

SINTEZA, CARACTERIZAREA ȘI DEGRADAREA UNOR NOI OLIGOESTERI DIN MATERII PRIME REGENERABILE

Teză de doctorat – Rezumat

pentru obținerea titlului științific de doctor la

Universitatea Politehnică Timișoara

în domeniul de doctorat Inginerie Chimică

autor chim. Diana - Maria APARASCHIVEI

conducător științific Prof.univ.dr.ing. Francisc PETER

Martie 2019

Biopolimerii obținuți din resurse regenerabile sunt încadrați ca produși ai Biotehnologiei albe, fiind obținuți fie prin izolarea biopolimerilor naturali din plante sau microorganisme, fie prin sinteză chimică sau enzimatică in vitro utilizând monomeri regenerabili. Polimerii de natură biologică au diverse aplicații în industriile medicală, farmaceutică, alimentară, a lacurilor și vopselelor, textilă, precum și în agricultură și horticultură.

Sinteza catalizată de enzime a unor biopolimeri reprezintă la ora actuală o alternativă la obținerea materialelor polimerice pe cale chimică, deoarece biocatalizatorii provin din resurse regenerabile, sunt biodegradabili, pot funcționa în condiții blânde de reacție și au un impact redus asupra mediului înconjurător.

Teza de doctorat este structurată în patru părți:

1. Studiu de literatură, în care este detaliat stadiul actual al cercetării în domeniul sintezei biopolimerilor utilizând enzime ca și catalizatori.

La ora actuală aproape fiecare material plastic convențional are și o alternativă ecologică. Industria biopolimerilor este în continuă dezvoltare, având potențialul de a rezolva problemele economice legate de epuizarea resurselor și de a reduce impactul dăunător al plasticelor nebiodegradabile asupra mediului. Cele trei clase în care se împart materialele polimerice de natură biologică sunt [1]:

- Materiale plastice de natură biologică, parțial sau total nebiodegradabile;
- Materiale plastice de natură biologică, biodegradabile;
- Materiale plastice obținute din resurse fosile, biodegradabile.

Utilizarea enzimelor drept catalizatori pentru reacțiile de polimerizare prezintă numeroase avantaje, deoarece acești biocatalizatori provin din resurse regenerabile, sunt biodegradabili, pot funcționa în condiții blânde de reacție și au un impact redus asupra mediului înconjurător.

Introducerea unor unități monomerice în catena principală sau în catena laterală a polimerilor naturali reprezintă o modalitate promițătoare pentru îmbunătățirea proprietăților acestora. Se obțin astfel polimeri cu funcțiuni noi, care pot fi utilizați în diverse aplicații, în special în domeniul medical și alimentar.

A fost realizat studiu bibliografic și asupra materiilor prime regenerabile utilizate în partea de Contribuții originale, care se pot obține din biomasă utilizând procedee în cataliză enzimatică sau chimică. De-a lungul timpului cercetătorii au descris sinteze în condiții cât mai blânde de reacție a numeroși monomeri regenerabili care pot fi utilizați în industria polimerilor.

Totodată, au fost descrise metodele de polimerizare a oligo- și poliesterilor, precum și

tipurile de polimerizare catalizate de enzime: polimerizarea enzimatică cu deschidere de ciclu și policondensarea enzimatică.

Una dintre cele mai eficiente lipaze pentru obținerea polimerilor cu proprietăți biocompatibile și biodegradabile este lipaza B din *Candida antarctica*, fapt confirmat de studiile numeroase din literatură [2] - [6]. Principalele caracteristici ale lipazelor sunt enantioselectivitatea, regioselectivitatea și chemoselectivitatea, datorită cărora s-au dovedit a fi biocatalizatori ideali pentru sinteza *in vitro* a polimerilor, obținându-se poliesteri, policarbonați, poliamide sau copolimeri grefați pe diferite schelete polimerice [7].

