

Tesis Doctoral

**MATERIALES POLIMÉRICOS
FUNCIONALIZADOS:
SÍNTESIS, MODIFICACIÓN Y
ESTUDIOS DE PROPIEDADES**



María Florencia Garcia Manzano

2015



El presente trabajo de Tesis Doctoral fue realizado con una beca de postgrado otorgada por CONICET, en el Grupo de Polímeros del Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, y se presenta a consideración de dicha Facultad para optar por el título de **Doctor en Ciencias Químicas.**

Directora:

Prof. Dra. Cecilia Inés Alvarez Igarzabal

Comisión de Tesis:

Prof. Dra. Miriam C. Strumia

Prof. Dra. María Rosa Mazzieri

Prof. Dra. Marcela Rodriguez

Evaluador Externo:

Prof. Dr. Nelio Ariel Ochoa

***Materiales
poliméricos
funcionalizados:***

***Síntesis, modificación
y estudios de
propiedades***

INDICE GENERAL

	<u>Página</u>
RESUMEN	1
ABSTRACT	5
ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	9
<u>CAPÍTULO 1: OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS</u>	13
1.1. OBJETIVOS GENERALES	15
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
<u>CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN</u>	19
2.1. INTRODUCCIÓN GENERAL	21
2.2. POLÍMEROS LINEALES, RAMIFICADOS Y ENTRECruzADOS	22
2.3. REDES POLIMÉRICAS ENTRECruzADAS EXPANDIBLES	29
2.4. FORMACIÓN DE GELES	30
2.5. CARACTERÍSTICAS DE LOS HIDROGELES	32
2.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROGELES	37
2.6.1. MEDIDAS DE HINCHAMIENTO Y DE FRACCIÓN DE VOLÚMENES DE RED DE LOS HIDROGELES	37
2.6.2. MEDIDA DE MASA MOLECULAR ENTRE DOS PUNTOS DE ENTRECruzAMIENTO (M_c)	40
2.6.3. ESPECTROSCOPIA INFRARROJO (FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY, FTIR)	41
2.6.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	41
2.6.5. REOLOGÍA	42
2.6.6. OTRAS TÉCNICAS	44

2.7. APLICACIONES DE LOS HIDROGELES	45
2.8. MÉTODOS PARA PREPARAR HIDROGELES	46
2.8.1. ENTRECruzAMIENTO FÍSICO	47
2.8.1.1. Calentamiento / enfriamiento de una solución de polímero	47
2.8.1.2. Gelación ionotrópica	47
2.8.1.3. Coacervación compleja	48
2.8.1.4. Puente hidrogeno	49
2.8.1.5. Maduración (agregación inducida por calor)	49
2.8.1.6. Congelación-descongelación	50
2.8.2. ENTRECruzAMIENTO QUÍMICO	50
2.8.2.1. Agentes químicos entrecruzantes	53
2.8.2.2. Reacciones de injerto	55
2.8.2.2.1. Injerto químico	55
2.8.2.2.2. Injerto por radiación	56
2.8.2.3. Entrecruzamiento por radiación	56
2.9. MODIFICACIÓN DE LOS HIDROGELES	57
REFERENCIAS	59

CAPÍTULO 3: SISTEMA DE HIDROGELES DE ACRILAMIDA Y N,N´METILEN BISACRILAMIDA, MODIFICADOS CON ETILENDIAMINA **71**

3.1. CONSIDERACIONES GENERALES	73
3.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	76
3.2.1. REACTIVOS	76
3.2.2. SÍNTESIS DE LOS HIDROGELES	76
3.2.3. MODIFICACIÓN	78
3.2.4. CUANTIFICACIÓN DE GRUPOS AMINO	78
3.2.5. CARACTERIZACIÓN FT-IR	79

3.2.6. CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA	79
3.2.7. DETERMINACIÓN DE INDICES DE HINCHAMIENTOS	80
3.2.7.1. Determinación de índices de hinchamiento en el equilibrio	80
3.2.7.2. Determinación de índices de hinchamiento a diferentes pH	80
3.2.8. DETERMINACIÓN DE LA CARGA SUPERFICIAL	81
3.2.9. RETENCIÓN DE Cu^{2+}	81
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	82
3.3.1. SÍNTESIS Y MODIFICACIÓN DE LOS HIDROGELES	82
3.3.2. ESTUDIOS DE FT-IR	86
3.3.3. ESTUDIOS DE HINCHAMIENTO A DISTINTOS VALORES DE pH	87
3.3.4. ESTUDIOS REOLÓGICOS	89
3.3.5. DETERMINACIÓN DE MOVILIDAD ELECTROFORETICA	90
3.4. CONCLUSIONES	93
REFERENCIAS	95
<u>CAPÍTULO 4: SISTEMA DE HIDROGELES DE N-ACRILÓIL-TRIS (HIDROXIMETIL) AMINOMETANO, 2-AMINOETIL METACRILATO Y N,N'-METILEN BISACRILAMIDA</u>	101
4.1. CONSIDERACIONES GENERALES	103
4.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	111
4.2.1. REACTIVOS	111
4.2.2. SÍNTESIS DE LOS HIDROGELES	111
4.2.3. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE RED	112
4.2.4. ESTUDIOS REOLÓGICOS	113

4.2.5. MODIFICACIÓN DE LOS HIDROGELES	113
4.2.5.1. Incorporación de grupos epóxido	113
4.2.5.2. Reacciones de injerto	116
4.2.6. INMOVILIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA ENZIMA LIPASA CANDIDA RUGOSA	116
4.2.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	117
4.2.8. ALMACENAMIENTO Y REUSABILIDAD	117
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	118
4.3.1. PARAMETROS DE RED	118
4.3.2. CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA	119
4.3.3. MODIFICACIÓN DE LOS HIDROGELES	121
4.3.3.1. Incorporación de grupos epóxido	121
4.3.3.2. Reacciones de injerto	125
4.3.4. CUANTIFICACIÓN DE LA ENZIMA UNIDA Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	127
4.3.5. ESTABILIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO Y REUTILIZACIÓN	131
4.3.6. REUTILIZACIÓN	131
4.4. CONCLUSIONES	133
REFERENCIAS	135
<u>CAPÍTULO 5: SISTEMA DE HIDROGELES DE N-[3-(DIMETILAMINO) PROPIL] METACRILAMIDA CON (i) DIFERENTES CANTIDADES DE AGENTE ENTRECruzANTE Y (ii) CO-POLIMERIZADOS CON N-[3-(DIMETILAMINO)ETIL] METACRILATO</u>	145
5.1. CONSIDERACIONES GENERALES	147

5.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	149
5.2.1. REACTIVOS	149
5.2.2. SÍNTESIS DE LOS HIDROGELES	149
5.2.3. DETERMINACIÓN DE PARAMETROS DE RED	150
5.2.4. ESTUDIOS POR FTIR	150
5.2.5. CARACTERIZACIÓN REOLOGICA	151
5.2.6. TEST DE COMPRESIÓN	151
5.2.7. RETENCIÓN DE METALES	151
5.2.8. ESTUDIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	152
5.2.9. ESTUDIO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE ¹³C DE SÓLIDOS	152
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	152
5.3.1. SÍNTESIS DE LOS HIDROGELES	152
5.3.2. ESTUDIOS FT-IR	154
5.3.3. ESTUDIOS REOLÓGICOS Y MECÁNICOS	155
5.3.4. RETENCIÓN DE METALES	159
5.3.5. ESTUDIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	171
5.3.6. ESTUDIO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE ¹³C DE SÓLIDOS	172
5.4. CONCLUSIONES	173
REFERENCIAS	176

CAPÍTULO 6: SISTEMA DE HIDROGELES DE N-[3-(DIMETILAMINO) PROPIL] METACRILAMIDA CO-POLIMERIZADOS CON N-[3-(DIMETILAMINO)ETIL]

METACRILATO Y 1-VINILIMIDAZOL	179
6.1. CONSIDERACIONES GENERALES	181
6.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	184
6.2.1. REACTIVOS	184
6.2.2. SÍNTESIS DE LOS HIDROGELES	185
6.2.3. PARÁMETROS DETERMINADOS	185
6.2.4. ESTUDIOS DE ESPECTROSCOPIA IR	187
6.2.5. ESTUDIOS REOLÓGICOS	188
6.2.6. TEST DE COMPRESIÓN	188
6.2.7. ESTUDIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO EN MODO DE PRESIÓN VARIABLE (VP-SEM)	188
6.2.8. RETENCIÓN DE METALES, INMOVILIZACIÓN DE ENZIMA CATALASA SOBRE EL COMPLEJO HIDROGEL/Cu²⁺ Y ENSAYO DE DESCOMPOSICIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO CON EL COMPLEJO HIDROGEL/Cu²⁺ Y EL COMPLEJO HIDROGEL/Cu²⁺/ENZIMA CATALASA	190
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	190
6.3.1. CARACTERIZACIÓN POR FT-IR	192
6.3.2. PROPIEDADES DE HINCHAMIENTO Y PARÁMETROS DE DIFUSIÓN DEL AGUA	194
6.3.3. HINCHAMIENTO CON RESPUESTA AL pH	195
6.3.4. ESTUDIOS REOLÓGICOS	198
6.3.5. PROPIEDADES MECÁNICAS	205
6.3.6. ESTUDIO DE VP-SEM	205

6.3.7. RETENCIÓN DE METALES, INMOVILIZACIÓN DE ENZIMA CATALASA SOBRE EL COMPLEJO HIDROGEL/Cu²⁺ Y ENSAYO DE DESCOMPOSICIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO CON EL COMPLEJO HIDROGEL/Cu²⁺ Y EL COMPLEJO HIDROGEL/Cu²⁺/ENZIMA CATALASA	207
6.4. CONCLUSIONES	211
REFERENCIAS	213
<u>CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES GENERALES</u>	221
TRABAJOS PUBLICADOS DURANTE EL TRABAJO DE TESIS Y	
PRESENTACIÓN DE TRABAJOS EN REUNIONES CIENTÍFICAS	227

RESUMEN

Los *materiales* que se utilizan en la vida cotidiana tienen un gran impacto en el desarrollo de la sociedad humana. En la época actual, los *polímeros* dominan en gran parte nuestras necesidades diarias y muestran un enorme potencial para el desarrollo de nuevas tecnologías. Numerosos materiales de la vida diaria, están hechos preferentemente de materiales poliméricos estándar, tales como poliolefinas, poliésteres o poliamidas. Así mismo, la química de polímeros está abocada a la elaboración de nuevos “*polímeros funcionales*”. Su desarrollo está siendo cada vez más importante por la diversidad de áreas específicas de aplicación.

Al iniciar el trabajo de Tesis, se propuso llevar a cabo la preparación de materiales poliméricos hidrofílicos *con grupos funcionales específicos* principalmente en sus estructuras. Además, realizar los *estudios físico-químicos y de estructura-propiedad* para los ensayos de las aplicaciones, de acuerdo a sus características.

En el **Capítulo 1**, se detallaron los objetivos planteados. Posteriormente, en el **Capítulo 2** correspondiente a la *Introducción General*, se abordaron los temas más importantes relacionados con el trabajo. Se describieron las propiedades más importantes de las redes poliméricas, dando mayor énfasis a las de características expandibles. Además, se detallaron las técnicas más comúnmente usadas para su preparación y caracterización, como así también de las principales aplicaciones.

En el **Capítulo 3**, se describe la síntesis de redes poliméricas entrecruzadas utilizando acrilamida (AAm) y N, N'-metilen bisacrilamida (BIS) como agente entrecruzante. Las reacciones de síntesis se llevaron a cabo bajo diferentes condiciones. Los diferentes tipos de productos, “*particulados*” y en *forma de “barra”*, fueron evaluados y modificados. En este caso, el objetivo fue obtener grupos amino primarios en las redes para otorgar a la matriz la capacidad de hinchamiento a diferentes pH y la posibilidad de retención de iones metálicos. Los *hidrogeles* resultaron de tipo homogéneos expandibles e hinchables en agua. La

retención de Cu^{2+} en ambos tipos de productos con grupos amino, resultó superior a la de los hidrogeles no modificados. A su vez, los mayores valores de retención de Cu^{2+} resultaron superiores en los productos de tipo “barra”. La desventaja que presentó la reacción usada para la incorporación de grupos amino, fue la reacción de hidrólisis secundaria producida. Para la próxima etapa, se propuso la preparación de hidrogeles a partir de monómeros con grupos amino en su estructura.

