



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA**  
**INGENIERÍA QUÍMICA – BIOCATÁLISIS**

SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE POLÍMEROS EN MEDIOS BASADOS EN LÍQUIDOS IÓNICOS

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA:  
M. EN I. MARÍA ENCARNACIÓN MENA MARTÍNEZ

TUTOR PRINCIPAL  
MIQUEL GIMENO SECO, FACULTAD DE QUÍMICA UNAM  
COMITÉ TUTOR  
ALBERTO TECANTE CORONEL, FACULTAD DE QUÍMICA UNAM  
CONCEPCIÓN KEIKO SHIRAI MATSUMOTO, PROGRAMA DE MAESTRÍA Y  
DOCTORADO EN INGENIERÍA.

MÉXICO, D. F. ENERO 2015



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. CARMINA MONTIEL PACHECO  
Vocal: DRA. CONCEPCIÓN KEIKO SHIRAI MATSUMOTO  
1<sup>er</sup> Suplente: DR. SERGIO HUERTA OCHOA  
2<sup>do</sup> Suplente: DR. MIQUEL GIMENO SECO

Lugar donde se realizó la tesis:

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

**TUTOR DE TESIS:**

Miquel Gimeno Seco

-----  
**FIRMA**



*A Carlos*

---

---

# AGRADECIMIENTOS

Primero que todo quiero agradecer a todas las personas que confiaron en mí y me han apoyado a lo largo de estos años, sin ustedes no hubiese tenido la fuerza ni la convicción para lograr esta meta.

**A Filomena y Oswaldo**, por ser la fuente de todo el amor, valores y perseverancia que poseo, por estar siempre para mí incondicionalmente cuando los necesito, por respetar mis decisiones y tenerme paciencia, las palabras se quedan cortas por todo lo que tengo que agradecerles, son los mejores padres del mundo, todos mis logros son por y para ustedes, los amo.

**A Carlos**, el amor de mi vida, por ser mi fuerza impulsora, creer en mí, amarme incondicionalmente, hacerme una mejor persona, ser mi compañero en todos los aspectos de mi vida, por no dejarme caer cuando las fuerzas desaparecían, por todos los hermosos momentos que hemos y seguiremos pasando juntos, por todo esto y muchas cosas más, te amo amor.

**A Roque y Trini** por su amor y apoyo para superar obstáculos a lo largo de toda mi vida y por compartir conmigo su mayor fortuna, sus hijos.

**A Montserrat, Carla, Daniela, Derek, Romi, Pepe, Dino, Yazely, Leo, Dayany, Rashid, Edi y Abraham**, porque sin sus travesuras y ocurrencias mi vida no sería igual, gracias por alegrarme la vida.

**A Adriana, Rosi y Miguel Ángel**, por su cariño, comprensión y apoyo y aunque no tengamos lazos sanguíneos, son parte de mi familia.

**A Irma, Carlos, Lupita, Leni, Cati, Ivonne y Astry**, por todo el apoyo y cariño durante estos años y por hacerme parte de su familia.

**A Miquel**, por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo, permitirme ser parte de este proyecto, por asesorarme a lo largo del mismo, confiar en mí, brindarme su apoyo, conocimiento, paciencia, pero sobre todo por su valiosa amistad .

**Al Sr. Alfredo Buenfil y su familia** por su apoyo y por estar siempre pendientes de nosotros.

**A Rafa, Marce y Rosy**, por sus consejos e impulsarme a alcanzar esta meta con su ejemplo.

---

---

**A la Dra. Keiko Shirai y al Dr. Alberto Tecante**, por ser parte de mi formación en este proyecto, por su orientación, apoyo y por enseñarme a exigirme más de mi.

**Al Dr. Alberto López Luna** por contribuir en la realización de este proyecto.

**Al laboratorio de difracción de rayos X (T-128) de la UAM-I** por las análisis de difracción de rayos X.

**Al Dr. Humberto Vázquez**, por brindarme su apoyo en la caracterización de las muestras.

**A los profesores investigadores miembros del jurado**, por la revisión, sus amables comentarios y sugerencias que han enriquecido este trabajo.

**A Alberto, Ameyalli, Andres, Axel, Carmina, Diego, Fernando, Jesús, Lidia, Miguel Ángel, Monse, Ramón y Sergio** porque sin ustedes mi estancia en el laboratorio no hubiese sido tan amena y por todo el apoyo, favores y por brindarme su valiosa amistad, siempre podrán contar conmigo, los quiero 314 y nunca los olvidare, plop.

**A Brenda, Geovanny, Ricardo, Santiago, Sindy y Teddy** por brindarme su amistad.

---

**“SE AGRADECE A CONACyT POR  
LA BECA DE DOCTORADO Y  
FINANCIAMIENTO A TRAVÉS DEL  
PROYECTO SEP-BÁSICA 2011  
#165757”**

---

---

# ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. El poliláctido como polímero biodegradable y biocompatible .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2. Lipasas como biocatalizadores .....</b>	<b>8</b>
2.2.1. Mecanismo de polimerización por apertura de anillo enzimática de la CALB .....	10
<b>2.3. Medios de reacción no convencionales .....</b>	<b>12</b>
2.3.1. Los líquidos iónicos como medios de reacción en síntesis .....	12
2.3.2. Los fluidos comprimidos como medio de reacción y miscibilidad con líquidos iónicos .....	14
2.3.3. Medio de reacción mezcla homogénea de R-134a y [C <sub>4</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ].....	16
<b>2.4. Lipasas en la síntesis de PLLA .....</b>	<b>17</b>
<b>2.5. Los polímeros hiperramificados .....</b>	<b>18</b>
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
3.1. Hipótesis .....	23
3.2. Objetivo general.....	23
3.3. Objetivos específicos .....	23
<b>4. METODOLOGÍA .....</b>	<b>24</b>
4.1. Materiales.....	24
4.2. Acondicionamiento del LLA.....	24
4.3. Pruebas iniciales de solubilidad del BHB en LI.....	24
4.4. Reacciones de polimerización en LI .....	25
4.5. Reacciones en el medio [C <sub>4</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]/R-134a .....	26
4.6. Reacciones en la celda de mirillas.....	28
4.7. Determinación de la actividad enzimática .....	29



---

---

4.8.	Técnicas de caracterización .....	30
5.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>36</b>
5.1.	Evaluación de temperaturas en la PAEE del PLLA.....	36
5.2.	Síntesis enzimática de poli(L-láctidos) hiperramificados en medio [C <sub>4</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ].....	49
5.2.1.	Solubilidad del BHB en [C <sub>4</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ] .....	49
5.2.2.	Polimerización por apertura de anillo enzimática de poli(L-láctido) hiperramificado con el co-monomero BHB .....	49
5.2.3.	Evaluación de la inactivación de la lipasa por el BHB .....	68
5.2.4.	Racionalización del mecanismo enzimático .....	70
5.2.5.	Estudio de otros centros de ramificación: ácido gálico y L-serina .....	72
5.3.	Síntesis de polímeros de PLLA lineales y ramificados en el sistema [C <sub>4</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]/R-134a .....	75
5.3.1.	Síntesis de PLLA en el sistema [C <sub>4</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]/R-134a .....	77
5.3.2.	Síntesis de polímeros hiperramificados en la mezcla [C <sub>4</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]/R-134a .....	85
6.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>95</b>
7.	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>96</b>
8.	<b>ANEXOS</b> .....	<b>103</b>

---

---

# ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Estereoisómeros del LA.....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 2. Reacciones de síntesis de PLLA. ....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 3. Imagen de la CALB. ....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 4. Mecanismo de reacción de PAAE de la CALB. ....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 5 .Equilibrio de fases [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]/R-134a (Ren y Scurto, 2008). ....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 6. Estructura general de los dendrímeros (A) y polímeros hiperramificados (B). .</i>	<i>19</i>
<i>Figura 7. Esquema de reacción de la síntesis de poliLLA-co-mevalonolactona. ....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 8. Esquema de reacción para la síntesis de poli(LLA-co-BHB) reportada por el grupo del Dr. Frey.....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 9. Esquema de reacción de la síntesis de pol-(LLA-co-5HDON) reportado por el grupo del Dr. Frey.....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 10. Sistema para la reacción de polimerización en LI. ....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 11. Sistema de reactores de alta presión. ....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 12. Celda de mirillas a alta presión.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 13. Estructura molecular del [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]. ....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 14. Curso temporal de la conversión de apertura de anillo enzimática de LA a diferentes temperaturas de reacción en [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>].....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 15. Consumo de monómero contra tiempo en la PAAE de PLLA.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 16. Peso molecular determinado por titulación de los PLLA sintetizados a las diferentes condiciones evaluadas.....</i>	<i>42</i>

---



---

<i>Figura 17. Conversión de la propagación de cadenas contra tiempo de PLLA a las diferentes condiciones de reacción evaluadas..</i>	44
<i>Figura 18. Variación del rendimiento con el tiempo de los PLLAs sintetizados a las condiciones evaluadas.....</i>	46
<i>Figura 19. <math>M_n</math> contra tiempo a las diferentes condiciones de reacción evaluadas. ....</i>	48
<i>Figura 20. Esquema de reacción de la síntesis por PAAE de poli(LLA-co-BHB) en LI .....</i>	50
<i>Figura 21. Espectro de <math>^1H</math> RMN del poli(LLA-co-BHB). ....</i>	51
<i>Figura 22. Variación del rendimiento de poli(LLA-co-BHB) en el tiempo. ....</i>	53
<i>Figura 23. Variación de DB de poli(LLA-co-BHB) en el tiempo.....</i>	58
<i>Figura 24. Espectro FT-IR del PLLA y del poli(L-láctido-co-BHB) a 11 días de reacción y relación molar 9:1 (LLA:BHB). ....</i>	60
<i>Figura 25. DSC de los polímeros hiperramificados en la relación molar de alimentación 9:1 (LLA:BHB) y del PLLA. ....</i>	62
<i>Figura 26. Espectros de PXRD de las tres relaciones molares de LLA:BHB evaluadas en los días de máximo rendimiento. ....</i>	63
<i>Figura 27. Espectro de MALDI-TOF del polímero hiperramificado poli(L-láctido-co-BHB) de la relación molar de alimentación 9:1 (LLA:BHB) en LI, día 11. ....</i>	64
<i>Figura 28. Sección representativa del espectro de MALDI-TOF del poliéster hiperramificado de la relación molar de alimentación 9:1 LLA:BHB, día 11 al momento del análisis. ....</i>	66
<i>Figura 29. Actividad residual de la CALB tratada a diferentes concentraciones de BHB a 1, 3 y 5 días de reacción.....</i>	69
<i>Figura 30. Mecanismo de reacción propuesto en la síntesis enzimática del polímero hiperramificado poli(LLA-co-BHB). ....</i>	71
<i>Figura 31. Posible formación del intermediario acil-enzima de BHB.....</i>	72

---

---

<i>Figura 32. Estructura del ácido gálico.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 33. Estructura de la L-serina. ....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 34. Estudio visual del comportamiento de fases de la mezcla [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]/R-134a.....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 35. Comparación de rendimientos contra el tiempo de los PLLAs sintetizados en los dos medios de reacción. ....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 36. Peso molecular con respecto al tiempo. ....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 37. Espectro de PXRD de PLLA sintetizado a 65 y 90 °C en medio [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] y [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]/R-134a. ....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 38. <sup>1</sup>H RMN de los polímeros hiperramificados obtenidos en las diferentes condiciones de reacción. ....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 39. Variación de rendimiento en el tiempo de los polímeros hiperramificados sintetizados en [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]/R-134a y [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>].....</i>	<i>88</i>
<i>Figura 40. DB a través del tiempo de los poliésteres hiperramificados de LLA y BHB. ...</i>	<i>89</i>
<i>Figura 41. Termogramas de TGA de los polímeros hiperramificados sintetizados en el medio [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]/R-134a a 65 °C.....</i>	<i>92</i>
<i>Figura 42. Espectro de MALDI-TOF del polímero hiperramificado poli(L-láctido-co-BHB) sintetizado en el medio de reacción [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]/R-134a a 65 °C. ....</i>	<i>94</i>

---

---

# ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Parámetros termodinámicos del R-134a. ....</i>	<i>28</i>
<i>Tabla 2. Valores de <math>k_{app}</math> de la síntesis de PLLA a las diferentes condiciones evaluadas... 41</i>	
<i>Tabla 3. Datos de caracterización de poliésteres hiperramificados de LLA y BHB en <math>[C_4MIM][PF_6]</math>. ....</i>	<i>55</i>
<i>Tabla 4. Datos de caracterización de poliésteres hiperramificados de LLA y BHB en masa. ....</i>	<i>57</i>
<i>Tabla 5. Asignación de señales de MALDI-TOF del polímero relación 9:1 (LLA/BHB). ....</i>	<i>67</i>
<i>Tabla 6. Rendimiento de los polímeros obtenidos de LLA y GA. ....</i>	<i>73</i>
<i>Tabla 7. Datos de caracterización de PLLA sintetizado en <math>[C_4MIM][PF_6]/R-134a</math> y <math>[C_4MIM][PF_6]</math> a 65 y 90 °C. ....</i>	<i>83</i>
<i>Tabla 8. Caracterización de los polímeros de poli(LLA-co-BHB) en <math>[C_4MIM][PF_6]</math> y <math>[C_4MIM][PF_6]/R-134a</math>. ....</i>	<i>91</i>
<i>Tabla 9. Porcentaje de cristalinidad de los polímeros hiperramificados a las diferentes condiciones evaluadas a 11 días de reacción. ....</i>	<i>93</i>

---

---

# LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

$^1\text{H}$ RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
5HDON	5-hidroximetil-1,4-dioxano-2-ona
$[\text{C}_4\text{MIM}][\text{NTf}_2]$	Bis(trifluorometil-sulfonyl)imida de 1-butil-3-metilimidazolio
$[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]$	Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio
$[\text{HMIM}][\text{PF}_6]$	Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
Å	Angstrom
AG	Ácido gálico
ATR FT-IR	Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier por reflectancia total atenuada
$a_{wi}$	Actividad inicial de agua
$\text{BF}_4^-$	Ión tetrafluoro borato
BHB	Ácido 2,2-bis(hidroximetil) butírico
$\text{C}_4\text{MIM}^+$	Ión inimidazolio
CALB	Isoenzima B de la lipasa de <i>Candida antarctica</i>
CL	$\epsilon$ -caprolactona
DB	Grado de ramificación
DHB	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (por sus siglas en inglés)
EP	Enzima producto
ES	Enzima sustrato
FC	Fluidos comprimidos
g	Gramos
GA	Glicólido
h	Horas
IAE	Intermediario acil enzima
$k_{app}$	Coefficiente de velocidad de reacción aparente de la apertura de anillo
L	Litros
LA	Ácido Láctido
LLA	Ácido L-láctido
LI	Líquido iónico
LU	Unidades de laurato de propilo
M	Concentración molar
$m/z$	Relación masa/carga

---

MALDI-TOF	Espectrometría de masas por ionización/desorción láser asistida por matriz acoplada a un detector de tiempo de vuelo (por sus siglas en inglés)
min	Minutos
$M_n$	Peso molecular en número
$M_w$	Peso molecular en peso
PAA	Polimerización por apertura de anillo
PAAE	Polimerización por apertura de anillo enzimática
PCL	Poli $\epsilon$ -caprolactona
PDI	Polidispersidad
PET	Tereftalato de polietileno
$\text{PF}_6^-$	Ión hexafluorofosfato
pH	Potencial de hidrógeno
PLA	Poliláctido
PLLA	Poli(L-láctido)
ppm	Partes por millón
PS	Lipasa de <i>Burkholderia cepacia</i>
PVL	Poli $\delta$ -valerolactona
PXRD	Difracción de rayos x en polvo
R-134a	1,1,1,2-tetrafluoroetano
rpm	Revoluciones por minuto
scCO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono supercrítico
SEC	Cromatografía de exclusión molecular (por sus siglas en inglés)
VL	$\delta$ -valerolactona
$T_d$	Temperatura de degradación al 5% de pérdida en peso por TGA
$T_m$	Temperatura de fusión
$T_g$	Temperatura de transición vítrea
TGA	Termogravimetría
THF	Tetrahidrofurano
TPN	Temperatura y presión normales

## RESUMEN

La presente tesis doctoral contribuye de manera novedosa y científica en el estudio de medios de reacción para la síntesis de polímeros, a partir de la reacción enzimática de apertura del anillo del monómero L-láctido y centros de ramificación polifuncionales: ácido 2,2-bis(hidroximetil) butírico, ácido gálico y L-serina en el líquido iónico hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio, para producir estructuras moleculares tipo poliésteres lineales e hiperramificados, los cuales son polímeros termoplásticos, biodegradables y biocompatibles. La mayor capacidad de disolución de sustratos en líquidos iónicos hidrofóbicos, así como la adecuada actividad de lipasas en éstos contribuyó a tal fin. Los polímeros obtenidos se caracterizaron por medio de  $^1\text{H}$  RMN, ATR FT-IR, MALDI-TOF, SEC, PXRD, DSC y TG; la mejor temperatura de reacción fue a  $90\text{ }^\circ\text{C}$ ; en el caso del homopolímero de PLLA lineal se obtuvo una conversión de apertura de anillo total a las 48 horas de reacción, un rendimiento del polímero del 48% con un peso molecular de hasta  $19.6 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ . Con respecto a los hiperramificados, se obtuvieron rendimientos hasta del 25%, DB de 0.21 y pesos moleculares de hasta de  $3.6 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ . Adicionalmente, en este trabajo se abordaron el efecto de inactivación por parte del centro de ramificación sobre la enzima y el efecto de la viscosidad del medio. Para el primero, se analizó la actividad enzimática residual y en lo referente a la viscosidad se realizó una investigación novedosa basada en el uso de un medio de reacción conteniendo el líquido iónico y el co-disolvente fluido comprimido 1,1,1,2-tetrafluoroetano líquido con el fin de modificar la viscosidad del medio de reacción y aumentar la transferencia de masa, de tal forma que los pesos moleculares de los polímeros fueron mayores que en  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]$ . Además, se halló evidencia de que en esta mezcla de reacción la contribución de mecanismos no enzimáticos se ve reducida en comparación con el medio  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]$  debido a interacciones disolvente-disolvente.



## ABSTRACT

This experimental work emphasizes the novelty and scientific contribution of a study of reaction media for the synthesis of polymers, from the enzymatic ring opening reaction of the L-lactide alone and with polyfunctional cores: bis(hydroxymethyl)butyric acid, gallic acid and L-serine in the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate to produce linear and hyperbranched polyester structures, which are thermoplastic, biodegradable and biocompatible polymers. The increased capacity for dissolving substrates in hydrophobic ionic liquids, and the appropriate lipase activity in these media contributed to this effect. The synthesized polymers were characterized by  $^1\text{H}$  NMR, ATR FT-IR, MALDI-TOF, SEC, PXRD, DSC Y TG, the better reaction temperature was at  $90\text{ }^\circ\text{C}$ ; for the linear PLLA homopolymer a total conversion of ring opening was obtained at 48 h reaction time, as well as a yield of 48% and a molecular weight up to  $19.6 \times 10^3\text{ gmol}^{-1}$ . While for the hyperbranched polymers, a yield was reached up to 25% with a DB up to 0.21 and a molecular weight up to  $3.6 \times 10^3\text{ gmol}^{-1}$ . In this work, it was also investigated the inhibitory effect of core molecules on the lipase and the viscosity of the medium. For the earliest, residual enzyme activity was assayed and in relation to the viscosity-based research a novel use of a reaction medium based on the ionic liquid and the compressed fluid liquid 1,1,1,2-tetrafluoroethane as co-solvent was performed to modify the viscosity of the medium for to increase the mass transfer, so that the molecular weights of the polymers were higher than in  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]$ . Furthermore, it was found evidence that in this reaction the contribution of non-enzymatic mechanisms is reduced by comparison with the  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]$  medium because solvent-solvent interaction.

# 1. INTRODUCCIÓN

Los poliláctidos (PLAs) son polímeros termoplásticos, biodegradables y biocompatibles que provienen de productos renovables tales como almidón y azúcar.<sup>1</sup> El dímero cíclico del ácido láctico, láctido (LA) es el principal precursor de este polímero. La mejor manera de producir PLA es mediante la polimerización por apertura de anillo (PAA) donde generalmente se utiliza octoato de estaño ( $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ ) como catalizador y su mecanismo es por vía coordinación-inserción.<sup>2-4</sup> El PLA tiene muchas aplicaciones en las áreas de medicina, textiles y empaques. Al polimerizar diferentes estereoisómeros, las propiedades de los materiales obtenidos son diferentes, los polímeros de L-(+)-LA (LLA) son materiales semi-cristalinos (37% de cristalinidad),<sup>3,5</sup> mientras que la polimerización de la muestra racémica (D,L)-LA (DLLA) resulta en la formación de un material amorfo,<sup>3</sup> sin embargo, por medio de la co-polimerización de éstos con otros monómeros se pueden modificar sus propiedades acorde a necesidades específicas.

El uso de enzimas como catalizadores tiene muchas ventajas, ya que provienen de recursos naturales como microorganismos, animales y plantas; son altamente activas, selectivas, biodegradables, biocompatibles y sobre todo no son tóxicas, además de que pueden ser recuperadas y reutilizadas.<sup>6,7</sup> Las lipasas son enzimas de la familia de las hidrolasas y han mostrado actividad y estabilidad en disolventes no acuosos apróticos e hidrofóbicos, catalizando la reacción de síntesis.<sup>8</sup> Entre ellas, destaca la isoenzima B de la lipasa de *Candida antarctica* (CALB) por su amplia especificidad hacia el sustrato y su termoestabilidad.<sup>9</sup>

Por otra parte, los líquidos iónicos (LI), son sales orgánicas líquidas a temperatura ambiente, formados por iones, poseen una alta polaridad, lo que permite disolver una gran variedad de sustratos y lo más destacable es que no son volátiles; esto hace de ellos medios interesantes de reacción dentro de la llamada química verde.<sup>10</sup> Además, algunos de estos LI proporcionan un ambiente apropiado para la adecuada actividad enzimática, en particular de lipasas. Entre las diversas reacciones enzimáticas en LI, destaca la síntesis enzimática de estructuras tipo

poliéster empleando lipasas debido a que los poliésteres alifáticos, derivados de monómeros cíclicos como el LA, son polímeros versátiles que pueden presentar propiedades mecánicas similares al poliestireno y tereftalato de polietileno (PET).<sup>2,4</sup> Una estrategia alternativa para generar propiedades modificadas dirigidas hacia una notable variedad de aplicaciones, es la hiperramificación de polímeros biodegradables.<sup>11</sup> La modificación de los grupos terminales de los polímeros hiperramificados permite modular algunas de sus propiedades, tales como la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), la solubilidad, las propiedades reológicas, las propiedades mecánicas, el perfil de biodegradación, del mismo modo que determina muchas de sus posibles aplicaciones.<sup>12</sup>

Finalmente, se tiene que el estudio del uso de LI como medios de reacción en la síntesis enzimática de polímeros de poli(L-láctido) (LLA) empleando centros de ramificación polifuncionales para producir estructuras moleculares hiperramificadas es novedoso. La mayor capacidad de disolución de sustratos en LI, así como la adecuada actividad de lipasas en éstos, es prometedora a tal fin, ya que de otra forma, como por ejemplo, utilizando disolventes hidrófobos y poco polares comúnmente utilizados en síntesis enzimática de poliésteres o reacciones en masa de LLA hidrofílico, limitarían los objetivos. Al momento no hay ningún reporte sobre el estudio de síntesis enzimática de PLLA hiperramificado en términos de grado de ramificación (DB) y el uso conjunto de lipasas con medios LI hidrófobos sólo o en mezcla con fluidos comprimidos (FC) no tóxicos y ecológicos con el fin de disminuir la viscosidad de los LI, garantizan la consecución del objetivo.

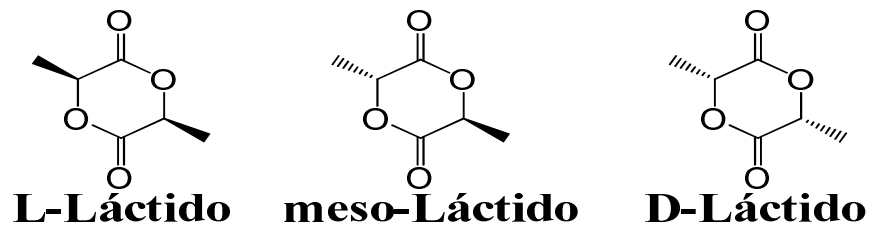
## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. El poliláctido como polímero biodegradable y biocompatible

Los PLAs son polímeros termoplásticos, biodegradables y biocompatibles que provienen de productos renovables tales como almidón y azúcar.<sup>1</sup> El precursor de los PLAs, el ácido láctico, proviene de la fermentación de estos sustratos con microorganismos; la mayoría del ácido láctico producido en el comercio mundial se realiza por la fermentación bacteriana de carbohidratos, utilizando organismos homolácticos y modificando diversas cepas del género *Lactobacilli*. Varios tipos de carbohidratos pueden ser utilizados durante la fermentación dependiendo de la cepa, incluyendo: glucosa, maltosa y dextrosa de almidón de maíz o papa, sacarosa de caña o de remolacha y lactosa del suero de queso.<sup>2</sup>

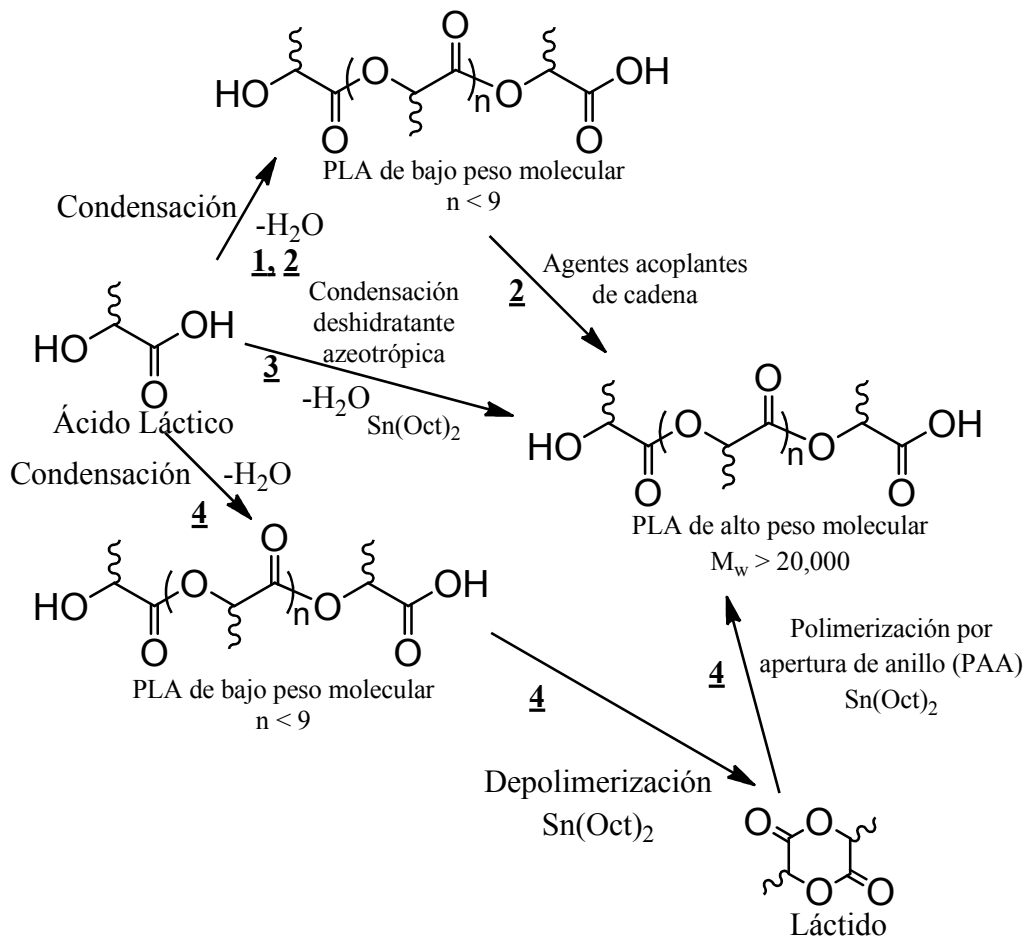
La fermentación comercial es usualmente realizada en lotes y toma de 3 a 6 días en completarse, con una producción de  $2 \text{ gL}^{-1}$  del ácido por hora. El mejor método de separación consiste en agregar  $\text{CaCO}_3$  y/o  $\text{Ca(OH)}_2$  para neutralizar el medio y producir una disolución de lactato de calcio, que posteriormente se filtra para separar la biomasa celular y las partes insolubles. El ácido láctico se obtiene después de subsiguientes pasos de evaporización, re-cristalización y acidificación con ácido sulfúrico.<sup>3</sup> Entre las empresas que lo producen destacan CCA Biochemical de Holanda, Archer Daniels Midland y Nature Works (filial de Cargill Dow) en EUA.

El dímero cíclico del ácido láctico, llamado ácido láctido o simplemente láctido (LA), se produce por la reacción de condensación continua del ácido láctico acuoso dando lugar a un polímero de bajo peso molecular que posteriormente es convertido en dímeros cíclicos (figura 1) utilizando 2-etil hexanoato de estaño (II), también llamado octoato de estaño, como catalizador en una reacción de depolimerización. El LA es purificado mediante destilación al vacío, lo que asegura la eliminación del catalizador organometálico (no destilable) del producto final.<sup>2-4,13</sup>



**Figura 1. Estereoisómeros del LA.**

Los PLAs (figura 2) se pueden preparar por diversas vías entre las que destacan, en primer lugar, la condensación directa de ácido láctico, la cual presenta problemas de eliminación de agua producida como subproducto, que conduce a polímeros de bajo peso molecular. La segunda vía se realiza en dos pasos, primero una condensación directa seguida por una reacción con agentes acoplantes de cadena, la cual proporciona un polímero de alto peso molecular, sin embargo, la mayoría de los agentes acoplantes no son biodegradables y esto limita el uso del polímero. La tercera vía es por condensación deshidratante azeotrópica, donde se obtiene un polímero de alto peso molecular; no obstante, se tiene que realizar una remoción estricta de agua y se utiliza una enorme cantidad del catalizador  $\text{-Sn(Oct)}_2$ , lo cual incrementa los costos de purificación del producto. Finalmente, la cuarta vía, la más utilizada a nivel industrial, es por PAA de LA; en esta polimerización generalmente se utiliza  $\text{Sn(Oct)}_2$  como catalizador y su mecanismo es por vía coordinación-inserción, ya que así se produce un polímero de alto peso molecular, presenta una buena rapidez de reacción y bajos niveles de racemización.<sup>2</sup> Las condiciones típicas de reacción son a temperaturas de 180-210 °C, usando  $\text{Sn(Oct)}_2$  en concentración de 100-1000 ppm durante 2 a 5 horas de reacción; obteniéndose 95% de conversión.<sup>3,13</sup> Los PLAs así obtenidos presentan un peso molecular promedio en peso ( $M_w$ ) mayor a 20,000  $\text{g mol}^{-1}$ ,<sup>2</sup>  $T_g$  alrededor de 55-65 °C y una  $T_m$  de aproximadamente 175-178 °C.<sup>3,5</sup> Industrialmente, Nature Works<sup>4</sup> produce alrededor de 14,000 toneladas por año.



**Figura 2. Reacciones de síntesis de PLLA.**

Al polimerizar diferentes estereoisómeros, las propiedades de los materiales obtenidos son diferentes; los polímeros de L-(+)-LA (LLA) son materiales semi-cristalinos (37% de cristalinidad) debido a su estereoregularidad. El material tiene alta resistencia a la tensión y baja elongación, consecuentemente tiene un módulo de Young elevado (en comparación con el PLA de la muestra racémica del mismo peso molecular),<sup>3,5</sup> mientras que la polimerización de la muestra racémica (D,L)-LA (DLLA) resulta en la formación de un material amorfo.<sup>13</sup> En este caso, el polímero tiene baja resistencia a la tensión, alta elongación y una elevada velocidad de degradación en comparación con el PLLA del mismo peso molecular. Debido a su mecanismo de degradación, el PLA tiene muchas aplicaciones en las áreas de medicina, textiles y empaques. Muchas de estas aplicaciones dependen

del estereoisómero usado en su preparación, por ejemplo, el PLLA es utilizado en suturas y en la producción de materiales ortopédicos donde es necesaria una alta resistencia mecánica,<sup>1</sup> además es un material biodegradable.<sup>2,14</sup> Adicionalmente, por medio de la co-polimerización de éste con otros co-monómeros se pueden modificar sus propiedades acorde a necesidades específicas.

## 2.2. Lipasas como biocatalizadores

Industrialmente, los PLA son producidos por síntesis química, lo que involucra el uso de catalizadores metálicos tóxicos<sup>2,3,5</sup> que aumenta los costos de purificación o bien limita sus aplicaciones.

Un área de interés creciente es la utilización de enzimas como catalizadores ya que provienen de recursos naturales como microorganismos, animales y plantas; son altamente activas, selectivas, biodegradables, biocompatibles y sobre todo no son tóxicas, además de que pueden ser recuperadas y reutilizadas.<sup>6,7</sup>

Las lipasas son enzimas de la familia de las hidrolasas que se encuentran en una gran variedad de organismos vivos donde se encargan de degradar las grasas de los alimentos de manera que se puedan absorber. Su función principal es precisamente catalizar la hidrólisis de los triacilglicéridos, produciendo glicerol y ácidos grasos libres. Anteriormente se creía que las lipasas sólo podían ser usadas *in vitro* en medio acuoso, sin embargo, en los años 80, los trabajos de Zacks y Klibanov (1984)<sup>8</sup> demostraron que algunas hidrolasas pueden ser activas y estables en disolventes no acuosos apróticos e hidrofóbicos, catalizando la reacción contraria, es decir, la esterificación.

La enzima está rodeada de moléculas de agua para retener su estado conformacional tridimensional. El agua contribuye a la integridad estructural, a la polaridad del sitio activo y a la estabilidad de la proteína. En los disolventes orgánicos hidrofóbicos este ambiente acuoso se reduce a un microambiente que es conformado por el agua retenida por la enzima.<sup>15,16</sup> Cabe mencionar que

disolventes orgánicos hidrofílicos puros y próticos, son desactivantes de las lipasas debido al efecto irreversible de partición de moléculas de agua de la enzima al medio por parte del disolvente, perdiendo así su conformación activa.<sup>17</sup> La cantidad necesaria de agua varía significativamente dependiendo del origen de la lipasa y del tipo de reacción.<sup>15,16</sup>

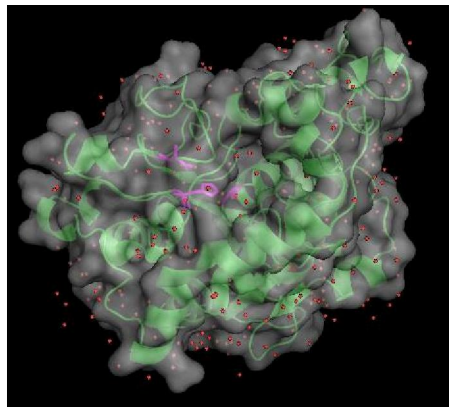
Las lipasas se pueden utilizar como biocatalizadores de diversas reacciones orgánicas como esterificación, transesterificación, hidrólisis y aminólisis. También existen numerosas publicaciones de lipasas en la polimerización por apertura de anillo enzimática (PAAE) de lactonas o en policondensación de oxácidos o sus ésteres.<sup>6</sup>

Entre las lipasas destaca la isoenzima B de la lipasa de *Candida antarctica* (CALB) como biocatalizador eficaz por su amplia especificidad hacia el sustrato y su termoestabilidad. La CALB ha demostrado gran actividad catalítica para una gran variedad de ésteres, amidas y tioles en medios de reacción hidrofóbicos. Su cadena polipeptídica está compuesta por 317 aminoácidos y su tamaño es de aproximadamente 30 x 40 x 50 Å; su sitio activo está formado por una tríada de residuos de serina, histidina y ácido aspártico (figura 3).<sup>18,19</sup> La CALB no requiere de activación interfacial a diferencia de las lipasas comunes. Dicha activación interfacial puede ser explicada por la apertura de una tapa en la estructura de la enzima, en una interfase. La lipasa con una tapa abierta es la forma activa de la enzima y da acceso al sitio activo. Esta tapa que cubre el sitio activo, está ausente o es muy pequeña en la CALB.<sup>9</sup>

La CALB comercial más utilizada se encuentra inmovilizada. 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.<sup>20</sup> La CALB es adsorbida en un soporte macroporoso esférico de aproximadamente de 1 mm de diámetro basado en polimetacrilato (Lewatit VPOC 1600), lo que facilita su separación; este biocatalizador ha sido ampliamente



utilizado en diversas investigaciones; recientemente, en el estudio de la distribución posicional de ácidos en triacilgliceroles sólidos grasos por transesterificación 1,3 selectiva;<sup>21</sup> también ha sido empleado en diversas PAAE por ejemplo, entre las más recientes, la polimerización de  $\epsilon$ -caprolactona (CL) utilizando iniciadores basados en alquinos.<sup>22</sup> Además, la CALB es una enzima que ha sido usada hasta 150 °C en disolventes orgánicos apróticos y de alta polaridad como acetonitrilo y DMSO, así como en LI, sistemas sólido-gas,  $scCO_2$  y otros FC.<sup>23</sup>



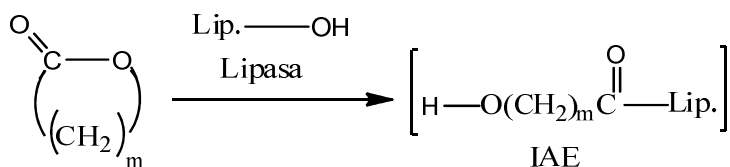
**Figura 3.** Imagen de la CALB. La tríada de residuos del sitio activo se presenta en rosado y las moléculas de agua en rojo. Realizado en Pymol®.

### **2.2.1. Mecanismo de polimerización por apertura de anillo enzimática de la CALB**

El mecanismo de polimerización de la CALB se lleva a cabo en dos pasos: iniciación y propagación (Figura 4). En la iniciación ocurre la apertura de anillo, a partir del reconocimiento enzimático que involucra la formación del complejo enzima-sustrato (ES); una vez formado el ES 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 estabilizado por los dos enlaces de hidrógeno formados con residuos oxianiónicos estabilizantes; 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 complejos es la etapa limitante. Posteriormente ocurre un ataque nucleofílico de una molécula de agua (presente en la mezcla de reacción) al carbono del carbonilo del intermediario IAE donde se forma un intermediario tetraédrico que evoluciona al complejo enzima-producto (EP) hasta obtener la enzima libre y el dímero lineal. Simultáneamente puede ocurrir también que un dímero lineal se introduzca en el sitio activo de la CALB y se forme un complejo ES<sub>2</sub> seguido de un intermediario tetraédrico y finalmente el intermediario IAE (etapa limitante). La etapa de propagación se produce cuando hay IAE y dímeros lineales que pueden sufrir una deshidrogenación parcial al acercarse al sitio activo de la enzima y atacar nucleofílicamente al carbono carbonilo del intermediario IAE; posteriormente se forma un intermediario tetraédrico desencadenando en el EP y finalmente se produce el polímero, regenerándose la enzima.

