TESIS CON CARÁCTER ABIERTO

PROGRAMA: DOCTORADO EN POLÍMEROS

AUTOR: DORA EVELIA RODRÍGUEZ FÉLIX

TITULO: <u>síntesis y caracterización de hidrogeles de redes</u> <u>semi-interpenetradas basadas en poli(acrilamida) y poli</u> (<u>ácido-γ-glutámico)</u>

ASESORES: Dr. Jorge Romero García

Dr. Eduardo Ramírez Vargas FIRMA:

Kome 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 de Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coah., a 20 de junio de 2006



Sello de la Institución

Dr. Juan Méndez Nonell Firma del Director General del CIQA



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA

TESIS

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES DE REDES SEMI-INTERPENETRADAS BASADAS EN POLI(ACRILAMIDA) Y POLI(ÁCIDO-γ-GLUTÁMICO)

Presentada por:

M. C. DORA EVELIA RODRÍGUEZ FÉLIX

Para obtener el grado de:

DOCTOR EN POLÍMEROS



CENTRO DE INFORMACIÓN

0 6 OCT 2006



Asesores:

Dr. Jorge Romero García Dr. Eduardo Ramírez Vargas

Saltillo, Coahuila

Junio 2006

CENTRO DE INVESTIGACION EN QUIMICA APLICADA

Programa de Doctorado en Polímeros

TESIS

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES DE REDES SEMI-INTERPENETRADAS BASADAS EN POLI(ACRILAMIDA) Y POLI (ÁCIDO-γ-GLUTÁMICO)

Presentada por:

DORA EVELIA RODRÍGUEZ FÉLIX

Para obtener el grado de:

DOCTOR EN POLIMEROS

Asesorada por:

DR. JORGE ROMERO GARCÍA DR. EDUARDO RAMÍREZ VARGAS

SINODALES

Dra. Odilia Pérez Camacho Presidente

Dra. Guadalupe Neira Velázquez 1er. Vocal

Dr. Humberto Vázquez Torres 3er. Vocal

Dr. Roberto Benavides Cantú Secretario

annis Castilli D.

Dra. Mónica Castillo Ortega 2do. Vocal

Saltillo, Coahuila

DECLARACIÓN

Declaro que la información obtenida en la Parte de Metodología y de Resultados de este documento provienen de las actividades de investigación realizadas durante el periodo que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis y que dicha información pertenece al Centro de Investigación en Química Aplicada.

Saltillo, Coahuila a 20 de Junio de 2006

Dora E. Ravez. F.

Dora Evelia Rodríguez Félix Nombre y firma del sustentante



DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi esposo Guillermo y a mi hijo Guillermito. Así como a mis papás Georgina y Francisco, a mis hermanos Ana María y Francisco, y a mi prima Emilia. Por todo el cariño y apoyo que siempre me han brindado.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios: por haberme dado vida y salud y con ello la oportunidad de terminar una etapa importante en mi vida.
- Al Centro de Investigación en Química Aplicada: por haberme recibido durante estos 3 años.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología: por la beca recibida para la realización de mis estudios de Doctorado en Polímeros, con número de registro 153210..
- Al Dr. Jorge Romero García: por su acertada dirección y asesorías otorgadas para la realización de esta tesis. Así como por sus enseñanzas y la formación recibida.
- Al Dr. Eduardo Ramírez Vargas: por su acertada dirección y asesorías otorgadas para la realización de esta tesis. Así como por sus enseñanzas y la formación recibida.
- Al Dr. Damaso Navarro, y a la M.C. Esther Treviño: por su apoyo como coordinadores de posgrado.
- A mis sinodales, Dra. Lupita Neira, Dra. Mónica Castillo, Dra. Odilia Pérez, Dr. Roberto Benavides y Dr. Humberto Vázquez: por sus valiosas sugerencias para la mejora de este trabajo de tesis.
- A la M. C. Silvia Solís: Por su valiosa cooperación en la mejora de este trabajo de tesis durante en tiempo en que participó como revisor de esta tesis.
- A la LCQ Gabriela Padrón y L.C.Q. Diana Iris: por su apoyo técnico en la caracterización de los materiales.

- Al M. C. Antonio Ledezma: por sus valiosos consejos y disponibilidad para ayudarme en el laboratorio. Así como por su valiosa amistad.
- A la Dra. Ivanna Moggio: por su colaboración en la realización de los análisis de fluorescencia.
- Al Departamento de Físico-Química del CIQA: Josefina Zamora, Blanca Huerta, Esmeralda Saucedo y M.C. Silvia Solís, por su colaboración en la realización de los análisis de caracterización de las muestras.
- A Marcelina Sánchez por su colaboración en las realización de las prueba en TMA.
- A mis amigas y compañeras del edificio B: Erika Vázquez, Erika Flores y Yolanda del Ángel, por los agradables momentos que compartimos juntas, y el apoyo que siempre recibí de su parte.
- A mis amigos y compañeros de CIQA: Rodolfo, Héctor, Isidro, Edgar, Gaby, Hortensia, Leonor, Selene, Gris, Fátima, Tere, Layza, Mayela y Alondra, por su valiosa amistad.
- Al Departamento de Sistemas, especialmente a Blanca García por el apoyo técnico brindado, así como por su valiosa amistad.
- Al Departamento de Información de CIQA, especialmente a Brunilda Seguí y a Patricia Siller, por su amable atención.

ÍNDICE

RE	MEN i	i
I	INTRODUCCIÓN 1	1
п	ASPECTOS TEÓRICOS 4 2.1 Geles basados en polímeros 4 2.2 Hidrogeles 6 2.2.1 Hidrogeles como materiales inteligentes 7 2.2.2 Transición de fase de volumen en hidrogeles 1 2.3.3 Propiedades de los hidrogeles 1 2.3.1 Contenido de agua en el equilibrio 1 2.3.2 Estabilidad dimensional 1 2.3.3 Humectabilidad superficial y tensión superficial crítica 1 2.3.3 Permeabilidad al oxígeno 1 2.3.4 Permeselectividad 1 2.3.5 Permeselectividad 1 2.3.6 Propiedades mecánicas 1 2.3.7 Propiedades mecánicas 1 2.3.8 Biocompatibilidad 2 2.3.4 Aplicaciones de los hidrogeles 2 2.4.4 Aplicaciones de los hidrogeles 2 2.4.4 Prótesis en tejidos 2 2.4.4 Revestimiento de suturas 2 2.4.4 Revestimiento de suturas 2 2.4.5 Cirugía 2 <td>4 4 5 7 10 14 17 17 18 19 19 12 12 22 3 23 24 24 22 5 27 30 1 32 9 4</td>	4 4 5 7 10 14 17 17 18 19 19 12 12 22 3 23 24 24 22 5 27 30 1 32 9 4
ш.	HIPÓTESIS	48
111.		.0
IV.	OBJETIVOS	49 49 49
V	METODOLOGÍA	50
•	 5.1 Obtención del poli(ácido-γ-glutámico)	50 51

	5.1.2	Caracterización del y-PGA	52				
	5.1.3	Hidrólisis alcalina.	53				
	5.1.4	Determinación de la masa molecular	55				
	5.2	Síntesis de redes semi-interpenetradas de poli(acrilamida)/poli(ácido-y-glutámico)					
		con masa molecular correspondiente a 83200 y155800g/mol	56				
	5.3	Estudio de la morfología de las redes semi-interpenetradas	57				
	5.3.1	Microscopía óptica	58				
	5.3.2	Derivatización del poli(ácido-y-glutámico) con pirenmetilamina	59				
	5.3.3	Análisis del poli(ácido-y-glutámico)-pirenmetilamina mediante microscopía de	62				
	521	Microscencia lastrónica de harride	63				
	5.5.4	Microscopia electronica de barrido.	03				
	5.4	Determinación de la posible interacción entre poli(acritamida) y poli(acido- γ -	62				
	5 5	Análisis tármico masánico	03 64				
	5.5	Analisis termico mecanico	04 64				
	5.0	Contenido de agua en el equinorio mediante analisis termogravimetrico	04 64				
	5.7	Cinéticos de hinehemiente	04 65				
	5.0	Empire alignation del mali(égide en plutémice) con 0 aigle deuteines	03 66				
	3.9	Functionalización del poli(acido-γ-giutamico) con p-ciclodextrinas	00				
	VI	RESULTADOS Y DISCUSIONES	68				
	6.1	Síntesis y purificación del poli(ácido-y-glutámico)	68				
	6.2	Determinación de la masa molecular del poli(ácido-y-glutámico)	69				
	6.3	Síntesis de redes semi-interpenetradas de poli(acrilamida)/poli(ácido-y-glutámico)	71				
	6.4	Estudio de la intercalación del poli(ácido-y-glutámico) dentro de la red semi-					
		interpenetrada, mediante microscopía óptica y microscopía de fluorescencia láser					
		confocal	72				
	6.5	Caracterización de la morfología mediante Microscopía Electrónica de Barrido	84				
	6.6	Interacción entre los polímeros constituyentes de las redes semi-interpenetradas	91				
	6.7	Análisis térmico mecánico	95				
	6.8	Resistencia a la compresión en ruptura	96				
	6.9	Propiedades de hinchamiento	99				
	6.9.1	Cinéticas de hinchamiento en agua a diferentes temperaturas	99				
	6.9.2	Cinéticas de hinchamiento en soluciones buffer a diferente pH	111				
	6.10	Poli(ácido-γ-glutámico) modificado con β-ciclodextrina	123				
	6.10.1	Hidrogeles con poli(ácido-γ-glutámico) modificado con β-ciclodextrina	128				
VII	CONCI	LUSIONES	131				
VIII	ACTIVIDADES FUTURAS						
IX	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA						

•

RESUMEN

El estudio de la preparación y caracterización de hidrogeles de redes interpenetradas basadas en polímeros ha sido de gran interés en la actualidad, debido a sus atractivas propiedades, entre las que se encuentran la capacidad de hinchamiento en agua o fluidos biológicos, así como su biocompatibilidad y biodegradabilidad; lo que les permite contar con aplicaciones potenciales dentro de los campos de bioingeniería, biotecnología, medicina, farmacia, agricultura, industria alimenticia, entre otros.

Tomando en consideración las buenas propiedades de hinchamiento de la poliacrilamida, así como las propiedades de biodegradabilidad y biocompatibilidad del biopolímero poli(ácido-y-glutámico), en el presente trabajo se llevó a cabo la preparación de hidrogeles de redes semi-interpenetradas de poliacrilamida (PAAm) y poli(ácido- γ -glutámico) (γ -PGA) en proporciones molares de PAAm/ γ -PGA correspondientes a 100/0, 95/5, 90/10, 85/15, 80/20 y 75/25 para analizar el efecto de la composición de las redes semi-interpenetradas (semi-IPNs) sobre las propiedades estudiadas. El y-PGA utilizado fue obtenido mediante el cultivo de la bacteria Bacillus licheniformis. En la preparación de las redes semi-interpenetradas se utilizaron dos masas moleculares diferentes de y-PGA, correspondientes a 83200 y 155800 g/mol, obtenidas mediante la hidrólisis alcalina del y-PGA previamente purificado. Se estudió el efecto de la masa molecular del y-PGA sobre la morfología, propiedades mecánicas, y propiedades de hinchamiento de estos sistemas poliméricos.

La caracterización de las redes semi-interpenetradas se llevó a cabo mediante microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido, microscopía de fluorescencia de láser confocal, espectroscopía de infrarrojo, análisis termomecánico, análisis termogravimétrico, propiedades mecánicas y propiedades de hinchamiento.

En los estudios realizados mediante microscopía óptica en hidrogeles teñidos con el colorante azul alcian, y mediante microscopía de fluorescencia de láser confocal, en hidrogeles elaborados con γ -PGA modificado con pirenmetilamina, se encontró que el γ -PGA permanece intercalado dentro de la semi-IPN y se encuentra distribuido de manera uniforme. Por otra parte, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), se encontró un

i

incremento en la porosidad de las semi-IPNs al aumentar el contenido de γ -PGA dentro de las mismas.

Los espectros de infrarrojo correspondientes a las semi-IPNs presentaron desplazamientos en la banda del estiramiento del grupo amida en PAAm; lo que aunado a la presencia de grupos los funcionales -COOH y -NH₂ en γ -PGA y PAAm, respectivamente; nos permite sugerir la existencia de interacción mediante puentes de hidrógeno.

En el análisis por TMA se encontró que los hidrogeles con mayor contenido de γ -PGA al ser sometidos al proceso de calentamiento con aplicación de carga constante pierden el agua mas rápidamente en comparación a los hidrogeles con menor contenido de γ -PGA, lo que puede atribuirse al mayor contenido de agua dentro del hidrogel.

En la determinación de la resistencia a la compresión de los hidrogeles, se encontró que en general la PAAm presenta mayor resistencia mecánica en comparación a las redes semi-interpenetradas, lo que puede ser atribuido a la rigidez del gel de PAAm; sin embargo, las semi-IPNs presentaron mayor capacidad de deformación a la ruptura en comparación a la PAAm, este comportamiento puede ser atribuido a la mayor flexibilidad de las semi-IPNs lo que les permite deformarse mas fácilmente.

Se analizó el efecto de la temperatura y pH sobre las cinéticas de hinchamiento de las semi-IPNs. En estas pruebas se encontró un aumento en los valores de hinchamiento, relacionado con el incremento del tiempo de contacto con el medio de hinchamiento, contenido de γ -PGA en la semi-IPN, temperatura y pH.

En este trabajo se llevó a cabo la modificación del γ -PGA con amino β -ciclodextrinas (β -CDNH₂), lo cual fue demostrado mediante RMN-¹H y RMN-¹³C. Se analizó la estabilidad térmica del γ -PGA modificado mediante análisis termogravimétrico, donde el γ PGA - amino β CD (γ PGA- β CDNH) presentó una estabilidad térmica intermedia entre los componentes individuales. Por otra parte, se elaboraron hidrogeles de PAAm/ γ PGA- β CDNH con la finalidad de estudiar el efecto de la temperatura y pH sobre las cinéticas de hinchamiento de estos hidrogeles, de este estudio se infiere que estos hidrogeles no presentan sensibilidad ante cambios de temperatura y pH, lo que se puede atribuir al bloqueo parcial de los grupos carboxilos del γ -PGA.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad los materiales poliméricos han alcanzado gran importancia dentro del mercado mundial, ya que cubren diferentes necesidades tanto de la vida cotidiana como a nivel industrial. Los polímeros son utilizados diariamente debido a que pueden encontrarse como parte de los utensilios de cocina, en aparatos electrodomésticos, en juguetes, equipos de oficina, en autos; así como en el área de la medicina, donde se utilizan en la elaboración de prótesis, músculos, en liberación controlada de fármacos, entre otros. Para éstas últimas aplicaciones en medicina se está estudiando ampliamente el uso de hidrogeles poliméricos, debido a que estos materiales pueden ser hinchados en soluciones acuosas y de esta manera son mas compatibles con los tejidos vivos.

Los hidrogeles son un tipo de material polimérico que consta de redes poliméricas entrecruzadas hinchadas en agua o fluidos biológicos¹⁻⁴. Se han llevado a cabo numerosos estudios basados en hidrogeles, los cuales se caracterizan por su sensibilidad ante cambios ambientales tales como pH, temperatura, campos electromagnéticos, fuerza iónica, entre otros, mostrando cambios rápidos de hinchamiento y sinéresis. Con base en estas propiedades, los hidrogeles poliméricos han sido objeto de estudio para la obtención de materiales con aplicación en campos de bioingeniería, biotecnología, medicina, farmacia, agricultura, industria alimenticia, entre otros 5,6 . Entre este tipo de materiales inteligentes, los hidrogeles sensibles a cambios de pH y temperatura son los que más ampliamente han sido estudiados. En este sentido se ha realizado investigación donde se combinan las sensibilidades del pH y la temperatura. mediante copolimerización de dos monómeros o mediante la formación de redes poliméricas interpenetradas. Es así como se han reportado numerosos trabajos basados en la preparación de hidrogeles de redes poliméricas interpenetradas (IPNs), cuya finalidad radica en la obtención de un material con propiedades de hinchamiento características de los hidrogeles, aunado a mejores propiedades mecánicas. Entre las redes que forman las IPNs no hay formación de enlaces covalentes, cada red mantiene sus propiedades, pero sí se puede variar de forma independiente la proporción de cada red^{3, 7-9}.

La poliacrilamida (PAAm) es uno de los principales polímeros estudiados en este tipo de sistemas, debido a que presenta buenas propiedades de hinchamiento^{8, 9}. Por otra parte, en el Departamento de Biopolímeros de esta institución se ha trabajado en la obtención del

biopolímero poli(ácido- γ -glutámico) (γ -PGA), a partir de un método biológico. De esta manera surgió la inquietud de combinar ambos polímeros, y llevar a cabo un estudio de preparación de hidrogeles de IPNs basadas en PAAm/ γ -PGA.

Como se mencionó anteriormente, en la literatura se encuentran citados una gran cantidad de estudios basados en la preparación de IPNs con PAAm, en estos trabajos se reportan buenas propiedades mecánicas y de hinchamiento para estos sistemas. Por otra parte, al incluir el biopolímero y-PGA en estos sistemas se adicionan propiedades como biodegradabilidad y biocompatibilidad; además en la bibliografía se han reportado muy pocos trabajos donde se utilice un biopolímero para la preparación de IPNs. De igual manera los trabajos citados en la bibliografía referentes al y-PGA se fundamentan únicamente en la preparación de hidrogeles, como se muestra en los trabajos realizados por H. J. Choi y col.¹⁰ donde se obtuvieron hidrogeles del γ -PGA mediante irradiación γ , los cuales presentaron buenas propiedades de hinchamiento e hidrodegradabilidad a 100 °C durante una hora en agua; M. Kunioka y col.¹¹ reportaron la elaboración de hidrogeles de γ -PGA y Poly(ε -lisina) mediante irradiación y, estos hidrogeles presentaron buena sensibilidad al cambio de pH sobre sus propiedades de hinchamiento; D. González y col.¹² reportaron la elaboración de hidrogeles de y-PGA el cual fue entrecruzado mediante el uso de dihalogenoalcanos, estos hidrogeles también presentaron sensibilidad hacia cambios de pH. Con base en lo anterior, la elaboración de redes semi-interpenetradas (semi-IPNs) utilizando y-PGA como polímero lineal representa una relevante importancia ya que permite obtener un material con las propiedades mecánicas y de hinchamiento características de las IPNs, así como biodegradabilidad y biocompatibilidad representativa de los biopolímero, esto aunado al carácter hidrófilo del γ -PGA lo que favorece las propiedades de hinchamiento del material. Por otra parte el γ -PGA contiene grupos carboxilo libres (sin reaccionar), mediante los cuales se pueden unir determinadas sustancias químicas, ampliando de esta manera el potencial de aplicaciones. Entre las aplicaciones potenciales de estos materiales se encuentra la liberación controlada de fármacos, liberación controlada de pesticidas, switches electrónicos e inmovilización de células y enzimas, así como en ingeniería de tejidos.

En el presente trabajo se reportan los resultados obtenidos en la síntesis de hidrogeles de semi-IPNs basados en PAAm/γ-PGA elaborados con variación en la proporción de los

componentes, donde se utilizó γ -PGA de masa molecular correspondiente a 83200 y 155800 g/mol, Así como los resultados obtenidos en la caracterización mediante análisis por microscopía óptica, microscopía de fluorescencia láser confocal, microscopía electrónica de barrido, espectroscopia de infrarrojo, análisis termomecánico y análisis termogravimétrico. Así mismo, se estudió del efecto del contenido de γ -PGA en la red semi-interpenetrada sobre la cinética de hinchamiento en agua, así como el efecto de la temperatura y pH en el equilibrio de hinchamiento. Finalmente se reporta la funcionalización del γ -PGA con β -CDNH₂, incluyendo su caracterización. Esta última parte se propone como un paso previo que permitirá utilizar la β -CD como molécula huésped de otras biomoléculas con uso potencial en la liberación controlada de fármacos.

II. ASPECTOS TEÓRICOS

2.1. Geles basados en polímeros

Los polímeros son aptos para llevar a cabo la formación de geles gracias a su estructura comprendida por largas cadenas. La flexibilidad de estas cadenas hace posible que se deformen para permitir la entrada de moléculas de disolvente dentro de su estructura tridimensional¹³.

Un gel es una red tridimensional constituida de elementos básicos interconectados en alguna forma e hinchada en un disolvente. Como regla, los geles son sistemas en los cuales el disolvente representa el componente mayor ¹⁴. Los geles se pueden clasificar en dos tipos, en función de la naturaleza de las uniones de la red tridimensional que los constituyen:

Geles físicos. Presentan una red tridimensional formada por uniones que no son completamente estables a ciertos cambios físicos (pH, temperatura, etc), sino que están asociadas a una formación y disociación de enlace, que se puede dar en los dos sentidos. Generalmente, las uniones son del tipo de van der Waals y puentes de hidrógeno, estos tipos de uniones son mucho mas débiles que las uniones covalentes. En la Figura 2.1a se esquematizan este tipo de interacciones.

Geles químicos. Son aquéllos en los que la red está formada a través de enlaces covalentes. Este tipo de enlace es muy fuerte y su ruptura conduce a la degradación del gel. Por este motivo se dice que los geles químicos no son reversibles con la temperatura, una vez rotos los enlaces no se pueden volver a formar. Este tipo de enlace da lugar a un proceso conocido como gelación fuerte¹³. En la Figura 2.1b se representa este tipo de enlace.



Figura 2.1. Tipos de enlaces en geles. a) Geles físicos, b) Geles químicos

Los geles son intermediarios importantes en la fabricación de polímeros tales como caucho, películas y membranas. Son utilizados como un absorbente en pañales, para purificación del agua, y en cromatografía y electroforesis, donde las moléculas son separadas de acuerdo a su velocidad con que pasan a través de los poros o son expulsadas por los mismos. Los geles son ampliamente usados como implantes en cirugía plástica, en lentes de contacto suaves, liberación controlada de fármacos, músculos artificiales, etc¹⁵.

La red polimérica de un gel puede ser formada por varios caminos; entre los que se encuentran, la formación del entrecruzamiento a partir de la polimerización del monómero, donde la red es formada por polimerización de unidades bifuncionales y unidades polifuncionales como se muestra en la Figura 2.2, donde se puede apreciar que las unidades bifuncionales son conectadas para formar largas cadenas, y las unidades polifuncionales actúan como entrecruzantes (Figura 2.2a), así como la formación de la red polimérica

mediante entrecruzamiento de las cadenas de polímero, las cuales son formadas desde unidades bifuncionales (Figura 2.2b). Los geles son también clasificados por la fuerza de los entrecruzamientos¹⁵.



Figura 2.2. Formación de la red. a) entrecruzamiento a partir de la polimerización del monómero, b) entrecruzamiento del polímero

2.2 Hidrogeles

No existe una definición precisa del término hidrogel; la descripción más común se refiere a estos como materiales poliméricos entrecruzados en forma de red tridimensional de origen natural o sintético, formadas por polímeros o copolímeros de monómeros hidrófilos. Estos materiales se hinchan al contacto con el agua, formando materiales blandos y elásticos, que retienen una fracción significativa de la misma en su estructura sin disolverse, ^{2-4, 16, 17}.

Los hidrogeles se caracterizan por su hidrofilicidad e insolubilidad en agua, alto contenido de agua, permeabilidad hacia una gran variedad de moléculas, incluyendo

macromoléculas, y por su buena biocompatibilidad. La hidrofilicidad se debe a la presencia de grupos solubles en agua tales como –OH, -COOH, -CONH-, -SO₃H, entre otros. La insolubilidad y la estabilidad de la forma del hidrogel se deben a la presencia de la red tridimensional. El alto contenido de agua en el hidrogel puede contribuir con su compatibilidad con los tejidos naturales ^{15, 18}.

Los hidrogeles pueden clasificarse de varias formas, dependiendo de las características y propiedades que se tomen como referencia¹⁹. Con base en la naturaleza de los grupos laterales, pueden clasificarse en neutros o iónicos (aniónicos, catiónicos, anfolíticos). De acuerdo a sus características mecánicas y estructurales, se pueden clasificar en redes afines o redes fantasmas. Dependiendo del método de preparación, en red homopolimérica, copolimérica, o red polimérica interpenetrada²⁰. Finalmente, pueden clasificarse con base en la estructura física de la red en hidrogeles amorfos, semicristalinos, estructuras por enlaces de hidrógeno y agregados hidrocoloidales²¹.

2.2.1 Hidrogeles como materiales inteligentes

Los hidrogeles basados en polímeros presentan un potencial muy prometedor como materiales inteligentes, ya que muestran cambios estructurales y físicos ante ciertas condiciones externas, entre las que se incluyen, temperatura, pH, campo eléctrico, iones ó ciertas especies químicas, fuerza iónica, componentes del solvente, radiación electromagnética y/ó estímulo fotoeléctrico, entre otros^{7, 18}. Las dos primeras condiciones externas son las que han tenido mayor relevancia en su estudio debido a la importancia de ambas variables en sistemas fisiológicos, biológicos y químicos. Enseguida se detalla la sensibilidad de los hidrogeles ante cada uno de estos factores externos.

 Sensibilidad al pH. El cambio del pH del medio de hinchamiento induce cambios en el grado de ionización correspondiente a los grupos funcionales libres en la cadena polimérica y, por lo tanto un cambio en la capacidad de hinchamiento del hidrogel. Si un gel contiene grupos ionizables, es considerado un gel sensible al pH ya que la ionización se encuentra determinada por el pH. En la Tabla 2.1 se muestran los grupos funcionales más comunes en este tipo de estudio.

Ionización	(Grupos funcional	es sensibles al pl	Η
Aniónicos	-CO0 ⁻	-OPO3 ⁻		
Catiónicos	$-NH_3^+$	-NRH ₂ ⁺	$-NR_2H^+$	$-NR_3^+$

Tabla 2.1. Grupos funcionales más comunes en hidrogeles sensibles al pH.

Las redes poliméricas con estos grupos ionizables experimentan cambios importantes en su comportamiento de hinchamiento al ser sometidos a medios de hinchamiento con diferentes pHs.

Los geles que contienen grupos funcionales como ácidos carboxílicos aumentan su ionización al aumentar el pH, con lo cual se incrementa el número de cargas en la red polimérica, provocando de esta manera un incremento de las repulsiones electrostáticas entre las cadenas. Esto produce un aumento en la hidrofilia de la red y, de esta manera, un mayor hinchamiento del material.

En cambio, los geles que contienen grupos funcionales como aminas incrementan su ionización con la disminución del pH del medio de hinchamiento lo que provoca un incremento en su capacidad de hinchamiento, atribuida a las repulsiones electrostáticas¹³.

 Sensibilidad a la Temperatura. La transición de fase en volumen (cambios de hinchamiento) de un gel termosensible se publicó por primera vez por Hirokawa y Tanaka en 1984 para geles de N-isopropilacrilamida (NIPA) en agua²².

El cambio de volumen producido en los geles termosensibles se encuentra basado en la temperatura de miscibilidad crítica inferior (LCST) de la cadena de polímero o copolímeros^{23, 24}. En esencia, ciertos polímeros con determinada composición y densidad de entrecruzamiento pueden hincharse en agua a temperatura ambiente y colapsar cuando alcanzan el valor de la LCST. Los hidrogeles que contienen N-isopropilacrilamida (NIPA) se encuentran dentro de este tipo de materiales. Los cambios de hinchamiento en estos geles son atribuidos al

cambio en el balance entre los diferentes tipos de interacciones que existen dentro de la red polimérica, especialmente los puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas²⁵.