El **Capítulo 4**, se centró en la síntesis, modificación y estudio de las propiedades de *hidrogeles* obtenidos a partir de 2-aminoetil metacrilato (AEMA) y N-acriloil-tris (hidroximetil) aminometano (NAT), usando BIS como agente entrecruzante. Los productos fueron modificados por dos vías diferentes. Por un lado, se incorporaron grupos epóxido, directamente sobre la matriz (mediante el uso de dos agentes epoxidantes de diferente largo de cadena) para la posterior inmovilización de la enzima lipasa *Candida rugosa*. Por otro lado, se realizaron reacciones de *injerto* sobre la matriz, mediante la incorporación de AEMA, con posterior incorporación de grupos epóxido para inmovilizar la enzima. Posteriormente, la actividad hidrolítica de la enzima de las matrices resultantes se determinó a partir de la hidrólisis de palmitato de p-nitrofenilo (p-NPP). Los mejores productos mantuvieron entre el 86,7 y el 89,5% de la actividad correspondiente a la enzima soluble y libre. Los ensayos de estabilidad de almacenamiento y reutilización permitieron indicar que varias de las matrices que contienen la enzima inmovilizada, conservan la actividad con mayores valores de porcentajes, en comparación con la enzima libre.

De esta manera, se pudo realizar la comparación en la eficiencia de la actividad de la enzima cuando fue inmovilizada sobre *grupos funcionales* en la superficie de la matriz con aquellas que contenían *el mismo grupo funcional* pero formando parte de las cadenas poliméricas formadas a partir de reacciones de *injerto*.

El **Capítulo 5** contiene la descripción de la preparación de *hidrogeles* en base a N-[3-(dimetilamino) propil] metacrilamida (DMAPMD) con (i) diferentes cantidades de agente entrecruzante (BIS) y (ii) co-polimerizado con N-[3-

(dimetilamino)etil] metacrilato (DMAEMT), para la remoción de iones metálicos divalentes (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} y Hg^{2+}) desde soluciones acuosas. Los hidrogeles resultaron homogéneos, expandibles e hinchables en agua. La retención de los iones metálicos resultó especialmente efectiva y alta hacia Cu^{2+} y Pb^{2+} . Los valores de coeficientes de correlación, indicaron que los datos experimentales para Cu^{2+} , Zn^{2+} y Pb^{2+} ajustan al modelo de Langmuir, mientras que para Hg^{2+} , ajustan al modelo de Freundlich.

Finalmente, el **Capítulo 6** describe la preparación de *hidrogeles* utilizando DMAPMD, DMAEMT y 1-vinilimidazol (VI) como monómeros mono-vinílicos, y BIS, como agente entrecruzante. Los productos resultaron homogéneos, expandibles e hinchables en agua. Los estudios de propiedades mecánicas mostraron que la incorporación de VI aumentó la rigidez de los materiales. Los productos con Cu^{2+} adsorbido (polímero-metal), se usaron para ensayar la efectividad en la descomposición de H_2O_2 . Dichos productos, fueron comparados con matrices polímero-metal que contienen la enzima catalasa inmovilizada. En los casos en los que se usaron los complejos polímero-metal, la descomposición de peróxido de hidrógeno fue efectiva.

ABSTRACT

The materials used every day in the life have a great impact on the development of human society. At the present time, polymers largely dominate our daily needs and show enormous potential for developing new technologies. Numerous materials of daily living are preferably made of standard polymer materials such as polyolefins, polyesters or polyamides. Also, polymer chemistry is doomed to the development of new "functional polymers". Its development is becoming increasingly important for the diversity of specific areas of application.

In this research, it was proposed to realize the preparation of hydrophilic polymeric materials with specific functional groups in their structures. In addition, the physicochemical and structural properties were analyzed for testing application studies, according to their characteristics.

In the Chapter 1, the main objectives were detailed. Later, in Chapter 2, corresponding to the General Introduction, the most important work-related issues were addressed. The most important properties of the polymer networks are described, giving greater emphasis to the expandable networks. In addition, the most commonly used techniques for the preparation and characterization, as well as the main applications, were detailed.

In Chapter 3, the synthesis of crosslinked polymer networks using acrylamide (AAm) and N, N'-methylene bisacrylamide (BIS) as crosslinking agent was described. The synthesis reactions were carried out under different conditions. Different types of products ("particulates" and in a "rod form") were evaluated and modified. In this case, the objective was to obtain primary amino groups in the networks to give the matrix swelling capacity at different pH and the possibility to retain metal ions. The hydrogels were homogeneous, expansible and swellable in water. Retention of Cu^{2+} in both types of products with amino groups was higher than those unmodified. In turn, higher retention values of Cu^{2+} were higher in rod type products. The disadvantage presented by the reaction used to incorporate amino groups, was

caused by hydrolysis, as secondary reaction. For the next stage, the preparation of hydrogels from monomers with amino groups in their structure was proposed.

Chapter 4 is focused on the synthesis, modification and study of the properties of hydrogels obtained from 2-aminoethyl methacrylate (AEMA) and N-acryloyl-tris (hydroxymethyl) aminomethane (NAT), using BIS as crosslinking agent. The products were modified in two different ways. On one hand, epoxy groups were incorporated directly into the matrix (using two epoxidizing agents with different long chain) for subsequent immobilization of *Candida rugosa* lipase enzyme. Furthermore, grafting reactions were performed on the matrix by incorporating AEMA, with subsequent incorporation of epoxide groups to immobilize the enzyme. Subsequently, the hydrolytic activity of the enzyme-containing matrices was determined from the hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate (p-NPP). The best product kept values between 86.7 and 89.5% of the activity respect to the amount of the soluble and free enzyme. The storage stability and reuse tests allowed indicate that several of the enzyme-containing matrices retained activity percentages higher values compared to the free enzyme.

Thus, it was possible to compare the efficiency of the enzyme activity when it was immobilized on functional groups on the surface of the network with those containing the same functional group but forming part of the polymer chains from grafting.

Chapter 5 contains a description of the preparation of hydrogels based on N-[3- (dimethylamino) propyl] methacrylamide (DMAPMD) with (i) varying amounts of crosslinking agent (BIS) and (ii) co-polymerized with N- [3- (dimethylamino) ethyl] methacrylate (DMAEMT), for the removal of divalent metal ions (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} and Hg^{2+}) from aqueous solutions. The hydrogels were homogeneous, expansible and swellable in water. Retention of metal ions was particularly effective and high to Cu^{2+} and Pb^{2+} . The values of coefficients of correlation indicated that the experimental data for Cu^{2+} , Zn^{2+} and Pb^{2+} resulted in accordance with the Langmuir model, while in accordance with the Freundlich model for Hg^{2+} .

Finally, Chapter 6 describes the preparation of hydrogels using DMAPMD,

DMAEMT and 1-vinylimidazole (VI) as mono-vinyl monomers and BIS as crosslinking agent. The products were homogeneous, expansible and swellable in water. Mechanical properties studies showed that incorporation of VI increased the stiffness of the materials. Polymer-metal (Cu^{2+}) products were used to test the effectiveness of the decomposition of H_2O_2 . These products were compared to polymer-metal matrices containing immobilized catalase. In the cases where the polymer-metal complexes were used, the decomposition of hydrogen peroxide resulted effective.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAm: acrilamida (IUPAC: prop-2-enamida)
AAc: ácido acrílico (IUPAC: ácido Prop-2-enoico)
AEMA: 2-aminoetil metacrilato (IUPAC: 2-aminoetil metacrilato)
AG: arabinogalactano
AGP: proteína arabinogalactano
AI: ácido itacónico (IUPAC: ácido 2- metilidenobutanedioico)
APS: persulfato de amonio (IUPAC: peroxodisulfato de diamonio)
BDGE: 1,4 butanodiol diglicidil éter (1,4-Bis(2,3-epoxypropyloxy)butane; IUPAC: 2,2'-[1,4-butanediilbis(oxymetilen)]dioxirane
BIS: N, N'-metileno bisacrilamida (IUPAC: N,N'-metileno bisacrilamida)
BR: *buffer* Britton Robinson
Ce(IV): sulfato de amonio cérico (IUPAC: sulfato de amonio cerico (4+))
CMC: carboximetilcelulosa
CMCh: carboximetilquitina
CMChs: carboximetilquitosano
Cn: relación característica de Flory del polímero lineal
CS: quitosano
 ρ_1 : densidad del polímero seco
 ρ_2 : densidad del agua
 ρ_h : densidad de heptano
DMAPMD: N-[3-(dimetilamino) propil] metacrilamida
DMAEMT: N-[3-(dimetilamino)etil] metacrilato
DMF: dimetilformamida
DN-gel: hidrogeles de doble red (del inglés “*double network gel*”)
DSC: calorimetría diferencial de barrido
 ξ : tamaño de poro
ECH: epíclorhidrina (IUPAC: 2-(clorometil)oxirano)
EDA: etilendiamina (IUPAC: 1,2-etanodiamina)
EGDMA: etilenglicoldimetacrilato (IUPAC: 1,2-etanodiilbis(2-metilacrilato)
EWC: fracción en peso de agua en equilibrio (del inglés “*equilibrium water content*”)
f: fracción del monómero en el hidrogel
% G: porcentaje de injerto (del inglés porcentaje de “*grafting*”)
G': componente elástica o módulo de almacenamiento
G'': componente viscosa o módulo de pérdida
GOD: glucosa oxidasa
GP: glicoproteína
HDPE: polietileno de alta densidad
HMDA: hexametildiamina (IUPAC: 1,6-hexanodiamina)
IPN: red polimérica interpenetrada (del inglés “*interpenetrated networks*”)
LDPE: polietileno de baja densidad

Lip: lipasa *Candida rugosa*
 M: masa molecular del monómero
 MAA: metacrilato de metilo (IUPAC: metil 2 –metilpropenoato)
 M_c: masa molecular entre dos puntos de entrecruzamiento
 m_{n,e}: peso de hidrogel hinchado
 m_r: masa del hidrogel luego de la síntesis
 m_s: peso de hidrogel en estado seco
 m_{msu}: masa del sustrato modificado
 m_{su}: masa del sustrato antes de la reacción de modificación
 Mt: masa de agua que ha difundido en la matriz a tiempo t
 M_∞: masa de agua que difundió hacia la matriz en el equilibrio
 n: número relacionado al tipo de difusión
 NAT: N-acriloil-tris (hidroximetil) aminometano (IUPAC: N-[1,3-dihidroxi-2 (hidroximetil)propan-2-il]prop-2-enamida))
 NIPA: N-isopropilacrilamida (IUPAC: 3-metil-2-metilenbutanamida)
 PAA: poli (ácido acrílico)
 PAAm: poliacrilamida
 PBO: peróxido de benzoilo (IUPAC: dibenzoil peróxido)
 PEG: poli (etilenglicol)
 PEO: poli (óxido de etileno)
 PET: poli (etilentereftalato)
 PLA: poli (ácido láctico)
 PMA: poli (metacrilato de metilo)
 p-NPP: palmitato de p-nitrofenilo (palmitato de 4-nitrofenilo; 4-nitrofenil palmitato; IUPAC: (4-nitrofenil)hexadecanoato)
 PVA: poli (vinilalcohol)
 PVC: poli (cloruro de vinilo)
 PVP: poli (vinil pirrolidona)
 PTFE: poli (tetrafluoretileno)
 RVL: rango viscoelástico lineal
 qr: índice de hinchamiento en el estado relajado
 qv: índice de hinchamiento en volumen en el equilibrio
 qw: índice de hinchamiento en peso en el equilibrio
 ST: estireno (IUPAC: feniletano)
 SEM: microscopía electrónica de barrido
 t: tiempo
 TEA: trietanolamina (IUPAC: 2,2',2''-nitrilotrietanol)
 TEMED: tetrametiletildiamina (IUPAC: N,N,N',N'-tetrametil-1,2-etanodiamina)
 Tg: temperatura de transición vítrea
 TNBS: ácido trinitrobenceno-sulfónico (IUPAC: ácido 2,4,6- trinitrobenceno-sulfónico)
 VI: volumen molar del solvente
 v_{2r}: fracción de volumen de red polimérica luego de la preparación
 v_{2s}: fracción de volumen de red polimérica en el hidrogel hinchado en el equilibrio

VDT: 2-vinil-4,6-diamino-1, 3, 5-triazina (IUPAC: 4,6-diamino-2-vinil-1,3,5-triazina)

VI: 1-vinilimidazol (IUPAC: 1-vinil-1H-imidazol)

V_p : volumen de los discos de polímero seco

VP-SEM: microscopía electrónica de barrido de presión variable

V_r : volumen promedio de las unidades repetidas del polímero

W_a : peso del disco de polímero seco en aire

W_h : peso del disco de polímero seco en heptano

χ : parámetro de interacción polímero-solvente

ϕ : funcionalidad del agente entrecruzante

CAPÍTULO 1.

OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS

1.1. OBJETIVOS GENERALES

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

CAPÍTULO 1

OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS

Actualmente, los materiales poliméricos dominan en gran parte nuestras necesidades diarias de desarrollo y muestran un enorme potencial para el progreso de nuevas tecnologías.

Los materiales hidrofílicos entrecruzados funcionalizados *capaces de absorber grandes cantidades de agua* han sido muy promisorios en su utilidad en diversas aplicaciones.

Los *materiales poliméricos funcionalizados* pueden ser obtenidos en forma de membranas, micro-partículas, barras, micro-esferas, entre otras. Su aprovechamiento en diversas áreas de la ciencia y la tecnología, es consecuencia de la relación entre la estructura y las propiedades que presentan. Es por ello, el gran interés en desarrollar esta área, tanto en sus aspectos básicos, como aplicados. Para la mayoría de las aplicaciones, el hinchamiento, el proceso de difusión y la composición de la red polimérica son muy importantes, porque determinan el funcionamiento o comportamiento de la red y su relación con el medio.

