

TESIS CON CARACTER ABIERTO

PROGRAMA: DOCTORADO EN POLÍMEROS

AUTOR: MA. ELENA CALIXTO OLALDE FIRMA



TITULO: Desarrollo de Hidrogeles basados en Redes Poliméricas Interpenetradas de Poli(Acrilamida)-Poli(Alcohol Vinílico) para la Inmovilización de Células de *Rhodococcus rhodochrous*.

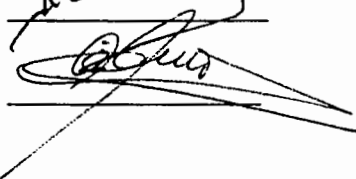
ASESORES: Dr. Jorge Romero García

FIRMA



Dr. José Luis Angulo Sánchez

FIRMA



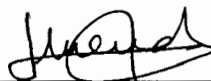
El Centro de Investigación en Química Aplicada clasifica el presente documento de tesis como ABIERTO.

Un documento clasificado como Abierto se expone en los estantes del Centro de Información para su consulta. Dicho documento no puede ser copiado en ninguna modalidad sin autorización por escrito del Titular del Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coahuila, a 2 de Diciembre de 2005



Sello de la Institución



Dr. Juan Méndez Nonell
Director General del CIQA



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUIMICA APLICADA

TESIS

**DESARROLLO DE HIDROGELES BASADOS EN REDES
POLIMÉRICAS INTERPENETRADAS DE
POLI(ACRILAMIDA)-POLI(ALCOHOL VINILICO) PARA LA
INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS DE *Rhodococcus rhodochrous*.**

Presentado por :

MA. ELENA CALIXTO OLALDE

Para obtener el grado de:

DOCTOR EN POLÍMEROS

Asesores:

Dr. JORGE ROMERO GARCÍA

Dr. JOSÉ LUIS ANGULO SÁNCHEZ

Saltillo, Coahuila

Diciembre 2005

CENTRO DE INVESTIGACION EN QUIMICA APLICADA
Programa de Doctorado en Polímeros

TESIS

**Desarrollo de Hidrogeles basados en Redes Poliméricas Interpenetradas
de Poli(Acrilamida)-Poli(Alcohol Vinílico) para la Inmovilización
de Células de *Rhodococcus rhodochrous***

Presentada por:

MA. ELENA CALIXTO OLALDE

Para obtener el grado de:

DOCTOR EN POLÍMEROS

Asesorado por:

DR. JORGE ROMERO GARCÍA
DR. JOSÉ LUIS ANGULO SÁNCHEZ


SINODALES




Dr. René Darío Peralta Rodríguez
Presidente



Dr. Enrique Saldivar Guerra
Secretario



Dr. Roberto Benavides Cantú
1er. Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño
2do. Vocal



Dr. Arturo Flores Carreón
3er. Vocal

DECLARACIÓN

Declaro que la información contenida en la Parte Experimental así como en la Parte de Resultados y Discusiones de este documento y que forman parte de las actividades de investigación y desarrollo realizadas durante el período que se me asignó para llevar a cabo mi trabajo de tesis, será propiedad del Centro de Investigación en Química Aplicada.

Saltillo, Coahuila a 2 de Diciembre de 2005



MA. ELENA CALIXTO OLALDE

Nombre y Firma

Dedicatoria.

Dedico este trabajo a mi esposo y a mi hija, por su amor y apoyo incondicional.
A mis padres Julia Olalde Olalde y Alejandro Calixto García
porque me enseñaron que todo es posible cuando no lo proponemos.
A mis hermanos: Gloria, Javier, Guadalupe, Alejandra y Aarón porque siempre
me apoyaron.
A Gabriela Padrón Gamboa por su amistad y apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca crédito otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado.

Al Centro de Investigación en Química Aplicada por permitirme realizar mis estudios de Doctorado, así como su ex-director Dr. Luis Francisco Ramos de Valle, así como al actual director Dr. Juan Mendez Nonell, por el apoyo recibido durante mi estancia en esta institución.

A mis asesores: Dr. José Luis Angulo Sánchez y en especial al Dr. Jorge Romero García por el enorme apoyo brindado para la elaboración de este documento, así como por su confianza y enseñanzas recibidas.

A mis sinodales: Dra. Katuska Arévalo Niño, Dr. Rene D. Peralta, Dr. Roberto Benavides Cantú, Dr. Arturo Flores Carreón y Dr. Enrique Saldivar por el tiempo invertido en la revisión y discusión de éste documento, pues sus comentarios fueron muy valiosos.

A la M. C. Leticia Rodríguez, ex-coordinadora del posgrado así como a M.C. Esther Treviño, actual coordinadora. Al Dr. Dámaso director de posgrado por el apoyo brindado. A Nancy G. Espinoza, por su apoyo como parte de la coordinación de posgrado.

A la Coordinación de Laboratorio Central de Inst. Analítica, antes Departamento de Físicoquímica, especialmente a Blanca Huerta, Josefina Zamora, Silvia Solís, por su apoyo para la caracterización de mis materiales.

Al Departamento de Materiales Avanzados, antes Biopolímeros, en especial a Antonio Ledezma S. por su amistad, apoyo y todas sus enseñanzas en el Laboratorio. A Diana I. Medellín por su amistad. A la Dra. Ivana Moggio por el apoyo brindado. En general a todas las personas que conforman éste departamento.

A Lidia Berlanga, Claudia C. Rivera por su ayuda en la caracterización de mis materiales, y a todas las personas que de algún modo me apoyaron durante mi estancia en CIQA.

Al Departamento de Información, especialmente a Brunilda Segui y a Patricia Siller por su amable atención.

A todos mis amigos en CIQA con los que compartí momentos muy importantes de mi vida y siempre me apoyaron en especial a Sofía Vázquez y Rodolfo Cruz, Norma González, Aidé Saenz, Maricela García, Odilia Pérez, Selene Sepúlveda, Isabel Morales y Juan Silva. A Hortensia Ortega por su apoyo y amistad .

Resumen

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCOTEÓRICO	3
2.1 Geles	3
2.2 Redes poliméricas interpenetradas	5
2.3.1 Morfología	7
2.3. Gel de poliacrilamida	9
2.4 Gel de poli(alcohol vinílico)	11
2.4.1 Gelación criotrópica	12
2.4.2 Bases fisicoquímicas de la gelación criotrópica en soluciones de polialcohol vinílico	13
2.4.3 Tacticidad	14
2.5 Inmovilización	16
2.5.1 Métodos de inmovilización	17
2.5.2 Características del método de inmovilización	19
2.5.3 Clasificación de soportes	20
2.5.4 Geles utilizadas como soportes	21
2.6 Biodesulfuración	22
2.6.1 Proceso de biodesulfuración	23
2.6.2 Utilización de surfactantes no iónicos	27
2.7 Sistema de estudio	28
3. ANTECEDENTES DEL SISTEMA DE ESTUDIO	29
4. HIPÓTESIS	31
4.1 Objetivo general	31
4.2 Objetivos particulares	31
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	32
5.1 Materiales	32

5.2 Microorganismo y medio de cultivo	32
5.3 Soluciones	32
5.4.Métodos	33
5.4.1 Peso molecular promedio viscosos del PVA	33
5.4.2 Tacticidad del poli(alcohol vinílico)	33
5.4.3 Preparación del hidrogel de poliacrilamida	33
5.4.4 Preparación de la red polimérica interpenetrada de poli(acrilamida)–poli(alcohol vinílico)	36
5.4.4.1 Método secuencial	36
5.4.4.2 Método simultáneo	37
5.4.5 Secado de hidrogeles	38
5.4.6 Estudio de Infrarrojo	38
5.4.7 Determinación de hinchamiento en hidrogeles	38
5.4.7.1 Efecto del contenido de heptano sobre la razón de hinchamiento	40
5.4.8 Resistencia a la compresión	40
5.4.9 Estudio por calorimetría diferencial de barrido	41
5.4.10 Microscopia Electrónica de Barrido	41
5.4.11 Inmovilización	41
5.4.12 Viabilidad celular.	42
5.4.13 Estabilización de la actividad desulfuradora de Rhodococcus rhodochrous.	42
5.4.14 Actividad desulfuradora de la bacteria	42
5.4.15 Medición de proteína en geles inmovilizados	43
5.4.16 Recuperación de dibenzotiofeno residual.	44
5.4.17 Cuantificación de dibenzotiofeno por cromatografía de gases	44
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	45
6.1. Caracterización del poli(alcohol vinílico)	45
6.1.1 Peso molecular	46
6.1.2 Tacticidad	47
6.2. Selección de la concentración de poli(acrilamida) en el hidrogel .	49

6.2.1 Razón de hinchamiento en agua	49
6.2.2 Resistencia a la compresión.	50
6.3. Síntesis de redes poliméricas interpenetradas	
de poli(acrilamida)-poli(alcohol vinílico)	53
6.3.1 Análisis Infrarrojo.	53
6.3.2 Hinchamiento en agua	57
6.3.2.1 Poli(acrilamida) y poli(alcohol vinílico) .	57
6.3.2.2 Extracción de la fracción <i>sol</i>	60
6.3.2.3 Razón de hinchamiento en redes poliméricas interpenetradas	61
6.3.2.4 Cinética de hinchamiento.	65
6.3.2.5 Contenido de agua en el equilibrio de redes poliméricas interpenetradas	71
6.3.2.6 Calorimetría diferencial de barrido	73
6.3.2.7 Resistencia a la compresión.	75
6.3.3 Morfología.	78
6.4 Hinchamiento en medio mineral basal-heptano	87
6.4.1 Efecto del contenido de heptano en el medio de hinchamiento sobre la razón de hinchamiento	87
6.4.2 Efecto del contenido de heptano en el medio de hinchamiento sobre la resistencia a la compresión	91
6.5 Surfactante dentro del medio de hinchamiento.	93
6.5.1. Optimización de la concentración del surfactante.	95
6.6. Inmovilización.	96
6.6.1 Efecto de la carga de biomasa sobre la razón de hinchamiento	96
6.6.2 Efecto de la carga de biomasa sobre la resistencia a la compresión	97
6.6.3 Análisis por microscopia electrónica de barrido de las células inmovilizadas	100
6.7 BIODESULFURACIÓN	109
6.7.1 Manipulación y activación de la bacteria	109
6.7.1.1 Efecto del sulfato de sodio sobre la actividad desulfuradora de la bacteria.	113

6.7.1.2 Efecto del acetato de sodio sobre la actividad desulfuradora de la bacteria	114
6.7.1.3 Efecto de la restricción de la fuente de carbono (glicerol) sobre la actividad desulfuradora de la bacteria.	114
6.7.1.4 Efecto del medio mineral basal sobre la actividad desulfuradora de la bacteria	114
6.7.1.5 Efecto del heptano dentro del medio de crecimiento sobre la actividad desulfuradora de la bacteria.	114
6.7.1.6 Efecto del surfactante en el medio de crecimiento sobre la actividad desulfuradora de la bacteria	115
6.7.1.7 Biodesulfuración con células inmovilizadas por atrapamiento en la IPNs (90/10).	115
7 CONCLUSIONES	118
8. TRABAJO A FUTURO	119
9 REFERENCIAS	121
APENDICES	128
Apéndice A. Teoría para hinchamiento para hidrogeles a base de acrilamida	128
Apéndice B. Pruebas de significancia	133
Apéndice C. Derivación de la ecuación para el cálculo del coeficiente de difusión	135
Apéndice D. Cálculo para determinar la difusión en IPNs	137
Apéndice.E. Índice de figuras y tablas	142

Desarrollo de hidrogeles basados en redes poliméricas interpenetradas de poli(acrilamida)-poli(alcohol vinílico) para la inmovilización de células de *Rhodococcus rhodochrous*.

RESUMEN

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos sobre la síntesis de hidrogeles de redes poliméricas interpenetradas (IPN) de poli(acrilamida)-poli(alcohol vinílico) a través de los métodos de síntesis secuencial (IPNs) y simultáneo (SIN). La preparación de estos materiales se realizó a través del método de criogelación para la preparación del hidrogel de poli(alcohol vinílico) (PVA) y de la polimerización radicalica para la formación de la poli(acrilamida) (PAAM). La relación molar de las redes poliméricas interpenetradas de PAAM/PVA fue de 90/10, 80/20, 60/40, 50/50, 40/60, 20/80.

El proceso de caracterización de los hidrogeles de redes poliméricas interpenetradas de PAAM/PVA se inició con el análisis por microscopía de FTIR. En los espectros obtenidos de cada uno de los hidrogeles se observó la presencia de las señales de los grupos funcionales de $-NH_2$ para la PAAM y $-OH$ del PVA lo cual indicó que la formación de los hidrogeles de redes poliméricas interpenetradas se llevó a cabo.

De las pruebas de hinchamiento se determinó el porcentaje de la fracción *sol* en cada uno de los hidrogeles de SIN e IPNs. Se encontró que cuando el porcentaje molar de PAAM en los hidrogeles es alto existe una mayor liberación de PVA. La razón de hinchamiento disminuyó conforme se incremento el contenido de PVA dentro del hidrogel.

De la cinética de hinchamiento se determinó que tanto para IPNs como para SIN, el mecanismo de difusión del agua es anómalo Fickiano debido a que presentan valores del exponente difusional n mayores de 0.5 y menores que 1. El valor del exponente difusional n también determinó el grado de compactación de la red de PAAM /PVA.

La IPN de PAAM/PVA fue preparada con diferente relación molar para buscar las condiciones de síntesis que permitieran obtener un hidrogel con un mayor hinchamiento, resistencia a la compresión (características importantes en un soporte), y un alto contenido de agua en el equilibrio.

Las IPN de PAAM/PVA fueron sometidas a diferentes medios de hinchamiento, esto con la finalidad de su posterior utilización como soporte.

El desplazamiento de la temperatura de fusión del PVA que presentaron algunos de los hidrogeles se atribuyó a una mayor interacción entre las redes de PAAM y PVA dentro de estructura de la IPN.

La morfología de las IPN en general se observó como una estructura porosa de tipo esponja, y en algunos casos con una muy amplia distribución del tamaño de los poros. La morfología observada indicó que algunas de las IPN presentaron más de una morfología posiblemente como resultado de diferentes grados de interpenetración.

Para el proceso de inmovilización fueron seleccionados tres hidrogeles de cada método de preparación. Los hidrogeles de IPN-PAAM/PVA que presentaron mayor razón de hinchamiento, alta resistencia a la compresión y estructura macroporosa fueron utilizados como soportes para la inmovilización de *Rhodococcus rhodochrous* (bacteria con capacidad desulfuradora) por atrapamiento. De acuerdo con estos resultados, se utilizaron para tal efecto las IPNs y SIN de PAAM/PVA (20/80), (50/50) y (90/10). Diferente cantidad de células de *Rhodococcus rhodochrous* (2, 4 y 6 g/dL de solución a polimerizar) fue inmovilizada en cada uno de los hidrogeles de IPN-PAAM/PVA seleccionados. Se observó que la viabilidad celular se mantuvo posterior al proceso de preparación de las IPNs y SIN. El efecto de la cantidad de células inmovilizadas sobre la matriz polimérica fue evaluado a través del índice de hinchamiento y resistencia a la compresión. La morfología del soporte fue evaluada a través de SEM, mostrando la presencia de las células bacterianas en el interior del mismo. El mayor índice de hinchamiento, resistencia a la compresión y la mejor distribución de células se observó en el hidrogel de IPNs-PAAM/PVA(90/10).

Durante el proceso de manipulación de la bacteria *Rhodococcus rhodochrous* se modificó el medio de cultivo para tratar de elevar en cada resiembra la actividad desulfuradora. La actividad de la bacteria se determinó como célula libre e inmovilizada. Esta actividad desulfuradora se determinó por cromatografía de gases, analizando la cantidad de DBT residual en el medio de reacción. Se determinó el efecto del surfactante, nonilfeniléter polióxido de etileno, y heptano sobre la actividad de la bacteria. Los resultados mostraron que el surfactante reduce la actividad de la bacteria y el heptano inhibe el crecimiento celular y con ello su actividad desulfuradora.

Finalmente se determinó la actividad desulfuradora de la bacteria inmovilizada en la IPNs PAAM/PVA (90/10) la cual disminuyó de forma una drástica respecto de la actividad de la célula libre. El porcentaje de eliminación de dibenzotiofeno fue del 3%.

De entre los resultados obtenidos, la viabilidad de la IPNs(90/10) resultó satisfactoria al permitir una reproducción celular como resultado de la difusión de los nutrientes hacia el interior del soporte.

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha generado un gran interés en el uso de geles hidrofílicos llamados hidrogeles. Estos materiales han sido principalmente utilizados en las áreas de medicina, farmacia, agricultura y biotecnología, entre otras¹⁻³.

La buena biocompatibilidad y propiedades de permeación al agua han sido la base de sus aplicaciones. Sin embargo, la baja fuerza mecánica de los hidrogeles ha limitado muchas de sus aplicaciones potenciales⁴⁻⁵. Nuevas familias de polímeros han sido desarrolladas buscando proporcionar un adecuado comportamiento mecánico de los hidrogeles². Alternativamente la preparación de redes poliméricas interpenetradas (IPN) ha permitido superar la baja fuerza mecánica que presentan los hidrogeles debido a la interpenetración.

Las IPN presentan una estructura de multidominio de fases, con tamaños de dominio del orden de 5 a 10 micras⁶. Estas estructuras con multidominio, al parecer favorecen la biocompatibilidad, además de proporcionarle buenas propiedades mecánicas. A diferencia de los copolímeros en bloque, la fase morfológica en las IPN permanece estable a pesar de los cambios del medio ambiente debido a que es fijada por el entrecruzamiento. El grado en el cual cada componente polimérico está separado en la IPN dependerá del complejo papel que juegan la estabilidad termodinámica, cinética y factores topológicos⁶.

En los primeros estudios sobre IPN se utilizaron polímeros acrílicos, los cuales frecuentemente son uno de los componentes de las IPN⁷⁻⁹, particularmente porque su mecanismo de polimerización es adecuado para llevarse a cabo por el método de preparación secuencial o simultáneo de las IPN. Cuando en una IPN una de las redes es un polímero hidrofílico, los hidrogeles formados pueden ser hinchados en agua⁷.

Las redes interpenetradas hidrofóbicas/hidrofílicas se han estudiado como materiales sensibles al pH o a la temperatura,¹⁰⁻¹⁴ en vista de su aplicación como sistemas de liberación controlada de fármacos,¹⁵⁻¹⁶ o bien como soportes de células debido a sus propiedades de adhesión¹⁴. En la mayoría de estos ejemplos, las redes formadoras de hidrogeles son polimetacrilato de hidroxietilo, poli(acrilamida), poliácido acrílico o poli(alcohol vinílico)¹⁴.

La inmovilización de células por atrapamiento o absorción en hidrogeles, es una técnica utilizada ampliamente en biotecnología a nivel laboratorio y escala industrial¹⁷⁻¹⁹. Los geles poliméricos utilizados con este fin pueden ser polímeros naturales (carrageno, alginato, agar, quitosan entre otros) o sintéticos poli(acrilamida), poliuretanos, poli(alcohol vinílico)²⁰. Cada uno de los materiales antes mencionados muestra diferentes grados de barrera difusional. Así mismo, la toxicidad del medio de síntesis, durante el proceso de inmovilización por atrapamiento, también se considera un serio problema para las células a inmovilizar.

Tanto la poli(acrilamida) (PAAM)²¹⁻²⁵ como el poli(alcohol vinílico) (PVA)²⁶⁻²⁸ son hidrogeles que han sido utilizados como soportes para la inmovilización de microorganismos. Sin embargo, hidrogeles de IPN de PAAM/PVA no han sido descritos como soporte de inmovilización de microorganismos. Este sistema fue seleccionado considerando las propiedades que poseen de forma independiente los hidrogeles de PVA²⁹ y PAAM³⁰. Propiedades que posteriormente se detallarán. Así mismo, se propone a la IPN de PAA/PVA como un soporte que permite la viabilidad de las células inmovilizadas por atrapamiento, a pesar de la toxicidad que presenta el medio de polimerización de la PAAM.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Geles.

Un gel puede ser considerado como un sistema polimérico formado por una red tridimensional (entrecruzada química o físicamente) conteniendo una gran cantidad de disolvente³¹⁻³³. Como regla, los geles son sistemas en los cuales el disolvente representa el componente mayoritario³¹.

Los geles son sistemas que presentan propiedades típicas de líquidos y de sólidos^{31, 34-36}. Su comportamiento en parte como líquidos se debe a su composición ya que en estado hinchado pueden llegar a contener hasta un 95-98% de líquidos como el agua. Pero simultáneamente el gel puede retener ciertas propiedades mecánicas como consecuencia del carácter entrecruzado y de la relación de compuestos hidrofílicos/hidrofóbicos de la matriz polimérica. Así es posible determinar un modelo de mallas e incluso propiedades elásticas asociadas a la estructura reticular o a las interacciones moleculares de grupos funcionales específicos^{31, 37, 38}.

En estado seco, el gel se denomina cerogel y es un material sólido que al estar en contacto con un disolvente se hincha absorbiendo el líquido hasta alcanzar el equilibrio. Una de las propiedades más importantes de este tipo de sistemas es el cambio de volumen que experimenta por la acción de agentes externos (temperatura^{38, 39}, pH y fuerza iónica⁴⁰⁻⁴², irradiación con luz a una longitud de onda adecuada⁴³, campos eléctricos⁴⁴) de tal forma que existe en condiciones específicas una transición de fase característica de cada tipo de sistema⁴⁵. El control físico de este tipo de transición es que una alteración infinitesimal de uno de los parámetros mencionados (temperatura^{38, 39}, pH y fuerza iónica⁴⁰⁻⁴², irradiación con luz a una longitud de onda adecuada⁴³, campos eléctricos⁴⁴) provoca un cambio brusco e intenso en el volumen o de las dimensiones del gel. La Figura 1 muestra de forma esquemática un modelo representado por una esfera que experimenta la transición reversible de volumen en condiciones características provocado por cualquiera de los agentes externos mencionados.

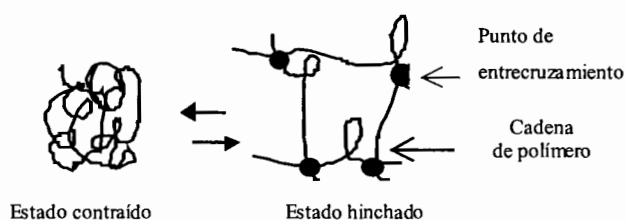


Figura 1. Representación esquemática de un hidrogel en su estado contraído e hinchado.

De acuerdo a su forma de entrecruzamiento los geles se clasifican como: geles químicos y geles físicos. En los geles químicos las cadenas son interconectadas a través de enlaces covalentes, los cuales son uniones muy fuertes, razón por la cual se utiliza una molécula multifuncional como agente de entrecruzamiento. El entrecruzamiento en los geles físicos puede darse a través de cinco tipos de interacciones moleculares las cuales son: fuerzas del tipo Van der Waals, puentes de hidrógeno, hidrofóbicas, interacciones electrostáticas e interacciones originadas por fenómenos de transferencia de carga. Los enlaces de este tipo de interacciones requieren cooperatividad, lo cual implica que los dominios de unión no sean en un solo punto sino que se extienden en todo el espacio ocupado por la molécula⁴⁵.

De manera particular los hidrogeles o geles conteniendo agua, son polímeros caracterizados por su hidrofiliicidad e insolubilidad en agua. En agua, los hidrogeles se hinchan hasta un volumen de equilibrio, pero preservan su forma. La hidrofiliicidad es debido a la presencia de grupos solubilizantes con el agua, tales como $-OH$, $-COOH$, $-CONH-$, $-SO_3H$, etc. La insolubilidad y estabilidad de su forma son debido a la presencia de una red tridimensional. El estado hinchado resulta de un balance entre las fuerzas de dispersión que actúan sobre las cadenas y las fuerzas cohesivas que no evitan la penetración del agua dentro de la red. Las fuerzas cohesivas son frecuentemente debido al entrecruzamiento mediante enlaces covalentes. Otras son de carácter electrostático, hidrofóbico o dipolo-dipolo. El grado y naturaleza de entrecruzamiento, así como la tacticidad y cristalinidad son los responsables de las características antes mencionadas en el estado hinchado. La habilidad para absorber agua sin la perder su forma o fuerza mecánica es valiosa en muchos hidrogeles naturales.

Los hidrogeles naturales se utilizan en la producción de papel, seda artificial, membranas celulósicas y aplicaciones biomédicas. Los hidrogeles sintéticos son utilizados como materiales para prótesis, lentes de contacto y membranas para la liberación controlada de fármacos debido a su compatibilidad con tejido vivo⁴⁷. Otras aplicaciones de los hidrogeles sintéticos son como supraabsorbentes, controladores de ambiente húmedo, separaciones analíticas (en GPC y electroforesis), sistemas de dosificación controlada de medicamentos, dosificación de pesticidas y nutrientes, control de componentes aromatizantes, sistemas de encapsulación celular, enzimática, entre otros⁴⁹. Sin embargo, muchos de sus usos potenciales se ven impedidos por su baja fuerza mecánica, para superar este problema el polímero es entrecruzado o se forma una red polimérica interpenetrada (IPN).

2.2 Redes poliméricas interpenetradas.

El término de IPN indica una clase completa de materiales, y no una simple topología molecular. En la más amplia definición, una IPN es cualquier material que contenga dos polímeros o más, cada uno en forma reticulada. Una restricción práctica para que un material sea considerado como IPN es que los dos polímeros hayan sido sintetizados o entrecruzados uno en presencia del otro o ambos de manera simultánea⁴⁶.

El término IPN implica una interpenetración de las dos redes poliméricas en alguna forma y fue concebido antes de conocer que existe una separación de fases⁴⁶. La interpenetración molecular únicamente ocurre en el caso de una solubilidad mutua total; sin embargo, la mayoría de las IPN presenta una separación de fases en mayor o menor grado.

En general, las IPN se clasifican en tres grupos de acuerdo a su ruta de síntesis y son los siguientes:

1. IPN secuencial (IPNs). La IPN se forma polimerizando primero una mezcla del monómero I con un agente de entrecruzamiento y un iniciador o catalizador para formar una red. La red es hinchada con la segunda combinación de monómero y agente de entrecruzamiento y polimerizado para formar una IPNs (Figura 2-a).

2. IPN simultánea (SIN). Dos monómeros o más se combinan, cada uno con su respectivo agente de entrecruzamiento e iniciador, para ser polimerizados al mismo tiempo de manera independiente (Figura 2-b).
3. Semi IPN (Semi-IPN). Se tiene la formación de la red por parte de uno de los monómeros, mientras que el otro monómero únicamente da origen al polímero lineal (Figura 2-c).

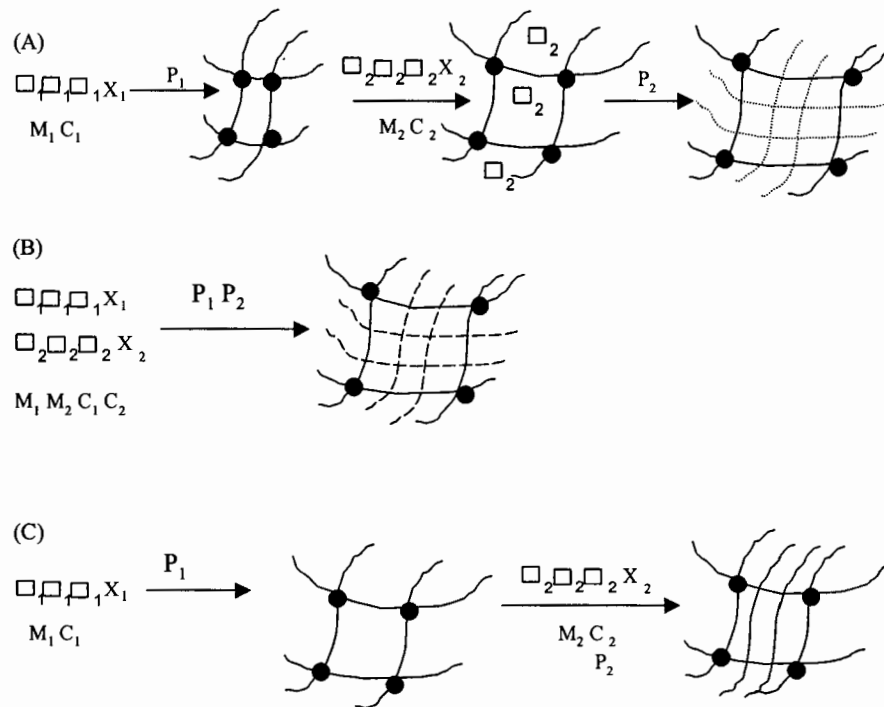


Figura 2. Clases de IPN. (a) IPN secuencial; (b) IPN simultánea; (c) semi-IPN. Red I = línea sólida; red II = línea desvanecida. M = monómero; P = polimerización; X = agente de entrecruzamiento, C = catalizador.

El método de síntesis seleccionado dependerá de las aplicaciones de la IPN, ya que sus propiedades estarán influenciadas por este.

Aunado a la mezcla mecánica y copolimerización, las IPN representan un tercer mecanismo por el cual, diferentes polímeros pueden ser combinados y al igual que las mezclas no existen enlaces covalentes entre los dos polímeros.

La combinación química y física de dos o más polímeros estructuralmente diferentes, proporciona una ruta que permite la modificación de propiedades para una aplicación específica. Esta combinación puede proporcionar al material propiedades de flexibilidad, resistencia al impacto, rigidez, resistencia a la inflamabilidad, etc. Las propiedades físicas y mecánicas de las IPN dependerán de las características propias y la proporción en la cual se combinan los polímeros⁴⁶.

Generalmente la formación de una IPN es a través del entrecruzamiento químico. Sin embargo, el entrecruzamiento físico también puede ser utilizado. Por ejemplo, en un copolímero tribloque ABA, la forma usualmente vítrea de los bloques terminales conforman una fase discreta en la fase polimérica proporcionando el entrecruzamiento físico. En los polímeros amorfos, los segmentos cristalinos sirven para llevar a cabo el entrecruzamiento físico⁴⁷.

2.2.1 Morfología de IPN.

La mayoría de las IPN y materiales relacionados investigados hoy en día muestran separación de fases. Las fases, sin embargo, varían en cantidad, tamaño, forma, flexibilidad de sus interfases y grado de continuidad. Juntos estos aspectos constituyen la morfología del material y las posibles variaciones entre ellas controlan muchas de las propiedades del material.

A. Factores que afectan la morfología.

La morfología de las IPN está en función de la compatibilidad química (parámetro de solubilidad), tensión interfacial, densidad de entrecruzamiento, cinética de polimerización y tipo de componentes. Estos factores pueden variar de forma independiente. A continuación se da un pequeño resumen de cada uno de estos factores.

1. Compatibilidad.

Un grado de compatibilidad entre polímeros es necesaria para las IPN, porque los monómeros o prepolímeros deben formar soluciones o redes hinchadas durante la síntesis. La separación de fases generalmente sucede durante el transcurso de la polimerización, pero el tamaño de la fase resultante es mucho más pequeño para sistemas con alta compatibilidad⁴⁸.

2. Entrecruzamiento.

El incremento en la densidad de entrecruzamiento en la primera red sintetizada en una IPN disminuye claramente el tamaño del dominio de la segunda red⁴⁹.

3. Método de polimerización.

Para las IPNs, el efecto de compatibilidad y densidad de entrecruzamiento ha sido bien descrita. La morfología de la red es controlada principalmente por la primera red. Por otro lado, en el caso de las redes poliméricas interpenetradas preparadas de manera secuencial, las redes se forman durante un el mismo periodo de tiempo. Aún cuando no necesariamente a igual velocidad y la morfología resultante es mucho más compleja.

4. Composición.

La composición de las IPN determina la cantidad de las dos fases presentes después de la polimerización. El incremento en la cantidad del polímero II generalmente conduce a incrementar el tamaño del dominio, pero el efecto también depende del método de polimerización⁴⁶.

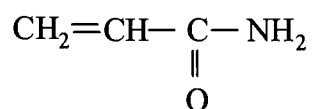
Los geles de IPN son atractivos porque la permeabilidad a través de estos materiales puede ser controlada no únicamente cambiando su estructura si no también alterando condiciones externas (pH, fuerza iónica y temperatura)⁵¹⁻⁵³.

Una gran variedad de IPN se han sintetizado tales como: poliuretano con polimetilmetacrilato, poliuretano con acrílicos, poliuretano con poliestireno, poliuretano con poliacrilato o epóxidos, poliuretano con polisiloxanos, copolímero tribloque de poliestireno-isopreno con poliestireno, poliésteres con policarbonatos, poliácido acrílico con poli(acrilamida), poliácido acrílico con poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida)-poli(alcohol vinílico), etc. Estas son sólo algunas IPN de la gran variedad que existe. En general la aplicación que se les ha dado a estos materiales es como rellenos dentales, membranas de bioseparación, soportes para medicamentos de liberación controlada, etc⁵⁰⁻⁵³.

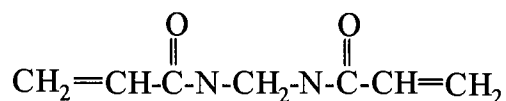
En este trabajo se sintetizó la IPN de poli(acrilamida)-poli(alcohol vinílico), la cual ha sido ya sintetizada de manera secuencial por entrecruzamiento químico para ser utilizada como membrana para la separación de la mezcla metanol-agua⁵⁴. Sin embargo, el proceso de preparación que se presenta es diferente debido a que se combinan métodos de preparación, entrecruzamiento físico y químico. A continuación se presentan de manera independiente las propiedades y características de cada una de las redes que constituyen la IPN de poli(acrilamida)-poli(alcohol vinílico).

2.3. Gel de poli(acrilamida).

En las últimas décadas, el uso industrial de los polímeros de acrilamida ha tenido un enorme crecimiento. La acrilamida es un monómero cuya estructura es



Este monómero inicia una reacción en cadena cuando se pone en contacto con radicales libres, los cuales son proporcionados por la descomposición del persulfato de amonio en medio acuoso y que a su vez se estabilizan por la N, N, N', N'-tetrametilendiamina (TEMED), dando lugar al crecimiento de las cadenas macromoleculares de poli(acrilamida). Cuando el agente bifuncional N, N'-metilenbisacrilamida es incluida en la reacción de polimerización las cadenas se entrecruzan para formar el hidrogel. La porosidad es determinada por la longitud de la cadena y el grado de entrecruzamiento. La estructura de la N, N'-metilenbisacrilamida es la que a continuación se presenta.



La estructura del hidrogel de PAAM se representa en la Figura 3. Un hidrogel derivado de acrilamida es una red entrecruzada de polímeros cuyo peso molecular es muy alto y posee una alta capacidad de absorción de agua, además de ser permeables al oxígeno y poseer buena biocompatibilidad⁵⁵⁻⁵⁷. Las interacciones responsables para la adsorción de disolvente son, entre otras, fuerzas capilares, ósmosis y las interacciones moleculares polímero/disolvente. El resultado es una estructura porosa en la cual pueden ser atrapadas enzimas, microorganismos,

fármacos, etc. La estructura interna del hidrogel depende de las cantidades relativas de sus componentes tales como; el monómero y el agente de entrecruzamiento⁴²⁻⁴³.

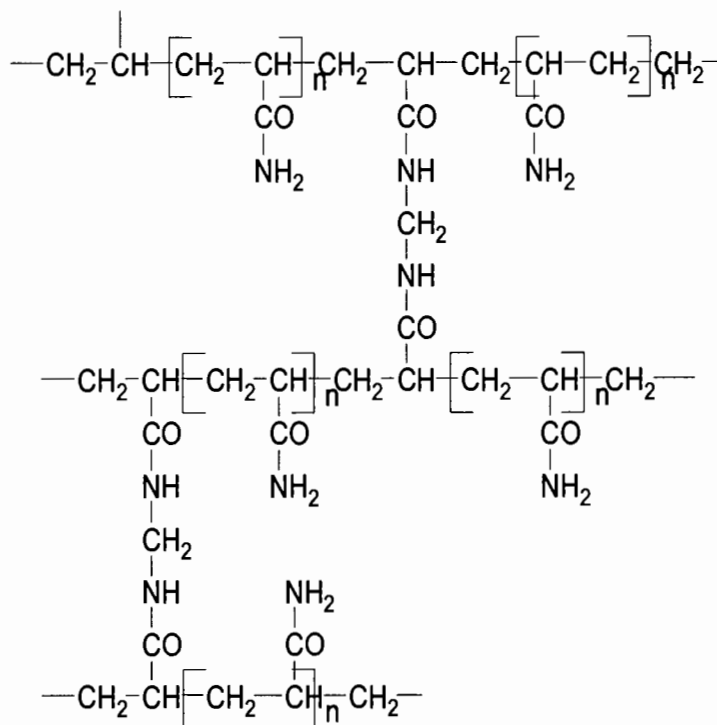


Figura 3. Estructura química del hidrogel de poli(acrilamida).

La PAAM ha sido utilizada tradicionalmente como una matriz inerte para cargar enzimas; en la mayoría de los casos el resultado es un sistema de inmovilización que frecuentemente presenta una baja actividad catalítica. La estructura del hidrogel, así como el tamaño de poro, son una función de las proporciones tanto del monómero como del agente de entrecruzamiento, los cuales conforman la red. La elección correcta de la relación monómero/agente de entrecruzamiento, permitirá obtener un hidrogel de composición optimizada, dando como resultado un hidrogel que permita la inmovilización adecuada de enzimas o microorganismos sin poner en peligro la actividad enzimática así como evitar la salida de las enzimas, pero al mismo tiempo que permita una buena difusión dentro de la matriz polimérica⁵⁸⁻⁵⁹. Uno de los principales impedimentos que restringe la utilización de la PAAM para su utilización efectiva en la inmovilización por atrapamiento de microorganismos, es la toxicidad del monómero de acrilamida y agente de entrecruzamiento (N, N-

metilenbisacrilamida) durante el proceso de polimerización, además de que son materiales muy frágiles.

2.4 Gel de poli(alcohol vinílico).

La red estructural del gel de poli(alcohol vinílico) (PVA) entrecruzado consiste principalmente de segmentos de cadena $-\text{CH}_2-\text{CHX}-$ con átomos de carbón alternado que poseen un grupo funcional ($\text{X}=\text{OH}$). La gran abundancia de estos grupos proporciona el carácter hidrofílico del polímero. El PVA se produce comercialmente por la hidrólisis del de poliacetato de vinilo, debido a que el alcohol vinílico, como monómero no existe en estado libre, aún cuando se han detectado trazas de este⁶⁰.

El PVA es un polímero biocompatible que ha sido utilizado para la preparación de algunos hidrogeles y el cual, puede ser potencialmente empleado como membrana sintética o resina de intercambio. Una solución acuosa de PVA gelará gradualmente y experimentará un incremento gradual en su elasticidad a temperatura ambiente. Este no es un fenómeno nuevo, recientes investigaciones demostraron que cuando el PVA se calienta para disolverlo, y posteriormente se somete a ciclos alternados de congelamiento-descongelamiento, forma un gel altamente elástico⁵⁸. Esta transición sol-gel produce un gel termorreversible^{59, 60}. El material de PVA resultante de este tratamiento presenta características peculiares y únicas. El hidrogel es estable a temperatura ambiente y retiene su forma original, pero puede ser extendido cinco o seis veces su tamaño inicial. Este comportamiento indica su naturaleza elástica y su alta fuerza mecánica. Estas propiedades pueden depender del peso molecular del polímero, concentración de la solución acuosa, la temperatura y tiempo del congelamiento y número de ciclos de congelamiento-descongelamiento. En agua, el hidrogel de PVA es esencialmente insoluble pero experimenta un hinchamiento significativo⁵⁹⁻⁶². El desarrollo de esta técnica de reforzamiento (gelación criotrópica) está basado en los primeros trabajos del grupo de Peppas^{63, 64}. La criogelación o gelación criotrópica es una técnica que permite la obtención de materiales altamente porosos.