**Iniciación**



**Propagación**

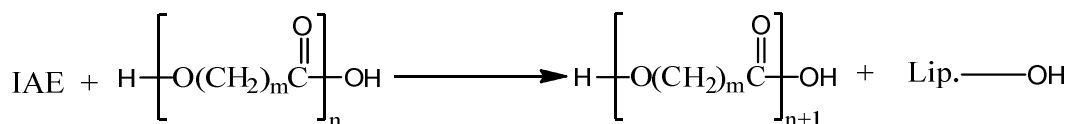


Figura 4. Mecanismo de reacción de PAAE de la CALB. <sup>24</sup>

Cabe mencionar que en este tipo de reacción, el agua en la reacción participa en dos diferentes rutas. Ésta decrece a medida que se hidrolizan los intermediarios IAE, mientras que, por otro lado, el contenido de agua se incrementa con la apertura de anillo y debido a las policondensaciones entre los IAEs y la forma abierta de la lactona, así como en la regeneración de la enzima libre; por ello, se reconoce que la participación del agua es dinámica en esta reacción.

### **2.3. Medios de reacción no convencionales**

Como se mencionó anteriormente, para poder llevar la PAAE es necesario la utilización de medios de reacción hidrófobos; los más empleados en este tipo de reacciones son los disolventes orgánicos volátiles; no obstante, estos disolventes suelen ser tóxicos, dañinos para el medio ambiente e inflamables. Una disyuntiva al uso de estos disolventes es la utilización de otros medios de reacción como son los LI y los FC.

#### **2.3.1. Los líquidos iónicos como medios de reacción en síntesis**

Los líquidos iónicos (LI) son sales orgánicas líquidas a temperatura ambiente formados por iones, por lo que su estructura es completamente diferente a la de otros disolventes orgánicos convencionales; de forma general, los LI están formados por un catión orgánico, donde los más comunes son heterociclos aromáticos con átomos de nitrógeno, asociado a un anión, que puede ser orgánico o mineral.<sup>25</sup> El anión es el que da el carácter hidrofílico o hidrofóbico al LI, por ejemplo los aniones  $\text{PF}_6^-$  dan lugar a LI altamente hidrofóbicos, mientras que aniones del tipo  $\text{BF}_4^-$  o  $\text{Cl}^-$  dan lugar a LI miscibles en agua. Una de las propiedades de los LI es que presentan un bajo punto de fusión ( $<100\text{ }^\circ\text{C}$ ) y se mantienen como líquidos dentro de un intervalo adecuado de temperaturas ( $10\text{-}300\text{ }^\circ\text{C}$ ) para ser usados como disolventes. Los LI poseen una alta polaridad, lo que permite disolver una gran variedad de sustratos y lo más destacable es que no son volátiles.<sup>10</sup> Esta alta capacidad de solvatación de solutos y prácticamente

nula presión de vapor hace de ellos interesantes medios de reacción dentro de la llamada química verde. Además, algunos de estos LI proporcionan un ambiente apropiado para la adecuada actividad enzimática, en particular de lipasas.

Debido a estas características, es y ha sido de interés estudiar la actividad de enzimas como catalizadores de una gran variedad de reacciones en este tipo de medio. Por ejemplo, Lozano y col. (2001)<sup>26</sup> estudiaron el incremento de la estabilidad de la CALB y  $\alpha$ -quimiotripsina al aumentar la temperatura en varios LI, comparados con diversos disolventes convencionales y este incremento se atribuyó a la conservación de la estructura nativa de la proteína en el medio. Entre las diversas reacciones enzimáticas en LI,<sup>27</sup> es de interés en la presente investigación, la síntesis enzimática de poliésteres empleando lipasas. Marcilla y col. (2006) reportaron la PAAE con CALB de  $\epsilon$ -caprolactona (CL) con tres LI, donde se obtuvieron polímeros con pesos moleculares promedio en número ( $M_n$ ) de 7 a  $9.5 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$  y rendimientos del 30% al 45%.<sup>28</sup> Yoshizawa-Fujita y col. (2008)<sup>29</sup> reportaron la polimerización de LLA catalizada por CALB en cuatro LI hidrofóbicos; en dicha investigación se pudo ver que la especie aniónica del LI influye tanto en la recuperación como en el  $M_n$  del polímero. Esta reacción también se pudo llevar a cabo exitosamente en nuestro grupo de investigación por Chanfreau y col. (2010)<sup>30</sup> usando como medio de reacción hidrofóbico el [HMIM][PF<sub>6</sub>], obteniendo un rendimiento del PLLA de 63%, con un  $M_n$  de  $37.8 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$  a los 7 días de reacción, siendo la temperatura idónea la de 90 °C; asimismo en un trabajo posterior de Mena y col. (2010)<sup>31</sup> se llevó a cabo la síntesis enzimática del poliLLA-co-glicólido (PLLGA) en otro LI de similares características, el [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>], con un rendimiento cercano al 65% y un  $M_n$  máximo de  $18.5 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ . En este trabajo, las fracciones molares de las unidades de repetición lactil y glicolil en el co-polímero pudieron ser controladas ajustando las condiciones de reacción, tales como temperatura y fracciones molares de alimentación.

### 2.3.2. Los fluidos comprimidos como medio de reacción y miscibilidad con líquidos iónicos

Otra alternativa a la utilización de disolventes orgánicos son los fluidos comprimidos (FC). Algunos de estos fluidos son considerados solventes generalmente reconocidos como seguros (GRAS, *Generally Recognized as Safe*, por sus siglas en inglés) y se han convertido en una alternativa muy atractiva debido a que sus propiedades como disolventes pueden ser manipuladas fácilmente; entre éstos destaca el CO<sub>2</sub> supercrítico (scCO<sub>2</sub>), ya que ha sido ampliamente utilizado en las reacciones enzimáticas, sin embargo, un problema al utilizar este FC apolar es la baja solubilidad de solutos polares, por lo que se requiere emplear co-disolventes polares que son de difícil remoción. Otro FC que ha llamado mucho la atención es el 1,1,1,2-tetrafluoroetano (R-134a), debido a que no es tóxico, no es flamable y, al igual que el CO<sub>2</sub>, no destruye la capa de ozono y es fácilmente reciclable. La aplicación principal del R-134a es como refrigerante ecológico de amplio uso, además de que puede sustituir a los clorofluorocarbonos como un propulsor en latas de aerosol, así como también en el soplado de espumas elaboradas de poliestireno y puede ser utilizado como excipiente farmacéutico,<sup>32</sup> principalmente para el tratamiento del asma crónica. Entre sus desventajas se encuentra que, al igual que el CO<sub>2</sub>, fomenta el efecto invernadero.

Entre sus principales características, destacan que es un disolvente polar (momento dipolar=5.0 debye,  $\epsilon=2.1D$ ) lo cual favorece la solubilidad de substratos de mayor polaridad, además es un disolvente hidrofóbico y su presión crítica (40.6 bar) es más baja que la del CO<sub>2</sub> (73.6 bar), por lo que se pueden utilizar condiciones de trabajo más suaves.<sup>33</sup> Estas características hacen que el R-134a líquido haya sido utilizado en extracciones de productos naturales,<sup>34</sup> separación de mezclas terciarias<sup>35</sup> o como solvente no convencional en distintas reacciones, entre ellas reacciones de espumado o polimerización.<sup>36,37</sup> Además, estas características lo hacen un excelente candidato como medio de reacción en la

síntesis enzimática, ya que evita la partición de las moléculas de agua de la enzima al medio de reacción manteniendo su conformación activa.

El primer trabajo del uso conjunto de R-134a líquido en síntesis enzimática fue publicado por Micklefield y col. (2004),<sup>38</sup> quienes trabajaron en la desimetrización de meso-2-ciclopenteno-1,4-diol catalizado por la lipasa de *Burkholderia cepacia* (lipasa PS) y CALB; donde se determinó un aumento en el rendimiento y enantioselectividad en comparación con los obtenidos en disolventes orgánicos. En dicho estudio también se reportó la reacción de transesterificación de un aminoácido N-prottegido catalizada por la proteasa *subtilisina Carlsberg*, demostrando la compatibilidad de dicha sustancia polar con el R-134a, ya que hubo una mejora de la actividad enzimática. En dicho estudio se argumenta que, aun siendo un disolvente polar, es compatible con la actividad enzimática sin la necesidad de agregar agua en el medio ya que es de naturaleza hidrofóbica.

Asimismo, se ha reportado la estabilidad y actividad enzimática de la CALB en el medio R-134a subcrítico en la esterificación de ácido oleico con glicerol, donde se observó que el uso del R-134a aumentó significativamente la actividad enzimática.<sup>39</sup> En nuestro grupo de investigación se realizó la primera PAAE utilizando R-134a subcrítico como medio de reacción: se sintetizó poliε-caprolactona (PCL) utilizando la CALB como catalizador y se determinó que las mejores condiciones de presión y temperatura para esta síntesis fueron 25 bar y 65 °C;<sup>40</sup> también se determinó que un factor importante a considerar en este tipo de reacción es la actividad del agua inicial ( $a_{wi}$ ), ya que a un  $a_{wi}$  de 0.22 se alcanzó el mayor rendimiento (99%); no obstante, a un  $a_{wi} < 0.16$  mayores  $M_n$  se alcanzaron (hasta  $83.6 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ ).<sup>41</sup> En este mismo grupo de investigación, se realizó la hiperramificación de CL y δ-valerolactona (VL) con BHB a las mismas condiciones subcríticas y biocatalizador.<sup>42</sup> En un trabajo más reciente, se realizó la síntesis de PLLA en R-134a en condiciones supercríticas utilizando la lipasa PS libre como biocatalizador, donde se determinó que, para esta síntesis, se obtuvieron mejores resultados a condiciones supercríticas (42% de rendimiento y

$M_n$  de  $14.0 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ ) que a condiciones subcríticas (28% de rendimiento y  $M_n$  de  $3.0 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ ).<sup>43</sup>

### 2.3.3. Medio de reacción mezcla homogénea de R-134a y [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]

Aunque, como se describió anteriormente, existen reportes de PAAE tanto de [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] como de R-134a, a la fecha no existen reportes de reacciones utilizando estos medios de reacción en conjunto ([C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]/R-134a); sin embargo, se han obtenido buenos resultados al utilizar otros FC en conjunto con LI como es el caso del sistema LI/scCO<sub>2</sub><sup>44</sup> para reacciones de transesterificación y esterificación,<sup>45</sup> como por ejemplo, las investigaciones reportadas por el grupo de Iborra y col. (2003),<sup>23</sup> quienes realizaron la síntesis de butil butirato y la transesterificación de 1-feniletanol, utilizando la CALB como biocatalizador en este sistema de forma continua, donde se logró la obtención de productos altamente puros en un proceso verde, así como se comprobó que, pese a utilizar temperaturas y presiones elevadas, la actividad enzimática no se vio comprometida.

Por otro lado, existen varios reportes de la solubilidad y equilibrio de fases del [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] y R-134a a bajas presiones (<10 bar),<sup>46-48</sup> e incluso Ren y Scurto (2009)<sup>49</sup> han publicado el comportamiento global de fases del sistema [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]/R-134a comprimido (figura 5); ellos realizaron este estudio utilizando un reactor hasta el 70% de su capacidad con LI y adicionando el R-134a hasta la presión deseada, obteniendo un comportamiento de fases en un intervalo de presión de 0 a 350 bar y de temperatura de 0 a 100 °C.<sup>49</sup> Se puede observar que en y debajo de los puntos del equilibrio líquido-vapor (VLE) se tiene una región bifásica y por debajo de los puntos críticos de la muestra una región multifásica, líquido-líquido-vapor en equilibrio (VLLE); no obstante, sobre la línea de puntos críticos de la muestra se tiene una región monofásica que los autores describen como una mezcla crítica.

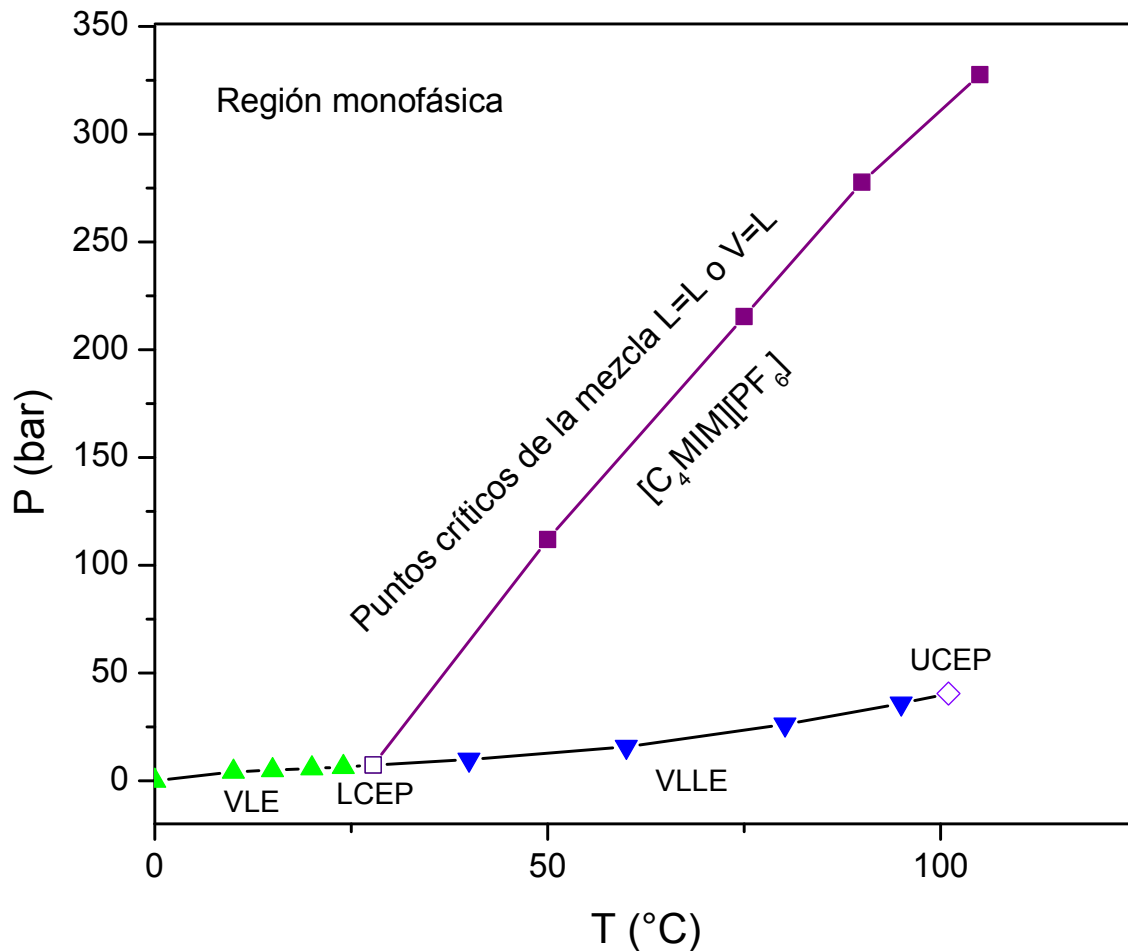


Figura 5. Equilibrio de fases  $[C_4MIM][PF_6]/R-134a$  (Ren y Scurto, 2008).<sup>49</sup> Equilibrio líquido-vapor (VLE), punto crítico final inferior (LCEP), equilibrio líquido-líquido-vapor (VLLE) y punto crítico final superior (UCEP).

## 2.4. Lipasas en la síntesis de PLLA

Muchos grupos de investigación han sintetizado el PLLA enzimáticamente, como Fujioka y col. (2006),<sup>50</sup> quienes realizaron la polimerización del LLA por PAAE con la CALB inmovilizada; esta biocatálisis se llevó a cabo a 100 °C con 6% en peso del biocatalizador. En este trabajo, se obtuvo un polímero con  $M_w$  de  $2.44 \times 10^3$   $g\ mol^{-1}$  en 10 días de reacción y un PDI de 2.6. García-Arrazola y col. (2009)<sup>51</sup> llevaron a cabo la síntesis enzimática del PLLA con CALB inmovilizada usando  $scCO_2$  en un sistema multifásico, donde a las condiciones iniciales el monómero



cíclico se encontraba parcialmente solubilizado en  $\text{scCO}_2$  (9.5% p/v) a una presión a 300 bar y una temperatura de 65 °C y otra fracción en una fase líquida orgánica de éste fundido. En ese trabajo se obtuvo un  $M_w$  de  $12.9 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$  a los 9 días de reacción. También López-Luna (2011)<sup>52</sup> intentó la polimerización de LLA con la CALB inmovilizada en R-134a líquido como medio de reacción a 65 °C y 25 bar; aunque el monómero solubilizó perfectamente, obtuvo rendimientos menores al 2% ya que el producto precipitaba debido a la insolubilidad del mismo en el medio de reacción. Por otro lado, otra lipasa empleada en polimerización de PLLA es la lipasa PS; entre los trabajos con esta lipasa, se encuentra el de Huijser y col. (2006)<sup>53</sup> quienes no reportan la polimerización de PLLA, sin embargo, reportaron la co-polimerización de LLA y glicólido (GA) en masa a 130 °C con 8% de enzima; a los 2 días de reacción obtuvieron  $M_n$  de  $20.0 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$  con un PDI de 4.0. Por otro lado, en el 2007 Numata y col. reportaron la polimerización del PLA utilizando alcoholes como iniciadores a 140 °C en masa y se obtuvieron  $M_n$  hasta de  $32.0 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ .<sup>54</sup> Guzmán-Lagunes y col.<sup>43</sup> reportaron la polimerización del LLA en medio R-134a empleando la Lipasa PS, en este trabajo se determinó que con las condiciones supercríticas se obtuvieron mejores resultados que con las subcríticas; se obtuvo un rendimiento de 42% con un  $M_n$  de  $14.0 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ .

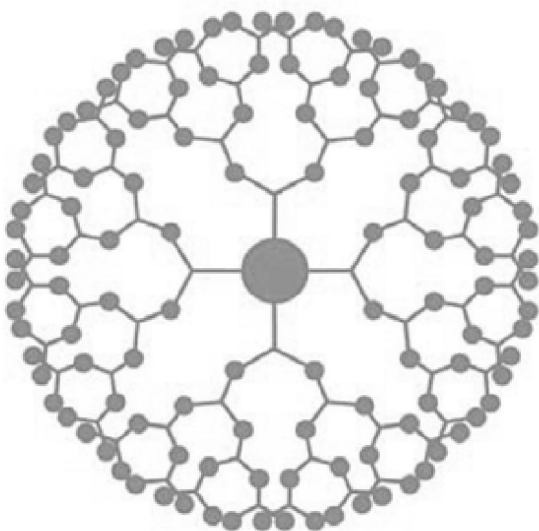
## 2.5. Los polímeros hiperramificados

Los poliésteres alifáticos, derivados de monómeros cíclicos como LA, son polímeros versátiles con propiedades mecánicas similares al poliestireno y al PET, como se mencionó anteriormente. Estos atributos los hacen interesantes para diversas aplicaciones que a menudo requieren propiedades específicas; la modificación y mejora de las características de estos poliésteres sigue siendo un reto, aunque se puede lograr con la formulación adecuada para cada uso en concreto. Una estrategia alternativa para generar propiedades inusuales dirigidas hacia una notable variedad de aplicaciones, combinadas con un perfil de biodegradación modificado, es la hiperramificación de polímeros biodegradables.<sup>55</sup>

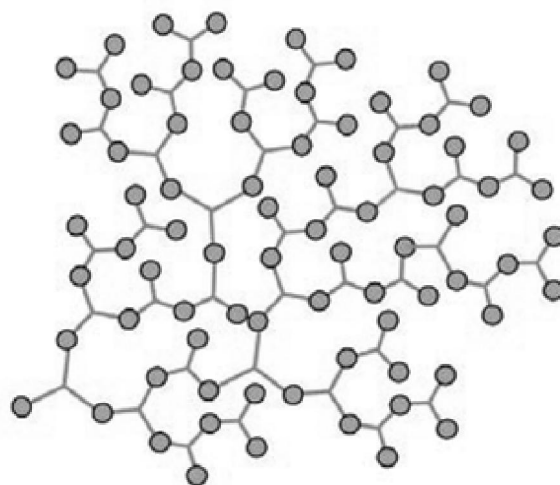
En la última década, las publicaciones de polímeros hiperramificados han aumentado notablemente al grado de tener cerca de 500 publicaciones por año; debido a su estructura y características químicas tienen una gran variedad de aplicaciones, ya que su alta funcionalidad permite el desarrollo de nuevos productos con una gran variedad de arquitecturas moleculares.<sup>56</sup>

Los polímeros dendríticos se dividen en dendrímeros y polímeros hiperramificados (figura 6). Los dendrímeros son estructuras arbóreas perfectas sintetizados por rutas de múltiples pasos incluyendo alternancias entre las reacciones de ramificación y pasos de purificación; la ventaja de esta síntesis orgánica es que se obtiene un polímero monodisperso; sin embargo, se obtienen cantidades de productos muy limitadas y su proceso de síntesis es costoso en tiempo y materiales.<sup>11</sup>

A)



B)



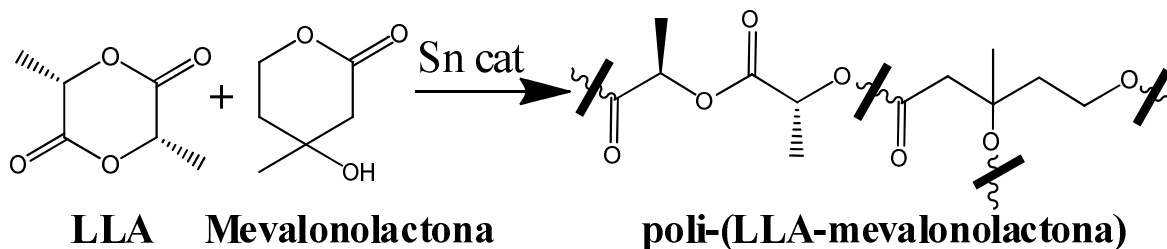
**Figura 6. Estructura general de los dendrímeros (A) y polímeros hiperramificados (B).**<sup>57</sup>

Los polímeros hiperramificados son producidos, por el contrario, en un solo paso de polimerización. En oposición a la preparación de dendrímeros, esta es directa y

rápida, pero con ramificaciones al azar. La simplicidad en la síntesis y las similitudes reportadas en cuanto a las propiedades físicas y mecánicas con aquellos dendrímeros con las mismas unidades de repetición hacen que éstos se contemplen como una alternativa económicamente viable.<sup>11</sup>

La modificación de los grupos terminales de los polímeros hiperramificados permite modular algunas de sus propiedades, tales como la  $T_g$ , la solubilidad, las propiedades reológicas, las propiedades mecánicas, el perfil de biodegradación, del mismo modo que determina muchas de sus posibles aplicaciones. Estas aplicaciones van desde aditivos para recubrimientos hasta las más avanzadas tecnologías, como es el caso de los sensores. Nuevas áreas prometedoras de las posibles aplicaciones de los polímeros hiperramificados incluyen procesos de separación por destilación extractiva, extracción por solvente, absorción, membranas o cromatografía.<sup>12</sup>

En este sentido, Tasaka y col. (2001)<sup>58</sup> llevaron a cabo la síntesis no enzimática de poli(LLA-co-mevalonolactona) (figura 7) en masa a 130 °C con dos catalizadores:  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  y distanoxano; donde observaron que la cristalinidad, la temperatura de fusión y de ebullición fueron más bajas que las del homopolímero PLLA lineal.



**Figura 7. Esquema de reacción de la síntesis de poliLLA-co-mevalonolactona.**

Entre los trabajos de hiperramificación empleando LLA también destacan el grupo del Dr. Frey (2006),<sup>59</sup> quienes realizaron la polimerización del LLA y el BHB con  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  (figura 8) obteniendo polímeros de un  $M_n$  de hasta  $6.0 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ , el

cual disminuyó al igual que la cristalinidad del polímero a medida que el DB aumentaba y con más de 7% de incorporación de BHB se obtuvieron materiales amorfos.

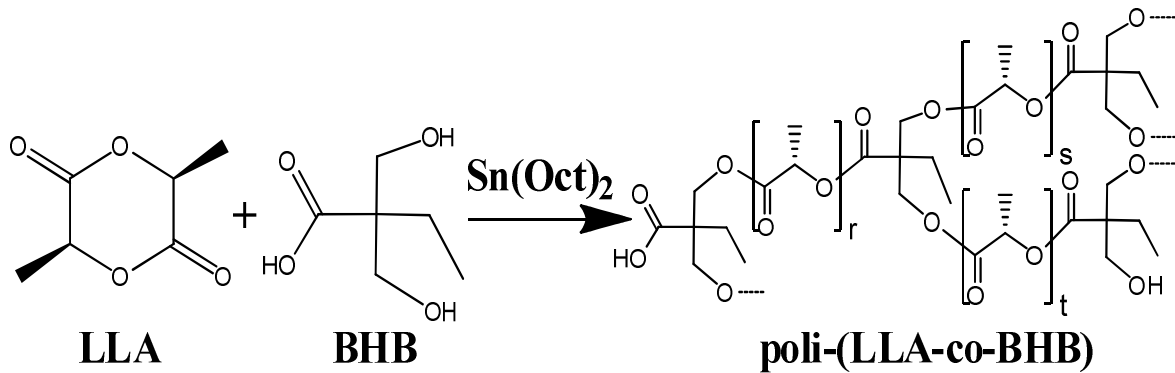


Figura 8. Esquema de reacción para la síntesis de poli(LLA-co-BHB) reportada por el grupo del Dr. Frey.<sup>59</sup>

Otro trabajo de este mismo grupo es la polimerización de LLA y el inímero cíclico 5-hidroximetil-1,4-dioxano-2-ona (5HDON) (figura 9) evaluando dos sistemas de reacción; con  $\text{Sn(Oct)}_2$  en masa y 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-eno en diclorometano, donde determinaron que aproximadamente el 50% del inímero es transformado en unidades dendríticas y obtuvieron DB de hasta 0.22.<sup>60</sup>

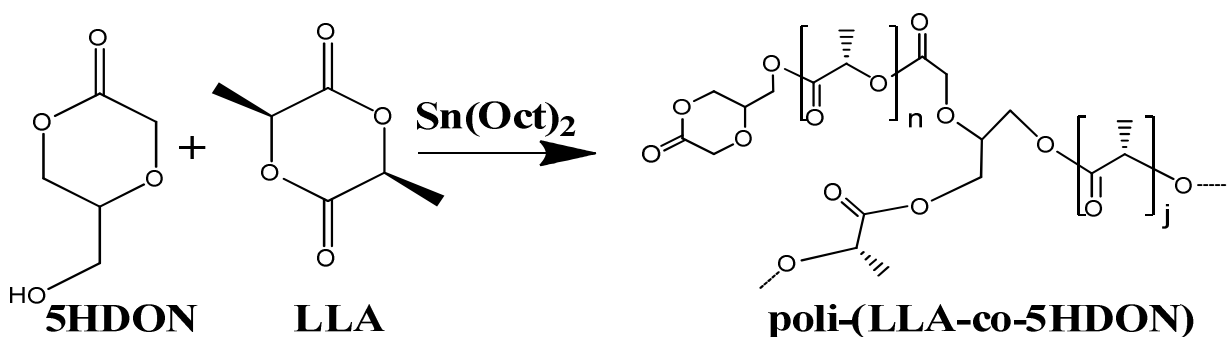


Figura 9. Esquema de reacción de la síntesis de poli(LLA-co-5HDON) reportado por el grupo del Dr. Frey.<sup>60</sup>

Recientemente el mismo grupo reportó hiperramificaciones de glicólido y BHB catalizado con  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  donde se obtuvieron  $M_n$  entre  $1.1$  y  $4.0 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$  y un rango de DB de  $0.12$  a  $0.44$ ; se determinó que los materiales fueron amorfos con más de  $15\%$  de incorporación de BHB.<sup>61</sup>

El grupo de investigación de Frey de la Universidad de Mainz en Alemania es uno de los pocos que ha trabajado con la hiperramificación enzimática (CALB inmovilizada),<sup>62</sup> preparando copoliésteres por PAAE de CL como monómero tipo AB y BHB. Mediante la variación sistemática de la concentración de BHB, obtuvieron muestras de poliésteres hiperramificados con diferentes DB. Otro reporte de hiperramificación enzimática es de nuestro grupo de investigación por parte de López-Luna y col. (2010),<sup>42</sup> quienes trabajaron en la síntesis de copolímeros hiperramificados de BHB con los monómeros CL y VL en el medio R-134a líquido con la CALB inmovilizada; en este reporte se obtuvieron en el caso de la VL y BHB,  $M_n$  entre  $0.9$  y  $2.0 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$  y grados de ramificación de hasta  $0.09$  y en el caso de la CL  $M_n$  de hasta  $2.7 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$  con un rango de DB de  $0.02$  a  $0.11$ .

## 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 3.1. Hipótesis

Debido a la mayor capacidad de disolución de sustratos en líquidos iónicos hidrofóbicos, así como la adecuada actividad de lipasas en éstos, si utilizamos medios de reacción basados en  $[C_4MIM][PF_6]$  se obtendrán polímeros lineales e hiperramificados con base en PLLA.

### 3.2. Objetivo general

Evaluar el efecto de las variables involucradas (temperatura, tiempo, relación molar de alimentación, centros de ramificación y medios de reacción) en la síntesis enzimática de homopolímeros y polímeros hiperramificados derivados del LLA en medios basados en LI hidrofóbico en las propiedades de los polímeros.

### 3.3. Objetivos específicos

- Determinar la mejor temperatura para la PAAE de PLLA en medio  $[C_4MIM][PF_6]$ , evaluando propiedades tales como conversión,  $M_n$  y rendimiento.
- Sintetizar materiales mediante la PAAE de LLA y los co-monómeros polifuncionales BHB, ácido gálico y L-serina en el medio  $[C_4MIM][PF_6]$  utilizando la enzima CALB inmovilizada como biocatalizador, así como caracterizar los materiales resultantes.
- Sintetizar y caracterizar los polímeros lineales e hiperramificados derivados de LLA en mezclas de reacción  $[C_4MIM][PF_6]/R-134$  utilizando CALB inmovilizada como biocatalizador.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Materiales

El biocatalizador utilizado fue CALB inmovilizada por adsorción sobre un soporte a base de polimetacrilato de Lewatit VP OC 1600 (esférico de 1mm) suministrado por C-Lecta (Alemania) con una actividad de  $4700.4 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  (corresponde a la síntesis de  $1 \mu\text{mol}$  por minuto de *p*-nitrofenol). Los monómeros empleados fueron: LLA (3*s*-cis-3,6-dimetil-1,4-dioxano-2,5-diona), 98% (Aldrich, EUA) y BHB (ácido 2,2-bis(hidroximetil) butírico) (Aldrich, EUA). Las sustancias empleadas fueron hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio ( $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]$ ), 99% (Solvionic, Francia), 1,1,1,2-tetrafluoroetano (R-134a) (Dupont SUVA R134a de refracciones STAR SA de CV), metanol grado industrial (Química Barsa S. de R.L., México), cloroformo grado reactivo (Química Meyer, México), DMSO grado reactivo (J.T. Baker, EUA) y THF grado HPLC (J.T. Baker, EUA).

### 4.2. Acondicionamiento del LLA

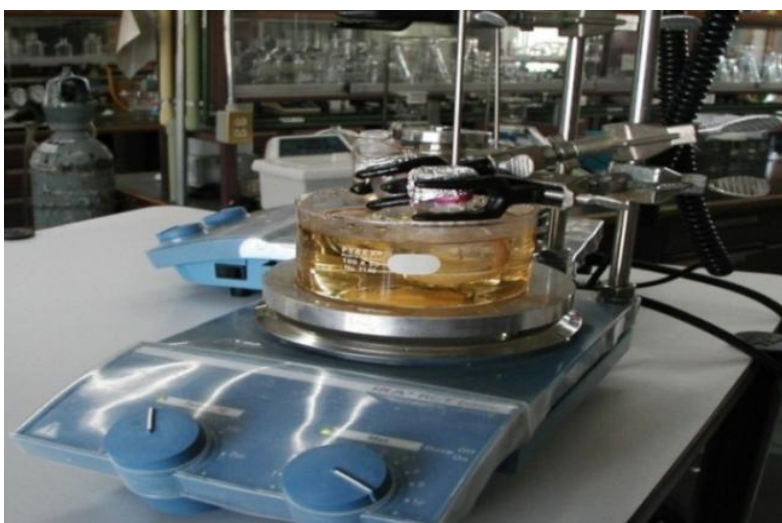
El LLA se recristalizó previo a su uso; 100 g se disolvieron en 600 mL de metanol a  $36 \text{ }^\circ\text{C}$  y se agitó hasta su disolución, inmediatamente se congeló a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 h, posteriormente se filtró al vacío para inmediatamente secar durante 4 h utilizando una bomba de alto vacío para eliminar trazas de metanol y de agua presentes en el LLA.

### 4.3. Pruebas iniciales de solubilidad del BHB en LI

Se realizaron pruebas de solubilidad del LLA y BHB en el LI  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]$  a diferentes concentraciones de BHB con respecto al LLA: 10, 20, 30, 40 y 50% mol, a una relación inicial de monómeros respecto al LI del 70% en peso en viales de 10 mL evaluando las temperaturas de 65 y  $90 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4.4. Reacciones de polimerización en LI

En un matraz de bola (10 mL) se pesaron 3.5 g (70% con respecto al LI [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]) de monómero (LLA o LLA y co-monómero según fue el caso) y 55.93 U de biocatalizador (CALB). El matraz, con el monómero y el biocatalizador, se congeló a -80 °C durante 2 horas; posteriormente se liofilizó por 2 horas, para eliminar cualquier cantidad de agua inicial a excepción de la que rodea la proteína. Al terminar la liofilización se agregaron 5 g del LI y se colocó el matraz en un baño de glicerina, el cual a su vez se situó sobre una parrilla de calentamiento con temperatura y agitación controlada (figura 10) hasta el tiempo definido para cada reacción. Cabe mencionar que se realizaron reacciones sin la adición de biocatalizador a manera de blanco bajo las mismas condiciones de reacción.



**Figura 10. Sistema para la reacción de polimerización en LI.**

Se realizó la purificación de los productos con disolventes, solubilizando el contenido de la reacción en cloroformo (homopolímeros) o DMSO (hiperramificados) para separar la enzima y posteriormente se precipitó en antisolvente metanol frío (5 °C), en un volumen 10 veces mayor; el polímero obtenido se secó al vacío y se determinó su peso, para enseguida calcular el rendimiento con la fórmula ( 1 ).



$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{g de polímero purificado}}{\text{g de monómero alimentado}} * 100 \quad (1)$$

Para la síntesis de PLLA se evaluaron 3 temperaturas 65, 73 y 90 °C con y sin la adición de biocatalizador. En la síntesis de los polímeros hiperramificados se evaluaron tres relaciones molares LLA:BHB 9:1, 12.3:1 y 19:1 a 90 °C; por otro lado, se realizaron reacciones en masa, es decir en ausencia de disolvente, siguiendo el mismo procedimiento anterior a 100 °C ( $T_f$ , aprox 92-94 °C) a las mismas relaciones molares.

Caracterización estructural:

$^1\text{H}$  RMN PLLA ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ) 5.23-5.04 (1H,  $\text{CH-CH}_3$ ), 1.70-1.53 (3H,  $\text{CHCH}_3$ ), FT-IR ( $\lambda$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3352 (tensión –OH), 2996 y 2942 (tensión de bandas alifáticas C-H), 1757 (tensión –C=O éster), 1455 (torsión C-H), 1303 (tensión C-O éster), 1183 tensión C-O), 1042 (tensión C-O éster), 720 y 730 (torsión –OH fuera del plano).

$^1\text{H}$  RMN hiperramificados poli(LLA-co-BHB) ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ) 5.23-5.04 (1H,  $\text{CH-CH}_3$ ), 4.41-4.24 (2H,  $\text{OOC-C-CH}_2\text{-O}$ ), 3.76-3.71 (2H,  $\text{OOC-C-CH}_2\text{-OH}$ ), 1.60-1.53 (3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.52-1.42 (2H,  $\text{OOC-C-CH}_2\text{-CH}_3$ ), 0.97-0.87 (3H,  $\text{OOC-C-CH}_2\text{-CH}_3$ ). FT-IR ( $\lambda$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3352 (tensión –OH), 2996 y 2942 (tensión de bandas alifáticas C-H), 1757 (tensión –C=O éster), 1455 (torsión C-H), 1303 (tensión C-O éster), 1183 tensión C-O), 1042 (tensión C-O éster), 720 y 730 (torsión –OH fuera del plano).

#### 4.5. Reacciones en el medio $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]/\text{R-134a}$

Para llevar a cabo la polimerización se colocaron 255.70 U de CALB en un reactor de alta presión de 40 mL (FILHER S.A. de C.V, México) equipado con un agitador magnético controlado con una parrilla de agitación externa, se agregaron los monómeros (16 g de LLA o LLA y BHB según fue el caso) previamente congelados y liofilizados durante 2 horas y finalmente 17 mL de  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]$ ; el reactor y su contenido se secaron durante 24 horas con una bomba de aceite de alto vacío (Vacuumbrand, GER). Posteriormente el reactor se llenó con R-134a a

través de una bomba ISCO de alta presión (ISCO Syringe Pump). La columna de presurización de la bomba ISCO se enfrió con un termocriostato (American HetoLabs. Inc. USA). La temperatura de reacción se monitoreó con dos termopares independientes (ENSA S.A. de C.V.), uno para la chaqueta cerámica de calentamiento y otro para el interior del reactor. La temperatura y presión de operación se ajustaron a las deseadas (65 o 90 °C y 300 bar de presión, figura 11). Después de haber enfriado el reactor a -5 °C durante 24 horas se realizó la despresurización a presión atmosférica al final de cada experimento. La purificación del PLLA y los polímeros hiperramificados se realizó usando cloroformo y DMSO respectivamente para la separación de la enzima y metanol para precipitar; este procedimiento se llevó a cabo en tres ciclos para eliminar completamente el LI del producto. Bajo este procedimiento de reacción se sintetizaron tanto PLLA como poli(LLA-co-BHB).



**Figura 11. Sistema de reactores de alta presión.**

La cantidad de R-134a inyectada al reactor se calculó mediante la ecuación de estado de Redlich-Kwong ( 2 ):<sup>63</sup>

$$P = \frac{RT}{V - b} - \frac{a(T)}{V(V + b)} \quad (2)$$

$$a(T) = 0.42748 \frac{R^2 T_c^2}{P_c} \alpha(T) \quad (3)$$

$$b = 0.08664 \frac{RT_c}{P_c} \quad (4)$$

$$\alpha(T) = \sum_{k=0}^{\leq 3} \beta_k (1/T_r - T_r)^k, T_r = T/T_c \quad (5)$$

Los parámetros termodinámicos se presentan en la tabla 1, los cuales fueron tomados de la publicación de Kim y col. (2013).<sup>63</sup>

**Tabla 1. Parámetros termodinámicos del R-134a.**

Compuesto	T <sub>c</sub> (K)	P <sub>c</sub> (kPa)	β <sub>0</sub>	β <sub>1</sub>	β <sub>2</sub>	β <sub>3</sub>
R-134a	374.21	4059	1.0025	0.5053	-0.04983	0

#### 4.6. Reacciones en la celda de mirillas

Con la finalidad de observar el comportamiento de las fases y la solubilidad de los monómeros en el sistema, se llevó a cabo la reacción en un reactor de 40 mL con tres mirillas de zafiro (THUROS S.A. de C.V, México), equipado con un agitador magnético controlado con una parrilla de agitación externa (figura 12). Cabe mencionar que no se agregó la enzima para tener una mejor apreciación. Se evaluaron dos temperaturas diferentes, 65 y 90°C, a 300 bar. El llenado del R-134a y la despresurización se realizaron como se describió anteriormente para las reacciones de [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]/R-134a.



