

# Lipasas en síntesis de polímeros: avances y contribución a la química verde de polímeros

## Lipases in polymer synthesis: advantages and its contribution to green polymer chemistry

*Juan David Villavicencio Romero*<sup>\*,1</sup>, *Luis Eduardo Enríquez Fernández*<sup>\*,1</sup>,  
*Ricardo Benítez Benítez*<sup>\*\*,1</sup>, *Jaime Martin Franco*<sup>\*\*\*,1</sup>, *Giovanni Rojas*<sup>\*\*\*\*</sup>.

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v21n2.72362

### RESUMEN

Las lipasas han sido usadas en las últimas décadas como catalizadores eficientes en la síntesis enzimática de polímeros y gracias a características como alta selectividad, reciclabilidad, inocuidad y fácil separación/purificación se han convertido en una herramienta importante en el campo de los polímeros. En este trabajo se recopilan los desarrollos más importantes en el área y a su vez se muestra la tendencia actual de este campo de investigación.

**Palabras clave:** lipasas, polímeros, química verde de polímeros, biotecnología blanca, poliesterificación.

### ABSTRACT

Lipases have been used in last decades as efficient catalysts in enzymatic polymer chemistry, thanks to its high selectivity, recyclability, safety and easy recovery/ separation, lipases have become in an important tool in polymer field. In this paper we compile the most important achievements in the enzymatic polymer chemistry and, at the same, time we show the current trend in this field of research.

**Key words:** lipases, polymers, green polymer chemistry, white biotechnology, polyesterification.

**Recibido:** diciembre 10 de 2018

**Aprobado:** octubre 17 de 2019

---

1 Grupo de Investigación de Química de Productos Naturales,

\* Estudiante de Química. Universidad del Cauca, Colombia. [jvillavicencio@unicauca.edu.co](mailto:jvillavicencio@unicauca.edu.co), [luisenriquez@unicauca.edu.co](mailto:luisenriquez@unicauca.edu.co)

\*\* Ph.D. Enzimología. Universidad del Cauca, Colombia. [rbenitez@unicauca.edu.co](mailto:rbenitez@unicauca.edu.co)

\*\*\* Ph.D. Química. Universidad del Cauca, Colombia. [jmartinf@unicauca.edu.co](mailto:jmartinf@unicauca.edu.co)

\*\*\*\* Ph.D. Química. Grupo Natura. Universidad Icesi, Colombia. [grojas@icesi.edu.co](mailto:grojas@icesi.edu.co)

## INTRODUCCIÓN

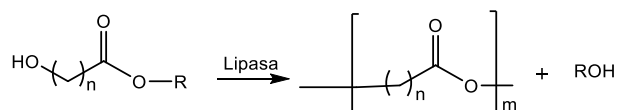
La síntesis enzimática de polímeros ofrece ventajas como la eficiencia catalítica, alta enantio-, quimio- y regioselectividad, versatilidad en las condiciones de reacción (temperatura, medio de reacción), además, dado que las enzimas provienen de fuentes renovables su uso conlleva un impacto ambiental mínimo (Gross *et al.*, 2001). Entre los diferentes tipos de enzimas, las lipasas han sido las más ampliamente usadas en síntesis de materiales poliméricos, esto es debido al carácter polifacético de este tipo de enzimas el cual se ve influido por el tipo de organismo del que se obtienen (Salihua & Alama, 2015), por ejemplo, una muestra de lipasa aislada de *Talaromyces thermophilus* puede usarse en condiciones de pH 9-11 y entre 50-60°C para hidrólisis de ácidos grasos y conserva su actividad en la presencia de surfactantes (Romdhane *et al.*, 2010), mientras que otra lipasa obtenida de *Candida rugosa* puede usarse en condiciones de pH ácido (<4) para la hidrólisis del 2-cloroetil éster del Ketoprofeno (Liu *et al.*, 1999). Una diferencia entre las lipasas y otras enzimas es que pueden conservar o incluso mejorar su actividad enzimática con respecto a una reacción específica en disolventes orgánicos, estas ventajas han sido explotadas por industrias como la alimentaria (Ahmed *et al.*, 2010; Fickers *et al.*, 2011; Mhetras *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2011; Van Kempen *et al.*, 2012), farmacéutica (Fickers *et al.*, 2011; Horchani *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 1999; Piotrowska & Sobczak, 2015), de biodiesel (Li & Yu, 2014; Mander *et al.*, 2012; Yoo *et al.*, 2011), detergentes (De Lourdes Moreno *et al.*, 2009; Romdhane *et al.*, 2010) entre otras. La síntesis enzimática de polímeros tuvo origen en una casualidad, en 1983 mientras se investigaba en la hidrólisis enzimática de aceite de castor, se evidenció la aparición de dímeros y trímeros del ácido ricinoleico (Susumo Okumura *et al.*, 1983), cabe resaltar que no fue sino hasta 1985 cuando se sintetizó el primer polímero por vía enzimática, a partir del Ácido 10-hidroxi-decanoico catalizado por lipasa de *Pseudomonas fluorescens* modificada con polietilenglicol (PEG) (Ajima *et al.*, 1985), en los años siguientes se harían las primeras síntesis de polímeros catalizado por lipasas de origen animal como la Lipasa de páncreas porcino (PPL) con la cual se hicieron avances en cuanto a polimerización de  $\omega$ -hidroxiésteres y  $\epsilon$ -caprolactona para obtención de polímeros lineales (Knani *et al.*, 1993; Shuai, Jedlinski, *et al.*, 1999a), desde sus inicios hasta la actualidad ha habido numerosos avances en la síntesis enzimática de polímeros tales como el uso de enzimas inmovilizadas (Miranda *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2018), la modificación de organismos mediante ingeniería genética, la utilización en conjunto con técnicas químicas o la búsqueda de materias

primas renovables como sustratos. Este trabajo es una recopilación de los desarrollos más significativos en cuanto a la síntesis enzimática de polímeros catalizada por lipasas y pretende dar una perspectiva tanto del desarrollo actual como del futuro posible en esta área de la química.

## PRIMEROS AÑOS

Como en todo campo de investigación la información para la síntesis enzimática de polímeros en un principio era limitada, así que los primeros artículos al respecto consolidan la utilidad de la nueva técnica para la formación de polímeros lineales y ramificados en 3 tipos de reacciones **1)** Trans-esterificación de diácidos con dioles, **2)** Trans-esterificación de hidroxiácidos y **3)** Polimerización por apertura de anillo de lactonas. Una limitación grande para los primeros investigadores fue la fuente de lipasas ya que eran pocas las opciones comerciales que se tenían en la época, a su vez dada la especificidad de la relación enzima-sustrato es necesario tratar cada reacción como una síntesis diferente en la que se estudian parámetros como el rendimiento, solubilidad, facilidad de recuperación, entre otros. En esta sección se muestran los primeros avances en la química enzimática de polímeros catalizada por lipasas.

