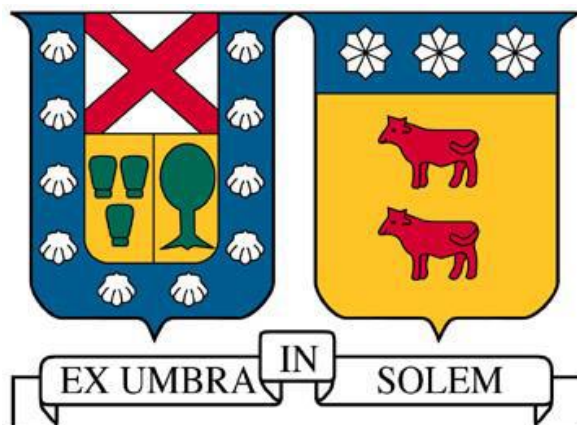


UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
SANTIAGO – CHILE



**“PRODUCCIÓN DE POLICAPROLACTONA A PARTIR DE UNA
REACCIÓN BIOCATALIZADA EN UN MEDIO CON CO₂
SUPERCRÍTICO”**

DAVID ALEJANDRO HUSERMAN OTERO

MEMORIA DE TITULACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO CIVIL QUÍMICO

PROESOR GUÍA

DR. GONZALO NÚÑEZ MONTTOYA

PROFESORA CO-REFERENTE

DRA. LORETO PARRA ATALA

NOVIEMBRE 2017

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a CONICYT, ya que la investigación está realizada dentro del marco del proyecto FONDEF, idea ID14I10219, titulada “Desarrollo de un proceso de síntesis de policaprolactona (PCL) a partir de ciclohexanona, combinando dos reacciones biocatalíticas mediante el uso de dióxido de carbono supercrítico”, en asociación con la Pontificia Universidad Católica de Chile, la Universidad de los Andes, la Universidad Técnica Federico Santa María, Cells for Cells S.A, y Laboratorios Euromed Chile S.A.

Agradecer a Loreto Parra, la líder de la investigación, por confiar tanto en mi como en mi profesor guía para la realización de esta investigación, a Juan Pablo Acevedo por la orientación en el análisis de muestras, a Natalia Carathanassis por el apoyo y capacitación dentro del laboratorio, y al Profesor Gonzalo Núñez, tanto como por ofrecerme participar en el proyecto como por la guía brindada durante toda la memoria. Por otra parte, agradecer a Jeamilette, Victoria, Jorge y Roberto, los apoyos del IQA que estuvieron siempre dispuestos a ayudarme en el laboratorio, incluso cuando llegaba a última hora.

A los profesores del departamento con los que hice ayudantía, ya que sin duda enseñar a los demás es una herramienta poderosa para reafirmar lo aprendido. Profesores Patricio Núñez, Daniel Navia, Daniel Ramírez, Rodrigo Benavides y Arturo Bejarano, muchas gracias por continuar enseñándome hasta el final, en especial Daniel Navia, quien siempre estuvo dispuesto a orientarme en lo que fuera.

A los amigos que deja la Universidad, Osvaldo, Víctor, Josefa, Camilo, Katherine, Pablo, Cristóbal. Por esas largas noches de estudio y de informes, y por esas noches de relajó o de carrete donde compartimos risas y mucho más. Gracias a ustedes amigos por seguir presentes, espero que siga así durante los años.

A mi familia un especial agradecimiento por la paciencia, el apoyo y la confianza en este proceso, tanto de memoria como de carrera, que tras largos años llega a su fin, incluyendo un cambio de Universidad y un intercambio en el INSA de Lyon, Francia, donde empecé a abrirme al mundo y conocí lugares y personas que nunca pensé. Si bien el proceso fue largo, todas las experiencias en el camino han sido enriquecedoras, y me han ido formando como persona, por lo que no me arrepiento de nada. Todo esto es posible gracias a ustedes.

Resumen

Durante los últimos años, la obtención de materiales biodegradables amigables con el medioambiente y el cuerpo ha ido en aumento. Particularmente, la PCL asoma como un polímero biodegradable con diversas aplicaciones, tanto en ingeniería de tejidos como en sistema de liberación de fármacos. La producción convencional de PCL usa solventes orgánicos y catalizadores metálicos o ácidos que pueden ser perjudiciales para la salud y el medioambiente, repercutiendo en su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Debido a esto, buscando una producción “verde”, se plantea el objetivo general de la investigación que es estudiar, montar y poner en marcha un sistema experimental para producir PCL en un medio con CO₂ supercrítico, catalizado mediante la enzima inmovilizada Lipasa B de *Candida antarctica*.

Los resultados obtenidos son concluyentes. Primero que todo se comprueba la obtención de PCL mediante resonancia magnética nuclear a partir de las distintas condiciones propuestas, al presentar espectros similares a los de la PCL comercial, lo que valida a su vez el montaje y metodología experimental propuestas. Las variables estudiadas que influyen en la reacción son la presión del sistema, el tiempo de reacción y el contenido de agua en el monómero.

Con respecto a la presión del sistema, se infiere con un 90% de certeza que las reacciones llevadas a cabo a 14,5 MPa entregaron PCL de mayor peso molecular que las realizadas a 20 MPa. El tiempo del sistema no resultó ser significativo con un 90% de confianza, ya que reacciones llevadas a 2 y 4,5 horas entregaron PCL de peso molecular similar, mientras que el contenido de agua en el monómero resultó ser la variable más influyente, llegando a obtener PCL de 21.000 Da a partir de un monómero de 97% de pureza, frente a los obtenidos con un monómero de 99% de pureza (6.200 Da). En base a los resultados obtenidos, se demuestra la posibilidad de producir PCL en el sistema experimental diseñado y puesto en marcha a partir de un proceso no convencional de producción.

Así, es posible proponer un diseño factorial como trabajo futuro, basándose en esta investigación, para poder evaluar el efecto de otras variables o a su vez ampliar el rango de las variables ya estudiadas para analizar el efecto de cada una de éstas por separado o incluso el efecto entre la combinación de variables.

Abstract

In recent years, production of materials friendly to the environment and the body has been increasing. In particular, PCL appears as a biodegradable polymer with diverse applications, both in tissue engineering and in drug delivery systems. Conventional PCL production, uses organic solvents and metal or acid catalysts, which can be harmful to the health and the environment, influencing the bioresorbability and biocompatibility. Thus, looking for a “green” production, the general objective of this research is to study, assembly and start up an experimental system to produce PCL in a supercritical CO₂ environment, catalyzed by the immobilized enzyme Lipase B from *Candida antarctica*.

The results obtained are conclusive. First of all, it is verified by nuclear magnetic resonance the PCL production from the different proposed conditions, presenting similar spectra compared to commercial PCL, which validates at the same time the experimental setup and the proposed methodology. The studied variables that influence the reaction are the system pressure, time reaction and water content in the monomer.

Regarding to the system pressure, it is inferred with 90% of certainty, that the reactions performed at 14,5 MPa give PCL with higher molecular weight than those performed at 20 MPa. The time reaction turned out not to be significant, with 90% of certainty, since reactions performed for 2 and 4,5 hours give PCL with similar molecular weight, while the water content in the monomer turned out to be the most influential variable, producing PCL up to 21.000 Da from a 97% purified monomer, versus 6.200 Da from a 99% purified monomer. Based on the results obtained, it is demonstrated the possibility to produce PCL in the experimental system designed and started up, from a non-conventional production process.

Thus, it is possible to propose a factorial design as future work, based on this research, to be able to evaluate the effect of other variables or expand the range of studied variables to analyze the effect of each one separately or even the effect between the combination of variables.

Índice de contenido

Agradecimientos	2
Resumen	3
Abstract	4
1. Introducción	10
1.1. Polímeros biodegradables.....	11
1.2. Degradación de un polímero	12
1.3. Poli ϵ -caprolactona.....	13
1.3.1. Degradación de la PCL.....	14
1.3.2. Aplicación de la PCL en biomedicina	15
1.3.3. Producción de PCL.....	19
1.3.4. Catalizadores y condiciones para una ROP.....	21
1.3.5. Dióxido de carbono supercrítico como alternativa de producción de PCL....	23
1.3.6. Estudios previos sobre producción de PCL con $scCO_2$	27
1.3.7. Estudio propuesto en esta investigación.....	32
2. Objetivos	33
3. Materiales y métodos	34
3.1. Solventes y reactivos.....	34
3.2. Montaje y puesta en marcha del sistema experimental	34
3.3. Condiciones operacionales propuestas	34
3.4. Procedimiento experimental.....	36
3.5. Método de análisis.....	39

4. Resultados y discusión	40
4.1. Validación del montaje y la puesta en marcha del sistema experimental	40
4.2. Validación del polímero obtenido mediante RMN	41
4.3. Validación de los resultados mediante comparación con la literatura.....	43
4.4. Estudio de la influencia de las variables estudiadas mediante intervalos de confianza.....	47
4.4.1. Estudio de la presión del sistema.....	49
4.4.2. Estudio del tiempo de reacción.....	50
4.4.3. Estudio del contenido de agua en el sistema	52
4.5. Cierre de balances de materia	56
5. Conclusiones y trabajo futuro	60
Nomenclatura	64
Referencias	65
Anexos	75

Índice de Figuras

- Figura 1.** Posibles modificaciones y formulaciones de la PCL para alterar sus propiedades según el requerimiento. (Adaptado de Dash & Konkimalla, 2012). 15
- Figura 2.** Diagrama de fases de un componente puro, donde se destaca la región del estado supercrítico. (Adaptado de Brunner, 2005). 25
- Figura 3.** Variaciones en la solubilidad de una sustancia de baja volatilidad, por ejemplo ϵ -CL, en función de la temperatura, la presión del proceso y la densidad del solvente. (líneas segmentadas corresponden a condiciones isobáricas, y las líneas punteadas corresponden a condiciones de densidad constante). (Adaptado de Brunner, 2005)..... 26
- Figura 4.** Mecanismo de polimerización por apertura de anillos catalizado mediante una lipasa, donde se observa el ataque nucleofílico que realiza el grupo carboxilo presente en el radical, por ejemplo agua, al complejo formado por la enzima y el monómero. (Adaptado de Labet & Thielemans, 2009). 32
- Figura 5.** Montaje experimental utilizado para la reacción. (Adaptado de Manual de Operación HPE lab500, ser no 365, Eurotechnica GmbH, Alemania)..... 37
- Figura 6.** Espectros obtenidos mediante RMN. Los dos primeros corresponden a dos muestras analizadas (espectros azul y verde), mientras que el último corresponde al espectro obtenido para PCL comercial (espectro rojo)..... 41
- Figura 7.** Espectro de protones superpuestos. Se destacan los picos correspondientes a los distintos grupos funcionales que componen la cadena polimérica, junto con la molécula de PCL..... 42

Figura 8. Intervalos de confianza del peso molecular obtenido para cada una de las condiciones operacionales estudiadas. El intervalo amarillo (condición 1) corresponde a una ROP de 4,5 h; 14,5 MPa y 99% de pureza de ϵ -CL. El intervalo verde (condición 2) corresponde a una ROP de 4,5 h; 20 MPa y 99% de pureza de ϵ -CL. El intervalo rojo (condición 3) corresponde a una ROP de 2 h; 20 MPa y 99% de pureza de ϵ -CL. El intervalo azul (condición 4) corresponde a una ROP de 2 h; 20 MPa y 97% de pureza de ϵ -CL. 48

Figura 9. Intervalos de confianza de las recuperaciones en cada una de las condiciones operacionales estudiadas para analizar las pérdidas del sistema. El intervalo morado (condición 1) corresponde a una ROP de 4,5 h; 14,5 MPa y 99% de pureza de ϵ -CL. El intervalo verde (condición 2) corresponde a una ROP de 4,5 h; 20 MPa y 99% de pureza de ϵ -CL. El intervalo rojo (condición 3) corresponde a una ROP de 2 h; 20 MPa y 99% de pureza de ϵ -CL. El intervalo azul (condición 4) corresponde a una ROP de 2 h; 20 MPa y 97% de pureza de ϵ -CL. 58

Figura 10. Intervalos de confianza del rendimiento aproximado obtenido para cada una de las condiciones operacionales estudiadas. El intervalo morado (condición 1) corresponde a una ROP de 4,5 h; 14,5 MPa y 99% de pureza de ϵ -CL. El intervalo verde (condición 2) corresponde a una ROP de 4,5 h; 20 MPa y 99% de pureza de ϵ -CL. El intervalo rojo (condición 3) corresponde a una ROP de 2 h; 20 MPa y 99% de pureza de ϵ -CL. El intervalo azul (condición 4) corresponde a una ROP de 2 h; 20 MPa y 97% de pureza de ϵ -CL. 59

Figura 11. Espectro de protones obtenido mediante RMN para PCL comercial (Polymorph, 80.000 Mw, China). 80

Figura 12. Espectro de protones obtenido mediante RMN para PCL comercial (Polymorph, 80.000 Mw, China), donde se destacan las amplitudes de los distintos picos. 81

Figura 13. Valor crítico F obtenido a partir de la tabla de distribución F de Fisher para dos grados de libertad tanto en el numerador como en el denominador, correspondiente al 5% de los datos. 83

Índice de Tablas

Tabla 1. Rangos típicos de las propiedades de PCL. (Adaptado de Labet & Thielemans, 2009).....	13
Tabla 2. Valores característicos de las propiedades físicas de un fluido supercrítico. (Adaptado de Brunner, 2005).	25
Tabla 3. Condiciones operacionales y resultados obtenidos por Loeker et al., 2004 para una ROP de ε -CL, catalizada mediante CALB en scCO ₂ . (Adaptado de Loeker et al., 2004). ..	28
Tabla 4. Condiciones operacionales y resultados obtenidos por Santos et al., 2012 para una ROP de ε -CL, catalizada mediante CALB en scCO ₂ . (Adaptado de Santos et al., 2012). ...	30
Tabla 5. Resultados obtenidos para una ROP de ε -CL catalizada mediante CALB en scCO ₂ para cada una de las condiciones operacionales estudiadas.	43
Tabla 6. Intervalos de confianza para las distintas condiciones operacionales estudiadas, junto con los valores a partir de los cuales fueron obtenidos.	48
Tabla 7. Recuperaciones y rendimientos aproximados para cada una de las raciones realiadas. Se tabulan tanto la masa recuperada (masa total en canastos y colector luego de la reacción) como la masa de PCL obtenida (masa contenida dentro de los canastos luego de la reacción).	57

1. Introducción

Un polímero es considerado una macromolécula, debido al gran tamaño de su estructura. Dicha estructura está conformada por una unidad básica que se repite de manera relativamente ordenada, denominada monómero (Rodríguez *et al.*, 2015).

Con respecto a la estructura de los polímeros, cada polímero posee propiedades estructurales y mecánicas determinadas, que dependen de la estructura que éste posea. Cada polímero posee una estructura molecular determinada, que le confiere ciertas propiedades al polímero, que a su vez influyen en la estructura macromolecular (supramolecular) que determina su composición y la interacción con otras moléculas (Wagner *et al.*, 2006)

Durante el auge de los polímeros biodegradables en los años 1970 y 1980, la policaprolactona (poli(ϵ -caprolactona), PCL) fue ampliamente usada en el campo de los biomateriales y en un gran número de dispositivos de liberación de fármacos, debido a su cinética de degradación adaptable, sus ventajosas propiedades mecánicas e incluso la posibilidad de agregarle grupos funcionales para hacer al polímero más hidrofílico. Sin embargo, debido a que el periodo de degradación de la PCL es largo, tomando de 3 a 4 años en degradarse, su popularidad fue rápidamente reemplazada por polímeros reabsorbibles de mayor rapidez, estudiados en aplicaciones que requerían liberar el fármaco encapsulado dentro de días o semanas, logrando una reabsorción completa entre 2 a 4 meses luego de ser implantados. Cercano a la década de los 2000, resurgió el interés por la PCL, junto con el inicio de una nueva disciplina llamada ingeniería de tejidos, debido a sus propiedades reológicas y viscoelásticas superiores sobre otros poliésteres alifáticos equivalentes, que permiten su fabricación y manipulación en un gran número de implantes y dispositivos. A partir de su producción relativamente barata y la aprobación de la FDA (*Food and Drug Administration*, por sus siglas en inglés), se presenta una vitrina prometedora para el diseño y fabricación de implantes degradables a largo plazo que pueden ser manipulados física, química y biológicamente para presentar cinéticas de degradación adaptables para encajar en cualquier sitio anatómico en particular (Woodruff & Hutmacher, 2010).

1.1. Polímeros biodegradables

Los materiales biodegradables pueden ser de origen natural o sintético. Si bien el concepto de biodegradabilidad está más ligado a biopolímeros naturales, los polímeros sintéticos también pueden cumplir con dicha propiedad gracias al manejo de las condiciones de operación para la obtención de éstos, de tal manera de optimizar las propiedades que se desea obtener, entre éstas la biocompatibilidad, la cual determina la compatibilidad de la molécula con el organismo y la biodegradación de ésta (Doppalapudi *et al.*, 2014).

Dentro de los polímeros biodegradables sintéticos se encuentran el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA), el polihidroxibutirato (PHB) y la PCL. Los polímeros PLA, PGA y sus copolímeros (PLGA) son usados con mayor frecuencia en ingeniería de tejidos, ya que han demostrado ser biocompatibles y degradados en componentes no tóxicos, ganando así la aprobación de la FDA para su uso clínico. La PCL ha sido recientemente estudiada para mejorar sus propiedades de degradación, por lo que ha sido utilizada como material de sutura y ha surgido como un polímero candidato en la ingeniería de tejidos óseos. De hecho, muestra propiedades mecánicas aptas para ser utilizada como soporte en aplicaciones de sustitución ósea, donde las propiedades mecánicas deben ser mantenidas por al menos 6 meses mientras ocurre la regeneración del hueso (Armentano *et al.*, 2010).

Una de las características deseables en cualquier soporte polimérico implantable, debe ser la sincronización de la degradación del polímero con el reemplazo de tejido natural producido por las células. Las cinéticas de degradación y reabsorción del soporte son asignadas para permitir a las células cultivadas proliferar y secretar su propia matriz extracelular mientras éste simultáneamente se reabsorbe, dejando espacio suficiente para la proliferación celular y el crecimiento de tejido nuevo. El soporte físico mediante armazones tridimensionales se mantiene hasta que el tejido creado tenga suficiente integridad mecánica para soportarse a sí mismo (Hutmacher, 2000).

Debido al gran auge que han tenido los polímeros biodegradables estas últimas décadas, la producción se ha ido masificando cada vez más y junto con esto, los residuos poliméricos han ido aumentando considerablemente. Es por esto que la introducción de polímeros biodegradables ha sido el reto de la ciencia de los materiales durante los últimos 20 años.

Sin ir más lejos, mientras algunos plásticos están siendo reciclados y reutilizados, la mayoría son dispuestos en rellenos sanitarios. En el 2005, los plásticos fueron recuperados en una razón menor al 10% en los Estados Unidos (Lim *et al.*, 2008).

1.2. Degradación de un polímero

La degradación de un polímero se debe principalmente a mecanismos químicos, mecánicos, térmicos, luminosos y biológicos. Entre ellos, la degradación química es el principal mecanismo que predomina en la degradación de un polímero. La degradación química es un proceso inducido por el contacto del polímero con productos químicos reactivos, siendo la hidrólisis uno de los tipos de degradación química más frecuentes. La hidrólisis es un mecanismo de degradación que ocurre cuando el material entra en contacto con un medio acuoso, lo que causa la ruptura de puentes de hidrógeno intermoleculares, hidratación de las moléculas y finalmente la ruptura de los enlaces estables que componen la molécula para resultar en moléculas más pequeñas de simple absorción. Dentro de los parámetros que controlan la hidrólisis, destacan la hidrofobicidad del polímero, la temperatura y pH del medio y el tiempo de degradación. (Lucas *et al.*, 2008).

Se entiende por biodegradabilidad la capacidad de una sustancia de descomponerse *in vitro* en los elementos químicos básicos que la componen, involucrando procesos como hidrólisis, oxidación de grupos funcionales, rotura de enlaces, entre otros, debido a la acción de organismos biológicos (enzimas, bacterias o microorganismos), en un periodo relativamente corto de tiempo (Leja & Lewandowicz, 2010).

Cuando se habla de polímeros es importante considerar que algo que es biodegradable no necesariamente implica ser bioreabsorbible, que significa ser degradado y separado de su sitio de acción *in vivo*, resultando en una eliminación total de los materiales externos iniciales y degradación de los subproductos sin efectos secundarios residuales (Vert *et al.*, 1992).

1.3. Poli ϵ -caprolactona

Dentro de todos los polímeros biodegradables usados en medicina, la PCL asoma como uno de los más investigados en este último tiempo, debido a sus propiedades mecánicas, biodegradabilidad y biocompatibilidad con el organismo y miscibilidad con una amplia gama de polímeros para poder formar copolímeros y poder complementar y mejorar las propiedades de acuerdo a lo requerido para las distintas aplicaciones vistas con anterioridad.

La PCL es un poliéster alifático compuesto de unidades repetitivas de ϵ -caprolactona. Es un polímero semicristalino y sus propiedades mecánicas, térmicas y físicas dependen de su peso molecular y su grado de cristalinidad, por lo que las propiedades que se obtenga dependen fuertemente del resultado del proceso de obtención de este polímero. Los rangos de los valores típicos de las propiedades físicas se muestran en la Tabla 1 (Labet & Thielemans, 2009).

Tabla 1. Rangos típicos de las propiedades de PCL. (Adaptado de Labet & Thielemans, 2009).

Propiedades	Rango
Peso molecular promedio en número (M_n / Da)	530 – 630.000
Densidad ($\rho / \text{kg m}^{-3}$)	(1,07 – 1,20)x10 ⁶
Temperatura de transición vítrea ($T_g / ^\circ\text{C}$)	(-65) – (-60)
Temperatura de fusión ($T_m / ^\circ\text{C}$)	56 – 65
Temperatura de descomposición ($^\circ\text{C}$)	350
Viscosidad intrínseca ($\eta / \text{m}^3 \text{kg}^{-1}$)	9x10 ⁻⁴
Resistencia a la tracción (σ / MPa)	4 – 785
Módulo de Young (E / MPa)	210 – 440
Elongación de ruptura ($\epsilon / \%$)	20 – 1.000

A temperatura ambiente, la PCL es altamente soluble en cloroformo, diclorometano, tetracloruro de carbono, benceno, tolueno, ciclohexanona y 2-nitropropano, además es ligeramente soluble en acetona, 2-butanona, acetato de etilo, dimetilformaldehído, y acetonitrilo. Por el contrario, la PCL es insoluble en alcoholes, bencina, dietil éter y agua (Sinha *et al.*, 2004).

1.3.1. Degradación de la PCL

En particular, la PCL puede ser biodegradada mediante organismos externos al cuerpo (bacterias y hongos), pero no puede ser biodegradada en organismos animales y humanos debido a la falta de enzimas adecuadas para su degradación. Esto no necesariamente significa que no puede ser bioreabsorbida, si no que más bien el proceso toma mucho más tiempo, propagándose primero vía degradación hidrolítica. Es ampliamente aceptado que la degradación hidrolítica de ésteres puede originarse mediante mecanismos de degradación en la superficie y en masa (Vert, 2009).