2.4.1 Gelación criotrópica.

La gelación criotrópica es un tipo específico de formación de un gel como resultado de la influencia inicial de sistemas potencialmente capaces de gelar. En este caso, el proceso de gelación ocurre durante estos ciclos alternados de congelamiento/almacenamiento, congelamiento/descongelamiento. De este modo la principal y mayor característica de la formación del gel es la cristalización obligatoria de un líquido de bajo peso molecular existente en el sistema inicial (agua). Esta característica diferencia la gelación criotrópica de la bien conocida formación del gel mediante gelación por enfriamiento inducido, donde la formación del gel tiene lugar después del enfriamiento del sistema, pero sin la transición de fase de un disolvente, de igual modo como ejemplo de la gelación de soluciones esta la gelatina o agar que gelan por debajo de su temperatura de *sol-gel*^{65, 67}.

En general los sistemas poliméricos espacialmente estructurados con disolvente inmovilizado, liogeles, son bien conocidos por ser obtenidos por hinchamiento limitado de polímeros no enlazados o por el hinchamiento de cerogeles (geles secos).

Después de que el sistema es congelado y descongelado se obtienen macroporos como resultado de los cristales del disolvente fundido, por lo que los cristales actúan como porógenos (formadores de poros). De hecho, estos cristales crecen hasta encontrarse en una superficie cristalina cercana una con otra, los macroporos en los criogeles son interconectados uno con otro y su tamaño depende de la naturaleza del disolvente y el régimen de congelamiento descongelamiento. En la poli(acrilamida) su macroporosidad es determinada por el régimen de tratamiento criogénico. El grado de hidrólisis tiene influencia sobre el grado de hinchamiento. A mayor grado de hidrólisis menor grado de hinchamiento.

Urashizaki y colaboradores determinaron que el número de ciclos de congelamiento-descongelamiento causa un incremento en el grado de entrecruzamiento, y en consecuencia el material es más rígido a medida que el número de ciclos fue incrementado⁶³.

La red de poli(alcohol vinílico) es formada por entrecruzamiento físico. A continuación se darán más detalles de la gelación criotrópica de las soluciones de PVA.

2.4.2 Bases fisicoquímicas de la gelación criotrópica en soluciones de poli(alcohol vinílico).

El PVA se clasifica como un polímero hidrofílico y sus soluciones concentradas son capaces de gelar por sí mismas con la formación de redes espaciales no covalentes bajo almacenamiento prolongado. El principal tipo de enlaces intermoleculares como nudos de unión de redes en todos los geles termorreversibles de PVA, incluyendo criogeles, son la formación de puentes de hidrógeno que ocurre entre los grupos -OH de las cadenas poliméricas vecinas. De este modo, la tacticidad del PVA es un parámetro fundamental que debe ser conocido debido a que los sitios sindiotácticos en estas cadenas son los responsables de la formación de enlaces intermoleculares y en cierta medida los sitios atácticos, mientras que los sitios isotácticos participan principalmente en interacciones intramoleculares⁶⁴, como se muestra en la Figura 4.

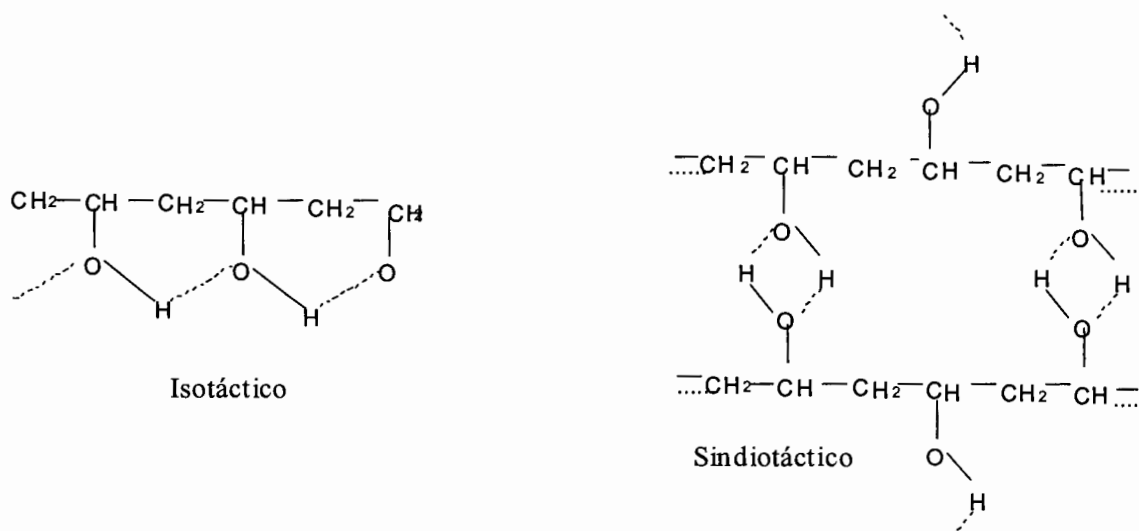


Figura 4. Estructura química de los estereoisómeros; isotáctico y sindiotáctico del poli(alcohol vinílico).

Cuando las soluciones de PVA son sometidas a ciclos de congelamiento-descongelamiento se facilita el proceso de gelación como resultado del incremento en la concentración de las moléculas disueltas en las regiones no congeladas del sistema, la cual se incrementa cuando el agua cristaliza primero. Estas inclusiones como líquido no congelado (son llamadas microfases líquidas)⁵⁸ dentro de las soluciones poliméricas macrocongeladas pueden existir a temperaturas lo suficientemente bajas (para el sistema “agua-PVA” puede ocurrir 50°C abajo

del punto de fusión del sistema)⁶⁵. Como resultado de este proceso las cadenas de PVA forman una estructura ordenada conocidas como zonas microcristalinas. Estas actúan como nudos de unión y se incrementan únicamente cuando los grupos OH están libres para participar en la interacción entre cadenas. El grado de hidrólisis y peso molecular son otros factores que tienen efecto sobre el proceso de gelación criotrópica. De manera particular los grupos residuales acetato (OAc) interfieren con el acoplamiento de contactos intermoleculares necesarios para la formación de cristalitas de PVA; por lo tanto, para la preparación de criogeles altamente rígidos es necesario utilizar PVA con grados de hidrólisis mínimo del 99%.

Por otra parte, es necesaria una concentración alta de las soluciones de PVA para la preparación de matrices criogélicas mecánicamente rígidas; sin embargo, las soluciones muy concentradas (> 20% en peso) son muy viscosas y difíciles de manipular por lo cual se recomiendan soluciones de PVA en un intervalo del 7 al 15% en peso y pesos moleculares entre 80,000 y 100,000. La temperatura de congelamiento no únicamente controla el enfriamiento dinámico sino también el equilibrio de fases. Se ha encontrado que a temperaturas bajas de congelamiento se facilita la interacción polímero-polímero (mediante puentes de hidrógeno) disminuyendo la rigidez del material⁶⁴. Otro de los factores que influyen en el proceso de gelación es la tacticidad.

2.4.3 Tacticidad del poli(alcohol vinílico).

El término tacticidad se refiere al ordenamiento espacial de las unidades estructurales de un polímero. En los polímeros vinílicos, como lo es el PVA, se pueden presentar las configuraciones meso (m, del mismo lado) a las cuales se les llama isotácticas y las configuraciones racémicas (r, o alternada) a estas se les llama sindiotácticas, como se muestra en la Figura 5, una mezcla de las configuraciones antes mencionadas se denominan atácticas.

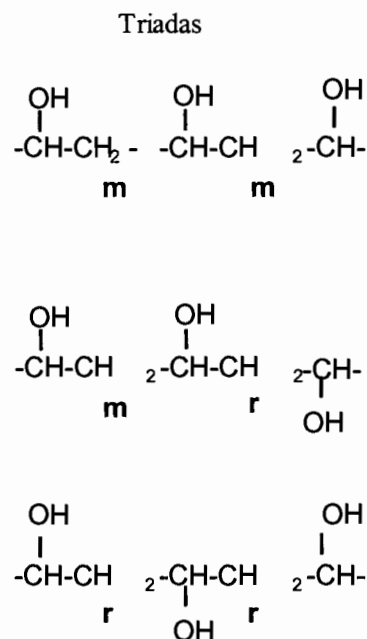


Figura 5. Representación de la tacticidad de la estructura química del PVA.

Como es bien conocido, el PVA es producido por la hidrólisis de una variedad de poli(ésteres vinílicos), tal como el poli(acetato) de vinilo (PVAc), poli(trifluoroacetato de vinilo), poli(propionato de vinilo), poli(benzoato de vinilo), entre otros⁴⁶. Uno de los factores más importantes que dominan las propiedades del PVA es la tacticidad. La tacticidad del PVA es controlada por la estructura y propiedades de sus monómeros ésteres vinílicos o éteres vinílicos y las condiciones de su correspondiente polimerización. De este modo, la determinación de la tacticidad del PVA utilizado en la preparación de hidrogeles por criogelación es primordial, debido a que los sitios sindiotácticos en las cadenas poliméricas son los responsables de la formación intermolecular por puentes de hidrógeno, mientras que los sitios isotácticos participan principalmente en las interacciones intermoleculares⁶⁵.

Al ser la tacticidad un parámetro tan importante dentro de la preparación de los hidrogeles termorreversibles del PVA, ésta pasa a ser un parámetro a determinar como parte de la caracterización primaria del PVA.

2.5 Inmovilización.

La inmovilización se define como la unión física o química de las células o enzimas a un soporte biológicamente inerte, el cual debe dar a las células ciertas características deseables dentro de un proceso biocatalítico⁶⁸.

Las células inmovilizadas pueden ser células muertas que poseen actividad enzimática, o bien células en crecimiento o vivas requeridas para un proceso bioquímico complejo, en el cual las coenzimas, cofactores, etc., son también involucrados. La inmovilización de microorganismos para la aplicación de una sola actividad enzimática es una alternativa a la inmovilización de enzimas que ha tenido un gran desarrollo en los últimos años. En general, el uso de células inmovilizadas supera alguno de los problemas que se tienen al inmovilizar enzimas, tal como el alto costo de manufactura y baja estabilidad operacional.

Las células son ya catalizadores heterogéneos por ser materiales orgánicos sólidos, pero en la práctica la flotabilidad neutral gelatinosa les hace imposible utilizarse como tal, sin la inmovilización completa. La membrana exterior celular puede ser usada como un sitio de anclaje a los soportes, aunque algunas veces la habilidad de las células para cambiar su estructura hace pensar que solo permanecerá enlazada si está provista del micromedioambiente en todo momento.

La inmovilización de células cubre una amplia gama de aplicaciones y son componentes esenciales de muchos de los procesos biotecnológicos. Las ventajas que se pueden obtener con la inmovilización son las siguientes:

1. Se puede recuperar fácilmente el biocatalizador del medio de reacción.
2. El biocatalizador puede ser reutilizado.
3. Bajo costo de operación del sistema biocatalítico.
4. El biocatalizador puede estar en altas concentraciones.

El tamaño de las células es una característica muy conveniente a través de la cual el catalizador puede ser retenido por atrapamiento a una estructura semipermeable. La necesidad

de mantener la estructura organizada de la célula restringe el modo de inmovilización y las condiciones operacionales a las que éstas pueden estar sujetas.

Uno de los principales problemas que se pueden presentar al inmovilizar una célula es la transferencia limitada de masa, principalmente cuando se utiliza el método de inmovilización por atrapamiento. Para un método de inmovilización dado, las limitaciones de transferencia de masa se definen por la actividad específica máxima que se puede obtener. Para evitar los problemas de difusión se proponen dos alternativas: reducción en la carga de la biomasa y el tamaño de partícula. Los problemas difusionales regirán la eficiencia del proceso biocatalítico⁶⁸.

2.5.1 Métodos de inmovilización.

Existen tres categorías dentro de los métodos de inmovilización: enlazamiento físico o adsorción, enlazamiento covalente y atrapamiento. Los métodos de inmovilización disponibles son igualmente aplicables a células y enzimas.

Enlazamiento físico o adsorción. El enlace físico o adsorción es la técnica de inmovilización más antigua pero la menos satisfactoria (Figura 6-a). Las células o enzimas son mezcladas con adsorbente y luego empacadas en una columna. Sin embargo, la facilidad de adsorción significa también facilidad de desorción y con ello la pérdida del biocatalizador.

La adsorción en un soporte sólido está regido por las fuerzas de Van der Waals, interacciones electrostáticas e interacciones iónicas. Este método resulta poco conveniente ya que las células tienden a la autólisis y en el caso de las enzimas estas pierden su actividad, parcial o total⁶⁹.

Enlace covalente. La formación de un enlace covalente (Figura 6-b) entre catalizador y soporte genera un conjugado estable difícil de disociar durante su uso continuo. Las condiciones en las que se lleva a cabo la formación del enlace covalente frecuentemente destruyen la delicada estructura tridimensional del biocatalizador, provocando una pérdida inevitable de más del 50% de la actividad catalítica. El uso de este método de inmovilización

se justifica cuando la estabilidad que se obtiene compensa la actividad perdida o bien cuando se requiere que no exista pérdida de actividad en las corrientes del producto⁶⁹.

Atrapamiento. Este método de inmovilización genera un sistema en el que las moléculas de sustrato y de producto pasan libremente a través de la red polimérica, pero que a su vez ésta sea impermeable al biocatalizador (células), es por ello que el tamaño de malla es un parámetro que debe de ser considerado (Figura 6-c).

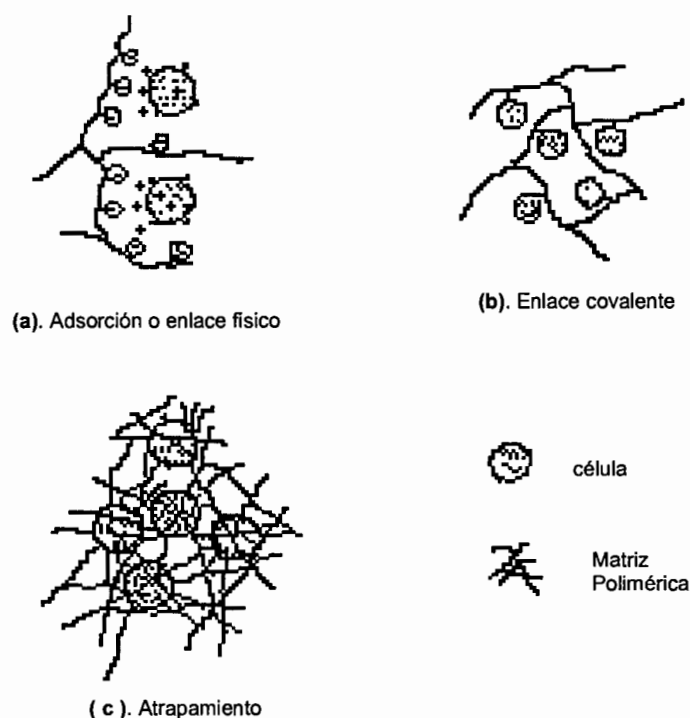


Figura 6. Métodos de inmovilización.

De manera particular, el atrapamiento en geles tridimensionales ha sido utilizado exitosamente en la inmovilización de células. Esta técnica involucra la gelación de una suspensión acuosa con células originando con ello la distribución del biocatalizador a través del sólido resultante. Generalmente los geles se obtienen mediante una polimerización *in situ* de monómeros, por ejemplo la acrilamida y bisacrilamida forman geles estables con propiedades predecibles obtenidos mediante polimerización *in situ*. Los geles formados por entrecruzamiento físico generalmente tienen propiedades físicas inferiores a los obtenidos por entrecruzamiento

químico, pero las células están sujetas a condiciones menos severas⁶⁹, como puede ser la toxicidad de los monómeros, agentes de entrecruzamiento o incluso los iniciadores.

2.5.2 Características del método de inmovilización.

El método de inmovilización utilizado debe dar como resultado el cumplimiento de los siguientes seis factores:

1. Estabilidad operacional del biocatalizador inmovilizado.
2. Costo del biocatalizador inmovilizado.
3. Actividad y rendimiento del biocatalizador inmovilizado.
4. La regeneración del biocatalizador.
5. El costo de la configuración del reactor apropiado.
6. Tiempo de vida media del biocatalizador.

La selección del método de inmovilización estará en función del tipo de célula y su modo de interacción de ésta con el sustrato.

En un sistema inmovilizado son tres los componentes importantes: la célula, el soporte y el modo de interacción de la célula con el soporte. El soporte es uno de los principales contribuyentes que determinará la eficiencia del proceso biocatalítico. Aun cuando no existe un soporte "universal", un material considerado como tal debe cumplir con las siguientes características⁷⁰:

- a. Gran área superficial.
- b. Permeable.
- c. Carácter hidrofílico.
- d. Insoluble en el medio de reacción.
- e. Biocompatible.
- f. Estable térmica, mecánica y químicamente.
- g. Alta rigidez.
- h. Tamaño y forma conveniente.
- i. Resistente al ataque microbiano.

Aunado a esto, el conjugado inmovilizado no debe permitir la liberación de microorganismos a la corriente del producto ni imponer restricciones de difusión hacia el sustrato y nutrientes, debe ser fácilmente manejable y permitir una alta capacidad de carga de biomasa⁷⁰.

2.5.3 Clasificación de soportes.

Un soporte sólido puede ser clasificado de acuerdo a su área superficial y tamaños de poro. A su vez, estos pueden ser clasificados como porosos y no porosos, dentro de los porosos podemos incluir a los geles que debido a su carácter elástico no tienen un tamaño de poro estable y son rápidamente compactados conduciendo a una gran caída de presión cuando se trabaja en columna⁶⁸.

Otra manera de clasificar a los soportes es de acuerdo a su naturaleza química en inorgánicos y orgánicos. La mayoría de los sistemas inmovilizados comercialmente disponibles se tienen en matrices orgánicas, esto debido a que hay una gran variedad de grupos funcionales reactivos que pueden ser enlazados sobre las matrices orgánicas. En contraste, la superficie de los soportes inorgánicos presenta en solución grupos hidróxilo que solo pueden interactuar con los grupos carboxilo o amino de las moléculas proteicas por adsorción^{70, 71}.

Soportes orgánicos. Estos son clasificados en macromoléculas naturales (alginato, carrageno, quitosán, celulosa, entre otros) y sintéticas, estas últimas conforman la familia más grande de soportes (poli(acrilamida), poli(acrilato), poliuretano, poli(alcohol vinílico), poliestireno, metacrilatos de glicidilos, hidroxialquil metacrilatos, poliamidas, etc.). La utilización constante de estos materiales como soportes se debe a sus características físicas, químicas y la facilidad de preparar varios polímeros para una misma aplicación. Algunas ventajas de este tipo de soportes son los diferentes grados de porosidad disponible y su composición química que puede ser alcanzada por diferentes tipos de reacciones⁶⁹.

Soportes inorgánicos. Este tipo de soportes también son utilizados a nivel industrial, pero en menor proporción que los orgánicos, sin embargo, tienen sus ventajas sobre su contraparte, por ejemplo tiene alta resistencia mecánica, estabilidad térmica, resistencia a disolventes orgánicos y al ataque microbiano, fácil de manejar, excelente vida útil y de fácil regeneración⁶⁹.

La utilización de un soporte en particular dependerá del sistema que se vaya a utilizar. Los soportes orgánicos son fácilmente biodegradados. Sin embargo, al ser utilizados en la inmovilización de alguna bacteria se elegirá uno que no sea atacado por ella.

2.5.4 Geles utilizadas como soportes.

La inmovilización de microorganismos por atrapamiento en hidrogeles ha sido sujeta a una amplia investigación basada en su aplicación potencial en la eliminación de contaminantes biodegradables presentes en aguas contaminadas y en la síntesis de bioproductos mediante fermentación. La utilización generalizada de hidrogeles, en la inmovilización de microorganismos, dependerá de que éstos cuenten con una estructura adecuada en términos de porosidad y propiedades físicas tales como: razón de hinchamiento, contenido de agua y que mantengan la viabilidad de los microorganismos⁷⁰.

Entre las matrices de hidrogeles que han sido propuestas como posibles soportes se encuentra cualquier biopolímero natural (polisacáridos tales como el alginato, carrageno, agar etc. o proteínas tales como gelatina, colágeno y otros) o polímeros sintéticos (poliacrilatos, poliuretanos, poliéter).⁷¹ Sin embargo, cada uno de los soportes antes mencionados presenta ventajas y desventajas, con respecto a su influencia sobre las células atrapadas, así como la estabilidad química y biológica de la matriz resultante. Un punto fundamentalmente importante son las condiciones favorables del micromedioambiente para las células inmovilizadas, particularmente, cuando se están utilizando células vivas que requieren un adecuado suministro de sustrato y eliminación de metabolitos. De este modo, un soporte de gel "ideal" debe contar con una estructura altamente porosa (preferiblemente macroporosa), con poros en un intervalo de 20 a 50 μm además de una buena distribución de ellos, para no impedir la difusión de solutos⁷². También el candidato a soporte debe tener una alta capacidad de absorción de agua que permita una viabilidad celular, considerándose aceptable un valor mayor al 90%. Esta estructura y propiedades son inherentes a los criogeles preparados por la técnica de congelamiento-descongelamiento. Todos los requerimientos que debe tener un soporte "ideal" no se han encontrado en los materiales antes mencionados. Sin embargo, la combinación de las propiedades físicas y químicas de dos o más hidrogeles mediante la

técnica de **redes poliméricas interpenetradas** puede dar origen a un soporte de hidrogel con las características que se buscan en un soporte para la inmovilización de microorganismos⁷³.

Considerando lo anterior, las IPN sintetizadas en este trabajo fueron caracterizadas determinando el contenido de agua en el equilibrio, resistencia a la compresión, comportamiento térmico (T_m), morfología, porosidad e interacciones químicas para evaluar su viabilidad como soportes.

La inmovilización de una bacteria desulfuradora se utilizó como un modelo de aplicación de este tipo de soportes desarrollados. El sistema inmovilizado fue probado en la eliminación de azufre utilizando también un compuesto modelo (dibenzotiofeno). A continuación se describen los aspectos más relevantes del proceso de biodesulfuración.

2.6 Biodesulfuración.

En la búsqueda de nuevos métodos para la eliminación de compuestos organosulfurados en los combustibles que se obtienen a partir de la destilación del petróleo, surge el concepto de la biodesulfuración. La biodesulfuración es un método para la eliminación de compuestos azufrados a través de microorganismos que presentan la habilidad de metabolizar moléculas organosulfuradas que son comúnmente recalcitrantes para el sistema de hidrosulfuración.

En la actualidad la biodesulfuración es un tema de gran interés que ha generado una serie de proyectos apoyados principalmente por las compañías petroleras de todo el mundo, incluso ya se han llegado a desarrollar sistemas de biodesulfuración a nivel planta piloto eliminando el 90% del contenido de azufre orgánico en un tiempo de seis horas utilizando células libres⁷⁴. Este método de eliminación de azufre orgánico ha permitido obtener resultados satisfactorios, sin embargo, en estos procesos homogéneos el biocatalizador (células o enzimas) pueden no expresar su actividad desulfuradora máxima y el control del proceso tiende a ser difícil y de baja intensidad (el proceso es lento y trabaja solo con soluciones diluidas), aunado a esto, es frecuente ver que el biocatalizador es destruido en el subsecuente drenado después de haber completado su función, de esta manera la actividad catalítica se pierde.

Para lograr el aprovechamiento máximo de la actividad enzimática surge como una alternativa la inmovilización de células o enzimas. En un sistema inmovilizado son tres los componentes importantes: célula, soporte y el modo de interacción entre la célula y el soporte. El soporte es uno de los principales contribuyentes que determinan la eficiencia del proceso biocatalítico.

2.6.1 Proceso de biodesulfuración.

Este proceso consiste en eliminar el azufre a través de la acción de microorganismos o sus enzimas, que en su mayoría son bacterias aeróbicas y anaeróbicas.

El proceso de biodesulfuración (BDS) utilizando microorganismos es conocido por ser prometedor en términos de seguridad al ser realizado bajo condiciones moderadas (temperatura ambiente, presión atmosférica y bajos costos de tratamiento)⁷⁵⁻⁷⁸. La BDS ha sido reportada desde 1935, y mucho trabajo ha sido realizado con el objetivo de entender la bioquímica del metabolismo microbiano, en la biotransformación de compuestos organosulfurados⁷⁹.

Sin embargo, la microbiología del petróleo se inicia con los trabajos de Sohngen y Tausson en 1913 y 1925 respectivamente, con bacterias que oxidan a los hidrocarburos de manera inespecífica, originando con ello la degradación del combustible⁷³. Tratando de mejorar el proceso de BDS y evitar la degradación del combustible se han seguido las investigaciones mediante el aislamiento de un gran número de microorganismos provenientes de lugares contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo, aguas termales sulfurosas y aguas residuales industriales. Sin embargo, no todos los microorganismos son específicos para romper únicamente el enlace C-S presente en los compuestos organosulfurados. Los principales microorganismos aislados capaces de metabolizar y romper tales enlaces son: *Pseudomonas sp.*, *Bacterium sp.*, *Acromobacter sp.*, *Clostridium sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Microcosi sp.*, *Actinomiceto sp.*, *Aspergillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Proactinomyces sp.*, *Bacillus sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Desulfovibrio sp.*, entre otras.⁶⁸

Algunas de estas cepas presentan actividades óptimas y estabilidad genética para obtener una adecuada eliminación de azufre sin degradar el combustible.

Durante algún tiempo la mayoría de las investigaciones sobre BDS se realizaron utilizando cepas puras, tanto silvestres como mutadas, obteniendo índices de eliminación de DBT alrededor del 90%. Sin embargo, en combustibles el índice de eliminación de azufre de los compuestos organosulfurados puede sufrir amplias variaciones (desde el 12.5 hasta el 90%) dependiendo del tipo de bacteria y las condiciones utilizadas durante el proceso de biodesulfuración^{68, 73}. Otros trabajos reportados han realizado experimentos combinando microorganismos de dos cultivos microbianos de los géneros: *Rhodococcus rhodochrous* y *Rhodococcus erythropolis*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella sp.*, *Bacillus sphaericus* y *Pseudomonas putida*, encontrando que la mezcla más apropiada para eliminar el azufre es la *Rhodococcus rhodochrous IGTS8* y *Bacillus sphaericus IGTS9*. De estos dos últimos la *Rhodococcus rhodochrous IGTS8* es la que presenta mejores resultados⁸⁰.

Rhodococcus rhodochrous IGTS8 es un microorganismo aerobio y tiene la habilidad de utilizar el DBT como fuente de azufre pero no de carbono⁸¹, sugiriendo con ello su utilización en el proceso de BDS y posee las siguientes características:

1. Es un actinomiceto aerobio, gram positivo, perteneciente a la familia Nocardiae.
2. No produce esporas.
3. Es pleomórfico, el cual después de la formación de un micelio primario se fractura rápidamente en bacilos y cocos.
4. La coloración de colonias va desde el amarillo hasta el salmón.
5. El análisis quimiotaxonómico revela que la pared celular esta constituida de ácido diaminopimélico, teniendo ácido tuberculoesteárico; además, siendo la mayoría de los ácidos grasos el ácido palmítico, el palmitoleico y el esteárico.

Este microorganismo fue obtenido de fuentes naturales tales como lodos contaminados, aguas residuales y suelos contaminados de petróleo crudo⁸². Inicialmente fue aislado con la finalidad de ser utilizado en la biodegradación de hidrocarburos, posteriormente el cultivo fue mantenido bajo condiciones continuas de restricción de azufre y en presencia de dibenzotiofeno. Este cultivo fue expuesto a un químico mutagénico (1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina, NTG), provocando una mutación no dirigida a nivel plásmido, esta mutación

le confiere al microorganismo utilizar al dibenzotiofeno como fuente de azufre al metabolizarlo por la ruta metabólica "4S"⁸³.

La ruta metabólica a través de la cual se lleva a cabo la eliminación de azufre de los compuestos organosulfurados es conocida como "4S", y fue propuesta inicialmente por Kee Rheen en 1987.⁸⁴

El metabolismo se realiza a través de un complejo proceso enzimático que requiere de oxígeno para metabolizar el DBT a los intermediarios antes de llegar a los productos finales para realizar la ruta completa⁸⁵.

La primera etapa en el mecanismo de biodesulfuración se inicia por la oxidación del DBT a DBTO, esta reacción se produce por la transferencia de un electrón del flavín mononucleótido y se cataliza por la enzima DBTO monoóxigenasa. Esta misma enzima cataliza la oxidación del sulfóxido a sulfona (DBTO₂). La primera ruptura del enlace carbón azufre (C-S) es catalizada por la enzima DBTO₂ sulfona monoóxigenasa transfiriéndose un electrón del flavin mononucleótido. La producción del sulfito y una molécula de hidrocarburo intacta es la última reacción en la ruta, esta es catalizada por la enzima desulfinasas. Los productos del proceso de biodesulfuración son el 2-hidroxibifenilo (HBP) y azufre inorgánico (SO₃²⁻)^{86, 87}. En la Figura 7 se muestra la ruta metabólica del DBT a 2-hidroxibifenilo.

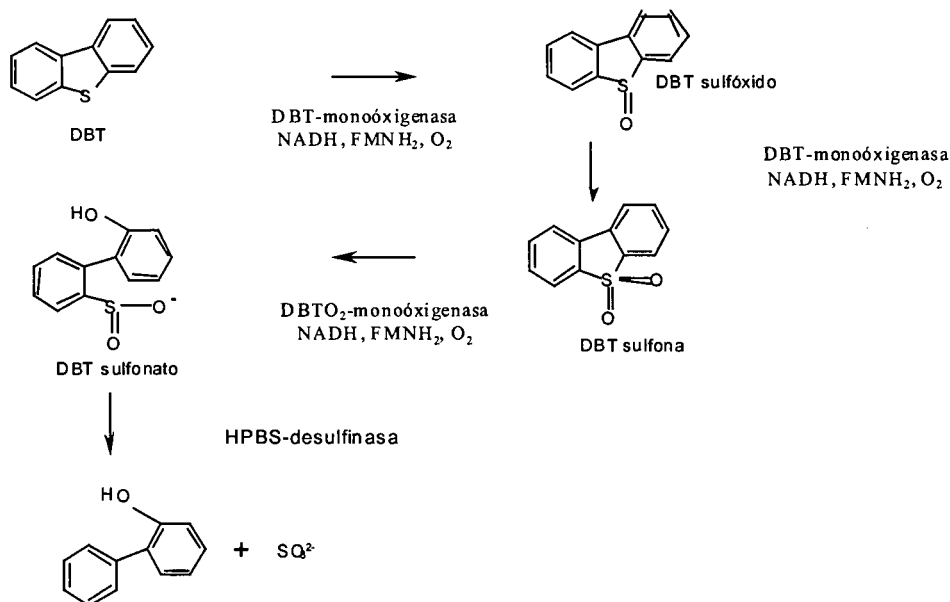


Figura 7. Mecanismo de biodesulfuración.

Hasta donde se tiene conocimiento, la mayoría de los estudios sobre BDS realizados han utilizado células libres como biocatalizador del proceso, lo cual ha dado resultados satisfactorios, sin embargo, el objetivo de inmovilizar las células es incrementar la eficiencia del proceso, mantener la viabilidad celular y poder recuperar fácilmente el biocatalizador del medio de reacción.

Para que el proceso de BDS sea efectivo utilizando células inmovilizadas, debe existir la solubilización de los compuestos organosulfurados insolubles o ligeramente solubles dentro de la solución acuosa. Los disolventes, frecuentemente utilizados con este propósito provocan lisis celular durante la BDS y esto origina contaminación secundaria después del tratamiento, por esta razón se recurre al uso de surfactantes, compuestos capaces de solubilizar a los compuestos organosulfurados⁸⁷. Sin embargo, los surfactantes no iónicos son los que se utilizan en el proceso de biodesulfuración, debido a que los surfactantes iónicos destruyen la pared celular.

2.6.2 Utilización de surfactantes no iónicos.

Los surfactantes o agentes con superficie activa, poseen una estructura molecular característica que consiste de un grupo estructural que tiene muy poca atracción por el disolvente, conocido como grupo liofóbico y un grupo que tiene una fuerte atracción por el disolvente, conocido como grupo liofilico⁸⁷.

Las moléculas pueden acumularse a lo largo de las interfaces aire-líquido, y líquido-líquido y de este modo reducir la tensión superficial e interfacial al mismo tiempo. Además, las moléculas del surfactante pueden formar agregados, llamadas micelas, en la solución acuosa. La concentración del surfactante a la cual se forman los agregados coloidales es conocida como concentración micelar crítica (CMC). Si la concentración del surfactante es mayor que la CMC, entonces el compuesto insoluble o ligeramente soluble puede ser solubilizado directamente dentro de las micelas. Este fenómeno es conocido como solubilización⁸⁷.

La solubilización, fue primero propuesta por McBain en 1955⁸⁸, es definida como la formación espontánea de una solución a partir de la disolución de una sustancia termodinámicamente estable (el solubilizado) normalmente insoluble o ligeramente insoluble en un disolvente dado, por la adición de un surfactante. Se cree que la solubilización ocurre en un número de sitios diferentes en las micelas dependiendo del compuesto solubilizado: (1) sobre la superficie de la micela, (2) entre la cabeza del grupo hidrofílico, (3) en el empalzado de la micela, esto es, entre la cabeza del grupo hidrofílico e hidrofóbico, y (4) en el núcleo inerte del interior de la micela⁸⁸.

De manera particular, en este trabajo el surfactante no iónico nonil-fénil-éter de polióxido de etileno fue utilizado durante el proceso de biodesulfuración, permitiendo la solubilización del DBT en el medio de reacción (medio acuoso), con la finalidad de que el DBT pudiera penetrar a la matriz hidrofílica (hidrogel de IPN-PAAM/PVA), y estar en contacto con la células inmovilizadas y así llevar a cabo la biotransformación a 2-hidroxibifenilo.

2.7 Sistema de estudio.

La síntesis y caracterización de las redes poliméricas interpenetradas de PAAM/PVA constituyen la parte fundamental de este trabajo. Sin embargo, también fue muy importante determinar sus aplicaciones. De este modo, fue evaluada la viabilidad de la matriz polimérica desarrollada como soporte, inmovilizando la bacteria desulfuradora de *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. Después de los procesos de inmovilización por atrapamiento y criogelación se determinó la viabilidad celular. Este soporte fue utilizado en la biodesulfuración de dibenzotiofeno. El dibenzotiofeno es un compuesto modelo que se utilizó para evaluar la actividad desulfuradora de la bacteria en cuestión.

En la Figura 8 se muestra el sistema en el cual las células de *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 están inmovilizadas en el hidrogel de IPN de PAAM/PVA por atrapamiento.

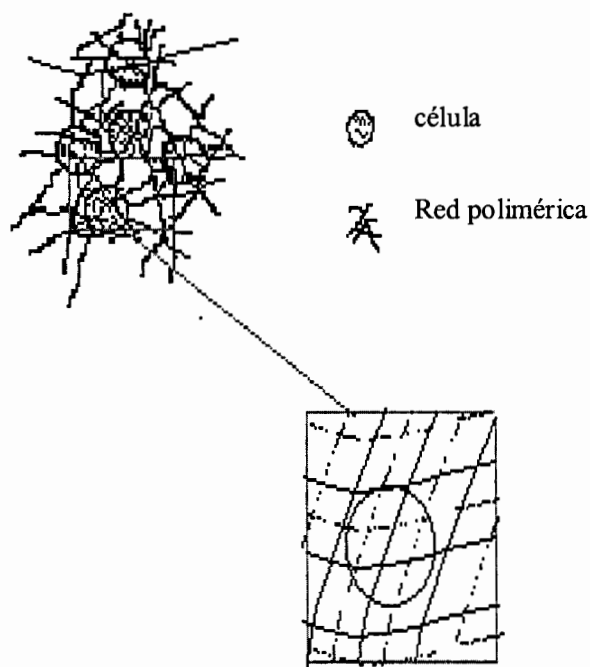


Figura 8. Sistema modelo de inmovilización de las células de *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 en IPN de PAAM/PVA.

3. ANTECEDENTES DEL SISTEMA DE ESTUDIO.

A partir de 1960 cuando Miller aplicó por primera vez el término de IPN la utilización de la tecnología de las IPN ha registrado una gran aplicación a escala industrial. Su creciente utilización ha llevado a la síntesis de nuevas IPN que combinen y mejoren las propiedades de los polímeros que la conformen. De este modo, se han combinado hidrogeles mediante la formación de una IPN mejorando de esta forma sus propiedades mecánicas. El gran interés de los hidrogeles se debe a la gran versatilidad de sus aplicaciones en diversas áreas⁸⁹.

Los hidrogeles de PAAM y PVA son polímeros que se complementan. Comparada con el PVA, la PAAM tiene una mayor termoestabilidad, absorbe una mayor cantidad de agua³¹ y presenta un alto hinchamiento en agua, pero es muy frágil. Por otro lado, el PVA preparado por criogelación da origen a criogeles macroporosos, viscoelásticos y con buenas propiedades mecánicas⁹⁰.

La IPN compuesta de PAAM y PVA fue sintetizada por Liang y Ruckenstein en 1995⁵⁴. Las membranas de esta IPN utilizadas en el proceso de separación de mezclas azeotrópicas fueron preparadas mediante de la técnica secuencial de IPN. El glutaraldehído y N, N'-metilenbisacrilamida fueron utilizados como agentes de entrecruzamiento para el PVA y PAAM respectivamente. El hinchamiento y propiedades mecánicas de esta IPN dependieron de la relación en peso y el contenido de agentes de entrecruzamiento presentes en el entrecruzamiento individual. De este trabajo se concluyó que la presencia de la PAAM afecta de manera positiva el hinchamiento, mientras que la presencia del PVA proporciona las propiedades mecánicas. De este modo, considerando las propiedades de esta IPN se propuso sintetizar este material bajo condiciones diferentes, las cuales podrían darle otras aplicaciones a este sistema, entre ellas como soporte para la inmovilización de microorganismos.

La aportación que hace este trabajo es la síntesis de la IPN de PAAM/PVA mediante las técnicas secuencial y simultánea de IPN. Así como un estudio de la viabilidad del material preparado para su utilización como soporte. Se cree que el PVA actúa como un

criopreservador para las células además de proteger a los microorganismos de la toxicidad del medio de reacción.

.

.

.

.

.

.

.

.

.

.

4. HIPÓTESIS.

Las propiedades resultantes de la combinación de PAAM y PVA en un sistema de redes poliméricas interpenetradas, dará lugar a un hidrogel con características requeridas en un material utilizado como soporte en la inmovilización de *Rhodococcus rhodochrous*.

4.1 Objetivo general.

Síntetizar y caracterizar los hidrogeles de redes poliméricas interpenetradas de poli(acrilamida)-poli(alcohol vinílico) con aplicaciones en la inmovilización de la bacteria *Rhodococcus rhodochrous*.

4.2 Objetivos particulares.

- * Adecuar la técnica de preparación de criogeles para la síntesis de una red polimérica interpenetrada de poli(acrilamida)-poli(alcohol vinílico).

- * Caracterizar los hidrogeles de poli(acrilamida)-poli(alcohol vinílico) preparados por los métodos secuencial y simultáneo de redes poliméricas interpenetradas.

- * Determinar la viabilidad de los hidrogeles de redes poliméricas interpenetradas para ser utilizados como soportes en la inmovilización de *Rhodococcus rhodochrous*.

- * Evaluar la eficiencia de las redes poliméricas interpenetradas como soporte de células de *Rhodococcus rhodochrous* en un sistema de biodesulfuración utilizando dibenzotiofeno como sustrato.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

5.1 Materiales.

El poli(alcohol vinílico) (PVA) fue proporcionado por DuPont de Monterrey, N.L. El grado de hidrólisis del PVA fue del 99% y peso molecular promedio viscosimétrico de $M_v = 65,290$ g/mol. La acrilamida (Aam), N, N'-metilenbisacrilamida (MBAAm), persulfato de amonio (PSA), N, N, N', N'-tetrametiletiléndiamina (TEMED) y el surfactante no iónico nonil-fenil éter polióxido de etileno fueron obtenidos de Aldrich. Otros de los reactivos que se utilizaron fueron el sulfato de sodio, acetato de sodio, heptano, hexano y dibenzotiofeno (DBT) también se obtuvieron de Aldrich. Todos los reactivos se utilizaron como se recibieron. Toda el agua utilizada en la síntesis, pruebas de hinchamiento y preparación de soluciones fue destilada.

