

Estudio de la polimerización de la ϵ -caprolactona (CL) por MALDI-TOF



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Adrián Carrillo Caro

Grado en Química

Trabajo de Fin de Grado

2019-2020

Tutorizado per Juan Carlos Ronda Bargalló

Índice

1. Resumen	4
Abstract.....	4
2. Objetivo.....	5
3. Introducción	5
4. Polímeros	6
5. Policaprolactona.....	8
5.1 Propiedades	10
5.2 Aplicaciones	11
5.3 Preparación de la PCL.....	13
5.3.1 Polimerización por apertura de anillo (ROP) de la ϵ -caprolactona.....	14
5.3.2 Polimerización radicalaria por apertura de anillo (RROP) del 2-metilen-1,3-dioxepano (MDO)	16
5.3.3 Policondensación del ácido 6-hidroxicaproico.....	17
6. Espectrometría de masas	18
6.1 Introducción.....	18
6.2 Fundamento de la técnica	19
7. MALDI-TOF	20
7.1 Introducción.....	20
7.2 Fundamento de la técnica	21
7.3 Parámetros de MALDI-TOF	23
7.3.1 Preparación de la muestra	23
7.3.1.1 Método de coprecipitación (air dried-droplet)	24
7.3.1.2 Método en capas finas (thin-layer)	24
7.3.1.3 Método en "sándwich"	25

7.3.1.4 Método de muestras libres de disolvente (solvent-free).....	25
7.3.2 Matriz.....	26
7.3.3 Agentes cationizantes.....	28
7.3.4 Analizador TOF (Time-Of-Flight).....	28
7.3.4.1 TOF en modo reflexión.....	30
7.3.5 Fuente láser.....	31
7.3.5.1 Mecanismo de ionización en UV MALDI.....	32
7.3.6 Detectores.....	34
8. Plan de trabajo.....	35
8.1 Selección de los diferentes parámetros de trabajo.....	35
8.1.1 Preparación de la PCL.....	35
8.1.1.1 Mecanismo de polimerización.....	35
8.1.1.2 Catalizador.....	35
8.1.1.3 Iniciador.....	37
8.1.2 Análisis de las muestras por MALDI-TOF.....	37
8.1.2.1 Tipo de fuente láser.....	37
8.1.2.2 Matriz de ionización.....	37
8.1.2.3 Agente cationizante.....	38
8.1.2.4 Disolvente para la preparación de la muestra.....	39
8.2 Propuesta de procedimiento experimental.....	39
8.2.1 Reactivos.....	39
8.2.2 Síntesis de PCL.....	40
8.2.3 Preparación de la muestra para análisis MALDI.....	40
8.2.4 Análisis MALDI-TOF.....	41
9. Conclusiones.....	45
10. Bibliografía.....	47

1. Resumen

Este proyecto comprende un estudio sobre la policaprolactona (PCL), un poliéster que destaca por sus excelentes propiedades físicas y químicas y sobre todo por su biodegradabilidad. Este conjunto de propiedades permite una gran diversidad de aplicaciones en diferentes campos, especialmente en bioingeniería. Se consideran también los diferentes métodos de preparación del polímero mediante apertura de anillo (ROP), apertura de anillo radicalaria (RROP) y policondensación.

Por otra parte, se considera la técnica de análisis de MALDI-TOF, la cual resulta especialmente indicada para el análisis de polímeros gracias a su débil grado de ionización que reduce notablemente la fragmentación de las macromoléculas. En este apartado se describen las diferentes variables que influyen en registro del espectro como son: la preparación de muestra, la matriz y los agentes cationizantes, el tipo de detector y de fuente láser...etc.

Finalmente, se propone un plan de trabajo que consiste en el estudio de la polimerización ROP de la ϵ -caprolactona (CL) en función de diferentes variables de reacción (temperatura, relación monómero/iniciador/catalizador tiempo de reacción, etc.) utilizando el octanoato estano (Sn(Oct)₂) como catalizador y la técnica de UV-MALDI-TOF para la caracterización estructural de los polímeros obtenidos.

Abstract

This project focuses on polycaprolactone (PCL), a polyester that stands out for its excellent physical and chemical properties and, above all, for its biodegradability. This set of properties allows a great diversity of applications in different fields, especially in bioengineering. The different methods of preparing the polymer by means of ring opening (ROP), radical ring opening (RROP) and polycondensation are also considered.

On the other hand, the MALDI-TOF analysis technique is considered, which is especially indicated for polymers analysis due to its low degree of ionization that greatly reduces macromolecules fragmentation. This section describes the different variables that influence spectrum recording, such as: sample preparation, matrix and cationizing agents, type of detector and laser source ... etc.

Finally, a work project is proposed, consisting of the study of the ROP polymerization of ϵ -caprolactone (CL) by varying different reaction variables (temperature, monomer / initiator / catalyst reaction time, etc.) ratio of polycaprolactone (PCL) and using stannous octanoate (Sn(Oct)₂) as catalyst. UV-MALDI-TOF technique is proposed for the structural characterization of the obtained polymers.

2.Objetivo

El objetivo de este proyecto consiste en el estudio bibliográfico de los mecanismos de polimerización de la ϵ -caprolactona y del análisis de polímeros mediante la técnica de MALDI-TOF, con el fin de proponer un plan de trabajo que permita estudiar el efecto de distintas variables de polimerización, como la temperatura, tiempo de reacción y proporción entre reactivos, en las características estructurales y de peso molecular de las muestras de PCL, las cuales se caracterizarán mediante análisis MALDI-TOF.

En este sentido, se utilizarán los datos bibliográficos para seleccionar tanto los parámetros de polimerización como los de análisis de MALDI-TOF con el objetivo último de preparar muestras de PCL de elevado peso molecular y baja polidispersidad.

3.Introducción

En este proyecto se ha propuesto el estudio de la polimerización de la PCL, debido a que es un material que continúa despertando un gran interés en aplicaciones biomédicas, gracias a sus propiedades mecánicas, miscibilidad con una amplia gama de otros polímeros y biodegradabilidad.

Se propone caracterizar los polímeros resultantes mediante MALDI como técnica avanzada que permite estudiar de forma eficaz las distintas especies que se forman durante la polimerización, gracias a su técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas que permite el análisis de moléculas orgánicas grandes como son los polímeros.

Mediante el seguimiento de la polimerización por MALDI-TOF y el ajuste de las variables de la polimerización se pretende controlar las características estructurales de la PCL resultante y poder así obtener materiales con las propiedades adecuadas para su aplicación. Para ello se ha realizado un trabajo bibliográfico sobre los métodos de polimerización de la CL y sobre la técnica de MALDI-TOF como método de análisis instrumental.

4. Polímeros

En la naturaleza existen moléculas enormes llamadas macromoléculas. Estas moléculas están formadas por cientos de miles de átomos por lo que sus pesos moleculares son muy elevados.

Los polímeros son un tipo particular de macromolécula, que se caracteriza por tener una o varias unidades que se repiten a lo largo de la molécula.

Los polímeros son moléculas de gran tamaño, constituidas por “eslabones” orgánicos denominados monómeros, unidos mediante enlaces covalentes. Los eslabones están formados, fundamentalmente, por átomos de carbono y pueden poseer grupos laterales o radicales con uno o más átomos. Estas moléculas orgánicas son las que constituyen los materiales plásticos (PVC, PE, PS, etc..) que conocemos y también los tejidos de los seres vivos (piel, músculos, tela de araña, seda, etc.).

Los polímeros sintéticos se producen mediante un proceso denominado polimerización. En este proceso se produce la reacción de miles de monómeros que pasan a formar parte de una larga cadena macromolecular. La polimerización se puede describir como una reacción química sencilla que se efectúa repetidamente.

El grado de polimerización de la cadena es equivalente al número de sub-unidades o monómeros empleados para formar dicha cadena. Por ejemplo, para el polietileno el grado de polimerización puede variar de 3.500 a 25.000. ¹

Existen tres tipos de polimerización: de adición, condensación o apertura de anillo.

Adición (Figura 1): La polimerización de adición es la adición sucesiva de monómeros insaturados como los derivados vinílicos o acrílicos entre sí. La reacción de adición puede ocurrir por medio de radicales, cationes o aniones intermedios.

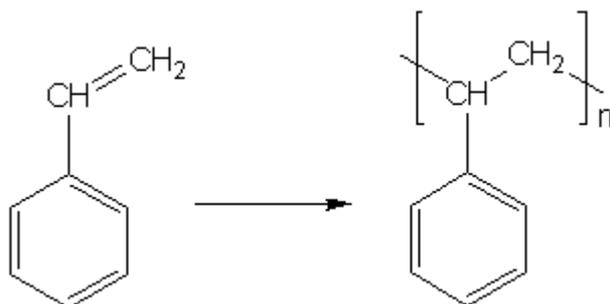


Figura 1: Síntesis del poliestireno (PE) mediante de una reacción de poliadición. ²

Condensación(Figura 2) : Los monómeros reaccionan entre ellos gracias a la condensación de grupos funcionales como los ácidos carboxílicos o sus derivados y los alcoholes o las aminas formando nuevos enlaces y liberando moléculas pequeñas como el agua .

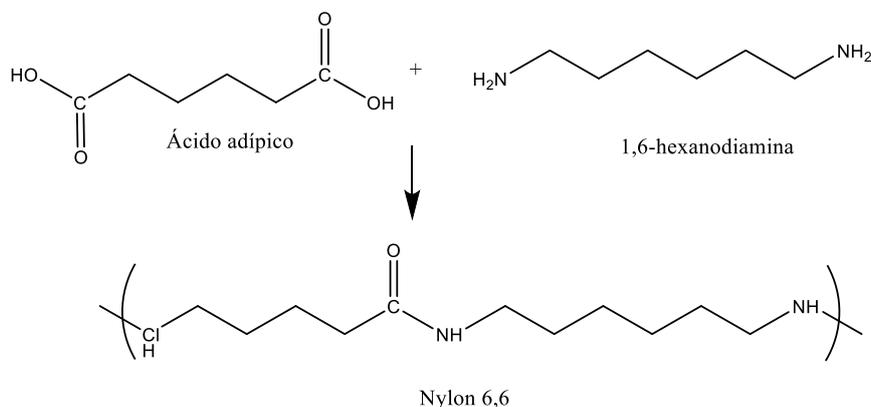


Figura 2: Síntesis del Nylon 6,6 mediante una reacción de policondensación. ²

Apertura de anillo: Parte de moléculas cíclicas con grupos funcionales y mediante de la apertura de las mismas, se llega a obtener los polímeros. Es necesario que los monómeros posean grupos funcionales que sean susceptibles al ataque nucleofílico o electrofílico por parte de aniones o cationes, los cuales actuarán como iniciadores y propiciarán la apertura del anillo. ²

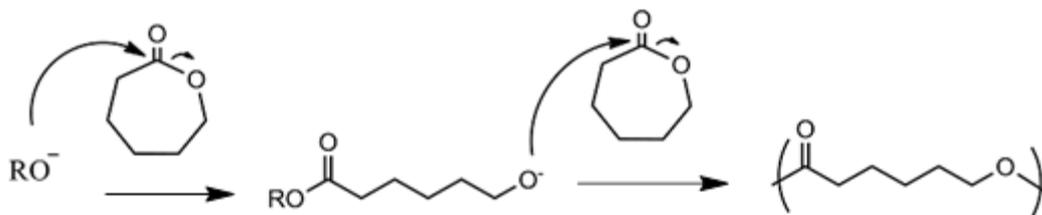


Figura 3: Síntesis de la policaprolactona (PCL) mediante una polimerización por apertura de anillo. ²

A los compuestos intermedios de bajo peso molecular se les llama oligómeros, y se pueden aislar en algunos casos.

La ϵ -policaprolactona pertenece a la familia de los poliésteres. Los poliésteres pueden ser termoplásticos o termoestables. Los poliésteres más comunes son los termoplásticos.

Los poliésteres como termoplásticos pueden cambiar de forma después de la aplicación de calor. Aunque son combustibles a altas temperaturas. Los poliésteres

tienden a encogerse en cercanía de las llamas y después del encendido se autoextinguen fácilmente al retirar la fuente de calor.

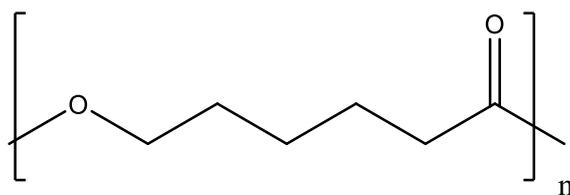
En general los poliésteres son muy resistentes a la humedad, a los productos químicos. Por su resistencia mecánica y a la tensión se usa en la fabricación de fibras, recubrimientos de láminas, envases etc. De hecho uno de los polímeros más utilizados en la fabricación de envases y fibras textiles, es un poliéster, el polietileno tereftalato (PET).

Las telas tejidas con hilo de poliéster se usan ampliamente en prendas de vestir y textil para el hogar como alfombras. Las fibras de poliéster industrial, los hilos y las cuerdas se utilizan en refuerzos de neumáticos de automóviles, tejidos para cintas transportadoras, cinturones de seguridad, tejidos recubiertos y refuerzos de plástico con alta absorción de energía.

Los poliésteres también se utilizan para fabricar botellas, películas, lonas, canoas, pantallas de cristal líquido, películas dieléctricas para condensadores, aislamiento de películas para cables y cintas aislantes, se usan ampliamente como acabado en productos de madera de alta calidad, como guitarras, pianos e interiores de vehículos.³

5. Policaprolactona

La ϵ -policaprolactona (PCL) es un polímero compuesto de unidades repetitivas de 6-hidroxihexanoato, perteneciente a la clase de poliésteres alifáticos (Figura 1).



Policaprolactona (PCL)

Figura 4: Molécula de policaprolactona(PCL).

PCL ha sido ampliamente investigada por sus propiedades mecánicas peculiares, miscibilidad con una amplia gama de otros polímeros y su biodegradabilidad.

El monómero de la policaprolactona es la ϵ -caprolactona, una molécula de éster cíclica cuya fórmula es $(\text{CH}_2)_5\text{CO}_2$, que es un líquido incoloro que hierve a 241°C y que es miscible en solventes orgánicos.

El monómero cíclico se obtiene industrialmente mediante la oxidación de Baeyer-Villiger de la de ciclohexanona con peróxido de hidrógeno en presencia de diferentes catalizadores .⁴

También se encuentran diferentes rutas sintéticas para la obtención del monómero de manera renovable. Una de las reacciones propuestas es la conversión de 5-hidroximetilfurfural (HMF) en caprolactona, a través de 1,6-hexanodiol (1,6-HD), que se muestra en la Figura 5. HMF se puede preparar con elevado rendimiento a partir de d-fructosa.