## TRANS-ESTERIFICACIÓN DE HIDROXIÁCIDOS Y SUS



Esquema 1. Reacción general de polimerización por condensación de hidroxiácidos o sus derivados.

## ÉSTERES

En 1986 se empleó ácido 12-hidroxi-octadecanoico, ácido 12-hidroxi-cis-9-octadecenoico, ácido 16-hidroxi-hexadecanoico y ácido 12-hidroxi-dodecanoico y mediante una reacción a 35°C en agua, hidrocarburos alifáticos o benceno con lipasa de *Candida cylindracea* (lipasa CC) como catalizador, se obtuvieron oligómeros con peso molecular promedio en número alrededor de  $(\bar{M}_n)$  1000g/mol y rendimientos tan altos como el 99%, a su vez se evidenció que la reacción ocurría a mayor velocidad y el producto tenía mayor peso molecular en los sustratos que poseen un grupo hidroxilo secundario (Matsumura & Takahashi, 1986).

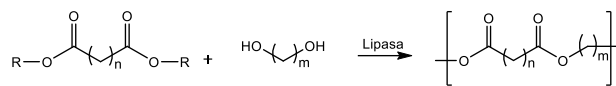
Dos investigaciones llevadas a cabo en 1992, emplearon hidroxiácidos para polimerización enzimática, en la pri-

mera Knani *et al.* (1993), emplearon hidroxiácidos de cadenas de 5 y 6 carbonos, los cuales fueron exitosamente polimerizados a temperaturas de 30°C y 70°C, usando PPL como catalizador, la influencia de la temperatura se observó en el grado de polimerización, obteniendo polímeros  $\bar{M}_w$  de alrededor de 250 dalton independientemente del disolvente utilizado para la primera temperatura, mientras que a 70°C el  $\bar{M}_w$  varía notablemente al usar diferentes disolventes, obteniendo valores de 200 y 295 para acetonitrilo y benceno respectivamente; valores máximos de 1130 en isooctano y 1035 en diisopropil éter, lo cual probó la influencia tanto del disolvente como de la temperatura para esta reacción, la dependencia de la actividad catalítica de las enzimas sobre la polaridad de los disolventes es atribuida mayoritariamente a la habilidad de los disolventes para cambiar la forma tridimensional de la enzima. O'Hagan & Zaidi (1993) estudiaron el comportamiento de la polimerización en hidroxiácidos de cadenas entre 6 y 12 carbonos, a 55°C con la implementación de tamices moleculares en el medio de reacción y catalizado por Lipasa CC, esta enzima no polimeriza los sustratos de cadena corta, mientras que se obtienen polímeros de 12 unidades para el ácido 12-hidroxidodecanoico y de 52 unidades para el ácido 10-hidroxidodecanoico, lo cual lleva a la conclusión de que para el sitio activo de esta enzima una longitud de cadena de 10 unidades es ideal.

Ohya *et al.* (1995), estudiaron sistemáticamente la síntesis enzimática de polímeros de 4  $\alpha$ -hidroxiácidos, ácido glicólico, ácido láctico, ácido 2-hidroxiburírico y ácido málico, diferentes condiciones, sustratos, disolventes, 8 enzimas fueron probadas y se llegó a la conclusión de que el mejor rendimiento (53%) para enzimas no modificadas se obtuvo con ácido glicólico en ciclohexanona, lo que indica que el disolvente ideal proporciona una buena solubilidad de los sustratos y no es miscible con el agua, entre las 8 hidrolasas probadas se logró la mayor conversión al usar lipasa de *Aspergillus niger*, adicionalmente se monitoreó la reacción al usar etil-glicolato en lugar de ácido glicólico, logrando incrementos en la conversión con 6 de las 8 enzimas. Por otra parte, se hicieron ensayos con enzimas modificadas con PEG, esta técnica de modificación permite una mayor solubilidad y los resultados indican que la conversión aumenta alcanzando una conversión del 65% cuando se utiliza etil-glicolato y estearasa de hígado de cerdo modificada con PEG de bajo peso molecular.

El ácido poliláctico (PLA) se sintetiza a partir de ácido láctico también hace parte de este tipo de reacciones, pero debido a su alto impacto se menciona en una sección posterior.

## TRANS-ESTERIFICACIÓN DE DIÁCIDOS Y SUS DERIVADOS CON DIOLES.



**Esquema 2.** Reacción general de polimerización por condensación de diácidos o sus derivados con dioles.

Wallace & Morrow (1989a, 1989b), investigaron en la síntesis de polímeros ópticamente activos a partir del ácido trans- $\beta$ -hidromucónico, un diácido, previamente activado con 2,2,2-tricloroetanol en presencia de N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 1,4-butanodiol, la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente en éter etílico catalizada por PPL, para el sustrato quiral se realizó la epoxidación del diácido con ácido m-cloroperoxibenzoico (m-CPBA) produciendo una mezcla racémica, la polimerización se llevó a cabo con atmósfera de nitrógeno durante 3.5 días aun cuando el 1,4-butanodiol se consumió a las 6 h de reacción, al finalizar la reacción se obtuvieron 2 productos, los resultados fueron que el producto 1 corresponde en un 95% al diéster dextrógiro  $[\alpha]_D = +12.3^\circ$  mientras que el producto 2 es el polímero formado con una pureza enantiomérica del 96%, un  $\bar{M}_n = 5300$  y un  $\bar{M}_w = 7900$ . En otro ensayo la polimerización enzimática del ácido trans- $\beta$ -hidromucónico activado con 2,2,2-tricloroetanol y 1,4-butanodiol se realizó con las mismas condiciones del ensayo anterior exceptuando el paso de la epoxidación, pero la reacción no se llevó a cabo completamente a pesar de que se hizo reaccionar por 14 días.

Binns *et al.* (1993), realizaron una polimerización de un sistema de ácido adípico/ 1,4- butanodiol sobre el cual se implementaron dos tipos de enzimas diferentes dejando como resultado un buen proceso inicial de esterificación tanto para PPL como para Lipasa *Mucor Meihe*, con la particularidad de que pasadas las 21 h de reacción PPL es insuficientemente resistente al daño mecánico por lo tanto se inactiva completamente después de ese tiempo de reacción, caso contrario el comportamiento que presenta la Lipasa *Mucor Meihe* la cual no reporta daño mecánico, no se inactiva y a temperatura ambiente genera oligómeros de peso molecular promedio  $M_n = 527$  en un tiempo de 70 h, cabe resaltar que para la elección del disolvente se pensó prioritariamente desde el punto de vista de solubilidad, ya que este tiene la particularidad de prevenir la deshidratación de la enzima, esto debido a que la enzima necesita cierta cantidad de agua para mantener su estructura, por tal motivo se emplea un disolvente apolar y un tamiz molecular en la reacción de polimerización, además de que al aplicar la temperatura óptima entre 40-44°C se incrementa

la relación de poliesterificación sin favorecer la volatilidad del disolvente (Binns, *et al.*, 1993).