5.2. Soluciones.

1. Solución patrón: mezcla compuesta del 29% de acrilamida y 1% de N, N-metilenbisacrilamida.
2. Solución de PVA. Esta solución se preparó al 10% en peso de PVA. El PVA fue disuelto a 80°C durante 4 horas.
3. Solución de persulfato de amonio Solución al 10% en peso. Antes de ser utilizado fue desgasificado.
4. Solución de Na_2SO_4 (0.05M).

5.3 Microorganismo y medio de cultivo.

Un cultivo puro de *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 53968 adquirido de la ATCC (*American Type Culture Collection*). La composición del medio líquido de cultivo (mmb1) del microorganismo se indica en la tabla 1. El medio sólido fue preparado adicionando 20 g/ L de agar al medio salino de crecimiento. El pH inicial del medio líquido fue ajustado a 6.5 con hidróxido de sodio, y el medio fue esterilizado a 121° C durante 20 min. El cultivo utilizado para la inoculación fue crecido durante 72 horas.

Condiciones de crecimiento del microorganismo.

Los experimentos fueron realizados en matraces con deflectores Erlenmeyer de 250 mL con tapón de plástico recubierto con papel aluminio, el volumen de trabajo conteniendo el medio

de cultivo fue de 20 mL. La incubación del medio de cultivo fue a 30° C y 150 rpm, en una incubadora bajo condiciones estériles.

Tabla 1 Composición del medio mineral basal.

Compuesto	Peso (g/100 mL de solución)	
	mmb1	mmb2
Fosfato monobásico de sodio	0.4	0.4
Fosfato dibásico de potasio	0.4	0.4
Cloruro de amonio	0.45	0.2
Cloruro de magnesio	0.0186	0.02
Cloruro férrico	0.0003	0.0001
Cloruro de calcio	0.00011	0.0001
Glicerol al 50 % en peso	1.86	0.1841
Dibenzotiofeno	1% en peso	

5.4 Métodos.

5.4.1 Peso molecular promedio viscoso.

La viscosidad de una solución es básicamente una medida del tamaño o extensión en el espacio de la molécula polimérica. Esta ha sido empíricamente relacionada con el peso molecular de polímeros lineales. La simplicidad de esta medición y la utilidad de poder correlacionar peso molecular-viscosidad constituye una herramienta extremadamente importante en la caracterización de los polímeros.

La viscosidad de la solución de PVA y del disolvente puro se midió en un viscosímetro capilar de precisión marca Cannon-Ubbelohde tamaño 75. La determinación se realizó en un baño de recirculación a una temperatura controlada de $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$: El disolvente utilizado fue una solución de Na_2SO_4 0.05M. Se utilizaron diferentes concentraciones y cada una de ellas se realizó por quintuplicado.

La viscosidad específica, η_e , se define como:

$$\eta_e = \frac{\eta_{solución} - \eta_{disolvente}}{\eta_{disolvente}} = \eta_r - 1 \cong \frac{t - t_o}{t_o} \quad (1)$$

en la que la viscosidad relativa, η_r , es la viscosidad entre la viscosidad de la solución y la viscosidad del disolvente puro. La viscosidad específica es la contribución relativa del polímero a la viscosidad de la solución y se determinó mediante la ecuación 1 comparando el tiempo (t) requerido para que un volumen específico de una solución polimérica fluya a través de un tubo capilar, con el correspondiente valor del tiempo de fluido del disolvente (t_o).

Si dividimos η_e entre la concentración del polímero, C , se obtiene una cantidad que aumenta con la concentración. Las mediciones de viscosidad se realizan como una función de la concentración y se graficó η_e/C contra la concentración.

Los datos de viscosidad como una función de la concentración son extrapolados a una dilución infinita ($C = 0$) por medio de la ecuación de Huggins³² obteniéndose de este modo la viscosidad intrínseca $[\eta]$.

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + \kappa[\eta]^2 c \quad (2)$$

Empíricamente se encuentra que la viscosidad intrínseca depende de la masa molar (M_v) según la siguiente fórmula para los siguiente polímeros lineales. La relación se expresa en la siguiente ecuación.

$$[\eta] = KMv^a \quad (3)$$

Las constantes empíricas K y a están en función del tipo de polímero y disolvente que se utilice. Para el sistema poli(alcohol vinílico) en una solución de Na_2SO_4 0.05 M a y K tienen los siguientes valores: $a = 0.53$ y $K' = 0.00174$ [mol/g].

5.4.2 Tacticidad del poli(alcohol vinílico).

La tacticidad del PVA fue determinada mediante resonancia magnética nuclear de carbono 13 (^{13}C RMN). El equipo utilizado fue un Gemini 200. La muestra de PVA fue disuelta en dimetilsulfóxido a una concentración de la solución de 10% en peso de PVA.

5.4.3 Preparación de hidrogeles de PAAM y PVA.

La PAAM entrecruzada fue preparada mediante polimerización radicalica en solución. En la preparación de los hidrogeles de PAAM se utilizó una solución patrón de acrilamida-bisacrilamida (AAm-BAAm), compuesta de 29% de AAm y 1% de BAAm disueltas en 100 mL de agua desionizada; una solución de PSA al 10% peso/volumen utilizado como iniciador, y TEMED como catalizador.

El procedimiento utilizado en la preparación de los hidrogeles de PAAM fue por referencia⁹⁵. El porcentaje en peso de PAAM en los hidrogeles fue del 3, 5 y 7. La reacción fue realizada en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con agitación magnética, sumergido en un baño con hielo para mantener la mezcla de reacción a 4°C, primeramente se adicionó el agua y la solución patrón (el volumen de la mezcla final fue de 50 mL), manteniéndose la mezcla en agitación durante cinco minutos. Posteriormente se agregó el PSA, previamente desgasificado, y tres minutos más se mantuvo en agitación. Después de este tiempo, se adicionó el TEMED y se continuó la agitación durante dos minutos más. La mezcla obtenida se vació en placas de vidrio 24x24 cm y en tarros de polipropileno de 3 cm de diámetro y 5 cm de altura, y se mantuvieron a temperatura ambiente durante dos horas para dar lugar a la gelación. Los hidrogeles obtenidos se lavaron con agua desionizada durante dos días. Las cantidades empleadas en la preparación de los hidrogeles de poli(acrilamida) se muestran en la Tabla 2.

En lo que se refiere a los hidrogeles de PVA, estos fueron preparados a partir de una solución de PVA al 10% en peso. Esta solución se preparo depositando el PVA en un matraz Erlenmeyer con agua destilada. El PVA para ser disuelto en agua requiere ser calentado hasta 90°C durante tres horas. Después de este tiempo la solución de PVA se dejó enfriar a temperatura ambiente y por último se filtró. Los criogeles de PVA fueron preparados vaciando la solución de PVA en moldes de polipropileno de 3 cm de diámetro y 5 cm de altura, y en

placas de vidrio de 25x 25 cm separadas con espaciadores de 3 mm. Por último los recipientes fueron sometidos a tres ciclos alternados de 24 horas de congelamiento a -26°C y 24 horas de descongelamiento a temperatura ambiente (25°C).

Tabla 2. Composición utilizada en la preparación del hidrogel de PAAM.

Porcentaje (p/v)	Soln. Patrón	Agua	PSA	TEMED
PAAM	(mL)	(mL)	(mL)	(mL)
3	8.5	41.5	0.5	0.075
5	14.2	35.8	0.83	0.125
7	19.8	30.2	1.16	0.175

5.4.4 Preparación de la red polimérica interpenetrada de poli(acrilamida)–poli(alcohol vinílico).

La preparación de las redes poliméricas interpenetradas de PAAM/PVA se llevo a cabo por medio de dos métodos de síntesis; secuencial (IPNs) y simultáneo (SIN)

5.4.4.1 Método secuencial.

En el método secuencial, la red primaria de PAAM fue preparada mediante polimerización radicalica en presencia de una solución de PVA, y posteriormente la red de PVA fue preparada por criogelación (red secundaria).

Se prepararon las IPNs en un porcentaje molar de PAAM/PVA de (90/10), (80/20), (60/40), (50/50), (40/60) y (20/80), el primer número corresponde al contenido de PAAM en la IPN. La reacción fue realizada en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con agitación magnética, sumergido en un baño con hielo para mantener la mezcla de reacción a 4°C . La síntesis se inició adicionando al matraz Erlenmeyer la solución patrón y el volumen de agua correspondiente para completar un volumen final de mezcla de 50 mL e inicia la agitación magnética. Posteriormente se agregó la solución de PVA a la mezcla en agitación, la mezcla se mantuvo en agitación hasta alcanzar una temperatura de 4°C . Enseguida se agregó la

solución de PSA y fue continuada la agitación durante 3 minutos más. Después de este tiempo se adiciono el TEMED y se continuo la agitación durante 2 minutos. La mezcla obtenida se distribuyó (en la primera etapa de este trabajo) en moldes de polipropileno de 3 cm de diámetro y 5 cm de altura, y en placas de vidrio de 25x 25 cm separadas con espaciadores de 3 mm (en la segunda etapa). La red primaria se formó a temperatura ambiente (25°C) después de dos horas las muestras fueron sometidas a tres ciclos alternados de 24 horas de congelamiento a -26°C y 24 horas de descongelamiento a temperatura ambiente (25°C) para la formación física de la red secundaria (PVA).

5.4.4.2 Método simultáneo.

En el método simultáneo las redes de PAAM y PVA son preparadas de manera simultánea sin interferir una con la formación de la otra. La red primaria de PAAM fue preparada mediante polimerización radicalica en solución de PVA, y de manera paralela la red de PVA fue preparada por criogelación.

Al igual que las IPNs, las SIN de PAAM/PVA fueron preparadas en el mismo porcentaje molar de (90/10), (80/20), (60/40), (50/50), (40/60) y (20/80). Las cantidades empleadas en la preparación de IPNs y SIN se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Cantidades empleadas en la preparación de IPNs y SIN de PAAM/PVA.

Porcentaje molar (PAAM/PVA)	Solución patrón (mL)	Agua (mL)	PSA (mL)	TEMED (mL)	PVA (g)
(100/0)	8.5	41.5	0.5	0.075	0
(90/10)	8.5	41.5	0.5	0.075	0.17
(80/20)	8.5	41.5	0.5	0.075	0.39
(60/40)	8.5	41.5	0.5	0.075	0.69
(50/50)	8.5	41.5	0.5	0.075	1.57
(40/60)	8.5	41.5	0.5	0.075	2.35
(20/80)	8.5	41.5	0.5	0.075	6.29

El mismo procedimiento de preparación de la mezcla final de reacción que se siguió en el método secuencial, fue el mismo que se siguió en este método de preparación. Sin embargo,

en este método la mezcla de reacción ya depositada en los respectivos recipientes, fue sometida inmediatamente a tres ciclos alternados de 24 horas de congelamiento a $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 24 horas de descongelamiento a temperatura ambiente (25°C) para la formación simultánea de ambas redes.

5.4.5 Secado de hidrogeles.

El secado de los hidrogeles de PVA, PAAM e IPN-PAAM/PVA se realizó de dos formas: una por liofilización. y la otra por deshidratación mediante el intercambio de disolvente (agua a etanol). Los hidrogeles fueron cortados en pequeños discos de 25 mm de diámetro y 3 mm de espesor.

En el secado por liofilización, los hidrogeles ya cortados son congelados y posteriormente sometidos a alto vacío durante 72 horas. Por otro lado, el proceso de secado por intercambio de disolvente agua-etanol consiste en depositar los discos de hidrogel en una solución de etanol al 30% v/v (a 4°C) incrementándose la concentración de etanol en 10 % cada hora hasta llegar al 100%. Por último, el gel deshidratado fue secado en alto vacío durante 72 horas.

5.4.6 Estudio de FTIR de las redes poliméricas interpenetradas.

La espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) fue utilizada para confirmar la estructura de las IPNs y SIN de PAAM/PVA, así como la formación de puentes de hidrógeno entre ambas redes. El equipo utilizado fue un equipo Nicolet IR-550.

5.4.7. Determinación del hinchamiento en hidrogeles.

El hinchamiento de los homopolímeros de PAAM, PVA e IPN-PAAM/PVA fue realizado bajo dos diferentes condiciones.

En la primera, se utilizaron hidrogeles recién preparados que fueron depositados en vasos de precipitado, con 150 mL de agua destilada y tapados con papel aluminio. Posteriormente, los vasos de precipitado se depositaron dentro de una incubadora con agitación (150 rpm) a 30°C . Bajo estas condiciones se utilizaron 6 muestras para cada composición de los hidrogeles, de los cuales tres se utilizaron para determinar la razón de hinchamiento y el resto para calcular el

porcentaje de extracción de PVA. En ambas pruebas se utilizaron hidrogeles de forma cilíndrica de 15 ± 1 mm de alto y de 30 ± 2 mm de diámetro.

La razón de hinchamiento (W_t) se determinó aplicando la siguiente ecuación

$$W_t = \frac{w_s - w_d}{w_d} \quad (4)$$

donde w_s es el peso hinchado del hidrogel a diferentes tiempos y w_d es el peso seco del polímero. Éste último se determinó al final del proceso de hinchamiento y se obtuvo cortando el hidrogel en pequeños trozos que se depositaron en charolas de aluminio (50 mm de diámetro y 20 mm de alto, puestas previamente a peso constante), que fueron colocadas en una estufa a 50°C durante una semana, al término de este tiempo las charolas fueron sacadas de la estufa y depositadas en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente. Por ultimo, la charola fue pesada y por diferencia de pesos se determinó el peso seco del hidrogel.

El porcentaje de extracción del PVA se determinó cuantificando el PVA liberado al medio de hinchamiento (agua) durante una semana, tiempo en el cual el agua se cambio tres veces y se colectó en un recipiente que se mantuvo en refrigeración. Después de una semana se tenía un volumen final de 150 mL aproximadamente. Este volumen se concentró y el PVA residual fue precipitado con acetona y puesto a secar durante una semana en una estufa a 50°C. Finalmente se obtuvo el peso seco del PVA residual y se determinó el porcentaje de extracción del PVA (W_{PVA}) aplicando la siguiente ecuación

$$W_{PVA} = \left[\frac{(W_{PVAi} - W_{PVAr})}{W_{PVAi}} \right] * 100 \quad (5)$$

donde W_{PVAi} y W_{PVAr} son el peso en gramos de PVA iniciales y recuperado, respectivamente.

En el segundo caso, la razón de hinchamiento se realizó bajo las mismas condiciones de hinchamiento que en el primer caso, sin embargo, en esta ocasión se utilizaron hidrogeles previamente sometidos a un proceso de secado y con forma de pequeños discos (25 mm de

diámetro y 3mm de espesor). La cinética de hinchamiento se determinó también con la ecuación (4).

El porcentaje del contenido de agua en el equilibrio (*EW*C) se determina con hidrogeles secos (cerogeles) aplicando la siguiente ecuación

$$EW\text{C}(\%) = \left(\frac{w_s - w_d}{w_s} \right) * 100 \quad (6)$$

donde w_s es el peso hinchado del hidrogel, w_d es el peso seco del hidrogel y $(w_s - w_d)$ es el agua absorbida por el hidrogel.

5.4.7.1 Efecto del contenido de heptano sobre la razón de hinchamiento.

El hinchamiento de los hidrogeles de IPN se realizó en heptano, medio mineral basal y mezclas de ellos en una relación de porcentaje volumen/volumen. El hinchamiento de los hidrogeles en los diferentes medios se llevó a cabo en una incubadora a 30°C y con una agitación de 150 rpm durante 5 días. La razón de hinchamiento se determinó utilizando la ecuación (4).

5.4.8 Resistencia a la compresión.

La resistencia a la compresión de los hidrogeles de IPNs y SIN fue realizada después del proceso de hinchamiento. El análisis se realizó utilizando muestras de forma cilíndrica con un diámetro de 32 ± 3 mm y una altura de 15 ± 1 mm de alto. La prueba se realizó en un equipo Instron 4301 equipado con una celda de carga de 500 N. El procedimiento consistió en comprimir el hidrogel entre dos placas circulares con un diámetro de 140 mm y un espesor de 12 mm a una velocidad de 1.3 mm/minuto, llevándose hasta una deformación del 50%. El valor de la resistencia a la compresión fue evaluado cuando las muestras alcanzaron un 20% de deformación.

5.4.9 Estudio por calorimetría diferencial de barrido.

El estudio por calorimetría diferencial de barrido se utilizó para determinar la temperatura de transición vítrea (T_g) de la SIN e IPNs. Evaluando de este modo el efecto de la composición molar y método de síntesis sobre la T_g de la IPN-PAAM/PVA. Las muestras utilizadas en este estudio fueron secadas por liofilización durante 72 horas. Las pruebas se realizaron en un calorímetro diferencial de barrido modelo MDSC 2920 por el método de modulado, a una velocidad de calentamiento de $5^\circ\text{C}/\text{min}$ en atmósfera de nitrógeno a un flujo de $50\text{ mL}/\text{min}$, en un intervalo de temperatura de $20\text{-}280^\circ\text{C}$.

5.4.10 Microscopía electrónica con barrido.

Se estudió el efecto del método de síntesis, composición molar, así como la distribución de las células en el soporte sobre la morfología de la IPN-PAAM/PVA mediante el análisis por microscopía electrónica con barrido (SEM). Las muestras fueron preparadas a través de dos métodos; liofilización y secado por intercambio de disolvente (agua-etanol). En ambos casos las muestras fueron fracturadas en nitrógeno líquido. La caracterización de las muestras se realizó utilizando un equipo marca TOPCOM SM-510.

5.4.11 Inmovilización.

La inmovilización de las células se realizó por atrapamiento en los hidrogeles de IPNs y SIN de PAA/PVA adicionando diferente cantidad de células dentro del medio de reacción (1.5, 2, 4 y 6 g/dL de solución a polimerizar) antes de iniciar la formación de las redes.

5.4.12 Viabilidad celular.

La viabilidad celular fue evaluada inoculando células, obtenidas del material sintetizado posterior a los ciclos de congelamiento-descongelamiento, en cajas petri provistas de agar y DBT. El DBT fue depositado sobre el agar, disolviendo DBT en n-hexano al 1% y depositando 1 mL de esta solución sobre la placa con agar agitándola para lograr una distribución uniforme durante la evaporación del disolvente.

5.4.13 Estabilización de la actividad desulfuradora de *Rhodococcus rhodochrous*.

Esta se define como una serie de procedimientos que permitieron elevar la actividad desulfuradora de la bacteria. El crecimiento de la bacteria *Rhodococcus rhodochrous* originalmente se realizó en un medio mineral basal (mmb1, su composición se indicó en la Tabla 1), glicerol como fuente de carbono y DBT como fuente de azufre al 1%.

La manipulación de la bacteria en éste trabajo consistió en la modificación del medio de crecimiento de la bacteria, dividiéndose en varias etapas. Primera, adición de sulfato de sodio en una concentración de 20 mM. Segunda, adición de acetato de sodio 20 mM. Tercera, diferente composición del medio mineral basal (mmb2, Tabla 1). Cuarta, reducción en el contenido de glicerol de 100 mM a 20 mM. Quinta, adición de surfactante al 2 % (p/v) de nonil fenil éter polióxido de etileno. En cada etapa se determinó el efecto del cambio en la composición molar del medio de crecimiento sobre la actividad desulfuradora de la bacteria.

5.4.14 Actividad desulfuradora de *Rhodococcus rhodochrous*.

La actividad desulfuradora de la *Rhodococcus rhodochrous* se determinó cuantificando la cantidad de DBT residual dentro del medio de reacción después de 120 horas. Por diferencia entre el peso inicial y el peso final se determinó cual es el porcentaje de DBT consumido por la bacteria. La cuantificación del DBT residual fue realizada por cromatografía de gases, como se describe más adelante en este mismo capítulo.

5.4.15 Medición de proteína en hidrogeles inmovilizados.

Este procedimiento esta basado en la deshidratación de geles por tratamiento con metanol, extracción de proteína con álcali a temperaturas altas y determinación de proteína por el método de Bradford⁹⁴.

Determinación de proteína de células libres. Procedimiento que consistió en tres pasos.

1) Secado de células. Un paquete celular de alrededor de 1 g (peso húmedo) fue resuspendido en una mezcla agua destilada-metanol 5 y 20 mL respectivamente. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 20 min. Los líquidos fueron cuidadosamente eliminados por decantación o vacío. La adición de metanol a este paquete celular fue repetida tres veces y los

microorganismos tratados de este modo fueron finalmente secados por liofilización durante 24 horas.

2) Extracción de proteína. Una cantidad de células secas (aproximadamente de 10 mg) se colocaron dentro de un matraz bola de 25 mL equipado con un condensador de reflujo, enseguida se adicionaron 10 mL de NaOH 1N. Posteriormente el matraz fue incubado en un baño de aceite a 125°C durante 15 minutos. Después de este tiempo, el matraz se retiró del baño de aceite y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

3) Determinación de proteína utilizando el reactivo de Bradford.

Una muestra problema de 0.1 mL en NaOH 1N se mezcló con 3 mL de reactivo de Bradford. La mezcla fue agitada vigorosamente y posteriormente puesta en reposo durante quince minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo se determinó la absorbancia a 595 nm. El blanco se preparó con 0.1 mL de NaOH 1N y 3 mL de reactivo de Bradford.

Preparación del gel. Determinación de proteína en células inmovilizadas.

Una cantidad de gel conteniendo cerca de 0.2 g de células secas inmovilizadas fue triturado con un homogenizador de cuchillas para obtener fragmentos del orden de 1mm de diámetro o menor. La suspensión obtenida de éste modo se transfirió a un recipiente de peso conocido de 50 o 100 mL y tratada con metanol de acuerdo con el procedimiento descrito para las células libres.

Construcción de la curva de calibración.

La construcción de la curva se realizó graficando la relación de áreas entre el DBT y estándar interno (naftaleno) contra la concentración del DBT. El intervalo de concentración para el DBT fue de 0.2 mg/mL a 1.5 mg/mL.

4.2.16 Recuperación de dibenzotiofeno residual.

La recuperación del DBT de dos medios de crecimiento: medio mineral basal y surfactante más medio mineral basal, fue realizada como se describe a continuación: (1) para el primer medio (medio mineral basal), al matraz de reacción se le adicionaron 20 mL de n-hexano para

disolver el DBT residual, se agitó vigorosamente y posteriormente el contenido del matraz se vació en un embudo de separación. Las fases fueron separadas y la fase orgánica recuperada. El disolvente heptano se evaporó a presión reducida.

Para el segundo medio (medio mineral basal más surfactante), el DBT fue solubilizado en medio mineral basal por la presencia del surfactante. La extracción del DBT residual, se realizó adicionando al medio 20 mL de n-hexano y se dejó en agitación (200 rpm a 30°C) durante media hora, formándose una emulsión. La emulsión se rompió por la adición de 40 mL de metanol frío, la mezcla se transfirió a un embudo de separación para recuperar la fase orgánica. Se realizaron seis extracciones líquido-líquido, la fase orgánica se recolectó en un matraz bola de 250 mL y por último, se evaporó el disolvente a presión reducida.

4.2.17 Cuantificación de dibenzotiofeno por cromatografía de gases.

La preparación de las muestras para su análisis por cromatografía de gases fue preparada de la siguiente manera. El DBT recuperado del medio de reacción (residual) es resuspendido en 10 mL de heptano, de esta solución se tomó una alícuota de 3 mL, la cual se depositó en un matraz de aforación de 10 mL junto con 0.5 mL de naftaleno ($C = 3.5 \text{ mg/mL}$, estándar interno), aforándose hasta la marca con heptano. De ésta solución se tomaron 1.5 mL, los cuales fueron filtrados y depositados en un vial para su análisis por cromatografía.

Las condiciones del análisis se describen a continuación: la inyección fue de forma automática y el volumen inyectado fue del μL . El inyector capilar se utilizó de modo split, como gas acarreador se empleó helio y la temperatura del inyector fue de 200°C. La columna utilizada fue una HPS 5% fenil metil siloxano con una longitud de 30 m y un diámetro interno de 320 μm . El calentamiento de la columna se realizó en rampa, con una temperatura inicial de 100°C, la cual fue mantenida durante 2 min, después de este tiempo se fue incrementando la temperatura a una velocidad de calentamiento de 25°/min hasta llegar a una temperatura final fue de 180°C la cual fue mantenida durante 2 min, terminando aquí la corrida de la muestra, siendo de 7.2 minutos el tiempo de análisis. El detector utilizado fue de ionización de flama (FID) a una temperatura de 250°C, para la flama del detector se utilizaron los siguientes gases: helio con un flujo de 63 mL/min, aire con un flujo de 400/mL/min y el gas auxiliar (Nitrógeno) a un flujo de 23 mL/min.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La formación de redes poliméricas interpenetradas es el único método mediante el cual se pueden combinar los hidrogeles y con ello incrementar sus propiedades mecánicas. De este modo, la síntesis de hidrogeles de redes poliméricas interpenetradas a partir de PAAM y PVA es la manera mediante la cual se buscó combinar sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas.

La PAAM es un hidrogel que absorbe una gran cantidad de agua³¹ y tiene una alta termo estabilidad⁹⁶. Sin embargo, es un material muy frágil lo cual restringe su utilización en diversas áreas. Por otro lado, el PVA posee una alta resistencia, fácil de procesar, bajo potencial de toxicidad y estabilidad del pH. La idea de combinar estos hidrogeles mediante el método secuencial y simultáneo de redes poliméricas interpenetradas fue obtener un hidrogel con resistencia mecánica (proporcionada por el PVA) y alta razón de hinchamiento (proporcionada por la PAAM) para ser utilizado como soporte en la inmovilización de la *Rhodococcus rhodochrous*.

Antes de iniciar la preparación de los hidrogeles de redes poliméricas interpenetradas fue de suma importancia la caracterización de las redes puras (PAAM y PVA), que permitió determinar las condiciones de preparación de estos hidrogeles antes de ser combinados. Para el PVA la caracterización consistió en determinar su peso molecular y tacticidad, debido a que estos parámetros rigen el proceso de gelación del PVA. Con respecto a la PAAM, se realizaron pruebas de concentración de los hidrogeles, debido a que la concentración del hidrogel determina, entre otros parámetros, la razón de hinchamiento y propiedades mecánicas del hidrogel.

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la caracterización del PVA y PAAM como hidrogeles puros.

6.1 Caracterización del poli(alcohol vinílico).

El peso molecular y la tacticidad rigen el proceso de gelación del PVA, por lo que resulta fundamental determinar estos dos parámetros.

6.1.1 Peso molecular promedio viscosimétrico.

La presencia de un polímero en un disolvente suele dar como resultado un aumento en la viscosidad de la solución aún a bajas concentraciones. Este efecto depende fuertemente de la concentración y del disolvente. En un disolvente pobre, la molécula de cadena larga se encuentra enrollada en su mayor parte; en un buen disolvente la molécula puede encontrarse desenrollada y alargada. Ambas configuraciones producen grandes cambios en la viscosidad de la solución. A medida que aumenta el peso molecular el efecto de viscosidad aumenta. La medición de la viscosidad es quizá la forma más simple de obtener un valor para el peso molecular de una macromolécula.

El peso molecular del PVA se determinó por medio de viscosimetría. El polímero fue disuelto en una solución de Na₂SO₄ (0.05 M) para obtener diferentes concentraciones, la prueba se realizó a una temperatura de 30°C. Para cada concentración, la determinación del tiempo de flujo (*t*), fue realizada cinco veces y el promedio de estos valores se indica en la Tabla 4.

Con la ecuación (1), que se encuentra en la parte experimental, se determinó el valor de la viscosidad específica (η_e) y los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Viscosidad de la solución de PVA en función de la concentración.

C(g/dL)	t (s)	η_e	η_e/C
0.6667	157	0.5096	0.7644
0.5555	147	0.4135	0.7443
0.4	133	0.2788	0.69711
0.3	125	0.2019	0.6731
0.2	117	0.125	0.6250

El valor de la viscosidad intrínseca $[\eta]$ se obtuvo de la gráfica de η_e/C contra *C* (Figura 9) al extrapolar a una dilución infinita (*C*= 0), como se indica a continuación:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_e}{C} \right) \quad (7)$$

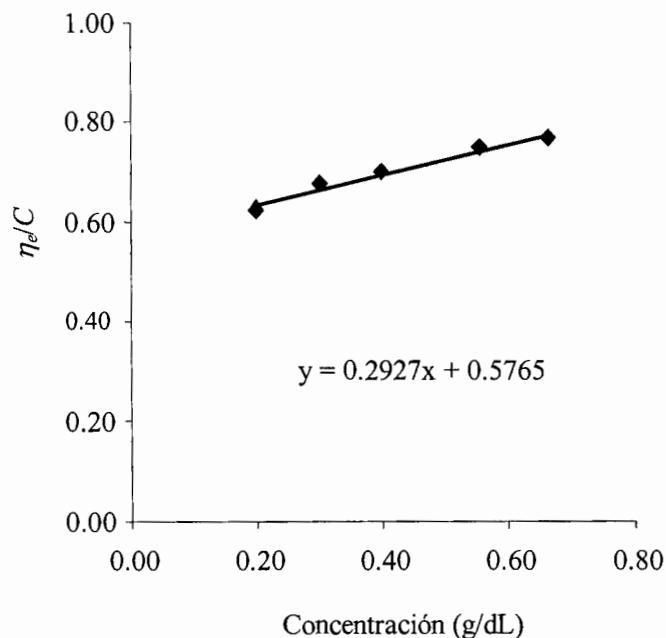


Figura 9. Curva de viscosidad-concentración para el PVA en Na_2SO_4 .

Por último, utilizando la ecuación (3), descrita en la parte experimental, se determinó el peso molecular promedio viscoso para el PVA, el cual fue de $M_v = 65290$ g/mol.

6.1.2 Tacticidad.

Datos reportados en la literatura indican que la tacticidad del PVA es uno de los factores que determinan la cristalización durante el proceso de criogelación⁹⁶. En estos trabajos se encontró que los sitios sindiotácticos y atácticos en las cadenas poliméricas del PVA, son los responsables de la formación de enlaces intermoleculares tipo puentes de hidrógeno, mientras que los sitios isotácticos participan principalmente en las interacciones intramoleculares⁶⁴.

Con la integración del área bajo la curva como se muestra en la Figura 10, se obtuvo el porcentaje de la tacticidad de las triadas, mm, mr y rr como se indica en la Tabla 5.

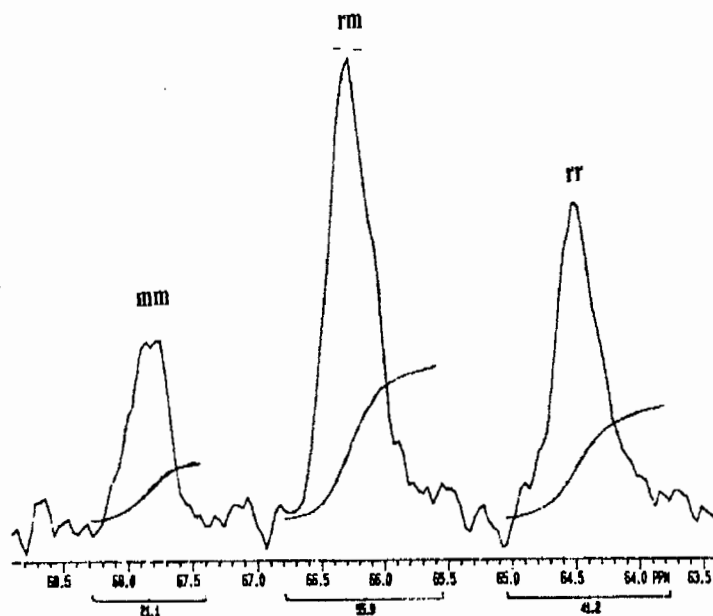


Figura 10. Espectro de RMN de ^{13}C del PVA, obtenido con 10,000 scans. Isómeros isotáctico (mm), sindiotáctico (rr) y atáctico (rm). PVA disuelto en dimetilsulfóxido al 10% en peso.

Con las áreas correspondientes a cada uno de los isómeros, se determinó el porcentaje de cada uno de ellos presentes en el PVA como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5. Tacticidad del PVA

Triada	Contenido (%)	Isómero
mm	17.85	Isotáctico
mr	47.30	Atáctico
rr	34.85	Sindiotáctico

Otro de los factores que influye en el proceso de criogelación del PVA es el grado de hidrólisis, por lo que en la mayoría de los trabajos publicados sobre la formación de criogeles se ha utilizado PVA con porcentajes de hidrólisis mayores al 98% para obtener buenos resultados. El nombre comercial del PVA con grado de hidrólisis mayor al 98% es el

Elvanol®, material que fue utilizado en este trabajo, el cual tiene un 99% de grado de hidrólisis. Para este parámetro se tomó como referencia el establecido por el proveedor (DuPont, Monterrey).

Tomando como referencia los resultados de peso molecular, tacticidad y grado de hidrólisis reportados en la literatura⁹⁷⁻⁹⁹ y comparando los obtenidos en este trabajo, se fijaron las condiciones de síntesis del criogel del PVA: la solución del PVA al 10% (p/v), y el proceso de criogelación consistió en tres ciclos alternados de 24 h de congelamiento a -26°C y 24 h de descongelamiento a 25°C . Bajo estas condiciones se obtuvo un hidrogel altamente elástico y con una adecuada razón de hinchamiento.

Por otro lado, la PAAM es el otro hidrogel que formó parte de las redes poliméricas interpenetradas y para el cual se requirió de una selección de su concentración. Estudio que a continuación se presenta.

6.2. Selección de la concentración de poli(acrilamida) en el hidrogel .

Considerando que las propiedades del hidrogel de PAAM son una función de las condiciones de síntesis, la selección de la concentración de éste, se realizó tomando en cuenta dos variables de respuesta: razón de hinchamiento y resistencia a la compresión.

6.2.1 Razón de hinchamiento en agua.

En estudios realizados por Lipatov y colaboradores se encontró que el incremento en la concentración del hidrogel de PAAM origina la disminución en el tamaño de poro como resultado de un incremento en el grado de entrecruzamiento intermolecular de las cadenas de PAAM⁶. Considerando lo anterior se realizaron las pruebas de hinchamiento que permitieron seleccionar la concentración del hidrogel que se utilizó en la preparación de redes poliméricas interpenetradas.

De los datos de hinchamiento, se encontró que los tres hidrogeles en el primer cuarto de hora presentan un hinchamiento muy similar, sin embargo el hidrogel con una concentración del 3% alcanza la mayor razón de hinchamiento en el equilibrio como se muestra en la Figura 11.

Con estos resultados se puede señalar que la concentración no afecta el tiempo en el cual se alcanza el equilibrio de hinchamiento, debido a que los tres hidrogeles logran este comportamiento durante las primeras 20 h de la prueba.

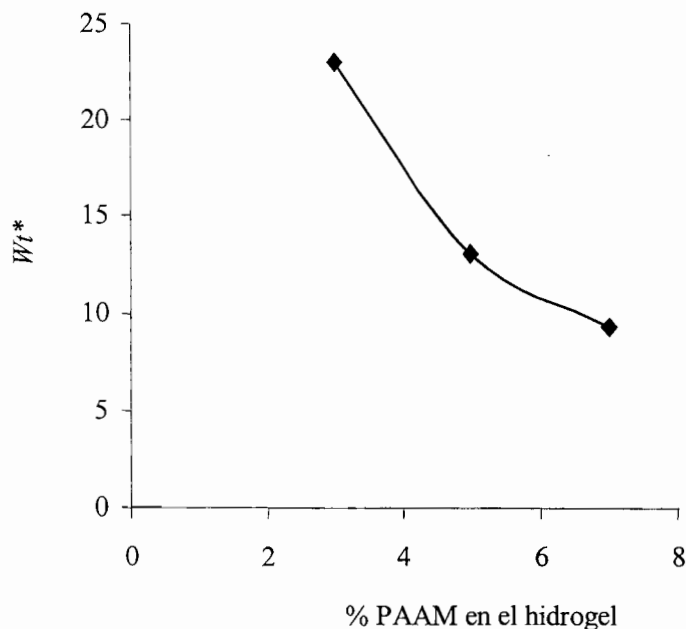


Figura11. Efecto de la concentración de PAAM en los hidrogeles sobre la razón de hinchamiento en el equilibrio.

El contenido de agua en el equilibrio para estos hidrogeles fue de 96, 93 y 90 para los hidrogeles de concentración 3, 5 y 7% en peso respectivamente.

Aún cuando la razón de hinchamiento es la que determinará la selección del hidrogel es importante conocer el efecto de la concentración del hidrogel sobre la resistencia a la compresión, resultados que a continuación se presentan.

6.2.2 Resistencia a la compresión.

En la Figura12 se ejemplifica el tipo de curva que fue obtenida para los hidrogeles de PAAM, PVA e IPN-PAAM/PVA al evaluar las propiedades mecánicas a través de la resistencia a la compresión.

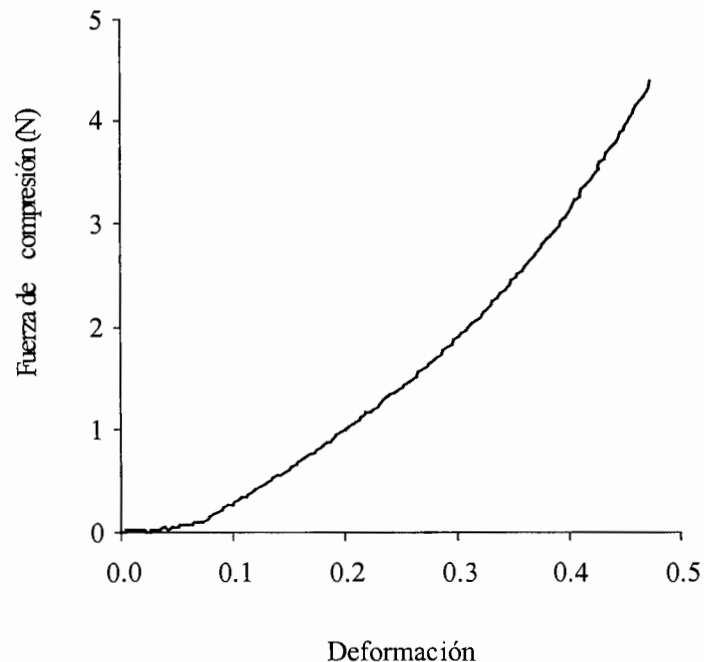


Figura12. Curva representativa de fuerza de compresión contra la deformación para el hidrogel con 3% (p/v) de PAAM.

En la Figura anterior se observó que la pendiente de la curva fue más pequeña a bajas deformaciones, esto fue atribuido al hecho de que la superficie inicial de la muestra cilíndrica no fue completamente plana. De este modo, si la superficie del hidrogel que está en contacto con el sistema de compresión es más pequeña que la superficie total, entonces la fuerza de compresión será más pequeña. Considerando esto, la fuerza de compresión fue evaluada a una deformación del 20%, en la cual ya se tiene una compresión uniforme en el hidrogel. Esta misma consideración se tomó en cuenta en todos los experimentos de compresión de hidrogeles realizados en este trabajo.

La consistencia y resistencia a la compresión de los hidrogeles de PAAM se incrementó con el aumento de la concentración, como se muestra en la Figura13. El incremento el la

concentración de PAAM en el hidrogel disminuye la razón de hinchamiento e incrementa la resistencia a la compresión.

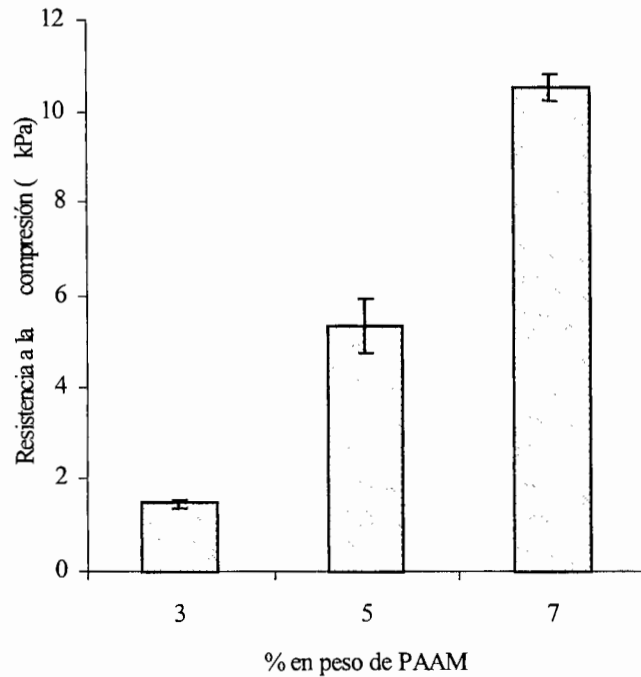


Figura13. Efecto de la concentración de PAAM en los hidrogeles sobre la resistencia a la compresión.