Figura 12. Celda de mirillas a alta presión.

#### 4.7. Determinación de la actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática de CALB, se realizó mediante la hidrólisis de acetato de *p*-nitrofenilo (Sigma Aldrich, EUA). En primer lugar, se elaboró una curva de calibración de *p*-nitrofenol; para esto, se requirió de una solución concentrada de 5 mM de *p*-nitrofenol (Sigma Aldrich, EUA) en acetonitrilo y se aforó en matraces de 5 mL con solución amortiguadora de fosfatos (50 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , pH 7.0 y 0.2% de emulsificante triton X-100) hasta obtener la concentración deseada de *p*-nitrofenol (25, 50, 100, y 250  $\mu$ M) en un volumen total de 2 mL, se determinó la absorbancia utilizando un espectrofotómetro Lambda 2S UV-Vis (Perkin Elmer, EUA) a 410 nm a TPN.

Posteriormente, se realizó la reacción de hidrólisis de acetato de *p*-nitrofenilo, donde se agregaron 0.32 U de CALB inmovilizada a 1.9 mL de solución amortiguadora de fosfatos y finalmente 100  $\mu$ L de acetato de *p*-nitrofenilo en acetonitrilo (100 mM), midiéndose la absorbancia a una longitud de onda de 410 nm (longitud de onda donde absorbe el *p*-nitrofenol, producto de la reacción de

hidrólisis) a TPN. Para evaluar la actividad inicial, se midió la variación de la absorbancia durante 2 min; posteriormente, se calculó la actividad con ayuda de la curva de calibración del *p*-nitrofenol (absorbancia/concentración) y la actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para obtener un  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol por minuto a pH 7.0 y TPN.<sup>64</sup>

También se determinó la actividad residual para conocer el efecto que tiene el BHB sobre la enzima; ésta última fue sometida a 5 diferentes concentraciones de BHB: 5, 7.5, 10, 25 y 50% molar en una solución acuosa durante 1, 3 y 5 días a 25 °C y 150 rpm en una incubadora; al mismo tiempo se llevó a cabo un control sin BHB para los tiempos evaluados. Con el fin de minimizar errores experimentales, se decidió, medir la actividad enzimática mediante la hidrólisis de acetato de *p*-nitrofenilo, como se describió anteriormente, de todas las muestras el mismo día utilizando soluciones frescas.

#### **4.8. Técnicas de caracterización**

Los materiales obtenidos se analizaron por resonancia magnética nuclear de protón (<sup>1</sup>H RMN), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y termogravimetría (TGA), éstos análisis se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI-FQ): mientras que la espectrometría de masas por ionización/desorción láser asistida por matriz acoplada a un detector de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) se realizó en el Instituto Nacional de Medicina Genómica y la espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier por reflectancia total atenuada (ATR FT-IR) se realizó en el laboratorio de Biopolímeros de la UAM-I. Con lo que respecta a la difracción de rayos x en polvo (PXRD) las determinaciones se realizaron tanto en la USAI-FQ como en el laboratorio de difracción de rayos X (T-128) de la UAM-Iztapalapa. La determinación de la viscosidad se realizó en el laboratorio 313 del conjunto E.

Por medio de los espectros de  $^1\text{H}$  RMN se determinó la estructura de los polímeros obtenidos; éstos se obtuvieron en un espectrómetro modelo Unity Innova (Varian, EUA) a 400 MHz. Los polímeros (20 mg) se disolvieron previamente en cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) para su análisis. El DB de la muestra se calculó por medio de la ecuación ( 6 ).<sup>59,65</sup>

$$DB_{AB/AB_2}^{stat} = 2 \frac{1 - X_{AB}}{(2 - X_{AB})^2} \quad (6)$$

donde  $X_{AB}$  es la fracción molar del co-monómero BHB, la cual se determinó integrando las señales características de protón del grupo metileno de las unidades BHB a  $\delta = 4.3$  y  $3.7$  ppm ( $\text{CH}_2$ ) comparándolas con la característica de protón del grupo metino (CH) de las unidades lactil  $\delta = 5.2$  ppm.

Asimismo, se realizó una determinación de la conversión de apertura de anillo, en las reacciones de síntesis de PLLA a 65, 73 y 90 °C con y sin adición de enzima, se tomaron alícuotas de la mezcla de reacción en tiempos iniciales y se les realizó  $^1\text{H}$  RMN , debido a que la estructura del LLA presenta una señal característica del protón del grupo metino (CH) a  $\delta = 5.0$  ppm a diferencia de la del protón del grupo metino (CH) de la estructura lineal que es a  $\delta = 5.2$  ppm. La conversión de apertura de anillo se determinó con la ecuación ( 7 ).

$$\text{Conversión (\%)} = \left( \frac{\int 5.2}{\int 5.2 + \int 5.0} \right) * 100 \quad (7)$$

donde:

$\int 5.0$  = Integral de área de la señal característica del protón del grupo metino del monómero cíclico.

$\int 5.2$  = Integral de área de la señal característica del protón del grupo metino de la estructura lineal.

Para conocer la presencia de grupos funcionales y así caracterizar estructuralmente, se realizó la espectroscopia de ATR-FTIR, para lo que se utilizó un espectrofotómetro ATR-FTIR 100 (Perkin Elmer, Inglaterra). Los espectros se adquirieron en un intervalo de onda de 650 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Las muestras se procesaron de dos formas: pulverizadas antes del análisis y también laminadas.

Por otro lado, para conocer el comportamiento térmico de los polímeros se emplearon los análisis, DSC y TGA; se realizaron en un termoanalizador MettlerToledo (Suiza) con módulos DSC-1 y TGA/SDTA 851. La rapidez de calentamiento fue de 10  $^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$  en una atmósfera de nitrógeno. Las muestras se analizaron a un intervalo de 0-400  $^{\circ}\text{C}$  (DSC) y 25-400  $^{\circ}\text{C}$  (TGA). Antes de cada corrida se realizó una rampa inicial hasta 100  $^{\circ}\text{C}$  para eliminar volátiles.

Por su parte, los espectros de PXRD se utilizaron para determinar el porcentaje de cristalinidad de los polímeros obtenidos, éstos se determinaron en un difractómetro de rayos X modelo D8 Advance Davinci (Bruker, EUA). Las muestras se pulverizaron perfectamente previamente a su análisis. El porcentaje de cristalinidad se calculó mediante la relación de las integrales de las áreas cristalinas entre el total (áreas cristalinas y amorfas) obtenidas en espectro.

A su vez, se realizó un análisis de MALDI-TOF para corroborar la estructura de los polímeros, así como su peso molecular; los espectros de MALDI-TOF se obtuvieron en un MALDI TOF/TOF 4800 Plus TM (Applied Biosystems, US). Las muestras (4 mg) se disolvieron en 1 mL de dimetilformamida (DMF); posteriormente 10  $\mu\text{L}$  de esta solución se mezclaron con un volumen igual de ácido 2,5-dihidroxi benzoico (DHB) disuelto previamente en DMF (10  $\text{mgmL}^{-1}$ ), finalmente se aplicó una alícuota (0.5  $\mu\text{L}$ ) de la muestra en una placa para MALDI y se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente. El espectro se llevó a

cabo en modo lineal y reflectrón ión positivo. Los productos con  $m/z$  menores a 500 se despreciaron en la evaluación del espectro debido al traslapamiento con la matriz.

A la par, la distribución de pesos moleculares ( $M_n$  y PDI) se determinó por cromatografía de exclusión molecular (SEC) en un cromatógrafo Agilent 1210 series (EUA) equipado con dos columnas PLgel 10  $\mu\text{m}$  MIXED-B LS 300 x 7.5 mm (Varian, EUA) a 40 °C; se utilizó como fase móvil THF a una velocidad de flujo de 1  $\text{mLmin}^{-1}$ , la determinación se realizó en un detector de dispersión de luz operando a 40 °C en el nebulizador, 80 °C en el evaporador y un flujo de gas (nitrógeno de alta pureza) de 1.0  $\text{mLmin}^{-1}$ . Se utilizaron estándares de poliestireno para la curva de calibración; tanto las muestras como los estándares se prepararon a una concentración de 2.5  $\text{mgmL}^{-1}$ .

Por su parte, se realizó una cromatografía en columna al filtrado de la reacción en LI, con la finalidad de determinar si estructuras con un mayor DB se estaban solubilizando en el disolvente metanol, para esto se empleó la relación de alimentación 90:10 (LLA:BHB) en el día 11 de reacción donde se recolectaron 17 fracciones, empleando sílica gel como fase estacionaria y metanol como fase móvil; el metanol se eliminó por rotaevaporación y las fracciones se enviaron a  $^1\text{H}$  RMN.

Se determinó la viscosidad del  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]$  para conocer su comportamiento de flujo en un intervalo de temperatura de 0 a 90 °C. Para este estudio se utilizó el reómetro de deformación controlada ARES-RFS III (TA Instruments, EUA) con una geometría de placas paralelas de 50 mm de diámetro y separación de 0.5 mm. El intervalo de velocidad de deformación fue de 1 a 200  $\text{s}^{-1}$ .

Finalmente, se realizó la determinación de hidroxilos al crudo de las reacciones<sup>66</sup> de las muestras obtenidas a las tres temperaturas evaluadas con y sin la adición de biocatalizador en LI con el fin de monitorear la conversión de la propagación de



cadenas así como el peso molecular. En primer lugar, se preparó una solución de THF y anhídrido acético al 0.5%, a 5 mL de esta solución se le agregó aproximadamente 50 mg de la muestra (alícuota tomada del medio de reacción); posteriormente, la reacción se llevó a cabo a 60 °C durante 3 horas en un baño de glicerina, utilizando un portatubo de ensayos y colocando un baño de hielo por encima para condensar lo volatilizado. Transcurrido el tiempo, se enfrió, se agregó agua destilada (0.1 mL) y se mantuvo durante 30 minutos a 60 °C; inmediatamente se tituló con una solución de KOH en etanol (aproximadamente 0.03 N valorada con una solución estándar 0.405 N de HCl), esta solución tenía que ser valorada minutos antes de medir las muestras para evitar la precipitación de la base; se utilizó fenolftaleína disuelta en etanol (10 gL<sup>-1</sup>) como indicador y al mismo tiempo se llevó a cabo un blanco sin muestra. A la par, se realizó para cada muestra una determinación de valor ácido en la cual se llevó a cabo el mismo procedimiento pero al THF no se le agregó anhídrido acético. El procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra. Para determinar el valor de hidroxilos se utilizó la ecuación ( 8 ).<sup>67</sup>

$$OH = \frac{B + \frac{SA}{C} - V}{S} N * 56.1 \quad (8)$$

donde:

*OH* = número de miligramos de KOH equivalente al contenido de hidroxilos en un gramo de muestra.

*A* = solución de KOH requerida por titulación del valor ácido, mL.

*B* = solución de KOH requerida por titulación del reactivo blanco, mL.

*C* = muestra usada para el valor ácido, g.

*V* = solución de KOH requerida por titulación del espécimen acetilado, mL.

*S* = muestra usada para acetilación, g.

$N$  = normalidad de la solución de KOH.

\*56.1: Peso molecular de KOH.

El peso molecular se determinó con la ecuación ( 9 ):<sup>68</sup>

$$\text{Peso molecular} = \frac{56100}{\text{Valor de hidroxilos}} \quad (9)$$

La conversión del polímero se calculó con la siguiente ecuación ( 10 ):

$$X = \frac{VOH_0 - VOH}{VOH_0} * 100 \quad (10)$$

donde

$VOH$  = valor de hidroxilos del polímero.

$VOH_0$  = valor de hidroxilos de la unidad de repetición.

## 5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se estudió la síntesis enzimática con CALB inmovilizada de los homopolímeros e hiperramificados de PLLA, ya que estos poliésteres tienen diversas aplicaciones, como se mencionó anteriormente, debido a sus propiedades, entre las que destacan la biodegradabilidad y biocompatibilidad; esto se realizó en el medio de reacción LI  $[C_4MIM][PF_6]$  (figura 13), debido a que es un solvente hidrofóbico, polar y puede utilizarse en un amplio intervalo de temperaturas, además se han obtenido buenos resultados utilizándolo en reacciones<sup>69</sup> enzimáticas, como por ejemplo en la síntesis de PLLAGA.<sup>31</sup> Además, este LI es considerado como un disolvente verde y no es tóxico (anexo 1) lo que amplía las aplicaciones de los polímeros sintetizados en este medio.

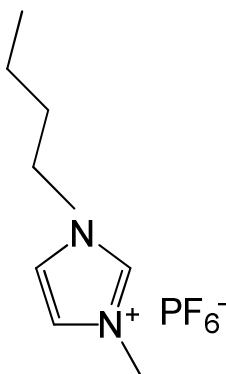


Figura 13. Estructura molecular del  $[C_4MIM][PF_6]$ .

### 5.1. Evaluación de temperaturas en la PAAE del PLLA

La síntesis enzimática de PLLA en LI está descrita en la literatura.<sup>30</sup> Sin embargo, no existen reportes de esta síntesis en  $[C_4MIM][PF_6]$ , por lo que, se decidió sintetizar enzimáticamente PLLA a tres temperaturas para determinar la temperatura a la cual se obtenían las mejores características de este polímero en cuanto a rendimiento, conversión y peso molecular. Se evaluaron las siguientes

temperaturas: 65, 73 y 90 °C, cada una de éstas se evaluó con y sin adición de biocatalizador.

Se llevó a cabo la síntesis de PLLA a las tres temperaturas como prueba preliminar; las reacciones se realizaron hasta la solidificación del medio de reacción, de manera similar a los reportes previos de homopolimerización de PLLA.<sup>30</sup> A 90 °C la reacción se detuvo a los 6 días mientras que las reacciones a 65 y 73 °C a los 9 días, cabe mencionar, que esta solidificación del medio de reacción fue observada con y sin la adición de biocatalizador a la temperatura de 90 °C. Para descartar que fuera un efecto del aumento de viscosidad del [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] por las temperaturas empleadas, se realizó un análisis de viscosidad del LI, donde este exhibió un comportamiento newtoniano entre 25 y 90 °C y a temperaturas mayores a 50 °C la viscosidad del LI fue relativamente baja (< 100 mPa·s) y no se esperaba que esta viscosidad fuera un factor relevante durante la síntesis enzimática (anexo 2). Por tanto, la solidificación del medio de reacción a estas temperaturas se atribuyó a la propagación de las cadenas poliméricas en dicho medio.

Por otro lado, ya precipitados los polímeros,<sup>30</sup> se determinó la pureza de los PLLAs obtenidos por medio de <sup>1</sup>H RMN (anexo 3), ya que en dichos espectros se encontraron sólo las señales características de PLLA en 5.23-5.04 ppm (asignado al protón del grupo metino) y en 1.7-1.53 ppm (asignado a los protones del grupo metilo).

Posteriormente, se evaluaron todas las condiciones (con y sin enzima a 65, 73 y 90 °C) y se tomaron alícuotas del crudo de la reacción a diferentes tiempos, con el fin de monitorear la conversión de apertura de anillo en los primeros días de reacción. Estas alícuotas se analizaron por <sup>1</sup>H RMN (anexo 3), en donde se integró la señal correspondiente al protón de grupo metino de la forma lineal (dímero lineal, oligómeros y polímero) 5.2 ppm y la señal asignada al protón del grupo metino del monómero cíclico no reaccionado (5.0 ppm). Posteriormente, se realizó el cálculo de la conversión como se describe en la sección experimental.

Los resultados de dicho cálculo se presentan en la figura 14, en donde se puede observar que existe un efecto térmico con respecto a la apertura de anillo, ya que a una mayor temperatura hay una mayor conversión de apertura de anillo al mismo tiempo de reacción; por ejemplo en el caso de 90 °C con biocatalizador la apertura de anillo es del 100% a las 48 h de reacción mientras que a 65 °C se alcanza esta conversión (98%) a las 120 h de reacción. Guzmán-Lagunes y col. (2012) alcanzaron la conversión completa de LLA en las primeras 72 h de reacción en scR134a, a diferencia del trabajo de García-Arrazola y col. (2009)<sup>51</sup> en scCO<sub>2</sub>, en la que la máxima conversión de monómero no superó el 60% en 9 días de reacción. Otros trabajos como el realizado por Fujioka y col. (2006)<sup>50</sup> en una reacción en masa utilizando la CALB como biocatalizador alcanzaron una conversión del 91% después de 240 h de reacción. Sin embargo Chanfreau y col. (2010) alcanzaron un 96% de conversión a las 24 horas de reacción a 90 °C usando un LI similar.

También se determinó una mayor rapidez de apertura de anillo en las reacciones con enzima (símbolos llenos) que en aquellas donde no se emplea este biocatalizador (símbolos vacíos) para las respectivas temperaturas; esto claramente indica la contribución del biocatalizador en esta polimerización.

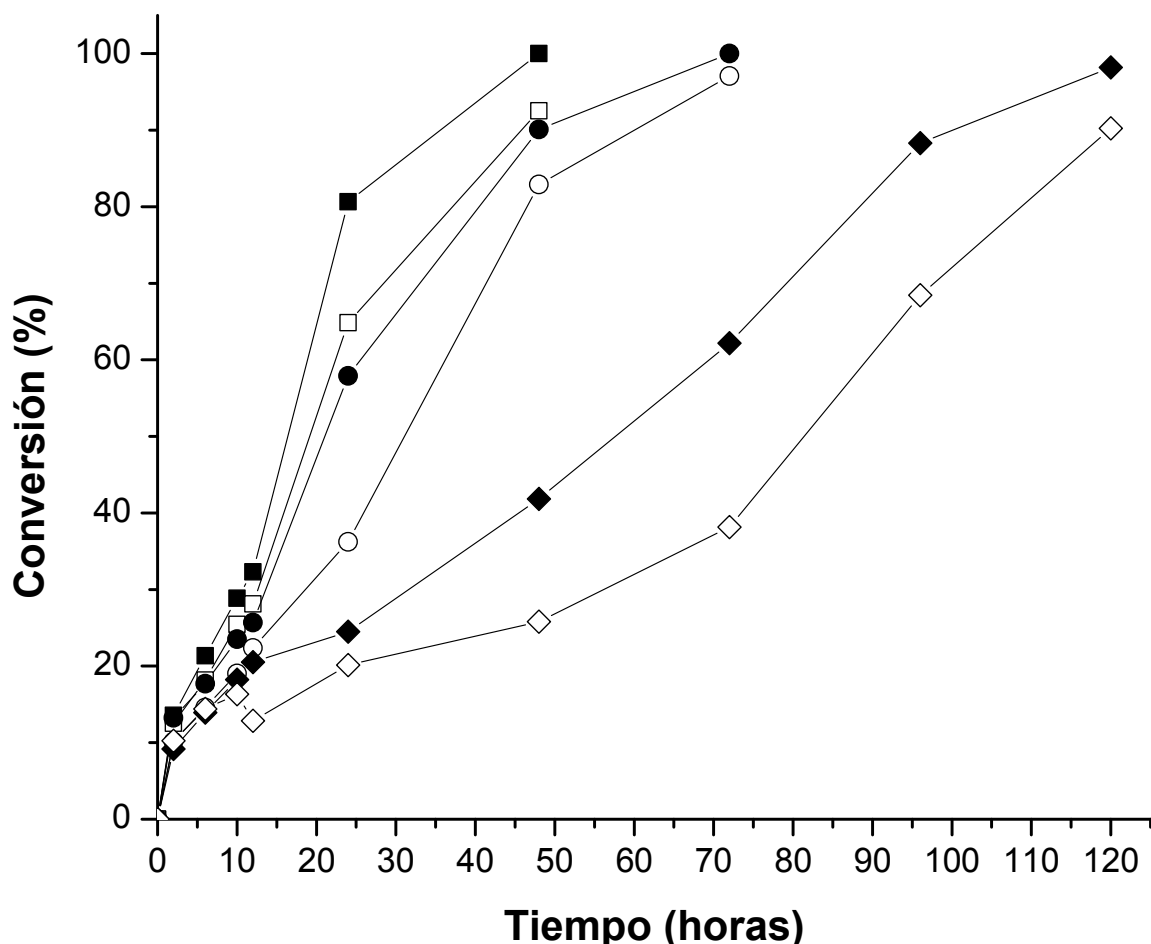


Figura 14. Curso temporal de la conversión de apertura de anillo enzimática de LA a diferentes temperaturas de reacción en  $[C_4MIM][PF_6]$ . Con enzima: 65 °C (◆), 73 °C (●) y 90 °C (■); conversión sin enzima: 65 °C (◇), 73 °C (○) y 90 °C (□).

Por otro lado, con los valores obtenidos de la conversión de apertura de anillo se realizó un análisis del consumo de monómero ( $\ln([M_0]/[M_t])$ ) a través del tiempo, los resultados se presentan en la figura 15. A estos datos se les realizó una correlación lineal, esta correlación sólo se pudo ajustar a los datos de las primeras 12 horas de reacción, donde se obtuvo valores de  $R^2$  mayores a 0.99 (tabla 2). Se ajustó la ecuación para cada una de las condiciones de reacción evaluadas y se determinó el valor del coeficiente de velocidad de reacción aparente de la apertura

de anillo ( $k_{app}$ ); los resultados se presentan en la tabla 2, donde se observa, en general, que a una mayor temperatura la  $k_{app}$  es mayor, con lo que se reitera que la temperatura de reacción afecta la apertura de anillo. El mayor valor de  $k_{app}$  se obtuvo en la reacción con enzima a 90 °C. Cabe mencionar que Kumar y col. (2000)<sup>19</sup> trabajaron con la síntesis enzimática (CALB) de PCL y al igual que en el presente trabajo obtuvieron la mayor  $k_{app}$  a 90 °C; por otro lado, a esta temperatura y a 73 °C no se encontró una gran diferencia entre la  $k_{app}$  enzimática y la no enzimática. No obstante, a la temperatura de 65 °C hubo una diferencia del doble entre la  $k_{app}$  de la reacción enzimática con respecto a la no enzimática. En esta última temperatura si se observa claramente el efecto del biocatalizador en la PAA.

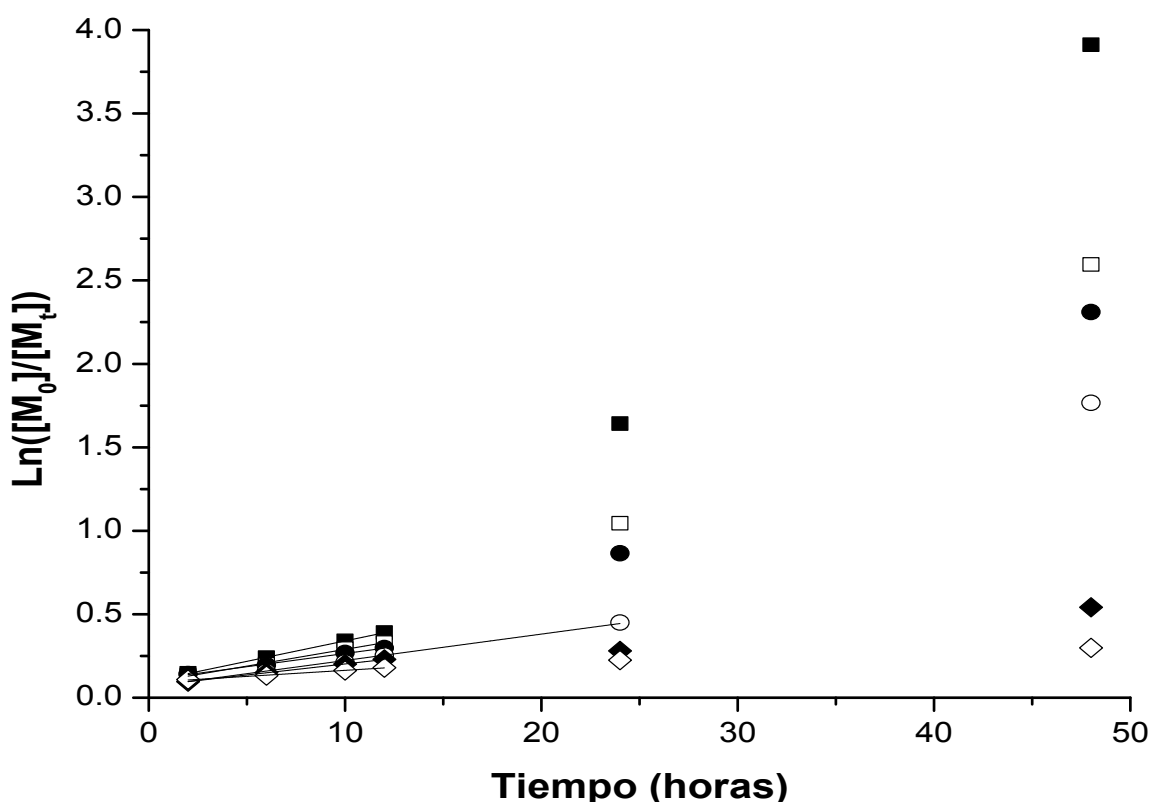


Figura 15. Consumo de monómero contra tiempo en la PAAE de PLLA. Con enzima: 65 °C (◆), 73 °C (●) y 90 °C (■); sin enzima: 65 °C (◇), 73 °C (○) y 90 °C (□).

**Tabla 2. Valores de  $k_{app}$  de la síntesis de PLLA a las diferentes condiciones evaluadas.**

Temperatura (°C)	$k_{app}^b$ ( $h^{-1}$ )	$R^{2\ b}$
65	0.01324	0.999
73	0.01584	0.997
90	0.02448	0.999
65 <sup>a</sup>	0.00722	0.993
73 <sup>a</sup>	0.01581	0.994
90 <sup>a</sup>	0.02004	0.993

<sup>a</sup> Reacciones sin enzima; <sup>b</sup> valores calculados de la regresión lineal:  $k_{app}$  corresponde al valor de la pendiente.

Asimismo, se realizó la determinación de  $M_n$  de las muestras en el seno de la reacción empleando una técnica de titulación, la cual se describe a detalle en la sección experimental. Mediante esta técnica se puede conocer el número de grupos hidroxilo terminales y de esta manera, de forma indirecta, calcular el  $M_n$  de las muestras (monómero no reaccionado, oligómero y polímero), cabe mencionar que este procedimiento no se podría realizar por SEC ya que en la mezcla de reacción hay LI, el cual aparecería en la detección por cromatografía. Se titularon las reacciones a las diferentes condiciones evaluadas (con y sin enzima a 65, 73 y 90 °C) cada 12 horas hasta la solidificación del medio de reacción, que varía para cada temperatura evaluada, como se mencionó anteriormente. Cabe destacar que este estudio se realizó con el fin de conocer la propagación, según sea el caso, a las diferentes temperaturas con y sin biocatalizador en el seno de la reacción.

En la figura 16 se puede observar que no hay mucha diferencia de  $M_n$  en los polímeros sintetizados a 65 °C (figura 16 inciso A) y 73 °C (figura 16 inciso B), además, a ambas temperaturas, las reacciones sin adición de enzima (símbolos vacíos) exhiben un menor peso molecular, obteniéndose en las reacciones a 65 °C los menores valores de  $M_n$ .



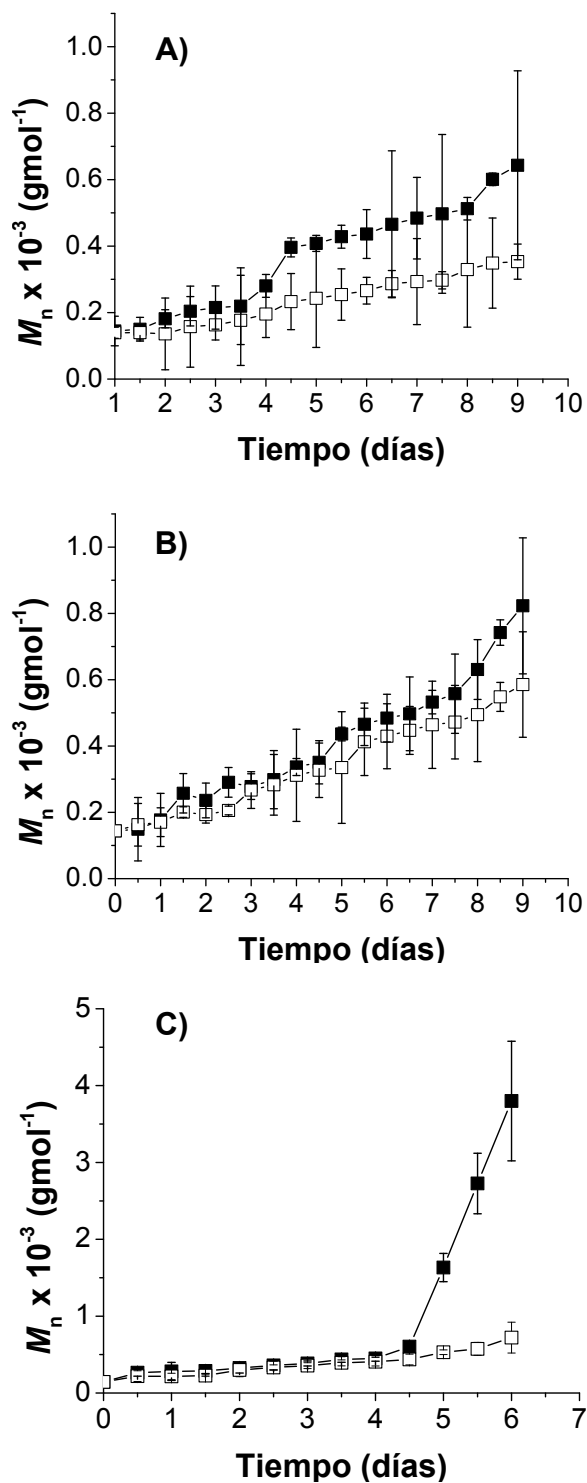
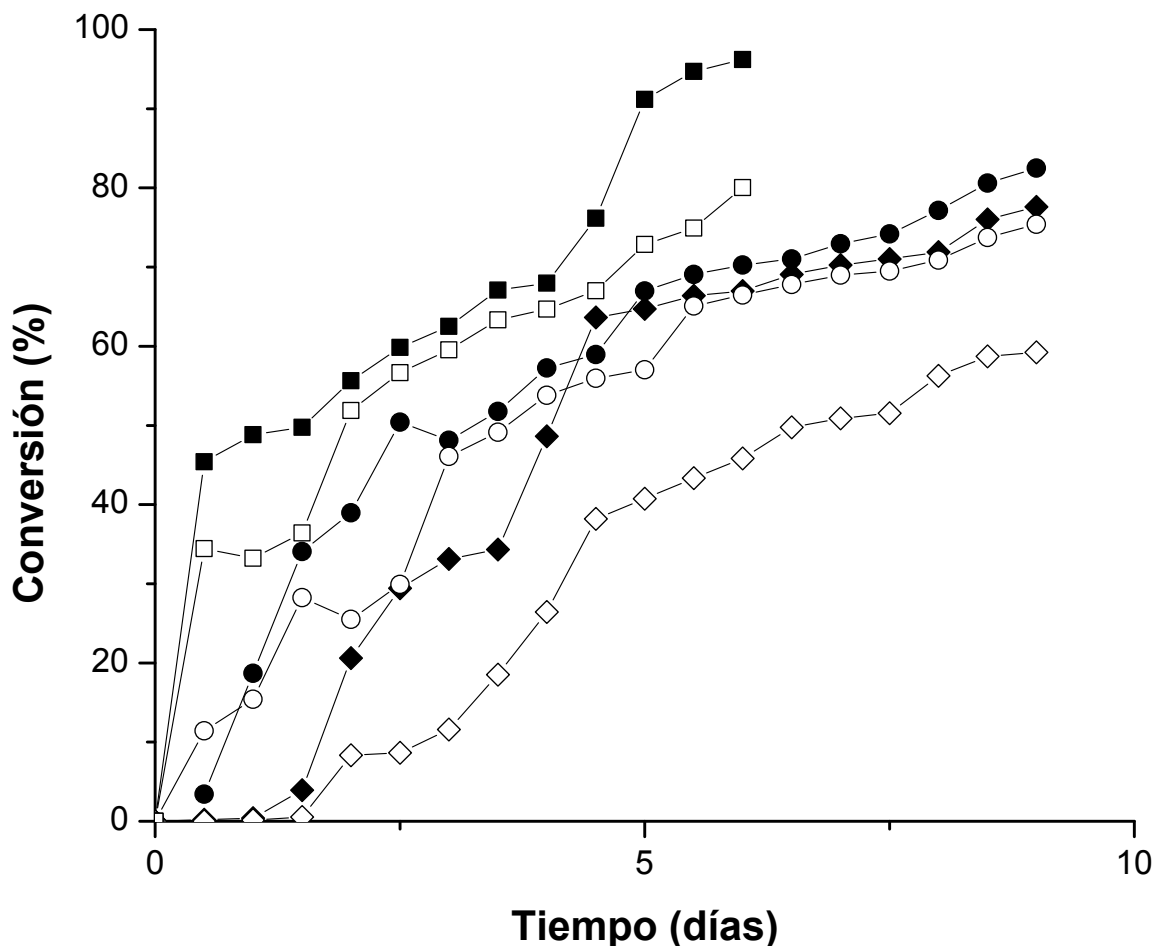


Figura 16. Peso molecular determinado por titulación de los PLLA sintetizados a las diferentes condiciones evaluadas A) 65 °C, B) 73 °C y C) 90 °C. Con enzima: 65 °C (◆), 73 °C (●) y 90 °C (■); sin enzima: 65 °C (◇), 73 °C (○) y 90 °C (□).

También es evidente la gran desviación estándar en ambas temperaturas, que puede deberse a que a estas temperaturas hay una mayor cantidad de moléculas de agua debido a la formación de éstas al ocurrir la propagación de las cadenas, que al titular las reacciones genera un error. En esta misma figura 16 inciso C se presentan los resultados de los polímeros obtenidos en las reacciones a 90 °C, donde se obtuvo una mayor propagación de cadena que en las otras temperaturas al igual que un  $M_n$  5 veces mayor que el de la reacción no enzimática. Con estos resultados se tiene evidencia que existe un efecto térmico, debido a otro mecanismo diferente al enzimático, en la reacción de síntesis de PLLA en este medio de reacción con respecto al  $M_n$ , ya que se obtuvo propagación en las reacciones no enzimáticas.

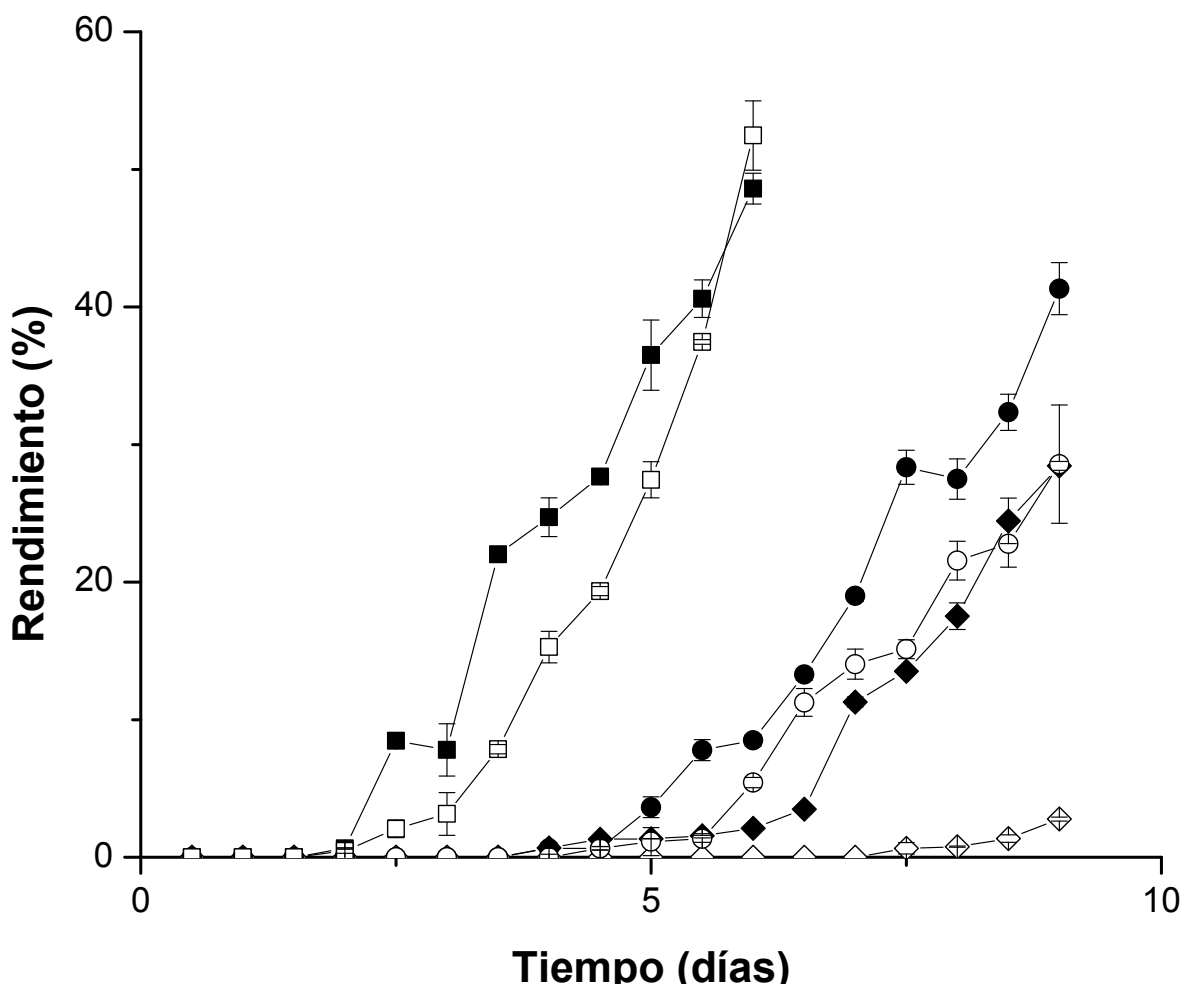
Con el número de hidroxilos obtenido en la titulación de las reacciones, fue posible obtener la conversión de la propagación de cadenas de los PLLA sintetizados; el cálculo de dicha conversión se presenta en la sección experimental y los resultados se exhiben en figura 17. Aunque a las tres temperaturas evaluadas se observó una mayor conversión en las reacciones enzimáticas (símbolos llenos) que en las no enzimáticas (símbolos vacíos) para las respectivas temperaturas, a 65 °C esta diferencia fue más pronunciada, ya que a los 9 días de reacción se obtuvo con enzima una conversión de 78% y sin enzima de 59%; la mayor conversión (96%) fue alcanzada a los 6 días de reacción y se obtuvo en la síntesis enzimática a 90 °C, con esta determinación pudo observarse el efecto de la temperatura y del biocatalizador sobre este parámetro.