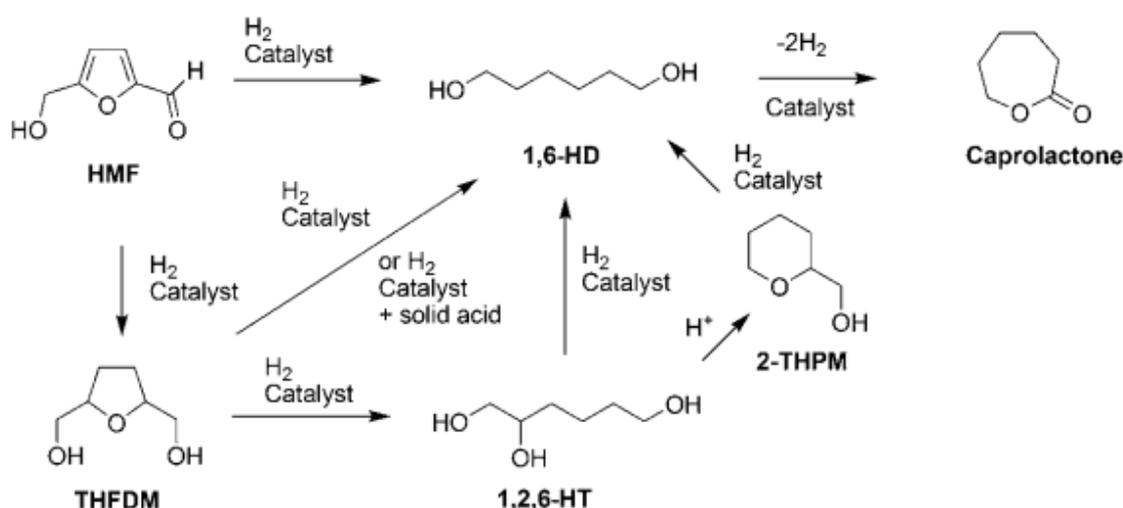


Figura 5: Rutas sintéticas para la conversión de HMF en caprolactona.⁵

Recientemente se han realizado numerosos avances en la conversión de HMF a 1,6-hexanodiol. Se han explorado cuatro rutas diferentes que implican reacciones de hidrogenación catalítica e hidrodeshidrogenación con diversos catalizadores homogéneos y heterogéneos: 1) La hidrogenación directa de HMF a 1,6-hexanodiol; 2) una secuencia de dos pasos a través de 2,5-THF-dimetanol (THFDM); 3) una síntesis de tres pasos a través de THFDM y 1,2,6-hexanotriol (1,2,6-HT); y 4) una síntesis de cuatro pasos a través de THFDM, 1,2,6-HT y tetrahidro-2H-piran-2- il metanol (2-THPM).⁵

Otra ruta consiste en utilizar el semialdehído adípico (SAA) (Figura 6), que se puede obtener a partir de la biomasa, en una combinación de biotecnología y catálisis química. Sin embargo, esta ruta es muy reciente y apenas existe información publicada.⁶

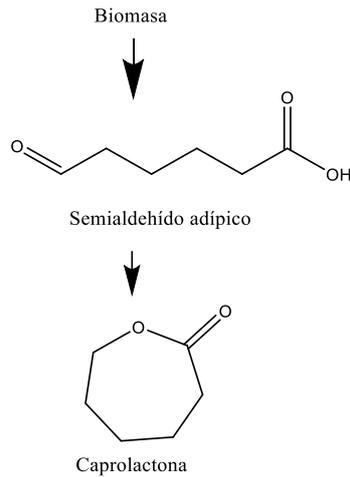


Figura 6: Esquema de la ruta sintética del semialdehído adipico a caprolactona.⁶

5.1 Propiedades

Las propiedades físicas, térmicas y mecánicas de PCL (*Tabla 1*) dependen principalmente de su peso molecular y grado de cristalinidad, que también contribuyen a su capacidad de degradarse, por hidrólisis de sus enlaces éster, en condiciones fisiológicas.

La PCL es un polímero fuertemente hidrofóbico, semicristalino (termoplástico), y fácilmente procesable, tiene un rango de punto de fusión de 51–60°C dependiendo del peso molecular promedio, baja viscosidad del fundido, y una temperatura de transición vítrea de -60°C .

Debido a su baja temperatura de fusión, PCL se procesa fácilmente mediante técnicas de fusión convencionales y se puede aditivar con materiales más rígidos (partículas o fibras) para mejorar las propiedades mecánicas.

En general, los materiales basados solo en PCL no se usan en aplicaciones donde se requieren elevados rendimientos estructurales debido al limitado rango de temperaturas de trabajo ($T_g -60^{\circ}\text{C}$ y $T_m 60^{\circ}\text{C}$) y las propiedades elásticas (módulo de Young alrededor de 130 MPa). Aunque es un polímero semicristalino, y por lo tanto, puede usarse por encima de su T_g , el módulo elástico es bastante bajo en comparación con otros polímeros biodegradables como el ácido poliláctico (PLA) o polihidroxitirato (PHB). Un método viable y efectivo para mejorar la rigidez de la PCL y aumentar su aplicabilidad potencial en aplicaciones de carga, es reforzarla, con cargas minerales reduciendo el coste del polímero.⁷

Tabla 1: Propiedades del PCL ⁸

Propiedad	Unidad	Valor/Rango
Peso molecular de la unidad de repetición	g/mol	114.14
Volumen molar (V_m)	mL/Mol	100.2
Densidad (ρ)	g/mL	1.11-1.14
Parámetro de solubilidad	MPa ^{1/2}	18.6-19.8
Índice de Refracción	-	1.47-1.49
Punto de fusión (M_w 50,000 hasta 80,000)	°C	58-60 51.9
Punto de fusión (M_w 2,000)		
Módulo de Young	MPa	90-150
Temperatura de transición vítrea (T_g)	°C	-60

La cadena PCL es flexible y exhibe un alto alargamiento a la rotura y un módulo bajo. Se ha informado que el alargamiento a la rotura y la resistencia a la tracción de las películas de PCL está entre 450% y 1100% y 25 y 33 MPa. PCL también tiene buena resistencia al agua, al aceite y al cloro. ⁸

Uno de los factores clave que han contribuido al uso generalizado de PCL en diferentes aplicaciones es su biodegradabilidad. Los tiempos de degradación de PCL dependen de su peso molecular, grado de cristalinidad y morfología. Se observa degradación más rápida en las fases amorfas. En particular, la degradación de PCL comienza con la difusión del agua hacia regiones amorfas, seguida de la escisión hidrolítica de los enlaces éster.

El PCL puede ser biodegradada por organismos vivos como varias bacterias y hongos, lo que la hace susceptible a la biodegradación en diferentes entornos bióticos. ⁹

5.2 Aplicaciones

La adición de policaprolactona-dioles en la producción de poliuretanos especiales es la aplicación más utilizada, las policaprolactonas imparten buena resistencia al agua, aceites, a los disolventes y al cloro en el poliuretano producido.

En los últimos años, PCL se ha combinado con éxito con polímeros naturales, como almidón, gelatina, colágeno o quitosano, así como sintéticos como polietilenglicol,

poliuretano y alcohol polivinílico, para satisfacer los principales requisitos en términos de propiedades físicas por ejemplo, la resistencia al impacto. ¹⁰



Figura 7: Cubiertos hechos de mezcla de almidón con PCL, para facilitar su plastificación. ¹²

Gracias a su permeabilidad, biodegradabilidad y biocompatibilidad, PCL ha sido ampliamente estudiado para la preparación de sistemas controlados de administración de fármacos mediante varias formulaciones de polímeros o copolímeros.

Debido a una velocidad de degradación marcadamente lenta, PCL se ha utilizado en gran medida para la preparación de implantes y prótesis a largo plazo capaces de reproducir la matriz extracelular natural, apoyando así el cultivo celular tridimensional (3D) en ingeniería y reparación de tejidos. ¹¹



Figura 8: Impresión 3D de un tejido hecho de PCL. ¹³

Por lo tanto, PCL también ha sido certificado como aprobado por la FDA (Food and Drug Administration, EE. UU.) y marca registrada CE (Comunidad Europea) para su uso en una gran cantidad de dispositivos médicos y de liberación controlada de medicamentos, aunque sorprendentemente pocos se han comercializado o traducido en estudios clínicos.

Actualmente se presta mucha atención al uso de PCL en combinación con biopolímeros, debido a sus interesantes características "*biofriendly*". Estas mezclas permiten una cinética de degradación y unas propiedades mecánicas, a medida. Una mayor capacidad de conformación y de fabricación que permite tamaños de poro apropiados que favorecen el crecimiento de tejido, y la liberación controlada de

fármacos contenidos dentro de la matriz. En el caso de la administración de fármacos, también pueden agregar grupos funcionales para modificar las cadenas de polímero para mejorar las propiedades hidrófilas, adhesivas o biocompatibles para inducir respuestas celulares favorables.¹²

Más recientemente, PCL ha despertado el interés en el diseño de materiales / biomateriales verdes utilizados para diversas aplicaciones. Las superiores propiedades reológicas y viscoelásticas respecto de otros poliésteres alifáticos hacen que PCL sea fácil de fabricar y manipular en una amplia gama de dispositivos biodegradables. Además, las propiedades mecánicas de PCL lo hacen adecuado para aplicaciones médicas complementarias a la ingeniería de tejidos, como, por ejemplo, apósito para heridas, anticonceptivos y odontología, pero también en campos no médicos como el medio ambiente, en el envasado de alimentos.⁷



Figura 9: Férula de PCL.¹⁴

Las aplicaciones de embalaje son una de las aplicaciones más intensamente estudiadas para materiales basados en PCL con funcionalidades comparables a las de los envases de plástico tradicionales a base de petróleo. A pesar de los mayores costos actuales en comparación con sus equivalentes plásticos tradicionales, muchos han encontrado aplicaciones comerciales en el campo de envasado, en particular en la industria alimentaria.⁹

5.3 Preparación de la PCL

Existen diferentes rutas sintéticas para la preparación de la PCL. La ruta más utilizada y más conocida es mediante la polimerización de apertura de anillo (ROP) (Figura 10a), catalizada por compuestos iónicos y iones metálicos del monómero cíclico ϵ -caprolactona.

También existe otra ruta que se está estudiando recientemente, que consiste en la polimerización por apertura de anillo radicalaria (RROP) (Figura 10b) del 2-metilen-1,3-dioxepano (MDO), usando diferentes condiciones.

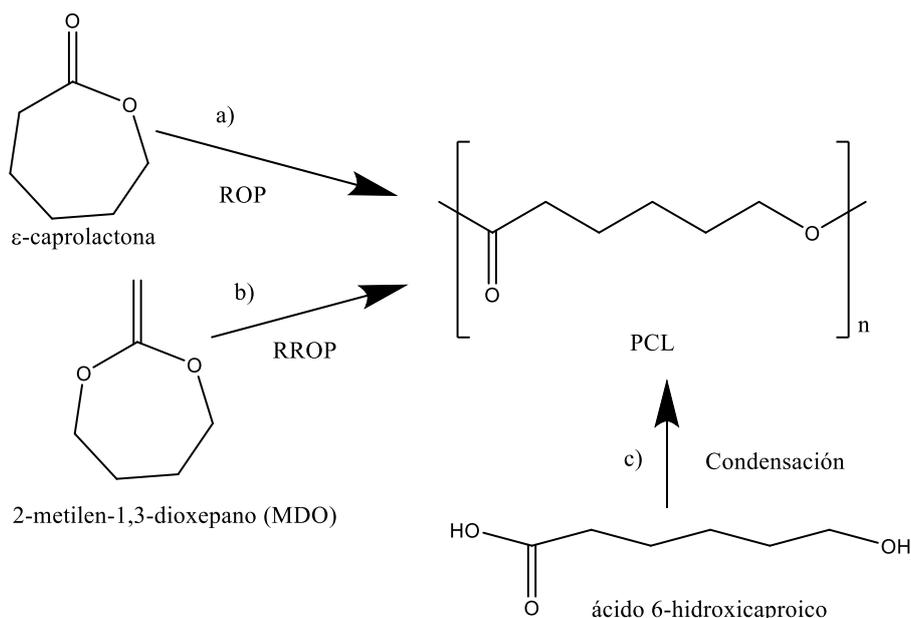


Figura 10: Rutas sintéticas para la formación de PCL, a) polimerización de apertura de anillo (ROP) ; b) polimerización apertura de anillo por radicales (RROP); c) por condensación.⁷

Finalmente, también puede ser preparada mediante la condensación del ácido 6-hidroxicaproico (Figura 10c), aunque esta vía no está muy estudiada y tampoco es la más efectiva para la síntesis de PCL.⁷

5.3.1 Polimerización por apertura de anillo (ROP) de la ϵ -caprolactona

Como hemos indicado en el apartado anterior, la ROP de la ϵ -caprolactona es la ruta preferida para la síntesis de la PCL.

Existen diferentes mecanismos para la ROP de lactonas que dependiendo del iniciador, puede ser aniónico, catiónico o por coordinación-inserción.

La ROP aniónica (Figura 11) utiliza especies nucleófilas capaces de atacar el carbono carbonílico de la caprolactona, induciendo la apertura del anillo y la formación de un alcóxido en crecimiento. La transesterificación intramolecular es una reacción secundaria relevante de este mecanismo. Un ejemplo de ROP aniónica produce en presencia de iniciadores basados en alcóxidos de metales alcalinos.¹⁵

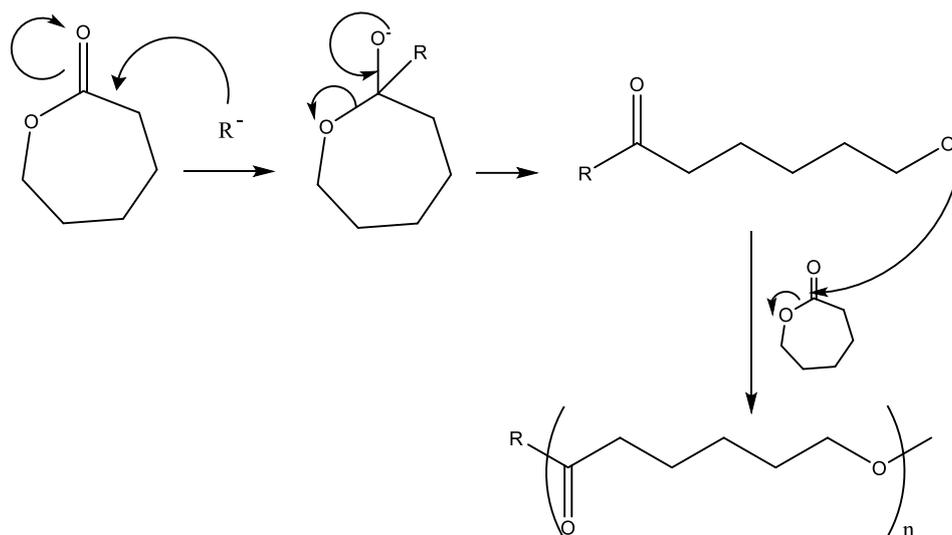


Figura 11: Mecanismo ROP aniónica de la ϵ -caprolactona.¹⁵

Durante la ROP, se deben considerar las reacciones secundarias de transesterificación intramolecular e intermolecular, significativas en las últimas etapas de la polimerización, que inducen en general una pérdida en el control del peso molecular y, en particular, una mayor polidispersidad.