En estudios similares donde se modificó la concentración del hidrogel de PAAM utilizados como soportes, se evaluó sobre un factor de efectividad, resultando ser mayor el hidrogel de más baja concentración⁷. Esto a pesar de su baja consistencia y fragilidad, lo cual los hace difícil de manipular. Sin embargo, los hidrogeles con mayor contenido de agua resultan ser más biocompatibles.

6.3. Síntesis de redes poliméricas interpenetradas de PAAM/PVA.

Una vez elegidas las condiciones de síntesis de los hidrogeles de PAAM y PVA se realizó la preparación de las redes poliméricas interpenetradas (IPN) con un porcentaje molar de PAAM/PVA de; 90/10, 80/20, 60/40, 50/50, 40/60 y 20/80. El porcentaje molar se estableció como una de las variables dentro del proceso de síntesis de las IPN, con el objetivo de evaluar el efecto del PVA sobre la razón de hinchamiento y resistencia a la compresión de las IPN. Las IPN fueron preparadas mediante dos métodos de síntesis: secuencial y simultáneo.

El objetivo de utilizar dos métodos de preparación para los hidrogeles de IPN de (PAAM/PVA) fue obtener hidrogeles de IPN con diferentes propiedades que permitieron elegir el hidrogel más adecuado para ser utilizado como soporte, selección que se realizó en secciones posteriores.

La identificación de los hidrogeles con base en su método de preparación fue la siguiente: Los hidrogeles preparados mediante el método simultáneo se identificaron como **SIN** y como **IPNs** los hidrogeles preparados por el método secuencial. El porcentaje molar de la red polimérica fue identificada entre paréntesis.

La caracterización básica de las IPN se realizó primero por espectroscopía infrarroja, para verificar la presencia de los grupos funcionales característicos de cada red (homopolímeros) en las IPN. Con el estudio de hinchamiento, se determinó la razón de hinchamiento y el contenido de agua en el equilibrio (*EWC*). La interacción entre las redes de PAAM y PVA, dentro de la IPN, se determinó mediante el desplazamiento de la temperatura de fusión del PVA dentro de las IPN. La resistencia a la compresión permitió evaluar las propiedades mecánicas de los hidrogeles de IPN, PAAM y PVA. A continuación se presentan los resultados obtenidos en cada una de las pruebas realizadas en los hidrogeles de IPN.

Los hidrogeles de IPN presentaron diferente consistencia y tonalidad dependiendo de su composición molar, como ejemplo de ello se muestra en la Figura 14, donde se muestra la fotografía de un hidrogel de IPNs-PAAM/PVA (90/10). El incremento en la tonalidad blanca depende del contenido de PVA.

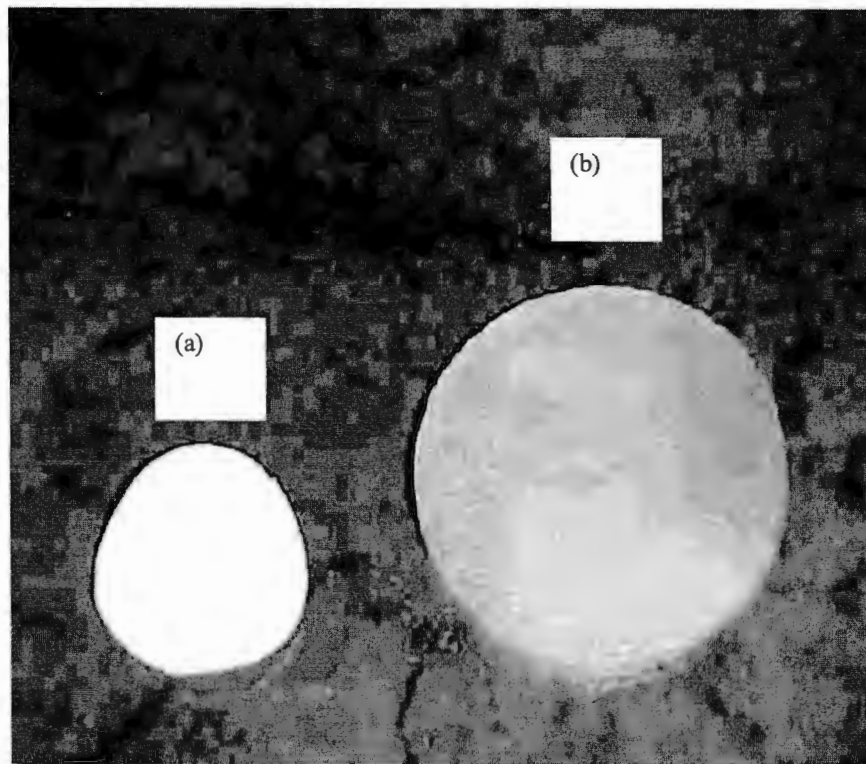


Figura 14. Fotografía de muestras de IPNs-PAAM/PVA(90/10) en estado seco o cerogel (a) e hinchado (b).

La caracterización de las IPNs y SIN se inició con los estudios de infrarrojo, verificando de esta forma su estructura e interacción entre los grupos funcionales de las redes que constituyen la IPN.

6.3.1 Análisis por microscopía de infrarrojo.

La Figura 15 muestra los espectros de FT-IR de la PAAM, PVA e IPNs con un porcentaje molar de PVA de 80, 50 y 10. En esta figura se aprecian las bandas de los grupos funcionales característicos de cada red.

El espectro de PAAM (Figura 15-E) presentó una banda fuerte a 1662 cm^{-1} asignada al movimiento combinado de alargamiento del grupo $\text{C}=\text{O}$ unido al grupo NH_2 y una banda muy ancha a 3420 cm^{-1} como resultado del alargamiento del enlace N-H y una flexión de éste mismo enlace a 1445 cm^{-1} . Las bandas de mayor vibración observadas en el espectro de PVA (Figura 15-A) fueron a 3350 , 1435 , 920 y 850 cm^{-1} . La banda de mayor absorción a 3350 cm^{-1} fue asignada al modo de alargamiento del hidrógeno enlazado en el grupo funcional OH . El pico a 1435 cm^{-1} fue asignado a la vibración de deformación del OH . Los picos a 920 y 850 cm^{-1} fueron asignados a la absorción característica de las cadenas sindiotácticas e isotácticas del PVA respectivamente.

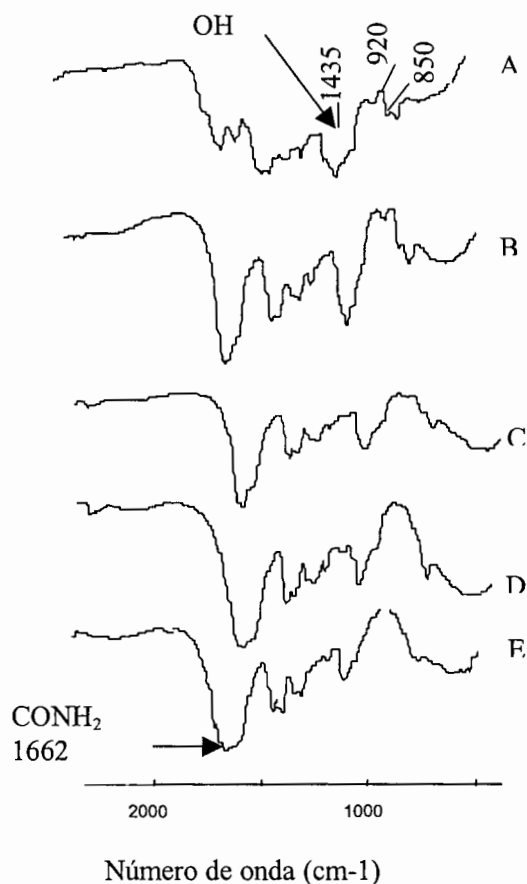


Figura 15. Espectros de infrarrojo de diferentes polímeros. (A) PVA, (B) IPNs-PAAM/PVA (20/80), (C) IPNs-PAAM/PVA (50/50), (D) IPNs-PAAM/PVA (90/10) y (E) PAAM.

Todas las bandas de mayor vibración de la PAAM y PVA están presentes en los espectros de infrarrojo de las IPNs-PAAM/PVA (Figuras 15 B-D). Sin embargo, se presentó un ligero desplazamiento en la banda correspondiente al grupo C=O (1662 cm^{-1}) de la PAAM. En el caso de la IPNs (20/80) esta aparece a 1655 cm^{-1} , para la IPNs (50/50) a 1657 cm^{-1} y en la IPNs (90/10) a 1657 cm^{-1} . Este ligero desplazamiento sugiere la interacción que existe entre ambas redes, posiblemente debido a la formación de puentes de hidrógeno. Estos resultados están de acuerdo con las estructuras de las IPNs presentadas por Liang y Ruckenstein⁵⁴. En la Figura 16 se muestran los espectros de infrarrojo para las redes poliméricas interpenetradas preparadas a través del método simultáneo (SIN).

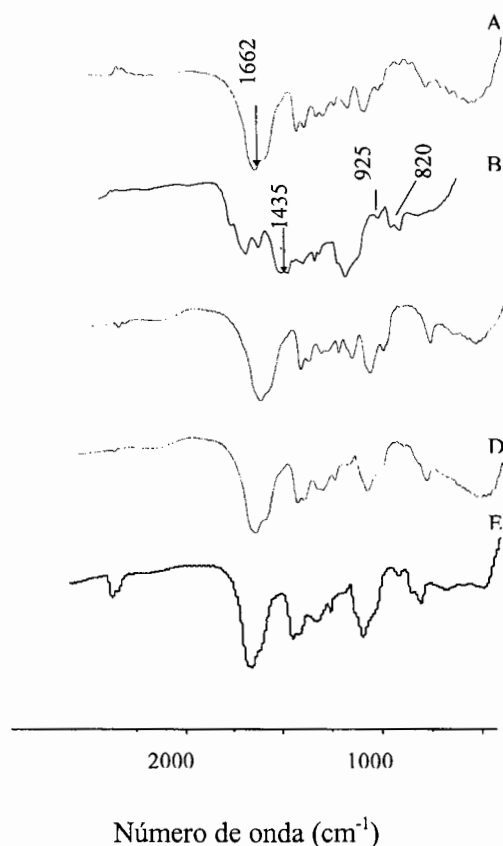


Figura 16. Espectros de infrarrojo de diferentes polímeros.
 (a) PAAM, (b) PVA, (c) SIN-PAAM/PVA (20/80), (d)
 SIN-PAAM/PVA (50/50), (e) SIN-PAAM/PVA (90/10).

Al igual que las IPNs, las SIN-PAAM/PVA (Figuras 16 C-E) presentaron todas las bandas de mayor vibración de la PAAM y PVA.

De acuerdo con lo anterior, el método de síntesis y relación molar no afecta la formación de las redes poliméricas interpenetradas de PAAM/PVA. Sin embargo, las propiedades de hinchamiento de los hidrogeles si fueron modificadas en función de la composición molar y método de síntesis como se indica a continuación.

6.3.2 Hinchamiento en agua.

La composición molar y el método de síntesis fueron las variables mediante las cuales se estudió el sistema de IPN de PAAM/PVA. La razón de hinchamiento y contenido de agua en el equilibrio (*EWC*) fueron determinados mediante las ecuaciones (4) y (6), respectivamente.

El estudio de la cinética de hinchamiento de las redes de PAAM y PVA es la referencia sobre la cual se evaluó el efecto de la composición molar sobre las propiedades de hinchamiento de los hidrogeles de IPN.

6.3.2.1 Hinchamiento de redes puras de PAAM y PVA.

El hidrogel de PAAM con una concentración del 3% (p/v) fue preparado de dos diferentes formas. En una de ellas, el proceso de gelación se realizó a temperatura ambiente y el hidrogel obtenido mediante este proceso se utilizó como referencia para las IPNs y se identificó como poliacrilamida secuencial (PAAMsec). La otra forma de preparación del hidrogel de PAAM se realizó utilizando el método de preparación de las SIN, el cual consistió en mezclar todos los componentes para formar el hidrogel y posteriormente la mezcla fue sometida a una temperatura de -26°C , el proceso de criogelación consistió en tres ciclos alternados de congelamiento y descongelamiento, por esta razón el hidrogel de PAAM preparado de esta forma se identificó como poliacrilamida simultánea (PAAMsim) y fue la referencia utilizada para las SIN.

En la Figura 17 se muestran las curvas de la cinética de hinchamiento donde se puede observar que la PAAMsec absorbió agua más lentamente que la PAAMsim y alcanzó su hinchamiento de equilibrio en 48 horas. El PVA durante el proceso de hinchamiento presenta el fenómeno de sinéresis (liberación del PVA no entrecruzado en el hidrogel al medio de hinchamiento). La

razón de hinchamiento en el equilibrio (W_i^*) para la PAAMsec fue de 21.36, de 19.24. para la PAAMsim y de 9.47 para el PVA.

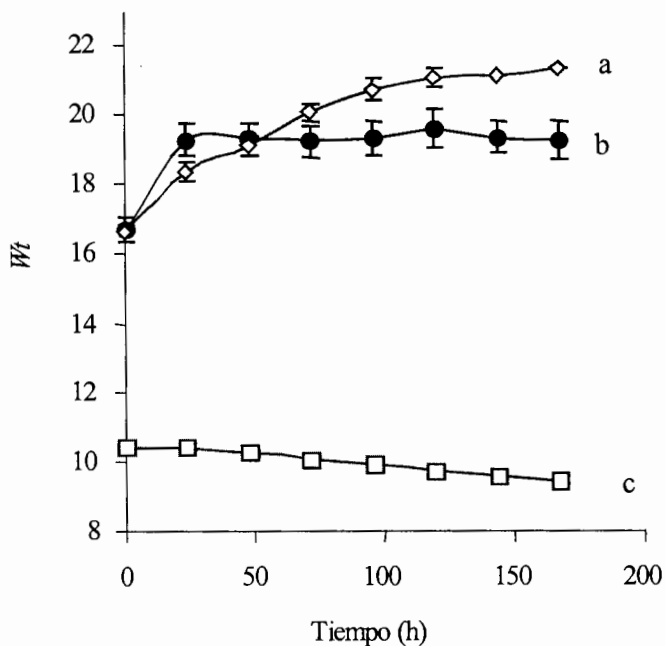


Figura 17. Cinética de hinchamiento después del proceso de síntesis de los hidrogeles de PAAMsec (a) PAAMsim (b) y PVA (c).

La diferencia en la razón de hinchamiento de la PAAM se relacionó con el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento (M_c), ya que a mayor peso molecular entre puntos de entrecruzamiento mayor razón de hinchamiento, como sucedió en este sistema.

La determinación M_c a partir de los datos de hinchamiento, fue otra forma de conocer la estructura entrecruzada de las redes de PAAM y PVA.

A partir de la ecuación de Flory¹⁹ fue posible determinar valor de M_c como se indica en la ecuación (8).

$$Mc = -\frac{\rho V_1((v_2^0)^{2/3} * v_2^{1/3} - v_2/2)}{\ln(1-v_2) + v_2 + \chi_{12}v_2^2} \quad (8)$$

donde V_1 es el volumen molar del agua a temperatura ambiente ($18 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$) y ρ es la densidad del gel seco de PAAM (1.24 g/mL , secuencial) y (1.19 g/mL , simultáneo), q_w es la relación de los pesos de la red en estado hinchado y en estado seco, d_1 es la densidad del agua, v_2^0 (0.0466) es la fracción en volumen de la red después de la preparación. Para el sistema gel de PAAM-agua, el valor de χ_{12} reportado fue de 0.48^{22}

El valor de v_2 , que es la fracción en volumen de la red del hinchamiento en el equilibrio¹⁷, se determinó a partir de la ecuación (9).

$$\frac{1}{v_2} = \frac{\rho(q_w - 1)}{d_1} + 1 \quad (9)$$

Después de la sustitución de datos en las respectivas fórmulas se determinó que para la PAAMsec el valor de Mc fue de 10090 g/mol y para PAAMsim fue de 7554 g/mol . Con estos resultados se justifica la diferencia en la razón de hinchamiento para la PAAM.

En el trabajo realizado por Kayaman y colaboradores¹⁰⁰, se reportó que la diferencia en la razón de hinchamiento de PAAM (preparada de forma secuencial y simultánea), con un valor para Mc de 1420 g/mol para la PAAM secuencial y de 2545 g/mol para la PAAM simultánea, se debió a la diferencia en la geometría de los recipientes de reacción (tarros y cajas Petri). Sin embargo, además de la geometría de los hidrogeles el valor de Mc también afecta la razón de hinchamiento del hidrogel como comprobó con la PAAMsec y PAAMsim, discutida anteriormente.

Continuando con los estudios de hinchamiento del PVA, los hidrogeles derivados de este polímero segregan la fracción sol⁹¹ durante el proceso de hinchamiento. Este comportamiento se presenta a continuación.

6.3.2.2 Extracción de la fracción sol de en los hidrogeles.

Es conocido que la gelación criotrópica del sistema agua-PVA no presenta una incorporación total de las macromoléculas del polímero dentro de la red no covalente del criogel formado. Como una consecuencia del proceso de preparación el criogel de PVA siempre tendrá algún contenido de la fracción sol, la cual fue separada del material insoluble (criogel) por extracción¹⁰¹. De este modo, el porcentaje de PVA extraído del criogel de PVA fue del 10% peso (g de PVA recuperados/ g iniciales de PVA), como se indica en el apéndice A. En la Figura 18 se muestra la dependencia del porcentaje extractado en agua de PVA como una función de la composición molar de las IPNs y SIN. Tanto IPNs como SIN muestran porcentajes altos de extracción, a una fracción mol menor a 0.4. Sin embargo, el porcentaje de extracción permanece constante a partir de una composición molar de 50% mol de PVA.

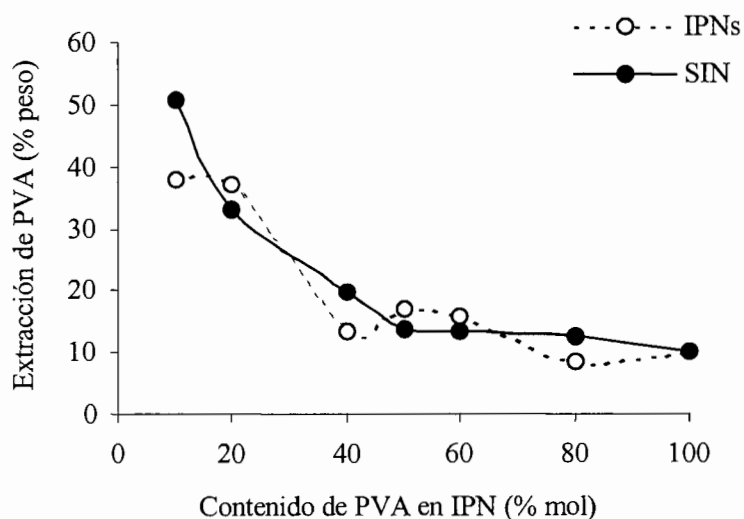


Figura 18. Extracción de PVA en IPNs y SIN, en función del contenido de PVA en IPN.

Sí comparamos el porcentaje de PVA extractado de los hidrogeles de IPNs y SIN en un 80% mol de PAAM, el cual fue del 37.15 y 32.9% peso respectivamente, con el con el de los hidrogeles con 20% mol de PAAM, que sería el caso opuesto de composición molar el cual

fue de 8.65 y 12.39% peso de PVA respectivamente. Esta enorme diferencia en el porcentaje de extracción de PVA en el hidrogel, dependiendo de la composición molar, sugiere que la presencia de la PAAM en un mayor porcentaje interfiere en el proceso de entrecruzamiento del PVA al no permitir de manera libre el acercamiento entre las cadenas de PVA.

6.3.2.3 Razón de hinchamiento de redes polimérica interpenetradas.

El estudio de hinchamiento en agua es una forma de caracterización de los hidrogeles sintetizados de IPNs y SIN. La razón de hinchamiento se determinó con cerogeles, hidrogeles que fueron secados por intercambio de disolvente (agua-etanol) y posterior secado en vacío durante 72 horas. El peso del cerogel fue la base para el cálculo de la razón de hinchamiento del hidrogel.

La cinética de hinchamiento de los hidrogeles de PAAMsec y PVA se muestra en la Figura 19. El PVA absorbe agua rápidamente y llega al equilibrio en las primeras 10 horas del proceso de hinchamiento, a diferencia del PVA, la PAAM en las primeras 10 horas su porcentaje de hinchamiento es del 77 %. En lo que respecta a la PAAMsim, su comportamiento en la de cinética de hinchamiento no se presentó en esta gráfica debido a que alcanza su hinchamiento de equilibrio en los primeros 15 minutos, razón por la que es difícil darle seguimiento.

Los resultados antes mencionados sugieren que el PVA presenta una mayor difusión del agua que la PAAM. Sin embargo, el valor de Wt^* es mayor para la PAAM debido a que presenta grupos con carácter más hidrofílico. .

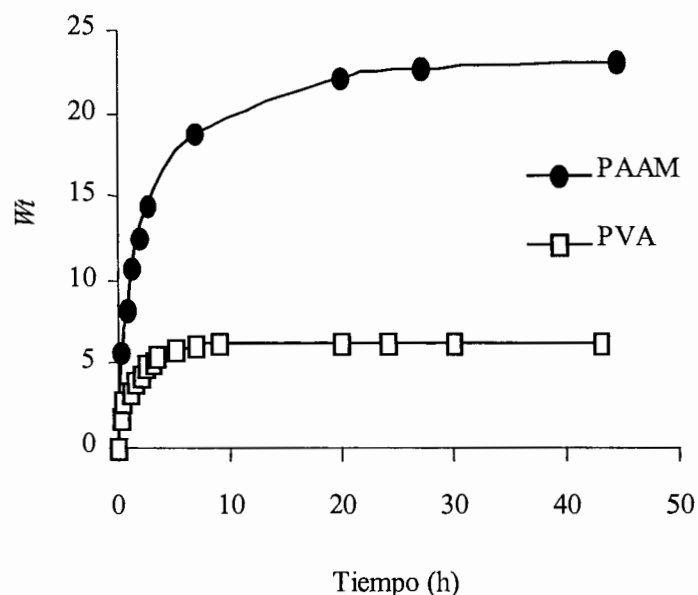


Figura 19. Cinética de hinchamiento después del proceso de secado por intercambio de disolvente de los hidrogel de PVA y PAAM.

De la cinética de hinchamiento, para las IPN de PAAM/PVA, se encontró que en general el valor de Wt disminuyó conforme se incrementó el contenido de PVA. El hinchamiento de equilibrio para las IPN se alcanzó en las primeras 20 h del proceso de hinchamiento.

Los valores de la razón de hinchamiento en el equilibrio, Wt^* , para las IPNs fueron graficados como una función de la composición molar de PVA (Figura 20). Para explicar el comportamiento de Wt^* se utilizó el modelo de Takayanagami¹⁰², el cual considera el acoplamiento de dos elementos en paralelo o en serie. Cuando el acoplamiento de los elementos se considera el paralelo corresponde a un mayor hinchamiento de lo esperado, por lo contrario, cuando los elementos están en serie el hinchamiento en el equilibrio es menor al esperado. Para el caso de las IPNs estudiadas, el comportamiento de los datos de Wt^* se ajustó mejor al modelo de dos elementos en serie.

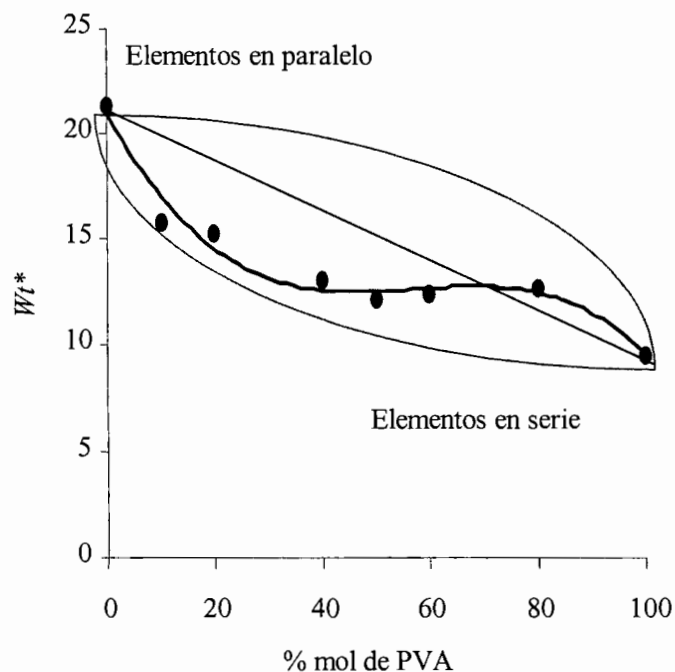


Figura 20. Comportamiento de la razón de hinchamiento en el equilibrio en agua destilada a 30°C de hidrogel de IPNs. Muestras secadas por intercambio de disolvente.

De acuerdo con el comportamiento de los valores de W_i^* , se observó que a partir de un porcentaje molar de PVA mayor de 60, se presentó una inversión de fases.

Para el caso de las SIN, el comportamiento de W_i^* se ajustó también al modelo que considera los elementos en serie, como se observa en la Figura 21. Para este caso, se observó que a partir de un porcentaje molar de PVA del 60, el comportamiento es aditivo.

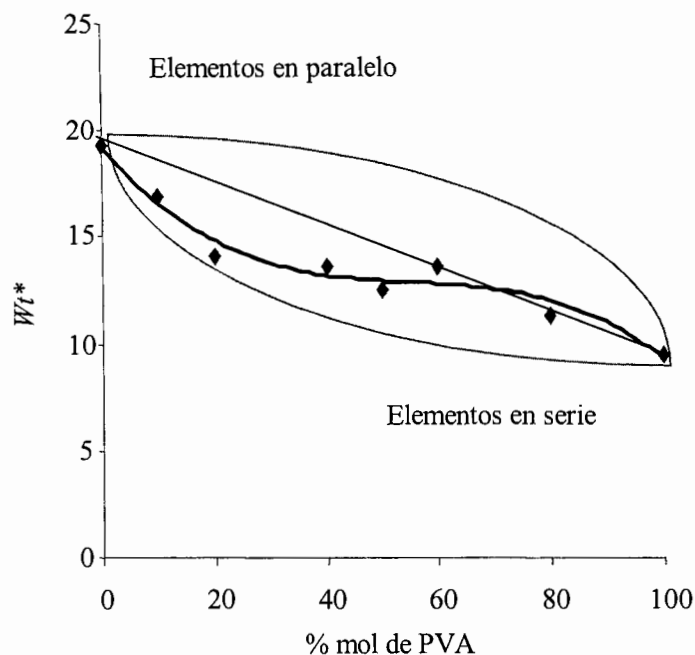


Figura 21. Comportamiento de la razón de hinchamiento equilibrio, en agua destilada a 30°C, de hidrogel de SIN. Muestras secadas por intercambio de disolvente.

El comportamiento que se observó tanto en IPNs como en SIN sugieren que para un porcentaje molar de PVA, hay mayor interacción entre las redes de PVA y PAAM como resultado de la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo $-OH$ del PVA y el grupo NH_2 en la PAAM, como lo reportó Mucha y colaboradores en un estudio realizado con mezclas de PVA y quitosan¹⁰³.

Las IPNs y SIN de PAAM/PVA presentaron un comportamiento de la razón de hinchamiento muy similar. Como resultó difícil establecer si existe efecto del método de preparación de las IPN sobre la razón de hinchamiento de las mismas, se aplicó la prueba de significación *t students* que corresponde a la comparación entre las medias de dos muestras. En este caso se comparó las medias de la razón de hinchamiento a una misma composición molar.

Aplicando la prueba *t students* con 4 grados de libertad y teniendo como hipótesis nula

H₀, la cual establece que no hay una diferencia significativa entre la razón de hinchamiento en el equilibrio entre IPNs y SIN a una misma composición molar. Esta hipótesis sólo se cumple si el valor de $t_{calculado} < t_{tablas}$.

En el Apéndice B, se presenta la tabla resumida que contiene el valor de $t_{calculada}$ así como la ecuación utilizada y el valor de t_{tablas} (valor determinado con un 95 % de confiabilidad). Los resultados obtenidos indicaron que solo para la PAAM e IPN-PAAM/PVA (40/60) y (20/80) si existe una diferencia significativa en el efecto del método de preparación sobre la razón de hinchamiento.

6.3.2.4 Cinética de hinchamiento.

La cinética de hinchamiento depende del mecanismo de difusión de las moléculas de agua hacia el interior de la matriz de IPN, seguido de una relajación de las cadenas macromoleculares de la IPN.

Para tener idea de los procesos que se involucran en el mecanismo de hinchamiento se utilizó un método simple que describe el transporte de agua en los polímeros, el cual se denomina como *El Modelo de la Ley de la Potencia*¹⁰⁴:

$$\frac{Wt}{W_{\infty}} = kt^n \quad (10)$$

donde Wt y W_{∞} son la razón de hinchamiento a tiempo t y en el equilibrio, respectivamente, k es la velocidad de hinchamiento y n es el exponente de difusión que determina el mecanismo de difusión. El mecanismo del transporte de agua es usualmente descrito por dos casos límite de este modelo, que son cuando $n = 0.5$ o $n = 1$. Si $n = 0.5$ (Caso I) indica un mecanismo de difusión Fickiana, lo cual implica que la velocidad de difusión es mucho más lenta que la velocidad de relajación. En éste caso, la velocidad de difusión del agua en el hidrogel es la que controla el proceso de hinchamiento y hay una dependencia lineal entre el agua absorbida y $t^{1/2}$. Para $n = 1$ la velocidad de difusión es mucho más rápida que la velocidad de relajación de las cadenas poliméricas, de este modo la velocidad de relajación controla el proceso de

hinchamiento de los hidrogeles y éste es proporcional al tiempo, este proceso es denominado como Caso II de difusión. El caso intermedio, conocido como difusión anómala ocurre cuando el transporte de agua es proporcional a t^n , donde $0.5 < n < 1$. El transporte anómalo ocurre como resultado de un acoplamiento entre la difusión Fickiana y la relajación polimérica¹⁰⁵.

La ecuación (10) se aplica cuando en el hinchamiento inicial se observa linealidad al graficar $\text{Log}(W_t/W_\infty)$ como una función de $\text{Log } t$. Esta ecuación sólo se aplica para una fracción de hinchamiento menor a 0.6 ¹⁰⁶. A partir de la ordenada al origen y la pendiente de las curvas para cada hidrogel de IPNs, se obtuvo el valor de la constante cinética k y el exponente de difusión n . Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Valores de n y k para el hinchamiento de diversos hidrogeles de IPNs-PAAM/PVA.

Composición molar (PAAM/PVA)	Exponente de difusión n	k (min^n)
100/0	0.58	0.0026
90/10	0.43	0.084
80/20	0.44	0.083
60/40	0.51	0.054
50/50	0.64	0.027
40/60	0.56	0.039
20/80	0.71	0.017
0/100	0.36	0.123

El valor del exponente de difusión n para las IPNs se encuentra en el intervalo de $0.5 < n < 1$, lo cual indica que la difusión del agua hacia el interior de todos los hidrogeles de IPNs siguen

un mecanismo de difusión anómalo y revela la existencia de cierto acoplamiento entre la difusión molecular y tensión-relajación desarrollada durante el proceso de hinchamiento de los hidrogeles¹⁰⁵.

En general, el exponente de difusión aumentó conforme se incrementó el contenido de PVA en los hidrogeles de las IPNs. Éstos resultados sugieren que el incremento en el contenido del PVA dentro de la estructura de las IPNs produce un arreglo compacto de las cadenas macromoleculares como fue sugerido por Kim y colaboradores¹⁰⁵. Con el incremento en la compactación de los hidrogeles de IPNs, la relajación de las cadenas macromoleculares sería más lenta y esto daría como resultado un proceso no Fickiano, siendo en éste caso la relajación la que controla el proceso de hinchamiento de los hidrogeles de IPNs. Los cambios en la velocidad de admisión de agua pueden ser atribuidos a la disminución de la constante cinética k . Esto quiere decir que conforme se incrementó el contenido de PVA dentro de las IPNs se tendría una estructura más compacta.

En éste estudio, se observó que la IPNs (50/50) presentó un comportamiento altamente anómalo como resultado de la fuerte interacción entre las redes de PAAM y PVA probablemente a través de sus grupos funcionales respectivos.

Para determinar el coeficiente de difusión, D en los hidrogeles de IPNs, se consideró que su proceso de transporte de agua es una mezcla entre el comportamiento de difusión Fickiana y anómala. Además, en agua pura la difusión se acerca a un comportamiento Fickiano¹⁰⁷ y por lo tanto es posible utilizar la ecuación (11) para calcular el coeficiente de difusión..

$$\frac{W_t}{W_\infty} = 4 \left(\frac{Dt}{\pi l^2} \right)^{1/2} \quad (11)$$

donde D , es el coeficiente de difusión del agua (cm^2/s) y l es el espesor del cerogel de IPNs. al igual que la ecuación (10), esta ecuación sólo se aplica para $(W_t/W_\infty) < 0.6$. La derivación de la ecuación (11) se muestra en el Apéndice C.

Los coeficientes de difusión fueron se evaluaron a partir de la porción recta de las líneas presentadas en la curva de la cinética de hinchamiento. La grafica correspondiente a cada uno de los hidrogeles de IPNs, se muestran en el Apéndice D.

En la Figura 22 se presenta de manera representativa, la grafica para la IPNs (50/50) del contenido de agua contra $t^{1/2}$, la parte lineal de la curva de la cinética de hinchamiento indica que en ésta etapa el proceso de hinchamiento es controlado por un mecanismo de difusión Fickiano.

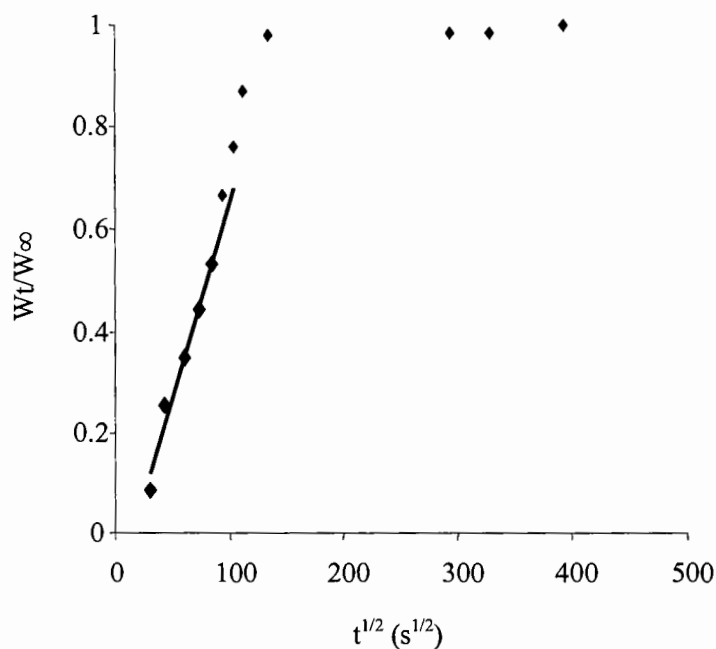


Figura 22. Gráfica del contenido de agua contra $t^{1/2}$ para el hidrogel de IPNs (50/50). Muestra secada por intercambio de disolvente.

Los coeficientes de difusión evaluados de la pendiente de la línea recta, se presentan en la Tabla 7. En esta tabla se observa que el coeficiente de difusión del agua dentro del PVA es mayor que el de la PAAM, a pesar de que la PAAM tiene un carácter más hidrofílico que el PVA.

Tabla 7. Coeficiente de difusión en IPNs

Composición molar (PAAM/PVA)	Coeficiente de difusión $D(X10^7)(cm^2/s)$
100/0	6.36
90/10	8.05
80/20	7.31
60/40	7.6
50/50	6.53
40/60	6.54
20/80	7.8
0/100	8.5

Para las IPNs se consideró que el coeficiente de difusión disminuye hasta un porcentaje molar de PVA de 40 (IPNs (40/60)), como resultado del incremento en la compactación de la red por la presencia del PVA. Por otro lado, la IPNs (20/80) presentó un importante incremento, con respecto a la tendencia que se tenía como resultado de un mayor contenido de PVA, esto sugiere que puede existir un a inversión de fases en donde el PVA aparentemente controla las propiedades de hinchamiento de esta IPNs.

Para determinar el mecanismo de difusión del agua en los hidrogeles de SIN también se aplicó el modelo de *La Ley de la Potencia*. El procedimiento para calcular el valor de n y k fue el mismo que se utilizó en las IPNs. Los resultados obtenidos muestran que el valor de n se encuentra en $0.5 < n < 1$, como se observa en la Tabla 8, lo cual indica que la difusión del agua hacia el interior de todos los hidrogeles de SIN, siguen un mecanismo de difusión anómalo y revela la existencia de cierto acoplamiento entre la difusión molecular y tensión-relajación

desarrollada durante el proceso de hinchamiento de los hidrogeles¹⁰⁶, de forma análoga a los resultados observados en las IPNs.

El valor del exponente de difusión, n en los hidrogeles de SIN presentó un incremento gradual conforme aumentó el contenido de PVA, a excepción de la SIN (50/50) que presentó una ligera disminución del valor de n como resultado de un aumento en la interacción de las redes de PAAM y PVA (Tabla 8). El comportamiento en el valor de n se atribuye a un incremento en la compactación de la red de SIN como previamente fue sugerido para las IPNs.

Tabla 8 Valores de n y k para el hinchamiento de diversos hidrogeles de SIN-PAAM/PVA

Composición molar (PAAM/PVA)	Exponente de difusión n	k (min ⁿ)
100/0	ND	ND
90/10	0.033	0.69
80/20	0.21	0.09
60/40	0.23	0.08
50/50	0.19	0.12
40/60	0.25	0.06
20/80	0.71	0.017
0/100	0.36	0.123

Los cambios en la velocidad de admisión del agua son atribuidos a una ligera disminución del valor de la constante cinética k , conforme se incrementó el contenido de PVA en las SIN.

El PVA es un polímero que tiene un comportamiento de difusión altamente anómalo, debido a la regularidad e interacción que existe entre sus cadenas poliméricas, de manera particular esta interacción se incrementa cuando el hidrogel es preparado por criogelación, como es el caso, dando lugar a una estructura compacta lo cual acentúa los aspectos anómalos de la difusión, aún para moléculas tan pequeñas como el agua¹⁰⁶. Sin embargo, en éste estudio, la difusión del agua a través de la red entrecruzada de SIN e IPNs de PAAM/PVA es más cercana a la difusión Fickiana debido a que al mezclarse con la PAAM se presenta una estructura más abierta.

Para los hidrogeles de SIN no se determinó el valor del coeficiente de difusión debido a que al graficar los datos de hinchamiento contra $t^{1/2}$ se observó que la curva de la cinética de hinchamiento presenta tres zonas con diferente velocidad de absorción de agua durante el proceso de hinchamiento. Aún cuando en la primer zona se considera que la difusión es Fickiana, no se cuenta con un suficiente número de datos, para el calculo de la pendiente, debido a que fue muy rápida la absorción de agua y bajo los intervalos de tiempo utilizados en este trabajo no es posible hacer la determinación, teniendo en cuenta que la ecuación utilizada para el calculo de difusión sólo se aplica en la fracción de hinchamiento menor a 0.6. Como ejemplo, la IPNs (90/10) alcanza su hinchamiento en los primeros 15 min.