La degradación o erosión de la superficie involucra la ruptura hidrolítica de la cadena principal de la PCL sólo en la superficie. Esto resulta en un adelgazamiento del polímero en el tiempo sin afectar el peso molecular del volumen interno de éste. La degradación en masa ocurre cuando el agua penetra completamente en el volumen de la matriz de la PCL, causando la hidrólisis a través de toda la matriz polimérica. Esto da lugar a rupturas hidrolíticas aleatorias de cadenas y provoca una reducción general del peso molecular. Si las moléculas de agua pueden difundir en el volumen del polímero, la hidrólisis permite que monómeros y oligómeros difundan hacia el exterior, dando paso a la erosión en la superficie gradualmente (Ginde & Gupta, 1987).

De estudios de degradación encontrados en la literatura, se puede deducir que la PCL experimenta una degradación en dos etapas; primero la hidrólisis no enzimática y luego las partes de menor peso molecular (menor a 3.000 Da) son degradadas por el medio intracelular lo que implicaría que la PCL puede ser completamente reabsorbida y degradada mediante mecanismos intracelulares una vez el peso molecular sea reducido (Woodward *et al.*, 1985).

El ritmo de la hidrólisis y por ende de degradación de la PCL puede ser alterado mediante copolimerización con otras lactonas, glicólidos o láctidos (Dash & Konkimalla, 2012). Sin ir más lejos, es común el diseño y la preparación de polímeros multicomponentes como estrategia viable para el desarrollo de innovadores biomateriales multifuncionales de acuerdo al requerimiento de la aplicación en particular. La Fig. 1 muestra las diversas posibilidades de modificaciones y formulaciones que tiene la PCL.



Figura 1. Posibles modificaciones y formulaciones de la PCL para alterar sus propiedades según el requerimiento. (Adaptado de Dash & Konkimalla, 2012).

1.3.2. Aplicación de la PCL en biomedicina

Debido a su alta permeabilidad a muchos fármacos, excelente biocompatibilidad y la capacidad de ser totalmente eliminada del cuerpo, la PCL es idónea para aplicaciones de liberación controlada de fármacos (Sinha *et al.*, 2004).

La administración de medicamentos mediante microesferas de PCL tiene como ventajas el poder ser ingeridos o inyectados, mayor eficiencia y eficacia terapéutica, prolongada actividad biológica, el control sobre la liberación del medicamento, disminuyendo la frecuencia de administración (Freiberg & Zhu, 2004).

Particularmente, las ventajas de la PCL sobre otros polímeros para éste tipo de aplicación, son la tendencia casi despreciable a formar un ambiente ácido durante la degradación en comparación con otros polímeros como PLA y PGA. Además, ya que la biodegradación de la PCL es lenta en comparación con otros polímeros, es más apta para distribución a largo plazo con una extensión de un periodo de más de un año y con la mezcla apropiada, la distribución puede ser incrementada o reducida según se requiera (Woodruff & Hutmacher, 2010).

Las nanoesferas de PCL son sistemas de liberación coloidales que actúan como compartimientos portadores para drogas y otras moléculas activas con un rango de tamaños que varían entre 10 y 1.000 nm. El tamaño de las nanoesferas permite que puedan ser administradas por vía intravenosa o inyectadas, que, a diferencia de otros sistemas coloidales, no obstruye ni las agujas ni los capilares. Éste tipo de aplicación puede ser usada para focalización selectiva mediante el sistema retículoendotelial en el hígado y en células fagocíticamente activas. La eficacia de estas partículas coloidales como portadores de fármacos está estrechamente relacionada a la interacción con proteínas y enzimas en diferentes fluidos del cuerpo (Zhang & Uludağ, 2009).

Durante las últimas cuatro décadas, diversos estudios han sido publicados en relación a la biocompatibilidad de suturas fabricadas a partir de poliésteres alifáticos, principalmente a partir de glicólidos, encontrando en algunos casos respuestas inflamatorias. En respuesta, copolímeros de bloques de PCL y glicólidos están siendo vendidos como suturas de monofilamentos por la empresa Ethicon, Inc. (Somerville, NJ), bajo la marca Monocryl, ofreciendo menor rigidez en comparación con polímeros poliglicólidos puros (Woodruff & Hutmacher, 2010).

Dentro de las muchas aplicaciones que tiene la PCL, se encuentra la fabricación de capas ultra delgadas para vendaje de heridas cutáneas (Ng *et al.*, 2007) y también como dispositivo para la liberación del antiséptico químico clorhexidina (Medlicott *et al.*, 1992).

Al mezclar PCL con el complejo polimérico antimicrobial, povidona yodada, se obtiene un biomaterial uretral de reducida incrustación. En dicha investigación se demuestra que existe una relación entre el grado de degradación del polímero y la resistencia a la incrustación; la degradación se alcanza disminuyendo la razón del peso molecular de la PCL en la mezcla polimérica (Jones *et al.*, 2002).

Cerca de 10 millones de mujeres han usado anticonceptivos subdérmicos, que a menudo conllevan operaciones traumáticas asociadas con el retiro definitivo de dicho dispositivo. En consecuencia, en las últimas dos décadas ha habido estudios fundamentales en el desarrollo de matrices implantables bioreabsorbibles para la administración controlada de anticonceptivos, evitando la necesidad de intervenciones quirúrgicas para retirar el dispositivo que puedan significar riesgos de contraer alguna infección o virus. La PCL es un óptimo candidato para esta aplicación, a partir de su lenta degradación, biocompatibilidad y aprobación por la FDA. Estudios han caracterizado y preparado microesferas inyectables a partir de PCL para el control de la liberación de esteroides anticonceptivos (Dhanaraju *et al.*, 2006).

También se ha desarrollado dispositivos anticonceptivos de dos años mezclando PCL con etilenglicol, rellenos de polvo de levonogestrel, que han sido aprobados por la SFDA (*State Food and Drug Administration*) para pasar a la fase dos de ensayos clínicos en China (Sun *et al.*, 2006).

Otros estudios preclínicos usando ratas y perros demostraron buenas cinéticas de descarga de levonogestrel sin efectos secundarios luego de dos años, manteniendo la estabilidad física, con una disminución en el peso molecular de polímero de 66.000 a 15.000 Da (Ma *et al.*, 2006).

Estudios donde se utilice PCL pura en aplicaciones ortopédicas no son muy comunes en la literatura científica actual. Un estudio de fijación de osteotomías de húmero en conejos con PCL reforzada con fibra de vidrio en comparación con acero inoxidable demostró que si bien la PCL causa menores respuestas de estrés que el acero inoxidable, la resistencia mecánica de la PCL no fue suficiente para soportar la carga debido a la alta tasa de uniones deficientes (Lowry *et al.*, 1997).

Por otra parte, existen diversos estudios que aprovechan las propiedades positivas de la PCL, mezclándola con otros materiales y así producir copolímeros y compuestos superiores que pueden tener propiedades deseables para el uso en aplicaciones mecánicas desafiantes, donde un material más resistente sea requerido (Agrawal & Ray, 2001).

La gutapercha en sus distintas formas ha sido el material más popular utilizado como relleno de conductos por casi 100 años. Un material óptimo para relleno de conductos debe proporcionar un sello que permita inhibir la formación de bacterias o bien eliminarlas, prevenir la re-contaminación y facilitar la sanación (Woodruff & Huttmacher, 2010).

La PCL es usada como un polímero termoplástico sintético en rellenos de conductos, recientemente introducido al mercado como parte del compuesto Resilon TM, junto con vidrio bioactivo, oxiclورو de bismuto y sulfato de bario. Este material reemplaza a los conos de gutapercha y de acuerdo a los productores, la PCL aporta al material propiedades termoplásticas que permiten su aplicación en técnicas que dependen de dicha característica (Miner *et al.*, 2006).

Schuckert *et al.* (2009) reportaron el primer caso clínico exitoso en la reconstrucción de la mandíbula anterior de una paciente mujer de 71 años con osteoporosis, usando un soporte 3D a partir de PCL, en combinación con plasma rico en plaquetas y una proteína humana recombinante (rhBMP-2). Una vez que la herida se sanó, libre de complicaciones, el control radiológico mostró nuevamente el crecimiento del hueso en la mandíbula anterior después de un postoperatorio de 6 meses, y luego de una nueva operación, se realizó implantes dentales. Una comparación entre una biopsia ósea del hueso nuevo y del hueso limítrofe fue realizada, donde ambas muestras resultaron ser idénticas, demostrando el éxito del procedimiento.

La ingeniería de tejidos por otra parte, es un área que puede ser definida como “un campo interdisciplinario que aplica principios de ingeniería y ciencias de organismos vivos hacia el desarrollo de sustitutos biológicos, que restituyan, mantengan o mejoren la función de tejidos o de un órgano completo” (Vacanti & Langer, 1999).

La PCL es un polímero bioreabsorbible increíblemente versátil y debido a sus propiedades reológicas superiores, como la resistencia a la deformación, o una viscosidad adecuada que le permite fluir libremente para manufacturar el producto final mediante extrusión o inyección, puede ser usado por casi cualquier tecnología de procesamiento polimérico para producir una amplia gama de soportes 3D de alta porosidad y área superficial mediante distintas técnicas de fabricación. Existen diversas aplicaciones para estos soportes y armazones dependiendo del requerimiento en distintas partes del organismo. Dichos soportes pueden ser usado en áreas de la ingeniería de tejidos como en ingeniería de huesos, cartílagos, tendones y ligamentos, piel, nervios, tejido vascular y cardiovascular (Woodruff & Hutmacher, 2010).

1.3.3. Producción de PCL

Existen principalmente dos vías de producción de PCL: La condensación de ácidos hidroxicarboxílicos y la reacción de polimerización por apertura de anillos (ROP, *Ring opening polymerization*, por sus siglas en inglés) de caprolactona (ϵ -caprolactona, ϵ -CL) (Labet & Thielemans, 2009).

Una reacción de polimerización por condensación se caracteriza por la pérdida de parte de la estructura del monómero cuando pasa a formar parte de la cadena, generalmente la molécula que se pierde para la unión de los monómeros es agua. El mecanismo para este tipo de polimerización es una reacción por etapas, donde uno o dos monómeros se unen para formar dímeros o trímeros, y luego estos reaccionan entre sí hasta formar la cadena final (Bower, 2002).

La polimerización por apertura de anillos asoma como el mecanismo más apto para la producción de PCL. Existen principalmente cuatro mecanismos para la reacción ROP de lactonas donde el factor determinante para todas éstas es el catalizador utilizado. Dichas reacciones son: aniónicas, catiónicas, monómero activado y coordinación-inserción. A partir de la ROP se obtiene polímeros con un mayor peso molecular y menor índice de polidispersidad (PDI) en comparación con la reacción de policondensación a partir de ácidos hidroxicarboxílicos (Labet & Thielemans, 2009). Se entiende por PDI la distribución de tamaños del peso molecular de un polímero, ya que no todas las cadenas que conforman el

polímero son de igual longitud, y por ende poseen distintos pesos moleculares, mientras mayor sea el PDI significa que la reacción pierde control sobre el peso molecular del polímero y se obtienen cadenas de distintos tamaños y pesos moleculares.

La ROP aniónica involucra la formación de un anión que ataca al carbono del grupo funcional carbonilo del monómero, rompiendo la cadena y dando origen a un alcóxido. El principal inconveniente con este método es la presencia de reacciones de transesterificación intramolecular en las etapas finales de la reacción. Esto implica la obtención de polímeros de bajo peso molecular si la reacción se puede detener a tiempo, o bien en polímeros cíclicos si no se puede controlar las reacciones paralelas (Khanna *et al.*, 2008).

La reacción ROP catiónica involucra la formación de un catión que es atacado por el oxígeno del grupo carbonilo del monómero, a través de una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular (Kricheldorf & Dunsing, 1986).

Una reacción ROP por monómero activado es un tipo de reacción catiónica que implica la activación del monómero mediante un catalizador, seguido por la inserción del monómero al final de la cadena polimérica. Este mecanismo puede anular reacciones desfavorables, como la desprotonación o la formación de cadenas cíclicas y se ha aplicado en la polimerización, resultando en polímeros lineales, libre de oligómeros cíclicos (Shibasaki *et al.*, 2000).

La forma más común de una ROP es la reacción de coordinación-inserción. Es una ROP pseudo aniónica, donde la propagación se da a través de la coordinación del monómero con el catalizador, y la inserción del monómero a un enlace entre una especie metálica y el oxígeno del catalizador. Durante la propagación, la cadena, ya rota, se une a la especie metálica a través de un enlace alcóxido (Dubois *et al.*, 1989).

Como ya se mencionó en la reacción ROP aniónica, durante una reacción de polimerización suelen ocurrir reacciones secundarias de transesterificación (se puede dar en otros mecanismos de ROP también). Durante una reacción de polimerización, usando un iniciador y un catalizador, pueden ocurrir reacciones de transesterificación tanto inter como intramoleculares. Éstas reacciones generalmente se encuentra durante las etapas finales de la polimerización, particularmente a altas temperaturas. Esto da como resultado PDI mayores y pérdida en el control de la reacción en sí (Labet & Thielemans, 2009).

1.3.4. Catalizadores y condiciones para una ROP

Existen principalmente 3 tipos de sistemas catalíticos que dan origen a una reacción ROP; aquellos basados en metales, en sistemas tanto orgánicos como inorgánicos y por último el mecanismo catalizado por enzimas. (Labet & Thielemans, 2009). En esta sección se revisa de manera general los distintos tipos de sistemas catalíticos, mientras que en el Anexo 1, se presentan más en detalle otros ejemplos de catalizadores.

Dentro de la comunidad científica, se usa distintos términos para describir los componentes basados en metales que forman parte de una ROP de lactonas. Algunos autores utilizan el término catalizador, otros usan iniciador, sistema iniciador o sistema catalítico. De hecho, el componente metálico debe ser regenerado en el paso final para ser realmente un catalizador y esto no siempre ocurre. Para dar consistencia, se decide llamar a los componentes metálicos catalizadores, y a los alcoholes y aminas iniciadores (Labet & Thielemans, 2009).

Los catalizadores alcalinos muestran cierta actividad, son especies iónicas y la ROP sigue un mecanismo aniónico. En consecuencia, la reacción no puede ser bien controlada debido a la transesterificación. Es más, compuestos basados en elementos alcalinos tienen la tendencia de formar agregados, lo que disminuye la solubilidad y, por ende, la ROP (Platel *et al.*, 2008).

En cuanto a catalizadores alcalinotérreos, según Platel *et al.* (2008), catalizadores con estas características son atractivos debido a su alta actividad y baja toxicidad. El magnesio y el calcio, debido a que son esenciales para plantas y animales, y por ende biológicamente benignos, se utiliza mayoritariamente en la producción de polímeros para aplicaciones biomédicas (Sánchez-Barba *et al.*, 2007).

La mayoría de los catalizadores metálicos usados como catalizadores para la ROP pertenecen al grupo de metales pobres, siendo mayormente usados los catalizadores basados en aluminio o estaño (Labet & Thielemans, 2009). El aluminio es un catalizador menos activo que muchos otros metales para la ROP de lactonas, pero es ampliamente usado debido a que permite un buen control de la reacción (Platel *et al.*, 2008).

El titanio es el metal de transición más utilizado como catalizador, y recientemente el zirconio ha atraído cierto interés, así como también ha sido estudiada la reacción utilizando zinc. Otros

autores han estudiado la reacción a partir de catalizadores basados en hierro, molibdeno y vanadio (Labet & Thielemans, 2009).

De acuerdo a Platel *et al.* (2008), los catalizadores basados en metales de tierra raros, son buenos catalizadores debido a su acidez moderada, incluso no tienen una toxicidad definida (Sánchez-Barba *et al.*, 2007).

Dentro de la categoría de los catalizadores orgánicos e inorgánicos, los compuestos orgánicos como catalizadores han sido los más estudiados, dentro de los que se destaca el uso de TBD, MTBD y DBU, distintos ácidos carboxílicos y algunos aminoácidos (Labet & Thielemans, 2009).

Catalizadores enzimáticos

La sustitución de catalizadores de origen metálico, orgánico o inorgánico que puedan ser tóxicos para el cuerpo y el medioambiente proporciona un importante desafío hacia la producción de PCL de manera sustentable, principalmente debido a las aplicaciones biomédicas que este polímero presenta, ya que las impurezas metálicas son difíciles de remover y pueden quedar concentradas en la matriz polimérica luego de la degradación de ésta (Albertsson & Srivastava, 2008).

Dentro de las principales ventajas de los catalizadores enzimáticos destacan las siguientes. Las enzimas provienen de recursos renovables, son reciclables, amigables con el medioambiente y no son tóxicas. Catalizan reacciones con alta enantio y regioselectividad, por lo que es factible producir polímeros con estructuras bien definidas a condiciones moderadas de presión, temperatura y pH. Finalmente, las lipasas en particular no requieren un proceso previo de extracción de agua (Varma *et al.*, 2005).

Kobayashi y colaboradores han realizado gran variedad de estudios en catálisis enzimática de ROP a partir de lactonas, y en particular usando ϵ -CL como monómero. Un amplio número de enzimas de diferentes orígenes fueron probadas: lipasa de páncreas de porcino (PPL), *Aspergillus niger* (Lipasa A), *Candida cylindracea* (Lipasas B y CC), Lipasa B de *Candida antarctica* (CALB), *Pseudomonas cepacia* (Lipasa PS-30), *Pseudomonas fluorescens* (Lipasas P y PF), *Rhizopus delemer* y *Rhizopus japonicus* (Lipasas RD y RJ), entre otras enzimas. La CALB fue la más eficiente, obteniendo una alta conversión en menos

de 24 horas, mientras que más de 10 días se necesitó para las otras lipasas. Además, una pequeña cantidad de enzima fue requerida, ya que en particular la CALB es inmovilizada, mientras que las demás se usó como polvo (Kobayashi *et al.*, 1998; Kobayashi, 1999; Kobayashi *et al.*, 2001).

Dong *et al.* (1999) demostraron usando PSL, que el contenido de agua en el medio de la reacción es extremadamente importante y no debe ser ni muy alto ni muy bajo para tener polímeros con alto peso molecular y bajos PDI, por otra parte, encontraron que añadiendo tamices moleculares en el medio proporciona un buen control del contenido de agua, y en consecuencia de la ROP.

Por otra parte, los estudios realizados por Hedfors *et al.* (2005), plantean la posibilidad de realizar una ROP sin necesidad de iniciadores, iniciando la reacción sólo con el agua presente en la ϵ -CL comercial.

Otros autores, junto con corroborar que la CALB posee la mayor actividad entre las enzimas utilizadas para la obtención de PCL, plantean una nueva ruta de producción a partir de dióxido de carbono supercrítico ($scCO_2$), un reemplazante para los solventes orgánicos utilizados en la polimerización catalizada por enzimas, ambientalmente amable, de gran disponibilidad y barato (Albertsson & Srivastava, 2008; Santos *et al.*, 2012; Stassin & Jérôme, 2003; Thurecht *et al.*, 2006).

Loeker *et al.* (2004) polimerizaron ϵ -CL utilizando CALB en $scCO_2$, obteniendo resultados similares a los obtenidos generalmente con enzimas en solventes orgánicos, pero con menores PDI.

1.3.5. Dióxido de carbono supercrítico como alternativa de producción de PCL

Una de las alternativas más llamativas para evitar el uso de solventes tanto orgánicos como inorgánicos, como son algunos ácidos y alcoholes mencionados en la sección de catalizadores para una ROP, son los fluidos supercríticos (SCF). Por otra parte, postula como un candidato idóneo para procesos de extracción, siendo una de las etapas finales del proceso de polimerización planteado en este proyecto, ya que permite la separación de monómero sin reaccionar y algunos oligómeros formados, del polímero final deseado (PCL) (Santos *et al.*, 2012; Loeker *et al.*, 2004).

La densidad de un SCF puro cambia fácilmente mediante variaciones relativamente pequeñas de presión y temperatura. Por otra parte, la viscosidad de un SCF es bastante baja, pero puede aumentar con la temperatura, y junto con la alta difusividad que estos fluidos presentan, produce fenómenos de transporte interesantes en fases condensadas. Los fluidos supercríticos, en particular el CO₂, influyen en las propiedades de los componentes con los que son mezclados y se disuelve sustancialmente en fases condensadas, junto con la capacidad de disolver componentes más allá de su presión de vapor. Debido a la tensión superficial prácticamente nula de los SCF, al solubilizar algunos líquidos, afecta su tensión superficial, disminuyéndola, lo que le permite a la mezcla fluir libremente en superficies porosas y espacios pequeños, promoviendo el contacto con los sitios activos en reacciones, por ejemplo, de polimerización. La solubilidad en fases gaseosas y condensadas es una de las principales propiedades de los SCF, pero para diseñar correctamente los procesos y para entender la fenomenología si alguna condición operacional cambia, hay que relacionar esta propiedad con el equilibrio termodinámico de fases (Brunner, 2010).

Estos fluidos son una herramienta flexible para procesar materiales, han sido aplicados a procesos de transferencia de masa, procesos de transición de fases, como medio de reacción y en procesos relacionados con materiales y nanomateriales. Para que éstas aplicaciones resulten exitosamente, las propiedades de los SCF, junto con las de los materiales procesados deben estar claramente determinadas y un conocimiento fundamental del complejo comportamiento de éstos es primordial. Sin embargo, si bien las propiedades de los SCF están bien establecidas, aún no son totalmente explotadas para aplicaciones industriales (Parker et al., 2009; Weidner, 2009; Nunes da Ponte, 2009; Kiran, 2009; Erkey, 2009).

Dentro de las reacciones que pueden ocurrir en medios supercríticos, está la fabricación de polímeros, donde las propiedades del CO₂ en particular lo posicionan como candidato ideal para reemplazar solventes orgánicos (Brunner, 2010). Así, se abre nuevas oportunidades para el uso de los SCF más allá de los procesos extractivos aplicados a los alimentos, que es el principal uso que se le da.

Para poder entender un poco más sobre los SCF es necesario analizar sus características, propiedades y ventajas. Un SCF es aquel compuesto puro, cuya presión y temperatura se encuentra por encima de sus valores críticos (T_c y P_c) (Bruner, 2005).

La Fig. 2 muestra un diagrama de fases de presión versus temperatura de un compuesto puro, destacando la región y las condiciones a las cuales el fluido se convierte en condición supercrítica, *i.e.*, en un estado entre los estados líquido y gaseoso.

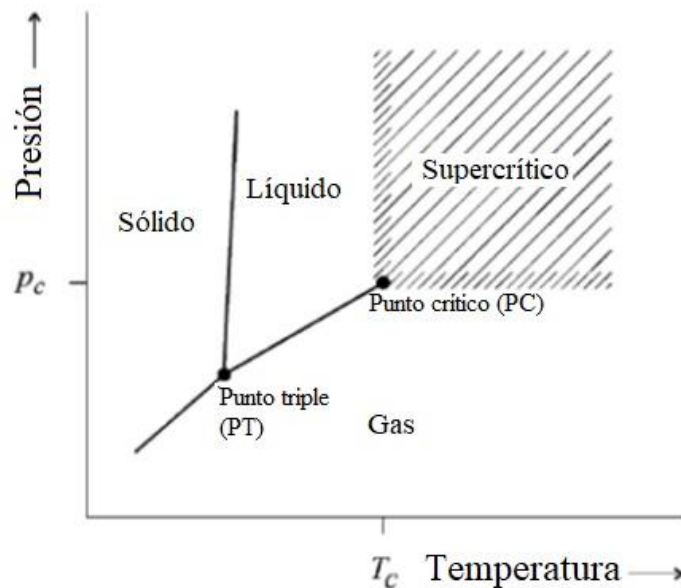


Figura 2. Diagrama de fases de un componente puro, donde se destaca la región del estado supercrítico. (Adaptado de Brunner, 2005).

