

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 102**

51 Int. Cl.:

C08J 3/20 (2006.01)

C08L 67/04 (2006.01)

C12N 9/14 (2006.01)

C12N 11/04 (2006.01)

C12N 11/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2012** **PCT/FR2012/053014**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013** **WO13093355**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2012** **E 12816748 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018** **EP 2794730**

54 Título: **Procedimiento de preparación de aleación de polímero/entidades biológicas**

30 Prioridad:

20.12.2011 FR 1162045

29.02.2012 FR 1251852

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.07.2018

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%)**

3, rue Michel-Ange

75794 Paris Cedex 16, FR;

UNIVERSITE DE POITIERS (33.3%) y

**VALAGRO CARBONE RENOUVELABLE POITOU-
CHARENTES (33.3%)**

72 Inventor/es:

FERREIRA, THIERRY;

BATAILLE, FRÉDÉRIC;

DEVER, CÉDRIC y

BARBIER, JACQUES

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 677 102 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de preparación de aleación de polímero/entidades biológicas

La presente descripción se refiere a un procedimiento para la preparación de materiales poliméricos derivados de la industria petroquímica y/o de origen biológico que comprenden en su composición entidades biológicas seleccionadas de enzimas y microorganismos que permiten degradarlos.

Los materiales poliméricos se han usado intensamente en los últimos años, particularmente en el campo de los plásticos. Esta explotación intensiva para usos habituales se ha traducido en la acumulación de plásticos en nuestro medio ambiente, fuente de molestia visual, de saturación en vertederos y de contaminación de suelos y medios marítimos. Además, debido a sus propiedades intrínsecas, en particular su propiedad de resistencia a la degradación, el tratamiento de desechos derivados de estos materiales constituye actualmente un problema ambiental y económico real.

Se han propuesto varias soluciones, entre ellas materiales plásticos biodegradables. Su formulación apunta en particular a adaptarse a una degradación por microorganismos del medio ambiente. Sin embargo, esta degradación generalmente se lleva a cabo parcialmente. Además, requiere condiciones extremadamente favorables detalladas en particular en la normal EN 13432. Estas condiciones se dan en circunstancias artificiales, como los composts industriales. Por ejemplo, estos materiales se degradan generalmente a temperaturas superiores a 40°C. Estas condiciones de temperatura son caras de implementar, tanto desde el punto de vista energético como financiero.

Las alternativas convencionales para el tratamiento de residuos, tales como la incineración o depósito en vertederos, resultan perjudiciales incluso cuando se aplican a materiales poliméricos biodegradables, y su degradación no tiene lugar por completo.

Además, los materiales biodegradables presentan propiedades físicas alteradas, particularmente en términos de resistencia a la humedad, a la temperatura y al alargamiento mecánico. Estas deficiencias los hacen inadecuados a una utilización en las operaciones clásicas de transformación del plástico tales como inyección o extrusión, e incompatibles con las aplicaciones previstas.

Por tanto, estos materiales biodegradables, aunque prometedores, no responden a los requisitos industriales y a los requisitos medioambientales.

Se han propuesto también materiales constituidos por polímeros con adición de una carga vegetal para mejorar la degradabilidad de dichos materiales. Ahora bien, esta degradación era debida a la única degradación de dicha carga vegetal, lo que conduce necesariamente a una degradación parcial. Además, tal solución ha demostrado ser insuficiente, ya que no permite la conservación de las propiedades mecánicas del polímero. Por tanto, dicho material también está limitado en cuanto a sus usos en el campo de los plásticos.

Por tanto existe una necesidad de materiales biodegradables, que presenten características mecánicas equivalentes a las de los plásticos de origen petroquímico y adaptadas para sus utilizaciones en las operaciones convencionales de la transformación del plástico, y que puedan dichos materiales ser degradados totalmente a una velocidad de degradación aceptable, y esto en condiciones de temperatura, de pH y de humedad compatibles con las que se encuentran en el entorno natural.

Después de largas y exhaustivas investigaciones, los inventores han desarrollado un procedimiento para preparar materiales poliméricos que comprenden en su composición entidades biológicas que permiten degradarlos. Los materiales poliméricos, o aleaciones de polímero/entidades biológicas así obtenidos presentan propiedades fisicoquímicas que permiten la degradación de manera total en condición acuosa mientras permanecen estables en estado sólido.

Por tanto, la presente descripción se refiere a un procedimiento para preparar una aleación de polímero/entidades biológicas que comprende una etapa de mezcla de un polímero y entidades biológicas que lo degradan durante un tratamiento térmico, realizándose dicho tratamiento térmico a una temperatura T superior a la temperatura ambiente y siendo dichas entidades biológicas resistentes a dicha temperatura T, caracterizado por que dichas entidades biológicas se seleccionan de las enzimas que degradan dicho polímero y de los microorganismos que degradan dicho polímero. Sorprendente e inesperadamente, los inventores han demostrado que dicho procedimiento permite la inclusión de entidades biológicas en la estructura misma del polímero sólido, mientras se mantiene la actividad enzimática de dichas entidades biológicas.

Sin desear estar ligado a la teoría, cuando dicha entidad biológica es una enzima, los inventores presentan la hipótesis según la cual el aumento de la temperatura va acompañado de una vaporización de los hidroxilos del polímero que hace que la enzima sea activa. Tal activación de la enzima genera un inicio de hidrólisis del polímero y por tanto una vitrificación que recubre dicha enzima. La enzima entonces está protegida.

Los inventores también han demostrado que la presencia de la entidad biológica mejora sustancialmente la degradabilidad de dicha aleación, y esto sin alterar las propiedades mecánicas del polímero. Además, las

propiedades mecánicas de dicha aleación son muy similares, incluso idénticas a las propiedades mecánicas del polímero solo. Estas propiedades se pueden determinar mediante la medida de la resiliencia, índice de fluidez en caliente, parámetros de tracción tales como la tensión de tracción máxima, alargamiento en rotura o incluso el módulo de Young en tracción. Además, la aleación obtenida según el procedimiento de la invención es muy apropiada para operaciones convencionales de transformación del plástico.

Sorprendentemente, los inventores han demostrado que la entidad biológica mantiene su actividad enzimática en la aleación de la invención. Además, dicha aleación permanece estable cuando no está en disolución. Por tanto, la entidad biológica se activa únicamente solo cuando la aleación de la invención se coloca en disolución. Asimismo, la presencia de estas entidades biológicas permite el control de las condiciones y de la velocidad de degradación de la aleación de la invención.

Por tanto, las aleaciones de la invención tienen la ventaja de ser estables cuando no se colocan en disolución, lo que por una parte facilita el almacenamiento y transporte del material y por otra parte indica la existencia de un efecto de "liberación" (o un efecto de retardo) de la activación de la entidad biológica. Tal efecto de liberación es muy ventajoso puesto que permite controlar la activación de la actividad enzimática y de la degradación de la aleación de la invención.

Por "aleación de polímero/entidades biológicas" o "aleación de la invención" se entiende un polímero que comprende en su composición entidades biológicas que permiten degradarlo. Por tanto, esta expresión abarca aleaciones de polímero/enzimas y aleaciones de polímero/microorganismos.

Por "entidad biológica" se entiende una enzima o un microorganismo. En el contexto de la presente invención, dicha entidad biológica tiene por característica la posibilidad de degradar un polímero de interés.

Por "aleación de polímero/enzimas" se entiende un polímero que comprende en su composición enzimas que permiten degradarlos. Preferiblemente, dicho polímero es un polímero biodegradable. La utilización de un polímero biodegradable como material de partida para la implementación del procedimiento permite obtener una aleación de polímero/enzimas que presenta propiedades de degradación más ventajosas.

Por "aleación de polímero/microorganismos" se entiende un polímero que comprende en su composición microorganismos que permiten degradarlo. Típicamente, estos microorganismos producen enzimas que degradan dicho polímero.

Por "tratamiento térmico" se entiende cualquier operación de transformación de polímero durante un aumento de la temperatura de dicho polímero, preferiblemente a una temperatura superior a la temperatura ambiente, y más preferiblemente a una temperatura superior a 50°C. Preferiblemente, dicho tratamiento térmico permite la inclusión de la entidad biológica. Más preferiblemente, dicho tratamiento térmico consiste en una operación seleccionada entre extrusión, inyección, termoformado, moldeo rotacional, compresión, calandrado, calderería, revestimiento, estratificación, expansión, pultrusión, extrusión-soplado, extrusión-inflado, y compresión-granulación. Estas operaciones se pueden llevar a cabo en polímeros en estado líquido y/o sólido. En un modo de realización preferido, el polímero está en estado sólido. En otro modo de realización, dicho polímero está en forma de sirope.

Por "temperatura ambiente" se entiende generalmente una temperatura comprendida entre 20°C y 30°C, más preferiblemente una temperatura de aproximadamente 25°C.

Por "extrusión" se entiende la preparación de un polímero en una forma deseada, a partir de un material en forma de gránulos o de polvo, y esto por medio de una extrusora. Esta expresión incluye la extrusión perfilada, extrusión-soplado, extrusión-hinchado, extrusión-calandrado.