La ROP catiónica (Figura 12) se basa en el ataque de un catión a la ϵ -caprolactona con la formación de una especie cargada positivamente, que luego es atacada por otro monómero que induce la apertura del anillo a través de un mecanismo S_N2 .¹⁶

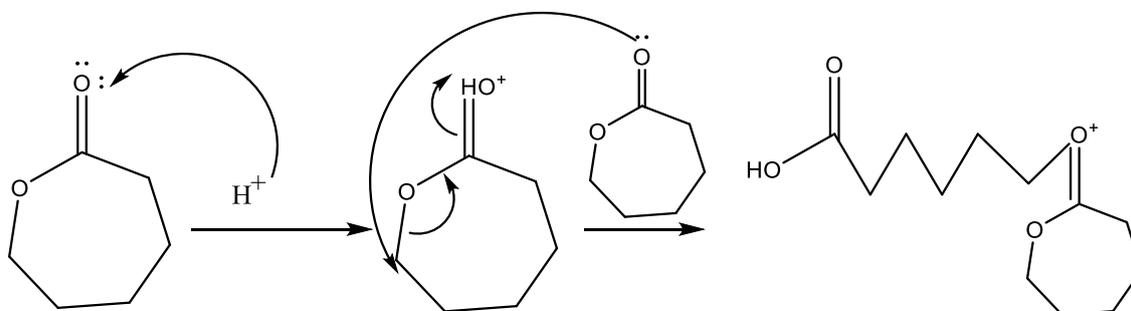


Figura 5: Mecanismo ROP catiónica de la ϵ -caprolactona.¹⁶

Sin embargo, la ROP es la más común utilizada para la polimerización de PCL se basa en el mecanismo de coordinación-inserción (Figura 13), que procede a través de la coordinación y la reacción de la ϵ -caprolactona con uno de los grupos alcóxido unidos al catalizador metálico y la formación de una especie en crecimiento vinculada al átomo de metal por un enlace alcóxido.

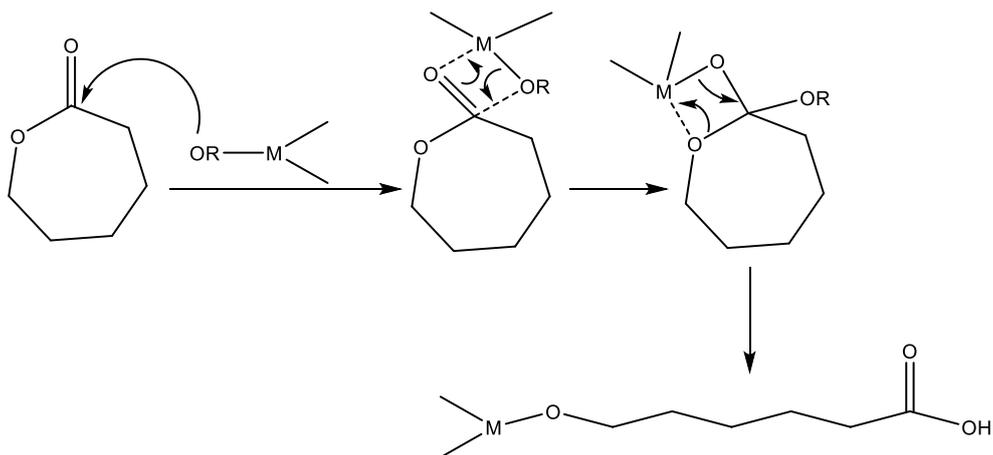


Figura 13: Mecanismo ROP coordinación-inserción de la ϵ -caprolactona.¹⁷

Se han descrito un gran número de complejos metálicos para la síntesis de PCL basados en el mecanismo de coordinación-inserción. Estos complejos permiten obtener pesos moleculares muy altos (hasta 800,000 g/mol) y baja polidispersidad, cercana a 1.1. En particular, el octoato de estaño (II) y el isopropóxido de aluminio (III) son los más utilizados en la síntesis de PCL.

Más recientemente, se ha descrito el uso de varios catalizadores de metales de transición (basados en titanio y zinc) y catalizadores de metales de tierras raras que está despertando un interés cada vez mayor.⁷

5.3.2 Polimerización radicalaria por apertura de anillo (RROP) del 2-metilen-1,3-dioxepano (MDO)

Este mecanismo de RROP puede aplicarse a los vinilacetales cíclicos (Figura 14). La polimerización se inicia por la adición de un radical al grupo vinilo exocíclico.

Dependiendo de las condiciones de reacción, la composición de la mezcla de monómeros, la temperatura, el tamaño del anillo cíclico y sus sustituyentes el proceso continúa a través de una poliadición 1,2- convencional o mediante la apertura del anillo.

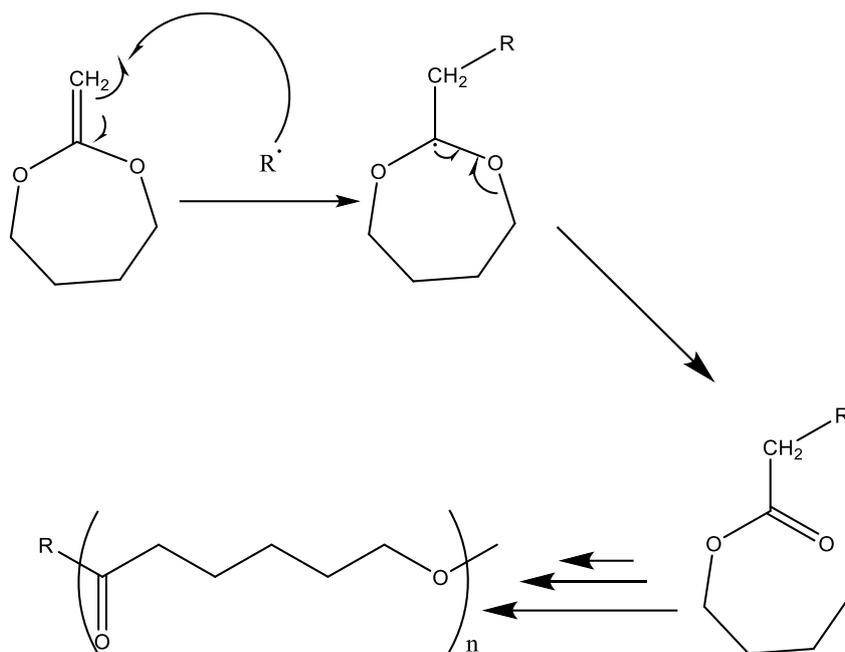


Figura 14: Polimerización por apertura de anillo por radicales (RROP) del 2-metilen-1,3-dioxepano (MDO).²⁴

Otro aspecto notable de la RROP de los acetales cíclicos, y en particular de MDO, es que la estructura de PCL obtenida mediante este método es diferente con respecto a la obtenida por ROP catalizada por iones o metales de ϵ -caprolactona.

RROP producen productos ramificados. La ramificación es un fenómeno relevante porque, dependiendo de las condiciones experimentales, se puede obtener hasta un 20% de densidad de ramificación.

La presencia de estas ramificaciones afecta la capacidad de cristalización de la PCL, dando lugar a un polímero altamente amorfo. Esta característica se ha utilizado para realizar mezclas de PCL semicristalinas obtenidas por ROP y PCL amorfas obtenidas por RROP, y estas mezclas han mostrado una compostabilidad drásticamente incrementada con respecto a la PCL tradicional, incluso a bajas cantidades de RROP-PCL.¹⁷

5.3.3 Policondensación del ácido 6-hidroxicaproico

La síntesis de PCL por policondensación de ácido 6-hidroxihexanoico se realiza en condiciones de vacío, eliminando así el agua producida durante la reacción y desplazando el equilibrio hacia la formación del polímero.

La reacción se realiza sin la adición de catalizador y se completa en 6 h a una temperatura que se incrementa gradualmente de 80 a 150 ° C.

La polimerización de ácido 6-hidroxicaproico usando lipasas como la *Candida antarctica* (CALB) al vacío da lugar a polímeros con un peso molecular promedio de 9000 g/mol y una polidispersidad menor a 1.5 después de 2 días de polimerización.

Son escasos los documentos que describen la preparación de PCL por policondensación en detalle. Este hecho puede ser atribuido a que la ROP produce un polímero con un peso molecular más alto y una polidispersidad más baja y por lo tanto presenta un mayor interés.¹⁸

6. Espectrometría de masas

6.1 Introducción

La técnica de espectrometría de masas surgió en el año 1897, cuando el físico Joseph John realizó experimentos que le llevaron a descubrimiento de la relación masa/carga. Esos avances hicieron que en el año 1912 se construyera el primer prototipo de espectrómetro de masas, un prototipo básico y restringido, a partir de allí se fueron mejorando las variables para mejorar la detección y resolución de los compuestos químicos.

A pesar de todos los avances y mejoras de la precisión en la medición de los espectros de masas, durante muchos años esta técnica solo pudo emplearse para el análisis de compuestos termoestables, fácilmente volatilizables y de bajo peso molecular.

La espectrometría de masas es una técnica microanalítica que puede usarse selectivamente para detectar y determinar la cantidad de un analito dado.

La espectrometría de masas también se usa para determinar la composición elemental y algunos aspectos de la estructura molecular de un analito.

Estas tareas se llevan a cabo mediante la medición experimental de la masa de iones en fase gaseosa producidos a partir de las moléculas de un analito. Las características únicas de la espectrometría de masas incluyen su capacidad para la determinación directa de la masa nominal (y en algunos casos, la masa molar) de un analito, y para producir y detectar fragmentos de la molécula que corresponden a grupos discretos de átomos de diferentes elementos que revelan características estructurales. La espectrometría de masas tiene la capacidad de generar más información estructural por unidad de cantidad de un analito que la que puede ser determinada por cualquier otra técnica analítica.¹⁹

La espectrometría de masas no se limita a los análisis de moléculas orgánicas. Se puede utilizar para la detección de cualquier elemento que se pueda ionizar.

6.2 Fundamento de la técnica

El fundamento de la técnica está basada primero en la ionización de la muestra para la obtención de iones a partir de moléculas, bombardeando mediante electrones el compuesto a analizar hasta vaporizarlo e ionizarlo, los iones formados son acelerados por un campo eléctrico formando un flujo de iones, generalmente positivos y de carga única.

La velocidad recibida por los iones sigue la siguiente ecuación:

$$v = \left(\frac{2eV}{m} \right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{(ecuación 1)}$$

Donde "V" es el potencial aplicado, "e" la carga del electrón y "m" la masa.

A continuación el haz de iones pasa por una zona del espacio donde existe un campo magnético, la fuerza que el campo magnético hace sobre una carga es perpendicular al campo magnético como se muestra en la Figura 15.²⁰

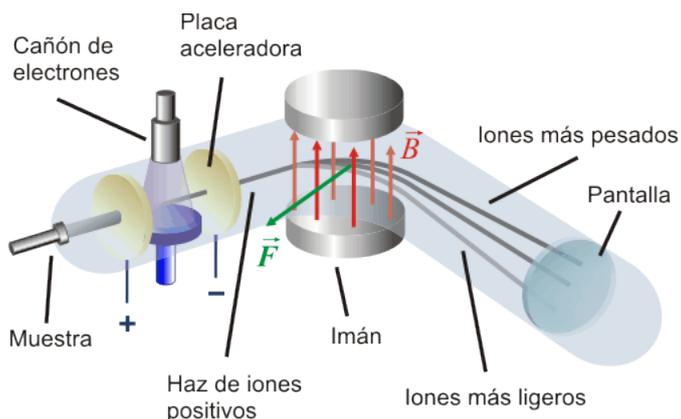


Figura 15: Esquema del funcionamiento de un espectrómetro de masas.²⁰

Puesto que la fuerza es perpendicular a la trayectoria de los iones, estos se verán acelerados y se desviarán describiendo una trayectoria curva.

Siguiendo la segunda ley de Newton:

$$\rho = \frac{m v}{z B} \quad \text{(ecuación 2)}$$

Cuanto menor sea el factor masa/carga (m/z), a una velocidad (v) y un campo magnético (B) fijos, menor será el radio de curvatura (ρ) y por lo tanto llegarán antes al detector, contra mayor resolución mejor separación entre partículas de relación m/q .

Finalmente el detector recoge las distintas señales y las reproduce en forma de espectrograma.²¹

7. MALDI TOF

7.1 Introducción

La ionización MALDI (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz), acoplada a un analizador TOF (tiempo de vuelo), es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas que permite el análisis de biomoléculas (biopolímeros como proteínas, péptidos y azúcares) y moléculas orgánicas grandes (como polímeros, dendrímeros y otras macromoléculas) que tienden a hacerse frágiles y fragmentarse cuando son ionizadas por métodos más convencionales.

Esta técnica de ionización apareció en los años 80 en que el ingeniero Koichi Tanaka, fue el primero en usar este método de MALDI para la ionización de proteínas, con la contribución de Michael Karas y Franz Hillenkamp, los cuales publicaron información por primera vez sobre MALDI, los tres fueron galardonado con el premio Nobel en el 2002.²²

La tecnología del tiempo de vuelo (TOF) ya se conocía en los años 80. Una técnica en la que los iones cargados se veían obligados a volar desde una fuente al detector para poder identificarlos en función del tiempo empleado en su vuelo al detector de iones. Pero TOF adolecía de su baja resolución y no encontró su aplicación en las técnicas de espectrometría de masas (EM). Solo más tarde, evidenció que la combinación de la tecnología MALDI-MS y TOF puede dar como resultado una técnica altamente sensible que hoy conocemos como MALDI-TOF-MS. La aplicación de la tecnología TOF, en particular, juega un papel importante cuando se aplica el modo de reflexión para analizar una muestra.

El análisis MALDI ha encontrado rápidamente una variedad de aplicaciones en muchas áreas científicas diferentes. En particular, el análisis MALDI proporciona información esencial sobre parámetros importantes como el peso molecular (M_w) y la polidispersidad (\mathcal{D}) del compuesto que se pueden usar de manera efectiva para una variedad de aplicaciones, como el estudio de las rutas de síntesis, la verificación de los mecanismos de degradación, la medición de los aditivos y las impurezas, formulaciones de productos e identificación de variaciones de composición.