**Figura 17. Conversión de la propagación de cadenas contra tiempo de PLLA a las diferentes condiciones de reacción evaluadas. Con enzima: 65 °C (◆), 73 °C (●) y 90 °C (■); sin enzima: 65 °C (◇), 73 °C (○) y 90 °C (□).**

A la par al estudio realizado en el seno de la reacción, se purificó el polímero solubilizando el contenido de la reacción en cloroformo y posteriormente se precipitó en metanol para cada reacción evaluada; se secó y pesó para posteriormente determinar el rendimiento (figura 18); cabe mencionar que en los primeros días de reacción no se obtuvo polímero precipitado, pese a que en las determinaciones anteriores realizadas en el seno de la reacción se obtuvieron valores a estos tiempos; esto fue debido a que a estos tiempos en la mezcla de reacción, en su mayoría, hay monómero no reaccionado o productos de bajo peso molecular, que se concluye son solubles en metanol y se pierden en el paso de

purificación. Cabe mencionar que, a medida que la temperatura aumentó, a menores tiempos se obtuvieron polímero precipitado. Otro factor importante es que a 65 °C sin enzima se obtuvo polímero hasta el día 7.5 de reacción, mientras que en la reacción con enzima fue al día 4 de reacción; asimismo, en la reacción enzimática al día 9 de reacción se obtuvo un rendimiento del polímero de 28% mientras que en la reacción sin adición de enzima de 2%; a esta temperatura se presenta una clara prevalencia de la propagación enzimática ya que se observó una menor contribución de otro tipo de mecanismos en la síntesis de PLLA tanto en el rendimiento como en las otras variables determinadas; por otro lado, a la temperatura de 73 °C se obtuvo polímero al día 4 de reacción para la reacción con enzima y al día 4.5 de reacción sin enzima; a los 9 días de reacción se determinó un 41% de rendimiento para las reacción con enzima y 28% para la reacción no enzimática. Por último, a la temperatura de 90 °C se obtuvo polímero en ambas reacciones con y sin adición de enzima a los 2 días de reacción y el rendimiento fue cerca del 50% para ambos casos a los 9 días de reacción; estos resultados sugieren que al aumentar la temperatura es mayor el resultado del mecanismo no enzimático implicado en la reacción. Huijser y col. (2006)<sup>53</sup> reportan que este comportamiento es debido a una propagación catiónica por parte de residuos de hidroxácidos provenientes del monómero. Por otro lado, Nyce y col. en 2003<sup>70</sup> reportaron la generación térmica de carbeno de un LI basado en imidazolio, en un sistema libre de metal para producir PLLA, obtuvieron rendimientos aceptables y pesos moleculares bajos. Otros autores afirman que la generación térmica de carbeno en el C2 no sustituido del anillo de imidazolio sin un iniciador o catalizador es promovida por la sustracción del hidrógeno en la posición C2 por el anión, lo cual se ve reforzado con la temperatura y esto depende de la naturaleza del anión.<sup>71</sup> Por lo que, con esta información y la evidencia experimental, se puede hipotetizar que la temperatura en el sistema de reacción provoca la formación de carbenos que realizan una propagación catiónica y por esto se obtienen rendimientos en las reacciones sin enzima.



**Figura 18.** Variación del rendimiento con el tiempo de los PLLAs sintetizados a las condiciones evaluadas. Con enzima: 65 °C (◆), 73 °C (●) y 90 °C (■); sin enzima: 65 °C (◇), 73 °C (○) y 90 °C (□).

Para completar este estudio de temperaturas, se decidió realizar una determinación de  $M_n$  y PDI por SEC, a los polímeros precipitados; estos resultados se presentan en la figura 19. En general, se observa que los  $M_n$  obtenidos con esta técnica son mayores a los obtenidos con la titulación; no obstante hay que recordar que los  $M_n$  calculados anteriormente fueron determinados por titulación y de alícuotas del crudo de la reacción y el SEC está calculado con base en estándares de poliestireno. En los PLLA obtenidos a 90 °C con el empleo de biocatalizador se encontró un aumento de la  $M_n$  con el tiempo hasta alcanzar un

valor máximo de  $(19.0 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1})$  a los 6 días de reacción, este fue 6 veces mayor que el alcanzado en el mismo tiempo en la reacción sin la adición de biocatalizador; los  $M_n$  obtenidos a las otras temperaturas con y sin la adición de CALB permanecen en un intervalo de  $1.7$  a  $3.2 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ . Este resultado es similar al obtenido en el seno de la reacción donde a  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  con biocatalizador, se obtuvo la mayor propagación. Estos resultados claramente indican la contribución de la enzima en la propagación de las cadenas poliméricas a la temperatura de  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  pese a la propagación no enzimática por otros mecanismos a esta misma temperatura, lo que confirma la estabilización de esta lipasa soportada en LI hidrofóbicos a alta temperatura. El peso molecular alcanzado fue mayor que los reportados en trabajos anteriores.<sup>43,51</sup> Adicionalmente, el PDI de los PLLA precipitados estuvo en un intervalo de  $1.1$  - $1.4$  y no pudieron ser correlacionados con el rendimiento o con el  $M_n$ .

Cabe mencionar que el PLLA es biodegradable, biocompatible y con propiedades mecánicas similares al poliestireno y al PET, por lo que tiene diversas aplicaciones, como se mencionó anteriormente; sin embargo, una forma de ampliar su rango de aplicación consiste en modificar sus propiedades como son la biodegradabilidad, la viscosidad, la solubilidad, la cristalinidad, etc. por medio de la co-polimerización, por lo que en este trabajo se decidió sintetizar hiperramificados de PLLA a manera de modificar sus propiedades y así ofrecer otra alternativa para su posible aplicación, ya que una de las ventajas de tener un polímero ramificado, es que se tiene una mayor cantidad de grupos terminales, lo que en el caso de poliésteres hiperramificados mejora su biodegradabilidad y su compatibilidad biológica.

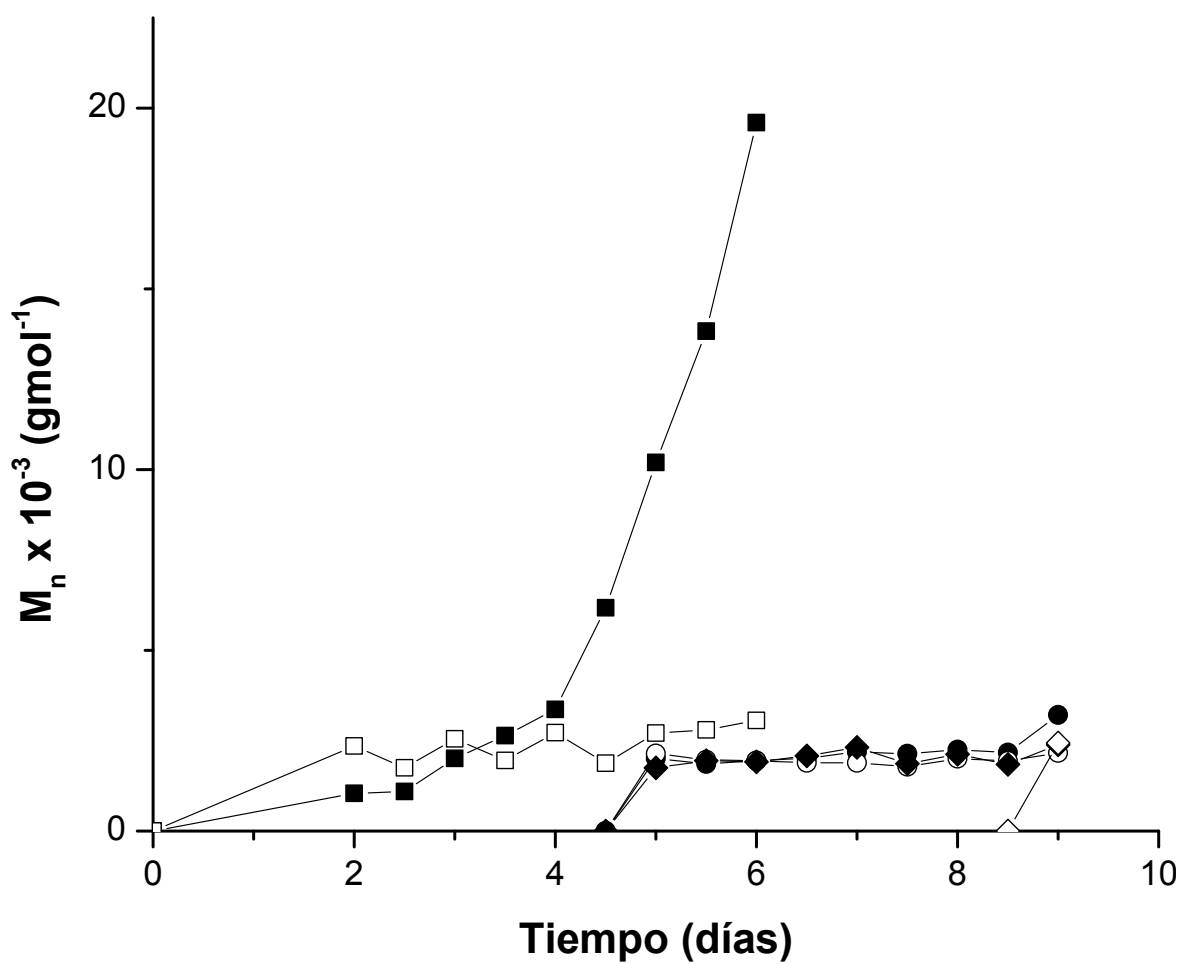


Figura 19.  $M_n$  contra tiempo a las diferentes condiciones de reacción evaluadas. Con enzima: 65 °C (♦), 73 °C (●) y 90 °C (■); sin enzima: 65 °C (◇), 73 °C (○) y 90 °C (□).

## **5.2. Síntesis enzimática de poli(L-láctidos) hiperramificados en medio [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]**

### **5.2.1. Solubilidad del BHB en [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]**

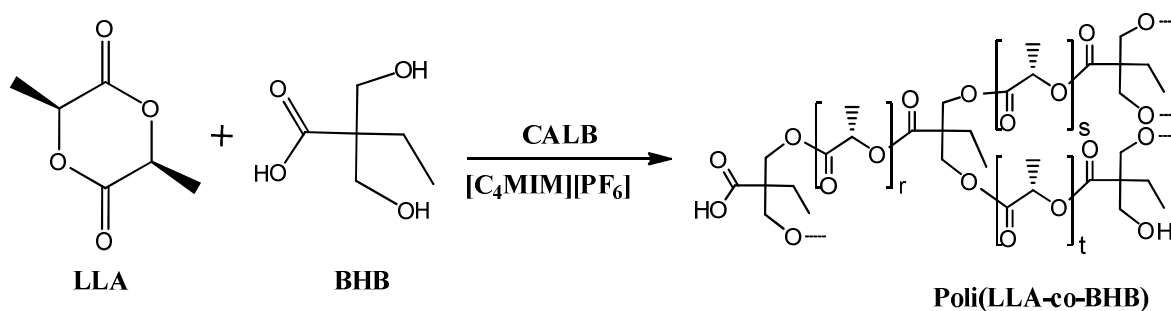
En primer lugar se realizó la prueba de solubilidad del BHB en el medio de reacción [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>], como se describió anteriormente en la metodología; se observó que a 65 °C la solubilidad fue total en las concentraciones de 10 y 20% mol, mientras que a 90 °C se obtuvo una solubilidad completa a las 5 concentraciones evaluadas (10, 20, 30, 40 y 50% mol). Este resultado representa una mejora sobre otros trabajos publicados, donde la síntesis se realizó en medios en donde la limitante fue la baja solubilidad del BHB, como por ejemplo en disolventes orgánicos como tolueno<sup>62</sup> y FC en la PAAE de polilactonas hiperramificadas de CL y VL.<sup>42</sup>

### **5.2.2. Polimerización por apertura de anillo enzimática de poli(L-láctido) hiperramificado con el co-monómero BHB**

Con base en estos resultados de solubilidad y el obtenido en la sección anterior, con lo que a la temperatura respecta, y la idoneidad reportada previamente de la PAAE de LLA en LI,<sup>30,31</sup> las reacciones se llevaron inicialmente a 90 °C. Cabe mencionar que, en pruebas preliminares, se encontró que la manera más eficaz de purificar el material fue disolviéndolo en DMSO (ya que se obtenía un mayor rendimiento que en CHCl<sub>3</sub>) para separar el biocatalizador insoluble y precipitar en metanol como anti-solvente.

Como se mencionó anteriormente, la síntesis enzimática de poliésteres hiperramificados ha sido poco estudiada y se reduce solo a CL y VL, no obstante, la síntesis enzimática del PLLA hiperramificado no ha sido publicada previamente. En este trabajo se presenta la PAAE del LLA (AB) con la concurrente policondensación del BHB (AB<sub>2</sub>) en [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]; el esquema general de reacción del poli(LLA-co-BHB) se presenta en la Figura 20





**Figura 20. Esquema de reacción de la síntesis por PAAE de poli(LLA-co-BHB) en LI**

En la figura 21 se presenta el espectro de  $^1\text{H}$  RMN para este poliéster hiperramificado, el cual confirma la incorporación del co-monomero  $\text{AB}_2$ , ya que se observan otras señales diferentes a los desplazamientos químicos característicos de los protones del PLLA (5.2 y 1.3 ppm); estas señales son características del centro de ramificación (BHB), entre éstas se encuentran las de los protones del grupo metileno ( $\text{CH}_2$ ) del BHB, ya que estos protones pueden tener dos diferentes señales de desplazamiento; una para el grupo hidroxilo sustituido o esterificado (figura 21 c) y otra para el grupo hidroxilo libre (figura 21 f). Estas señales se utilizaron para realizar el cálculo de incorporación del BHB como se describe en la sección experimental,<sup>59</sup> también otra señal característica de protón del BHB para realizar el cálculo de incorporación es la del grupo metilo (figura 21 e).<sup>42,62</sup>

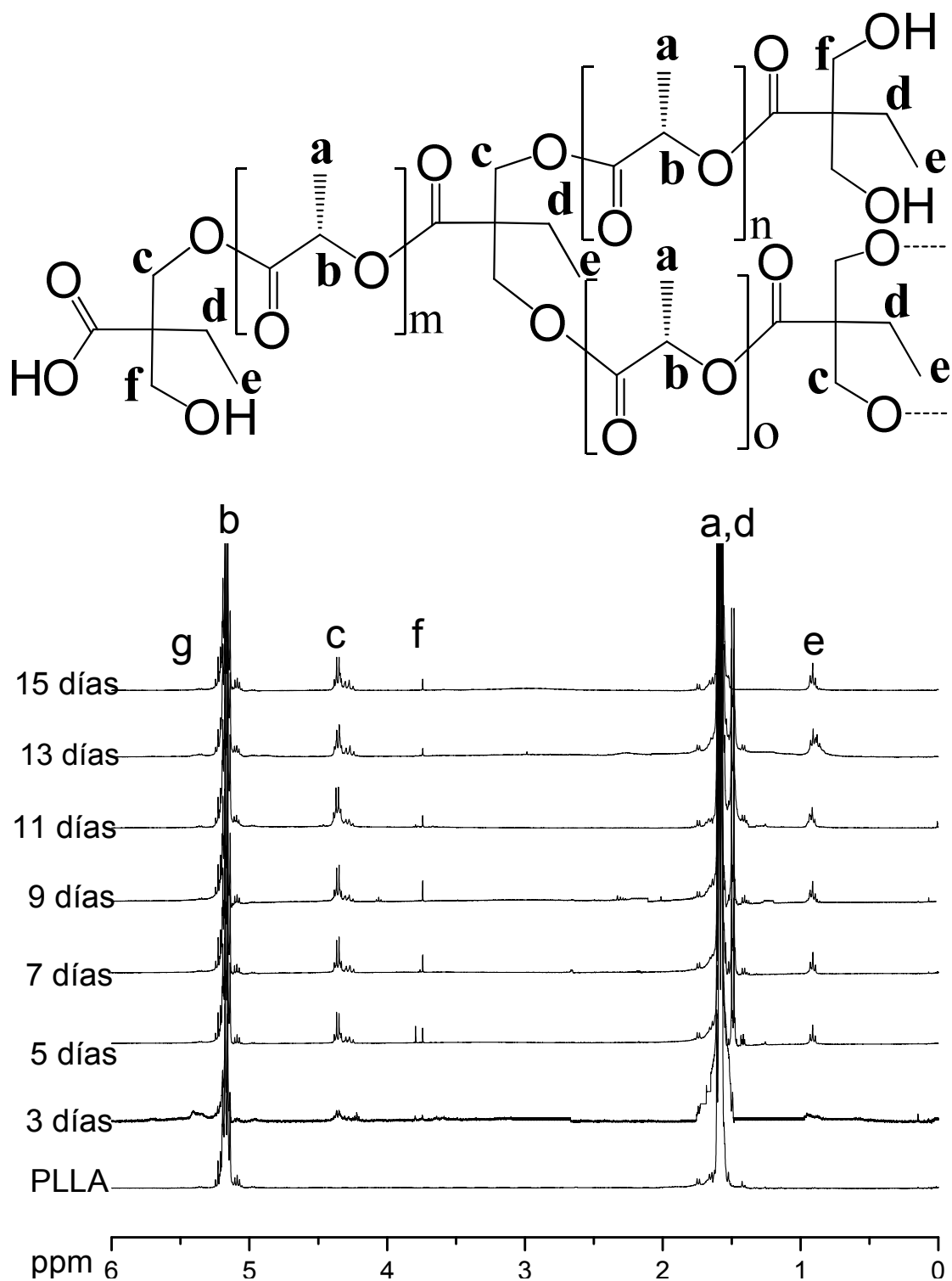
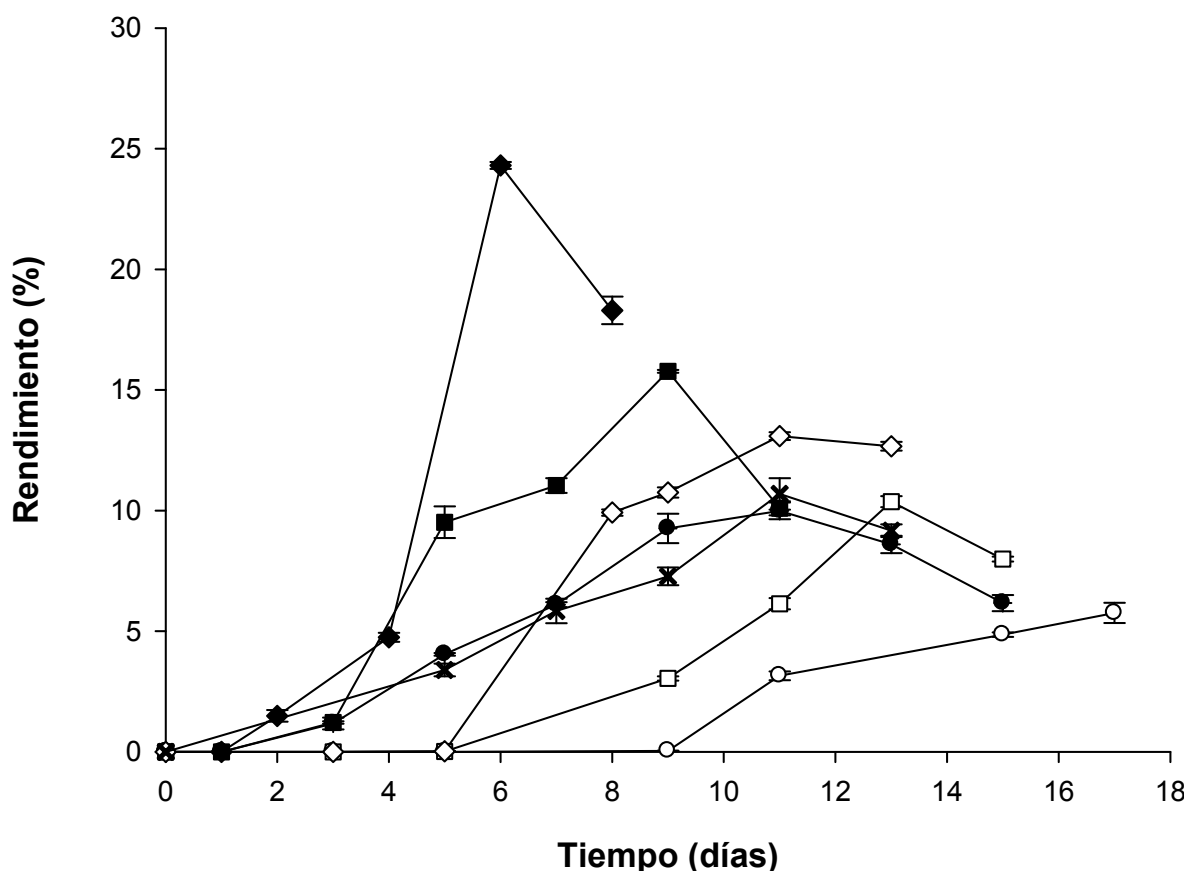


Figura 21. Espectro de <sup>1</sup>H RMN del poli(LLA-co-BHB), relación molar de monómeros LLA:BHB, 9:1, a diferentes tiempos de reacción y del homopolímero PLLA (6 días) a 90 °C.

Posterior a la precipitación en metanol, los polímeros hiperramificados de PLLA se recuperaron por filtración. Trabajos previos como el de López-Luna y col. (2010)<sup>42</sup> publicaron la presencia de una segunda fracción de poli(CL-co-BHB) y poli(VL-co-BHB) soluble en metanol, precipitada después de 24 horas a 5 °C con un DB mayor al encontrado en la primera fracción precipitada; por su parte Gottschalk y Frey (2006)<sup>59</sup> describen que para polímeros con una incorporación mayor al 6% el método de purificación con metanol tuvo que ser modificado. En este trabajo, para determinar si existía un co-polímero con mayor ramificación soluble en la fase metanólica, se eligió la muestra con mayor DB obtenido por medio de <sup>1</sup>H RMN, la relación molar de alimentación 9:1 (LLA:BHB) a 11 días de reacción; la fase metanólica se secó y se pasó por una columna de cromatografía utilizando como fase estacionaria sílica gel y como fase móvil metanol; se recolectaron 17 fracciones. El metanol fue rotaevaporado y estas fracciones fueron analizadas por <sup>1</sup>H RMN. Cabe mencionar que en todas las fracciones se detectó DMSO, sin embargo, el [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] fue eluido en las primeras 6 fracciones; por otro lado, se detectaron por <sup>1</sup>H RMN señales características del co-polímero en las fracciones 7 y 8, por tanto, se removió el DMSO al vacío ( $4 \times 10^{-4}$  mbar) y a 70 °C. Mediante el espectro de <sup>1</sup>H RMN (anexo 3) del co-polímero se calculó la incorporación de éste, que fue de 4.76% y su DB de 0.087 (calculadas con las señales características antes mencionadas). Los datos de SEC arrojaron pesos moleculares bajos ( $< 0.5 \times 10^3$  g mol<sup>-1</sup>), lo que descartó la presencia de fracciones solubles en metanol de poliésteres hiperramificados e indicando que el proceso de purificación utilizado fue el adecuado.

Ya que se confirmó la incorporación de BHB en el polímero y se estableció el método de purificación, se realizaron reacciones en las relaciones molares (LLA:BHB) 1:1, 9:1, 12.3:1 y 19:1 a diferentes tiempos de reacción, como se describió en la sección de materiales y métodos. Los rendimientos medios de dichas reacciones se presentan en la figura 22 (símbolos llenos), donde se aprecia que a medida que pasa el tiempo de reacción el rendimiento de los hiperramificados incrementa hasta alcanzar un máximo, el tiempo en el que la

reacción es detenida por la solidificación del medio, como se observó en la síntesis del PLLA; esto es atribuido a que conforme aumenta el tiempo aumenta la viscosidad del medio de reacción debido a la propagación de las cadenas poliméricas; un resultado similar se obtuvo en homopolimerización y copolimerización del LLA en LI hidrofóbicos como es el caso del  $[C_4MIM][PF_6]$ .<sup>30,31</sup>



**Figura 22. Variación del rendimiento de poli(LLA-co-BHB) en el tiempo; relación molar de monómeros (LLA:BHB): 9:1 en LI (●); 12.3:1 en LI (■); 19:1 en LI (◆); 9:1 sin biocatalizador en LI (x); 9:1 en masa (○); 12.3:1 en masa (□); 19:1 e masa (◇).**

El máximo rendimiento obtenido de 25% (figura 22) corresponde a la fracción molar alimentada 19:1 (LLA:BHB) en el día 6 de reacción, este resultado coincide con la solidificación del medio mencionada anteriormente, un comportamiento

similar se observó en las otras dos relaciones molares evaluadas. En esta misma figura (símbolos llenos), se observa una disminución en el rendimiento de los polímeros hiperramificados en las tres relaciones de LLA:BHB alimentadas después de la solidificación del medio, por lo que, se asume que se empieza a llevar a cabo la reacción contraria, es decir, la hidrólisis (depolymerización) por el incremento de la disponibilidad de moléculas de agua.

Por otro lado, se puede observar una disminución en el rendimiento de los polímeros hiperramificados con el incremento de la cantidad de BHB alimentado; ya que el rendimiento del homopolímero de PLLA es cerca de 50%, el doble que el obtenido en el polímero hiperramificado en la relación molar de alimentación 19:1 (LLA:BHB). Este resultado evidencia que la actividad de la CALB es afectada por la concentración del co-monómero BHB utilizado como sustrato en este sistema; esta suposición también se reafirma con el resultado obtenido en la relación de alimentación 1:1 molar (LLA:BHB), en la cual después de 20 días de reacción no hubo solidificación en el medio de reacción, el rendimiento fue de 2% y en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la muestra, no se encontraron señales características del BHB por lo que se le descartó de la investigación.

Estas evidencias experimentales indicaron un posible efecto del BHB sobre la enzima, lo cual se ahondará más adelante. Por su parte, en la misma figura (cruz) los blancos (sin enzima) en medio  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]$  de la relación molar de alimentación 9:1(LLA:BHB) presentan propagación no enzimática (rendimientos similares a los obtenidos en la reacción enzimática); sin embargo, el  $M_n$  de las reacciones enzimáticas fue alrededor de 3 veces el  $M_n$  de la reacción sin enzima (tabla 3); resultados similares se han encontrado en trabajos previos como el reportado por Huijser y col. (2006)<sup>53</sup> que explican la posible causa de este resultado en la PAAE de poli(LLA-co-glicólido); ellos suponen que existe un mecanismo catiónico promovido por trazas de hidroxácidos presentes en los monómeros, como se mencionó anteriormente. También existen reportes previos de la homopolimerización y co-polimerización de LLA en medio LI donde se tiene

propagación no enzimática, no obstante el peso molecular en las reacciones con CALB es mayor. En el presente trabajo se estima que esta propagación no enzimática pudiera ser promovida por el catión  $[C_4MIM]^+$  como se mencionó anteriormente y se discutirá más adelante.

**Tabla 3. Datos de caracterización de poliésteres hiperramificados de LLA y BHB en  $[C_4MIM][PF_6]$ .**

Exp.	LLA:BHB (mol:mol)	Tiempo (días)	BHB <sup>c</sup> (%)	$T_m^d$ (°C)	$T_d^e$ (°C)	$M_n^f \times 10^{-3}$ (g/mol)	PDI <sup>f</sup>
1	Control <sup>a</sup>	6	n.a	130	252.7	19.6	1.2
2	9:1	3	7.4 ± 0.6	n.d.	n.d.	3.2	1.4
3	9:1	5	9.3 ± 0.3	n.d.	254.6	3.5	1.6
4	9:1	7	10.7 ± 0.3	103.3	233.1	3.6	1.6
5	9:1	9	12.5 ± 0.8	115.9	231.3	3.6	1.6
6	9:1	11	13.6 ± 0.3	118.8	242.9	3	1.6
7	9:1	13	13.6 ± 0.8	116.5	224.6	1.9	1.5
8	9:1	15	13.4 ± 1.1	118.6	224.4	0.9	1.3
9	9:1	3	7.8 ± 0.4	n.d.	n.d.	2.2	1.3
10	12.3:1	5	8 ± 0.3	116.4	215.3	2.5	1.5
11	12.3:1	7	8.5 ± 0.3	118.1	191.7	2.6	1.5
12	12.3:1	9	9.5 ± 0.6	117.2	248.5	2.5	1.5
13	12.3:1	11	9.5 ± 0.6	115.9	255.3	2.5	1.4
14	19:1	2	4.5 ± 0.3	n.d.	225.3	0.9	1
15	19:1	4	7.2 ± 0.3	103.8	204.1	3.9	1.7
16	19:1	6	7 ± 0.2	116.7	196.8	3	1.5
17	19:1	8	6.5 ± 0.1	114.7	249.1	3.1	1.5
18 <sup>b</sup>	9:1	5	5.9 ± 0.3	n.d.	208.2	0.9	2.2
19 <sup>b</sup>	9:1	7	5.2 ± 0.6	132.7	212.8	0.9	1.7
20 <sup>b</sup>	9:1	9	6.1 ± 0.6	136	239.6	0.8	1.4
21 <sup>b</sup>	9:1	11	6.8 ± 0.3	152.1	212.1	1.2	1.8
21 <sup>b</sup>	9:1	13	7.2 ± 0.9	125.1	204.3	1.5	1.7

<sup>a</sup>Homopolímero de PLLA sin BHB bajo las mismas condiciones de reacción. <sup>b</sup>Experimento sin biocatalizador (blanco). <sup>c</sup>% de incorporación del BHB calculado por <sup>1</sup>H RMN <sup>d</sup>Temperatura de fusión medida por DSC. <sup>e</sup>Temperatura de degradación al 5% de pérdida de material determinado por TGA <sup>f</sup>Determinado por SEC calibrado con poliestireno estándar.

En la tabla 3 se observa que el  $M_n$  del homopolímero (mismas condiciones de reacción en LI) es mayor al de los hiperramificados en las concentraciones evaluadas; esto quizá se deba al efecto del BHB en la reacción, ya que López-Luna y col. (2012)<sup>42</sup> en la síntesis de co-polímeros de CL y VL utilizando BHB como centro de ramificación obtuvieron un menor  $M_n$  en éstos que en los homopolímeros sintetizados bajo las mismas condiciones; o bien, a que la determinación del  $M_n$  mediante SEC podría estar subestimándolo, ya que se ha reportado que el SEC no separa la molécula por peso molecular propiamente dicho, sino por el tamaño de la molécula de soluto en solución (volumen hidrodinámico), el cual es menor para los polímeros hiperramificados en comparación con los lineales debido a su estructura globular.

A la par, se realizaron reacciones en masa a las mismas relaciones molares de LLA:BHB evaluadas en medio LI (figura 22 símbolos vacíos), cabe destacar que en estas reacciones no se observó polímero en los primeros 7 días de reacción. Por otro lado, se obtuvo un mayor rendimiento en las reacciones con menor cantidad de BHB (19:1, LLA:BHB) que con las otras relaciones molares, tal y como se observó en las reacciones en medio  $[C_4MIM][PF_6]$ ; los rendimientos obtenidos en estas reacciones fueron alrededor de la mitad de los obtenidos en medio LI, adicionalmente los  $M_n$  son menores en masa (tabla 4) que con la reacción enzimática con  $[C_4MIM][PF_6]$  y a un mayor tiempo de reacción, esta es una evidencia de la mejora al utilizar  $[C_4MIM][PF_6]$  como medio de reacción. Asimismo, al igual que con el medio LI, se comienza a apreciar la posible hidrólisis en las relaciones molares 19:1 y 12.3:1.

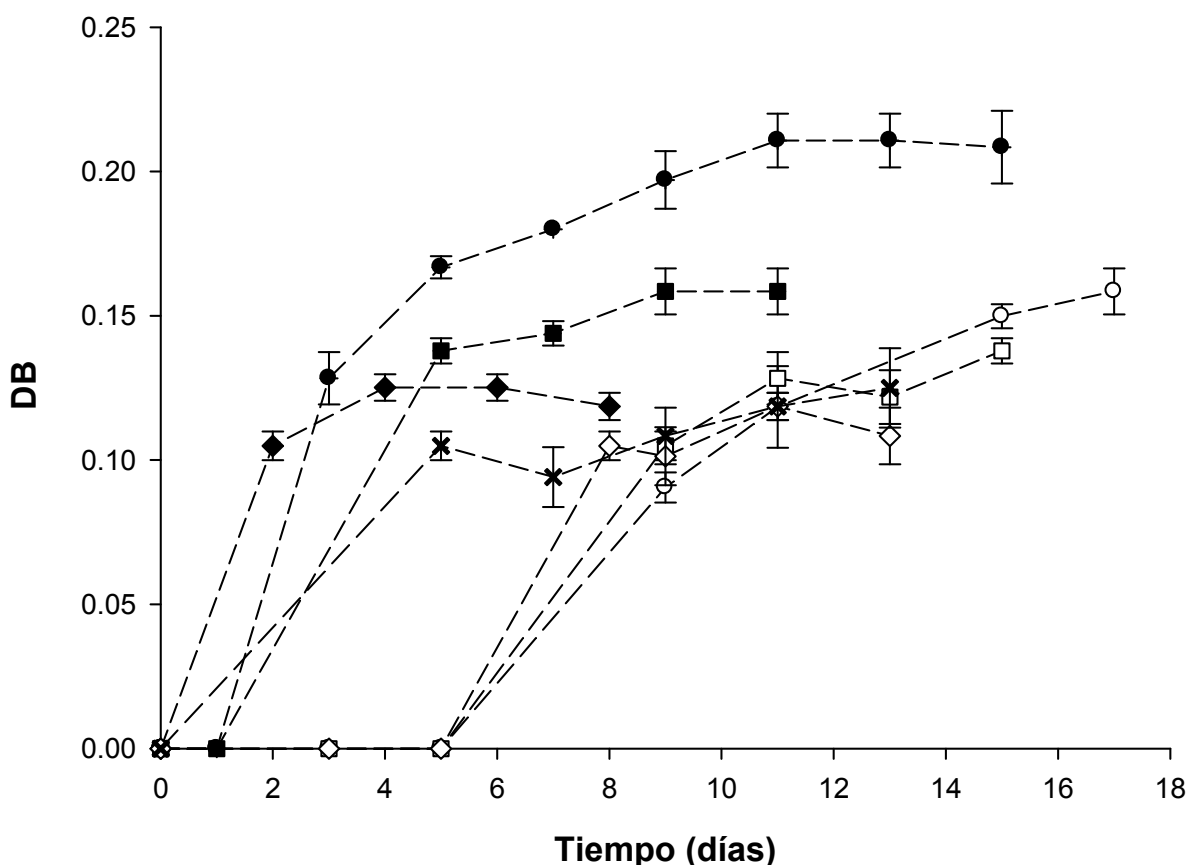
**Tabla 4. Datos de caracterización de poliésteres hiperramificados de LLA y BHB en masa.**

Exp.	LLA:BHB (mol:mol)	Tiempo (días)	BHB <sup>a</sup> (%)	$M_n^b \times 10^{-3}$ ( $\text{gmol}^{-1}$ )	PDI <sup>a</sup>
1	9:1	9	5.0 ± 0.3	2.2	1.3
2	9:1	11	6.8 ± 0.9	2.9	1.2
3	9:1	15	8.9 ± 0.3	2.7	1.2
4	9:1	17	9.5 ± 0.6	2.4	1.3
5	12.3:1	9	5.9 ± 0.3	2.4	1.3
6	12.3:1	11	7.4 ± 0.6	1.5	1.6
7	12.3:1	13	7.0 ± 0.6	2.0	1.4
8	12.3:1	15	8.0 ± 0.3	2.1	1.4
9	19:1	8	5.9 ± 0.3	2.0	1.5
10	19:1	9	5.7 ± 0.6	1.8	1.7
11	19:1	11	6.8 ± 0.3	1.0	1.6
12	19:1	13	6.1 ± 0.6	1.5	1.7

<sup>a</sup> % de incorporación de BHB calculado por <sup>1</sup>H RMN <sup>b</sup> Determinado por SEC calibrado con poliestireno estándar.

El DB de las muestras se determinó como se indicó en la sección experimental, los valores más altos de DB se alcanzaron en la relación molar 9:1 (LLA:BHB); en la figura 23 se puede observar que a mayor cantidad de BHB alimentado el DB se incrementa, esto se traduce como un aumento en la hiperramificación, a diferencia del rendimiento que a mayor cantidad de BHB, éste disminuye. La evidencia experimental se puede explicar con la posible hidrólisis del material como se había mencionado anteriormente, ya que, aunque el polímero se degrade esta degradación se da tanto en regiones lineales como dendríticas lo que se ve reflejado en la disminución del rendimiento mientras que en un valor constante del DB. En general, se observa un comportamiento similar en las reacciones en masa, no obstante, el DB obtenido en estas reacciones es menor al obtenido en las reacciones en medio  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]$ . Por su parte, en la reacción control (sin enzima) de la relación 9:1 (LLA:BHB) el DB es de aproximadamente la mitad del obtenido en estas mismas condiciones pero con la presencia de la enzima.



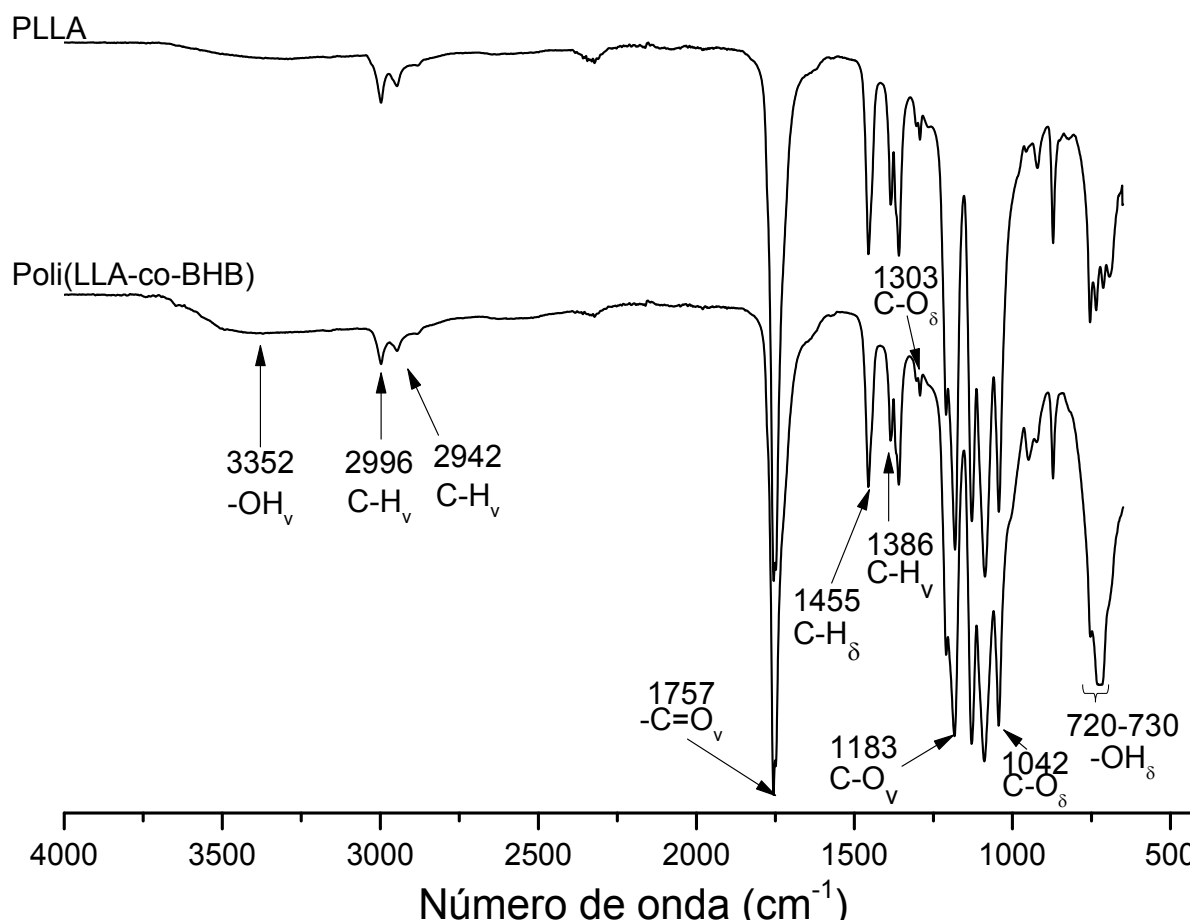


**Figura 23. Variación de DB de poli(LLA-co-BHB) en el tiempo; relación molar de alimentación de monómeros (LLA:BHB): 9:1 en LI (●); 12.3:1 en LI (■); 19:1 en LI (◆); 9:1 sin biocatalizador en LI (x); 9:1 en masa (○); 12.3:1 en masa (□); 19:1 en masa (◇).**

Asimismo, el mayor DB obtenido (aproximadamente 0.21) es mayor que el obtenido en la PAAE de la CL y CV en medio R-134a,<sup>42</sup> que fue de 0.09 para la VL y 0.11 para la CL. Se asume que se debe a la gran solubilidad de los monómeros en el medio de reacción, así como la buena actividad enzimática de la CALB en el [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]. Un trabajo similar a éste es el de Skaria y col. (2002)<sup>62</sup> quienes trabajaron en la síntesis de polímeros hiperramificados de CL y BHB, en una mezcla de disolventes tolueno/dioxano. Estos trabajos son los únicos existentes de la síntesis enzimática de polímeros hiperramificados. Hasta el momento no se ha reportado, como se mencionó anteriormente, la síntesis enzimática de hiperramificados de LLA, sin embargo, existe un reporte de la síntesis química de

dichos polímeros empleando el derivado de estaño como catalizador, en donde se publicaron resultados similares a los presentados en este trabajo. En aquel, con una alimentación del 10% molar de BHB se obtuvo en el polímero hiperramificado una incorporación del 16% y un DB de 0.246; se puede observar que al igual que en el polímero hiperramificado obtenido en este trabajo por medio de la síntesis enzimática con la relación molar de alimentación de 9:1(LLA:BHB), donde se obtuvo una incorporación de 13.6% (tabla 3) y un DB de 0.21, la incorporación calculada por  $^1\text{H}$  RMN es mayor que la alimentada (10%). Gottstak y col. (2006)<sup>59</sup> describen en su estudio que una posible explicación para este comportamiento es que los compuestos que contienen grupos hidroxilos libres (por ejemplo: agua o hidroxiácidos) son empleados para controlar la velocidad de reacción y el peso molecular promedio en la síntesis del LLA lineal y podrían tener el mismo efecto en los hiperramificados; sin embargo, cabe mencionar que ellos también llevaron a cabo la reacción con una remoción estricta de agua y no encontraron diferencias ni en la incorporación ni en el peso molecular del polímero.