La Tabla 2 presenta las propiedades físicas características de un fluido supercrítico, comparadas a las propiedades de un líquido o un gas.

Tabla 2. Valores característicos de las propiedades físicas de un fluido supercrítico. (Adaptado de Brunner, 2005).

Estado del fluido	Densidad (kg m^{-3})	Difusividad ($\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$)	Viscosidad ($\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Gas			
$P = 0,1 \text{ MPa}$ $T = 15\text{-}30 \text{ }^\circ\text{C}$	0,6 – 2,0	0,01 – 0,04	$(0,6 - 2,0) \times 10^{-5}$
Líquido			
$P = 0,1 \text{ MPa}$ $T = 15\text{-}30 \text{ }^\circ\text{C}$	600 – 1.600	$(0,2 - 2,0) \times 10^{-6}$	$(0,2 - 3,0) \times 10^{-3}$
Fluido supercrítico			
$P \approx P_c$ $T \approx T_c$	200 – 500	$0,7 \times 10^{-4}$	$(1,0 - 3,0) \times 10^{-5}$
$P \approx 4P_c$ $T \approx T_c$	400 – 900	$0,2 \times 10^{-4}$	$(3,0 - 9,0) \times 10^{-5}$

De la Tabla 2, se puede apreciar que un fluido supercrítico presenta densidades similares a los líquidos, sin embargo, presenta difusividades de hasta 2 órdenes de magnitud mayor, y por otra parte viscosidades cercanas a los gases. Estas características le confieren un a fluido supercrítico propiedades que lo hacen idóneo para diversas aplicaciones, al ser volátil y fácilmente separable como los gases y densos como los líquidos, pero con altas difusividades, lo que le confiere al fluido un alto poder de solvente.

En cuanto a la solubilidad de los SCF, la Fig. 3 muestra la solubilidad de una sustancia de baja volatilidad como es el caso de la ϵ -CL, en un fluido supercrítico, por ejemplo, CO_2 . Para el caso de fluidos supercríticos, cuya temperatura sea mayor a la temperatura crítica, se observa distintos comportamientos dependiendo del rango de presiones a las que se encuentre el fluido. Para el caso de presiones bajas (bajo 10 MPa), la solubilidad de la sustancia poco volátil en el SCF disminuye con la temperatura, así como también la densidad lo hace a una de manera considerable, mientras que cuando se está en presencia de altas presiones (superior a 10 MPa), la solubilidad aumenta cada vez que lo hace la temperatura, a una presión constante y la densidad del solvente disminuye a una razón bastante menor (Brunner, 2005).

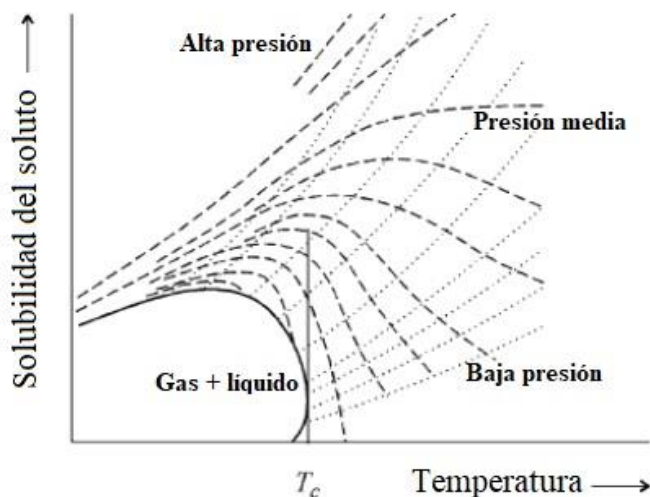


Figura 3. Variaciones en la solubilidad de una sustancia de baja volatilidad, por ejemplo ϵ -CL, en función de la temperatura, la presión del proceso y la densidad del solvente. (líneas segmentadas corresponden a condiciones isobáricas, y las líneas punteadas corresponden a condiciones de densidad constante). (Adaptado de Brunner, 2005).

El CO₂ es el SCF más usado como solvente en aplicaciones de extracción en la industria de los alimentos. Aparte de ser barato y fácilmente obtenible con alta pureza, es seguro de manejar y al ser reciclado no contribuye al problema ambiental sobre el CO₂.

El scCO₂ tiene distintas propiedades, dentro de las que destaca las siguientes (Del valle & Aguilera, 1999), lo que lo hace una excelente opción para su utilización en una ROP, evitando el uso de solventes tóxicos.

- Disuelve componentes no polares o ligeramente polares.
- El poder solvente es alto para componentes de bajo peso molecular, y disminuye cuando el peso molecular del soluto aumenta.
- El scCO₂ tiene alta afinidad con compuestos orgánicos oxigenados de peso molecular medio.
- El agua presenta una baja solubilidad, menor a 0,5% en peso a temperaturas menores a 100 °C.
- El scCO₂ es capaz de separar componentes menos volátiles, de mayor peso molecular o que sean más polares a medida que la presión aumenta.

1.3.6. Estudios previos sobre producción de PCL con scCO₂

El enfoque del proyecto es producir PCL de una manera amigable con el ambiente y el cuerpo, por lo que se pretende evitar el uso de solventes y catalizadores tóxicos y/o dañinos para la salud, debido a las importantes aplicaciones en biomedicina que la PCL presenta, por lo que a continuación se estudiarán los autores encontrados en la literatura que presentan un proceso productivo lo más similar al utilizado en este proyecto, es decir, estudios que se basen en el uso de scCO₂ como medio de reacción y CALB como catalizador de la reacción.

Autores como Loeker *et al.* (2004) y Santos *et al.* (2012) han realizado estudios sobre la ROP de ϵ -CL combinando las rutas alternativas de producción de una reacción enzimática (utilizando una lipasa como catalizador) y un solvente en estado supercrítico como medio de reacción (scCO₂). Para Loeker *et al.* (2004) el principal objetivo fue el análisis del efecto del tiempo de reacción en el peso molecular del polímero obtenido. Para cada uno de los experimentos, se mantuvo constante la densidad del CO₂ en la reacción, variando así proporcionalmente presión y temperatura.

Los resultados presentados en la Tabla 3 (ensayos 1-8) muestran los pesos moleculares promedio en número (M_n) obtenidos mediante cromatografía por permeación de gel (GPC), junto con los respectivos PDI y el rendimiento de la reacción, obtenido como el peso de PCL purificada, dividido el peso de ϵ -CL inicial.

Tabla 3. Condiciones operacionales y resultados obtenidos por Loeker *et al.*, 2004 para una ROP de ϵ -CL, catalizada mediante CALB en $scCO_2$. (Adaptado de Loeker *et al.*, 2004).

Ensayo	T (°C)	P (MPa)	ρ CO_2 (kg m ⁻³)	t (h)	Resultados GPC			Rendimiento (%)
					M_n (Da)	M_w (Da)	PDI	
1	65	22,06	720	72	26.000	43.000	1,6	95
2	65	22,06	720	24	30.000	51.000	1,7	97
3	65	22,06	720	6	24.000	40.000	1,6	91
4	65	22,06	720	2	17.000	30.000	1,8	93
5	50	15,86	720	24	22.000	40.000	1,8	98
6	50	15,86	720	6	18.000	29.000	1,6	69
7	35	10,34	720	24	22.000	40.000	1,8	84
8	35	10,34	720	6	12.000	18.000	1,5	70
9	35	8,14	500	24	30.000	47.000	1,5	98
10	35	8,14	500	24	35.000	50.000	1,4	95
11	65	13,86	500	24	35.000	54.000	1,5	98
12	35	24,13	900	24	18.000	37.000	1,9	75
13	35	8,14	500	24	15.000	23.000	1,5	87
14	35	8,14	500	24	14.000	23.000	1,4	38

Los resultados muestran que a tiempos cortos de reacción la reacción presenta polímeros de cadena corta, con pesos moleculares y conversiones menores, mientras que para tiempos extensos de reacción (72 horas) se tiene presencia de degradación parcial del polímero, debido posiblemente a la naturaleza reversible de la reacción o a mecanismos de transesterificación secundarios, ya que el peso molecular es menor frente a una reacción de 24 horas. Así, la primera parte del experimento muestra los mejores resultados para tiempos de reacción de 24 horas, donde se obtiene mayores pesos moleculares y conversiones.

La temperatura del sistema también mostró influencias en el polímero final. Los autores Loeker *et al.* (2004) comparan polímeros obtenidos a densidad constante del medio, disminuyendo la temperatura de 65 °C (ensayos 1-4) a 50 °C (ensayos 5 y 6) y finalmente a 35 °C (ensayos 7 y 8). Se puede observar que se reportan disminuciones en el peso molecular final conforme disminuye la temperatura, pese a que al comparar los ensayos 5 y 7 se obtiene pesos moleculares idénticos, al igual que los PDI. No obstante, la diferencia radica en el rendimiento de la reacción, donde se observa que a menores temperaturas la conversión de la reacción disminuye.

Así, se establece que mayores temperaturas no solo fomentan la formación de cadenas poliméricas más largas, si no que facilita la conversión del monómero por lo observado según los autores y presentado anteriormente al comparar los ensayos 5 y 7.

Otra parte del análisis tiene que ver con el estudio del efecto de la densidad del medio de reacción en el polímero obtenido, basándose en información obtenida a partir de estudios de ROP en solventes orgánicos, donde se concluye que la concentración de CO₂ en la reacción tiene una importante influencia en la polimerización (Kumar & Gross, 2000; Kumar *et al.*, 2000). Los resultados de los ensayos 7, 9 y 12 (a temperatura constante), muestran que a partir de una disminución en la densidad del medio, se logra un aumento en la concentración de ϵ -CL en la reacción, repercutiendo en un polímero de mayor peso molecular.

Finalmente se analiza el efecto de la cantidad de enzima presente en la reacción en los resultados. Dicha variable resulta ser crucial tanto en el peso molecular del polímero obtenido como en la conversión de la reacción. Los experimentos correspondientes a los ensayos 1-12 fueron realizados con un 10 % de enzima, mientras que los correspondientes a los ensayos 13 y 14 fueron realizados con un 5 y 2,5 % de enzima respectivamente.

Al comparar los ensayos 9, 13 y 14, donde todas las condiciones se mantienen constantes, excepto por el contenido de enzima, se aprecia que tanto el peso molecular como el rendimiento de la reacción se reducen drásticamente conforme disminuye la concentración de enzima.

En base a los resultados, los autores (Loeker et al., 2004) concluyen que la polimerización en scCO₂ tiene efectos similares en el peso molecular del polímero y en la conversión al ser comparados con reacciones usando tolueno como solvente (Kumar & Gross, 2000), ratificando así la posibilidad de producir PCL mediante una ruta de producción alternativa, usando una enzima como catalizador y scCO₂ como medio de reacción.

La investigación realizada por Santos *et al.* (2012) tuvo como objetivo estudiar el efecto de distintas variables en la reacción (presión, temperatura, densidad, contenido de enzima y contenido de agua) en el tamaño de la cadena del polímero y el respectivo PDI. A continuación, se presenta la Tabla 4, donde se muestran los resultados obtenidos por los autores.

Tabla 4. Condiciones operacionales y resultados obtenidos por Santos *et al.*, 2012 para una ROP de ϵ -CL, catalizada mediante CALB en scCO₂. (Adaptado de Santos *et al.*, 2012).

Ensayo	T (°C) / P (MPa)	ρ CO ₂ (kg m ⁻³)	Enzima (%p/p)	Agua (%p/p)	Recuperación (%)	M_n (Da)	M_w (Da)	PDI
1	35/8,3	560	1	0	-	-	-	-
2	65/14,5	530	1	0	-	-	-	-
3	35/8,3	560	10	0	-	-	-	-
4	65/14,5	530	10	0	100	3.893	7.639	1,96
5	35/8,3	560	1	2	-	-	-	-
6	65/14,5	530	1	2	-	-	-	-
7	35/8,3	560	10	2	96,19	1.252	1.867	1,49
8	65/14,5	530	10	2	92,77	2.105	3.129	1,49
9	50/11,4	540	5,5	1	91,16	2.224	3.567	1,60
10	50/11,4	540	5,5	1	93,93	2.064	3.023	1,46
11	50/11,4	540	5,5	1	93,45	2.555	3.957	1,55
12	65/18,0	660	10	0	79,22	7.419	14.550	1,96

Los autores proponen experimentos basados en mantener constante la densidad del CO₂ en la reacción (variando proporcionalmente presión y temperatura), y así analizar variables como contenido de enzima, contenido de agua, y presión y temperatura como un conjunto.

De acuerdo a lo que obtuvieron los autores, como primera observación se tiene que hay reacciones que no produjeron PCL, tal es el caso de reacciones llevadas a cabo con un contenido de 1% en peso de enzima, por lo que se rectifica lo expuesto por Loeker *et al.* (2004) respecto al contenido óptimo de enzima en la reacción.

A partir del resto de los resultados se infiere que bajas presiones y temperaturas no favorecen la formación de cadenas largas de PCL, mientras que para presiones y temperaturas mayores (65 °C y 14,5 MPa) se obtiene PCL de mayor peso molecular.

La concentración de agua en la reacción también mostró influencias en el polímero obtenido. Los resultados muestran que, a menor contenido de agua en la reacción, mayor será el peso molecular del polímero obtenido. Esta variable muestra una particular influencia en la reacción, ya que autores como Thurecht *et al.* (2006) exponen la idea de que existe una relación inversamente proporcional entre el peso molecular y el contenido de agua en la reacción, debido a que dicha variable provoca el cierre de cadenas, formando componentes cíclicos, interrumpiendo el curso de la reacción. Por otra parte, los estudios realizados a partir de ϵ -CL por Albertsson & Srivastava (2008), muestran que el agua actúa como iniciador de la reacción, al realizar un ataque nucleofílico del compuesto formado cuando la enzima actúa sobre el monómero. Así, se plantea la idea de que el contenido de agua en la reacción no debe ser excesivamente alto para evitar la formación de cadenas cíclicas, pero sin embargo debe haber cierto contenido de agua que permita el inicio de la reacción y así lograr producir PCL de mayor peso molecular.

A continuación, se adjunta la Fig. 13, donde se muestra un ejemplo del ataque nucleofílico que realiza el agua al complejo formado por la enzima y el monómero presentado por Albertsson & Srivastava, (2008).

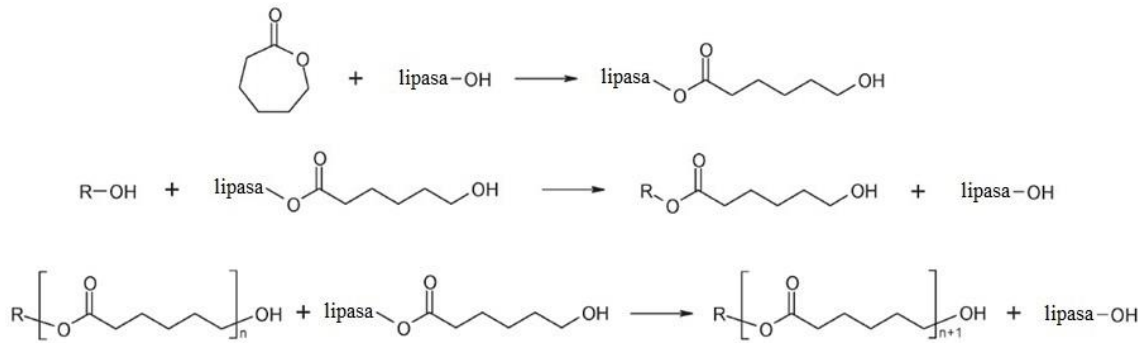


Figura 4. Mecanismo de polimerización por apertura de anillos catalizado mediante una lipasa, donde se observa el ataque nucleofílico que realiza el grupo carboxilo presente en el radical, por ejemplo agua, al complejo formado por la enzima y el monómero. (Adaptado de Labet & Thielemans, 2009).

1.3.7. Estudio propuesto en esta investigación

Debido a las complicaciones que existen con el proceso convencional de producción de PCL mediante la reacción de polimerización por apertura de anillos, utilizando catalizadores y solventes potencialmente tóxicos para la salud y el ambiente, lo que dificulta su aplicación, principalmente en biomedicina, donde se requiere un polímero lo más biocompatible posible, se propone el estudio del proceso alternativo de producción de PCL a partir de un catalizador enzimático y un solvente inocuo, como es el caso de la CALB y el scCO_2 respectivamente.

Si bien ya existen estudios que combinan dichas alternativas, el presente estudio incluye el montaje y puesta en marcha de un sistema experimental que pueda reproducir las condiciones para la producción biocatalizada de PCL a alta presión, junto con el proceso de extracción a alta presión con scCO_2 de subproductos o sustrato remanente en la reacción. Siendo el único sistema en el país capaz de replicar la realizado por otros autores.

Por otra parte, en etapas posteriores a esta investigación, se plantea la posibilidad de utilizar dicho sistema experimental para producir PCL uniendo las reacciones de producción tanto de monómero como de polímero, realizando un solo proceso en serie, evitando etapas intermedias de separación de ϵ -caprolactona.

2. Objetivos

El objetivo general de esta memoria de titulación es montar, poner en marcha y estudiar sistema experimental para la producción de poli(ϵ -caprolactona) mediante una reacción de polimerización por apertura de anillos, usando la enzima Lipasa B de *Candida antarctica* como catalizador, en un ambiente con dióxido de carbono supercrítico como solvente y medio de reacción.

En base al objetivo general de la investigación, se plantean los siguientes objetivos específicos.

1. Montar y poner en marcha una unidad experimental para la reacción de polimerización por apertura de anillos a alta presión.
2. Desarrollar una metodología de operación de la unidad experimental que permita replicar las condiciones reportadas en la literatura para la producción de poli(ϵ -caprolactona).
3. Determinar las principales variables que influyen en el peso molecular final del polímero en la reacción de polimerización por apertura de anillos a alta presión de ϵ -caprolactona a poli(ϵ -caprolactona), utilizando dióxido de carbono supercrítico.
4. Analizar la poli(ϵ -caprolactona) producida mediante resonancia magnética nuclear para determinar su peso molecular.

3. Materiales y métodos

3.1. Solventes y reactivos

Para realizar la reacción de polimerización de ϵ -CL para producir PCL se utiliza dos monómeros distintos, uno proporcionado por la empresa estadounidense Sigma-Aldrich (Saint Luis, MO) de 97% de pureza y el otro adquirido de la empresa AK Scientific (Union City, CA) de 99% de pureza. Como catalizador se utilizó la enzima Lipasa B de *Candida antarctica*. también administrada por Sigma-Aldrich (Saint Luis, MO), mientras que para el medio de reacción se utilizó CO₂ provisto por Indura S.A (Santiago, Chile) de 99,9% de pureza, llevado a condiciones supercríticas mediante aumento de presión y temperatura. Para el proceso de separación del polímero se utilizó cloroformo analítico de alta pureza para laboratorio y uso industrial especializado, adquirido de la empresa J. T. Baker (Phillipsburg, NJ).

3.2. Montaje y puesta en marcha del sistema experimental

El montaje y la puesta en marcha del sistema experimental se realiza en conjunto con la empresa alemana Eurotechnica GmbH (Bargteheide, Alemania), por lo que se incluyen etapas de capacitación en seguridad, manejo y operación de un reactor/extractor a alta presión a cargo del Dr.-Ing. Phillip Jaeger. El montaje del sistema experimental incluye los sistemas de pre-enfriamiento y agitación, externos al reactor/extractor, mientras que la puesta en marcha incluye reacciones de prueba para corroborar el correcto funcionamiento del equipo.

3.3. Condiciones operacionales propuestas

Debido a la gran cantidad de variables que afectan a la reacción, se opta por bloquear algunas de estas, manteniéndolas constantes a lo largo de la investigación y estudiar otras, para poder realizar un estudio más acabado sobre el efecto que tienen estas variables operacionales en el peso molecular del polímero final y concluir si existen diferencias significativas entre las distintas condiciones propuestas, cimentando las bases de investigaciones futuras y aspirando a poder optimizar el proceso y lograr escalarlo industrialmente.

A continuación, se explica que variables se mantienen constantes y cuáles se modifican para analizar su influencia en el polímero final.

La temperatura se mantiene constante en 65 °C para cada uno de los experimentos, ya que fue la temperatura a la que se ha obtenido mejores resultados hasta el momento (Santos *et al.*, 2012; Loeker *et al.*, 2004) y a su vez corresponde a una temperatura cercana a la temperatura óptima para la actividad enzimática del catalizador utilizado (60 °C, Thurecht *et al.*, 2006). Así, la investigación realizada puede ser comparada con la de otros autores.

El contenido de enzima ha demostrado ser una variable influyente en la reacción, donde los mejores resultados se ha obtenido cuando ésta se añade en un 10% en peso respecto al monómero (Loeker *et al.*, 2004; Thurecht *et al.*, 2006). Así, esta variable también se mantiene constante a lo largo de los experimentos, siendo un 10%. A su vez, previa su utilización, es necesaria una etapa de activación de enzima, la cual consiste en llevar la enzima a 40°C durante una hora para reducir su contenido de humedad (Santos *et al.*, 2012).

El contenido de agua según distintos autores es una variable que no debe ser excesivamente alta para evitar reacciones secundarias, pero a su vez tampoco muy baja, ya que el agua actúa como iniciador de la reacción (Santos *et al.*, 2012; Thurecht *et al.*, 2006; Albertsson & Srivastava, 2008). Por consiguiente, se utilizan monómeros de 97% y 99% de humedad para analizar el efecto de la cantidad de agua presente en la reacción en la PCL formada.

La presión de operación repercute en la densidad del CO₂ en el sistema, por lo que es una variable bastante influyente (Kumar & Gross, 2000; Kumar *et al.*, 2000; Loeker *et al.*, 2004). De acuerdo a los experimentos realizados por Santos *et al.* (2012) para densidades similares, los mejores resultados fueron obtenidos a condiciones medias de presión y temperatura, es por esto que se realizan experimentos a 14,5 y 20 MPa.

El tiempo de reacción es una condición de operación que tiene una amplia variación entre los distintos estudios realizados, con tiempos que van desde 2 a 72 horas (Santos *et al.*, 2012; Loeker *et al.*, 2004). Por limitaciones de seguridad, aspecto altamente importante a la hora de trabajar con altas presiones, no se puede realizar reacciones prolongadas, ya que la reacción debe ser monitoreada en todo momento. Por consiguiente, se propone estudiar el efecto del tiempo de reacción realizando experimentos a 2 y 4,5 horas.

La agitación, si bien es una variable que ayuda a la transferencia de masa en la reacción y por lo tanto acelera el proceso, no ha sido una variable estudiada en extensión, por lo que no se estudia el efecto que tiene sobre el polímero final. Debido a lo anterior, se decide mantenerla constante a lo largo de todas las reacciones, sin embargo, por limitaciones del equipo no es posible determinar el valor.

