

**SÍNTESIS DE POLÍMEROS DE XILITOL Y ÁCIDO SUCCÍNICO POR CONDENSACIÓN  
ENZIMÁTICA CON NOVOZYM® 435**

**JUAN DAVID VILLAVICENCIO ROMERO**



**UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**POPAYÁN**

**2018**

**SÍNTESIS DE POLÍMEROS DE XILITOL Y ÁCIDO SUCCÍNICO POR CONDENSACIÓN  
ENZIMÁTICA CON NOVOZYM® 435**

**JUAN DAVID VILLAVICENCIO ROMERO**

**Trabajo de grado en la modalidad de Investigación presentado como requisito  
parcial para optar al título de químico.**

**Director:**

**JAIME MARTIN FRANCO Ph.D**

**Grupo de investigación Química de Productos Naturales**

**Universidad del Cauca**

**Asesor:**

**RICARDO BENITEZ BENITEZ Ph.D**

**Grupo de Investigación Química de Productos Naturales**

**Universidad del Cauca**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**POPAYÁN**

**2018**

## **DEDICATORIA**

A mi hijo Matías, que con su curiosidad me recuerda por qué hacemos ciencia.

A mis padres, a quienes debo todo, por su amor y paciencia.

## AGRADECIMIENTOS

A las personas que fueron partícipes en mi proceso de formación, profesores y compañeros, gracias por el ambiente académico y por compartir conocimiento y experiencias.

Agradezco a la Universidad del Cauca por proporcionarme las herramientas y espacios necesarios para llevar a cabo esta investigación de la mejor forma posible, de forma similar a la Universidad del Valle y Universidad ICESI, por la colaboración interinstitucional, algunos de los resultados más importantes en este documento se obtuvieron en sus laboratorios de instrumental químico.

A la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología (Banco de la República de Colombia) por su apoyo financiero a través del proyecto 3708 (ID 4202).

A Novozymes Brasil y EXFOR SA por la donación de la enzima Novozym® 435 y el producto Aqua Clean® ACF-SC respectivamente.

A mis profesores Ricardo Benítez y Jaime Martin, por confiar en mí para la ejecución de este proyecto.

A mi familia en general, y para que no se me escape nadie, por el apoyo incondicional durante toda mi formación.

A Natalia, por cuidar de quien más quiero.

A Luis Enríquez, por ser un gran compañero de laboratorio, por las amanecidas estudiando y por las tertulias, algunas de las cuales produjeron grandes ideas para esta investigación.

A Juliana, por supuesto.

A la cafeína, la luna y a Joaquin por la compañía en la escritura de este documento.

## CONTENIDO

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA</b>	<b>5</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>6</b>
<b>2.1 MATERIALES POLIMÉRICOS</b>	<b>6</b>
2.1.1 Síntesis de polímeros.	8
2.1.2 Polímeros biodegradables.	9
<b>2.2 TÉCNICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE POLÍMEROS</b>	<b>11</b>
2.2.1 Espectroscopía Infrarroja (IR).	11
2.2.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).	11
2.2.3 Cromatografía de permeación en gel (GPC).	12
2.2.4 Técnicas térmicas: Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y Análisis termogravimétrico (TGA).	12
<b>2.3 ENZIMAS</b>	<b>13</b>
2.3.1 Lipasas.	14

2.3.2 Enzimas inmovilizadas.	15
2.3.3 Síntesis de polímeros catalizada por lipasas.	15
<b>2.4 PROPIEDADES GENERALES DE LOS SUSTRATOS</b>	<b>16</b>
2.4.1 Xilitol.	16
2.4.2 Ácido Succínico.	17
<b>3. ESTADO DEL ARTE</b>	<b>18</b>
3.1 POLIMERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE ÁCIDO SUCCÍNICO	18
3.2 POLIMERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE XILITOL	19
3.3 AVANCES DENTRO DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN	20
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
4.1 GENERAL	22
4.2 ESPECÍFICOS	22
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>23</b>
5.1 MATERIALES	23
5.2 SÍNTESIS DE LOS POLÍMEROS DE XILITOL Y ÁCIDO SUCCÍNICO (pXS's)	23
5.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS pXS's	25
5.3.1 Análisis de apariencia y solubilidad de los pXS's.	26
5.3.2 Caracterización de los pXS's mediante espectroscopía IR-ATR.	26
5.3.3 Análisis térmicos.	26
5.3.3.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).	26

5.3.3.2	Análisis termogravimétrico (TGA).	26
5.3.4	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).	26
5.3.5	Análisis de peso molecular por cromatografía de permeación en gel (GPC).	27
5.3.6	Ensayos de biodegradabilidad.	27
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>29</b>
6.1	ANÁLISIS DE APARIENCIA Y SOLUBILIDAD DE LOS pXS's	29
6.2	CARACTERIZACIÓN DE LOS pXS's MEDIANTE ESPECTROSCOPIA IR-ATR	31
6.3	ANÁLISIS TÉRMICOS	35
6.3.1	Calorimetría diferencial de barrido (DSC).	34
6.3.2	Análisis Termogravimétrico (TGA).	37
6.4	ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	40
6.5	ANÁLISIS DE PESO MOLECULAR OBTENIDO POR GPC	42
6.6	RESULTADO DE LOS ENSAYOS DE BIODEGRADABILIDAD	43
6.7	PROPUESTA ESTRUCTURAL Y APLICACIONES POTENCIALES DE LOS pXS's	45
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>49</b>
<b>8.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>50</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>51</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>57</b>

## RESUMEN

Se realizó la síntesis de nuevos materiales poliméricos, mediante la reacción de esterificación de xilitol y ácido succínico con participación de la enzima Novozym-435, una lipasa comercial de *Candida antarctica* soportada sobre resina acrílica. Las reacciones se llevaron a cabo en un matraz de fondo redondo con agitación magnética, adaptado a un condensador recto y sobre trampa de arena.

Se aplicó un diseño experimental tipo Draper-Lin con 18 ensayos, utilizando las variables temperatura, relación molar ácido succínico:xilitol, relación enzima:sustrato y tiempo de reacción; la variable respuesta fue el peso molecular. Los datos fueron procesados con el Software STATGRAPHICS Centurion XVI y los productos obtenidos se caracterizaron mediante Espectroscopía IR, Análisis termogravimétrico (TGA), Calorimetría diferencial de barrido (DSC), Espectroscopía RMN y a tres de los productos obtenidos se les realizó una prueba de inmersión en suelo natural con el fin testear su biodegradabilidad.

Los materiales de partida utilizados en esta investigación son obtenidos comúnmente de residuos agroindustriales y de otras fuentes renovables, de baja demanda en la región. En tal consideración, surge el propósito central de esta investigación, brindar valor agregado a las materias primas que contienen los sustratos mencionados, mediante el uso de ellos en la fabricación de nuevos materiales poliméricos potencialmente biodegradables, a través de nuevas rutas sintéticas.

Se obtuvieron 2 tipos de productos, por una parte, un material sólido entrecruzado similar a una resina, insoluble en agua, termoestable y que presenta biodegradación en condiciones específicas; y por la otra, un material viscoso, termoestable, soluble en agua y de estructura lineal con grupos hidroxilos en la cadena polimérica.

**Palabras clave:** polimerización enzimática, xilitol, ácido succínico, Novozym® 435, polímeros biodegradables, caracterización de polímeros.

## ABSTRACT

The synthesis of novel polymeric materials through Novozym® 435 (a commercial lipase from *Candida antarctica* supported on acrylic resin) catalyzed esterification between xylitol and succinic acid was developed. Biochemical reactions were carried on a round bottom flask with magnetic bar, adapted Liebig type condenser and sand bath.

Response surface methodology was employed, a Draper-Lin desing with 18 experiments was selected, temperature, succinic acid:xylitol ratio, enzyme:substrate ratio and reaction time were employed as process variables and molecular weight as the response variable; data were analyzed with STATGRAPHICS Centurion XVI. The obtained products were individually characterized by Infrared spectroscopy (IR), Thermogravimetric analysis (TGA), Differential scanning calorimetry (DSC); 3 samples were used in a degradation test in natural soil.

Starting materials employed in this investigation are commonly obtained from agroindustrial waste and other renewable sources, low demanded in our region. In this way, the main objective of this work was provide added value to raw materials used in xylitol and succinic acid production by giving them an extra use in polymeric material development through novel synthetic routes.

Two kinds of product were obtained, on one hand, a solid resin-like crosslinked material, non-water soluble, thermoset and that presents biodegradation under specific conditions; on the other hand, a viscous liquid, thermoset, water soluble and with linear structure containing hydroxyl groups attached in polymer backbone.

**Keywords:** enzymatic polymerization, xylitol, succinic acid, Novozym® 435, biodegradable polymers, polymer characterization.

## INTRODUCCIÓN.

Los polímeros sintéticos surgen por primera vez a mediados del siglo XIX, inicialmente se producían por transformación de polímeros de origen natural, muestra de esto es la vulcanización del caucho de Charles Goodyear en 1839 (Europäische Kommission, 1998). El primer polímero netamente sintético fue la baquelita, obtenida en 1907 por condensación de fenol y formaldehído (Baekeland, 1909). En adelante, la investigación en polímeros basados en compuestos químicos derivados de combustibles fósiles se desarrolló “lentamente”; sin embargo, durante la segunda guerra mundial la escasez de materias primas obligó a las potencias a emplear nuevos materiales poliméricos los cuales reemplazaron rápidamente a los ya existentes, por ofrecer una mayor variedad de aplicaciones (Smith, 1988); no obstante, la utilización masiva de estas sustancias en aplicaciones de corto uso, muy por debajo del tiempo de vida, ha provocado la acumulación de enormes cantidades de polímeros, convirtiéndose en agentes contaminantes (Steinbüchel, 1995).

La comunidad científica en la búsqueda de soluciones ha desarrollado nuevos materiales poliméricos, en la mayoría de los casos sintetizados a partir de monómeros de origen natural, con características de biodegradabilidad (Kobayashi, 2015).

A finales del siglo pasado surgió la síntesis enzimática como un nuevo método de síntesis de polímeros con ventajas como la eficiencia catalítica, alta enantio, quimio y regioselectividad, versatilidad en las condiciones de reacción y menor impacto ambiental frente a métodos convencionales. El boom de la química verde ha sido el motor de investigaciones que han desarrollado metodologías más limpias, culminando con la aparición de los nuevos materiales poliméricos con características biodegradables (Kobayashi, 2017).

En el grupo de Química de Productos Naturales de la Universidad del Cauca se ha incursionado en la síntesis de polímeros con potencial biodegradable, mediante el desarrollo del proyecto *Síntesis de polímeros a base de Xilitol y Ácido succínico*, obteniendo polímeros de bajo peso molecular por la policondensación química de los 2 reactivos en atmósfera inerte utilizando tolueno como solvente (Liz-Andela, Benitez, Martin-Franco, & Rojas, 2017). Este trabajo ha dado continuidad a la investigación en el área, utilizando la catálisis enzimática con Novozym® 435, una lipasa comercial reportada en un gran número

de publicaciones, en la producción de nuevos polímeros con propiedades características, mediante una síntesis ambientalmente más amigable, por la disminución del tiempo de reacción, menor temperatura y la utilización de limoneno, un solvente verde, de cuya implementación no existen reportes hasta la fecha, en reacciones de polimerización enzimática.

Los resultados de este proyecto son una contribución a la investigación en síntesis de productos poliméricos potencialmente biodegradables, derivados de materias primas poco explotadas en la región.

## 1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El D-Xilitol es un polialcohol ampliamente usado como edulcorante debido a que posee el mismo dulzor de la sacarosa, este material tiene gran importancia económica ya que su precio oscila entre 3000-4000 USD/ton, y social puesto que su producción y uso genera empleos en industrias como la química, farmacéutica y odontológica. Industrialmente se obtiene a partir de la reducción de la D-Xilosa, la cual a su vez es el principal componente del hidrolizado de bagazo de caña (Solenzal, Ríos, Bueno, Santana, & Martínez, 2005).

La industria azucarera del norte del Cauca tiene la mayor producción de azúcar por hectárea en el mundo y el bagazo de caña es uno de los subproductos disponibles para aprovechamiento de más fácil acceso en nuestra región, que lamentablemente, en la actualidad es subexplotado; según datos de asocaña (Carvajal, 2007) el 15% de este subproducto se emplea en la fabricación de papel mientras que el porcentaje restante se emplea en la alimentación de calderas aun cuando su contenido de humedad no lo hace ideal para este uso (Rueda *et al.*, 2016). Por otra parte, el Xilitol puede obtenerse también de hojas y cogollos de la caña de azúcar cuyo contenido de D-Xilosa es hasta un 25,2% en peso seco (de Freitas Branco, dos Santos, & da Silva, 2011).

Con conocimiento de la situación planteada anteriormente y teniendo en cuenta la problemática mundial de contaminación por polímeros sintetizados a partir de combustibles fósiles y la tendencia en las últimas décadas de generar nuevos materiales derivados de productos agrícolas renovables que suplan exitosamente la función de los polímeros derivados del petróleo, el grupo de investigación Química de Productos Naturales (QPN) de la Universidad del Cauca ha propuesto desde tiempo atrás investigaciones sobre la preparación de nuevos materiales poliméricos a partir de xilitol y ácido succínico.

Este trabajo pretende dar valor agregado al bagazo de caña, transformándolo de desecho industrial a materia prima para la síntesis de polímeros por vía enzimática. Con el propósito de obtener resultados promisorios y contribuir a la solución de la problemática ambiental es importante contar con la caracterización de los materiales obtenidos en términos estructurales y de biodegradabilidad.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 MATERIALES POLIMÉRICOS

Los polímeros son el tipo de molécula más abundante en el planeta, algunos de ellos como el almidón o la celulosa son producidos naturalmente en billones de toneladas al año (Delmer, 1999). Son macromoléculas formadas por la repetición sucesiva de unidades comúnmente llamadas monómeros. En la actualidad se producen y comercializan polímeros con diferentes utilidades en las industrias de empaques, en alimentos, biomedicina y en materiales estructurales. La enorme versatilidad de los polímeros los ha llevado a ser objeto de estudio creciente en el último siglo (Agarwal, 2012).

Los polímeros se pueden clasificar en grupos por el comportamiento, estructura química u origen. Según el origen existen polímeros naturales o sintéticos. Los polímeros naturales se producen en organismos vivos a nivel celular y los sintéticos se preparan mediante reacciones químicas en el laboratorio a partir de diversos materiales que comúnmente incluyen derivados del petróleo o una combinación de la biosíntesis y la síntesis química (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación de polímeros según su origen.