De asemenea, au fost prezentate numeroase studii privind obținerea poliesterilor pe bază de ϵ -caprolactonă [8], [9], derivați ai 5-hidroximetilfurfuralului [10] - [12] și derivați ai acidului itaconic [13], [14].

Una dintre principalele preocupări ale polimerilor o reprezintă biodegradabilitatea. În acest sens au fost amintite o serie de cercetări cu privire la degradarea enzimatică și microbiană a unor polimeri [15] - [17].

Cu toate că efectuarea calculelor teoretice asupra polimerilor reprezintă un domeniu mai restrâns al literaturii de specialitate, tot mai multe grupuri de cercetare se orientează către acest domeniu datorită informațiilor prețioase care se pot obține prin aceste metode. În acest sens au fost precizate câteva rapoarte despre modelarea moleculară a unor polimeri.

2. Contribuții originale, în care sunt prezentate rezultatele obținute pe parcursul cercetărilor, debutează cu prezentarea obiectivelor tezei de doctorat. Teza de doctorat este focalizată pe sinteza enzimatică (folosind lipaze) sau chimică a unor noi biopoliesteri pe bază de materii prime regenerabile, caracterizarea acestora și studii teoretice privind stabilitatea lor energetică sau chimică. Copoliesterificarea reprezintă o modalitate pentru îmbunătățirea proprietăților unor polimeri deja cunoscuți.

Sinteza și caracterizarea copolimerilor ϵ -caprolactonei cu acid 5-hidroximetil-2-furoic

În acest capitol au fost sintetizați enzimatic noi oligomeri conținând ϵ -caprolactonă (ECL) și acid 5-hidroximetil-2-furoic (5OH2FA). Formarea copolimerilor a fost demonstrată prin spectrometrie MALDI TOF-MS și au putut fi identificați copolimeri cu mai multe unități 5OH2FA inserate în lanțul poli(ϵ -caprolactonei) (PCL).

Reacțiile s-au realizat în intervalul de temperatură 40-80°C și au fost testate trei enzime imobilizate, disponibile comercial: Novozyme 435, Lipozyme CalB și GF-CalB-IM. Cele mai bune rezultate s-au obținut pentru lipaza GF-CalB-IM.

A fost studiată influența apei asupra formării produșilor de reacție, demonstrându-se efectul negativ al conținutului mai ridicat de apă asupra maselor moleculare medii.

Structura copoliesterilor sintetizați a fost confirmată de spectroscopia FT-IR și RMN, iar comportamentul termic a fost evaluat prin TG și DSC.

Reutilizarea biocatalizatorului în 4 cicluri de reacție în regim discontinuu a arătat o stabilitate operațională destul de bună, cu reducerea treptată a eficienței catalitice de polimerizare.

Sinteza copoliesterilor 5OH2FA_ECL în proces continuu a fost studiată pentru lipaza cu cele mai bune rezultate în sistem discontinuu (GF-CalB-IM), la diferite temperaturi și s-a demonstrat astfel pentru prima oară posibilitatea polimerizării în asemenea condiții.

Sinteza enzimatică și caracterizarea unor terpolimeri obținuți din surse regenerabile

În acest capitol este prezentată polimerizarea enzimatică în solvent organic a trei monomeri de natură biologică: dimetil 2,5-furandicarboxilat (DMFDC), dimetil itaconat (DMI) și 1,6-hexandiol (HDO), în vederea obținerii unor noi terpolimeri.

Au fost testate două enzime imobilizate, disponibile comercial. Enzima GF-CalB-IM

(lipaza din *Candida antarctica* B imobilizată pe rășină schimbătoare de ioni microporoasă), a demonstrat o eficacitate mai mare în sinteza poliesterilor decât Novozyme 435, o enzimă imobilizată utilizată pe scară largă în reacțiile de polimerizare.