Teniendo en consideración las condiciones elegidas para la investigación, basándose en estudios anteriores y con la meta del cumplimiento de los objetivos, se presenta a continuación los diferentes experimentos realizados, cada una de éstos en triplicado, para luego realizar un análisis estadístico de intervalos de confianza para poder determinar la significancia del efecto de las distintas variables estudiadas. Las condiciones que se mantienen constantes durante los experimentos son la temperatura (65 °C), el contenido de enzima (10% en peso) y la agitación. Así, los experimentos realizados son los siguientes:

- 1) ROP durante 4,5 h a 14,5 MPa con un monómero de 99% de pureza
- 2) ROP durante 4,5 h a 20 MPa con un monómero de 99% de pureza
- 3) ROP durante 2 h a 20 MPa con un monómero de 99% de pureza
- 4) ROP durante 2 h a 20 MPa con un monómero de 97% de pureza

3.4. Procedimiento experimental

El equipo de alta presión utilizado para esta investigación fue diseñado y elaborado por la empresa alemana Eurotechnica GmbH y consiste de un reactor enchaquetado de 280 cm³ con dos canastos interiores. La temperatura del sistema se fija mediante un controlador de temperatura, mientras que la presión del sistema se controla usando una válvula reguladora de contrapresión (BPR por sus siglas en inglés), proporcionado por la empresa Tescom (Elk River, MN), asegurando que la presión aguas arriba se mantenga constante.

El sistema cuenta con un baño frío que se asegura de mantener el CO₂ en estado líquido y evitar la cavitación de la bomba de acción neumática que impulsa el CO₂ al interior del reactor. Por otra parte, el sistema cuenta con un precalentador que calienta el CO₂ para así disminuir el consumo energético del reactor y el tiempo que toma el sistema en llegar a las condiciones operacionales. El montaje experimental se muestra a continuación en la Fig. 4.

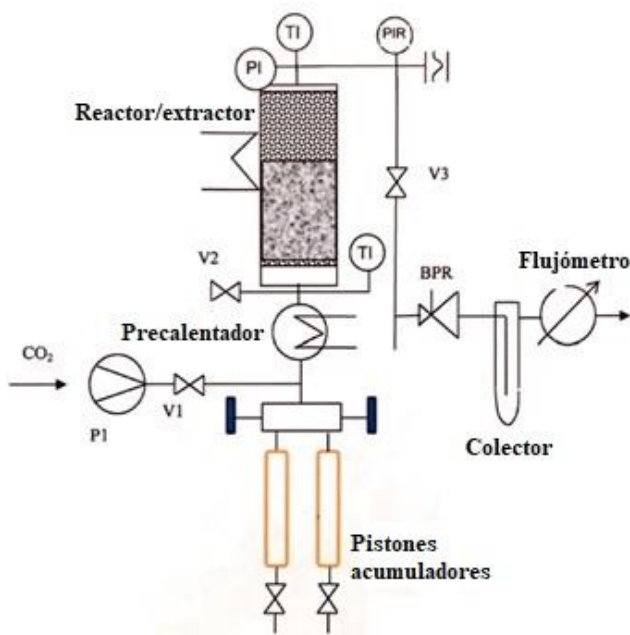


Figura 5. Montaje experimental utilizado para la reacción. (Adaptado de Manual de Operación HPE lab500, ser no 365, Eurotechnica GmbH, Alemania).

El procedimiento comienza masando los canastos, junto con perlas de vidrio para así reducir el consumo de CO₂, utilizando una balanza analítica. Adicionalmente se masa 1 g de enzima, junto con 10 g de ϵ -CL, con el fin de mantener constante la condición de 10% en peso de enzima con respecto al monómero. Posteriormente se lleva a la enzima a las condiciones óptimas de actividad, precalentando la enzima a 40 °C durante una hora para reducir su contenido de humedad.

Luego de realizar la activación de la enzima, se cierra las válvulas de purga (V2), de salida (V3) y BPR para realizar una reacción *batch* y se procede a cargar el reactor con ϵ -CL y enzima. Se monta el agitador y se fija la temperatura del sistema en 65 °C, para luego abrir la válvula de entrada (V1) y bombear el CO₂ al reactor hasta alcanzar la presión de sistema (ver condiciones en la sección 3.3. Condiciones operacionales propuestas) y finalmente

cerrar la válvula de entrada (V1) y apagar la bomba de manera simultánea. A partir de este momento la reacción comienza y se mantiene las condiciones operacionales durante el tiempo que dure la reacción. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se despresuriza el sistema abriendo la válvula de salida (V3) y usando la válvula BPR se controla el flujo de descarga, y mediante la ayuda de un flujómetro conectado a la salida del reactor se mide la cantidad de CO₂ presente en la reacción.

Como resultado de la reacción, se obtiene el polímero producido, junto con monómero remanente de la reacción y el resto de subproductos, tales como oligómeros u otros compuestos de bajo peso molecular resultantes de reacciones secundarias de transesterificación. En consecuencia, la segunda parte de la experimentación corresponde a la extracción con scCO₂, donde el fluido arrastra el resto de componentes livianos, depositándolos en un colector al final del sistema y dejando el polímero obtenido al interior del reactor, debido a la diferencia en el peso y la solubilidad de las sustancias. Así, es necesario volver a cargar el sistema con CO₂ hasta alcanzar una presión de 20 MPa, y mediante la válvula BPR se controla el flujo de salida, procurando que la presión se mantenga constante en el reactor y que el flujo de salida no sea demasiado elevado para evitar la disminución excesiva de la temperatura por expansión del CO₂, pudiendo dañar el equipo (conductos y/o colector). Una vez concluida esta etapa, se despresuriza nuevamente el sistema y se da por finalizado el experimento.

Luego de dar por finalizado el experimento, se tiene dentro del reactor la enzima catalizadora junto con el polímero obtenido y se procede a masar tanto los contenedores interiores como el colector, donde se depositaron tanto subproductos como monómero sin reaccionar para luego realizar el cierre de los balances de materia.

Debido a que se está en presencia de una mezcla heterogénea sólida de enzima, perlas de vidrio y polímero producido, es necesario solubilizar el polímero deseado en cloroformo, basándose en la alta solubilidad que estos compuestos presentes, ya que no es separable fácilmente por métodos mecánicos. Para esto, una vez realizada la solución de PCL-cloroformo, es posible separarlo de las perlas y la enzima, y con la ayuda de un filtro de membrana de nylon y una jeringa, se deposita la solución obtenida en viales para ser llevados a análisis de resonancia magnética nuclear.

3.5. Método de análisis

El proceso de análisis del peso molecular promedio en número (M_n) del polímero obtenido es llevado a cabo por el Centro de Investigación Biomédica (CIB) de la Universidad de los Andes mediante la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN).

Debido a que el proceso de análisis como tal del polímero se realiza por terceros, éste se encuentra fuera de los objetivos del proyecto. Sin embargo, se realiza una breve descripción del proceso de obtención del peso molecular promedio en número en el Anexo 2.

4. Resultados y discusión

Los resultados presentados para esta investigación incluyen la validación del sistema experimental propuesto, la corroboración mediante resonancia magnética nuclear del polímero producido y el posterior estudio y análisis del efecto en el peso molecular del polímero de las distintas condiciones operacionales propuestas, con el fin de discutir los resultados y plantear conclusiones y trabajos futuros que permitan la optimización, escalamiento y producción sustentable de PCL

4.1. Validación del montaje y la puesta en marcha del sistema experimental

Para la validación del montaje y la puesta en marcha del sistema experimental se realizó 2 reacciones de prueba, sin el sistema de agitación, ya que el objetivo era corroborar el correcto funcionamiento del reactor/extractor.

El polímero producido fue analizado mediante resonancia magnética nuclear, lo que entregó pesos moleculares de 8.129 Da en promedio para una reacción llevada a cabo a 2 h, 20 MPa, con un monómero de 97% de pureza. Al comparar estos resultados con los obtenidos para las mismas condiciones, pero con agitación (ver Tabla 5, condición 4) se observa que con el sistema de agitación se obtiene polímeros con un peso molecular de 2,5 veces mayor en promedio, lo que valida la obtención de polímero mediante el sistema experimental propuesto y por otra parte el efecto del sistema de agitación en el polímero producido.

Si bien los resultados para el resto de las condiciones (condiciones 1, 2 y 3 presentados en la Tabla 5), muestra polímeros de entre 6.161 y 12.192 Da, estos resultados no son comparables con lo obtenido sin agitación, ya que el monómero utilizado para dichas reacciones posee un 99% de pureza, lo que puede dar un indicio de la importancia del contenido de agua en el sistema por sobre la agitación, sin embargo, el efecto de dicha variable será estudiada más adelante.

4.2. Validación del polímero obtenido mediante RMN

En primer lugar, antes de analizar el peso molecular del polímero producido, se analiza y se comprueba si luego de la reacción llevada a cabo se obtuvo efectivamente el polímero deseado, para esto, se comparan los espectros obtenidos mediante RMN con un espectro estándar de PCL comercial.

Para el análisis se adjuntan a continuación las Figuras 6 y 7. La Fig. 6 muestra tres espectros distintos (en azul y verde dos espectros de dos reacciones distintas y en rojo la PCL comercial). La Fig. 7 muestra la superposición de estos espectros para facilitar la comparación.

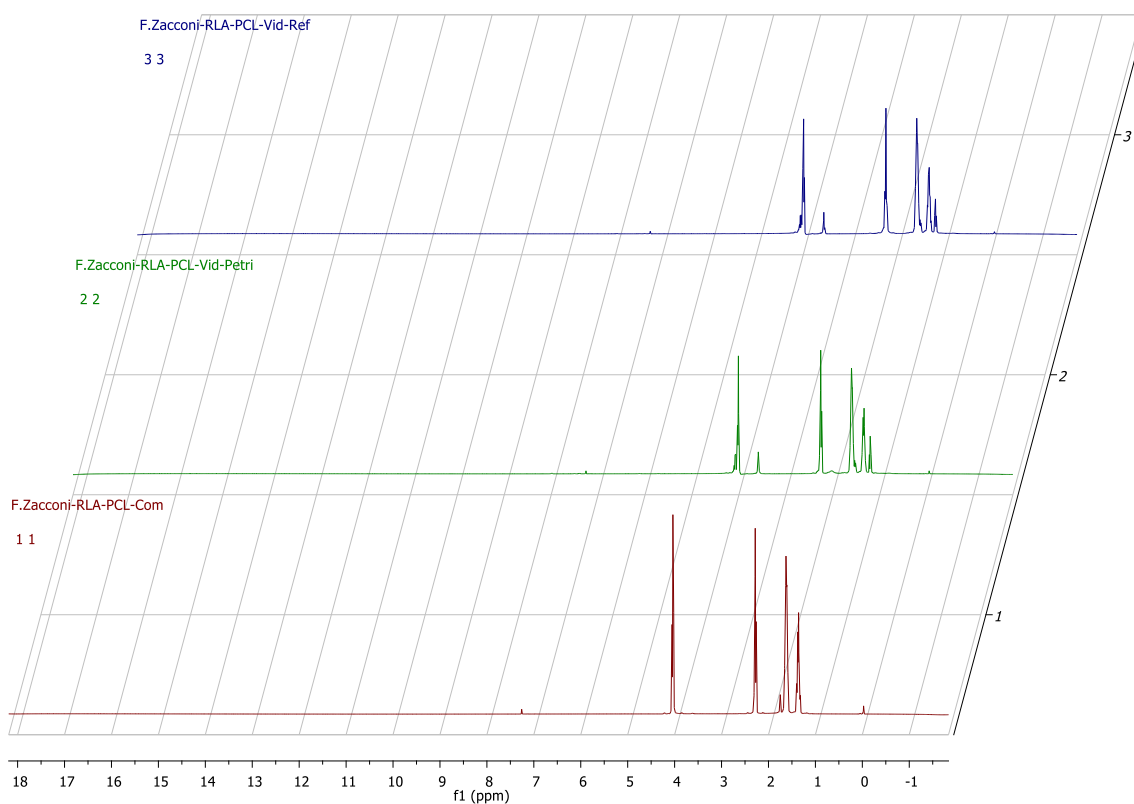


Figura 6. Espectros obtenidos mediante RMN. Los dos primeros corresponden a dos muestras analizadas (espectros azul y verde), mientras que el último corresponde al espectro obtenido para PCL comercial (espectro rojo).

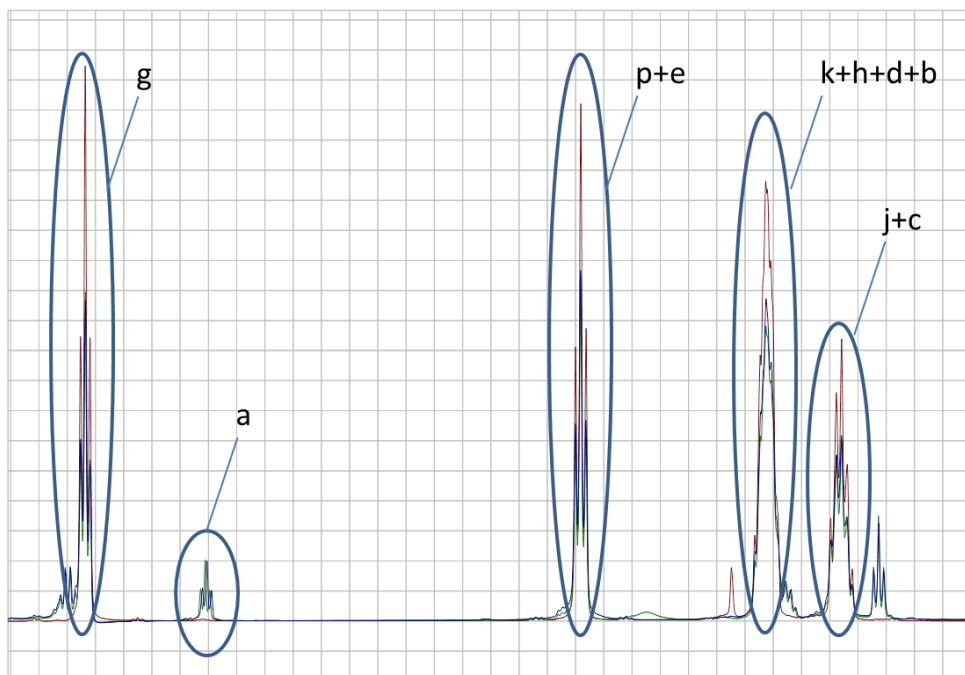
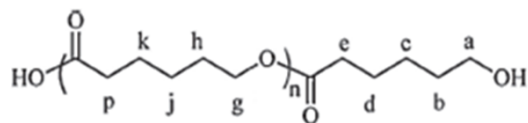


Figura 7. Espectro de protones superpuestos. Se destacan los picos correspondientes a los distintos grupos funcionales que componen la cadena polimérica, junto con la molécula de PCL.

De las Figuras 6 y 7 se observa sutiles diferencias frente al espectro de la PCL comercial, presentando picos correspondientes eventualmente a otros compuestos, derivados tanto de la enzima solubilizada al momento de la separación final del polímero, como de posibles subproductos formados por transesterificación o sustrato sin reaccionar. Sin embargo, también se observa que tanto los espectros de los polímeros obtenidos en el laboratorio como el espectro de la PCL comercial presentan picos comunes, correspondientes a los distintos grupos funcionales de los que está compuesta la molécula, por lo que se puede inferir que se está en presencia de PCL en el polímero producido en el laboratorio con las condiciones propuestas.

Cabe destacar que el proceso de comparación se realizó para cada una de las muestras obtenidas y analizadas. Los espectros adjuntos con anterioridad se muestran con fines explicativos del procedimiento de validación.

4.3. Validación de los resultados mediante comparación con la literatura

El peso molecular (M_n) obtenido mediante RMN para cada una de las ROP realizadas en triplicado se muestran a continuación en la Tabla 5 (ver condiciones en la sección 3.3. Condiciones operacionales propuestas).

Tabla 5. Resultados obtenidos para una ROP de ϵ -CL catalizada mediante CALB en scCO₂ para cada una de las condiciones operacionales estudiadas.

Condiciones	Réplicas	M_n (Da)	Promedio (Da)
1	1	13.492	12.196
	2	10.656	
	3	12.440	
2	1	9.358	8.826
	2	8.398	
	3	8.723	
3	1	5.801	6.161
	2	5.037	
	3	7.646	
4	1	26.065	20.811
	2	18.557	
	3	17.812	

De acuerdo a los resultados obtenidos para las primeras condiciones operacionales estudiadas (Ver sección 3.3. Condiciones operacionales propuestas), presentados en la Tabla 5, se obtiene en promedio un peso molecular de 12.200 Da, con pesos moleculares que van desde los 10.700 a los 13.500 Da aproximadamente.

Los resultados obtenidos por Santos *et al.* (2012) (ver Tabla 4), para reacciones realizadas a 65 °C y 14,5 MPa muestran pesos moleculares de 2.100 y 3.900 Da, mientras que para reacciones a 15 MPa se obtiene un peso molecular de 1.150 Da, sin embargo, todas las reacciones fueron realizadas durante 2 horas.

Al comparar los resultados obtenidos para las primeras condiciones operacionales estudiadas con los de Santos *et al.* (2012) (ver Tabla 4), se puede encontrar diferencias sustanciales en el peso molecular, siendo mucho mayor los obtenidos en esta investigación. Dicha diferencia se puede atribuir principalmente al tiempo de reacción, no obstante, es necesario un estudio de intervalos de confianza para evaluar si efectivamente dicha diferencia el tiempo es una variable influyente en la reacción. Por otra parte, el estudio realizado por Santos *et al.* (2012), obtuvo los pesos moleculares mediante un análisis GPC, mientras que el presente estudio se basa en un análisis de RMN, lo que puede influir a su vez en las diferencias obtenidas.

En cuanto a los resultados expuestos por Loeker *et al.* (2004) (ver Tabla 3) para reacciones a las condiciones similares a la estudiadas, los autores obtienen un polímero de 35.000 Da para una reacción llevada a cabo a 65 °C y 14 MPa, un valor en promedio 3 veces mayor al obtenido en la presente investigación. Estas diferencias son atribuibles principalmente al tiempo de reacción, ya que los experimentos realizados por Loeker *et al.* (2004) fueron durante 24 horas, un tiempo 12 veces mayor, donde se le puede dar el tiempo necesario a la reacción para que sea llevada a cabo en su totalidad y aumente tanto la conversión como el tamaño de las cadenas poliméricas. Sin ir más lejos, el peso molecular y la conversión (98%) del polímero obtenido por los autores fue el mayor dentro del resto de condiciones estudiadas lo que se condice con lo obtenido para esta investigación, ya que estas condiciones presentan los mejores resultados para un monómero de 99% de pureza, mismo valor que el utilizado por los autores anteriormente citados.

Las segundas condiciones operacionales estudiadas (Ver sección 3.3. Condiciones operacionales propuestas), correspondientes a los resultados mostrados en la Tabla 5, arrojan polímeros de peso molecular de entre 8.400 y 9.400 Da aproximadamente, con un promedio de 8.800 Da.

Según los experimentos realizados por Santos *et al.* (2012) (ver Tabla 4) para las condiciones similares a las segundas condiciones estudiadas (ver sección 3.3. Condiciones operacionales propuestas), a 20 MPa y 65 °C, el peso molecular obtenido es de entre 1.100 y 1.500 Da, siendo en promedio un 85% menor que las obtenidas en este estudio. Sin embargo, el monómero utilizado por Santos *et al.* (2012) fue de 97% de pureza y adicionalmente se le agrega más agua. De acuerdo a estos resultados, se puede ver que el exceso de agua presente

en la reacción promueve reacciones secundarias que impiden el crecimiento de cadenas poliméricas, formando incluso cadenas cíclicas de menor peso.

Adicionalmente los autores obtienen un polímero de 7.400 Da sin agregar agua al sistema, a una presión de operación de 18 MPa y una temperatura de 65 °C, lo que se acerca más a los resultados expuestos con anterioridad, pese a que los autores realizan las reacciones con un tiempo de reacción de 2 horas, lo que explica en parte esta pequeña diferencia, teniendo aún que rectificarla o refutarla según el estudio de significancia correspondiente.

Al comparar los pesos moleculares obtenidos a partir de las segundas condiciones (ver Tabla 5), con los resultados que obtienen los autores Loeker *et al.* (2004) (ver Tabla 3), se observa diferencias importantes, donde dichos autores obtienen polímeros de pesos moleculares notoriamente mayores.

Para una reacción a 65 °C y 22 MPa, los autores obtienen polímeros de pesos moleculares que van desde los 17.000 hasta los 30.000 Da, para reacciones con 2, 6, 24 y 72 horas de tiempo de residencia siendo estos resultados 2 a 3,5 veces mayor a los 8.800 Da obtenidos para las segundas condiciones operacionales estudiadas. Cabe mencionar que para éstas condiciones los autores logran los mejores resultados para una reacción por 24 horas, mientras que, para una reacción de 72 horas el peso molecular disminuye, posiblemente atribuible a la degradación del polímero debido a la exposición prolongada a altas presiones y temperaturas.

Dichas diferencias son atribuibles posiblemente al control sobre otras condiciones operacionales no estudiadas, como la relación entre ϵ -CL y scCO₂, debido a que la conformación del sistema experimental difiere al usado en este proyecto e impide el control sobre dicha variable, ya que el resto de las condiciones operacionales replicadas fueron casi idénticas entre ambos estudios.

Las condiciones 3 y 4 estudiadas (ver sección 3.3. Condiciones operacionales propuestas), se comparan con la literatura en conjunto, ya que estas reacciones variaron solamente en el grado de pureza del monómero utilizado, y los autores con los que se realizan dichas comparaciones también utilizan distintos contenidos de agua para la reacción de polimerización.

La Tabla 5 muestran pesos moleculares de 6.200 y 21.000 Da aproximadamente para las condiciones 3 y 4 respectivamente. En primera instancia, se está en presencia de notorias diferencias entre los monómeros utilizados, ya que el resto de las condiciones se mantuvo constante en ambas reacciones, sin embargo, el estudio de la influencia de las variables se realizará en el punto siguiente, mientras que para esta oportunidad se da lugar a la comparación con la literatura.

Las reacciones llevadas a cabo por Santos *et al.* (2012) (ver Tabla 4) a 20 MPa y 2 horas de tiempo de residencia muestran pesos moleculares de 1.300 Da aproximadamente. Dichos resultados son ampliamente inferiores a los presentados en este estudio a pesar de haber tenido el mismo tiempo de reacción, sin embargo, al igual que lo discutido para las segundas condiciones, los autores utilizan agua adicional, lo que puede ser contraproducente ya que un exceso de agua en la ROP, según Thurecht *et al.* (2006), dará lugar a cadenas poliméricas más cortas de menor peso molecular, debido al cierre de cadenas que el agua provoca, interrumpiendo el curso normal de la reacción.

Si se realiza una comparación con los resultados obtenidos por Loeker *et al.* (2004) (ver Tabla 3), se está en presencia de un fenómeno interesante. Los autores realizan reacciones de polimerización a 65 °C y 22 MPa a distintos tiempos de residencia. Una reacción de 2 horas de tiempo de reacción, entrega un polímero de 17.000 Da de peso molecular, que al ser comparado con el peso molecular del polímero producido con un monómero de 99% de pureza resulta ser bastante mayor, sin embargo, cuando se repitió el experimento con un monómero de 97% de pureza, los resultados mejoraron considerablemente, ya que el polímero obtenido es de 21.000 Da en promedio.

Es en este punto donde se puede inferir que los postulados realizados por Albertsson & Srivastava, (2008) sobre la propiedad de iniciar la reacción que tiene el agua presente en la alimentación no son incorrectos. Este será justamente un punto importante de comparación y de validación de la significancia de las variables controladas en la reacción, el cual será estudiado en detalle en la siguiente sección, con el cual se podrá finalmente refutar o corroborar el postulado.