O'Hagan & Zaidi (1994) llevaron a cabo la polimerización de ácido 11- hidroxoundecanoico utilizando como catalizador una lipasa *Candida Cylindracea* (CC), la mencionada polimerización se realizó en hexano, con una temperatura de reacción de 55°C empleando como agente desecante los tamices moleculares y un tiempo de reacción de 103 h, el poliéster obtenido tiene un peso molecular de  $M_w = 22430$  siendo bastante elevado aunque no alcanzando el peso molecular objetivo de  $M_w = 35000$  que se habían obtenido de poliésteres sintetizados en trabajos anteriores, cabe resaltar que lo interesante del proceso de polimerización en donde se obtienen poliésteres de peso molecular tan alto, es una especie de dos etapas o al parecer un intermediario de reacción; en donde el reactivo de partida se polimeriza formando oligómeros de bajo peso molecular los cuales gracias a su bajo peso molecular y la disposición de los grupos funcionales facilita la condensación de los oligómeros en reacción con relación 1:1 (Alcohol: Ácido) permitiendo la formación de los poliésteres de alto peso molecular cercanos a los pesos moleculares objetivos.

A través del tiempo el avance en la síntesis enzimática de polímeros fue mejorada con el fin de mejorar los pesos moleculares a obtener, tanto así que en 1996 se desarrolló una polimerización quimio enzimática de oligómeros a partir de ácido cólico el cual tiene como particularidad que presenta actividad biológica, además el proceso de condensación catalizado por una lipasa deja como resultado polímeros tipo peine (comb-polymers), estos polímeros son obtenidos a partir de la reacción del ácido cólico y el ácido 11-metacrililaminoundecanoico el cual reacciona con uno de los tres grupos hidroxilos que presenta el ácido cólico, debido a que de los tres hidroxilos solo uno se encuentra en posición ecuatorial con este hidroxilo se da la reacción de esterificación gracias a que el catalizador en este caso la lipasa *Candida Antártica* favorece esto por disposición espacial del hidroxilo, ya producido el monómero mediante síntesis enzimática este reacciona químicamente con AIBN (2,2-azoisobutironitrilo) el cual funciona como un iniciador radicalario para promover la formación del polímero en peine, presentado un peso molecular promedio de  $\bar{M}_n = 33000$  y un rendimiento de reacción del 52%, el polímero sintetizado al presentar actividad biológica es de potencial valor para la industria farmacéutica y biomédica (Noll & Ritter, 1996).

En 1997 sabiendo que los polímeros tenían un alto potencial en la industria farmacéutica Noll y Ritter sintetizaron un polirotaxano utilizando como disolvente Tetrahidrofu-

rano (THF) el cual es de mediana polaridad, lo que era muy poco probable hasta la fecha. Teniendo en cuenta de que los esfuerzos por desarrollar nuevas macromoléculas funcionalizadas, se integran en la química de los polímeros los rotaxanos los cuales debido a su estructura tipo mancuerna poseen diversas aplicaciones y pueden ser muy útiles en la industria, la reacción de esterificación dada entre el ácido 12-hidroxilaurico y el ácido 11-metacrililaminoundecanoico en presencia de THF, para la cual se empleó como catalizador Novozym®435 generó oligoésteres, la oligocondensación y el alargamiento de la cadena fueron favorecidos gracias a la presencia de la lipasa, los oligómeros copolimerizan radicalariamente con metilmetacrilamida (MMA) para generar los polímeros tipo peine, estos seguidos se condensan con N-(4-aminobutanoil)-4-trifenilmetilanilina en presencia de 2,6-dimetil-ciclodextrina y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) para producir los polirotaxanos, los cuales presentan una estructura polimérica tipo mancuerna garantizando de que por cada unidad de la cadena estén presentes anillos de la ciclodextrina. El alargamiento de la cadena de manera lateral garantiza una parte del tapón de la estructura tipo mancuerna de los rotaxanos y la otra parte del tapón es el grupo voluminoso de la N-(4-aminobutanoil)-4-trifenilmetilanilina el cual condensado funciona como barrera para evitar la salida de la ciclodextrina, el interés en este tipo de polímeros radica en su potencial uso en el campo de la electrónica molecular (Noll & Ritter, 1997).

De acuerdo a lo publicado en (O'Hagan & Parker, 1998) la síntesis de poliésteres de tipo A-B enantioméricamente selectivos fue posible gracias a que utilizaron la lipasa de tipo *Candida Rugosa*, ya que esta favorece la producción de un monómero estéreo- y regioselectivo, esto con el objetivo de obtener un poliéster enriquecido enantioméricamente, para verificar esta propuesta O'Hagan y H. Parker optaron por esterificar una mezcla racémica de ácido 10- hidroxoundecanoico durante 6 h y 55°C de temperatura empleando como disolvente hexano y como agente secante tamices moleculares, el resultado de la mencionada polimerización fue: peso molecular  $M_w = 1000$  y una distribución de pesos moleculares  $PDI = 1,3$ ; con un exceso enantiomérico del 60% para el enantiómero (S) y 33% para el enantiómero (R), esto es logrado gracias a la capacidad de la enzima para permitir el ataque nucleofílico de las especies monoméricas (S), teniendo en cuenta que en el instante de formación del complejo enzima - acilo proveniente de la acilación de la mezcla racémica del ácido 10- hidroxoundecanoico no se distingue el centro estereogénico del enantiómero (S) ó (R), pero en el momento de la des-acilación y formación del polímero prefiere que el ataque nucleofílico sea realizado por el grupo hidroxilo del enantiómero (S) de ahí el 60%

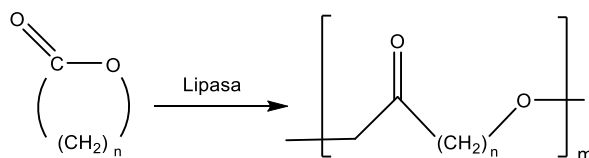
de exceso enantiomérico. La enzima al facilitar la formación del complejo enzima-acilo hace mucho más estereoselectivo y regioespecífico la poliesterificación del ácido 10-hidroxiundecanoico dejando como resultado poliésteres enriquecidos enantioméricamente de tipo A-B.

