación se realizó mediante cromatografía de gases.

A continuación se presenta la curva patrón para este análisis (Gráfica 7), la cual se realizó con distintas concentraciones del monómero cíclico CL disueltas en cloroformo grado HPLC.



Gráfica 7. Curva patrón CL.

Para este experimento se montaron reacciones por duplicado. Se montó una reacción control, la cual es la síntesis enzimática del polímero lineal PCL y adicionalmente reacciones enzimáticas en presencia de las tres concentraciones de BHP probadas en este estudio, con el fin de observar cómo afecta la presencia del BHP en el consumo de la CL. Se tomaron muestras de 100 μ L a cada tiempo de reacción evaluado (12, 24, 36, 48 y 72 h). Los resultados del experimento se presentan en la Gráfica 8.



Gráfica 8. Cuantificación de la concentración de la CL durante el transcurso de la reacción.

En este experimento se aprecia el consumo del monómero cíclico CL por la enzima y el efecto producido por la adición de BHP a la reacción enzimática (Gráfica 8). Se observa que el BHP favorece el consumo del monómero cíclico CL, ya que, para las tres concentraciones probadas, la CL prácticamente es consumida en su totalidad a las 36 h, caso contrario a la reacción en ausencia de BHP, ya que, incluso hasta las 72 h de reacción, se observa que aún queda monómero cíclico por consumir.

Comparando los resultados obtenidos en este experimento con los que se obtuvieron de rendimiento y de peso molecular de polímero hiperramificado, se observa que el máximo de rendimiento y de peso molecular obtenido a las 36 h de reacción coincide con el punto en el que el monómero cíclico se consumió en su totalidad (Gráfica 2A y Gráfica 5A). Este dato nos brinda información útil sobre el mecanismo de PAA enzimática, ya que una vez que el anillo se consumió por completo la propagación se ve desfavorecida, por lo que podemos decir que la polimerización es inducida por el reconocimiento enzimático del monómero cíclico o visto de otra forma que la apertura de anillo es una fuerza impulsora de la reacción puesto que es entrópicamente favorecida.

Como se mencionó en el apartado 3.6, para que la polimerización enzimática se lleve a cabo se requiere de un ataque nucleofílico para romper el

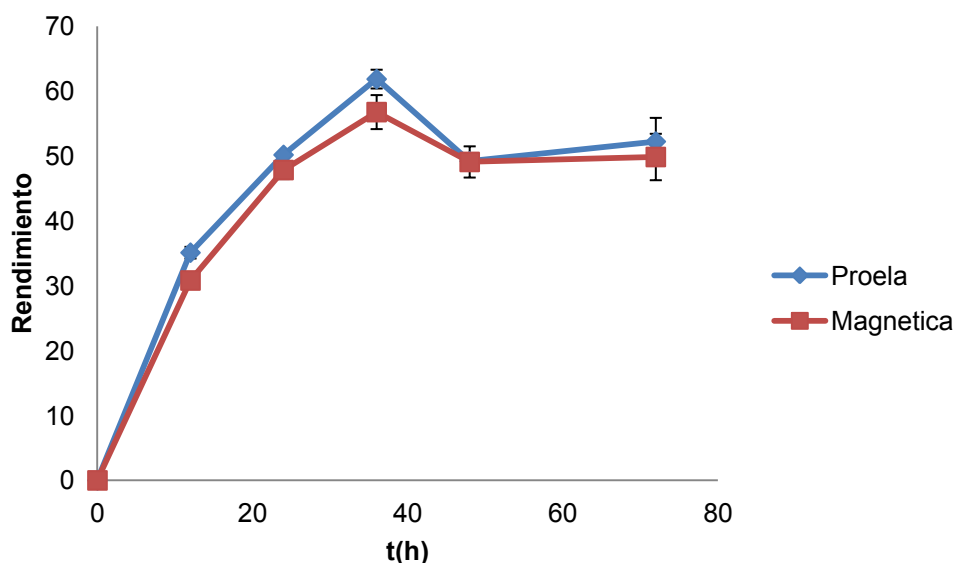
intermediario acil enzima (IAE) formado entre el grupo hidroxilo de la serina del sitio activo y el carbonilo de la lactona abierta. En el caso del polímero lineal, para que se dé la iniciación de la polimerización, la única molécula probable para realizar el ataque nucleofílico al IAE es el agua y con forme avanza la reacción dicho ataque puede darse por formas abiertas del anillo sin polimerizar y oligómeros, ocasionando que el consumo de la CL sea más lento comparado con los polímeros sintetizados en presencia de BHP; en las reacciones en las que se agregó BHP el aumento en la velocidad del consumo del anillo puede deberse, por un lado a un efecto enzimático, ya que aumenta número de moléculas presentes en el seno de la reacción de carácter nucleofílico capaces de atacar al IAE, una de ellas sería el agua presente y el posible el ataque nucleofílico de los hidroxilo del BHP y por otro lado tenemos, una posible hidrólisis acida de la CL mediada por el BHP, favoreciendo la apertura del anillo vía química, lo que podría estar limitando el reconocimiento del monómero cíclico por parte de la enzima.