Esta etapa de extrusión se lleva a cabo a la temperatura de fusión de dicho polímero. El polímero está entonces en estado fundido parcial o completamente. Por tanto, esta temperatura depende de la naturaleza de dicho polímero y de la naturaleza de la entidad biológica de interés. Esta temperatura puede determinarse fácilmente por el experto en la técnica, a la luz de sus conocimientos generales. Bajo la acción de la temperatura y de la presión, dicho polímero biodegradable en estado fundido o parcialmente fundido se mezclará con otras materias primas, y en particular con entidades biológicas que lo degradan. Preferiblemente, dicha temperatura T está comprendida entre la temperatura de transición vítrea y la temperatura de fusión de dicho polímero. Más preferiblemente, dicha temperatura T es la temperatura de fusión de dicho polímero. Normalmente, dicha temperatura T depende de la naturaleza de dicho polímero y la naturaleza de la entidad biológica de interés y es superior a 50°C, preferiblemente superior a 60°C, preferiblemente superior a 70°, preferiblemente superior a 80°, preferiblemente superior a 90°, preferiblemente superior a 100°, preferiblemente superior a 120°, preferiblemente superior a 140°C, preferiblemente superior a 150°C. Normalmente, esta temperatura no sobrepasa los 300°C.

La principal función de la extrusora es permitir, por la acción de la temperatura y presión, el paso del polímero a través de una hilera que se encuentra en su extremo. Normalmente, una extrusora está compuesta por una o varias mangas calefactoras con diferentes grados de temperatura, uno o dos tornillos de Arquímedes que permitirán el transporte del material a lo largo de la manga, una tolva que permite el suministro en diferentes puntos del material a extrudir que se presenta en forma de gránulos o de harina, una hilera más o menos compleja que se encuentra en el

extremo de la manga y que permite dar la forma y el tamaño deseado al material plástico que sale continuamente. Preferiblemente, la etapa de extrusión se lleva a cabo por medio de una extrusora de tipo de dos tornillos BC21, comercializada bajo la denominación CLEXTRAL.

La implementación de esta etapa de extrusión entra en las competencias normales del experto en la técnica. Generalmente se realiza según las etapas siguientes:

- introducción de una mezcla de polímero y de entidades biológicas que lo degradan;
- paso de dicha mezcla a la extrusora;
- salida de una varilla a través de una hilera;
- enfriamiento de dicha varilla opcionalmente seguido de un secado;

- cortado en forma de gránulos regulares en función de la forma deseada; y

- secado, preferiblemente en horno turbo a una temperatura comprendida entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 60°C, aún más preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 50°C.

Normalmente, la relación de entidades biológicas/polímero en peso está comprendida entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 10%, preferiblemente entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 8%, preferiblemente entre aproximadamente 1% y aproximadamente 6%, preferiblemente entre aproximadamente 1% y aproximadamente 5%, preferiblemente entre aproximadamente 1% y aproximadamente 4%, preferiblemente entre aproximadamente 1% y aproximadamente 3%, preferiblemente entre aproximadamente 1,5% y aproximadamente 3%, y aún más preferiblemente esta relación es aproximadamente 2%. Esta relación está adaptada por el experto en la técnica en función de la naturaleza del polímero biodegradable, la naturaleza de las entidades biológicas utilizadas, y los resultados deseados, en particular en términos de degradabilidad de la aleación obtenida por el procedimiento.

Preferiblemente, el procedimiento comprende además la adición de una sustancia capaz de optimizar las capacidades de degradación de dichas entidades biológicas. Normalmente, cuando dichas entidades biológicas son enzimas, estas sustancias pueden ser cofactores de dichas enzimas, tales como cationes divalentes.

En el contexto de la presente descripción, el término “polímero” abarca polímeros derivados de la industria petroquímica, polímeros de origen biológico, y polímeros de biorreserva.

En un modo de realización particular, los polímeros relevantes en el contexto de la presente invención derivan de la industria petroquímica. El interés de estos polímeros es el control del proceso de polimerización y de los constituyentes básicos que permiten garantizar una transformación fácil. Normalmente, se trata de polímeros que contienen unidades monoméricas que comprenden enlaces hidrolizables, como los ésteres o amidas.

En otro modo de la invención, los polímeros relevantes en el contexto de la presente invención son los polímeros de origen biológico.

Por “polímero de origen biológico” se entiende un polímero derivado de recursos renovables. Estos polímeros de origen biológico se utilizan a veces en combinación con aditivos tales como plastificantes. Dicho polímero se selecciona de poli(caprolactona) (o CAPA), poli(ácido láctico), poli(tereftalato de etileno), poli(tereftalato de trimetileno), un polihidroxialcanoato de C₁-C₆, acetato de celulosa, poli(adipato-co-tereftalato de butileno), poli(succinato de butileno), poliamida PA11 y sus mezclas.

Más preferiblemente, dicho polímero es poli(ácido láctico) o PLA. El PLA tiene propiedades mecánicas parecidas a ciertos termoplásticos petroquímicos tales como poli(propileno).

Aún más preferiblemente, dicho polímero es poli(caprolactona) o CAPA.

En el marco de la presente invención, conviene seleccionar una entidad biológica, preferiblemente una enzima que sea resistente a la temperatura de implementación de la etapa de extrusión según el procedimiento de la invención. El experto en la técnica dispone de los conocimientos generales que le permiten determinar estas temperaturas e identificar entidades biológicas que resisten estas temperaturas.

Por “polímero biodegradable” se entiende un material susceptible de ser degradado por entidades biológicas. El resultado de la degradación de tales materiales es la formación de agua, dióxido de carbono y metano, y eventualmente subproductos. Los subproductos obtenidos durante la degradación de dichos polímeros no son tóxicos.

La norma NE 13432:2000 establece los requisitos relacionados con los embalajes valorizables por compostaje y biodegradación. Fija las características que un material debe presentar para ser definido como compostable. Se basa en los criterios siguientes:

- biodegradabilidad: se mide por la conversión metabólica del material en dióxido de carbono. Esta propiedad se mide utilizando el método normalizado EN 14046. La tasa de descomposición a alcanzar es de 90% en menos de 6 meses.
- 5 ➤ desintegración: se trata de la fragmentación del material y su falta de identificación visual en el compost final. Se mide por el método de compostaje EN 14045. El material se debe disgregar en presencia de residuos orgánicos en menos de tres meses. Después de este tiempo, el compost se tamiza con un tamiz de 2 mm. Los residuos del material que poseen un tamaño superior a 2 mm se consideran como no desintegrados. Esta fracción debe representar menos de 10% de la masa inicial.
- 10 ➤ Una baja proporción de metales pesados y la ausencia de efectos negativos en la calidad del compost: se realiza una prueba de crecimiento de plantas, según el método de la prueba 208 de la OECD, con una muestra de compost. Otros parámetros fisicoquímicos del compost no deben modificarse (en comparación con un compost que no contiene polímeros): salinidad, % de nitrógeno, de fósforo, de magnesio y de potasio.

En un primer modo de realización preferido, dichas entidades biológicas son enzimas, preferiblemente enzimas resistentes a la temperatura de extrusión.

- 15 Por “enzimas resistentes a la temperatura de extrusión” se entienden enzimas cuya estructura proteica y/o actividad enzimática no se ven afectadas por la temperatura a la que se lleva a cabo la etapa de extrusión según el procedimiento de la invención. Por tanto, estas enzimas son muy apropiadas para una utilización a temperaturas superiores a la temperatura ambiente.

Preferiblemente, dichas enzimas se seleccionan de enzimas termorresistentes y enzimas termoestabilizadas.

- 20 Por enzimas “termorresistentes” se entiende enzimas cuya naturaleza intrínseca proporciona resistencia a altas temperaturas, en particular a la temperatura a la que se lleva a cabo la etapa de extrusión según el procedimiento de la invención.

Preferiblemente, dichas enzimas termorresistentes se seleccionan de lipasa PS de *Pseudomonas cepacia*, lipasa B de *Candida antarctica*, proteinasa K, una despolimerasa de polihidroxialcanoato de C₁-C₆ y sus mezclas.

- 25 Por enzimas “termoestabilizadas” o “termoprotegidas” se entiende enzimas que no son naturalmente termorresistentes, pero que se presentan bajo una forma particular que les confiere una resistencia a la temperatura a la que se lleva a cabo la etapa de extrusión según el procedimiento de la invención. Preferiblemente, estas enzimas termoestabilizadas se obtienen por un procedimiento químico o físico.

- 30 Preferiblemente, dichas enzimas termoestabilizadas se seleccionan de enzimas encapsuladas en nanocápsulas constituidas por el mismo material que dicho polímero, enzimas encapsuladas en jaulas moleculares y enzimas agregadas entre sí.

- 35 Estas enzimas termoestabilizadas se pueden obtener por encapsulación de las enzimas no termorresistentes en nanocápsulas, preferiblemente nanocápsulas constituidas por el mismo material que dicho polímero. Las técnicas que permiten la encapsulación son muy conocidas por el experto en la técnica. Normalmente, esta encapsulación se lleva a cabo mediante la implementación de nanoemulsiones. Esta encapsulación de las enzimas permite el control de la activación de las enzimas. Este modo de realización es particularmente ventajoso para una utilización de las aleaciones de la invención en el envasado de productos alimenticios.