A la hora de usar MALDI TOF/MS hay que tener en cuenta una serie de variables, como son la preparación de la muestra, que incluye la matriz, el solvente y el agente cationizante, así como las condiciones en las que se aplica la fuente de ionización.²³

7.2 Fundamento de la técnica

Como se ha comentado, un espectrómetro de masas posee 3 elementos principales: la fuente de ionización, el analizador y el detector. En el caso de MALDI-TOF, la fuente de ionización es un láser, se pueden utilizar láseres de longitudes de onda ultravioleta (UV) e infrarroja (IR), pero los láseres UV son con diferencia, las fuentes de luz más importantes en MALDI analítico. Entre estos, los láseres de N_2 y los láseres de Nd: YAG: (YAG: cristal sintético de granate de itrio y aluminio), triplicados o cuadruplicados a menudo sirven para la mayoría de las aplicaciones. IR-MALDI está dominado por los láseres Er: YAG, mientras que los láseres TEA- CO_2 (TEA: Transversely Excited Atmospheric), los cuales son láseres de alto voltaje que trabajan a presión atmosférica, rara vez se usan.²⁴

Para que se produzca la desorción e ionización de la muestra es necesario el empleo de una matriz. La muestra se mezcla con la matriz en exceso sobre una superficie de metal de tal forma que ambas co-cristalizan, las moléculas de la muestra quedan incorporadas dentro de la estructura de los cristales de la matriz cuando se evapora el solvente. La función de la matriz es absorber la mayor parte de la radiación emitida por el láser, permitiendo la desorción e ionización del analito de forma intacta. Para llevar a cabo el análisis de sustancias mediante la técnica MALDI, estas se mezclan con el compuesto matriz en proporciones variables de manera que queden muy diluidas en su seno. Idealmente en un experimento de este tipo, la absorción de la radiación láser por parte del analito debe de ser nula o muy pequeña en comparación con la del compuesto que actúe como matriz.

Así, al interaccionar la muestra con el pulso láser, es la matriz la que experimenta un incremento notable de su energía y posteriormente sufre una relajación, cediendo la energía emitida a las moléculas de la muestra de una forma controlada, de manera que permite la desorción de las moléculas quedando como iones intactos en fase gaseosa. Cuando en este caso, el analito será literalmente arrastrado por la matriz durante el proceso de desorción, vaporizándose e ionizándose de forma “suave”, es decir, con un reducido grado de fragmentación (Figura 16).²⁵

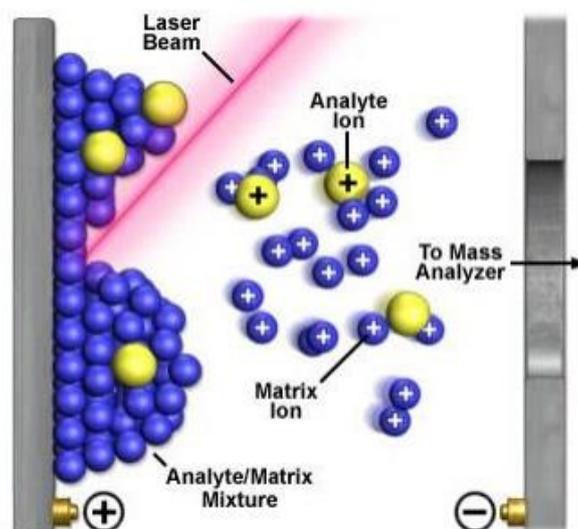


Figura 16: Esquema del proceso de desorción por matriz.²⁵

La elección de la matriz depende de las aplicaciones y de la naturaleza del analito.

El segundo elemento es el analizador que como bien indica su nombre es el TOF (tiempo de vuelo). Los iones una vez acelerados por el campo eléctrico pasan por el analizador TOF que los detecta por su diferente tiempo de vuelo.

La absorción de energía por parte de la matriz es convertida en energía de excitación y en transferencia de H^+ a la muestra (ionización) dando lugar, normalmente, a especies monocargadas, el ratio masa/ carga en realidad equivale a la masa molecular de los iones generados.

Finalmente, los iones impactan contra el detector, que recoge toda la información necesaria para generar un espectro de masas de cada compuesto analizado. Un espectro obtenido es un gráfico que representa las masas de diferentes iones generados a partir de la muestra analizada, podemos observar el proceso general en la Figura 17.²⁶

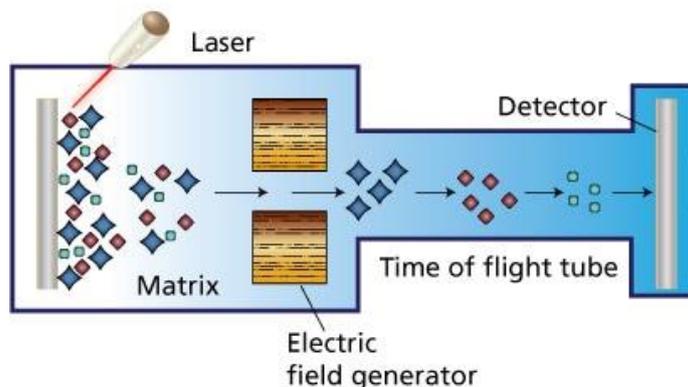


Figura 17: Esquema general del funcionamiento de MALDI-TOF.²⁶

7.3 Parámetros de MALDI-TOF

7.3.1 Preparación de la muestra

En MALDI-TOF, se pueden analizar muchos tipos de muestras y cada una tiene un pretratamiento diferente, ya que no es el mismo para una proteína que para un polímero sintético, también existen diferencias en el pretratamiento de un mismo tipo de analito en función de su naturaleza y características. Básicamente este apartado hace referencia a las diferentes técnicas de preparación, a los que aspectos deben tenerse en cuenta antes en la introducción de la muestra dentro del instrumento.

En las medidas por MALDI, la muestra se debe mezclar con una matriz adecuada y un disolvente que de forma conjunta, se dejará secar y cristalizar antes de comenzar a realizar las medidas.

Se opera mezclando una disolución de la muestra con una matriz que se encuentra en mucha mayor proporción que la muestra.

La mezcla se deposita en un dispositivo portamuestras, que es una placa metálica (Figura 18) conductora para lograr una co-cristalización muestra-matriz. Este portamuestras está especialmente diseñado para este sistema de ionización, las muestras se añaden en pocillos circulares, dependiendo del número de pocillos que tenga el instrumento mayor número de análisis simultáneos podrá hacer.²⁶



Figura 18: Placa metálica de disposición 24x16 (384 pocillos)⁵⁰.

Entre la gran variedad de métodos y protocolos que se han desarrollado para la preparación de muestras en análisis de MALDI, es el método de coprecipitación (air dried-droplet) es el que tradicionalmente ha sido más utilizado (así como algunas de sus variantes como la deposición en capas finas (thin-layer) o las preparaciones en "sándwich". También destacan otros métodos relativamente más recientes como el método de preparación de muestras libres de disolvente (solvent free).

7.3.1.1 Método de coprecipitación (*air dried-droplet*)

El método de coprecipitación es el más antiguo y se ha mantenido como el método preferido de preparación de muestras en la comunidad MALDI, este método es sorprendentemente simple y proporciona buenos resultados para muchos tipos diferentes de muestras.

Consiste en la mezcla de pequeños volúmenes de matriz y analito, una vez la mezcla esta homogénea se introduce en el portamuestras (placa metálica), y se deja evaporar el disolvente consiguiendo una co-cristalización matriz-analito, muchos factores pueden modificar la apariencia y la homogeneidad, como son la matriz, la proporción matriz/analito, el pH o el disolvente.

El método de coprecipitación tolera muy bien la presencia de sales y tampones, dentro de determinados límites. La mezcla completa de la matriz y el analito antes de la cristalización generalmente asegura la mejor reproducibilidad posible de los resultados.

Aún así el método también tiene desventajas, ya que por un lado, el proceso de evaporación del disolvente en condiciones normales (25 °C, 1 atm) hace que el proceso sea lento y pueda ocasionar una cocristalización lenta y el analito se segregue excluyéndose de los cristales de la matriz y produciendo una mezcla no homogénea de analito en toda la muestra.

Además, si se agrega un agente de cationización, la cristalización lenta favorece la formación de una estructura cristalina altamente ordenada que no es deseable durante el proceso de desorción e ionización.

Otro inconveniente que presenta, es que las muestras preparadas con este método, dependiendo del ángulo de incidencia del láser produce variaciones en la intensidad y resolución. Normalmente, cuando estos cristales no son homogéneos y se distribuyen de manera irregular, el analito se distribuye de una manera irregular por la matriz, generando zonas con una densidad de analito mayor que otras, por eso es importante la localización de zonas con una buena intensidad de señal y una buena resolución.²⁷

7.3.1.2 Método en capas finas (*thin-layer*)

Este método separa la aplicación de la matriz y la preparación de la muestra, y tiene muchas ventajas sobre el proceso de coprecipitación.

El procedimiento consiste en aplicar la solución de la matriz en el extremo de la sonda del espectrómetro con un solvente de evaporación rápida, como por ejemplo cetona, consiguiendo una película densa, plana y delgada que consta de cristales muy

pequeños de matriz. Luego se aplica encima una pequeña cantidad de la muestra sobre la película de cristales, y se deja evaporar el disolvente de la muestra, para eso la muestra no debe re disolver la película de matriz formada, sino la capa más externa.

Este método de preparación de muestras de capas finas tiene numerosas ventajas importantes sobre el método convencional de gotas secas.

Algunas de las ventajas más importantes que tiene sobre el método de coprecipitación es una mejor sensibilidad, homogeneidad de la superficie y distribución de energía de los iones desorbidos, también se ha encontrado que las superficies de la matriz se pueden lavar extensamente sin dañarlas, colocando una gota de ácido orgánico diluido en la superficie después de que la solución de analito se seque por completo y luego soplar la gota con aire a presión después de unos segundos.

La preparación de la superficie es simple, involucra solo un paso de pipeteo ahorrando tiempo de análisis.²⁸

7.3.1.3 Método en "sándwich"

El método sándwich se deriva del método en capas finas. Fue reportado por primera vez por Liang Li y sus colaboradores en 1996³⁶, y utilizado para el análisis de lisados de células de mamíferos individuales por espectrometría de masas.

Básicamente el método sándwich, tiene la misma preparación que el método en capas finas pero se le aplica una segunda capa superior de matriz con un disolvente convencional (no volátil). La muestra se intercala básicamente entre las dos capas de la matriz.

Este método no se utiliza ampliamente, y son más usados otro tipos de métodos.²⁹

7.3.1.4 Método de muestras libres de disolvente (solvent-free)

Este último método, como bien indica su nombre, no requiere el uso de disolvente, se desarrolló principalmente con el fin de aplicar la técnica a polímeros poco solubles de elevado peso molecular.

Los hidrocarburos poliaromáticos, presentan una solubilidad baja en disolventes polares que son los más adecuados para disolver matrices y sales cationizantes que se añaden a las muestras, entonces este método facilita mucho el poder analizar este tipo de compuestos con un procedimiento de preparación sencillo.

El analito se mezcla con la matriz y las sales iónicas (en caso de ser necesarias) con sus respectivas proporciones, y se muele con un molinillo, mortero, o incluso en un

método más novedoso en el que se utiliza un vial de vidrio pequeño al cual se le agrega pequeñas bolas de metal para triturar y obtener un polvo fino.

Luego se añade la cantidad precisa en el portamuestras con ayuda de una espátula. El portamuestras debe ser antes aireado para que no queden restos de polvo o cualquier otra sustancia que pueda interferir dentro del análisis.

Con anterioridad se pensaba que para análisis MALDI era imprescindible la formación de cristales de matriz, en los que el analito quedara embebido, para que la matriz pudiera asistir de forma eficiente el proceso de desorción del analito. Sin embargo, el método solvent-free pone de manifiesto que la cocrystalización matriz-analito no es necesaria y que los efectos que tienen lugar en la desorción son lo suficientemente eficientes como para producir la ionización de las moléculas de analito.³⁰

Este método se está consolidando y actualmente es un método complementario para MALDI. Las ventajas de la preparación de muestras de MALDI libres de disolvente, son que permiten minimizar problemas de la preparación de la muestra, tales como, por ejemplo, miscibilidad, segregación y efectos de supresión, restricciones de solubilidad e incompatibilidad, etc.

Sin embargo, la ventaja más útil y prometedora es la capacidad para caracterizar muestras insolubles en general. Esto también podría ser valioso no solo para polímeros sino también al análisis de proteínas que muestran fuertes restricciones de solubilidad.

De estos resultados se concluye que el modelo hipotético de un analito incrustado en una matriz cristalina es de hecho, una concepción errónea y que el factor más importante que influye en la calidad de los espectros de masas MALDI es el carácter altamente homogéneo de la mezcla analito / matriz.³¹

7.3.2 Matriz

Una de las variables más influyentes en el espectro MALDI es la matriz empleada. Como hemos mencionado en el fundamento de la técnica, la función de la matriz es absorber toda la energía de longitud de onda del láser y transferir esa energía al analito de una forma controlada para que estos queden ionizados y puedan volar en el campo eléctrico y ser analizados.

Las matrices utilizadas en la espectrometría de masas MALDI-TOF son compuestos que contienen en su estructura un anillo bencénico conjugado que absorbe la energía UV irradiada por el láser y que se volatilizan fácilmente formando iones en una cámara de alto vacío.

La elección del tipo de matriz dependerá de la naturaleza del analito que se desee analizar, para eso requiere la busca bibliográfica, y luego realizar pruebas ensayo/error, no solo variando el tipo de matriz, sino también en su proporción.