Por su parte, el PLLA y los poli(LLA-co-BHB) fueron analizados por espectroscopia ATR FT-IR medio. En la figura 24 se presentan las bandas de absorción características de estos polímeros, se puede apreciar que la diferencia entre estos dos espectros se presenta en las bandas de los grupos hidroxilos, ya que para los poli(LLA-co-BHB) se obtienen más intensas, tanto en la tensión  $3352\text{ cm}^{-1}$  (–OH) como en la torsión fuera del plano  $720$  y  $730\text{ cm}^{-1}$  (–OH).



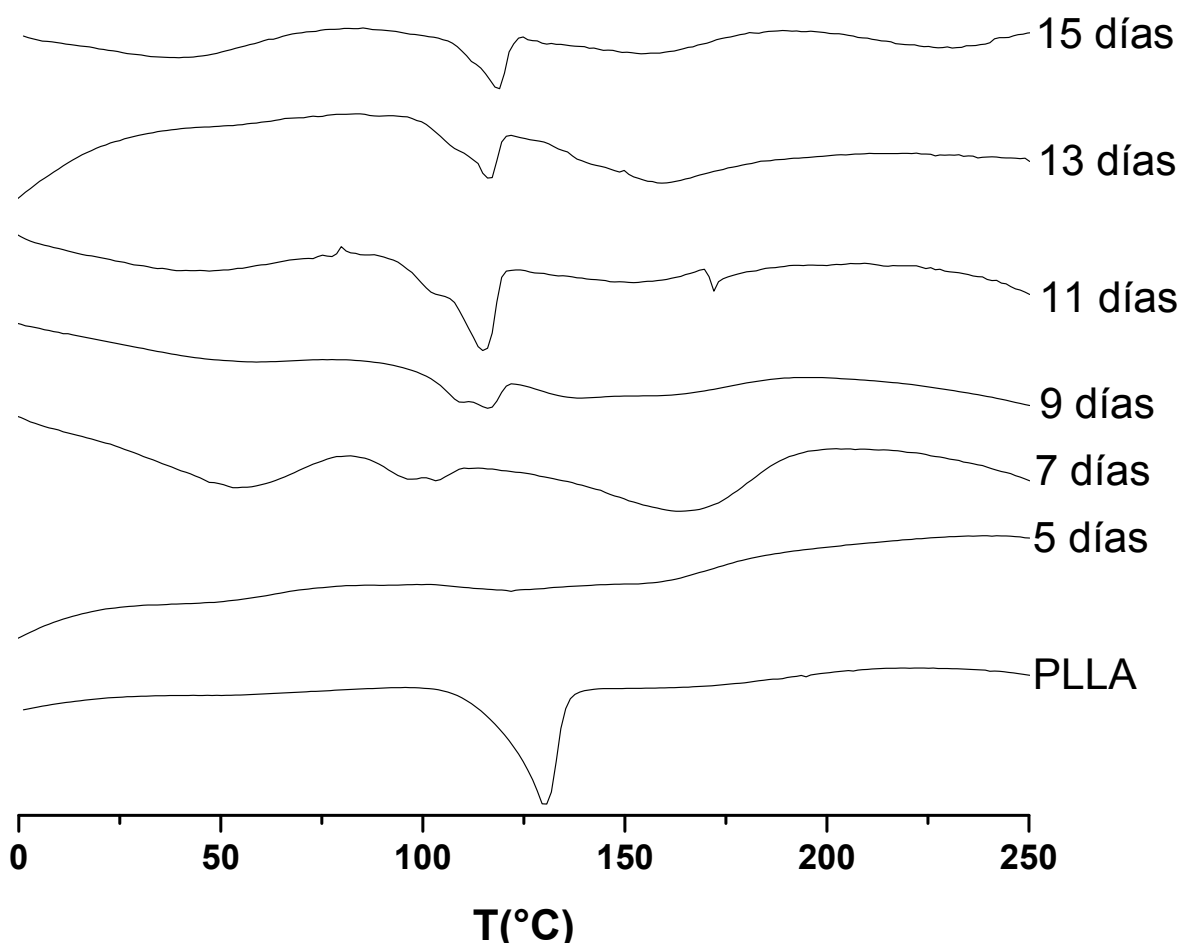
**Figura 24.** Espectro FT-IR del PLLA y del poli(L-láctido-co-BHB) a 11 días de reacción y relación molar 9:1 (LLA:BHB). v: tensión,  $\delta$ : torsión.

Por otro lado, se determinaron las propiedades térmicas de los polímeros hiperramificados obtenidos, empleando las técnicas de DSC y TGA. Debido a su estructura altamente ramificada, estos polímeros son materiales amorfos como se describe más adelante. Por lo tanto, la  $T_g$  es una de las propiedades térmicas más importantes, ya que de ésta dependen algunas de sus potenciales aplicaciones. Hawker y Chu (1996)<sup>72</sup> realizaron la síntesis de poli(etercetona)s hiperramificadas, ellos emplearon varios grupos funcionales terminales y diferentes grados de ramificación, empleando estructuras monoméricas del tipo  $\text{AB}_x$ , y demostraron que las propiedades térmicas de los polímeros hiperramificados son independientes de la estructura macromolecular y dependen en gran medida de los grupos

funcionales terminales y de las unidades de monómero internas.<sup>73</sup> En otros estudios se ha propuesto que la transición vítrea de los polímeros hiperramificados es un movimiento de traslación de la molécula entera en lugar de movimientos de segmentos de la cadena.<sup>74</sup> Sin embargo, en la presente investigación la  $T_g$  de los polímeros hiperramificados fue imperceptible; esto puede deberse en gran medida a la naturaleza de los grupos terminales (OH), que debido al grado de ramificación de los polímeros sintetizados forman fuertes interacciones dipolo-dipolo, lo que provoca que el movimiento de traslación de la molécula disminuya.

En la figura 25 se presenta, a manera de ejemplo, el DSC de los polímeros hiperramificados en la relación molar 9:1 a los diferentes días de reacción evaluados; con respecto a las temperaturas de fusión ( $T_m$ ), se puede observar que a los 5 días de reacción la temperatura de fusión es imperceptible, en el día 7 de reacción se empieza a apreciar, sin embargo no está bien definida; esto quizá es debido a que hay una mayor cantidad de oligómeros en estas muestras de reacción o bien al grado de cristalinidad de estos polímeros, un resultado similar en los primeros días de reacción fue obtenido en el trabajo de Chanfreau y col. (2010)<sup>30</sup> en medio LI [HMIM][PF<sub>6</sub>]. En los días siguientes de reacción no hay gran diferencia en las  $T_m$  (3°C). En la tabla 3 se presenta la  $T_m$  en las tres relaciones molares de alimentación. Se observa que las  $T_m$  son menores que la del homopolímero lineal, lo cual es otro indicio de que se está obteniendo el copolímero, ya que como está reportado en la literatura, la  $T_m$  de los materiales hiperramificados es menor que la del lineal, aunque aquí no hay que perder de vista la posible diferencia en pesos moleculares en la comparación. Asimismo, en ambas condiciones el punto de fusión en los primeros días de reacción no pudo ser determinado ya que el rendimiento obtenido fue muy bajo, pero a partir de cierto tiempo de reacción éstos aumentan hasta llegar a ser casi constantes en ambas condiciones. Por otro lado, a pesar de que la incorporación del BHB es mayor en la relación 90:10 (tabla 3) que en las otras dos, no se puede apreciar diferencias entre las  $T_m$  de los materiales. Sin embargo, al comparar las obtenidas

en la reacción sin enzima (tabla 3), se puede ver que estas temperaturas son mayores, quizá debido a que la incorporación del BHB en el polímero es menor.



**Figura 25. DSC de los polímeros hiperramificados en la relación molar de alimentación 9:1 (LLA:BHB) y del PLLA.**

En cuanto al TGA, se presentan los resultados en la tabla 3 donde se observa que la temperatura de degradación al 5 % ( $T_d$ ) de los polímeros hiperramificados es menor a la del homopolímero, esto podría deberse a que el PLLA es más estable, ya que su estructura es semicristalina, y en el caso de los hiperramificados podrían presentar una estructura más amorfa. Este resultado se soporta con el análisis de PXRD de las muestras sintetizadas (figura 26), en el que se calcularon

los porcentajes de cristalinidad de los polímeros hiperramificados y se determinó que estos porcentajes fueron menores que el del homopolímero, el cual exhibió un porcentaje de cristalinidad de 45%. Este resultado concuerda con la literatura,<sup>58,75</sup> donde se menciona que los polímeros hiperramificados son más amorfos que los lineales; asimismo un resultado muy interesante es que a medida que aumentó la cantidad de BHB en la alimentación, conlleva un aumento en el grado de ramificación, el porcentaje de cristalinidad en los polímeros disminuyó; cabe mencionar que este resultado es acorde al obtenido por Ursu y col. (2006)<sup>11</sup> que al sintetizar polímeros hiperramificados de BHB y CL obtuvieron un comportamiento similar con respecto a la cristalinidad.

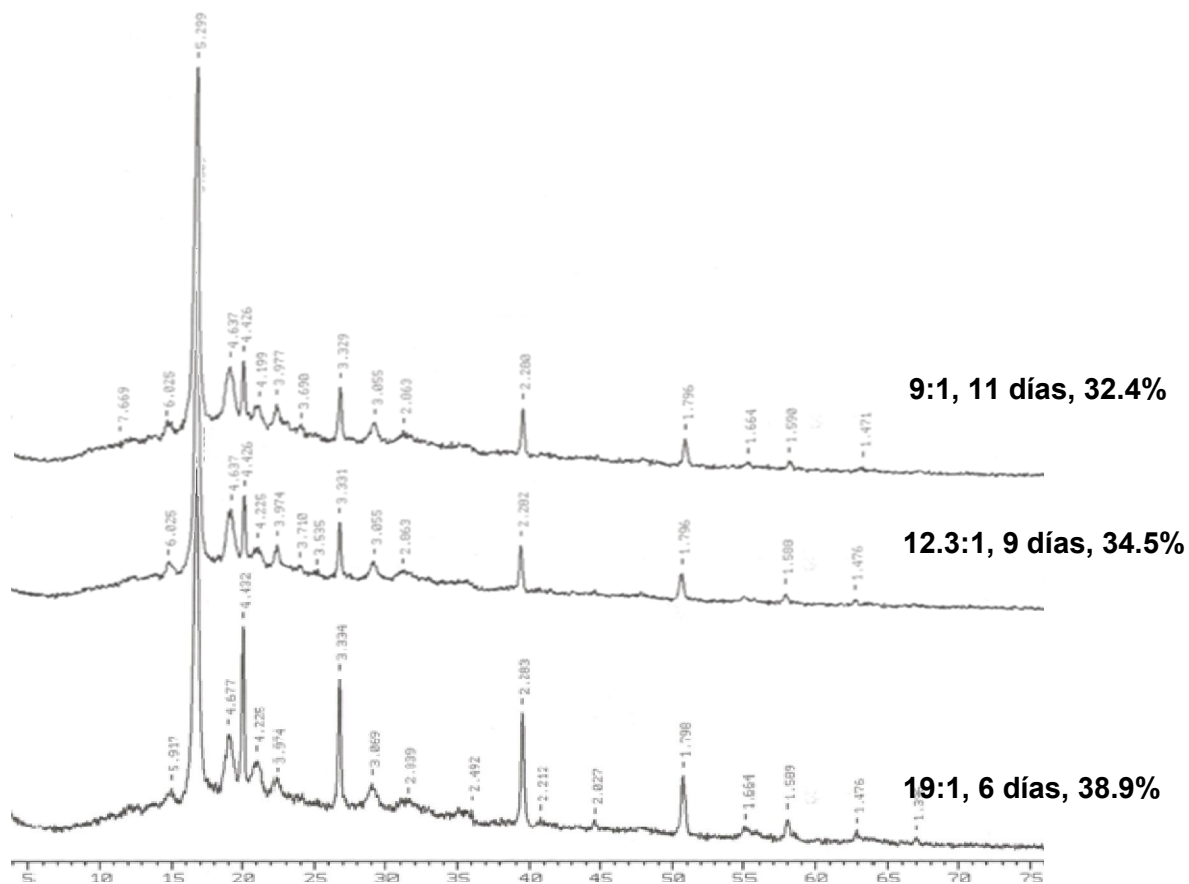
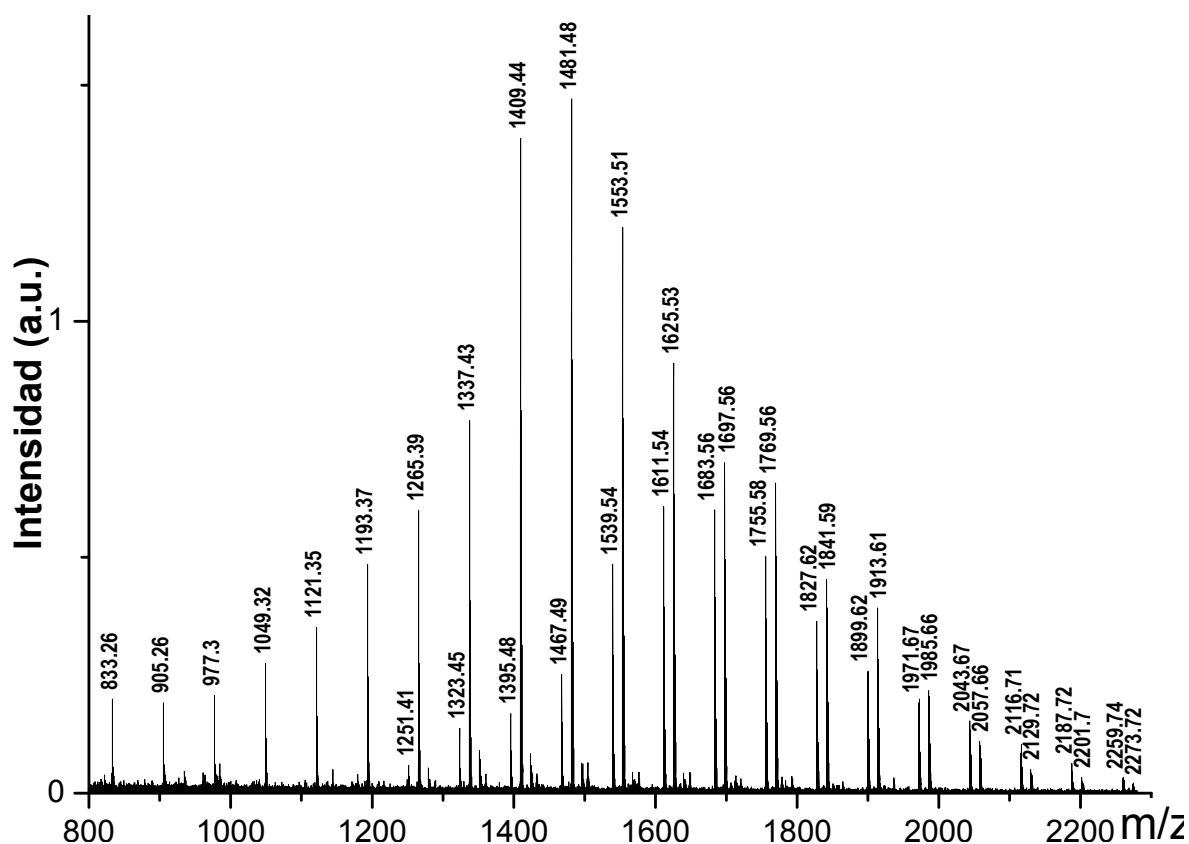


Figura 26. Espectros de PXRD de las tres relaciones molares de LLA:BHB evaluadas en los días de máximo rendimiento.

Por otro lado, siguiendo con la caracterización, se corroboró la estructura de los polímeros hiperramificados por medio de la espectrometría MALDI-TOF. En la figura 27 se presenta el espectro del poli(LLA-co-BHB) con una relación de alimentación de 9:1 (LLA:BHB).



**Figura 27. Espectro de MALDI-TOF del polímero hiperramificado poli(L-láctido-co-BHB) de la relación molar de alimentación 9:1 (LLA:BHB) en LI, día 11.**

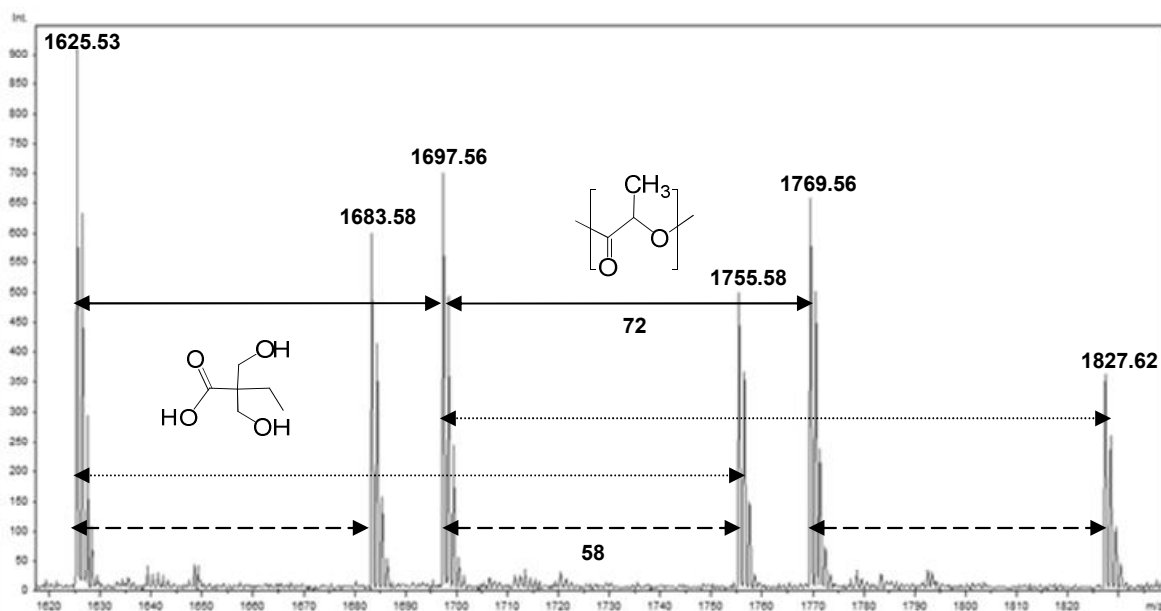
En esta técnica el polímero es primero embebido en una matriz sólida que se encuentra en mayor proporción que la muestra, esta matriz a menudo consiste de un material orgánico, en este trabajo se utilizó ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), la finalidad de la matriz es para proteger al polímero del bombardeo electrónico, además, facilita la vaporización y la ionización. La mezcla se deposita en un dispositivo portamuestras especialmente diseñado para este sistema de ionización. Tras la evaporación del disolvente, los cristales de la mezcla muestra-

matriz se irradian con un haz láser de elevada potencia y de pulsos cortos; la energía del láser expulsa iones de la matriz electrónicamente excitados, cationes y macromoléculas neutras, que crean una densa nube de gas por encima de la superficie de la muestra. La macromolécula es ionizada por las colisiones y acomplejamiento con pequeños cationes. Los campos eléctricos luego guían los iones al tubo de vuelo, estos son separados de acuerdo a su carga de masa ( $m/z$ ), finalmente la cantidad de cada ion es determinada por medio del detector.

El espectro fue tomado en modo ion positivo. Los productos con  $m/z$  menores a 500 fueron despreciados en la evaluación del espectro debido al traslapamiento con la matriz. Se observaron pesos moleculares de hasta  $3.5 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ , sin embargo, el  $M_n$  calculado por esta técnica fue de  $1.52 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$  con un PDI de 1.1, estos datos no concuerdan con los determinados por SEC donde el peso molecular de este polímero fue de  $3.0 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$  con un PDI de 1.6; la diferencias de peso molecular con respecto a SEC (tabla 5) puede atribuirse a que el pulso láser únicamente desorbe una fracción de la cadena macromolecular del polímero, limitando el análisis. Otros autores han atribuido el límite de detección al corte de las cadenas poliméricas durante la preparación de la muestras, o por el pulso láser.

La señales observadas son atribuibles a las del poli(LLA-co-BHB), como se puede observar en la figura 28; las señales fueron observadas a intervalos regulares de 72  $m/z$  que corresponde al peso molecular de la unidad estructural lactil, la diferencia entre los picos adyacentes de 58  $m/z$  fue asignado al cambio de una unidad lactil por BHB lo que confirma una incorporación al azar de cada unidad monomérica en el co-polímero.





**Figura 28. Sección representativa del espectro de MALDI-TOF del poliéster hiperramificado de la relación molar de alimentación 9:1 LLA:BHB, día 11 al momento del análisis.**

Por otro lado, se calculó la composición monomérica para cada señal del espectro de MALDI-TOF, ya que cada uno de los valores  $m/z$  es una combinación de la masa molecular de lactil:  $C_3H_4O_2$  (72 g/mol), BHB<sub>D</sub>:  $C_6H_9O_3$  (129 g/mol) y BHB<sub>L</sub>  $C_6H_{10}O_3$  (130 g/mol), el resultado se presenta en la tabla 5 donde también se puede encontrar el porcentaje molar de BHB para cada señal, este porcentaje molar se multiplicó por la parte proporcional de la intensidad de cada señal y se calculó la incorporación promedio del BHB para esta muestra; el porcentaje molar fue de 11.88%, cuyo resultado coincide con el calculado por 1H RMN que fue de 12.33%.

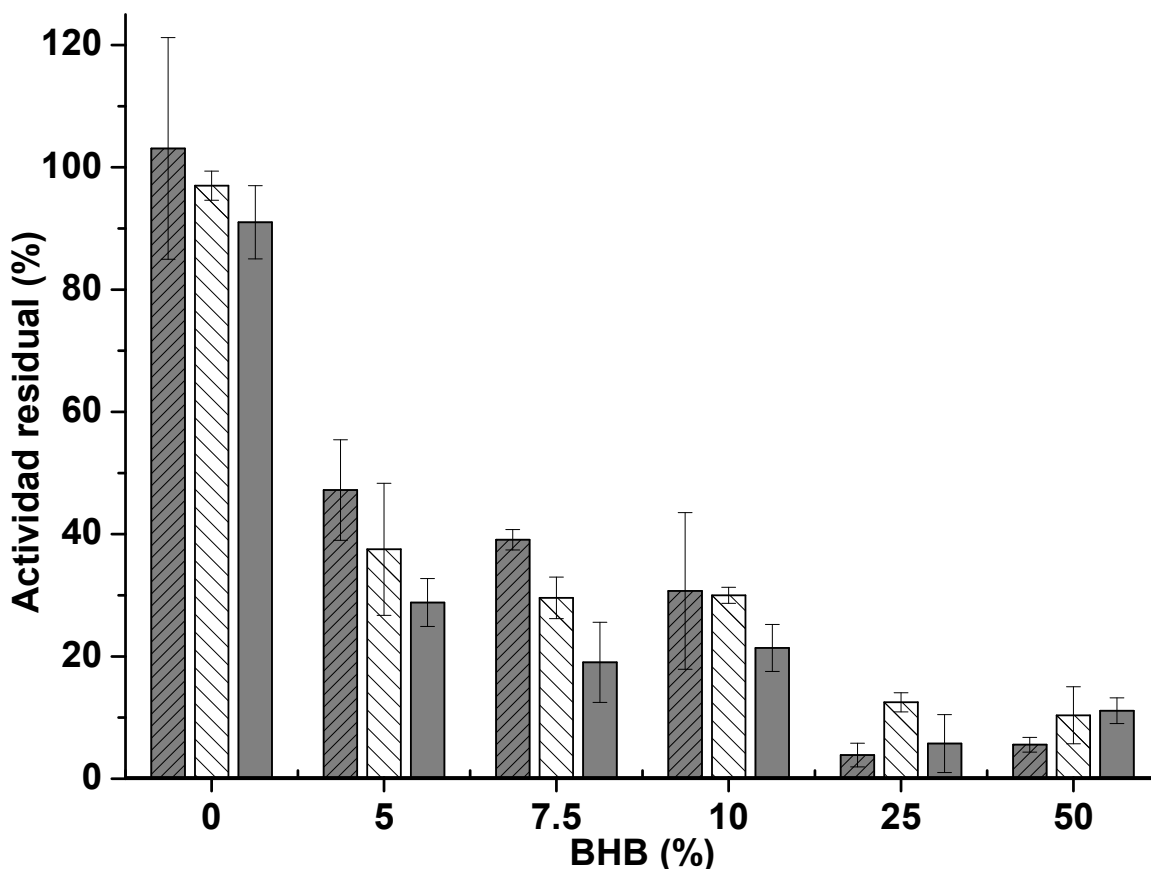
Tabla 5. Asignación de señales de MALDI-TOF del polímero relación 9:1 (LLA/BHB).

Lactilo <sup>a</sup>	BHB <sub>D</sub> <sup>b</sup>	BHB <sub>L</sub> <sup>c</sup>	<i>m/z</i> calculado	<i>m/z</i>	Incorporación BHB (%)
8	2	0	834	833.26	20.00
9	2	0	906	905.26	18.18
10	2	0	978	977.30	16.67
11	2	0	1050	1049.32	15.38
12	2	0	1122	1121.35	14.29
13	2	0	1194	1193.37	13.33
12	2	1	1252	1251.41	20.00
14	2	0	1266	1265.39	12.50
13	2	1	1324	1323.45	18.75
15	2	0	1338	1337.43	11.76
14	2	1	1396	1395.48	17.65
16	2	0	1410	1409.44	11.11
15	2	1	1468	1467.49	16.67
17	2	0	1482	1481.48	10.53
16	2	1	1540	1539.54	15.79
18	2	0	1554	1553.51	10.00
17	2	1	1612	1611.54	15.00
19	2	0	1626	1625.53	9.52
18	2	1	1684	1683.56	14.29
20	2	0	1698	1697.56	9.09
19	2	1	1756	1755.58	13.64
21	2	0	1770	1769.56	8.70
20	2	1	1828	1827.62	13.04
22	2	0	1842	1841.59	8.33
21	2	1	1900	1899.62	12.50
23	2	0	1914	1913.61	8.00
22	2	1	1972	1971.67	12.00
24	2	0	1986	1985.66	7.69
23	2	1	2044	2043.67	11.54
25	2	0	2058	2057.66	7.41
24	1	2	2117	2116.71	11.11
26	2	0	2130	2129.72	7.14
25	2	1	2188	2187.72	10.71
27	2	0	2202	2201.70	6.90
26	2	1	2260	2259.74	10.34
28	2	0	2274	2273.72	6.67
27	1	2	2333	2332.78	10.00

<sup>a</sup>Lactil (72 g/mol); <sup>b</sup>BHB<sub>D</sub> (129 g/mol), BHB dendrítico; <sup>c</sup>BHB<sub>L</sub> (130 g/mol), BHB Lineal

### 5.2.3. Evaluación de la inactivación de la lipasa por el BHB

Se observó anteriormente que, tanto en LI como en masa, al incremento de la cantidad de BHB en la alimentación corresponde una disminución del rendimiento del poli(LLA-co-BHB); debido a esto, se decidió realizar a la par un análisis de la actividad residual de la enzima. Esto se realizó mediante la hidrólisis enzimática de *p*-nitrofenil acetato a *p*-nitrofenol, determinando la concentración de este último espectrofotométricamente. Cabe mencionar que se determinó la actividad enzimática de la enzima sin tratamiento, la cual fue de  $4700.4 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  y con base en ésta, se calculó la actividad residual para conocer el efecto que tiene el BHB sobre la enzima; ésta última fue sometida a 5 diferentes concentraciones de BHB: 5, 7.5, 10, 25 y 50% molar en una solución acuosa durante 1, 3 y 5 días, como se describió en la parte experimental. Con el fin de minimizar errores experimentales, se decidió, medir todas las muestras el mismo día utilizando soluciones frescas. Como se puede observar (figura 29), a las concentraciones de 5, 7.5 y 10% la CALB mostró una reducción drástica de la actividad residual desde el primer día de tratamiento, sin embargo la actividad residual es similar en estas tres concentraciones evaluadas. En el caso de las concentraciones de 25 y 50% la actividad residual es menor que de las otras concentraciones. A partir de estos resultados, se puede inferir que hay efecto de inactivación del BHB sobre la CALB y que éste se acentúa de forma significativa con la concentración del ácido.

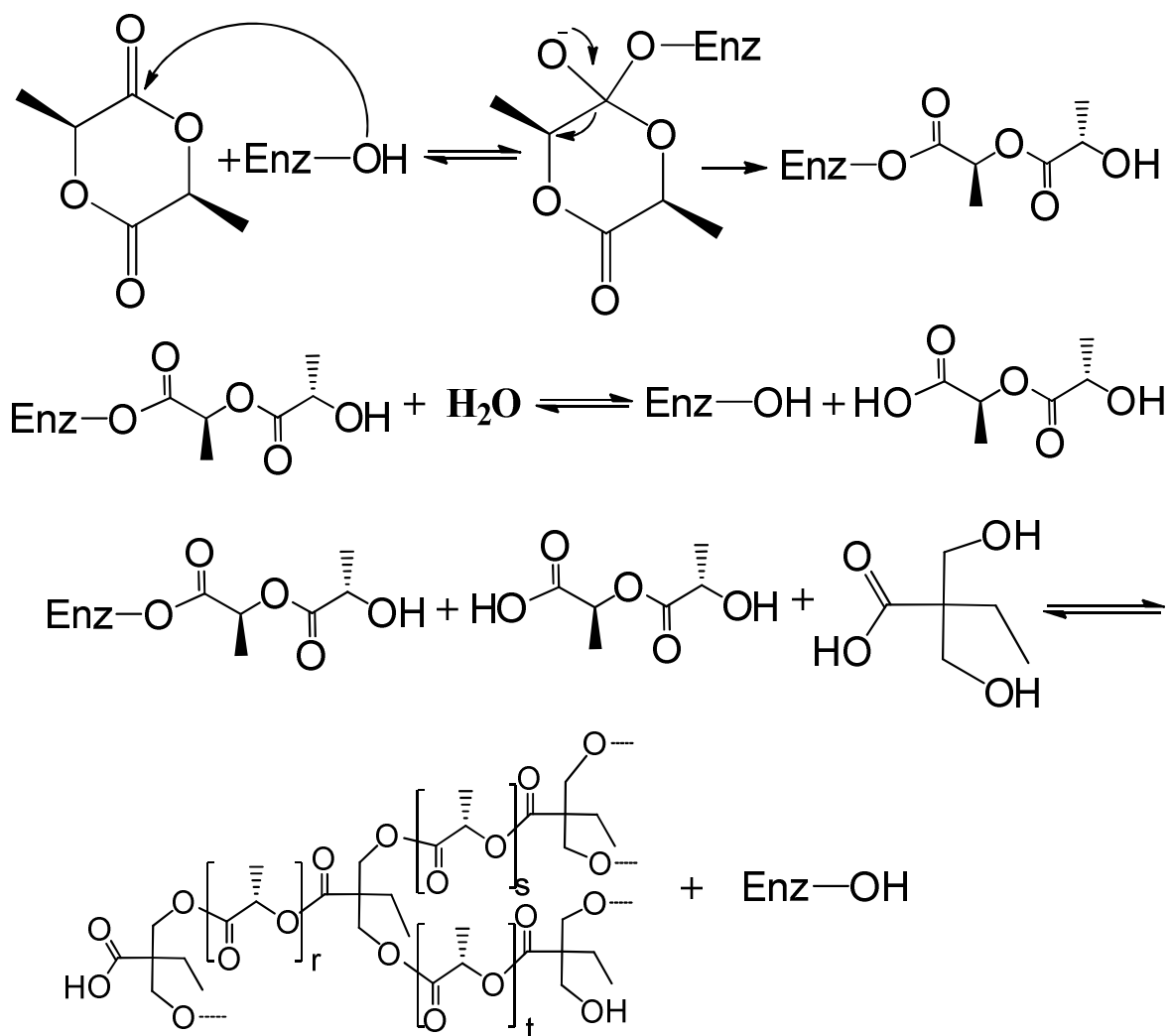


**Figura 29. Actividad residual de la CALB tratada a diferentes concentraciones de BHB a 1 (▨), 3 (▩) y 5 (■) días de reacción.**

Un comportamiento similar fue observado por Romero y col. (2007),<sup>76</sup> que al llevar a cabo la síntesis de acetato de isoamilo por acilación del alcohol isoamílico con anhídrido acético, utilizando la CALB como catalizador, en hexano determinaron que el ácido acético formado durante la reacción causaba una inhibición enzimática a concentraciones mayores a 0.1 M, por lo que se presume que los ácidos orgánicos de cadena corta, como el ácido acético y en nuestro caso, el BHB, podrían inhibir a la CALB. En nuestro caso pudimos comprobar que la enzima pierde actividad (se inactiva) al estar en contacto con el BHB previo a la reacción.

#### 5.2.4. Racionalización del mecanismo enzimático

Por otro lado, el mecanismo para la síntesis enzimática de poli(LLA-co-BHB) se presenta en la figura 30, similar al mencionado anteriormente para el PLLA. En primer lugar, una etapa de iniciación donde ocurre una apertura de anillo del LLA debido a un ataque nucleofílico del residuo de la serina del sitio activo y posteriormente se genera el intermediario acil-enzima (IAE) y una molécula de agua, después, una molécula de agua ataca nucleofílicamente a dicho intermediario y se forma el dímero lineal; ya que existan dímeros lineales libres e IAE, se produce la etapa de propagación; tanto el dímero lineal como el BHB pueden sufrir una deshidrogenación parcial al acercarse al sitio activo de la enzima y atacar nucleofílicamente al IAE, se produce el polímero y se regenera la enzima. También se puede formar el IAE con cadenas cortas lineales. Al incorporar la molécula de BHB en este sistema, no se sabe realmente si ésta participa en la formación de los IAE (figura 31) o sólo es un sustrato de condensación (enzimática, ya que ocurre en el sitio activo) hacia acil-enzimas como se mencionó anteriormente.



**Figura 30. Mecanismo de reacción propuesto en la síntesis enzimática del polímero hiperramificado poli(LLA-co-BHB).**

Lo que indica la evidencia experimental, que se describió previamente, es que el BHB no es indiferente a la CALB, puesto que su incorporación baja el rendimiento, debido posiblemente a la inactivación; sin embargo, es posible que la enzima lo reconozca como sustrato; aunque otra posibilidad sería que la reacción es más lenta con el BHB; sin embargo, esta posibilidad no es muy viable ya que en las reacciones con LI enzimáticas a mayores días de reacción se produce la hidrólisis, no obstante, la hidrólisis se produce después de la solidificación del medio por la polimerización.

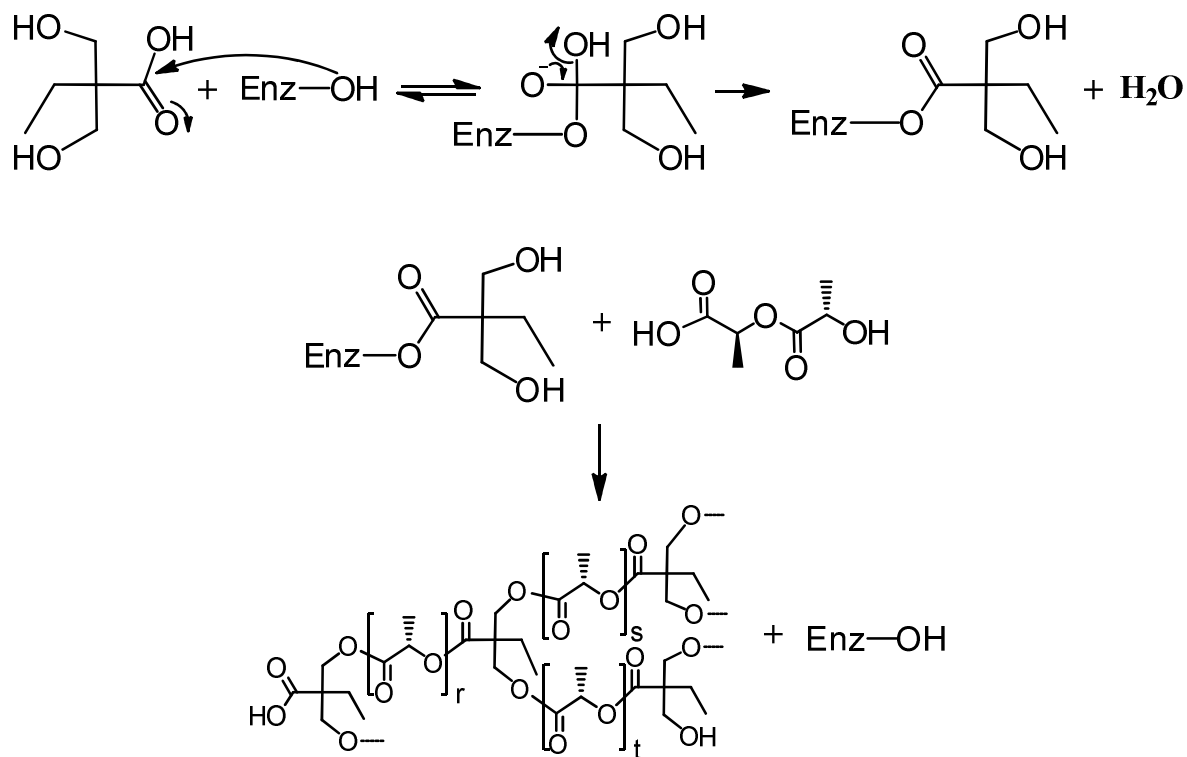


Figura 31. Posible formación del intermediario acil-enzima de BHB.