Estas enzimas termoestabilizadas se pueden obtener también por encapsulación de enzimas en jaulas moleculares. Tal encapsulación permite proteger dichas enzimas de cualquier degradación relacionada con la temperatura.

- 40 Por “jaula molecular” se entiende una molécula susceptible de insertarse en la estructura de dichas enzimas para estabilizarlas y hacerlas resistentes a temperaturas superiores a la temperatura ambiente.

Estas enzimas termoestabilizadas se pueden obtener también por agregación entre sí de enzimas no termorresistentes. El experto en la técnica dispone de suficientes conocimientos técnicos para implementar tal agregación.

- 45 En un modo de realización particular, dichas enzimas están en forma de apoenzimas, y se activan en presencia de cofactores.

En un segundo modo de realización, dichas entidades biológicas son microorganismos.

Normalmente, estos microorganismos son microorganismos susceptibles o no de esporular y producir enzimas que degradan polímeros de interés. Preferiblemente, estos microorganismos son bacterias, hongos o levaduras.

- 50 En este modo de realización, la aleación de la invención es una aleación de polímero/microorganismos, preferiblemente una aleación de poli(ácido láctico)/microorganismos.

Preferiblemente, dichos microorganismos se seleccionan de bacterias del género *Ochrobactrum*, bacterias que pertenecen al filo de las Firmicutes (*Firmus cutis*), bacterias de la clase bacilos, en particular cepas de bacterias *Bacillus cereus* spp. y más particularmente *Bacillus cereus* G9241, y cepas de bacterias *Bacillus clausii* spp.

- 5 Más preferiblemente, dicho microorganismo es una cepa de bacteria del género *Ochrobactrum*, llamada *Ochrobactrum* sp. 37S, y presentada según del Tratado de Budapest el 23 de julio de 2009 en nombre del Centro Nacional de la Investigación Científica en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos bajo el número CNCM I-4212, o una variante de dicha cepa, siendo dicha variante capaz de degradar poli(ácido láctico).

Preferiblemente, dicho polímero es poli(ácido láctico) y dichas entidades biológicas son bacterias (*Ochrobactrum* sp. 37S, degradando dichas bacterias el poli(ácido láctico).

- 10 Por “variante”, se entiende:

➤ una variante natural de una cepa, es decir, una variante obtenida espontáneamente a partir de una cepa tras incubación en un medio de selección. Por tanto, una variante natural se obtiene sin ninguna manipulación genética del operador, pero solamente por mutación natural de la cepa y selección de esta cepa mutada en un medio apropiado, o

- 15 ➤ una variante de una cepa que comprende al menos una mutación en su genoma, siendo dicha mutación inducida por ingeniería genética, por ejemplo por mutagénesis dirigida o mutagénesis aleatoria. Por ejemplo, la mutagénesis aleatoria se puede llevar a cabo por medio de mutágenos tales como las radiaciones (rayos UV, radiaciones ionizantes, calor) o compuestos químicos (ácido nitroso, metanosulfonato de etilo, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanina, N-etil-N-nitrosourea, naranja de acridina, proflavina, etc.).

- 20 Por “mutación” se entiende la adición, supresión o sustitución de al menos un nucleótido en el genoma de la cepa según la invención.

Además, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de una aleación de polímero/entidades biológicas que comprende las etapas siguientes:

- 25 i) selección de un polímero de poli(caprolactona), poli(ácido láctico), poli(tereftalato de etileno), poli(tereftalato de trimetileno), un polihidroxialcanoato de C1-C6, acetato de celulosa, poli(adipato-co-tereftalato de butileno), poli(succinato de butileno), poliamida PA 11, y sus mezclas.

ii) selección de entidades biológicas susceptibles de degradar dicho polímero y resistentes a una temperatura T superior a la temperatura ambiente; y

- 30 iii) mezcla de dicho polímero y dichas entidades biológicas durante un tratamiento térmico llevado a cabo a la temperatura T,

caracterizado por que dichas entidades biológicas se seleccionan de enzimas que degradan dicho polímero y microorganismos que degradan dicho polímero.

Todas las características descritas anteriormente se aplican a este procedimiento.

- 35 El procedimiento tiene la ventaja de ser compatible con los equipos utilizados tradicionalmente en la industria de transformación del plástico, lo que permite su implementación rápida y directa por los profesionales, sin modificación significativa de las herramientas de producción utilizadas convencionalmente, en particular las reservadas habitualmente para la elaboración de plásticos de origen petroquímico.

Además, el procedimiento de la invención no requiere la utilización de productos potencialmente peligrosos para la salud humana o el medio ambiente. Tampoco genera subproductos que puedan representar dicho peligro.

- 40 El procedimiento permite obtener una aleación de polímero/entidades biológicas “por encargo” incluyendo entidades biológicas, preferiblemente enzimas, en un polímero, preferiblemente un polímero biodegradable, lo que influye en la degradación de las aleaciones así obtenidas.

Por tanto, la presente descripción permite obtener una aleación de polímero/entidades biológicas, preferiblemente una aleación de polímero/enzimas única cuya velocidad de degradación es posible controlar.

- 45 Una lista no limitante de estas aleaciones de polímero/enzimas consiste en los pares de poli(caprolactona)/lipasa PS de *Pseudomonas cepacia*; poli(caprolactona)/lipasa B de *Candida antarctica*; poli(ácido láctico)/proteínasa K; polihidroxialcanoato de C1-C6/despolimerasa de polihidroxialcanoato de C1-C6.

- 50 Preferiblemente, la invención se refiere a un procedimiento para preparar una aleación de polímero/enzimas que comprende la extrusión de poli(caprolactona) con una lipasa, preferiblemente amanolipasa PS de *Pseudomonas cepacia*, a la temperatura de fusión de la poli(caprolactona) en una relación enzimas/polímero de 2% en peso. En efecto, los inventores han demostrado el hecho de que la aleación así obtenida se degrada totalmente al cabo de 4

meses en medio acuoso, mientras que la poli(caprolactona) sin suplemento de lipasa no se degrada durante este intervalo de tiempo.

Además los inventores han mostrado y ejemplificado el hecho de que una aleación de este tipo se degrada a temperaturas de extrusión de 80°C, 100°C, 120°C y 140°C.

- 5 También se describe una aleación de polímero/enzimas, caracterizada por que dichas enzimas degradan dicho polímero y están termoestabilizadas.

Estas aleaciones son muy ventajosas debido, por una parte, a su degradabilidad mejorada cuando se colocan en disolución acuosa y, por otra parte, a sus propiedades mecánicas adaptadas a sus usos en la industria. La inclusión de la enzima dentro de la aleación no altera las propiedades del polímero solo. Además, las propiedades mecánicas de dicha aleación son muy similares, incluso idénticas a las propiedades mecánicas del polímero solo.

- 10

Preferiblemente, dichas enzimas termoestabilizadas se seleccionan de enzimas encapsuladas en nanocápsulas constituidas por el mismo material que dicho polímero, enzimas encapsuladas en jaulas moleculares y enzimas agregadas entre sí.

- 15 Todas las características técnicas mencionadas anteriormente referentes a dicho polímero y dichas enzimas termoestabilizadas son aplicables a esta aleación.

Alternativamente, se describe una aleación de polímero/entidades biológicas caracterizada por que dicho polímero es poli(ácido láctico) y dichas entidades biológicas son bacterias *Ochrobactrum* sp. 37S, degradando dichas bacterias el poli(ácido láctico).

- 20 En otro aspecto, se describe la utilización de aleación de polímero/entidades biológicas en los sectores de la agricultura, horticultura, envasado, restauración, medio ambiente, transporte, textiles, electrónica y farmacia. En lo que sigue, las expresiones “aleación” y “aleación de polímero/entidades biológicas obtenidas según el procedimiento de la invención” se usan indistintamente.

- 25 Preferiblemente, se describe la utilización de la aleación en el sector de envasado, más preferiblemente para el envasado de productos alimenticios, en particular frutas y verduras y productos de panadería. Además, se describe la utilización de la aleación como envasado de alimentos de larga duración de conservación. En efecto, la aleación es muy adecuada para el contacto con productos alimenticios, ya que no tiene efectos adversos, es fácilmente degradable y constituye una barrera para el paso de dióxido de carbono, oxígeno y agua, evitando así la alteración de los alimentos.

- 30 También se describe la utilización de la aleación en el sector de la agricultura, en particular para la obtención de gránulos que comprenden productos fitosanitarios, películas de acolchado, películas de túnel y materiales para empalzar.

Además, se describe el uso de dicha aleación para la obtención de botellas.

Finalmente, se describe la utilización de la aleación en el campo de la medicina, en particular para la producción de suturas reabsorbibles y como vector de molécula terapéuticamente activa.

- 35 Preferiblemente, estas aleaciones se utilizan en forma de nanopartículas que contienen dicha molécula terapéuticamente activa. El experto en la técnica tiene conocimientos técnicos generales que le permiten preparar nanopartículas a partir de la aleación.