6.3.2.6 Contenido de agua en el equilibrio de las IPN.

EL contenido de agua en el equilibrio (*EWC*) es otro parámetro que forma parte de la caracterización de los hidrogeles de las IPN de PAAM/PVA y fue calculado mediante la ecuación (6).

El hidrogel de PAAM (secuencial y simultánea) presentó un valor de *EWC* mayor que el del PVA, como resultado de una mayor hidrofiliidad de la PAAM¹.

El comportamiento entre de los valores del *EWC* tanto para IPNs (Figura 23-a) como para las SIN (Figura 23-b) es similar. Así mismo, el valor de *EWC* disminuye conforme se incrementa el contenido de PVA dentro de las IPN, este comportamiento se atribuye al incremento en la

compactación de la red por el incremento del PVA, como se estableció al determinar el valor de n .

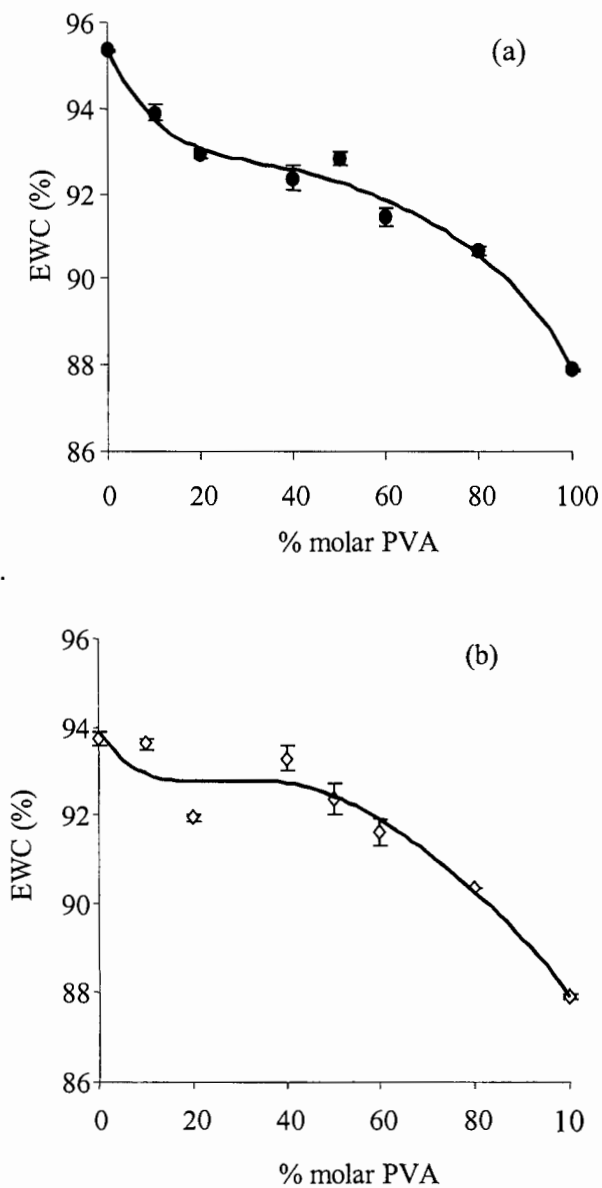


Figura 23. Comportamiento de *EWC* como una función de la composición molar de PVA. (a) IPNs y (b) SIN.

Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los obtenidos por Lee y colaboradores para el sistema quitosan-poliácido acrílico¹⁰⁸. En este trabajo se dice que los grupos hidrofílicos de un polímero incrementan el *EWC*, sin embargo su valor es afectado por la formación de puentes de hidrogeno (como ocurre en el sistema PAAM/PVA) o complejos polielectrolíticos que capturan los grupos hidrofílicos (sistema quitosana -poliácido acrílico) y producen una estructura mucho más cerrada o compacta.

El valor de *EWC* tanto para IPNs como para SIN se encuentra por arriba del 90 %, lo cual significa que los hidrogeles sintetizados en este trabajo son altamente hidrofílicos y por lo tanto biocompatibles.

Mediante un análisis estadístico (prueba *tstudents*), los resultados se muestran en el Apéndice B (Tabla A), se determinó que el efecto del método de preparación sobre el *EWC* de las IPN es significativo para una composición molar de PAAM/PVA de (80/20) y (60/40).

6.3.2.7 Calorimetría diferencial de barrido.

El comportamiento térmico de los hidrogeles de PVA e IPN de PAAM/PVA fue investigado por calorimetría diferencial de barrido. En esta sección no se utilizó la transición térmica que presenta la PAAM porque al estar combinada con el PVA (el cual presenta cierto grado de cristalinidad) la temperatura de transición vítrea (*Tg*) no puede apreciarse. Por esta razón, resultó más conveniente utilizar el pico endotérmico de fusión (*Tm*) que presenta el PVA a 232°C.

En la Figura 24 se muestran los termogramas para el PVA, así como para las IPNs de PAAM/PVA. El PVA presentó un endoterma a 232°C, correspondiente a su temperatura de fusión (*Tm*). El mayor desplazamiento de la *Tm* del PVA dentro de la IPNs fue en la composición molar PAAM/PVA (50/50).

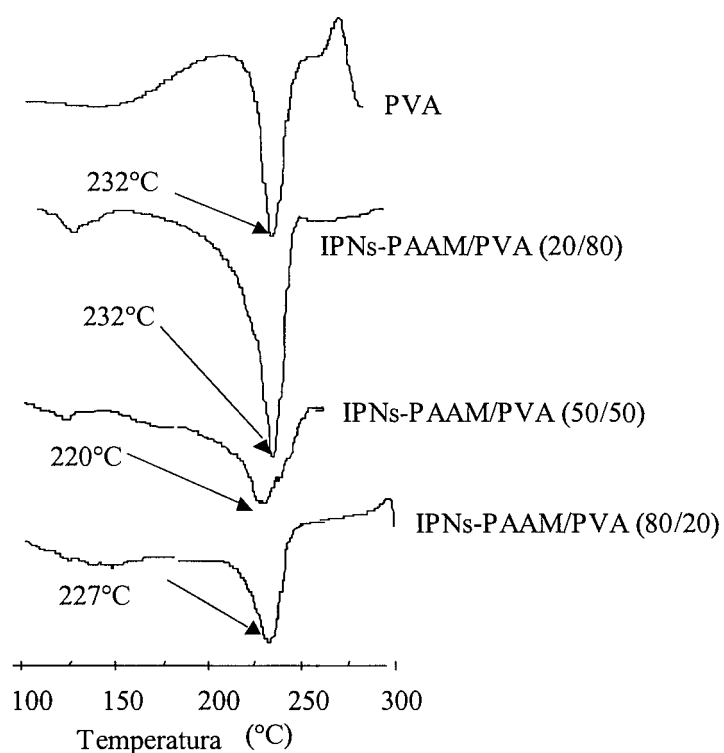


Figura 24. Termogramas de DSC para PVA y algunas IPNs. Los hidrogeles fueron secados por intercambio de disolvente.

Este comportamiento confirma que en esta composición molar, se presenta una mayor compactación de la red como resultado del incremento en la interacción entre la red de PAAM y PVA, como se estableció al determinar el valor de n y en la disminución de la razón de hinchamiento.

Por otro lado, los hidrogeles de SIN muestran un comportamiento muy similar al de los endotermas de fusión del PVA en las IPNs, como se muestra en la Tabla 9. Para las SIN el desplazamiento presentado por el PVA en las SIN no es tan grande como para fundamentar de manera confiable la estructura de las IPN de PAAM/PVA. Sin embargo, a través de la resistencia a la compresión, microscopía diferencial de barrido (pruebas que posteriormente se discutirán), además de las ya discutidas permitirán establecer la estructura de las SIN.

Tabla 9. Valores de la temperatura de fusión para el PVA en IPNs y SIN.

Composición molar (PAAM/PVA)	T _m (°C) para el PVA	
	IPNs	SIN
90/10	231	226
80/20	227	228
60/40	227	229
50/50	220	228
40/60	228	230
20/80	232	230
0/100	232	232

6.3.2.8 Resistencia a la compresión.

La resistencia a la compresión de los hidrogeles de PAAM, PVA e IPN fue determinada después de un proceso de hinchamiento en agua a 30°C.

El hidrogel de PAAM presentó diferentes consistencias dependiendo del proceso mediante el cual fue obtenido (secuencial o simultáneo). En el caso del hidrogel de la PAAMsec fue difícil de manipular debido a que es muy blando y frágil. Por lo contrario el hidrogel de PAAsim, al ser obtenido por criogelación da como resultado un hidrogel rígido y duro. Al evaluar la resistencia a la compresión de estos hidrogeles de PAAM se encontró que la PAAmsim presenta una resistencia a la compresión casi dos veces mayor que el hidrogel de PAAMsec (Tabla 10), lo cual indica que el proceso de criogelación aumenta la resistencia a la compresión del hidrogel de PAAM.

En el caso del PVA, el cual es un material que al ser calentado para disolverlo y posteriormente sujeto a congelamiento-descongelamiento, forma una red polimérica

entrecruzada que produce un hidrogel altamente elástico¹⁰⁹. Este hidrogel es estable a temperatura ambiente y retiene su forma, pudiendo ser extendido hasta seis veces su tamaño inicial. De este modo, el PVA presenta una resistencia a la compresión de 6.24 kPa, siendo este valor tres veces mayor que el de la PAAM.

La resistencia a la compresión de los hidrogeles tanto de IPNs como de SIN se muestra en la Tabla 10. La presencia del PVA dentro de la red del hidrogel hace a las IPNs y SIN un material más denso y refuerza al hidrogel el cual incrementa su resistencia a la compresión. Ejemplo de esto, es el incremento de la resistencia a la compresión de 1.9 kPa a 4.1 kPa cuando la cantidad de PVA en el hidrogel de PAAM se incrementó de 0 a 10% relación molar. Esto representó un incremento del 211 y 132 % en la resistencia a la compresión respecto de la PAAMsec y PAAMsim, respectivamente. El incremento de la resistencia a la compresión en las IPN puede ser entendido como información acerca de una estructura mucho más densa de los hidrogeles.

Los hidrogeles que llegan a presentar una mayor razón de hinchamiento, son hidrogeles blandos que llegan a tener una densidad de red mucho más baja¹⁰⁵ y esto da como resultado una disminución en su resistencia a la compresión. Este comportamiento se visualiza para la IPNs, como se muestra en la Tabla 10, en la cual, el incremento del PVA dentro de los hidrogeles de las IPNs da como resultado el aumento de la resistencia a la compresión.

La combinación de la red de PAAM y PVA mediante redes poliméricas interpenetradas permitió obtener hidrogeles con buenas propiedades mecánicas. El valor de la resistencia a la compresión tanto en IPNs como en SIN, es intermedia entre la obtenida para el PVA y PAAM. El reforzamiento que proporciona el PVA a la PAAM es visualizado en la IPNs (90/10), en esta composición molar podemos observar que la adición de un 10 % mol de PVA a la PAAM dio como resultado un incremento en su resistencia a la compresión del 200%.

Tabla 10. Resistencia a la compresión de los hidrogeles de IPNs y SIN*.

Composición % molar (PAAM/PVA)	Resistencia a la compresión (kPa)	
	IPNs	SIN
100/0	1.94 ± 0.02	3.27 ± 0.2
90/10	4.10 ± .038	4.33 ± 0.3
80/20	4.35 ± 0.13	4.91 ± 0.4
60/40	5.74 ± 0.08	4.76 ± 0.2
50/50	4.8 ± 0.5	4.98 ± 0.08
40/60	5.23 ± 0.03	4.12 ± 0.12
20/80	5.16 ± 0.2	4.80 ± 0.02
0/100	6.38 ± 0.13	6.38 ± 0.13

*La determinación se realizó con hidrogeles hinchados.

6.3.3 Morfología.

La morfología estructural de los hidrogeles de PVA, PAAM e IPN-PAAM/PVA fue estudiada a través de microscopía electrónica con barrido. Las Figuras 25-29 muestran la imagen de la superficie fracturada de IPNs con diferente composición molar.

En la Figura 25 se muestra el hidrogel de PVA, el cual presentó una estructura como esponja y una morfología tipo tubular formada por poros cilíndricos de gruesas paredes, de los cuales muchos se encuentran divididos internamente por delgadas paredes. El tamaño de poro se encuentra en el intervalo de 2.4-40 μm . La morfología reportada en este trabajo esta de acuerdo con la presentada por Okazaki y colaboradores¹¹⁰.

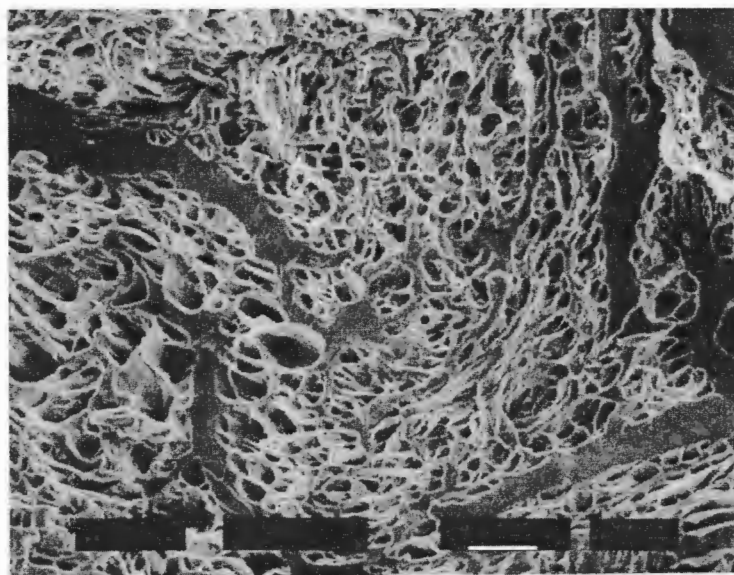


Figura 25. Micrografía del hidrogel de PVA. Muestra secada por liofilización durante 72 h. Muestra fracturada en nitrógeno líquido. La barra indica 50 μm . Esta figura está a 200X

La PAAMsec al igual que el PVA, presentó una estructura como esponja con poros de forma regular separados con paredes muy delgadas, como se muestra en la Figura 26. Con una distribución del tamaño de los poros mayor que la del PVA, la cual fue de 7.6-95 μm .

En algunos trabajos se ha reportado¹⁰⁶ que el PVA presenta un tamaño de poro mayor que la PAAM, sin embargo esto ocurre únicamente cuando el porcentaje de acrilamida en el hidrogel es muy alto (19% peso).

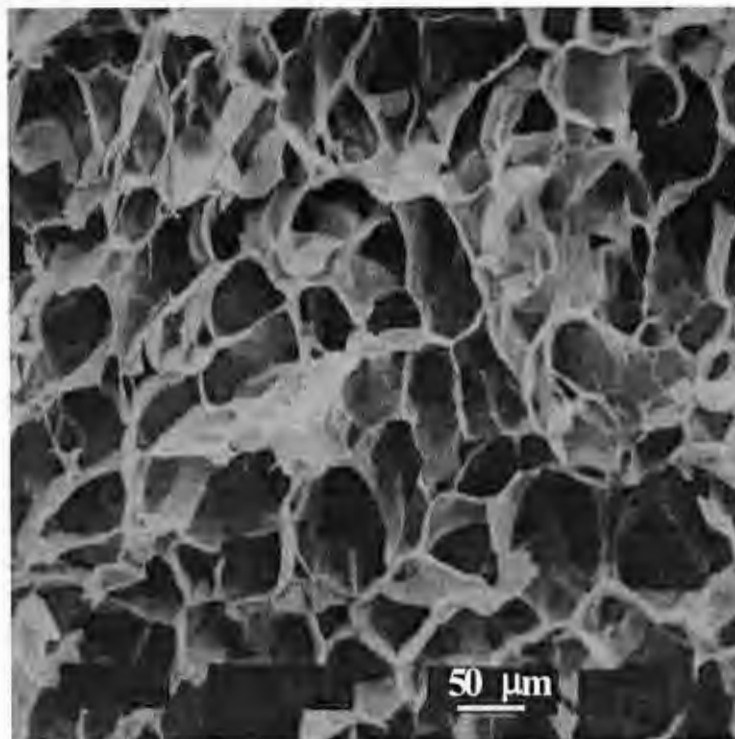


Figura 26. Micrografía del hidrogel de PAAMsec. Muestra secada por liofilización. Muestra fracturada en nitrógeno líquido. La barra indica 50 μ m. Esta figura está a 200X

La PAAMsim presentó una estructura muy parecida a la PAAMsec y debido a esto, al comparar las micrografías de cada una de ellas resultó difícil establecer alguna diferencia como resultado de su método de preparación. Sin embargo, al comparar la pared de un poro, para cada una de ellas (Figura 27) se pudo observar que la PAAMsec presentó una estructura en forma de malla mientras que la PAAMsim muestra una estructura fibrilar y mucho más densa, teniéndose que recurrir a mayores aumentos para poder ser visualizada de forma clara. Este resultado permite establecer que la PAAMsim al tener una estructura más compactada presentaría una mayor resistencia a la compresión, así como menor razón de hinchamiento que

la PAAMsec, resultados que permiten establecer la relación que existe entre su morfología y propiedades físicas y mecánicas.

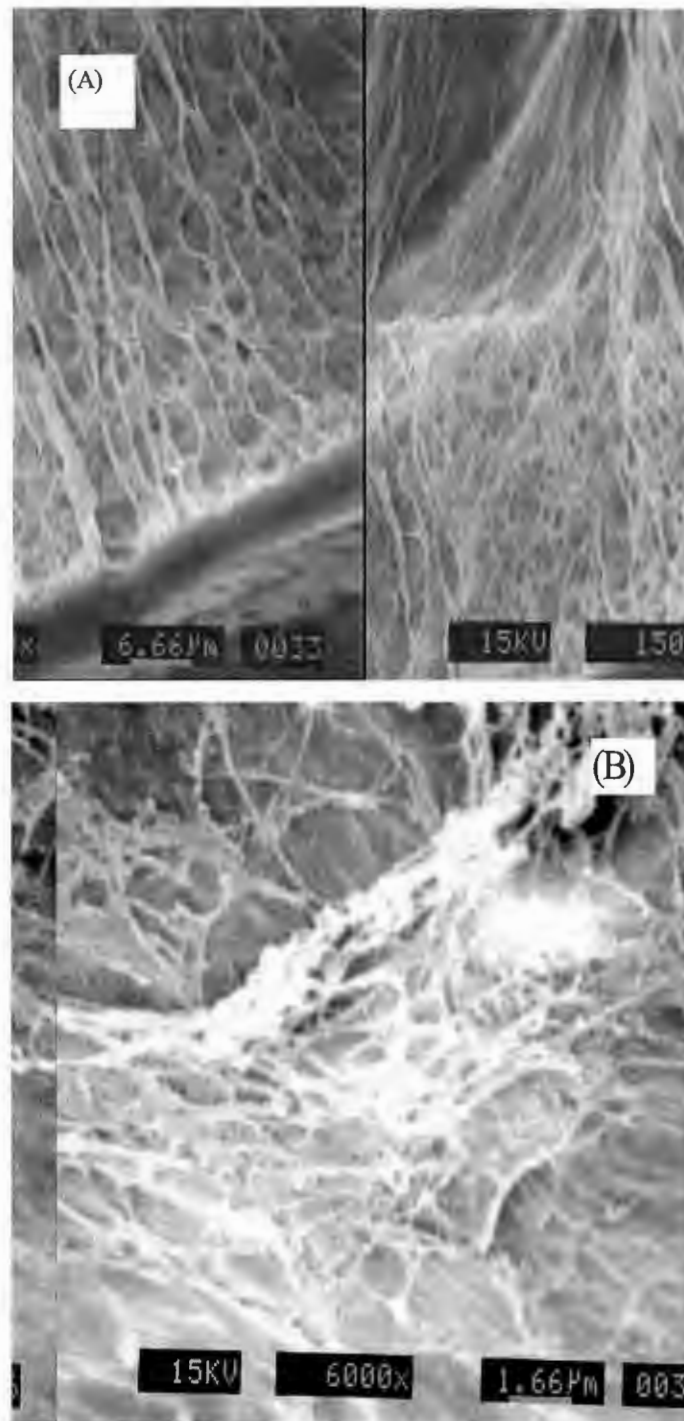


Figura 27. Pared de un poro de PAAM (A) secuencial a 1500X y (B) simultánea a 6000X.

Antes de presentar la morfología de las IPN, se hace hincapié en que la PAAM es la matriz primaria sobre la cual se determinó el efecto de la adición de PVA en diferentes cantidades durante la preparación de las IPN.

Las IPNs presentaron una estructura porosa, como esponja. La forma y distribución del tamaño de poro de los hidrogeles estuvo en función de la composición molar.

De manera particular, en la Figura 28 se muestra la morfología presentada por la IPNs (90/10), esto es 90 % mol de PAAM y 10% mol de PVA, se observó una morfología porosa. Dentro de los poros se encuentran pequeños poros interconectados entre sí. Con respecto a la morfología de la PAAM, se observó la formación de ramificaciones dentro de los poros de la PAAM.

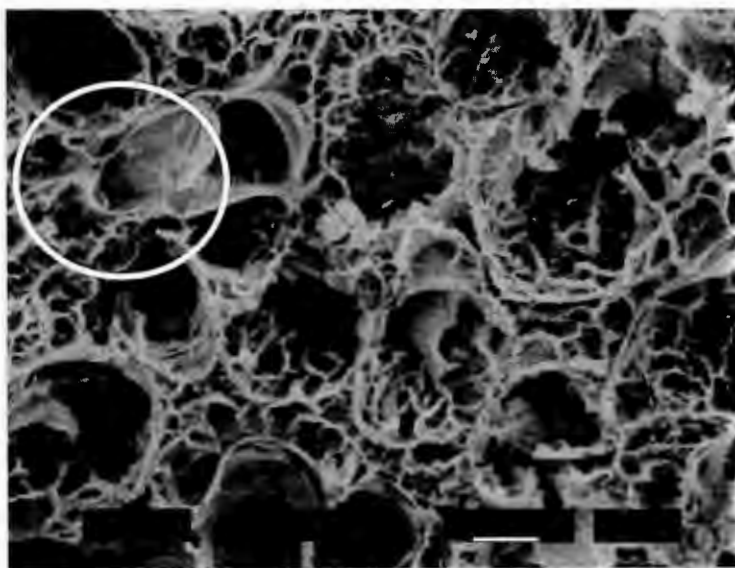


Figura 28. Micrografía de SEM del hidrogel de IPNs (90/10), preparada con 90% mol de PAAM y 10% mol de PVA. El secado de las muestras se realizó por liofilización durante 72 h. La muestra fue fracturada en nitrógeno líquido. La barra indica 50 μ m. Esta figura está a 200X.

Con la finalidad de profundizar en la morfología de la IPNs (90/10) se realizó una ampliación a 1500X de uno de sus poros (zona marcada de la Figura 28). Los resultados obtenidos indican

que el PVA se interpenetra con la PAAM, al observarse la formación de una estructura muy fina, lo cual se considera que es el PVA, como se muestra en la figura 29. Esta morfología justifica el incremento importante que presenta ésta IPNs respecto de la PAAMsec, esto es, la interpenetración del PVA con la PAAM incrementa la rigidez de material y por lo tanto su resistencia a la compresión.

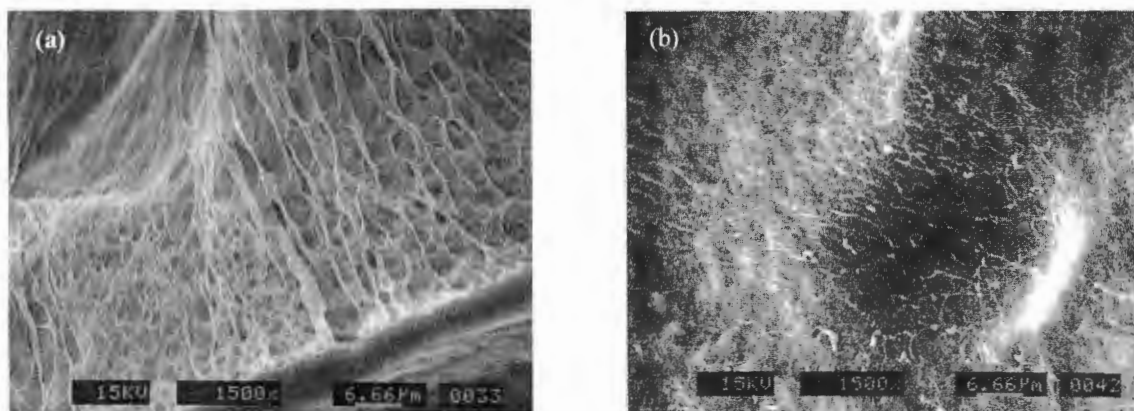


Figura 29. Comparación de la pared de un poro entre la PAAMsec (a) e IPNs(90/10) (b) a 1500X. Hidrogeles secados por liofilización. El secado de las muestras se realizó por liofilización durante 72 h. La muestra fue fracturada en nitrógeno líquido. La barra de escala indica 6.66 μm.

La morfología de la IPNs (50/50) presentó una estructura porosa (Figura 30-b), con una disminución y distribución uniforme del tamaño de poro (respecto de la PAAMsec), estos resultados sugieren que al existir la misma composición de cada uno de los componentes da como resultado la estructura homogéneamente. La disminución del tamaño de poro en esta IPNs así como el incremento en la interacción de las redes de PAAM y PVA justifica la disminución de la razón de hinchamiento y el incremento en el valor del coeficiente de difusión n .

La morfología de la IPNs (20/80) (Figuran 30-c) es muy similar a la del hidrogel de PVA, al observarse un mayor tamaño de la pared de los poros que el obtenido en las otras IPNs, su estructura es porosa y presenta una amplia distribución del tamaño de los poros. La IPNs (20/80) presenta un alto grado de compactación, de acuerdo con el valor obtenido de su

exponente de difusión n , como resultado del alto contenido de PVA dentro de su estructura, comportamiento que corresponde a la morfología presentada por esta IPNs.

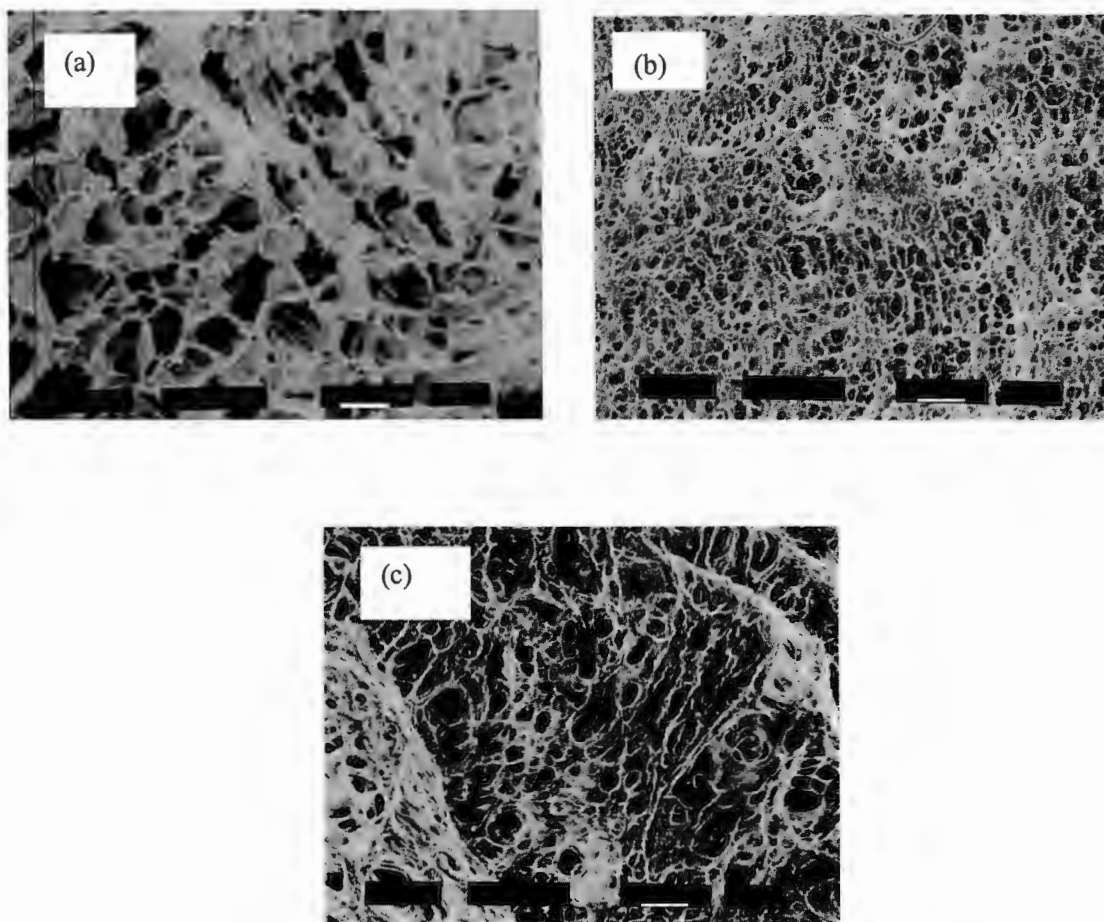


Figura 30. Micrografías de SEM para los hidrogeles de IPNs-PAAM/PVA (a) 80/20, (b) 50/50 y (c) 20/80. Las tres micrografías se encuentran a 200X y la escala es de 50 μm . El secado de las muestras se realizó por liofilización. Cada muestra fue fracturada en nitrógeno líquido. La barra de escala indica 50 μm .

En resumen, todas las IPNs preparadas en este trabajo presentaron una estructura macroporosa, donde no se puede apreciar una separación de fase, lo cual no indica que no exista.

A medida que se incrementó el contenido de PVA en las IPNs aumentó la compactación de hidrogel manifestándose en la morfología, por una disminución del tamaño de poro. Así mismo, la interpenetración por parte del PVA en la PAAM incrementó la resistencia mecánica del hidrogel (respecto de la resistencia mecánica del homopolímero de PAAMsec) y provocó la disminución de la razón de hinchamiento (con respecto al homopolímero de PAAMsec). Estos resultados indican que la morfología de las IPNs se encuentra estrechamente relacionada con sus propiedades físicas y mecánicas.

Sin embargo, cuando se modifica el método de preparación de las IPN de PAAM/PVA los resultados pueden ser diferentes, aún cuando sea la misma composición molar como se demuestra a continuación al analizar la morfología de las SIN-PAAM/PVA.

Las redes poliméricas interpenetradas preparadas mediante el método simultáneo, SIN, muestran algunas diferencias con respecto a las IPNs. De este modo, la SIN(90/10) muestra una morfología porosa, con pequeñas ramificaciones dentro de los poros, como se muestra en la figura 31.

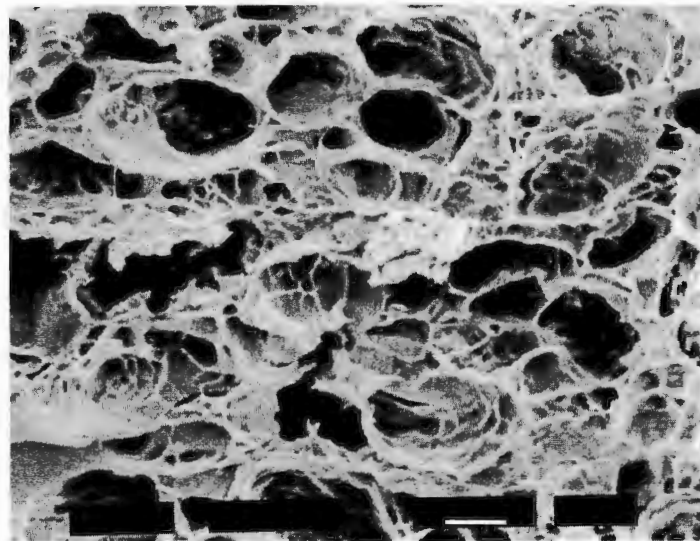


Figura 31. Micrografía de SEM del hidrogel de SIN (90/10). El secado de la muestra se realizó por liofilización durante 72 h. Muestra fracturada en nitrógeno líquido. La barra indica 50 μ m. Esta figura está a 200X

La disminución de las ramificaciones, respecto de la IPNs (90/10), probablemente se debe a que exista una menor cantidad de PVA dentro de la microestructura de la red, como resultado de la sinérisis⁴⁰ presentada por este hidrogel, al no entrecruzarse el 50% del PVA puesto inicialmente.

El resto de las SIN presentaron un cambio muy significativo en su morfología, conforme se incrementó el contenido de PVA dentro de su estructura. Algunas de ellas presentaron la formación de dos morfologías, como fue el caso de la SIN(40/60). Este hidrogel muestra una estructura tipo celular¹¹¹ la cual se considera una estructura altamente interpenetrada, combinada con una estructura de dedos¹¹². Se sugiere que la combinación de estas morfologías explica el comportamiento cinético que presentó esta SIN. Al iniciar con una rápida absorción de agua como resultado de una estructura porosa, proceso que se consideró sigue un comportamiento Fickiano, seguido de una disminución en la velocidad de absorción del agua como resultado de una mayor interpenetración y disminución en el tamaño de poro, como se puede observar en la Figura 32.

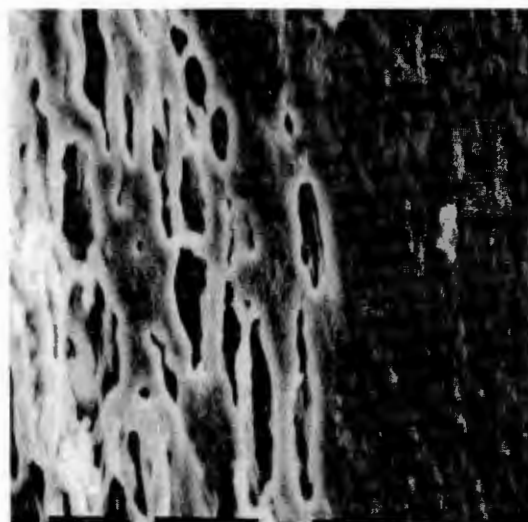
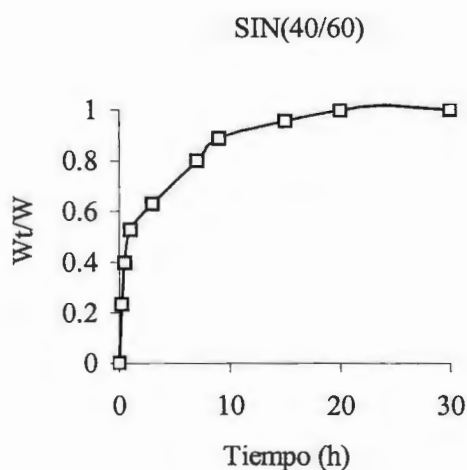


Figura 32. Comparación entre la cinética de hinchamiento y la morfología para el hidrogel de SIN (40/60). El secado de la muestra se realizó por liofilización durante 72 h. Muestra fracturada en nitrógeno líquido. La barra indica 50 μm . Esta figura está a 200X.

Por otro lado, el proceso de secado de los hidrogeles puede modificar su morfología. Como ejemplo, en la Figura 33 se muestra la morfología de la IPNs (50/50) después del proceso de secado, que implicó el intercambio de disolvente, en ésta figura se observa un incremento del tamaño de la pared de los poros, con respecto a la morfología presentada para esta misma IPNs en la Figura 30-b.

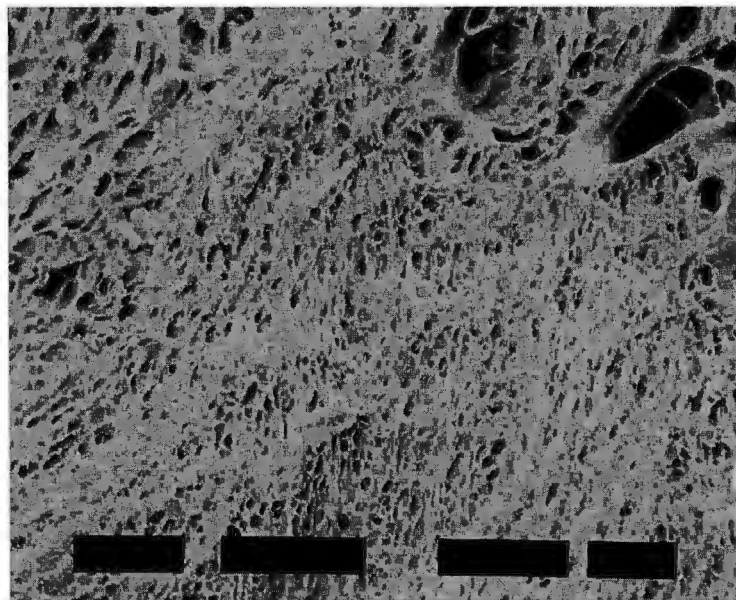


Figura 33. Micrografía de SEM para el hidrogel de SIN(50/50). El secado de la muestra se realizó por intercambio de disolvente y posteriormente el disolvente se evaporó por liofilización durante 72 h. Muestra fracturada en nitrógeno líquido. La barra de escala indica 50 μm . Este figura está a 200X.

En resumen, se considera que la morfología que presentaron las IPNs pueden ser viable para ser utilizadas como soportes al presentar una distribución del tamaño de poros homogénea. Mientras que en el caso de la morfología presentada por las SIN es irregular y en algunos casos se presentó la formación de dos morfologías lo cual se considera que modifica su cinética de hinchamiento. Sin embargo, en la siguiente etapa de estudio sólo serán considerados algunos hidrogeles tanto de IPNs como de SIN para evaluar su comportamiento bajo condiciones de inmovilización.

6.4 Hinchamiento en medio mineral basal-heptano.

En la sección anterior se determinó que los hidrogeles seleccionados para ser utilizados como soportes en la inmovilización de *Rhodococcus rhodochrous* fueron los hidrogeles de IPNs y SIN PAAM/PVA (90/10), (50/50) y (20/80).

Al ser utilizados como soportes, los hidrogeles están expuestos a ingredientes de soluciones reguladoras y medios de cultivo que pueden afectar el hinchamiento característico de ellos, causando un hinchamiento adicional indeseable o incluso llegar a la disolución del soporte, como fue el caso del hidrogel de Ca-alginato en presencia de iones de metales alcalinos o agentes quelantes^{113, 114}, o deshinchamiento del hidrogel (similar a una disminución del hinchamiento de la agarosa o carragenina en mezclas de agua-dimetilsulfóxido o agua-etanol¹¹⁵). Por esta razón, cada uno de los hidrogeles de IPN seleccionados como soportes, fue sometido a hinchamiento en heptano, medio mineral basal y combinación de los dos, con la idea de estudiar el efecto de cada uno de los medios de hinchamiento sobre la resistencia a la compresión y razón de hinchamiento de los hidrogeles.

Los medios de hinchamiento fueron seleccionados considerando las condiciones operacionales a la que está sometido un hidrogel al ser utilizado como soporte en la inmovilización de la bacteria en estudio.

El heptano se utilizó como medio de hinchamiento porque el dibenzotiofeno (compuesto utilizado en la evaluación de la actividad desulfuradora) es muy soluble en este compuesto. El medio mineral basal se utilizó porque es el medio de crecimiento. La combinación de heptano con el medio mineral basal en diferente proporción se realizó buscando disminuir el efecto del carácter hidrofóbico del heptano sobre el hinchamiento del hidrogel.

6.4.1 Efecto del contenido de heptano sobre la razón de hinchamiento

Los resultados obtenidos, muestran que el heptano no afectó de manera importante la razón de hinchamiento de las IPNs, en los diferentes porcentajes que se utilizaron, excepto cuando fue 100% heptano, donde sí se observó una importante disminución de la razón de hinchamiento, como se muestra en la Figura 34.

Durante el proceso de hinchamiento el hidrogel de IPNs libera PVA al medio de hinchamiento, el cual actúa como surfactante¹¹⁴ que permite la formación de una emulsión entre el heptano y el medio mineral basal, evitando de este modo el efecto del heptano sobre la razón de hinchamiento de los hidrogeles altamente hidrofílicos.