4.4. Estudio de la influencia de las variables estudiadas mediante intervalos de confianza

Durante esta sección se estudia el efecto que tienen las variables en el polímero producido, y si presentan diferencias significativas al modificar alguna de ellas, lo que pueda dar indicios de la dirección a seguir apuntando a la optimización del proceso, buscando encontrar las condiciones óptimas de operación para poder lograr producir un polímero apto para su aplicación comercial, principalmente en el campo de la medicina, donde un polímero de alto peso molecular es deseado debido a sus características estructurales que presenta.

La obtención de los intervalos de confianza para las distintas condiciones estudiadas se realiza con un 90% de confianza y dos grados de libertad, ya que cada una de las reacciones fueron realizadas en triplicado, apuntando a reducir la variabilidad de los datos.

Se opta por un 90% de confianza ya que el proceso no está estandarizado y la investigación se encuentra en una fase más bien de exploración. Por otra parte, el equipo no permite replicar en un 100% las condiciones deseadas, sin embargo, como ya fue demostrado con anterioridad, el protocolo y la unidad experimental permiten producir polímeros de un peso molecular medio, superando incluso los obtenidos por algunos autores. Por otra parte, la elección también se fundamenta en otros estudios realizados, como por ejemplo los que realizaron Santos *et al.* (2012), donde el análisis estadístico fue con un 90% de confianza.

A continuación, se presenta la Tabla 6, en la cual están tabulados los valores para la obtención de los intervalos de confianza del peso molecular logrado a partir de las distintas condiciones operacionales estudiadas junto con los límites resultantes del análisis.

Tabla 6. Intervalos de confianza para las distintas condiciones operacionales estudiadas, junto con los valores a partir de los cuales fueron obtenidos.

Parámetro	Condiciones operacionales			
	1	2	3	4
M_n promedio (Da)	12.196	8.726	6.161	20.811
Desviación estándar (Da)	1.434	488	1.341	4.565
Confianza (%)	90	90	90	90
Grados de libertad	2	2	2	2
t crítico	2,92	2,92	2,92	2,92
Límite inferior (Da)	9.779	8.003	3.900	13.115
Límite superior (Da)	14.613	9.649	8.623	28.507

Para facilitar el análisis en el estudio de los intervalos de confianza de las alternativas propuestas, se presenta la Fig. 8, donde se encuentran graficados los intervalos de confianza para cada una de las cuatro alternativas estudiadas.

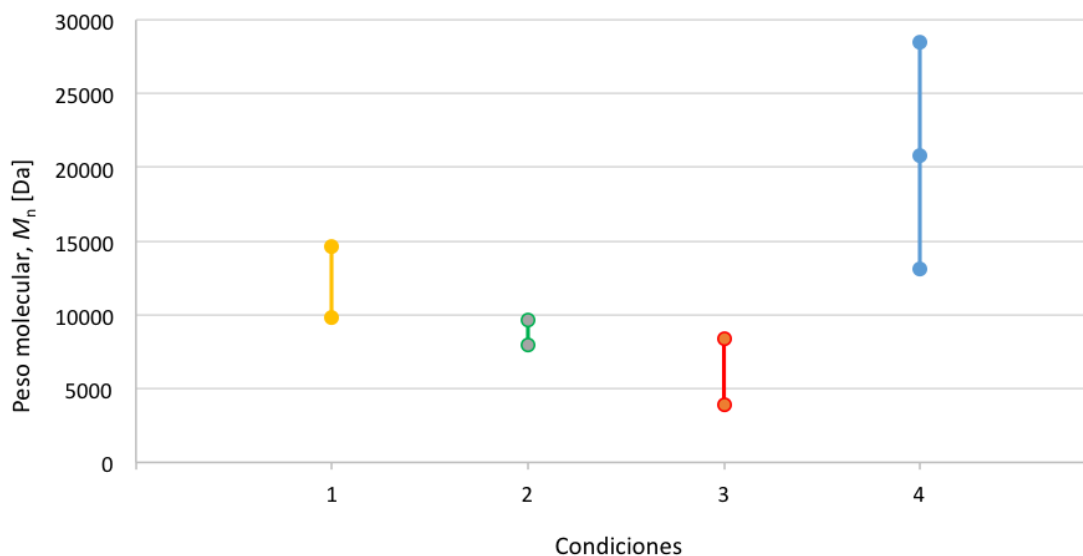


Figura 8. Intervalos de confianza del peso molecular obtenido para cada una de las condiciones operacionales estudiadas. El intervalo amarillo (condición 1) corresponde a una ROP de 4,5 h; 14,5 MPa y 99% de pureza de ϵ -CL. El intervalo verde (condición 2) corresponde a una ROP de 4,5 h; 20 MPa y 99% de pureza de ϵ -CL. El intervalo rojo (condición 3) corresponde a una ROP de 2 h; 20 MPa y 99% de pureza de ϵ -CL. El intervalo azul (condición 4) corresponde a una ROP de 2 h; 20 MPa y 97% de pureza de ϵ -CL.

4.4.1. Estudio de la presión del sistema

De la Tabla 6 se desprende los intervalos de confianza para una reacción llevada a cabo a dos presiones distintas, 14,5 y 20 MPa respectivamente (Condiciones operacionales 1 y 2, ver sección 3.3. Condiciones operacionales propuestas), mientras que el resto de los parámetros se mantuvo constante (temperatura, proporción de enzima, cantidad de agua, agitación). Así, es posible estudiar el efecto de la presión en el polímero producido, y de encontrar diferencias entre los pesos molecular logrados, estudiar si esta diferencia es significativa o no, lo que implicaría que la modificación de la presión en experimentos futuros asegura resultados distintos a los obtenidos con anterioridad.

En promedio, una reacción a 14,5 MPa presenta polímeros con un peso molecular de 12.000 Da aproximadamente, mientras que para una reacción a 20 MPa el peso molecular del polímero producido es en promedio aproximadamente 8.800 Da. En primera instancia, se aprecia que una reacción a 14,5 MPa produce polímeros de mayor peso molecular que una reacción llevada a cabo a 20 MPa, sin embargo, es necesario estudiar los intervalos de confianza para inferir si esta diferencia es significativa o no.

Con respecto a la Fig. 8, se puede observar que los intervalos de confianza de las condiciones 1 y 2 no se solapan y se puede apreciar que una reacción a 14,5 MPa daría como mínimo un polímero de 9.800 Da aproximadamente, mientras que lo máximo que una reacción a 20 MPa podría producir es un polímero de 9.700 Da aprox.

Así, es posible inferir con un 90% de certeza que las reacciones llevadas a cabo durante 4,5 horas y 14,5 MPa producen un polímero de mayor peso molecular que aquellas realizadas durante el mismo tiempo, pero a 20 MPa.

Adicionalmente, es pertinente analizar la estrecha diferencia que presentan dichos intervalos de confianza, pudiendo acrecentar las diferencias si se pudiera replicar más veces las reacciones, aumentando los grados de confianza y disminuyendo la variabilidad de los datos, o bien aumentando la distancia entre los valores estudiados de la variable objetivo, es decir, realizar experimentos a presiones menores de 14,5 MPa y otras mayores a 20 MPa para así establecer si las diferencias al aumentar o disminuir la presión son más evidentes.

De manera complementaria, se discute y fundamenta los resultados a partir de la solubilidad del monómero utilizado en la reacción en el CO₂. El estudio del efecto de la presión del sistema en la ROP no es un tema sencillo de discutir ni es posible llegar a conclusiones definitivas al respecto debido al poco conocimiento que se tiene sobre el control de la reacción y al efecto que tienen las distintas variables en ésta, teniendo que validar cada una de las conjeturas realizadas por medio de experimentación.

A temperatura constante, un aumento en la presión del sistema aumenta la solubilidad del soluto en el solvente en la fase gaseosa, que es la que permite el transporte y el contacto entre la enzima y el sustrato (Bender *et al.*, 2010). Deteniéndose en esta observación, es posible pensar que a mayores presiones se lograría un mayor peso molecular, debido a que el monómero estaría más disuelto en el medio de reacción, sin embargo, los resultados obtenidos no lo avalan

Es aquí donde se tiene la primera problemática, ya que no necesariamente al aumentar la solubilidad se obtienen mejores resultados. La razón de esta situación radica en que al encontrarse el monómero más disuelto en el medio, éste se encuentra más aislado y por lo tanto se le dificulta más la interacción con el sitio activo de la enzima que es la que facilita la propagación de la cadena polimérica. Así, mediante esta conjetura es posible validar los resultados obtenidos y se establece la incertidumbre sobre el rango de presiones óptimas para la reacción, ya que ésta no debe ser demasiado alta para solubilizar un alto porcentaje de monómero, disminuyendo así la disponibilidad de éste en la reacción, ni tampoco debe ser demasiado baja, debido a que de no presentar monómero disuelto en el CO₂, se dificulta la interacción entre la ϵ -CL y la enzima, repercutiendo en polímeros de menores pesos moleculares.

4.4.2. Estudio del tiempo de reacción

El segundo estudio a realizar es sobre el efecto del tiempo de residencia en el polímero formado a través de una reacción de polimerización durante 4,5 y 2 horas, para establecer si a partir de dicha diferencia en el tiempo se obtiene efectivamente polímeros de mayor peso molecular como se podría esperar según la cinética de una reacción. La Tabla 6 muestra los intervalos de confianza para las dos reacciones llevadas a cabo, donde se indican las

condiciones para su obtención (condiciones operacionales 2 y 3 respectivamente, ver sección 3.3. Condiciones operacionales propuestas).

En primera instancia, se observa que una reacción de 4,5 horas y 20 MPa produce un polímero con un peso molecular de 8.800 Da en promedio, mientras que para una reacción de 2 horas y 20 MPa se obtiene en promedio un polímero con 6.100 Da de peso molecular. A partir de esta información se podría intuir que una reacción de 4,5 horas produciría polímeros de mayor peso molecular, sin embargo, es necesario complementar esta información mediante el análisis de los intervalos de confianza obtenidos para ambas condiciones.

De la Fig. 8., se aprecia que los intervalos de confianza de las condiciones 2 y 3 se solapan, al tener que una reacción de 4,5 horas produce un polímero con un peso molecular de 8.000 Da como mínimo, y que el límite superior para una reacción de 2 horas es un polímero de peso molecular de 8.400 Da aproximadamente como máximo.

Así, con un 90% de certeza, se puede inferir que una reacción de 4,5 horas no necesariamente entrega polímeros de mayor peso molecular respecto a la misma reacción llevada a cabo por sólo dos horas.

Pese a que el análisis a partir de los intervalos de confianza sugiere que una reacción de 4,5 horas no representa diferencias significativas respecto a una reacción llevada a cabo por 2 horas, es posible analizar otros aspectos que puedan dar indicios de que se está en la dirección correcta. Primero que todo, al fijarse en las desviaciones estándar para cada una de las reacciones, se observa que para una reacción de 4,5 horas se tiene menor variabilidad, lo que podría indicar que los polímeros obtenidos a partir de estas condiciones estarán dentro de un rango más acotado de pesos moleculares, parámetro que se desea mantener lo más controlado posible, pudiendo así inclinarse por esta alternativa frente a una reacción de dos horas, que presenta una desviación estándar aproximadamente 3 veces mayor.

Si se sostiene la hipótesis de que a mayores tiempos de residencia se obtiene un polímero de mayor peso molecular, es necesario plantear la posibilidad de analizar la diferencia respecto a tiempos de residencia aún mayores en comparación a las 4,5 horas estudiadas.

Finalmente, se plantea aumentar la diferencia entre los valores que toma la variable estudiada, y, en vez de estudiar la diferencia entre reacciones de 2 y 4,5 horas, realizar experimentos que permitan estudiar una diferencia mayor, como por ejemplo entre reacciones de 2 y 8 horas, con el fin de obtener datos más concluyentes al respecto, aumentando las diferencias entre los polímeros obtenidos.

4.4.3. Estudio del contenido de agua en el sistema

Debido a que existen diversos postulados sobre el efecto del contenido óptimo de agua en una reacción de polimerización, donde se deduce que no es conveniente un contenido elevado de agua que pueda desencadenar en reacciones secundarias, pero tampoco es recomendable una ausencia de este compuesto debido a su capacidad de iniciar la reacción y así evitar iniciadores externos (alcoholes o amidas), se ha optado por estudiar el efecto de esta variable en el polímero final obtenido, manteniendo todo el resto de los parámetros constantes y así estudiar la diferencia entre los polímeros, y de encontrarse diferencias, estudiar si esta es significativa o no, donde se pueda inferir qué contenido de agua genera polímeros más pesados, y por ende más aptos para su aplicación industrial.

La Tabla 6 muestra los intervalos de confianza para reacciones llevadas a cabo con monómeros de 99% y 97% de pureza respectivamente (Condiciones operacionales 3 y 4, ver sección 3.3. Condiciones operacionales propuestas), junto con las condiciones bajo las cuales fueron obtenidos.

Se puede observar una diferencia notoria entre los pesos moleculares del polímero obtenido utilizando los distintos monómeros. Para una reacción llevada a cabo con un monómero de 97% de pureza, se obtuvo polímeros de un peso molecular de 21.000 Da en promedio, aproximadamente, mientras que una reacción utilizando un monómero de 99% de pureza entrega polímeros de peso molecular de 6.200 Da en promedio, aproximadamente. En una primera instancia, se puede intuir que una reacción con monómeros de 97% de pureza efectivamente entrega diferencias significativas respecto al de 99%, a pesar de presentar una desviación estándar elevada, sin embargo, es necesario confirmar dicha hipótesis mediante el análisis de intervalos de confianza.

Para mayor comodidad y facilidad en el análisis, observando los intervalos de confianza para las condiciones 3 y 4 mostrados en la Fig. 8, queda en evidencia que ambos intervalos no se solapan, sin ir más lejos, las diferencias son notorias y se logra inferir con un 90% de confianza que un monómero de 97% de pureza presenta diferencias significativas positivas en el peso molecular del polímero obtenido.

Pese a que ambos intervalos de confianza no se solapan, se puede observar una alta variabilidad en el intervalo de confianza obtenido para una reacción llevada a cabo con un monómero de 97% de pureza, por lo que se puede intuir que el contenido de agua en el sistema genera reacciones secundarias, resultando en un menor control de la reacción. El problema radica en que no se tiene conciencia del límite máximo del contenido de agua en la reacción sin que ésta pierda control. Es por esto que se propone realizar un test de Fischer para comparar ambas varianzas y así obtener información sobre el intervalo de confianza que poseen las varianzas poblacionales de dichas alternativas, lo que puede entregar información sobre si efectivamente un monómero de 97% de pureza, debido a su mayor contenido de agua resulta en un menor control en el peso molecular final.

La obtención del intervalo de confianza para la razón entre varianzas poblacionales de las condiciones 3 y 4 está detallada en el Anexo 3. A partir de dicho intervalo de confianza, se puede observar que el valor 1 para la razón entre las varianzas poblacionales está incluido en el intervalo, por lo que no se puede descartar la idea de que éstas sean iguales. Por consiguiente, se infiere con un 90% de confianza que la distribución de las varianzas obtenidas proviene de varianzas poblacionales iguales.

En función a lo encontrado a partir del test de Fischer realizado, se descarta la idea de que un monómero de 97% de pureza entrega resultados con mayor variabilidad y por ende menor control sobre la reacción, por lo que reafirma la importancia de dicha variable en el resultado final, resultando en polímeros de pesos moleculares mayores, sin perder control sobre la reacción.

Analizando más a fondo los resultados, comparando todos los promedios mostrados en la Tabla 6, obtenidos para todas las reacciones a distintas condiciones, se puede observar que el mejor resultado corresponde precisamente al polímero de peso molecular de 21.000 Da aproximadamente, obtenido mediante una reacción a 20 MPa y 2 horas, a partir de un

monómero de 97% de pureza. Dicho resultado es el mejor obtenido al compararlo con el resto de las reacciones, donde se combinan distintos valores de presión y tiempo de reacción, sin embargo, el resto de las reacciones fueron llevadas a cabo a partir de un monómero de 99% de pureza, reafirmando el hecho de que un mayor porcentaje de agua en la reacción fomenta el inicio de la reacción y por ende la obtención de polímeros de mayor peso molecular.

Para realizar un correcto análisis y comparar simultáneamente dicho polímero con el resto, obtenido a partir de las distintas condiciones estudiadas, se debe mirar la Fig. 8, donde se aprecia que el intervalo de confianza azul, correspondiente al monómero de 97% de pureza (cuarta condición estudiada), es superior al resto, al menos de manera tentativa.

Ya que el análisis entre la tercera y la cuarta condición fue realizado recientemente, resultando en una influencia significativa positiva del contenido de agua, es oportuno comparar en esta oportunidad la segunda condición con el intervalo correspondiente a la cuarta condición. Ambas reacciones fueron llevadas a cabo a 20 MPa, por lo que se descarta una influencia de esta variable en los resultados, al mantenerse constante dicho parámetro, sin embargo, la segunda condición propuesta fue realizada por 4,5 horas, por lo que se deberían esperar polímeros de un peso molecular ligeramente mayor, o al menos no menores, sin mayores diferencias significativas, como fue demostrado en el estudio del tiempo de reacción (ver sección 4.4.2. Estudio del tiempo de reacción).

Paradójicamente, dichos intervalos no se solapan e incluso se observa que la cuarta alternativa resulta en polímeros significativamente mayores, pese a obtenerse a un menor tiempo de residencia. Así, se le adjudica dicha diferencia nuevamente al contenido de agua, corroborando la inferencia realizada con anterioridad.

Por último, se analizan los intervalos correspondientes a la primera y cuarta condición (ver Fig. 8). La primera condición corresponde a la combinación de las mejores condiciones esperables, un tiempo de reacción de 4,5 horas, dándole un tiempo mayor de residencia que permita un aumento de la cadena polimérica, esperando polímeros de mayores pesos moleculares, y por otra parte una presión de 14,5 MPa, que como ya se demostró con anterioridad, esta presión mostró efectos significativamente positivos en el polímero resultante frente a una reacción a 20 MPa (ver sección 4.4.1. Estudio de la presión del

sistema), como es el caso de la cuarta condición, que corresponde a una reacción de menor tiempo de residencia (2 horas) y 20 MPa.

La primera condición entrega en promedio polímeros con un peso molecular de aproximadamente 12.000 Da, mientras que la cuarta alternativa produce en promedio polímeros de 21.000 Da. Como se observa en la Fig. 8, estos intervalos de confianza se solapan, por lo que con un 90% de confianza se puede inferir que no se obtienen diferencias significativas entre estas alternativas. Sin embargo, el solapamiento es mínimo y la desviación estándar de la cuarta alternativa es 3 veces mayor a la obtenida para la primera alternativa, por lo que se intuye que, aumentando el número de grados de libertad, esta diferencia podría ir aumentando hasta incluso encontrar diferencias significativas entre ambas alternativas.

Para rectificar dicha hipótesis, es posible referirse al Test de Fischer realizado con anterioridad, donde el intervalo de confianza para las variables poblacionales no encontró diferencias entre un monómero de 99% y 97%, por lo que, al realizarse más réplicas para el estudio, las variabilidades deberían equipararse, y las diferencias podrían ser más notorias.

Sin ir más lejos, la Tabla 5 muestra los resultados para cada uno de los triplicados realizados para las condiciones 1 y 4 (Ver sección 3.3. Condiciones operacionales propuestas), donde se observa que el polímero de mayor peso molecular que se logra con las primeras condiciones (las mejores propuestas) es de 14.000 Da aproximadamente, mientras que el mínimo peso molecular que se obtiene a partir de la cuarta alternativa, es de 18.000 Da aproximadamente, aun cuando esta reacción se lleva a cabo con las condiciones operacionales menos auspiciosas.

Una vez más, ya que el efecto del tiempo de reacción y la presión del sistema fueron discutidos, se atribuye esta diferencia a la pureza del monómero, ya que la primeras condiciones comprenden a un monómero de 99% de pureza, mientras que la cuarta incluye un monómero de 97% de pureza, intuyendo que mientras menos pureza tenga el sustrato, mayor será el contenido de agua que posea y, por consiguiente, ésta actúa como iniciador de la reacción, resultando en polímeros de mayor peso molecular al facilitar la acción de la enzima y la propagación de la cadena polimérica. Notar que existe un rango de contenido de agua óptimo, ya que de aumentar mucho su composición en la reacción se perdería control

de ésta y se fomenta la formación de reacciones secundarias y polímeros de menor peso molecular, sin embargo, no se tiene certeza de cuál es el contenido de agua máximo que pueda.

De manera complementaria, debido a que se tiene conciencia de la importancia del contenido de agua en la reacción, tal como distintos autores han demostrado (Dong *et al.*, 1999; Hedfors *et al.*, 2005), y en base a lo discutido en esta investigación, se realizó estudios paralelos de absorción de agua en el sistema, utilizando sílica gel o carbón activado. La metodología y los resultados sobre estos estudios se encuentran en el Anexo 4.

4.5. Cierre de balances de materia

El siguiente punto tiene como objetivo mostrar los resultados obtenidos a partir del cierre de los balances de materia, como recuperación y rendimiento. Cabe destacar que debido a que se desconoce la cinética y la conversión de la reacción, y por ende la cantidad de polímero obtenido al final de la reacción, no se puede obtener el dato de rendimiento neto, sin embargo, a partir de algunos supuestos se presentan datos aproximados.

Como resultado de la reacción se tiene un colector al final del reactor, donde luego del proceso de extracción quedaron depositados tanto subproductos de bajo peso molecular, como oligómeros o cadenas cortas junto con parte del monómero que pueda haber quedado sin reaccionar, mientras que el resto del polímero obtenido, se encuentra dentro de los canastos que se encontraban dentro del reactor.

Para considerar las pérdidas de masa durante la reacción y/o extracción, que puede deberse a materia retenida en los conductos o monómero arrastrado hacia el ambiente por el CO₂ luego del proceso de extracción (primer supuesto), se considera como masa recuperada tanto la masa retenida en el reactor como la masa depositada en el colector. Así, las pérdidas será la diferencia entre la masa inicial de monómero ingresado al sistema y la masa recuperada luego del proceso de polimerización y extracción.

Por otro lado, para presentar un valor de rendimiento aproximado de la reacción, se realiza el supuesto donde se considera que todo lo que quedó contenido en los canastos interiores corresponde a un polímero de peso molecular suficientemente alto para no haber sido

extraído en el proceso final de extracción, por lo que se considera dicha masa como la masa total de polímero producida (Masa PCL).

La Tabla 7 muestra la masa resultante para cada una de las reacciones realizadas, tanto para las distintas alternativas estudiadas, como cada uno de los triplicados realizados para cada una de éstas.

Tabla 7. Recuperaciones y rendimientos aproximados para cada una de las racciones realiadas. Se tabulan tanto la masa recuperada (masa total en canastos y colector luego de la reacción) como la masa de PCL obtenida (masa contenida dentro de los canastos luego de la reacción).