- 40 El interés de la utilización de las aleaciones en terapia es evidente en varios niveles. Por un lado, la degradación de la nanopartícula permite administrar el medicamento de manera progresiva en las células diana. Además, permite limitar los efectos secundarios relacionados con la acumulación de la molécula terapéutica en ciertos tejidos, tales como los órganos desintoxicantes como el hígado y el bazo. Finalmente, la biodegradabilidad de tales nanopartículas limitará los impactos potenciales sobre el medio ambiente, que están asociados con la difusión de las nanopartículas en el medio exterior a través de las secreciones naturales del paciente.

- 45 El procedimiento para preparar aleaciones según la invención permite obtener aleaciones que presentan una degradabilidad adaptada en función de la utilización deseada. Además, en un contexto terapéutico, el experto en la técnica será capaz de adaptar el procedimiento para obtener una aleación que no implique la acumulación de nanopartículas en ciertos órganos del paciente tratado, con el fin de evitar los efectos adversos que pueden estar asociados a la presencia de dichas nanopartículas.

- 50 El experto en la técnica deberá, además, adaptar la naturaleza de la molécula terapéuticamente activa encapsulada por la nanopartícula en función del tipo de patologías a tratar y de la naturaleza de la nanopartícula *per se*. En efecto, en función de las características fisicoquímicas de dicha nanopartícula (en particular su peso, tamaño, lipofilia, hidrofilia, y estado de ionización) es susceptible o no de cruzar la barrera transmembrana. Por tanto, la naturaleza de la nanopartícula influye sobre la distribución de la molécula terapéuticamente activa en el individuo en el que se administra la nanopartícula constituida por la aleación.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de aleaciones de polímero/enzimas según la invención

Materiales y métodos

1. Inclusión de enzimas en el material de partida durante la etapa de extrusión

- 5 La incorporación de enzimas en el polímero biodegradable de partida se realiza durante la denominada etapa de extrusión.

La etapa de extrusión se realiza mediante una extrusora de tipo de doble tornillo BC21 de marca CLEXTRAL (potencia de motor 9 kW, velocidad de tornillo max 600 rpm, amperaje máx 18,9 A). Los tornillos tienen un diámetro de 25 mm y el espacio entre los dos tornillos es 21 mm.

- 10 La longitud de la manga es 600 mm, o sea una relación L/d de 24.

La extrusión se realiza en 5 etapas:

- introducción de una mezcla de polímero biodegradable/enzimas,
- paso de dicha mezcla a la extrusora,
- salida de una varilla a través de una hilera circular de 3 mm de diámetro,

- 15 - enfriamiento de la varilla en una bandeja de agua fría de tres metros de largo, después "secado" por aire frío pulsado,

- corte en forma de gránulos regulares por un sistema con cuchilla giratoria.

Las formulaciones pueden variar en función de la relación polímero biodegradable/enzimas. En los experimentos presentados en esta solicitud, los resultados corresponden a una relación de 2% (m/m) de enzima en el material.

- 20 Los gránulos obtenidos por extrusión se ponen a secar después en horno turbo a 50°C durante 15 horas (turbo-mezclador dotado de una doble camisa de circulación de aceite) con el fin de eliminar el agua residual presente, debido al paso a la bandeja de agua. El seguimiento del porcentaje de humedad durante el secado se realiza gracias a un analizador de humedad dotado de resistencias infrarrojas.

2. Preparación de probetas – Inyección

- 25 Con el fin de evaluar las propiedades mecánicas de la aleación obtenida de polímero/enzimas, así como sus capacidades de degradación, se obtienen por inyección piezas moldeadas de formato estándar llamadas "probetas".

La inyección es un procedimiento discontinuo en lotes que permite la presentación de gránulos en productos terminados tridimensionales. El principio consiste en calentar el material plástico en la manga de alimentación para llevarlo al estado fundido, hacia la zona de dosificación y compresión para inyectarlo en el molde a través de un pistón. La pieza moldeada se enfría en el molde y después se expulsa.

- 30

La prensa de inyección que se ha utilizado es de la marca ARBURG, modelo Allrounder 1000-420C-250.

Las probetas inyectadas corresponden al tipo 1 de la norma ISO 3167.

Resultado

1. Selección de enzimas en medio líquido

- 35 Para la implementación del procedimiento, conviene identificar enzimas capaces de degradar el polímero biodegradable, con el fin de identificar el buen "par" de enzima/material que se utilizará durante la etapa de extrusión.

Hemos desarrollado dos pruebas simples con el fin de identificar las enzimas de interés. Estas pruebas se realizan en muestras de material puro en forma de probeta o de gránulos, respectivamente.

- 40 Las pruebas presentadas a continuación se han realizado en probetas o gránulos de poli(caprolactona) o CAPA (Perstorp; Ref. 6506; 50.000 g/mol). Los inventores han evaluado dos enzimas comerciales, conocidas por su capacidad para degradar la CAPA: lipasa PS de *Pseudomonas cepacia* y lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens* (Amano, Japón).

a) Pruebas en probetas

- 45 Las probetas de polímeros vírgenes sometidas a biodegradación son probetas resultantes de la inyección de los

gránulos de CAPA. Todas las pruebas de biodegradación se llevan a cabo en un horno y se termorregulan a 30°C.

Las pruebas presentadas en este estudio se han realizado en una disolución de nutrientes, cuya composición se define según la norma ISO 14852 : 1999. Alternativamente, la degradación también se puede evaluar en agua de la marca *Fontaine Cristalline*, es decir, un agua de manantial de composición constante que permite tener las mismas condiciones de medio.

Para estas pruebas, las probetas se mantienen completamente sumergidas en la disolución, con o sin la adición de enzimas a la concentración final de 200 mg/L.

El seguimiento de la degradación de los materiales se realiza por cálculo de la pérdida de masa de la muestra tras un tiempo definido de presencia en el medio.

Este método utiliza una serie de 13 probetas idénticas, cinco de las cuales se hornean a 103°C durante 48 horas con el fin de determinar la pérdida de agua de la muestra. Esta etapa permite realizar una corrección para el cálculo de la pérdida de masa de las muestras colocadas en biodegradación. Las otras 8 probetas se sumergen en el medio de degradación y se colocan en un horno termorregulado a 30°C. Después se tomarán al cabo de un tiempo establecido con el fin de seguir el comportamiento del material a lo largo del tiempo. Después de cada toma, las probetas se secan en horno a 103°C durante 48 horas y se pesan.

La pérdida de masa se calcula según la fórmula siguiente:

$$\Delta m = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} * 100$$

Δm entre temperatura ambiente y 103°C

Con m_i : masa inicial de la probeta

m_f : masa final de la probeta

Los resultados muestran que la presencia de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* no permite mejorar la biodegradabilidad de la poli(caprolactona) puesto que la tasa de degradación es sustancialmente la misma que cuando las enzimas no están presentes.

En cambio, en lo que respecta a la lipasa de *Pseudomonas cepacia* se constata una diferencia muy clara a partir de la primera toma realizada después de 7 días de contacto con el medio. En efecto, se obtiene una tasa de degradación del 5% mientras que en el mismo tiempo la muestra degradada en ausencia de enzima presenta solo una pérdida de masa del 0,2%. Sin embargo, se observa rápidamente una meseta y la tasa de biodegradación ya no cambia. Por tanto se decidió cambiar la disolución de nutrientes con enzimas adicionales (siempre a 200 mg/L de disolución nutritiva). Este cambio se realizó 44 días después del inicio de la degradación. Esto permitió observar una recuperación de la degradación hasta aproximadamente 9% en 70 días.

b) Pruebas en gránulos

La ventaja de este método es que permite trabajar en pequeños volúmenes de reacción, haciendo los experimentos sustancialmente menos costosos. Además, pueden probarse simultáneamente varias enzimas y varias concentraciones. Finalmente, la posibilidad de trabajar con altas concentraciones de enzimas permite obtener tasas de degradación importantes en cortos periodos de tiempo.

En este experimento, los gránulos de CAPA (volumen aproximado: 50 mm³; masa aproximada: 40 mg) se incubaron en 1,9 mL de tampón (tampón fosfato 25 mM, pH 7, azida sódica 2 g/L) con o sin adición de lipasa PS de *Pseudomonas cepacia* a la concentración final de 20 mg/mL. La incubación se realiza a 28°C. A intervalos de tiempo regulares, se toman los gránulos, se enjuagan abundantemente con agua antes de ser incubados durante 24 h a 28°C para el secado. La masa se determina entonces y se compara con la masa de partida, es decir, antes de la incubación en la mezcla de reacción.

Los resultados muestran una tasa de degradación de CAPA superior a 50% con lipasa PS de *Pseudomonas cepacia*, en las condiciones especificadas, confirmando los resultados obtenidos con las probetas.

Este protocolo se puede usar para la determinación de la enzima más relevante para su inclusión posterior en un polímero dado.

Además, también puede permitir identificar ciertos "aditivos" que tienen la propiedad de optimizar la actividad de degradación. Estos aditivos podrían entonces añadirse con la enzima en el material durante la etapa de extrusión, para acelerar la degradación del mismo.