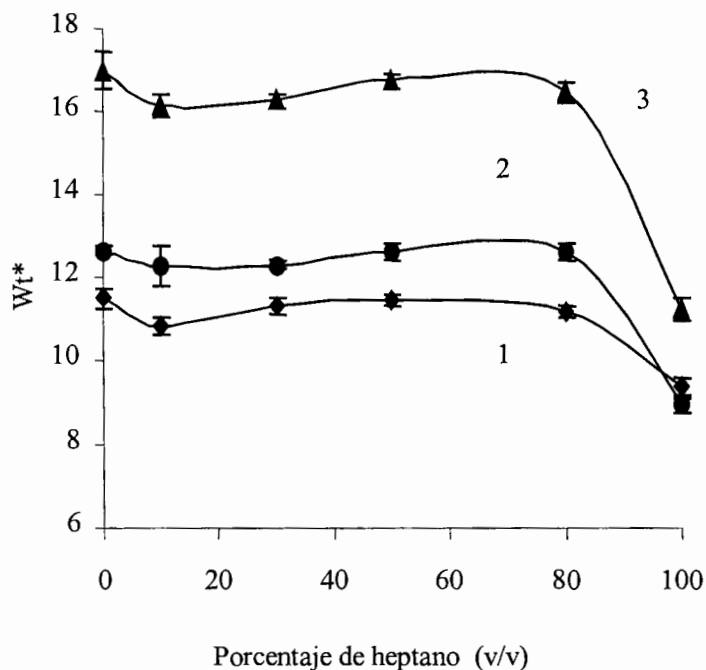


Figura 34. Efecto del porcentaje de heptano en el medio de hinchamiento sobre la razón de hinchamiento en el equilibrio de los hidrogeles de IPNs (90/10) (curva 3), IPNs (50/50) (curva 2) e IPNs (20/80) (curva 1).

El hidrogel de IPNs (90/10) libera el 37% de PVA al medio de hinchamiento (en agua), como se discutió anteriormente, lo cual da como resultado la formación de una emulsión mucho más estable que la formada para los hidrogeles de IPNs (50/50) y (20/80) y por lo tanto el efecto del heptano es menor.

Para los hidrogeles de SIN, el efecto del porcentaje de heptano en el medio de hinchamiento sobre la razón de hinchamiento fue poco importante excepto para un 100% de heptano como ocurrió en las IPNs, como se muestra en la Figura 35.

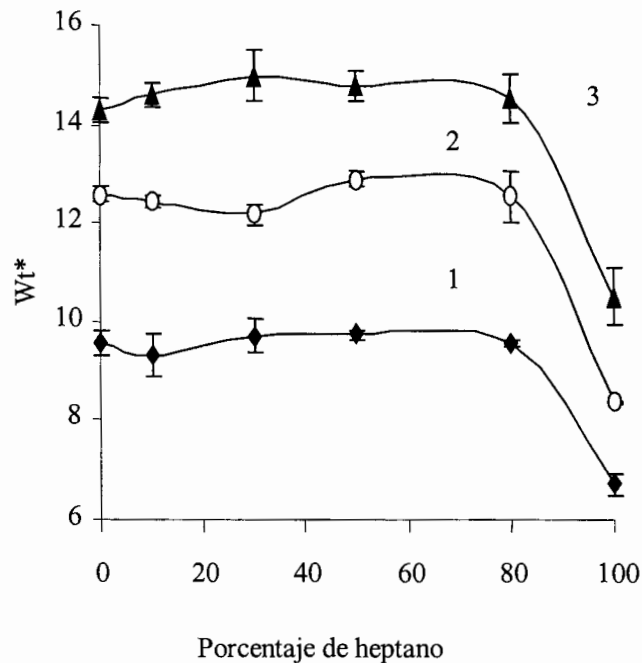
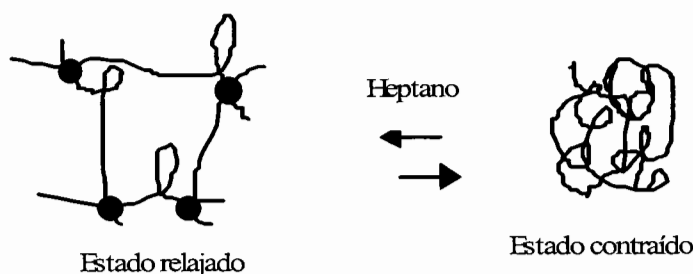


Figura 35. Efecto del porcentaje de heptano, en el medio de hinchamiento, sobre la razón de hinchamiento en el equilibrio de los hidrogeles de IPNs (90/10) (curva 3), IPNs (50/50) (curva 2) e IPNs (20/80) (curva 1).

El heptano, al ser un disolvente hidrofóbico provoca una disminución del volumen de los hidrogeles de las IPN, como resultado de su carácter hidrofílico proporcionado por los grupos OH del PVA y NH₂ de la PAAM. Este comportamiento se debe a que las cadenas poliméricas entrecruzadas se pliegan sobre si mismas, como se muestra en el siguiente esquema:



Sin embargo, al estar interpenetradas las redes de PVA y PAAM existe una restricción por parte del entrecruzamiento, lo cual disminuye el efecto de este disolvente sobre el volumen del hidrogel.

Las sales inorgánicas con propiedades liotrópicas pueden tener influencia sobre los hidrogeles. Diferentes iones de la serie de liótropa o de Hofmeister se clasifican de acuerdo con su “efecto salino” sobre las macromoléculas¹¹⁵, dentro de las cuales se incluyen los geles. Los iones pueden ser subdivididos en caotrópicos, anticaotrópicos y de débil efecto, en otras palabras destruyen estructura del agua (enlazamiento de hidrógeno), la refuerzan y de baja influencia, respectivamente.

De acuerdo con esta clasificación, el medio mineral basal utilizado como medio de hinchamiento para las IPN contiene iones caotrópicos como son; Cl^- , PO_4^- y SO_4^- y iones anticaotrópicos entre ellos: K^+ y Na^+ . Sin embargo, el efecto de cada una de las sales inorgánicas no fue determinada de manera independiente, por lo cual se considera que se tiene un efecto combinado sobre el hinchamiento de los hidrogeles de IPN de PAAM/PVA:

De este modo, el efecto combinado entre las sales caotrópicas y anticaotrópicas, así como la baja concentración de las éstas dentro del medio de hinchamiento dio como resultado el poco efecto que presentó. En el trabajo realizado por Lozinsky¹¹⁶ se encontró que para concentraciones de NaCl (0.1 y 0.2 M), no hay efecto sobre la razón de hinchamiento, y sólo se presenta cuando la concentración de la sal se incrementa por arriba de 1M. En este caso, el volumen de hidrogel disminuyó por más del 20%. De este modo, el deshinchamiento de las IPN en el medio mineral basal y combinación de heptano con el medio mineral basal, se relaciona principalmente con interacciones por puentes de hidrógeno en lugar de atribuirse a

efectos causados por la presencia de sales dentro del medio de hinchamiento ya que todas las sales presentes dentro del medio se encuentran en una concentración menor al 0.04M.

Los resultados de razón de hinchamiento en diferentes medios, tanto para IPNs como de SIN permitieron establecer que el medio de hinchamiento más adecuado fue el que contiene volúmenes iguales de heptano y medio mineral basal. El hidrogel de IPN (90/10), tanto en IPNs como en SIN, presentó un ligero aumento en su razón de hinchamiento (respecto al agua) del orden de 10.5 y 5.37 % respectivamente, lo cual sugiere que estos hidrogeles son de los más viables para el proceso de inmovilización, debido a que cuando un hidrogel tiene un mayor contenido de agua se favorece la viabilidad de los microorganismos inmovilizados¹¹⁷⁻¹¹⁹.

El porcentaje de heptano pueden afectar las propiedades mecánicas tanto de IPNs como de SIN, razón por la cual a continuación se presentan los resultados de la resistencia a la compresión para los hidrogeles después del proceso de hinchamiento.

6.4.2 Efecto del contenido de heptano sobre la resistencia a la compresión.

Después del proceso de hinchamiento, se evaluó el efecto del porcentaje de heptano sobre la resistencia a la compresión de los hidrogeles de IPNs, valores que se muestran en la Tabla 11. Conforme a ésta tabla se observa que la IPNs (20/80) es la que presentó el mayor efecto del porcentaje de heptano sobre su resistencia a la compresión. Esto se debe principalmente al deshinchamiento del hidrogel, en el medio de hinchamiento con 10% (v/v) de heptano, lo cual conduce a un incremento de las cadenas elásticamente activas. Este mismo comportamiento se presentó en el trabajo realizado por Philoppova y colaboradores¹²⁰.

En lo que respecta a la IPNs (50/50) y (90/10) se observa que el porcentaje de heptano dentro del medio de hinchamiento no afecta de manera importante su resistencia a la compresión, excepto cuando es un 100% de heptano. Este comportamiento está en relación directa con el hecho de que en el mismo intervalo de contenido de heptano no se presentó un efecto sobre su razón de hinchamiento, por lo tanto su resistencia a la compresión prácticamente no se modificó, como se observa en la Tabla 11.

Tabla 11. Efecto del porcentaje de heptano en el medio de hinchamiento sobre la resistencia a la compresión de IPNs, evaluada después del proceso de hinchamiento.

Porcentaje de heptano (v/v)	Resistencia a la compresión (kPa) de IPNs - PAAM/PVA		
	(20/80)	(50/50)	(90/10)
0	7.04 ± 0.2	5.15 ± 0.3	5.4 ± 0.25
10	8.3 ± 0.2	4.64 ± 0.3	4.13 ± 0.7
30	5 ± 0.7	4.97 ± 0.5	5.16 ± 0.07
50	7.8 ± 0.1	4.5 ± 0.27	5.7 ± 0.18
80	8.1 ± 0.5	4.4 ± 0.3	5.4 ± 0.8
100	5.7 ± 0.8	4.9 ± 0.2	2.89 ± 0.4

La IPNs (90/10) experimenta un mayor efecto por parte del heptano al disminuir su resistencia a la compresión en un 72% (respecto al hidrogel hinchado en 100% de mmb). Se consideró que el heptano disminuye la resistencia a la compresión del hidrogel como resultado de la contracción de las cadenas, induciendo con ello al hidrogel a ser menos rígido. La contracción del hidrogel producida por el heptano puede provocar la ruptura de algunos de los puentes de hidrógeno disminuyendo con ello la rigidez del hidrogel.

En lo que se refiere a los hidrogeles de SIN, se consideró que su resistencia a la compresión no se ve afectada por el porcentaje de heptano dentro del medio de hinchamiento (Tabla 12) como resultado de una mayor interpenetración entre las redes de PAAM y PVA como se presentó en la sección de morfología.

A diferencia de los hidrogeles de IPNs, los hidrogeles de SIN presentaron un menor efecto por parte del heptano sobre su resistencia a la compresión como se pudo observar al comparar la disminución de la resistencia a la compresión del hidrogel (90/10) la cual fue de 15.47 y 72% para cuando se preparó mediante SIN e IPNs respectivamente. Esta diferencia se atribuye principalmente a que el proceso de SIN proporciona una mayor interpenetración entre las

redes de PAAM y PVA lo cual disminuye el efecto del heptano a pesar de ser la misma composición molar.

Tabla 12. Efecto del porcentaje de heptano en el medio de hinchamiento sobre la resistencia a la compresión de SIN, evaluada después del proceso de hinchamiento.

Porcentaje de heptano	Resistencia a la compresión (kPa) de SIN - PAAM/PVA			
	(v/v)	(20/80)	(50/50)	(90/10)
0		4.13 ± 0.28	5.55 ± 0.16	4.18 ± 0.39
10		8.26 ± 0.05	4.57 ± 0.18	3.89 ± 0.35
30		4.08 ± 0.39	2.6 ± 0.2	3.85 ± 0.26
50		3.54 ± 0.13	4.04 ± 0.13	3.97 ± 0.18
80		3.74 ± 0.34	4.51 ± 0.3	3.75 ± 0.18
100		2.93 ± 0.1	4.71 ± 0.2	3.66 ± 0.35

Esta prueba permitió establecer que a pesar de que el PVA liberado al medio durante el proceso de hinchamiento permitió la formación de una emulsión durante la agitación, sin embargo en reposo se presentaba una separación de fases. Por esta razón se recurrió a la utilización de un surfactante que permitió obtener una emulsión estable. Un surfactante no iónico fue el que se utilizó, debido a que éste tipo de surfactante presenta un menor efecto dañino hacia las células. El nonil-fenil-éter polióxido de etileno se utilizó como surfactante no iónico.

6.5 Surfactante dentro del medio de hinchamiento.

Dentro del estudio de sistemas ternarios, compuestos de agua, hidrocarburo y surfactante hay muchas variables, tales como tipo de hidrocarburo, tipo de surfactante, composición de los componentes y temperatura. Sin embargo, en éste trabajo sólo nos interesó determinar el porcentaje de surfactante a utilizar con el medio de hinchamiento compuesto por volúmenes iguales de medio mineral basal y heptano. Conforme a referencia se establece que porcentaje de surfactante puede ser fijada en un intervalo entre 1 y 10% (w/v)¹²¹.

Considerando lo dicho anteriormente, la cantidad del surfactante no iónico nonil-fenil-éter polióxido de etileno se fijó en un 2% en p/v, con la finalidad de verificar si el medio de hinchamiento compuesto por la relación 50/50 es la más adecuada (como se determinó en la sección anterior) o bien encontrar la relación % v/v del medio mineral basal y heptano en la cual no se afecte la razón de hinchamiento del hidrogel. Para esta prueba se utilizó el cerogel de IPNs (50/50). La razón de hinchamiento fue la variable de respuesta que permitió seleccionar la composición del medio de hinchamiento.

En la Figura 36 se muestran los resultados obtenidos en esta prueba. Se encontró que la razón de hinchamiento para IPNs (50/50) presentó una disminución de 5, 3, 0.85, 3.8 y 12.5% al estar en los medios de hinchamiento con porcentaje de heptano de 20, 40, 50, 60 y 80% v/v respectivamente.

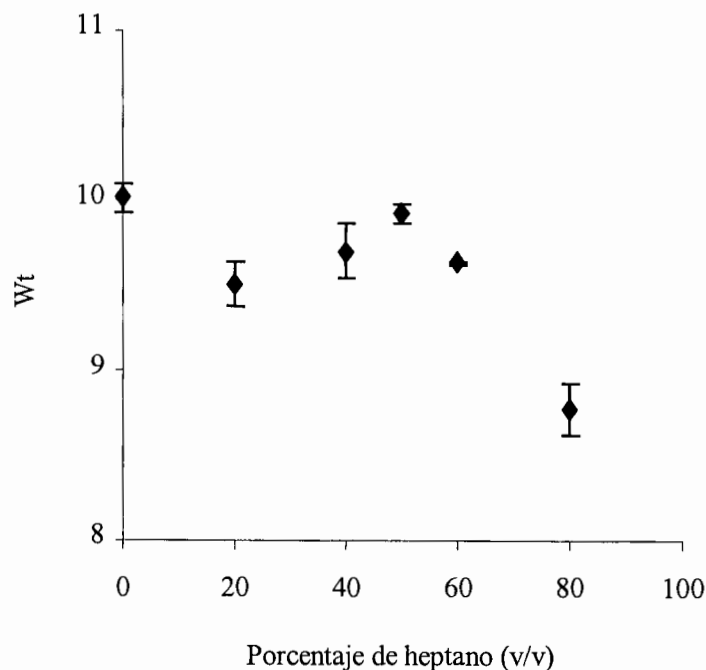


Figura 36. Efecto del porcentaje de heptano en el medio de hinchamiento a 30°C, 180 rpm y 2% de surfactante nonil-fenil-éter polióxido de etileno sobre la razón de hinchamiento del cerogel de IPNs (50/50).

La emulsión obtenida en una relación de heptano con 20, 40, 60 y 80% (v/v) fue inestable, manteniéndose únicamente durante la agitación (150 rpm). Sin embargo, cuando la relación del medio de hinchamiento fue del 50% de medio mineral basal y 50% de heptano se estableció un equilibrio entre las fases dando lugar a la formación de una emulsión estable (no se determinó tamaño de gota). Este equilibrio permitió la difusión de la emulsión hacia el hidrogel, no afectando de este modo la razón de hinchamiento obtenida por el hidrogel en la emulsión (con respecto al medio mineral basal), como se observa en la Figura 36.

Como se mencionó al inicio de esta sección, la concentración del surfactante puede ser fijada en un intervalo de 1 y 10%. Lo cual dio la pauta para tratar de optimizar la concentración del surfactante bajo las condiciones de este estudio.

6.5.1 Optimización de la concentración del surfactante.

En esta prueba se utilizó una concentración de surfactante de 1, 2, 3, 5, 7 % w/v. El medio de hinchamiento fue de 50% de medio mineral basal y 50% de heptano a 30°C y agitación de 180 rpm. Después de 40 h se determinó la razón de hinchamiento. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 37.

A pesar de que el aumento de la concentración del surfactante favoreció la solubilización del dibenzotiofeno contenido en el heptano, la razón de hinchamiento del hidrogel disminuyó. Se considera que éste efecto está relacionado con el aumento de la viscosidad del medio como resultado del incremento en la concentración del surfactante.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos hasta esta etapa se realizó la primera inmovilización *Rhodoccus rhodochrous* en los hidrogeles de IPNs y SIN. Las condiciones bajo las cuales se determinó el efecto de la carga de biomasa sobre los hidrogeles fue el medio de hinchamiento compuesto por 50% v/v medio mineral basal y 50% v/v heptano, y 2% (w/v) de surfactante. Con esta prueba se buscó determinar el efecto de la carga de biomasa sobre la razón de hinchamiento, así como la resistencia a la compresión de los hidrogeles sin importar la actividad de la bacteria inmovilizada. Los resultados obtenidos de esta prueba se discuten a continuación.

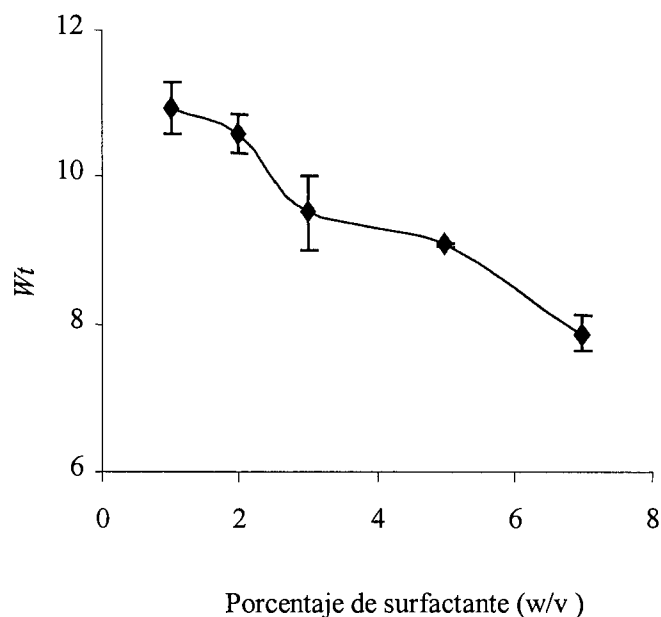


Figura 37. Efecto del porcentaje de surfactante sobre la razón de hinchamiento del cerogel IPNs (50/50). Temperatura de 30°C y 180rpm.

6.6 Inmovilización.

Dentro de los problemas asociados con la inmovilización en los hidrogeles de IPN se encuentra la influencia de la biomasa atrapada sobre las características físicas y mecánicas del compuesto de hidrogel obtenido. Se denomina a un compuesto como la combinación entre células/sopORTE hidrogel.

6.6.1 Efecto de la carga de biomasa sobre la razón de hinchamiento.

El efecto de la carga de biomasa sobre la razón de hinchamiento de las IPNs se muestra en la Figura 38, en la cual se observa que dos hidrogeles de IPNs muestran un comportamiento muy similar, IPNs (20/80) y (50/50) a medida que se va incrementando la carga de biomasa su razón de hinchamiento ligeramente disminuye, mientras que la IPNs (90/10) hasta una concentración de 4 g de células peso húmedo/dL de solución a polimerizar presenta un ligero incremento en su razón de hinchamiento. Las tres IPN coinciden en una disminución de la

razón de hinchamiento en 6 g de células húmedas/dL de solución a polimerizar. Al parecer a esta carga de biomasa se presenta una saturación en el hidrogel lo cual provoca la disminución de la razón de hinchamiento.

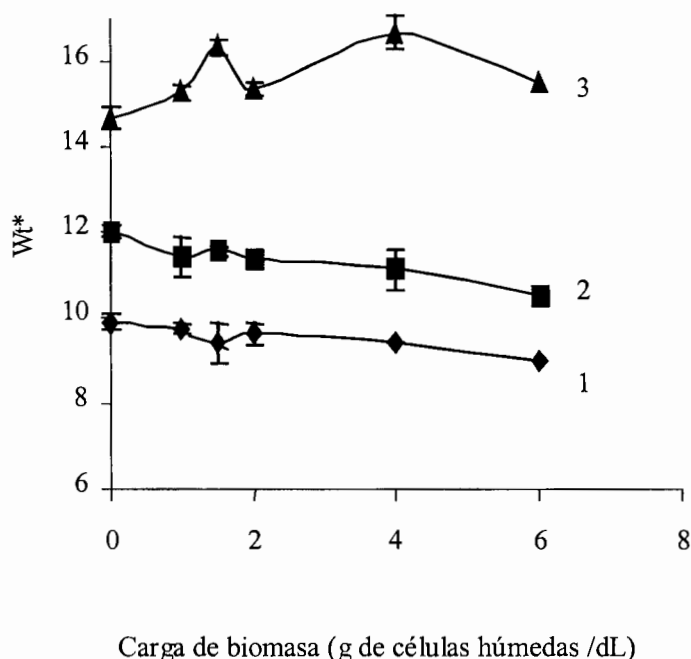


Figura 38. Influencia de la carga de *Rhodococcus rodochrous* inmovilizadas por atrapamiento en los hidrogel de IPNs (20/80) (curva 1), (50/50) (curva 2) y (90/10) (curva 3).

Otro de los problemas asociados con la inmovilización dentro de los hidrogel de IPN fue la influencia de la biomasa atrapada sobre las propiedades mecánicas, evaluadas a través de la resistencia a la compresión del compuesto. A continuación se presentan estos resultados.

6.6.2. Efecto de la carga de biomasa sobre la resistencia a la compresión.

Es bien conocido^{123, 124} que las propiedades de los composites poliméricos rellenos con partículas discretas dependen de muchos factores, incluyendo la fuerza mecánica del relleno; esto es, concentración y tamaño de grano, así como la fuerza de las interacciones adhesivas entre el aditivo y el enlazante. En general, el efecto de un relleno sobre las propiedades físicas

de un composito son usualmente divididas en; activas (reforzamiento) e inactivas (poco eficiente) y de debilitamiento¹²⁵. Estas mismas consideraciones son válidas para geles rellenos¹²⁵, así como para compositos de criogeles de PVA y redes poliméricas interpenetradas de PAAM y PVA.

En algunas ocasiones las células dentro del soporte reducen significativamente la fuerza del biocatalizador inmovilizado, provocando una disminución de la fuerza mecánica del soporte gel como resultado de la presencia de la biomasa, esto es, las células atrapadas ejercen una acción de debilitamiento sobre la rigidez del soporte resultante, como ocurrió para la matriz de alginato-Ca.¹²⁶

Los datos mostrados en la Figura 39 indican que la diferente cantidad de *Rhodococcus rodochrous* inmovilizada por atrapamiento en las IPNs, puede afectar la resistencia a la compresión del composito de manera activa para la IPNs (90/10) (curva 3), inactiva para la IPNs (50/50) (curva 2) y de debilitamiento para la IPNs (20/80) (curva1). En las tres curvas se observa este comportamiento para cargas de biomasa mayores a 4 g de células húmedas/dL solución a polimerizar.

En el trabajo realizado por Lozinsky y colaboradores¹²⁶ se reportó que las células de *Pseudomonas sp.* inmovilizadas por atrapamiento en criogeles de PVA, afectan al soporte de una manera compleja. De este modo, para un bajo contenido de biomasa tales células no afectan las propiedades mecánicas del soporte. A concentraciones moderadas las células se comportan de manera similar a un relleno mientras que a concentraciones altas de carga de biomasa (mayores a 6 g células secas/100 g de soporte) se observa un efecto de debilitamiento sobre los criogeles del PVA.

A pesar de que el mecanismo exacto de la influencia por parte de la bacteria *Rhodococcus rodochrous* no queda establecido claramente, se cree que al ser ésta bacteria de un origen muy similar a la *Pseudomonas sp.*, su mecanismo de acción será muy similar al establecido por Lozinsky (como se emncionó anteriormente) ya que este comportamiento lo presenta la IPNs (50/50).

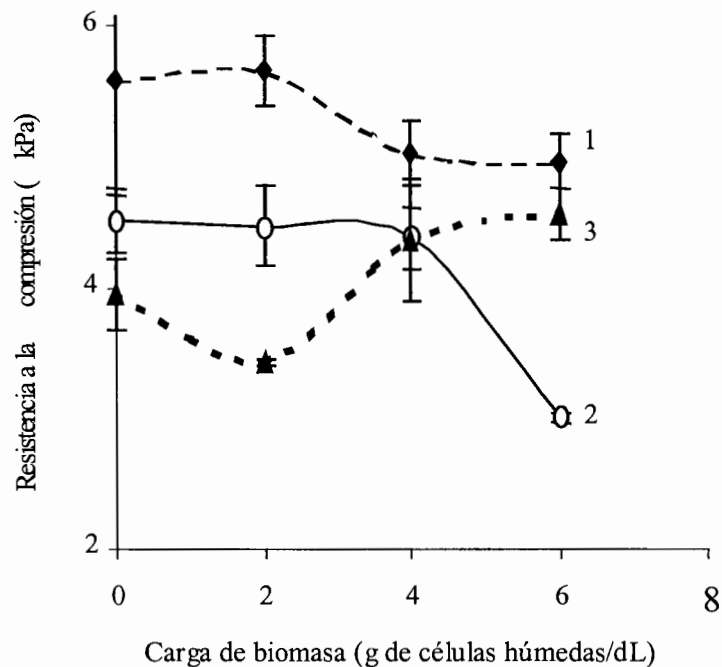


Figura 39. Efecto de la carga de biomasa atrapada en los hidrogeles de IPNs (20/80) (curva 1), (50/50) (curva 2) y (90/10) (curva 3) sobre la resistencia a la compresión. Después del hinchamiento en S50 y 2% de surfactante.

Aunado a lo dicho anteriormente, se propone que el efecto de la carga de biomasa se relaciona también con la composición molar (PAAM/PVA) del soporte al presentar diferente comportamiento cada una de las IPNs. La IPNs (90/10) favorece el reforzamiento del hidrogel con el incremento de la carga de biomasa, al tener un alto contenido de PAAM

El incremento en la resistencia a compresión de la IPNs (90/10) a partir de 2 g de células (húmedas) se atribuye a la interacción¹²⁶ y distribución de las células en el soporte. En este contexto, la información acerca de las interacciones existentes entre el soporte y las células fue obtenida mediante el análisis de los hidrogeles por microscopía electrónica con barrido donde se observó la estructura y variación de la morfología del soporte hidrogel inducida por las células inmovilizadas.

6.6.3 Análisis por microscopía electrónica de barrido de las células inmovilizadas.

En la Figura 40 se observa una estructura porosa de la IPNs (20/80), la cual presenta poros de forma muy irregular con huecos aislados mayores a 100 μm . Las bacterias se encuentran dentro de la estructura fibrilar del hidrogel (en la figura se marca la zona en la cual se encuentran las bacterias). Éstas al parecer no sufrieron ruptura durante el proceso de criogelación, ya que las células se observan intactas. Las bacterias principalmente se encuentran sobre la pared de los poros del hidrogel.

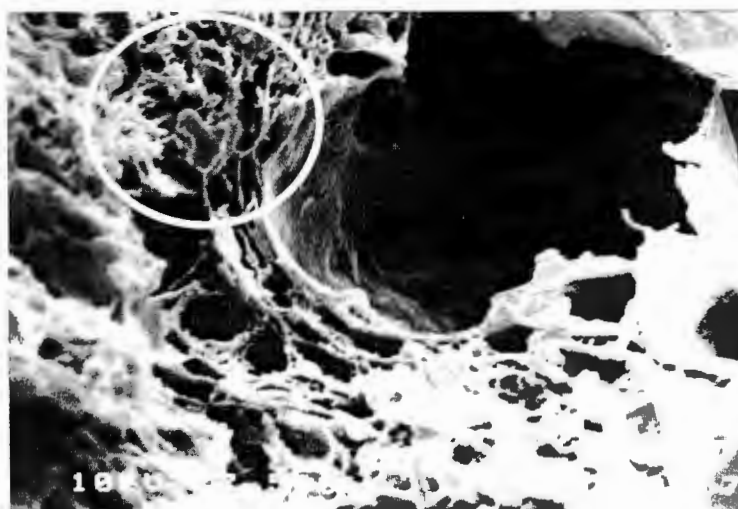


Figura 40. Micrografía de SEM del compuesto de IPNs (20/80) con células de *Rhodococcus rhodochrous* inmovilizadas por atrapamiento. Carga de biomasa de 6 g de células húmedas/dL.

En lo que se refiere a la morfología presentada por la IPNs (50/50), ésta presentó también la aparición poros con paredes muy delgadas que componen la red, en donde se observa la presencia de huecos del orden de 100 μm , de los cuales sólo se observa el contorno ya que estos se encuentran cubiertos por poros de menor tamaño como se observa en la Figura 41.

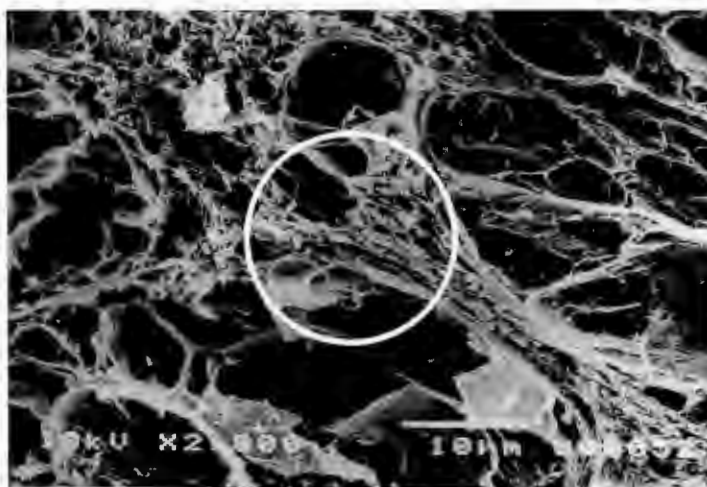


Figura 41. Micrografía de SEM, para el compuesto de IPNs (50/50) a 2000X con células de *Rhodococcus rhodochrous* inmovilizadas por atrapamiento. Carga de biomasa de 6 g de células húmedas/dL.

La ampliación de la zona marcada en la Figura 41 permite visualizar de manera clara como se encuentran las células de *Rhodococcus rodochrous* dentro de los poros.

Las bacterias inmovilizadas en la IPNs (50/50) al parecer tampoco sufrieron daño durante el proceso de inmovilización, como se puede observar en la Figura 45. La distribución de la *Rhodococcus rhodochrous* en la IPNs (50/50) fue más homogénea que en la IPNs (29/80).

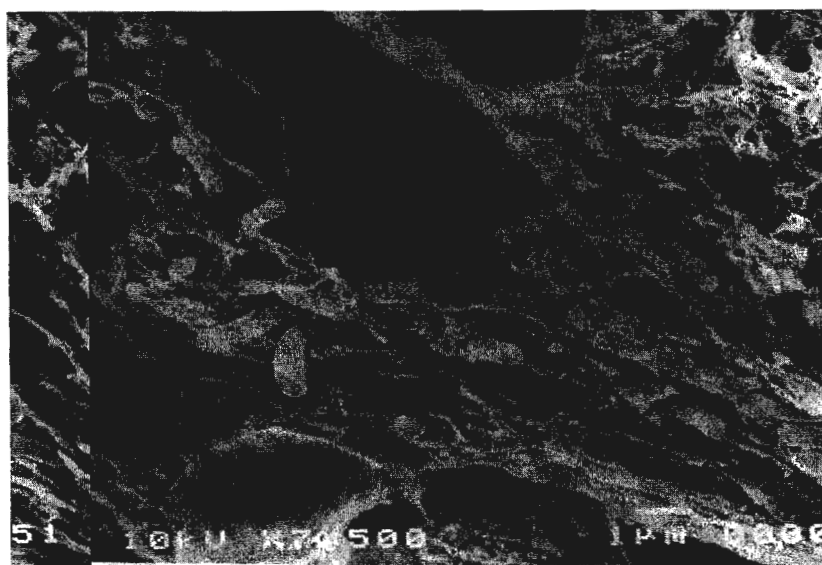


Figura 42. Micrografía de SEM a 7500X, para el compuesto de IPNs (50/50) a con células de *Rhodococcus rhodochrous* inmovilizadas por atrapamiento. Carga de biomasa de 6 g de células húmedas/dL.

En la IPNs (90/10) mantiene su estructura porosa parecida a una esponja. Las células se localizaron principalmente dentro de los poros, como puede observarse en la Figura 43, y se observa una mejor distribución de las bacterias dentro del hidrogel que en los otros hidrogeles de IPNs ya presentados.

De los tres hidrogeles de IPNs la IPNs (90/10) presentó la mejor distribución de las bacterias dentro del hidrogel como resultado de un 90% mol de PAAM la cual favorece una distribución uniforme de los microorganismos de acuerdo a lo publicado por Afigenova y colaboradores.^{127.}

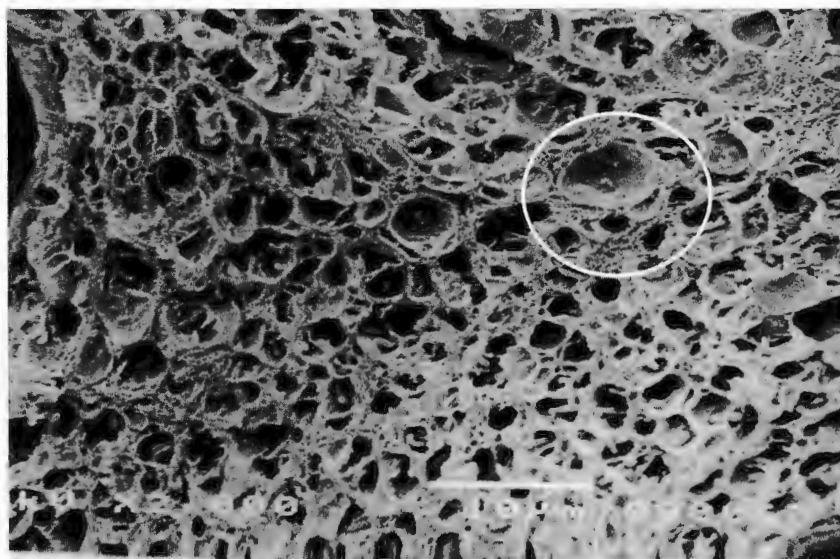


Figura 43. Micrografía de SEM a 7500X, para el compuesto de IPNs (90/10) a con células de *Rhodococcus rhodochrous* inmovilizadas por atrapamiento. Carga de biomasa de 6 g de células húmedas/dL.

Con la finalidad de conocer la forma en la cual se encuentran unidas las bacterias al soporte, se realizó una ampliación de la zona marcada en la Figura 43, la cual corresponde a un aumento de la pared de uno de los poros dentro de la IPNs (90/10), como se muestra en la Figura 44. En ésta micrografía se confirma que las bacterias se encuentran principalmente en la pared de los poros, a la cual se encuentran fijadas mediante delgadas fibras que evitan su salida del soporte. Estas observaciones sugieren que el PVA funciona como un fijador de las células a los poros del hidrogel. Resultados similares fueron reportados por Ruiz-Treviño y colaboradores⁷⁴ en el sistema de criogeles de PVA.

Los resultados obtenidos indican que la función del PVA es principalmente de adhesión de la bacteria, mientras que la PAAM aparentemente es la matriz de atrapamiento.

Con base en los resultados obtenidos en esta sección se considera que la IPNs (90/10) puede ser viable su utilización como soporte en la inmovilización de la bacteria *Rhodococcus*

rodochrous al presentar un alto contenido de agua, una adecuada resistencia a la compresión y buena distribución de las células dentro del soporte.



Figura 44. Micrografía de la pared de un poro del hidrogel soporte de IPNs(90/10).

Aparte de la distribución de las células en hidrogel es importante considerar el efecto que puede tener el proceso de preparación sobre las células inmovilizadas, por esta razón se comparó la morfología entre las células libres y las células inmovilizadas como se muestra en la Figura 45, donde se puede observar que aparentemente la morfología de las células inmovilizadas no se modificó durante el proceso de preparación del soporte.

Por otro lado, la viabilidad de las células inmovilizadas se comprobó por la resiembra de células obtenidas del hidrogel, raspando con una aza en el interior del hidrogel (el cual fue manejado bajo condiciones estériles) y posteriormente se inoculó sobre una caja petri con agar y DBT. Después de 48 horas se observó un prominente crecimiento en la caja petri, como se muestra en la Figura 46.

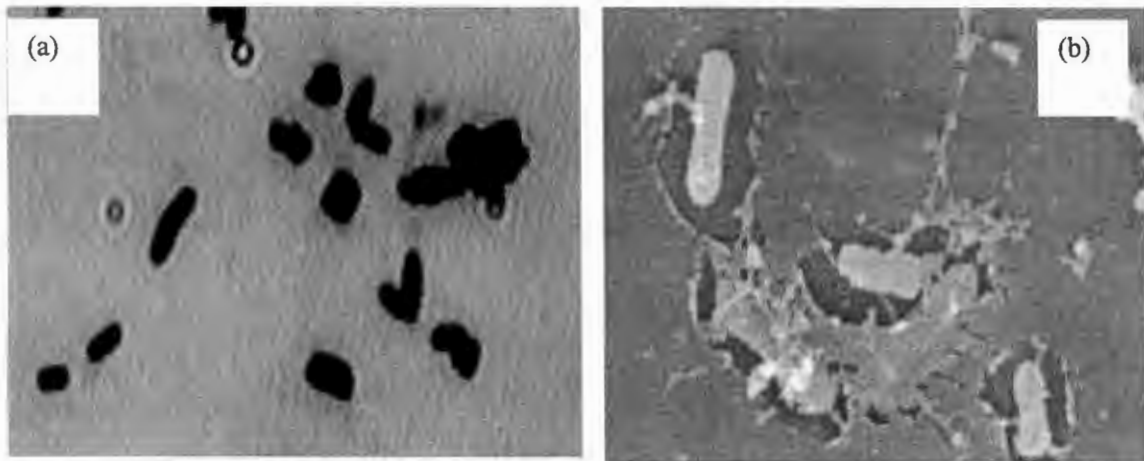


Figura 45. Células de *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. (a) células libres vista a 1500X en microscopio óptico. (b) células inmovilizadas en IPNs (90/10) a 7500X.



Figura 46. Crecimiento celular de *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 despues de 48 h.

Las células inmobilizadas dentro de los hidrogeles de SIN se encuentran principalmente sobre la pared de los poros, así mismo no se muestra una distribución uniforme de las células dentro de los poros.

En la zona marcada de la Figura 47 se observa que las células presentan una morfología esférica, la cual es diferente a la que se había observado como célula libre, la cual es de forma alargada, lo que sugiere que durante el proceso de preparación del hidrogel SIN PAAM/PVA (20/80) la *Rhodococcus rhodochrous* sufre alteraciones en su morfología.