Condiciones	Réplicas	ϵ -CL inicial (g)	Masa recuperada (g)	Masa PCL (g)	Recuperación (%)	Rendimiento (%)
1	1	11,37	8,78	7,08	77,26	62,25
	2	11,32	9,02	6,52	79,73	57,62
	3	10,09	8,29	6,75	82,20	66,89
2	1	13,53	8,08	7,13	59,54	52,73
	2	10,43	6,65	4,55	63,76	43,61
	3	10,08	7,24	5,98	71,86	59,35
3	1	11,00	7,57	5,58	68,82	50,69
	2	10,08	5,64	5,24	55,93	52,00
	3	11,02	7,97	7,24	72,34	65,65
4	1	10,52	5,58	4,75	53,06	45,13
	2	12,49	9,18	8,34	73,46	66,78
	3	10,37	8,05	6,39	77,64	61,64

A partir de la información entregada por la Tabla 7, se puede apreciar que las recuperaciones del sistema se encuentran en un intervalo de entre un 82,20 y un 53,06 %, con un promedio de 69,65%. Lo deseable sería reducir las pérdidas del sistema, lo que implicaría que o bien las pérdidas en los conductos se redujo, siendo resultado de mayor cantidad de polímero dentro del reactor y por consiguiente un mayor rendimiento, y/o que las pérdidas por arrastre de CO₂ al ambiente disminuyeron.

Para esto se realiza un estudio de intervalos de confianza para las recuperaciones de cada una de las alternativas, graficados en la Fig. 9.

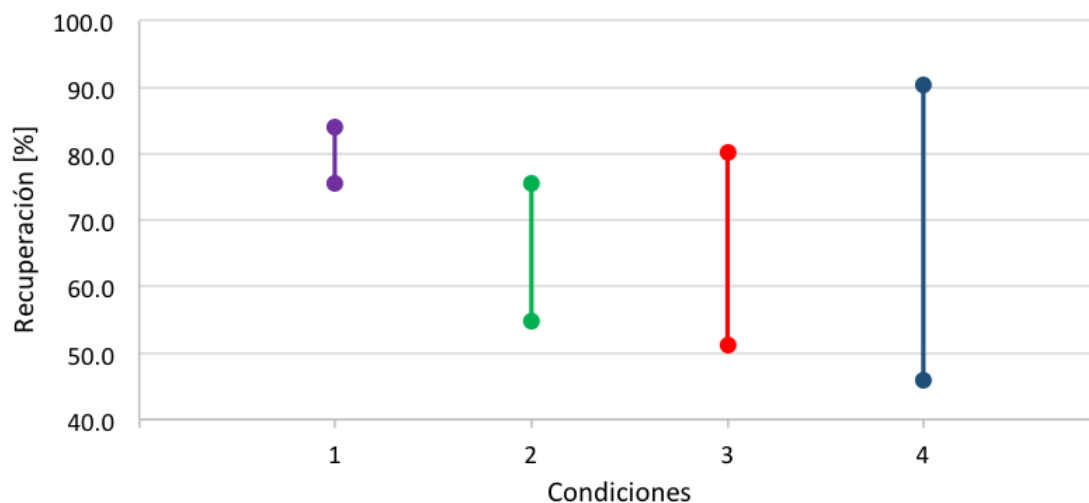


Figura 9. Intervalos de confianza de las recuperaciones en cada una de las condiciones operacionales estudiadas para analizar las pérdidas del sistema. El intervalo morado (condición 1) corresponde a una ROP de 4,5 h; 14,5 MPa y 99% de pureza de ϵ -CL. El intervalo verde (condición 2) corresponde a una ROP de 4,5 h; 20 MPa y 99% de pureza de ϵ -CL. El intervalo rojo (condición 3) corresponde a una ROP de 2 h; 20 MPa y 99% de pureza de ϵ -CL. El intervalo azul (condición 4) corresponde a una ROP de 2 h; 20 MPa y 97% de pureza de ϵ -CL.

De la Fig. 9 se puede apreciar que los intervalos para las recuperaciones a partir de todas las alternativas se solapan entre sí, por lo que se puede inferir con un 90% de confianza que los resultados de recuperación obtenidos son independientes de las condiciones operacionales del sistema y se debe netamente a la conformación del sistema experimental. En cuanto al rendimiento aproximado de la reacción (ver Tabla 7), se tiene que dicho valor varía entre 66,89 y un 43,61 %, con un promedio de 57,03 %.

Ya que el objetivo del proyecto es producir PCL apta para su aplicación, el rendimiento de la reacción es de suma importancia para aumentar la productividad. En base a esto, se realiza un estudio de intervalos de confianza para los rendimientos aproximados de la reacción, con un 90% de certeza, graficados en la Fig. 10.

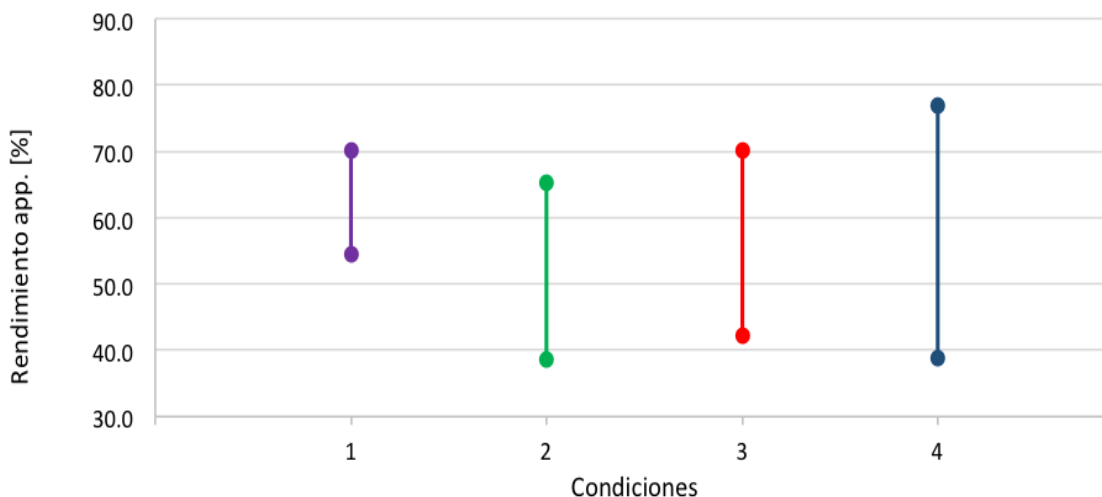


Figura 10. Intervalos de confianza del rendimiento aproximado obtenido para cada una de las condiciones operacionales estudiadas. El intervalo morado (condición 1) corresponde a una ROP de 4,5 h; 14,5 MPa y 99% de pureza de ϵ -CL. El intervalo verde (condición 2) corresponde a una ROP de 4,5 h; 20 MPa y 99% de pureza de ϵ -CL. El intervalo rojo (condición 3) corresponde a una ROP de 2 h; 20 MPa y 99% de pureza de ϵ -CL. El intervalo azul (condición 4) corresponde a una ROP de 2 h; 20 MPa y 97% de pureza de ϵ -CL.

Se puede apreciar que los intervalos para cada una de las reacciones se solapan, por lo que se puede inferir con un 90% de confianza que para estas alternativas no se presentan diferencias significativas en el rendimiento aproximado de la reacción. En base a lo anterior, es posible intuir que la cantidad de masa retenida en el reactor no corresponde en su totalidad a PCL y se puede estar en presencia de cadenas poliméricas más cortas o moléculas provenientes de reacciones secundarias que no lograron ser separadas mediante el proceso de extracción, por lo que para obtener un valor certero de rendimiento es necesario un análisis químico que entregue la cantidad exacta de PCL obtenida luego de la ROP.

5. Conclusiones y trabajo futuro

Una vez finalizada la investigación, queda en evidencia la importancia de la PCL en el desarrollo y avance de la ciencia en la actualidad, debido a la cantidad e importancia de las aplicaciones que poseen los polímeros, principalmente en el área médica, donde el constante desarrollo de nuevas tecnologías permite al humano avanzar en dirección de una mejora de la calidad de vida.

El principal objetivo de esta investigación fue proponer un método alternativo de producción de PCL de manera amigable con el ambiente y el cuerpo humano. En base a los resultados obtenidos mediante RMN, donde el análisis de los espectros muestran picos característicos de los grupos funcionales de una molécula de PCL, se valida el método de obtención propuesto, de una reacción de polimerización por apertura de anillos biocatalizada a partir de la enzima Lipasa B de *Candida antarctica*, en un medio con dióxido de carbono supercrítico, por lo que, si bien esta investigación corresponde a una fase exploratoria en la optimización del proceso de producción de PCL, donde son necesarias etapas posteriores de estudio para reducir las diferencias con respecto al peso molecular de la PCL producida comercialmente, se está en presencia de una metodología con muchas ventajas y un futuro promisorio.

Con respecto a los objetivos específicos de la investigación, tanto el montaje de la unidad experimental como el protocolo de operación para la reacción a alta presión fueron cumplidos a cabalidad, permitiendo replicar las condiciones encontradas en la literatura sin mayores complicaciones, para su posterior análisis mediante RMN.

En cuanto al estudio de las variables que afectan la reacción, se puede concluir que las variables estudiadas fueron bastante influyentes en la reacción y los resultados obtenidos entregan importantes herramientas sobre la comprensión y control de la ROP.

Las variables en estudio fueron presión, tiempo de reacción y porcentaje inicial de agua en el monómero. La presión del sistema resultó ser una variable determinante en el peso molecular final del polímero, donde se obtuvo mejores resultados para reacciones llevadas a cabo a 14,5 MPa, frente a las reacciones llevadas a cabo a 20 MPa. Dichos resultados fueron corroborados mediante los intervalos de confianza para ambas alternativas, donde no se observa que éstos se solapen, por lo que se puede inferir con un 90% de certeza que presiones

llevadas a cabo a 14,5 MPa resultan en polímeros más pesados. Sin embargo, es necesario ampliar el rango de presiones en investigaciones futuras para lograr un total entendimiento del efecto que tiene esta variable en la reacción.

Si bien el estudio de intervalos de confianza para el tiempo de reacción no demostró diferencias significativas con un 90% de confianza entre las reacciones llevadas a cabo a 2 y 4,5 horas respectivamente, en promedio las reacciones realizadas por más tiempo dieron como resultado polímeros de mayor peso molecular. En base a lo anterior, se propone realizar reacciones a tiempos mayores, por ejemplo 6 u 8 horas, con el objetivo de aumentar las diferencias entre las alternativas propuestas para así lograr un mayor control en las propiedades del polímero final deseado.

La variable más influyente en la reacción fue el contenido de agua inicial en el monómero, ya que, contra todo pronóstico, una reacción llevada a cabo a las condiciones menos auspiciosas, con menor tiempo de residencia y una presión de sistema de 20 MPa, dio como resultado polímeros más pesados al utilizar un monómero de 97% de pureza frente al resto de polímeros obtenidos a partir de distintas condiciones operacionales, pero con un monómero de 99% de pureza. Para validar el efecto del contenido de agua en el sistema en el peso molecular final de polímero, se realizó un estudio de intervalos de confianza entre reacciones llevadas a cabo con las mismas condiciones operacionales, variando solamente la pureza del monómero, para analizar su influencia en el polímero final. El intervalo de confianza para una reacción llevada a cabo a partir de un monómero de un 97% de pureza presenta diferencias significativas con un 90% de certeza frente a las reacciones llevadas a cabo a las mismas condiciones, pero con un monómero de 99% de pureza, por lo que queda en evidencia la importancia de la presencia de agua en la reacción, principalmente en el mecanismo de iniciación de la reacción.

A partir del estudio de los balances de materia, se concluye que las pérdidas del sistema no se pueden disminuir a partir del manejo de las condiciones operacionales. Ya que los intervalos de confianza para la recuperación, se solapan entre todas las alternativas y se infiere con un 90% de certeza que no existen diferencias entre éstas, por lo que dichas pérdidas se consideran inherentes al sistema experimental.

Si bien no es posible obtener un valor concreto de rendimiento de la reacción, ya que no se conoce la cantidad de polímero producido, es posible obtener valores aproximados a partir de algunos supuestos para realizar una comparación entre las alternativas. Los intervalos de confianza obtenidos para los rendimientos aproximados en función de las distintas alternativas no muestran diferencias significativas con un 90% de confianza y se infiere que la cantidad de masa retenida en el reactor no corresponde únicamente a PCL, si no que se puede estar en presencia de cadenas más cortas o subproductos provenientes de reacciones secundarias de transesterificación que no fue posible separar mediante el proceso de extracción.

En función a los resultados obtenidos y a los respectivos análisis realizados, se concluye que tanto el montaje del sistema experimental como la metodología de trabajo propuesta, muestran resultados positivos y logran cumplir con los objetivos de la investigación, al producir polímeros de pesos moleculares medios, comparables a lo encontrado en la literatura, lo que indica que se está en la dirección correcta de estudio. Sin embargo, para ir avanzando y acercarse a la optimización del proceso, es necesario continuar el estudio sobre la reacción de polimerización por apertura de anillos a alta presión, biocatalizada enzimáticamente en presencia de dióxido de carbono supercrítico, estudiando otras variables influyentes, o ampliando el rango de las ya estudiadas.

Como trabajo futuro, para lograr comprender en detalle y a cabalidad el efecto de cada una de las condiciones que afectan a la reacción y al peso molecular del polímero obtenido, se propone un diseño factorial donde se estudie un rango más amplio de las variables, por ejemplo, de presión y tiempo de reacción, para que las diferencias se hagan más evidentes.

Por otra parte, debido a que la naturaleza de la reacción es influenciada por diversas variables, se propone estudiar otras variables que influyen en la reacción, como la temperatura, que, pese a que en este caso se mantuvo constante en el valor óptimo encontrado en la literatura, ésta interactúa con la presión, afectando a la solubilidad del monómero en el medio. Además, la razón entre monómero y solvente ha sido estudiada por otros autores, no obstante, en esta investigación no fue una variable estudiada, debido al impedimento que presenta el sistema experimental para controlar dicha variable, sin embargo, según la literatura existen diferencias al modificar esta relación. Otra variable de interés es la agitación del sistema, que

para facilitar el análisis de las variables estudiadas y debido a la configuración del equipo se mantuvo constante para todos los experimentos, sin embargo, una mayor y mejor agitación promueve la interacción entre el monómero y la enzima que cataliza la reacción. Finalmente, para controlar el contenido de agua en la reacción, que resultó ser la variable más influyente en el peso molecular del polímero producido, se propone el uso de tamices moleculares, una técnica que ha demostrado ser un mecanismo efectivo de absorción para gases y líquidos. Adicionalmente, para complementar el entendimiento de la función del agua de la reacción, se propone estudiar el equilibrio triple de $\epsilon\text{-CL} - \text{CO}_2 - \text{H}_2\text{O}$, lo que puede dar indicios sobre el proceso de extracción para remover el agua contenida en la reacción, que en exceso tiende a producir polímeros de menor peso molecular.

Al lograr realizar un diseño factorial con todas las condiciones influyentes en la reacción, se permite un mayor control y optimización del proceso, logrando deducir el efecto que tiene cada una de las variables por separado e incluso el efecto que tiene las combinaciones entre éstas. Cabe destacar que lo anterior sería realizable gracias al presente estudio, ya que así se logra tener un primer acercamiento sobre el efecto de algunas de las variables influyentes y el rango aproximado donde dichas variables pueden modificarse.

De manera complementaria, uno de los aspectos fundamentales sobre la validez de los resultados, es el método de análisis, por lo que, si bien los resultados obtenidos son concluyentes y positivos, es necesario mejorar y/o complementar la metodología de análisis, como por ejemplo mediante cromatografía por permeación de gel, que ha sido utilizada por algunos autores, para determinar si los resultados varían de acuerdo a la metodología de análisis utilizada, con el fin de avanzar en la comprensión de la reacción de polimerización por apertura de anillos y el efecto de las variables que puedan repercutir en la optimización del proceso.

Finalmente, apuntando a una producción de poli(ϵ -caprolactona) amigable con el ambiente y el cuerpo, se propone mejorar el proceso de separación final con cloroformo del polímero, la enzima y subproductos que no se pudieron extraer. Para evitar el uso de solventes tanto orgánicos como inorgánicos, potencialmente tóxicos, se puede optar por un proceso de separación mecánica por centrifugación.

Nomenclatura

Sigla	Significado
BPR	Válvula reguladora de contrapresión, <i>Back pressure regulator</i>
CALB	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
DBU	1,8- diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
ε-CL	Caprolactona, ε-caprolactona
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos, <i>Food and Drug Administration</i>
GPC	Cromatografía por permeación de gel, <i>Gel permeation chromatography</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento, <i>High performance liquid chromatography</i>
M_n	Peso molecular promedio en número
M_w	Peso molecular promedio en peso
MSA	Ácido metanosulfónico, <i>Methanesulfonic acid</i>
MTBD	7-Metil-1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-eno
PCL	Policaprolactona, poli(ε-caprolactona)
PDI	Índice de polidispersidad, <i>Polydispersity index</i>
PGA	Ácido poliglicólico, <i>Polyglycolic acid</i>
PHB	Polihidroxibutirato,
PLA	Ácido poliláctico, <i>Polylactic acid</i>
PSL	Lipasa de pseudomonas, <i>Pseudomonas sp. lipase</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROP	Polimerización por apertura de anillos, <i>Ring-opening polymerization</i>
scCO ₂	Dióxido de carbono supercrítico, <i>Supercritical carbon dioxide</i>
SCF	Fluido supercrítico, <i>Supercritical fluid</i>
TBD	1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-eno

Referencias

- Agrawal, C. M., & Ray, R. B. (2001). Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 55(2), 141–150. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(200105\)55:2<141::AID-JBM1000>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1097-4636(200105)55:2<141::AID-JBM1000>3.0.CO;2-J)
- Albertsson, A. C., & Srivastava, R. K. (2008). Recent developments in enzyme-catalyzed ring-opening polymerization. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(9), 1077–1093. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.02.007>
- Armentano, I., Dottori, M., Fortunati, E., Mattioli, S., & Kenny, J. M. (2010). Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polymer Degradation and Stability*, 95(11), 2126–2146. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.06.007>
- Bender, J. P., Feitein, M., Franceschi, E., Corazza, M. L., & Oliveira, J. V. (2010). Phase behaviour of binary systems of lactones in carbon dioxide. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 42(1), 48-53. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2009.07.003>
- Bhaw-Luximon, A., Jhurry, D., Motala-Timol, S., & Lochee, Y. (2006). Polymerization of ϵ -caprolactone and its copolymerization with gamma-butyrolactone using metal complexes. *Macromolecular Symposia*, 231(1), 60–68. <https://doi.org/10.1002/masy.200551306>
- Bower, D. I. (2002). *An introduction to polymer physics*. Cambridge, U. K: Cambridge University Press, 8-26.
- Braud, C., Devarieux, R., Atlan, A., Ducos, C., & Vert, M. (1998). Capillary zones electrophoresis in normal or reverse polarity separation modes for the analysis of hydroxy acid oligomers in neutral phosphate buffer. *J. Chrom., B: Biomed. Sci. Appl.*, 706(1), 73-82. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00468-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00468-4)
- Brunner, G. (2005). Supercritical fluids: Technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, 67(1–2), 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.060>

- Brunner, G. (2010). Applications of Supercritical Fluids. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 1(1), 321–342. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-073009-101311>
- Casas, J., Persson, P. V., Iversen, T., & Córdova, A. (2004). Direct organocatalytic ring-opening polymerizations of lactones. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 346(9–10), 1087–1089. <https://doi.org/10.1002/adsc.200404082>
- Chmura, A. J., Davidson, M. G., Jones, M. D., Lunn, M. D., Mahon, M. F., Johnson, A. F., ... Wong, S. S. F. (2006). Group 4 complexes with aminebisphenolate ligands and their application for the ring opening polymerization of cyclic esters. *Macromolecules*, 39(21), 7250–7257. <https://doi.org/10.1021/ma061028j>
- Dash, T. K., & Konkimalla, V. B. (2012). Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *Journal of Controlled Release*, 158(1), 15–33. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.064>
- Davidson, M. G., Jones, M. D., Lunn, M. D., & Mahon, M. F. (2006). Synthesis and X-ray structures of new titanium(IV) aryloxides and their exploitation for the ring opening polymerization of ϵ -caprolactone. *Inorganic Chemistry*, 45(5), 2282–2287. <https://doi.org/10.1021/ic051708n>
- del Valle, J. M., & Aguilera, J. M. (1999). Revision: Extracción con CO₂ a alta presión. Fundamentos y aplicaciones en la industria de alimentos / Review: High pressure CO₂ extraction. Fundamentals and applications in the food industry. *Revista de Agaroquímica Y Tecnología de Alimentos*, 5(1), 1–24. <https://doi.org/10.1177/108201329900500101>
- Deng, X., Yuan, M., Xiong, C., & Li, X. (1999). Polymerization of lactides and lactones. IV. ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone by rare earth phenyl compounds. *J. Appl. Polym. Sci.*, 73(8), 1401-1408. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19990822\)73:8<1401::AID-APP7>3.0.CO;2-M](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19990822)73:8<1401::AID-APP7>3.0.CO;2-M)

- Dhanaraju, M. D., Gopinath, D., Ahmed, M. R., Jayakumar, R., & Vamsadhara, C. (2006). Characterization of polymeric poly(ϵ -caprolactone) injectable implant delivery system for the controlled delivery of contraceptive steroids. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 76(1), 63–72. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30458>.
- Dong, H., Cao, S. G., Zheng-Qiang, L. I., Han, S. I. P., You, D. E. L., & Shen, J. C. (1999). Study on the enzymatic polymerization mechanism of lactone and the strategy for improving the degree of polymerization. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 37(9), 1265–1275. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0518\(19990501\)37:9<1265::AID-POLA6>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0518(19990501)37:9<1265::AID-POLA6>3.0.CO;2-I)
- Dong, H., Wang, H. D., Cao, S. G., & Shen, J. C. (1998). Lipase-catalyzed polymerization of lactones and linear hydroxyesters. *Biotechnology Letters*, 20(10), 905–908. <https://doi.org/10.1023/a:1005441707356>
- Doppalapudi, S., Jain, A., Khan, W., & Domb, A. J. (2014). Biodegradable polymers-an overview. *Polymers for Advanced Technologies*, 25(5), 427–435. <https://doi.org/10.1002/pat.3305>
- Dubois, P., Jerome, R., & Teyssie, P. (1989). Macromolecular engineering of polylactones and polylactides - I. End-functionalization of poly ϵ -caprolactone. *Polymer Bulletin*, 22(5–6), 475–482. <https://doi.org/10.1007/BF00718922>
- Duda, A. (1996). Polymerization of ϵ -Caprolactone Initiated by Aluminum Isopropoxide Carried Out in the Presence of Alcohols and Diols. Kinetics and Mechanism. *Macromolecules*, 29(5), 1399–1406. <https://doi.org/10.1021/ma951442b>
- Erkey, C. (2009). Preparation of metallic supported nanoparticles and films using supercritical fluid deposition. *Journal of Supercritical Fluids*, 47(3), 517–522. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.10.019>
- Freiberg, S., & Zhu, X. X. (2004). Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 282(1–2), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.04.013>