2) Evaluación de la resistencia térmica de las enzimas para determinar la temperatura óptima de extrusión

Durante la etapa de extrusión, la mezcla de polímero/enzimas se somete a una temperatura elevada correspondiente a la temperatura de fusión del polímero. En el caso de la CAPA, establecimos esta temperatura de extrusión a 80°C. Según la hoja de datos técnicos del proveedor, la lipasa PS de *Pseudomonas cepacia* es estable en forma de polvo durante varias horas a 100°C.

- 5 Sin embargo, estos datos se refieren a la actividad lipasa de la enzima y no evalúan la resistencia térmica de su actividad despolimerasa de la CAPA.

Por tanto, realizamos el experimento en gránulos descrito anteriormente, pero tratando la disolución enzimática (20 mg/mL de enzima) durante 5 min a 80°C. El tiempo y temperatura seleccionados corresponden a condiciones térmicas cercanas a las encontradas durante la etapa de extrusión.

- 10 Los resultados muestran que este tratamiento tiene un pequeño impacto en la actividad enzimática de despolimerasa de CAPA. En efecto, los inventores han revelado solo 10% de pérdida de actividad a los 7 días. Se deduce que la lipasa PS de *Pseudomonas cepacia* es un excelente candidato para la realización de la aleación de CAPA/enzima.

3. Incorporación de la lipasa PS de *Pseudomonas cepacia* durante el proceso de aplicación de la poli(caprolactona)

- 15 Los inventores han realizado, por tanto, una extrusión de poli(caprolactona) incorporando dicha enzima. Para ello se coloca en un dosificador una mezcla de polímero en forma de polvo y de enzima en forma de polvo.

En los experimentos que se presentan en esta memoria, los caudales de estos dos dosificadores se ajustaron para obtener un porcentaje de enzima en el material de 2% (m/m). También se preparó una formulación sin enzima (control) (Tabla 1).

Formulación (% máscico)	Masa de enzima (g) en el dosificador	Masa de CAPA 6506 P (g) en el dosificador
98% m de CAPA 6506 + 2% m de lipasa	30	1500
100% m de CAPA 6506	0	1500

20 Tabla 1: Formulaciones realizadas en este estudio

La extrusión se realizó a 80°C, para tener una temperatura superior al punto de fusión de la CAPA (60°C), pero no demasiado alta, para evitar cualquier riesgo de desnaturalización de la enzima.

Los parámetros precisos de la extrusión, que se realizó en las mismas condiciones para las dos formulaciones, se presentan en la Tabla 2.

Formulación	Temperaturas de extrusión (zona 1 de hilera)	Velocidad BC 21, T/min	Presión, bar (kPa)	Par (%)
98% m de CAPA 6506 + 2% m de lipasa	18/20/39/65/67/72/68/65/71	256	71-74 (7.100-7.400)	53-54
100% m de CAPA 6506	20/20/40/65/65/69/65/65/65	256	73-75 (7.300-7.500)	55-60

25 Tabla 2: Parámetros de extrusiones realizadas en este estudio

El término “par” citado en la Tabla 2 corresponde a la intensidad relativa del motor y representa la energía mecánica suministrada por la extrusora al material extrudido.

Los gránulos obtenidos se secaron a continuación en horno turbo con el fin de eliminar el agua residual.

- 30 Las 2 formulaciones se sometieron después a una etapa de inyección para obtener probetas normalizadas. Las condiciones de inyección fueron idénticas para los 2 materiales.

La tabla 3 presenta los ajustes de la prensa de inyección que se han utilizado en este estudio.

Temperaturas °C (Alimentación → Boquilla)	40/55/60/80/110
Impronta	Probeta
Velocidad de dosificación (v401) m/min	8,0
Volumen de dosificación (V403) cm ³	14,3
Contrapresión (p401) bar (kPa)	150 (15.000)
Tiempo de dosificación (t402M) s	3,9
Presión de inyección (p301) bar (kPa)	800 (80.000)
Caudal de inyección (Q301) cm ³ /s	5
Conmutación (V311) cm ³	5
Presión de mantenimiento (p321) bar (kPa)	650 (65.000)
Caudal de mantenimiento (Q321) cm ³ /s	5
Tiempo de mantenimiento (t321) s	30
Tiempo de enfriamiento (t400) s	25
Tiempo de ciclo (t902M) s	65,8
Colchón (V321I) s	1,3
Velocidad del eyector (v602) mm/s	10
Fuerza del eyector (F601) kN	5
Posición de boquilla	Desprendida
Temperatura del molde °C	18

Tabla 3: Parámetros de inyección en prensa ARBURG 100/420C/250

Las eficiencias de degradación se evaluaron en agua de manantial *Cristalline*. En resumen, para cada formulación, 4 probetas normalizadas (cuyas masas se midieron previamente) se sumergieron en una bandeja de agua (agua de manantial, referencia *Cristalline*). Las bandejas se colocaron después en un recinto termorregulado a 32°C y ventilado.

Se tomó luego una probeta después de 1, 2, 3 y 6 meses y se pesó (después de tratar en horno a 103°C durante 48 h). La degradabilidad del material se midió por pérdida de masa, calculada como se ha especificado anteriormente.

Los resultados obtenidos muestran una biodegradabilidad total de CAPA cuando la enzima se incorporó en el material, a partir de 102 días de incubación de probetas en agua, lo que demuestra que la enzima resistió los tratamientos térmicos impuestos durante las etapas de extrusión y de inyección.

Los inventores han demostrado así que una enzima puede incorporarse eficazmente en un polímero a partir de la fase de extrusión mientras que conserva sus propiedades de degradación del polímero.

Este enfoque constituye, por tanto, un método simple, fácil de implementar que puede adaptarse fácilmente a muchos otros pares de polímero/enzimas para controlar la degradación de los materiales en medio natural.

Ejemplo 2: Caracterización de las aleaciones de la invención

Los inventores han comparado las propiedades mecánicas de CAPA sola, de CAPA mezclada con una carga vegetal y de una aleación constituida por CAPA y lipasa PS de *Pseudomonas cepacia* y obtenida según el procedimiento de la invención.

Materiales y métodos

1. Obtención de las aleaciones

La aleación CAPA/lipasa PS de *Pseudomonas cepacia* se obtuvo mediante las materias primas siguientes:

Nombre	Proveedor	Definición
CAPA 6506 (CAPA)	Solvay	Poli(caprolactona) en polvo
Trigo	Amo	Harina de trigo, referencia "La Dorée" previamente seca
Lipasa	Amano	Referencia "PS SD"

Tabla 4: Materias primas utilizadas para la formulación de las aleaciones

➤ Etapa de granulación por extrusión

La etapa de extrusión se realizó en 5 etapas, mediante una extrusora de doble tornillo co-giratorio Clextral BC21

- 5 - introducción de los diversos elementos en las proporciones previstas por medio de un dosificador ponderal y un dosificador volumétrico;
- fundir, amasar, desgasificar, mezclar y presurizar el material en las partes sucesivas de la extrusora;
- salida de una varilla a través de una hilera circular de 3 mm de diámetro;
- 10 - enfriamiento de la varilla en una bandeja de agua fría de tres metro de largo, y después "secado" mediante aire frío pulsado;
- corte en forma de gránulos regulares por un sistema con cuchilla giratoria.

Se prepararon así cuatro formulaciones (los % corresponden a porcentajes máxicos):

- 100% de CAPA;
- 98% de CAPA + 2% de lipasa;
- 15 - 80% de CAPA + 20% de trigo;
- 55% de CAPA + 45% de trigo.

La adición de una carga vegetal (harina de trigo) es una alternativa clásica para aumentar la tasa de degradación de un polímero. En efecto, la tasa de degradación máxima corresponde a la degradación de la carga vegetal, no degradándose de hecho el polímero utilizado como aglutinante (véase a continuación).

- 20 Los gránulos obtenidos por extrusión se secaron después en horno turbo a 40°C durante 12 horas para eliminar el agua residual presente, debido al paso a la bandeja de agua. Los gránulos secos pudieron después inyectarse y caracterizarse.

➤ Etapa de inyección

- 25 La etapa de inyección permite transformar los gránulos obtenidos por extrusión en probetas de caracterización. El principio de la inyección consiste en calentar el material plástico en una manga para llevarlo al estado fundido (fase de plastificación) e inyectarlo bajo presión en un molde por medio de un pistón. El material se solidifica y se enfría parcialmente en el molde antes de ser expulsado. La prensa utilizada es de marca ARBURG y de modelo Allrounder 1000-420C-250.

Las probetas inyectadas corresponden al tipo 1 de la norma ISO 3167.

- 30 Algunas probetas "98% de CAPA + 2% de lipasa" obtenidas por inyección se sometieron a un post-tratamiento antes de la caracterización, que consiste en un almacenamiento en una bolsa sellada colocada en caja de cartón sellada durante 1 mes a temperatura ambiente, siendo el objetivo de esta etapa evaluar el impacto del almacenamiento en la estabilidad del material, tanto desde el punto de vista de sus propiedades mecánicas como de su capacidad para degradarse.