6.6. Efecto de la agitación en la hiperramificación

Una vez que se observó la influencia de las tres concentraciones de BHP en la síntesis del polímero hiperramificado, se decidió llevar a cabo la síntesis del polímero modificando el tipo de agitación, de una agitación magnética a 1000 rpm a una agitación empleando una propela mecánica a 2000 rpm con el fin de mejorar la transferencia de masa en el seno de la reacción y ver si se lograban mejorar los resultados obtenidos anteriormente. En este estudio se observó que con el avance en el tiempo de la reacción la viscosidad en el medio comienza aumentar, producto del crecimiento de cadenas del polímero, impidiendo una buena agitación en el sistema.

Para este experimento se seleccionó la concentración de BHP alimentada de 3% molar debido a que mostró tener la mejor relación entre el rendimiento, el peso molecular, el porcentaje de incorporación y el DB obtenidos.

En la Gráfica 9 se muestra la comparación del rendimiento obtenido con agitación magnética y agitación con propela.

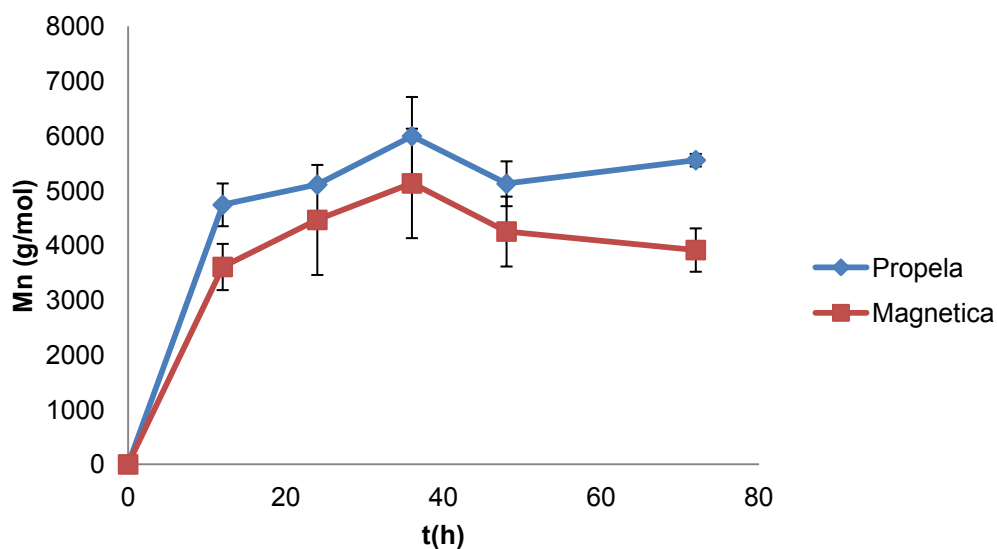


Gráfica 9. Rendimiento de la reacción ocupando distintas formas de agitación.

El rendimiento alcanzado empleando la propela no presentó una mejora sustancial comparado con el que se obtuvo usando agitación magnética. A las 36 h de reacción se observa un máximo que coincide con la extinción del monómero cíclico en el medio de reacción seguido de un descenso que posiblemente se deba a la hidrólisis del polímero por parte de la enzima.

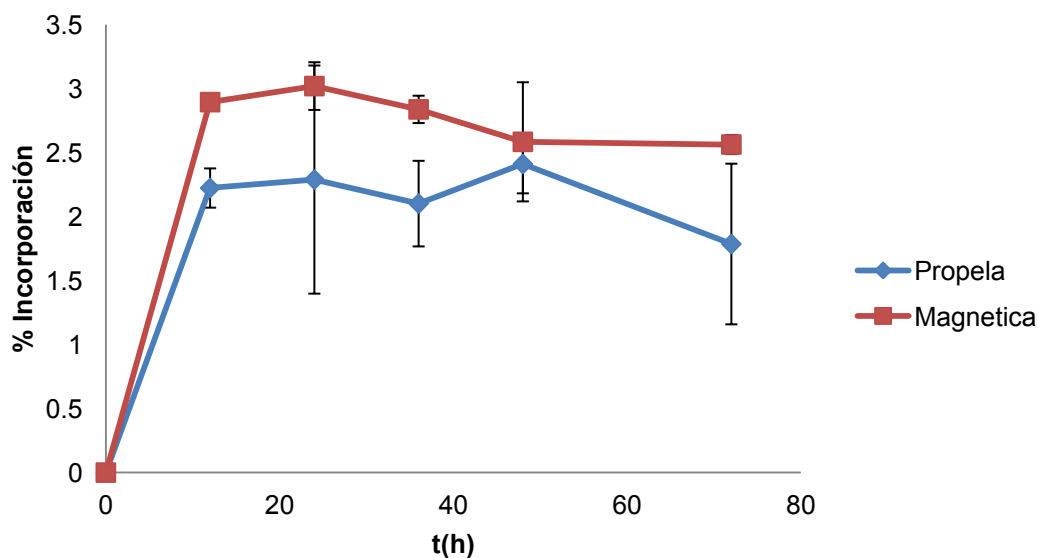
Se determinó el peso molecular para ver si este aumentaba cambiando el tipo de agitación. El peso molecular representa un parámetro importante ya que de este dependen muchas de las propiedades de los polímeros como son las mecánicas, térmicas, reológicas así como su posible aplicación.