Las características más generales que una matriz debe cumplir para un buen análisis MALDI deben ser: capaz de absorber la radiación del láser utilizado, ser soluble con el solvente en el cual se trabaja, no debe producir reacciones secundarias con el analito y en el caso de darlas debe conocerse su naturaleza, no deben de sublimar cuando se les somete al vacío de la cámara láser, ha de fragmentarse poco con la radiación laser para evitar reacciones secundarias y deben que ser sustancias acidas para que pueda ceder fácilmente protones durante la ionización de la muestra.³²

Algunas de las matrices más utilizadas en MALDI son: el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA), el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), el ácido ferúlico (FA) y el ácido sinapínico (SA) (Figura 14). La matriz HCCA generalmente usada para la detección de picos de baja masa pudiendo llegar a la detección de iones de 10 kDa. La matriz DHB también es útil para la detección de picos de baja masa. La matriz ácido sinapínico se usa para la detección de picos de elevada masa.³³

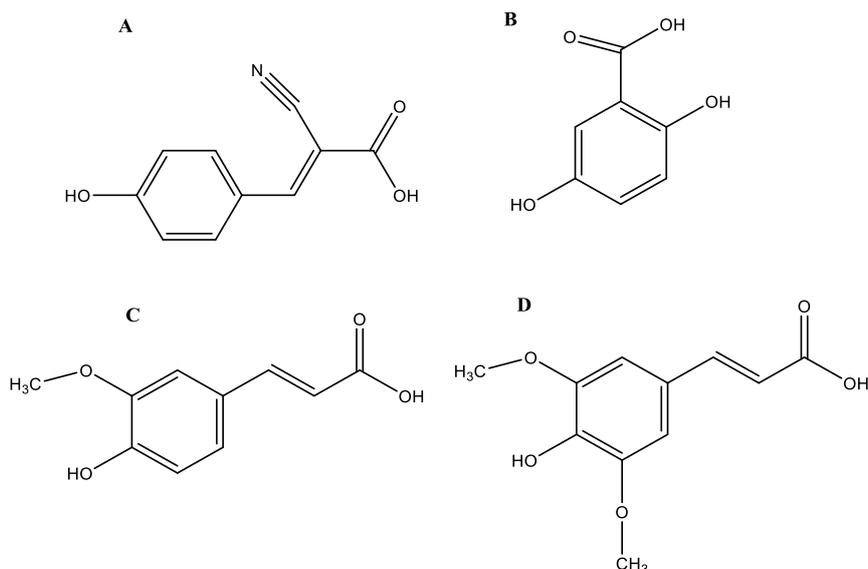


Figura 19: Matrices MALDI : A) Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA); B) el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB); C) Ácido ferúlico (FA) ; D) ácido sinapínico (SA).

El uso de matrices MALDI sólidas produce complicaciones a la hora de preparar la muestra, no siempre es posible solubilizar analitos y matrices en el mismo solvente y, por lo tanto, obtener una muestra homogénea. Esto resulta en la existencia de puntos en los que se concentra el analito y se genera una distribución no-homogénea del analito en la superficie. Estos problemas se pueden reducir usando un método de preparación adecuado, como los que hemos en el anterior apartado. La elección del método más apropiado para cada muestra mejora la resolución, la reproducibilidad y reduce la cantidad de ruido del espectro MALDI.³⁴

7.3.3 Agentes cationizantes

La elección adecuada del agente de cationización es un factor crucial para el uso de MALDI en polímeros, una elección adecuada puede suprimir las señales causadas por otras sales presentes en la muestra.

Los polímeros normalmente presentan una alta afinidad por los cationes, los poliéteres son fácilmente cationizados por iones de metales alcalinos; los polímeros que contienen restos aromáticos se pueden cationizar con Ag^+ o Cu^+ . Además de estos cationes, que son con mucho los más utilizados, se ha empleado una amplia variedad de sales para la cationización de muestras de polímeros.

La cantidad de agentes cationizantes no tiene que ser excesivamente grandes, De hecho, muchas veces las impurezas de la matriz, en los reactivos o en los solventes son suficientes para cationizar el polímero. Para mejorar la ionización lo más utilizado es la adición de soluciones de sales alcalinas (LiCl , NaCl , KCl , KCF_3COO).

El polietileno (PE) ha sido difícil analizar por MALDI durante mucho tiempo debido a su poca afinidad con los cationes metálicos, en este caso se ha propuesto la adición de partículas metálicas en la muestra de PE o derivatización del PE para crear una carga positiva en la muestra .³⁴

7.3.4 Analizador TOF (Time-Of-Flight)

El analizador genérico, más usado en MALDI es el analizador de tiempo de vuelo (TOF) (Figura 20). Se pueden utilizar otros analizadores de masas como los espectrómetros de masas de resonancia de ciclotrón de iones con transformada de Fourier (FT - ICR), trampas de iones, instrumentos basados en cuadrupolo, espectrómetros de masas sectoriales o instrumentos híbridos.

Un analizador TOF es un dispositivo que separa iones según lo que tardan en atravesar el tubo de vacío, desde el pulso del láser hasta que el ion choca con el detector .

TOF es tan especialmente adecuado para la ionización MALDI debido a que como la ionización es por pulsos, el pulso de láser se puede usar como señal de inicio para la medida de tiempo.

El analizador TOF consta de una zona de aceleración para los iones en fase gas en la que todos los iones reciben la misma aceleración instantánea. De esta forma cuando los iones salen de la zona de aceleración idealmente tienen la misma energía cinética, aunque los iones tendrán diferentes velocidades, en función de su masa, como resultado de sus diferentes valores de m/z , se separan en grupos de acuerdo a su velocidad.

La diferencia entre la señal de salida y la del ión cuando llega al detector, corresponde al tiempo de vuelo (t_{TOF}), que se expresa en la siguiente ecuación:

$$t_{TOF} = \frac{L}{v} = L \sqrt{\frac{m}{2qU}} \propto \sqrt{\frac{m}{z}} \cdot a \quad \text{(ecuación 3)}$$

Donde t_{TOF} es la L es la longitud desde la fuente de iones hasta el detector, v es la velocidad del ión después de la aceleración, que equivale a, m que es la masa del ión, q su carga, eV que es la diferencia de potencial eléctrico de aceleración. Esta ecuación es proporcional a la raíz de m partido por z que es el número de cargas.

Entonces se puede determinar que los iones con una relación baja m/z tendrán un tiempo de vuelo menor y llegaran al detector antes que aquellos con m/z alta ya que cuanto mayor sea la relación m/z mayor será el tiempo de vuelo.

Las ventajas de TOF es el intervalo corto de tiempo para obtener un espectro de masas, típicamente es necesario microsegundo para escanear hasta 2000 unidades de masa, por eso se pueden hacer varios miles de espectros de masas en un segundo.

El principal problema de este tipo de analizadores es que su resolución a veces no es suficiente para discriminar entre masas de isotopos. Para eso se desarrolló, la técnica de detección por reflexión.³⁵

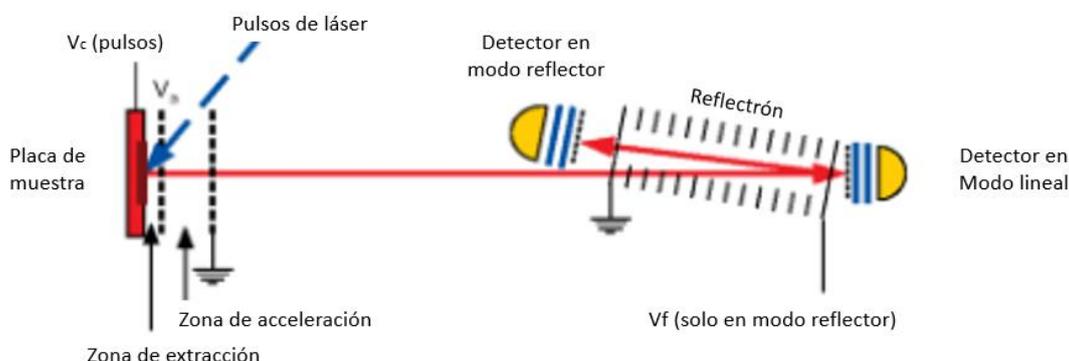


Figura 20: Esquema general de un analizador TOF en modo reflexión.³⁵

7.3.4.1 TOF en modo reflexión

Los iones con la misma relación m/z , no parten de la fuente de iones exactamente con la misma energía cinética, por ello se incorpora una unidad de reflexión que permite compensar estas diferencias corrigiendo la dispersión.

Cuando se utiliza este dispositivo se utiliza el término (RTOF) mientras que para diferenciarlo del normal (lineal) se utiliza (LTOF) para no causar confusión. En la Figura 21 se puede observar la diferencia visual entre los dos dispositivos.

La unidad de reflexión crea un campo retardante que actúa como un espejo de iones reflejándolo hacia el sentido contrario en un diferente ángulo, esto es debido a una serie de anillos electrodos que producen un campo electrostático. El primer anillo tiene un potencial bajo y va aumentando hasta el último que tiene el potencial más alto.

El detector se encuentra al final del tubo y está situado con un ligero ángulo para detectar los iones que son reflejados hacia la fuente de iones. Cuando los iones llegan al reflector, sufren un potencial de retardo causado por los anillos hasta que los frenan y los impulsa en el sentido contrario. Los iones más rápidos, con una mayor energía cinética, llegarán antes al reflector y penetrarán más en el campo electrostático, y tardarán más en salir. En cambio, los que tengan menos velocidad tardarán menos. De esta forma, un paquete de iones de una misma relación m/z que contenga iones con diferentes energías cinéticas, igualara la llegada de los iones al mismo tiempo, disminuyendo así su dispersión y mejorando la resolución de espectrómetro. El uso de reflector también tiene desventajas como disminución de su sensibilidad debido a la pérdida de iones por colisiones y dispersiones de haz principal.³⁵

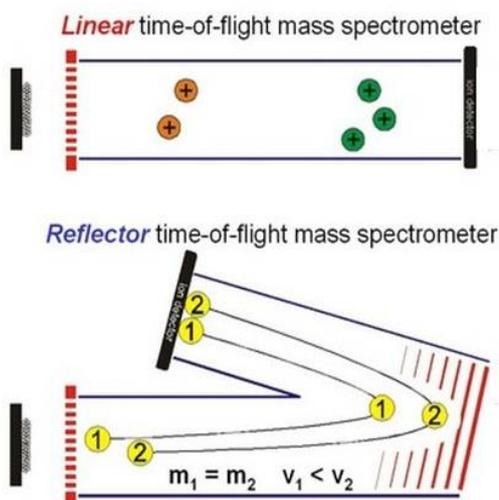


Figura 21: Esquema de un TOF lineal (LTOF) y un TOF en modo reflexión (RTOF).³⁵

7.3.5 Fuente láser

La longitud de onda del láser es una de las variables más influyentes en la ionización MALDI, ya que determina la matriz que se debe usar

La forma precisa en que se producen los iones también puede variar. Se han utilizado muchas líneas láser diferentes para MALDI, incluida la radiación infrarroja a 2,94 μm (láser Er: YAG) y 10,6 μm (CO_2) con matrices especiales, pero los láseres de 337 nm (láser N_2) y 355 nm (láser Nd: YAG triplicados) son las opciones más populares, exitosas y asequibles, y se utilizan ampliamente en el campo de la espectrometría de masas (MS) de polímero MALDI. En la Tabla 2 se puede observar sus diferentes características.

Aunque los espectros obtenidos por UV-MALDI e IR-MALDI son similares, pero los mecanismos de ionización difieren. La ionización en UV-MALDI se ha estudiado más ampliamente que IR-MALDI.

A longitudes de onda UV, la desorción / ionización eficiente requiere que la matriz absorba fuertemente la irradiación láser a través de transiciones electrónicas en la matriz. Se sabe menos acerca de los requisitos de absorción para un MALDI efectivo en longitudes de onda IR, donde los fotones láser se absorben principalmente a través de transiciones vibratorias en la matriz.³⁶

Tabla 2: Características de láseres MALDI-TOF.⁴⁸

Láser	Longitud de onda	Energía fotón (eV)	Duración del pulso (ns)
N_2	337 nm	3.68	<1
Nd:YAG (3r armónico)	355 nm	3.49	5
Nd:YAG(4r armónico)	266 nm	4.66	5
Er:YAG	2.94 μm	0.42	85
CO_2	10.6 μm	0.12	100

Las investigaciones de láseres en MALDI, indican una tendencia general hacia la formación de estados de mayor carga en IR-MALDI en comparación con UV-MALDI y también indican una mayor eliminación de material de matriz de muestra por disparo láser por IR-MALDI que por UV-MALDI.

En otros estudios comparativos los iones producidos por IR-MALDI, mostraron una menor fragmentación que los iones de proteínas correspondientes producidos por UV-MALDI, también se pueden encontrar señales de aductos formados por el analito e iones como Na^+ y K^+ que se producen durante UV-MALDI están ausentes en IR-MALDI.

Por lo que se refiere a la potencia del láser, una irradiación láser demasiado alta conduce a una degradación de las especies y a un cambio los espectros respecto a la resolución y la forma de la distribución de la masa molecular. A medida que aumenta la energía interna de las moléculas de analito, se puede observar una degradación creciente. Por lo tanto, la intensidad del láser y la homogeneidad del perfil del haz en la superficie de la muestra deben controlarse cuidadosamente. ³⁷

7.3.5.1 Mecanismo de ionización en UV MALDI

Actualmente la comprensión de la formación de iones aún es incompleta, pero se ha avanzado mucho hacia una comprensión de la formación de iones en el mecanismo de MALDI durante estos últimos años.

Se han hecho algunos intentos para explicar el proceso de desorción/ionización de iones como un proceso integral, aunque el modelo de más éxito, en particular dentro del ámbito del análisis de polímeros, es considerar los procesos de ionización primaria y secundaria en MALDI por separado.

La ionización primaria ocurre en los primeros estadios, en la matriz sólida o casi sólida. La ionización secundaria implica reacciones posteriores en el haz de expansión (nube formada por la muestra en el proceso de desorción). Para estudiar los fenómenos de agregación que experimentan los compuestos de interés en los experimentos MALDI es necesario contemplar los parámetros que caracterizan el haz de desorción, como son su composición, evolución temporal, distribución de velocidades y energía interna de sus componentes.

Los procesos secundarios son principalmente reacciones entre iones y moléculas que involucran iones primarios y moléculas neutra de la matriz (Figura 22) .

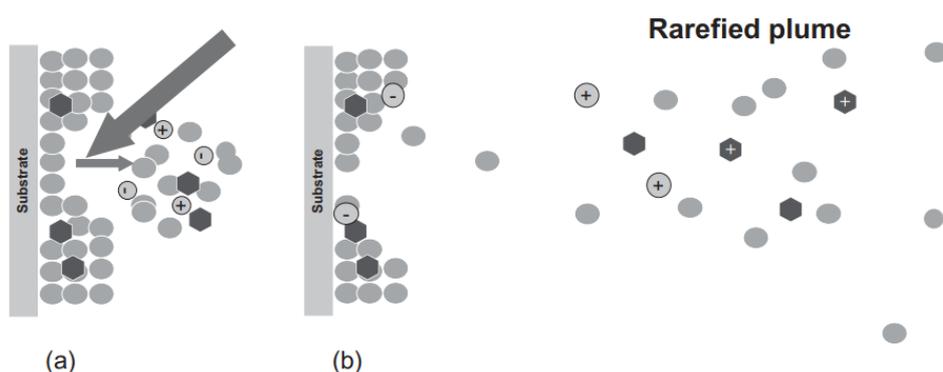


Figura 22: Mecanismo de ionización MALDI a) Ionización primaria: directamente en la matriz b) Ionización secundaria: ocurre en la expansión de la pluma .²²

Habitualmente, se separan estos mecanismos debido a que el pulso láser generalmente dura de 3 a 5 ns (láseres de N_2 o Nd: YAG), pero el tiempo requerido para la expansión a densidades libres de colisión es mucho más largo, los iones

primarios se generarán durante el pulso del láser o dentro del tiempo de vida excitado de la matriz. Sin embargo, el haz (ionización secundaria), las reacciones entre iones y moléculas neutras continuarán mientras haya colisiones.