- Sensibilidad al cambio de la composición del disolvente. Algunos geles experimentan transiciones de fases al variar la composición del disolvente. Este tipo de comportamiento se observa en el hinchamiento de geles de NIPA y acrilamida en mezclas de DMSO y agua (Hirokawa y col., 1984)²⁶.
- Sensibilidad a la ionización por iluminación con luz ultravioleta. Existen geles que en ausencia de la radiación ultravioleta sufren un cambio de volumen continuo, mientras que en presencia de radiación ultravioleta muestran una transición en fase de volumen. A una temperatura determinada los geles se hinchan discontinuamente en respuesta a la exposición a radiación ultravioleta y se colapsan cuando dejan de ser irradiados, este efecto se observó en geles de copolímeros de N-isopropilacrilamida (NIPA) y moléculas fotosensibles (V. Sáez y col., 2003)¹³.
- Sensibilidad al calentamiento local por iluminación con luz visible. Este efecto se manifiesta mediante un incremento de la temperatura dentro de un gel termosensible. En un estudio realizado con un gel de NIPA y el cromóforo clorofila se encontró que, en ausencia de luz, el gel cambiaba de volumen de forma continua al variar la temperatura, mientras que en presencia de iluminación la temperatura de transición disminuye y a un determinado umbral de irradiación la transición de fase de volumen se hace discontinua. En este caso, se propone que la transición de fase es inducida por un calentamiento local de las cadenas de polímero, debido a la absorción y la consiguiente disipación térmica de la energía luminosa del cromóforo¹³.
- Sensibilidad al campo eléctrico. El efecto de la aplicación de campos eléctricos en los procesos de hinchamiento fue conocido desde antes de que se descubriera la transición de fase²⁷. En un estudio realizado en tres tipos de geles aniónicos, aplicados en la liberación de fármacos eléctricamente modulada, se observó que la intensidad de la corriente eléctrica y la composición del gel influían en el mecanismo de liberación²⁸.

En geles de poliacrilamida hinchada en mezclas de acetona/agua se encontró el efecto de transición de fase al aplicar el campo eléctrico; el efecto más importante se atribuye a la migración y redistribución de los iones y contraiones añadidos dentro del gel^{13,29}. Por otra parte, se han sintetizado geles de polielectrolitos conjugados con polímeros conductores sensibles al campo eléctrico que ofrecen, además, posibilidades sustanciales en el control de la acción mecánica, de tal manera que el material sea capaz de contraerse y relajarse de forma reversible ante estímulos eléctricos con tiempo y fuerzas de contracción similares a las de los músculos de los organismos vivos³⁰. Por esta razón a estos materiales se les conoce como músculos artificiales,

Sensibilidad a reacciones bioquímicas. Un gel puede presentar un cambio en su estado de hinchamiento al estar en contacto con elementos bioquímicamente activos, tales como enzimas o receptores, donde el elemento activo puede formar un complejo, el cual altera el equilibrio del gel induciendo la transición de fase de hinchamiento o el colapso^{31, 32}.

2.2.2 Transición de fase de volumen en hidrogeles

El estudio de las transiciones de fase en volumen se inició mediante una predicción teórica donde se sugirió la posibilidad de un cambio de volumen discontinuo en el gel, basándose en la analogía de la transición ovillo-glóbulo de polímeros en solución³³. Finalmente la transición de fase en volumen fue descubierta experimentalmente por Tanaka y col. en 1978, en un hidrogel de poliacrilamida parcialmente ionizada en una mezcla de acetona/agua. La transición significa que un cambio infinitesimal de una variable intensiva del medio, como puede ser la composición del disolvente, temperatura, potencial químico, pH, entre otros, puede desencadenar un cambio apreciable de las propiedades extensivas del material, como es el volumen³⁴⁻⁴³.

Un hidrogel puede cambiar su estado drásticamente, de manera similar como un gas cambia su volumen. La Figura 2.3 muestra esquemáticamente los dos posibles estados de un

hidrogel, el colapsado y el hinchado, los cuales corresponden a los estados líquido y gaseoso de los fluidos, respectivamente¹³.



Figura 2.3. Estados colapsado e hinchado de un gel

El estado de hinchamiento es el resultado del balance entre las fuerzas cohesivas y dispersivas intermoleculares que actúan en las cadenas hidratadas. Las fuerzas cohesivas son principalmente debidas a entrecruzamientos covalentes, dando lugar a la formación de hidrogeles químicos, por otra parte pueden ser atribuidos a fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas o fuerzas dipolo-dipolo, correspondientes a hidrogeles físicos. Las fuerzas dispersivas se atribuyen, en parte, a una repulsión entre los iones fijos de la red, provocando el hinchamiento del material¹⁰. La forma no hidratada se denomina xerogel⁴⁴.

En general, existen cinco interacciones moleculares fundamentales que hacen posible la transición de fase: fuerzas de van der Waals, interacciones hidrófobas, electrostáticas, enlaces de hidrógeno y transferencias de carga. En el caso de los geles se han estudiado mas intensamente las primeras cuatro interacciones, las cuales se muestran en el esquema de la Figura 2.4. Estas interacciones determinan el comportamiento de fases, la configuración y la reactividad química de las moléculas¹³.



Figura 2.4. Representación esquemática de las cuatro interacciones responsables del comportamiento de la transición de fase en geles.

Enseguida se describe brevemente la acción de cada una de estas interacciones en los estudios de las cinéticas de hinchamiento en hidrogeles:

- Fuerzas de van der Waals. En un gel de acrilamida parcialmente ionizado en mezclas de agua/acetona, la principal afinidad polímero-polímero es debida a este tipo de interacción. La acetona se agrega al agua para incrementar las interacciones atractivas entre los polímeros. A temperatura alta el gel se hincha y a temperaturas bajas se deshincha³⁵, (Figura 2.4a).
- Interacción hidrófoba. Las moléculas de agua vecinas a las cadenas hidrófobas de polímero tienen muchos enlaces de hidrógeno y forman unas estructuras ordenadas, llamadas icebergs, las cuales son similares a la estructura de las moléculas de agua en el hielo. Después de la formación del iceberg, disminuyen tanto la entalpía como la

entropía de la mezcla, siendo este proceso exotérmico¹³. Aunque la energía de la interacción hidrófoba es muy pequeña juega un papel muy importante en la estabilización de la configuración de los biopolímeros. En los polímeros sintéticos estas interacciones se pueden controlar sustituyendo el grupo lateral de la cadena polimérica que forma la red, (Figura 2.4b).

- Enlace de hidrógeno. Este tipo de interacción se presenta cuando existe un átomo de hidrógeno localizado entre dos átomos próximos con alta electronegatividad, entre los que se encuentran, oxígeno y nitrógeno. Los efectos de este tipo de interacción en los estudios de transición de fase fueron demostrados en una red interpenetrada basada en poli(ácido acrílico) y (poliacrilamida), donde se encontró que el hidrogel se comprimía a bajas temperaturas mientras que su volumen se incrementaba a medida que lo hacía la temperatura, este efecto ha sido explicado mediante la formación y disociación de puentes de hidrógeno a bajas y altas temperaturas, respectivamente. La disociación de puentes de hidrógeno formado entre ambas cadenas poliméricas favorece al estado hinchado del hidrogel, (Figura 2.4c)^{13, 31}.
- Interacción electrostática. Este tipo de interacción es inversamente proporcional a la constante dieléctrica del medio. Debido a que las cargas presentes en las cadenas poliméricas no pueden desplazarse, los contraiones tienden a estar localizados cerca de ellas para mantener la electroneutralidad del sistema, lo cual provoca la formación de un potencial de Donan entre el interior y el exterior del gel, prevaleciendo la presión osmótica, por lo que el hidrogel se hincha. En estudios basados en diferente pH, se ha encontrado que a pH neutro los hidrogeles se comprimen, mientras que a pHs ácidos o básicos los hidrogeles se hinchan. Por lo que deduce que a pH neutro todas las cargas están ionizadas y se atraen unas con otras de manera que el gel se comprime; en cambio, si una de las cargas está neutralizada y la otra está ionizada el hidrogel tiende a hincharse⁴⁵, (Figura 2.4d).

2.2.3 Propiedades de los hidrogeles

En general, las propiedades de un hidrogel se encuentran basadas en su estructura molecular, y en el método de síntesis mediante el cual fue obtenido. De igual manera, existen una serie de propiedades muy importantes derivadas de la situación de hinchamiento del hidrogel⁴⁶⁻⁴⁸. Los aspectos más importantes se analizarán a continuación.

2.2.3.1 Contenido de agua en el equilibrio

Los sistemas basados en hidrogeles son muy populares debido a la estructura única que poseen, la cual les permite un gran hinchamiento en presencia de agua, logrando conservar su forma original.

El contenido de agua en el equilibrio de un hidrogel depende principalmente de la naturaleza del monómero o monómeros hidrófilos que lo forman, tipo y densidad de entrecruzamiento, entre otros factores tales como , temperatura, fuerza iónica y pH del medio de hidratación¹⁷.

El comportamiento de hinchamiento es una parte integral del comportamiento físico de los hidrogeles. Desde su preparación, deben estar en contacto con el agua para obtener la estructura solvatada final, el hidrogel obtenido puede someterse a un proceso de hinchamiento en agua; ó ser primeramente secado y luego someterse al proceso de hinchamiento en agua. La Figura 2.5 indica los dos posibles procesos de hinchamiento de los hidrogeles..



Figura 2.5. Proceso de hinchamiento a partir del estado seco y parcialmente hinchado.

La habilidad que tienen para absorber agua y iones sin perder su forma original y sin utilizar esfuerzo mecánico resulta muy valiosa para muchos hidrogeles naturales como es el caso de los que se encuentran en músculos, tendones y cartílago¹⁵.

Los distintos estados físicos en que se encuentran las moléculas de agua dentro de la red polimérica son un aspecto importante para comprender los procesos de difusión de solutos a través de un hidrogel. En hidrogeles el agua se presenta en diferentes estados físicos como consecuencia de las distintas formas de interacción que se pueden presentar entre el agua y las cadenas poliméricas. El primero consiste en un estado de agua fuertemente asociada a la matriz polimérica mediante enlaces de hidrógeno y un segundo estado de agua con un alto grado de movilidad y que no se ve afectada por el entorno polimérico, ésta se conoce como agua libre. La proporción entre estos tipos de agua es atribuida principalmente al contenido de entrecruzante del polímero^{49,50,51}.

El agua enlazada juega un papel importante en diferentes procesos biológicos, contribuyendo a la estabilización conformacional de las proteínas e influyendo en la actividad enzimática y procesos de liberación controlada. Hasta hace poco, se consideraba que el agua enlazada se encontraba sólo formando parte de interacciones mediante puentes de hidrógeno con grupos polares del polímero. Sin embargo, mediante el empleo de técnicas calorimétricas y espectroscópicas, recientemente se ha demostrado que ésta también puede estar formanado parte de "nanocavidades", con una movilidad muy diferente a la del agua libre. De acuerdo con lo anterior, el agua enlazada por puentes de hidrógeno es sólo uno de los estados físicos del agua en los retículos poliméricos⁵¹.

El agua libre ocupa los espacios entre las cadenas poliméricas y su proporción es uno de los factores que determina la difusión de solutos a través de estos materiales⁵².

La cantidad de agua retenida dentro del hidrogel al alcanzar el equilibrio, puede ser expresada de distintas maneras, como se muestra en las siguientes ecuaciones^{13, 53}:

• Porcentaje de agua en peso

$$W = \frac{peso \ húmedo - peso \ sec \ o}{peso \ húmedo} X \ 100$$

Porcentaje de hidratación o índice de hinchamiento en peso

$$H = \frac{peso \ húmedo - peso \ sec \ o}{peso \ sec \ o} \ X \ 100$$

• Grado de hinchamiento en peso

 $D_h = \frac{peso \ húmedo}{peso \ sec \ o}$

2.2.3.2 Estabilidad dimensional

Tanto el hinchamiento lineal como el hinchamiento en volumen dependen de la cantidad de agua absorbida, por lo tanto, cualquier fenómeno que dé lugar a cambios en el contenido de agua absorbida dará lugar a cambios dimensionales. Tomando en consideración que el contenido de agua absorbida depende de la estructura del material, la composición del hidrogel tendrá un importante efecto sobre la estabilidad del mismo⁵⁴. Entre los factores ambientales que pueden provocar cambios dimensionales en los hidrogeles se encuentran la temperatura, pH, fuerza iónica, campos electromagnéticos, entre otros. Los cambios dimensionales atribuidos al cambio de temperatura se basan en la formación y disociación de puentes de hidrógeno entre las cadenas poliméricas a baja y alta temperatura, respectivamente. La disociación de los puentes de hidrógeno favorece el hinchamiento del material. Por otra parte, el cambio del pH de la solución de hinchamiento provoca cambios dimensionales en los hidrogeles debido a la ionización de los grupos funcionales de las cadenas poliméricas, de esta manera se provoca la repulsión o atracción de las cadenas poliméricas favoreciendo el hinchamiento o compresión de los hidrogeles.

El poli(HEMA) es un hidrogel extremadamente estable, por lo que las variaciones en temperatura, pH y tonicidad tienen relativamente pequeños efectos sobre su contenido de agua⁵⁴.

En general, los hidrogeles muestran algunos pequeños decrementos en el contenido de agua cuando la solución en que se encuentran hinchados cambia de agua pura a solución salina isotónica. Sin embargo, las variaciones causadas por cambios del pH son mucho más grandes y dependientes del monómero⁵⁴.

2.2.3.3 Humectabilidad superficial y tensión superficial crítica.

Las propiedades superficiales de un material son importantes para establecer su biocompatibilidad. La humectabilidad superficial es obtenida mediante la determinación de la tensión superficial crítica, y ésta, a su vez, se determina midiendo el ángulo de contacto de un

Aspectos teóricos

liquido con la superficie. La medida del ángulo de contacto de una serie de líquidos con diferente tensión superficial conduce a la determinación de la tensión superficial crítica. ^{54, 55}.

Las propiedades humectantes de las lentes de contacto son importantes, ya que se requiere de la formación de una película lacrimal sobre la cornea en forma de una capa muy delgada, esto ha sido ampliamente reconocido como un requerimiento primario para la compatibilidad fisiológica entre las lentes y el paciente. En términos cuantitativos, las características de superficie necesarias para producir este comportamiento han sido determinadas utilizando el criterio de la tensión superficial crítica.

2.2.3.4. Permeabilidad al oxígeno.

La velocidad de transporte de compuestos de bajo peso molecular a través de hidrogeles es un importante parámetro para muchas aplicaciones. De esta manera, la permeabilidad de los hidrogeles hacia el oxígeno es de gran importancia en aplicaciones de lentes de contacto¹³.

Se debe distinguir entre la permeabilidad de una película expuesta a gases y la permeabilidad de una película expuesta a líquidos que la humedecen. En el caso de los hidrogeles, se mide la permeabilidad del oxígeno disuelto en agua en lugar de la permeabilidad al oxígeno gaseoso. Uno de los principales requerimientos en la aplicación de lentes de contacto es que el oxígeno llegue a la cornea, por lo tanto la permeabilidad de los hidrogeles hacia el oxígeno es de gran importancia en aplicaciones de lentes de contacto.¹³.

En los hidrogeles la permeabilidad al oxígeno se encuentra regida por el contenido de agua en el equilibrio. En hidrogeles con un contenido de agua menor o igual al 30 %, la permeabilidad del oxígeno se basa en la estructura polimérica que condiciona la proporción de agua unida y de agua libre. En cambio en hidrogeles con contenido de agua mayor al 30 %, la permeabilidad del oxígeno se encuentra en proporción logarítmica al contenido de agua del hidrogel^{54, 56, 57}.

2.2.3.5 Permeselectividad

Las membranas de hidrogeles se preparan mediante la polimerización de los monómeros en ausencia de agentes entrecruzantes. El polímero obtenido en solución forma películas que posteriormente se entrecruzan térmica o fotoquímicamente. Las membranas obtenidas de esta manera presentan una baja tensión superficial con los fluidos acuosos o biológicos y su contenido en agua asociada permite controlar la permeabilidad. El transporte de iones a través de la membrana no sólo depende de su tamaño, sino del contenido de agua que es el factor que condiciona el tamaño de poro. Tomando en consideración que el contenido de agua depende de la estructura molecular, se pueden elaborar membranas con distinto tamaño de poro que permitan de esta manera, el paso selectivo de diferentes iones individuales como pueden ser K^+ , Na⁺ y Ca^{++ 54}.

2.2.3.6 Propiedades ópticas

El índice de refracción de los hidrogeles depende de su composición química, del grado de hinchamiento y de la naturaleza del disolvente que produce el hinchamiento.

Cuando la mezcla monomérica se polimeriza en presencia de una elevada cantidad de un disolvente con bajo poder de solvatación, se produce la separación de fases y el gel que se obtiene es heterogéneo, éste presenta regiones con diferente índice de refracción, y por lo tanto es un gel turbio. Por otra parte, un gel originalmente homogéneo puede convertirse en un gel con turbidez cuando el poder solvatante del disolvente que hincha el gel se empobrece. Este empobrecimiento del poder solvatante puede deberse a variaciones de temperatura o al intercambio de un buen disolvente por otro de menor poder solvatente¹⁶.

2.2.3.7 Propiedades mecánicas

La resistencia mecánica representa la capacidad de un material para soportar la acción de una fuerza sin romperse y generalmente se caracteriza por el esfuerzo que induce dicha ruptura. La respuesta de un material a la acción de una fuerza puede oscilar entre dos comportamientos extremos:

- Viscoso: Toda la fuerza aplicada al cuerpo lo deforma, y al dejar de actuar, permanece la deformación. La energía suministrada se pierde en forma de calor.
- Elástico: Una vez que cesa la aplicación de la fuerza, desaparece la deformación inducida, recuperándose el trabajo realizado.

Los materiales poliméricos poseen la capacidad de sufrir deformaciones temporales cuando se les aplica un esfuerzo externo, y dicha deformación desaparece cuando el esfuerzo cesa. A este comportamiento se le denomina elasticidad y está relacionado con la flexibilidad molecular de los polímeros. Cuando el material se encuentra entrecruzado formando una malla o red tridimensional, puede resistir esfuerzos mucho mayores sin perder su forma original, puesto que los enlaces intermoleculares evitan el desplazamiento de unas cadenas con respecto a otras, a estos materiales se les conoce como elastómeros.

Un hidrogel hinchado es un material blando que presenta baja resistencia a la tracción y al desgarre. El comportamiento elástico y la rigidez de los hidrogeles depende de su estructura molecular, densidad de entrecruzamiento, formación de enlaces covalentes y de las fuerzas de interacción iónica, polares y/o estéricas. Las propiedades mecánicas de un hidrogel se mejoran cuando el monómero tiene la capacidad de formar puentes de hidrógeno, aunque esto le provoque mayor sensibilidad hacia los cambios de temperatura y pH del medio¹³.

Las propiedades mecánicas de un hidrogel pueden ser controladas por tres diferentes vías:

- Alterando la composición monomérica del polímero, con sólo aumentar la cantidad relativa del componente hidrófobo se aumentará la fuerza mecánica del producto final.
- Aumentando o disminuyendo la densidad de entrecruzamiento, la fuerza mecánica aumenta drásticamente cuando se incrementa la densidad de entrecruzamiento.
- Variando las condiciones bajo las que el gel es sintetizado, como el tiempo de reacción, temperatura, cantidad y tipo de disolvente, teniendo en cuenta que cualquier cambio en el polímero afecta no sólo a las propiedades mecánicas de un hidrogel sino también a otros tipos de comportamiento del material.

2.2.3.8 Biocompatibilidad

En el campo de los polímeros el término biocompatibilidad se refiere a dos aspectos diferentes pero que se encuentran directamente relacionados:

- La elevada tolerancia que muestran los tejidos hacia el agente extraño, fundamentalmente cuando el polímero va a ser implantado.
- La estabilidad química y, especialmente, física del material polimérico durante el tiempo en que se encuentre en contacto con el organismo.

Desde que los hidrogeles se introdujeron en el campo de la biomedicina, ha quedado demostrado que poseen un gran potencial como biomateriales, debido a su buena biocompatibilidad. Esta propiedad se debe a que las propiedades físicas de los hidrogeles se asemejan a las de los tejidos vivos mas que cualquier otra clase de biomateriales sintéticos, particularmente, en lo referente a su alto contenido en agua, consistencia blanda y baja tensión superficial^{16, 58, 59}. En aplicaciones biomédicas, el agua libre actúa como un plastificante, un medio de transporte en la matriz polimérica para solutos disueltos en ella, como puede ser oxígeno o fármacos, y un puente entre las muy distintas energías superficiales de los hidrogeles sintéticos y los fluidos corporales⁴⁹. El alto contenido de agua en los tejidos biológicos, y la forma de organización molecular de la misma, hace pensar que la estructura organizada del agua en los geles (agua asociada) posee una gran influencia en una amplia variedad de las propiedades de los hidrogeles, entre las que se encuentran, coeficientes de permeabilidad y difusión, interacción con proteínas plasmáticas y biocompatibilidad con la sangre y con los tejidos⁶⁰.

Los hidrogeles se consideran biocompatibles cuando al entrar en contacto con fluidos corporales y tejidos, estos materiales no cambian sus propiedades físicas, químicas y mecánicas; además, no deben dañar los tejidos ni causar reacciones tóxicas o alérgicas, ni provocar la formación de tumores; no han de destruir las enzimas y proteínas plasmáticas, ni los elementos de la sangre; no deben reducir los electrolitos de los tejidos o interferir en el metabolismo de los mismos; y por último, los hidrogeles no deben deteriorarse durante la esterilización con el resultado de cambios en las características físicas, químicas, mecánicas y superficiales¹³.

2.2.4 Aplicaciones de los hidrogeles

Los hidrogeles son utilizados para mantener la humedad de la tierra de cultivo, como materiales absorbentes, en membranas, recubrimientos, microcápsulas, en la producción de papel, fijación de herbicidas, en cromatografía, como portadores de enzimas, procesamiento de alimentos, tratamiento del aire, como agentes de separación, entre otros. Pero la aplicación mas importante de los hidrogeles corresponde al campo de la biomedicina; en esta aplicación se requiere del cumplimiento de una serie de propiedades, entre las que se encuentran compatibilidad mínima con los tejidos, inalterabilidad frente a los procesos degradativos y resistencia mecánica apropiada para cada uso⁶¹.

2.2.4.1 Lentes de contacto

En esta aplicación se requiere que la lente permita la llegada de oxígeno a la córnea, que el fluido lacrimal forme una película entre la córnea y la lente y, que la lente resista la fuerza del párpado para evitar posibles inestabilidades visuales⁶². Los hidrogeles se clasifican de acuerdo con el contenido de agua, debido a que esta característica condiciona la cantidad de oxígeno que puede difundir. De esta manera, existen geles de baja, media y alta hidratación correspondientes a contenidos de agua de 38 al 45 %, 50 al 60 % y mayor de 70 %, respectivamente.

Las primeras lentes de contacto elaboradas con hidrogeles, se sintetizaron utilizando poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), ligeramente entrecruzado con dimetacrilato de glicol. Actualmente, se elaboran lentes de contacto hechas de un hidrogel que incorpora un análogo sintético de la fosforilcolina y otros que tienen usos terapéuticos contra afecciones tales como: erosión recurrente, úlceras metaherpéticas y otros defectos epiteliales⁶³.

2.2.4.2 Prótesis en tejidos

Las propiedades físicas de los hidrogeles permiten su empleo en prótesis de tejidos blandos. En implantes cerebrales, se han utilizado diferentes hidrogeles que actúan como sustrato para la cura y crecimiento de tejidos, así como en el encapsulamiento, transplante y liberación de células y en la regeneración de axones⁶⁴⁻⁶⁶. En la reproducción de tejido cartilaginoso, en cirugía reconstructiva de la aurícula, se han empleado hidrogeles de alginato y colágeno⁶⁷. El poli (2-hidroxietil metacrilato) (HEMA) se ha utilizado en prótesis de senos presentando ventajas sobre los tejidos grasos que tienden a reabsorberse, y otros materiales sintéticos como las siliconas, ya que los hidrogeles son permeables a los fluidos corporales y no presentan barreras impermeables a los procesos fisiológicos.

Los hidrogeles de poli (alcohol vinílico) y las redes interpenetradas (IPNs), presentan mejores propiedades mecánicas y se han estudiado como posibles sustitutos de los tendones, ligamentos y discos invertebrales⁶⁸.

2.2.4.3 Prótesis de conductos humanos

Los hidrogeles se han utilizado en la fabricación de prótesis de uréter, conductos biliares y esófago. Se emplean también, para encapsular materiales duros poco compatibles debido a su pequeña resistencia al desgarre^{17, 55}.

2.2.4.4 Revestimiento de suturas

Los hidrogeles no han podido ser utilizados en la elaboración de suturas quirúrgicas debido a que no poseen las propiedades mecánicas adecuadas, sin embargo, debido a su biocompatibilidad han sido utilizados como revestimiento de suturas. Los beneficios de este tipo de revestimiento se manifiestan en un mayor crecimiento de las células y en la eliminación de algunos efectos nocivos que producen las suturas tradicionales¹³.

2.2.4.5 Cirugía

Cuando existe desprendimiento de retina, el gel deshidratado se coloca en la cavidad vítrea mediante una pequeña incisión y posteriormente se hincha absorbiendo los fluidos oculares^{55, 17}. Los hidrogeles de PHEMA han sido exitosamente utilizados en cirugía de córnea como queratoprótesis⁶⁹.

También han sido utilizados en la corrección de glaucomas, donde se inserta una tira de hidrogel en la cámara ocular, la cual al hidratarse se hincha y reblandece tapando la incisión quirúrgica, permitiendo, al mismo tiempo, un lento drenaje del fluido ocular, con la consiguiente disminución de la tensión ocular¹³.

Los hidrogeles de gelatina y poli (ácido glutámico) son utilizados como sellantes de los agujeros de aire que comúnmente aparecen en operaciones de tórax y de pulmón¹³.

2.2.4.6 Hemodiálisis

En ésta técnica se utilizan membranas de celulosa regenerada, sin embargo se han ensayado membranas que presentan permeabilidad selectiva, basadas en polímeros y copolímeros de PHEMA, N-vinilpirrolidona, ácido acrílico y acrilonitrilo.

2.2.4.7 Hemoperfusión

Esta técnica requiere de absorbentes biocompatibles que presenten algún grado de especificidad frente a determinadas toxinas de la sangre. Diversos tipos de carbón activado presentan una elevada área superficial y poseen gran capacidad de adsorción de ciertas toxinas, pero presentan baja compatibilidad con la sangre. Para mejorar la biocompatibilidad se han utilizado hidrogeles como material de revestimiento de los granos de carbón activado; los hidrogeles actúan como membranas^{17, 70}.

2.2.4.8 Liberación controlada de fármacos

Los hidrogeles han sido utilizados como vehículos para inmovilizar, encapsular y liberar de manera controlada un gran número de sustancias con actividad fisiológica, tales como, antibióticos, anticoagulantes, antineoplásicos, anticuerpos, anticonceptivos, entre otros^{17, 19}. Muchos de los estudios con hidrogeles se han centrado en la liberación de especies de peso molecular relativamente bajo pero últimamente ha aumentado el interés por componentes macromoleculares como proteínas ⁷¹⁻⁷⁷. En la Tabla 2.2 se presentan algunos ejemplos de los hidrogeles utilizados en la liberación de sustancias.

La incorporación de la sustancia biológicamente activa dentro del hidrogel puede llevarse a cabo de dos formas.