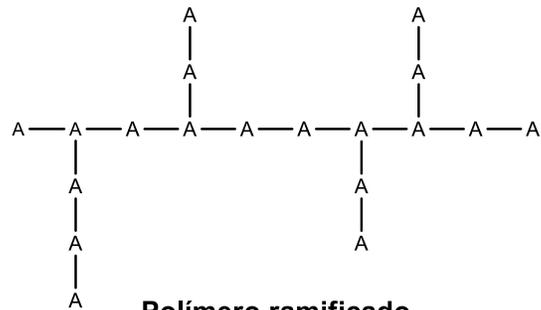
Origen	Ejemplo
• Natural (Biosíntesis in vivo).	• Proteínas, polisacáridos, polihidroxicanoatos.
• Semi-biosintético: Precursores generados biológicamente, son polimerizados <i>in vitro</i> por <i>vía</i> química o enzimática.	• Polilactidas, poliácridamidas, ácido poliláctico, poliésteres.
• Semi-sintéticos: Naturales con modificación química	• Almidones modificados, caucho vulcanizado, nitrocelulosa.
• Sintéticos	• Polietileno, poliuretano, baquelita.

**Fuente:** Use of Biosynthetic, Biodegradable Thermoplastics and Elastomers from Renewable Resources: The Pros and Cons (Steinbüchel, 1995).

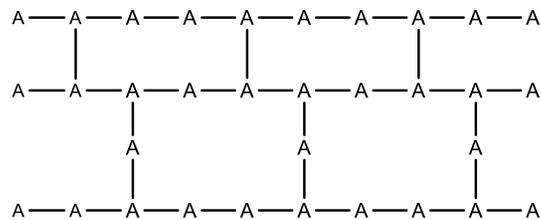
Cuando se analiza la estructura química de la cadena en un material polimérico se observan tres tipos principales de estructuras (ver Figura 1): en los polímeros lineales los monómeros se unen mediante enlaces covalentes a lo largo de una cadena, a medida que la cadena se vuelve más larga disminuye la capacidad de rotación en los enlaces de los monómeros y consecuencia de esto se forma una estructura semirrígida, como ocurre con el policloruro de vinilo (PVC) y el ácido poliláctico (PLA); en los polímeros ramificados los monómeros se pueden enlazar covalentemente por más de un sitio en la molécula (grupo funcional), lo cual ocasiona que además de formarse una cadena principal, cada cierto número de monómeros se formen cadenas laterales, variadas en cuanto al número de monómeros, como ocurre en el almidón. Cuando las cadenas de un polímero se enlazan covalentemente, se forman redes de dos y tres dimensiones, este tipo de estructuras poliméricas se conocen como entrecruzadas. Uno de los polímeros entrecruzados más utilizado es el caucho vulcanizado (Steinbüchel, 1995).



**Polímero lineal**



**Polímero ramificado**



**Polímero entrecruzado**

**Figura 1.** Tipos de polímeros según la estructura de la cadena.

La estructura en un polímero se relaciona directamente con las propiedades físicas y químicas y uno de los aspectos más importantes para la industria de polímeros es la capacidad de reuso, la cual depende del comportamiento térmico de los polímeros. Pueden ser termoplásticos, cuando al ser sometidos a calor fluyen y se pueden remodelar o termoestables cuando al ser sometidos a calor no funden, sino que se resquebrajan o descomponen; esta clasificación está supeditada a la estructura de la cadena (Tabla 2).

**Tabla 2.** Clasificación de polímeros por su comportamiento térmico.

	<b>Termoplásticos</b>	<b>Termoestables</b>
<b>Estructura</b>	Lineal, ramificada	Altamente entrecruzada
<b>Solubilidad</b>	Soluble o parcialmente soluble.	Insoluble
<b>Fusibilidad</b>	Se puede fundir	No se puede fundir

**Fuente:** Polymer process engineering, Springer Netherlands, Pág 6 (Griskey, 1995).

### 2.1.1 Síntesis de polímeros

En cuanto su forma de obtención, en términos generales los polímeros se dividen en dos tipos, los que se obtienen por adición y los que se obtienen por condensación, cada uno con características diferentes (Tabla 3), los primeros se obtienen por reacción de un único monómero en reacciones sucesivas en donde todos los átomos de la molécula inicial pasan a formar parte del polímero lo cual produce una eficiencia atómica del 100% (Esquema 1a), estas reacciones se desarrollan en tres pasos, iniciación, propagación y finalización.

En cuanto a las reacciones de condensación, la gran mayoría involucra dos monómeros con funcionalidades reactivas entre sí ó monómeros con doble funcionalidad, como el ácido láctico el cual presenta un grupo funcional ácido y un grupo funcional hidroxilo en la misma molécula; estos grupos reaccionan entre sí para formar el polímero. En etapas tempranas de estas reacciones cada unión produce una molécula pequeña como subproducto, ensanchándose molecularmente a medida que el polímero va creciendo (Esquema 1b) (Griskey, 1995). En reacciones con materiales de partida de esta naturaleza se utilizan condiciones de dilución apropiadas para evitar la competencia de la reacción intramolecular.

En este documento se hace énfasis en los polímeros sintetizados por condensación, en consideración a la reacción objeto de estudio entre el xilitol y el ácido succínico, la cual es de este tipo.

**Tabla 3.** Características de los polímeros sintetizados por adición y condensación.

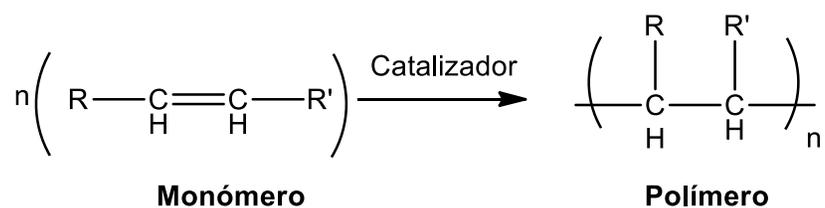
<b>Polímeros por adición.</b>	<b>Polímeros por condensación.</b>
1. Reacción en cadena	1. Diferentes moléculas condensándose
2. Aumenta el peso molecular, una unidad monomérica a la vez	2. Dos moléculas cualesquiera pueden condensarse
3. La cantidad de monómero va disminuyendo a medida que avanza la reacción.	3. Los monómeros desaparecen en etapas tempranas de la reacción
4. Polímeros de alto peso molecular	4. El grado de polimerización* aumenta a medida que avanza la reacción
5. Tiempos de reacción altos producen rendimientos altos	5. Tiempos de reacción altos producen grados de polimerización altos.
6. Las únicas moléculas presentes son el monómero y el polímero.	6. Diferentes tipos de moléculas presentes. (dímeros, oligómeros)
7. Sin subproducto	7. Moléculas pequeñas como subproducto.

\***Grado de polimerización:** hace referencia al número de unidades monoméricas incluidas en una macromolécula. **Fuente:** Polymer process engineering, Springer Netherlands, Pág 8 (Griskey, 1995).

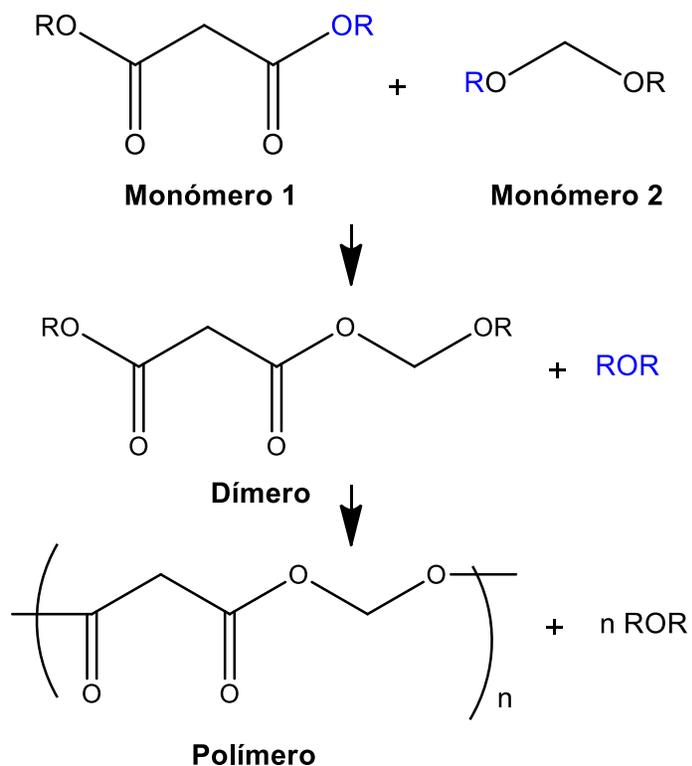
### 2.1.2 Polímeros biodegradables

El principal problema ocasionado por los polímeros de origen sintético se debe a su elevada persistencia en el medio ambiente, esto ocasiona su acumulación, la cual es potenciada por el destino de los polímeros en aplicaciones de corto uso, tales como bolsas desechables, empaques, etc.

La comunidad científica en la búsqueda de una solución a esta problemática, ha desarrollado un nuevo grupo de polímeros, usualmente provenientes de fuentes naturales renovables. La característica más importante que poseen estos compuestos es la biodegradabilidad, en virtud a ciertos enlaces en el polímero final, vulnerables a la actividad de las enzimas presentes en microorganismos, pudiendo ser transformados por ellos hasta moléculas pequeñas aprovechables (Richard A. Gross & Bhanu Kalra, 2002).



a.) Reacción general de polimerización por adición.



b.) Reacción general de polimerización por condensación.

**Esquema 1.** Reacciones químicas generales para polímeros sintetizados por adición y condensación.

Los polímeros biocompatibles son otro tipo de polímeros, la biocompatibilidad consiste en que estos materiales tienen la capacidad de mantenerse en sistemas biológicos y que suplementan o reemplazan una parte del cuerpo. Usualmente la biocompatibilidad y la biodegradabilidad son propiedades simultáneas de una misma sustancia y en virtud a esto ha aumentado la importancia comercial de los polímeros biodegradables, encontrando que

las áreas con más demanda son la ingeniería de tejidos y la ortopedia; otras aplicaciones actuales se encuentran en el campo de los empaques, cosméticos, suturas médicas, prótesis dentales, alimentos y bebidas (Balaji, Pakalapati, Khalid, Walvekar, & Siddiqui, 2018).

## **2.2 TÉCNICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE POLÍMEROS**

En esta sección se describen brevemente los métodos empleados en la caracterización de los polímeros que han sido utilizadas en esta investigación.

### **2.2.1 Espectroscopía Infrarroja (IR)**

La espectroscopía infrarroja es una técnica muy útil para la identificación de los grupos funcionales que están presentes en una sustancia con características dipolares específicas. La vibración de un enlace covalente, al ser irradiado por la luz infrarroja, produce una señal característica a cierto número de onda, en este trabajo en particular se analizaron las señales más importantes, estas se especifican a continuación: vibraciones correspondientes al grupo carbonilo (C=O) presente en el monómero ácido succínico y que se espera quede incluido en el poliéster final, el enlace O-H del grupo hidroxilo presente en el xilitol y cuya intensidad es inversamente proporcional al grado de entrecruzamiento en el polímero y la vibración C-O-C ausente en los monómeros y cuya aparición es evidencia de la reacción de policondensación.

### **2.2.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)**

La resonancia magnética nuclear es una espectroscopia de absorción que se fundamenta en la absorción de energía (en forma de radiofrecuencia) por parte de un núcleo magnéticamente activo, el cual está orientado en el interior de un campo magnético, y que por efecto de esa energía cambia su orientación. Para que un átomo sea visible en esta

técnica su núcleo debe poseer un número atómico impar o un número atómico par y masa impar entre los más comunes se tienen  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  y  $^{31}\text{P}$ .

Los espectros de RMN son gráficos de la intensidad de absorción frente a la frecuencia de resonancia (que se expresa en ppm) y presentan señales cuya posición, forma y tamaño dependen del ambiente químico del núcleo en cuestión. El análisis detallado de estos espectros puede dar como resultado la elucidación estructural de un compuesto químico.

En polímeros, es común que se utilice esta técnica para elucidar la proporción real entre los monómeros que conforman el material.

### **2.2.3 Cromatografía de permeación en gel (GPC)**

La cromatografía de permeación en gel es un tipo de separación mediante exclusión por tamaño (SEC) que se emplea comúnmente en la caracterización de polímeros; se utiliza como fase estacionaria un gel poroso, mientras que la fase móvil debe ser un solvente en el cuál el polímero sea completamente soluble. A medida que la muestra pasa por la columna de separación las moléculas grandes son prácticamente excluidas de los poros de la fase estacionaria mientras que las moléculas pequeñas pueden acceder a la mayoría de caminos dentro de la fase estacionaria, entre más pequeña sea la molécula mayor tiempo le tomará atravesar la columna. Entre los detectores más comunes están absorción UV, índice de refracción, absorción IR y detectores de densidad.

El cromatograma resultante muestra la distribución de tamaños en una muestra de polímero, lo cual a su vez es la distribución de los pesos moleculares, de esta forma se obtiene información valiosa como el peso molecular promedio en número ( $M_n$ ) y el peso molecular promedio en peso ( $M_w$ ), cuya relación ( $M_w/M_n$ ) proporciona el valor de polidispersidad (PD) en el polímero.

### **2.2.4 Técnicas térmicas: Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y Análisis termogravimétrico (TGA)**

La calorimetría diferencial de barrido permite estudiar los cambios de entalpía producidos por procesos tales como la capacidad calorífica, el punto de fusión, ebullición y

cristalización. En el caso de materiales poliméricos permite determinar la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), la temperatura de cristalización ( $T_c$ ) y la temperatura de fusión ( $T_m$ ). La técnica se basa en la medición del flujo de calor de la muestra a medida que la temperatura se aumenta linealmente.

En cuanto al análisis termogravimétrico este permite analizar las pérdidas porcentuales de peso en una muestra a medida que se aumenta la temperatura, procesos como la absorción, desorción, sublimación o descomposición implican pérdidas de masa y son observables mediante esta técnica.

En términos generales los análisis térmicos permiten estudiar el comportamiento del material polimérico en un rango de temperaturas, dependiendo de los resultados obtenidos un material puede o no, ser empleado en cierta aplicación específica.

## **2.3 ENZIMAS**

Una enzima es una sustancia de elevado peso molecular que cumple la función de catalizador en prácticamente todos los procesos metabólicos ocurridos en el interior de una célula (Shoda, Uyama, Kadokawa, Kimura, & Kobayashi, 2016).

Las enzimas poseen la capacidad de acelerar reacciones bajo condiciones suaves y tienen características de versatilidad y especificidad. A diferencia de los catalizadores químicos convencionales, producen un mayor aumento en la velocidad de reacción (Shoda et al., 2016).

Las enzimas se nombran añadiendo el sufijo *asa* al sustrato sobre el que trabajan, por ejemplo, celulasa, lactasa, etc.; el nombre también se asocia a la reacción que catalizan como la piruvato deshidrogenasa. La clasificación según la reacción que operan es la más empleada y con base en ella se han establecido 6 grupos de enzimas (Tabla 4). En la clasificación internacional se asigna un código de cuatro dígitos a cada enzima, según la reacción que cataliza (Liu, 2017).