En la Gráfica 10 se muestran los pesos moleculares conseguidos empleando ya sea agitación magnética o agitación con propela; se observa que hay una ligera mejora de aproximadamente 1000 g/mol en cada uno de los tiempos de reacción de los polímeros sintetizados ocupando agitación con propela, sin embargo de igual manera que con el rendimiento de la reacción, no se observa una mejora sustancial cambiando el tipo de agitación debido a que los valores para cada tiempo y condición caen dentro de desviación estándar.

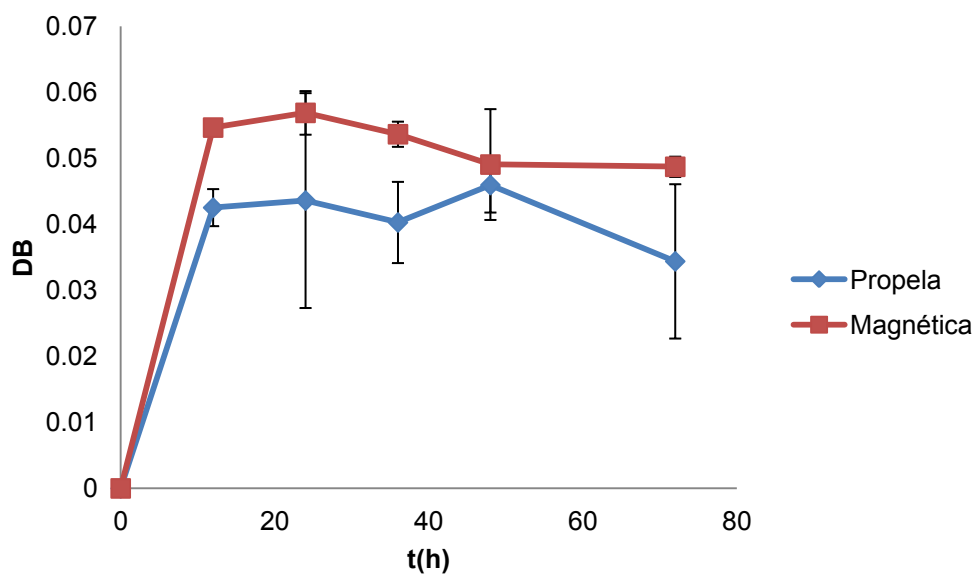


Gráfica 10. Comparación del peso molecular alcanzado cambiando el tipo de agitación.

El polímero obtenido empleando agitación con propela se caracterizó mediante H-RMN con el fin de comparar si el porcentaje de incorporación y el DB habían mejorado con respecto al polímero que se sintetizó empleando agitación magnética. En la Gráfica 11 se presentan los datos obtenidos del porcentaje de incorporación y Gráfica 12 se presentan los datos del DB.



Gráfica 11. Porcentaje de Incorporación cambiando tipo de agitación.



Gráfica 12. Grado de ramificación. Cambiando tipo de agitación.

Se puede observar que ninguno de los dos parámetros, tanto porcentaje de inserción y DB, presentan una mejoría sustancial.

Dado que no se encontró una mejora importante en los parámetros evaluados en la síntesis del polímero hiperramificado, cambiando el tipo de agitación parece ser que el aumento de viscosidad en el medio de reacción, no es un factor crítico en nuestro sistema.

7. CONCLUSIONES

Se realizó exitosamente la síntesis enzimática con CALB de PCL-co-BHP, encontrando que la mejor concentración de BHP alimentada para la obtención del polímero hiperramificado es la de 3% molar, ya que permite obtener la mejor relación entre rendimiento, peso molecular y DB; obteniendo rendimientos de hasta 56%, un peso molecular de 5 131 g/mol y un DB de 0.057.