- La primera consiste en la inclusión de la sustancia mediante métodos físicos, para lo cual se introduce el xerogel en soluciones concentradas de la sustancia deseada, una vez que el gel haya alcanzado el equilibrio se procede a evaporar el disolvente. Si el fármaco es estable ante las soluciones de síntesis requeridas, se incluye esta sustancia en la mezcla inicial de polimerización y de esta manera se obtiene directamente de la reacción, el gel cargado con el fármaco^{17, 70}.
- La segunda forma de inclusión del fármaco en el hidrogel se lleva a cabo mediante mecanismos químicos, los cuales consisten en la inmovilización de la sustancia en la matriz del hidrogel mediante la formación de enlaces tipo éster, anhídrido, amida, entre otros. Se aprovecha su hidrólisis en medio acuoso para conseguir una liberación altamente controlada de la sustancia activa.
Tabla 2.2 Ejemplos de sustancias empleadas en liberación controlada e hidrogeles comúnmente utilizados.

HIDROGEL	SUSTANCIA LIBERADA	REFERENCIA
Poli(metacrilato de 2-hidroxietilo)	Ácido salicílico	Pywell y col., 1986 ⁷⁸
PHEMA	Citarabina	Trigo y col., 1994 ⁷⁹
	Cloranfenicol	Yean y col., 1990 ⁸⁰
		García y col, 1994 ⁸¹
	5-Fluorouracilo	Canterella y col., 1993 ⁸²
	Fosfatasa ácida	Bae y col., 1989 ⁸³
	Insulina	Song y col., 1981 ⁸⁴
	Progesterona	De Leede y col., 1986 ⁸⁵
	Teofilina	
Poli(vinil alcohol) PVA	Albúmina	Burczack y col., 1994 86
	Atenolol	Morimoto y col., 1989 ⁸⁷
	Indometacina	Morimoto y col., 1989 88
	Proxifilina	Gander y col., 1989
	Teofilina	Gander y col., 1989 ⁸⁹
Poli(etilenglicol) PEG	Eritromicina	Ates y col., 1994 90
	Proxifilina	McNeil y Graham, 1996 91
	Clorfenamina	Mathir y col., 1997 92
Poli(etilenglicol-co-	Albúmina	Bezemer y col., 2000 93
butilentereftalato) P(EG-BT)		
Poli(acrilamida-co-	Citarabina	Gómez y col., 1998 $_{05}^{94}$
monoalquilitaconato)	5-fluorouracilo	Blanco y col., 1996 93
Poli(metacrilato-co-etilenglicol)	Insulina	Lowman y col., 1999 90
Poli(ácido acrílico) PAA	Estradiol	Balin y col., 1974
	Insulina	Davis y col., 1972 98
Poli(1-vinil-2-pirrilidona) PVP	Maleato de	Lapidus y Lordi, 1968 99
	clorofenilamina	00
	Salicilato sódico	Lapidus y Lordi, 1968 99
Poli(N-isopropil acrilamida) PNIPA	Vitamina B ₁₂	Afrassiabi y col., 1987 ¹⁰⁰
Polímeros de poliéter PE	Cis-platino	Deurloo y col., 1990 ¹⁰¹
Poli(metacrilato de hidroxietilo-co-	Procainamida	Schacht y col., 1985 ¹⁰²
dimetilmetacrilato)		Gyselinck y col., 1983 ¹⁰³
P(HEMA-co-DMM)		

La aplicación de los hidrogeles homopoliméricos o copoliméricos, fundamentada en su propiedad de hinchamiento en agua se ve afectada por sus propiedades mecánicas pobres, por lo tanto se opta por la preparación de redes poliméricas interpenetradas (IPNs), con la finalidad de obtener un material que presente un buen hinchamiento en agua y que a la vez cuente con buenas propiedades mecánicas.

2.3 Hidrogeles de redes poliméricas interpenetradas

La combinación química y física de dos o más polímeros con estructuras diferentes proveen un camino conveniente para modificación de propiedades y de esta manera lograr satisfacer ciertas necesidades específicas¹⁵

La formación de redes poliméricas interpenetradas (IPNs) representa un método conveniente para superar la dificultad que se presenta al mezclar polímeros que son incompatibles químicamente¹⁰⁴.

Las (IPNs) se encuentran constituidas por dos redes coexistentes químicamente diferentes. Muestran una estructura de gran simplicidad que consta de largas cadenas de polímero entrecruzadas, correspondientes a cada especie química¹⁰⁵. Las IPNs no contienen enlaces covalentes entre los dos polímeros; el monómero I reacciona únicamente con moléculas del monómero I, de forma similar sucede para el monómero II, esta interacción se puede apreciar en la Figura 2.6¹⁵.



Figura 2.6. Red polimérica interpenetrada (IPN):.--- polímero I, --- polímero II.

Aspectos teóricos

Si al menos uno de los componentes de la red interpenetrada es hidrofilico, ésta puede formar un hidrogel basado en polímero cuando el agua sea absorbida. La influencia del agua en las propiedades de los hidrogeles es considerada de gran importancia¹⁴.

Estas redes poliméricas interpenetradas pueden sintetizarse por diferentes caminos. (1) Polimerización por interpenetración secuencial (IPNs).

El monómero I es combinado con un agente de entrecruzamiento e iniciador para formar la red; la red I es entonces hinchada en presencia del monómero II con su respectivo agente de entrecruzamiento e iniciador (o bien puede ser un polímero lineal) para formar la red II, Figura 2.7a.

(2) Redes de interpenetración simultánea (SINs)

Son sintetizadas a través de la combinación de dos monómeros o más, cada uno con su respectivo agente de entrecruzamiento e iniciador, para ser polimerizados de manera independiente, en masa, solución ó dispersión, Figura 2.7b.

(3) Redes poliméricas semi-interpenetradas (semi-IPN)

Se forman a través de la síntesis de la red mediante uno solo de los monómeros y el otro únicamente queda como polímero lineal, Figura 2.7c¹⁵.



Figura 2.7. Clasificación de las IPNs en base a su método de síntesis. a) IPN secuencial,
b) IPN simultanea, c) semi-IPN. M=monómero, P=polimerización, X=agente entrecruzante y
C=catalizador

Se han preparado una gran variedad de redes semi-interpenetradas (semi-IPN) mediante la disolución de un polímero lineal presintetizado en un monómero hidrofílico, en presencia de un agente de entrecruzamiento y seguido de la correspondiente polimerización. En esta forma se obtiene una red de un hidrogel alrededor de una cadena primaria de polímero capaz de modificar el comportamiento del hidrogel.

En la Tabla 2.3 se muestra una clasificación de las IPNs basada en el método de síntesis utilizado¹⁵.

Tabla 2.3. Clasificación de las IPNs

Categoría	Definición			
IPN	Cualquier material que contenga dos o mas polímeros en el cual no son inducidos entrecruzamientos entre los polímeros individuales			
IPN secuencial (SIPN)	El polímero A es hinchado en el monómero B, su agente entrecruzador e iniciador, la polimerización de B in situ			
IPN simultanea (SIN)	Los monómeros A y B, y sus respectivos agentes entrecruzadores e iniciadores, son polimerizados simultáneamente sin interferencia			
IPN termoplástica	IPN de dos polímeros en la que los polímeros individuales son termoplásticos; los polímeros pueden contener entrecruzadores físicos, ejemplo, los ionómeros que unen dos o mas cadenas a la vez o pueden ser sistemas simples de polímeros separadores de fase.			
Semi-I IPN	IPN secuencial donde el polímero I es entrecruzado y en polímero II es lineal			
Semi-II IPN	IPN secuencial donde el polímero I es lineal y el polímero II entrecruzado			
Pseudo-IPN	IPN simultanea en la que un polímero está en forma de red, ejemplo, entrecruzado, y el otro lineal			

2.3.1 Morfología de las IPNs

Las IPNs muestran diferentes grados de separación de fase. Las fases varían en tamaño, forma, agudeza en las interfases y grado de continuidad. La morfología de las IPNs, controlada por la orientación molecular, se encuentra relacionada con sus propiedades físicas tales como módulos y transición vítrea, y existe interpenetración de las redes. Los componentes de las IPNs se pueden visualizar por microscopía electrónica de transmisión y de barrido. La morfología es controlada por compatibilidad química (ej. parámetros de solubilidad), tensión interfacial, densidad de entrecruzamiento, cinética de polimerización y tipos de componentes ¹⁵.

Las IPNs presentan un comportamiento mecánico aceptable, su morfología es estable ante cambios ambientales ya que se mantiene fija gracias al entrecruzamiento ¹⁴.

2.3.2 Propiedades físicas de las IPNs

Las propiedades físicas de los polímeros combinados dependen de las propiedades de los polímeros individuales, así como del camino mediante el cual son combinados.

Las IPNs exhiben mejores propiedades mecánicas que las mezclas constituidas por los mismos polímeros. Esto se atribuye al alto grado de interpenetración y a la buena compatibilidad, con lo que se obtiene un mayor grado de mezclado y una mayor adhesión entre las fases dispersa y continua, por lo que estos materiales presentan un esfuerzo tensil significativamente mas alto que el que corresponde a cada polímero constituyente ^{15, 104}.

El análisis termogravimétrico (TGA) muestra que las IPNs independientes de su composición, cuentan con mejores propiedades térmicas que los homopolímeros correspondientes ¹⁵.

En los materiales poliméricos la Tg se entiende como una temperatura de transición cristalino-elástico, dependiente de la naturaleza química del polímero. Este concepto se aplica en materiales mayoritariamente amorfos, es decir, con bajo grado de cristalinidad, ya que si el polímero tiene un alto grado de cristalinidad esta transición no es apreciable. En las IPNs incompatibles o de fases separadas y en otros sistemas similares de dos o mas polímeros cada fase retiene su temperatura de transición vítrea (Tg). Las transiciones pueden variar con respecto al grado de mezclado en las IPNs. Cuando se tiene compatibilidad, es decir, un mezclado completo, únicamente se observa una transición, que usualmente abarca las transiciones vítreas de los polímeros componentes.

Las transiciones vítreas de las IPNs miscibles pueden ser calculadas usando las siguientes ecuaciones:

$$\frac{1}{Tg} = \frac{W_1}{Tg_1} + \frac{W_2}{Tg_2} \qquad \text{(Ecuación de Fox)}$$

$$Tg = W_1 Tg_1 + W_2 Tg_2$$
 (Ecuación de Gordon-Taylor)

Donde $W_1(W_2)$ y $T_{g1}(T_{g2})$ son las fracciones en peso y transiciones vítreas de los polímeros 1 y 2, respectivamente. Las transiciones vítreas en IPNs compatibles cambian con

respecto al componente individual, en algunos casos se amplían de tal manera que los picos se traslapan. La T_g se incrementa con el incremento de la densidad de entrecruzamiento ¹⁵.

Por otra parte, los hidrogeles poseen propiedades sobresalientes de hinchamiento; los polímeros entrecruzados no se pueden disolver completamente pero tienen la capacidad de hincharse muchas veces con respecto a su volumen original por absorción del líquido con el cual se encuentran en contacto. El hinchamiento ocurre por la misma razón que un polímero lineal se disuelve: la adición del disolvente proporciona un incremento en la entropía¹⁸.

Con base en las atractivas propiedades de estos sistemas, se han realizado numerosos estudios en la preparación de una gran variedad de semi-IPNs, entre los cuales se encuentran los trabajos reportados por R. A. Style y col. en sistemas de Poli (N-isopropil acrilamida)/ poli (ácido acrílico)¹⁰⁶; YQ Xia y col.¹⁰⁷ en semi-IPNs de Poli(acrilamida)/Quitosan; S. Jin y col.¹⁰⁸ basados en Poli(N-vinil pirrolidona)/ poli (ácido acrílico) y M. E. Harmon y col^{.109} en sistemas de Poli(N-isopropil acrilamida)/ Poli(acrilamida). A partir de los estudios reportados en la bibliografia, en el presente trabajo se decidió estudiar la preparación de semi-IPNs basadas en poli (acrilamida)/ poli (ácido- γ -glutámico).

2.4 Poliacrilamida

El monómero acrilamida fue sintetizado por primera vez por el científico German Moureu en 1893; sin embargo, no fue ampliamente comercializada sino hasta la década de 1950, cuando la compañía Hercules inició la producción en cantidades comerciales. La acrilamida es generalmente formada por hidratación del acrilonitrilo con ácido sulfúrico entre 90 y 100 °C o más. Recientemente es formada mediante hidratación catalítica usando cobre como catalizador. La capacidad de producción total en el mundo es de más de 300,000 toneladas por año¹¹⁰.

El monómero acrilamida es un sólido cristalino blanco inodoro, a temperatura ambiente y presión estándar, condiciones en las que puede ser disuelto en el solvente para la polimerización ¹¹¹. Posee un punto de fusión de 84.5 °C. Es soluble en muchos solventes polares entre los que se encuentran acetona, acetonitrilo y agua; 215.5 g pueden ser disueltos

en 100 ml de agua a 30 °C. La acrilamida contiene dos grupos funcionales principales, el doble enlace carbono-carbono vinílico y un grupo amida, como se muestra en la Figura 2.8¹¹⁰.



Figura 2.8. Estructura de la acrilamida

La solubilidad en agua de la acrilamida le permite ser absorbida fácilmente por una variedad de microorganismos tales como bacterias, desde diversos hábitats, entre los que se incluyen: suelo, acuático y aguas residuales. Una vez que es absorbida, las enzimas se encargan de su transformación en agua, amoniaco, y otros productos constituyentes. Shanker y col.¹¹² demostraron que la acrilamida puede actuar como fuente de carbono y nitrógeno para el desarrollo microbiano. En la Figura 2.9 se presenta el camino para el metabolismo de la acrilamida en la bacteria propuesto por Shanker¹¹².



Figura 2.9. Camino propuesto para la biodegradación de acrilamida por bacterias.

El monómero acrilamida es polimerizado por iniciadores de radicales libres, entre los que se encuentran, compuestos azo, catalizadores redox, luz y radiación. El mecanismo básico involucrado en la polimerización por radicales libres de acrilamida se presenta en el esquema de la Figura 2.10. Este monómero es único entre los monómeros vinílicos y acrílicos, ya que puede ser polimerizado hasta muy alto peso molecular. Esta característica extraordinaria en la polimerización de acrilamida es atribuida, en parte, a la fácil purificación del monómero acrilamida y a la rapidez de propagación, poco común en polimerizaciones, en comparación con las constantes de velocidad de terminación. La poliacrilamida (PAAm) puede ser preparada vía solución, emulsión ó precipitación ¹⁵. En la Figura 2.11 se muestra la unidad fundamental de la poliacrilamida ¹¹³.



Figura 2.10. Polimerización de acrilamida mediante formación de radicales libres



Figura 2.11. Unidad fundamental de la poliacrilamida

El proceso de polimerización de la acrilamida produce una poliacrilamida que cuenta con características químicas y biológicas completamente diferentes a las del monómero. Como ocurre con todos los monómeros acrílicos y vinílicos, la acrilamida es químicamente una especie altamente reactiva debido al doble enlace rico en electrones; sin embargo en el proceso de polimerización para formar poliacrilamida el doble enlace es removido, y por lo tanto la poliacrilamida muestra una notable inercia química bajo condiciones normales. A diferencia de la acrilamida, las poliacrilamidas no son fácilmente propensas a la adición nucleofílica en la cadena principal debido a que poseen únicamente un enlace simple C-C. El grupo amida de la poliacrilamida puede experimentar reacciones tales como hidrólisis y deshidratación¹¹⁰.

La poliacrilamida (PAAm) frecuentemente tiene un peso molecular extremadamente alto (arriba de decenas de millones). Se disuelve fácilmente en agua e incrementa su viscosidad considerablemente¹¹³.

Un gel derivado de acrilamida es una red entrecruzada de polímeros con peso molecular muy alto, puede absorber solvente, principalmente agua, pero es insoluble en el mismo. Las interacciones responsables de la absorción de solvente son, fuerzas de capilaridad, osmosis, y las interacciones moleculares polímero-solvente, entre otros. La estructura interna del gel depende de las cantidades relativas de sus componentes; monómero y entrecruzador ¹¹⁴.

En la preparación de un hidrogel basado en acrilamida deben ser especificadas previamente la cantidad de solvente (comúnmente agua) presente en la polimerización, o, por otra parte, la concentración inicial total del monómero; ya que éste no puede ser preparado en

masa. La concentración inicial total del monómero puede variar, con la finalidad de alterar la estructura del hidrogel y, a su vez, alterar las propiedades del hidrogel¹¹¹.

Una red preparada en solución puede tener propiedades muy diferentes en comparación con las redes preparadas en masa. Una red preparada en solvente tiene una estructura de red móvil, en cambio, una red preparada en masa tiene una estructura de red ajustada la cual resulta de la interpenetración de las cadenas de polímero durante la formación de la red ¹¹¹. La poliacrilamida presenta enlaces intra e intercadena de tipo imidación, como se esquematiza en la Figura 2.12.

a)

b)





La degradación térmica de la poliacrilamida es influenciada por un gran número de factores entre los que se incluyen peso molecular, composición del copolímero, forma de síntesis, contenido de oxígeno, historia térmica, y la presencia de impurezas. Sin embargo, se ha sugerido que la degradación de la PAAm ocurre en ciertas regiones de temperatura; la primera alrededor de 200 °C, la segunda entre aproximadamente 200-300 °C y la tercera arriba de 300 °C¹¹⁰.

Desde la temperatura ambiente hasta alrededor de 200 °C las poliacrilamidas son generalmente estables térmicamente y experimentan cambios físicos muy pequeños y una ligera pérdida de masa. La pérdida de peso es atribuida a la pérdida del agua absorbida del medio ambiente y otras impurezas volátiles. A temperaturas arriba de 200 °C, las poliacrilamidas comienzan a experimentar cambios químicos irreversibles resultantes de la degradación térmica. En esta etapa, se libera H₂O, NH₃, y pequeñas cantidades de CO₂ como subproductos de la formación y degradación de las uniones imida. La tercera región de degradación se caracteriza inicialmente por la descomposición de los grupos imida para formar nitrilos con la subsecuente liberación de compuestos volátiles como el CO₂ y el H₂O. En el avance de la degradación ocurre la escisión de algunas cadenas principales produciendo varias glutarimidas sustituidas. A más altas temperaturas, las reacciones predominantes son la escisión de enlaces de la cadena polimérica principal, formando largas cadenas hidrocarbonadas¹¹⁰.

La estabilidad de las soluciones de poliacrilamida es apropiada para muchas aplicaciones; sin embargo, pueden ocurrir cambios en la viscosidad como resultado del esfuerzo físico, reacciones químicas, ó rearreglos conformacionales ¹⁵. Con base en las atractivas propiedades de PAAm se han reportado una gran variedad de estudios basados en la preparación de hidrogeles de PAAm, entre los que se encuentran los citados por T. Aoki y col. (1994)⁹, J. P. Baker y col. (1994)¹¹¹, P. Munk (1989)¹¹³, C. Pizarro y col. (1997)¹¹⁴, J. Baselga y col. (1987)¹¹⁵, M. J. Caulfield y col. (2003)¹¹⁶, y H. Kasgöz y col. (2003)¹¹⁷.

En la investigación reportada por Takashi Aoki y col. en 1994, basada en la preparación de IPN de poliacrilamida-poli(ácido acrílico)(PAAc), se menciona la formación de complejos interpolímeros mediante puentes de hidrógeno a baja temperatura y la disociación del complejo a altas temperaturas. En la Figura 2.13 se esquematiza la interacción intermolecular de PAAm-PAAc⁹.



Figura 2.13. Complejo PAAm – PAAc

Los cambios en el estado de hinchamiento y compresión se deben a la fuerza de atracción o repulsión en el complejo polímero – polímero y a las interacciones polímero – agua. Por lo tanto, la formación y disociación de complejos interpolímeros es el factor determinante principal para alterar los estados de hinchamiento y compresión en los hidrogeles de IPNs⁹.

Actualmente las aplicaciones biomédicas de las IPNs han cobrado mucha importancia por lo que resulta conveniente incluir un polímero biológico dentro de la IPN con la finalidad de mejorar la biocompatibilidad y biodegradabilidad del material. Por lo tanto en el presente trabajo se decidió trabajar con semi-IPNs basadas en poliacrilamida y el biopolímero lineal poli(ácido-γ-glutámico).

2.5 Poli(ácido-γ-glutámico)

El grupo de los biopolímeros incluyen moléculas poliméricas largas, tales como polipéptidos y proteínas, ácidos nucleicos o polinucléotidos, y polisacáridos. Estas macromoléculas son formadas por reacciones de condensación. El término biopolímeros también es aplicado para polímeros sintéticos preparados a partir de la misma unidad de

monómero o una similar a la unidad de monómero del polímero natural ¹⁵. El poli(ácido-γglutámico) (γ-PGA) se encuentra ubicado dentro del grupo de los biopolímeros.

El poli(ácido- γ - glutámico) bacteriano es claramente diferente en estructura, en comparación con los poli(aminoácidos) convencionales unidos mediante el carbono α , por lo que podría ser mejor clasificado como un pseudo poli(aminoácido)¹¹⁸.

El poli(ácido- γ -glutámico) ha sido producido principalmente por especies específicas del género *Bacillus* hacia el exterior de las células. Este biopolímero consiste de unidades repetitivas de ácido glutámico que son unidas mediante el grupo α -amino y el grupo funcional γ -ácido carboxílico, como puede apreciarse en la estructura química presente en la Figura 2.14¹¹⁸.



Figura 2.14. Estructura química del γ-PGA.

El γ -PGA fue descubierto como una cápsula de *Bacillus anthracis* en 1973²¹. El poli(ácido- γ -glutámico) es un componente de la cápsula de *Bacillus anthracis* y *Bacillus mesentericus*, y es acumulado en un caldo de cultivo de *Bacillus subtilis* como un producto de la fermentación ^{119, 120}.

Cepas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis* pueden sintetizar un material viscoso soluble en agua que contiene residuos de D- y L- ácido glutámico. Este ácido poliglutámico es polimerizado mediante la vía de enlaces amida entre los grupos α amino y γ carboxílico. El γ -PGA es el principal componente de "Itohiki-natto", una comida tradicional japonesa preparada desde soya al vapor mediante la acción biológica del PGA producido por *B. Subtilis*, a los que generalmente se conoce como "*Bacillus natto*" ó *B. Subtilis* (natto)¹²¹.

Los mecanismos de biosíntesis en *B. Licheniformis* y *B. Subtilis* han sido elucidados recientemente. Se ha caracterizado parcialmente a un complejo de sintetasa presente en la membrana celular de *B. Licheniformis* que cataliza la activación, racemización y polimerización de L- glutamato dentro de exclusivamente poly-D-glutamato ¹²¹. En *B. Subtilis* se reportó la presencia de un gen específico responsable de la producción de γ -PGA y se sugirió que la actividad de la γ -glutamiltranspeptidasa (γ -GTP) participa principalmente en la biosíntesis de γ -PGA. Sin embargo, la actividad de la γ -GTP se pierde por tratamiento del plásmido de la bacteria con naranja de acridina, y no se produce el material viscoso mediante las células tratadas. Con estas observaciones se pudo inferir que el gen del γ -GTP se encontraba en el plásmido, y el γ -PGA presente en el material viscoso fue sintetizado por esta enzima. Se encontró que γ -GTP en *B. Subtilis* es una enzima extracelular y que se sintetizó en las células o en la superficie celular y fue secretada hacia el medio ¹²⁰.

El γ -PGA puede adoptar varias conformaciones dependiendo de las condiciones de la solución. De esta manera, la presencia de macromoléculas biológicas más cargadas o polares, los factores como temperatura, pH, concentración del polímero, peso molecular y fuerza iónica pueden cambiar la conformación general y local de la estructura de γ -PGA ¹²².

En años recientes, los hidrogeles preparados desde polímeros naturales han recibido atención con la finalidad de contribuir en la preservación del ambiente. Los hidrogeles originados desde poli(ácido- γ -glutámico) y poli(ε -lisina) microbianos pueden ser preparados mediante irradiación γ . Estos poli(aminoácidos) microbianos son solubles en agua, son hidrodegradables y biodegradables¹¹.

La sensibilidad del γ -PGA hacia los cambios de pH se pone de manifiesto mediante la protonación y desprotonación de los grupos carboxilo y amino, como se muestra en el estudio reportado por M. Kunioka y col.¹¹ en el cual preparó un hidrogel de γ -PGA y poli(ε -lisina) en proporción 50/50 (PGA/PL), éste se trató con soluciones de diferente pH; el hidrogel presentó hinchamiento a pH menor de 4 y mayor de 6, lo que se justifica con la variación de la composición iónica con respecto al pH, comportamiento que se aprecia en la Figura 2.15.



Figura 2.15. Cambios en el estado de hinchamiento-compresión en el hidrogel 50/50 (PGA/PL), en soluciones acuosas a diferente pH. a) Hinchamiento, b) Compresión e c) Hinchamiento.

El tipo de carga de los grupos iónicos varía con el pH, las cargas dominantes en el gel PGA/PL son los grupos amino protonados y los grupos carboxilo desprotonados a pH menor de 4 y mayor de 6, respectivamente. En esta región de pH, el gel está hinchado debido al incremento de la presión iónica de hinchamiento. Por otra parte, a pH comprendido entre 4 y 6, la mayoría de los grupos iónicos están ausentes debido a la protonación de los grupos carboxilo y desprotonación de los grupos aminos, bajo estas condiciones el gel se encuentra comprimido; como se muestra en la Figura 2.15. Con estos resultados demostraron la sensibilidad de los geles de PGA/PL al cambio de pH¹¹.

En la síntesis de hidrogeles de γ -PGA el enlace del polímero a través de sus grupos carboxílicos libres resulta complicado debido a su fuerte acidez y cercanía con la cadena principal, lo que provoca un importante impedimento estérico. Sin embargo se ha logrado llevar a cabo el entrecruzamiento del polímero para formar la red mediante poca o nula hidrólisis de la cadena principal por el uso de condiciones suaves de esterificación. Se han utilizado dihalogenoalcanos como agentes de entrecruzamiento formando enlaces éster con los grupos carboxílicos del γ -PGA, como se esquematiza en la Figura 2.16. Otro método estudiado para el entrecruzamiento de este polímero es por irradiación γ , en el cual los rayos γ inducidos debilitan los enlaces C-H y pueden generar radicales libres en los carbonos metilo del γ -PGA, seguido de la combinación intermolecular de radicales con lo que se induce al entrecruzamiento del polímero¹².



Figura 2.16. Entrecruzamiento del y-PGA utilizando un dihalogenoalcano

El γ -PGA es soluble en agua y biodegradable, y se puede obtener con una masa molecular relativamente alta (M. 100,000-1,000,000), puede ser usado como un espesante, humectante, material alimentado para liberación, o como acarreador biodegradable de fármacos en los campos de alimentos, cosméticos y medicina ^{119, 123}.

Dentro de las aplicaciones más importantes de las IPNs constituidas por polímeros naturales se encuentra la liberación controlada de fármacos, por lo que este trabajo va encaminado hacia tal fin; sin embargo, en esta parte del trabajo solamente se abarcará el proceso de síntesis y caracterización de redes semi-interpenetradas basadas en PAAm y γ-PGA. En el presente trabajo se espera que la combinación de la estabilidad y propiedades de hinchamiento de la PAAm con la biodegradabilidad y bicompatibilidad, representativas de los biopolímeros, dé lugar a la obtención de un material con un amplio potencial en aplicaciones biomédicas.

2.6. Generalidades de las ciclodextrinas

llamadas ciclodextrina Algunas bacterias producen un grupo de enzimas que degradan la fracción de la amilosa del almidón, glicosiltransferasas (CGTasas), hidrolizando una o varias vueltas de la hélice y enlazando sus extremos, de tal modo que se producen oligosacáridos cíclicos con uniones α -(1-4), que no contienen grupos terminales reductores o no reductores; como se esquematiza en la Figura 2.17. Estas moléculas cíclicas se llaman ciclodextrinas, y se abrevian como CD. Las ciclodextrinas también se conocen como dextrinas de Schardinger, ciclomaltosas, cicloglucanas y cicloglucoamilosas¹²⁴.