Au fost determinate raportul molar optim al monomerilor cu grupări dicarboxilat, concentrația biocatalizatorului și timpul de reacție, demonstrând că atât gradul de polimerizare cât și conținutul relativ al produșilor de reacție pot fi controlate prin ajustarea fină a acestor parametrii.

Stabilitatea biocatalizatorului GF-CalB-IM a fost investigată în 5 cicluri de reacție, prezentând o scădere a maselor moleculare medii după trei reutilizări. Au fost sintetizați poliești conținând mai mult de 90% terpolimer la un timp mai îndelungat de reacție, rezultatele fiind calculate pe baza spectrelor MALDI TOF-MS.

Analiza RMN a ajutat la demonstrarea structurilor produșilor de reacție și a oferit informații relevante privind reactivitatea și regioselectivitatea reacțiilor, iar analiza termică a confirmat stabilitatea ridicată a terpolimerului, ceea ce îl face disponibil pentru diverse aplicații.

Sinteza chimică și caracterizarea copolimerilor obținuți din ϵ -caprolactonă și hidroxi-acizi grași

Au fost sintetizați chimic noi copoliești ai ϵ -caprolactonei cu trei hidroxi-acizi grași diferiți: acidul 16-hidroxihexadecanoic, acidul 12-hidroxistearic și acidul ricinoleic, utilizând SnOct₂ drept catalizator. Aceste sinteze au fost efectuate în completarea unor studii anterioare de obținere a acestor polimeri în cataliză enzimatică, studii ce nu fac obiectul acestei teze [18]. Cu ajutorul spectrometriei de masă MALDI TOF-MS s-a determinat masa moleculară medie și gradul de polimerizare a copolimerilor sintetizați.

Parametrii de reacție investigați în vederea obținerii unor produși de reacție cu mase moleculare mari și un conținut mare de copolimer au fost raportul molar dintre comonomeri și temperatura. Rezultatele cele mai bune, mase moleculare peste 2200 Da și grade de polimerizare mai mari de 30, s-au obținut la raportul molar ECL:RCA și ECL:16HHDA de 5:1, la temperatura de 90°C.

Copolimerii sintetizați au fost caracterizați prin FT-IR și RMN, confirmând structurile polimerice dorite, iar proprietățile termice au fost analizate prin TG și DSC.

Degradarea enzimatică și microbiană a unor biopolimeri selectați

În vederea determinării biodegradabilității copolieșterilor sintetizați au fost selectate două metode de degradare. În prima metodă copolieșterii obținuți au fost supuși degradării în soluție de tampon fosfat (pH=7,4), în prezență de lipază din pancreas de porc, iar cea de-a doua metodă a utilizat un amestec de microorganisme colectate din mediul natural apos (râul Bega, localitatea Timișoara, județul Timiș).

Evaluarea degradabilității poliesterilor a fost realizată prin cuantificarea pierderii de masă în timp și completată de analiza MALDI TOF-MS a extractelor organice. Copolimerii 5OH2FA_ECL s-au degradat cel mai rapid, în timp ce terpolimerii au avut o rezistență mare la degradare. S-a demonstrat că în funcție de structura heterociclică sau alifatică introdusă în lanțul PCL s-au obținut copoliești cu diferite grade de biodegradabilitate, aceasta depinzând și de metoda de degradare folosită.

Modelarea moleculară a oligoesterilor sintetizați

Modelarea moleculară este o metodă prin care se pot stabili anumite corelații între structura moleculelor și proprietățile acestora [19]. Scopul calculelor teoretice a fost de a determina care dintre structurile oligomerice sau polimerice posibile, având o anumită secvență structurală de unități monomerice, are șanse mai mari de a fi sintetizată, pe baza stabilității sale.

3. Partea experimentală, cuprinde materialele și procedeele utilizate în sinteza oligoesterilor sau în cadrul altor proceduri, precum și metodele analiză utilizate (MALDI TOF-MS, RMN, ATR FT-IR, TG, DSC, HPLC, precum și pachetul software HyperChem prin metodele MM+, mecanică moleculară, și PM3, semi-empirică).