Los procesos que se han presentado como posibles procesos de ionización primaria y secundaria para UV MALDI se resumen en la Tabla 3:

Tabla 3: Procesos de ionización primaria y secundaria para UV MALDI.³⁶

Procesos de ionización primaria	Procesos de ionización secundaria
Dismutación	Expulsión de carga
Transferencia de protones en estado excitado	Transferencia de electrones
Ruptura de matriz y la carga estadística de partículas.	Transferencia de protones
	Transferencia de cationes

Entre los procesos de ionización primarios, se ha observado que la dismutación, la transferencia de protones en estado excitado, la ionización térmica y la ionización de múltiples fotones aunque esta última es menos probable, basándose principalmente en mediciones termodinámicas de matrices MALDI.

Los mecanismos de ionización primarios más probables que conducen a las primeras moléculas cargadas son:

La ruptura de la matriz y la carga estadística de los grupos / partículas, conducen a una fracción de grupos y partículas que llevan una carga después del paso de ablación del láser.

Entre los procesos secundarios enumerados, solo la expulsión de carga no es muy probable, en cambio se sabe que los otros tres procesos ocurren con frecuencia.

En el ámbito del análisis polímero MALDI, la liberación de iones preformados, que a menudo se originan a partir de la sal / agente de cationización introducido en la muestra, es un proceso importante en la formación de carga primaria. Estos iones reaccionarían posteriormente en procesos secundarios (haz) mediante transferencia de cationes en fase gas a la muestra.

Muchos de los procesos enumerados en la Tabla 3 no pueden descartarse o confirmarse fácilmente debido a la falta de datos termodinámicos en las matrices

MALDI. Sin embargo, estos datos están cada vez más disponibles y permiten hacer conjeturas claras en muchos casos.³⁷

7.3.6 Detectores

El último paso en la técnica de MALDI, una vez se han separado los iones, es la detección de esos iones. Los dispositivos utilizados principalmente para la detección de iones son el multiplicador de electrones y la caja de Faraday.

El detector más común, es el multiplicador de electrones, puede ser de tipo diodo discreto o continuo.

El multiplicador de electrones, utiliza la energía cinética de los iones para cuando chocan con una superficie recubierta por óxidos de tierras raras. Al chocar contra la superficie desprenden electrones asociados con la capa externa de la superficie. A este proceso se le llama emisión secundaria.

Se suelen utilizar entre 10 y 16 placas aunque no existe un límite definido. Por medio de este detector, se consiguen amplificaciones de la corriente iónica con factores de multiplicación de 10^6 o mayores.

El diodo discreto consiste en 10-20 electrodos hechos de berilio-cobre para lograr una buena propiedad de emisión secundaria. El impacto de un ion en el primer electrodo (de conversión) libera una lluvia de electrones que se multiplican en un efecto en cascada por la estructura del diodo.

Los diodos continuos que se parecen a un tubo cónico en espiral y se denominan multiplicador de electrones Channeltron. Los iones que impactan en el orificio de entrada liberan nuevamente una lluvia de electrones que se desplazan hacia el extremo estrecho conectado a tierra. A través de colisiones con la pared del multiplicador se logra el efecto de cascada deseado.

Otro tipo de detector es la caja de Faraday, que consiste en una placa, de la que los iones toman electrones al chocar para neutralizar su carga. Midiendo la corriente electrónica necesaria para neutralizar a todos los iones, se puede tener una idea bastante exacta del número de iones que han alcanzado la placa. Este tipo de detector es muy utilizado para determinaciones cuantitativas.

La única desventaja de este detector es que la señal es débil y tiene una menor sensibilidad y mayor tiempo de respuesta.³⁷

8. Plan de trabajo

8.1 Selección de los diferentes parámetros de trabajo

A continuación, se explican las diferentes variables consideradas para llevar a cabo este proyecto. Todas se han seleccionado con el objetivo de optimizar la formación y caracterización del producto de acuerdo con los resultados bibliográficos expuestos anteriormente y teniendo en cuenta estudios similares de polimerización de CL publicados en la literatura.

8.1.1 Preparación de la PCL

8.1.1.1 Mecanismo de polimerización

En la parte bibliográfica anterior se han presentado las diferentes rutas sintéticas del PCL, en este apartado se comentará, el mecanismo de polimerización seleccionado para este proyecto y sus motivos.

Para la selección del método de polimerización se ha tenido en cuenta que la policondensación, presenta diferentes desventajas, como un control menos preciso de la masa molar, mayor dispersión de la distribución de pesos moleculares y la formación de diferentes grupos finales de cadena.

En el caso de la ROP, los procesos iónicos debido a su mayor reactividad, son menos selectivos presentan una mayor susceptibilidad a reacciones secundarias no deseadas como, por ejemplo, la transesterificación que conduce a la formación de macrociclos o al aumento de la polidispersidad (\bar{M}_w/\bar{M}_n).

Si por el contrario consideramos el método de coordinación-inserción, este ofrece una amplia gama de ventajas, desde el control sobre la estructura del polímero hasta una mejora en la cinética de polimerización y en el control del peso molecular.³⁸

Este proceso, como se ha mencionado anteriormente, consta esencialmente en cuatro etapas: (i) coordinación del monómero al centro metálico, (ii) inserción del monómero en el enlace metal-alcóxido, (iii) apertura del anillo a través de la escisión de aciloxígeno, y (iv) propagación.³⁹

8.1.1.2 Catalizador

Establecido el tipo de polimerización, el siguiente paso consiste en la elección del catalizador y del iniciador, el catalizador más utilizado en la producción de PCL es el octoato de estaño (II) o bis-2-etilhexanoato de estaño (II) ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$). Las principales

razones son su disponibilidad a escala industrial, su buena solubilidad en una amplia gama de monómeros y disolventes orgánicos comunes, su buena estabilidad y su baja toxicidad ya que ha sido aprobado por la FDA como aditivo alimentario.

La especie iniciadora se forma in situ tras la reacción de $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ con un iniciador nucleófilo prático comúnmente un alcohol o agua, antes de la polimerización, que conduce a la formación de las especies de alcóxido de estaño correspondientes y ácido octanoico libre (Figura 23).

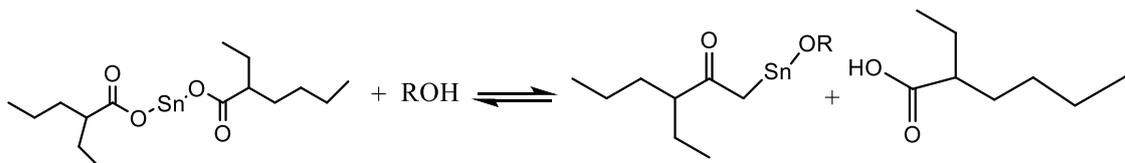


Figura 23: Formación del iniciador a partir del octoato de estaño para la ROP de la ϵ -caprolactona.⁴⁰

La masa molar de la PCL resultante se controla mediante la relación inicial monómero/alcohol utilizando cantidades variables de catalizador de estaño. En estas condiciones las polidispersidades obtenidas $\bar{D} = M_w / M_n$ suelen ser > 1.2 .

De esta forma, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ se comporta como un catalizador, mientras que el alcohol nucleófilo actúa como la especie iniciadora real. En la mayoría de las polimerizaciones de PCL, el iniciador prático se agrega en exceso respecto a $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ lo que permite un mejor control del peso molecular. Ese fenómeno se ha racionalizado considerando los equilibrios complejos existentes durante el proceso de polimerización.⁴⁰

El proceso clave en la terminación de la reacción, es la transferencia de cadena y la formación de una especie inactiva, lo que permite que la cantidad de extremos de la cadena activa sea menor que la cantidad de cadenas en crecimiento (Figura 24). Este hecho permite disminuir dramáticamente la cantidad de catalizador de estaño necesaria para la reacción de polimerización.

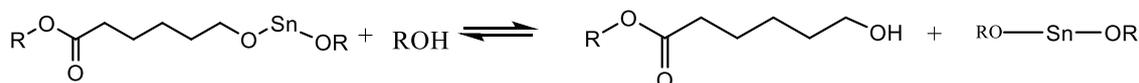


Figura 64: Transferencia de cadena en el proceso de polimerización de la PCL.

Al finalizar la polimerización, la mayoría de los grupos del extremo del polímero contienen un grupo hidroxilo libre mientras que en el extremo restante se encuentra el grupo alcóxido proveniente del alcohol utilizado como iniciador.³⁹

8.1.1.3 Iniciador

La posibilidad de usar casi cualquier compuesto que contenga uno o varios grupos hidroxilo como iniciador, siempre y cuando sea estable frente a las condiciones de polimerización (como calentamiento o catalizador), es de hecho un aspecto clave para la accesibilidad de PCL con estructuras bien definidas y utilizarlos como por ejemplo en el caso de las policaprolactona-dioles (Figura 25) para la obtención de polímeros en bloque.

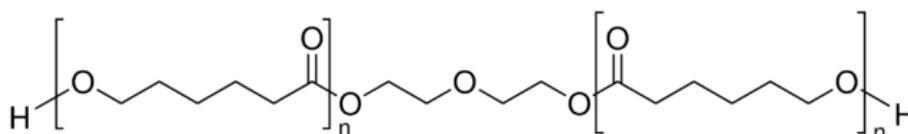


Figura 25: Policaprolactona-diol

Los alcoholes más utilizados para la ROP de la PCL, son el etilenglicol (EG), el dietilenglicol (DEG), 1,3-propanodiol (PD) y n-butanol. De acuerdo con un estudio comparativo, el uso de iniciadores diol conduce a la formación de un alcóxido estano más estable y menos reactivo.⁴¹

Cuanto más estable es el alcóxido estano producido por el iniciador, más difícil es que el monómero experimente una reacción de inserción. Esta característica, fue determinante para la elección del n-butanol como iniciador.

8.1.2 Análisis de las muestras por MALDI-TOF

8.1.2.1 Tipo de fuente láser

El proyecto pretende trabajar en condiciones UV-MALDI, por lo tanto los láseres más apropiados de UV-MALDI son los láseres de N_2 (337 nm) y Nd: YAG (355 nm). Ambos podrían servir para este proyecto, aunque se propone el láser de N_2 ya que es el más habitual en los aparatos comerciales.

8.1.2.2 Matriz de ionización

Anteriormente se ha comentado la función y características que debe tener una matriz MALDI, en consecuencia para su elección debemos pensar primero de todo en la muestra a analizar, la cuestión clave es su solubilidad (o miscibilidad), dentro de la matriz sólida. Puesto que se utilizará un láser de N_2 , las matrices a escoger deben ser específicas para UV-MALDI, como puede deducirse en las base de datos, la mayoría de

las matrices contienen restos aromáticos que aseguran una absorción suficiente de la radiación láser (en general 337 nm de un láser N_2).

Como se ha comentado, lo más apropiado es realizar pruebas ensayo-error para poder evaluar su grado de compatibilidad, pero también se pueden tener en cuenta los datos reportados en la literatura.

El Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST), ha creado una base de datos para la elección de matrices MALDI, donde seleccionando el polímero deseado, se describen las matrices MALDI y los métodos de preparación de la muestra.⁴²

En el caso de la policaprolactona (PCL) se describen dos matrices polares, la primera es el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) y la segunda el ácido 2-(4-hidroxifenilazo)benzoico (HABA), las dos son muy utilizadas en la química de polímeros.

Para proceder a la posterior elección del solvente más adecuado se elige la matriz más utilizada para casi cualquier tipo de polímero que sería el DHB (Figura 26).

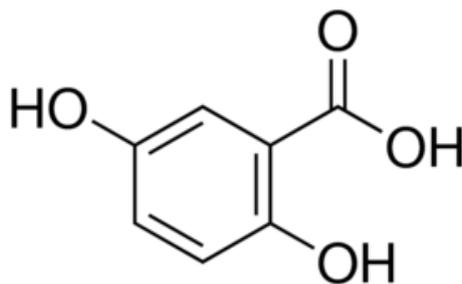


Figura 26: Ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB).

8.1.2.3 Agente cationizante

Se pueden usar diferentes cationes (como litio, sodio, potasio y cesio) y sales de metales de transición (como $Ag^+ X^-$, $Cu^{2+} X^{2-}$) que envuelven eficientemente el polímero y se agregan en forma de agentes generalmente de aniones no nucleófilos.

Si se esperan analitos catiónizados, se debe elegir una matriz que no compita por el catión con el analito. En el caso de matrices aromáticas, $AgTFA$ o $CuTFA$ son los agentes catiónicos recomendados.³⁴

Haciendo referencia a un estudio sobre el mecanismo de cationización, se observó que la plata apenas puede unirse a los oligómeros, mientras que el cobre lo hace con éxito debido a la diferencia de sus diámetros catiónicos. Postulando una mejor observación

de los oligómeros en el espectro en este trabajo se escogerá el trifluoroacetato de Cu como agente cationizante.

8.1.2.4 Disolvente para la preparación de la muestra

En general, los mejores resultados se obtienen usando el mismo solvente para cada uno de los componentes de la muestra MALDI. Considerando la técnica de co-precipitación, debe elegirse un buen disolvente tanto para la matriz, como para el analito y el agente cationizante. A medida que el solvente se evapora, cada uno de los componentes de la muestra alcanza su límite de saturación y comienza a precipitarse de la solución.

El tetrahidrofurano (THF) es un disolvente aprótico polar, con un punto de ebullición de 65 ° C es ideal para cristalizar a temperatura ambiente.

Es capaz de disolver un amplio rango de compuestos, y es muy utilizado en la disolución de polímeros, este hecho nos permite utilizar este disolvente tanto para la matriz, como para la muestra y para el agente cationizante a temperatura ambiente o ligeramente superior.³⁶

8.2 Propuesta de procedimiento experimental

El procedimiento experimental de la polimerización se ha basado en diversos artículos^{34,37,43,44,45,46}, sobre el estudio de la cinética y mecanismos de polimerización de PCL y otros poliésteres que también se sintetizan mediante ROP.

En el proyecto propuesto, se estudiará el efecto de las distintas variables de polimerización, como la temperatura, tiempo de reacción, relación monómero/catalizador y relación iniciador/catalizador en las características estructurales y peso molecular de las muestras de PCL obtenidas. Para ello se propone realizar diversos experimentos de polimerización y caracterizar en cada caso el polímero obtenido, una vez aislado por precipitación mediante la técnica de MALDI-TOF. También se analizarán muestras de polímero de la mezcla de polimerización previa a su purificación.

8.2.1 Reactivos

ϵ -Caprolactona ($C_6H_{10}O_2$); Octoato de estaño ($C_{16}H_{30}O_4Sn$); Tetrahidrofurano (C_4H_8O); Ácido 2,5-dihidroxibenzoico ($C_7H_6O_4$); 1-Butanol ($C_4H_{10}O$); Metanol (CH_3OH); Cloruro de metileno (CH_2Cl_2).