Figura 2.17 Formación de dextrinas acíclicas y cíclicas a partir de la fracción de amilosa del almidón

Las tres principales ciclodextrinas son sustancias cristalinas, homogéneas, no higroscópicas, no reductoras, solubles en agua, y son macroanillos constituidos por unidades de glucopiranosa. Las ciclodextrinas son estructuras anilladas con 6, 7 y 8 unidades de glucopiranosa correspondientes a α , β , y γ – CD respectivamente^{124, 125}.

La superficie externa de las CDs está compuesta por seis o más hexágonos, y, por lo tanto, la profundidad de la molécula es el ancho del anillo de glucosa, tienen n grupos hidroxilo primarios para n unidades de glucosa (-CH₂OH de C-6) y 2n grupos OH secundarios (-OH de C-2 y C-3) en los extremos de la cavidad. Como consecuencia de la conformación ${}^{4}C_{1}$ de las unidades glucopiranosa, todos los grupos hidroxilo secundarios se sitúan en uno de los dos bordes del anillo, mientras que todos los primarios se colocan en el otro borde; el borde donde se sitúan los grupos hidroxilo secundarios el diámetro de la cavidad es más grande que el borde de los hidroxilos primarios, debido a que la rotación libre del último reduce el diámetro efectivo de la cavidad. Por lo tanto, la configuración molecular tridimensional más estable para estos oligosacáridos cíclicos toma la forma de un cono truncado, hueco y poco profundo como se representa en la Figura 2.18, aunque con frecuencia se describe como un toroide¹²⁴.



Figura 2.18. Representación de la ciclodextrina.

Una de las características mas importante de la CD se refiere a la distribución de los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. Debido a que los grupos hidrofílicos del hidroxilo ocupan ambos bordes del cono, vuelven a la CD soluble en agua. El interior de la cavidad es de carácter hidrofóbico debido a que está cubierto por los hidrógenos de los grupos metino (C3-H y C5-H), metileno (C6-H₂), así como por oxígenos tipo éter (O4). Por lo tanto, las cavidades proporcionan una matriz hidrofóbica en solución acuosa, lo que conduce al término ambiente microheterogéneo

La cavidad de las ciclodextrinas está compuesta por átomos de hidrógeno y puentes glucosídicos de oxígeno, cuyos pares de electrones no compartidos se dirigen hacia el interior de la misma produciendo una alta densidad electrónica y haciendo que el interior de la cavidad sea hidrofóbico, similar al ambiente encontrado en el interior de la hélice de la amilosa, como puede apreciarse en el esquema de la Figura 2.19.



Figura 2.19. Representación de una ciclodextrina, indicando las regiones hidrofóbica e hidrofílica.

En cuanto a las dimensiones de las ciclodextrinas, todas tienen una profundidad de 7.9 Å, con diversos diámetros exteriores y de cavidad que dependen del número de unidades de D-glucosa en la molécula. Para la α - CD se tiene un diámetro mayor de 13.7 Å. Además, conforme el número de unidades de glucosa aumenta, se presenta una forma disimétrica de la molécula. En la tabla 2.4 se muestran las dimensiones de estas moléculas¹²⁴.

Tabla 2.4. Dimensiones de las n	noléculas de ciclodextrinas
---------------------------------	-----------------------------

Dimensión Å	Alfa (α)	Beta (β)	Gamma (y)
Diámetro de la periferia	14.6 ± 0.4	15.4 ± 0.4	17.5 ± 0.4
Diámetro de la cavidad (aproximado)	4.7 – 5.3	6.0 - 6.5	7.5 - 8.3
Altura del toroide	7.9 ± 0.1	7.9 ± 0.1	7.9 ± 0.1

Mediante la formación de compuestos de inclusión, las ciclodextrinas pueden estabilizar, solubilizar, retener y liberar de manera controlada una gran variedad de compuestos, entre los que se incluyen gases, parafinas, alcoholes, ácidos carboxílicos, colorantes aromáticos, derivados del benceno, sales, y agua, entre otros. Los resultados sugieren la viabilidad del uso de ciclodextrinas en productos farmacéuticos, químicos, pinturas y colorantes, alimentos, cosméticos, artículos de tocador y pesticidas. Pueden encapsularse compuestos lábiles, tóxicos, explosivos, emulsionar aceites, enmascarar sabores u olores, aumentar la solubilidad de medicamentos y convertir en polvo compuestos viscosos. Además, los complejos con ciclodextrinas normalmente tienen una presión de vapor baja, lo que reduce la volatilidad; y de esta manera, se podría retener un insecticida en el lugar que se aplicó sin dispersarse en el aire. Pueden utilizarse también para mantener por mas tiempo el aroma de los perfumes¹²⁴.

En el presente trabajo se optó por unir la β -ciclodextrina al γ -PGA, con la finalidad de incrementar las aplicaciones del γ -PGA; posteriormente se elaboraron redes semiinterpenetradas basadas en PAAm y γ PGA- β CD, con el fin de utilizar la β -CD como una molécula huésped de otras biomoléculas y ampliar de esta manera el potencial de aplicaciones de estos materiales, principalmente en la liberación controlada de fármacos.

III. HIPÓTESIS

La poli(acrilamida) contiene grupos funcionales que le permite entrecruzarse de manera independiente en presencia del poli(ácido-γ-glutámico) utilizando un agente de entrecruzamiento apropiado. Basados en estas características es posible sintetizar redes semiinterpenetradas basadas en poli(acrilamida) y poli(ácido-γ-glutámico).

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Establecer las condiciones de síntesis para la obtención y caracterización de redes poliméricas semi-interpenetradas formadas por poli(acrilamida)/poli(ácido-γ-glutámico).

Objetivos Particulares

Síntesis de hidrogeles de semi-IPNs basadas en poli(acrilamida)/poli(ácido- γ glutámico) con variación en la masa molecular del γ -PGA, y evaluación del efecto de la variación en la relación molar de los polímeros constituyentes, sobre las propiedades de estos materiales.

Estudio de la morfología, propiedades térmicas, mecánicas y de hinchamiento de las redes poliméricas sintetizadas, y la interacción entre los polímeros constituyentes.

V.- METODOLOGÍA

5.1 Obtención del poli(ácido-γ-glutámico)

El poliácido- γ -glutámico (γ -PGA) fue producido por la bacteria *Bacillus Licheniformis*. Primeramente se preparó el medio de cultivo conteniendo los nutrientes necesarios para el cultivo de esta bacteria y la producción del poli(ácido- γ -glutámico). El medio de cultivo se preparó de forma similar a la reportada por D. Gonzales y col¹², y J. H. Do y col.¹²⁶; en la Tabla 5.1 se muestra la composición de este medio nutritivo. Una vez preparado el medio de cultivo, éste se distribuyó en matraces Erlenmeyer; posteriormente se ajustó el pH a 7 con la finalidad de obtener la disolución completa del ácido glutámico. Los matraces con el medio de cultivo se esterilizaron a 121 °C durante 15 minutos y fueron inoculados con alrededor de 0.8 ml de la cepa de *B. Licheniformis* utilizando 700 ml del caldo de cultivo, a continuación estos matraces se incubaron a 37 °C durante 96 h manteniendo agitación mecánica de 300 rpm. Después de este tiempo, se sacaron los matraces de la incubadora y se bajó el pH de la mezcla hasta un valor de 3 para disminuir la viscosidad del medio de cultivo y facilitar la separación del paquete celular del γ -PGA. El paquete celular fue separado mediante centrifugación a 15000 rpm durante 30 min, el γ -PGA quedó disuelto en el sobrenadante.

Nutrientes	Gramos/Litro.
Ácido L-glutámico	20.0
Ácido cítrico	12.0
Glicerol	80.0
NH₄Cl	7.0
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.5
FeCl ₃ . 6H ₂ O	0.04
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.15
MnSO ₄ . nH ₂ O	0.0057

Tabla 5.1. Medio de cultivo para	В.	Lichenij	formis
----------------------------------	----	----------	--------

El γ -PGA se precipitó adicionando acetona al sobrenadante en una relación 1:1, el polímero precipitado se disolvió en agua y se congeló para ser secado mediante liofilización. De esta manera se obtuvo el γ -PGA crudo. El proceso de obtención se esquematiza en la Figura 5.1.



Fígura 5.1. Diagrama de flujo correspondiente al proceso de obtención del γ-PGA

5.1.1 Método de purificación

El proceso de purificación del γ -PGA se inició con la diálisis del mismo, para ello se utilizaron piezas de tubo para diálisis de aproximadamente 35 cm de longitud, con capacidad de purificación de moléculas con masa molecular mayor a 12,000 g/mol. Los tubos de diálisis se sometieron a un tratamiento que consistió en hervir las membranas en una solución de bicarbonato de sodio en EDTA (1 mM) al 2% (w/v) durante 10 min, después se lavaron con agua destilada y fueron hervidos en solución de EDTA durante 10 min. Finalmente se conservaron en la solución de EDTA a 4 °C.

Se prepararon soluciones del polímero crudo al 2 % (w/v) en agua desionizada. La solución del polímero se distribuyó en los tubos de diálisis previamente tratados, enseguida éstos fueron introducidos en agua desionizada con pH=3 (Figura 5.2). La diálisis se desarrolló durante un periodo de 16 horas, efectuando cambios de agua cada 4 horas. Al término de las 16 horas, se recuperó la solución de polímero y se centrífugó a 15000 rpm durante 30 min para precipitar las impurezas que hubieran quedado suspendidas en el agua. El γ -PGA presente en el sobrenadante se congeló para ser secado mediante liofilización, y de esta manera se obtuvo el γ -PGA puro.



Figura 5.2. Procedimiento y equipo utilizado en la diálisis del y-PGA

5.1.2 Caracterización del γ-PGA

El γ-PGA obtenido se caracterizó por resonancia magnética de protón y carbono 13 (RMN-¹H y RMN-¹³C), espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) y mediante deterrminación de la masa molecular.

El estudio por RMN del ¹H y ¹³C, se realizó utilizando como solvente agua deuterada (D_2O) , se utilizó un equipo Jeol Eclipse de 300 MHz.

Para el análisis por FT-IR se elaboraron pastillas del polímero seco con bromuro de potasio, estas fueron analizadas en la modalidad de transmitancia. Se utilizó un equipo Nicolet 550.

La masa molecular del γ -PGA se determinó de manera indirecta mediante una curva de calibración previamente elaborada, compuesta por la masa molecular del γ -PGA obtenida por GPC contra el ln de la viscosidad relariva, (sección 5.1.4).

5.1.3 Hidrólisis alcalina

La masa molecular promedio (Mw) de γ -PGA obtenido vía fermentación fue de alrededor de 155800 g/mol. El γ -PGA purificado se utilizó para llevar a cabo la hidrólisis alcalina, se partió de 10g de γ -PGA, el polímero se colocó en un reactor de tres bocas con chaqueta de enfriamiento. Posteriormente, se agregaron 90 ml de una solución de bicarbonato de sodio 67.6 mM para disolver el polímero. El reactor se conectó a un baño de aceite para proporcionar el calentamiento y se le colocó un termómetro en una de las bocas del matraz, un tubo refrigerante en la boca del centro, y en la tercera se colocó un tapón; enseguida se inició la agitación magnética y el calentamiento del reactor hasta alcanzar 90 °C. Este procedimiento se esquematiza en la Figura 5.3. Una vez alcanzada esta temperatura se adicionaron 1.5465 g de NaOH disueltos en 10 ml de solución de bicarbonato de sodio¹²⁷. A partir de esta adición se empezó a contar el tiempo, efectuándose muestreos cada hora hasta completar 7 horas, con el fin de obtener fragmentos de γ -PGA con distinta masa molecular.



Figura 5.3. Esquema de la hidrólisis alcalina del y-PGA

El γ -PGA hidrolizado se precipitó agregando una mezcla de isopropanol/éter 1:1, dejando evaporar el solvente, posteriormente se disolvió en agua desionizada, para secarse mediante liofilización.

Se determinó la viscosidad relativa correspondiente a cada una de las muestras recolectadas durante la cinética de hidrólisis para determinar la masa molecular, mediante el uso de la curva de calibración de masa molecular descrita en la sección anterior. Se seleccionaron dos tiempos de hidrólisis para obtener dos masas moleculares distintas y continuar con los estudios; finalmente se hidrolizaron 60 g del γ -PGA, en los tiempos seleccionados en el estudio anterior.

5.1.4 Determinación de la masa molecular

Como se mencionó en la sección 5.1.2, la masa molecular del γ -PGA se determinó de manera indirecta utilizando una curva de calibración donde la masa molecular se determinó mediante GPC. Para la determinación de la masa molecular mediante GPC se prepararon muestras a una concentración de 0.1% (w/v) utilizando como disolvente una solución constituida por 50 mM de NaCl/acetonitrilo en relación 4:1. Se inyectaron en el equipo volúmenes de 200 µl de la solución conteniendo el polímero, manteniéndose la fase móvil (NaCl/acetonitrilo) a una velocidad de flujo de 1.0 ml/min. Se utilizó un equipo Waters 150-C equipado con un detector UV operado a 248 nm y columnas lineales Hidrogel (Waters) así como PL-aquagel-OH. Se determinó también la viscosidad relativa de estas fracciones de γ -PGA, de esta manera se construyó una curva de calibración compuesta por la masa molecular del polímero obtenida por GPC contra ln de la viscosidad relativa del polímero (Figura 5.4). Esta curva de calibración se utilizó para la determinación indirecta de las masas moleculares de las fracciones de γ -PGA obtenidas en la hidrólisis alcalina, mediante la determinación de sus valores de viscosidad relativa.



Figura 5.4. Correlación entre el ln de la viscosidad y la masa molecular del γ -PGA determinada mediante GPC.

Para la determinación de la viscosidad relativa de las muestras hidrolizadas, se prepararon soluciones al 0.7% (w/v) de γ -PGA y mezcla de NaCl 50mM/acetonitrilo 4:1 (v/v). Las muestras se filtraron a través de una membrana de Nylaflo con un tamaño de poro de 0.2 µm. La medición se llevó a cabo en un viscosímetro Ubbelhode a una temperatura de 30±0.1°C.

Los valores de viscosidad relativa obtenidos se interpolaron en la curva de calibración compuesta por la masa molecular obtenida por GPC contra el ln de la viscosidad relativa, obtenida en un trabajo previo, (Figura 5.4). De esta manera se obtuvieron las masas moleculares correspondientes a las fracciones de γ -PGA hidrolizado; de donde se seleccionaron dos masas moleculares de γ -PGA, una de baja masa molecular y otra de alta masa molecular, correspondientes a 83200 y 155800 g/mol, respectivamente; con las que se llevó a cabo la preparación de las redes semi-interpenetradas.

5.2 Síntesis de redes semi-interpenetradas de poli(acrilamida)/poli(ácido-γ-glutámico) con masa molecular correspondiente a 83200 y 155800 g/mol

En la elaboración de las semi-IPNs de PAAm- γ PGA se utilizó una solución patrón de acrilamida (AAm) al 30%, compuesta por 29 g de acrilamida y 1 g de bisacrilamida disueltos en 100 ml de agua desionizada, una solución de persulfato de amonio (PSA) al 10% (w/v) (iniciador); y N, N, N', N'- tetrametiletilendiamina (TEMED) (catalizador). Se utilizó una solución acuosa de γ -PGA al 10% (w/v) con masa molecular correspondiente a 83200 y 155800 g/mol.

Se prepararon semi-IPNs de PAAm/ γ -PGA en proporciones molares (95/5), (90/10), (85/15), (80/20) y (75/25). Para llevar a cabo la síntesis, primeramente se adicionó a un matraz Erlenmeyer la solución patrón y el volumen de agua respectiva para completar un volumen de mezcla final correspondiente a 20 ml. Posteriormente se agregó la solución de γ -PGA al 10% y se aplicó agitación magnética para el mezclado de los componentes, enseguida se adicionó la solución de persulfato de amonio y se continuó la agitación durante 3 min, después de este tiempo se añadió TEMED y se continuó la agitación por 2 min. Las cantidades de cada uno de

los componentes de la mezcla empleadas en la preparación de las semi-IPNs se muestran en la tabla 5.2.

PAAm/PGA	Soln. Patrón ^a	Agua	PSA ^b	TEMED	γ-PGA ^c
	(ml)	(ml)	(ml)	(ml)	(ml)
100/0	13.9	6.1	0.5	0.075	0
95/5	13.9	2.1	0.5	0.075	4
90/10	6.6	9.4	0.5	0.075	4
85/15	4.2	11.8	0.5	0.075	4
80/20	2.9	13.1	0.5	0.075	4
75/25	2.2	13.8	0.5	0.075	4

Tabla 5.2. Cantidades empleadas en la preparación de semi-IPNs de PAAm-yPGA

^a Solución de acrilamida al 30%,

^b Solución de persulfato de amonio al 10%

^c Solución de poli(ácido-y- glutámico) al 10%

La mezcla obtenida se distribuyó en moldes cilíndricos y se mantuvieron a temperatura ambiente para iniciar la polimerización y gelación de estos materiales. Los hidrogeles obtenidos se lavaron con agua desionizada durante 2 días para eliminar los residuos de los reactivos que no reaccionaron.

5.3 Estudio de la morfología de las redes semi-interpenetradas

La morfología de las redes semi-interpenetradas de PAAm/γ-PGA se analizó mediante microscopía óptica (M.O), microscopía de fluorescencia láser confocal (MLC) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Los detalles de preparación de muestras y condiciones de análisis se describen a continuación.

5.3.1 Microscopía óptica

Para el análisis mediante microscopía óptica, los hidrogeles de PAAm y semi-IPNs de PAAm/γPGA (95/5), (90/10), (85/15), (80/20) y (75/25) fueron teñidos con el colorante azul alcian; para lo cual se sumergieron en una solución del colorante azul alcian al 3% (w/v) en solución de ácido acético:metanol (4:1), en la Figura 5.5 se presenta la estructura química de este colorante. Los hidrogeles permanecieron dentro de la solución de colorante durante 24 h para dar tiempo a que el colorante se fijara al γ-PGA.



Figura 5.5. Estructura química del colorante azul alcian

Una vez teñidos, los hidrogeles fueron sumergidos en una solución de ácido acético: metanol con la finalidad de liberar el colorante que no se hubiera fijado al γ -PGA, este proceso finalizó cuando se observó la desaparición de una coloración azul en esta solución. En este momento se decantó el decolorante y se adicionó agua desionizada para mantener a los geles hinchados en agua. Este estudio se fundamenta en información bibliográfica donde se reporta que este colorante presenta afinidad hacia grupos carboxilo libres¹²⁸.

Para llevar a cabo la observación por microscopía óptica, se realizaron cortes transversales de aproximadamente 30 µm de espesor, utilizando un microtomo criogénico, estos cortes fueron observados en su estado hinchado, es decir una vez realizado el corte se procedió inmediatamente a su observación en un microscopio óptico con cámara de video

integrada; la observación se realizó con el objetivo de 500 aumentos. Por otra parte, las primeras dos muestras fueron analizadas también en un estado húmedo, es decir alrededor de dos horas después de haberse realizado el corte, por lo que la muestra ya no estaba completamente hinchada en agua sino que ya había sufrido cierta pérdida de la misma por evaporación. Se utilizó un microscopio óptico con analizador de imagen OLYMPUS BX60. El procedimiento se esquematiza en la Figura 5.6.



Figura 5.6. Procedimiento utilizado para la observación microscópica de los hidrogeles teñidos.

5.3.2 Derivatización del poli(ácido-y-glutámico) con pirenmetilamina

La reacción del γ -PGA con la pirenmetilamina se realizó con el fin de marcar al γ -PGA con un reactivo fluorescente y de esta manera poder estudiar la distribución de este biopolímero dentro de la red semi-interpenetrada mediante microscopía de fluoresecencia láser confocal (MLC). La modificación del γ -PGA con el grupo pireno se realizó tomando como base la metodología reportada por J. Duhamel y col.¹²⁹ y H. S. Telmo y col.¹³⁰, para la modificación del poli(ácido- α -glutámico) y poli(óxido de etileno), respectivamente.

La pirenmetilamina se obtuvo mediante la neutralización del hidrocloruro de pirenmetilamina (Aldrich), usando una solución acuosa de NH₄OH 0.5M, (Figura 5.7a). Para ésto se utilizó 1 g $(3.7 \times 10^{-3} \text{ mol})$ de pirenmetilamina hidroclorada, la cual se disolvió en 50 ml de agua desionizada y posteriormente se le fue adicionando solución de hidróxido de amonio 0.5 M gota a gota hasta obtener un pH=7. Para extraer la pirenmetilamina neutra de la solución acuosa, se colocó la solución de pirenmetilamina neutra en un embudo de separación y se le adicionó 100 ml de hexano, inmediatamente se observó la separación de dos fases, de donde se extrajo la fase inferior correspondiente a la solución acuosa, posteriormente se volvieron a adicionar 100 ml de hexano para el lavado y se separaron dos fases; en la inferior estaba el reactivo neutro y en la superior el hexano; de esta manera se extrajo la PyMeNH₂ presente en la fase inferior, y se secó utilizando vacío durante 4 h.

Para la realización de la reacción de γ -PGA de masa molecular igual a 83200 g/mol con pirenmetilamina (PyMeNH₂), primeramente se adicionó 1 g (1.2 x10⁻⁵ mol) de γ -PGA, enseguida se agregaron 75 ml de agua desionizada; la solución se mantuvo con agitación magnética y se adicionaron 200 ml de THF; posteriormente se agregaron 86 x10⁻⁵ mol de PyMeNH₂ y la solución fue agitada vigorosamente durante aproximadamente 15 minutos. Posteriormente se agregaron 86 x10⁻⁵ mol de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida hidrocloruro (EDC) (Sigma). Esta reacción se representa en el esquema de la Figura 5.7b. La reacción se llevó a cabo bajo vigorosa agitación magnética durante 5h, a temperatura ambiente.



Figura 5.7. a) Neutralización de la pirenmetilamina hidroclorada, b) Reacción del poli(ácido-γ-glutámico) y la pirenmetilamina neutra.

La purificación del γ -PGA marcado se llevó a cabo mediante el proceso de diálisis en agua desionizada durante 72 horas con cambio de agua cada 24 horas. Pasado este tiempo, se recuperó la solución contenida en las bolsas de diálisis y se evaporó el THF por rotaevaporación; la solución restante se redisolvió en agua desionizada, se congeló y se secó mediante liofilización.

El γ PGA-PyMeNH obtenido en esta reacción fue sometido a un proceso de extracción por soxhlet utilizando al THF como solvente, con la finalidad de extraer las moléculas de pireno que no hayan reaccionado con el γ -PGA, y corroborar de esta manera que el pireno encontrado en los estudios de caracterización se encuentra unido al γ -PGA.
El γ -PGA modificado se caracterizó mediante, espectroscopía de UV-Vis, espectroscopía de fluorescencia, resonancia magnética nuclear del protón (RMN-¹H) y espectroscopía de infrarrojo (FT-IR), con la finalidad de corroborar la modificación del γ -PGA con PyMeNH₂.

- Espectroscopia de UV-Vis

Para la realización de este análisis se prepararon soluciones con distinta concentración de γPGA-PyMeNH utilizando THF como disolvente. Se utilizó un equipo SHIMADZU UV-2401 PC

- Espectroscopia de fluorescencia

Este estudio se realizó para corroborar la actividad fluorescente del γ PGA-PyMeNH, para lo cual se analizaron soluciones de γ PGA-PyMeNH en THF con la misma concentración utilizada en el análisis por UV-Vis. Para este estudio se utilizó una longitud de onda de excitación de 354 nm, un Slit de 2.5-5 y una velocidad de 500 nm/min.

Se utilizó un equipo Perkin Elmer LS-50B

- Resonancia magnética nuclear de ¹H

En la preparación de las muestras se utilizó como disolvente agua deuterada (D_2O), y se analizaron a temperatura de 25 °C en un equipo JEOL ECLIPSE de 300 MHz.

- Espectroscopia de Infrarrojo (FT-IR)

Este estudio se llevó a cabo en pastillas de γ PGA-PyMeNH seco con bromuro de potasio, estas muestras fueron analizadas en la modalidad de transmitancia. Se utilizó un equipo Nicolet 550.

5.3.3 Análisis del poli(ácido-γ-glutámico)-pirenmetilamina mediante microscopía de fluorescencia laser confocal

El γ -PGA marcado con pireno (γ PGA-PyMeNH) se utilizó para preparar hidrogeles de PAAm/ γ PGA-PyMeNH (90/10). Para llevar a cabo la observación en el microscopio de fluorescencia láser confocal se realizaron cortes del hidrogel en su estado hinchado de 50 μ m de espesor utilizando un microtomo criogénico. Se utilizó una longitud de excitación de 458 nm, utilizando láser de argón, y un objetivo de 20x. Esta longitud de onda es la mas cercana a la reportada teóricamente para el grupo pireno, que puede ser utilizada en este microscopio. El modelo del equipo utilizado en este análisis es LSM 5 PASCAL

5.3.4 Microscopía electrónica de barrido

Se estudió el efecto de la presencia de γ -PGA sobre la morfología de las semi-IPNs mediante el análisis por SEM; para lo cual se realizaron cortes transversales de los hidrogeles en su estado hinchado, con un espesor de aproximadamente 10 µm utilizando un microtomo criogénico. Previo a la observación, las muestras fueron cubiertas con oro-paladio, se utilizó un voltaje de aceleración de 15 kV y una distancia de trabajo correspondiente a 18 mm. El modelo del equipo usado en este análisis es TOPCOM SM-510.

5.4 Determinación de la posible interacción entre poli(acrilamida) y poli(ácido-γglutámico)

Los hidrogeles preparados se analizaron por espectroscopía de Infrarrojo con la finalidad de encontrar alguna evidencia de algún tipo de interacción entre los dos polímeros constituyentes; tales como desplazamiento de las bandas características de los grupos funcionales de los polímeros constituyentes. El análisis se llevó a cabo en hidrogeles secos, los cuales se transportaron cuidadosamente cubiertos para evitar al máximo la absorción de

humedad. Se elaboraron pastillas del gel seco con bromuro de potasio, éstas fueron analizadas en la modalidad de transmitancia. Se utilizó un equipo Nicolet 550 C.

5.5 Análisis térmico mecánico

Este estudio se realizó con la finalidad de conocer el efecto del contenido de γ -PGA sobre la pérdida de agua y el cambio en dimensión de los hidrogeles de PAAM/ γ PGA hinchados, al aplicarles temperatura en un intervalo de 20 a 150 °C con velocidad de calentamiento de 5 °C/min, y fuerza constante correspondiente a 0.05 N; con respecto a la cantidad de γ -PGA utilizada en la preparación de los hidrogeles, para lo cual se prepararon discos del hidrogel hinchado con dimensiones de alrededor de 5 mm de diámetro y 2 mm de altura. El estudio se llevó a cabo en un equipo modelo TMA 2940 T.A. Instruments.