4. Concluzii finale și contribuții originale, rezultate din studiile experimentale și teoretice, în conformitate cu obiectivele propuse.

Obiectivele tezei de doctorat au fost îndeplinite, rezultând următoarele concluzii:

1. Studiul de literatură, prezentat în prima parte a tezei de doctorat, a arătat importanța biocatalizei în sinteza oligo și poliesterilor, prin următoarele aspecte:

- Sinteza unor noi materiale polimerice cu proprietăți specifice este necesară pentru aplicații în domeniul medical și alimentar;

- Materiile prime regenerabile pot funcționa ca monomeri în sinteza polimerilor;

- Utilizarea enzimelor reprezintă o alternativă ecologică a catalizatorilor chimici pentru sinteza polimerilor;

- Poliesterii ce conțin monomeri din resurse regenerabile au fost utilizați în domenii precum biomedicina, industria alimentară, în obținerea elastomerilor și a rășinilor.

2. S-au obținut copoliesteri liniari și ciclici utilizând ϵ -caprolactonă și acid 5-hidroximetil-2-furoic în cataliză enzimatică.

2.1. Analizele MALDI TOF-MS au demonstrat formarea oligoesterilor de ϵ -caprolactonă în care au fost inserați una sau mai multe unități de acid 5-hidroximetil-2-furoic.

2.2. Au fost testate 3 lipaze imobilizate, disponibile comercial, cea mai eficientă fiind lipaza GF-CalB-IM.

2.3. Temperatura optimă pentru formarea poliesterilor conținând ϵ -caprolactonă și acid 5-hidroximetil-2-furoic cu mase moleculare medii ridicate a fost determinată ca fiind 80°C.

2.4. Prezența apei în sistem are un efect negativ asupra formării poliesterilor cu mase moleculare ridicate.

2.5. Spectroscopia bidimensională HMBC-RMN a confirmat formarea legăturii esterice dintre acidul 6-hidroxihexanoic (provenit din ϵ -caprolactonă) și acidul 5-hidroximetil-2-furoic.

2.6. Stabilitatea termică a oligoesterilor a fost studiată prin termogravimetrie, obținându-se un compus mai puțin stabil decât poli(ϵ -caprolactona), cu pierderi de masă majore în intervalul de temperatură 200-300°C.

2.7. Reutilizarea biocatalizatorului în 4 cicluri de reacție a condus la valori mai mici ale maselor moleculare medii, însă nu și a conținutului relativ de copoliesteri.

2.8. Sinteza copoliesterilor în sistem continuu s-a realizat cu succes în terț-butanol, fiind un solvent potrivit pentru solubilizarea acidului 5-hidroximetil-2-furoic, în același timp compatibil cu lipazele ca mediu de reacție.

3. A fost realizată pentru prima dată sinteza enzimatică a terpolimerilor din dimetil 2,5-furandicarboxilat, dimetil itaconat și 1,6-hexandiol.

3.1. Au fost testate 2 enzime imobilizate: Novozyme 435 și GF-CalB-IM, disponibile comercial, rezultate mai bune obținându-se pentru biocatalizatorul GF-CalB-IM.

3.2. Sinteza enzimatică a terpolimerilor utilizând lipaze imobilizate a fost mult mai eficientă decât sinteza terpolimerilor utilizând un catalizator metalic (2-etilhexanoat de staniu (II)).

3.3. S-a realizat optimizarea reacțiilor investigând doi parametri: raportul molar dintre reactanți și concentrația biocatalizatorului, 5% biocatalizator (% de masă, raportat la masa totală de monomeri) și raportul molar DMFDC:DMI=2:1 au fost alese ca fiind ideale pentru sinteza terpolimerilor.

3.4. Timpul de reacție optim în vederea obținerii terpolimerilor cu mase moleculare medii ridicate și un conținut mare de terpolimeri a fost demonstrat a fi 24 h.