Shuai, *et al.* (1999b), promovieron la síntesis de poliésteres desde ácido 3-hidroxi-butirico (3-HBA) y ácido-12-hidroxidodecanoico (12-HDA), el proceso de homopolimerización enzimática fue catalizado por *Lipasa Pancreática Porcina* (PPL) empleando diferentes disolventes, además se realizaron procesos de polimerización con y sin tamiz molecular, esto con la finalidad de comprobar si el agua afecta tanto en el rendimiento de reacción como en el porcentaje de conversión del monómero, en el proceso de síntesis también se estudió la influencia del tiempo y la temperatura sobre el peso molecular promedio y el rendimiento de reacción, dejando como resultado que a mayores tiempos y temperaturas altas de reacción la policondensación es mejorada, por tanto, pesos moleculares elevados son obtenidos del poliéster respectivo; de acuerdo al estudio de síntesis realizado Shuai (1999b) *et al.*, llegaron a la conclusión de que el disolvente ideal para el proceso de polimerización era el hexano, ya que favorece el proceso de eliminación del agua y su evaporación necesita menor gasto energético, la temperatura de 55°C fue la seleccionada como óptima ya que se obtuvieron buenos rendimientos del poliéster, además de que mejora la policondensación del ácido 3-hidroxi-butirico y ácido-12-hidroxidodecanoico aumentando la posibilidad de ciclación. Debido a que es catálisis enzimática, la participación en la producción del poliéster de la PPL notablemente favorece la policondensación de los grupos terminales hidroxilo y carboxilo además el efecto de usar lipasa disminuye la energía de activación necesaria para la esterificación de los grupos terminales, de ahí que los polímeros obtenidos de (3-HBA) y de (12-HDA) dejaron como resultado pesos moleculares promedio  $\bar{M}_n = 660$  y  $\bar{M}_n = 1200$  respectivamente, lo novedoso del trabajo es que en estudios anteriores la poliesterificación con esta lipasa y en este tipo de disolvente no era para nada posible por la baja reactividad de los productos iniciales.

En el año 2000 se publicó la síntesis de poliésteres alifáticos a partir de policondensación de ácidos dicarboxílicos y glicoles, lo interesante del trabajo es que la polimerización es llevada a cabo en sistemas libres de disolvente. Para la experimentación se emplearon diferentes tipos de lipasas (*MM*, *PC*, *PF*, *PPL* y *CA*) con el objetivo de observar que tipo de lipasa favorecía la esterificación de mejor manera con la particularidad de una sistema libre de disolventes, también se realizó el estudio de los efectos de las condiciones de reacción (Temperatura y

tiempo); la lipasa *CA* fue la enzima que arrojó los mejores resultados en cuanto a rendimiento y peso molecular promedio (56% y  $M_n = 3800$  respectivamente) además en lo relacionado con las condiciones de reacción el tiempo y temperatura a la cual se obtuvo ese rendimiento y peso molecular fue de 8 h y 60°C, de ahí en más se marcó un inicio en la síntesis enzimática de polímeros teniendo en cuenta conceptos de química verde relacionado con los medios benignos de reacción, de este modo provee un acercamiento inicial a la Química verde de polímeros. (Hiroshi Uyama *et al.*, 2000)

### POLIMERIZACIÓN POR APERTURA DE ANILLO.



Esquema 3. Reacción general de polimerización por apertura de anillo de lactona.

La polimerización de lactonas catalizada por lipasas ha sido ampliamente estudiada, en general, la reacción produce tanto productos lineares como cíclicos. Entre los primeros en experimentar con esta síntesis se encuentran Uyama, H. & Kobayashi, S. (1993) quienes realizaron la síntesis enzimática de polímeros a partir de  $\epsilon$ -caprolactona y  $\delta$ -valerolactona, en la cual probaron 3 lipasas: *Pseudomonas fluorescens* (*PF*), PPL y Lipasa *CC*, la reacción se llevó a cabo exitosamente en bulk a 60°C por 10 días, entre las lipasas utilizadas la mejor conversión para la  $\epsilon$ -caprolactona se obtuvo con *Pseudomonas fluorescens*, la cual produjo un polímero de ( $\bar{M}_n$ )  $\bar{M}_n = 7000$ , la  $\delta$ -valerolactona también se polimeriza en estas condiciones con una mayor conversión pero menor peso molecular en el producto.

Otras lactonas de con anillos de entre 4 y 16 miembros también fueron estudiadas y polimerizadas con condiciones suaves por diferentes autores en los años subsecuentes (Shuhei Namekawa *et al.*, 1996; Suichi Matsumura *et al.*, 1996), las lipasas de la familia *Pseudomonas* permitieron observar que los sustratos de menor tensión en el anillo fueron polimerizados con mejores resultados. En la síntesis en bulk de poly( $\beta$ -propiolactona) con Lipasa *CC* se logró obtener un polímero de  $\bar{M}_w = 5000$ .

Otra síntesis que llamó la atención de la comunidad científica fue la polimerización de  $\beta$ -butirolactona puesto que esta produce poly( $\beta$ -hidroxibutirato) (PHB), en algunos organismos el PHB se sintetiza *in vivo* y se emplea como una sustancia de almacenamiento de energía. La síntesis en bulk de

PHB catalizada por PPL a temperatura ambiente produjo un polímero de  $\bar{M}_w = 1000$ , mientras que a temperatura más altas se obtuvieron pesos moleculares mayores con lipasa CC y lipasa PF. (Geoffrey AR Nobes *et al.*, 1996; Huan Dong *et al.*, 1998).

Suichi Matsumura *et al.* (1996), realizaron la síntesis de poly(ácido málico) a partir de bencil- $\beta$ -malolactona catalizado con PPL y Novozym®435, esto es importante debido a la naturaleza biodegradable del poly(ácido málico) que lo hace útil en industria y farmacia. La reacción se llevó a cabo primero por vía enzimática para obtener poly (bencil  $\beta$ -malato) (PBM), acto seguido, mediante hidrogenación catalítica se obtuvo el poly(ácido málico). El peso molecular máximo obtenido fue  $\bar{M}_w = 7000$  independientemente de la enzima utilizada, mientras que el mejor rendimiento se obtuvo con PPL. 3 años más tarde se mejoró la síntesis al añadir  $\beta$ -propiolactona en 17% mol con respecto al monómero obteniendo un nuevo copolímero con  $\bar{M}_w = 32000$  (Suichi Matsumura *et al.*, 1999).

Un año después, se utilizó lipasa CA y lipasa PF para la polimerización de lactonas de 6, 11 y 12 miembros con la consideración de que en esta ocasión las lipasas fueron inmovilizadas, la lipasa CA inmovilizada se consigue comercialmente como Novozym-435 y la lipasa PF fue inmovilizada previamente en zeolitas lo cual permitió que se usara sólo un 1% p/p de enzima comparado con valores que alcanzan el 50% usados en la síntesis con enzimas libres, esta síntesis permitió formar polímeros de hasta  $\bar{M}_n = 7000$ . Adicionalmente, se demostró que la polimerización se mejora en presencia de pequeñas cantidades de 1-octanol aumentando la velocidad de conversión hasta en 4 veces (Hiroshi Uyama *et al.*, 1997). En un estudio similar se notó que la polimerización alcanza mayores pesos moleculares y produce mayor cantidad de polímero lineal cuando se hace en bulk, mientras que la polimerización en disolventes orgánicos produjo principalmente oligómeros cíclicos (Córdova *et al.*, 1998).

Otra molécula de interés polimerizada exitosamente mediante lipasas es la 1,2-dioxan-2-ona, el polímero que se obtiene se conoce como PDO poly-(1,2-dioxan-2-ona), este presenta buenas propiedades físicas y su biocompatibilidad lo hace un candidato para uso en suturas quirúrgicas, pero además puede ser utilizado en películas, recubrimientos, adhesivos, entre otros. El peso molecular más alto alcanzado en la síntesis con Lipasa CA fue de  $\bar{M}_w = 41000$  (Nishida *et al.*, 2000).