### 5.2.5. Estudio de otros centros de ramificación: ácido gálico y L-serina

Debido a la factible inactivación enzimática de la BHB, se planteó estudiar el efecto del centro de ramificación utilizando un ácido orgánico con estructura molecular más grande; el ácido gálico (AG) (figura 32), el cual ha sido reportado previamente como centro de ramificación tipo  $AB_3$  en síntesis convencional de poliésteres hiperramificados.<sup>37</sup>

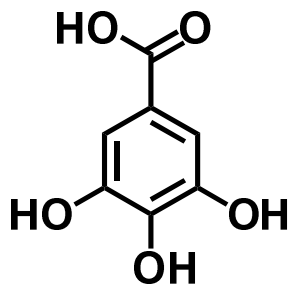


Figura 32. Estructura del ácido gálico.

Se decidió trabajar con tres concentraciones 19:1, 9:1 y 4:1 (LLA:AG) en  $[C_4MIM][PF_6]$ , en la tabla 6, se pueden observar que los rendimientos obtenidos fueron muy similares al obtenido con el homopolímero.

**Tabla 6 .Rendimiento de los polímeros obtenidos de LLA y GA.**

Experimento	LLA:AG (mol:mol)	Tiempo (días)	Rendimiento (%)
1	n/a	5	55.40
2	19:1	6	51
3	9:1	9	49
4	4:1	11	45

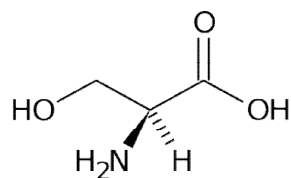
<sup>a</sup> Experimento llevado a cabo sin adición de AG. <sup>b</sup> Determinado por peso.

Para determinar la estructura del polímero obtenido se realizó  $^1H$  RMN en las tres relaciones molares evaluadas. No se observó la presencia de la señal característica de los protones aromáticos del AG; cabe mencionar que en las tres relaciones evaluadas se determinó el mismo espectro, por lo que se puede deducir que aunque el AG no inhibe la actividad enzimática (debido a que no se encontró una disminución en el rendimiento), no se lleva a cabo la co-polimerización; esto puede deberse a un problema de solubilidad del AG en el LI en los primeros días de reacción o bien a que el AG es una molécula no complementaria con el sitio activo de la enzima.

Por otro lado, se decidió probar otro centro de ramificación, la L-serina, cuya estructura se aprecia en la figura 33. La L-serina cuenta con 3 grupos funcionales: un grupo carboxilo, uno hidroxilo y uno amino. Se consideró un buen candidato para su evaluación como centro de ramificación, ya que es posible que la CALB lleve a cabo la poliamidación (poliéster-amida); además al incorporar al PLLA un aminoácido biológicamente activo se puede mejorar su biodegradabilidad, biocompatibilidad y modificar sus propiedades físicas. Además la L-serina no afectó la actividad enzimática (anexo 4). Sin embargo, la incorporación de la L-serina en el polímero fue menor al 4% con una relación de alimentación molar de 4:1, menor a la obtenida con BHB (13%) utilizando una relación de alimentación molar de 9:1, asimismo en la  $^1H$  RMN sólo aparecieron las señales indicativas de



una poliesterificación, esto quiere decir que, aunque se logró una copolimerización, no se pudo obtener un polímero hiperramificado utilizando la L-serina como centro de ramificación ya que la amidación enzimática no se llevó a cabo.



**Figura 33. Estructura de la L-serina.**

### 5.3. Síntesis de polímeros de PLLA lineales y ramificados en el sistema [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]/R-134a

La experimentación arrojó que aunque se evaluaron tres centros de ramificación diferentes, sólo con el BHB se obtuvo un polímero hiperramificado. A pesar de la posible afectación de la actividad enzimática, se decidió seguir trabajando con éste y enfocarse en la disminución de la viscosidad del medio de reacción; porque, como se había mencionado anteriormente, los resultados indicaron que la transferencia de masa se ve seriamente afectada por la solidificación del medio de reacción como resultado del aumento de la viscosidad al aumentar la propagación de las cadenas poliméricas. Se planteó que si la viscosidad del medio se modificaba, esto influiría de forma directa en las características del polímero obtenido.

Por lo anterior, se decidió trabajar en un medio de reacción de LI/FC; ya que se planteó la posibilidad de que el uso conjunto de estos dos disolventes disminuiría la viscosidad del medio de reacción; se eligió como FC el R-134a debido a sus características: hidrofóbico, polar y no afecta la actividad enzimática (como se mencionó anteriormente en el apartado de antecedentes), además, la síntesis de PLLA fue reportada en este medio de reacción utilizando la lipasa PS como biocatalizador y se encontró que a condiciones supercríticas las características del polímero, en cuanto a rendimiento y  $M_n$ , mejoraron con respecto a las condiciones subcríticas.<sup>43</sup>

Aunque no existen publicaciones de reacciones utilizando conjuntamente [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] y R-134a como medio de reacción, en la literatura se han publicado algunos trabajos sobre la solubilidad, difusividad y el equilibrio de fases de este sistema a bajas presiones;<sup>46-48</sup> también existe una publicación de este sistema a presiones mayores (< 10 bar) ya que en 2008 Ren y Scurto<sup>49</sup> describieron el comportamiento de fases a diferentes presiones y temperaturas (figura 5).

Se decidió trabajar a las condiciones supercríticas reportadas por Guzmán-Lagunes y col. (2012)<sup>43</sup> a 105 °C y 50 bar, en donde en el comportamiento de

fases mencionado anteriormente se encuentra una región multifásica (VLL), no obstante, a estas condiciones de reacción evaluadas el rendimiento del polímero obtenido fue menor al 3%, por lo que, se decidió evaluar condiciones de reacción en donde se tuviera una región monofásica según lo descrito en el comportamiento global de fases;<sup>49</sup> en dicha gráfica esta fase se encuentra por arriba de los puntos críticos de la mezcla. Primero se evaluó la temperatura de 90 °C, que es la temperatura a la que se obtuvo un mayor rendimiento y peso molecular en el medio de reacción al que se trabajó anteriormente ([C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]), y a 300 bar; estas condiciones de reacción se encuentran en la región de una sola fase y se decidió evaluar otra temperatura a 65 °C (temperatura donde hubo una menor contribución de la propagación no enzimática) a 300 bar para ver si el comportamiento era el mismo que en el medio [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] (figura 5).

Para empezar, se realizó un estudio visual de la solubilidad de fases. Con este estudio se pretendía corroborar que, a las condiciones evaluadas, el sistema se comportara tal como se reportó en el comportamiento global de fases de Ren y Scurto (2008)<sup>49</sup>. En la (figura 34) se pueden observar los resultados obtenidos en dicho experimento donde los incisos B) y C) muestran las condiciones de 65 °C y 90 °C (300 bar), respectivamente; en dicha figura se observa que a 25 °C y 100 bar no hay una fase homogénea (figura 34 inciso A) en comparación con las otras dos condiciones evaluadas, con este resultado se pudo observar el comportamiento descrito en el reporte previo y se puede establecer que a las condiciones de operación evaluadas en este trabajo la mezcla [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]/R-134a se comporta como una sola fase (mezcla crítica). Cabe mencionar que también se corroboró la solubilidad de los monómeros (LLA y BHB) a las condiciones estudiadas.

Determinadas las condiciones de operación, se decidió realizar la síntesis del homopolímero PLLA para determinar si había una mejora en dicha síntesis, al emplear una mezcla binaria como medio de reacción con respecto a la síntesis en [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] como se planteó anteriormente, ya que esta síntesis no es tan compleja como la del polímero hiperramificado.

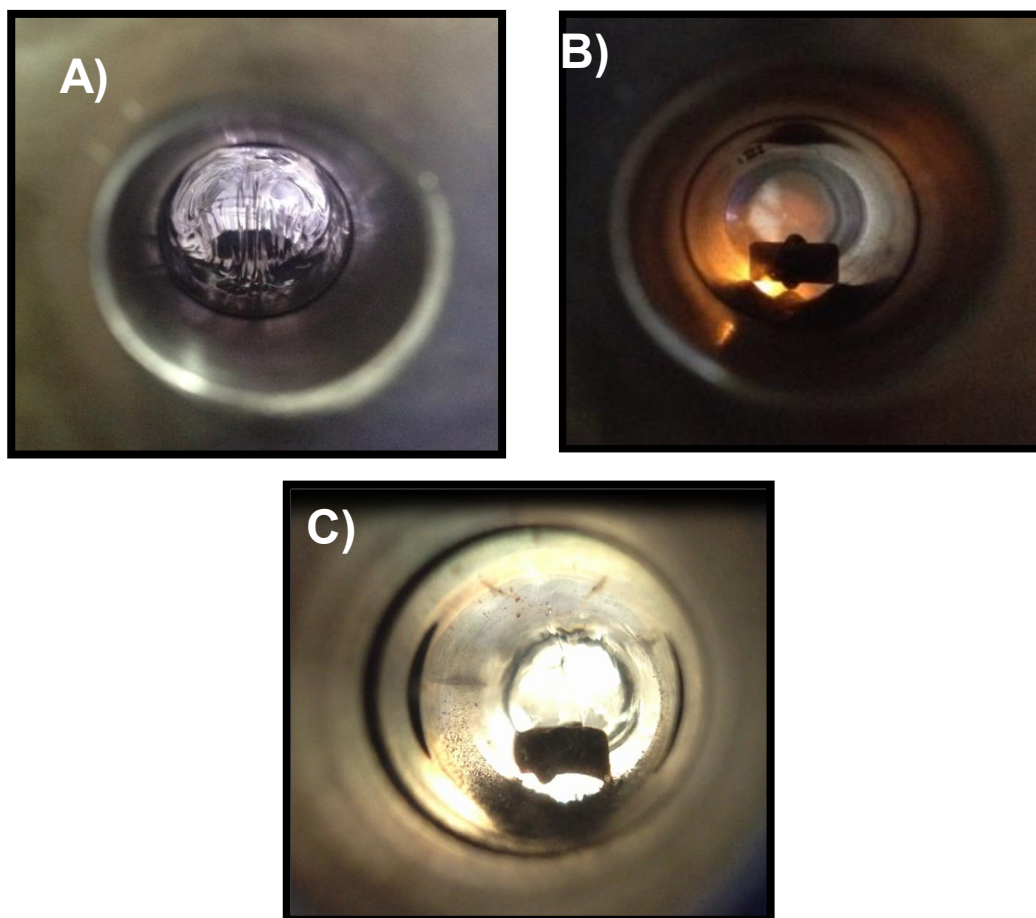


Figura 34. Estudio visual del comportamiento de fases de la mezcla  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]/\text{R-134a}$ ; A) 25 °C y 100 bar B) 65 °C y 300 bar y C) 90 °C y 300 bar.

### 5.3.1. Síntesis de PLLA en el sistema $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]/\text{R-134a}$

En la figura 35 se comparan los resultados de rendimiento con respecto al tiempo de los polímeros de PLLA obtenidos en las síntesis enzimáticas (símbolos llenos), tanto en medio  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]$  (líneas punteadas) como en  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]/\text{R-134a}$  (líneas continuas) a las 2 temperaturas evaluadas (65 y 90 °C); así como en las respectivas reacciones no enzimáticas (símbolos vacíos). Se puede apreciar que al utilizar la mezcla  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]/\text{R-134a}$  en la síntesis a 65 °C se obtiene un menor rendimiento de los polímeros obtenidos que a 90 °C, comportamiento similar al del medio  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]$  reportado anteriormente; esto es atribuible a una mayor propagación por aumento de la temperatura (efecto térmico); asimismo, a

65 °C el rendimiento del polímero obtenido es mayor en medio  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]$ , de igual manera se observa el mismo comportamiento a la temperatura de 90 °C, donde en LI se alcanzaron rendimientos hasta del 50% mientras que en el sistema  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]/\text{R-134a}$  se obtuvo 35% de rendimiento, lo que se discutirá más adelante.

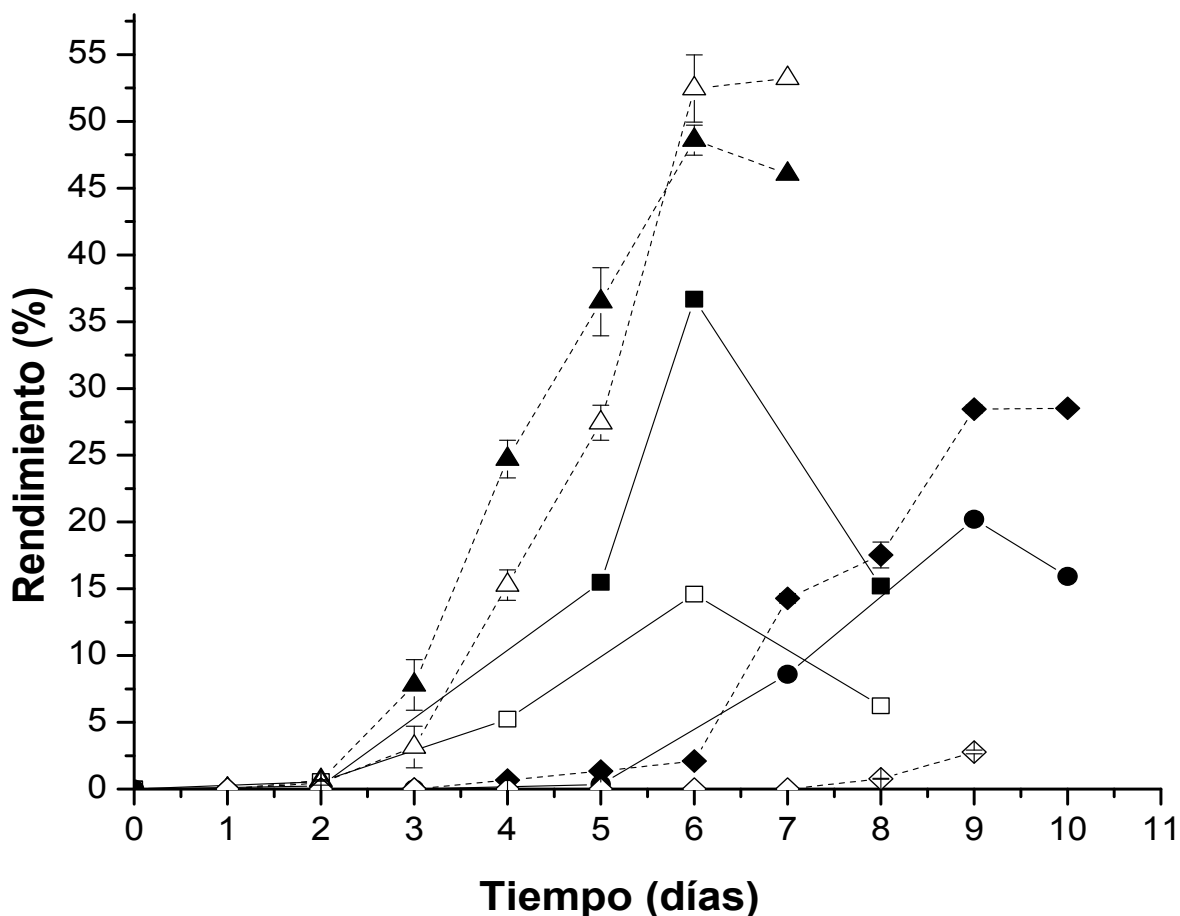


Figura 35. Comparación de rendimientos contra el tiempo de los PLLAs sintetizados en los dos medios de reacción.  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]/\text{R-134a}$ : 90 °C con enzima (■), 90 °C sin enzima (□), 65 °C con enzima (●).  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]$ : 90 °C con enzima (▲), 90 °C sin enzima (△), 65 °C con enzima (◆), 65 °C sin enzima (◇).

Por otro lado, con respecto a los polímeros obtenidos en las reacciones control en ausencia de biocatalizador (símbolos vacíos), en el sistema  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]/\text{R-134a}$

no se obtuvo polímero precipitado a 65 °C a 10 días de reacción a diferencia que en LI, donde el polímero obtenido alcanzó un 2% de rendimiento, así mismo, a 90 °C en el sistema  $[C_4MIM][PF_6]/R-134a$  el rendimiento del polímero en la reacción no enzimática (15%) es menor a la enzimática (35%), esto difiere de los resultados de los rendimientos obtenidos en medio  $[C_4MIM][PF_6]$ , donde dichos rendimientos son similares con y sin adición de enzima. Este resultado ha sido discutido en la sección anterior y se atribuye a la propagación catiónica del ion imidazolio del LI (figura 13).

La evidencia experimental, en cuanto a la diferencia de rendimientos de las reacciones con y sin enzima en los dos medios de reacción evaluados, sugiere que dicha propagación catiónica se reduce en el sistema  $[C_4MIM][PF_6]/R-134a$  al ser menor el rendimiento en la síntesis sin enzima. Una posible explicación son las interacciones entre disolventes ya que recientemente Ali y col. (2014)<sup>77</sup> encontraron, al estudiar mezclas binarias bis(trifluorometil-sulfonyl)imida de 1-butil-3-metilimidazolio  $[C_4MIM][TF_2N]$  y solventes moleculares comunes (metano, 1-butanol, DMSO y DMF), en primer lugar, que la polaridad de la mezcla es mucho mayor que la de los componentes puros a lo que denominaron una “hiperpolaridad”; además, que existen interacciones disolvente-disolvente debido a que el hidrogeno del C2 del catión  $[C_4MIM]^+$  interacciona con los pares de electrones libres del disolvente molecular. En nuestro caso, en el sistema  $[C_4MIM][PF_6]/R-134a$  podemos suponer que, el catión  $[C_4MIM]^+$  está interaccionando con los pares de electrones libres de los átomos flúor de la molécula del R-134a, ya que esto evitaría la propagación catiónica (dependiente del catión imidazolio) al no estar disponible el catión; sin embargo, en nuestros resultados no desaparece por completo dicha propagación, sólo se reduce debido a que el  $[C_4MIM]^+$  y el R-134a no se alimentaron estequiométricamente al reactor (2.37% mol a 90 °C y 3.26% mol a 65 °C).

También, cabe destacar que aunque al utilizar CALB como biocatalizador en la síntesis del PLLA en R-134a no se obtuvo polimerización,<sup>52</sup> en el trabajo de

Guzmán-Lagunes y col. (2013),<sup>43</sup> quienes realizaron esta misma síntesis utilizando la enzima lipasa PS, se obtuvo un rendimiento cercano al 42% y la propagación no enzimática fue menor que la enzimática (8%), a pesar de que se utilizó una temperatura de 105 °C; esto es otra evidencia de que en medio R-134a comprimido la propagación catiónica está reducida.

Por otro lado, se puede observar que el rendimiento de los polímeros obtenidos en ambos medios de reacción evaluados, alcanza un valor máximo a los 6 días a 90 °C y 9 días a 65 °C, lo que indica que la reacción llega al equilibrio y a partir de ese momento es posible que se lleve a cabo la hidrólisis del polímero, ya que el rendimiento disminuye notablemente, por el exceso de agua en el medio de reacción.

Por otro lado, se determinó por SEC el peso molecular de los polímeros sintetizados (figura 36); en donde, se observó que el  $M_n$  de éstos a 90 °C es mayor que a 65 °C para ambos medios de reacción. Un resultado muy interesante es que en los polímeros sintetizados en el sistema  $[C_4MIM][PF_6]/R-134a$  (líneas continuas) el  $M_n$  es mayor en ambas temperaturas; Asimismo, los PLLAs sintetizados en las reacciones enzimáticas (símbolos llenos) tiene un  $M_n$  mayor que los obtenidos en las reacciones sin adición de enzima (símbolos vacíos), para todas las condiciones evaluadas. Resultados similares se habían obtenido en reportes previos de síntesis enzimática de polímeros en LI.<sup>30,31</sup> Cabe destacar que a 90 °C en medio  $[C_4MIM][PF_6]/R-134a$  el  $M_n$  del polímero aumentó considerablemente ( $28 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ ) en comparación con el obtenido en medio  $[C_4MIM][PF_6]$  ( $19 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ ). Este resultado se atribuye a que sí se consiguió una disminución en la viscosidad en el medio de reacción al agregar el co-solvente R-134a comprimido y por ende, una mejor transferencia de masa, como se planteó en un principio, y esto se refleja en que la propagación de las cadenas en dicho medio de reacción fue mayor que en  $[C_4MIM][PF_6]$  para ambas temperaturas. Sin embargo, se debe recordar que en este medio de reacción la propagación catiónica fue menor que en  $[C_4MIM][PF_6]$  lo que deriva en un menor número de cadenas cortas y un aumento en el peso molecular promedio. No obstante, no se

pudo realizar un seguimiento visual de la reacción, para observar la disminución de la viscosidad del medio en comparación con  $[C_4MIM][PF_6]$ , porque la agitación de la capsula de mirillas no es la misma que la del reactor utilizado en la síntesis, lo que nos arrojaría un posible error al momento de realizar este monitoreo.

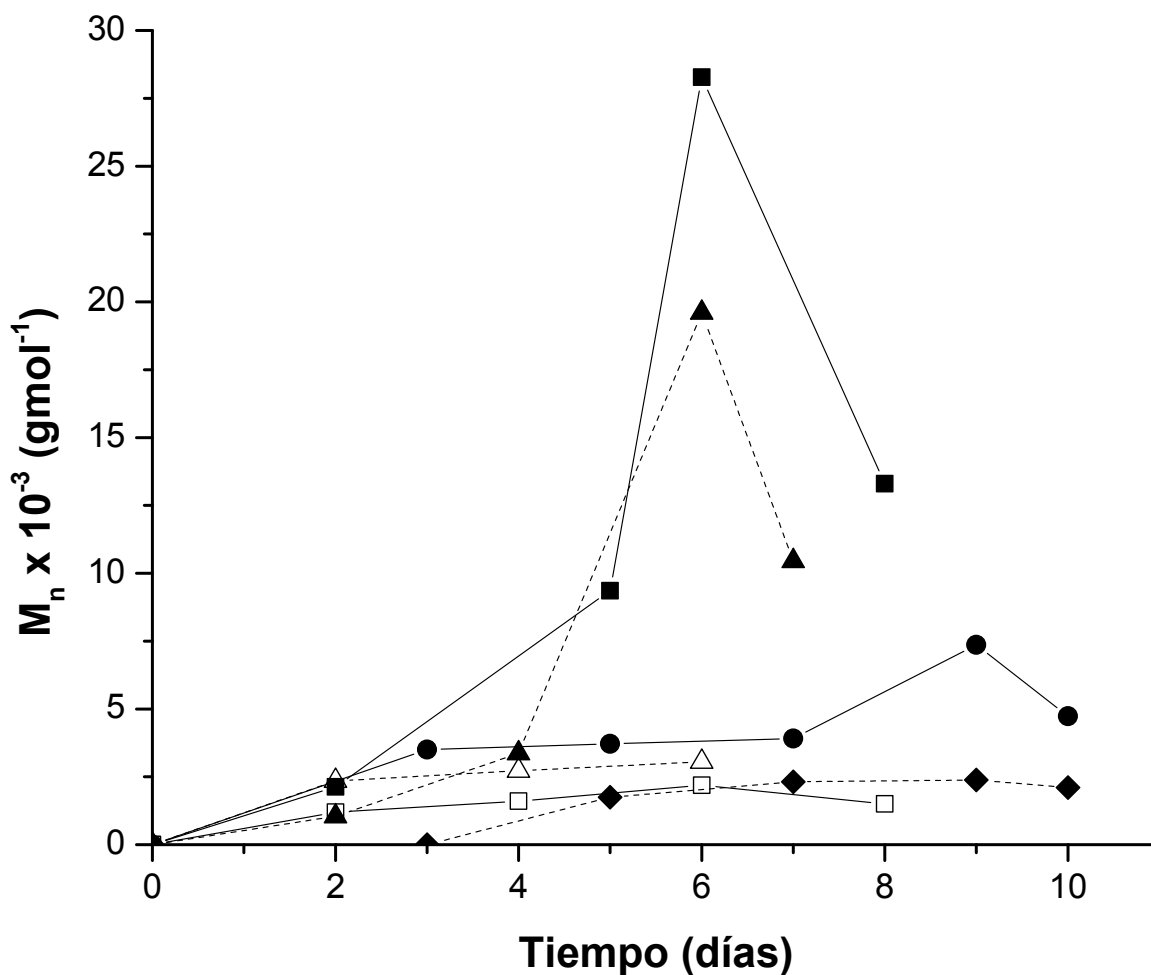


Figura 36. Peso molecular con respecto al tiempo.  $[C_4MIM][PF_6]/R-134a$ : 90 °C con enzima (■), 90 °C sin enzima (□), 65 °C con enzima (●).  $[C_4MIM][PF_6]$ : 90 °C con enzima (▲), 90 °C sin enzima (△), 65 °C con enzima (◆), 65 °C sin enzima (◇).

Cabe mencionar que el  $M_n$  de los polímeros obtenidos al utilizar la mezcla binaria como medio de reacción fue el doble del obtenido en el reporte previo de la síntesis de PLLA en R-134a con la lipasa PS ( $14 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ ),<sup>43</sup> lo que demuestra la viabilidad de la mezcla de reacción en comparación con la síntesis utilizando los



componentes por separado como medio de reacción. Por su parte, los PDIs de los polímeros se encuentran en un intervalo de 1.1 -1.7 (tabla 7), lo cual es indicativo de que son polímeros poco dispersos.

Por otro lado, se realizaron análisis térmicos de DSC y TGA (tabla 7); con respecto al DSC, la  $T_g$  de los polímeros sintetizados estuvo en un intervalo de 48.8 a 62.0 °C que coincide con lo publicado en la literatura,<sup>30</sup> sin embargo, en algunos termogramas no se pudo observar dicha temperatura. Esto se atribuye al bajo peso molecular de algunos de los polímeros sintetizados, ya que son más cristalinos, como se menciona a continuación. Las  $T_m$  se encuentran en un intervalo de 109 a 138 °C donde no se encontró una correlación de los datos con otras propiedades.

Asimismo, la  $T_d$  del polímero se encuentra en el intervalo de 155 a 122 °C y se observan  $T_d$  mayores en los polímeros sintetizados en medio  $[C_4MIM][PF_6]$  en ambas temperaturas evaluadas; esto indica que los polímeros obtenidos en este medio son más estables térmicamente que los sintetizados en medio  $[C_4MIM][PF_6]/R-134a$ . Este resultado está relacionado con el porcentaje de cristalinidad de los polímeros como se explica a continuación.

Tabla 7. Datos de caracterización de PLLA sintetizado en [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]/R-134a y [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] a 65 y 90 °C.

Exp.	Medio <sup>a</sup> de reacción	Temperatura (°C)	Tiempo (días)	T <sub>m</sub> <sup>c</sup> (°C)	T <sub>d</sub> <sup>d</sup> (°C)	PDI <sup>e</sup>
1	2	90	2	122.7	187.4	1.5
2	2	90	5	133.7	190.8	1.1
3	2	90	6	138.7	227.5	1.5
4	2	90	8	125.6	170.3	1.7
5	2 <sup>b</sup>	90	2	122.5	165.7	1.2
6	2 <sup>b</sup>	90	4	126.3	155.4	1.4
7	2 <sup>b</sup>	90	6	128.6	158.7	1.2
8	2 <sup>b</sup>	90	8	125.2	141.66	1.3
9	1	90	2	124.4	221.5	1.4
10	1	90	4	125.9	228.2	1.4
11	1	90	6	130.0	252.7	1.2
12	1	90	7	125.5	230.4	1.3
13	1 <sup>b</sup>	90	2	120.2	171.3	1.2
14	1 <sup>b</sup>	90	4	115.9	198.6	1.2
15	1 <sup>b</sup>	90	6	126.8	205.5	1.4
16	2	65	3	n.d.	n.d.	1.3
17	2	65	5	119.5	158.66	1.2
18	2	65	7	122.7	160.2	1.1
19	2	65	9	125.6	157.3	1.1
20	2	65	10	118.5	173.1	1.1
21	1	65	3	n.d.	n.d.	1.3
22	1	65	5	121.8	232.5	1.3
23	1	65	7	116.6	234.8	1.1
24	1	65	9	118.0	223.5	1.2
25	1	65	10	115.3	220.1	1.3
26	1 <sup>b</sup>	65	9	109.8	184.0	1.1

<sup>a</sup> medio 1: [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>], medio 2: [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]/R-134a. <sup>b</sup> Experimento sin biocatalizador (blanco). <sup>c</sup> Temperatura de fusión medida por DSC. <sup>d</sup> Temperatura de degradación al 5% de pérdida de material determinado por TGA <sup>e</sup> Determinado por SEC calibrado con poliestireno estándar.

A la par, los porcentajes de cristalinidad de los polímeros fueron determinados por PXRD; donde se encontraron en un rango de 43-50%; en la figura 37 se presentan, a manera de ejemplo, las mejores condiciones de cada temperatura en

ambos medios de reacción. Se ha reportado que al realizar la precipitación del polímero en un anti-solvente para purificar el producto (cristalización), las cadenas relativamente cortas se organizan en estructuras cristalinas más rápidamente que las cadenas más grandes. Esto quiere decir que polímeros con una mayor cantidad de unidades de repetición tiene dificultad al empaquetarse ya que tienden a enredarse. Este comportamiento se observó en este trabajo, ya que, el polímero con un mayor peso molecular (sintetizado en  $[C_4MIM][PF_6]/R-134a$ ) tiene un menor porcentaje de cristalinidad (43.2%) que el sintetizado en  $[C_4MIM][PF_6]$  de menor peso molecular (49.8%). En la figura 37, se observa que el tamaño del cristal fue mayor en los polímeros sintetizados en medio  $[C_4MIM][PF_6]$  que en  $[C_4MIM][PF_6]/R-134a$ ; este comportamiento es similar al encontrado en las  $T_d$  de los polímeros en los diferentes medios de reacción. Estos resultados indican que al modificar el medio de reacción (menor viscosidad), las propiedades del polímero se modifican, como es el caso del peso molecular el cual afecta directamente la cristalinidad y el comportamiento térmico del polímero

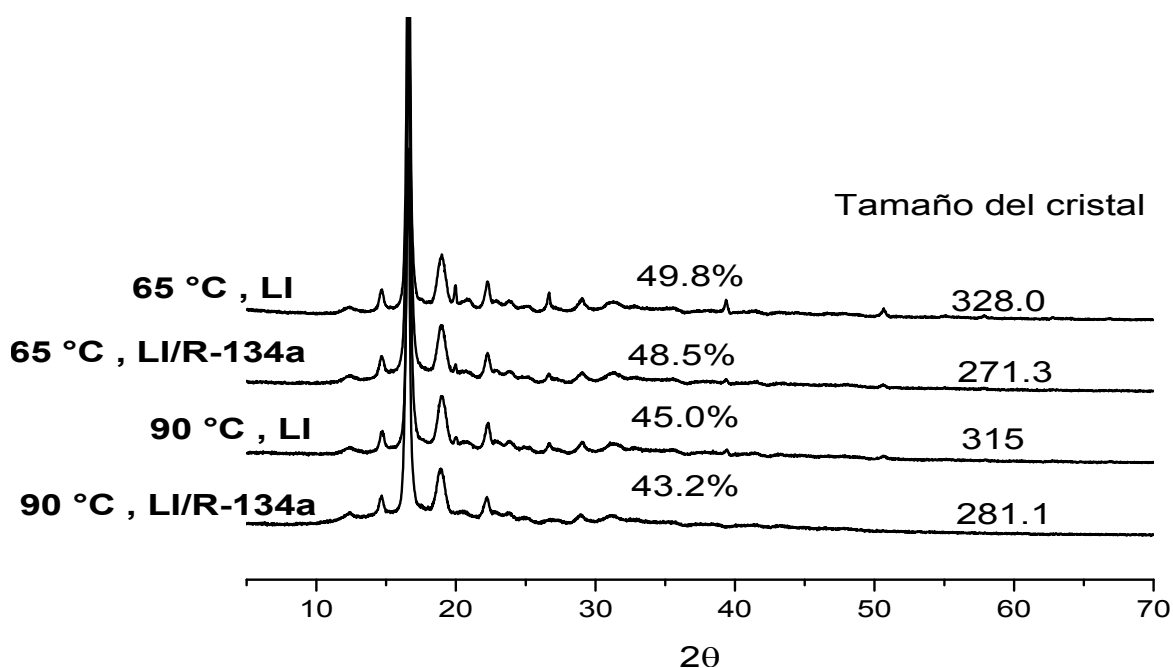


Figura 37. Espectro de PXRd de PLLA sintetizado a 65 y 90 °C en medio  $[C_4MIM][PF_6]$  y  $[C_4MIM][PF_6]/R-134a$ .

Debido a los resultados favorables obtenidos en la homopolimerización del PLLA en el sistema  $[C_4MIM][PF_6]/R-134a$ ; se decidió realizar la síntesis del poli(LLA-co-BHB).

### 5.3.2. Síntesis de polímeros hiperramificados en la mezcla $[C_4MIM][PF_6]/R-134a$

Las reacciones para los polímeros hiperramificados se llevaron a cabo a las mismas condiciones que el homopolímero. También se estableció trabajar con la relación molar de alimentación 9:1(LLA:BHB), ya que fue en la que se determinó un mayor DB. Se decidió evaluar dos temperaturas, 65 y 90 °C, para conocer qué ocurría con la propagación no enzimática a estas condiciones de reacción, ya que en la sección anterior sólo se llevaron a cabo las reacciones a 90 °C.

En primera instancia se realizó una  $^1H$  RMN a los polímeros obtenidos, porque aunque a 90 °C en  $[C_4MIM][PF_6]$  se obtuvieron polímeros hiperramificados, no se tenía la certeza de si a una temperatura menor o bien, cambiando el medio de reacción, se obtendrían dichos polímeros. En la figura 38, se observa el espectro de  $^1H$  RMN de los polímeros, donde se corrobora que en las condiciones evaluadas se observaron las señales de protón características tanto del lactil como del BHB lo cual confirma la incorporación de este último en el polímero; a manera de ejemplo se muestran los  $^1H$  RMN de todas las condiciones evaluadas en el tiempo (días) donde se obtuvieron las mejores características de los mismos. Se puede ver que al modificar el medio de reacción, la incorporación del BHB (tabla 8) del polímero hiperramificado a la temperatura de 90 °C se vio ligeramente afectada, ya que, en el medio de reacción  $[C_4MIM][PF_6]$  se obtuvo, como se describió anteriormente, 13.6% y en el medio de reacción modificado  $[C_4MIM][PF_6]/R-134$ , 11.9% (tabla 8). En esta misma figura se observa que, la incorporación del BHB en los polímeros hiperramificados obtenidos en la síntesis a 65 °C, en ambos medios evaluados, tuvieron valores menores a los obtenidos en la síntesis a 90 °C (cerca de 8%); en conclusión, la incorporación del BHB está influenciada por la temperatura de reacción en ambos medios de reacción

evaluados y no del tipo de medio empleado. Un resultado similar se observó en la co-polimerización de PLLGA<sup>31</sup>, donde se obtuvo una mayor incorporación del LA al incrementar la temperatura de reacción.

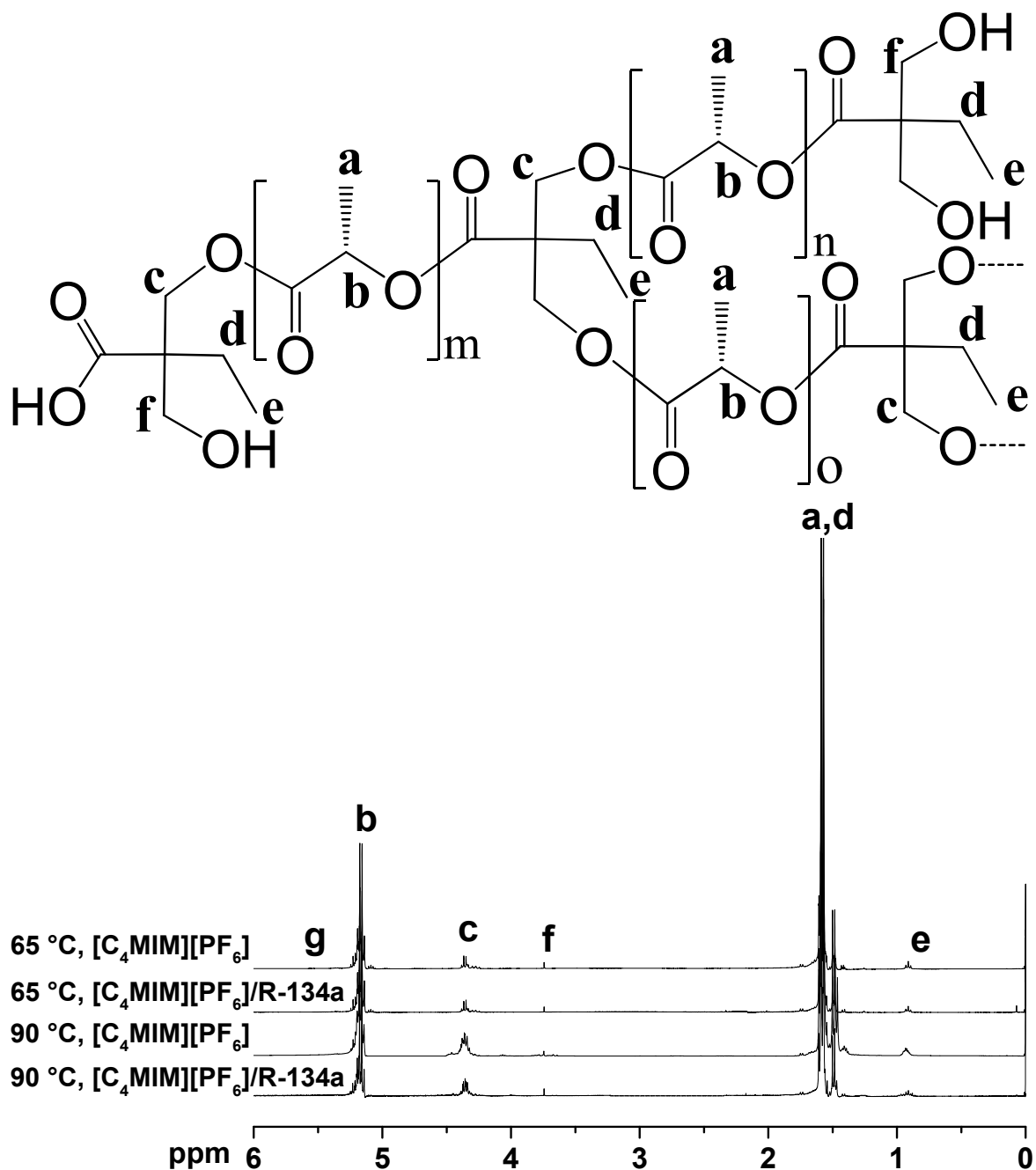


Figura 38. <sup>1</sup>H RMN de los polímeros hiperramificados obtenidos en las diferentes condiciones de reacción.