5.6 Contenido de agua en el equilibrio mediante análisis termogravimétrico

El contenido de agua en el equilibrio se determinó mediante el análisis termogravimétrico, donde se analizó el porcentaje de pérdida de peso atribuido a la pérdida de agua al variar la temperatura de 20 a 150 °C, se utilizó una velocidad de calentamiento correspondiente a 10 °C/min. Se analizaron discos de alrededor de 5 mm de diámetro y 2 mm de altura de los hidrogeles hinchados a temperatura ambiente en agua desionizada. Se utilizó un equipo modelo TGA Q500 T. A. Instruments

5.7 Resistencia a la compresión en ruptura

Mediante este estudio se analizó el efecto del contenido de γ -PGA sobre la resistencia a la carga máxima aplicada, y la capacidad de deformación de los hidrogeles hinchados de PAAm/ γ -PGA. Se utilizaron muestras cilíndricas de 1.9 cm de diámetro y 2 cm de espesor. El procedimiento consistió en comprimir el gel entre dos placas circulares con un diámetro 14 cm y un espesor de 1.2 cm, se utilizó una velocidad de 1.3 mm/min, llevándose a una deformación hasta la ruptura.

5.8 Cinéticas de hinchamiento

Para llevar a cabo las cinéticas de hinchamiento en agua de los cerogeles (gel seco) preparados, primeramente se tomaron muestras de cada gel de alrededor de 1 cm² de area y 3 mm de espesor, se pesaron para conocer el peso del gel seco, enseguida se sumergieron en agua desionizada, los geles se estuvieron pesando continuamente en intervalos de 1 hora hasta llegar al equilibrio de hinchamiento. Los valores de los pesos obtenidos durante la prueba de hinchamiento se utilizaron para la determinación de la razón de hinchamiento (δ) y el porcentaje de contenido de agua en el equilibrio (EWC) utilizando las siguientes ecuaciones, respectivamente:

$$\delta = \frac{W_s - W_d}{W_d} \qquad \qquad EWC \ (\%) = \frac{W_d - W_s}{W_d} X \ 100$$

Donde W_s es el peso del hidrogel hinchado y W_d es el peso del gel seco.

La razón de hinchamiento se determinó mediante las cinéticas de hinchamiento en agua teniendo como variables temperatura, pH y contenido de γ -PGA. En el primer caso se trabajó a 25 y 37°C, y en el segundo se utilizaron soluciones acuosas con pH correspondiente a 3, 5, 7 y 10.

El contenido de agua en el equilibrio (%) en el equilibrio se determinó en las cinéticas de hinchamiento en agua desionizada a 25 °C y estos valores fueron comparados con los obtenidos mediante análisis termogravimétrico.

Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado, para conocer la reproducibilidad del análisis. Por otra parte, se seleccionaron muestras utilizadas en cada cinética de hinchamiento, se secaron por liofilización y se repitió la cinética de hinchamiento con la finalidad de conocer la posibilidad de reutilizar estos hidrogeles en este tipo de pruebas.

5.9. Funcionalización del poli(ácido-γ-glutámico) con β-ciclodextrinas

La modificación del γ -PGA se realizó tomando como base la metodología reportada por X. Guo y col.¹²⁵ para la reacción de imidación del poli(ácido acrílico) y mono amino ciclodextrinas, con apoyo de la metodología reportada por J. Duhamel y col.¹²⁹, para la modificación del α -PGA con PyMeNH₂.

Para llevar a cabo la neutralización de la β-CDNH₂ hidroclorada, primeramente se disolvieron 0.13 g (1.15 x10⁻⁴ mol) de β-CDNH₂ hidroclorada en aproximadamente 20 ml de agua desionizada y se le agregó solución de hidróxido de amonio 0.5 M gota a gota hasta obtener un pH 7, la solución de β-CDNH₂ neutra se congeló y se secó por liofilización. Para separar la β-CDNH₂ de las sales formadas durante la neutralización, se disolvió la β-CDNH₂ neutra en alrededor de 2 ml de agua desionizada y posteriormente se añadió a un vaso de precipitado con alrededor de 50 ml de acetona, con esto se precipitó la β-CDNH₂. La solución restante se centrifugó para separar el resto de β-CDNH₂ que no se haya precipitado inicialmente. De esta manera se obtuvo la β-CDNH₂ pura. Para llevar a cabo la reacción, se adicionó a un matraz 1.2 g (1.4 x10⁻⁵ mol) de γ-PGA y 75 ml de H₂O desionizada, la solución fue sometida a agitación magnética, posteriormente se adicionó 0.1 g de β-ciclodextrina y la solución continuó siendo agitada durante alrededor de 15 minutos, enseguida se añadió 0.1 g (5.26 x 10⁻⁴ mol) de 1-(3-(dimetilamino) propil)-3-etilcarbodiimida hidrocloruro (EDC). La reacción se llevó a cabo en vigorosa agitación magnética durante 5 horas. En el diagrama de flujo de la Figura 5.8 se esquematizan los pasos generales de la reacción del γ-PGA y la β-CD.

El producto obtenido en esta reacción fue purificado mediante el proceso de diálisis en agua desionizada hasta que se obtuvo un valor constante en la conductividad eléctrica del agua desionizada exterior.



Figura 5.8. Diagrama de flujo del proceso de síntesis del yPGA-CDNH

El γ PGA- β CD fue caracterizado mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ¹H y ¹³C, con la finalidad de corroborar la existencia de la β -ciclodextrina en la cadena del γ -PGA. Se analizó la estabilidad térmica del γ PGA- β CDNH mediante análisis termogravimétrico.

Se elaboraron hidrogeles de PAAm/ γ PGA- β CDNH en proporción molar correspondiente a 85/15 y 75/25. Se analizaron las propiedades de hinchamiento de estos hidrogeles en función de la temperatura y pH.

VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Síntesis y purificación del poli(ácido-γ-glutámico)

La producción del γ -PGA se llevó a cabo utilizando las condiciones descritas en el capítulo de la parte experimental. El rendimiento promedio obtenido en la producción de polímero crudo correspondió a 15 g por litro de medio de cultivo. En la literatura se reporta una producción de γ -PGA igual a 13.5 g/l¹¹⁸ y 14.2 g/l de polímero crudo¹³¹, en medios de cultivo donde se utilizó *Bacillus licheniformis*. Por lo tanto, la producción de γ -PGA obtenida en este trabajo es ligeramente mayor a las encontradas en la literatura.

El γ -PGA crudo se purificó mediante diálisis, se obtuvo un porcentaje de rendimiento correspondiente a 67.3 %, ya que de 17.8 g de polímero crudo utilizados para llevar a cabo su purificación se recuperaron 12 g, el polímero obtenido del proceso de diálisis es conocido como γ -PGA puro. Este resultado lo consideramos satisfactorio en nuestro estudio. La caracterización de este biopolímero se realizó mediante resonancia magnética del ¹H y ¹³C, los espectros obtenidos fueron comparados con los reportados en la bibliografía^{129, 132}. En la Figura 6.1 se presenta el espectro de RMN-¹H correspondiente al γ -PGA donde aparece la señal del CH a 4.1 ppm, CH₂ (α) a 2.3 ppm, CH₂ (β) a 1.9 ppm y el NH a 8.1 ppm. En la Figura 6.2 se presenta el espectro de RMN-¹³C, donde la señal del CH aparece a 54 ppm, CH₂ (α) a 28 ppm, -COOH a 175 ppm y -CONH a 178 ppm.



Figura 6.1. Espectro de RMN-¹H del γ -PGA purificado, en D₂O, 300 MHz y temperatura de 25 °C.



Figura 6.2. Espectro de RMN-¹³C del γ -PGA purificado, en D₂O, 300 MHz y temperatura de 25 °C.

6.2 Determinación de la masa molecular del poli(ácido-γ-glutámico)

En un estudio previo realizado en este departamento, se determinó la masa molecular mediante análisis por GPC y la viscosidad relativa del γ -PGA hidrolizado. Con los datos obtenidos se construyó una curva de calibración, como se muestra en la Figura 6.3. En el presente estudio, se utilizó esta curva de calibración para determinar de manera indirecta la masa molecular de las fracciones del γ -PGA hidrolizado, mediante los valores de viscosidad relativa obtenidos para cada una de estas fracciones de γ -PGA.



Figura 6.3. Correlación entre el ln de la viscosidad y la masa molecular del γ -PGA determinada mediante GPC.

Basándonos en esta curva de calibración se obtuvieron las diferentes masas moleculares del γ -PGA a diferentes tiempos de hidrólisis. En la Figura 6.4 se pueden apreciar estos valores. En esta gráfica se puede observar que en las primeras horas de hidrólisis se presenta una gran disminución de la masa molecular del polímero y, al transcurrir el tiempo, la disminución de masa molecular es menor; esto se podría atribuir a que en las primeras horas hay mas sitios disponibles de ataque para el NaOH y conforme transcurrió el tiempo estos disminuyeron, por lo que el proceso de hidrólisis fue mas lento.



Figura 6.4. Cinética de hidrólisis con NaOH del γ-PGA.

De este estudio, se seleccionaron dos tiempos de hidrólisis correspondientes a 0 y 2h, con los cuales obtuvimos las masas moleculares apropiadas para continuar nuestro trabajo. Las masas moleculares de γ -PGA obtenidas en este proceso correspondieron a 155800 y 83200 g/mol. Una vez conocida la masa molecular del γ -PGA se prosiguió a la preparación de los hidrogeles de semi-IPNs basados en PAAm/ γ -PGA.

6.3 Síntesis de redes semi-interpenetradas de poli(acrilamida)/poli(ácido-γ- glutámico)

Los hidrogeles de semi-IPNs basados en PAAm/ γ PGA se prepararon con composiciones de 95/5, 90/10, 85/15, 80/20 y 75/25. El proceso de formación de las redes semi-interpenetradas se representa mediante el esquema de la Figura 6.5. En este esquema podemos observar que una vez mezcladas la PAAm y el γ -PGA, la adición del persulfato de amonio (iniciador) y subsecuentemente el TEMED (catalizador) propician la formación de la red de PAAm en presencia de las cadenas lineales del γ -PGA. Se obtuvo la red de PAAm con las cadenas de γ -PGA interpenetradas dentro de la misma, lo que dió lugar a la formación de los hidrogeles de redes semi-interpenetradas basadas en PAAm/ γ -PGA.



Figura 6.5. Proceso de síntesis de las redes semi-interpenetradas basadas en PAAm/y-PGA.

En general, los hidrogeles sintetizados presentaron transparencia y adquirieron la forma circular correspondiente al molde que los contenía con un diámetro de 3 cm. En la Figura 6.6 se presenta una fotografía de los hidrogeles después de las 48 horas

correspondientes al tiempo de lavado, en esta fotografía podemos observar que los hidrogeles presentan tamaño de diámetro mayor al del molde original debido a que los hidrogeles absorben agua durante el proceso de lavado; de esta manera, los geles con mayor contenido de γ -PGA presentan un incremento mayor en diámetro, lo cual esta relacionado con las diferentes capacidades de hinchamiento en agua de cada uno de los hidrogeles. En la presente fotografía no es fácilmente apreciable el incremento de diámetro con respecto al contenido de γ -PGA, sin embargo estas propiedades se estudiarán ampliamente en los estudios basados en cinéticas de hinchamiento en agua, análisis térmico y morfología.



Figura 6.6. Fotografía correspondiente a Hidrogeles de PAAm/y-PGA después del proceso de lavado en agua desionizada.

6.4 Estudio de la intercalación del poli(ácido-γ-glutámico) dentro de la red semiinterpenetrada, mediante microscopía óptica y microscopía de fluorescencia láser confocal.

Para llevar a acabo la observación de los hidrogeles de semi-IPNs mediante microscopía óptica, éstos fueron previamente teñidos con el colorante azul alcian. Se observó que el hidrogel de PAAm sometido al proceso de tinción no fue teñido por este colorante, como era de esperarse, ya que la PAAm no tiene los grupos carboxilo requeridos para interaccionar con este colorante; de esta manera, el hidrogel de PAAm continuó incoloro, (Figura 6.7). En cambio los hidrogeles de PAAm-γPGA sí tuvieron la capacidad de retener el colorante, por lo que se observaron de color azul, como se aprecia en la Figura 6.7.



Figura 6.7. Fotografía de los hidrogeles de PAAm y PAAm/γ-PGA después de haber sido teñidos con el colorante azul alcian.

El colorante azul alcian tiene la capacidad de unirse a compuestos sulfonados o carboxilados, debido a que es una macromolécula cargada positivamente por lo que se une a moléculas cargadas negativamente¹²⁸. Por lo tanto, la retención del colorante dentro del hidrogel con γ -PGA es atribuido a la atracción electrostática que existe entre el colorante y los grupos carboxilo libres (sin reaccionar) presentes en la cadena hidrocarbonada del γ -PGA, como se muestra de forma muy simplificada en la Figura 6.8.



Figura 6.8. Representación de la interacción del y-PGA con el colorante azul alcian.

Las observaciones obtenidas en la escala macroscópica fueron posteriormente confirmadas mediante el análisis por microscopía óptica en los hidrogeles de PAAm/ γ -PGA. En la Figura 6.9 se presentan las fotografías de los cortes de los hidrogeles hinchados en agua analizados en este estudio, donde se pudo observar la formación de una bicapa; una capa compuesta de PAAm y γ -PGA que se encuentra formando toda la red, la cual presentó un color azul tenue, y otra capa con color azul remarcado alrededor de los poros, estas observaciones podrían indicar que el γ -PGA se encuentra principalmente en este sitio. Esto lo podemos explicar con base en el carácter hidrofílico del biopolímero, lo que le permitiría ubicarse en la superficie del poro para estar en contacto con el agua y, por otra parte, interaccionar con la red de la PAAm. En la Figura 6.9 se representa de forma esquemática la probabilidad de ubicación del γ -PGA dentro de la red semi-interpenetrada.



Figura 6.9. Microscopía óptica a 500 aumentos, correspondientes a semi-IPNs hinchadas en agua con variación en la composición PAAm/ γ PGA. a)95/5, b)90/10, c)85/15, d)80/20, e)75/25, f) Esquema que representa el arreglo del γ -PGA en los poros de las semi-IPNs.

Por otra parte, en las micrografías obtenidas mediante microscopía óptica en cortes de los hidrogeles de PAAm y PAAm/ γ -PGA en un estado húmedo (Figura 6.10), se observó ausencia de color en los hidrogeles de PAAm, de forma análoga a lo observado en la escala macroscópica. En cambio, en la micrografía del hidrogel de PAAm/ γ -PGA se observó un color azul distribuido de manera uniforme dentro de la red, este color azul es atribuido a la presencia del γ -PGA unido al colorante azul alcian.



Figura 6.10. Micrografía óptica de hidrogeles húmedos a 500 aumentos. a)PAAm, b)PAAm/γ-PGA (95/5).

Finalmente, mediante estos estudios se infiere que el γ -PGA permanece dentro de la red de PAAm, y que además se encuentra distribuido de forma uniforme dentro de la red semiinterpenetrada y principalmente se concentra alrededor de los poros en la red polimérica cuando se encuentran hinchados en agua desionizada. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden de alguna forma con lo reportado por M. E. Harmon¹⁰⁹, quien se menciona que, mediante estudios basados en cinéticas de transición de fase de volumen, el polímero lineal permanece dentro de la red polimérica y que se encuentra distribuido de manera uniforme.

Con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos anteriormente, se marcó el γ -PGA con moléculas de pirenmetilamina (PyMeNH₂), para observar la distribución del γ -PGA dentro

del hidrogel de PAAm'γPGA-PyMeNH mediante microscopía de flurescencia láser confocal. En la Figura 6.11 se muestra la estructura química del γPGA-PyMeNH.



Figura 6.11. Estructura química del yPGA-PyMeNH.

Una vez finalizado el proceso de reacción y purificación del γ PGA-PyMeNH se realizaron los estudios de caracterización correspondientes. El análisis por espectroscopía UV-Vis nos reveló la existencia del grupo pireno dentro del γ -PGA, ya que se presentaron las tres bandas de absorción máxima a 314, 328 y 344 nm, características de este grupo¹²⁹ (Figura 6.12). Por otra parte, mediante este estudio se pudo inferir que el grupo pireno se unió químicamente al γ -PGA como se esperaba, ya que el γ PGA-PyMeNH logró conservar unido al grupo pireno, después de ser sometido al proceso de extracción por Soxhlet. Para estimar la cantidad de pireno que reaccionó con el γ -PGA, se determinó primeramente el contenido de pireno en la muestra sometida a la extracción por soxhlet y después de este proceso se determinó el contenido de pireno extraído por el solvente, los cálculos se realizaron tomando como base el valor de absorbancia a 344 nm en los espectros UV-Visible. Con estos valores se determinó la concentración de pireno en mol/l y finalmente el contenido de pireno en mol/g de γ -PGA, utilizando las siguientes ecuaciones respectivamente¹²⁹:

$$C = \frac{A}{\varepsilon b}$$
 (Ecuación. 6.1) $\lambda = \frac{[Py]}{\frac{m}{v}}$ (Ecuación 6.2)

en la ecuación 6.1, A es el valor de absorbancia del pireno a 344 nm, ε es el coeficiente de extinción molar y b la longitud de la celda. En la ecuación 6.2, [Py] es el contenido de pireno en mol/g, m/v es la concentración de la solución de pireno (mg/ml) utilizada en este análisis.

Con base en lo anterior, se puede decir que el pireno extraído por el solvente se encontraba atrapado fisicamente en las cadenas de γ -PGA. Sin embargo pudimos estimar que el 91% del grupo pireno presente en γ -PGA se encontró unido químicamente, mientras que solamente el 9% se encontraba atrapado fisicamente dentro del biopolímero (sin reaccionar). En la literatura se ha reportado la unión química del grupo pireno con poli(óxido de etileno)¹³⁰ y poli(ácido- α -glutámico)¹²⁹, en este trabajo se reporta la unión química del grupo pireno al poli(ácido- γ -glutámico).

En la Figura 6.12 se muestran las absorbancias en espectroscopía UV-Visible correspondientes a soluciones de distinta concentración de γ PGA-PyMeNH. En esta gráfica se observa un incremento de los valores de absorbancia en UV-Visible con el incremento de la concentración de la solución de γ PGA-PyMeNH. El contar con tres concentraciones distintas de γ -PGA modificado permitió realizar por triplicado los cálculos de la cantidad de PyMeNH₂ unida al γ -PGA, y de esta manera obtener un resultado representativo.



Figura 6.12. Espectro de Uv-Vis de soluciones con distinta concentración de γ PGA-PyMeNH. a) 0.004 mg/ml, b) 0.006 mg/ml, C) 0.008 mg/ml.

Para la determinación del contenido del grupo pireno en el γ -PGA se utilizó el valor de absorbancia correspondiente a la banda de mayor absorción a 344 nm, para determinar la concentración de pireno en mol/l y contenido de pireno en mol/g de γ -PGA, se utilizaron la ecuaciones 6.1 y 6.2, respectivamente¹²⁹.

El contenido de pireno por gramo de γ -PGA se utilizó para determinar los moles de pireno presentes en un gramo de γ -PGA, y con estos datos encontramos que, por cada 11 grupos carboxilo presentes en la cadena de γ -PGA, existe una molécula de pireno unido.

El análisis por espectroscopía de fluorescencia se realizó con la finalidad de corroborar la actividad fluorescente del γ PGA-PyMeNH₂, donde encontró que al aumentar la concentración de la solución de γ PGA-PyMeNH aumentó también la intensidad de fluorescencia, (Figura 6.13). El pico de máxima emisión de fluorescencia se presentó a 375 nm.



Figura 6.13. Espectro de fluorescencia correspondiente a soluciones con diferente concentración de γ -PyMeNH. a) 0.004 mg/ml, b) 0.006 mg/ml, c) 0.008 mg/ml.

Los estudios mediante resonancia magnética nuclear de protones también revelaron la presencia del grupo pireno unido al γ-PGA, ya que en el espectro se pueden observar las señales características del grupo pireno, aunque éstas no son muy apreciables debido a que

este grupo en agua suele formar aglomeraciones, lo cual no permite obtener señales claras¹²⁹⁻¹³¹, sin embargo en el espectro es posible apreciar su existencia. En la Figura 6.14(a) y 6.14(b) se presentan los espectros de RMN-H¹ correspondientes al γ -PGA y γ PGA-PyMeNH, respectivamente. En el espectro correspondiente al γ -PGA aparece la señal del CH a 4.1 ppm, CH₂ (α) a 2.3 ppm y CH₂ (β) a 1.9 ppm; en el espectro del γ PGA-PyMeNH₂ aparece una señal adicional a 2.8 ppm atribuida al CH₂ unido al grupo pireno y una señal de 7.8 a 8.3 ppm atribuida al grupo pireno. El espectro de RMN-H¹ correspondiente al γ PGA-PyMeNH es similar al reportado por J. Duhamel y col.¹²⁹, quien reporta la presencia de algunos picos de 7.5-8.4 ppm, correspondientes al grupo pireno en agua deuterada. Sin embargo, reportan la señal del protón del grupo NH en γ -PGA a 4.6 ppm, y en nuestro espectro de la Figura 6.14(a) aparece a 8.1 ppm, lo que coincide con lo reportado por M. Morillo y col.¹³². La señal a 4.9 ppm presente en ambos espectros es atribuida al agua existente en el solvente (D₂O).



Figura 6.14. Espectroscopía de RMN-¹H. a) γ -PGA, b) γ PGA-PyMeNH, en D₂O, 300 MHz y temperatura de 25 °C.

En la Figura 6.15 se presentan los espectros de infrarrojo correspondientes al γ -PGA, γ PGA-PyMeNH y PyMeNH₂. En los tres espectros se pudo observar la banda del estiramiento del grupo amida (NH) alrededor de 3400 cm⁻¹. En los espectros de la Figura 6.15a y 6.15b correspondientes al γ -PGA y γ PGA-PyMeNH se observó la banda correspondiente al grupo carbonilo (C=O) alrededor de 1700 cm⁻¹, en la Figura 6.15c se puede observar la aparición de las bandas correspondientes al grupo aromático alrededor de 1600 y 1400 cm⁻¹. éstas no son apreciables en el espectro de la Figura 6.15b debido a que se traslapan con las señales del

 γ -PGA. En los espectros correspondientes a PyMeNH₂ y γ PGA-PyMeNH se presenta una señal alrededor del 780 nm atribuida al estiramiento del grupo metino del anillo aromático monosustituido. Los espectros obtenidos en este estudio presentaron las bandas de absorción características de ambos componentes, con lo que se pudo confirmar una vez mas la unión del grupo pireno al γ -PGA. La asignación de las señales fue apoyada en tablas de espectroscopia de infrarrojo reportadas en la bibliografia¹³³.



Figura 6.15. Espectros obtenidos mediante FT-IR. a) γ -PGA, b) γ PGA-PyMeNH, c) PyMeNH₂. Pastillas de KBr

Una vez marcado el γ -PGA con el grupo pireno, este material se utilizó para preparar hidrogeles de semi-IPNs basadas en PAAm/ γ PGA-PyMeNH utilizando el procedimiento descrito en la parte experimental. En la Figura 6.16 se presentan las micrografías de los hidrogeles de PAAm/ γ PGA-PyMeNH obtenidas mediante microscopía de fluorescencia láser confocal. En la micrografía de la Figura 6.16a, es posible observar que el γ -PGA se encuentra distribuido de manera homogénea dentro de la red semi-interpenetrada. La Figura 6.16b corresponde a una ampliación de tamaño (seis veces) de la primera micrografía; en ésta se puede apreciar mejor la distribución homogénea de y-PGA dentro de la red. Las partes claras observadas en las micrografías corresponden al y-PGA marcado con el grupo fluorescente pireno. La longitud de onda de excitación utilizado en este análisis fue de 458 nm, y en el espectro de fluorescencia del yPGA-PyMeNH se encontró un máximo de emisión a 375 nm. Sin embargo, el microscopio de fluorescencia utilizado en este análisis no cuenta con láser de esta radiación, por lo que se utilizó la longitud de onda mas cercana posible a la de emisión, y se estuvo variando la intensidad hasta obtener las micrografías. Este tipo de fluoróforos son capaces de formar agregados de pireno excitado, formando instantáneamente excímeros que emiten a longitudes de onda mayores, lo cual pudo haber contribuido para obtener la imagen en las micrografías, a pesar de haber utilizado una longitud de onda de excitación mayor a la requerida^{126,127}. Mediante este estudio podemos inferir que el γ -PGA se encuentra intercalado dentro de la red semi-interpenetrada y se encuentra distribuido de manera uniforme, como es propuesto por M. E. Harmon y col.¹⁰⁹ donde se menciona que el polímero lineal N-alquilpoli(acrilamida) está uniformemente distribuido y atrapado dentro de la red.



b)



Figura 6.16. Micrografías de fluorescencia láser confocal correspondiente a un hidrogel de PAAm/γPGA-PyMeNH (90/10). Objetivo 20x

Las observaciones llevadas a cabo en este análisis concuerdan con las realizadas en el estudio por microscopía óptica por lo que se puede inferir la intercalación del γ-PGA dentro de la red semi-interpenetrada.

6.5 Caracterización de la morfología mediante Microscopía Electrónica de Barrido

En la Figura 6.17 se muestran las micrografías correspondientes a los hidrogeles de PAAm y semi-IPNs de PAAm/ γ -PGA, elaborados con γ -PGA de masa molecular igual a 83200 g/mol; donde se observó mayor porosidad en los hidrogeles de semi-IPNs en comparación al hidrogel de PAAm; además se observó que al aumentar el contenido de γ -PGA dentro de la semi-IPN se incrementó también la porosidad. El incremento en la porosidad puede ser explicado mediante el esquema propuesto en la Figura 6.18 donde la intercalación del polímero lineal dentro de la red de PAAm provoca la división de los poros en la red y, por consiguiente, se aumenta la cantidad de los mismos, pero con menor tamaño. Además, este comportamiento es mas evidente al aumentar el contenido de γ -PGA dentro de las semi-IPNs, ya que al existir una mayor cantidad de cadenas lineales que se van a intercalar entre las cadenas de PAAm, se favorece la división de los poros de la red de PAAm y aumenta la porosidad y, por lo tanto, disminuye el tamaño de los poros.

De lo anterior se deduce que el aumento en el contenido de γ -PGA provoca un aumento en la porosidad del material, y por lo tanto, una disminución del tamaño de poro. Con base en estos resultados podemos inferir que el γ -PGA actúa dentro de la red semi-interpenetrada como un porógeno, coincidiendo en parte con lo propuesto por M. E. Harmon y col.¹⁰⁹, donde se menciona que en un sistema de redes semi-interpenetradas el polímero lineal puede funcionar como un porógeno durante las formación del hidrogel, y después es extraído del hidrogel durante las cinéticas de hinchamiento. Por otra parte mencionan que el polímero lineal pudiera simplemente estar distribuido de manera uniforme dentro de la red. En nuestro trabajo hemos encontrado primeramente que el γ -PGA actúa como un porógeno, sin embargo éste no es extraído de la red, durante el proceso de lavado en agua desionizada, ya que mediante los estudios por microscopía óptica y microscopía de fluorescencia láser confocal encontramos que el γ -PGA permanece dentro de la red.



Figura 6.17. Micrografías obtenidas por SEM a 400 aumentos, correspondientes a semi-IPNs con diferente proporción PAAm/ γ -PGA, a)PAAm, b)95/5, c)90/10, d)85/15, e)80/20, f)75/25.



Figura 5.18. Representación del incremento de la porosidad en las redes semi-interpenetradas respecto al aumento del contenido de γ -PGA.

Se determinó el tamaño promedio de poro con la finalidad de obtener datos mas claros con base al aumento en la porosidad y así mismo de la disminución del tamaño de poro. En la Figura 6.19 se muestran los valores de los tamaños de poro con su respectiva desviación estándar en función del contenido de γ -PGA en los hidrogeles de las semi-IPNs. El tamaño promedio de poro para PAAm fue de 49 µm; mientras que para el hidrogel de PAAm/ γ -PGA (75/25) el tamaño de poro correspondió a 7.3 µm, lo cual indica que en las semi-IPNs se logró reducir hasta alrededor de 75 % el tamaño de poro, en comparación al gel de PAAm. Para los hidrogeles con proporción de PAAm/ γ -PGA correspondiente a 95/5, 90/10, 85/15 y 80/20 se obtuvieron tamaños de poro de 37 µm, 22 µm, 15 µm y 11.8 µm, respectivamente, que son valores intermedios entre el mayor contenido de γ -PGA y la ausencia de éste en los hidrogeles.