Investigadores de la Universidad de Kioto sintetizaron copolímeros de lactonas, diésteres y dioles con lipasa CA y lipasa PF (Namekawa *et al.*, 2000). El objetivo de

este ensayo fue determinar si diferentes tipos de polimerización, en este caso, polimerización por apertura de anillo de lactona y policondensación podían llevarse a cabo en un mismo recipiente, el producto de reacción no fue una mezcla de homopolímeros, sino, un copolímero que incluía a todos los monómeros indicando que los 2 tipos de polimerización enzimática se desarrollaron simultáneamente.

Bisht *et al.* (1998), desarrollaron la polimerización de  $\epsilon$ -caprolactona y trimetilencarbonato (TMC) con el iniciador multifuncional etilglucopiranosido, la síntesis se realizó en bulk, a 70°C por entre 48 y 96 h, el producto obtenido fue un poliéster amifílico cuya porción glucosídica se unió regioselectivamente por el grupo hidroxilo primario sin necesidad de protección/desprotección. Este tipo de moléculas son atractivas para la síntesis de surfactantes biodegradables.

La polimerización por apertura de anillo de lactida catalizada por lipasa PS inmovilizada en zeolita y Novozym-435 se llevó a cabo alcanzando pesos moleculares de  $\bar{M}_w = 270000$  y  $\bar{M}_n = 126000$  respectivamente (Matsumura *et al.*, 1997, 1998). También se pudo ver que la polimerización tiene mejores resultados cuando se utiliza la D,L-lactida comparado con los otros enantiómeros. En el mismo estudio se investigó en la hidrólisis del PLA formado con diferentes enzimas, pero no se encontró una relación directa entre el tipo de enzima, la degradabilidad y la polimerización enzimática.

## LIPASAS COMERCIALES

La investigación en síntesis enzimática de polímeros se vio considerablemente mejorada por la masificación en la producción de lipasas, actualmente se cuenta con un buen número de lipasas, de fuentes diferentes, que están disponibles en el mercado (ver tabla 1). Esto hizo posible que diferentes investigadores alrededor del mundo incurrieran en el campo de la síntesis enzimática de polímeros y se abrió la puerta para la investigación en nuevos métodos, el uso de diferentes sustratos y por consiguiente nuevas aplicaciones para estos materiales.

Si lo que se desea es ver la aplicación de estas lipasas en síntesis de polímeros, un resumen detallado de condiciones de reacción, sustratos y resultados se puede encontrar en (Gross *et al.*, 2010).

## CONCEPTOS NUEVOS Y QUÍMICA VERDE DE POLÍMEROS.

La química verde de polímeros se basa en 3 principios, **1)** Uso de materiales de partida renovables, **2)** métodos

**Tabla 1.** Algunas de las lipasas disponibles en el mercado y sus aplicaciones.

Enzima	Estado	Actividad	Aplicación
Lipasa de Páncreas Porcino (PPL)	Polvo Liofilizado	$\geq 20.000$ U/mg	Son usadas industrialmente para la resolución de compuestos quirales y la transesterificación para la producción de biodiesel
	Cake	100-500 U/mg	Análisis de ácidos grasos en la posición 2 de triacilglicéridos. Determinación de la fracción indigerible de la fuente vegetal que es resistente a la acción de enzimas digestivas. Como un componente de medio de disolución para el estudio de perfiles de disolución de teofilina.
Lipasa de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (PF)	Polvo Fino	$\sim 40$ U/mg	Se utiliza para estudiar la actividad de la lipasa en medios con restricción de agua, además de estudiar la inactivación de la enzima.
	Inmovilizada (Immobead 150)	$\geq 600$ U/mg	Es usada comúnmente en la industria farmacéutica para resolución de compuestos quirales.
	Inmovilizada (Sol-Gel-AK)	$\geq 30$ U/g	
Lipasa de <i>Aspergillus niger</i>	Polvo fino	$\sim 200$ U/g	Policondensación de $\alpha$ -hidroxiácidos
Lipasa de <i>Candida antártica</i> (CA)	Polvo liofilizado	$\sim 0,3$ U/mg	Catalizan una amplia variedad de reacciones orgánicas incluyendo síntesis de productos quirales.
	Inmovilizada (Perlas)	$> 2$ U/mg	
Lipasa A de <i>Candida antártica</i>	Polvo	$\sim 2$ U/mg	Se emplea como un activador facial en reacciones de síntesis orgánica.
	Inmovilizada (Immobead 150)	$> 2$ U/g	
Lipasa B de <i>Candida antártica</i>	Polvo	$\sim 9$ U/mg	Cataliza la síntesis de ésteres de D-glucopiranosido de etilo a partir de ácidos grasos de cadena carbonada mayor a 8.
	Inmovilizada	$\geq 2000$ U/g	Se emplea comúnmente en reacción de polimerización.
Lipasa de <i>Candida rugosa</i>	Polvo liofilizado	$\geq 40000$ U/mg	Se emplea para catalizar la síntesis de esteres de sabor usados en la mejora de alimentos.
	Inmovilizada (Immobead 150)	$\geq 100$ U/g	Se ha utilizado para evaluar la influencia de la segregación de fases sobre la actividad hidrolítica enzimática.
Lipasa de <i>Candida cylindracea</i> (CC)	Inmovilizada (Sol-Gel-AK)		Recomendada para reacciones de esterificación.
Lipasa de <i>Chromobacterium viscosum</i>	Polvo	$\geq 2.500$ U/mg	Cataliza la hidrólisis de triglicéridos a glicerol y ácidos grasos.
Lipasa de <i>Mucor Meihei</i> (MM)	Polvo liofilizado	$\geq 4.000$ U/mg	Se ha utilizado para evaluar el de efecto no térmico de la radiación de microondas en la esterificación enzimática no acuosa.
Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> (PC)	Polvo	$\geq 30$ U/mg	Comúnmente empleada en la producción de biodiesel mediante transesterificación.
	Inmovilizada (Immobead 150)	$\geq 900$ U/g	

de síntesis verdes y **3**) biodegradabilidad en productos de reacción (Kobayashi, 2017).

Entre los métodos verdes de síntesis se encuentra, por supuesto, la síntesis enzimática catalizada por lipasas, diferentes sustratos son susceptibles a ser polimerizados como se vio en la sección anterior. Dentro de las fuentes renovables de sustratos encontramos la celulosa, almidón, aceites vegetales, residuos industriales de origen vegetal o alimentario, entre otras.

Entre los sustratos más utilizados se encuentra el sorbitol, el cual se obtiene por hidrólisis de celulosa o almidón seguido de una hidrogenación para convertir la glucosa en sorbitol, entre los autores que han utilizado este sustrato resaltan los trabajos de (Fu *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2003) quienes realizaron la síntesis de polímeros de sorbitol y 1,8-octanodiol con ácido adípico, por 48 h, en bulk, con vacío y a 90°C. Se observó que al variar la relación sorbitol:1,8-octanodiol del 0 al 100% se obtuvo polímeros con propiedades físicas diferentes, los pesos moleculares superan en todos los casos los  $\bar{M}_n = 7000$  y con excepción del polímero con 100% de sorbitol (PSorA) son semicristalinos, el PSorA es amorfo, el punto de fusión decrece al aumentar la cantidad de Sorbitol en los polímeros.