Por lo expuesto anteriormente, en este trabajo de Tesis se plantearon los siguientes objetivos generales y particulares.

1.1. OBJETIVOS GENERALES

Los Objetivos Generales del trabajo de Tesis se basaron en la preparación de materiales poliméricos hidrofílicos con grupos funcionales específicos en sus estructuras. Además, se planteó la necesidad de llevar a cabo diversos estudios para poder analizar y relacionar la estructura de los productos con sus propiedades. Por otro lado, se propuso realizar ensayos de algunas aplicaciones. Principalmente para ello, se proyectó que los productos tuviesen las características apropiadas para ser

utilizados en aplicaciones concretas, como acomplejantes de iones metálicos, para la descontaminación de ríos, efluentes, etc. y en la inmovilización de moléculas biológicas, para su uso en catálisis.

La búsqueda de propiedades mecánicas óptimas, fue de gran importancia debido a que, la reutilización de estos sistemas poliméricos es fundamental para su relevancia en las áreas mencionadas. Para lograr el objetivo del trabajo, se planteó entonces la combinación de numerosos monómeros, considerando las ventajas que aportan cada uno de ellos.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los Objetivos Específicos planteados comprendieron:

-Llevar a cabo la preparación de nuevos materiales poliméricos hidrofílicos funcionalizados. Para ello, se propuso optimizar las condiciones experimentales para la preparación de dichos materiales, utilizando distintas estrategias de síntesis, o de modificación de los materiales de partida, según las necesidades. Además, se planteó la combinación de distintos monómeros, considerando los grupos funcionales presentes en su estructura, y la posibilidad de co-polimerización, para lograr productos en los que la combinación favorezca las propiedades finales.

-En cuanto a la modificación de los materiales, se proyectó realizar reacciones de injerto o “*grafting*” de monómeros que confieran los grupos funcionales específicos requeridos. Uno de los propósitos de esta estrategia, fue realizar estudios de comparación de los productos conteniendo los grupos funcionales en la red polimérica, con aquellas conteniendo el mismo grupo funcional, pero formando parte de las cadenas poliméricas injertadas.

- Realizar los estudios de caracterización de los materiales, desde el punto de vista físico-químico, reológico, mecánico y morfológico, entre otros.

-Llevar a cabo el estudio y el análisis de las propiedades de los materiales.

-Realizar ensayos de aplicación de los materiales desarrollados, de acuerdo a sus propiedades finales. Para ello, se propuso la utilización de los productos en las siguientes áreas:

- ✓ Para la descontaminación (de ríos, efluentes, entre otros), con aquellos materiales con grupos funcionales que actúan como acomplejantes de iones metálicos.

- ✓ En el área biológica, con aquellos materiales con grupos funcionales capaces de inmovilizar moléculas biológicas, tales como enzimas, para lograr productos útiles en catálisis enzimática.

CAPÍTULO 2:

Introducción

2.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

2.2. POLÍMEROS LINEALES, RAMIFICADOS Y ENTRECruzADOS

2.3. REDES POLIMÉRICAS ENTRECruzADAS

EXPANDIBLES

2.4. FORMACIÓN DE GELES

2.5. CARACTERÍSTICAS DE LOS HIDROGELES

2.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROGELES

2.7. APLICACIONES DE LOS HIDROGELES

2.8. MÉTODOS PARA PREPARAR HIDROGELES

2.9. MODIFICACIÓN DE HIDROGELES

REFERENCIAS

CAPÍTULO 2

2.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los materiales poliméricos simples y complejos, forman parte de diferentes objetos de la vida diaria, pero incluso, forman parte como eje fundamental de nuestro organismo. En el cuerpo, los músculos y los huesos están formados por polímeros naturales tales como las proteínas, así como nuestro material genético, ADN y ARN, forman también estructuras poliméricas. La celulosa y los hidratos de carbono complejos que forma parte del material vegetal, son polímeros. El caucho, es otro buen ejemplo de un polímero de origen natural.

Ahora bien, muchos de los polímeros comúnmente usados son sintéticos. En esta categoría se incluyen el rayón, el nylon, la bakelita, el poli(cloruro de vinilo), PVC, el poli(tetrafluoretileno), PTF, el poliestireno y el poliéster, entre otros.

Los polímeros se forman cuando numerosos monómeros similares o distintos se unen entre sí por medio de enlaces químicos, formando estructuras de peso molecular elevado (1). La mayoría de los polímeros se componen de numerosas cadenas largas en forma lineal. Muchas veces, estas largas cadenas están conectadas entre sí por medio de "agentes entrecruzantes o reticulantes" para hacer del polímero un material en forma de malla, más fuerte.

Ahora bien, una de las características más importantes desde el punto de vista microestructural de un polímero, es la referida a lo que comúnmente se le llama su "arquitectura". La misma, se refiere a la disposición espacial de sus cadenas, que se pueden encontrar no solo en forma lineal o entrecruzada, sino también en forma de ramificaciones. Estas últimas, pueden producirse al azar en la reacción de polimerización usada para formar el polímero, o bien, creándolas por medio de reacciones específicas, diseñando una arquitectura específica dirigida a un uso determinado.

La arquitectura de un polímero afecta a muchas de sus propiedades, incluyendo la viscosidad de la solución, la solubilidad en diversos disolventes, la

temperatura de transición vítrea, T_g^1 , y el tamaño de los “ovillos” individuales que forma una cadena polimérica en solución, entre otras (1).

2.2. POLÍMEROS LINEALES, RAMIFICADOS Y ENTRECruzADOS

La Figura 2.1 muestra esquemáticamente polímeros lineales, ramificados y entrecruzados.

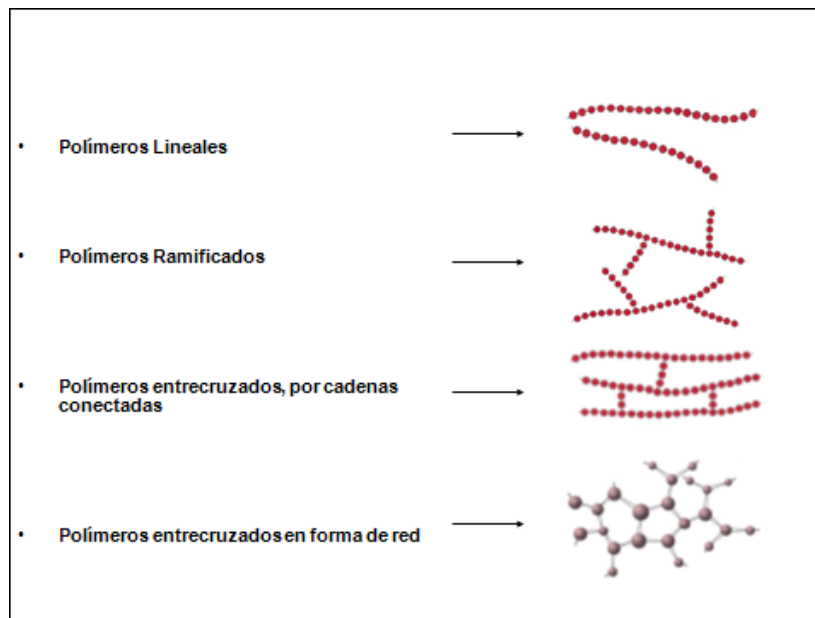


Figura 2.1 Esquema de polímeros lineales, ramificados y entrecruzados

En general, los polímeros lineales mantienen una estructura empaquetada y fuerte por uniones entre sí, tales como las de puente hidrógeno en el caso del Nylon 6, 6. Otros polímeros tales como el polietileno lineal o de muy bajo grado de ramificación, mantienen sus cadenas unidas por uniones de tipo Van der Waals. Este, conocido comúnmente como polietileno de alta densidad (HDPE), posee características de relativa rigidez y se utiliza en aplicaciones tales como chalecos

¹ T_g : temperatura de transición vítrea (temperatura de transición entre el estado "vítreo", duro, frágil y quebradizo y "gomoso", elástico y flexible)

antibalas. Ahora bien, si el polietileno posee ramificaciones en sus cadenas, la eficiencia del empaquetamiento es reducido en comparación con la estructura lineal, dando polietileno de baja densidad (LDPE), material menos fuerte y relativamente flexible, que se utiliza en aplicaciones tales como películas, films o bolsas.

Si las ramificaciones de cadena son extremadamente largas, pueden aumentar la fuerza, la dureza, y la Tg del polímero, debido a un aumento en el número de enredos por cadena.

Cuando se forma una reticulación química por medio de enlaces covalentes entre las cadenas, tiende a aumentar la Tg, la fuerza y la resistencia del material. Este proceso, se utiliza por ejemplo para fortalecer cauchos en el proceso de “vulcanización”, basado en la reticulación por azufre y calor (Figura 2.2 a) (1-2). El poliisopreno (látex natural), suave, pegajoso y estirable, es generalmente sometido al proceso de vulcanización, dando un material fuerte (Figura 2.2 b), resistente a muy altas temperaturas sin ablandarse, que permanece elástico y flexible en frío (2). Las cadenas poliméricas se estiran, pero los entrecruzamientos evitan rasgaduras. En este proceso, a mayor cantidad de azufre, se logra mayor dureza en el material.

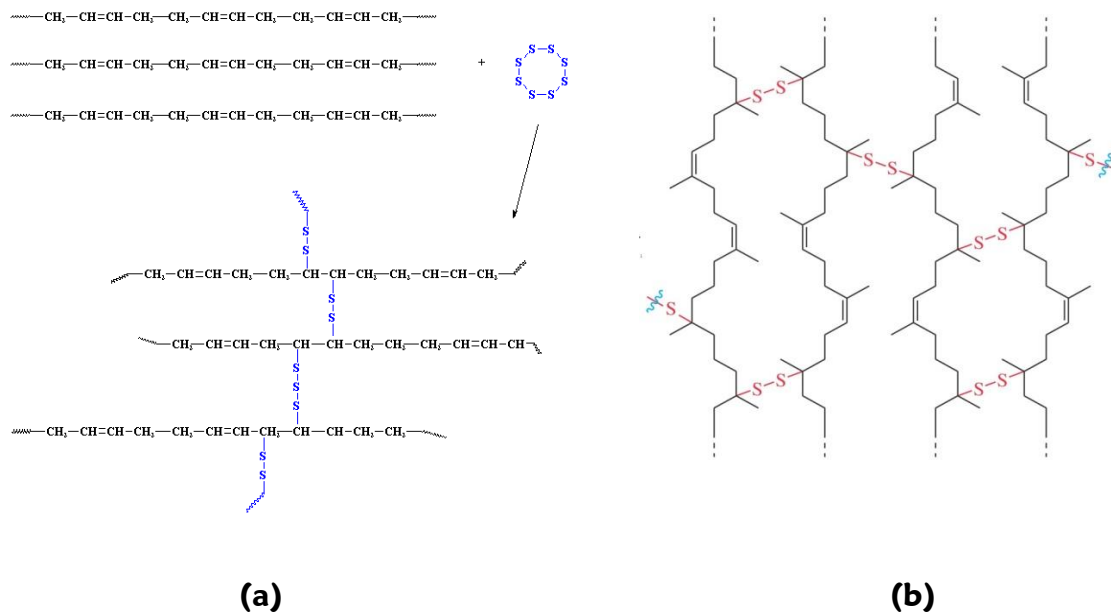


Figura 2.2. (a) Proceso de vulcanización del polibutadieno (hule sintético) con azufre y calor; (b) Representación de la estructura de poliisopreno

entrecruzado por vulcanización con azufre y calor (1)

Existen otras formas de polímeros entrecruzados, cuyas estructuras forman redes tridimensionales con mayor o menor grado de entrecruzamiento, representadas en la Figura 2.1. Muchos de ellos tienen propiedades térmicas y mecánicas particulares que suelen originar materiales duros y quebradizos. Hay numerosos casos, entre los cuales se pueden citar, a modo de ejemplo:

(a) las resinas epoxi, formadas a partir de un pre-polímero (que tiene el grupo epóxido en el terminal de cadena) y una diamina, que da un producto final duro, resistente y que no se puede reprocesar. Suele ser usado en general para recubrimiento superficial y como adhesivo (Figura 2.3 a);

(b) los poliésteres entrecruzados, formados a partir de un polímero foto-entrecruzable (como el cinamato de polivinilo) en presencia de luz (Figura 2.3 b) (3).

La Figura 2.3 c muestra el cinamato de celulosa, que constituye un polímero fotoentrecruzable, precursor de un material entrecruzado.

Hay casos en los que se preparan macro-monómeros fotopolimerizables, que luego del entrecruzamiento por foto-polimerización, dan productos finales (por ejemplo hidrogeles) que son usados para aplicaciones en ingeniería de tejidos (4-6).