- 35 2. Determinación de las características mecánicas

➤ Prueba de tracción

Las características de tracción se determinan según las recomendaciones descritas en la norma internacional ISO/R 527 (determinación de las características de tracción). Estas pruebas se deben realizar en condiciones bien definidas de temperatura, humedad y velocidad de separación de las mordazas.

- 40 La prueba de tracción consiste en imponer un alargamiento en una probeta de sección inicial S_0 y de longitud útil L_0 . La probeta se incrusta mediante sus dos extremos en mordazas. Una de estas mordazas, móvil, está conectada a

un sistema de accionamiento de velocidad de desplazamiento lineal. La medida de las fuerzas se realiza mediante un sensor de fuerza electrónico (10 kN).

Las informaciones recopiladas a partir de estas pruebas son tres:

- la tensión de tracción máxima (Cmax TR; MPa),
- 5 - el alargamiento en ruptura (%),
- módulo de Young en tracción (en Mpa).

Como se indica en la norma, las pruebas se realizan en cinco probetas de cada lote de material y los resultados presentados son el promedio de estas cinco determinaciones. La velocidad de desplazamiento se fija en 50 mm/min y el módulo de tracción se calcula entre 10 y 50% del valor de la tensión máxima. La máquina de tracción utilizada está comercializada por ZWICK.

➤ Choque Charpy

Este método permite estudiar el comportamiento de probetas definidas, sometidas a tensiones de choque para estimar su fragilidad o tenacidad. Para estas pruebas, los inventores han utilizado probetas de tipo 1 anteriormente descritas, sin muesca.

15 El material utilizado es un martinete-péndulo de una energía de 15 Julios de marca ZWICK. La unidad está dirigida por un software que registra los valores medidos y los análisis. Durante la prueba, la probeta se coloca horizontalmente delante de los soportes y es golpeada por el péndulo en su centro. La resistencia al impacto Charpy corresponde a la energía absorbida por la ruptura de una probeta relacionada con su sección recta antes de la prueba (Resiliencia).

20 3. Caracterizaciones reológicas: índice de fluidez en caliente (MFR)

La norma ISO 1133 especifica un método para determinar el índice de fluidez en caliente (MFR) de termoplásticos en condiciones definidas de temperatura y presión. Esta prueba permite determinar el grado del polímero probado y nos informa sobre la capacidad del polímero para fluir a través de una hilera para una temperatura determinada (lo que es un parámetro importante para la inyección).

25 El aparato utilizado es un plastómetro de extrusión de marca ZWICK conectado a una balanza de precisión y controlado por un software específico que puede determinar el MFR expresado en g/10 minutos.

30 Durante una prueba, la mezcla, calentada en el cilindro vertical, se extruye a través de una hilera por medio de una carga unida a un pistón. Los materiales de cinco extrusiones se cortan en intervalos de tiempo regulares, se recuperan y después se pesan. Los parámetros a fijar son, por tanto, la temperatura del cilindro, el peso de la carga y el tiempo entre dos cortes.

4. Prueba de degradación en agua

35 Para cada formulación, 4 probetas normalizadas (cuyas masas secas a 103°C se midieron previamente) se sumergen en una bandeja de agua (agua de manantial de referencia *Cristalline*, Leclerc). Las bandejas se colocan en un recinto termostático a 32°C y ventilado. Luego se toma una probeta después de 1, 2, 3 y 4 meses y se pesa (después de colocarla en un horno a 103°C durante 48 h). La degradabilidad del material se mide por pérdida de masa calculada de la siguiente manera:

$$\text{Pérdida (\%)} = (\text{pérdida de masa total} - \text{pérdida de agua a } 103^{\circ}\text{C}) \times 100$$

Resultados

1. Características mecánicas y reología

40 Los resultados obtenidos se presentan en la tabla a continuación:

Formulación (% másico)	Post- tratamiento	Resiliencia Kj/m ²	MFR 150°C/2, 16 kg	Pruebas de tracción				Densidad (g/cm ³)	% de degra- dación a los 3 meses
				Cmax TR Mpa	Alarga- miento en ruptura (%)	Módulo de Young (Mpa)	Ruptura al final de la tracción		
100% de CAPA		23	14	23	533	400	Sin ruptura	1,11	1

Formulación (% másico)	Post- tratamiento	Resiliencia Kj/m ²	MFR 150°C/2, 16 kg	Pruebas de tracción				Densidad (g/cm ³)	% de degra- dación a los 3 meses
				Cmax TR Mpa	Alarga- miento en ruptura (%)	Módulo de Young (Mpa)	Ruptura al final de la tracción		
98% de CAPA + 2% de lipasa		24	14	23	530	450	Sin ruptura	1,14	71
98% de CAPA + 2% de lipasa	Almacena- miento 1 mes en la oscuridad en bolsa sellada	ND	ND	26	530	500	Sin ruptura	1,14	77
80% de CAPA + 20% de trigo		24	11	19	532	500	Sin ruptura	1,16	18
55% de CAPA + 45% de trigo		21	4	9	286	675	Ruptura	1,22	42

Tabla 5: Características de los materiales

Esta tabla indica que la adición de enzima no modifica las propiedades mecánicas de la CAPA probadas en esta invención, a saber, la resiliencia, el MFR o el conjunto de los parámetros en tracción. Esto está en marcado contraste con los polímeros que consisten en 55% de CAPA + 45% de trigo, que ven todas las propiedades mecánicas degradadas en comparación con la CAPA sola. La mezcla 80% de CAPA + 20% de trigo permite, por su parte, conservar propiedades similares a la de la CAPA sola.

Además, la aleación de la invención está muy adaptada para mejorar la degradación de la CAPA, al tiempo que conserva sus propiedades.

2. Degradación en medios acuosos

Los resultados indican que la CAPA sola no se degrada cuando se sumerge en un medio acuoso. Si la adición de una carga vegetal del 20% permite mejorar la degradación de la aleación, no obstante la tasa máxima llega a menos del 20%. Como ya se ha indicado, esta degradación corresponde a la degradación de la harina de trigo, mientras que el material permanece, por su parte, inalterado.

Por tanto, una mejora en la biodegradación se correlaciona directamente con un aumento del porcentaje de la carga vegetal en la aleación con, como corolario, una alteración de las propiedades mecánicas.

Los resultados indican también que la adición de enzimas es mucho más conveniente que la adición de una carga vegetal, ya que induce la degradación de la CAPA (aproximadamente 70% después de 3 meses en agua), mientras se mantienen las propiedades mecánicas del material puro.

Los inventores también han tenido éxito en mostrar que las composiciones obtenidas presentan una mejor degradabilidad que con una carga vegetal, y esto a la vez que se mantienen las propiedades mecánicas del polímero.

Finalmente, el almacenamiento en la oscuridad y en bolsa sellada del polímero 98% de CAPA + 2% de lipasa no altera ni las propiedades mecánicas ni su capacidad para degradarse (comparación de los comportamientos de los polímeros 98% de CAPA + 2% de lipasa después de post-tratamiento o no). Por tanto la aleación de la invención es estable y no se degrada cuando no está en disolución y, por tanto, es adecuada para el almacenamiento.

En conclusión, el conjunto de los resultados indica que el procedimiento para preparar aleaciones de polímero/enzimas según la invención es una solución industrial particularmente atractiva para el desarrollo de material de vida corta, al tiempo que reduce los impactos negativos sobre el medio ambiente, inherentes a la diseminación de residuos en el medio ambiente natural.

Ejemplo 3: Impacto de la temperatura en la biodegradación de la poli(caprolactona) (CAPA)

Para demostrar que la temperatura de transformación de la poli(caprolactona) no tiene impacto en su biodegradación, se extruyó poli(caprolactona) a 170°C y se evaluó su biodegradación.

3.1. Etapa de granulación por extrusión de la poli(caprolactona) a 170°C

La etapa de extrusión se realiza como se define en el Ejemplo 1 (ver sección de Materiales y Métodos 1), excepto que la temperatura de extrusión en este ejemplo es 170°C y la formulación está compuesta por 100% de CAPA (sin enzima). Los parámetros de extrusión se presentan en la tabla 6.

Formulación	Temperaturas de extrusión (Zona 1 de hilera)	Velocidad BC 21, T/min	Presión, bar (kPa)	Par (%)
100% m de CAPA 6506	20-80-7*170	200	42 (4.200)	38

Tabla 6. Parámetros de extrusión realizada en este estudio.

3.2. Inyección

Los gránulos de 100% de CAPA (ver 100% m de CAPA 6506) se sometieron después a una etapa de inyección para obtener probetas normalizadas. La etapa de inyección se realiza como se describe en el Ejemplo 1.

- 5 La tabla 7 muestra los ajustes de la prensa de inyección que se utilizaron en este estudio.