Una aplicación de este tipo de materiales se puede ver en (Gustini *et al.* (2015), quienes sintetizaron polímeros de sorbitol, 1,10-decanodiol con diferentes diácidos para obtener polímeros con pesos moleculares entre 4 y 7 Kg/mol, además observaron que estos materiales tenían propiedades adecuadas como resinas de revestimiento, para esto modificaron el polímero con di- y poliisocianatos obteniendo un poliuretano con buena resistencia a los disolventes y buenas propiedades mecánicas.

El ácido furan-2,5-dicarboxílico (FDCA) es otro derivado de interés ya que puede reemplazar al ácido tereftálico en la síntesis de poliésteres (Moreau *et al.*, 2004). Este derivado se obtiene usualmente a partir de Fructosa que se convierte por deshidratación en diferentes disolventes en hidroximetilfurfural, el HMF se convierte vía oxidación catalítica en (FDCA).

El glicerol, actualmente, debido a la alta demanda de biocombustibles y a la expansión del mercado del biodiesel (de los cuales es un subproducto) se ha convertido en una materia prima de costo mínimo, y su versatilidad hace que pueda utilizarse en síntesis de polímeros en su estado normal o con modificaciones químicas previas como su bioconversión en 1,3-propanodiol (43), otro derivado del glicerol, el ácido glicólico, produce productos análogos al PLA, y cuando se usa en conjun-

to con ácido láctico para la síntesis de PLGA empleando Novozym 435 se sintetizan copolímeros con alto peso molecular ( $\bar{M}_n = 44800$  g/mol) aptos para aplicaciones biomédicas (Lassalle *et al.*, 2008).

El ácido láctico es una molécula comercialmente producida por fermentación de glucosa con microorganismos, su principal uso es la producción del Ácido poliláctico (PLA), este material posee propiedades mecánicas similares y superiores en algunos aspectos al poliestireno y su utilidad en el almacenamiento de alimentos es comparable a la del tereftalato de polietileno (PET), una caracterización detallada de este material fue realizada en Vink *et al.*, 2003.

El ácido succínico se puede obtener mediante fermentación de glucosa por microorganismos recombinados *E. coli* y ha sido empleado en la síntesis de polímeros por metodología química convencional con isosorbida, donde se obtuvo polímeros ramificados de peso molecular  $\bar{M}_n = 2500$  g/mol. (Noordover *et al.*, 2006)

También en años recientes se han hecho ensayos de polimerización utilizando lipasas en conjunto con ultrasonido. Tomke *et al.* (2017), sintetizó exitosamente poli-etilenglutarato, polietilenmalonato y polietilénftalato en condiciones libres de disolvente. El proceso consta de 2 periodos de sonicación de 0.5 h a 100W y 53kHz precedidos de 3 h de baño maría para obtener en el mejor de los ensayos se alcanzó un grado de polimerización de 7. Una tabla detallada de las reacciones, sustratos y condiciones para síntesis asistida por lipasas y ultrasonido se puede encontrar en (Bansode & Rathod, 2017).

Métodos quimioenzimáticos añaden las ventajas de la síntesis química tradicional al permitir construir materiales poliméricos con una estructura deseada específica (polímeros block, brush, comb y graft). Los polímeros sintetizados por vía enzimática poseen buenas características en cuanto a biodegradabilidad y biocompatibilidad, la combinación con métodos químicos mejora la complejidad macromolecular de los materiales y amplía el grupo de productos posibles (Yang *et al.*, 2014).

## CONCLUSIONES

La síntesis enzimática de polímeros es un área reciente de la química de polímeros y que, debido a sus ventajas en cuanto a facilidad de reacción, condiciones suaves, selectividad, inocuidad y facilidad en la recuperación y reutilización del catalizador se ha convertido en una herramienta fuerte en la síntesis de polímeros amigables con el medio ambiente.



La gran versatilidad de estas reacciones nos ha dejado una gran gama de nuevos materiales que aún están siendo estudiados para diferentes y variadas aplicaciones.

A futuro se tienen como retos mejorar ciertos aspectos de la síntesis para llevarla a una escala mayor, como reducir la cantidad de enzima empleada, lo cual ayudaría en particular a separar el catalizador en reacciones con un medio de reacción altamente viscoso, desarrollar catalizadores (enzimas inmovilizadas) que sean aptos para los diferentes procesos y dispositivos a escala industrial y la búsqueda nuevas enzimas que permitan emplear diferentes monómeros o mejorar propiedades específicas como la estabilidad térmica a altas temperaturas y la resistencia a disolventes.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las Universidades del Cauca e ICESI y al semillero del Grupo de Investigación en Química de Productos Naturales, por la infraestructura, para el desarrollo del documento.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, E. H., Raghavendra, T., & Madamwar, D. (2010). An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter* sp. EH28: Application for ethyl caprylate synthesis. *Bioresource Technology*, 101(10), 3628-3634. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.107>.
- Ajima, A., Yoshimoto, T., Takahashi, K., Tamaura, Y., Saito, Y., & Inada, Y. (1985). Polymerization of 10-hydroxydecanoic acid in benzene with polyethylene glycol-modified lipase. *Biotechnology Letters*, 7(5), 303-306.
- Bansode, S. R., & Rathod, V. K. (2017). An investigation of lipase catalysed sonochemical synthesis: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 503-529. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.02.028>
- Binns, F., Roberts, S. M., Taylor, A., & Williams, C. F. (1993). Enzymic polymerisation of an unactivated diol/diacid system. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (8), 899-904.
- Bisht, K. S., Deng, F., Gross, R. A., Kaplan, D. L., & Swift, G. (1998). Ethyl glucoside as a multifunctional initiator for enzyme-catalyzed regioselective lactone ring-opening polymerization. *Journal of the American Chemical Society*, 120(7), 1363-1367.
- Córdova, A., Iversen, T., Hult, K., & Martinelle, M. (1998). Lipase-catalysed formation of macrocycles by ring-opening polymerisation of  $\epsilon$ -caprolactone. *Polymer*, 39(25), 6519-6524.
- De Lourdes Moreno, M., García, M. T., Ventosa, A., & Mellado, E. (2009). Characterization of *Salicola* sp. IC10, a lipase- and protease-producing extreme halophile: Hydrolytic enzymes from extreme halophiles. *FEMS Microbiology Ecology*, 68(1), 59-71. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00651.x>
- Ferreira Matheus M., Santiago Fernanda L.B., Da Silva N´adia A.G., Luiz Jaine H.H., Fernandez-Lafuente Roberto, Mendes Adriano A., Hirata Daniela B., (2018). Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: kinetic and thermodynamic studies. *Process Biochemistry*, 67, 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.028>
- Fickers, P., Marty, A., & Nicaud, J. M. (2011). The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 29(6), 632-644. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.005>
- Fu, H., Kulshrestha, A. S., Gao, W., Gross, R. A., Baiardo, M., & Scandola, M. (2003). Physical Characterization of Sorbitol or Glycerol Containing Aliphatic Copolyesters Synthesized by Lipase-Catalyzed Polymerization. *Macromolecules*, 36(26), 9804-9808. <https://doi.org/10.1021/ma035129i>.
- Geoffrey AR Nobes, Romas J. Kazlauskas, & Robert H. Marchessault. (1996). Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of lactones: a novel route to poly(hydroxyalkanoate)s. *Macromolecules*, 29(14), 4829-4833.
- Gross, R. A., Ganesh, M., & Lu, W. (2010). Enzyme-catalysis breathes new life into polyester condensation polymerizations. *Trends in Biotechnology*, 28(8), 435-443. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.05.004>.
- Gross, R. A., Kumar, A., & Kalra, B. (2001). Polymer Synthesis by *In Vitro* Enzyme Catalysis. *Chemical Reviews*, 101(7), 2097-2124. <https://doi.org/10.1021/cr0002590>.
- Gustini, L., Noordover, B. A. J., Gehrels, C., Dietz, C., & Koning, C. E. (2015). Enzymatic synthesis and preliminary evaluation as coating of sorbitol-based, hydroxy-functional polyesters with controlled molecular weights. *European Polymer Journal*, 67, 459-475. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.12.025>.
- Hiroshi Uyama, Kojiro Inada, & Shiro Kobayashi. (2000). Lipase Catalyzed Synthesis of Aliphatic Polyesters by Polycondensation of Dicarboxylic Acids and Glycols in Solvent-Free System. *Polymer Journal*, 32(5), 440-443.
- Hiroshi Uyama, Sakae Suda, Hirofumi Kikuchi, & Shiro Kobayashi. (1997). Extremely Efficient Catalysis of Immobilized Lipase in Ring-opening Polymerization of Lactones. *Chemistry Letters*, 1109-1110.
- Horchani, H., Aissa, I., Ouertani, S., Zarai, Z., Gargouri, Y., & Sayari, A. (2012). Staphylococcal lipases: Biotechnological applications. *Journal of Molecular Catal-*