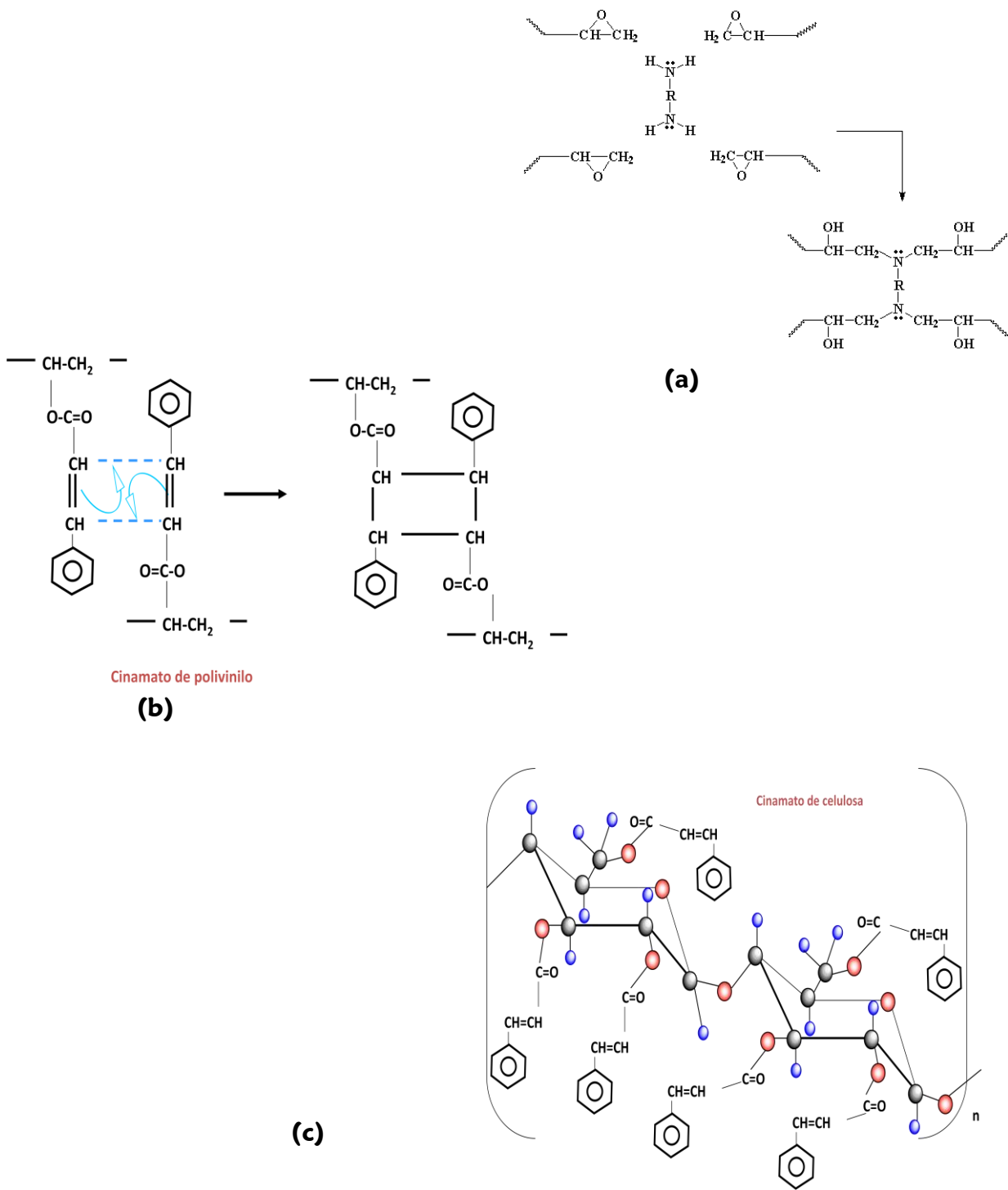


Figura 2.3. Representación de (a) formación de una resina epoxi a partir de un pre-polímero que contiene grupos epóxido en el terminal de cadena y una diamina; (b) formación de un poliéster entrecruzado a partir de un polímero fotoentrecruzable en presencia de luz; (c) cinamato de celulosa, polímero fotoentrecruzable.

En los casos antes mencionados, se muestra cómo es posible a veces obtener polímeros entrecruzados cuyas reticulaciones han sido formadas por grupos funcionales presentes en las estructuras químicas de sus precursores. Numerosos polímeros lineales, que contienen distintos grupos funcionales (ácido, amino, alcohol, entre otros) y hasta las mismas insaturaciones presentes en estructuras poliméricas, son capaces de reaccionar entre sí, en determinadas condiciones experimentales, para dar redes entrecruzadas.

En este punto, es importante destacar que muchos de los polímeros usados para preparar estructuras entrecruzadas tridimensionales son naturales y, en general, de diferentes fuentes tales como los derivados del colágeno, de la fibrina, del ácido hialurónico (glicosaminoglicano), de la agarosa, del quitosan (CS), entre otros (4-8). Algunos, como el ácido algínico, las pectinas, los carragenanos y el ácido hialurónico son polímeros aniónicos; otros, como el CS y la polilisina son catiónicos, mientras que el dextrano y la agarosa son neutros.

En los casos de obtención de polímeros entrecruzados usando reactivos di o tri-funcionales como agentes entrecruzantes, es muy importante la elección de los grupos funcionales involucrados, de las condiciones de reacción y del largo de cadena del reactivo elegido. Por ejemplo, en el caso de las diaminas, el uso de la hexametildiamina (HMDA) en lugar de otra de menor número de átomos de carbono, como la etilendiamina (EDA), provocará que las cadenas entrecruzadas estén más alejadas entre sí, dando una estructura más abierta.

Otro factor a tener en cuenta al momento de planificar una reacción de entrecruzamiento de este tipo, es la cantidad del agente entrecruzante a utilizar. El uso de una mayor cantidad de dicho agente, provocará una estructura con mayor grado de entrecruzamiento ya que habrá un mayor número de unión por unidad de masa del retículo tridimensional formado. En general, el factor del grado o densidad de entrecruzamiento estará relacionado con la aplicación final del producto.

Ahora bien, otro tipo de reacción muy usado para la obtención de polímeros

entrecruzados de tipo red tridimensional, es la co-polimerización radicalaria. El caso más simple es el de un monómero mono-vinílico y de un monómero di (o tri) vinílico, en condiciones experimentales adecuadas y en presencia de un iniciador radicalario. Cuando es necesaria la presencia de diferentes grupos funcionales en la estructura final de la red, surge la posibilidad del uso de dos (o más) monómeros mono-vinílicos. A veces, la incorporación de un segundo monómero otorga al producto final mejores propiedades, por ejemplo mecánicas.

Se conocen varias formas de llevar a cabo una co-polimerización radicalaria. Entre las más importantes, se pueden mencionar la polimerización en masa, en solución, en emulsión y en suspensión. Cada una de ellas se realiza en diferentes condiciones experimentales, teniendo en cuenta algunas propiedades de los monómeros, tales como la solubilidad en agua y/o en solventes orgánicos. Ahora bien, *una misma combinación de monómeros* (mono y di-vinílico) puede reaccionar bajo diferentes condiciones experimentales, y, aunque las redes poliméricas finales contengan los mismos grupos funcionales, tanto la forma física, como las características morfológicas y las propiedades, serán diferentes.

Por ejemplo, la co-polimerización de monómeros mono y di-vinílicos en presencia de un diluyente inerte, conduce a la formación de estructuras poliméricas entrecruzadas: (a) **expandibles (homogéneas; hinchables)** o (b) **rígidas (heterogéneas)**, las cuáles son clasificadas en función de la distribución del diluyente en la red formada.

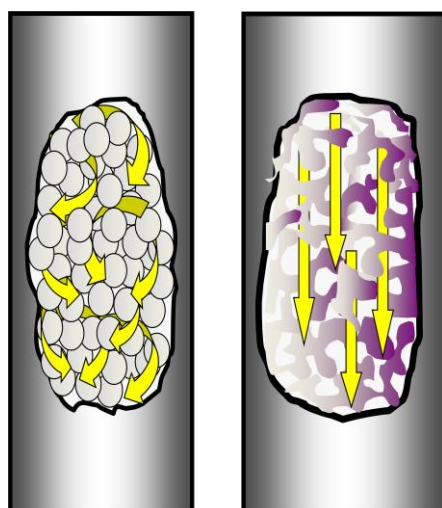
Así, si es una polimerización en “solución”, a partir de monómeros y agentes entrecruzantes (monómeros di-vinílicos) altamente hidrofílicos se obtienen **redes poliméricas expandibles (hinchables)**. El diluyente, generalmente agua, presente durante la formación, permanece en la fase red (de tipo gel) desde el principio hasta el final de la polimerización ya que las cadenas están solvatadas por el diluyente. Una vez que se forma la red, se mantiene hinchada en el medio de reacción. Cuando se quita el solvente y se seca, la red colapsa, pero este estado es generalmente reversible ya que, al re-hidratarse, puede re-expandirse o re-hincharse.

En general, estas redes expandibles de bajo grado de entrecruzamiento, son promisorias por su utilidad en diversas aéreas (9-24).

Por otra parte, cuando el solvente se separa de la red durante la polimerización (por ejemplo, en una polimerización en “suspensión”, que da lugar a la formación de partículas) se forman las **redes rígidas o heterogéneas** (25-30). En este caso, el grado de solvatación de las cadenas poliméricas por parte del solvente es escaso o nulo, razón por la cual esta red mantiene su porosidad tanto en estado hinchado como seco.

Dichas redes, altamente porosas y estables mecánicamente, hidrofílicas y derivatizables, son requeridas para aplicaciones como rellenos de columnas de diferentes tipos de cromatografía (como resinas de intercambio iónico, soportes de afinidad cromatográfica, para cromatografía de permeación por geles, entre otras). Existen matrices poliméricas de este tipo, en forma de “*partículas*”, sintetizadas con derivados de la acrilamida (Trisacryl®, Sephacryl®), de metacrilatos (TSK gel Toyopearl®, Eupergit®) o del poliestireno. También, se conocen las del tipo “*membranas macroporosas*”, que constituyen una capa de fase estacionaria en forma de *discos rígidos porosos continuos* (“*rods* o barras monolíticas”) y no en forma de partículas. Son matrices altamente entrecruzadas, contienen *canales*, y son sintetizadas por polimerización en solución, usando como solvente un agente *porógeno* o formador de poros, sin agua ni agente suspensor, en un molde, “*in situ*” y sin agitación (25-30). En la Figura 2.4, se muestra una representación esquemática de las formas de las redes rígidas o heterogéneas.

Cuando el relleno usado como soportes cromatografico está formado por partículas, la fase móvil fluye principalmente entre los *espacios inter-partículas* y *dentro de los poros de las partículas*. Por su parte, en el caso de que el relleno sea en forma de barra monolítica (rígida y porosa) la fase móvil fluye principalmente dentro de los “*canales*” que forman la red. Estos últimos, son generalmente usados en procesos cromatograficos que involucran separación y/o purificación de moléculas de muy alto peso molecular. De esta manera, se fuerza a la fase móvil a atravesar todo el medio de separación (25-30).



(a)

(b)

Figura 2.4. Representación de las formas de las redes rígidas o heterogéneas utilizadas como soportes cromatograficos. En las mismas, la fase móvil fluye principalmente: (a) entre los espacios inter-partículas y dentro de los poros de las partículas; (b) dentro de los “canales” que forman la red en los soportes de tipo *rod* o barra monolítica

2.3. REDES POLIMÉRICAS ENTRECruzADAS EXPANDIBLES

Las estructuras de redes tridimensionales entrecruzadas, que pueden absorber y retener cantidades significativas de agua produciendo la *expansión* o el hinchamiento de las mismas, son comúnmente llamadas *hidrogel* (31). La estructura del hidrogel es creada por grupos o dominios hidrofílicos presentes en una red polimérica cuando se produce la hidratación, en un ambiente generalmente acuoso, manteniendo el carácter tridimensional, lo que le confiere integridad. Al entrar en contacto con un fluido, en general acuoso, la estructura se hincha y expande. Dichas estructuras son blandas, en general, y tienen elasticidad, lo que les confiere una “configuración de referencia” a la cuál retoman luego de una deformación.

En un hidrogel, el líquido previene a que la red “colapse”, es decir que la expande; mientras que la red, que tiene nudos, previene que el líquido se “desborde”, lo que significa que lo contiene. La función de un hidrogel se centra principalmente en sus propiedades de tamaño de poros, equilibrio y cinética de

hinchamiento, permeabilidad y biocompatibilidad. Los avances en los métodos de reticulación, para la preparación de los hidrogeles, están dirigidos particularmente a las aplicaciones finales requeridas. La Figura 2.5 muestra un hidrogel en estado seco e hinchado en agua.