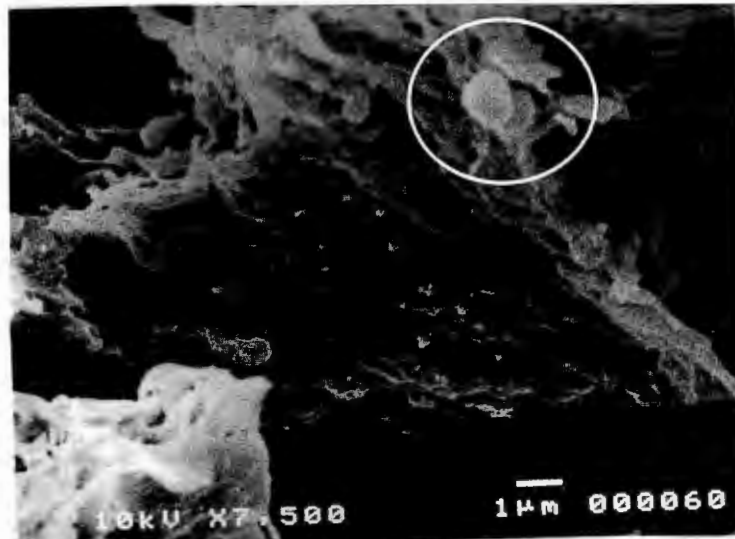


Figura 47. Micrografía de SIN (20/80) con células inmobilizadas de *Rhodococcus rhodochrous*, con una carga de biomasa de 6 g de células húmedas/ dL.

En lo que se refiere a la SIN (50/50), las células se encuentran dentro de los poros del hidrogel y al igual que en la SIN (20/80) la morfología de la *Rhodococcus rhodochrous* es un poco diferente e incluso se observan células mucho más grandes, además de que no se observa una gran cantidad de células en el hidrogel como se muestra en la Figura 48. Sin embargo, muestra una estructura porosa, la cual favorece la difusión de los nutrientes hacia las células inmobilizadas en las capas más internas del hidrogel



Figura 48. Micrografía de SIN (50/50) con células inmovilizadas de *Rhodococcus rodochrous* con una carga de biomasa de 6 g de células húmedas/ dL.

Por último el hidrogel de SIN (90/10) presenta una morfología diferente a la presentada sin células, ya que no se observa la ramificación dentro del poro, sin embargo mantiene su estructura porosa aún cuando se observa una disminución del tamaño de poro. Las células se encuentran dentro del poro y en su pared, como se muestra en la Figura 49. A pesar de que se inmovilizó la misma cantidad de células en todos los hidrogeles (6 g de células húmedas/dL de solución a polimerizar), en la SIN (90/10) no se observa una gran cantidad de células como en la IPNs (90/10). Esto puede ser debido a una distribución no uniforme de las células dentro del hidrogel de la SIN(90/10) o bien a que se haya presentado lisis celular como resultado de las condiciones de inmovilización.

Como se indicó durante la inmovilización de *Rhodococcus rodochrous* en los hidrogeles de SIN se presentaron cambios de morfología en las células debido al medio tóxico de reacción y condiciones de polimerización.

El efecto tóxico del medio hacia las células se presenta durante la criogelación de la PAAM, proceso que implica la preparación de las redes interpenetradas preparadas mediante el método

simultáneo (SIN). Se ha reportado que las células inmovilizadas mediante ésta técnica de preparación de los hidrogeles, produce cambios ultraestructurales más profundos en las células inmovilizadas tales como plasmolisis y la división celular queda bloqueada completamente, y aún cuando una pequeña fracción de la población retiene su capacidad para crecer, las células resultantes presentan una formación anómala de formas bacterianas alargadas. Esto como resultado de la reacción que presentan las células a la acrilamida compuestos que mutagénico. Este efecto, se observó únicamente en las SIN debido a que las células están durante más tiempo en contacto con la acrilamida, ya que el tiempo de polimerización en éste caso es mucho más largo que en las IPNs, donde no se observan alteraciones en la morfología de las células⁴.

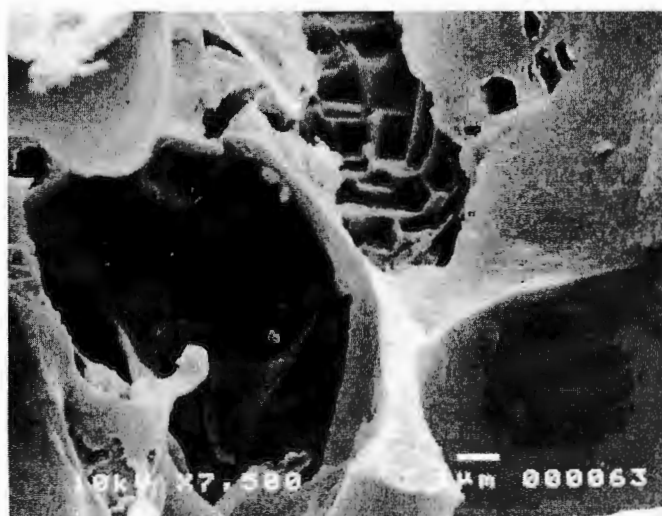


Figura 49 Micrografía de SIN (90/10) con células inmovilizadas de *Rhodococcus rodochrous*, con una carga de biomasa de 6 g de células húmedas/ dL.

Considerando el efecto tóxico de la acrilamida, la preparación de un biocatalizador con SIN de PAAM/PVA resulta poco viable. Sin embargo, para el caso de las IPNs el efecto tóxico de la acrilamida es menor ya que las células están por un corto tiempo en contacto con ella, debido a que en éste caso el tiempo de polimerización de la acrilamida es de alrededor de 10 min. Por esta razón, la IPNs (90/10) fue el hidrogel seleccionado para ser utilizado en la preparación de un biocatalizador aplicado a la biodesulfuración.

6.7 Biodesulfuración.

Como recordaremos, el proceso de biodesulfuración es un método alternativo mediante el cual, se lleva a cabo la eliminación de azufre de compuestos organosulfurados a través de microorganismos que presentan la habilidad de metabolizar moléculas organosulfuradas que son comúnmente recalcitrantes para el sistema de hidrosulfuración.

La realización de esta prueba se llevó a cabo para evaluar el comportamiento del hidrogel de IPNs (90/10) como soporte de *Rhodococcus rhodochrous*, la cual tiene la capacidad de metabolizar moléculas organosulfuradas.

En esta prueba se trabajó bajo condiciones estériles y fue evaluada la actividad desulfuradora de la bacteria. Sin embargo, previo a la inmovilización de la bacteria en el hidrogel se realizó un proceso de la manipulación de la bacteria, con la finalidad de encontrar las condiciones adecuadas en las cuales la bacteria exprese su mayor actividad desulfuradora.

6.7.1 Manipulación y activación de la bacteria *Rhodococcus rhodochrous*.

La manipulación de la bacteria es el proceso requerido para encontrar las condiciones de crecimiento de la bacteria, en las cuales exprese una mayor actividad desulfuradora como célula libre.

La actividad desulfuradora de la bacteria *Rhodococcus rhodochrous* en estado libre, se definió como el consumo de DBT/g de células húmedas/tiempo. El DBT fue identificado y cuantificado mediante cromatografía de gases (CG), a través de una curva de calibración.

La curva de calibración en CG fue generada a partir de cinco diferentes concentraciones de DBT (el mismo que se utilizó para evaluar la actividad desulfuradora), en un intervalo de concentración de 0.1 a 1.2 mg/mL como se muestra en la Figura 50, donde cada punto de la gráfica fue realizado por triplicado. En ésta figura se puede observar que existe un buen ajuste lineal de los datos. A partir de este gráfica y los datos de CG, para las diferentes muestras, se determinó el DBT residual en los medios de propagación de la bacteria.

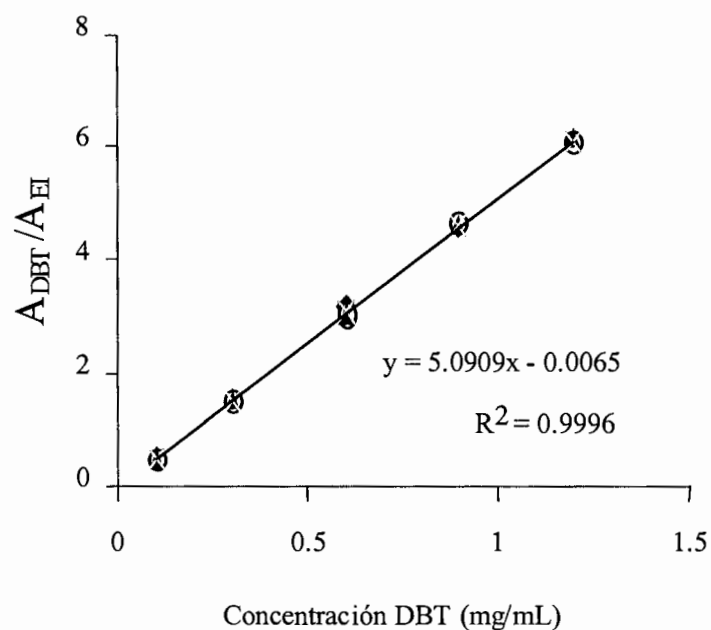


Figura 50. Curva de calibración para el DBT generada de los datos de cromatografía de gases.

El DBT consumido por la bacteria se determinó a partir de la diferencia entre el peso inicial del DBT y el DBT recuperado después del proceso de propagación de la bacteria. De éste modo, la diferencia corresponde al DBT consumido por la bacteria más la pérdida que se tiene durante el proceso de recuperación.

El porcentaje de recuperación del DBT, se define como la cantidad de DBT que se recupera realmente después del proceso de recuperación del medio de cultivo, en el medio de crecimiento de las células libres. Para la recuperación del DBT del medio de cultivo se utilizaron dos disolventes: heptano y hexano, el DBT es muy soluble en éstos dos disolventes. En la tabla 13 se indica el porcentaje de recuperación del DBT y del producto de biodesulfuración, 2-hidroxibifenilo (HBF), en cada disolvente.

Tabla 13. Porcentaje de recuperación de DBT y HBF en heptano y hexano.

Compuesto	Porcentaje de recuperación en	
	heptano	hexano
DBT	91.6	95
HBF	46.7	94.9

El heptano fue utilizado como disolvente para la extracción del DBT del medio de crecimiento de la bacteria, debido a que fue el disolvente que se utilizó en el análisis por cromatografía de gases. Sin embargo, el hexano presentó una mejor extracción tanto para el DBT como para el HBF. Una vez establecido el disolvente para la extracción del DBT y el porcentaje de recuperación se procedió a determinar la actividad de la bacteria durante el proceso de manipulación.

Al inicio de este proceso se contaba con 2 cultivos de la *Rhodococcus rhodochrous*, cada uno de ellos tenía diferente historial de propagación.

El cultivo 1 (C-1) provenía de la primera propagación de cepa original IGTS8. Este cultivo fue propagado en caldo nutritivo durante 24 h , recuperada la biomasa y puesta en refrigeración en una solución salina (NaCl 0.085% peso), posteriormente se inoculó en medio mineral basal y DBT al 1%w/v, para tener un pase en DBT y estar listo para determinar su actividad desulfuradora.

El cultivo 2 (C2) provenía de un cultivo que después de su propagación ya había tenido 8 pases en DBT y tenía un año en criopreservación. Este cultivo fue reactivado directamente en medio mineral basal con DBT al 1% w/v durante 96 h, las bacterias fueron recuperadas del medio de crecimiento, lavadas y puestas en ayuno en solución fisiológica durante 24 h quedando listo el inóculo para determinar su actividad.

La actividad desulfuradora de cada cultivo se determinó inoculando 50 µl de suspensión celular (0.00403 g de células, peso humedo) en matraces con deflectores, los cuales contenían 20 mL de medio mineral basal y DBT al 1% w/v. Los matraces fueron puestos dentro de una incubadora a 30°C y 180 rpm durante 120 h. Después de éste tiempo, el DBT residual fue extraído y cuantificado mediante cromatografía de gases.

La identificación de los picos en las muestras se realizó por comparación entre los compuestos utilizados como estándares de cada uno de los compuestos que deben aparecer en las muestras, como se indica en la Figura 51.

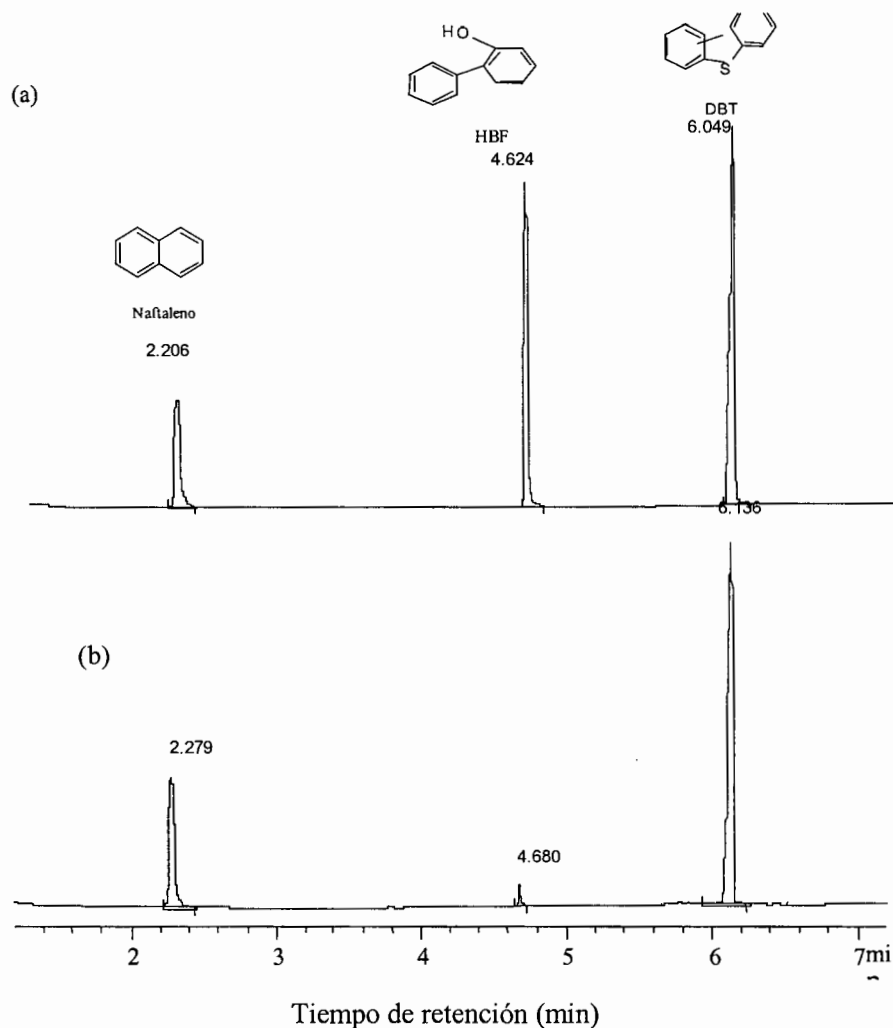


Figura 51. Comparación entre los compuestos utilizados como estándares (a) y las muestras problema (b). Los números sobre cada pico, corresponden al tiempo de retención de cada compuesto.

El naftaleno se utilizó como estándar interno, para evitar interferencias de la matriz.

Para el C-1 se obtuvo una actividad específica de 0.98 mg DBT consumido/g (células humedad)/h. El C-2 fue de 1 mg DBT consumido/g (células humedad)/h. De acuerdo con estos resultados se optó por realizar las siguientes pruebas con el C-2 debido a que se tiene la mayor actividad específica.

Dentro del proceso de manipulación de la bacteria una de las primeras pruebas fue determinar el efecto del tiempo de almacenamiento en refrigeración del cultivo suspendido en solución salina al 0.85% en peso de NaCl.

Después de 20 días fue evaluada nuevamente la actividad específica de la bacteria en el C-2, la cual fue de 0.29 mg DBT consumido/g células húmedas/h, equivaliendo a una disminución del 80%. De acuerdo con esto, es recomendable no dejar el cultivo por mucho tiempo en la solución fisiológica, resulta más adecuado criopreservarlo si es que se utilizara en tiempos mayores a un mes. La criopreservación es un método mediante el cual el cultivo mantiene su actividad por largos periodos de tiempo.

Es importante señalar que con cada pase en DBT el cultivo puede modificar su actividad específica, razón por la cual en cada prueba siempre se determinará su actividad en un medio de crecimiento sin modificarlo a lo largo de todo el estudio.

6.7.1.1 Efecto del sulfato de sodio sobre la actividad desulfuradora de la bacteria.

El valor de la actividad desulfuradora de la bacteria con el medio de cultivo especificado por el proveedor se estableció como referencia para evaluar el efecto de la adición de sulfato de sodio al medio de crecimiento, con la finalidad de inducir un incremento en la actividad desulfuradora de la bacteria. Sin embargo, esto no ocurrió así debido a que la concentración del sulfato de sodio se encuentra por arriba de lo establecido por Kilbane⁸³ y colaboradores quienes establecieron que para concentraciones menores a 0.2 mM se obtiene un incremento de la biodesulfuración, como resultado del incremento en el crecimiento celular.

Los resultados obtenidos de esta prueba indicaron que se obtiene un gran crecimiento celular pero inhibición de la desulfuración debido a que el valor de la concentración de sulfato de sodio se encuentra por arriba de lo establecido por Kilbane. La actividad específica obtenida con la adición de sulfato de sodio es de 0.38 mg DBT consumido/g células húmedas/h.

6.7.1.2 Efecto del acetato de sodio sobre la actividad desulfuradora de la bacteria.

En la revisión bibliográfica se encontró que la adición de acetato de sodio 20 mM al medio de cultivo incrementa la actividad desulfuradora de la *Rhodococcus rhodochrous*¹⁹. Esta prueba fue reproducida en nuestro sistema, y se encontró que efectivamente se incrementa en un 36% respecto de la referencia. Al parecer el acetato de sodio actúa como un cofactor para el cultivo de *Rhodococcus rhodochrous*. Este incremento en la actividad de la bacteria dio la pauta para tratar de optimizar las condiciones de biodesulfuración.

6.7.1.3 Efecto de la restricción de la fuente de carbono (glicerol) sobre la actividad desulfuradora de la bacteria.

Mediante la restricción de la fuente de carbono (glicerol) de 100 mM a 20 mM se trató de inducir un incremento en la actividad desulfuradora de la bacteria. De acuerdo con los resultados obtenidos se encontró que esta restricción disminuyó la actividad desulfuradora en un 38%.

6.7.1.4 Efecto del medio mineral basal sobre la actividad desulfuradora de la bacteria.

El medio de crecimiento de *Rhodococcus rhodochrous* especificado por el proveedor fue modificado por el utilizado por Olson y colaboradores²⁰, quién utilizó un medio mineral basal diferente (mmb2), modificándose la cantidad de las sales de sulfato dentro del medio. La actividad desulfuradora de la bacteria con el cambio en el mmb disminuyó en un 17%, por lo cual no resulta adecuado para la actividad de la bacteria modificar el medio de cultivo.

6.7.1.5 Efecto del heptano dentro del medio de cultivo sobre la actividad desulfuradora de la bacteria.

Cuando las células se encuentran libres interaccionan con el DBT a través de la adhesión a los cristales del DBT y se lleva a cabo el proceso de biodesulfuración³⁷. Sin embargo, al estar

inmovilizadas las células por atrapamiento resulta imposible que se lleve a cabo este proceso debido a que el DBT es insoluble en el medio de crecimiento. Por esta razón se utilizó el heptano, en el cual es soluble el DBT, y un surfactante (nonil fenilpolioxiéter) el cual permitió la formación de una emulsión estable. A pesar de que el DBT se encuentra soluble dentro del medio, no existe crecimiento celular y por lo tanto no hay biodesulfuración debido a la presencia del heptano, el cual resulta demasiado tóxico para las células.

6.7.1.6 Efecto del surfactante en el medio de cultivo sobre la actividad desulfuradora de la bacteria.

Tomando en cuenta los resultados anteriores se optó por eliminar el heptano del medio de cultivo y sólo de dejó el surfactante. Aún cuando se requiere de 24 h para la disolución del DBT dentro del medio de cultivo con el surfactante, el efecto no es tan drástico como el de la emulsión con el heptano. Bajo estas condiciones si hubo biodesulfuración, aún cuando la presencia del surfactante disminuyó la actividad específica de la bacteria en un 40% respecto de la referencia.

6.7.1.7 Biodesulfuración de células inmovilizadas por atrapamiento en la IPNs (90/10).

Finalmente, en esta sección se llevó a cabo la biodesulfuración con las células inmovilizadas en la IPNs (90/10). La biodesulfuración se llevó a cabo tomando en cuenta los resultados obtenidos durante el proceso de manipulación de la bacteria.

La actividad de un catalizador microbiano (biocatalizador) en la eliminación de compuestos de azufre, tales como benzotiofeno o dibenzotiofeno (en condiciones aeróbicas o anaeróbicas) se considera competitiva con los catalizadores de uso convencional en hidrosulfuración, si ésta se encuentra en un intervalo de 0.4 a 18 mg de dibenzotiofeno consumido/g (biocatalizador)/h²⁴. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo con el biocatalizador de IPNs (90/10) no presentó una eliminación competitiva de DBT, ya que ésta fue de 0.03 mg de DBT consumido/g (biocatalizador)/h, después de 120 h de fermentación.

Es importante señalar que las condiciones de inmovilización en el proceso de biodesulfuración no fueron optimizadas y sólo fueron pruebas preliminares.

Sin embargo, a pesar de los resultados en la biodesulfuración, esta prueba preliminar permitió comprobar que la difusión del soporte es adecuada para permitir la entrada de nutrientes a las células inmovilizadas y de éste modo llevar a cabo su reproducción. Estos resultados se comprobaron al analizar el hidrogel por SEM antes de ser puesto dentro del medio de cultivo con el DBT (disuelto por el surfactante), observándose las células dentro del soporte, como se indica en la zona marcada de la Figura 52.

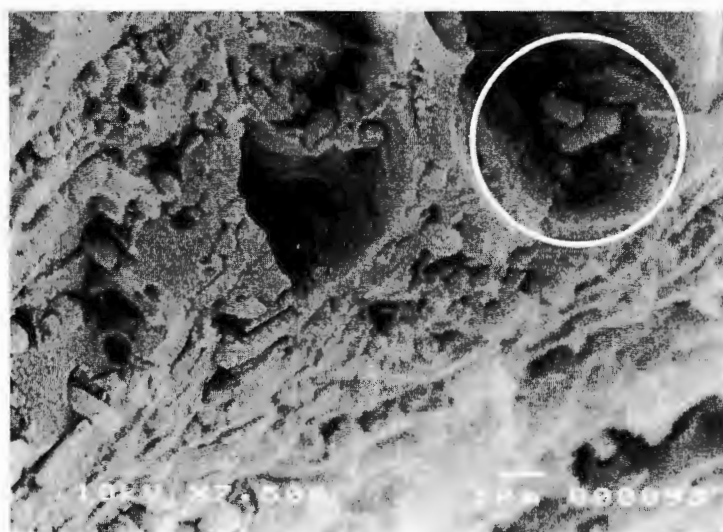


Figura 52 Micrografía de SEM para el biocatalizador IPNs (90/10) posterior al proceso de preparación. La carga de biomasa fue de 6 g células húmedas/dL.

Después de 120 h (tiempo de incubación del cultivo con el biocatalizador) se tomó una muestra de la parte central del hidrogel y se analizó por SEMd, encontrándose una gran cantidad de células dentro del soporte, como se observa en la Figura 53. Estos resultados sugieren que el biocatalizador de IPNs (90/10) posee una buena difusión, al haber llegado los nutrientes hasta las capas internas lo cual originó el crecimiento celular.



Figura 53. Micrografía de SEM, IPNs (90/10) después del proceso de biodesulfuración (tiempo de incubación = 120 h)

Las propiedades que presentó el hidrogel IPNs (90/10) como soporte, fueron ampliamente satisfactorias y abre la posibilidad de ser utilizado con otro tipo de microorganismos y sistemas, al cumplir de manera satisfactoria con los algunos de los requerimientos que necesita tener un hidrogel para ser considerado como soporte, considerando su principal aplicación en la inmovilización de microorganismos.

7. CONCLUSIONES.

La preparación de hidrogeles de IPN de PAAM/PVA mediante los métodos secuencial y simultáneo, constituye nuevas formas de preparación de ésta IPN. En donde el entrecruzamiento químico de la PAAM con el entrecruzamiento físico del PVA dio como resultado hidrogeles elásticos y con buenas propiedades mecánicas

Las IPN-PAAM/PVA se prepararon con diferente porcentaje molar de 20 a 90 de PAAM y se encontró que la razón de hinchamiento depende de éste parámetro. Los valores de *EWC* están por arriba del 90% lo cual indica que son hidrogeles biocompatibles y muy hidrofílicos. La razón de hinchamiento tanto en IPNs como en SIN disminuye conforme se incrementa el contenido de PVA, debido a una mayor compactación de la red y menos grupos hidrofílicos.

Se determinó que cuando el porcentaje molar de PAAM es del 90 las SIN incrementan hasta un 50% la fracción soluble del PVA, indicándo con ello que la PAAM en este porcentaje molar interfiere en la formación del criogel del PVA.

El mecanismo de difusión de agua en los hidrogeles de IPNs y SIN de PAAM/PVA corresponde a una difusión anómala Fickiana con valores de *n* diferentes de 0.5. El valor de *n* aumentó gradualmente conforme se incrementó el contenido de PVA en las IPNs hasta un 40% y la difusión disminuyó debido a un incremento en la compactación del hidrogel. Sin embargo, en un 50% mol de PVA el valor de *n* muestra un incremento importante y el coeficiente de difusión disminuye debido a una mayor interacción entre las redes de PAAM y PVA, esto fue corroborado por un desplazamiento en la temperatura de fusión del PVA en la IPNs-(50/50) con respecto a la del hidrogel de PVA

La difusión del agua en los hidrogeles de SIN presenta tres diferentes velocidades, al inicio es muy rápida y esta va disminuyendo seguramente por el incremento en la interpenetración de la red. Se observó que la morfología de las IPNs es porosa; como esponja. La distribución y el tamaño de los poros depende de la composición molar. La morfología de las IPN está en función del método de síntesis y de la composición molar. De los resultados de SEM se

observó que los microorganismos están enlazados al PVA y crecen dentro del poro de PAAM. Lo cual indica que la función del PVA es de adhesión, mientras que la PAAM es la matriz de atrapamiento. De acuerdo con los resultados obtenidos en las diferentes pruebas se encontró que la IPNs (90/10) fue la más viable para la inmovilización de la *Rhodococcus rhodochrous*. La difusión de los nutrientes en las capas internas del hidrogel de IPNs (90/10) se comprobó al presentar un crecimiento celular durante la incubación.

8. Trabajo futuro.

*Análisis detallado de estructuras para explicar la difusión anómala de las SIN.

*Probar el hidrogel de IPNs (90/10) con otro tipo de bacterias y evaluar de manera cuantitativa la viabilidad celular en el sistema inmovilizado.

•Preparación de la red interpenetrada de PAAM/PVA a partir del entrecruzamiento de la PAAM en presencia del PVA.

9. REFERENCIAS.

1. Peppas, N.A. Ed. *Hidrogeles en medicina y farmacia*; CRC Press: Boca Raton, FL. **1** (1986).
2. Stoy V., y Kliment, C. Hidrogeles. *Plásticos especializados para aplicaciones biomédicas y farmacéuticas*. Technomic Pub.: Basel. (1996).
3. Rault, J., Lucas, A., Neffati, R., y Pradas M. *Macromolecules*. **30**: 7846 (1997).
4. Aharoni, S. M. *Synthesis, Characterization and Theory of Polymeric Networks and Gels*. Plenum Press:New York, (1992).
5. Frisch, K. C., Klempler, D., Frisch, H., y Ghiradella H. *Polymer Science and Technology*. Edit: Sperling. **1**: 4 (1973).
6. Lipatov, Yu. S. *Interpenetrating Polymer Network*. Klempler, D., Sperling, L. H., Utracki. L.A., Eds.; Advances in Chemistry Series 239. American Chemical Society: Washinton, D.C. (1994).
7. Huelck, V., Thomas, D. A., Sperling, L. H. *Macromolecules*. **5**: 340 (1972).
8. Yang, J., Winnik, M. A., Ylitalo, D., De Voe, R. J. *Macromolecules*. **29**: 7047 (1996).
9. Kanapitsas, A., Pissis, P., Karabanova, L., Sergeeva, L., Apekis, L. *Polymers Gels and Networks*. **6**: 83 (1998).
10. Ramaraj, B. y Radhakishnan, G. *Polymer*. **35**: 2167 (1994).
11. Okahata, Y., Noguchi, H., y Seki, T. *Macromolecules*. **17**: 1880 (1984).
12. Okahata, Y., Noguchi, H., y Seki, T. *Macromolecules*. **20**: 15 (1987).
13. Gudeman, L. M. y Peppas, N. A. *Journal Membrane Science*. **107**: 239 (1995)
14. Yoshida, M., Yang, J. S., Kumakaru, M., Hagiwara, M. y Katakai, R. *European Polymer Journal*. **27**: 997 (1991).
15. Gutowska, A., Bae, Y. H., Jacobs, H., Feijen, J., y Kim, S. W. *Macromolecules*. **27**: 255 (1990).
16. Okano, T., Bae, Y. H., Jacobs, J., y Kim, S. W. *Controlled Release*. **11**: 4167 (1994).
17. Gudeman, L. F. y Peppas, N. A. *Journal of Applied Polymer Science*. **55**: 919 (1995).
18. Peppas, N. A. y Wright, S. L. *Macromolecules*. **29**: 8798 (1996).
19. Lee, Y. H., Kim, D., Lee, D. S. *Journal of Applied Polymer Science*. **64**: 2647 (1997).
20. Brodelius, P., y Vandamme, E. J. *Biotechnology. A Comprehensive Treatise in 8 Volumes*, **7a**. VCH Verlag, Weiheim:405 (1987).

21. Calagrande, O., Silva, A., y Fumi, M. D. *Biotechnology Progress*. **10**: 405 (1994).
22. Tucker, M. D., Barton, L. L., y Thomson B. M. *Journal of Industrial & Biotechnology*. **20**: 13 (1998).
23. Lusta K. A., Starostina N. G., Gorkina N. B., Fikhte B. A., Lozinsky V. I., Vainerman E. S., y Rogozhin S. V. *Priklandnaya Biochemistry and Microbiology*. **24**, 4: 504 August (1988).
24. Pizarro, C., Fernández-Torroba, M. A., Benito, C., González-Sáiz. J. M. *Biotechnology and Bioengineering*. **53**, 5 March 5:497 (1997).
25. Graham, F., Owen, R., Thomas, T. *Enzyme Microbiology Technology*. 12, September: 697 (1990).
26. Norton, S., y D'Amore, T. *Enzyme and Microbial Technology*. **16**: 365 (1994).
27. Ichijo, H.; Ichimura, K.; Uuedaira, H.; Suehiro, T.; Nawasawa, J., Yamauchi, A., y Aisaka, N. *Polymers Gels*. Edited by DeRossi, D. Plenum Press, New York (1991).
28. Hamada, M. O., Fujii, H., Mizobe, A., Matsuzawa, Y. *Journal of Applied Polymer Science*. **58**: 2235 (1998).
29. Aminabhavi, T. M., Khinnavar, R. S., Harogoppad, U. S., Aithal, Q. T. *Journal Macromolecules Chemical Physics*. **34**: 139 (1994).
30. Kaur H. y Chatterji P. R. *Macromolecule*. **23**: 4898 (1990).
31. Shibayama M., y Tanaka T. *Advances in Polymer Science*. **109**: 1 (1993).
32. Flory P. J. *Principles of Polymer of Chemical*. Cornell University Press, Nueva York (1975).
33. De. Geenes P. G., *Scaling Concepts in Polymer Physics*. Cornell University Press, Nueva York (1979).
34. De Rossi, Kajiwara, K., Osada, Y., y Yamauchi, A. *Polymers Gels*. Plenum. Press, Nueva York (1991).
35. Kramer, O. *Biological and Synthetic Polymer Networks*. Elseiver, Londres (1988).
36. Clark, A. H, Ross-Murphy. *Ach. Polymer Science*. **83**: 60(1987).
37. Ramaraj, B. y Radhakishnan, G. *Journal of Applied Polymer Science*. **51**: 979 (1994).
38. Peluso, G., Petilo, O., Anderson, J. M., Ambrosio, L., Nicolais, L., Melone, M. A., Eschbach, F. O. y Huang, S. J. *Journal Biomedical Materials Research*. **34**: 327 (1997).

39. Sperling, L. H. *Interpenetrating Polymer Network*: Klemperer, D.: Sperling L. H., Utracki. L. A. *Advances in Chemistry Series 239. American Chemical Society: Washinton, D.C. (1994).*
40. Kyritsis, A., Pissis, P., Gómez Ribelles, J. L. y Monleón Pradas, M. *Journal Polymer Science Polymer Physics*. Ed. 32: 1001 (1994).
41. Firestone, B. A., Siegel, R. A. *Journal of Applied Polymer Science*. **43**: 901 (1991).
42. Siegel, R. A., Firestone, B. A. *Macromolecules*. **21**:3254 (1988).
43. Synitsyn, A. P., Rainina E., Lozinsky, V. I y Spasov S. D. *Immobilized Cells of Microorganisms 2nd* . Ed., Moscow State University Public. Moscow. 113 (1994).
44. Tucker M. D., Barton L. L., y Thomson B. M. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **20**:13 (1998).
45. Lusta K. A., Starostina N. G., Gorkina N. B. Fikhte B. A., Lozinsky V. I., Vainerman E. S., y Rogozhin S. V. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*. **24**, 4: 418 (1988).
46. Klemperer D. "Interpenetrating Polymer Networks" *Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. John Wiley & Sons. New York.
47. Kim, S. C., Klemperer, D., Frish, K. C., Frish, H. L., y Ghiradella, H. *Polymer Engineering Science*. **15**: 339 (1973).
48. Donatelli, A. A., Thomas, D. A., y Sperling, L. H. *Recent Advances in Polymer Blends, Grafts and Blocks*. Plenum New York (1974).
49. Graham F. W. y Owen R.T. *Enzyme and Microbial Technology*. **12**, September: 697 (1990).
50. Millar, J, R. *Journal Chemical Society*. **263**, 1311(1960).
51. Dusek, K., Patterson, D. *Journal Polymer Science. Part A-2*, **6**: 1209 (1968).
52. Curtins, A. J., Covitch, D. A., Sperling, L. H. *Polymer Engineering Science*. **12**: 101 (1972).
53. Gudeman, L. F., Peppas, N. A. *Journal of Applied of Polymer Science*. **55**: 919 (1995).
54. Liang, L. y Ruckestein E. *Journal of Membrane Science*. **106**: 167 (1995).
55. Queen, D., Evans, J. H., Gaylor, J. D. S., Courtney, JM., Reid, WH. *Biomaterials*. **8**: 372 (1987).
56. Queen, D., Gaylor, JDS.Evans, JH., Courtney, JM., Reid, WH. *Biomaterials*. **8**: 367 (1987).

57. Dusek, K. *In Polymers Networks. Structure and Mechanical Properties*; (Eds AJ Chomppf, S. Newman), Plenum Press. New York (1971).
58. Dusek, K., Janacek, J. *Journal Applied Polymer Science*. **19**: 361 (1975).
59. Ichijo H., Ichimura K., Uedaira H., Suehiro T., Yamauchi A., y Aizaka N. *Polymer Gels*, Edited by D. DeRossi et al. Plenum Press, New York, (1991).
60. Yokoyama, F., Masada, I., Shimamura, K., Ikawa, T., y Minobe, K. *Colloid Polymer Science*. **264**: 595 (1986).
61. Kawanishi, K., Komatsu, M. y Inoue, T. *Polymer*, **28**: 984 (1987).
62. Stoks, W. y Berghmans, H. *Polymer Journal*. **20**:361 (1988).
63. Peppas, N. A., Wright, S. L. *Macromolecules*. **39**: 8798 (1996).
64. Stauffer, S. R. y Peppas, N. A. *Polymer*. **33**, 18, 3932 (1992).
65. Lozinsky V.I. *Proceedings of American Chemical Society. Division of Polymeric Materials Science & Engineering. Fall Meetings August 23-27* (1998)
66. Fujii, K. *Macromolecules Rev*. **5**: 431 (1971).
67. Gusev D. G., Lozinsky V. I., Vainerman E. S., y Bakhmutov V. I. *Magnetic Resonance Chemical*. **28**, 7: 651 (1990).
68. Rosevear, A. *Journal Chemical Technical Biotechnology*. **34B**: 127 (1984).
69. Sefti, L. Pifferi, P. G., Lanzarini, G. *Medicine Faculty Landbouw. Univ. Gent*. 54/4b (1994).
70. Rainina, Y. E., Pusheva, A. M., Bolotina, N. P., Lozinsky, V. I.,y Varfoloyev. *Biotechnology Applied Biochemistry*. **19**: 321 81998).
71. Platé, N. A.,y Chupov, V. V. *Polymer Science*. **36**: 1568 (1994).
72. Tanigami T., Shirai Y., Yamaura K., y Matsuzawa S. *Polymer*. **35**, 9: 1970 (1994).
73. Lozinsky, V. L, Domotenko, I.V., Vainerman, E. S., Mamtsis A.M., Titova, E. F., Belavtseva, E.M. y Rogozhin, S. V. *Colloid Polymer Science*. **264**: 19 (1986).
74. Ruiz-Treviño F. A., Rios-Arciga C., Doria-Cerrano M. C., Hernández- Esparza M., y Santiago P. *Proceedings of the American Chemical Society Polymer Materials: Science and Engineering*. **82**, Spring meeting, March (2000).
75. Long, D. D., y Luyen, D. V. *Pure Applied Chemical*. **33**:1875 (1996).
76. Klein, J., y Ziehr, H. *Journal of Biotechnology*. **16**: 1 (1990).
77. Grange, P. *Catalysis Review Science Engineering*. **21**:135 (1980).

78. Angelici, R. *Journal Acta. Chemical Research.* **21**: 387 (1988).
79. Massoth, F. E. *Advances Catalysis.* **27**: 265 (1978).
80. Gates, B. C., Katzer, J. R., Schuit, G. C. A. *Chemistry Catalytic Processes*; McGraw-Hill: New York (1979).
81. Malik, K. A. *Process Biochemistry.* **13**: 10 (1978).
82. Platé, N. A., y Chupov, V. V. *Polymer Science.* **36**:1568 (1994).
83. Kilbane, J. J, y Jackowski, K. *Biotechnology Bioengineering.* **40**: 1107 (1972).
84. Monticello, D. J. *CHEMTECH.* **28**: 38 (1998).
85. Kilbane, J. J.; Bielaga, B. A. *CHEMTECH.* Diciembre (1990).
86. Monticello, J. D. *Enviromental Progress.* **12**: 1 (1996).
87. Boffa, L. C., Carpaneto, E. M., Allfrey, V. G. *Procceding Natl. Academic Science: USA.* **92**: 1901 (1995).
88. Orum, H., Nielsen, P. E., Jorgensen, M., Larsson, C.;Stanley, C., y Koch, T. *Biotechniques.* **19**:472 (1996).
89. Rosen, M. J. *Surfactants and Interfacial Phenomena.* Wiley New York (1989).
90. McBain, M. E., Hutchison, E. *Solubilization and Related Phenomena*; Academic Press: New York (1955).
91. Manson, J. A y Sperling, L. H. "Polymer Blens and Composites". Capitulo 8. Plenum, New York (1976).
92. Millar, J. R. *Journal Chemical Society.* **263**:1311 (1960).
93. Sperling, L. H. *Polymer Engineering Science.* **16**: 87 (1976).
94. Hassan C.M. y Peppas N. A. *Proceedings of American Chemical Society. Division of Polymeric Materials Science & Engineering. Fall meetings August 23-27* (1998)
95. Greenwald, H. y Luskin, L. S. *Hadbook of Water Soluble Gums and Resins.* Davison, Ed., MacGraw-Hill, New York (1980).
96. Freeman, A.; Blank, T. y Aharonowitz. *European Journal Applied Microbiology Biotechnology.* **14**:13 (1982).
97. Brandrup J. y Immergut E. H. *Polymer Handbook*, 3rd Ed., Willey, New York, VI/217, VI/221 (1989).
98. Tanigame T., Shirai Y., Yamaura K.y Matsuzawa S. *Polymer.* **35**, 9: 1970 (1994).
99. Stauffer S. R. y Peppas N. A. *Polymer.* **33**, 18: 3932 (1990).