Asimismo, en la figura 39 se aprecia la comparación de rendimientos a través del tiempo en los dos medios de reacción evaluados a dos diferentes temperaturas. Se puede observar un comportamiento similar al de la síntesis del PLLA con respecto al aumento en la temperatura. Por otro lado, con respecto a la temperatura de 65 °C, en la síntesis en el medio [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]/R-134a se obtuvo un ligero aumento en el rendimiento del polímero hiperramificado en comparación con el obtenido en el [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>], esto se atribuye a que no hubo en ninguno de los casos propagación catiónica, en contraste con la síntesis del PLLA, ya que en ninguno de los medios evaluados se obtuvo polímero precipitado en la reacción no enzimática. Por otro lado, se puede observar que los poli(LLA-co-BHB) sintetizados a 90 °C con enzima, el comportamiento del rendimiento es similar en ambos medios de reacción; sin embargo, el rendimiento de los polímeros sintetizados sin adición de enzima es menor (2%) al enzimático (9%) en el sistema [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]/R-134a, este resultado reafirma que la propagación no enzimática se reduce al incorporar el FC, debido posiblemente a las interacciones disolvente-disolvente como se describió anteriormente.

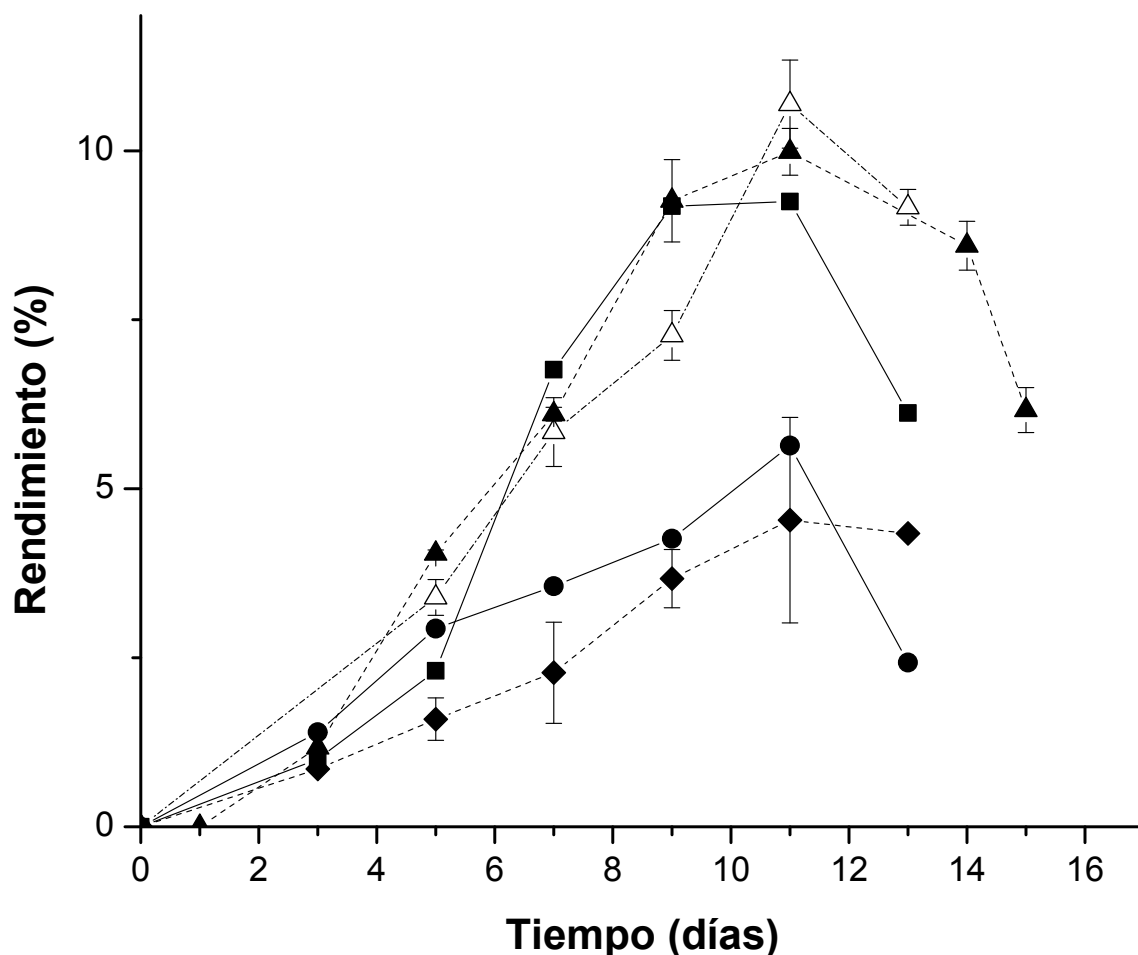


Figura 39. Variación de rendimiento en el tiempo de los polímeros hiperramificados sintetizados en  $[C_4MIM][PF_6]/R-134a$  y  $[C_4MIM][PF_6]$ .  $C_4MIM][PF_6]/R-134a$ : 90 °C con enzima (■), 65 °C con enzima (●).  $[C_4MIM][PF_6]$ : 90 °C con enzima (▲), 90 °C sin enzima (△), 65 °C con enzima (◆).

Por su parte, se determinó el DB de los polímeros hiperramificados (Figura 40) integrando las áreas correspondientes a las señales características de  $^1H$  RMN y posteriormente calculando el DB; en donde se observó que el DB de los polímeros sintetizados a 65 °C fue menor que a 90 °C para los dos medios de reacción, este resultado nos indica que a la temperatura de 90 °C, no solo aumenta el rendimiento obtenido si no que también se observa una mejora en el DB en ambos medios de reacción y por ende, en la incorporación de BHB al polímero (Tabla 8).

El DB de los polímeros hiperramificados en las reacciones a 65 °C para ambos medios de reacción es similar y está en un intervalo de 0.10 a 0.14. Sin embargo hay un diferencia en las reacciones a 90 °C; en donde el DB de los polímeros sintetizados en medio  $[C_4MIM][PF_6]/R-134a$  son ligeramente menores, ya que para este medio el DB es de hasta 0.19 y en el medio  $[C_4MIM][PF_6]$  alcanza un valor de hasta 0.21.

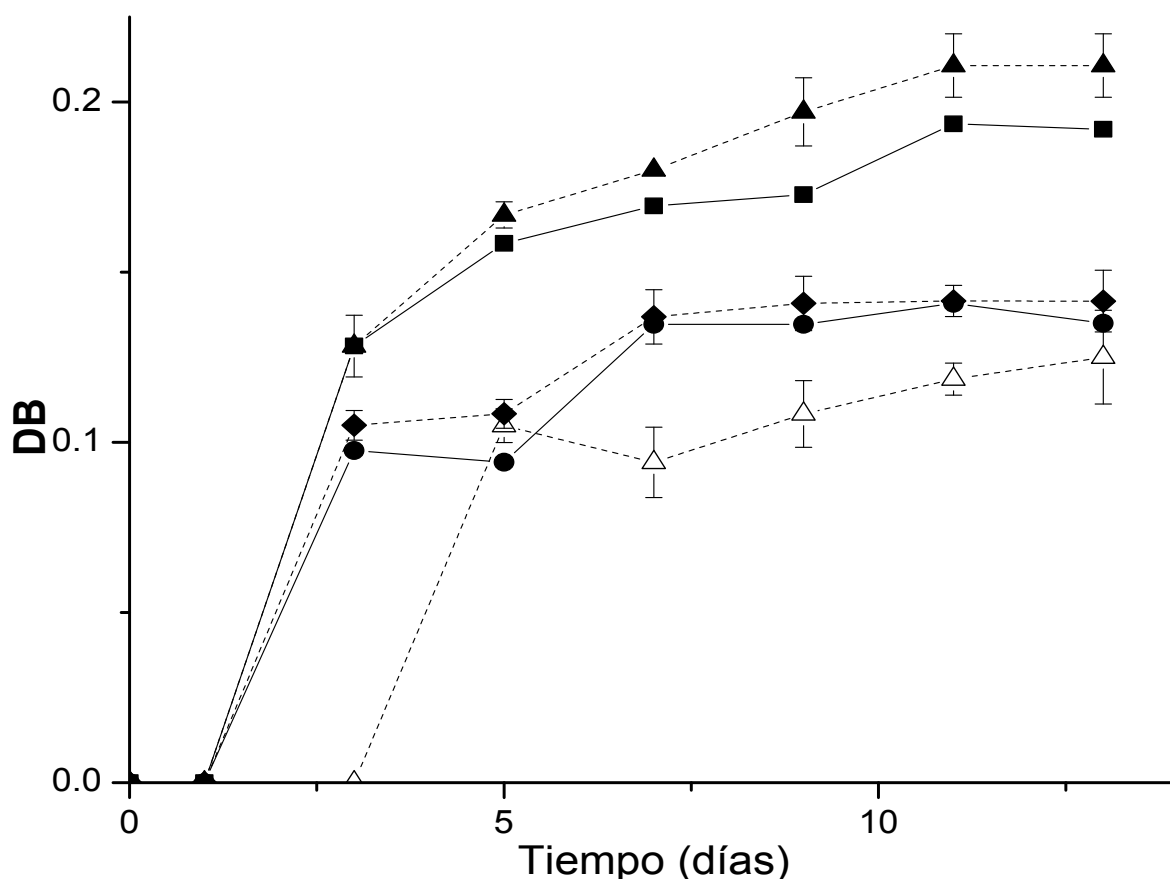


Figura 40. DB a través del tiempo de los poliésteres hiperramificados de LLA y BHB.  $C_4MIM][PF_6]/R-134a$ : 90 °C con enzima (■), 65 °C con enzima (●).  $[C_4MIM][PF_6]$ : 90 °C con enzima (▲), 90 °C sin enzima (△), 65 °C con enzima (◆).



Por otro lado, se determinó el  $M_n$  de los polímeros por SEC (tabla 8); en general se obtuvieron  $M_n$  mayores en los polímeros sintetizados a la temperatura de 90 °C para ambos medios de reacción, además, las reacciones enzimáticas (símbolos llenos) tuvieron mayores pesos moleculares que las no enzimáticas (símbolos vacíos). En la síntesis en medio  $[C_4MIM][PF_6]/R-134a$  a 90 °C y 11 días de reacción se obtuvo un  $M_n$  de  $11.2 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ ; este  $M_n$  fue tres veces mayor al obtenido en la síntesis de poli(PLLA-co-BHB) en  $[C_4MIM][PF_6]$  (líneas punteadas). Este resultado es mejor que el reportado en la síntesis química de este mismo polímero, donde obtuvieron un polímero hiperramificado de un peso molecular similar con una relación molar de alimentación de 49:1 con un DB de 0.042; sin embargo, es similar al obtenido en el trabajo de Skaria y col. (2002) donde sintetizaron enzimáticamente poli(CL-co-BHB) con una relación molar de alimentación de 9:1 y obtiene un peso molecular de  $12.9 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$  con un DB de 0.21.

Este aumento en el peso molecular es similar al obtenido en la síntesis del homopolímero y es un indicio más de que la viscosidad del medio de reacción disminuye al mezclar  $[C_4MIM][PF_6]$  con el fluido comprimido R-134a, lo que provoca una mayor propagación de las cadenas poliméricas disminuyendo ligeramente la proporción de BHB incorporado en el polímero. Por otro lado, el PDI de los polímeros estuvo en un intervalo de 1.1 a 2.2 (tabla 8), de donde el 2.2 corresponde al poliéster hiperramificado de mayor peso molecular el cual es más disperso en cuanto tamaño de cadenas poliméricas.

Se realizaron los análisis térmicos de DSC y TGA de los polímeros hiperramificados obtenidos. Los resultados se pueden observar en la tabla 8; las temperaturas de fusión en ambos medios de reacción son similares a las mismas temperaturas de síntesis, sin embargo las  $T_m$  de los poli(LLA-co-BHB) sintetizados a 90 °C (103-122 °C) son ligeramente mayores que a 65 °C (101-116 °C) para ambos medios de reacción. Otro resultado interesante es que la temperatura de estos polímeros es menor a la de sus homólogos lineales (tabla 7); las  $T_g$  no fueron apreciadas igual que, como se había mencionado anteriormente, en las

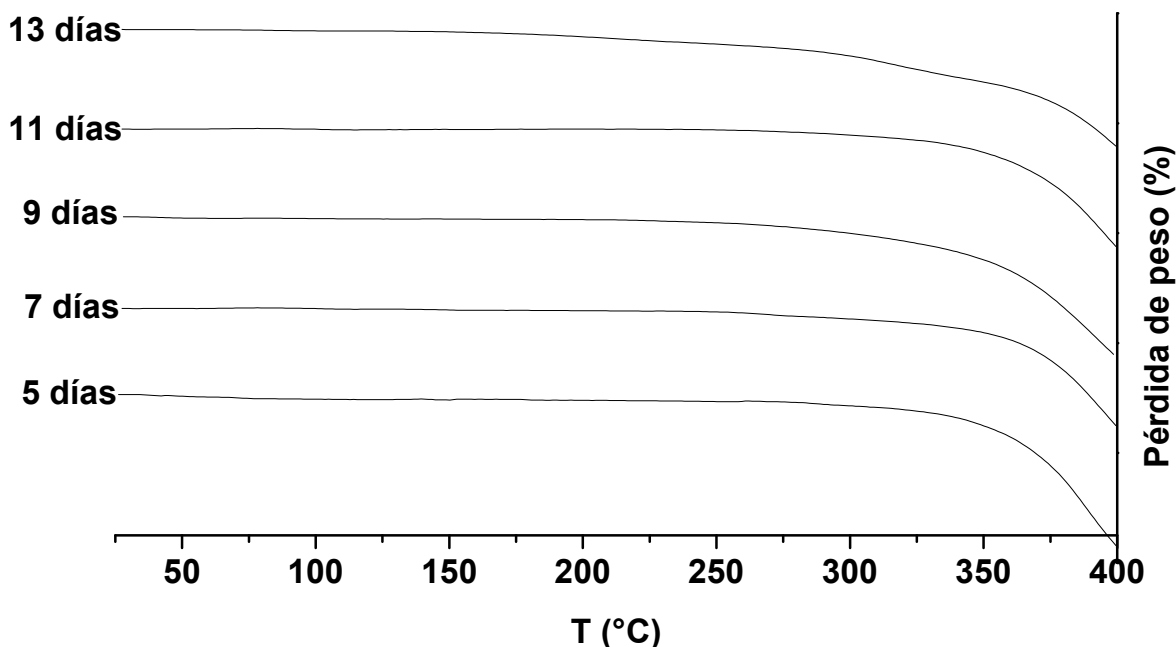
muestras sintetizadas en el medio [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]. Por otro lado, la T<sub>d</sub> de los polímeros estuvo en un intervalo de 155-323 °C. En la figura 41 se presentan los resultados de TGA de los polímeros sintetizados a 65 °C en medio [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]/R-134a.

**Tabla 8. Caracterización de los polímeros de poli(LLA-co-BHB) en [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] y [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]/R-134a.**

Exp.	Medio <sup>a</sup>	Temperatura (°C)	Tiempo (días)	BHB <sup>c</sup> (%)	T <sub>m</sub> <sup>d</sup> (°C)	T <sub>d</sub> <sup>e</sup> (°C)	M <sub>n</sub> <sup>f</sup> x 10 <sup>-3</sup> (g mol <sup>-1</sup> )	PDI <sup>f</sup>
1	2	90	3	7.82	n.d.	225.5	3.4	1.4
2	2	90	5	8.99	115.2	223.5	3.3	1.6
3	2	90	7	10.31	112.0	155.5	4.1	1.9
4	2	90	9	9.09	119.9	208.5	9.0	1.5
5	2	90	11	11.89	122.2	244.2	11.2	2.2
6	2	90	13	12.05	112.5	230.1	4.7	1.9
7	2 <sup>b</sup>	90	11	6.52	110.8	270.4	1.1	1.2
8	1	90	3	7.4	n.d.	230.1	3.6	1.7
9	1	90	5	10.11	n.d.	254.6	3.5	1.6
10	1	90	7	11.11	103.3	233.1	3.6	1.6
11	1	90	9	12.5	115.9	231.3	3.6	1.6
12	1	90	11	13.6	118.8	242.9	3.0	1.6
13	1	90	13	13.6	116.5	224.6	1.9	1.5
14	1	90	15	13.4	118.6	224.4	0.9	1.3
15	1 <sup>b</sup>	90	11	6.80	152.1	212.1	1.2	1.8
16	2	65	3	3.2	n.d.	170.5	1.3	1.7
17	2	65	5	6.10	102.4	271.8	1.4	1.6
18	2	65	7	7.98	111.7	298.2	1.5	1.5
19	2	65	9	8.25	112.9	280.0	2.0	1.7
20	2	65	11	8.30	115.9	298.8	3.5	2.0
21	2	65	13	7.85	111.3	225	2.5	1.7
22	1	65	3	n.d.	n.d.	215.3	1.3	1.2
23	1	65	5	5.21	101.7	323.5	1.1	1.4
24	1	65	7	7.83	104.3	303.5	1.1	1.3
25	1	65	9	7.83	116.3	213.5	1.7	1.2
26	1	65	11	8.25	112.5	167.5	2.3	1.4
27	1	65	13	8.29	114.8	254.2	1.6	1.1

<sup>a</sup> medio de reacción 1: [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>], 2: [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]/R-134a. <sup>b</sup> Experimento sin biocatalizador (blanco). <sup>c</sup> % de incorporación del BHB calculado por <sup>1</sup>H RMN <sup>d</sup>Temperatura

de fusión medida por DSC. <sup>e</sup> Temperatura de degradación al 5% de pérdida de material determinado por TGA <sup>f</sup> Determinado por SEC calibrado con poliestireno estándar.



**Figura 41. Termogramas de TGA de los polímeros hiperramificados sintetizados en el medio  $[C_4MIM][PF_6]/R-134a$  a  $65\text{ }^\circ\text{C}$ .**

Por su parte, en el PXRD se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 9, en donde, se observa que, en comparación con los resultados obtenidos con los homopolímeros (figura 37), los porcentajes de cristalinidad y el tamaño del cristal son menores en todos los casos; esto es de esperarse ya que, los polímeros hiperramificados, como se comentó anteriormente, exhiben la propiedad de ser más amorfos que los lineales. También se puede observar, en esta misma tabla, que los polímeros hiperramificados sinterizados en medio  $[C_4MIM][PF_6]$  presentan un mayor porcentaje de cristalinidad que los sintetizados en  $[C_4MIM][PF_6]/R-134a$ , así como un mayor tamaño de cristal. Los polímeros evaluados a las mismas condiciones en diferentes medios de reacción tienen similares DB, por lo cual se esperaría un porcentaje de cristalinidad similar, pero estos difieren en  $M_n$  lo que causaría que el de mayor  $M_n$  no se empaque tan bien como el de menor  $M_n$ .

Este resultado es muy similar al obtenido en la síntesis del homopolímero y nos presenta otro indicio de que al incorporar un FC en el medio de reacción para la síntesis, se modifican las propiedades de los polímeros obtenidos.

**Tabla 9. Porcentaje de cristalinidad de los polímeros hiperramificados a las diferentes condiciones evaluadas a 11 días de reacción.**

Muestra	Cristalinidad (%)	Tamaño de cristal
65 °C [C <sub>4</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]	37	26.5
65 °C [C <sub>4</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]/R-134a	30	9.69
90 °C [C <sub>4</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]	32.4	36.5
90 °C [C <sub>4</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]/R-134a	27.4	8.5

Siguiendo con la caracterización de los polímeros hiperramificados obtenidos, se realizó un análisis de MALDI-TOF, con el fin de reafirmar la incorporación obtenida por <sup>1</sup>H RMN. A manera de ejemplo en la figura 42 se presenta el espectro de MALDI-TOF del polímero hiperramificado sintetizado a 65 °C en medio [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]/R134a. Los productos con m/z menores a 500 se despreciaron; el peso molecular fue de hasta  $2.8 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ , el  $M_n$  fue de  $1.6 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$  y el PDI de 1.01; mientras que por SEC se obtuvo un  $M_n$  de  $2.3 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$  y 1.4 de PDI. Por otro lado, se calculó la incorporación promedio del BHB para esta muestra que fue de 8.23%, un resultado similar al calculado por <sup>1</sup>H RMN que fue de 8.25%; en este análisis de datos se pudo identificar que la incorporación de BHB fue tanto de manera lineal como de manera dendrítica. Si se comparan estos datos con los obtenidos en la muestra a 90 °C en el medio de reacción [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] (figura 27), se observa que se obtuvo un menor porcentaje de incorporación, no obstante, un peso molecular similar; esto puede deberse a las condiciones experimentales, ya que no todas las muestras se desorben y fragmentan igual por el pulso láser.

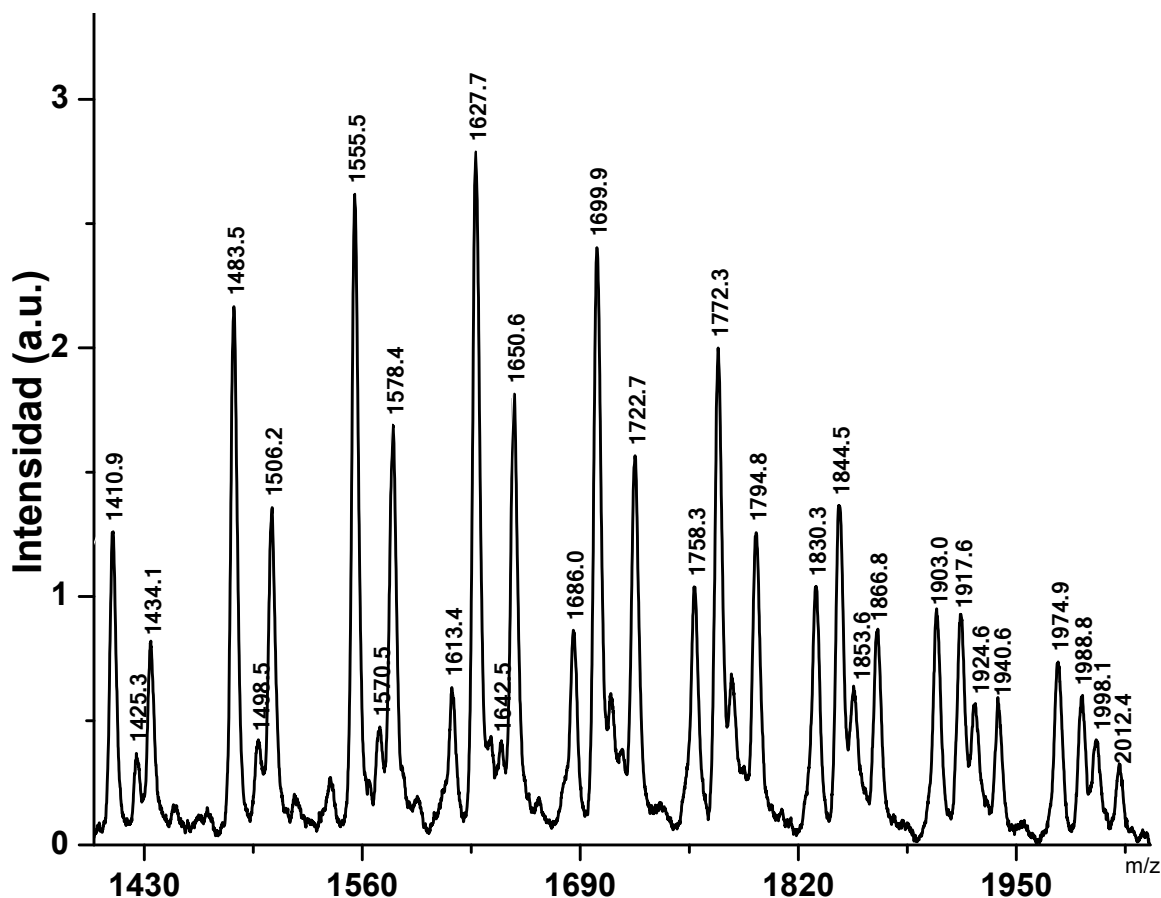


Figura 42. Espectro de MALDI-TOF del polímero hiperramificado poli(L-láctido-co-BHB) sintetizado en el medio de reacción  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]/\text{R-134a}$  a  $65\text{ }^\circ\text{C}$ .

Aunque el DB de los polímeros ramificados obtenidos en la síntesis en medio  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]/\text{R-134a}$  se vio ligeramente afectado por modificar el medio de reacción, el peso molecular del polímero hiperramificado fue mayor; esto es alentador, ya que quizá sea posible obtener películas de este material y posteriormente determinar si tiene aplicaciones biomédicas, debido a que los poliésteres hiperramificados son más biodegradables y compatibles biológicamente que los lineales debido a su mayor cantidad de grupos funcionales terminales.

## 6. CONCLUSIONES

Se realizaron exitosamente las síntesis enzimáticas con CALB del PLLA lineal e hiperramificado con el co-monómero trifuncional BHB en medio  $[C_4MIM][PF_6]$ . Se encontró que la mejor temperatura de reacción fue a 90 °C; para el PLLA lineal se obtuvo una conversión de PAAE a las 48 horas del 100%, un  $M_n$  del crudo de la reacción de  $3.8 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ , una conversión de propagación de cadenas poliméricas de 96% y un rendimiento del polímero precipitado de 48% con un peso molecular de  $19.6 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ . Con respecto a los hiperramificados, con el ácido gálico y la L-serina no se obtuvieron polímeros hiperramificados, sin embargo con el BHB se alcanzaron rendimientos de hasta el 25%, DB de 0.21 y  $M_n$  de hasta de  $3.6 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ . Además estas mismas síntesis fueron llevadas a cabo exitosamente en un medio  $[C_4MIM][PF_6]/R-134a$  donde los  $M_n$  de los polímeros fueron mayores que en  $[C_4MIM][PF_6]$ , siendo éste para los PLLA de hasta  $28.0 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$  y para el poli(LLA-co-BHB) de hasta  $11.2 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ . Se halló evidencia de que en esta mezcla de reacción la contribución de mecanismos no enzimáticos se ve reducida en comparación con el medio  $[C_4MIM][PF_6]$  debido a interacciones disolvente-disolvente.

## 7. REFERENCIAS

1. Williams, C. K. Synthesis of functionalized biodegradable polyesters. *Chem. Soc. Rev.* **36**, 1573–80 (2007).
2. Garlotta, D. A literature review of poly (lactic acid). *J. Polym. Environ.* **9**, 63–84 (2001).
3. Drumright, R. y Gruber, P. Polylactic Acid Technology. *Adv. Mater.* **12**, 1841–1846 (2000).
4. Mehta, R., Kumar, V., Bhunia, H. y Upadhyay, S. Synthesis of Poly(Lactic Acid): A Review. *J. Macromol. Sci. Part C Polym. Rev.* **45**, 325–349 (2005).
5. Perepelkin, K. Polylactide fibres: Fabrication, properties, use, prospects. A review. *Fibre Chem.* **34**, 85–100 (2002).
6. Kobayashi, S., Uyama, H. y Kimura, S. Enzymatic polymerization. *Chem. Rev.* **101**, 3793–3818 (2001).
7. Kobayashi, S. y Uyama, H. in *Biopolymers* (Steinbuchel, A.) 373–394 (WILEY-VCH, 2004).
8. Zaks, A. y Klibanov, A. M. Enzymatic catalysis in organic media at 100 °C. *Science.* **224**, 1249–1251 (1984).
9. Kirk, O. y Christensen, M. Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin. *Org. Process Res. Dev.* **6**, 446–451 (2002).
10. Berthod, A. y Broch, S. C. Líquidos iónicos: descripción y aplicaciones de esta nueva clase de disolventes en el análisis químico. *Cromatogr. y Técnicas Afines* **24**, 36–44 (2003).
11. Ursu, M., Neuner, I., Thomann, R., Rusu, M. y Frey, H. Properties of hyperbranched poly( $\epsilon$ -caprolactone) copolyesters. *Mater. Plast.* **43**, 241–249 (2006).
12. Seiler, M. Hyperbranched polymers: Phase behavior and new applications in the field of chemical engineering. *Fluid Phase Equilib.* **241**, 155–174 (2006).
13. Gruber, P. y O'Brien, M. in *Biopolym. Online* (Steinbüchel, A.) 235–250 (WILEY-VCH, 2002).

14. Jarerat, A., Tokiwa, Y. y Tanaka, H. Microbial Poly (L-lactide) - Degrading Enzyme Induced by Amino Acids, Peptides, and Poly (L-amino Acids). *J. Polym. Environ.* **12**, 139–146 (2004).
15. Klibanov, A. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409**, 241–246 (2001).
16. Yahya, A., Anderson, W. y Moo-Young, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enzyme Microb. Technol.* **23**, 438 – 450 (1998).
17. Gorman, L. a y Dordick, J. S. Organic solvents strip water off enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* **39**, 392–7 (1992).
18. Gotor-Fernandez, V., Busto, E. y Gotor, V. *Candida antarctica* lipase B: an ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds. *Adv. Synth. Catal.* **348**, 797–812 (2006).
19. Kumar, A. y Gross, R. a. *Candida antarctica* Lipase B Catalyzed Polycaprolactone Synthesis: Effects of Organic Media and Temperature. *Biomacromolecules* **1**, 133–138 (2000).
20. Miletić, N., Abetz, V., Ebert, K. y Loos, K. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on Polystyrene Nanoparticles. *Macromol. Rapid Commun.* **31**, 71–4 (2010).
21. Watanabe, Y. *et al.* Enzymatic Analysis of Positional Distribution of Fatty Acids in Solid Fat by 1,3-Selective Transesterification with *Candida antarctica* Lipase B. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **91**, 1323–1330 (2014).
22. Castano, M., Zheng, J., Puskas, J. E. y Becker, M. L. Enzyme-catalyzed ring-opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone using alkyne functionalized initiators. *Polym. Chem.* **5**, 1891–1896 (2014).
23. Lozano, P., De Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M. y Iborra, J. L. Lipase catalysis in ionic liquids and supercritical carbon dioxide at 150 degrees C. *Biotechnol. Prog.* **19**, 380–2 (2003).
24. Uyama, H., Takeya, K. y Kobayashi, S. Enzymatic Ring-Opening Polymerization of Lactones to Polyesters by Lipase Catalyst: Unusually High Reactivity of Macrolides. *Bull. Chem. Soc. ...* **68**, 56–61 (1995).
25. Yang, Z. y Pan, W. Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme Microb. Technol.* **37**, 19–28 (2005).



26. Lozano, P., De Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M. y Iborra, J. Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis. *Biotechnol. Lett.* **23**, 1529–1533 (2001).
27. Erbedinger, M., Mesiano, a J. y Russell, a J. Enzymatic Catalysis of Formation of Z-Aspartame in Ionic Liquid - An Alternative to Enzymatic Catalysis in Organic Solvents. *Biotechnol. Prog.* **16**, 1129–1131 (2000).
28. Marcilla, R. *et al.* Enzymatic polyester synthesis in ionic liquids. *Eur. Polym. J.* **42**, 1215–1221 (2006).
29. Yoshizawa-fujita, M., Saito, C., Takeoka, Y. y Rikukawa, M. Lipase-catalyzed polymerization of L -lactide in ionic liquids. *Polym. Adv. Technol.* **19**, 1396–1400 (2008).
30. Chanfreau, S., Mena, M., Porrás-Domínguez, J., Ramírez-Gilly, M., Gimeno, M., Roquero, P., Tecante A. y Bárzana, E. Enzymatic synthesis of poly-L-lactide and poly-L-lactide-co-glycolide in an ionic liquid. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **33**, 629–638 (2010).
31. Mena, M., Chanfreau, S., Gimeno, M. y Bárzana, E. Enzymatic synthesis of poly-L-lactide-co-glycolide in the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **33**, 1095–11101 (2010).
32. Brown, A. y George, D. Tetrafluoroethane (R134A) Propellant-Driven Aerosols of Proteins. *Pharm. Res.* **14**, 1542–1547 (1997).
33. Gimeno, M., Ventosa, N., Sala, S. y Veciana, J. Use of 1,1,1,2-Tetrafluoroethane (R-134a)-Expanded Liquids as Solvent Media for Ecoefficient Particle Design with the DELOS Crystallization Process. *Cryst. Growth Des.* **6**, 23–25 (2006).
34. Corr, S. 1,1,1,2-Tetrafluoroethane; from refrigerant and propellant to solvent. *J. Fluor. Chem.* **118**, 55–67 (2002).
35. Abbott, A. P., Eltringham, W., Hope, E. G. y Nicola, M. Solubility of unsaturated carboxylic acids in supercritical 1,1,1,2-tetrafluoroethane (HFC 134a) and a methodology for the separation of ternary mixtures. *Green Chem.* **7**, 210–216 (2005).
36. Wood, C. D., Senoo, K., Martin, C., Cuellar, J. y Cooper, A. I. Polymer Synthesis Using Hydrofluorocarbon Solvents. 1. Synthesis of Cross-Linked Polymers by Dispersion Polymerization in 1,1,1,2-Tetrafluoroethane Colin D. Wood,† Kazunobu Seno. *Macromolecules* **35**, 6743–6746 (2002).

37. Wood, C. D. y Cooper, A. I. Synthesis of Polystyrene by Dispersion Polymerization in Macromonomer Stabilizers. *Macromolecules* **36**, 7534–7542 (2003).
38. Saul, S., Corr, S. y Micklefield, J. Biotransformations in low-boiling hydrofluorocarbon solvents. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **43**, 5519–23 (2004).
39. Yu, G., Xue, Y., Xu, W., Zhang, J. y Xue, C. H. Stability and activity of lipase in subcritical 1,1,1,2-tetrafluoroethane (R134a). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 793–8 (2007).
40. García-Arrazola, R., Gimeno, M. y Bárzana, E. Use of Liquid 1,1,1,2-Tetrafluoroethane as Solvent Media for Enzyme-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of Lactones. *Macromolecules* **40**, 4119–4120 (2007).
41. García-Arrazola, R., Gimeno, M. y Bárzana, E. Effect of the initial water activity on the yields and molecular weights of the lipase-catalysed synthesis of aliphatic polyesters in low pressure liquid R-134a. *e-Polymers* **19**, 1–6 (2008).
42. López-Luna, A., Gallegos, J. L., Gimeno, M., Vivaldo-Lima, E. y 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).
43. Guzmán-Lagunes, F., López-Luna, A., Gimeno, M. y Bárzana, E. Enzymatic synthesis of poly-L-lactide in supercritical R134a. *J. Supercrit. Fluids* **72**, 186–190 (2012).
44. Fan, Y. y Qian, J. Lipase catalysis in ionic liquids/supercritical carbon dioxide and its applications. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **66**, 1–7 (2010).
45. Paljevac, M., Knez, Z. y Habulin, M. Lipase-catalyzed transesterification of (R, S)-1-phenylethanol in SC CO<sub>2</sub> and in SC CO<sub>2</sub>/ionic liquid systems. *Acta Chim. Slov.* **56**, 815–825 (2009).
46. Shiflett, M. B., Harmer, M. a., Junk, C. P. y Yokozeki, a. Solubility and diffusivity of 1,1,1,2-tetrafluoroethane in room-temperature ionic liquids. *Fluid Phase Equilib.* **242**, 220–232 (2006).
47. Shiflett, M. B. y Yokozeki, a. Solubility and diffusivity of hydrofluorocarbons in room-temperature ionic liquids. *AIChE J.* **52**, 1205–1219 (2006).

48. Shiflett, M. B. y Yokozeki, A. Vapor-Liquid-Liquid Equilibria of Hydrofluorocarbons + 1-Butyl-3-methylimidazolium Hexafluorophosphate. *J. Chem. Eng. Data* **51**, 1931–1939 (2006).
49. Ren, W. y Scurto, A. M. Global Phase Behavior of Imidazolium. *AIChE J.* **55**, 486–493 (2009).
50. Fujioka, M. *et al.* One-pot enzymatic synthesis of poly (L,L-lactide) by immobilized lipase catalyst. *Sen'i Gakkaishi* **62**, 63–65 (2006).
51. García-Arazola, R., López-Guerrero, D., Gimeno, M. y Bárzana, E. Lipase-catalyzed synthesis of poly-L-lactide using supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* **51**, 197–201 (2009).
52. López-Luna, A. Síntesis enzimática de biopolímeros en 1,1,1,2-tetrafluoroetano líquido. UNAM. 148 (2011).
53. Huijser, S., Staal, B. B. P., Huang, J., Duchateau, R. y Koning, C. E. Topology characterization by MALDI-ToF-MS of enzymatically synthesized poly(lactide-co-glycolide). *Biomacromolecules* **7**, 2465–2469 (2006).
54. Numata, K. *et al.* Branched poly(lactide) synthesized by enzymatic polymerization: effects of molecular branches and stereochemistry on enzymatic degradation and alkaline hydrolysis. *Biomacromolecules* **8**, 3115–3125 (2007).
55. Hans, M., Xiao, Y., Keul, H., Heise, A. y Moeller, M. Novel Biodegradable Heterografted Polymer Brushes Prepared via a Chemoenzymatic Approach. *Macromol. Chem. Phys.* **210**, 736–746 (2009).
56. Inoue, K. Functional dendrimers, hyperbranched and star polymers. *Prog. Polym. Sci.* **25**, 453–571 (2000).
57. Bruchmann, B. Dendritic Polymers - Academia meets Industry. 1 (2011). en <<http://www-isis.u-strasbg.fr/cellphysics/Seminary21.02.2011.html>> (accesado julio 15, 2014)
58. Tasaka, F., Ohya, Y. y Ouchi, T. One-Pot Synthesis of Novel Branched Polylactide Through the Copolymerization of Lactide with Mevalonolactone. *Macromol. Rapid Commun.* **22**, 820–824 (2001).
59. Gottschalk, C. y Frey, H. Hyperbranched polylactide copolymers. *Macromolecules* **39**, 1719–1723 (2006).

60. Wolf, F. K. y Frey, H. Inimer-promoted synthesis of branched and hyperbranched polylactide copolymers. *Macromolecules* **42**, 9443–9456 (2009).
61. Fischer, A. M. y Frey, H. Soluble Hyperbranched Poly(glycolide) Copolymers. *Macromolecules* **43**, 8539–8548 (2010).
62. Skaria, S., Smet, M. y Frey, H. Enzyme-Catalyzed Synthesis of Hyperbranched Aliphatic Polyesters. *Macromol. Rapid Commun.* **23**, 292–296 (2002).
63. Kim, S., Patel, N. y Kohl, P. Performance Simulation of Ionic Liquid and Hydrofluorocarbon Working Fluids for an Absorption Refrigeration System. *Ind. Eng. Chem. ...* **52**, 6329–6335 (2013).
64. Furutani, T., Su, R., Ooshima, H. y Kato, J. Simple screening method for lipase for transesterification in organic solvent. *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 1067–1072 (1995).
65. Hölter, D., Burgath, A. y Frey, H. Degree of branching in hyperbranched polymers. *Acta Polym.* **50**, 67–76 (1999).
66. Collins, E., Bares, J. y Billmeyer, F. *Experiments in polymer science*. 545 (Edit wiley-interscience publication, 1973).
67. ATMS. Standard test method for hydroxyl value of fatty oils and acids. 1957–86 (2001).
68. Hiltunen, K., Seppälä, J. y Härkönen, M. Effect of catalyst and polymerization conditions on the preparation of low molecular weight lactic acid polymers. *Macromolecules* **30**, 373–379 (1997).
69. Sureshkumar, M. y Lee, C.-K. Biocatalytic reactions in hydrophobic ionic liquids. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **60**, 1–12 (2009).
70. Nyce, G., Glauser, T. y Connor, E. In situ generation of carbenes: a general and versatile platform for organocatalytic living polymerization. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 3046–3056 (2003).
71. Huddleston, J. G. *et al.* Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation. *Green Chem.* **3**, 156–164 (2001).
72. Hawker, C. J. y Chu, F. Hyperbranched Poly (ether ketones): Manipulation of Structure and Physical Properties. *Macromolecules* **29**, 4370–4380 (1996).