**Tabla 4.** Grupos de enzimas según la reacción catalizada.

Nombre del grupo de enzimas	Reacción que catalizan
• <b>Oxidoreductasas</b>	• Transferencia de hidrógeno, oxígeno o electrones de un sustrato a otro.
• <b>Transferasas</b>	• Transferencia de un grupo funcional, excluyendo hidrógeno y oxígeno.
• <b>Hidrolasas</b>	• Hidrólisis de enlaces en éster, éter, glicosídicos, peptídicos, C-C, entre otros.
• <b>Liasas</b>	• Remoción no hidrolítica de grupos funcionales. (Usualmente produce un doble enlace).
• <b>Isomerasas</b>	• Convierte un isómero en otro (racemización, transferencia de grupos funcionales intramolecular, <i>cis/trans</i> ).
• <b>Ligasas</b>	• Formación de enlaces mediante utilización de ATP u otro nucleótido fosforilado.

**Fuente:** Capítulo 7- Enzymes, In Bioprocess Engineering (2° edición), Elsevier, 2017, Pág. 299-300 (Liu, 2017).

### 2.3.1 Lipasas

En la familia de las Hidrolasas, existe un grupo particular de enzimas encargadas de la hidrólisis de los triacilglicéridos. Se denominan Lipasas y son catalizadores biológicos que actúan en el interior de los organismos en el proceso de digestión de las grasas; a menudo rompen enlaces en posiciones específicas de un triglicérido como es el caso de la principal lipasa en humanos que hidroliza el triacilglicérido y produce un monoacilglicérido y dos ácidos grasos (Angajala, Pavan, & Subashini, 2016).

Dentro de las particularidades de las lipasas se encuentra su capacidad para catalizar tanto la reacción directa como la inversa (reacción reversible) y la posibilidad de trabajar tanto en medios acuosos como orgánicos. El avance en el proceso de producción y extracción de este tipo de enzimas ha originado una variedad de lipasas que además de las ventajas mencionadas anteriormente, pueden actuar a pH's muy ácidos o muy básicos y temperaturas elevadas, bajo condiciones inusuales (Salihi & Alam, 2015).

### **2.3.2 Enzimas inmovilizadas**

Los catalizadores químicos heterogéneos se recuperan con alguna facilidad y en ciertos casos se reactivan mediante un procedimiento de adecuación antes de ser reutilizados. La catálisis enzimática por su parte presenta esta desventaja comparativa, porque usualmente no se recupera la enzima para ser reutilizada; esto condujo a desarrollar variadas técnicas de inmovilización de las enzimas, permitiendo la recuperación y reutilización, con alto grado de efectividad (Liu, 2017).

Se conoce como inmovilización el proceso de fijar la enzima a un espacio limitado sobre un material denominado soporte, el resultado de la inmovilización es típicamente un catalizador macroscópico que cumple con las ventajas de la catálisis heterogénea y la efectividad del catalizador homogéneo. Las enzimas inmovilizadas usualmente son más estables, más resistentes a la acidez o basicidad y tienen mejor resistencia térmica que las enzimas en solución, debido a la influencia del soporte sobre la conformación de la enzima. Una debilidad es el impedimento estérico producido por el soporte, mayormente posible con ciertos sustratos de gran peso molecular, los cuales son incapaces de entrar en contacto con el sitio activo de una enzima inmovilizada (Liu, 2017).

### **2.3.3 Síntesis de polímeros catalizada por lipasas**

La síntesis enzimática de polímeros ofrece ventajas como la eficiencia catalítica, alta enantio-, quimio- y regioselectividad, versatilidad en cuanto a las condiciones de reacción (temperatura, medio de reacción). Adicionalmente, las enzimas provienen de fuentes renovables y su uso conlleva un impacto ambiental mínimo (Gross, Kumar, & Kalra, 2001). Las lipasas han sido ampliamente usadas en síntesis de materiales poliméricos, debido a las características particulares adquiridas del organismo que las produce. Así, un organismo termófilo, producirá lipasas termófilas (Salihu & Alam, 2015), también pueden conferirle resistencia a los solventes orgánicos.

La síntesis de polímeros *vía* catálisis enzimática ocurrió por primera vez por casualidad en 1983 mientras se investigaba la hidrólisis enzimática del aceite de castor, cuando se evidenció la aparición de dímeros y trímeros del ácido ricinoleico (Okumura, Iwai, &

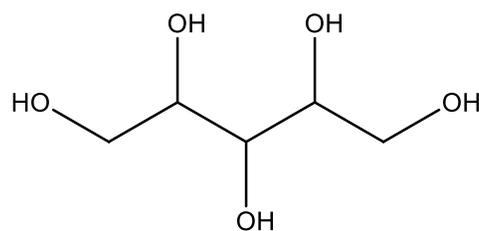
Tsujisaka, 1983). Cabe resaltar que solo hasta 1985 se reportó el primer polímero obtenido por *vía* enzimática (Ajima *et al.*, 1985). Desde esa época hasta la actualidad han tenido lugar numerosos avances en la síntesis enzimática de polímeros, mediante el uso de enzimas inmovilizadas. También se ha llevado a cabo la modificación genética de organismos, para producir enzimas específicas y se ha generado nuevo conocimiento en la utilización de metabolitos primarios como materias primas renovables.

La síntesis de polímeros catalizada por lipasas es bastante empleada en el desarrollo de nuevos materiales poliméricos debido a que son aptas en el contexto de la llamada Química Verde de Polímeros, que considera premisas como 1) Uso de materiales de partida renovables, 2) métodos de síntesis verdes y 3) biodegradabilidad de los productos de reacción (Kobayashi, 2017).

## 2.4 PROPIEDADES GENERALES DE LOS SUSTRATOS

### 2.4.1 Xilitol

El xilitol (1, 2, 3, 4, 5 - pentanopentaol) (ver Figura 2) es un polialcohol que puede ser producido mediante hidrólisis de xilano, el segundo polisacárido más abundante después de la celulosa, debido al alto contenido de xilosa en este polisacárido, a su vez, la xilosa, puede ser convertida en xilitol por medio de hidrogenación catalítica o bioconversión por microorganismos que presentan la enzima D-xilosa reductasa. El xilano está ampliamente disponible en materias primas renovables como la corteza de abedul, el bagazo de caña o la tusa del maíz (Hricovíniová, 2013).



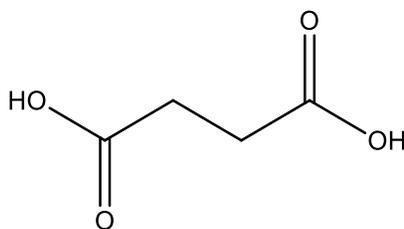
**Figura 2.** Estructura química del xilitol

Actualmente la aplicación más importante del xilitol es como edulcorante en la industria de alimentos debido a que su dulzor es igual al de la sacarosa y que además es apto para diabéticos y no es cariogénico (de Freitas Branco *et al.*, 2011).

En esta investigación se aprovechó la naturaleza química polifuncional del xilitol en la formación de estructuras poliméricas mediante policondensación lineal y/o entrecruzada.

### 2.4.2 Ácido Succínico

El ácido succínico (ver Figura 3) cuyo nombre IUPAC es ácido 1, 4 – butanodioico, es dicarboxílico. Su producción ocurre en los seres vivos, en las mitocondrias, en forma de anión succinato durante el ciclo de los ácidos tricarbónicos del cual es intermediario (Noordover *et al.*, 2006).



**Figura 3.** Estructura química del ácido succínico.

Históricamente, desde su obtención a partir del ámbar en el siglo XVI, el ácido succínico se ha usado en diferentes aplicaciones, en agricultura y las industrias de alimentos y farmacéutica. Actualmente, además de las aplicaciones mencionadas, se utiliza como material de partida en síntesis, en la producción de diversos reactivos químicos y como componente de detergentes, cosméticos y polímeros biodegradables. (Saxena, Saran, Isar, & Kaushik, 2017)

### 3. ESTADO DEL ARTE

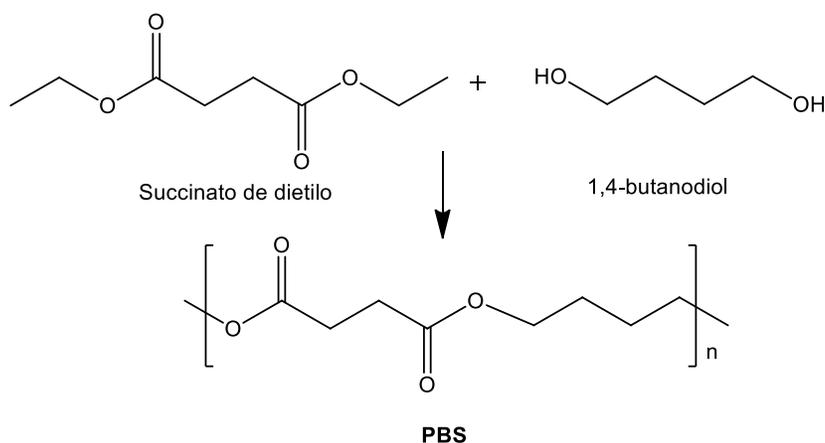
#### 3.1 POLIMERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE ÁCIDO SUCCÍNICO

El ácido succínico se ha empleado como sustrato en la fabricación de polibutilensuccinato (PBS), un material promisorio como polímero termoplástico biodegradable. Su síntesis se ha realizado libre de catalizadores metálicos y el material producido es biocompatible, apto para aplicaciones médicas, las cuales requieren un  $M_w > 20000$ . La síntesis enzimática con Novozym® 435 (N435) ha producido material con estas características a partir de succinato de dietilo y 1, 4 - butanodiol en difenil éter (Esquema 2); las condiciones de reacción se presentan en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Condiciones de síntesis de PBS catalizada por Novozym® 435

succinato de dietilo	1,4-butanodiol	Carga enzimática	Condiciones de reacción	$M_w$	$M_w/M_n$
22.96 mmol	22.96 mmol	10% del peso de monómeros	1. 80°C, 2 h, a P. atmosférica 2. 80°C, 5-24 h a P. reducida 3. 95°C, 20-30 h a P. reducida	>35000	1.39

**Fuente:** *Candida antarctica* Lipase B-catalyzed synthesis of poly(butylene succinate): Shorter chain building blocks also work (Azim, Dekhterman, Jiang, & Gross, 2006).



**Esquema 2.** Producción del PBS.

Esta síntesis es la primera de su tipo; posterior a ella, ha habido numerosas investigaciones que utilizan el PBS y otros polímeros para fabricar nuevos copolímeros con mejores propiedades físicas, algunas, se reportan en la Tabla 6.

Además del PBS se han estudiado ampliamente otros materiales análogos, el polietilensuccinato (PES) y polipropilensuccinato (PPS), obtenidos mediante síntesis enzimática (Debuissy, Pollet, & Avérous, 2017).

**Tabla 6.** Condiciones de copolimerización del PBS *vía* enzimática.

Copolímero(s)	Enzima/Carga (% peso de monómeros)	Solvente	Condiciones de reacción	M <sub>w</sub>	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>
• poli( $\omega$ -pentadecalactona) [1]	N435/ 10%	difenil éter	• 1. 95°C por 20 h, P= 600 mm Hg • 2. 95°C por 51 h, P= 2 mm Hg	>85000	2.3-3.8
• poli[(R)-3-hidroxitirato] [2]	N435/ 10%	• difenil éter • dibencil éter • anisol	90°C por 72 h, P= 15 mm Hg	Hasta 38400	2.2
• Poli( $\epsilon$ -caprolactona) [3]	N435/ 50%	sin solvente	130°C por 24 h atmósfera de N <sub>2</sub>	13500	2.1
• Pripol 2033 (9,10-dinoniloctadecan-1,18-diol) [4]	N435/ 10%	difenil éter	• 1. 95°C por 18 h, P= 600 mm Hg • 2. 95°C por 84 h, P= 2 mm Hg	>34000	2.7
• poli( $p$ -dioxanona) [5]	N435/ 5%	difenil éter	• 1. 70°C por 24 h, atmósfera de Ar • 2. 70°C por 48 h, P= 1 mm Hg	Hasta 33200	1.3

**Fuente:** [1] Enzymatic Synthesis and Structural and Thermal Properties of Poly( $\omega$ -pentadecalactone-co-butylene-co-succinate) (Mazzocchetti, Scandola, & Jiang, 2009), [2] Enzymatic Synthesis of a Bio-Based Copolyester from Poly(butylene succinate) and Poly(( R)-3-hydroxybutyrate) (Debuissy, Pollet, & Avérous, 2016), [3] Poly(butylene succinate- ran - $\epsilon$ -caprolactone) copolyesters (Ciulik et al., 2017), [4] Enzymatic synthesis of an electrospinnable poly(butylene succinate-co-dilinoleic succinate) thermoplastic elastomer (Sonseca & El Fray, 2017), [5] One-step enzymatic synthesis of poly( $p$ -dioxanone-co-butylene-co-succinate) copolyesters with well-defined structure and enhanced degradability (Nie, Dang, Wang, Song, & Wang, 2017).

### **3.2 POLIMERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE XILITOL**

El xilitol es llamativo como monómero por la posibilidad de formar polímeros lineales con grupos hidroxilos incluidos en el esqueleto del polímero, lo cual ahorraría la derivatización que se hace en algunos polímeros para funcionalizar la cadena.

Existen estudios de polimerización de xilitol con diácidos, especialmente con el ácido sebácico reportando materiales de enorme importancia en ingeniería de tejidos y transporte de fármacos, con capacidad de ser degradados enzimáticamente (Bruggeman, Bettinger, & Langer, 2010).

En la literatura se encuentran pocos reportes de polímeros de xilitol obtenidos por síntesis enzimática, se destaca principalmente la investigación en policondensación enzimática de alditoles, en la cual varios sustratos incluido el xilitol son polimerizados con el ácido sebácico. Esta reacción se llevó a cabo sin solvente, a 95°C por 48 horas, utilizando N435 como catalizador y presión reducida (Hu, Gao, Kulshrestha, & Gross, 2006).

Recientemente se ha reportado la síntesis de poli(xilitol adipato) usando xilitol y divinil adipato como reactivos, la reacción se realizó en acetonitrilo, catalizada por N435, a 50°C, con una duración de 92 h (Bilal *et al.*, 2016).

Finalmente, hasta la fecha de escritura de este documento no existen reportes de policondensación enzimática de xilitol con ácido succínico.

### **3.3 AVANCES DENTRO DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN.**

El grupo de investigación Química de Productos Naturales de la Universidad del Cauca y el grupo Natura de la Universidad ICESI han incursionado recientemente en el campo de nuevos materiales poliméricos con el desarrollo del proyecto SÍNTESIS DE POLÍMEROS A BASE DE XILITOL Y ACIDO SUCCÍNICO.