3.5. A fost demonstrată posibilitatea reutilizării enzimei imobilizate GF-CalB-IM în mai

multe cicluri de reacție, însă valorile maselor moleculare medii ale terpolimerilor au scăzut.

3.6. Formarea terpolimerilor a fost demonstrată prin tehnica MALDI TOF-MS și prin spectroscopia RMN.

3.7. Proprietățile termice ale terpolimerilor au fost studiate prin TG și DSC, stabilitatea termică a terpolimerilor fiind mult peste stabilitatea monomerilor.

4. Sinteza oligoesterilor ϵ -caprolactonei cu hidroxi-acizi grași a fost realizată în cataliză chimică, utilizând 2-etilhexanoat de staniu (II).

4.1. Formarea oligoesterilor liniari și ciclici a fost dovedită prin MALDI TOF-MS și spectroscopie RMN.

4.2. A fost investigată influența temperaturii și a raportului molar ECL:HFA asupra maselor moleculare medii ale oligoesterilor obținuți.

4.3. Structura poliesterilor a fost elucidată prin spectrul bidimensional HMBC-RMN.

4.4. Stabilitatea termică a copoliesterilor a fost demonstrată prin termogravimetrie, comparativ cu homopolimerul PCL.

5. Biodegradabilitatea poliesterilor sintetizați a fost investigată în prezența lipazei din pancreas de porc și în prezența microorganismelor.

5.1. Dintre poliesterii sintetizați cea mai bună capacitate de degradare în prezența lipazei a prezentat oligoesterul obținut din ϵ -caprolactonă și acid 5-hidroximetil-2-furoic. Biodegradabilitatea homopolimerului PCL și terpolimerului au fost foarte redusă.

5.2. Microorganismele s-au dovedit eficiente în studiul de degradare al poliesterilor sintetizați, mai puțin pentru PCL și terpolimer.

6. Stabilitatea poliesterilor a fost determinată prin modelare moleculară.

6.1. Conform calculelor teoretice structura cea mai stabilă a poliesterilor ϵ -caprolactonei cu acid 5-hidroximetil-2-furoic este alcătuită din 8 unități (4 unități de ECL și 4 unități de 5OH2FA).

6.2. Calculele cuantochimice realizate pe structurile posibile ale terpolimerilor corelează cu datele obținute din MALDI TOF-MS și RMN, unitatea terminală cea mai probabilă fiind itaconat.

6.3. Modelarea moleculară a homopolimerilor conținând hidroxi-acizi grași și ECL a arătat stabilitatea mărită a homopolimerului 12HSA, în timp ce homopolimerul PCL este cel mai puțin stabil.

6.4. Stabilitatea poliesterilor liniari și ciclici ai ECL cu hidroxi-acizi grași crește în ordinea: RCA_ECL < 16HHDA_ECL < 12HSA_ECL.

BIBLIOGRAFIE

[1] S. Pathak, C. L. R. Sneha, B. B. Mathew, Bioplastics: its timeline based scenario & challenges, *J. Polym. Biopolym. Phys. Chem.*, **2014**, 2(4), 84-90.

[2] Y. Yang, W. Lu, X. Zhang, W. Xie, M. Cai, R. Gross, Two-step biocatalytic route to biobased functional polyesters from ω -carboxy fatty acids and diols, *Biomacromolecules*, **2010**, 11, 259-268.

[3] D. Juais, A. Naves, C. Li, R. Gross, L. Catalan, Isosorbide polyesters from enzymatic catalysis, *Macromolecules*, **2010**, 43, 10315-10319.

[4] Z. Jiang, Lipase-catalyzed synthesis of aliphatic polyesters via copolymerization of lactone, dialkyl diester and diol, *Biomacromolecules*, **2008**, 9, 3246-3251.