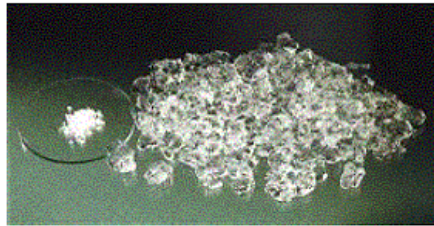


Figura 2.5. Hidrogel en estado seco e hinchado en agua

2.4. FORMACIÓN DE GELES (FÍSICOS Y QUÍMICOS)

La gelificación se refiere a la unión de cadenas macromoleculares, inicialmente solubles, que conduce a una mezcla polidispersa llamada “sol”. A continuación del proceso, las cadenas se van enlazando con la consecuente disminución de la solubilidad. Este paso, conduce a la llamada fase "gel". La transición de un sistema formado por un polímero, con un número finito de moléculas a la fase red, se llama "transición sol-gel" (o "gelificación") y el punto crítico en el que aparece el gel se llama "punto de gel" (32). La gelificación se puede dar por unión física (gelificación física) o mediante la unión química (gelificación química). Los geles físicos, pueden ser sub-categorizados como fuertes o débiles. En el primer caso, el gel se origina por interacciones físicas entre las cadenas del polímero y puede ser efectivamente permanente en determinadas condiciones experimentales. Por lo tanto, los geles físicos fuertes son análogos a los geles químicos. Algunos microcristales laminares o hélices dobles y triples son ejemplos de geles físicos fuertes. Los geles físicos débiles se forman a partir de asociaciones temporales de enlaces reversibles entre cadenas. Estas asociaciones se van rompiendo y se van reformando continuamente. Redes con enlaces de puente

hidrógeno, micelas de co-polímeros en bloque y redes con interacciones o asociaciones iónicas, son ejemplos de geles físicos débiles.

Por otro lado, la gelificación química implica formación de enlaces covalentes y siempre resulta en un gel fuerte. Los tres procesos químicos principales por los que se puede lograr geles químicos, incluyen la polimerización de adición, la polimerización de condensación y el entrecruzamiento químico.

Los geles, se clasifican entonces en dos categorías (31):

-Gel químico/permanente: se les llama 'geles químicos' cuando son "redes permanentes" o "covalentemente reticuladas" (por enlaces covalentes fuertes y estables) (33). Ellos alcanzan un estado de equilibrio del hinchamiento, que depende del parámetro de interacción polímero-agua y de la densidad de entrecruzamiento (34).

-Gel físico/reversible: se les llama geles 'reversibles' o "físicos" cuando las redes se mantienen unidas por enredos moleculares y/o cuando existen fuerzas secundarias (enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas ó hidrofóbicas). Sus cadenas poliméricas son flexibles. Si el gel se pone en contacto con un líquido, sus cadenas se van desenrollando, hasta que en general se disuelve, dando un fluido y perdiendo la estructura física. En geles físicamente reticulados, la disolución está a veces impedida por las interacciones físicas que existen entre las diferentes cadenas del polímero (33). Todas estas interacciones son reversibles, y pueden ser interrumpidas por cambios en las condiciones o por la aplicación de estrés físico (34).

Hay diferentes mecanismos para la formación de estructuras entrecruzadas que le confieren propiedades finales a cada material (35). El entrecruzamiento físico, se destaca porque involucra pocos pasos sintéticos y carencia de un agente que actúe como entrecruzante. Por otra parte, los hidrogeles químicamente entrecruzados, son muy importantes ya que poseen enlaces covalentes en sus estructuras, lo que les confiere mayor resistencia mecánica respecto a los anteriores, aunque a veces no toleran un gran cambio de volumen.

2.5. CARACTERÍSTICAS DE LOS HIDROGELES

Las propiedades de los hidrogeles dependen de diferentes factores como: método de preparación, presencia de grupos funcionales, elasticidad de la red, grado de entrecruzamiento, composición de la red por la presencia de comonomeros, interacciones entre el agua y el hidrogel, y distintas posibilidades de arreglos entre dominios hidrofóbicos-hidrofilicos. Para la mayoría de las aplicaciones, el hinchamiento, el proceso de difusión y la composición de la red son muy importantes, porque determinan el funcionamiento o comportamiento del hidrogel y su relación con el medio (36-38). Debido a sus entrecruzamientos y a la presencia de “ciertos grupos funcionales”, varias propiedades de las “redes expandibles” (geles) se hacen visibles a escala macroscópica.

La “transición de fases” en geles es uno de los más importantes fenómenos que nos permiten explorar los principios de las interacciones que existen en polímeros biológicos y sintéticos. La red del polímero puede cambiar su volumen significativamente, en respuesta a pequeños cambios en el medio (temperatura, composición del disolvente, pH, entre otros) conformando los hidrogeles inteligentes (39-41). La “transición de fase de volumen” de los geles corresponden a fases “hinchadas y colapsadas (o encogidas)”. Un gel puede expresar un cambio del entorno externo cambiando su tamaño, ya que este último es sensible a cambios en interacciones moleculares (42-44). Por ejemplo, un hidrogel que contiene grupos ácidos o básicos, exhibirá un comportamiento de hinchamiento-deshinchamiento de tipo pH-dependiente. En un medio acuoso de pH y fuerza iónica apropiados, los grupos pendientes pueden ionizar desarrollando cargas netas en el gel y exhibir un cambio drástico en su hinchamiento. Por lo tanto, estructuras poliméricas de este tipo, pueden ser usadas para liberación controlada de fármacos. En la Figura 2.6 se esquematiza el mecanismo de acción de este tipo de hidrogeles (45). La estructura del hidrogel está formada por un co-polímero de metacrilato de metilo (MAA) y polietilenglicol (PEG). El hidrogel es cargado físicamente con un fármaco y el

individuo lo ingiere, por ejemplo en forma de comprimido. Al llegar al estómago (que se encuentra a un bajo pH) no se produce la expansión de la red, el sistema queda protegido y el fármaco no se libera. Sin embargo, al pasar al intestino (que se encuentra a mayor pH) el sistema se expande, debido a la repulsión que genera la formación de aniones carboxilatos, y el fármaco se libera en el lugar.

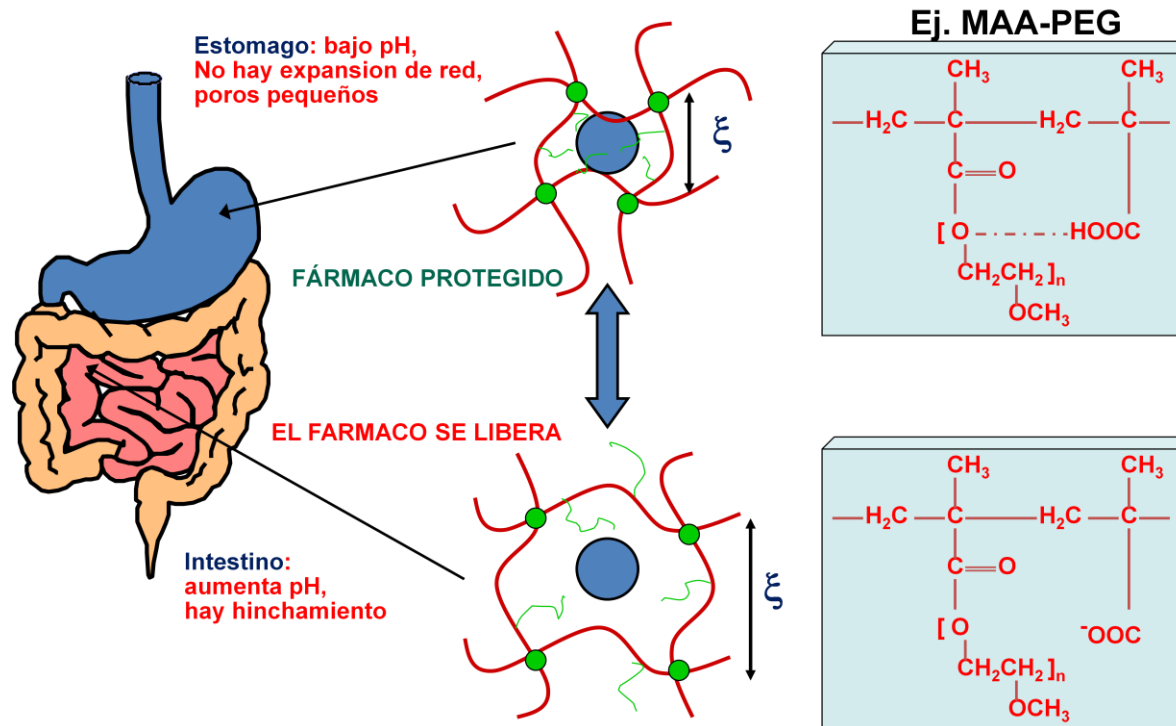


Figura 2.6 Esquema del mecanismo de acción de hidrogeles de tipo pH dependiente, usados para liberación controlada de fármacos (45). MAA-PEG: co-polímero de metacrilato de metilo y polietilenglicol

Otro ejemplo, lo constituye un hidrogel que contiene grupos amino en su estructura, que también responde a cambios de hinchamiento con el pH. En este caso, el hidrogel fue combinado con glucosa oxidasa (GOD) y catalasa. La GOD se incorporó para detectar glucosa y regular liberación de insulina, en respuesta a la concentración de glucosa (46-47). En la Figura 2.7 se esquematiza el mecanismo de

acción de estos hidrogeles (46). El hidrogel, contiene insulina atrapada físicamente dentro de su red. El hinchamiento en respuesta al pH es producido por la diferencia de glucosa en el entorno al gel. Cuando en dicho entorno hay glucosa en exceso, la misma se convierte en ácido glucónico (cuya conversión es catalizada por una de las enzimas inmovilizadas) y su presencia produce disminución del pH del medio, causando hinchamiento del gel. Por el proceso de hinchamiento, se produce la liberación de insulina. Posteriormente, cuando la concentración de glucosa disminuye en respuesta a la insulina liberada, el gel se contrae nuevamente, disminuyendo la velocidad de liberación de la insulina y el sistema se re-establece. De esta forma, este sistema puede actuar como un dispositivo de liberación de insulina, regulado por sí mismo.

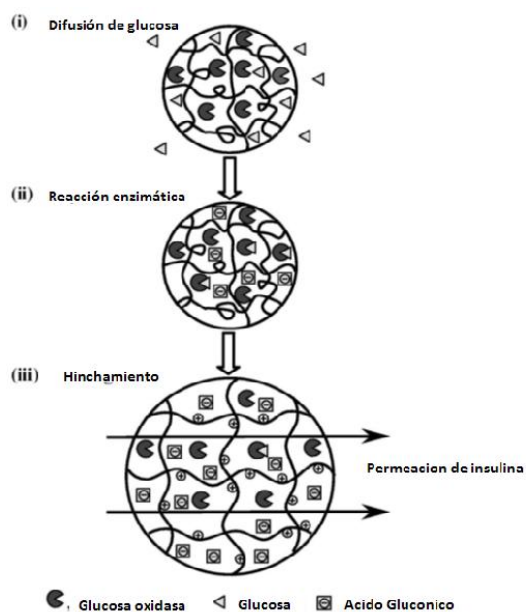


Figura 2.7 Esquema del mecanismo de acción de un hidrogel que contiene grupos amino, sensible a glucosa, de tipo pH dependiente y usado para liberación de insulina (46)

Además, podemos citar el caso de geles de N-isopropilacrilamida (NIPA, $[\text{CH}_2=\text{CHCONHCH}(\text{CH}_3)_2]$) entrecruzados. Cuando se encuentran hinchados en agua, a bajas temperaturas, predominan interacciones hidrofílicas debido a las

interacciones puente hidrógeno con el grupo amida. Al aumentar la temperatura, dichas interacciones se van debilitando, de tal forma que comienza a dar lugar el predominio de interacciones hidrofóbicas, por la presencia del grupo isopropilo. Al llegar a cierta temperatura, se produce la agregación de cadenas laterales y el colapso de la red (48). La temperatura crítica de esta transición de fase (LCST, lower critical solution temperature) se encuentra alrededor de los 32 °C. Algunos polímeros biodegradables sensibles a la temperatura incluyen poliésteres, polifosfacenos, polipéptidos y CS. Otros, basados en sulfametazina, poli (éster β -amino), poli (amino uretano), y poli (amidoamina) resultan sensibles al pH y a la temperatura (49).

Por su parte, los nanogeles pueden describirse como redes poliméricas de tamaño nanométrico (50-200 nm) formadas por entrecruzamiento físico o químico. Poseen propiedades tales como alto contenido de agua, naturaleza blanda, flexibilidad, biocompatibilidad y excelente capacidad de dispersabilidad en agua. Junto con la posibilidad de un posible ajuste “a medida” de su estructura/superficie y la capacidad de incorporar fármacos en sus cavidades, abren oportunidades para su uso como nano-transportadores hacia niveles celulares (50-51). El uso de estos sistemas puede ser ventajoso, ya que el fármaco puede ser luego liberado en un lugar determinado, protegiendo aquellos que poseen baja estabilidad en el torrente sanguíneo. Además, los nanogeles pueden contener grupos funcionales (ácido, amino, alcohol), para unir químicamente fármacos, cuyas uniones luego de hidrolizarse (enzimáticamente, uniones lábiles al pH, etc.) pueda liberarlo en el sitio de acción deseado. Algunos fármacos pueden ser unidos a nanogeles, permaneciendo estable la unión química a un determinado pH, e hidrolizándose posteriormente, con un cambio del mismo. Los nanogeles pueden también ser preparados de manera tal que, llegados al sitio de acción, respondan a algún estímulo y el fármaco contenido pueda difundir al exterior liberándose, aprovechando cambios en el pH, temperatura, luz y concentración de iones, entre otros (52-54).