Los primeros resultados se obtuvieron en el 2014 por Néstor Ivan Liz, quien en el desarrollo de su tesis de grado de química sintetizó por primera vez polímeros de Xilitol con dicloruro

de succinilo y también con ácido succínico, mediante policondensación química en Tolueno. Se obtuvieron materiales amorfos cuya temperatura de transición vítrea aumentaba al incrementar el tiempo de reacción y la cantidad molar de ácido succínico, se evidenció además una disminución de la solubilidad. El peso molecular de estos materiales fue superior a 1000 g/mol en su fracción soluble. Los resultados de su investigación están reportados en su tesis de pregrado titulada FORMACIÓN QUIMIOSELECTIVA DEL POLÍMERO POLI (SUCCINATO DE 2,3,4-TRI-O-ACETIL-XILITOL) A PARTIR DE ÁCIDO SUCCÍNICO Y XILITOL y en el artículo de investigación publicado en Polymer International (Liz-Andela *et al.*, 2017).

En la actualidad se desarrolla el estudio de la síntesis de xilitol y ácido succínico en el grupo de investigación hacia la síntesis enzimática con participación de la enzima inmovilizada Novozym® 435 y los resultados inicialmente obtenidos son consignados y analizados en este documento. También se está investigando la formación de poliésteres con participación de otras lipasas, libres e inmovilizadas; sin dejar atrás el estudio de la polimerización por metodologías químicas convencionales y, recientemente, vía activación por radiación de microondas.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 GENERAL**

Obtener poliésteres a base de xilitol y ácido succínico, vía condensación enzimática, usando Novozym®435.

### **4.2 ESPECÍFICOS**

- Estudiar las condiciones de la reacción enzimática de xilitol con ácido succínico, catalizada por Novozym® 435.
- Determinar las características moleculares de los polímeros obtenidos mediante técnicas térmicas (DSC, TGA) y espectroscópicas (RMN, IR).
- Evaluar la biodegradabilidad de los productos obtenidos haciendo uso de la prueba de inmersión en suelo.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 MATERIALES

- **Xilitol** grado analítico con pureza  $\geq 99\%$  fabricado por Sigma-Aldrich.
- **Ácido Succínico** grado reactivo ACS con pureza  $\geq 99\%$  fabricado por Sigma-Aldrich.
- **Limoneno** grado industrial como medio de reacción.
- **Novozym® 435 (N435)**. La enzima fue donada por Novozymes Brasil. Esta consiste en lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) adsorbida sobre una resina acrílica macroporosa.
- **Aqua Clean® ACF-SC**. Donado por ASCOR SA. Consiste en una mezcla de enzimas y microorganismos.

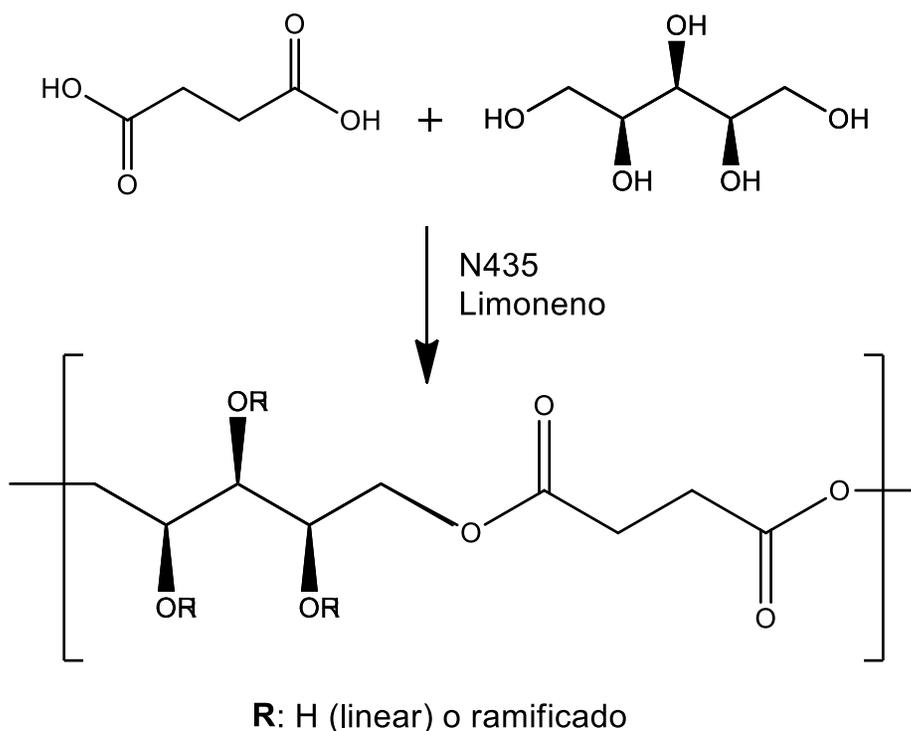
### 5.2 SÍNTESIS DE LOS POLÍMEROS DE XILITOL Y ÁCIDO SUCCÍNICO (pXS's).

A partir de los datos obtenidos en los ensayos preliminares de la investigación (Ver ANEXOS), se determinó las variables de proceso y con ellas se estableció un diseño experimental para la optimización, cuyas condiciones se reportan en la Tabla 7.

**Tabla 7. Parámetros del diseño experimental**

Clase de diseño	Nombre del diseño	Factores experimentales	Bloques	Factor de respuesta	Corridas
Superficie de respuesta	Compuesto reducido de Draper y Lin	4 (Tiempo, relación de sustratos, Carga enzimática y Temperatura)	1	1	18 (con 2 puntos centrales)

La reacción química esperada para la síntesis se muestra en el Esquema 3. y el diseño experimental completo se muestra en la Tabla 8



**Esquema 3.** Reacción de policondensación enzimática entre el ácido succínico y el xilitol.

Para cada uno de los experimentos planteados, el procedimiento se realizó sobre un montaje de reflujo, empleando un balón de fondo plano de 50 mL, ubicado sobre una trampa de arena y conectado a un condensador recto. En el balón con agitador magnético se depositó en total 2 g de monómeros distribuidos en la relación que se indica para cada experimento (0.5, 1.25, 2), finalmente se vertió 10 mL de Limoneno. La mezcla de reacción se incubó con agitación constante de 100 rpm y se calentó. Al momento de alcanzar la temperatura del experimento se añadió la enzima inmovilizada y la reacción prosiguió por el tiempo indicado en cada caso, de 12, 30 o 48 h.

**Tabla 8. Diseño de superficie de respuesta.**

<b>Experimento</b>	<b>Tiempo (h)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>% Enzima</b>	<b>Relación AS: X*</b>
1	30	140	5.5	1.25
2	48	160	10	2
3	48	160	1	2
4	12	160	10	0.5
5	48	120	1	0.5
6	12	160	10	0.5
7	12	120	10	2
8	48	120	10	0.5
9	12	120	1	2
10	30	120	5.5	1.25
11	30	160	5.5	1.25
12	12	140	5.5	1.25
13	48	140	5.5	1.25
14	30	140	1	1.25
15	30	140	10	1.25
16	30	140	5.5	2
17	30	140	5.5	0.5
18	30	140	5.5	1.25

\* AS(Ácido succínico): X(Xilitol).

Alcanzado el tiempo de reacción previsto, se llevó el balón a un baño de hielo para minimizar la actividad enzimática. Al solidificar el producto obtenido, se decantó el Limoneno y el producto obtenido se solubilizó en agua caliente y se filtró al vacío en caliente para separarlo de la enzima. Terminada esta operación, el filtrado se llevó a sequedad en horno por varios días a 90°C y se caracterizó.

### **5.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS Pxs'S**

En esta sección se especifica la metodología que se empleó en cada una de las técnicas de caracterización.

### **5.3.1 Análisis de apariencia y solubilidad de los pXS's.**

Los materiales sintetizados se diferenciaron por su color, estado físico y solubilidad en solventes orgánicos. Para la solubilidad se utilizaron entre 5-10 mg de producto en 5 mL de solvente a temperatura ambiente.

### **5.3.2 Caracterización de los pXS's mediante espectroscopía IR-ATR.**

Los espectros IR para los productos obtenidos se obtuvieron en un equipo **Thermo electron Nicolet iS10 FT-IR** provisto de un dispositivo ATR (Reflectancia total atenuada). Cantidades similares de muestras sólidas o líquidas viscosas se colocaron directamente sobre la punta de diamante para obtener la lectura. Este método fue el preferido debido a la facilidad en la ejecución.

### **5.3.3 Análisis térmicos.**

#### **5.3.3.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).**

Las muestras se llevaron al Laboratorio de Instrumentación Química (LIQ) en la Universidad ICESI en donde fueron analizadas en un equipo DSC Q2000 V24.11 Build 124 de TA instruments, en dos ciclos calentamiento-enfriamiento entre -20°C y 200°C, con rampa de T° de 10 °C/min.

#### **5.3.3.2 Análisis termogravimétrico (TGA).**

Las muestras se analizaron en el Laboratorio de reología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, en la Universidad del Cauca con un equipo TGA Q50 V20.10 Build 36 hasta 600°C en atmósfera de nitrógeno, empleando una rampa de 20°C/ min.

### **5.3.4 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).**

Los espectros RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se obtuvieron en agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ), en un espectrómetro de RMN BRUKER de 400MHz, modelo AVANCE II2. El servicio fue prestado por la Universidad del Valle.

### **5.3.5 Análisis de peso molecular por cromatografía de permeación en gel (GPC).**

Con el objetivo de disminuir la ventana de pesos moleculares, previo al envío de las muestras para el análisis por GPC, se procedió a purificarlas mediante un procedimiento que consistió en disolver entre 0.4 y 1.0 g de producto en 5.0 mL de agua. En seguida, la solución concentrada se vertió gota a gota en 1 L de acetato de etilo bajo agitación magnética. Con esta operación se esperaba que las moléculas de menor peso molecular quedaran dispersas en el solvente mientras que las de mayor peso molecular precipitaran. Al precipitado se lo denominó muestra “purificada” y en este trabajo se diferenciará por una P mayúscula, es decir la muestra 1P es el precipitado obtenido de la muestra 1 mediante el procedimiento mencionado anteriormente.

Las muestras 5P, 10P y 15P fueron seleccionadas para medirles el peso molecular buscando variabilidad en los resultados, las mediciones se realizaron mediante GPC en el laboratorio de polímeros del grupo de investigación SIMERQO de la Universidad del Valle, para esto se prepararon soluciones de 1.5-2.0 mg/mL en agua las cuales se filtraron con membranas con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , para la separación se empleó agua como fase móvil, los parámetros del método fueron: flujo 0,5 mL/min, volumen de inyección 20  $\mu\text{L}$ , columnas de exclusión molecular Shodex OHPak SB-805 (8.0 x 300 mm, 13  $\mu\text{m}$ ) y Shodex OHPak SB-806 (8.0 x 300 mm, 13  $\mu\text{m}$ ), temperatura de la columna 30°C y se empleó un detector de índice de refracción.

### **5.3.6 Ensayos de biodegradabilidad.**

La metodología de este ensayo se adaptó de una prueba de biodegradabilidad en suelo natural reportado para polímeros de almidón (Riyajan, 2015). Para los productos sólidos obtenidos (Experimentos 2, 3 y 16, Tabla 8) se realizó el test que consistió en colocar un peso conocido de material polimérico en una caja de Petri con suelo, la muestra de suelo

fue comprada en un vivero de la ciudad y según referenció el vendedor había sido abonada y se le había adicionado cascarilla de arroz.

El porcentaje de biodegradación se obtuvo cuantificando la pérdida de peso porcentual de las muestras luego de un periodo de 4 semanas.

Un ensayo similar se realizó para las muestras 3 y 16, solo que, como medio de degradación se empleó una solución de 1000 ppm de AquaClean® ACF-SC, un producto comercializado como limpiador ecológico que consiste en una mezcla de enzimas y microorganismos en solución acuosa.

También se investigó el comportamiento del material 3 en agua y en una caja de Petri vacía durante el mismo periodo de tiempo, con el fin de usar los valores obtenidos como punto de comparación.

Finalizado el tiempo del test, las muestras se lavaron con agua destilada, se secaron en estufa a 90 °C por 12 h y se calculó la pérdida de peso.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 ANÁLISIS DE APARIENCIA Y SOLUBILIDAD DE LOS pXS's.

**Tabla 9.** Apariencia de los pXS's.

<b>Experimento</b>	<b>Color del producto</b>	<b>Estado físico.</b>	<b>Color final enzima.</b>
1	Marrón.	Líquido viscoso.	Marrón claro.
2	Ámbar.	Sólido.	Ámbar.
3	Ámbar.	Sólido.	Ámbar.
4	Marrón	Líquido viscoso	Marrón claro.
5	Marrón.	Líquido viscoso.	Amarillo claro.
6	Marrón	Líquido viscoso.	Marrón claro
7	Amarillo.	Sólido blando.	Amarillo claro.
8	Marrón.	Líquido viscoso.	Marrón claro.
9	Amarillo.	Sólido blando.	Amarillo claro.
10	Marrón.	Líquido viscoso.	Amarillo claro.
11	Marrón oscuro.	Líquido viscoso.	Marrón oscuro.
12	Marrón.	Líquido viscoso.	Marrón claro.
13	Marrón oscuro.	Líquido viscoso.	Marrón oscuro.
14	Marrón.	Líquido viscoso.	Marrón claro.
15	Marrón.	Líquido viscoso.	Marrón claro.
16	Ámbar.	Sólido.	Ámbar.
17	Marrón.	Líquido viscoso.	Marrón claro.
18	Marrón.	Líquido viscoso.	Marrón claro.

En cuanto a las características de los productos obtenidos la gran mayoría tienen apariencia similar, una consistencia viscosa y color marrón (Tabla 9). Los experimentos que difieren notablemente de los demás son 2, 3, 7, 9 y 16; es preciso resaltar que estos tienen en común que la relación ácido succínico:xilitol es de 2:1, los experimentos 7 y 9 son a su vez similares entre sí, son sólidos amarillentos que se pueden separar fácilmente con ayuda de

una espátula (ver Figura 4.), los experimentos 2, 3 y 16, también son similares entre sí, la diferencia entre los 2 tipos de producto debe entonces atribuirse al tiempo de reacción, así a tiempos de reacción bajos (12h) se obtiene el sólido blando y a tiempos de reacción altos (30-48h) se obtiene el sólido duro, con estas últimas muestras fue difícil la separación de la enzima ya que fue imposible solubilizarlas y la obtención del material se hizo rompiendo el balón (Experimento 3) o sometiendo a calentamiento las muestras hasta que empezaron a resquebrajarse (Experimentos 2 y 16). El resto de productos obtenidos es similar entre sí, con un color caramelo/marrón oscuro y una consistencia de líquido viscoso, a temperatura ambiente se puede notar que las muestras con más horas de síntesis son más difíciles de tomar con la espátula ya que se hacen más duras que los experimentos con menos horas de reacción.

**Tabla 10.** Solubilidad de los pXS's a temperatura ambiente después de 30 minutos.

Experimento	Agua	Metanol	Etanol	Isopropanol	Acetona	AcOEt	Limoneno
1	+	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	++	-	-	-	-	-	-
5	+/-	*	*	*	+/-	-	-
6	++	-	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	-	-	-
8	+/-	*	*	*	+/-	-	-
9	+	-	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-	-
11	+/-	*	*	*	+/-	-	-
12	++	-	-	-	-	-	-
13	+	+	+	*	*	-	-
14	+	-	-	-	-	-	-
15	+	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-
17	+	-	-	-	-	-	-
18	+	-	-	-	-	-	-

<++> Altamente soluble, <+> Soluble, <\*> Turbidez, <-> Insoluble, <+/-> Solubiliza una fracción del material.