8.2.2 Síntesis de PCL

Primero se destilará a presión reducida la ϵ -Caprolactona (80 ° C / 1 mbar) en presencia de hidruro de calcio y se almacenará al vacío sobre tamices moleculares de 4 Å con el fin de purificarla y eliminar los restos de humedad.⁴³

En un matraz tipo Schlenk de 50 ml perfectamente seco y bajo atmósfera inerte de nitrógeno se introducirán por este orden las cantidades necesarias de monómero (ϵ -Caprolactona), iniciador (1-Butanol) y el catalizador (SnOct_2). Puesto que todos los reactivos son líquidos se utilizarán técnicas de cánula bajo presión positiva de N_2 o jeringas para su correcta dosificación. La relación [ϵ -Caprolactona]: [Octoato de estaño] según un estudio de optimización del catalizador para la obtención de una conversión cercana al 100% debería ser de 1000:1⁴⁴, aunque para el estudio se emplearían en cuenta diversas relaciones de 100:1, 1000:1, 2000:1 para el estudio.

El recipiente de reacción se mantendrá con agitación magnética en un baño de aceite termostatzado a una selección de diferentes temperaturas alrededor de 120 °C (100°C, 120°C y 140°C) durante diferentes largos tiempo de reacción (24h, 48h, 72h). Cuando se complete el tiempo de reacción seleccionado, de la mezcla de reacción, una vez enfriada se tomarán pequeñas muestras para el análisis MALDI. El resto se disolverá en CH_2Cl_2 , y se precipitará en un gran exceso de metanol frío con ácido clorhídrico diluido (para neutralizar el residuo de catalizador). Finalmente el polímero se secará al vacío durante 72 h. La precipitación se recomienda realizarla varias veces, para asegurar que el polímero este lo más puro posible.⁴⁵

Del polímero una vez precipitado, también se tomarán muestras para su análisis por MALDI.

Si bien, no constituye el objetivo central de este estudio, las muestras del polímero serán también caracterizadas mediante el resto de técnicas habituales en polímeros como son el análisis por resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{HNMR}$) y la cromatografía de exclusión por tamaños (SEC), cuyos resultados permitirán contrastar y evaluar los obtenidos mediante MALDI-TOF.

8.2.3 Preparación de la muestra para análisis MALDI

De acuerdo con el procedimiento descrito, una solución de la matriz, ácido 2,5-dihidroxibenzoico, (DHB) de 5 mg/mL, se disolverá en THF purificado (10 mg/mL) y la solución se mezclará con el polímero en una relación de 25: 1⁴³, y se añadirán 2 mg/mL de CuTFA ³⁴. Finalmente, mediante una micropipeta, se tomarán pequeñas cantidades de la mezcla y se depositarán sobre la placa metálica dejando que el disolvente se evapore a temperatura ambiente.

8.2.4 Análisis MALDI-TOF

Según la literatura para la observación exitosa de especies que contienen Sn (II) por MALDI-TOF requiere que se cumplan dos requisitos previos.

Primero, la concentración inicial de Sn (Oct)₂ debe ser lo suficientemente alta, y segundo, que se debe tener mucho cuidado al preparar y manipular las soluciones de polímeros para evitar la hidrólisis, si hay agua en el sistema, ya que los enlaces Sn (II) - O se hidrolizarían antes de realizar el experimento MALDI.

Si se requiere detectar las especies que forman las cadenas en crecimiento es precisa una alta concentración inicial de Sn (Oct)₂ para obtener un polímero con una masa molar suficientemente baja con el fin de observar la característica distribución isotópica del estaño en MALDI. Esta tiene su origen en la abundancia de los diferentes isótopos estables de una determinada especie con Sn que existen en una muestra.⁴³

Como se puede observar en la Figura 27, la presencia de los átomos de estaño en MALDI, se manifiesta en al menos dos efectos: la señal presenta un mayor número de picos, en comparación con las muestras que no contienen estaño, y disminuye considerablemente la altura de la señal. Esto resulta de una combinación de la distribución isotópica de los átomos de estaño y carbono.

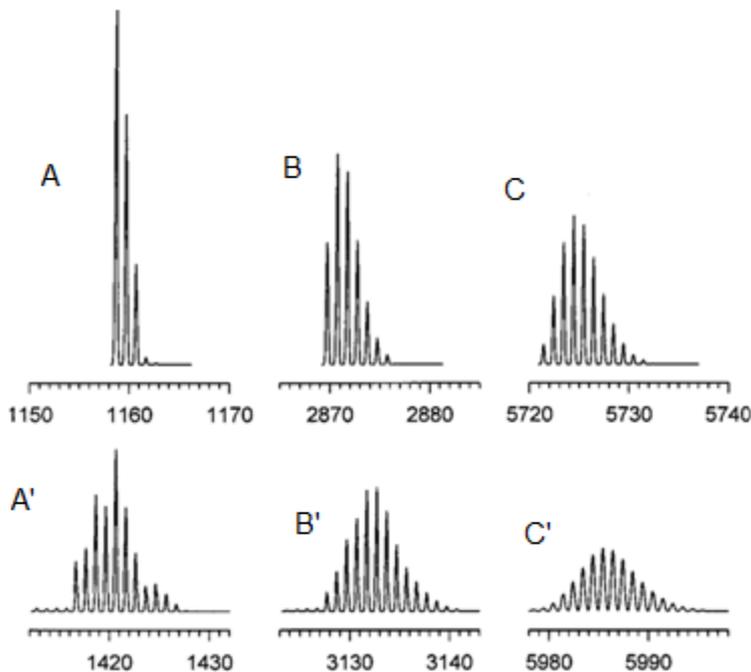


Figura 27: Comparación de la distribución de masas de oligómeros de la ϵ -caprolactona a diferente número de cadenas, (A-C) HO[OC(CH₂)₅O]_nH (A'-C') HO[OC(CH₂)₅O]_nHSnOct; (A,A') n=10, (B,B') n=25, (C,C') n=50.⁴³

La distribución de pesos moleculares y los distintos promedios de peso molecular determinados (M_n , M_w , y M_w/M_n) por MALDI pueden ser comparados con los determinados por cromatografía de exclusión.

Para el ejemplo que se muestra en la Figura 3 los valores encontrados fueron $M_n=800$, $M_w= 1424$ y $M_w/M_n= 1,78$.⁴³

Por otra parte el análisis de la estructura fina del espectro MALDI debe permitir determinar la estructura de las diferentes especies contenidas en la mezcla. que en algunos casos podrían ser detectadas también por ^1H NMR.

La Figura 28 muestra a título de ejemplo el espectro MALDI-TOF de una policaprolactona (PCL) preparada con un sistema iniciador $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ / butanol.

Los iones más abundantes pueden identificarse como cadenas de los oligómeros de $\text{Bu}(\text{CL})_n\text{Oct}$ catiónizados con iones Na^+ .

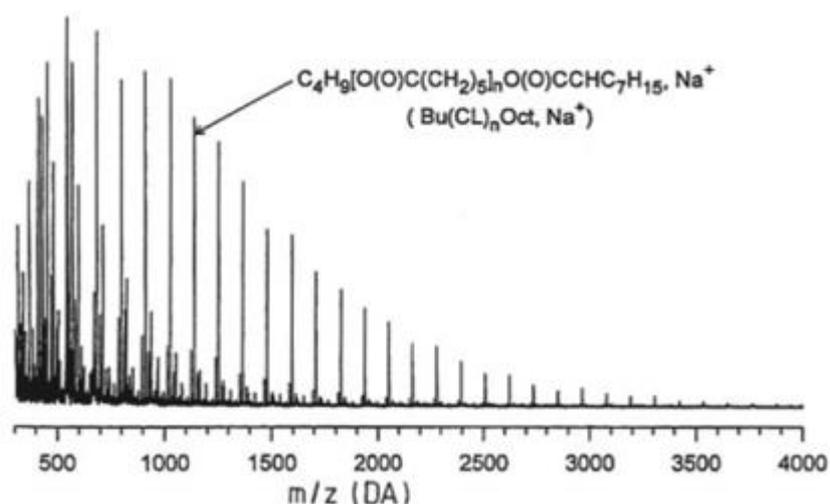


Figura 28: Espectro MALDI-TOF de la reacción de ϵ -caprolactona con octoato estanoso, cationizada por Na^+ .⁴³

El espectro muestra una serie de señales de diferente intensidad que pueden asignarse para una obtener una información más detallada. De esta forma podemos analizar con detalle un determinado rango de masa molar representativo, como por ejemplo (de 1000 a 1550 Da) en este caso (Figura 29).

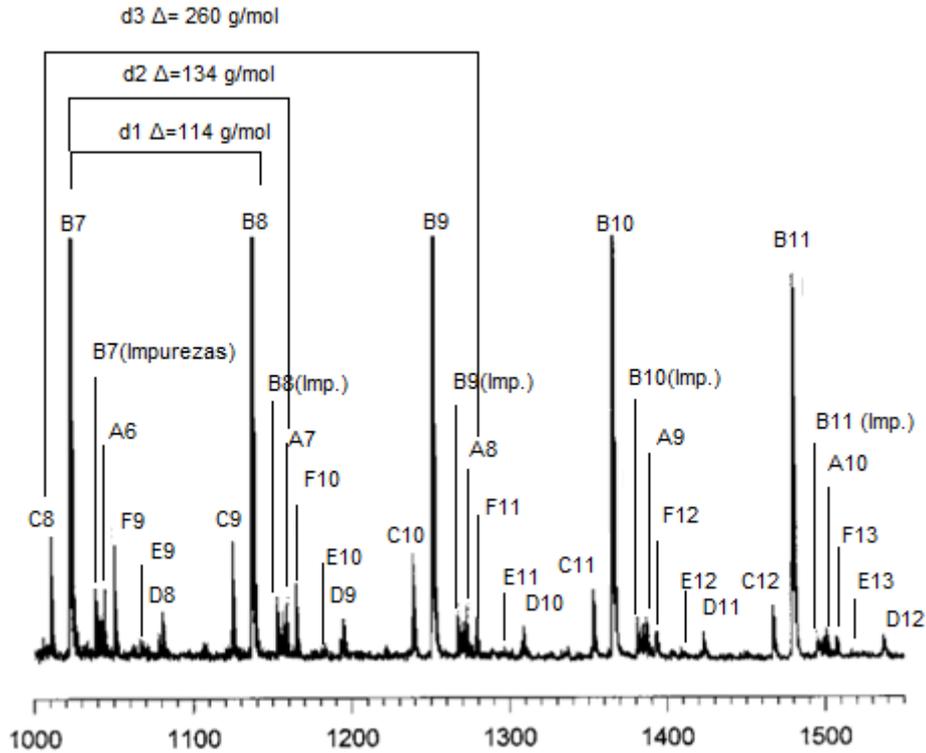


Figura 29: Espectro MALDI-TOF de la reacción de ϵ -caprolactona con octoato estano, cationizada por Na^+ , en un rango de 1000-1550 Da.³⁷

En este rango puede detectarse la formación de al menos seis poblaciones diferentes compuestos (Figura 30). Los diferentes picos del espectro de masas corresponden a las especies siguientes:

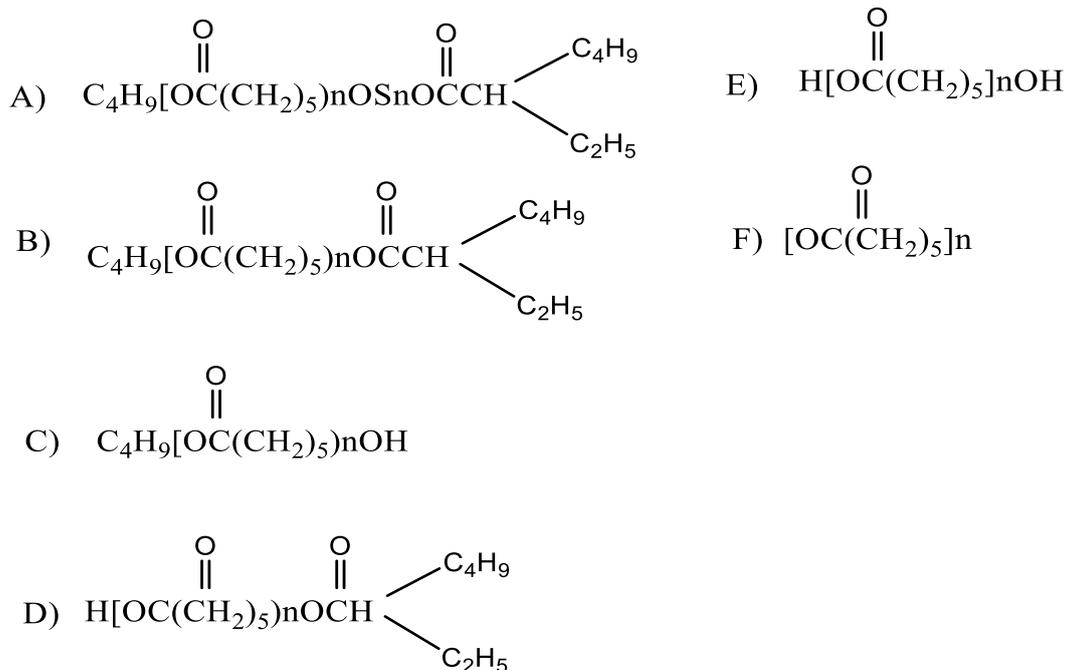


Figura 30: Compuestos formados en la reacción de ϵ -caprolactona con octoato estano.³⁷

Se puede observar que los compuestos A y C, respectivamente forman parte del mecanismo descrito anteriormente, A es el resultado de la fase iniciadora, y C el resultado de la transferencia de cadena.

En el espectro se pueden observar tres distribuciones principales, la distribución 1 (d1), sería la que resulta de las mismas especies con diferentes unidades repetitivas de CL. Así para cada distribución los picos están separados exactamente por 114 g/mol, que corresponde al peso molecular de la unidad repetitiva de la caprolactona.

La distribución 2 (d2) correspondería a las especies A y B, cuyos picos presentan una diferencia de masa de 134 g/mol, correspondientes al peso del Sn (118)+ O (16).

La distribución 3 (d3) correspondería a las especies originadas en el proceso de propagación (A) y en el de transferencia de cadena. El proceso de propagación contiene parte del catalizador Sn(Oct)₂, el cual solo contiene 8 carbonos ya que el resto de carbonos del catalizador se pierden en la reacción con el iniciador. Como consecuencia, la diferencia de peso respecto a la especie resultante de la transferencia de cadena debería de ser de 261 g/mol, 8 C (12) + 2 O (16) + Sn (118) + 15 H(1). A esta diferencia debe restarse el peso de un hidrogeno que forma parte del hidroxilo final de la cadena y que se adquiere al hidrolizarse el alcóxido final. Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, los picos de esta distribución aparecen con una diferencia de 260 g/mol.⁴⁶

Todas las señales observadas en el espectro MALDI utilizado como ejemplo, se deben a iones macromoleculares [M + Na], excepto una serie que pueden estar ionizadas por otros metales que se pueden encontrar como impurezas en la muestra o que simplemente formen parte de la sal añadida o de los reactivos utilizados durante los distintos tratamientos.