Por otra parte pudimos observar que, conforme se aumentó el contenido de polímero lineal, la disminución del tamaño de poro fue menos apreciable. La explicación a esta observación podría realizarse considerando que en una red con un tamaño de poro grande el polímero lineal puede intercalarse dentro de la red y dividir los poros con lo que se disminuye el tamaño de poro de manera bastante apreciable sin embargo en una red con tamaño de poro mas pequeño al aumentar la cantidad de polímero lineal intercalado dentro de esta red la disminución del tamaño de poro es menos apreciable. Por otra parte los hidrogeles con poros de menor tamaño presentaron mayor homogeneidad en el tamaño de poro lo que se reflejó en un valor de desviación estándar pequeño.

Por otra parte, M. E. Harmon y col.¹³⁴ reportaron un sistema de semi-IPNs de poli(Nisopropilacrilamida) y poli(N-alquil-acrilamida), donde proponen que a baja concentración del polímero lineal se forman poros aislados y al aumentar la concentración de este polímero se presenta la interconexión de los poros. Con base a esto, se podría dar una segunda explicación de la uniformidad del tamaño de poro en semi-IPNs con mayor contenido de polímero lineal, ya que al tener bajo contenido de polímero lineal, pudieron haberse formando poros aislados y conforme se incrementó el contenido de este polímero, los poros se fueron interconectando, y esto pudo reflejarse en la disminución en el tamaño de poro, con tendencia hacia valores semejantes.



Figura 6.19. Tamaño de poro promedio en hidrogeles de PAAm/γ-PGA con distinta composición molar.

Para determinar el efecto de la masa molecular del γ-PGA sobre el tamaño promedio de poro se prepararon hidrogeles utilizando γ-PGA de mayor masa molecular (155800 g/mol). En la Figura 6.20 se muestran las micrografías correspondientes a los hidrogeles elaborados con γ -PGA de masa molecular de 155800 g/mol, donde se observó un aumento en la porosidad del material al aumentar su contenido de polímero lineal, así como disminución en el tamaño de poro. Este comportamiento es similar al discutido en el análisis anterior donde se utilizó γ -PGA con masa molecular de 83,200 g/mol.

De los resultados anteriores podemos inferir el γ -PGA actúa como porógeno dentro de las redes semi-interpenetradas elaboradas con ambas masas moleculares de γ -PGA, por lo tanto la función como porógeno del γ -PGA es independiente de la masa molecular, al menos en el intervalo de valores de masa molecular estudiado.



Figura 6.20. Micrografías obtenidas mediante SEM a 400 aumentos. a) PAAm, b) PAAm/ γ -PGA (95/5), c) PAAm/ γ -PGA (90/10), d) PAAm/ γ -PGA (85/15), e) PAAm/ γ -PGA (80/20) y f) PAAm/ γ -PGA (75/25). γ -PGA de 155800 g/mol.

89

Los hidrogeles de PAAm/y-PGA 95/5, 90/10, 85/15, 80/20 y 75/25 presentaron tamaño de poro correspondiente a 48.1 μ m, 36.1 μ m, 24.2 μ m, 20.6 μ m y 4.26 μ m, respectivamente. Estos valores se presentan en la Figura 6.21. En este estudio encontramos que estos hidrogeles presentaron en general un tamaño de poro mayor al encontrado en los hidrogeles elaborados con γ -PGA de masa molecular igual a 83200 g/mol, este comportamiento podría atribuirse al hecho de contar con cadenas mas largas, las cuales pueden contener algunas zonas enrolladas por lo cual se reduce la división de los poros de la red primaria, de manera similar a como es reportado por M. E. Harmon y col¹⁰⁹ donde se menciona la formación de aglomerados de mayor tamaño al aumentar la masa molecular del lineal redes semi-interpenetradas basadas polímero en un sistema de en poli(N-isopropilacrilamida) como polímero entrecruzado y poli(acrilamida) como polímero lineal. En cambio el hidrogel con mayor contenido de y-PGA presentó un tamaño de poro similar al encontrado en el estudio anterior, por lo que en este caso el incremento de la masa molecular del polímero lineal no afectó el tamaño de poro de la semi-IPN.



Figura 6.21. Tamaño de poro promedio en hidrogeles de semi-IPNs de PAAm/ γ -PGA con distinta composición molar. Utilizando γ -PGA con masa molecular de 155800g/mol.

Finalmente tomando en cuenta que el tamaño promedio de poro para PAAm correspondió a 49 μ m, mientras que para el de hidrogel PAAm/ γ -PGA (75/25) el tamaño de poro correspondió a 4.3 μ m, podemos asumir que en estos sistemas de redes semiinterpenetradas se logró reducir hasta un 91 % el tamaño de poro en comparación al gel de PAAm.

6.6 Interacción entre los polímeros constituyentes de las redes semi-interpenetradas

El espectro de infrarrojo correspondiente a los hidrogeles elaborados con γ -PGA de masa molecular igual a 83200 g/mol presente en la Figura 6.22, mostró la banda asignada al estiramiento NH en el gel de PAAm a 3433 cm⁻¹. teóricamente esta banda debe aparecer mas estrecha en comparación a la observada en nuestro análisis; sin embargo en la bibliografía puede observarse cómo esta forma de banda es característica del estiramiento NH de algunos polímeros como PAAm⁸. Esta banda de absorción presenta un desplazamiento hacia menores números de onda en las redes semi-interpenetradas de PAAm/ γ -PGA, dicho desplazamiento se incrementó con el aumento en el contenido de γ -PGA; este comportamiento fue más apreciable en los hidrogeles con proporción PAAm/ γ -PGA correspondiente a 80/20 y 75/25, donde se observó un desplazamiento de 11 cm⁻¹, con respecto a la banda de PAAm. Estos deplazamientos pueden ser atribuidos a la formación de complejos interpolímero entre PAAm y γ -PGA; por otra parte, la presencia de los grupos funcionales amino y carboxilo en PAAm y γ -PGA, apoyan la hipótesis de una posible interacción por puentes de hidrógeno.

Con base en la existencia de los grupos amino y carboxilo presentes en PAAm y γ -PGA respectivamente, se puede proponer la posible interacción a través de la formación de puentes de hidrógeno, como se muestra en la Figura 6.23. Este tipo de interacción es reportado por T. Aoki y col.⁹ en un sistema de redes interpenetradas basadas en PAAm y PAAc.

91



Figura 6.22. FT-IR donde se muestra la banda correspondiente al estiramiento del grupo amida en redes semi-interpenetradas con diferente proporción PAAm/ γ -PGA, a)PAAm, b)95/5, c)90/10, d)85/15, e)80/20, f)75/25. Elaboradas con γ -PGA de 83200 g/mol. Pastillas de KBr.



Figura 6.23. Representación de la interacción por puente de hidrógeno entre PAAm y γ-PGA.

La Figura 6.24 muestra los espectros FT-IR de los hidrogeles elaborados con γ -PGA de masa molecular 155800 g/mol. En esta figura se puede observar un desplazamiento hacia menor número de onda, en la banda atribuida al estiramiento NH en PAAm presente a 3433 cm⁻¹. En la cual se puede apreciar un mayor desplazamiento en los hidrogeles que contienen mayor contenido de γ -PGA, obteniéndose un desplazamiento máximo de 33 cm⁻¹, con lo cual se puede inferir, al igual que en las muestras anteriores, la posible existencia de interacción entre ambos polímeros, como se muestra en la Figura 6.23. Además este desplazamiento es mayor que el obtenido en el caso anterior donde se trabajó con γ -PGA de menor masa molecular, esto se puede atribuir a que posiblemente el γ -PGA con masa molecular mas grande se acomoda dentro de la red de PAAm de tal manera que se favorece el contacto entre sus respectivos grupos funcionales y con ello se da lugar a un mayor número de sitios de interacción entre ambos polímeros, por lo que los desplazamientos en el espectro de infrarrojo son mas apreciables.



Figura 6.24. FT- IR de la banda correspondiente al estiramiento del grupo amida en redes semi-interpenetradas con diferente proporción PAAm/ γ -PGA, a)PAAm, b)95/5, c)90/10, d)85/15, e)80/20, f)75/25. Elaboradas con γ -PGA de 155800 g/mol. Pastillas de KBr.

En estos espectros, no fue posible observar desplazamientos en las señales correspondientes al resto de los grupos funcionales debido a que PAAm y γ -PGA contienen los mismos grupos funcionales, y las señales se traslapan. Por lo tanto no fue posible observar deplazamientos en las bandas de la PAAm obtenidas a 1120 y 1657 cm⁻¹ correspondientes al estiramiento del grupo amida y grupo C-O, respectivamente.

6.7 Análisis térmico mecánico

En los termogramas obtenidos en este estudio, presentes en la Figura 6.25, se puede observar que los hidrogeles con proporción PAAm/ γ -PGA de 80/20, y 75/25 inician su pérdida de agua a menor temperatura, ésto se pone de manifiesto mediante un cambio en dimensión bastante apreciable alrededor de 60 y 100 °C, por lo que se encontró que estos hidrogeles al ser sometidos al proceso de calentamiento con aplicación de carga constante pierden el agua mas rápidamente y en mayor cantidad en comparación a los hidrogeles con menor contenido de γ -PGA. Con estas observaciones podemos inferir que estas muestras absorben mayor cantidad de agua, estos datos se presentan y discuten mas ampliamente en la sección de cinéticas de hinchamiento en agua. En general, en los termogramas analizados se inicia el cambio de dimensión a 60 °C y se estabiliza aproximadamente a 120 °C.

Por otra parte se encontró que el hidrogel de PAAm presenta mayor cambio de dimensión al aplicar temperatura y carga constante, en comparación a los hidrogeles con PAAm y γ -PGA, sin embargo los hidrogeles con menor contenido de γ -PGA correspondientes a las proporciones PAAm/ γ -PGA 95/5, 90/10 y 85/15 presentaron un cambio en dimensión similar al de PAAm. Los hidrogeles con mayor contenido de γ -PGA correspondientes a 80/20 y 75/25 presentaron un cambio menor de dimensión. Tomando en consideración que los hidrogeles con menor contenido de γ -PGA absorben menor cantidad de agua, se esperaría un cambio en dimensión menor en estos hidrogeles; sin embargo se obtuvo un comportamiento contrario al esperado; este comportamiento fue atribuido a la ruptura de la muestra durante el análisis, esto se pudo apreciar al finalizar la prueba y de esta manera se registró un cambio en dimensión mayor. Esta ruptura puede deberse a la rigidez y fragilidad del hidrogel de PAAm. Por lo que se puede proponer, que al introducir a la red de PAAm un polímero lineal, éste le

confiere parte de su flexibilidad, debido a la intercalación de éste dentro de la red, por lo que al ser sometidos a este análisis, estos hidrogeles no se rompen sino que al finalizar la prueba se observa la formación de una película sobre el portamuestra, y de esta manera se registra un cambio en dimensión menor.

Tomando en consideración que los geles de PAAm y de las semi-IPNs con menor contenido de γ -PGA se rompen durante el proceso de análisis, el cambio en dimensión en estas muestras no representa la pérdida de agua.



Figura 6.25. Termogramas obtenidos por TMA para los hidrogeles de PAAm/γ-PGA. a) PAAm, b)95/5, c) 90/10, d) 85/15, e)80/20, f)75/25. Hidrogeles con γ-PGA de 83200 g/mol.

6.8 Resistencia a la compresión en ruptura

En la evaluación de las propiedades de resistencia a la compresión el hidrogel de PAAm presentó un valor de resistencia a la carga máxima correspondiente a 60 N, como se muestra

96

en la Tabla 6.2. Los valores de resistencia en las redes semi-interpenetradas fueron menores, en comparación al obtenido en PAAm, a excepción del hidrogel con menor contenido de γ -PGA el cual presentó mayor resistencia a la carga, en este caso se puede observar cómo la adición de una pequeña cantidad del polímero lineal aumentó la resistencia mecánica del gel de PAAm. Los hidrogeles con proporción PAAm/y-PGA de 80/20 presentaron una resistencia a la carga máxima correspondiente 10.6 y 8.5 N en hidrogeles con y-PGA de masa molecular correspondiente a 83200 y 155800 g/mol, respectivamente. Con estos resultados podemos sugerir que el polímero lineal (y-PGA) le confiere al gel rígido y denso de PAAm cierta flexibilidad y se requiere de menor carga para su deformación. Además se observó que los hidrogeles elaborados con y-PGA de masa molecular igual a 155800 g/mol presentaron ligeramente menor resistencia a la carga aplicada, en comparación a los hidrogeles con y-PGA de 83200 g/mol, este comportamiento podemos atribuirlo a la formación de aglomerados de mayor tamaño debido a la mayor longitud de la cadena polimérica, con lo que se obtiene un gel menos resistente a la carga aplicada. M.E. Harmon y col.¹⁰⁹ reportaron la existencia de las zonas de aglomeración atribuidas al incremento de la masa molecular del polímero lineal en sistemas de semi-IPNs.

Tabla 6.2. Resistencia a la	. compresión	correspondientes	a los	s hidrogeles	elaborados	con
ambas masas moleculares del p	olímero line:	al.				

Composición	Carga Máxima (N)			
PAAm/γ-PGA	γ-PGA 83200 g/mol	γ-PGA 155800 g/mol		
PAAm	60.4 ± 1.5	60.4 ± 1.5		
95/5	82.1 ± 8.7	76.7± 2.2		
90/10	53.4 ± 4.7	40.9 ± 0.6		
85/15	27.6 ± 4.2	28.0 ± 0.7		
80/20	10.6 ± 2.7	8.5 ± 0.9		

97
Los valores de deformación a la carga máxima en estos hidrogeles se presentan en la Tabla 6.3. El hidrogel de PAAm presentó una deformación correspondiente a 22.4 %, este valor es menor al encontrado en las redes semi-interpenetradas donde se obtuvo una deformación de hasta 75.9 y 80.6 % correspondientes a hidrogeles con y-PGA de menor y mayor masa molecular, respectivamente. Mediante estos resultados podemos observar un incremento en la elasticidad del hidrogel, el cual es proporcional a la cantidad de y-PGA presente en la red semi-interpenetrada. El hidrogel con proporción PAAm/y-PGA igual a 90/10 no cumplió con este comportamiento ya que presentó una capacidad de deformación menor a la esperada, la cual podría ser atribuido a la existencia de cierta separación de fases, lo que reduce de alguna manera la elasticidad del material; para tener datos mas claros sobre esta hipótesis, se propone como trabajo futuro, el estudio sobre la capacidad de deformación en hidrogeles de PAAm/ γ -PGA en un intervalo de composición de 95/5 y 90/10. Los hidrogeles con polímero lineal de mayor masa molecular presentaron una capacidad de deformación ligeramente mayor en comparación a los hidrogeles elaborados con y-PGA de menor masa molecular, este comportamiento puede ser atribuido a la formación de aglomerados de mayor tamaño del polímero lineal que funcionan como zonas de amortiguación dentro del hidrogel y favorecen de esta manera la flexibilidad del material, por lo que la fuerza aplicada provoca una mayor deformación del hidrogel. Como se mencionó anteriormente, M. E. Harmon y col. reportaron un aumento del tamaño de los aglomerados con respecto al incremento de la masa molecular del polímero lineal en semi-IPNs.

Composición	Deformación a la carga máxima (%)				
PAAm/γ-PGA	γ-PGA 83200 g/mol	γ-PGA 155800 g/mol			
PAAm	22.4 ± 0.3	22.4 ± 0.3			
95/5	21.2 ± 1.1	24.1 ± 1.9			
90/10	12.5 ± 0.9	14.9 ± 1.0			
85/15	67.2 ± 0.9	77.4± 5.5			
80/20	75.9 ± 3.0	80.6 ± 0.5			

Tabla 6.3. Porcentaje de deformación a la carga máxima, correspondientes a los hidrogeles elaborados con ambas masas moleculares del polímero lineal.

6.9 Propiedades de Hinchamiento

6.9.1 Cinéticas de hinchamiento en agua a diferentes temperaturas

En general, se presentan los resultados obtenidos en el estudio de las propiedades de hinchamiento en agua desionizada a temperatura constante de 25 y 37 °C, con variación en la proporción PAAm/ γ -PGA, en hidrogeles elaborados con γ -PGA de masa molecular de 83200 y 155800 g/mol.

Hidrogeles con masa molecular correspondiente a 83200 g/mol

La cinética de hinchamiento en agua a 25 °C, en hidrogeles con γ -PGA de 83200 g/mol se aprecia en la Figura 6.26. La razón de hinchamiento se incrementó conforme transcurrió el tiempo hasta llegar al equilibrio, donde el peso del hidrogel hinchado se mantuvo constante. Mientras el hidrogel de PAAm presentó una razón de hinchamiento en el equilibrio de 5.8, el hidrogel con mayor contenido de γ -PGA (75/25) presentó un valor de

23.5, en este caso el y-PGA incrementó 4 veces la capacidad de hinchamiento en comparación a los geles de PAAm. Los hidrogeles de PAAm y PAAm/ γ -PGA (95/5) fueron los primeros en alcanzar el equilibrio en su hinchamiento en alrededor de 5 h, lo cual es atribuido a su menor capacidad de absorción de agua, en cambio el resto de las muestras alcanzó su equilibrio en alrededor de 10 h, debido a que poseen mayor capacidad de hinchamiento. Sin embargo en todas las muestras analizadas se encontró que a las 5 h de hinchamiento de obtiene un valor máximo de razón de hinchamiento, y este valor cambia ligeramente con el tiempo de hinchamiento hasta llegar a un valor constante, es decir hasta alcanzar el equilibrio. Además, se observó un incremento en la razón de hinchamiento de las muestras respecto al incremento de la cantidad de y-PGA utilizada en la elaboración de las mismas. Los hidrogeles de PAAm y redes semi-interpenetradas con mas bajo contenido de y-PGA mostraron valores de razón de hinchamiento semejantes, por lo que la cantidad empleada en la elaboración de este último no fue suficiente para mejorar la capacidad de hinchamiento de la PAAm. Los hidrogeles con γ -PGA presentaron un incremento marcado en la razón de hinchamiento, por lo que se deduce que el y-PGA presenta mayor afinidad por el agua en comparación a la PAAm, ésto puede atribuirse a la presencia de grupos carboxilo libres (sin reaccionar) en la cadena del γ -PGA; además, los hidrogeles con γ -PGA presentaron mayor porosidad lo que favorece también la capacidad de hinchamiento.



Figura 6.26. Razón de hinchamiento en agua a 25 °C, en hidrogeles de PAAm/ γ -PGA. a)PAAm, b) 95/5, c) 90/10, d) 85/15, e) 80/20, f)75/25. Utilizando γ -PGA de 83200 g/mol

Los valores de razón de hinchamiento obtenidos en la cinética a 37 °C se presentan en la gráfica de la Figura 6.27. Los hidrogeles presentaron un incremento en la razón de hinchamiento con el transcurso del tiempo y con el incremento del contenido de γ -PGA, al igual que en la cinética realizada a 25 °C. En general estos valores fueron mayores a los obtenidos en el hinchamiento a 25 °C. Mientras que el hidrogel de PAAm presentó un valor de razón de hinchamiento en el equilibrio correspondiente a 5.9, el hidrogel con mayor contenido de γ -PGA (75/25) presentó un valor de 33.3, por lo tanto la adición del γ -PGA dentro de la red de PAAm favoreció hasta 6 veces la capacidad de hinchamiento en agua de esta última. Al igual que en el estudio realizado a 25 °C el equilibrio en el hinchamiento fue alcanzado en un tiempo máximo de alrededor de 10 h.

101



Figura 6.27. Razón de hinchamiento en agua a 37 °C, correspondiente a hidrogeles de PAAm/ γ -PGA. a) PAAm, b) 95/5, c) 90/10, d) 85/15, e) 80/20, f) 75/25. Utilizando γ -PGA de 83200 g/mol.

Como se puede apreciar en la Figura 6.28, los hidrogeles de composición constante hinchados a 25 y 37 °C, mostraron un incremento en los valores de razón de hinchamiento al aumentar la temperatura, este comportamiento fue poco apreciable en hidrogeles con proporción PAAm/ γ -PGA de 95/5. En cambio los hidrogeles con composición 90/10 y 80/20 presentaron un incremento en el valor de razón de hinchamiento en el equilibrio correspondiente a 0.6 y 3.9 respectivamente, al variar la temperatura de 25 a 37 °C. Con estos resultados encontramos que el incremento en la razón de hinchamiento con temperatura variable es mas fácilmente apreciable al aumentar la cantidad de γ -PGA en el hidrogel. Los hidrogeles con composición PAAm/ γ -PGA de 85/15 y 75/25, mostraron un aumento en el valor de razón de hinchamiento en el equilibrio en el estato en el estato en el estato en el estato en el xator de as fácilmente apreciable al aumentar la cantidad de γ -PGA en el hidrogel. Los hidrogeles con composición PAAm/ γ -PGA de 85/15 y 75/25, mostraron un aumento en el valor de razón de hinchamiento en el equilibrio igual a 3.5 y 9.8, respectivamente, al pasar de 25 a 37 °C, como puede observarse en la Figura 6.28.

Los valores de razón de hinchamiento en el equilibrio encontrados en la prueba a 25 °C presentaron una desviación estándar promedio de 0.3, mientras que para el hinchamiento a 37°C se obtuvo una desviación estándar promedio de 1.4.



Figura 6.28. Razón de hinchamiento en el equilibrio en hidrogeles con distinto contenido molar de γ -PGA. a) T=25°C, b) T=37°C. Hidrogeles elaborados con γ -PGA de 83200 g/mol.

El incremento en los valores de razón de hinchamiento presentado con el aumento de la temperatura puede ser atribuido a la disociación de puentes de hidrógeno intermoleculares existentes entre ambos polímeros y en PAAm, lo cual permite la separación de las cadenas poliméricas facilitando de esta manera la difusión del agua al interior de la red polimérica, con lo que se favorece el hinchamiento del material. Además mediante disociación de las interacciones por puente de hidrógeno se produce un mayor número de sitios libres que interaccionan con el agua, lo que favorece también el hinchamiento de la red polimérica. Este efecto se representa mediante el esquema de la Figura 6.29. T. Aoki y col.⁹ reportaron un esquema similar en IPNs basadas en poli(N,N, dimetilacrilamida) con poli(ácido acrílico), donde se explica el incremento de la capacidad de hinchamiento basado en la disociación de puentes de hidrógeno.

Se encontró que al aumentar el contenido de γ -PGA en el material se obtiene un mayor incremento en la razón de hinchamiento al aumentar la temperatura. Este resultado puede ser explicado con base en la hipótesis de formación y disociación por puentes de hidrógenos; de esta manera se sugiere que en los hidrogeles con mayor contenido de γ -PGA existen un mayor número de interacciones entre ambos polímeros, por lo que al aumentar la temperatura existe una mayor disociación de interacciones, por lo que se obtiene un mayor incremento en los valores de razón de hinchamiento; Por otra parte, este comportamiento puede también ser atribuido a la gran capacidad de absorción de agua del γ -PGA, la cual se determinó en el estudio anterior donde se mantuvo constante la temperatura y se varió únicamente la proporción PAAm/ γ -PGA. Así como al incremento en la porosidad de los hidrogeles obtenido con el aumento del contenido de γ -PGA dentro de las semi-IPNs lo que también favorece la capacidad de hinchamiento.



Figura 6.29. Modelo propuesto basado en el efecto del aumento de la temperatura sobre los puentes de hidrógeno formados en los hidrogeles de semi-IPNs.

En la Tabla 6.4 se presentan los valores de razón de hinchamiento obtenidos en el estudio del reuso de los hidrogeles en las cinéticas de hinchamiento a 25 y 37 °C. Los

hidrogeles al ser sometidos a un primer y segundo hinchamiento en ambas temperaturas presentaron una desviación estándar en sus valores de razón de hinchamiento correspondiente a 0.5 y 0.9, a 25 y 37 °C, respectivamente. Con base en los valores de desviación estándar obtenidos podemos deducir que estos hidrogeles pueden ser reutilizados en el hinchamiento en agua a 25 y 37 °C sin afectar de manera considerable su capacidad de hinchamiento.

Tabla 6.4. Valores de la razón de hinchamiento obtenidos en el estudio del reuso de los hidrogeles en la cinética de hinchamiento con temperatura variable. En hidrogeles con γ -PGA de masa molecular 83200 g/mol

Composición	Razón de hi 2	inchamiento (δ) 5 °C	Razón de hinchamiento (δ) 37 °C		
PAAm/yPGA	Primera prueba	Primera Segunda Primera prueba prueba prueba		Segunda prueba	
PAAm	5.8	5.7	5.9	6.4	
90/10	11.8	11.7	12.6	14	
85/15	19.2	21.9	21.7	23	
80/20	22.6	23.6	30.7	34.5	

En la Figura 6.30 se muestran los valores del porcentaje de contenido de agua en el equilibrio (% EWC) obtenidos mediante las cinéticas de hinchamiento y el análisis termogravimétrico. En esta comparación se encontró que los valores obtenidos en la determinación del % EWC a 25°C fueron semejantes al contenido de agua determinado mediante análisis termogravimétrico en los hidrogeles hinchados a 25°C.



Figura 6.30. Contenido de agua en el equilibrio en hidrogeles a 25 °C con distinto contenido molar de γ -PGA, determinada mediante: a) Cinéticas de hinchamiento y b)Análisis termogravimétrico. Hidrogeles elaborados con γ -PGA de 83200 g/mol.

• Hidrogeles con masa molecular correspondiente a 155800 g/mol

Los hidrogeles elaborados con γ -PGA de masa molecular de 155800 g/mol presentaron valores de razón de hinchamiento en el equilibrio a 25 °C semejantes a los obtenidos en el caso anterior donde se utilizó γ -PGA de menor tamaño molecular, a excepción del hidrogel con mayor contenido de γ -PGA (75/25) el cual presentó un valor de razón de hinchamiento mayor, como se puede apreciar en la Figura 6.31. Al igual que en los estudios anteriores se pudo observar un incremento en la capacidad de hinchamiento al transcurrir el tiempo de contacto con el agua, así mismo, al aumentar el contenido de γ -PGA presente en el hidrogel. Mientras que el hidrogel de PAAm presentó un valor de razón de hinchamiento en el equilibrio igual a 5.8, el hidrogel con mayor contenido de γ -PGA presentó un valor de 34.5, por lo que la adición del γ -PGA dentro de la red de PAAm mejoró su capacidad de hinchamiento alrededor de 6 veces. Se observó un alto valor de razón de hinchamiento alrededor de las 5 h, este valor de razón de hinchamiento continuó incrementándose ligeramente hasta alcanzar el equilibrio de hinchamiento, el cual se alcanzó alrededor de las 10 h.



Figura 6.31. Razón de hinchamiento en agua a 25 °C, en hidrogeles de PAAm/ γ -PGA. a)PAAm, b) 95/5, c) 90/10, d) 85/15, e) 80/20, f)75/25. Utilizando γ -PGA de 155800 g/mol

La cinética de hinchamiento a 37 °C presentó un comportamiento similar a los casos anteriores, como se puede observar en la Figura 6.32. En esta figura se puede apreciar que el hidrogel de PAAm/ γ -PGA (75/25) presentó un valor de razón de hinchamiento en el equilibrio de 44.7, por lo que en esta prueba podemos decir que el γ -PGA dentro de la red de PAAm mejoró hasta alrededor de 8 veces la capacidad de absorción de agua del hidrogel de PAAm.