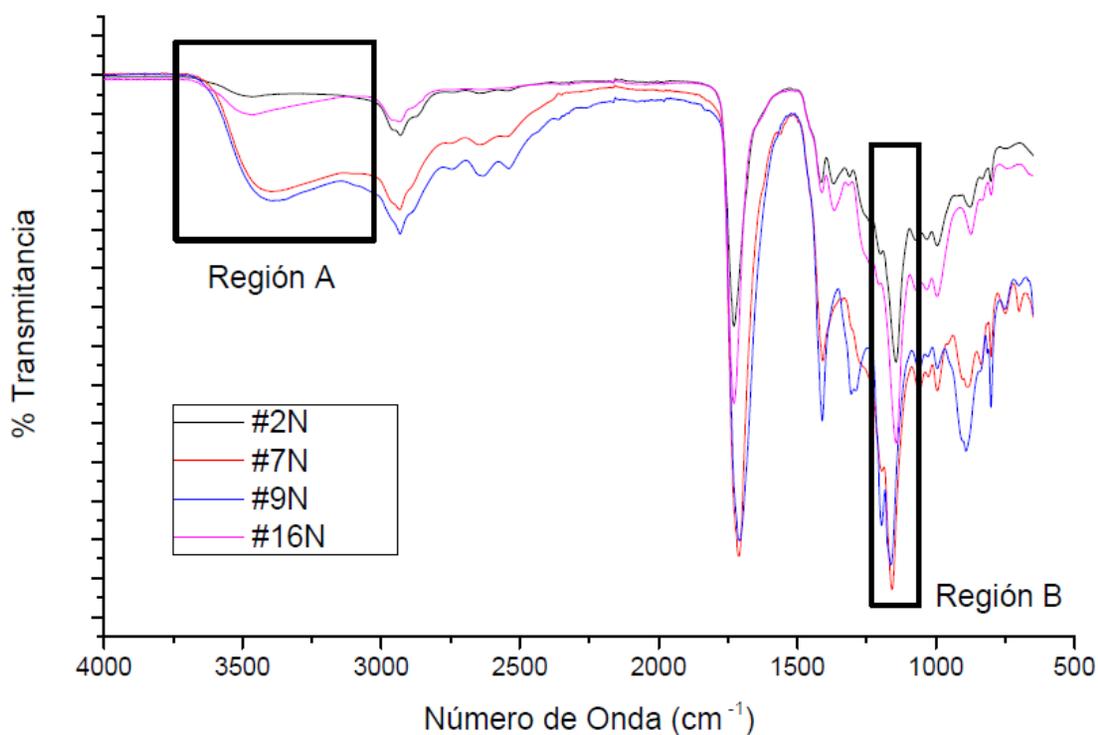
**Figura 4.** Fotografías de los productos obtenidos de izquierda a derecha, pXS9, pXS4 (previa separación de la enzima) y pXS3.

Las pruebas de solubilidad (Tabla 10) indican que los polímeros no son solubles a temperatura ambiente incluso en solventes orgánicos polares, el solvente más adecuado para los productos es el agua, que cuando se utiliza en caliente, las únicas muestras que resultan insolubles son 2, 3 y 16. Adicionalmente, se tiene que en los productos 7 y 9 es conveniente emplear un volumen pequeño de etanol, metanol o acetona para solubilizar pequeñas fracciones de producto que quedan en el kitasato cuando se hace la filtración. Al relacionar los datos de la Tabla 10 y compararlo con las condiciones de reacción, se puede ver una relación inversa entre el contenido de ácido succínico en el polímero y su solubilidad en agua, también es posible observar que, para experimentos con la misma relación de sustratos, la solubilidad en agua disminuye al aumentar el tiempo de reacción.

## **6.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS pXS's MEDIANTE ESPECTROSCOPIA IR-ATR.**

En la Figura 5 se muestran superpuestos los espectros IR de algunos de los polímeros obtenidos, en ellos se pueden asociar las bandas a las siguientes funcionalidades:  $\bar{\nu} = 3380-3400 \text{ cm}^{-1}$  tensión O-H del grupo hidroxilo,  $2930 \text{ cm}^{-1}$  que corresponde al estiramiento del enlace C-H de metilenos alifáticos, se observa una señal a  $\bar{\nu} = 1716 \text{ cm}^{-1}$  que se atribuye al estiramiento del grupo carbonilo (C=O), además aparece una señal sobre los  $\bar{\nu} = 1157 (\text{cm}^{-1})$  la tensión de deformación del enlace C-O-C éster. Las señales más importantes para la caracterización de los productos obtenidos se encuentran señaladas como Región A y Región B, en la Región A encontramos la señal de la tensión O-H es importante señalar que las bandas en esta región son más intensas en los experimentos 7 y 9 los cuales tienen

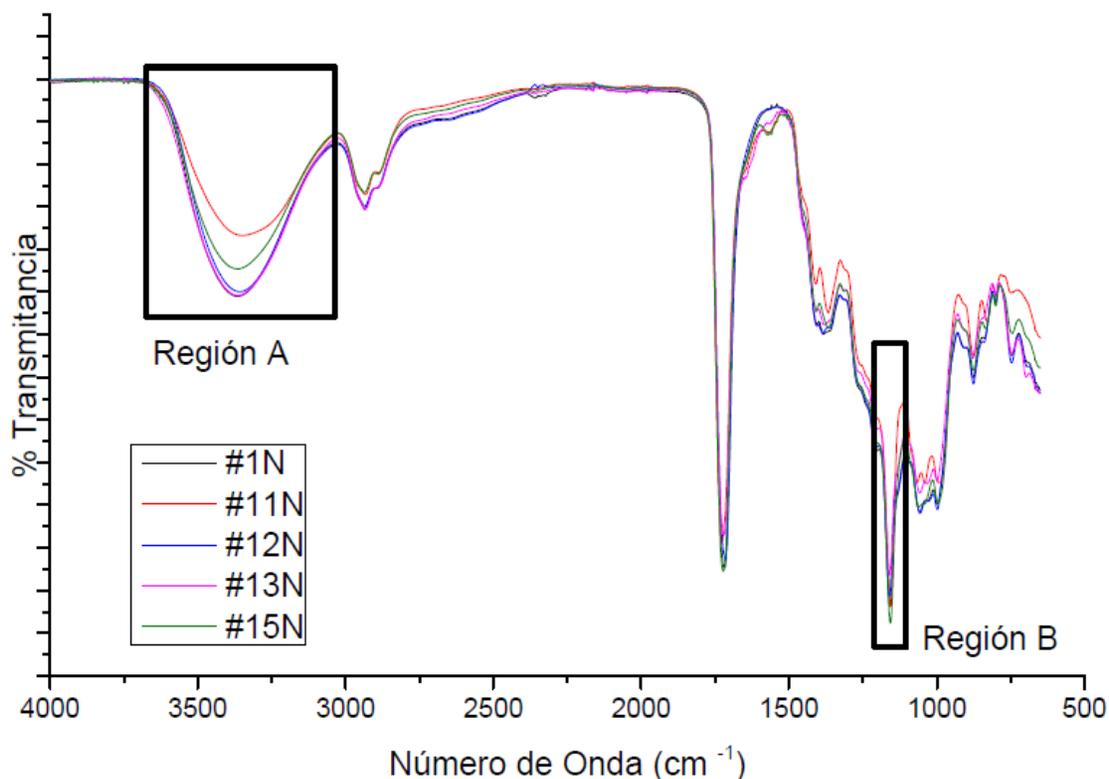
12 horas de reacción, en el caso de los experimentos 2 y 16 esta banda es menos intensa, esto indica una disminución en la cantidad de grupos hidroxilos libres en el producto, lo cual a su vez es probable que se deba a un nivel mayor de entrecruzamiento en la estructura del polímero final, lo anterior concuerda con los resultados de la prueba de solubilidad en donde se puede observar que los productos 2, 3 y 6 no fueron solubles en ninguno de los solventes probados. En cuanto a la región B, esta es de importancia debido a que es ahí en donde se observan las señales de deformación del enlace C-O-C, lo cual evidencia que la reacción de poliesterificación se llevó a cabo exitosamente.



**Figura 5.** Espectros FTIR para los pXS's con relación ácido succínico:xilitol 2:1.

El análisis de los espectros IR de los pXS's 1, 11, 12, 13 y 15 (Figura 6) es similar a los mencionados anteriormente, en la Figura 5 es fácil diferenciar las bandas alrededor de  $\bar{\nu} = 3380-3400 \text{ cm}^{-1}$  tensión O-H del grupo hidroxilo,  $2930 \text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento del enlace C-H de metilenos alifáticos, también se observan unas señales alrededor de  $\bar{\nu} = 1710-1730 \text{ cm}^{-1}$  que se deben al estiramiento del grupo carbonilo (C=O) y sobre los  $\bar{\nu} =$

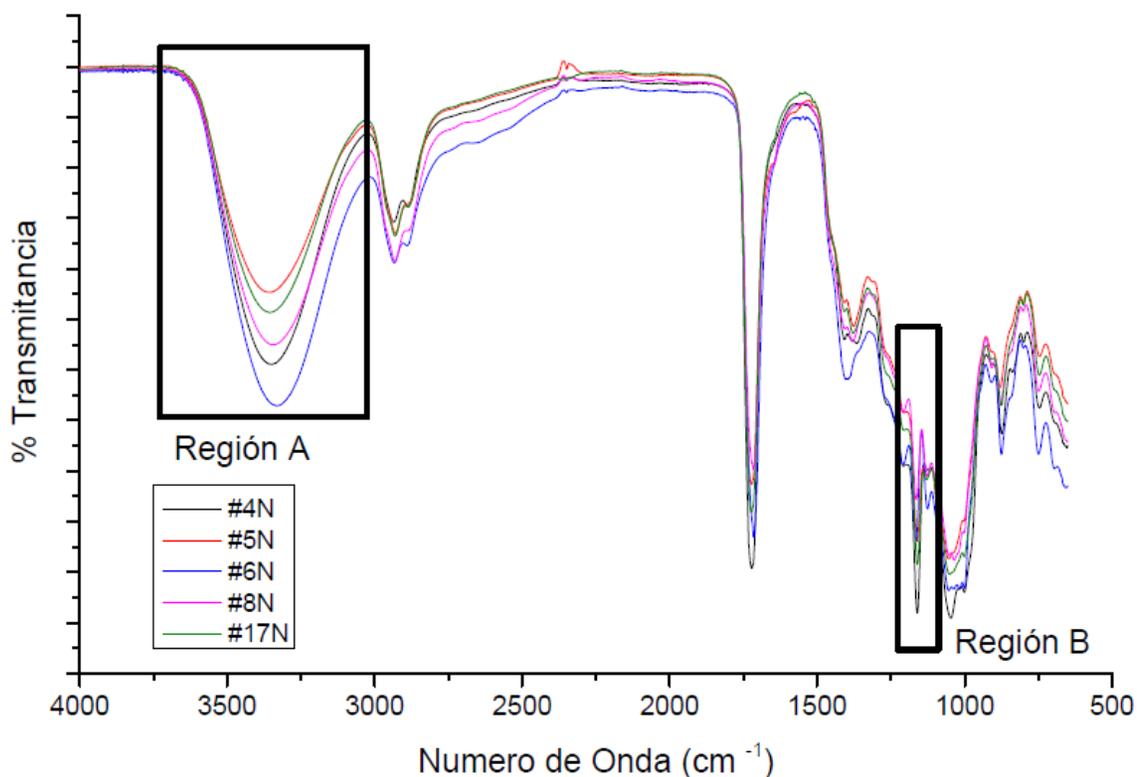
1150  $\text{cm}^{-1}$  está presente la señal correspondiente a la tensión de deformación del enlace C-O-C éster.



**Figura 6.** Espectros FTIR para los pXS's con relación ácido succínico:xilitol 5:4.

Si se compara estos espectros con los que se analizaron en la Figura 5, se puede observar un aumento en la intensidad de las bandas en la región A, lo cual seguramente se debe a una mayor linealidad en el producto de reacción, tanto las bandas de enlace éster como la señal del grupo carbonilo son fácilmente identificables lo cual es indicio de que la reacción de esterificación está ocurriendo, el diseño experimental carece de un ensayo de 12h con relación entre sustratos 5:4 por lo cual es difícil atribuir alguna modificación en los espectros IR al tiempo de reacción, por otra parte los parámetros, carga enzimática y temperatura de reacción no parecen tener una influencia directa sobre las señales del espectro IR.

El análisis de los espectros IR de 4, 5, 6, 8 y 17 presenta las mismas bandas ya señaladas en los pXS's analizados anteriormente (Figuras 5 y 6) las bandas alrededor de  $\bar{\nu} = 3380-3400 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 7) corresponden a la tensión O-H del grupo hidroxilo, cerca de los  $2930 \text{ cm}^{-1}$  se puede ver la vibración del enlace C-H de metilenos alifáticos, también se observan señales alrededor de  $\bar{\nu} = 1710-1730 \text{ cm}^{-1}$  que se deben al estiramiento del grupo carbonilo (C=O) y sobre los  $\bar{\nu} = 1150 \text{ cm}^{-1}$  está presente la señal correspondiente a la tensión de deformación del enlace C-O-C éster. En este caso particular se puede apreciar una disminución en la intensidad de la banda de tensión O-H en la región A, a medida que aumenta el tiempo de reacción, la banda más pronunciada pertenece a el experimento 6 (12h) mientras que la menos intensa corresponde al 5 (48h).



**Figura 7.** Espectros IR de los pXS's con relación ácido succínico:xilitol 1:2.

Salvo las excepciones comentadas anteriormente todos los productos obtenidos poseen espectros IR similares, las intensidades de la banda en la región A se pueden relacionar

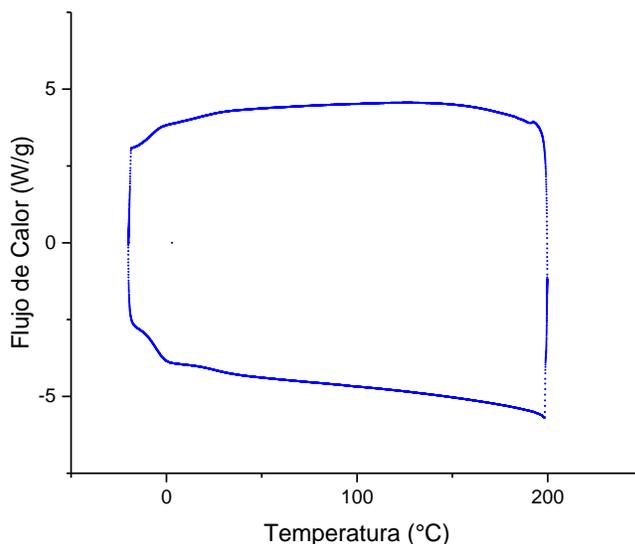
con los resultados de la prueba de solubilidad, a menor intensidad menor solubilidad en agua, también están relacionadas con la apariencia y estructura del polímero, de esta forma se puede prever cuán ramificada es la estructura de un pXS con respecto a otro observando sus espectros IR, cuanto menor sea intensidad de la banda en la región A más entrecruzado será el pXS.