En la Figura 29, se pueden observar los picos de una cationizada por otro metal, este caso K⁺ (B Impurezas) que aparecen a una masa superior a los cationizados con Na.³⁷

En el caso de usar un agente cationizante basado en Cu⁺, como es el propuesto en este proyecto, probablemente también se observarían los picos correspondientes a las especies cationizadas con Na⁺ y K⁺ ya que estos cationes se encuentra en la práctica totalidad de reactivos de laboratorio comerciales.

En la investigación de las muestras de polímero posteriores al proceso de purificación por precipitación y secado esperaríamos encontrar cadenas de PCL libres de estaño.

En el estudio de la polimerización en condiciones de baja concentración de Sn(Oct)₂ / ROH, debería esperarse que solo se formaran dos poblaciones de macromoléculas PCL, correspondientes a las especies C y F.

C correspondería a las cadenas iniciadas por el grupo butóxido y terminadas con un grupo hidroxilo después de la hidrólisis de extremo en crecimiento durante el procesado y precipitación de la PCL. F correspondería a los oligómeros cíclicos que generalmente ocurre en la polimerización de ésteres cíclicos. También podían detectarse poblaciones de picos E que indicarían que el proceso de secado de todo el sistema de polimerización ha sido deficiente y se han iniciado cadenas con las trazas de humedad existente.

En conclusión, los análisis de MALDI-TOF permiten revelar las diferentes especies y procesos que tienen lugar durante la polimerización de ϵ -caprolactona usando octoato de estaño como catalizador y butanol como iniciador.

De esta forma, la técnica MALDI no solo permite analizar la composición de las muestras de PCL obtenidas después del procesado, sino que también algunas de las especies organometálicas implicadas en el proceso de polimerización y así ayudarnos a entender también parte del mecanismo.

9. Conclusiones

- 1.- El estudio bibliográfico ha permitido establecer que el mejor procedimiento para obtener PCL de elevado peso molecular y baja polidispersidad consiste en la polimerización por apertura de anillo mediante un mecanismo de coordinación-inserción utilizando catalizadores como el octoato de estaño.
- 2.- De acuerdo con la bibliografía las mejores condiciones de polimerización se alcanzan utilizando alcoholes primarios como iniciadores y bajas concentraciones de octoato de estaño a temperaturas de alrededor de 120 °C.
- 3.- El estudio bibliográfico ha permitido también establecer que las condiciones más apropiadas para el análisis de la PCL por UV-MALDI-TOF consisten en la preparación de la muestra por el método de coprecipitación utilizando DHB como matriz, CuTFA como agente cationizante y THF como disolvente.
- 4.- La revisión bibliográfica ha permitido constatar que la técnica de MALDI-TOF no solo permite evaluar el peso molecular y la distribución de pesos moleculares, sino también determinar las diferentes especies que se forman durante la polimerización y que determinan la estructura del polímero final.
- 5.- Las diferentes evidencias bibliográficas han permitido establecer un plan de trabajo adecuado para la investigación de la polimerización de la ϵ -caprolactona utilizando octoato de estaño como catalizador.

- 1.- *The bibliographic study allowed to establish the best procedure to obtain PCL of high molecular weight and low polydispersity is ring-opening polymerization through a coordination-insertion mechanism using tin octoate as catalysts.*
- 2.- *According to bibliography, best polymerization conditions are achieved by using primary alcohols as initiators and low concentrations of tin octoate at temperatures about 120 °C.*
- 3.- *The bibliographic study has also established that the most appropriate conditions for the analysis of PCL by UV-MALDI-TOF consist of preparing the sample by the co-precipitation method using DHB as the matrix, CuTFA as the cationizing agent and THF as a solvent.*
- 4.- *Bibliographic review has confirmed that MALDI-TOF analysis not only allows evaluating molecular weight and molecular weights distribution, but also determining the different species formed during polymerization which determine the structure of the final polymer.*
- 5.-*The different bibliographic evidences have led to establish an adequate work plan for the investigation of the ϵ -caprolactone polymerization using tin octoate as a catalyst.*

10. Bibliografía

- (1) Hermida, É. *Polímeros*. Buenos Aires: Instituto Nacional de Educación Tecnológica, **2011**, pp.14-16.
- (2) Ouellette, R. and Rawn, J. *Organic Chemistry Study Guide*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, **2015**, pp.31-46.
- (3) Rosato, Dominick V.; Rosato, Donald V.; Rosato, Matthew V. *Plastic product material and process selection handbook*. Elsevier, **2004**; pp. 85.
- (4) Cavani, F., Raabova, K., Bigi, F. and Quarantelli, C. *A Rationale of the Baeyer-Villiger Oxidation of Cyclohexanone to ϵ -Caprolactone with Hydrogen Peroxide: Unprecedented Evidence for a Radical Mechanism Controlling Reactivity*. *Chemistry - Chem. Eur. J.*, **2010**. 16(43), 12962-12969.
- (5) Buntara, T., Noel, S., Phua, P., Melián-Cabrera, I., de Vries, J. and Heeres, H., *Caprolactam from Renewable Resources: Catalytic Conversion of 5-Hydroxymethylfurfural into Caprolactone*. *Angew. Chem*, **2011**, 123(31), 7221-7225.
- (6) Beerthuis, R., Rothenberg, G. and Shiju, N., *ChemInform Abstract: Catalytic Routes Towards Acrylic Acid, Adipic Acid and ϵ -Caprolactam Starting from Biorenewables*. *ChemInform*, **2015**, 46(20), 1341-1361.
- (7) Guarino, V., Gentile, G., Sorrentino, L. and Ambrosio, L. *Polycaprolactone: Synthesis, Properties, and Applications*. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, **2017**, 1-36.
- (8) Ellis, B. and Smith, R. *Polymers*. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis Group, **2009**; pp.127.
- (9) Ebnesajjad, S. *Plastic Films In Food Packaging*. Oxford: William Andrew, **2013**, pp.217-248.
- (10) Ortega-Toro, R., Santagata, G., Gomez d'Ayala, G., Cerruti, P., Talens Oliag, P., Chiralt Boix, M. and Malinconico, M., Enhancement of interfacial adhesion between starch and grafted poly(ϵ -caprolactone). *Carbohydrate Polymers*, **2016**, 147, 16-27.
- (11) Cameron, R. and Kamvari-Moghaddam, A. Synthetic bioresorbable polymers. *Durability and Reliability of Medical Polymers*, **2012**, 96-118.
- (12) *Policaprolactona (PCL)*. Available at: <https://tecnologiadelosplasticos.blogspot.com/2012/11/policaprolactona-pcl.html> 2012 (accessed May 10, 2020).

- (13) elperiodico. *La Impresión De Tejido Humano En 3D Ya Es Una Realidad*. Available at: <<https://www.elperiodico.com/es/extra/20170620/tejidos-humanos-imprimidos-en-3d-en-investigacion-espanola-6117740>>.2017(accessed May 10, 2020)
- (14) Plasticsheet-es.com. *Línea De Producción De Placas Plásticas De Grado Médico / Producción De Placas Termoplásticas / Xiaoshan*. Available at: <<http://plasticsheet-es.com/5-polycaprolactone-sheet-extrusion-line.html>>. (accessed May 10, 2020)
- (15) Yuan, M., Xiong, C. and Deng, X., Ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone initiated by cyclopentadienyl sodium. *J. Appl. Polym. Sci.*, **1998**, 67(7),1273-1276.
- (16) Stridsberg, K., Ryner, M. and Albertsson, A., Controlled Ring-Opening Polymerization: Polymers with designed Macromolecular Architecture. *ADV POLYM SCI*, **2002**,41-65.
- (17) Agarwal, S., Chemistry, chances and limitations of the radical ring-opening polymerization of cyclic ketene acetals for the synthesis of degradable polyesters. *Polym. Chem*, 1(7), **2010**, 953-958.
- (18) Labet, M. and Thielemans, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chem. Soc. Rev.*,**2009**,38(12), 3484-3486.
- (19) Hoffmann, E. and Stroobant, V. *Mass Spectrometry*. Chichester: John Wiley & Sons,**2012**, pp.1-10.
- (20) Corral, A.,. *FUNDAMENTOS Y FUNCIONES DE LA ESPECTROMETRIA DE MASAS*. [online] ,**2006**, pp.2-5. Available at: <<http://mural.uv.es/calooan/>>. (accessed May 25, 2020)
- (21) Watson, J. and Sparkman, O. *Introduction To Mass Spectrometry*. Chichester: Wiley, **2011**,pp.4-6.
- (22) Koichi Tanaka. [online] <https://en.wikipedia.org/wiki/Koichi_Tanaka> (accessed May 27, 2020).
- (23) Alicante, S., 2020. *ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MALDI-TOF)*. *Servicios Técnicos De Investigación*. <<https://ssti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-genomica-y-proteomica/espectrometria-de-masas-maldi-tof.html>>(accessed May 27, 2020)
- (24) Montaudo G, Samperi F, Montaudo MS. Characterization of synthetic polymers by MALDI-MS. *Prog. Polym. Sci.*, **2006**; 31: pp.277-279.
- (25) Hosseini, S. and Martinez-Chapa, S. *Fundamentals Of MALDI-Tof-MS Analysis*. 1st ed. Signapore: Springer,**2007**, pp.2-3. (accessed May 31, 2020)

- (26) Hurtado Castillo, P., *Estudio De Agregados Supramoleculares Mediante Técnicas De Desorción/Ionización Y Espectroscopia Láser. Universidad Pablo de Olavide. 2012*, pp.5-60.
- (27) *Msr.dom.wustl.edu. Biomedical Mass Spectrometry Resource | WUSTL.Edu » MALDI Sample Preparation Dried-Droplet Crystallization. [online] Available at: <<https://msr.dom.wustl.edu/maldi-sample-preparation-dried-droplet-crystallization/>> (accessed June 1, 2020)*
- (28) O. Vorm, P. Roepstorff, M. Mann. *Improved resolution and very high sensitivity in MALDI TOF of matrix surfaces made by fast evaporation. Anal. Chem*, **1994**, 66 (19): 3281-3287.
- (29) Kussmann M, Roepstorff P. *Sample preparation techniques for peptides and proteins analyzed by MALDI-MS. Methods Mol. Bio. 2000; pp.405–424.*
- (30) V. Horneffer, K. Dreisewerd, H.C. Lüdemann, F. Hillenkamp, M. Läge, K. Strupat. *A study of five positional isomers of dihydroxybenzoic acid. Int. J. Mass Spectrom*, **1998**, 859-870.
- (31) S. Trimpin, A. Rouhanipour, R. Az, H.J. Räder, K. Müllen. *New aspects in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a universal solvent-free sample preparation. 15, 2001*, 1364-1373.
- (32) Alonso García, F. *El Uso De Distintas Matrices De Matrices MALDI-MS Para El Análisis De Proteínas Intactas Y Su Comparación Con ESI-MSI. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Oviedo; 2014. , pp.11-13.*
- (33) Gil Gonzalo, A., *Espectrometría MALDI-TOF Aplicada A Levaduras Enológicas: Identificación. Trabajo fin de grado. Universidad de Valladolid; 2019, pp.11-15.*
- (34) Rivas Becerra, D. *"Aplicación de MALDI-TOF Imaging y HPLC-MS/MS al estudio de la degradación del polímero policaprolactonadiol en diferentes medios acuáticos". Tesis doctoral, UPC, Departament d'Enginyeria Civil i Ambiental, 2017. pp.65-108.*
- (35) Velasco Aparicio, F., *Analizadores De Proceso En Línea. Madrid: Díaz de Santos, 2015*, pp.94-95.
- (36) Li, L., 2009. *Maldi Mass Spectrometry For Synthetic Polymer Analysis. Wiley, 2009, pp.10-1,11-16,146-149.*
- (37) Pasch, H. and Schrepp, W., *MALDI-TOF Mass Spectrometry Of Synthetic Polymers. Berlin: Springer, 2003.*, pp.38-42, 73,162-167.
- (38) Arbaoui, A. and Redshaw, C. *Metal catalysts for ϵ -caprolactone polymerisation. Polym. Chem., 1(6), 2010*, 801-826.

- (39) Guillaume, S., 2017. Handbook Of Telechelic Polyesters, Polycarbonates, And Polyethers. Pan Stanford Publishing, pp.210-218.
- (40) Biela, T., Kowalski, A., Libiszowski, J., Duda, A., and Penczek, S., Progress in polymerization of cyclic esters: mechanisms and synthetic applications, *Macromol. Symp.*, **2006**, 240, 47-55.
- (41) Storey, R. and Sherman, J.,. Kinetics and Mechanism of the Stannous Octoate-Catalyzed Bulk Polymerization of ϵ -Caprolactone. *Macromolecules*, **2002**,35(5), pp.1504-1512.
- (42) Maldi.nist.gov. n.d. MALDI Recipes. [online] Available at: <<https://maldi.nist.gov/>>. (accessed June 15, 2020)
- (43) Kowalski, A., Duda, A., & Penczek, S. Macromolecules Fitted with Tin(II) Alkoxide Species Observed Directly in MALDI-TOF Spectra. *Macromolecules*, **2000** 33(3), 689-695.
- (44) Stjerndahl, A., Finne-Wistrand, A., Albertsson, A., Bäckesjö, C., & Lindgren, U. Minimization of residual tin in the controlled Sn(II)octoate-catalyzed polymerization of ϵ -caprolactone. *J. Biomed. Mater. Res*,**2008**. 87A(4), 1086-1091.
- (45) Sobczak, M. Synthesis and characterization of polyester conjugates of ciprofloxacin. *Eur. J. Med. Chem*, 45(9), **2010**. 3844-3849
- (46) Storey, R., Brister, L. and Sherman, J. STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF POLY(ϵ -CAPROLACTONE) AND POLY(ϵ -CAPROLACTONE-*b*-ISOBUTYLENE-*b*- ϵ -CAPROLACTONE) BLOCK COPOLYMERS BY MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY. *J. Macromol. Sci. A*, 38(2), **2001**, 107-122.
- (47) Chen, H., He, M., Chen, Z. and Zhou, C. The cationization mechanism study of novel oligo (p-phenyleneethynylene)s. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*, 16(10), **2005**,1695-1701.
- (48) Weber, M., *Handbook Of Laser Wavelengths*. Boca Raton, Fla.: CRC Press,**1999**.