- ysis *B: Enzymatic*, 76, 125-132. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.11.018>.
- Huan Dong, Zhi Wang, Zheng-Qiang Li, De-Lin You, Si-Ping Han, Shu-Gui Cao, & Jia-Cong Shen. (1998). Enzyme-Catalyzed Synthesis of Polyester: Effect of the Microenvironment of Enzyme on Polyesterification. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 864, 263.
- Knani, D., Gutman, A. L., & Kohn, D. H. (1993). Enzymatic polyesterification in organic media. Enzyme-catalyzed synthesis of linear polyesters. I. Condensation polymerization of linear hydroxyesters. II. Ring-opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 31(5), 1221-1232.
- Kobayashi, S. (2017). Green polymer chemistry: new methods of polymer synthesis using renewable starting materials. *Structural Chemistry*, 28(2), 461-474. <https://doi.org/10.1007/s11224-016-0861-3>.
- Kumar, A., Kulshrestha, A. S., Gao, W., & Gross, R. A. (2003). Versatile Route to Polyol Polyesters by Lipase Catalysis. *Macromolecules*, 36(22), 8219-8221. <https://doi.org/10.1021/ma0351827>.
- Lassalle, V., Galland, G. B., & Ferreira, M. L. (2008). Lipase-catalyzed copolymerization of lactic and glycolic acid with potential as drug delivery devices. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31(5), 499-508. <https://doi.org/10.1007/s00449-007-0188-y>.
- Li, X., & Yu, H.-Y. (2014). Characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Haloarcula* sp. G41 and its application for biodiesel production. *Folia Microbiologica*, 59(6), 455-463. <https://doi.org/10.1007/s12223-014-0320-8>.
- Liu, Y.-Y., Xu, J.-H., Xu, Q.-G., & Hu, Y. (1999). Significant enhancement of lipase enantioselectivity toward (S)-ketoprofen ester at pH 2. *Biotechnology letters*, 21(2), 143-146.
- Mander, P., Cho, S. S., Simkhada, J. R., Choi, Y. H., Park, D. J., Ha, J. W., & Yoo, J. C. (2012). An organic solvent-tolerant alkaline lipase from *Streptomyces* sp. CS268 and its application in biodiesel production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17(1), 67-75. <https://doi.org/10.1007/s12257-011-0347-5>.
- Matsumura, S., Mabuchi, K., & Toshima, K. (1997). Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of lactide. *Macromolecular Rapid Communications*, 18(6), 477-482.
- Matsumura, S., Mabuchi, K., & Toshima, K. (1998). Novel ring-opening polymerization of lactide by lipase. In *Macromolecular Symposia* (Vol. 130, pp. 285-304). Wiley Online Library.
- Matsumura, S., & Takahashi, J. (1986). Enzymatic synthesis of functional oligomers, 1 lipase catalyzed polymerization of hydroxy acids. *Macromolecular Rapid Communications*, 7(6), 369-373.
- Mhetras, N., Patil, S., & Gokhale, D. (2010). Lipase of *Aspergillus niger* NCIM 1207: A Potential Biocatalyst for Synthesis of Isoamyl Acetate. *Indian Journal of Microbiology*, 50(4), 432-437. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0087-4>.
- Miranda Jéssica S., Silva Natália C.A., Bassi Jaqueline J., Corradini Maria C.C. Co, Lage Flávia A.P., Hirata Daniela B., Mendes Adriano A., (2014). Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on mesoporous poly-hydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis: Isotherm, thermodynamic and mass transfer studies. *Chemical Engineering Journal*, 251, 392-403. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.04.087>.
- Moreau, C., Belgacem, M. N., & Gandini, A. (2004). Recent catalytic advances in the chemistry of substituted furans from carbohydrates and in the ensuing polymers. *Topics in Catalysis*, 27(1), 11-30.
- Namekawa, S., Uyama, H., & Kobayashi, S. (2000). Enzymatic Synthesis of Polyesters from Lactones, Dicarboxylic Acid Divinyl Esters, and Glycols through Combination of Ring-Opening Polymerization and Polycondensation. *Biomacromolecules*, 1(3), 335-338. <https://doi.org/10.1021/bm000030u>.
- Nishida, H., Yamashita, M., Nagashima, M., Endo, T., & Tokiwa, Y. (2000). Synthesis of metal-free poly (1, 4-dioxan-2-one) by enzyme-catalyzed ring-opening polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 38(9), 1560-1567.
- Noll, O., & Ritter, H. (1996). Enzymes in polymer chemistry, 9. Polymerizable oligoesters from cholic acid via lipase catalyzed condensation reactions. *Macromolecular Rapid Communications*, 17(8), 553-557.
- Noll, O., & Ritter, H. (1997). New side-chain poly (methacryl-rotaxanes) bearing cyclodextrins as non-covalently anchored ring components. Chemoenzymatic synthesis and degradation. *Macromolecular Rapid Communications*, 18(1), 53-58.
- Noordover, B. A., van Staalduinen, V. G., Duchateau, R., Koning, C. E., van Benthem, R. A., Mak, M., ... van Haveren, J. (2006). Co-and terpolyesters based on isosorbide and succinic acid for coating applications: synthesis and characterization. *Biomacromolecules*, 7(12), 3406-3416.
- O'Hagan, D., & Parker, A. H. (1998). Enzyme mediated polyester synthesis with the lipase from *Candida rugosa* Preparation of an enantiomerically enriched polymer from an AB monomer. *Polymer Bulletin*, 41(5), 519-524.
- O'Hagan, D., & Zaidi, N. A. (1993). Polymerisation of 10-hydroxydecanoic acid with the lipase from *Candida cylindracea*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (20), 2389-2390.