73. Wooley, K., Hawker, C., Pochan, J. y Fréchet, J. Physical properties of dendritic macromolecules: a study of glass transition temperature. *Macromolecules* **26**, 1514–1519 (1993).
74. Kim, Y. y Webster, O. Hyperbranched polyphenylenes. *Macromolecules* **25**, 5561–5572 (1992).
75. Hult, A., Johansson, M. y Malmström, E. Hyperbranched Polymers. *Adv. Polym. Sci.* **143**, 1–34 (1999).
76. Romero, M., Calvo, L., Alba, C. y Daneshfar, A. A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane. *J. Biotechnol.* **127**, 269–277 (2007).
77. Ali, A., Ali, M. y Malik, N. Solvatochromic Absorbance Probe Behavior within Mixtures of the Ionic Liquid 1-Butyl-3-methylimidazolium Bis (trifluoromethylsulfonyl) imide<sup>+</sup> Molecular Organic. *J. Chem. Eng. data* **59**, 1755–1765 (2014).
78. Scott Masten. Review of Toxicological Literature. 56 (2004).
79. Matsumoto, M., Mochiduki, K. y Kondo, K. Toxicity of ionic liquids and organic solvents to lactic acid-producing bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* **98**, 344–347 (2004).

## 8. ANEXOS

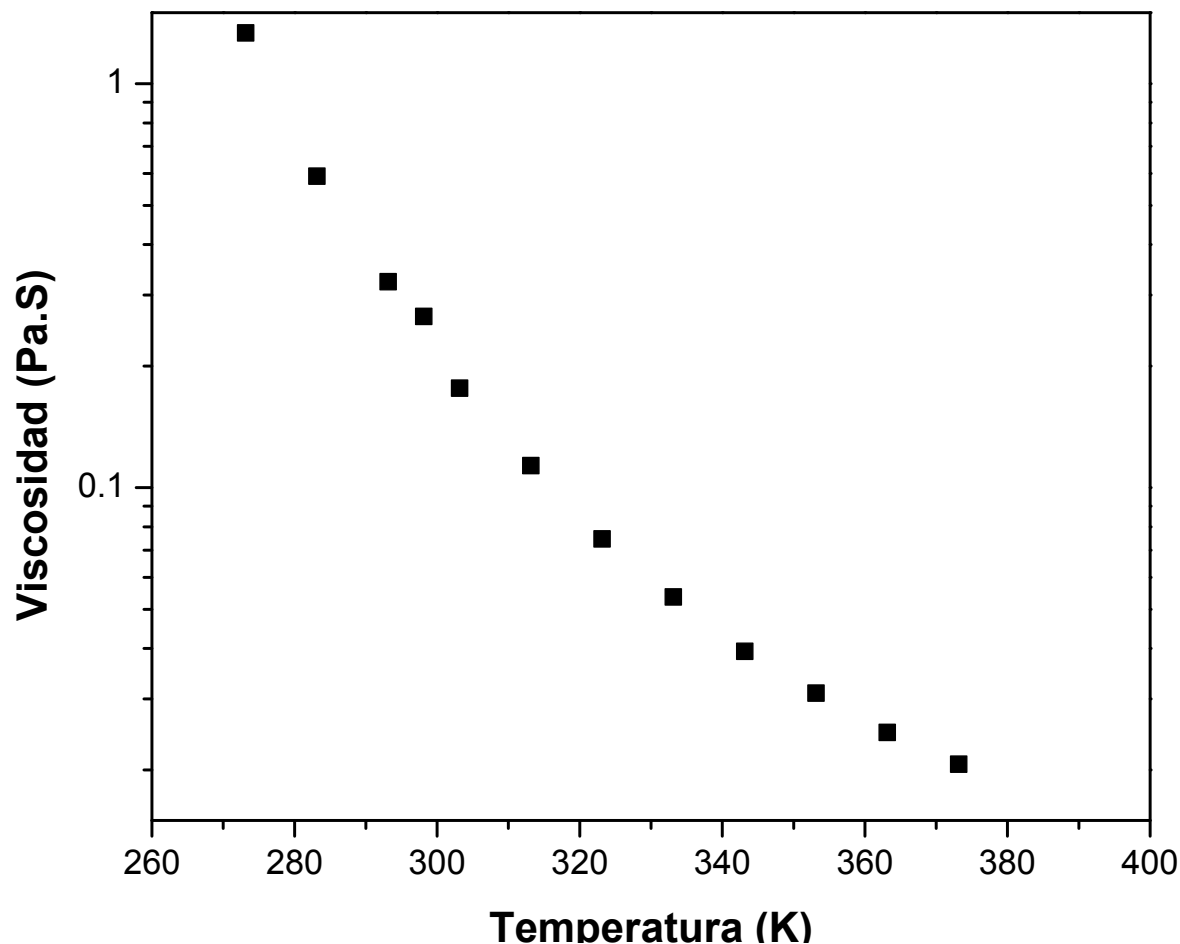
### Anexo 1. Toxicidad de $[C_4MIM][PF_6]$ <sup>78,79</sup>

- Toxicidad en bacterias.
- En ratas, una dosis oral de  $DL_{50}$  de 300 a 500 mg / kg y una  $DL_{50}$  cutánea de > 2000 mg/Kg.
- En el conejo, la irritación mínima fue visto cuando el compuesto ha sido probado en el ojo, mientras que no se observó irritación cuando se aplica por vía cutánea.
- En conejillos de indias, no irrita la piel.

Adicionalmente,  $[C_4MIM][PF_6]$  no fue mutagénico en el test de Ames.

Descomposición a altas temperaturas:

- Dióxido de carbono ( $CO_2$ ).
- Monóxido de carbono (CO).
- Gases nitrosos ( $NO_x$ ).
- Ácido fluorhídrico (HF).

**Anexo 2. Estudio de viscosidad de  $[C_4MIM][PF_6]$** 

**Ilustración 1. Estudio de viscosidad de  $[C_4MIM][PF_6]$  en un intervalo de temperatura de 0 a 90 °C.**

La viscosidad del LI disminuyó significativamente a medida que la temperatura aumentó, exhibió un comportamiento newtoniano entre 25 y 90 °C en el rango de 1 a 200 s<sup>-1</sup>. Sin embargo, esta dependencia no pudo expresarse por un arreglo de tipo Arrhenius en todo el rango de temperaturas, de todas formas a temperaturas altas la viscosidad del LI es relativamente baja (< 100 mPa·s) y no se esperaba que ésta fuera un factor relevante durante la síntesis enzimática.

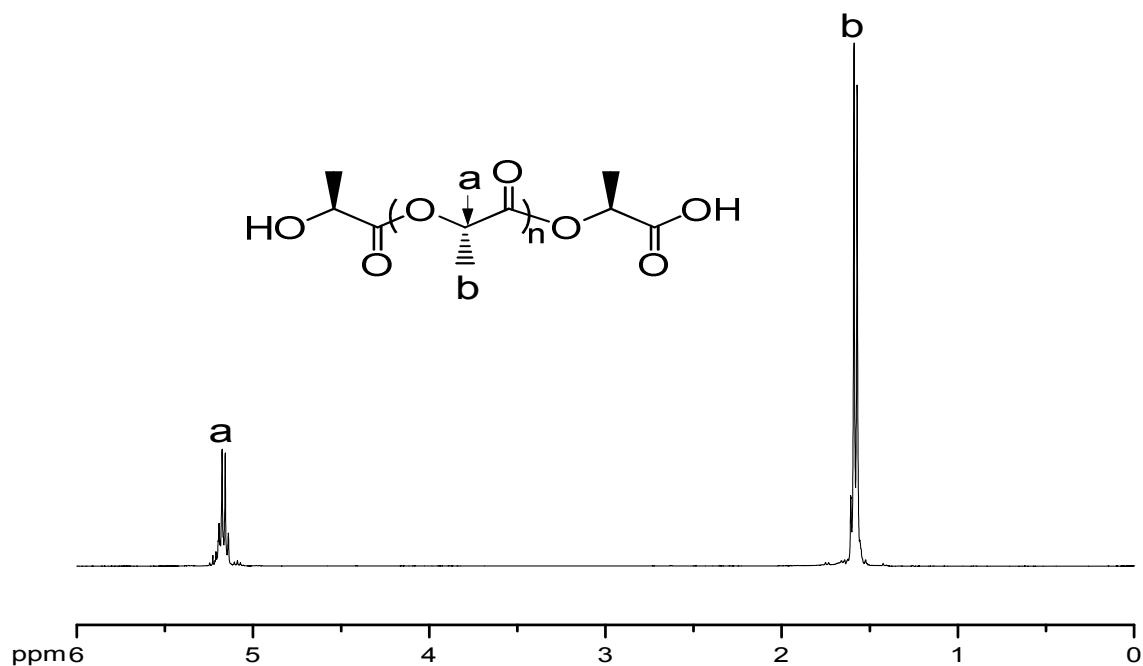
Anexo 3. Espectros de  $^1\text{H}$  RMN

Ilustración 2. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de PLLA, sintetizado con enzima a  $90\text{ }^\circ\text{C}$  a 6 días de reacción

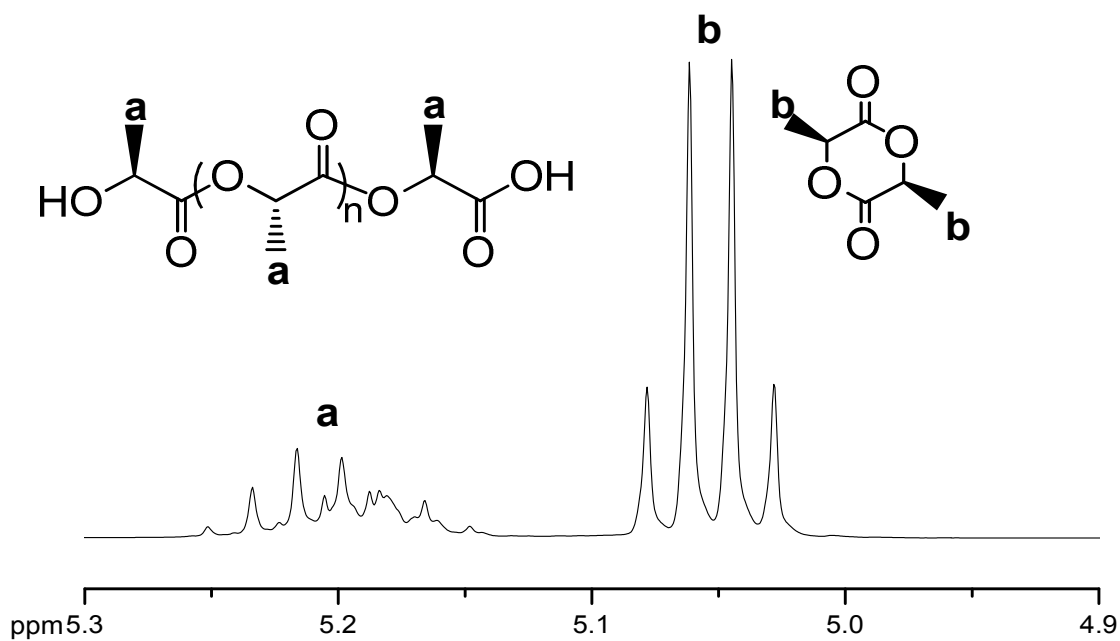
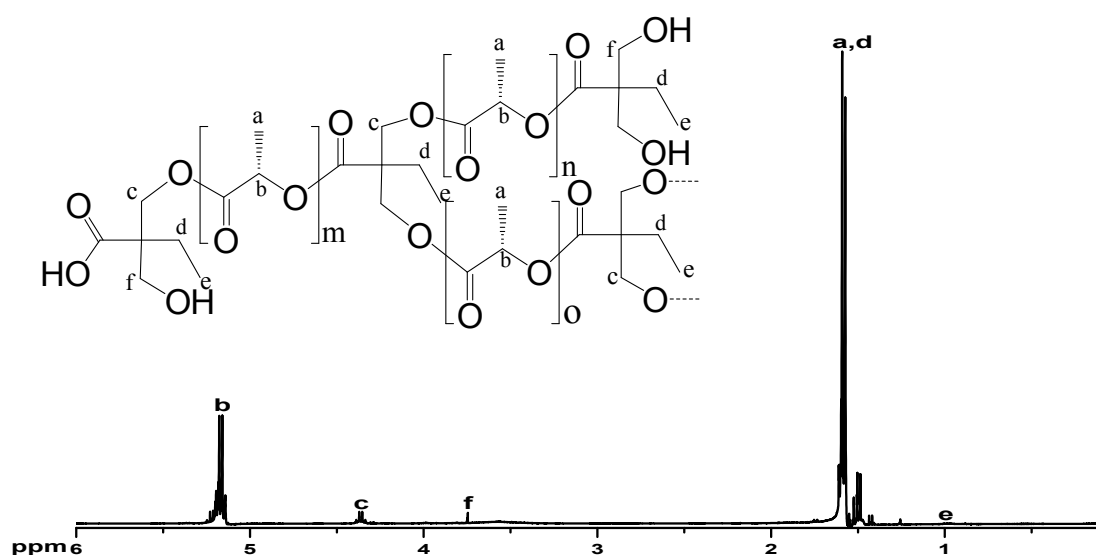
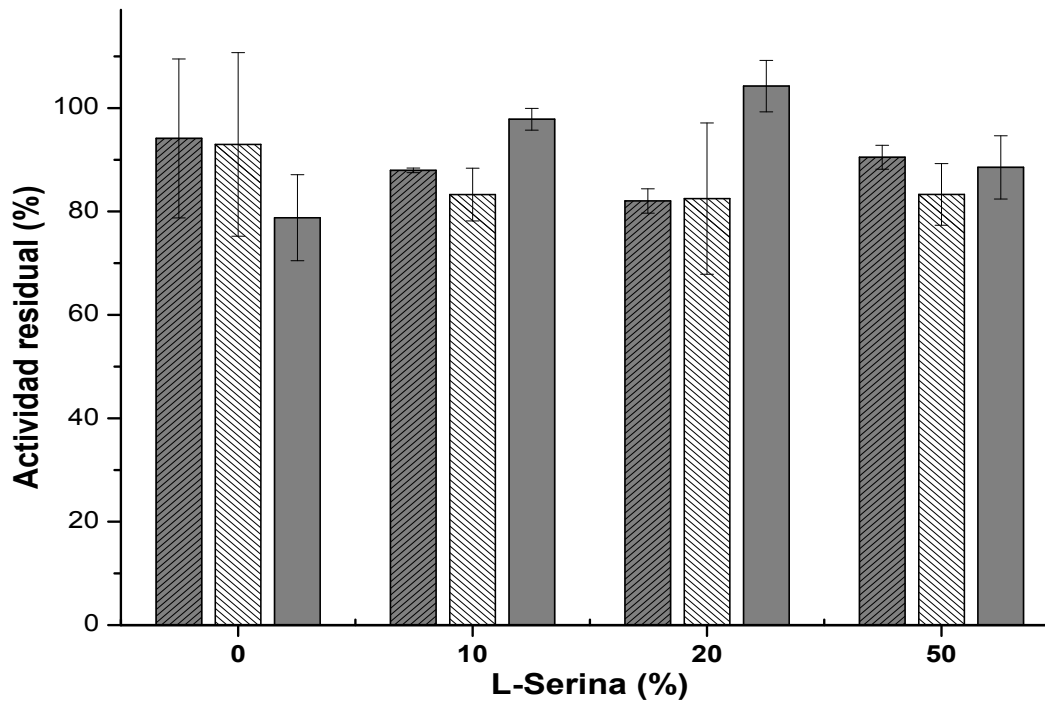


Ilustración 3. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del PLLA, señales correspondientes a la forma abierta y el monómero cíclico.





**Ilustración 4. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la fracción 7 recolectada en la cromatografía en columna de la fase metanólica del polímero hiperramificado obtenido con una fracción molar de alimentación 9:1 (LLA:BHB) a los 11 días de reacción a 90 °C.**

**Anexo 4. Actividad residual de la CALB**

**Ilustración 5. Actividad residual de la CALB tratada a diferentes concentraciones de L-serina en 1, 3 y 5 días de reacción.**

# Lipase-catalyzed synthesis of hyperbranched poly-L-lactide in an ionic liquid

María Mena · Alberto López-Luna ·  
Keiko Shirai · Alberto Tecante · Miquel Gimeno ·  
Eduardo Bárzana

Received: 11 July 2012 / Accepted: 17 July 2012 / Published online: 7 August 2012  
© Springer-Verlag 2012

**Abstract** Hyperbranched poly-L-lactides have been synthesized by eROP in  $[C_4MIM][PF_6]$  media. The bis(hydroxymethyl)butyric acid molecule was used as the  $AB_2$  core co-monomer and immobilized lipase B from *Candida antarctica* as biocatalyst. The degree of branching could be controlled by the reaction conditions, with the maximum achieved being 0.21. The successful achievement of the hyperbranched structure is attributed to the high solvent power of substrates and products in the ionic liquid besides sustained lipase activity.

**Keywords** Ionic liquids · Lipase · Hyperbranched polylactide

## Introduction

Poly(lactides (PLAs) and some of their derivatives are thermoplastic, biodegradable and biocompatible polymers extensively studied in the last 20 years [1] and the development of synthetic processes to produce them with

defined as well as novel structures and properties is encouraging [2–6]. Bulk ring opening of lactides (LA), the cyclic dimers of the linear acid precursors, is mostly used for homopolymer production employing metal catalysts at high temperatures. Alternatively, enzymatic ring-opening polymerizations (eROPs) promoted by lipases proceed in mild reaction conditions without metal contamination [4, 5]. In addition, eROP of hyperbranched polyesters is a challenging field of research where the interest in these complex structures arises from their compactness and their enhanced segment density and functionality [7]. Skaria et al. were the first to report a hyperbranched polyester by eROP of  $\epsilon$ -caprolactone (CL) using *candida antarctica* lipase B (CALB) with bis(hydroxymethyl)butyric acid (BHB) as  $AB_2$  core in toluene/dioxane mixtures to attain degree of branching (DB) from 0.03 to 0.33 [8]. The main drawback of that reaction was the low solubility of the core molecule in low polar toluene, and the addition of 1,4-dioxane to increase substrate solubility had to be kept to a minimum as it might deactivate the lipase. More recently, López-Luna et al. reported the CALB-mediated synthesis of hyperbranched polylactones using BHB with rather low DB (0.02–0.09) in liquid 1,1,1,2-tetrafluoroethane media [9]. In that work, the maximum BHB solubility was 10 wt%, which might have limited the DB. There are no reports hitherto of enzyme-mediated synthesis of hyperbranched PLAs and, generally, the low solubility of LAs in the aforementioned organic solvents restricts its eROP to bulk reactions, in which the relatively polar and hydrophilic environment of the melted LA is susceptible to lipase deactivation, thereby limiting polymer propagation [10–12]. Recently, imidazolium-based liquids (IL)s have been shown to be adequate to sustain lipase activities and a good solvent for LA and subsequent polyester toward high PLA molecular weights [13–15]. The present work aims to

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00449-012-0792-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Mena · A. Tecante · M. Gimeno (✉) · E. Bárzana (✉)  
Depto. Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
Ciudad Universitaria, Mexico DF 04510, Mexico  
e-mail: mgimeno@servidor.unam.mx

E. Bárzana  
e-mail: ebg@servidor.unam.mx

A. López-Luna · K. Shirai  
Depto. Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-  
Unidad Iztapalapa, Mexico DF 09340, Mexico

study the use of 1-butyl-3-methylimidazoliumhexafluorophosphate [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] media toward first lipase-mediated production of hyperbranched poly-L-lactide (PLLA).

## Experimental

### Materials

The biocatalyst was supplied by C-Lecta (GER) and consisted of 10 wt% of CALB immobilized by physical adsorption on Lewatit VP OC 1600 (Lanxess) spherical (1 mm) resin (specific activity of 6,000 PLU g<sup>-1</sup>). L-Lactide was supplied by Aldrich (USA, 98 % purity) and re-crystallized in methanol. 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DBA) was supplied by Sigma-Aldrich (USA) and used as supplied. [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] was purchased from Sigma-Aldrich (USA) and dried in vacuum (3 h, 4 × 10<sup>-4</sup> mbar) prior to use. Spectrophotometric grade tetrahydrofuran (THF) and dimethylformamide (DMF) were purchased from JT Baker (US).

### Polymerization procedure

Biocatalyst beads (10 wt%) and different amounts, as indicated, of LLA and BHB (70 wt%) were weighed in 15 ml flasks equipped with a cross-bar magnetic stirrer. The contents were dried under vacuum prior to [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] (5 g) addition and the reaction was conducted at 90 °C. Blank experiments were identically carried out without addition of the biocatalyst. Control experiments were carried out in bulk at 95 °C. At the end of each experiment, dimethylsulfoxide (20 mL) was added, the biocatalyst was separated by filtration and products precipitated in 1/10 (v/v) cold methanol (5 °C) to yield white powders. All experiments were carried out in duplicate.

### Measurements

<sup>1</sup>H NMR spectra of samples in *d*-chloroform were recorded in a Varian Unity Innova (US) spectrometer at 400 MHz. DB of samples was determined using below equation:

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

where X<sub>AB</sub> is the molar fraction of BHB by <sup>1</sup>H NMR spectra; δ = 0.9 ppm (3H) methyl group from BHB units; δ = 5.2 ppm (1H) methine group of lactyl units.

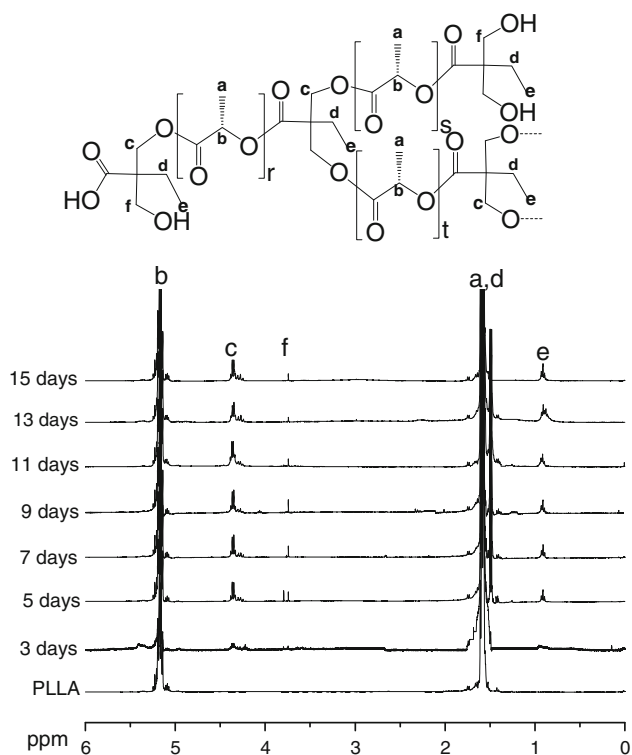
Molecular weight distributions (*M<sub>n</sub>* and polydispersities PDI) were measured by SEC in an HP 1100 (US) HPLC equipped with two PLgel 10 μm MIXED-B LS 300 × 7.5 mm (25 °C) columns (Varian, US), eluted with THF

(1 mL min<sup>-1</sup>) and calibrated with polystyrene standards. Evaporative light scattering PL-ELS 1,000 (Polymer Labs, US) was used as detector (gas flow = 1.0 mL min<sup>-1</sup>; neb. temp. = 40 °C; evap. temp. = 80 °C). MALDI-TOF spectra were recorded in an Applied Biosystems MALDI-TOF/TOF 4800 PlusTM (US). Samples (4 mg) were dissolved in DMF (1 mL) and 10 μL of this solution was mixed with an equal volume of DBA (10 mgmL<sup>-1</sup>) in DMF. Spectra were taken in the positive ion mode. Products having *m/z* values below 500 were disregarded in the evaluation of spectra to avoid matrix signals. Differential scanning calorimetry (DSC) measurements were carried out in a DuPont DSC 2100 (US) under nitrogen atmosphere in the range -10–300 °C at a heating rate of 10 °C min<sup>-1</sup>. Thermogravimetric analyses (TGA) were conducted on a TA Instruments Hi-Res TGA 2950 (US) under nitrogen atmosphere at 25–400 °C at a heating rate of 10 °C min<sup>-1</sup>.

## Results and discussion

The reaction temperature was 90 °C with 70 wt% of substrates relative to IL, as this was reported earlier for the best PLLA homopolymerization in [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] [15]. Dissolution of BHB in our system was up to 50 wt%, which is an improvement over earlier reports in which conventional organic solvents or compressed fluids were used to obtain hyperbranched polylactones with BHB comonomer [11, 12], and accounts for the advantage of using this IL as solvent media. As observed in <sup>1</sup>H NMR spectra in Fig. 1, two different signal displacements of methylene (CH<sub>2</sub>) group from AB<sub>2</sub> core could be distinguished, linked to esterificated (*c* in Fig. 1) and free (*f* in Fig. 1) vicinal hydroxyl groups, at δ = 4.2 ppm and δ = 3.7 ppm, respectively. The thermal properties of the attained hyperbranched polymer samples were investigated by DSC (Table 1), which displayed lower melting temperatures than linear PLLA, in agreement with reported data on hyperbranched polyesters [11, 12], without trends among samples. TGA of samples showed acceptable degradation temperatures, which were in most of the cases ca. 20 °C below that of PLLA (Table 1). Figure 2a shows that yields tend to increase with reaction time until the reactions are halted by solidification of the polymer mass, in a similar way to our previously reported eROP of LLA in imidazolium-based ILs [13–15].

The maximum *M<sub>n</sub>* was obtained with the 19:1 (LLA:BHB) feed (Entry 13 in Table 1) coinciding also with the maximum yield in 6 days. Generally, the *M<sub>n</sub>* of all samples were lower than that obtained in the synthesis of linear PLLA and with longer reaction times; however, solidification of the reaction media was delayed upon increasing the BHB feed. The latter was susceptible to



**Fig. 1**  $^1\text{H}$  NMR spectra upon reaction time of poly(LLA-co-BHB) samples obtained with a monomer molar relation feed 9:1 (LLA:BHB) and linear control PLLA

increase in the reverse reaction of polymer hydrolysis at later reaction times, assessed by decreased  $M_n$  values (Table 1; entry 2–7).

These experimental results evidenced the rather low activity of CALB in the presence of the  $\text{AB}_2$  substrate in this system. It is worth noting that reactions conducted with the highest BHB feed (50 wt%) in a 1:1 LLA:BHB ratio gave no polymerization. Blank experiments in IL media without biocatalyst showed no solidification of the media in accordance with the low  $M_n$  measured by SEC. This low polyester propagation in blank experiments has been explained by Huijser et al. [9] in eROP of LLA in bulk due to side cationic mechanisms promoted by traces of hydroxyacid from the LLA, and it was also reported in eROP of LLA in imidazolium-based IL media [14]. Regarding the latter, similar yields to those with added biocatalyst was found, but the remarkable difference was in the molecular weights, which were fivefold higher in the presence of CALB.

The advantage of using this IL media for this synthetic route was evidenced in control bulk polymerizations which started from 5 days of reaction (Fig. 2a); it is worth noting that the highest LLA:BHB molar ratio (19:1) resulted in the highest yields, similarly to that found in IL media. As shown in Table 2, the  $M_n$  of samples from bulk eROP displayed lower values than those using the IL with

**Table 1** Data on eROP of LLA with BHB in  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]$  media

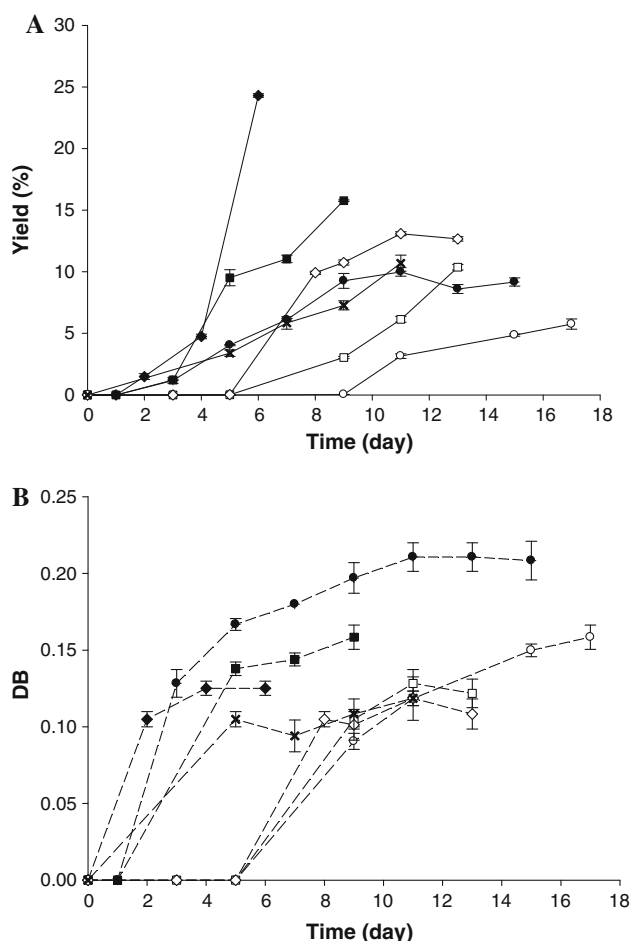
Entry	LLA:BHB (mol:mol)	Time (days)	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_d^d$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$M_n \times 10^{-3}$ ( $\text{g mol}^{-1}$ )	PDI
1	n/a <sup>a</sup>	5	130.0	252.7	19.6	1.2
2	9	5	ND	254.6	3.5	1.6
3	9	7	103.3	233.1	3.6	1.6
4	9	9	115.9	231.3	3.6	1.6
5	9	11	118.8	242.9	3.0	1.6
6	9	13	116.5	224.6	1.9	1.5
7	9	15	118.6	224.4	0.9	1.3
8	12.3	5	116.4	215.3	2.5	1.5
9	12.3	7	118.1	191.7	2.6	1.5
10	12.3	9	117.2	248.5	2.5	1.5
11	19	2	ND	225.3	0.9	1.2
12	19	4	103.8	204.1	3.8	1.7
13	19	6	116.7	196.8	3.9	1.5
14 <sup>b</sup>	9	5	ND	208.2	0.9	2.2
15 <sup>b</sup>	9	7	132.7	212.8	0.9	1.7
16 <sup>b</sup>	9	9	136.0	239.6	0.8	1.4
17 <sup>b</sup>	9	11	152.1	212.1	1.2	1.8

<sup>a</sup> Experiment without BHB addition. <sup>b</sup> Blank experiments without biocatalyst

increased reaction times. In addition, depolymerization was also observed, which might be attributed to reverse hydrolysis reactions.

Regarding the DB of samples (Fig. 2b), the highest value was found for the lowest LLA to BHB molar ratio (9:1). Therefore, the increase in BHB feed would increase the hyperbranching but decrease in recovered polymer (Table 1). BHB incorporation occurred at a low extent in blank reactions in IL media having similar DB to those in bulk with CALB, but in shortened reaction times. This could be also attributed to cationic polymerization; nevertheless, this demonstrates the highly deactivating conditions for lipase of the bulk system. It is remarkable that the maximum DB attained in IL media (ca. 0.22) was higher than that in the aforementioned work using BHB core and lactones in liquid 1,1,1,2-tetrafluoroethane media [12], which is assumed due to the increasing solubility of BHB in IL, and similar to the hyperbranched PCL synthesized by CALB and reported by Skaria et al. [11] in toluene/dioxane mixture media.

There are no reports thereof on enzyme-mediated synthesis of hyperbranched PLLA; however, Gottschalk et al. [16] described the copolymerization of LLA and BHB using  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  catalyst to attain above 7 % of incorporation of BHB (maximum DB = 0.21). More recently, LLA was co-polymerized with the cyclic inimer-promoter 5-hydroxymethyl-1,4-dioxane-2-on (5HDON) using  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  and 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene as catalysts in bulk and in dichloromethane media. Therein, ca. 50 % of inimer



**Fig. 2** Variation of poly(LLA-co-BHB) yields versus reaction time (a) monomer molar relation LLA:BHB = 9 in IL (filled circles); LLA:BHB = 12.3 in IL (filled squares); LLA:BHB = 19 in IL (filled diamonds); LLA:BHB = 9 without biocatalyst in IL (times); LLA:BHB = 9 in bulk (open circles); LLA:BHB = 12.3 in bulk (open squares); LLA:BHB = 19 in Bulk (open diamonds); and variation of DB vs reaction time (b), LLA:BHB = 9 in IL (filled circles); LLA:BHB = 12.3 in IL (filled squares); LLA:BHB = 19 in IL (filled diamonds); LLA:BHB = 9 without biocatalyst in IL (times); LLA:BHB = 9 in bulk (open circles); LLA:BHB = 12.3 in bulk (open squares); LLA:BHB = 19 in Bulk (open diamonds)

turned into dendritic units with DB variations (0.02–0.22) upon reaction conditions and an  $M_n$  range between 1,200 and 34,000  $\text{gmol}^{-1}$  [17]. Accordingly, our enzyme catalyzed processes reached similar DB of hyperbranched PLLA than those by chemical means in other systems. MALDI-TOF mass spectrometry data corroborated the molecular structure of the hyperbranched polyesters (see supplementary data for an example of MALDI-TOF spectrum) with signals observed at regular intervals of  $72 \text{ m}z^{-1}$  corresponding to the molecular weight of the lactyl unit. The difference between adjacent peaks of  $58 \text{ m}z^{-1}$  was assigned to the exchange of a lactyl unit with that from BHB, which confirms a random incorporation of each unit in the copolymers. The observed minor series of

**Table 2** Data on eROP of LLA with BHB in bulk

Entry	LLA:BHB (mol:mol)	Time (days)	$M_n^a \times 10^{-3}$ ( $\text{gmol}^{-1}$ )	PDI <sup>a</sup>
1	9	11	2.9	1.2
2	9	15	2.7	1.2
3	9	17	2.4	1.3
4	12.3	9	2.4	1.3
5	12.3	11	1.5	1.6
6	12.3	13	2.0	1.4
7	19	8	2.0	1.5
8	19	9	1.8	1.7
9	19	11	1.0	1.6
10	19	13	1.5	1.7

<sup>a</sup> Determined by SEC calibrated with polystyrene standards

signals with the loss of 10 units ( $\text{H}_2\text{O}$ ) from the major peaks might indicate that macromolecular cyclization also occurred to a certain extent [11, 12].

### Concluding remarks

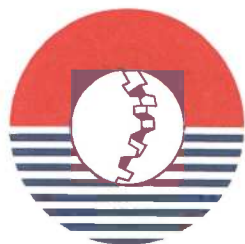
The novel lipase-mediated synthesis of hyperbranched PLLA is successfully reported in  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]$  media, which is a greener procedure compared to earlier reported hyperbranched PLLA routes. The sustained immobilized CALB activities in this green solvent along with the high solubility of the substrates and products are prompted as crucial factors for the successful synthesis. Research on the use of this and other ILs to exploit alternative polymerization routes has great potential toward novel polyester structures mediated by lipases.

**Acknowledgments** We would like to thank PAPIIT IN211412 and CONACyT for the scholarship (MM) and financial support (funding projects 117503 and 165757).

### References

1. Nampoothiri KM, Nair NR, John RP (2010) An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresour Technol* 101:8493–8501
2. Dechy-Cabaret O, Martin-Vaca B, Bourissou D (2004) Controlled ring-opening polymerization of lactide and glycolide. *Chem Rev* 104:6147–6176
3. An YH, Woolf SK, Friedman RJ (2000) Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. *Biomaterials* 21:2635–2652
4. Albertsson AC, Srivastava RK (2008) Recent developments in enzyme-catalyzed ring-opening polymerization. *Adv Drug Deliv Rev* 60:1077–1093

5. Jerome C, Lecomte P (2008) Recent advances in the synthesis of aliphatic polyesters by ring-opening polymerization. *Adv Drug Deliv Rev* 60:1056–1076
6. García-Arrazola R, López-Guerrero D, Gimeno M, Bárzana E (2009) Lipase-catalyzed synthesis of poly-L-lactide using supercritical carbon dioxide. *J Supercr Fluids* 51:197–201
7. Matsumura S, Mabuchi K, Toshima K (1997) Lipase-catalyzed polymerization of lactide. *Macromol Rapid Comm* 18:477–482
8. Fujioka M, Hosoda N, Nishiyama S, Noguchi H, Shoji A, Kumar DS, Katsuraya K, Ishii S, Yoshida Y (2006) One-pot enzymatic synthesis of poly(L, L)-lactide by immobilized lipase catalyst. *Seni Gakkaishi* 62:63–65
9. Huijser S, Staal BBP, Huang J, Duchateau R, Koning CE (2006) Topology characterization by MALDIToF-MS of enzymatically synthesized poly(lactide-co-glycolide). *Biomacromolecules* 7: 2465–2469
10. Newkome GR, Moorefield CN, Vögtle F (eds) (2001) *Dendrimers, dendrons: concepts, syntheses, applications*, 2nd edn. Wiley-VCH, Weinheim
11. Skaria S, Smet M, Frey H (2002) Enzyme-catalyzed synthesis of hyperbranched aliphatic polyesters. *Macromol Rapid Comm* 23: 292–296
12. Lopez-Luna A, Gallegos JL, Gimeno M, Vivaldo-Lima E, Bárzana E (2010) Lipase-catalyzed syntheses of linear and hyperbranched polyesters using compressed fluids as solvent media. *J Molec Cat B Enzym* 67:143–149
13. Yoshizawa-Fujita M, Saito Ch, Takeoka Y, Rikukawa M (2008) Lipase catalyzed polymerization of L-lactide in ionic liquids. *Polym Adv Technol* 19:1396–1400
14. Chanfreau S, Mena M, Porras-Domínguez J, Ramírez-Gilly M, Gimeno M, Roquero P, Tecante A, Bárzana E (2010) Enzymatic synthesis of poly-L-lactide and poly-L-lactide-co-glycolide in an ionic liquid. *Bioprocess Biosyst Eng* 33:629–638
15. Mena M, Chanfreau S, Gimeno M, Bárzana E (2010) Enzymatic synthesis of poly-L-lactide-co-glycolide in the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate. *Bioprocess Biosyst Eng* 33:1095–1101
16. Gottschalk C, Frey H (2006) Hyperbranched polylactide copolymers. *Macromolecules* 39:1719–1723
17. Wolf FK, Frey H (2009) Inimer-promoted synthesis of branched and hyperbranched polylactide copolymers. *Macromolecules* 42:9443–9456



# biocat2014 HAMBURG

## *Confirmation of participation*

We herewith confirm that

**María Mena**

participated in the

**7th International Congress on Biocatalysis  
August 31 – September 04, 2014  
Hamburg, Germany**

and presented the following poster:

**“Lipase-catalyzed synthesis of hyperbranched poly-L-lactide in [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]”**  
”

On behalf of  
TuTech Innovation GmbH  
Congress Office

*i. A. J. Peters*

Hamburg, September 4, 2014

**TuTech Innovation GmbH**  
Harburger Schloßstraße 6-12  
21079 Hamburg · Germany  
Tel. +49 4076629-0 · Fax -6119  
[www.tutech.de](http://www.tutech.de)