Surgió la hipótesis de que la incorporación de BHP como centro de ramificación al polímero se da principalmente de forma química, al encontrarse que las concentraciones probadas de BHP no inhiben a la CALB.

8. REFERENCIAS

1. Nair, L. S. & Laurencin, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* **32**, 762–798 (2007).
2. Comim Rosso, S. R., Bianchin, E., de Oliveira, D., Oliveira, J. V. & Ferreira, S. R. S. Enzymatic synthesis of poly(ϵ -caprolactone) in supercritical carbon dioxide medium by means of a variable-volume view reactor. *J. Supercrit. Fluids* **79**, 133–141 (2013).
3. Woodruff, M. A. & Hutmacher, D. W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Prog. Polym. Sci.* **35**, 1217–1256 (2010).
4. Stridsberg, K., Ryner, M. & Albertsson, A. Controlled ring-opening polymerization: polymers with designed macromolecular architecture. *Adv. Polym. Sci.* **157**, 1–25 (2002).
5. Labet, M. & Thielemans, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 3484–3504 (2009).
6. Kobayashi, S. & Makino, A. Enzymatic polymer synthesis: an opportunity for green polymer chemistry. *Chem. Rev.* **109**, 5288–353 (2009).
7. Kirk, O., Borchert, T. V. & Fuglsang, C. C. Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 345–351 (2002).
8. Salihu, A. & Alam, M. Z. Solvent tolerant lipases: A review. *Process Biochem.* **50**, 86–96 (2015).
9. Palmans, a R. & Heise, a. *Enzymatic polymerisation. Book* (2011). doi:10.1007/978-3-642-16376-0
10. Kobayashi, S. Lipase-catalyzed polyester synthesis--a green polymer chemistry. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **86**, 338–365 (2010).
11. Namekawa, S., Suda, S., Uyama, H. & Kobayashi, S. Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of lactones to polyesters and its mechanistic aspects. *Int. J. Biol. Macromol.* **25**, 145–51 (1999).
12. Trodler, P. & Pleiss, J. Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *BMC Struct. Biol.* **8**, 9 (2008).
13. Chen, B. *et al.* *Candida antarctica* Lipase B chemically immobilized on epoxy-activated micro- and nanobeads: Catalysts for polyester synthesis. *Biomacromolecules* **9**, 463–471 (2008).

14. Uyama, H., Takeya, K. & Kobayashi, S. Enzymatic Ring-Opening Polymerization of Lactones to Polyesters by Lipase Catalyst: Unusually High Reactivity of Macrolides. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **68**, 56–61 (1995).
15. Kobayashi, S. Enzymatic ring-opening polymerization of lactones by lipase catalyst: Mechanistic aspects. *Macromol. Symp.* **240**, 178–185 (2006).
16. Velthoen, I. W., Dijkstra, P. J. & Feijen, J. AB₂ functional polyesters via ring opening polymerization: Synthesis and characterization. *Macromol. Chem. Phys.* **210**, 689–697 (2009).
17. Seiler, M. Hyperbranched polymers: Phase behavior and new applications in the field of chemical engineering. *Fluid Phase Equilib.* **241**, 155–174 (2006).
18. Malmström, E. & Hult, A. Hyperbranched Polymers: *Polym. Rev.* **37**, 555–579 (1997).
19. Jikei, M. & Kakimoto, M. Hyperbranched polymers: a promising new class of materials. *Prog. Polym. Sci.* **26**, 1233–1285 (2001).
20. Yates, C. R. & Hayes, W. Synthesis and applications of hyperbranched polymers. *Eur. Polym. J.* **40**, 1257–1281 (2004).
21. Gao, C. & Yan, D. Hyperbranched polymers: from synthesis to applications. *Prog. Polym. Sci.* **29**, 183–275 (2004).
22. Trollsås, M., Claesson, H. & Hedrick, J. L. Hyperbranched Poly (ε-caprolactone) s. **9297**, 3439–3445 (1998).
23. Trollsås, M. & Hedrick, J. L. Hyperbranched Poly(ε-caprolactone) Derived from Intrinsically Branched AB₂ Macromonomers. **9297**, 4390–4395 (1998).
24. Skaria, S., Smet, M. & Frey, H. Enzyme-Catalyzed Synthesis of Hyperbranched Aliphatic Polyesters. *Macromol. Rapid Commun.* **23**, 292–296 (2002).
25. López-Luna, A., Gallegos, J. L., Gimeno, M., Vivaldo-Lima, E. & Bárzana, E. Lipase-catalyzed syntheses of linear and hyperbranched polyesters using compressed fluids as solvent media. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **67**, 143–149 (2010).
26. Frey, H. & Ho, D. Degree of branching in hyperbranched polymers . 3. 67–76 (1999).