- O'Hagan, D., & Zaidi, N. A. (1994). Enzyme-catalysed condensation polymerization of 11-hydroxyundecanoic acid with lipase from *Candida cylindracea*. *Polymer*, *35*(16), 3576–3578.
- Ohya, Y., Sugitou, T., & Ouchi, T. (1995). Polycondensation of  $\alpha$ -Hydroxy Acids by Enzymes or PEG-Modified Enzymes in Organic Media. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, *32*(2), 179-190. <https://doi.org/10.1080/10601329508011155>.
- Park Kyung-Min, Lee Da Eun, Sung Ho, Lee JaeHwan, Chang Pahn-Shick. (2011). Lipase-catalysed synthesis of erythorbyl laurate in acetonitrile. *Food Chemistry*, *129*, 59-63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.03.021>.
- Pérez, D., Martín, S., Fernández-Lorente, G., Filice, M., Guisán, J. M., Ventosa, A., ... Mellado, E. (2011). A Novel Halophilic Lipase, LipBL, Showing High Efficiency in the Production of Eicosapentaenoic Acid (EPA). *PLoS ONE*, *6*(8), e23325. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023325>.
- Piotrowska Urszula & Sobczak Marcin. (2015). Enzymatic Polymerization of Cyclic Monomers in Ionic Liquids as a Prospective Synthesis Method for Polyesters Used in Drug Delivery Systems. *Molecules*, *20*, 1-23, <https://doi:10.3390/molecules20010001>.
- Romdhane, I. B.-B., Fendri, A., Gargouri, Y., Gargouri, A., & Belghith, H. (2010). A novel thermoactive and alkaline lipase from *Talaromyces thermophilus* fungus for use in laundry detergents. *Biochemical Engineering Journal*, *53*(1), 112-120. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.10.002>.
- Salihua, A., & Alama, M. Z. (2015). Solvent tolerant lipases: A review. *Process Biochemistry*, *50*(1), 86-96. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.019>
- Shuai, X., Jedlinski, Z., Kowalczyk, M., Rydz, J., & Tan, H. (1999a). Enzymatic synthesis of polyesters from hydroxyl acids. *European Polymer Journal*, *35*(4), 721–725.
- Shuai, X., Jedlinski, Z., Kowalczyk, M., Rydz, J., & Tan, H. (1999b). Enzymatic synthesis of polyesters from hydroxyl acids. *European Polymer Journal*, *35*(4), 721–725.
- Shuhei Namekawa, Shiro Kobayashi, & Hiroshi Uyama. (1996). Lipase-Catalyzed Ring-Opening Polymerization and Copolymerization of  $\beta$ -propiolactone. *Polymer Journal*, *28*(8), 730-731.
- Suichi Matsumura, Hideki Beppu, & Kazonobu Toshima. (1999). Enzymatic Preparation of Malate-Based Polycarboxylates Having Higher Molecular Weights by Copolymerization with Lactone. *Chemistry Letters*, 249-250.
- Suichi Matsumura, Hideki Beppu, Kazuhiro Nakamura, Suichi Osanai, & Kazonobu Toshima. (1996). Preparation of Poly ( $\beta$ -malic acid) by Enzymatic Ring-Opening Polymerization of  $\beta$ -malolactonate. *Chemistry Letters*, *25*, 795-796.
- Suichi Matsumura, Hideki Beppu, Keisuke Tsukada, & Kazonobu Toshima. (1996). Enzyme-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of  $\beta$ -propiolactone. *Biotechnology Letters*, 1041-1046.
- Sususmo Okumura, Mieko Iwai, & Yoshio Tsujisaka. (1983). Synthesis of Estolides During Hydrolysis of Castor Oil by *Geotrichum candidum* Lipase. *Yakagaku (Journal of Japan Oil Chemists Society)*, *32*, 271-273.
- Tomke, P. D., Zhao, X., Chiplunkar, P. P., Xu, B., Wang, H., Silva, C., ... Cavaco-Paulo, A. (2017). Lipase-ultrasound assisted synthesis of polyesters. *Ultrasonics Sonochemistry*, *38*, 496-502. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.051>
- Uyama, H., & Kobayashi, S. (1993). Enzymatic Ring-Opening Polymerization of lactones Catalyzed by lipase. *Chemistry Letters*, 1149-1150.
- Van Kempen Silvia E.H.J., Boeriu Carmen G., Schols Henk A., De Waard Pieter, Van der Linden Erik, Sagis Leonard M.C., (2012). Novel surface-active oligofructose fatty acid mono-esters by enzymatic Esterification. *Food Chemistry*, *138*, 1884–1891. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.09.133.
- Vink, E. T. H., Rábago, K. R., Glassner, D. A., & Gruber, P. R. (2003). Applications of life cycle assessment to NatureWorks™ polylactide (PLA) production. *Polymer Degradation and Stability*, *80*(3), 403-419. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(02\)00372-5](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(02)00372-5).
- Wallace, J. S., & Morrow, C. J. (1989a). Biocatalytic synthesis of polymers. II. Preparation of [AA–BB] x polyesters by porcine pancreatic lipase catalyzed transesterification in anhydrous, low polarity organic solvents. *Journal of Polymer Science. Part A: Polymer Chemistry*, *27*(10), 3271–3284.
- Wallace, J. S., & Morrow, C. J. (1989b). Biocatalytic synthesis of polymers. Synthesis of an optically active, epoxy-substituted polyester by lipase-catalyzed polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, *27*(8), 2553–2567.
- Yang, Y., Zhang, J., Wu, D., Xing, Z., Zhou, Y., Shi, W., & Li, Q. (2014). Chemoenzymatic synthesis of polymeric materials using lipases as catalysts: A review. *Biotechnology Advances*, *32*(3), 642-651. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.011>.
- Yoo, H.-Y., Simkhada, J. R., Cho, S. S., Park, D. H., Kim, S. W., Seong, C. N., & Yoo, J. C. (2011). A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production. *Bioresource Technology*, *102* (10), 6104-6111. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.046>