### 6.3 ANÁLISIS TÉRMICOS

En esta sección se analizará los resultados obtenidos mediante las técnicas TGA y DSC.

#### 6.3.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Los resultados de esta sección se resumen en forma de tabla debido a la similitud en la forma de los termogramas; como muestra se puede observar la Figura 8. Se observó para la gran mayoría de los materiales sintetizados una única transición debido a la forma característica, esta se reconoció como la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ). Esta temperatura se entiende como el punto en el cual hay un cambio en el comportamiento del



**Figura 8.** Termograma DSC del producto pXS1, comportamiento típico de los pXS's.

polímero, para las temperaturas inferiores a la  $T_g$  el material se comportará como un sólido rígido, duro y quebradizo con propiedades análogas a las de un vidrio (de ahí el nombre de la transición), por otra parte, para temperaturas superiores el polímero se torna blando, gomoso y se comporta como un líquido viscoso.

Es conveniente resaltar que la  $T_g$  se diferencia de la temperatura de fusión ( $T_m$ ), esta última sólo se expresa en polímeros cristalinos, mientras que la temperatura de transición vítrea es propia de polímeros amorfos. Para materiales que presentan las dos transiciones se resalta que sólo la fracción amorfa produce la señal de  $T_g$ , y la fracción cristalina del polímero produce la señal de  $T_m$ .

En la Tabla 11 se muestran los valores de  $T_g$ , los cuales se pueden agrupar *grosso modo* en 2 categorías, los productos que tienen  $T_g$  superior a  $47^\circ\text{C}$  (muestras 2, 3 y 16) se comportan a temperatura ambiente como sólidos rígidos este resultado va de la mano con los resultados experimentales (ver Tabla 10); se observa también que para temperaturas superiores a los  $65^\circ\text{C}$  estos productos cambian su comportamiento de manera que es posible pensar en una forma de moldeo a temperaturas intermedias entre su  $T_g$  y su temperatura de descomposición, por ejemplo a  $200^\circ\text{C}$ . Por otra parte, el resto de productos obtenidos presentan  $T_g$  en el rango entre ( $-10$  a  $10^\circ\text{C}$ ), a temperatura ambiente se comportan como un líquido viscoso, estos materiales son más fáciles de manejar, al estudiar la relación que existe entre estructura del polímero y su  $T_g$ , teniendo en cuenta los

**Tabla 11.** Resumen de Resultados de DSC en los pXS's.

Experimento	$T_{g1}$ ( $^\circ\text{C}$ )	$T_2$ ( $^\circ\text{C}$ )	Experimento	$T_{g1}$ ( $^\circ\text{C}$ )	$T_2$ ( $^\circ\text{C}$ )
1	-5.66		10	1.23	
2	63.03		11	1.45	
3	51.99		12	1.34	
4	-7.41	165.7	13	9.77	
5	-7.42		14	-3.94	
6	-5.77		15	8.55	23.86
7	-9.28		16	47.96	
8	-7.50		17	-6.08	
9	-5.48	27.17	18	1.54	

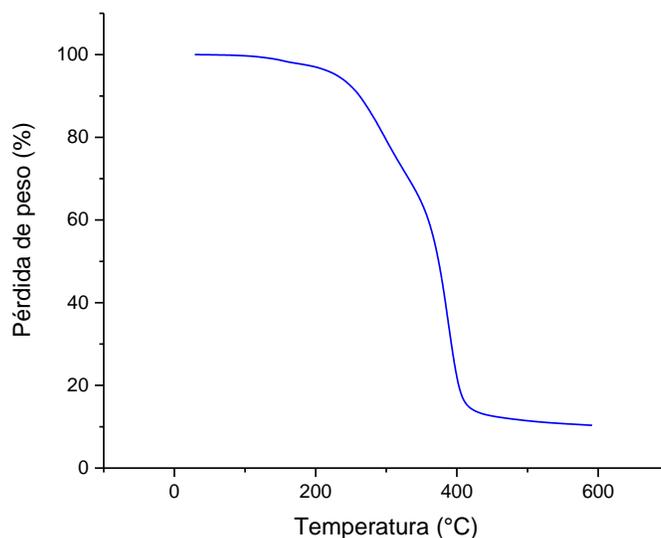
$T_{g1}$ : temperatura de transición vítrea.  $T_2$ : transición de cambio de estructura.

resultados previos de espectroscopía IR se puede justificar los resultados obtenidos ya que la movilidad de las cadenas poliméricas modifica la temperatura de transición vítrea, de esta manera tiene sentido que polímeros probablemente más entrecruzados como 2, 3 y 16 presenten  $T_g$  mayor que el resto de los productos, que se presume, son lineares.

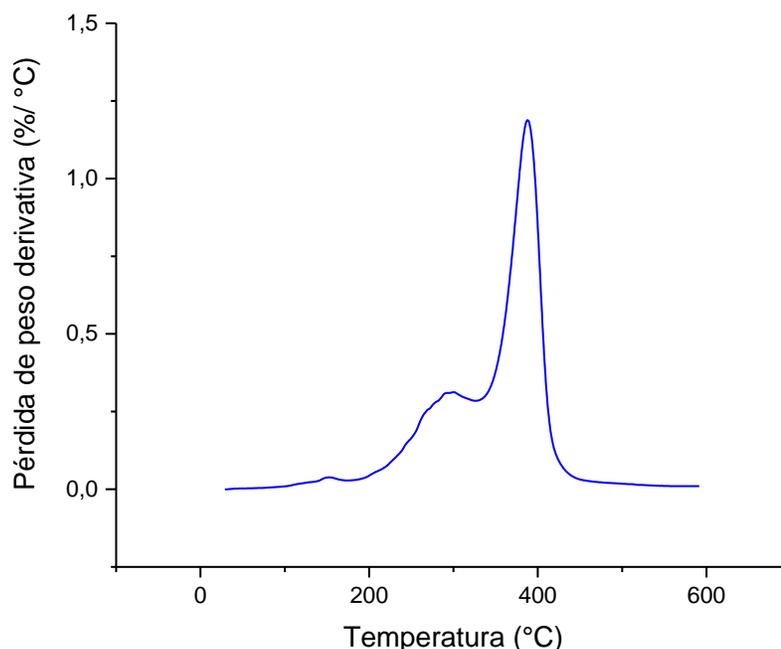
Finalmente es apropiado concluir de estos resultados que todos los materiales sintetizados son amorfos, debido a la ausencia de transiciones propias de una fase cristalina, como temperaturas de fusión y cristalización.

### 6.3.2 Análisis Termogravimétrico (TGA).

Al observar los termogramas de los productos poliméricos entre 0 y 600°C se obtiene el valor de la temperatura de descomposición para el material. De forma análoga a los resultados obtenidos en DSC, se presentará una figura modelo (Figura 9) tanto de TGA como del análisis termogravimétrico derivativo (DTGA) (Figura 10) (este tipo de gráfica muestra con exactitud la o las temperaturas de descomposición y por consiguiente es más útil para el análisis) y los resultados para los 18 materiales sintetizados se resumen en la Tabla 12.



**Figura 9.** Termograma TGA del producto pXS1, comportamiento típico de los pXS's



**Figura 10.** Termograma DTGA del producto pXS1, comportamiento típico de los pXS's

En términos generales todos los materiales sintetizados son estables hasta 200 °C, en ese punto inicia su descomposición, la cual finaliza alrededor de 450 °C los valores denominados  $T_{d1}$  y  $T_{d2}$  en la Tabla 12 representan las temperaturas en que la pérdida de peso es máxima, y se obtuvieron de la curva de DTGA, en cuanto a los valores de pérdida de peso estos se obtienen de la curva de TGA cuando se analizan los rangos de temperatura que corresponden a  $T_{d1}$  y  $T_{d2}$ , para este análisis se empleó el software TA Universal Analysis.

Al hablar de estabilidad térmica un valor más alto de  $T_d$  significa una mayor estabilidad, es conveniente aclarar que los dos valores consignados en la Tabla 12 que representan las temperaturas donde la pérdida de peso es máxima representan fracciones del material polimérico diferentes, los cuales, como se observó en los resultados del DSC no poseen fase cristalina, por esta razón se atribuye la aparición de dos temperaturas de descomposición diferentes a fracciones de polímero con diferente peso molecular. El único producto que carece de dos temperaturas de descomposición es el 16N, lo que probablemente se debe a la uniformidad en la composición de este producto.

Las pérdidas de peso previas a los 200°C se atribuyen a solventes incluidos en el polímero (agua y/o limoneno), es probable que, con una mejor purificación del producto, por ejemplo, sometiéndolos a vacío por 24 h estos desaparecerían.

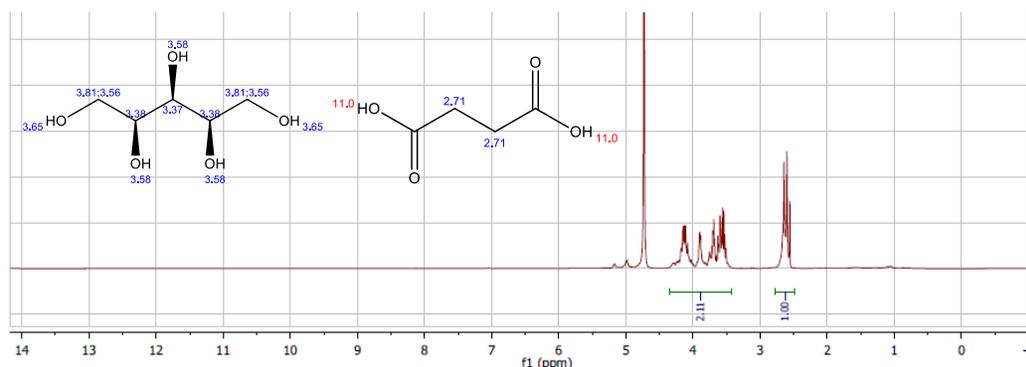
**Tabla 12. Resultados obtenidos por TGA y DTGA en los pXS's.**

<b>Experimento</b>	<b>T<sub>d1</sub> (°C)</b>	<b>Pérdida de peso (%)</b>	<b>T<sub>d2</sub> (°C)</b>	<b>Pérdida de peso (%)</b>
1	300.24	28.72	388.01	56.90
2	336.97	52.16	355.63	44.28
3	251.63	10.59	372.59	75.00
4	283.33	49.57	382.76	29.14
5	304.98	49.53	378.93	38.71
6	299.42	51.15	387.18	40.07
7	217.18	41.48	385.96	44.44
8	322.06	47.30	392.44	36.51
9	230.93	49.19	391.23	40.26
10	304.73	31.34	395.15	53.76
11	292.23	21.37	383.98	62.45
12	303.00	28.31	398.05	63.49
13	303.18	32.06	387.60	53.38
14	310.61	25.61	393.00	63.71
15	304.14	24.92	394.24	63.79
16	407.73	93.44	-	-
17	322.46	49.12	404.44	42.57
18	297.14	29.38	382.08	45.73

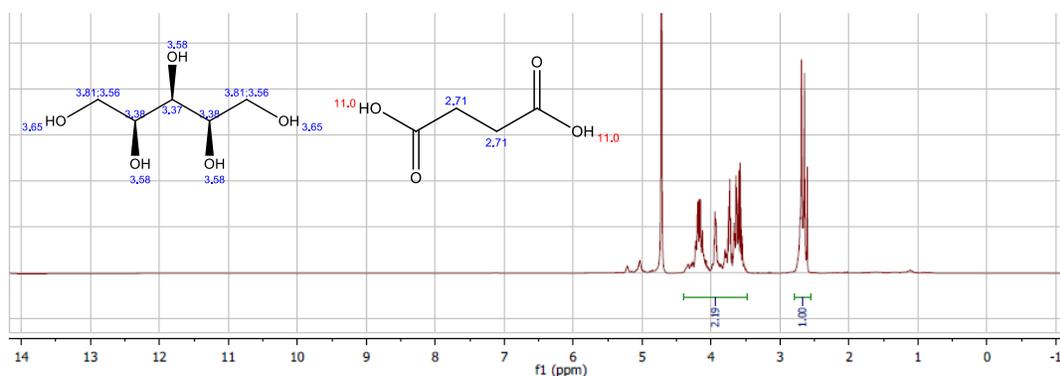
Según los resultados de los análisis térmicos, debido a la ausencia de temperaturas de fusión y a las temperaturas de descomposición se puede decir que los materiales sintetizados son termoestables.

## 6.4 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (RMN)

La espectroscopía de RMN permite prever las posibles estructuras de los polímeros formados, a continuación (Figuras 11 y 12), se presentan los espectros obtenidos para el pXS10.



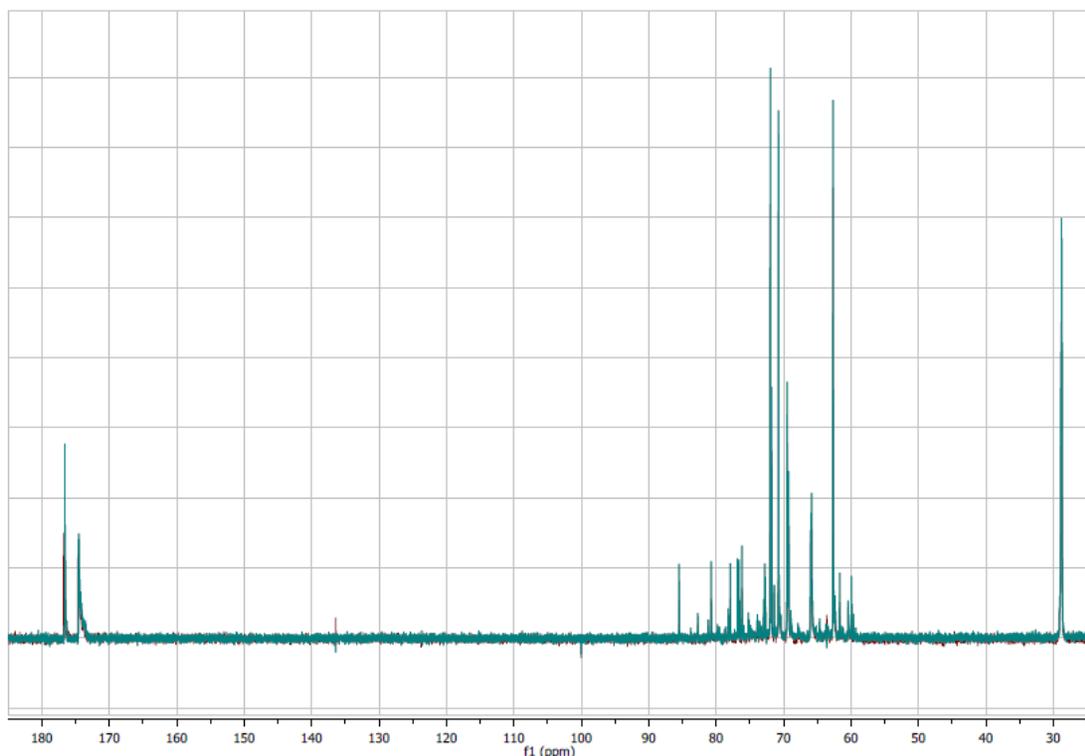
**Figura 11.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  del pXS10 (Inset: estructuras de xilitol y ácido succínico y predicción de desplazamiento en RMN  $^1\text{H}$ ).