Temperaturas °C (Alimentación → Boquilla)	40/55/60/80/100
Impronta	Probeta
Velocidad de dosificación (v401) m/min	8,0
Volumen de dosificación (V403) cm ³	19
Contrapresión (p401) bar (kPa)	150 (15.000)
Tiempo de dosificación (t402M) s	4,5-7,5
Presión de inyección (p301) bar (kPa)	800 (80.000)
Caudal de inyección (Q301) cm ³ /s	5
Conmutación (V311) cm ³	5
Presión de mantenimiento (p321) bar (kPa)	650 (65.000)
Caudal de mantenimiento (Q321) cm ³ /s	5
Tiempo de mantenimiento (t321) s	30
Tiempo de enfriamiento (t400) s	20
Tiempo de ciclo (t902M) s	60
Colchón (V321I) s	1 ± 0,5
Velocidad del eyector (v602) mm/s	400
Fuerza del eyector (F601) kN	20
Posición de boquilla	Desprendida
Temperatura del molde °C	Frío directo, 5°C

Tabla 7. Parámetros de inyección en prensa ARBURG 100/420C/250.

3.3. Medida de la biodegradación

- Degradación en agua a 30°C: seguimiento de la pérdida de masa

- 10 La degradación se evaluó en agua de manantial *Cristalline*. 4 probetas normalizadas (cuyas masas se midieron previamente) se sumergieron en una bandeja de agua. Las bandejas se colocaron después en un recinto termostático a 32°C y ventilado.

Luego se tomó una probeta después de 15 días, 1, 2 y 3 meses y se pesó (después de colocarla en horno a 103°C durante 48 h). La degradabilidad del material se midió por pérdida de masa, calculada como se especifica en el Ejemplo 1.

Al igual que para la formulación 100% m de CAPA 6506 (ver el Ejemplo 2.), la “pérdida de masa” de las probetas realizadas a partir de la formulación 100% m de CAPA 6506-170 no muestra degradación alguna después de 2 meses. El seguimiento de la degradación en agua a 32°C permite demostrar que la CAPA sola no se degrada con el tiempo en agua, cuando se extrude a temperaturas de 80°C hasta 170°C.

5 Ejemplo 4. Inclusión de lipasa PS de *Pseudomonas cepacia* al 2% en CAPA al 98% a 100°C

4.1. Inclusión de la enzima

Los inventores han realizado una extrusión de poli(caprolactona) incorporando dicha enzima. Para ello se colocó en un dosificador una mezcla de 98% másico de polímero y de 2% másico de enzima. Las cantidades utilizadas en la mezcla se presenta en esta memoria (ver tabla 8).

Formulación (% másico)	Masa de enzima (g) en el dosificador	Masa de CAPA 6506 P (g) en el dosificador
98% m de CAPA 6506 + 2% m de lipasa	30	1500

10 Tabla 8. Formulación realizada en este estudio

4.1.a. Extrusión

La extrusión se realizó a 100°C. La etapa de extrusión se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1. (ver sección de Materiales y Métodos 1).

Los parámetros de extrusión se muestran en la tabla 9.

Formulación	Temperaturas de extrusión (Zona 1 de hilera)	Velocidad BC 21, T/min	Presión, bar (kPa)	Par (%)
98% m de CAPA 6506 + 2% m de lipasa	20-80-7*100	200	65 (6.500)	53

15 Tabla 9. Parámetros de extrusión realizada en este estudio.

4.2. Inyección

La formulación se sometió después a una etapa de inyección para obtener probetas normalizadas. Los ajustes de la prensa de inyección que se utilizaron en este estudio son los mismos utilizados en el Ejemplo 3 (ver tabla 7).

4.3. Medida de biodegradación

20 Las eficiencias de degradación se evaluaron mediante degradación en agua.

➤ Degradación en agua a 30°C: seguimiento de la pérdida de masa

Le degradación se evaluó en agua de manantial *Cristalline* como en el Ejemplo 3 (ver sección 3.3).

25 Luego se tomó una probeta después de 15 días, 1, 2 y 3 meses y se pesó (después de colocarla en horno 103°C durante 48 h). La degradabilidad del material se midió por pérdida de masa, calculada como se especifica en el Ejemplo 1.

Los resultados obtenidos muestran una biodegradabilidad con una pérdida de masa de 54% después de 2 meses. Esto demuestra que la enzima ha resistido los tratamientos térmicos impuestos durante las etapas de extrusión e inyección.

30 Los inventores han demostrado así que una enzima se puede incorporar realmente a un polímero a partir de la fase de extrusión a 100°C mientras que conserva sus propiedades de degradación del polímero.

Ejemplo 5. Inclusión de lipasa PS al 2% en CAPA al 98% a 120°C

5.1. Inclusión de la enzima

Los inventores han realizado una extrusión de poli(caprolactona) incorporando dicha enzima. Para ello el polímero se colocó en un dosificador y la enzima en otro, ambos en forma de polvo.

35 En los experimentos que se presentan en esta memoria, los caudales de estos dos dosificadores se ajustaron para obtener un porcentaje de enzima de 2% (m/m) en el material (ver tabla 10).

Formulación (% másico)	Masa de enzima (g) en el dosificador	Masa de CAPA 6506 P (g) en el dosificador
98% m de CAPA 6506 + 2% m de lipasa	30	1500

Tabla 10. Formulación realizada en este estudio

5.1.a. Extrusión

La aleación entre el polímero y la enzima se realizó por extrusión a 120°C. La etapa de extrusión se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1 (ver sección de Materiales y Métodos 1).

5 Los parámetros de extrusión se muestran en la tabla 11.

Formulación	Temperaturas de extrusión (Zona 1 de hilera)	Velocidad BC 21, T/min	Presión, bar (kPa)	Par (%)
98% m de CAPA 6506 + 2% m de lipasa	20-80-7*120	200	65 (6.500)	55

Tabla 11. Parámetros de extrusión realizada en este estudio.

5.2. Inyección

La formulación se sometió después a una etapa de inyección para obtener probetas normalizadas. Las condiciones de inyección fueron las mismas que para el Ejemplo 3 (ver tabla 7).

10 5.3. Medida de biodegradación

Las eficiencias de degradación se evaluaron mediante degradación en agua.

➤ Degradación en agua a 30°C: seguimiento de la pérdida de masa

La degradación se evaluó en agua en las mismas condiciones descritas en el Ejemplo 3.

15 Los resultados obtenidos muestran una biodegradabilidad con una pérdida de masa de 27,5% después de 2 meses. Esto demuestra que la enzima resistió los tratamientos térmicos impuestos durante las etapas de extrusión y de inyección.

Los inventores han demostrado así que una enzima se puede incorporar eficazmente en un polímero a partir de la fase de extrusión a 120°C mientras que conserva sus propiedades de degradación del polímero.

Ejemplo 6. Inclusión de lipasa PS al 2% en CAPA al 98% a 140°C

20 Los inventores realizaron una extrusión de poli(caprolactona) incorporando dicha enzima. Para ello el polímero se colocó en un dosificador y la enzima en otro, ambos en forma de polvo.

En los experimentos que se presentan en esta memoria, los caudales de estos dos dosificadores se ajustaron para obtener un porcentaje de enzima de 2% (m/m) en el material (ver tabla 12).

Formulación (% másico)	Masa de enzima (g) en el dosificador	Masa de CAPA 6506 P (g) en el dosificador
98% m de CAPA 6506 + 2% m de lipasa	30	1500

Tabla 12. Formulación realizada en este estudio

25 6.1.a. Extrusión

La extrusión se realizó a 140°C. La etapa de extrusión se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1 (ver sección de Materiales y Métodos 1).

Los parámetros de extrusión se muestran en la tabla 13.

Formulación	Temperaturas de extrusión (Zona 1 de hilera)	Velocidad BC 21, T/min	Presión, bar (kPa)	Par (%)
98% m de CAPA 6506 + 2% m de lipasa-140	20-80-7*140	200	59 (5.900)	48

Tabla 13. Parámetros de extrusión realizada en este estudio.

6.2. Inyección

La formulación se sometió después a una etapa de inyección para obtener probetas normalizadas. Los ajustes de la prensa de inyección que se utilizaron en este estudio son los mismos utilizados en el Ejemplo 3, sección 3.2 (ver tabla 7).

6.3. Medida de biodegradación

Las eficiencias de degradación se evaluaron mediante degradación en agua.

➤ Degradación en agua a 30°C: seguimiento de la pérdida de masa

La degradación se evaluó en agua de manantial *Cristalline* como en el Ejemplo 3 (ver sección 3.3).

Luego se tomó una probeta después de 15 días, 1, 2 y 3 meses y se pesó (después de colocarla en horno a 103°C durante 48 h). La degradabilidad del material se midió por pérdida de masa, calculada como se especifica en el Ejemplo 1 (ver la sección Resultado 1.a.).

Los resultados obtenidos muestran una biodegradabilidad con una pérdida de masa de 4,5% después de 2 meses. Esto demuestra que la enzima resistió los tratamientos térmicos impuestos durante las etapas de extrusión y de inyección.

Los inventores han demostrado así que una enzima se puede incorporar eficazmente en un polímero a partir de la fase de extrusión a 140°C mientras que conserva sus propiedades de degradación del polímero.

En conclusión, los inventores han ejemplificado el hecho de que el procedimiento de la invención permite obtener una aleación que se degrada a diferentes temperaturas de extrusión, en particular a 80°C, 100°C, 120°C y 140°C.