La “capacidad de retención de agua y la permeabilidad” son los rasgos

característicos más importantes de un hidrogel. Los grupos hidrofílicos polares son los primeros en ser hidratados, al entrar en contacto con agua, denominándose “agua unida primaria”. Como resultado de este hecho, la red se hincha y expone los grupos hidrofóbicos, que también son capaces de interactuar con moléculas de agua. Esto conduce a la formación de agua hidrofóbicamente unida, también llamada “agua unida secundaria”. El agua unida, primaria y secundaria, se combina y forma la denominada “agua unida total” (34, 55). La red es capaz de absorber agua adicional, debido a la fuerza osmótica de sus cadenas, tendiendo a la dilución total. Este hinchamiento adicional es entonces contrarrestado por los entrecruzamientos físicos o químicos covalentes, mediante una fuerza de retracción elástica de la red. Así, el hidrogel alcanzará un nivel de hinchamiento en equilibrio. El agua absorbida adicional es el “agua libre” o “agua en masa” y es la que llena el espacio entre las cadenas de la red o el centro de los espacios o poros más grandes. En función de la naturaleza y de la composición del hidrogel, el siguiente paso puede ser la desintegración o la disolución de la red en los casos en que, las cadenas poliméricas o los enlaces que forman los entrecruzamientos, sean degradables. Por lo tanto, hidrogeles biodegradables que contienen enlaces débiles, son ventajosos en aplicaciones tales como en la administración de fármacos, para la cicatrización de heridas y en la ingeniería de tejidos, entre otras. Estos enlaces débiles pueden estar presentes en la cadena principal del polímero o en los entrecruzamientos de la estructura del hidrogel. Los enlaces lábiles pueden romperse en condiciones fisiológicas, en la mayor parte de los casos por hidrólisis enzimática o químicamente (34, 55).

La “biocompatibilidad” es otra propiedad característica de los hidrogeles. En muchas aplicaciones, se requiere que su estructura sea compatible con el organismo y que los productos de degradación formados no sean tóxicos. Idealmente, deben ser metabolizados a compuestos inocuos o que puedan ser excretados en el proceso de filtración renal. Generalmente, los hidrogeles poseen buena biocompatibilidad, ya que su superficie hidrofílica posee baja energía libre interfacial, al entrar en contacto con los fluidos corporales, lo que resulta en una baja tendencia de las

proteínas y de las células para adherirse a estas superficies. Por otra parte, la naturaleza suave y elástica de los hidrogeles minimiza la irritación del tejido circundante. Además, debido a su importante contenido de agua, poseen un grado de flexibilidad similar al tejido natural (56).

En resumen, es importante destacar que, mediante el control de la estructura, presencia de grupos funcionales, polaridad, propiedades de superficie, propiedades mecánicas y de comportamiento de hinchamiento, es posible lograr diversos tipos de hidrogeles de acuerdo a la aplicación final buscada.

2.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROGELES

A continuación, se resumen y se describen las maneras principales de caracterizar los hidrogeles.

2.6.1. MEDIDAS DE HINCHAMIENTO Y DE FRACCIÓN DE VOLÚMENES DE RED DE LOS HIDROGELES

El *índice de hinchamiento en el equilibrio* (q_w) de los hidrogeles se determina según la ecuación 2.1, donde $m_{h,e}$ y m_s son la masa del hidrogel hinchado en agua en el equilibrio y la masa seca, respectivamente. El *índice de hinchamiento en el estado relajado* (q_r) (luego de la preparación) se determina según la ecuación 2.2, donde m_r es la masa del hidrogel luego de la síntesis.

$$q_w = m_{h,e} / m_s \quad (2.1)$$

$$q_r = m_r / m_s \quad (2.2)$$

Otro parámetro importante a determinar para caracterizar los hidrogeles, es la fracción en peso de agua en equilibrio (EWC), que se calcula según la ecuación 2.3.

$$EWC = (m_h / m_s) / m_h \quad (2.3)$$

El volumen de los discos de un hidrogel seco (V_p) se determina usando la ecuación 2.4. W_a y W_h son el peso del disco de polímero seco en aire y en heptano (solvente en el que el hidrogel no tiene afinidad), respectivamente, y ρ_h es la densidad de heptano ($0,684 \text{ g mL}^{-1}$) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

$$V_p = (W_a - W_h) / \rho_h \quad (2.4)$$

Posteriormente, se puede calcular la densidad de cada disco del hidrogel (ρ) usando los datos de la masa y el V_p del polímero seco.

La *fracción de volumen de red polimérica luego de la preparación* (v_{2r}), se obtiene a partir de la ecuación 2.5, donde ρ_1 es la densidad del polímero seco y ρ_2 es la densidad del agua ($1,0 \text{ g/mL}$) (57).

$$v_{2r} = | 1 + \{[(q_r - 1) \rho_2] / \rho_1\} |^{-1} \quad (2.5)$$

El parámetro v_{2r} puede también ser calculado en forma teórica, a partir de la ecuación 2.6, donde C_0 es la concentración inicial de monómeros y V_r es el volumen promedio de las unidades repetidas del polímero. A su vez, V_r puede obtenerse usando la ecuación 2.7, donde M es la masa molecular del monómero y f es la fracción del monómero en el hidrogel.

$$v_{2r} = C_0 V_r \quad (2.6)$$

$$V_r = (M_1 f_1 + M_2 f_2) / \rho_1 \quad (2.7)$$

La *fracción de volumen de red polimérica en el hidrogel hinchado en el equilibrio* (v_{2s}) se calcula según la ecuación 2.8:

$$v_{2s} = \left| 1 + \left\{ \frac{[(q_w - 1) \rho_2]}{\rho_1} \right\} \right|^{-1} \quad (2.8)$$

El índice de hinchamiento en el equilibrio (q_w) puede ser medido a distintos tiempos y, cuando es graficado en función del tiempo resulta útil en la determinación de la cinética del hinchamiento. La Figura 2.8 muestra un gráfico de cinética de hinchamiento en agua de tres hidrogeles, H1, H2 y H3, de diferente grado de entrecruzamiento. El H1, sería el de menor grado de entrecruzamiento y el que, por ende, alcanza mayor hinchamiento en agua. Una vez alcanzada la meseta o “plateau”, el valor del q_w es el que corresponde al hinchamiento en equilibrio.

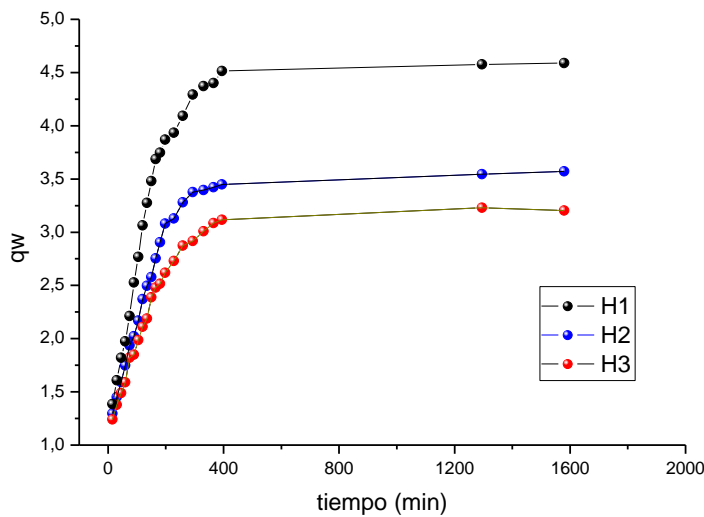


Figura 2.8 Gráfico de cinética de hinchamiento en agua de tres hidrogeles, H1-H3, cuyos grados de entrecruzamientos son H1<H2<H3

En base a la cinética de hinchamiento de los hidrogeles, es posible estimar el tipo de difusión del agua dentro de la matriz, utilizando la ecuación 2.9.

$$F = Mt / M_{\infty} = k t^n \quad (2.9)$$

M_t corresponde a la masa de agua que ha difundido en la matriz a tiempo t , M_∞ es la masa de agua que difundió hacia la matriz en el equilibrio, y k , es una constante relacionada con la estructura de la red.

El exponente n es un número relacionado al tipo de difusión. Esta ecuación es aplicable sólo durante el inicio del hinchamiento, cuando éste es menor al 60%. El valor de n y k se obtienen de la pendiente y ordenada al origen de la curva $\ln F$ vs. $\ln t$, respectivamente. Si el valor de n es de 0,45-0,5, la difusión sigue el comportamiento de Fick, lo que significa que el fenómeno es controlado por difusión. Si el valor es de $0,5 < n < 1,0$, la difusión es anómala (“no-Fickiana”), lo que significa que el hinchamiento está controlado por difusión y relajación (las cadenas necesitan tiempo para responder a la presión de hinchamiento y ordenarse para acomodar moléculas de solvente). Si el valor de n es 1, la difusión es de Tipo II, lo que significa que la migración del agua es a velocidad constante, controlado por la relajación de las cadenas (57-58).

2.6.2. MEDIDA DE MASA MOLECULAR ENTRE DOS PUNTOS DE ENTRECruzAMIENTO (M_c)

Varios de los parámetros mencionados anteriormente son necesarios para poder determinar la *masa molecular entre dos puntos de entrecruzamiento* (M_c). Esta, puede ser calculada según la ecuación 2.10 basada en el modelo de red de Phantom, donde ϕ es la funcionalidad del entrecruzante ($\phi = 4$), V_1 es el volumen molar del solvente (18 mL/mol) y χ es el parámetro de interacción polímero-solvente que puede ser obtenido según la ecuación 2.11 (57).

$$M_c = [(1 - 2\phi^{-1}) V_1 \rho_2 v_{2r}^{2/3} v_{2s}^{1/3}] / [\ln(1 - v_{2s}) + v_{2s} + \chi v_{2s}^2] \quad (2.10)$$

$$\chi = 1/2 + v_{2s}/3 \quad (2.11)$$

A partir de los parámetros mencionados anteriormente, se puede determinar el tamaño de poro ξ a partir de la ecuación 2.12, donde C_n es el radio característico de Flory del polímero para un solvente determinado y l es el largo de los enlaces de la cadena principal del polímero (1,54 Å para polímeros vinílicos) (59).

$$\xi = v_{2s}^{-1/3} \{[(2 C_n M_c) / V_r]^{1/2}\} l \quad (2.12)$$

La Figura 2.9 muestra la representación gráfica de los parámetros M_c y ξ .

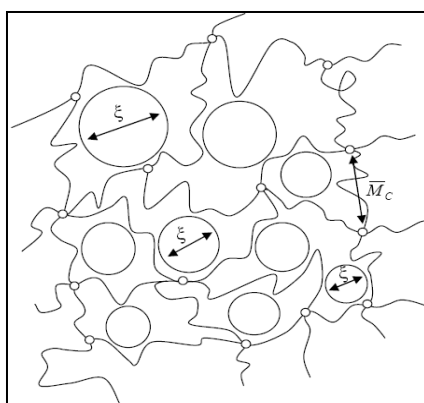


Figura 2.9. Representación gráfica de los parámetros M_c y ξ

2.6.3. ESPECTROSCOPIA INFRARROJO (FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY, FTIR)

Por la presencia de una gran cantidad de grupos funcionales en las redes poliméricas, la técnica de FTIR es muy utilizada para poder identificar la estructura química de las mismas, pero especialmente para la comparación con los reactivos de partida (60-61).

2.6.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

La técnica de microscopía electrónica de barrido puede proporcionar información sobre la morfología de la superficie de la muestra polimérica. Es ampliamente utilizada para analizar la estructura característica de “red” en los hidrogeles, en especial cuando se usa un equipo de SEM bajo el modo de *presión variable*. La técnica de microscopía electrónica de barrido de presión variable (VP-SEM) se ha convertido en una herramienta importante para la obtención de imágenes de muestras hidratadas y muestras con baja conductividad. Varios tipos de polímeros tales como “*scaffolds*” (soportes o andamios para el crecimiento celular) sintetizados a partir de carbohidratos o de proteínas, fibras de colágeno, moldes de poli(dimetilsiloxano) e hidrogeles, entre otros, se estudian por esta técnica para explorar su porosidad. Es una técnica que generalmente permite obtener imágenes de muestras en estado hinchado o hidratado, que no se pueden analizar por los métodos convencionales de SEM, ya que este último precisa el secado de la muestra. En el caso de los “*scaffolds*”, es útil no sólo en su visualización como matriz porosa, sino también en la proliferación celular sobre el mismo. En el caso específico de los hidrogeles, el secado de la muestra trae generalmente aparejado el colapso de la red, mientras que la técnica de VP-SEM permite la visualización de la muestra en su estado de expansión o de máximo hinchamiento. En este caso, la micrografía se obtiene luego de que la muestra se coloca en el porta-muestra de aluminio y se observa no-metalizada y a bajo vacío (62-64).