- Ginde, R. M., & Gupta, R. K. (1987). In vitro chemical degradation of poly(glycolic acid) pellets and fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 33(7), 2411–2429. <https://doi.org/10.1002/app.1987.070330712>
- Hutmacher, D. W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21(24), 2529–2543. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00121-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00121-6)
- Jones, D. S., Djokic, J., McCoy, C. P., & Gorman, S. P. (2002). Poly(ϵ -caprolactone) and poly(ϵ -caprolactone)-polyvinylpyrrolidone-iodine blends as ureteral biomaterials: Characterisation of mechanical and surface properties, degradation and resistance to encrustation in vitro. *Biomaterials*, 23(23), 4449–4458. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00158-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00158-8)
- Khanna, A., Sudha, Y. S., Pillai, S., & Rath, S. S. (2008). Molecular modeling studies of polylactic acid initiation mechanisms. *Journal of Molecular Modeling*, 14(5), 367–374. <https://doi.org/10.1007/s00894-008-0278-z>
- Kiran, E. (2009). Polymer miscibility, phase separation, morphological modifications and polymorphic transformations in dense fluids. *Journal of Supercritical Fluids*, 47(3), 466–483. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.11.010>
- Kobayashi, S. (1999). Enzymatic polymerization: a new method of polymer synthesis. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 37(16), 3041–3056. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0518\(19990815\)37:16<3041::AID-POLA1>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0518(19990815)37:16<3041::AID-POLA1>3.0.CO;2-V)
- Kobayashi, S., Takeya, K., Sudu, S., & Uyama, H. (1998). Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of medium-size lactones to polyesters. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 199(8), 1729–1736. <https://doi.org/10.1002/macp.1998.021990834>
- Kobayashi, S., Uyama, H., & Ohmae, M. (2001). Enzymatic polymerization for precision polymer synthesis. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 74(4), 613–635. <https://doi.org/10.1246/bcsj.74.613>

- Kricheldorf, H. R., & Dunsing, R. (1986). Polylactones, 8. Mechanism of the cationic polymerization of L,L-dilactide. *Makromol. Chem.*, *187*(7), 1611–1625. <https://doi.org/10.1002/macp.1986.021870706>
- Kumar, A., & Gross, R. A. (2000). *Candida antarctica* Lipase B Catalyzed Polycaprolactone Synthesis: Effects of Organic Media and Temperature. *Biomacromolecules*, *1*(1), 133–138. <https://doi.org/10.1021/bm990510p>
- Kumar, A., Kalra, B., Dekhterman, A., & Gross, R. A. (2000). Efficient Ring-Opening Polymerization and Copolymerization of ϵ -Caprolactone and ω -Pentadecalactone Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B. *Macromolecules*, *33*(17), 6303–6309. <https://doi.org/10.1021/ma000344+>
- Labet, M., & Thielemans, W. (2009). Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical Society Reviews*, *38*(12), 3484–3504. <https://doi.org/10.1039/b820162p>
- Leja, K., & Lewandowicz, G. (2010). Polymer biodegradation and biodegradable polymers - A review. *Polish Journal of Environmental Studies*, *19*(2), 255–266. <https://doi.org/12301485>
- Liao, L., Liu, L., Zhang, C., & Gong, S. S. (2006). Microwave-Assisted Ring-Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone in the Presence of Ionic Liquid. *Macromolecular Rapid Communications*, *27*(24), 2060–2064. <https://doi.org/10.1002/marc.200600591>
- Lim, L.-T., Auras, R., & Rubino, M. (2008). Processing technologies for poly(lactic acid). *Progress in Polymer Science*, *33*(8), 820–852. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2008.05.004>
- Lockwood, M. A., Wang, K., & Mayer, J. M. (1999). Communications to the Editor. *Society*, *38*(9), 11894–11895. <https://doi.org/10.1021/ma60030a030>
- Loeker, F. C., Duxbury, C. J., Kumar, R., Gao, W., Gross, R. A., & Howdle, S. M. (2004). Enzyme-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone in Supercritical Carbon Dioxide. *Macromolecules*, *37*(7), 2450–2453. <https://doi.org/10.1021/ma0349884>

- Lohmeijer, B. G. G., Pratt, R. C., Leibfarth, F., Logan, J. W., Long, D. A., Dove, A. P., ... Hedrick, J. L. (2006). Guanidine and amidine organocatalysts for ring-opening polymerization of cyclic esters. *Macromolecules*, 39(25), 8574–8583. <https://doi.org/10.1021/ma0619381>
- Lowry, K. J., Hamson, K. R., Bear, L., Peng, Y. B., Calaluce, R., Evans, M. L., ... Allen, W. C. (1997). Polycaprolactone/glass bioabsorbable implant in a rabbit humerus fracture model. *Journal of Biomedical Materials Research*, 36(4), 536–541. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19970915\)36:4<536::AID-JBM12>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19970915)36:4<536::AID-JBM12>3.0.CO;2-8)
- Lucas, N., Bienaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F., & Nava-Saucedo, J. E. (2008). Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques - A review. *Chemosphere*, 73(4), 429–442. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.064>
- Ma, G., Song, C., Sun, H., Yang, J., & Leng, X. (2006). A biodegradable levonorgestrel-releasing implant made of PCL/F68 compound as tested in rats and dogs. *Contraception*, 74(2), 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2006.02.013>
- Mahapatro, A., Kumar, A., & Gross, R. a. (2004). Mild, solvent-free ω -hydroxy acid polycondensations catalyzed by candida antarctica lipase B. *Biomacromolecules*, 5(1), 62–68. <https://doi.org/10.1021/bm0342382>
- Medlicott, N. J., Jones, D. S., Tucker, I. G., & Holborow, D. (1992). Preliminary release studies of chlorhexidine (base and diacetate) from poly(ϵ -caprolactone) films prepared by solvent evaporation. *International Journal of Pharmaceutics*, 84(1), 85–89. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(92\)90218-Q](https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90218-Q)
- Mei, Y., Kumar, A., & Gross, R. A. (2002). Probing water-temperature relationships for Lipase-catalyzed lactone ring-opening polymerizations. *Macromolecules*, 35(14), 5444–5448. <https://doi.org/10.1021/ma020019h>
- Miner, M. R., Berzins, D. W., & Bahcall, J. K. (2006). A Comparison of Thermal Properties Between Gutta-Percha and a Synthetic Polymer Based Root Canal Filling Material (Resilon). *Journal of Endodontics*, 32(7), 683–686. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.01.008>

- Ng, K. W., Achuth, H. N., Moochhala, S., Lim, T. C., & Hutmacher, D. W. (2007). In vivo evaluation of an ultra-thin polycaprolactone film as a wound dressing. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 18(7), 925–938. <https://doi.org/10.1163/156856207781367693>
- Nobes, G. A. R., Kazlauskas, R. J., & Marchessault, R. H. (1996). Lipase-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of Lactones: A Novel Route to Poly(hydroxyalkanoate)s. *Macromolecules*, 29(14), 4829–4833. <https://doi.org/10.1021/ma951774g>
- Nomura, N., Taira, A., Nakase, A., Tomioka, T., & Okada, M. (2007). Ring-opening polymerization of lactones by rare-earth metal triflates and by their reusable system in ionic liquids. *Tetrahedron*, 63(35), 8478–8484. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.05.073>
- Nomura, N., Taira, A., Tomioka, T., & Okada, M. (2000). A Catalytic Approach for Cationic Living Polymerization: Sc(OTf)₃-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of Lactones. *Macromolecules*, 33(5), 1497–1499. <https://doi.org/10.1021/ma991580r>
- Nunes da Ponte, M. (2009). Phase equilibrium-controlled chemical reaction kinetics in high pressure carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 47(3), 344–350. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.10.007>
- Parker, M. E., Meyer, J. P., & Meadows, S. R. (2009). Carbon Dioxide Enhanced Oil Recovery Injection Operations Technologies (Poster Presentation). *Energy Procedia*, 1(1), 3141–3148. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2009.02.096>
- Persson, P. V., Schröder, J., Wickholm, K., Hedenström, E., & Iversen, T. (2004). Selective organocatalytic ring-opening polymerization: A versatile route to carbohydrate-functionalized poly(ϵ -caprolactones). *Macromolecules*, 37(16), 5889–5893. <https://doi.org/10.1021/ma049562j>
- Piao, L., Deng, M., Chen, X., Jiang, L., & Jing, X. (2003). Ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone and L-lactide using organic amino calcium catalyst. *Polymer*, 44(8), 2331–2336. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(03\)00118-6](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(03)00118-6)

- Platel, R. H., Hodgson, L. M., & Williams, C. K. (2008). Biocompatible initiators for lactide polymerization. *Polymer Reviews*, 48(1), 11–63. <https://doi.org/10.1080/15583720701834166>
- Pratt, R. C., Lohmeijer, B. G. G., Long, D. A., Waymouth, R. M., & Hedrick, J. L. (2006). Triazabicyclodecene: A Simple Bifunctional Organocatalyst for Acyl Transfer and Ring-Opening Polymerization of Cyclic Esters. *Journal of the American Chemical Society*, 128(14), 4556–4557. <https://doi.org/10.1021/ja060662+>
- Rodríguez, F., Cohen, C., Ober, C. K., Archer, L. A. (2015). *Principles of polymer systems*, 6th ed., Boca Raton, FL, CRC Press, 1-183.
- Sánchez-Barba, L. F., Garcés, A., Fajardo, M., Alonso-Moreno, C., Fernández-Baeza, J., Otero, A., ... López-Solera, M. I. (2007). Well-defined alkyl heteroscorpionate magnesium complexes as excellent initiators for the ROP of cyclic esters. *Organometallics*, 26(25), 6403–6411. <https://doi.org/10.1021/om7007327>
- Santos, R. D., Rosso Comim, S. R., Oliveira, D. de, Treichel, H., Di Luccio, M., Ferreira, S. R. S., & Oliveira, J. V. (2012). Lipase-catalyzed synthesis of poly(ϵ -caprolactone) in supercritical carbon dioxide. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(4), 280–283. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2012.04.002>
- Schuckert, K.-H., Jopp, S., & Teoh, S.-H. (2009). Mandibular defect reconstruction using three-dimensional polycaprolactone scaffold in combination with platelet-rich plasma and recombinant human bone morphogenetic protein-2: de novo synthesis of bone in a single case. *Tissue Engineering. Part A*, 15(3), 493–499. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0033>
- Shibasaki, Y., Sanada, H., Yokoi, M., Sanda, F., & Endo, T. (2000). Activated monomer cationic polymerization of lactones and the application to well-defined block copolymer synthesis with seven-membered cyclic carbonate. *Macromolecules*, 33(12), 4316–4320. <https://doi.org/10.1021/ma992138b>
- Sinha, V. R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., & Trehan, A. (2004). Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: An overview. *International Journal of Pharmaceutics*, 278(1), 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.01.044>

- Sivalingam, G., & Madras, G. (2004). Modeling of lipase catalyzed ring-opening polymerization of caprolactone. *Biomacromolecules*, 5(2), 603–609. <https://doi.org/10.1021/bm0344405>
- Stassin, F., & Jérôme, R. (2003). Effect of pressure and temperature upon tin alkoxide-promoted ring-opening polymerisation of ϵ -caprolactone in supercritical carbon dioxide. *Chemical Communications*, (2), 232–233. <https://doi.org/10.1039/B209170d>
- Sun, H., Mei, L., Song, C., Cui, X., & Wang, P. (2006). The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. *Biomaterials*, 27(9), 1735–1740. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.09.019>
- Takeuchi, D., Nakamura, T., & Aida, T. (2000). Bulky Titanium Bis(phenolate) Complexes as Novel Initiators for Living Anionic Polymerization of ϵ -Caprolactone. *Macromolecules*, 33(3), 725–729. <https://doi.org/10.1021/ma991441+>
- Thurecht, K. J., Heise, A., deGeus, M., Villarroya, S., Zhou, J. X., Wyatt, M. F., & Howdle, S. M. (2006). Kinetics of enzymatic ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone in supercritical carbon dioxide. *Macromolecules*, 39(23), 7967–7972. <http://dx.doi.org/10.1021/ma061310q>
- Uyama, H., Suda, S., Kikuchi, H., & Kobayashi, S. (1997). Extremely Efficient Catalysis of Immobilized Lipase in Ring-opening Polymerization of Lactones. *Chemistry Letters*, 26(11), 1109–1110. <https://doi.org/10.1246/cl.1997.1109>
- Vacanti, J. P., & Langer, R. (1999). Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*, 354(suppl 1), 32–34. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)90247-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)90247-7)
- Varma, I. K., Albertsson, A. C., Rajkhowa, R., & Srivastava, R. K. (2005). Enzyme catalyzed synthesis of polyesters. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 30(10), 949–981. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2005.06.010>
- Vert, M. (2009). Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: Beliefs and facts. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20(2), 437–446. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3581-4>

- Vert, M., Li, S. M., Spenlehauer, G., & Guerin, P. (1992). Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 3(6), 432–446. <https://doi.org/10.1007/BF00701240>
- Wagner, B., Tharmann, R., Haase, I., Fischer, M., & Bausch, A. R. (2006). Cytoskeletal polymer networks: the molecular structure of cross-linkers determines macroscopic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(38), 13974–13978. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510190103>
- Weidner, E. (2009). High pressure micronization for food applications. *Journal of Supercritical Fluids*, 47(3), 556–565. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.11.009>
- Woodruff, M. A., & Hutmacher, D. W. (2010). The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, 35(10), 1217–1256. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002>
- Woodward, S. C., Brewer, P. S., Moatamed, F., Schindler, A., & Pitt, C. G. (1985). The intracellular degradation of poly(ϵ -caprolactone). *Journal of Biomedical Materials Research*, 19(4), 437–444. <https://doi.org/10.1002/jbm.820190408>
- Yu, T. L., Wu, C. C., Chen, C. C., Huang, B. H., Wu, J., & Lin, C. C. (2005). Catalysts for the ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone and L-lactide and the mechanistic study. *Polymer*, 46(16), 5909–5917. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.04.079>
- Zhang, S., & Uludağ, H. (2009). Nanoparticulate systems for growth factor delivery. *Pharmaceutical Research*, 26(7), 1561–1580. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-9897-z>
- Zhong, Z., Dijkstra, P. J., Birg, C., Westerhausen, M., & Feijen, J. (2001). Article A Novel and Versatile Calcium-Based Initiator System for the Ring-Opening Polymerization of Cyclic Esters. *Macromolecules*, 34(12), 3863–3868. <https://doi.org/10.1021/ma0019510>

Anexos

Anexo 1. Ejemplos de catalizadores para una ROP

I. Catalizadores metálicos

Bhaw-luximon *et al.* (2006) polimerizaron ϵ -CL en dioxano usando diisopropilamida de litio como catalizador. Luego de algunos minutos, a 25 °C se obtiene un peso molecular medio de 5.700 Da, con una proporción monómero/catalizador de 50. Además, realizaron una ROP en dioxano y tolueno a 110 °C usando un compuesto de etilhexanoato-etanolamina de estaño (II). En dioxano la conversión fue de 40% después de 42 horas de reacción, obteniendo polímeros de bajo peso molecular. En tolueno, la polimerización se completa luego de 21 horas resultando en un polímero de peso molecular medio (5.700 Da).

Otros autores como Deng *et al.* (1999) utilizan fenil-litio, obteniendo polímeros de alto peso molecular en un par de horas a 170 °C, mientras que otros estudios, sintetizan PCL usando ciclopentadienil sódico en distintos solventes (polares y no polares). En el caso de la utilización de solventes polares, se obtiene solo oligómeros, mientras que, utilizando solventes no polares, se logra polímeros con peso molecular promedio en número hasta de 130.000 Da (Yuan *et al.*, 1998).

Usando complejos de alquil-magnesio se obtiene polímeros de alto peso molecular, con PDI entre bajos y moderados (Sánchez-Barba *et al.*, 2007). Aplicando complejos de alcóxido de magnesio, resultó en polímeros con pesos moleculares entre medio a alto (6.300 a 54.200 Da) y PDI de bajos a medios (1,06 a 1,35) (Yu *et al.*, 2005).

Zhong *et al.* (2001) investigaron un sistema basado en calcio, encontrando PDI amplios (cerca de 4), sin embargo, en presencia de alcohol la polimerización se vuelve controlada con PDI cerca de 1. Otros autores usaron nitrato de calcio, siguiendo un mecanismo de reacción de coordinación-inserción en el enlace Ca-O y usando un ácido para terminar la reacción (Piao *et al.*, 2003).

Se han realizado otros estudios usando distintos alcóxidos de aluminio, como, por ejemplo, metóxido de dietil-aluminio, alquilóxido de dietil-aluminio y metóxido de diisobutil-aluminio. Cada molécula de alcóxido de aluminio inicia una macromolécula, infiriendo que solo los grupos alcóxidos y no los alquilos están activos en la ROP (Labet & Thielemans, 2009).

Uno de los catalizadores basados en aluminio más estudiados es el isopropóxido de aluminio (III), que se sabe que en algunos solventes no existe como molécula única sino más bien como trímeros o tetrámeros, presentando distinta reactividad y equilibrio entre ambas especies. Disuelto en ϵ -CL los trímeros se disgregan y forman moléculas aisladas que luego forman un complejo de aluminio hexacoordinado, el catalizador en concreto para la ROP (Duda, 1996).

En cuanto a los catalizadores basados en estaño, el etil-hexanoato de estaño (II) es sin duda el catalizador que ha sido utilizado con mayor frecuencia para la ROP de ϵ -CL. Es efectivo, comercialmente disponible, fácil de manipular y soluble en los solventes orgánicos más usados. Debe ser usado junto con un componente nucleofílico (generalmente un alcohol) para iniciar la reacción si se desea llevar un control sobre ésta. La principal desventaja de usar este compuesto es que necesita altas temperaturas, lo que fomenta las reacciones de transesterificación (inter e intramolecular) y por lo tanto aumenta el PDI (Labet & Thielemans, 2009).

Con respecto a los catalizadores a partir de titanio basados en ligandos de catecol, se obtiene resultados con bajo PDI, lo que implica una polimerización controlada. Otros estudios fueron realizados usando distintos complejos tanto de titanio (IV) como de zirconio (IV). Sobre los complejos de titanio (IV), los más voluminosos son los que muestran actividad, a pesar de una alto PDI, lo que refleja un bajo control de la polimerización, dando lugar a significativas reacciones de transesterificación. Para las reacciones llevadas a cabo con zirconio (IV), los menos voluminosos mostraron más actividad y un mejor control sobre la reacción de polimerización (Davidson et al., 2006; Chmura et al., 2006).

La acidez de Lewis también resulta ser un parámetro considerable, donde ésta no debe ser muy alta para que ocurra la polimerización. Es más, cuando la reacción logra llevarse a cabo, por cada molécula de catalizador, se forma dos cadenas poliméricas (Takeuchi *et al.*, 2000).

Utilizando óxido de zinc como catalizador, resulta en una ROP exitosa, en presencia de un líquido iónico y bajo tratamiento térmico en microondas, donde la combinación de dichos elementos aumenta la eficiencia de la polimerización. Polímeros con un peso molecular promedio entre 2.260 y 11.060 Da y PDI entre 1,3 y 2,5 se obtuvo (Liao *et al.*, 2006).

Triflatos de escandio fueron combinados con agua y alcohol bencílico como iniciadores para catalizar la ROP. Como resultado se obtiene polímeros de alto peso molecular (M_n hasta 25.000 Da), con bajo PDI (menor a 1,18) (Nomura *et al.*, 2000).

Otros complejos, a partir de itrio, lantano, cesio, neodimio, europio, gadolinio, iterbio y lutecio fueron estudiados. Dentro de estos complejos, el mejor resultado se da utilizando triflato de lantano (M_n de 2.900 Da, PDI 1,16) con una conversión completa luego de 3 horas a 25 °C en tolueno (Nomura *et al.*, 2007).

II. Catalizadores orgánicos e inorgánicos

A partir de distintos estudios se muestra que la TBD tiene la habilidad de activar tanto el monómero como el alcohol utilizado en la reacción, mientras que los compuestos MTBD y DBU requieren co-catalizadores, como tiourea ya que dichos compuestos sólo activan al monómero (Lohmeijer *et al.*, 2006; Pratt *et al.*, 2006).

Las investigaciones realizadas por Casas *et al.* (2004) y Persson *et al.* (2004) se centraron en el uso de distintos ácidos carboxílicos (ácidos lácticos, tartárico, hexanóico, propiónico y cítrico), y algunos aminoácidos (glicina, prolina y serina) como catalizadores de la ROP, junto con alcohol bencílico para iniciar la reacción. La mayor actividad catalítica para la ROP fue presentada por aquellos compuestos con una constante de disociación pK_a entre 3 y 5, resultando en polímeros con un peso molecular promedio de hasta 2.800 Da y PDI entre 1,2 y 1,3. La eficiencia en la catálisis de los distintos ácidos sigue el siguiente orden: ácido tartárico > ácido cítrico > ácido láctico > prolina. El resto de los compuestos testeados no presentaron mayor actividad y permitieron una baja conversión de monómero (12%) luego de 2-4 horas de reacción.

En cuanto a catalizadores inorgánicos, Shibasaki *et al.* (2000) estudiaron la polimerización de ϵ -CL utilizando ácido clorhídrico en solución con dietil éter y n-butanol como sistema catalizador-iniciador. Luego de 25 horas, Las reacciones realizadas dieron como resultado polímeros con PDI cercanos a 1 y pesos moleculares cercanos a 10.000 Da.

El ácido metanosulfónico (MSA) fue propuesto como alternativa frente al ácido clorhídrico y al ácido trifluorometanosulfónico debido a la alta acidez de éste último y la alta corrosividad del ácido clorhídrico. Los resultados sugieren que el MSA, si bien presenta una actividad relativamente parecida a los otros ácidos, en presencia de otros solventes resulta ser ligeramente mayor. Para el caso de las reacciones realizadas con MSA, se obtiene polímeros de $M_n \approx 4.300$ Da y PDI de 1,07 (Labet & Thielemans, 2009).

III. Catalizadores enzimáticos

Un mecanismo para la ROP usando lipasas ha sido propuesto por varios autores. Primero la lipasa reacciona con el monómero, formando un complejo lipasa – ϵ -CL activada, para luego reaccionar con el alcohol (Kobayashi, 1999; Nobes *et al.*, 1996). Estudios de modelado de la reacción vía catálisis enzimática revelaron que la polimerización, degradación y desactivación de la enzima ocurren simultáneamente, por lo que el equilibrio en la reacción debe ser cuidadosamente controlado (Sivalingam & Madras, 2004).

Dentro de los estudios de Kobayashi *et al.* (1998), se probó distintos solventes, como acetonitrilo, acetona, 2-butanona, alcohol terbutílico, terbutil-metil-eter, isopropil éter, benceno, tetracloruro de carbono, heptano, ciclooctano e isooctano y surgió que la eficiencia de la polimerización estaba relacionada con la hidrofobicidad del solvente usado. Cuando una ROP fue realizada en solventes hidrofílicos, la conversión fue muy baja luego de 10 días y los polímeros obtenidos tuvieron un peso molecular bajo. Se encuentra que los hidrocarburos son solventes más adecuados para una ROP.

Kumar & Gross (2000) confirmaron varias de las conclusiones de los autores anteriores, en particular con respecto al uso de solventes hidrofílicos o hidrofóbicos para la CALB. Por otra parte, mostraron que realizando la reacción a mayor escala incrementaba el peso molecular del polímero, creyendo que se debe a la susceptibilidad de absorber agua durante la reacción.

Con respecto al contenido de agua y a la temperatura de la polimerización catalizada por CALB, hay estudios que muestran que la temperatura tiene poca influencia en la polimerización, mientras que mientras menor sea el contenido de agua de la enzima, mayor será el número de cadenas poliméricas y por ende el peso molecular (Mei *et al.*, 2002).

El uso de iniciadores para una reacción ROP catalizada por CALB, implica una reacción de polimerización más rápida (78% de conversión luego de 1 hora, versus 46% sin alcohol). Sin embargo, el uso de alcohol deriva en cadenas poliméricas más cortas (M_n de 1.000 Da vs 5.200 Da sin alcohol) y en PDI menores (1,5 vs 3,2 sin alcohol), lo que permite realizar conjeturas sobre el control de la reacción que el alcohol proporciona (Uyama *et al.*, 1997).