**Figura 12.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  del pXS10 purificado (Inset: estructuras de xilitol y ácido succínico y predicción de desplazamiento en RMN  $^1\text{H}$ ).

En los espectros mostrados en las Figuras 11 y 12 se observan dos zonas representativas de señales, en la región entre 2.5-3 ppm aparecen las señales correspondientes a los metilenos del ácido succínico, como no se observan protones a campo bajo, donde debería

encontrarse un protón ácido se asume que no hay ácido succínico terminal en las cadenas poliméricas. La región comprendida entre 3.5-4 ppm muestra las señales correspondientes a los hidrógenos del xilitol (ver Figura 3), más desprotegidos por la acción de los 5 oxígenos de la molécula.



**Figura 13.** Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  del pXS10 purificado y sin purificar (superpuesto).

Al restar los hidrógenos de los hidroxilos primarios del xilitol, y de los grupos ácidos en el ácido succínico (estos se pierden en la condensación), se puede notar que la región del xilitol integra para 10 hidrógenos mientras que la región del ácido succínico solo integra para 4 protones (en el caso ideal de una polimerización lineal), de esta manera una relación 10:4 (2.5:1) en las integraciones indica una proporción 1:1 xilitol: ácido succínico. Al observar los valores reales de las integraciones en los espectros de RMN se observa que esta es de 2.19:1 en el compuesto purificado un valor que, si bien es menor, no difiere

significativamente de la situación ideal, lo cual permite suponer que este material polimérico está conformado casi en su totalidad por cadenas lineales.

La aparición de dos señales por encima de los 170 ppm en la Figura 13, corresponde a grupos carbonilo con ambientes químicos diferentes, dado que ya se ha descartado la existencia de grupos ácido en el compuesto, la explicación más probable para estas señales es la formación de ésteres con ambientes químicos diferentes, los cuales corresponderían al éster de enlace lineal y al éster de enlace ramificado formado por la condensación de un grupo hidroxilo secundario del xilitol con el ácido succínico.

Además, se puede observar (Figura 13) que no hay diferencia significativa entre los espectros RMN del compuesto sin purificar y después del proceso de purificación que consistió en una recristalización a partir de una solución acuosa concentrada del producto añadida gota a gota en un recipiente con gran cantidad de acetato de etilo.

## **6.5 ANÁLISIS DE PESO MOLECULAR OBTENIDO POR GPC**

Los resultados de la Tabla 13 muestran los valores obtenidos en el análisis de GPC para 3 muestras con condiciones de reacción diferentes: los tiempos de reacción son de 48h para la muestra 5 y de 30h para las muestras 10 y 15; la carga enzimática fue de 1%, 5.5% y 10 % para las muestras 5, 10 y 15, respectivamente; en cuanto a las temperaturas de reacción fueron de 120°C para las muestras 5 y 10, y de 140°C para la muestra 15. Se puede observar que el rango de pesos moleculares obtenidos es similar, aunque la muestra 15P presenta un mayor peso molecular atribuible tanto a la mayor carga enzimática como a la mayor temperatura de reacción.

En cuanto a las muestras 5Ac y 5P que corresponden a fracciones solubles en acetona y agua de un mismo experimento se observa que la fracción de mayor peso molecular corresponde a la soluble en agua, lo cual es contrario a lo que se esperaría normalmente puesto que al aumentar el peso molecular usualmente disminuye la solubilidad, sin embargo, es debido a la acción selectiva de la enzima hacia hidroxilos primarios que es posible encontrar en esta muestra fracciones solubles de mayor peso molecular, a pesar de esto, a medida que transcurre el tiempo de reacción la cantidad de grupos hidroxilos

primarios disponibles disminuye y por consiguiente se favorece la formación de enlaces éster con los grupos hidroxilos secundarios dando lugar así a la aparición de la fracción insoluble en agua.

**Tabla 13. Resultados de pesos moleculares promedio.**

Muestra	$M_n$	$M_w$	$M_z$	PD
5Ac	849	1181	1651	1.3910
5P	942	1520	4998	1.6136
10P	924	1226	1598	1.3268
15P	1213	1776	2873	1.4641

$M_n$  peso molecular promedio en número,  $M_w$  peso molecular promedio en masa,  $M_z$  Peso molecular promedio centrifugal,  $PD = M_w/M_n$ , polidispersidad, este parámetro está relacionado con la uniformidad en la longitud de las cadenas.

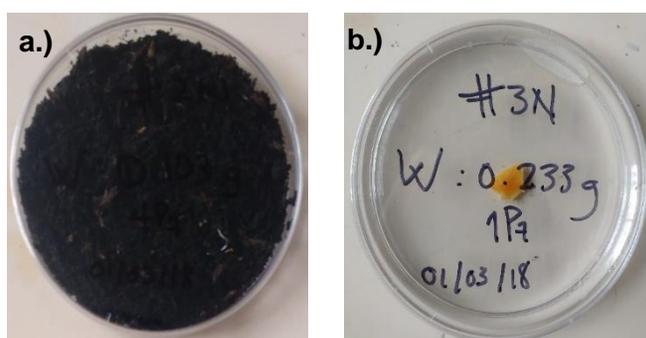
Los experimentos 10 y 15 con el mismo tiempo de reacción y la misma relación entre sustratos indican que al aumentar la carga enzimática y la temperatura de reacción se obtienen mayores pesos moleculares en el producto.

La polidispersidad en términos generales está en los rangos deseables (cerca de 1), una polidispersidad elevada no es conveniente en la mayoría de aplicaciones debido a que esta representa una gran variación en los pesos moleculares de la muestra y tiene efectos negativos en las aplicaciones potenciales del producto.

Si se comparan los resultados de esta investigación con los obtenidos previamente en el grupo de investigación ( $M_n$ :1000 y  $M_w$ : 1332) (Liz-Andela *et al.*, 2017) para un pXS sintetizado por vía química en atmósfera de Nitrógeno durante 80h, se observa un aumento considerable en el peso molecular (474 unidades comparado con la muestra 15) y se reduce el tiempo de reacción a menos de la mitad.

## 6.6 RESULTADO DE LOS ENSAYOS DE BIODEGRADABILIDAD

Los ensayos de biodegradabilidad (Figura 14) produjeron buenos resultados, en un periodo de tiempo corto (4 semanas) se logró comprobar que existe pérdida de peso para las muestras sólidas tanto en suelo natural (Tabla 13) como en el producto comercial Aqua Clean® ACF-SC (Tabla 14), sin embargo, no existe una relación directa apreciable entre la pérdida de peso porcentual y el tiempo de reacción o la carga enzimática empleada, de momento se puede decir que estos materiales son biodegradables pero es necesario realizar análisis adicionales con respecto a la relación entre la degradación y la estructura tridimensional del material.



**Figura 14.** Montaje del ensayo de biodegradabilidad en: a.) suelo y b.) Aqua Clean® ACF-SC.

**Tabla 13.** Resultados del test de biodegradabilidad en Suelo.

# Muestra	Peso Inicial	Peso Final	Pérdida de Peso	Pérdida porcentual	Promedio pérdida porcentual
2	0,113	0,107	0,006	5,310	9,179
	0,104	0,093	0,011	10,577	
	0,103	0,091	0,012	11,650	
3	0,204	0,151	0,053	25,980	21,030
	0,205	0,173	0,032	15,610	
	0,200	0,157	0,043	21,500	
16	0,105	0,102	0,003	2,857	3,267
	0,120	0,115	0,005	4,167	
	0,108	0,105	0,003	2,778	

**Tabla 14.** Resultados del test de biodegradabilidad en Aqua Clean® ACF-SC.

# Muestra	Peso Inicial	Peso Final	Pérdida de Peso	Pérdida porcentual	Promedio pérdida porcentual
3	0,223	0,187	0,036	16,143	16,071
	0,213	0,184	0,029	13,615	
	0,233	0,190	0,043	18,455	
16	0,129	0,125	0,004	3,101	2,697
	0,123	0,119	0,004	3,252	
	0,115	0,113	0,002	1,739	

En cuanto al medio de degradación se pudo apreciar que el suelo produjo una mayor biodegradación que una solución a 1000 ppm de Aqua Clean® ACF-SC lo cual es atribuible a una mayor variedad de especies de microorganismos, y ambos medios ocasionaron una mayor degradación que el agua lo que indica que la pérdida de peso no es producto solamente de hidrólisis. El resultado con la caja que no contenía más que el polímero (Tabla 16) no fue el previsto, puesto que se esperaba que este no presentara una pérdida de peso, al parecer este material posee la capacidad de incorporar agua en su estructura tridimensional y de esta manera ganar peso, un factor que no fue tenido en cuenta antes de iniciar la prueba y que podría dar lugar a otras aplicaciones para el material obtenido.

**Tabla 15.** Valores de referencia obtenidos con la Muestra #3.

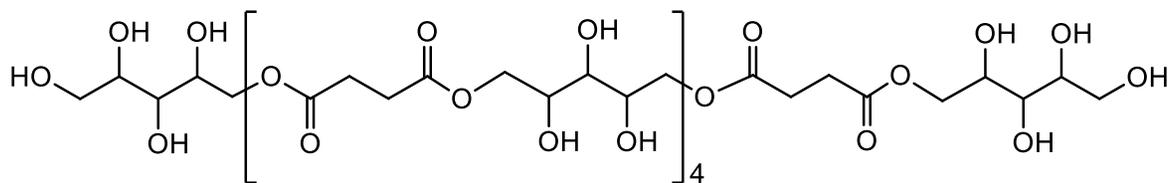
Muestra	Peso Inicial	Peso Final	Pérdida de Peso	Pérdida porcentual
Caja con Agua	0,164	0,160	0,004	2,439
Caja Vacía	0,295	0,291	0,004	1,356

## 6.7 PROPUESTA ESTRUCTURAL Y APLICACIONES POTENCIALES DE LOS pXS's

En la Figura 15 se muestra un ejemplo de posible estructura para un oligómero lineal de xilitol y ácido succínico, una molécula con esta estructura química probablemente conservaría la solubilidad en agua de los monómeros, es de esperar que, en los pXS's con excepción de los productos 2,3 y 16, estén presente mayoritariamente moléculas como la de la Figura 15. Particularmente se sabe, gracias al análisis por resonancia magnética

nuclear, que la relación entre monómeros de la muestra 1 es muy cercana a 1 lo cual nos proporciona la estructura lineal, además, debido a la ausencia de protones ácidos se sabe que los monómeros en los extremos de la cadena deben ser moléculas de xilitol.

Este tipo de polímeros tienen aplicación en el campo de la biomedicina, donde se emplean polímeros con alcoholes secundarios en la cadena polimérica principal para incluir mediante enlaces covalentes fármacos como la aspirina (que tiene un grupo ácido carboxílico en su estructura) y permitiendo una liberación prolongada del fármaco en condiciones fisiológicas lo cual confiere al material original propiedades de antiinflamatorio (Dasgupta, Movva, Chatterjee, & Madras, 2017).



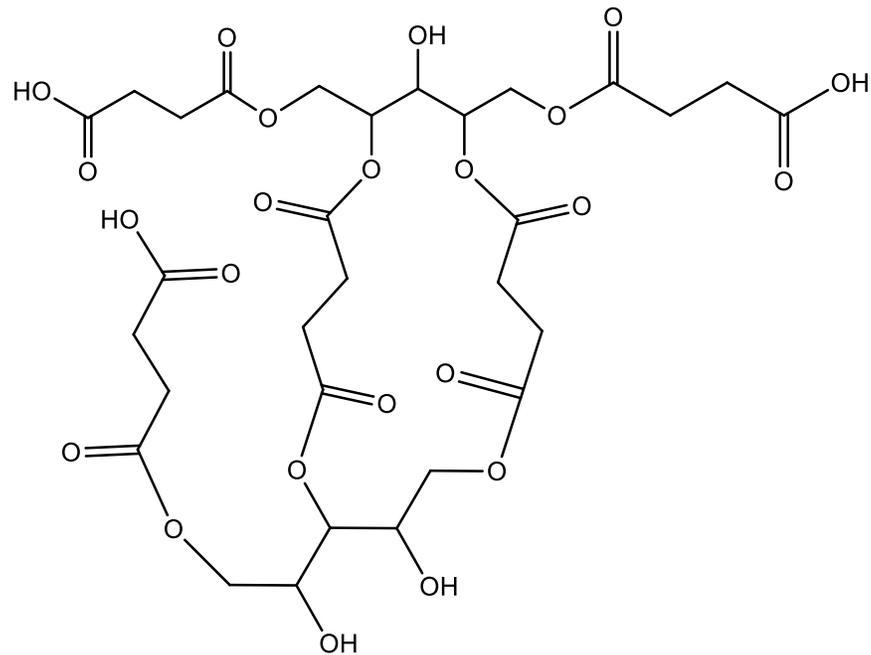
**Figura 15.** Estructura propuesta para un pXS lineal de 11 unidades monoméricas, con PM: 1304 D.

Otra industria que podría beneficiarse de las propiedades de estos nuevos materiales es la industria alimenticia, ya que, los oligómeros de carbohidratos tienen variedad de aplicaciones, gracias a su solubilidad en agua su biocompatibilidad e incluso su aporte calórico (Vázquez, Alonso, Domínguez, & Parajó, 2000).

Por otra parte, los pXS's 2,3 y 16 se diferencian notablemente de los demás materiales obtenidos, el hecho de que presenten características tan diferentes, dado que provienen de los mismos monómeros y en condiciones de síntesis similares tiene que deberse a la estructura molecular del material, probablemente su estructura sea similar a la que se representó en la Figura 16, el espectro infrarrojo de estos materiales muestra una disminución bastante notable en la banda correspondiente a los grupos hidroxilos lo cual evidencia la aparición de ramificaciones, lo anterior se produce debido a un exceso de ácido succínico en la carga de monómeros (relación xilitol:ácido succínico 1:2). Lamentablemente hasta la fecha de escritura de este documento no ha sido posible obtener datos de masa

molecular y resonancia magnética nuclear debido a que no se cuenta con los equipos necesarios para analizar sólidos.

Lo que se sabe es que estos materiales están por debajo de su temperatura de transición vítrea a temperatura ambiente, que son biodegradables, insolubles en los solventes orgánicos convencionales y que tienen la capacidad de absorber moléculas de agua en su estructura.