[5] A. Cruz-Izquierdo, L. A. M. van den Broek, J. L. Serra, M. J. Llama, C. G. Boeriu, Lipase-catalyzed synthesis of oligoesters of 2,5-furandicarboxylic acid with aliphatic diols, *Pure Appl. Chem.*, **2015**, 87(1), 59-69.

[6] Y. Jiang, A. J. J. Woortman, G. O. A. van Ekenstein, D. M. Petrović, K. Loos, Enzymatic

synthesis of biobased polyesters using 2,5-bis(hydroxymethyl)furan as the building block, *Biomacromolecules*, **2014**, 15(7), 2482-2493.

[7] S. Kobayashi, A. Makino, Enzymatic polymer synthesis: An opportunity for green polymer chemistry, *Chem. Rev.*, **2009**, 109(11), 5288-5353.

[8] I. Armentano, M. Dottori, E. Fortunati, S. Mattioli, J. M. Kenny, Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review, *Polym. Degrad. Stab.*, **2010**, 95, 2126-2146.

[9] X. Zhang, B. H. Tan, Z. Li, Biodegradable polyester shape memory polymers: Recent advances in design, material properties and applications, *Mater. Sci. Eng. C*, **2018**, 92, 1061-1074.

[10] Y. Jiang, A. J. J. Woortman, G. O. R Alberda van Ekenstein, K. Loos, A biocatalytic approach towards sustainable furanic-aliphatic polyesters, *Polym. Chem.*, **2015**, 6(29), 5198-5211.

[11] D. Maniar, Y. Jiang, A. Woortman, J. van Dijken, K. Loos, Furan-based copolyesters from renewable resources: enzymatic synthesis and properties, *ChemSusChem*, **2019**, DOI: 10.1002/cssc.201802867.

[12] M. Matos, A. F. Sousa, A. C. Fonseca, C. S. R. Freire, J. F. J. Coelho, A. J. D. Silvestre, A new generation of furanic copolyesters with enhanced degradability: poly(ethylene 2,5-furandicarboxylate)-co-poly(lactic acid) copolyesters, *Macromol. Chem. Phys.*, **2014**, 215, 2175-2184.

[13] Y. Jiang, A. J. J. Woortman, G. O. R. Alberda van Ekenstein, K. Loos, Environmentally benign synthesis of saturated and unsaturated aliphatic polyesters via enzymatic polymerization of biobased monomers derived from renewable resources, *Polym. Chem.*, **2015**, 6, 5451-5463.

[14] S. Yamaguchi, M. Tanha, A. Hult, T. Okuda, H. Ohara, S. Kobayashi, Green polymer chemistry: lipase-catalyzed synthesis of bio-based reactive polyesters employing itaconic anhydride as a renewable monomer, *Polym. J.*, **2014**, 46(1), 2-13.

[15] M. A. Elsayy, K. -H. Kim, J. -W. Park, A. Deep, Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **2017**, 79, 1346-1352.

[16] A. Pellis, K. Haernvall, C. M. Pichler, G. Ghazaryan, R. Breinbauer, G. M. Guebitz, Enzymatic hydrolysis of poly(ethylene furanoate), *J. Biotechnol.*, **2016**, 235, 47-53.

[17] K. Haernvall, S. Zitzenbacher, H. Amer, M. T. Zumstein, M. Sander, K. McNeill, M. Yamamoto, M. B. Schick, D. Ribitsch, G. M. Guebitz, Polyol structure influences enzymatic hydrolysis of bio-based 2,5-furandicarboxylic acid (FDCA) polyesters, *Biotechnol. J.*, **2017**, 12, 1600741.

[18] A. Todea, D. Aparaschivei, V. Badea, C. G. Boeriu, F. Peter, biocatalytic route for the synthesis of oligoesters of hydroxy-fatty acids and ϵ -caprolactone, *Biotechnol. J.*, **2018**, 13, 1700629.

[19] M. Medeleanu, Micro și nanomateriale. Modelarea nanostructurilor, Editura Politehnica, Timișoara, **2013**.