Los estudios realizados por Hedfors *et al.* (2005) proporcionan importantes hipótesis en los que se basa el proyecto. Dichos autores realizaron una ROP utilizando CALB como catalizador y siguieron tres rutas de producción para obtener polímeros funcionales, que son aquellos que presentan terminaciones de distintos grupos funcionales, que le otorgan otras características al polímero. Debido a que la CALB posee la característica de ser quimioselectivo, permite sintetizar polímeros terminados en distintos grupos funcionales, sin necesidad de realizar pasos de protección o desprotección de los grupos funcionales del monómero como parte de la ruta de producción que se utiliza convencionalmente, donde es necesario proteger a los grupos funcionales de interés, como por ejemplo de la dismutación, para que se mantengan intactos y pasen a formar parte de la cadena final, resultando en un polímero funcional según los requerimientos que se tenga.

Anexo 2. Obtención del peso molecular promedio en número mediante RMN

Mediante el análisis de resonancia magnética nuclear, se obtiene un espectro como el mostrado en la Fig. 14, adjunta a continuación.

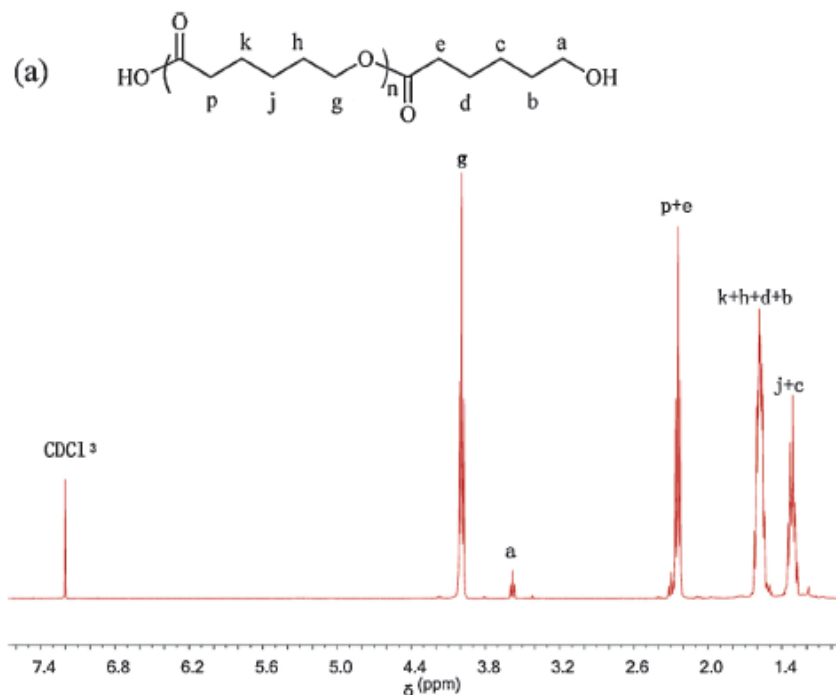


Figura 11. Espectro de protones obtenido mediante RMN para PCL comercial (Polymorph, 80.000 Mw, China).

En la figura se puede observar que cada pico presente en el espectro obtenido corresponde y se relaciona a los distintos grupos funcionales presentes en la molécula de PCL.

El cálculo del peso molecular promedio en número es entonces el siguiente en relación al peso atómico de cada una de las secciones de la cadena:



Finalmente, el peso molecular promedio en número (M_n) se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$M_n = 17 + 124 \cdot n + 125 \quad (\text{ecuación 1})$$

Donde n es el número de repeticiones del monómero, obtenido a partir de la siguiente ecuación.

$$n = \frac{(g+pe+khdb+jc)}{10\beta} - 1 \text{ (ecuación 2)}$$

Dónde g, pe, khdb y jc corresponden a las amplitudes de los picos g, p+e, k+h+d+b y j+c respectivamente, presentes en la Fig. 14, y β corresponde a la integral por protón, obtenida de la siguiente forma:

$$\beta = \frac{a}{2} \text{ (ecuación 3)}$$

Con a igual a la amplitud del pico a.

A modo de ejemplo, se realiza el cálculo para la PCL comercial de peso molecular 80.000 Da, a partir del espectro presente en la Fig. 15.

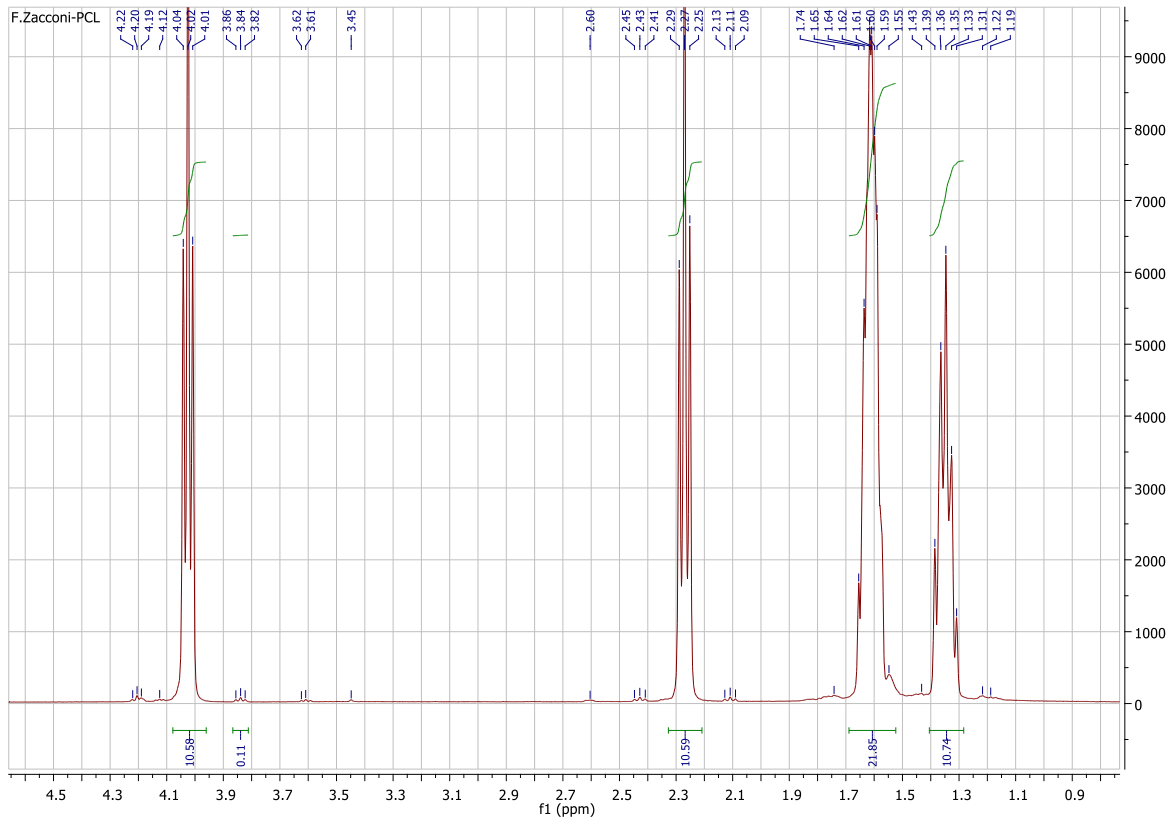


Figura 12. Espectro de protones obtenido mediante RMN para PCL comercial (Polymorph, 80.000 Mw, China), donde se destacan las amplitudes de los distintos picos.

Se tiene que el pico a tiene una amplitud de 0,11, por lo que el término β de integral por protón es de 0,055 (ecuación 3).

Las amplitudes de los picos g, p+e, k+h+d+b y j+c son 10,58; 10,59; 21,85 y 10,74 respectivamente, por lo que el valor del número de repeticiones del monómero (n) toma el valor de 976 aproximadamente (ecuación 2).

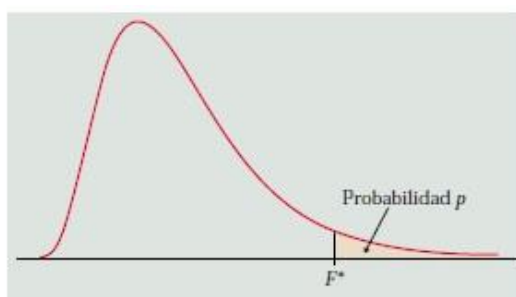
Así, reemplazando en la ecuación 1, se obtiene un peso molecular promedio en número (M_n) de 12.166 Da, lo que difiere de los 80.000 que originalmente presenta la PCL comercial, por lo que para efectos del cálculo, el análisis y la comparación del polímero obtenido en este proyecto con la PCL comercial y la obtenida por otros autores, se multiplicarán los pesos moleculares obtenidos mediante la ecuación 1, por el factor de corrección f , siendo f la razón entre la PCL comercial estándar (80.000 Da) y la PCL obtenida mediante el espectro de protones (12.166 Da), resultando en un factor f de 6,58.

Anexo 3. Test de Fischer para el contenido de agua en la reacción

Se tiene que el intervalo de confianza para la comparación de varianzas poblacionales ($\sigma A^2/\sigma B^2$) se obtiene de la siguiente manera:

$$\frac{SA^2/SB^2}{F_{(\frac{\alpha}{2}),va,vb}} \leq \sigma A^2/\sigma B^2 \leq \frac{SA^2/SB^2}{F_{(1-\frac{\alpha}{2}),va,vb}} \quad (\text{ecuación 4})$$

Los valores y la forma de obtención de los valores F se encuentra a partir de la tabla de distribución de Fischer mostrada en la Fig. 16 adjunta a continuación.



El valor de la tabla para p es el valor crítico F* que deja la probabilidad p a la derecha

Valores críticos de la distribución F de Fisher										
		Grados de libertad en el numerador								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
p										
1	.100	39.86	49.50	53.59	55.83	57.24	58.20	58.91	59.44	59.86
	.050	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54
	.025	647.79	799.50	864.16	899.58	921.85	937.11	948.22	956.66	963.28
	.010	4052.2	4999.5	5403.4	5624.6	5763.6	5859.0	5928.4	5981.1	6022.5
	.001	405284	500000	540379	562500	576405	585937	592873	598144	602284
2	.100	8.53	9.00	9.16	9.24	9.29	9.33	9.35	9.37	9.38
	.050	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38
	.025	38.51	39.00	39.17	39.25	39.30	39.33	39.36	39.37	39.39
	.010	98.50	99.00	99.17	99.25	99.30	99.33	99.36	99.37	99.39
	.001	998.50	999.00	999.17	999.25	999.30	999.33	999.36	999.37	999.39
3	.100	5.54	5.46	5.39	5.34	5.31	5.28	5.27	5.25	5.24
	.050	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81
	.025	17.44	16.04	15.44	15.10	14.88	14.73	14.62	14.54	14.47
	.010	34.12	30.82	29.46	28.71	28.24	27.91	27.67	27.49	27.35
	.001	167.03	148.50	141.11	137.10	134.58	132.85	131.58	130.62	129.86
4	.100	4.54	4.32	4.19	4.11	4.05	4.01	3.98	3.95	3.94
	.050	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00
	.025	12.22	10.65	9.98	9.60	9.36	9.20	9.07	8.98	8.90
	.010	21.20	18.00	16.69	15.98	15.52	15.21	14.98	14.80	14.66
	.001	74.14	61.25	56.18	53.44	51.71	50.53	49.66	49.00	48.47
5	.100	4.06	3.78	3.62	3.52	3.45	3.40	3.37	3.34	3.32
	.050	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77
	.025	10.01	8.43	7.76	7.39	7.15	6.98	6.85	6.76	6.68
	.010	16.26	13.27	12.06	11.39	10.97	10.67	10.46	10.29	10.16
	.001	47.18	37.12	33.20	31.09	29.75	28.83	28.16	27.65	27.24

Figura 13. Valor crítico F obtenido a partir de la tabla de distribución F de Fisher para dos grados de libertad tanto en el numerador como en el denominador, correspondiente al 5% de los datos.

Los valores críticos de F se obtienen a partir de los grados de libertad del numerador y del denominador, y luego se ubica el valor correspondiente a la probabilidad deseada.

Para este caso, el intervalo de confianza se obtiene con un 90% de confianza, por lo que el valor de α es de 10%. Así, como se muestra en la Fig. 15, el valor F correspondiente al 5% de los datos, para dos grados de libertad en el numerador y dos grados de libertad en el denominador, ya que cada una de las reacciones fue realizada en triplicado ($F_{(\frac{\alpha}{2}),va,vb}$), resulta ser de 19, mientras que para el 95% el valor no se puede obtener directamente de la tabla, sin embargo, es posible calcularlo de la siguiente forma:

$$F_{(1-\frac{\alpha}{2}),va,vb} = \frac{1}{F_{(\frac{\alpha}{2}),va,vb}} \text{ (ecuación 5)}$$

Luego, el valor $F_{(1-\frac{\alpha}{2}),va,vb}$, obtenido a partir de la ecuación 5 es de 0,05 aproximadamente.

Los valores de SA y SB corresponden a las desviaciones estándar para las reacciones llevadas a cabo a las condiciones 3 y 4 respectivamente. De la Tabla 9 se puede obtener los valores siendo respectivamente 1.341 Da y 4.565 Da. Así, reemplazando los valores en la ecuación 4, se logra obtener un intervalo para la razón entre las varianzas poblacionales de:

$$4,5 \times 10^{-3} \leq \sigma A^2 / \sigma B^2 \leq 1,73$$

Debido a que el intervalo de confianza para la razón entre las varianzas poblacionales del peso molecular del polímero obtenido para ambas condiciones estudiadas (3 y 4) acepta el valor 1 y por consiguiente que $\sigma A^2 = \sigma B^2$, se afirma con un 90% de confianza que no existen diferencias significativas entre las varianzas obtenidas para ambos polímeros producidos.

Anexo 4. Estudios sobre la absorción de agua

Para estudiar la absorción de agua en el sistema, se propone comparar la absorción de agua tanto en sílica gel como en carbón activado, y finalmente realizar una extracción de ϵ -CL en scCO₂, para analizar si es posible absorber el agua sin arrastrar la ϵ -CL, y de ser posible, analizar finalmente cuánta ϵ -CL se puede extraer mediante este método, analizando la muestra retenida en el colector dispuesto al final del reactor, mediante HPLC. Estimando así si es posible idealmente que la ϵ -CL pase a un proceso de ROP o incluso mantenerse en el sistema para realizarse simultáneamente la ROP. Para esto, se propone la siguiente metodología detallada a continuación.

Metodología propuesta

Se masan tanto ϵ -CL como agua, a una proporción 1:100. Para evitar que el agua quede atrapada en el conducto de purga, lo que puede producir sesgos a la hora de analizar la absorción, se taponea el fondo del reactor con lana de vidrio. Por otra parte, se debe masar el absorbente utilizado (sílica gel o carbón activado según corresponda) a una proporción 1:1 respecto al agua masada.

Una vez masados los compuestos, se procede a cargar el canasto inferior del reactor con la mezcla de ϵ -CL y agua, junto con el absorbente utilizado y luego depositar el canasto superior vacío. Se cierra el reactor y las válvulas de entrada y de salida del sistema, y se espera durante 30 minutos para que el agua se absorba en el absorbente. Luego, se lleva el sistema a las condiciones de extracción (50 °C y 12 MPa) y se mantienen las condiciones hasta que no se vea extracto en la corriente de salida. El montaje experimental para este estudio es el mismo utilizado para las reacciones de polimerización del presente estudio (ver Fig. 5).

Una vez completada la extracción de ϵ -CL se masan tanto el canasto inferior como el colector de extracto para cerrar los balances de materia. Finalmente, el extracto obtenido en el colector se analiza mediante HPLC para determinar si lo que se extrajo efectivamente corresponde a ϵ -CL.

Resultados

Ensayo 1, absorción mediante sílica gel

Al sistema se ingresó 0,2 g de ϵ -CL, 20,2 g de agua y 20,2 g de sílica gel. El reactor se taponeó con 2 g aprox. de lana de vidrio, que también absorbe parte del agua ingresada al sistema.

Luego del proceso de absorción y extracción, se masa tanto la sílica como la lana de vidrio para analizar el contenido de agua absorbido. La masa de sílica final es de 26,8 g y la masa de lana de vidrio es de 9,0 g. De estos valores, se obtiene que la masa de agua absorbida en la sílica es de 6,6 g aprox. y la masa absorbida por la lana de vidrio es de 7,0 g aprox., por lo que las pérdidas de agua resultan ser 6,6 g aproximadamente.

Con estos valores, se tiene que aproximadamente un 32,7% de agua se absorbe en la sílica gel y un 34,7% se absorbe en la lana de vidrio, representando un 67,4% de absorción total.

Una vez cerrados los balances de materia, se realiza el análisis mediante HPLC al extracto obtenido en el colector. La masa extraída en el colector es de 0,2 g aprox., lo que indicaría que se extrajo el 100% de la ϵ -CL añadida al sistema, sin embargo, se desconoce la concentración del extracto, por lo que para el análisis se disuelve el extracto en 250 cm³ de agua ultra pura. Como resultado de la cromatografía se obtiene dos muestras de 7,15 y 6,18 ppm, lo que indica que se obtuvo en promedio $7,15 \times 10^{-3}$ g de ϵ -CL en el colector, lo que representa a un porcentaje de rendimiento de extracción de 0,9% aproximadamente.

Ensayo 2, absorción mediante carbón activado

Al sistema se ingresó 0,11 g de ϵ -CL, 11,3 g de agua y 11,4 g de carbón activado, que junto con el canasto inferior y la lana de vidrio conforman una masa de 79,9 g aprox. A diferencia del ensayo anterior, se masa el canasto completo ya que luego del proceso no se puede obtener la masa aislada de carbón activado ya que se encuentra como polvo y para el cierre de balances de materia se realiza la diferencia entre el peso inicial y final del canasto para analizar la cantidad de agua absorbida en el proceso.

Luego del proceso, la masa final del canasto inferior fue de 89,9 g aproximadamente, lo que indica que se absorbió 10 g aprox. de agua y 1,1 g aprox. de agua corresponden a pérdidas del sistema. Así, se tiene un 88,6% de absorción total aproximadamente.

En este caso, no se pudo realizar un análisis mediante HPCL al extracto obtenido en el colector, ya que el colector estaba contaminado con aceite proveniente de otros experimentos.

Ensayo 3, absorción con carbón activado

En este caso se ingresó al sistema 0,12 g de ϵ -CL, 12,1 g de agua y 12,2 g de carbón activado, repartidos entre los canastos superior inferior (5,09 g aprox. de carbón en el canasto superior). La masa inicial del canasto inferior, junto con el carbón activado es fue de 81,5 g aprox., y la del canasto superior, también con carbón activado fue de 73,3 g aprox.

El proceso de extracción realizado este ensayo fue de una extracción prolongada en serie, cambiando de vial cada 100 L de CO₂ utilizados para la extracción. Como resultado se tuvo 3 viales, donde se extrajo 0,09 g en el primer vial, 0,04g en el segundo y 0,15 g en el tercero, sin embargo, el primer vial no fue sometido a análisis ya que parte del carbón contenido en el reactor fue arrastrado por el CO₂. Así, la masa extraída se considera como la suma de los dos últimos viales, representando una masa de 0,19 g, que, al ser superior a los 0,12 g de ϵ -CL ingresados inicialmente al sistema, se infiere que la concentración del extracto no corresponde a un 100% de ϵ -CL.

Para realizar el análisis cromatográfico a los extractos, se disuelven las muestras en 20 cm³ de agua ultra pura y luego del análisis HPLC, se obtiene una concentración de 6 ppm aprox. en el vial 2 y 29,1 ppm aprox. en el vial 3, lo que representa a $1,2 \times 10^{-4}$ g de ϵ -CL extraídos en el vial 2 y $5,8 \times 10^{-4}$ g de ϵ -CL extraídos en el vial 3. Así, sumando estos valores se tiene un total de $7,0 \times 10^{-4}$ g de ϵ -CL, representando un 0,6% de rendimiento de la extracción. Cabe recordar que parte de la masa extraída no pudo ser sometida a análisis debido a la contaminación de ésta con carbón activado, por lo que se estima que el rendimiento de la extracción puede llegar al 1%.

Luego del proceso de absorción y extracción, los canastos masaron 91,7 g y 73,4 g aprox. (canastos inferior y superior respectivamente), con lo que, a partir de la diferencia con su masa inicial, se obtiene 10,2 g de agua en el canasto inferior y 0,1 g en el canasto superior, sumando 10,3 g de agua absorbida y 1,8 g de agua atribuibles a pérdidas del sistema. A partir de la masa absorbida, se tiene un 85,1% de rendimiento.

Discusión

A modo de discusión, se realiza un breve análisis de los resultados obtenidos. Con respecto al rendimiento de la absorción de agua en los distintos absorbentes, se tiene que, para la sílica, el rendimiento alcanza un 67,5%, mientras los ensayos realizados con carbón activado entregan rendimientos de 88,6% y 85,1%. La razón de esta diferencia puede ser atribuible a la mayor superficie de contacto que presenta el carbón activado, lo que le confiere un mayor poder absorbente, así como también evita que el agua fluya con mayor facilidad al fondo del reactor, pudiendo quedar atrapada en los conductos de purga, debido a la conformación en polvo que tiene, lo que hace que se amolde de mejor manera al canasto, a diferencia de la sílica gel, que tiene forma de pequeñas esferas, aumentando la porosidad.

En cuanto al rendimiento de la extracción de ϵ -CL, se tiene que para los dos ensayos analizados, el rendimiento fue similar y no mayor al 1%, por lo que se infiere que parte de la ϵ -CL ingresada al sistema, o bien quedó retenida en los conductos de purga o de salida del montaje experimental, o quedó absorbida en los absorbentes utilizados o la lana de vidrio usada para taponear el fondo del reactor.

Se tiene conciencia por otra parte, que al ingresar al sistema una masa menor a 1g, es muy factible que se pierda o se absorba gran cantidad de la ϵ -CL ingresada al sistema, por lo que se propone realizar ensayos con una masa considerable para evitar pérdidas. Se plantea también la posibilidad de comparar el rendimiento de absorción mediante tamices moleculares, propuesto por Dong *et al.* (1999).

Ensayo complementario, columna rellena con carbón activado

Ya que los ensayos a partir de carbón activado entregaron mayores rendimientos de absorción, se planteó la posibilidad de realizar una columna de 6 m de largo en forma de serpentín, rellena con carbón activado, para otorgarle un mayor tiempo de residencia a la mezcla de ϵ -CL y agua durante el proceso de extracción y así aumentar la cantidad de agua retenida en el carbón activado.

Lamentablemente, una vez se conectó la columna a la salida del reactor y se inició el proceso de extracción, la presión y la porosidad de la columna evitaron que el CO_2 fluyera libremente, taponeándose la columna, sin obtener extracto alguno en el colector final. Una vez retirada la columna, se liberó la presión acumulada adentro y el carbón activado salió expulsado de la columna. Se repitió una vez más el proceso para ver si una menor cantidad de carbón activado en la columna permitía el flujo de CO_2 y, por ende, el proceso de extracción. Sin embargo, nuevamente se taponeó la columna y al volver a retirarla el carbón activado volvió a salir expulsado de la columna.