Figura 6.32. Razón de hinchamiento en agua a 37 °C, correspondiente a hidrogeles de PAAm/ γ -PGA. a) PAAm, b) 95/5, c) 90/10, d) 85/15, e) 80/20, f) 75/25. Utilizando γ -PGA de masa molecular 155800 g/mol.

Los valores de razón de hinchamiento son mayores a los obtenidos en la prueba anterior donde se utilizó una temperatura de 25 °C. Por otra parte, estos valores son similares a los obtenidos en la misma prueba pero en hidrogeles con masa molecular de 83200 g/mol, a excepción del hidrogel con composición PAAm/ γ -PGA 75/25, el cual presentó mayor capacidad de hinchamiento. Con base en estos resultados podemos inferir que el incremento en la masa molecular del γ -PGA en hidrogeles con composición 75/25 mejoró la capacidad de hinchamiento en agua de los hidrogeles de PAAm/ γ -PGA.

Los valores de razón de hinchamiento se incrementaron al pasar de 25 a 37 °C en el hidrogel con proporción PAAm/ γ -PGA constante, como se muestra en la Figura 6.33, donde se presentan los valores de la razón de hinchamiento en el equilibrio en ambas temperaturas. Los hidrogeles de PAAm/ γ -PGA (95/5) no presentaron cambio apreciable en su hinchamiento al incrementar la temperatura. En cambio, los hidrogeles de PAAm/ γ -PGA en proporción 90/10, 85/15, 80/20 y 75/25 presentaron un incremento de 0.8, 5, 5.1 y 10.2, respectivamente al incrementar su temperatura de 25 a 37 °C. Como ya se mencionó en el estudio realizado con γ -PGA de masa molecular de 83200 g/mol, este incremento en la capacidad de hinchamiento a

mayor temperatura es podría ser atribuido a la disociación de puentes de hidrógeno formados de manera intercadena entre PAAm y γ-PGA así como intracadena en PAAm.



Figura 6.33. Razón de hinchamiento en el equilibrio en hidrogeles con distinto contenido molar de γ -PGA. a) T=25°C, b) T=37°C

Los valores de razón de hinchamiento en el equilibrio encontrados en las cinéticas de hinchamiento a 25 °C presentaron una desviación estándar promedio de 1.0, mientras que para el hinchamiento a 37°C se obtuvo una desviación estándar promedio de 1.7.

En la Tabla 6.5 se muestran los valores de razón de hinchamiento en el equilibrio presentados por los hidrogeles con γ -PGA de 155800 g/mol al ser sometidos a un primer y segundo hinchamiento en agua a 25 y 37 °C. Estos valores presentaron una desviación estándar correspondiente a 0.7 en ambas temperaturas. Con base en los valores obtenidos de desviación estándar podemos sugerir que estos hidrogeles pueden ser reutilizados en el hinchamiento en agua a 25 y 37 °C sin afectar de manera considerable su capacidad de hinchamiento.

Tabla 6.5. Valores de la razón de hinchamiento obtenidos en el estudio del reuso de los hidrogeles en la cinética de hinchamiento con temperatura variable. En hidrogeles con γ -PGA de masa molecular 155800 g/mol

Composición	Razón de hi 2	nchamiento (δ) 5 °C	Razón de hinchamiento (δ) 37 °C		
PAAm/yPGA	Primera prueba	Segunda prueba	Primera prueba	Segunda prueba	
PAAm	5.8	5.7	5.9	6.4	
95/5	6.0	6.2	6.2	6.2	
90/10	12.3	12.9	14	11.8	
85/15	16.3	17.5	20.2	17.5	
80/20	23.2	24.3	25.8	24.5	
75/25	38.5	41.9	38.6	39.7	

Como puede ser observado en la Figura 6.34 el porcentaje de contenido de agua en el equilibrio obtenido en la cinética de hinchamiento a 25 °C fue similar al obtenido mediante el análisis termogravimétrico de los hidrogeles hinchados a 25 °C.



Figura 6.34. Contenido de agua en el equilibrio en hidrogeles a 25 °C con distinto contenido molar de γ -PGA, determinada mediante: a) Cinética de hinchamiento, b)Análisis termogravimétrico. Hidrogeles elaborados con γ -PGA de 155800 g/mol.

6.9.2 Cinéticas de hinchamiento en soluciones buffer a diferente pH

Para la realización de estas pruebas se seleccionaron tres composiciones representativas de PAAm/ γ -PGA correspondientes a 95/5, 85/15 y 75/25. Este estudio se realizó con la finalidad de conocer la sensibilidad de los hidrogeles ante los cambios de pH.

El efecto del cambio de pH sobre los valores de razón de hinchamiento de las semi-IPNs puede ser explicado con base en el valor de pKa del γ -PGA (4-4.8)¹³⁵, ya que en los geles que contienen grupos ionizables como ácidos carboxílicos, la ionización ocurre cuando el pH del medio está por encima del pKa del grupo ionizable, lo que favorece las repulsiones electrostáticas y con ello incrementa el hinchamiento del hidrogel¹³. En cambio a pH por debajo del pKa se presenta un hinchamiento mucho menor como es reportado por L. F. Gudeman y col.¹³⁶ en sistemas de redes interpenetradas de poli(vinil alcohol) y poli(ácido acrílico).

Los cambios en las propiedades de hinchamiento esperados en este estudio se atribuyen a la presencia del grupo carboxilo libre en la cadena de γ-PGA, éste al encontrarse en un medio ácido, por debajo de su valor de pKa, se encuentra en su forma -COOH por lo que no existen repulsiones iónicas y no se estimula el hinchamiento del material, sin embargo a pH mas alcalinos, arriba del valor del pKa, estos grupos se encuentran como aniones -COO⁻ y se repelen entre ellos provocando la separación de las cadenas poliméricas y contribuyendo de esta manera al hinchamiento del material. M. Kunioka y col.¹¹ reportaron un estudio similar basado en hidrogeles de y-PGA y ɛ-lisina, los cuales fueron sometidos a soluciones buffer con pHs en un rango de >4 y <6, en este sistema existen grupos amino y carboxilo libres, por lo que a pH más ácido predominaron los grupos NH_3^+ y a pH mas básico los grupos -COO, obteniéndose en ambos casos un mayor grado de hinchamiento debido a la repulsión electrostática, en comparación a pHs intermedios donde la existencia de ambos grupos iónicos provoca la atracción entre las cadenas predominando el estado de compresión en el hidrogel. Este último comportamiento no podrá ser apreciado en nuestro sistema debido a que sólo existen grupos carboxilo libres por lo que sólo se observa el incremento de hinchamiento a pHs mas básicos.

• Hidrogeles con masa molecular correspondiente a 83200 g/mol

En los hidrogeles con γ -PGA de masa molecular de 83200 g/mol, los valores de la razón de hinchamiento en soluciones con pH constante y distinta composición PAAm/ γ -PGA se incrementaron con el aumento del contenido del γ -PGA dentro de los hidrogeles, al igual como ha sido observado en los estudios anteriores. Por lo tanto podemos inferir que el γ -PGA gobierna la capacidad de hinchamiento en estos hidrogeles al ser sometidos a soluciones con diferente pH y esto puede ser atribuido a la presencia del grupo carboxilo libre en la cadena del γ -PGA

En las cinéticas de hinchamiento en soluciones con pH=3, mostradas en la Figura 6.35, los hidrogeles con composición PAAm/ γ -PGA igual a 95/5 presentaron un ligero incremento en los valores de razón de hinchamiento al transcurrir el tiempo de contacto con la solución, en cambio los hidrogeles de composición 85/15 y 75/25 presentaron un incremento apreciable en su capacidad de hinchamiento conforme transcurrió el tiempo, alcanzando altos valores de razón de hinchamiento en el equilibrio correspondientes a 15 y 25.3 respectivamente. Se observó una mayor capacidad de hinchamiento en los hidrogeles con mayor contenido de γ -PGA. Se puede observar también que los hidrogeles alcanzan su máximo hinchamiento alrededor de las 14 h de contacto con la solución.



Figura 6.35. Razón de hinchamiento en solución buffer de pH 3 a 25 °C correspondiente a hidrogeles de PAAm/ γ -PGA: a) 95/5, b) 85/15, c) 75/25. Utilizando γ -PGA de 83200 g/mol.

El hinchamiento observado en este estudio es relativamente pequeño, en comparación a los estudios realizados con soluciones de pH mayor, debido a que al estar en contacto el hidrogel con una solución ácida de pH=3, el cual se encuentra por debajo del valor del pKa del PGA (4-4.8)¹³⁵, no se produce la ionización de los grupos carboxilo del γ -PGA, por lo que se encuentran en su estado protonado y de esta manera no existe una repulsión electrostática entre las cadenas poliméricas que facilite la difusión de la solución buffer hacia el interior de la red polimérica y por lo tanto no se favorece el hinchamiento del hidrogel, lo que se ve reflejado en bajos valores en la razón de hinchamiento. Este comportamiento puede ser explicado mediante en esquema presente en la Figura 6.36.



Figura 6.36. Comportamiento del grupo -COOH libre en γ -PGA al estar en contacto con soluciones buffer de distinto pH.

En la bibliografía se han reportado una gran variedad de estudios basados en el efecto del cambio de pH sobre las propiedades de hinchamiento de los hidrogeles. L. F. Gudeman y col.¹³⁶ reportaron un sistema de IPNs basado en poli(vinil alcohol) y poli(ácido acrílico) donde se presentó una razón de hinchamiento en el equilibrio de 3.4 a pH=3 en hidrogeles con 50% molar de PAA a 25 °C; J. Byun y col.⁷ reportaron un sistema similar compuesto de poli(vinil alcohol) y poli(ácido acrílico) donde se encontró una razón de hinchamiento en el equilibrio de 4.9 a pH 3 en hidrogeles con 10% de PVA a 30 °C; por otra parte, L. Yu-Yang y col.¹³⁷ reportaron un estudio basado en hidrogeles de poli(N-isopropilacrilamida) y ciclodextrina donde se presentó un valor de razón de hinchamiento en el equilibrio de 20 a pH=3 y 25 °C, en hidrogeles con 70 % de NIPA. En el presente estudio se obtuvo un valor de razón de hinchamiento de 25.3 a pH 3 y 25 °C en hidrogeles con 25% molar de γ -PGA, con lo que se deduce que estos hidrogeles poseen mayor capacidad de hinchamiento a este pH; sin embargo en todos los casos mencionados se presentó menor hinchamiento en comparación a cinéticas de hinchamiento de estos sistemas a mayores pHs.

Las cinéticas de hinchamiento en soluciones con pH igual a 5 y 7 se presentan en las Figuras 6.37 y 6.38, respectivamente. Las muestras de composición 95/5 presentaron muy poco hinchamiento con respecto al tiempo de contacto con la solución buffer, sin embargo las muestras de composición 85/15 y 75/25 presentaron un incremento apreciable en el hinchamiento al transcurrir el tiempo de contacto con la solución, alcanzando valores de razón de hinchamiento en el equilibrio igual a 16.5 y 35.5 respectivamente, en soluciones con pH=5

114

y para soluciones con pH=7 valores de 17.4 y 34.6 respectivamente. La capacidad de hinchamiento determinada en este estudio es mayor a la presentada en las cinéticas con soluciones de pH=3, lo cual lo podemos justificar mediante el esquema de la Figura 6.36, donde se puede deducir que a pH igual a 5 y 7 algunos grupos carboxilo del γ -PGA se encuentran en forma ionizada (-COO⁻), ya que estos valores de pH se encuentran por encima del valor de pKa del γ -PGA, por lo que este biopolímero se encuentran parcialmente ionizado y esto provoca cierta repulsión electrostática entre las cadenas poliméricas, lo que causa la separación de las mismas facilitando de esta manera la difusión de agua al interior de la red y favoreciendo el hinchamiento del hidrogel. Este comportamiento se refleja en valores de razón de hinchamiento mas altos, en comparación a las cinéticas de hinchamiento con soluciones de pH=3. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la bibliografia^{7,53,137}.



Figura 6.37. Razón de hinchamiento en solución buffer de pH 5 a 25 °C de hidrogeles de PAAm/ γ -PGA: a)95/5, b)85/15, c)75/25. Utilizando γ -PGA de 83200 g/mol.

115



Figura 6.38. Razón de hinchamiento en solución buffer de pH 7 a 25 °C de hidrogeles de PAAm/γ-PGA: a)95/5, b)85/15, c)75/25. Utilizando γ-PGA de 83200 g/mol

En un sistema de IPNs reportado por Y. M. Lee y col.⁵³ basado en poli(vinil alcohol) y poli(ácido acrílico), se presentaron valores de razón de hinchamiento de 7.2 y 11.9 a pH igual a 5 y 7 respectivamente a 35 °C, en hidrogeles con 50 % molar de PAA. J. Byun y col.⁷ reportaron un sistema similar basado en poli(vinil alcohol) y poli(ácido acrílico) donde se presentó un valor de razón de hinchamiento en el equilibrio a pH igual a 5 y 7 correspondiente a 13 y 18, respectivamente, a 30 °C en hidrogeles con 10 % de PVA. Por otra parte, L. Yu-Yang y col.¹³⁷ reportaron una razón de hinchamiento a pH igual a 5 y 7 correspondiente a 26 y 28, respectivamente, a 25 °C, en hidrogeles de poli(N-isopropilacrilamida)/ciclodextrina con 70 % de NIPA. En el presente trabajo se obtuvieron valores de razón de hinchamiento de alrededor de 35 a pH correspondiente a 5 y 7 a una temperatura de 25 °C, en hidrogeles con 75 % molar de PAAm, la capacidad de hinchamiento de estos sistemas a pH de 5 y 7 es mayor a la reportada en los sistemas mencionados anteriormente. En este estudio no se observó un incremento en la razón de hinchamiento al incrementar el pH de 5 a 7, por lo que se sugiere que el grado de ionización del γ -PGA no cambia significativamente al pasar de pH 5 a pH 7.

En ambos estudios, con solución a pH igual a 5 y 7, pudimos observar un incremento en la razón de hinchamiento con el aumento del contenido del γ-PGA.

Las cinéticas de hinchamiento en soluciones de pH 10 se muestran en la gráfica de la Figura 6.39. Los hidrogeles con proporción PAAm/ γ -PGA de 95/5 no presentaron cambios importantes en el hinchamiento con el transcurso del tiempo de contacto en solución buffer; al igual que en las pruebas anteriores. En cambio las muestras con composición 85/15 y 75/25 si presentaron cambios apreciables en estas condiciones, mostrando valores de razón de hinchamiento en el equilibrio correspondientes a 18.2 y y 37.7 respectivamente, dichos valores son mas altos que los encontrados en los estudios descritos anteriormente donde se utilizaron soluciones con pH de 3, 5 y 7. El comportamiento observado en este estudio puede ser entendido mediante el esquema de la Figura 6.36, en el cual la mayor capacidad de hinchamiento es atribuido a la existencia de un mayor número de grupos carboxilo en forma aniónica (-COO), lo que provoca una mayor repulsión electrostática entre las cadenas del polímero lineal cargado negativamente, de esta manera existe una mayor separación de las cadenas poliméricas lo que facilita la difusión de la solución buffer hacia el interior del hidrogel y con ello un mayor hinchamiento del material, por lo que se obtienen valores de razón de hinchamiento mas altos. Este comportamiento se debe a que se utilizó un pH mucho mayor al pKa del y-PGA $(4 - 4.8)^{135}$, por lo que se obtuvo un alto grado de ionización y con ello mayor hinchamiento del hidrogel.

Los hidrogeles de PAAm/ γ -PGA (75/25) presentaron una valor de razón de hinchamiento a pH=10 correspondiente a 37.7, la capacidad de hinchamiento de estos hidrogeles es mayor a la reportada por J. Byun y col.⁷ en sistemas de IPNs basados en poli(vinil alcohol) y poli(ácido acrílico) donde se encontró un valor de razón de hinchamiento en el equilibrio correspondiente a 27, utilizando solución buffer a pH=10 y temperatura de 30 °C, en hidrogeles con 10 % en peso de PVA. En ambos estudios se obtuvo mayor capacidad de hinchamiento a este pH, en comparación a los estudios realizados con soluciones buffer de pH menor.



Figura 6.39. Razón de hinchamiento en solución buffer de pH 10 a 25 °C de hidrogeles de PAAm/γ-PGA: a)95/5, b)85/15, c)75/25. Utilizando γ-PGA de 83200 g/mol

De las cuatro cinéticas de hinchamiento con solución buffer de distinto pH, podemos concluir que el hidrogel de PAAm/ γ -PGA (75/25) hinchado en solución buffer con pH=10, fue el que presentó mayor capacidad de hinchamiento, debido a que es el hidrogel con mayor contenido de γ -PGA y por lo tanto mayor contenido de grupos carboxilo, los cuales a pH=10 presentan un alto grado de ionización, debido a que este pH se encuentra por encima del pKa del γ -PGA, lo que favorece el hinchamiento del material^{13,136}.

La razón de hinchamiento en el equilibrio presentada por cada uno de los hidrogeles estudiados nos permite visualizar mejor la variación de la capacidad de hinchamiento de estos materiales respecto al incremento de pH, ésto se puede observar en la Figura 6.40. Los valores de razón de hinchamiento en el equilibrio obtenidos en soluciones a pH=3 y pH=10 correspondientes a hidrogeles con composición 85/15 fueron de 15 y 18.5, respectivamente, es decir hubo un incremento de 3.5 al aumentar el pH. Por otra parte, los hidrogeles de composición 75/25 presentaron valores de 25.3 y 37.7 respectivamente, obteniéndose un incremento de 12.4 al aumentar el pH de la solución buffer. Estos resultados pueden ser explicados mediante la Figura 6.36, donde podemos visualizar como a pH=3 los grupos

carboxilo del γ -PGA se encuentran en estado protonado y con ello no se favorece el hinchamiento del material y en cambio en solución buffer a pH=10 los grupos carboxilo del γ -PGA se encuentran en estado aniónico lo que provoca la repulsión de las cadenas poliméricas, favoreciéndose de esta manera, una mayor difusión de la solución buffer hacia el interior del hidrogel, lo que se refleja en altos valores de la razón de hinchamiento. Este comportamiento ha sido reportado por varios investigadores como, M. Kunioka y col.¹¹ en hidrogeles de γ -PGA y poli(ε -lisina); Y. M. Lee y col.⁵³ en IPNs de poli(vinil alcohol) y poli(ácido acrílico); L. F. Gudeman y col.¹³⁶ en sistemas de IPNs basadas en poli(vinil alcohol) y poli(ácido acrílico); entre otros.



Figura 6.40. Razón de hinchamiento en el equilibrio en soluciones con diferente pH, de hidrogeles de PAAm/ γ -PGA: a)95/5, b)85/15, c)75/25.

Con estos resultados podemos deducir que los hidrogeles con proporción PAAm/ γ -PGA igual a 85/15 y 75/25 son sensibles al cambio de pH y que esta sensibilidad es mayor con el aumento en el contenido de γ -PGA.

Por otra parte, en la Tabla 6.6 se presentan los valores de razón de hinchamiento obtenidos en los estudios del reuso de los hidrogeles en la cinéticas de hinchamiento a pH

119

igual a 3, 5, 7 y 10, donde se observaron desviaciones estándar promedio correspondientes a 0.2, 0.8, 1.0 y 2.4 respectivamente. Mediante los valores de desviación estándar obtenidos al repetir los hinchamientos a diferentes pHs, se puede concluir que los hidrogeles estudiados pueden ser reutilizados en este tipo de pruebas sin variar considerablemente su capacidad de hinchamiento.

Tabla 6.6. Razón de hinchamiento obtenida en el estudio del reuso de los hidrogeles en la cinética de hinchamiento con pH variable y Temperatura constante de 25 °C, en hidrogeles con γ -PGA de 83200 g/mol

Composición PAAm/γ-PGA	R. Hinchamiento		R. Hinchamiento		R. Hinchamiento		R. Hinchamiento	
	pH 3		PH 5		pH 7		pH 10	
	Prueba 1	Prueba 2						
95/5	5.7	5.5	5.7	5.7	5.7	5.8	5.9	5.7
85/15	16.0	15.5	17.5	17.1	17.9	17.1	17.6	14.5
75/25	27.9	29.7	36.4	32.2	34.6	37.5	38.0	37.0

Hidrogeles con masa molecular correspondiente a 155800 g/mol

Los hidrogeles elaborados con γ -PGA de masa molecular igual a 155800 g/mol presentaron el mismo comportamiento que los hidrogeles analizados en el caso anterior donde se utilizó γ -PGA de masa molecular igual a 83200 g/mol, es decir se observó un incremento en los valores de razón de hinchamiento al transcurrir el tiempo de contacto con la solución buffer, así como al aumentar el contenido de γ -PGA e incrementar el pH de la solución buffer.

El hinchamiento presentado por los hidrogeles de composición PAAm/γ-PGA (95/5) no sufrió cambios apreciables al ser sometido a soluciones buffer con diferente pH, al igual que en todos los estudios de cinéticas de hinchamiento discutidos anteriormente. Tomando en consideración, que estos hidrogeles presentaron un comportamiento similar al observado en el estudio anterior en hidrogeles con γ -PGA de masa molecular menor, se van a presentar únicamente los valores de razón de hinchamiento obtenidos en el equilibrio.

Los hidrogeles de composición 85/15, presentaron cambios apreciables de la razón de hinchamiento en el equilibrio, como se puede observar en la Figura 6.41. Se obtuvieron valores de razón de hinchamiento en el equilibrio correspondientes a 13.7, 15.2, 16.3 y 18.0 al estar en contacto con soluciones buffer de pH igual a 3, 5, 7 y 10, respectivamente, por lo que al pasar de pH=3 a pH=10 se obtuvo un incremento en la razón de hinchamiento correspondiente a 4.3, por lo que se puede deducir que estos hidrogeles presentan sensibilidad hacia el cambio de pH. Por otra parte, la capacidad de hinchamiento de estos hidrogeles es similar a la encontrada en los hidrogeles elaborados con γ -PGA de menor masa molecular, por lo que los valores de razón de hinchamiento presentados en este estudio son aceptables y podemos hablar de una buena sensibilidad hacia cambios de pH. En la bibliografía no se encontraron estudios basados en el efecto del la masa molecular del polímero en hidrogeles sobre las propiedades de hinchamiento dependientes del pH.

Los hidrogeles con mayor contenido de γ -PGA (75/25) presentaron valores de razón de hinchamiento en el equilibrio mayores, correspondientes a 25.2, 28.1, 27.9 y 38 en las cinéticas de hinchamiento en soluciones buffer con pH igual a 3, 5, 7 y 10. como se muestra en la Figura 6.41. Por lo tanto, el hidrogel incrementó su razón de hinchamiento en un valor igual a 12.8 al cambiar de una solución con pH=3 hacia otra solución con pH=10. Estos hidrogeles también presentaron capacidad de hinchamiento similar a la presentada por los hidrogeles con γ -PGA de masa molecular igual a 83200 g/mol. Con base en estos resultados podemos deducir que estos hidrogeles presentan sensibilidad hacia los cambios de pH.



Figura 6.41. Razón de hinchamiento en el equilibrio en soluciones con diferente pH de hidrogeles de PAAm/ γ -PGA: a)95/5, b)85/15, c)75/25. Utilizando γ -PGA de 155800 g/mol.

Los valores de razón de hinchamiento presentados por estos sistemas de hidrogeles (γ -PGA 155800 g/mol) en soluciones buffer con pH correspondiente a 3, 5, 7 y 10, fueron similares a los encontrados en el estudio anterior donde se utilizó hidrogeles con γ -PGA de 83200 g/mol, además estos valores de razón de hinchamiento son mayores a los reportados en la bibliografía en los sistemas de hidrogeles descritos en la sección anterior^{7, 53, 136, 137}.

Con lo que respecta al estudio del reuso, en la Tabla 6.7 se presentan los valores de razón de hinchamiento en el equilibrio obtenidos en ambas pruebas. Se encontraron desviaciones estándar en los valores de razón de hinchamiento correspondientes a 0.7, 0.9, 1.6, y 0.8 en pruebas de hinchamiento a pH de 3, 5, 7 y 10, respectivamente. Con base en las desviaciones estándar promedio obtenidas en este estudio se puede proponer el reuso de los hidrogeles estudiados en este tipo de pruebas.

Como conclusiones parciales de las propiedades de hinchamiento tenemos que la razón de hinchamiento se incrementó con el aumento en el contenido de γ -PGA dentro del hidrogel, tiempo de contacto con el medio de hinchamiento, temperatura y pH, en hidrogeles con ambas masas moleculares del γ -PGA.

Composición	R. Hinchamiento		R. Hinchamiento		R. Hinchamiento		R. Hinchamiento	
PAAm/y-PGA	pH 3		pH 5		pH 7		pH 10	
	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 1	Prueba 2
PAAm	5.5	5.2	5.5	5.4	5.7	5.4	5.8	5.8
95/5	5.6	5.4	5.6	5.3	5.5	5.4	5.4	5.6
85/15	11.7	10.6	14.8	13.9	[·] 15.9	13.4	17.6	18.6
75/25	22.7	24.8	28.5	24.9	27.5	21.5	36.9	33.5

Tabla 6.7. Valores de la razón de hinchamiento obtenidos en el estudio del reuso de los hidrogeles en la cinética de hinchamiento con pH variable, en hidrogeles con γ -PGA de 155800 g/mol

En general, estos sistemas de IPNs mostraron sensibilidad hacia el cambio de temperatura y pH, por lo que se comportan como materiales inteligentes, esta propiedad hace factible su aplicación potencial en áreas como la medicina, farmacia, agricultura, entre otros. Entre las principales ventajas de estos sistemas de hidrogeles se encuentra su alta capacidad de hinchamiento, así como sus propiedades de biodegradabilidad y biocompatibilidad adquiridas al introducir al biopolímero γ -PGA dentro del hidrogel. Estas últimas propiedades otorgadas por el biopolímero incrementan su potencial de aplicaciones en la medicina, principalmente en la liberación controlada de fármacos.

6.10 Poli(ácido-γ-glutámico) modificado con β-ciclodextrina

Se optó por unir la β -ciclodextrina al γ -PGA, con la finalidad de obtener nuevas propiedades que permitan incrementar el potencial de aplicaciones de este biopolímero. Principalmente en aplicaciones de liberación controlada de moléculas hidrófobas atrapadas dentro de la cavidad de la CD.

La modificación del γ -PGA con la β -CDNH₂, se realizó mediante una reacción de imidación entre los grupos carboxilo del γ -PGA y el grupo NH₂ unido a la β -CD^{125,129}. En la Figura 6.42 se presenta la estructura química del γ PGA- β CDNH. Este producto fue caracterizado mediante espectroscopía de RMN-¹H y ¹³C, así como por análisis termogravimétrico.