100. Kayaman N., Gürel H. E. E., Uyanilk N., y Baysal B. *Macromolecules Chemical Physics*. **200**: 231 (1999).
101. Lozinsky V. I., Vainerman E. S., Domotenko L. V., Mantsis A. M., Titova E. F., Belantseva E. M., y Rogizhin S. V. *Colloid & Polymer Science*. **264**: 19 (1986).
102. Takayanagi, M., Harina, H. y Iwata, Y. *Memorial Facultad Engineering* . Kyushu Univesity. **23**, (1963).
103. Mucha, M. *Reactivities Functional. Polymer*. **39**: 19 (1998).
104. Astarita, G. *Transport Phenomena in Polymeric Systems*. Mashelkar, R. A. Mujumdar, A. S., Kamal, R. Eds. Wiley New York. 331 (1989).
105. Kim, S. J.; Li K. J. Kim, I. Y. y Kim S. I. *Journal of Macromolecular Science. Part A- Pure and Applied Chemistry*. **A40**, 5, 501 (2003).
106. Bruck, S. D. *Journal Biomedical Materials Research*. 7: 387 (1973).
107. Zhang, X. Z.; Zhuo, R. X. *Journal Colloides Interface Science*. 223, 311-313 (2000)
108. Lee J.W., Kim S.Y., Lee Y. G., Lee K. H., y Kim J. S. *Journal of Applied Polymer Science*. **73**: 113, (1999).
109. Barens, A R. y Hopfenberg, H. B. *Polymer*. **19**:489 (1978).
110. Okazaki M., Hamada T., Fujii H., Mizobe A. y Matsuzawa S. *Journal of Applied Polymer Science*. **58**: 2235 (1995).
111. Barens, A. R. y Hopfenberg, H. B. *Polymer*. **19**: 489 (1979).
112. Muniz E. C. y Geuskens G. *Macromolecules*. **34**: 4480 (2001).
113. Gutowska, A. F. *Macromolecules*. **27**, 15: 4164 (1994).
114. Curtisus, A., Covitch, J. M., Thomas, D. A., y Sperling, L. H. *Polymer Engineering and Science*. March. **12**, 2: 101 (1972).
115. Liang L. y Ruckestein E. *Journal. of Membrane Science*. **110**: 99 (1996).
116. Lozinsky V. I, Zubov A. L., y Titova E. F. *Enzyme and Microbiology Technology*. **18**: 561 (1996).
117. Buke, C. *Methodos Enzymologics*. **135**, 175 (1987).
118. Tanaka H., y Irie, S. *Biotechnology Technology*. **2**:115 (1988).
119. Martinsen, A., Skjak-break, G.,y Smidtrod, O. *Biotechnology Bioengineering*. **33**, 79 (1989).

120. Philopova O. E., Rulkens R., Kovtunencko B. I., Abramchuck S. S., Khokhlov A. R., y Wegner G. *Macromolecules*. **31**: 1168 (1998).
121. Watasa, M.,y Nishinari, K. *Polymer Journal*. **18**: 1017 (1986).
122. von Hippel, P. H.,y Schleic, Th.. *In Structure and Stability of Biological Macromolecules*. (Timasheff, S. N. And Fasman, G. D. Eds.). Mir. Moscow. 320-480 (1973).
123. Okazaki M., Hamada T., Fujii H., Mizobe A., y Matsuzawa, S. *Journal of Applied Polymer Science*.**58**: 2235 (1995).
124. Okazaki M., Hamada T., Fujii H., Mizobe A., y Matsuzawa, S. *Journal of Applied Polymer Science*. **58**: 2235 (1995).
125. Okazaki M., Hamada T., Fujii H., Kusudo O., Mizobe A., y Matsuzawa. *Journal of Applied Polymer Science*. **58**, 2243 (1995).
126. Lozinsky V.I., Zubov A. L., y Titova E. T. *Enzyme and Microbial Technology*. **20**:182 (1997).
127. Afigenova, A.; Shorokoba, A. P. y Fikhthe. *Microbiology*. **59**:553 (1990).

Apéndice A. Teoría para hinchamiento de hidrogeles a base de acrilamida.

Aunque en el presente trabajo no se realizaron cálculos termodinámicos de hinchamiento de los geles, a continuación se presenta la metodología reportada por Baker et al., (1995) para entender el proceso de hinchamiento al equilibrio en hidrogeles a base de acrilamida.

1. Modelo tipo Flory.

Para describir la elasticidad de la red y considerar cadenas a base de acrilamida, con alto hinchamiento, Baker et al., (1995) consideran la teoría de una red fantasma y generaliza el modelo de Flory al caso de geles conteniendo cargas fijas de cationes y aniones (amfolíticas).

En principio el cálculo del hinchamiento en el equilibrio en una solución con una sal, requiere de la solución de dos ecuaciones con dos incógnitas. Las ecuaciones se obtienen al igualar el potencial químico del agua en el gel y en el baño expresado como la presión osmótica para provocar el hinchamiento.

$$\mu_i^\alpha = \mu_i^\beta \quad (1)$$

donde α y β corresponden a las fases; μ_i^α es el potencial químico de “i” en el hidrogel y μ_i^β el potencial en la solución externa. Para el agua, esta ecuación se puede expresar como:

$$\Delta\Pi_{hinchamiento} = -\frac{\mu_i^{gel} - \mu_i^{baño}}{V_1} = 0 \quad (2)$$

donde $\Delta\Pi$ es la diferencia en presión osmótica entre el hidrogel y la solución externa, también llamada presión de hinchamiento. V_1 el volumen molar del agua.

La presión de hinchamiento es igual a cero en el equilibrio, por tanto:

$$\Delta\Pi_{hinchamiento} = \Delta\Pi_{mezclado} + \Delta\Pi_{elástico} + \Delta\Pi_{ion} = 0 \quad (3)$$

donde $\Delta\Pi_{\text{mezclado}}$ corresponde a la presión por interacciones agua-polímero, $\Delta\Pi_{\text{elástico}}$ a la presión provocada por la deformación del hidrogel y $\Delta\Pi_{\text{ion}}$ aquella debida a los iones móviles e injertados en el polímero.

Mezclado

Para $\Delta\Pi_{\text{mezclado}}$ se puede emplear la teoría de Flory-Huggins

$$\Delta\Pi_{\text{mezclado}} = \frac{RT}{V_1} \left[\ln(1 - \phi_2) + \phi_2 + \chi\phi_2^2 \right] \quad (4)$$

donde R es la constante de los gases; T la temperatura; ϕ_2 la fracción volumen del polímero y χ el parámetro de interacción que cuantifica las interacciones polímero-agua.

Elástica

Para una red tetra-funcional, perfecta, el hinchamiento isotrópico de una red tipo fantasma:

$$\Delta\Pi_{\text{elástica}} = -C_c RT \left(\frac{\phi_2}{\phi_{2c}} \right)^{1/3} \quad (5)$$

donde C_c es la concentración de enlaces efectivos en el estado de referencia (por ejemplo en la preparación del gel) y la fracción volumen del gel en el estado de referencia.

Iónica

La necesidad de mantener una electroneutralidad en el sistema implica una distribución diferentes de iones móviles en el hidrogel y la solución externa. El equilibrio ideal de Donan se ha empleado para estudiar los geles de acrilamida despreciando las interacciones ion-polímero, ion-ion e ion-disolvente obteniendo:

$$\Delta\Pi_{\text{ion}} = RT \sum (C_i^{\text{gel}} - C_i^{\text{baño}}) \quad (6)$$

donde C_i es la concentración de los iones móviles en el hidrogel y la solución externa. En esta ecuación se asume que la concentración de iones es baja y el coeficiente osmótico del agua es igual a la unidad. La concentración de sal en la solución externa se define por las condiciones experimentales, mientras que la concentración de iones móviles dentro del hidrogel se calcula de acuerdo con el equilibrio Donan, igualando el potencial químico de los iones en el hidrogel y la solución externa y aplicando electroneutralidad en las cargas fijas y móviles. Para un hidrogel en solución conteniendo una sal (1:1)

$$(C_+^{gel}) * (C_-^{gel}) = (C_s^{baño})^2 \quad (7)$$

aquí se asume que el coeficiente de actividad media de la sal difusible en el hidrogel es igual al de la solución externa. Para mantener una electro-neutralidad el número de iones positivos debe ser igual al de iones negativos en el hidrogel, para electrolitos univalentes:

$$(C_+^{gel}) + IC_{mc} \frac{\phi_2}{\phi_{2c}} = C_-^{gel} + JC_{mc} \frac{\phi_2}{\phi_{2c}} \quad (8)$$

Donde I y J representan la fracción de unidades de monómero en el hidrogel que contienen cargas fijas, positivas y negativas, C_{mc} es la concentración de monómero en la formación de la red.

Combinando las ecuaciones anteriores se obtienen dos incógnitas ϕ_2 y C_-^{gel} ; por un procedimiento de iteración utilizando una rutina generalizada Newton-Rampson se pueden resolver la ecuaciones. En el presente trabajo no se realizaron estos cálculos.

2. Teoría Debye-Hückel para hidrogeles amfóliticos.

La expresión para la presión de hinchamiento del gel (ecuación 3) es un balance de fuerzas. El término de mezclado es positivo y favorece el hinchamiento mientras que el elástico es negativo y se opone al hinchamiento. En el modelo presentado en la sección anterior el $\Delta\Pi_{ion}$ es positivo y favorece el hinchamiento excepto para geles amfóliticos con cargas balanceadas (carga neta cero) en cuyo caso es igual a cero.

Para considerar el comportamiento anti-polielectrolito de los hidrogeles, Baker et al, (1995) superpusieron la teoría de Debye-Hückel de soluciones de polielectrolitos con el modelo de hinchamiento. Bajo ciertas condiciones se pueden obtener valores negativos de $\Delta\Pi_{ion}$ que se oponen al proceso de hinchamiento este procedimiento es similar al reportado por Higgs and Joanny (1991) y Khokhlov et al (1993, 1986).

Baker et al., (1995) insertaron coeficientes medios de actividad ionica γ_{\pm} en la ecuación 7

$$(C_+^{gel})^* (C_-^{gel})^* (\gamma_{\pm}^{gel})^2 = (C_s^{baño})^2 (\gamma_{\pm}^{baño})^2 \quad (9)$$

La teoría extendida de Debye-Hückel fue empleada para calcular los coeficientes de actividad

$$\ln \gamma_{\pm} = - \left(\frac{|z_a z_c| F^2}{8\pi \epsilon_o \epsilon N_A RT} \right) \left(\frac{\kappa}{1 + \kappa a} \right) \quad (10)$$

donde κ es el inverso de la longitud de apantallamiento

$$\kappa^2 = - \left(\frac{F^2}{\epsilon_o \epsilon RT} \right) \sum_i C_i z_i^2 \quad (11)$$

N_A es el número de Avogadro, a el radio iónico (anión o catión), F la constante de Faraday, C_i la concentración del ion, z_i la valencia del ion ϵ_0 la permitividad del vacío y ϵ la constante dieléctrica del agua.

La ecuación 6 se puede reescribir para incluir los términos de la teoría de Debye-Hückel

$$\Delta\Pi_{ion} = (\Pi_{ion-gel} - \Pi_{ion, baño}) \quad (6a)$$

Para la solución externa $\Pi_{ion,baño}$ está dado por:

$$\Pi_{ion,baño} = RT \sum_i^{baño} \frac{RT \kappa_{baño}^3}{N_A 24\pi} \sigma(\kappa_{baño} a) \quad (12)$$

donde

$$\sigma(\kappa a) = \frac{3}{(\kappa a)^3} \left(1 + \kappa a - \frac{1}{1 + \kappa a} - 2 \ln(1 + \kappa a) \right) \quad (13)$$

$\Pi_{ion,baño}$ tiene dos términos, uno ideal $\Pi=CRT$ y la corrección de Debye-Hückel. El término ideal disminuye por las interacciones electrostáticas entre iones. El término de Debye-Hückel aparece cuando se deriva el potencial químico del agua en una solución de electrolito a través de la integración de la ecuación de Gibbs-Duhem. Cuando κa es mucho menor que la unidad (soluciones diluidas), σ se aproxima a la unidad obteniéndose la proporcionalidad $\kappa^3/24\pi$ de la ley de Debye-Hückel. En el cálculo del término entrópico ideal $\Pi=CRT$ Baker et al., (1995) incluyen solamente las especies iónicas móviles

Apéndice B. Pruebas de significancia entre el método secuencial y simultáneo.

En este caso tenemos dos medias muestrales x_1 y x_2 , que corresponde al promedio de la razón de hinchamiento para la Tabla A, contenido de agua en el equilibrio para la Tabla B y resistencia a la compresión para la Tabla C, a una misma composición molar.

La hipótesis nula, H_0 establece que no hay diferencia en las propiedades (Wt , EWC o R.C.) del hidrogel obtenido por el método secuencial o simultáneo.

Para que se cumpla la H_0 , se requiere que $t_{calculada} < t_{tablas}$. El valor de t_{tablas} se determinó con cuatro grados de libertad ($n_1 - n_2 - 2 =$ grados de libertad), con $n_1 = n_2 = 3$ y un 95% de confiabilidad.

El valor de t_{cal} se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$t_{cal} = (x_1 - x_2) / s \sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)}$$

El valor de s se obtiene de $s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$

A. Resumen de los resultados del análisis estadístico para Wt^* entre los hidrogeles de IPNs y SIN.

Composición molar (PAAM/PVA)	Wt^*		$t_{calculada}$	t_{tablas} para $n=4$ a 95%	$t_{tablas} - t_{cal}$	$H_0 = t_{calculada} < t_{tablas}$
	IPNs (x_1)	SIN (x_2)				
100/0	21.36	19.25	6.896	2.78	-4.116	Hay diferencia significativa
90/10	15.79	16.9	2.143	2.78	0.637	No hay diferencia significativa
80/20	15.31	14.06	2.772	2.78	0.008	No hay diferencia significativa
60/40	12.98	13.55	1.519	2.78	1.261	No hay diferencia significativa
50/50	12.04	12.56	2.582	2.78	0.198	No hay diferencia significativa
40/60	12.38	13.64	10.345	2.78	-7.565	Hay diferencia significativa
20/80	12.69	11.27	11.369	2.78	-8.589	Hay diferencia significativa
0/100	9.49	9.48	0.153	2.78	2.627	No hay diferencia significativa

B. Resumen de los resultados del análisis estadístico para *EWC* entre los hidrogeles de IPNs y SIN.

Composición molar (PAAM/PVA)	<i>EWC</i> (%)		$t_{calculada}$	t_{tablas} para $n=4$ a 95%	$t_{tablas}-t_{cal}$	$H_0 = t_{calculada} < t_{tablas}$
	IPNs (x_1)	SIN (x_2)				
100/0	95.34	93.76	17.07	2.78	-14.291	Hay diferencia significativa
90/10	93.91	93.63	2.11	2.78	0.673	No hay diferencia significativa
80/20	92.92	91.96	12.98	2.78	-10.204	Hay diferencia significativa
60/40	92.37	93.32	4.01	2.78	-1.232	Hay diferencia significativa
50/50	92.81	92.39	1.84	2.78	0.933	No hay diferencia significativa
40/60	91.45	91.61	0.76	2.78	2.011	No hay diferencia significativa
20/80	90.66	90.35	1.693	2.78	1.082	No hay diferencia significativa
0/100	87.88	87.88	0	2.78	2.780	No hay diferencia significativa

C. Resumen de los resultados del análisis estadístico para la resistencia a la compresión (R.C.) entre los hidrogeles de IPNs y SIN.

Composición molar (PAAM/PVA)	R. C.(kPa)		$t_{calculada}$	t_{tablas} para $n = 4$ a 95%	$t_{tablas}-t_{cal}$	$H_0 = t_{calculada} < t_{tablas}$
	IPNs (x_1)	SIN (x_2)				
100/0	1.94	3.27	11.461	2.78	-8.681	Hay diferencia significativa
90/10	4.1	4.33	1.317	2.78	1.463	No hay diferencia significativa
80/20	4.35	4.91	2.424	2.78	0.356	No hay diferencia significativa
60/40	5.74	4.76	7.880	2.78	-5.100	Hay diferencia significativa
50/50	4.8	4.98	0.616	2.78	2.164	No hay diferencia significativa
40/60	5.23	4.12	15.543	2.78	-12.763	Hay diferencia significativa
20/80	5.16	4.8	3.102	2.78	-0.322	Hay diferencia significativa
0/100	6.38	6.38	0.000	2.78	2.780	No hay diferencia significativa

Apéndice C. Derivación de la ecuación para calcular el coeficiente de difusión..

Harmon y colaboradores¹ propusieron un modelo, que considera los tres procesos del transporte del agua, *Caso I*, *Caso II* y anómalo. El flujo total J consiste de dos componentes: uno es debido a la difusión con un gradiente de concentración y el otro es debido al esfuerzo de relajación de las cadenas poliméricas con una velocidad de propagación ν . Por lo tanto, para la variación de volumen de los hidrogeles ,

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial x} \pm \nu(C - C_0) \quad \text{para } 0 \leq |x| \leq l \quad (1)$$

donde C y C_0 es la concentración en los puntos x y $x = 0$, de la tablilla de un hidrogel de espesor finito $2l$ respectivamente. El coeficiente de difusión D y la velocidad ν provienen del *Caso I* y *Caso II* del proceso de transporte de agua.

De acuerdo con la conservación de masa, se tiene la siguiente ecuación:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - \nu \frac{\partial C}{\partial x} \quad \text{para } 0 \leq |x| \leq l \quad (2)$$

Después de hacer la integración de la concentración con las condiciones límite a C_0 en $x = \pm l$, Harmon y colaboradores obtuvieron la variación de la masa del agua Wt a tiempo t y se relacionó con la masa de agua en el equilibrio W_∞ como⁷:

$$\frac{Wt}{W_\infty} = 1 - 2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\lambda_n^2 (1 - 2 \cos \lambda_n \exp(-[\nu l]/(2D)))}{\beta_n^4 (1 - (2D)/(\nu l) \cos^2 \lambda_n)} \exp\left(-\frac{\beta_n^2 Dt}{l^2}\right) \quad (3)$$

donde

$$\lambda_n = \frac{\nu l}{2D} \tan \lambda_n \quad (4)$$

$$\beta_n^2 = \frac{\nu^2 l^2}{4D^2} - \lambda_n \quad (5)$$

La raíz de la ecuación (4) (λ_n con $n = 1, 2, 3, \dots, \infty$) son utilizadas en las ecuaciones (3) y (5). En el caso limite se tiene un valor. Cuando $\nu = 0$, las ecuaciones (4) y (5) llegando a ser $\lambda_n = (n + 1/2)\pi$ y $\beta_n = \lambda_n$, respectivamente. Por lo tanto, la ecuación (3) es reducida a:

$$\frac{Wt}{W_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \left[\frac{8}{(2n+1)^2 \pi^2} \right] \exp \left[- (2n+1)^2 \pi^2 \left(\frac{Dt}{l^2} \right) \right] \quad (6)$$

Para tiempos cortos la ecuación (6) se transforma en la ecuación (7), y sólo se aplica para fracciones de hinchamiento menores a 0.6.

$$\frac{Wt}{W_\infty} = 4 \left(\frac{Dt}{\pi l^2} \right)^{1/2}$$

La ecuación (6) claramente implica que la gráfica entre Wt/W_∞ y $t^{1/2}$ producirá una línea recta y a partir de la pendiente de la grafica determinar el valor del coeficiente de difusión D .

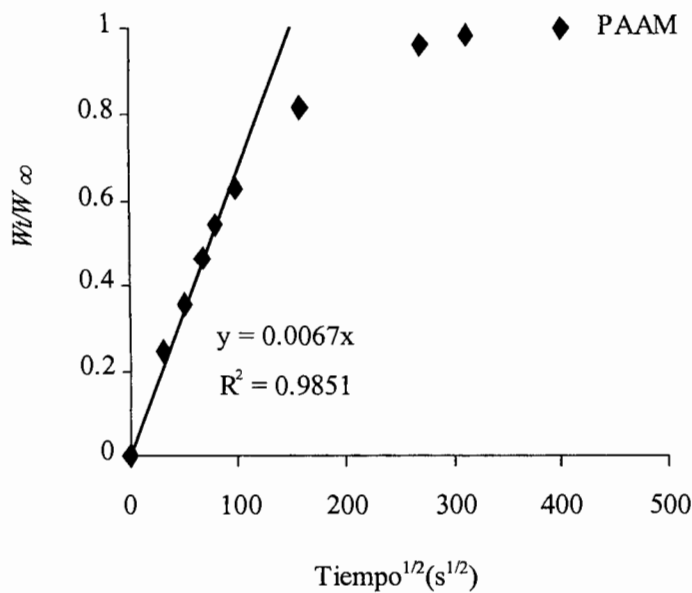
Apéndice D. Cálculos para determinar el coeficiente de difusión del agua en los hidrogeles de IPNs.

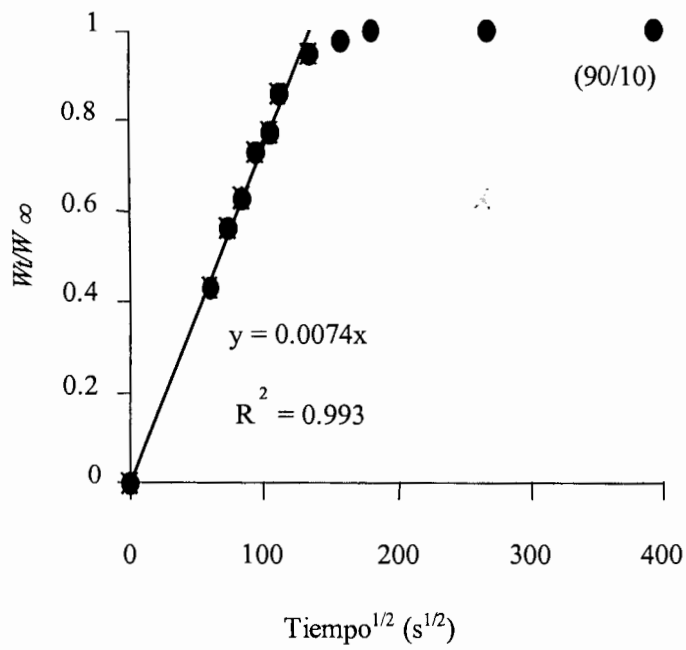
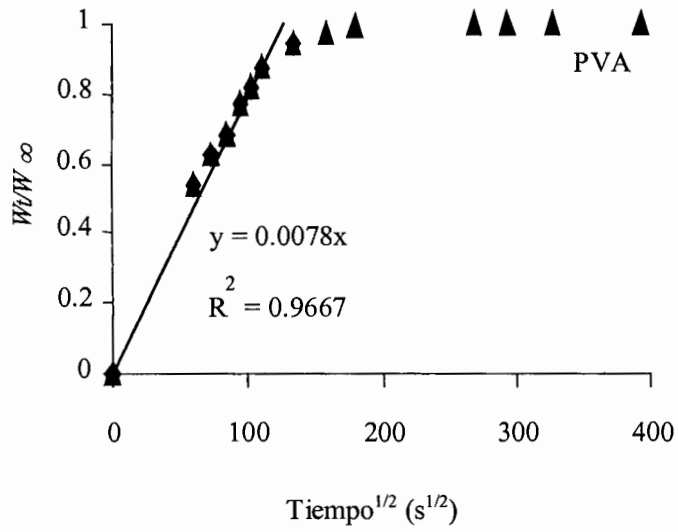
Utilizando la ecuación $\frac{W_t}{W_\infty} = kt^{1/2}$ se graficó $\frac{W_t}{W_\infty}$ & $t^{1/2}$ y de esta gráfica se determina el

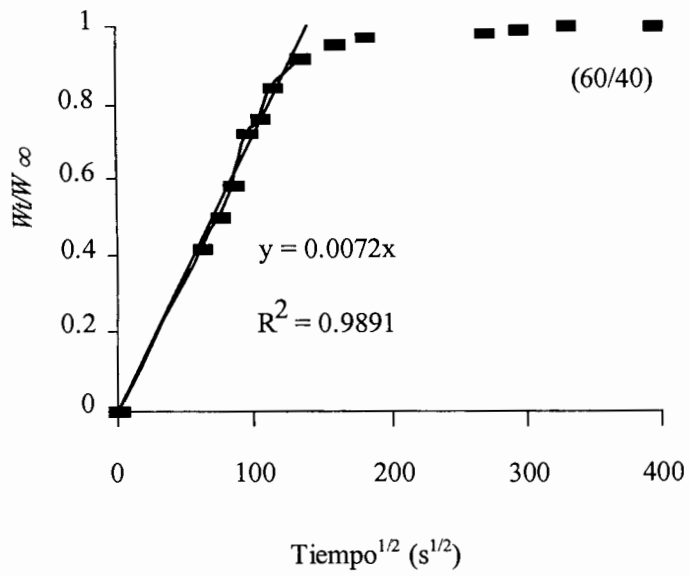
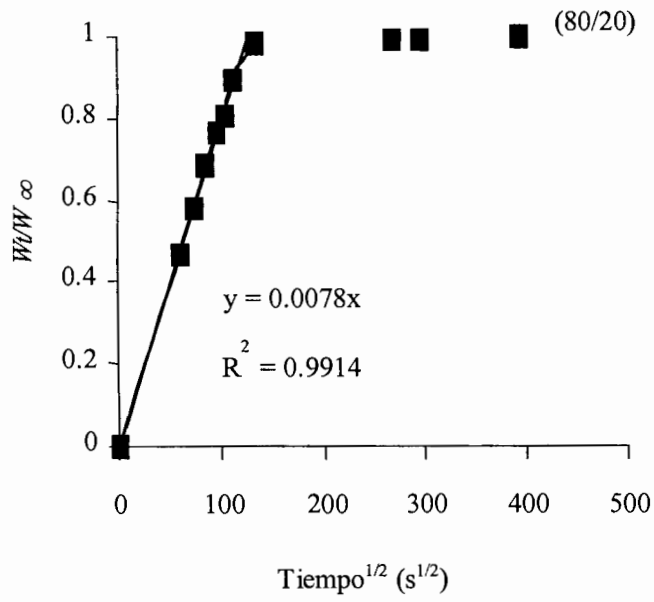
valor de k como la pendiente de la recta con ordenada al origen cero. la cual es igual a la

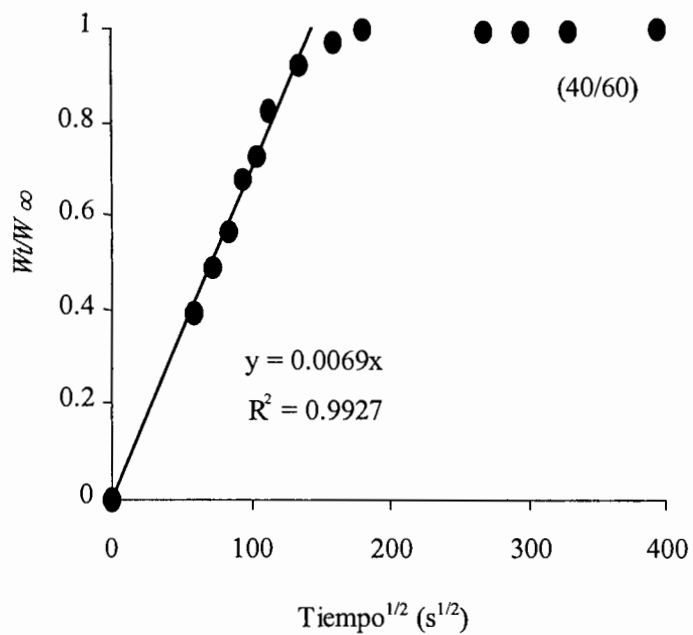
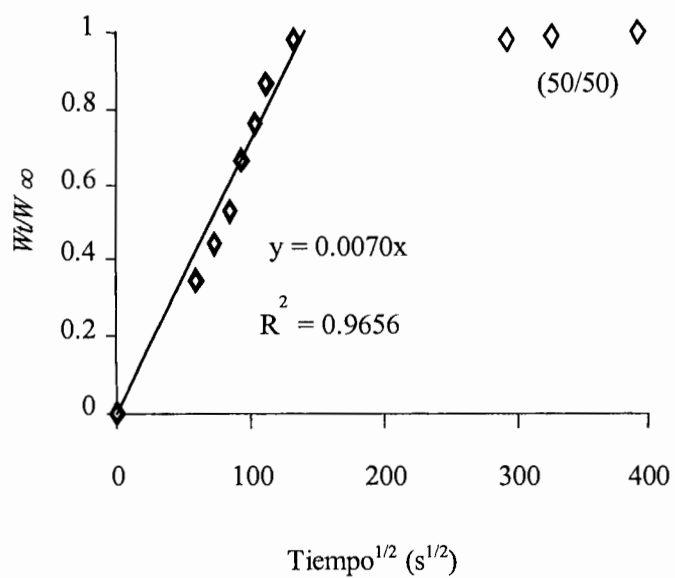
pendiente y también $k = 4\left(\frac{D}{\pi l^2}\right)^{1/2}$ de esta ecuación se despejó D (cm^2/s) fue determinada

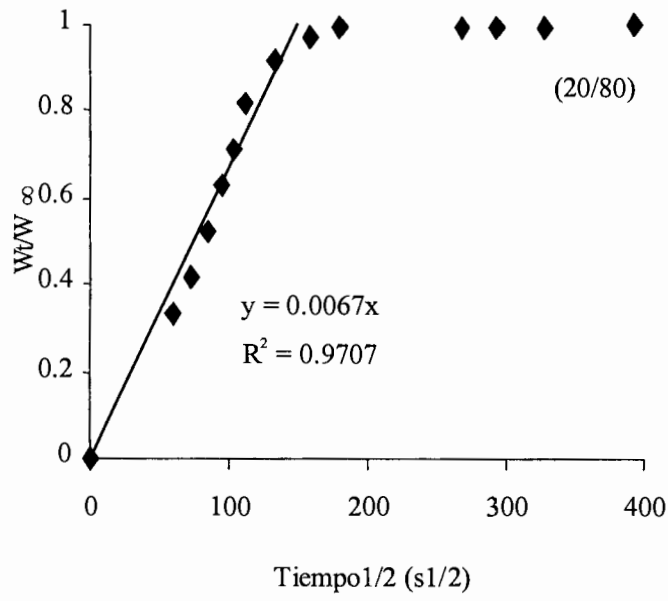
para cada uno de los hidrogeles. A continuación se muestran las gráficas correspondientes a cada uno de los hidrogeles de las SIN.











Apéndice E. Índice de figuras

No.	Leyenda	Pag.
1	Representación esquemática de un hidrogel en su estado contraído e hinchado.	4
2	Clases de IPN. (a) IPN secuencial; (b) IPN simultánea; (c) semi-IPN. Red I = línea sólida; red II = línea desvanecida. M = monómero; polimerización; X = agente de entrecruzamiento, C = catalizador	6
3	Estructura química del hidrogel de poli(acrilamida).	10
4	Estructura química de los estereoisómeros; isotáctico y sindiotáctico del poli(alcohol vinílico).	13
5	Representación de la tacticidad de la estructura química del PVA.	15
6	Métodos de inmovilización.	18
7	Mecanismo de biodesulfuración.	26
8	Sistema modelo de inmovilización de las células de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> IGTS8 en IPN de PAAM/PVA.	28
9	Curva de viscosidad-concentración para el PVA en Na ₂ SO ₄ .	47
10	Espectro de RMN de ¹³ C del PVA, obtenido con 10,000 scans. Isómeros isotáctico (mm), sindiotáctico (rr) y atáctico (rm). PVA disuelto en dimetilsulfóxido al 10% en peso.	48
11	Efecto de la concentración de PAAM en los hidrogeles sobre la razón de hinchamiento en el equilibrio.	50
12	Curva representativa de fuerza de compresión contra la deformación para el hidrogel con 3% (p/v) de PAAM.	51
13	Efecto de la concentración de PAAM en los hidrogeles sobre la resistencia a la compresión	52
14	Fotografía de muestras de IPNs-PAAM/PVA(90/10) en estado seco o cerogel (a) e hinchado (b).	54
15	Espectros de infrarrojo de diferentes polímeros. (A) PVA, (B) IPNs-PAAM/PVA (20/80), (C) IPNs-PAAM/PVA (50/50), (D) IPNs-PAAM/PVA (90/10) y (E) PAAM.	55
16	Espectros de infrarrojo de diferentes polímeros. (a) PAAM, (b) PVA, (c) SIN-PAAM/PVA (20/80), (d) SIN-PAAM/PVA (50/50), (e) SIN-PAAM/PVA (90/10)	56
17	Cinética de hinchamiento después del proceso de síntesis de los hidrogeles de PAAMsec (a) PAAMsim (b) y PVA (c).	58
18	Extracción de PVA en IPNs y SIN, en función del contenido de PVA en IPN.	60
19	Cinética de hinchamiento después del proceso de secado por intercambio de disolvente de los hidrogeles de PVA y PAAM.	62
20	Comportamiento de la razón de hinchamiento en el equilibrio en agua destilada a 30°C de hidrogeles de IPNs. Muestras secadas por intercambio de disolvente.	63
21	Comportamiento de la razón de hinchamiento equilibrio, en agua destilada a 30°C, de hidrogeles de SIN. Muestras secadas por intercambio de disolvente.	64
22	Gráfica del contenido de agua contra t1/2 para el hidrogel de IPNs (50/50). Muestra secada por intercambio de disolvente.	68
23	Comportamiento de EWC como una función de la composición molar de PVA. (a) IPNs y (b) SIN.	72
25	Micrografía del hidrogel de PVA. Muestra secada por liofilización durante 72 h. Muestra fracturada en nitrógeno líquido. La barra indica 50µm. Esta figura está a 200X.	78

26	Micrografía del hidrogel de PAAMsec. Muestra secada por liofilización. Muestra fracturada en nitrógeno líquido. La barra indica 50µm. Esta figura está a 200X	79
27	Pared de un poro de PAAM (A) secuencial a 1500X y (B) simultánea a 6000X.	80
28	Micrografía de SEM del hidrogel de IPNs (90/10), preparada con 90% mol de PAAM y 10% mol de PVA. La muestra fue secada por liofilización durante 72 h. La muestra fue fracturada en nitrógeno líquido. La barra indica 50µm. Esta figura está a 200X..	81
29	Comparación de la pared de un poro entre la PAAMsec (a) e IPNs(90/10) (b) a 1500X. Hidrogeles secados por liofilización. La muestra fue secada por liofilización durante 72 h. La muestra fue fracturada en nitrógeno líquido. La barra de escala indica 6.66 µm.	82
30	Micrografías de SEM para los hidrogeles de IPNs-PAAM/PVA (a) 80/20, (b) 50/50 y (c) 20/80. Las tres micrografías se encuentran a 200X y la escala es de 50 µm. El secado de las muestras se realizó por liofilización. Cada muestra fue fracturada en nitrógeno líquido. La barra de escala indica 50 µm.	83
31	Micrografía de SEM del hidrogel de SIN (90/10). El secado de la muestra se realizó por liofilización durante 72 h. Muestra fracturada en nitrógeno líquido. La barra indica 50µm. Esta figura está a 200X	84
32	Comparación entre la cinética de hinchamiento y la morfología para el hidrogel de SIN (40/60). El secado de la muestra se realizó por liofilización durante 72 h. Muestra fracturada en nitrógeno líquido. La barra indica 50 µm. Esta figura está a 200X.	85
33	Micrografía de SEM para el hidrogel de SIN(50/50). El secado de la muestra se realizó por intercambio de disolvente y posteriormente, el disolvente se evaporó por liofilización durante 72 h. Muestra fracturada en nitrógeno líquido. La barra de escala indica 50 µm. Este figura está a 200X.	86
34	Efecto del porcentaje de heptano en el medio de hinchamiento sobre la razón de hinchamiento en el equilibrio de los hidrogeles de IPNs (90/10) (curva 3), IPNs (50/50) (curva 2) e IPNs (20/80) (curva 1).	88
35	Efecto del porcentaje de heptano, en el medio de hinchamiento. sobre la razón de hinchamiento en el equilibrio de los hidrogeles de IPNs (90/10) (curva 3), IPNs (50/50) (curva 2) e IPNs (20/80) (curva 1).	89
36	Efecto del porcentaje de heptano en el medio de hinchamiento a 30°C, 180 rpm y 2% de surfactante nonil-fenil-éter polióxido de etileno sobre la razón de hinchamiento del cerogel de IPNs (50/50).	94
37	Efecto del porcentaje de surfactante sobre la razón de hinchamiento del cerogel IPNs (50/50). Temperatura de 30°C y 180rpm.	96
38	Influencia de la carga de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> inmovilizadas por atrapamiento en los hidrogeles de IPNs (20/80) (curva 1), (50/50) (curva 2) y (90/10) (curva 3).	97
39	Efecto de la carga de biomasa atrapada en los hidrogeles de IPNs (20/80) (curva 1), (50/50) (curva 2) y (90/10) (curva 3).sobre la resistencia a la compresión. Después del hinchamiento en S50 y 2% de surfactante.	99
40	Micrografía de SEM del composito de IPNs (20/80) con células de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> inmovilizadas por atrapamiento. Carga de biomasa de 6 g de células húmedas/dL.	100
41	Micrografía de SEM, para el composito de IPNs (50/50) a 2000X con células de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> inmovilizadas por atrapamiento. Carga de biomasa de 6 g de células húmedas/dL.	101

42	Micrografía de SEM a 7500X, para el composito de IPNs (50/50) a con células de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> inmovilizadas por atrapamiento. Carga de biomasa de 6 g de células húmedas/dL.	102
43	Micrografía de SEM a 7500X, para el composito de IPNs (90/10) a con células de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> inmovilizadas por atrapamiento. Carga de biomasa de 6 g de células húmedas/dL.	103
44	Micrografía de la pared de un poro del hidrogel soporte de IPNs(90/10).	104
45	Células de <i>Rhodococcus rhodochrous IGTS8</i> . (a) células libres vista a 1500X en microscopio óptico. (b) células inmovilizadas en IPNs (90/10) a 7500X..	105
46	Crecimiento celular de <i>Rhodococcus rhodochrous IGTS8</i> despues de 48 h.	105
47	Micrografía de SIN (20/80) con células inmovilizadas de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> , con una carga de biomasa de 6 g de células húmedas/ dL.	106
48	Micrografía de SIN (50/50) con células inmovilizadas de <i>Rhodococcus rodochrous</i> con una carga de biomasa de 6 g de células humedas/ dL.	107
49	Micrografía de SIN (90/10) con células inmovilizadas de <i>Rhodococcus rodochrous</i> , con una carga de biomasa de 6 g de células húmedas/ dL.	108
50	Curva de calibración para el DBT generada de los datos de cromatografía de gases.	110
51	Comparación entre los compuestos utilizados como estándares (a) y las muestras problema (b). Los números sobre cada pico, corresponden al tiempo de retención de cada compuesto.	112
52	Micrografía de SEM para el biocatalizador IPNs (90/10) posterior al proceso de preparación. La carga de biomasa fue de 6 g células humedas/dL.	116
53	Micrografía de SEM, IPNs (90/10) después del proceso de biodesulfuración (tiempo de incubación = 120 h)	117

Apéndice E. Índice de Tablas

No.	Leyenda	Pag.
1	Composición del medio mineral basal.	33
2	Composición utilizada en la preparación del hidrogel de PAAM.	36
3	Cantidades empleadas en la preparación de IPNs y SIN de PAAM/PVA	38
4	Viscosidad de la solución de PVA en función de la concentración.	46
5	Tacticidad del PVA	48
6	Valores de n y k para el hinchamiento de diversos hidrogeles de IPNs-PAAM/PVA.	66
7	Coefficiente de difusión en IPNs	69
8	Valores de n y k para el hinchamiento de diversos hidrogeles de SIN-PAAM/PVA.	70
9	Valores de la temperatura de fusión para el PVA en IPNs y SIN.	75
10	Resistencia a la compresión de los hidrogeles de IPNs y SIN*.	77
11	Efecto del porcentaje de heptano en el medio de hinchamiento sobre la resistencia a la compresión de IPNs, evaluada después del proceso de hinchamiento.	92
12	Efecto del porcentaje de heptano en el medio de hinchamiento sobre la resistencia a la compresión de SIN, evaluada después del proceso de hinchamiento.	93
13	Porcentaje de recuperación de DBT y HBF en heptano y hexano.	111