2.6.5. REOLOGÍA

La reología estudia el flujo y la deformación de los materiales. Se utiliza para analizar la estructura macroscópica de los materiales de forma indirecta y la respuesta que presentan bajo condiciones de estrés mecánico (65). Los geles son materiales viscoelásticos, porque presentan la capacidad de fluir (comportamiento viscoso), como la capacidad de almacenar energía y recuperar su forma original después de haber sido sometidos a un proceso de deformación (comportamiento elástico). El comportamiento viscoelástico de un material sometido a un esfuerzo

sinusoidal en un intervalo de frecuencia puede ser representado por dos componentes: la componente elástica o módulo de almacenamiento (G') y la componente viscosa o módulo de pérdida (G''). Caracterizados de este modo, los geles pueden ser clasificados en fuertes, débiles y disoluciones macromoleculares o concentradas (Figura 2.10) (66). En los considerados “fuertes”, los valores de G' son mayores que los de G'' , dentro del intervalo de frecuencia estudiado. Además, dichos valores se mantienen independientes de la frecuencia, por lo que su valor resulta prácticamente constante. En los clasificados como “débiles”, G' es mayor que G'' , sin embargo, a diferencia de los fuertes, los módulos dependen de la frecuencia y su valor cambia conforme aumenta la frecuencia aplicada (67).

En las disoluciones macromoleculares, el valor de G'' es mayor que G' , la componente viscosa predomina en el comportamiento y los módulos son dependientes de la frecuencia, como en el caso de los geles débiles. Por lo tanto, mediante estudios reológicos, se pueden caracterizar geles con determinadas características mecánicas, cuya información permite predecir diversas aplicaciones (66-76). Los estudios reológicos permiten, entonces, determinar las propiedades mecánicas de los hidrogeles cuando éstos sufren una dada deformación.

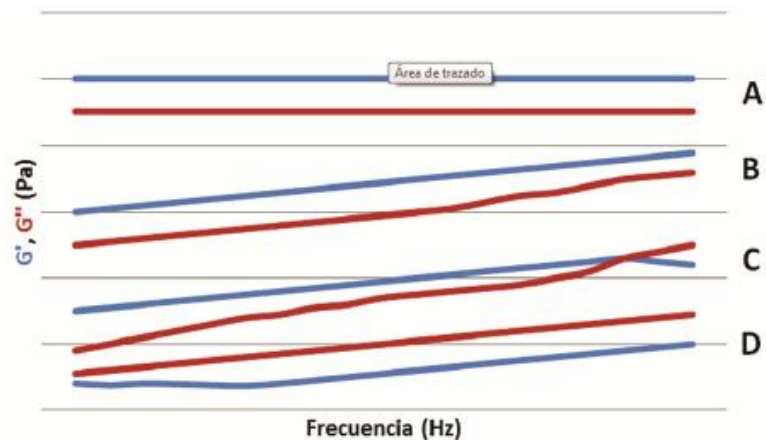


Figura 2.10. Módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') característicos para: a) Geles fuertes; b) Geles débiles; c) Disolución concentrada y d) Disolución diluida

Para determinar las propiedades viscoelásticas de los hidrogeles se suelen realizar ensayos dinamo-mecánicos de deformación, tiempo y frecuencia para determinar los módulos G' y G'' de cada sistema entrecruzado y estimar su transición *sol-gel* (77). Por otro lado, debido a que la gelificación es una transición gradual, de un líquido viscoelástico a un sólido viscoelástico, las mediciones de las propiedades reológicas son muy útiles y sirven como herramienta para el seguimiento de la gelificación y los cambios microestructurales. La formación de geles se puede controlar desde el desarrollo de las funciones viscoelásticas del material en el “punto gel”. Este último, es uno de los parámetros más importantes del proceso de gelificación, que se caracteriza por la aparición de una macromolécula con un peso molecular infinitamente grande en el sistema reactivo. En la práctica, una pérdida repentina de flujo debido al hecho de que las propiedades viscoelásticas cambian abruptamente desde un estado líquido inicial al del estado sólido, es muy útil para la determinación del punto gel. La transición *sol-gel* puede ser determinada fácilmente, a partir de datos reológicos, porque coincide con el punto en el que G' cruza G'' (78).

Varios estudios han sido llevados a cabo para caracterizar soluciones de CS, geles y redes entrecruzadas (11, 70, 74, 76, 79). Además, es un método eficaz para estudiar el curado de polímeros termoestables.

Las propiedades mecánicas estudiadas por la reología se pueden medir mediante reómetros, que son aparatos que permiten someter al material a diferentes tipos de deformaciones controladas y medir los esfuerzos o viceversa. Aparte de los módulos de almacenamiento y de pérdidas (comportamiento viscoelástico lineal), otras propiedades reológicas importantes son: la viscosidad aparente (relación entre esfuerzo de corte y velocidad de corte), los coeficientes de esfuerzos normales, la viscosidad compleja (respuesta ante esfuerzos de corte oscilatorio) y las funciones complejas de viscoelasticidad no lineal.

2.6.6. OTRAS TÉCNICAS

Los principales métodos utilizados para caracterizar y cuantificar la cantidad de agua libre y unida en hidrogeles son la calorimetría diferencial de barrido (DSC) y la resonancia magnética nuclear (RMN). La RMN de protones da información sobre el intercambio de las moléculas de agua entre los estados de agua libre y unida (80). El uso de DSC se basa en la suposición de que sólo el *agua libre* puede ser congelada, por lo que se supone que la endoterma que es medida cuando una muestra de gel congelado se va calentando, representa la fusión del agua libre, y ese valor corresponderá a la cantidad de *agua libre* en la muestra del hidrogel que se está estudiando. El *agua unida* puede ser obtenida, entonces, por la diferencia del *contenido de agua total medida* del hidrogel y el *agua libre* medida (55). Otros de los métodos que también se utilizan para confirmar la formación de estructuras tipo red de hidrogeles son: el análisis termogravimétrico, la difracción de rayos X y el análisis de fracción sol-gel, entre otros (60- 61, 81-85).

2.7. APLICACIONES DE LOS HIDROGELES

Uno de los hidrogeles más simples, derivado del acrilato de sodio, es muy utilizado como relleno de pañales. El mismo, forma una estructura con bajo grado de entrecruzamiento capaz de absorber grandes cantidades de fluidos conformando en este caso, un material superabsorbente. Otros, también de estructura simple, derivados de la acrilamida (AAm), han sido muy utilizados en bioquímica, especialmente en electroforesis como así también en agricultura, en liberación controlada de nutrientes y fertilizantes de plantas. En esta aplicación, la superficie del polímero puede actuar como una membrana a través de la cual un soluto debe difundir en el medio que lo rodea. De esta forma, permite el crecimiento de la planta con menor pérdida del fertilizante y menos necesidad de irrigaciones frecuentes. Al retener la humedad en el interior de los poros, aún una vez liberado el principio activo, actúan además como sistema “reservorio” de agua. A partir de numerosos polímeros sintéticos y naturales se han producido, también, gran variedad de hidrogeles con la finalidad de ser usados en productos farmacéuticos y

cosméticos, en ingeniería de tejidos, y en el campo biomédico (18). Debido a su alta capacidad de absorción de agua y su biocompatibilidad se han utilizado en vendajes para heridas, en liberación controlada de fármacos, como sistemas poliméricos inyectables, en aplicaciones oftálmicas, para la preparación de sistemas transdérmicos, para materiales dentales, para implantes, para sistemas de tipo híbrido (células vivas encapsuladas), para sistemas de separación y para tratamiento de agua, entre otros (86-87). También, hay antecedentes de sistemas de integración de entidades biológicas con hidrogeles sintéticos, en los que se combinan sinérgicamente mecanismos biológicos (por ejemplo, afinidad/especificidad) con las propiedades de los hidrogeles (ej. respuestas a cambios externos). Así, moléculas biológicamente activas se pueden incorporar en una red, ya sea por atrapamiento químico o físico, para producir biomateriales conjugados como en el caso de la inmovilización de enzimas en hidrogeles.

2.8. MÉTODOS PARA PREPARAR HIDROGELES

Existen en la literatura numerosos reportes referidos a la formación de *redes* entrecruzadas de polímeros sintéticos tales como los de poli (óxido de etileno) (PEO), poli (vinil pirrolidona) (PVP), poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido acrílico) (PAA), poli(metacrilato de metilo) (PMA), poli(etilenglicol) (PEG). También, de biopolímeros naturales tales como CS, alginato, carragenina, ácido hialurónico y carboximetilcelulosa (CMC) (75, 88-93).

Diversas técnicas de preparación, tales como entrecruzamiento físico y químico, reacciones de injerto y entrecruzamiento por radiación, entre otras, han sido estudiadas y reportadas (33, 94-97). Muchas de estas reacciones son utilizadas para producir modificaciones en las estructuras poliméricas, con la finalidad de mejorar las propiedades mecánicas y su viscoelasticidad, para poder aplicar los productos en las áreas biomédica y farmacéutica (87, 94). Los métodos generales para producir geles químicos y físicos se describen a continuación.

2.8.1. ENTRECruzAMIENTO FÍSICO

Debido a la relativa facilidad de la producción y a la ventaja de no utilizar agentes de entrecruzamiento, la preparación de geles físicos o reversibles es cada vez más utilizada. Esto suele ser necesario en procesos en los que se debe incorporar una biomolécula (por ejemplo, células o proteínas) por *atrapamiento* dentro de una red entrecruzada. Los agentes entrecruzantes pueden afectar la integridad de dichas sustancias. Además, una de las desventajas de usar un agente entrecruzante, es que lo que queda sin reaccionar, debe ser removido inmediatamente. Particularmente, esta forma de preparación de hidrogeles es muy utilizada en la industria alimentaria, para lo cual se usan hidrocoloides seleccionados.

Los diversos métodos reportados en literatura para obtener hidrogeles físicamente reticulados son:

2.8.1.1. Calentamiento/enfriamiento de una solución del polímero

Geles físicamente entrecruzados se pueden preparar por enfriamiento de soluciones calientes de gelatina o carragenina. Hay formación de una estructura hélice y su posterior asociación, creando zonas de unión (71). En algunos casos, el simple calentamiento de soluciones de polímero, que causa la co-polimerización en bloque, también puede dar un hidrogel. Algunos de los ejemplos son el óxido de polietileno/óxido de polipropileno y el hidrogel de poli(etilenglicol)/poli(ácido láctico) (33, 55).

2.8.1.2. Gelación ionotrópica

Los polímeros iónicos pueden ser entrecruzados mediante la adición de contraiones di- o tri-valentes. Este método produce la gelificación de una solución de polielectrolito (por ejemplo alginato de sodio) con un ion multivalente de cargas opuestas (por ejemplo, Ca^{2+}) (Figura 2.11).

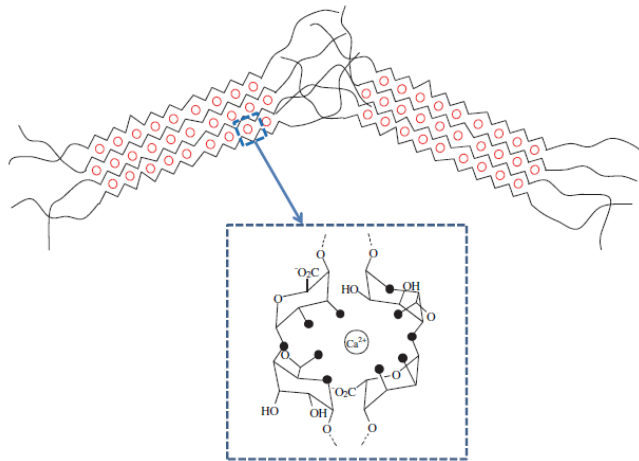


Figura 2.11. Gelación ionotrópica por interacción entre grupos aniónicos del alginato (COO^-) y iones metálicos divalentes (Ca^{2+})

2.8.1.3. Coacervación compleja

Mediante la mezcla de un polianión con un polication se pueden formar geles de *coacervado complejo*. El fundamento de este método es que los polímeros con cargas opuestas se unan y formen complejos solubles o insolubles, en función de la concentración y el pH de las soluciones respectivas (Figura 2.12). Un ejemplo de ello es la coacervación de xantano (polianiónico) con CS (policationico) (98). Las proteínas, por debajo de su punto isoeléctrico se cargan positivamente y puedan asociarse con hidrocoloides aniónicos formando un hidrogel complejo coacervado (99).