Figura 6.42. Estructura química propuesta para γPGA-βCDNH

En la Figura 6.43 se presentan los espectros de resonancia magnética de protón, correspondiente al γ -PGA, β -CDNH₂ y γ PGA- β CDNH. Primeramente, en el espectro de RMN-¹H (Figura 6.43a) se presentan las señales correspondientes a la β -CDNH₂, donde aparece la señal de los protones H6 y H6' a 1.9 ppm, H5 a 3.2 ppm, H3 y H2 a 3.5 ppm y 3.9 ppm, respectivamente, y H1 a 5.2 ppm. Las señales de los hidrógenos de la β -CDNH₂, presentan múltiples acoplamientos de las diferentes posiciones axial y ecuatorial, presentes en las diferentes conformaciones de los ciclos, por lo que las señales se ven ensanchadas. En el espectro de RMN-¹H (Figura 6.43c) se presentan las señales características del γ -PGA, donde aparece la señal del CH a 4.1 ppm, CH₂ (α) a 2.3 ppm, CH₂ (β) a 1.9 ppm y el NH a 8.1 ppm. En el espectro de RMN-¹H (Figura 6.43b) correspondiente al γ -PGA- β CDNH se encontraron las señales correspondientes a ambos componentes individuales, los cuales muestran desplazamientos muy similares a sus correspondientes materias primas, sin embargo, en el

caso de la β -CDNH unida al γ -PGA, las señales de los protones de los ciclos y el CH₂ adyacente al grupo amida son ahora señales mas finas, lo que sugiere una disminución en las conformaciones de los ciclos de la β -CD debido a que se encuentra fija en el polímero; estos estudios nos revelaron la modificación del γ -PGA con β -CDNH₂. Para la asignación de las señales nos apoyamos en la bibliografía¹³² y en el método de simulación teórica (Chem Draw).



Figura 6.43. Espectro de RMN-¹H, a) β -CD, b) γ PGA- β CD y c) γ -PGA, en D₂O, 300 MHz y temperatura de 25 °C.

La presencia de las señales correspondientes a la β -CDNH en el espectro de la figura 6.43b nos indica la unión de la β -CDNH₂ al γ -PGA. La β -CDNH₂ que no haya reaccionado con el γ -PGA debió ser extraída durante el proceso de diálisis en agua desionizada, ya que es muy soluble en este disolvente.

Los espectros correspondientes a la resonancia magnética del ¹³C se presentan en la Figura 6.44. El espectro de RMN-¹³C correspondiente a la β -CDNH₂ (Figura 6.44a) presentó la señal del C6' a 40 ppm, C6 a 60 ppm, C5 a 69 ppm, C3 a 71 ppm, C2 a 72 ppm, C4 a 81 ppm y C1 a 102 ppm. En el espectro del γ -PGA (Figura 6.44c), la señal del grupo CH aparece a 54 ppm, CH₂ (α) a 32 ppm, CH₂ (β) a 28 ppm, -COOH a 175 ppm y -CONH a 178 ppm. El espectro del γ PGA- β CDNH (Figura 6.44b) presentó básicamente las señales de ambos componentes. La asignación de las señales se reforzó mediante el uso de la bibliografía^{132, 137} y el modelo de simulación teórica (Chem Draw). En general, en ambos espectros de RMN-¹H y ¹³C del γ PGA- β CDNH se observaron las señales correspondientes al γ -PGA, ya que de lo contrario, la β -CDNH₂ habría sido extraída durante el proceso de diálisis en agua desionizada, ya que ésta es muy soluble en agua, y por lo tanto, no aparecerían sus señales características en los espectros de RMN.



Figura 6.44. Espectro de RMN- ¹³C, a) β -CD, b) γ PGA- β CD y c) γ -PGA, en D₂O, 300 MHz y temperatura de 25 °C.

Por otra parte, en la Figura 6.45 se rnuestran los termogramas del γ -PGA, β -CD y γ PGA- β CD, obtenidos mediante TGA con la finalidad de estudiar su estabilidad térmica. La primera pérdida en peso se presentó en un intervalo de 50 a 150 °C, ésta se atribuyó a la evaporación del agua presente en las muestras. Después de la pérdida de agua se registró una disminución en peso muy apreciable la cual fue atribuida a la degradación de cada uno de los componentes analizados (γ -PGA y β -CD), el inicio de esta degradación en γ -PGA, β -CD y γ PGA- β CD se presentó a 281, 239 y 266 °C, respectivamente. Como pudo observarse, la β -CD inicia su degradación a menor temperatura, luego el γ -PGA- β CD y finalmente el γ -PGA inicia su degradación a mayor temperatura, por lo que se encontró que el γ PGA- β CD

presentó una estabilidad térmica intermedia entre los componentes individuales, como puede observarse en la Figura 6.45. R. Hernández y col.¹³⁸ reportaron un comportamiento similar en un sistema compuesto por PVA y γ -CD, donde el PVA- γ CD inició su descomposición térmica a una temperatura de 374 °C, la cual es intermedia entre las temperaturas de descomposición del PVA (393 °C) y γ -CD (346 °C), lo que es considerado como un comportamiento lógico atribuido a la combinación de las propiedades térmicas de ambos polímeros individuales (PVA y γ CD).



Figura 6.45. Termogramas obtenidos por TGA. a)y-PGA, b)yPGA-\betaCD, c)\beta-CD

6.10.1 Hidrogeles con poli(ácido-γ-glutámico) modificado con β-ciclodextrina

El γ -PGA modificado con β -CDNH₂ por si solo no posee aplicaciones importantes, por lo que se prosiguió a la elaboración de los hidrogeles de PAAm/ γ PGA- β CDNH. Los hidrogeles cuentan con un amplio potencial de aplicaciones, la adición de la β -CDNH₂ dentro de estos hidrogeles, tiene como finalidad agregar principalmente la propiedad de atrapar moléculas hidrófobas que puedan ser utilizadas en aplicaciones de liberación controlada de fármacos.

En las cinéticas de hinchamiento correspondientes a los hidrogeles elaborados con γ PGA- β CDNH, presentes en la Figura 6.46, no se observó sensibilidad apreciable ante los cambios de temperatura y pH del medio de hinchamiento. Por otra parte, los valores de razón de hinchamiento obtenidos en este estudio se asemejan a los obtenidos en las cinéticas de hinchamiento en agua a 25 °C correspondientes a las redes semi-interpenetradas de PAAm/ γ -PGA sin β -CDNH₂, por lo que se puede deducir que los hidrogeles con β -CDNH₂ no pierden su capacidad de hinchamiento en agua a 25 °C. La pérdida de sensibilidad al cambio de temperatura y pH en los hidrogeles con β -CDNH₂ puede atribuirse principalmente a que los grupos -COOH del γ -PGA, los cuales son los principales responsables de la sensibilidad al cambio de pH en sistemas de poli(N-isopropilacrilamida)/ciclodextrina reportado por L. Yu-Yang y col.¹³⁷, se encontró que al aumentar el contenido de ciclodextrina en el hidrogel se disminuía su capacidad de hinchamiento, de este trabajo podemos deducir la conveniencia de variar el contenido de CD dentro del γ PGA y estudiar su efecto sobre las propiedades de hinchamiento.



Figura 6.46. Valores de razón de hinchamiento obtenidos en las cinéticas de hinchamiento con cambio de Temperatura y pH en hidrogeles de PAAm/ γ PGA-CDNH, a) 85/15, b) 75/25. Utilizando γ -PGA de 83200 g/mol

La apariencia física de los hidrogeles obtenidos fue similar a los preparados con γ -PGA sin ciclodextrina; el lograr obtener hidrogeles con γ PGA- β CDNH, incrementa el potencial de aplicaciones para estos sistemas de redes semi-interpenetradas, ya que la β -CD tiene la capacidad de atrapar moléculas hidrófobas en el interior de su cavidad y con ello se incrementa el número de moléculas que pueden ser utilizadas en estos sistemas para aplicaciones en sistemas de liberación controlada.

VI. CONCLUSIONES

- 1.- Se obtuvieron 15 g de γ -PGA por litro de medio de cultivo con *Bacillus licheniformis*.
- El proceso de hidrólisis del γ-PGA permitió obtener un amplio rango de masas moleculares comprendidas desde 30,000 hasta 155800 g/mol.
- 3.- Se obtuvieron hidrogeles de redes semi-interpenetradas de PAAm-γPGA con proporciones de PAAm/γ-PGA correspondientes a 95/5, 90/10, 85/15, 80/20 y 75/25, con γ-PGA de masa molecular igual a 83200 y 155800 g/mol.
- 4.- Se encontró que el γ-PGA permanece intercalado dentro de la semi-IPN, y se encuentra distribuido de manera uniforme.
- El aumento del contenido de γ-PGA en las semi-IPNs aumentó la porosidad de las mismas.
- 6.- En los espectros de infrarrojo de las semi-IPNs se observó un desplazamiento en la señal del estiramiento del grupo amida en PAAm hacia menor número de onda, con lo que se infiere en la posible interacción mediante puentes de hidrógeno.
- 7.- Las semi-IPNs de PAAm/γ-PGA presentaron mayor capacidad de deformación y menor resistencia a la compresión ante la carga máxima aplicada, en comparación a PAAm.
- 8.- La razón de hinchamiento de las semi-IPNs con γ-PGA de ambas masas moleculares, se incrementó con el tiempo de contacto en solución, con la temperatura, con el pH y con el contenido de γ-PGA.
- 9.- Se llevó a cabo la derivatización del γ-PGA con β-CD, lo cual se pudo sustentar mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

•

 los hidrogeles de PAAm/γPGA-βCDNH mo presentaron sensibilidad ante cambios de temperatura y pH.

.

•

•

VIII.- ACTIVIDADES FUTURAS

- Estudio de la aplicación de los hidrogeles estudiados, como sistemas de liberación controlada
- Pruebas de biocompatibilidad de los hidrogeles elaborados en el presente trabajo
- Síntesis y caracterización de γPGA-βCD variando la concentración de β-CD
- Estudios de derivatización del γ-PGA con otros compuestos que le confieran propiedades importantes
- Elaboración de redes interpenetradas de PAAm/y-PGA
- Elaboración de redes interpenetradas de y-PGA con otros polímeros como PVA
- Estudio del comportamiento de la resistencia a la deformación de los hidrogeles de PAAm/γ-PGA en proporciones comprendidas entre 95/5 y 90/10
- Estudio del comportamiento de la razón de hinchamiento en agua desionizada a 25 y 37 °C, en los hidrogeles de PAAm/γ-PGA en proporciones comprendidas entre 80/20 y 75/25
IX.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- 1. Y. E. Shapiro, Journal of colloid and interface science 212, 453-465 (1999)
- 2. L. I. Valuev, V. V. Chupov, G. A. Sytov, I. M. Shakhnazarova, L. N. Kislaya, V. A. Sinoni, and N. A. Platë, *Polymer Science series A* 37/5, 511-514 (1995)
- H. S. Shin, S. Y. Kim, Y. M. Lee, K. H. Lee, S. J. Kim, and C. E. Rogers, Journal of Applied Polymer Science 69, 479-486 (1998)
- 4. N. Kayaman, A. Erarslan, O. Okay, and B. M. Baysal, Journal of Applied Polymer Science 67, 805-814 (1998)
- 5. J. Woo, S. yeon, S. Soo, Y. Moo, K. Hyun, and S. Jeang, *Journal of Applied* Polymer Science 73, 113 (1999)
- 6. B. Isik, Journal of Applied Polymer Science 91, 1289 (2004)
- J. Byun, Y. M. Lee, and C. S. Cho, Journal of Applied Polymer Science 61, 697-702 (1996)
- 8. L. Liang, and E. Ruckenstein, Journal of Membrane Science 106, 167-182 (1993)
- 9. T. Aoki, M. Kawashima, H. Katano, K. Sanui, N. Ogata, T. Okano and Y. Sakurai, *Macromolecules* 27, 947-952
- 10. H. J. Choi, and M. Kunioka, Radiation Physics Chemical 46/2, 175-179 (1995)
- 11. M. Kunioka, and H. J. Choi, Journal of Environmental Polymer Degradation 4/2, (1996)
- 12. D. González, K. Fan, and M. Sevoian, Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry 34, 2019-2027 (1996)
- 13. V. Sáez, E. Hemández, and L. Sanz Angulo, Revista Iberoamericana de polímeros 4/1, 21-91 (2003)
- 14. J. Rault, A. Lucas, R. Neffati, and M. M. Pradas, *Macromolecules* **30**, 7866-7873 (1997)
- D. Klempner, Concise Encyclopedia of Polymer Science and engineering, John & Sons, New York, 1990
- 16. O. Wichterle, Encyclopedia Polymer Science and technology, 1^a Ed, 15 (1971)
- 17. G. Pedley, P. J. Skelly, and B. J. Tighe, Br. Polymer Journal 12, 99 (1980)

- 18. F. W. Billmeyer, Jr, Text book of Polymer Science, John Wiley and Sons, New York, 1962
- 19. N. A. Peppas, P. Bures, W. Leobandund, and H. Ichikawa, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 50, 27-46 (2000)
- 20. E. Tsuchida, and K. Abe, Advances in Polymer Science 45, 1-119 (1982)
- 21. S. A. Hickey, and N. A. Peppas, Journal Membrane Science 107, 229-237 (1995)
- 22. Y. Hirokawa, and T. Tanaka, *Microbial Adhesion and Aggregation*, Springer, Berlin Heidelberg, New york (1984)
- 23. H. Shunsuke, and Y. Hirokawa, T. Tanaka, Journal of Chemical Physics 87, 1392 (1987)
- 24. K. Otake, H. Inomata, M. Cono, and S. Saito, Journal of Chemical Physics 91, 1345 (1989)
- L. C. Dong, and A. S. Hoffman, *Journal of controlled Release* 4, 213-222 (1986)
- 26. Y. Hirokawa, T. Tanaka, and E. Matsuo, Journal of Chemical Physics 81, (1984)
- 27. Y. Osada, K. Umezawa, and A. Yamauchi, *Makromol. Chem.* 189, 597-605 (1988)
- 28. C. S. Hsu, and L. H. Block, Pharmaceutical Research 13, 1865-1870 (1996)
- 29. T. Tanaka, I. Nishio, S. T. Sun, and S. Veno-Nishio, Science 218, 417 (1982)
- 30. P. Chiarelli, K. Umezawa, and D. De Rossi, Polymer Gels, Ed. Plenum Press, New York, 1991
- 31. T. Okano, Y. H. Bae, H. Jacobs, and S. W. Kim, Journal controlled release 11, 255 (1990)
- 32. T. Miyazaki, N. Ascmi, and T. Urgami, *Macromolecules* 32, 2082-2084 (1999)
- 33. K. Dusek, and D. Patterson, Journal Polymer Science Part A-2 6, 1209 (1968)
- 34. T. Tanaka, *Physical Review Letter* **40**, 820 (1978)
- 35. T. Tanaka, D. J. Fillmore, S-T Sun, I. Nishio, G. Swislow, and A. Shah, *Physical Review Letter* 45, 1636 (1980)
- 36. T. Amiya, and T. Tanaka, *Macromolecules* 20, 1162 (1987)

- 37. T. Katayama, and A. Ohta, *Macromolecules* 18, 2781 (1985)
- S. Hirotsu, Y. Hirokawa, and T. Tanaka, Journal of Chemical Physics 87, 1392 (1987)
- 39. H. Inomata, Y. Yagui, and S. Saito, Macromolecules 29, 4887 (1990)
- 40. K. Otake, H. Inomata, M. Cono, and S. Saito, *Macromolecules* 23, 283 (1990)
- 41. R. A. Siegel, and B. A. Firestone, Macromolecules 21, 3254 (1988)
- 42. J. Ricka, and T. Tanaka, Macromolecules 17, 2916 (1984)
- 43. I Ohmine, and T. Tanaka, Journal of Chemical Physics 77, 5725 (1982)
- 44. I. Katime, R. Novoa, E. Diaz, E. Mendizábal, and J. Puig, *Polymer Testing* 18, 549-506 (1999)
- 45. F. Ilmain, T. Tanaka, and E. Kokufuta, Nature 349, 400 (1991)
- 46. M. L. Hitchman, M.B. Huglin, S. Melling, and M. B. Zacario, *Polymer* 25, 1441 (1984)
- 47. S. Nagaoka, Polymer Science 21, 847 (1989)
- 48. H. R. Oxley, P. H. Corkhill, J. M. Fitton, and B. J. Tighe, *Biomaterials* 14, 1064 (1993)
- 49. P. H. Corkhill, A. M. Jolly, and B. J. Tighe, *Polymer* 28, 1758 (1987)
- 50. K. D., Yao, W. G. Liu, and J. Liu, Journal of Applied Polymer Science 71, 449 (1999)
- 51. W. G. Liu and K.D. Yao, *Polymer* 42, 3943 (2001)
- 52. A. S. Hoffman, Advanced drug delivery reviews 54, 3 (2002)
- Y. M. Lee, S. H. Kim, and C. S. Cho, Journal of Applied Polymer Science 62, 301-311 (1996)
- 54. B. J. Tighe, Br. Polymer Journal 18, 8 (1986)
- 55. V. Kudela, Encyclopedia Polymer Science and Technology, Vol. 7, Ed. Wiley, New York, (1987) 783
- 56. Y. C. Chen, W. A. Fletcher, and B. J. Griffin, Biomaterials 9, 372 (1988)

- 57. N. González, I. Vadillo, M. D. Blanco, R. M. Trigo, and J. M. Teijón, *Revista Iberoamericana de Polímeros* 1, 79 (1992)
- 58. R. Jeyanthi, and K. P. Rao, *Biomaterials* **11**, 238 (1990)
- 59. K. Smetana, *Biomaterials* 14, 1046 (1993)
- 60. S. D. Bruck, Journal of Biomedical Materials 7, 387 (1973)
- 61. R. Yoda, Journal Biomaterials Science, Polymer Ed. 9, 561 (1998)
- 62. M. F. Refojo, *Revista de Plásticos Modernos* 27, 369 (1987)
- 63. M. L. Mc Dermott, and J. W. Chander, *Survey of Ophtalmology* **33**, 381 (1989)
- 64. S. Woerly, R. Marchand and C. Lavalle, *Biomateriales* 11, 97 (1990)
- 65. J. A. Rowley, G. Madlambayan, and D. J. Mooney, *Biomaterials* 20, 45 (1999)
- 66. S. Woerly, *Biomaterials* **14**, 1056 (1993)
- 67. T. De Chalain, J. H. Phillips, and A. Hinek, *Journal of Biomedical Materials* 44, 280 (1999)
- 68. Z. Q. Gu, J. H. Xiao, and X. H. Zhang, *Biomedical Materials and Engineering* 8, 75 (1998)
- 69. S. R. Sandenmon, R. G. Faragher, M. C. Allen, C. Liu, and A. W. Lloyd, *British Journal of Ophtalmology* 84, 640 (2000)
- 70. R. W. Korsmeyer, and N. A. Peppas, *Journal Controlled Release* 1, 89 (1984)
- M. J. Bruining, P. S. Edelbroek-Hoogendoorn, H. G. Blaauwgeers, C. M. Mooy, F. H. Hendrikse, and L. H. Koole, *Journal of Biomedical Materials Research* 47, 189 (1999)
- A. R. Khare, and N. A. Peppas, *Journal of Biomaterials Science*. Polymer Edition 4, 275 (1993)
- 73. M. D. Blanco, R. M. Trigo, O. García, and J. M. Teijón, *Journal of Biomaterials* Science. Polymer Edition 8, 709 (1997)
- 74. J. M. Teijón, R. H. Trigo, O. García, and M. D. Blanco, *Biomaterials* 18, 383 (1997)
- 75. N. S. Patil, J. S. Dordick, and D. G. Rethwisch, *Biomaterials* 17, 2343 (1996)

- 76. N. A. Peppas, K. B. Keys, M. Torres-Lugo, and A. M. Lowman, *Journal Controlled Release* 62, 81 (1999)
- 77. R. Dengre, M. Bajpai, and S. K. Bajpai, Journal Applied Polymer Science 76, 1706 (2000)
- 78. E. Pywell, S. Yalkowsky and J. Collet, Drug Development and Industrial Pharmacy 12, 1767 (1986)
- 79. R. M. Trigo, M. D. Blanco, J. M. Teijon and R. Sastre, *Biomaterials* 15, 1181 (1994)
- 80. L. Yean, C. Bunel and J. P. Vairon, *Makromol. Chem.* 191, 1119 (1990)
- 81. O. García, R. M. Trigo, M. D. Blanco and J. M. Teijon, *Biomaterials* 15, 689 (1994)
- 82. L. Cantarella, F. Alfoni and M. Cantarella, *Enzime and Microbial Technology* 15, 861 (1993)
- 83. Y. H. Bae, T. Okano and S. W. Kim, Journal of Controlled Release 9, 271 (1989)
- 84. S. Z. Song, J. R. Cardinal, S. H. Kim and S. W. Kim, Journal of Pharmaceutical Sciences 70, 216 (1981)
- 85. L. G. De Leede, A. G. De Boer, J. Feijen and D. D. Breimer, Journal Controlled of Release 4, 17(1986)
- 86. K. Burczack, T. Fujisato, M. Hatada and Y. Ikada, *Biomaterials* 15, 231 (1994)
- 87. K. morimoto, S. Fukanoki, K. Morisaka, S. H. Hyon, Y. Ikada, Chemical Pharmacy Bulletin 37, 2491 (1989)
- 88. K. Morimoto, A. Nagayasu, S. Fukanoki, K. Morisaka and Y. Ikada, *Pharmaceutical Research* 6, 578 (1989)
- 89. B. Gander, R. Gurny, E. Doelker and N. Peppas, *Pharmaceutical Research* 6, 578 (1989)
- 90. S. Ates, T. Tuncel, G. Otuk, *Pharmazie* 49, 459 (1994)
- 91. M. E. Mc Neil, N. B. Graham, Journal of Biomaterials Science Polymer Ed. 7, 953 (1996)
- 92. Z. M. Mathir, C. M. Dangor, T. Govender and D. J. Chetty, Journal of Microencapsulation 14, 743 (1997)

- 93. J. M. Bezemer, D. W. Grijpma, P. J. Dijkstra, C. A. Blitters and J. Feijen, Journal of Controlled Release 66, 307 (2000)
- C. Gómez, M. D. Blanco, M. V. Bernardo, R. L. Sastre, J. M. Teijon, Journal of Pharmacy and Pharmacology 50, 703 (1998)
- M. D. Blanco, O. García, R. M. Trigo, J. M. Teijon and I. Katime, *Biomaterials* 17, 1061 (1996)
- 96. A. M. Lowman, M. Morishita, M. Kajita, T. Nagai and N. A. Peppas, Journal of *Pharmaceutical Sciences* 88, 933 (1999)
- 97. H. Balin, B. D. Halpern, R. H. Davis, M. K. Akkapeddi, and G. A. Kyriazis, Journal of Reproductive Medicine 13, 2008 (1974)
- 98. B. K. Davis, I. Noske and M. C. Chang, Acta Endocrinológica 70, 385 (1972)
- H. Lapidus and N. G. Lordi, Journal ∞f Pharmaceutical Sciences 57, 1292 (1968)
- A. Afrassiabi, A. S. Hoffman and L. Cadwell, Journal of Membrane Science 33, 191 (1987)
- M. J. Deurloo, S. Bohlken, W. Kop, C. F. Lerk, W. Hennink and H. Bartelink, Cancer Chemoterapy and Pharmacology 27, 135 (1990)
- 102. E. Schocht, J. Vermeensch, F. Vandocorne, R. Vercauteren and J. P. Remon, Journal of Controlled Release 2, 245 (19 85)
- A. M. Lowman, M. Morishita, M. Kajita, T. Nagai and N. A. Peppas, Journal of Pharmaceutical Sciences 88, 933 (1999)
- D. Klempner, and H. L. Frison, Journal of Polymer Science A-2 8, 921-935 (1970)
- 105. C. M. Daoud, Journal of Polymer Science: Part B Polymer Physics 36, 1507-1512 (1998)
- 106. R. A. Style and K. E. Healy, *Biomacromolecules* 3, 591 (2002)
- 107. Y. Xia, T. Guo, M. Song and B. Zhang, *Biomacromolecules* 6/5, 2601 (2005)
- 108. S. Jin, Polymer 47, 1526 (2006)
- 109. M. E. Harmon, W. Schrof and C. W. Framk, Polymer 44, 6927 (2003)

- 110. M. J. Caulfield, G. G. Qiao, and D. H. Solomon, *Chemical Review* 102, 3067-3083 (2002)
- R. Shanker, C. Ramakrishna and R. K. Seth, Archives of Microbiology 154, 192 (1990)
- 112. J. P. Baker, L. H. Hong, H. W. Blanch, and J. M. Pravsnitz, *Macromolecules* 27, 1446-1454 (1994)
- 113. P. Munk, J. Wiley & Sons, Introduction to Macromolecular Science, EEUU, 1989
- 114. C. Pizarro, M. A. Fernández-Torroba, C. Benito, and J. M. González-Sáiz, Biotechnology and bioengineering 53/5, 497-506 (1997)
- 115. J. Baselga, I. Hernández-fuentes, I. F. Piérola, and M. A. Llorente, Macromolecules 20/12, 3060-3065 (1987)
- M. J. Caulfield, X. Hao, G. G. Qiao, and D. H. Solomon, *Polymer* 44, 3817-3826 (2003)
- 117. H. Kasgöz, S. Özgumus, and M. Orbay, *Polymer* 44, 1785-1793 (2003)
- 118. R. A. Gross, G. A. Birrer, A. M. Cromwick, S. A. Giannos, and S. P. McCarthy, Biotechnological Polymers: Medical Pharmaceutical and Industrial Applications, Ed. Technomic Publishing Co., 1993
- 119. M. Kunioka, and A. Goto, *Applied Microbiology and Biotechnology* **40**, 867-872 (1994)
- 120. Y. Ogawa, H. Hasoyama, M. Hamano, and H. Motai, *Agricultural and Biological Chemistry* 55/12, 2971-2977, (1991)
- 121. M. Kambourova, M. Tangney, and F. G. Priest, *Applied and Environmental Microbiology* 67/2, 1004-1007 (2001)
- 122. D. Sanuy, and C. Alemán, *Biomacromolecules* 2, 651-657 (2001)

÷

- 123. A.Goto, and M. Kunioka, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 56/7, 1031-1035, (1992)
- 124. H. J. Contreras, Ciclodextrinas, Naturaleza, Propiedades y Aplicaciones, Versión 1.0, Departamento de Madera, Celulosa y Papel, Universidad de Guadalajara, México, 2001
- 125. X. Guo, A. A. Abdala, B. L. May, S. F. Lincoln, and S. A. Khan, Macromolecules, (2005)

- 126. J. H. Do, H. N. Chang, and S. Y. Lee, *Biotechnology and Bioengineering* 76/3, 219-223 (2001)
- 127. H. Kubota, Y. Nambu, and T. Endo, *Journal of Polymer Science: Part A:* Polymer Chemistry **34**, 1347-1351 (1996)
- 128. E. Wendi, Hematology and Histology 37/2, (2004)
- 129. J. Duhamel, S. Kanagalingam, T. J. o'Brien, and M. W. Ingratta, *Journal American Chemical Society* 125/42, 12810-12822 (2003)
- 130. H. S. Telmo, J. V. Prazeres and Duhamel, *Macromolecules* 38/7, 2865 (2005)
- 131. H. S. Telmo, J. V. Prazeres, R. Beingessner and J. Duhamel, *Macromolecules* 34, 7876 (2001)
- 132. M. Morillo, A. M. De Ilarduya, and S. Muñoz-Guerra, *Macromolecules* **34**, 7868-7875 (2001)
- 133. S. H. Pine, J. B. Hendrickson, D. J. Cram and G. S. Hammond, Química Orgánica, 2da. Edición, Ed. McGraw-Hill, México
- M. E. Harmon and W. F. Curtis, American Chemical Society Symposium Series 833, 2 (2003).
- 135. S. Avivi, A. Gedanken, Biochemical Journal 366, 705 (2002).
- 136. L. F. Gudeman, N. A. Peppas, *Journal of Applied Polymer Science* 55, 919 (1995)
- 137. L. Yu-Yang, F. Xiao-Dong, *Polymer* 43, 4997-5003 (2002)
- 138. R. Hernández, M. Rusa, C. C. Rusa, D. López, C. Mijangos, and A. E. Tonelli, Macromolecules 37, 9620-9625 (2004)