Ejemplo 7: Métodos para introducir la lipasa

Con el fin de demostrar la importancia de la inclusión de la lipasa por extrusión, sobre la biodegradación del material correspondiente, se realizaron diferentes métodos de introducción de la lipasa sobre una poli(caprolactona).

1: Introducción de la lipasa por extrusión (Prueba 7a)

Una mezcla de 98% m de poli(caprolactona) (CAPA 6506) y 2% m de lipasa PS se extruyó a 65°C en las condiciones descritas en el Ejemplo 1 (ver la sección de Materiales y Métodos 1).

Los parámetros de extrusión se muestran en la tabla 14.

Formulación	Temperaturas de extrusión (Zona 1 de hilera)	Velocidad BC 21, T/min	Presión, bar (kPa)	Par (%)
98% m de CAPA 6506 + 2% m de lipasa	20-20-40-6*65	250	93 (9.300)	63

Tabla 14. Parámetros de extrusión realizada en este estudio.

La formulación se sometió después a una etapa de inyección para obtener probetas normalizadas. Los ajustes de la prensa de inyección son los mismos que los utilizados en el Ejemplo 3 (ver tabla 7).

La eficacia de degradación de las piezas inyectadas de referencia 7a se evaluó después mediante la degradación en agua, según el método descrito en el Ejemplo 3.

2. Introducción de lipasa por pulverización en la superficie de piezas inyectadas de poli(caprolactona) (Prueba 7b)

Una poli(caprolactona) CAPA6506 no extrudida se sometió a una etapa de inyección para obtener probetas normalizadas. Los ajustes de la prensa de inyección son los mismos que los utilizados en el Ejemplo 3 (ver tabla 7).

Después se pulverizó una disolución acuosa de lipasa PS en la superficie de las piezas inyectadas de poli(caprolactona) hasta obtener el equivalente de una mezcla de 98% m de poli(caprolactona) y de 2% m de lipasa.

La eficacia de degradación de las piezas inyectadas se evaluó después mediante la degradación en agua, según el método descrito en el Ejemplo 3.

3. Introducción de lipasa en el agua utilizada en la prueba de degradación en agua (Prueba 7c).

- 5 Una poli(caprolactona) CAPA6506 no extrudida se sometió a una etapa de inyección para obtener probetas normalizadas. Los ajustes de la prensa de inyección son los mismos que los utilizados en el Ejemplo 3 (ver tabla 7).

La eficacia de degradación de las piezas inyectadas de referencia 7a se evaluaron después mediante la degradación en agua sembrada de lipasa PS, según el método descrito en el Ejemplo 3. La cantidad de lipasa añadida equivale a una mezcla de 98% m de poli(caprolactona) y 2% m de lipasa PS.

Las pérdidas de masa de las formulaciones 7a, 7b y 7c se dan en la tabla a continuación:

Referencia	Método de introducción de la lipasa PS	Pérdida de masa (% másico) en agua después de			
		15 días	1 mes	2 meses	3 meses
7a	Extrusión	16	34	64	86
7b	Aspersión de superficie	17	21	21	21
7c	Siembra del agua utilizada en la degradación	15	21	31	32

10 Tabla 15. Pérdida de masa en el agua de las muestras 7a, 7b y 7c.

Estos resultados resaltan el hecho de que cuando la lipasa se introduce por aspersión o en la disolución de degradación, la degradación es menos importante que cuando la lipasa se incluye en la aleación.

En otras palabras, los inventores han demostrado que la etapa de extrusión permite obtener una aleación que presenta una mejor degradabilidad que la etapa de dispersión/disolución de la lipasa.

15 Ejemplo 8: Pruebas complementarias

Las materias primas utilizadas para estas pruebas complementarias son como sigue:

- Poli(caprolactona) CAPA 6506
- Harina de madera Arbocel C320 suministrada por Rettenmaier; y
- Harina de trigo La Dorée suministrada por AMO

- 20 Se prepararon diversas aleaciones de poli(caprolactona), lipasa PS y/o carga vegetal (harina de trigo o harina de madera) por extrusión en las condiciones descritas en el Ejemplo 1 (ver sección de Materiales y Métodos):

Referencia	Composición
7a	98% m de CAPA + 2% m de lipasa
8	55% m de CAPA + 45% m de harina de trigo
9	80% m de CAPA + 20% m de harina de trigo
10	100% de CAPA
11	55% m de CAPA + 45% m de harina de madera

Tabla 16. Composición de diversas aleaciones obtenidas por extrusión en este estudio.

Los parámetros de extrusión se muestran en la tabla 17.

Temperaturas de extrusión (Zona 1 de hilera)	Velocidad BC 21, T/min
20-20-40-6*65	250

Tabla 17. Parámetros de extrusión realizada en este estudio.

Las diversas aleaciones obtenidas se sometieron después a una etapa de inyección para obtener probetas normalizadas. Los ajustes de la prensa de inyección son los mismos que los utilizados en el Ejemplo 3 (ver tabla 7).

Las eficiencias de degradación de las piezas inyectadas de referencia 7a, 8, 9, 10 y 11 se evaluaron después mediante la degradación en agua, según el método descrito en el Ejemplo 3. Estas eficiencias se muestran en la tabla a continuación:

5

Referencia	Composición	Pérdida de masa (% másico) en agua después de			
		15 días	1 mes	2 meses	3 meses
7a	98% m de CAPA + 2% m de lipasa	16	34	64	86
8	55% m de CAPA + 45% m de harina de trigo	<1	3	6	9
9	80% m de CAPA + 20% m de harina de trigo	<1	4	6	7
10	100% de CAPA	<1	<1	<1	<1
11	55% m de CAPA + 45% m de harina de madera	<1	<1	<1	<1

Tabla 18. Pérdida de masa de las muestras 7a, 8, 9, 10 y 11.

Los inventores han demostrado así que para obtener una fuerte biodegradabilidad, la adición de enzimas es mucho más ventajosa que la adición de una carga vegetal.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar una aleación de polímero sólido/entidades biológicas, que comprende las etapas según las cuales:
 - se selecciona un polímero de poli(caprolactona), poli(ácido láctico), poli(tereftalato de etileno), poli(tereftalato de trimetileno), un polihidroxialcanoato de C1-C6, acetato de celulosa, poli(adipato-co-tereftalato de butileno), poli(succinato de butileno), poliamida PA 11, y sus mezclas;
 - se seleccionan entidades biológicas de enzimas y microorganismos capaces de degradar dicho polímero en condiciones acuosas;
 - la aleación se realiza mezclando el polímero y las entidades biológicas durante un tratamiento térmico llevado a cabo a una temperatura T superior a la temperatura ambiente, a la cual el polímero está parcial o totalmente fundido, permitiendo dichas entidades biológicas degradar dicho polímero en la aleación.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha temperatura T está comprendida entre la temperatura de transición vítrea y la temperatura de fusión de dicho polímero.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha temperatura T es la temperatura de fusión de dicho polímero.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicho tratamiento térmico consiste en una operación seleccionada de extrusión, inyección, termoformado, moldeo rotacional, compresión, calandrado, calderería, revestimiento, estratificación, expansión, pultrusión, extrusión-soplado, extrusión-inflado, y compresión-granulación, preferiblemente extrusión.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la relación en peso de entidades biológicas/polímero está comprendida entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 10%, preferiblemente entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 8%, preferiblemente entre 30 aproximadamente 1% y aproximadamente 6%, preferiblemente entre aproximadamente 1% y aproximadamente 5%, preferiblemente entre aproximadamente 1% y aproximadamente 4%, preferiblemente entre aproximadamente 1% y aproximadamente 3%, preferiblemente entre aproximadamente 1,5% y aproximadamente 3%, y aún más preferiblemente esta relación es aproximadamente 2%.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que dichas entidades biológicas son enzimas termorresistentes seleccionadas preferiblemente de: lipasa PS de *Pseudomonas cepacia*, lipasa B de *Candida antartica*, proteinasa K, una despolimerasa de polihidroxialcanoato de C1-C6 y sus mezclas.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que dichas entidades biológicas son enzimas termoestabilizadas, seleccionadas preferiblemente de enzimas encapsuladas en nanocápsulas constituidas por el mismo material que dicho polímero, enzimas encapsuladas en jaulas moleculares y enzimas agregadas entre sí.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que dicho polímero es poli(caprolactona) y la entidad biológica comprende una lipasa, preferiblemente una amanolipasa PS de *Pseudomonas cepacia*.
9. Procedimiento para preparar una aleación de polímero sólido/entidades biológicas, que comprende una etapa de extrusión de un polímero con entidades biológicas seleccionadas de enzimas y microorganismos que degradan dicho polímero, en una relación en peso de entidades biológicas/polímero comprendida entre 1% y 5%, a una temperatura a la que el polímero está parcial o totalmente fundido, seleccionándose dicho polímero de poli(caprolactona), poli(ácido láctico), poli(tereftalato de etileno), poli(tereftalato de trimetileno), un polihidroxialcanoato de C1-C6, acetato de celulosa, poli(adipato-co-tereftalato de butileno), poli(succinato de butileno), poliamida PA 11, y sus mezclas, permitiendo dichas entidades biológicas degradar dicho polímero en la aleación.