**Figura 16.** Estructura propuesta para un pXS entrecruzado de 7 unidades monoméricas, probablemente insoluble en agua con PM: 769 D.

De forma general se puede pensar en los productos 2,3 y 16 como resinas termoestables, rígidas y con buena estabilidad mecánica, este tipo de materiales se utilizan en construcción de equipos y tuberías (Martinelli, Froimowicz, & Calderón, 2003). Aunque quizá sea prematuro hablar de aplicaciones para estos materiales específicamente, debido a la poca información que se tiene, se podría pensar que estos sean aptos para las mismas aplicaciones que otros polímeros de naturaleza similar, está reportado que poliésteres similares a base de galactitol son aptos para su aplicación en ingeniería de tejidos debido

a sus propiedades mecánicas, y en la liberación de drogas gracias al conjunto de sus propiedades estructurales (Natarajan, Movva, Madras, & Chatterjee, 2017).

## 7. CONCLUSIONES

Se empleó por primera vez Novozym® 435 para la obtención de polímeros de xilitol y ácido succínico. Los productos obtenidos poseen mayor peso molecular comparado con los pXS sintetizados por vía química tradicional reportados previamente en el grupo de investigación, además, con una reducción de más del 50% del tiempo de reacción.

Las condiciones de reacción empleadas se adecuan a la tendencia actual de investigación en polímeros en cuanto al uso de materias primas de fuentes renovables y económicas, la selección de un medio de reacción, limoneno, que es amigable con el ambiente y se emplea por primera vez en polimerizaciones enzimáticas, el catalizador, que además de ser no tóxico es 100% recuperable y los productos obtenidos sufren procesos de biodegradación en suelo y en Aqua Clean® ACF-SC.

Los materiales obtenidos son polímeros amorfos y termoestables, 15 de los 18 productos sintetizados son solubles en agua, con temperaturas de transición vítrea menores a 10°C; los 3 restantes, insolubles, presentaron una temperatura de transición vítrea entre 45-65 °C, evidenciando la versatilidad del método ya que sólo con variar la proporción entre monómeros se obtienen materiales con propiedades físicas diferentes y que pueden, potencialmente, ser adaptados a aplicaciones distintas.

Los pesos moleculares obtenidos ( $M_w$ : 1520,  $M_w$ : 1226 y  $M_w$  1776 para los pXS's 5,10 y 15), a pesar de ser superiores a lo reportado previamente, son bajos en términos de materiales poliméricos tradicionales, por lo cual estos materiales se clasifican como oligómeros.

El ensayo de biodegradabilidad permitió observar que, al mismo tiempo de experimentación, el suelo natural provoca una mayor degradación que el producto comercial Aqua Clean® ACF-SC, lo cual se explica por la presencia de una mayor variedad de microorganismos.

## 8. RECOMENDACIONES

Para aplicaciones en biopolímeros usualmente se requieren productos con peso molecular superior a 5000, dado que este es el principal interés en los poliésteres biocompatibles sería conveniente estudiar una posible copolimerización de los polímeros obtenidos con otros polímeros provenientes de fuentes naturales con características diferentes con el fin de elevar su peso molecular y así producir materiales con mejores propiedades físicas.

Es conveniente ampliar el estudio de las propiedades físicas y químicas de los pXS's obtenidos, incluyendo pruebas de biodegradabilidad con mayor número de muestras y mayores tiempos, así como otras pruebas de interés como hinchamiento en diferentes solventes, hidrólisis a pH's ácidos y básicos y pruebas reológicas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, S. (2012). Biodegradable Polyesters. En *Polymer Science: A Comprehensive Reference* (pp. 333-361). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00145-X>
- Ajima, A., Yoshimoto, T., Takahashi, K., Tamaura, Y., Saito, Y., & Inada, Y. (1985). Polymerization of 10-hydroxydecanoic acid in benzene with polyethylene glycol-modified lipase. *Biotechnology letters*, 7(5), 303–306.
- Angajala, G., Pavan, P., & Subashini, R. (2016). Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 257-270. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.07.001>
- Azim, H., Dekhterman, A., Jiang, Z., & Gross, R. A. (2006). Candida antarctica Lipase B-Catalyzed Synthesis of Poly(butylene succinate): Shorter Chain Building Blocks Also Work. *Biomacromolecules*, 7(11), 3093-3097.  
<https://doi.org/10.1021/bm060574h>
- Baekeland, L. H. (1909). The Synthesis, Constitution, and Uses of Bakelite. *Industrial & Engineering Chemistry*, 1(3), 149–161.
- Balaji, A. B., Pakalapati, H., Khalid, M., Walvekar, R., & Siddiqui, H. (2018). Natural and synthetic biocompatible and biodegradable polymers. En *Biodegradable and Biocompatible Polymer Composites* (pp. 3-32). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100970-3.00001-8>
- Bilal, M., Prehm, M., Njau, A., Samiullah, M., Meister, A., & Kressler, J. (2016). Enzymatic Synthesis and Characterization of Hydrophilic Sugar Based Polyesters and Their

Modification with Stearic Acid. *Polymers*, 8(12), 80.

<https://doi.org/10.3390/polym8030080>

Bruggeman, J. P., Bettinger, C. J., & Langer, R. (2010). Biodegradable xylitol-based elastomers: In vivo behavior and biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 95A(1), 92-104. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32733>

Carvajal, A. (2007). Energía: La nueva agenda del sector azucarero. Recuperado de <http://www.asocana.org/StaticContentFull.aspx?SCid=167>

Ciulik, C., Safari, M., Martínez de Ilarduya, A., Morales-Huerta, J. C., Iturrospe, A., Arbe, A., ... Muñoz-Guerra, S. (2017). Poly(butylene succinate- ran - $\epsilon$ -caprolactone) copolyesters: Enzymatic synthesis and crystalline isodimorphic character. *European Polymer Journal*, 95, 795-808.

<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.05.002>

Dasgupta, Q., Movva, S., Chatterjee, K., & Madras, G. (2017). Controlled release from aspirin based linear biodegradable poly(anhydride esters) for anti-inflammatory activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 528(1-2), 732-740.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.065>

de Freitas Branco, R., dos Santos, J. C., & da Silva, S. S. (2011). A novel use for sugarcane bagasse hemicellulosic fraction: Xylitol enzymatic production. *Biomass and Bioenergy*, 35(7), 3241-3246. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.02.014>

Debuissy, T., Pollet, E., & Avérous, L. (2016). Enzymatic Synthesis of a Bio-Based Copolyester from Poly(butylene succinate) and Poly(( R )-3-hydroxybutyrate): Study of Reaction Parameters on the Transesterification Rate. *Biomacromolecules*, 17(12), 4054-4063. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01494>

Debuissy, T., Pollet, E., & Avérous, L. (2017). Synthesis and characterization of fully biobased poly(propylene succinate-ran-propylene adipate). Analysis of the

- architecture-dependent physicochemical behavior. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 55(17), 2738-2748. <https://doi.org/10.1002/pola.28668>
- Delmer, D. P. (1999). Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study. *Annual review of plant biology*, 50(1), 245–276.
- Europäische Kommission (Ed.). (1998). *FAIR Programme: renewable biomaterials ; the green chemical and polymer integrated chain ; fourth framework programme project catalogue*. Luxembourg: Office for Official Publications of the EC.
- Griskey, R. G. (1995). *Polymer Process Engineering*. Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-0581-1>
- Gross, R. A., Kumar, A., & Kalra, B. (2001). Polymer Synthesis by In Vitro Enzyme Catalysis. *Chemical Reviews*, 101(7), 2097-2124. <https://doi.org/10.1021/cr0002590>
- Hricovíniová, Z. (2013). Xylans are a valuable alternative resource: Production of d-xylose, d-lyxose and furfural under microwave irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 98(2), 1416-1421. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.066>
- Hu, J., Gao, W., Kulshrestha, A., & Gross, R. A. (2006). “Sweet Polyesters”: Lipase-Catalyzed Condensation–Polymerizations of Alditols. *Macromolecules*, 39(20), 6789-6792. <https://doi.org/10.1021/ma0612834>
- Kobayashi, S. (2015). Enzymatic ring-opening polymerization and polycondensation for the green synthesis of polyesters: ENZYMATIC RING-OPENING POLYMERIZATION AND POLYCONDENSATION. *Polymers for Advanced Technologies*, 26(7), 677-686. <https://doi.org/10.1002/pat.3564>
- Kobayashi, S. (2017). Green polymer chemistry: new methods of polymer synthesis using renewable starting materials. *Structural Chemistry*, 28(2), 461-474. <https://doi.org/10.1007/s11224-016-0861-3>

- Liu, S. (2017). Enzymes. En *Bioprocess Engineering* (pp. 297-373). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63783-3.00007-1>
- Liz-Andela, N. I., Benitez, R., Martin-Franco, J., & Rojas, G. (2017). Tunable polyesterification of xylitol: from linear to crosslinked structures. *Polymer International*, 66(4), 532-539. <https://doi.org/10.1002/pi.5301>
- Martinelli, M., Froimowicz, P., & Calderón, M. (2003). Materiales Poliméricos Funcionalizados. Parte I: Síntesis y Polimerización de monómeros funcionalizados., 18.
- Mazzocchetti, L., Scandola, M., & Jiang, Z. (2009). Enzymatic Synthesis and Structural and Thermal Properties of Poly( $\omega$ -pentadecalactone-co -butylene-co-succinate). *Macromolecules*, 42(20), 7811-7819. <https://doi.org/10.1021/ma901338v>
- Natarajan, J., Movva, S., Madras, G., & Chatterjee, K. (2017). Biodegradable galactitol based crosslinked polyesters for controlled release and bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 77, 534-547.  
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.160>
- Nie, W.-C., Dang, H.-C., Wang, X.-L., Song, F., & Wang, Y.-Z. (2017). One-step enzymatic synthesis of poly( p -dioxanone- co -butylene- co -succinate) copolyesters with well-defined structure and enhanced degradability. *Polymer*, 111, 107-114.  
<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2017.01.055>
- Noordover, B. A. J., van Staalduinen, V. G., Duchateau, R., Koning, C. E., van Benthem, Mak, M., ... van Haveren, J. (2006). Co- and Terpolyesters Based on Isosorbide and Succinic Acid for Coating Applications: Synthesis and Characterization. *Biomacromolecules*, 7(12), 3406-3416. <https://doi.org/10.1021/bm060713v>

- Okumura, S., Iwai, M., & Tsujisaka, Y. (1983). Synthesis of Estolides During Hydrolysis of Castor Oil by *Geotrichum candidum* Lipase. *Journal of Japan Oil Chemistry Society (Yukagaku)*, 32, 271-272.
- Richard A. Gross, & Bhanu Kalra. (2002). Biodegradable Polymers for the Environment. *Science*, 297(5582), 803-807.
- Riyajan, S.-A. (2015). Robust and biodegradable polymer of cassava starch and modified natural rubber. *Carbohydrate Polymers*, 134, 267-277.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.038>
- Rueda, G. Z., Gutiérrez, C., Mistretta, G., Peralta, F., Golato, M., & Ruiz, M. (2016). Determinación del contenido de humedad del bagazo de caña de azúcar por medio de microondas, 6.
- Salihu, A., & Alam, M. Z. (2015). Solvent tolerant lipases: A review. *Process Biochemistry*, 50(1), 86-96. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.019>
- Saxena, R. K., Saran, S., Isar, J., & Kaushik, R. (2017). Production and Applications of Succinic Acid. En *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 601-630). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00027-0>
- Shoda, S., Uyama, H., Kadokawa, J., Kimura, S., & Kobayashi, S. (2016). Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis. *Chemical Reviews*, 116(4), 2307-2413. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00472>
- Smith, J. K. (1988). World War II and the Transformation of the American Chemical Industry. En *Science, Technology and the Military* (pp. 307–322). Springer.
- Solenzal, A. I. N., Ríos, M. D. de los, Bueno, M. G., Santana, E. M., & Martínez, E. A. (2005). Tecnología del proceso de obtención de licores de Xilosa a partir de bagazo de caña, para la producción biotecnológica de Xilitol. *Brazilian Journal of Food Technology*, 5° SIPAL.

- Sonseca, A., & El Fray, M. (2017). Enzymatic synthesis of an electrospinnable poly(butylene succinate-co-dilinoleic succinate) thermoplastic elastomer. *RSC Advances*, 7(34), 21258-21267. <https://doi.org/10.1039/C7RA02509B>
- Steinbüchel, A. (1995). Use of Biosynthetic, Biodegradable Thermoplastics and Elastomers from Renewable Resources: The Pros and Cons. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 32(4), 653-660. <https://doi.org/10.1080/10601329508010278>
- Vázquez, M. ., Alonso, J. ., Domínguez, H., & Parajó, J. . (2000). Xyloligosaccharides: manufacture and applications. *Trends in Food Science & Technology*, 11(11), 387-393. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00031-0)

## ANEXOS

### ANEXO A Ensayos preliminares.

En esta sección se plasman los ensayos iniciales en la investigación, la información obtenida en los mismos fue importante para el planteamiento del diseño experimental.

Primeras aproximaciones a la síntesis de pXS por vía enzimática con N435.

#Ensayo	Relación AS: X*	Tiempo (h)	% Enzima	Temperatura (°C)	Medio de reacción	Resultado
1	1:1	24	10	35	Éter dietílico	N.R
2	1:1	24	10	45	THF	N.R
3	1:1	1	10	95	Sin solvente	Reacción interrumpida por burbujeo excesivo.
4	1:1	12	10	140	Limoneno	Líquido viscoso color marrón
5	1:1	12	5	140	Limoneno	Líquido viscoso color marrón
6	1:1	12	10 (Reutilizada)	140	Limoneno	Líquido viscoso color marrón

\* AS (Ácido succínico): X (Xilitol).

Todos los ensayos se llevaron a cabo en un matraz de fondo redondo con agitación magnética, adaptado a un condensador recto y sobre trampa de arena. Los primeros

intentos de síntesis no produjeron el resultado deseado, de hecho, no produjeron ningún producto (Tabla 7, Aproximaciones 1 y 2). Los medios de reacción éter dietílico y THF fueron descartados debido a su bajo punto de ebullición, lo que restringía la temperatura de la reacción, tampoco se pudo llevar a cabo sin solvente (Tabla 7, Aproximación 3) debido a la formación de burbujas que desplazaban el contenido del matraz hacia el condensador. Por otra, parte el limoneno como medio de reacción produjo buenos resultados gracias a su alto punto de ebullición lo que permitió la formación de un producto viscoso color marrón, el buen resultado producido al usar este solvente y la naturaleza del mismo hizo que se optara por utilizar limoneno para todos los ensayos posteriores y en el diseño experimental

Los otros parámetros (Tiempo, Relación Ácido Succínico: Xilitol, % Enzima y Temperatura) fueron seleccionados como variables del diseño.

**ANEXO B** CD con Espectros IR, DSC y TGA de los productos obtenidos.