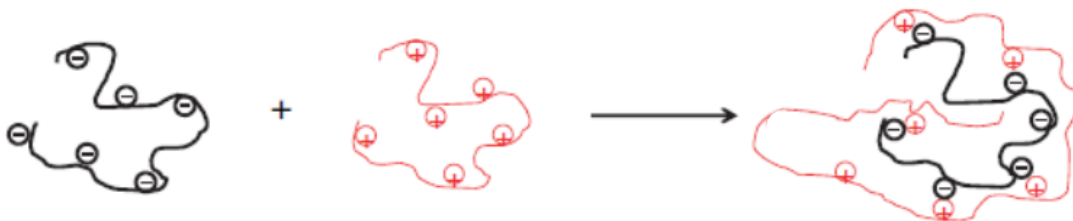


Figura 2.12. Esquema de formación de un complejo coacervado a partir de un polianión y un polication

2.8.1.4. Puente de hidrógeno

Hidrogeles unidos por puente hidrógeno se pueden preparar mediante la reducción del pH de la solución acuosa de polímeros portadores de grupos carboxilo, tales como CMC, cuya red puede ser formada por dispersión de CMC en HCl 0,1 M (100). El mecanismo consiste en reemplazar el sodio de la CMC, con el hidrógeno de la solución del ácido, para promover la unión de hidrógeno (Figura 2.13). Los enlaces de hidrógeno inducen una disminución de la solubilidad en agua de CMC, dando como resultado la formación de un hidrogel elástico.

Los hidrogeles de quitosano carboximetilado (CS-CM) también pueden ser preparados por entrecruzamiento, en presencia de ácidos o monómeros polifuncionales. Otro ejemplo, es un hidrogel basado en poli(ácido acrílico) y poli(óxido de etileno) (PEO-PAA) preparado disminuyendo el pH, para formar un gel en su solución acuosa (55). En caso del sistema mixto xantano-alginato, la interacción molecular entre ambos, causa un cambio en la estructura de la matriz, debido a la unión intermolecular de puente hidrógeno entre ellos resultando en la formación de un hidrogel insoluble.

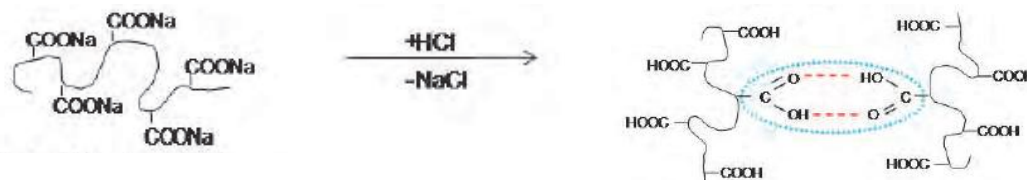


Figura 2.13. Formación de hidrogeles por interacción de puente hidrógeno

2.8.1.5. Maduración o agregación de componentes proteicos inducida por calor

La goma arábiga (goma de acacia) está formada predominantemente por hidratos de carbono, pero contiene 2-3% de proteínas como parte integral de su estructura (101). Se han identificado tres fracciones principales con diferentes pesos moleculares y contenido de proteínas: proteína arabinogalactano (AGP),

arabinogalactano (AG) y glicoproteína (GP). La agregación de los componentes proteicos, inducida por tratamiento con calor, aumenta el peso molecular y, posteriormente, produce un hidrogel con propiedades mecánicas mejoradas y con capacidad de retención de agua (102-103). El método también se aplicó a otras gomas tales como la de *ghatti* y *Acacia kerensis* para la aplicación en el cuidado de la dentadura (104).

2.8.1.6. Congelación-descongelación

Los entrecruzamientos físicos de un polímero para formar su hidrogel también se pueden lograr mediante el uso de ciclos de congelación-descongelación. El mecanismo implica la formación de microcristales en la estructura debido a dicho proceso. Como ejemplos de este tipo de gelificación, se pueden citar los geles de poli(vinilalcohol) (PVA) y de xantano (55, 105-106).

2.8.2. ENTRECruzamiento QUÍMICO

Uno de los métodos más utilizados para obtener polímeros entrecruzados es la reacción de adición o radicalaria, más específicamente por co-polimerización de monómero/s mono-vinílico/s funcionales y uno que tenga al menos dos dobles enlaces, que actúa como entrecruzante (33, 107). En general, los monómeros que se utilizan tienen, además del doble enlace, algún grupo funcional (hidroxilo, ácido, amino, amida, entre otros) que impartirá al producto final ciertas propiedades. En estos casos, la co-polimerización se lleva a cabo usando un iniciador radicalario, un solvente adecuado y, cuando es necesario, se utiliza temperatura para la iniciación de la reacción. Si se lleva a cabo con monómeros hidrofílicos, se puede usar agua como disolvente. En este último caso, se suele usar un par redox formado por persulfato de amonio (APS) y trietilanolamina (TEA) que actúan como iniciador y activador, respectivamente. La descomposición de oxidantes promovidas por aminas es muy utilizada. Otro activador muy utilizado es el tetrametiletildiamina

(TEMED). La presencia de TEA o de TEMED aumenta la constante de descomposición del APS y facilita que la reacción ocurra a temperatura ambiente. La Figura 2.14 muestra un ejemplo de un producto entrecruzado formado por la reacción de AAm y N,N'-metilen bisacrilamida (BIS) en agua, usando APS/TEA. Los grupos amida confieren alta hidrofiliicidad al producto final. Los geles de poli(acrilamida) son utilizados en electroforesis para realizar separaciones, ya sea por carga o peso molecular principalmente de proteínas, aunque también puede ser aplicado para el análisis de fragmentos de ADN (108). Los usos analíticos de la electroforesis empleando geles de poli(acrilamida) se centran en la caracterización de proteínas, pureza, tamaño y peso molecular, entre otras.

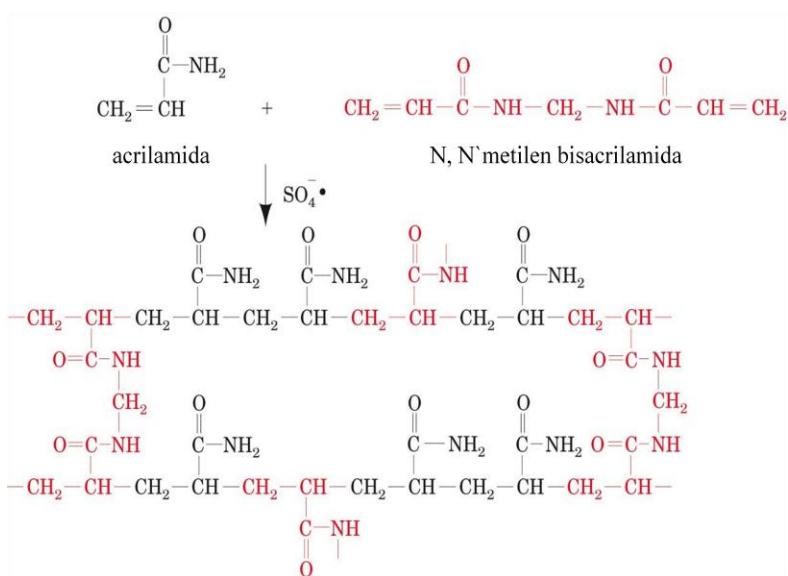


Figura 2.14 Esquema de reacción entre AAm, BIS y APS/TEA en agua a temperatura ambiente, para dar un producto entrecruzado hidrofílico

En la reacción de co-polimerización, a veces se usan monómeros sintéticos, derivados de moléculas naturales (tales como carbohidratos) a las que previamente se les ha incorporado un doble enlace, por medio de una modificación química. De esta manera, el macro-monómero final, cuyo precursor fue una molécula natural, confiere hidrofiliicidad al producto (109). En la Figura 2.15 se muestra un producto

entrecruzado, formado a partir de dialildextrano y BIS (Sephacryl®).

Ahora bien, el entrecruzamiento de polímeros ya formados (naturales y sintéticos) puede ser alcanzado a través de una reacción de su grupo funcional (tales como OH, COOH, y NH₂) con agentes de entrecruzamiento tales como aldehído (por ejemplo, glutaraldehído) o dihidrazida (por ejemplo, dihidrazida de ácido adípico).

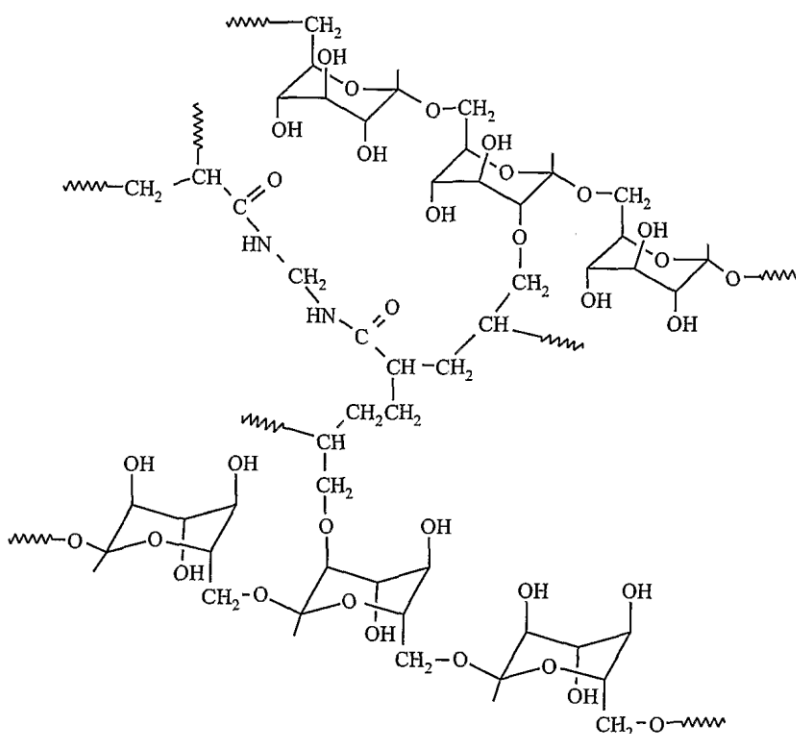


Figura 2.15 Esquema de Sephacryl®, a partir de dialildextrano y BIS

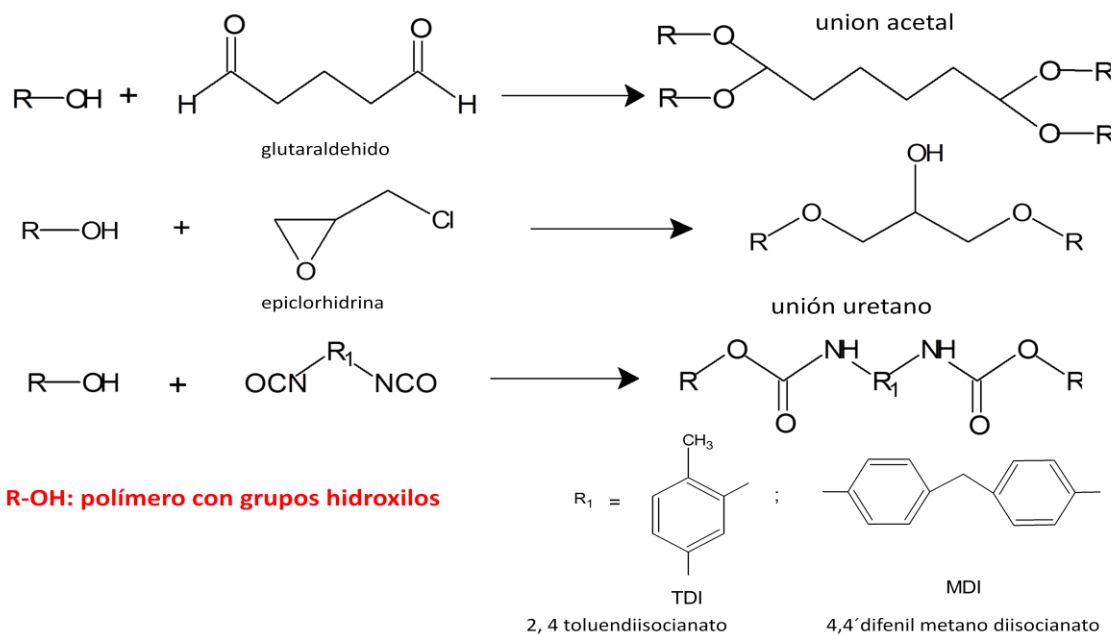
Hay numerosos métodos reportados en literatura para obtener entrecruzamientos permanentes químicamente. Un tipo especial está representado por redes poliméricas interpenetradas (*interpenetrated networks, IPN*), constituidas por dos o más estructuras poliméricas en forma de red, con al menos una de ellas polimerizada o entrecruzada en presencia de la otra. Generalmente, hay dos redes interpenetradas que pueden ser de diferente composición química, formando una estructura tridimensional, donde ambos polímeros están físicamente entrecruzados

(*entangled*) sin formar necesariamente uniones químicas. Por ello, cada polímero puede retener sus propiedades y el comportamiento del IPN puede resultar de una combinación de ellas. En general, estos materiales poseen alta resistencia mecánica y amplio campo de aplicación en diferentes áreas (implantes artificiales, membranas de diálisis, sistemas de liberación controlada de fármacos, etc.). Los IPN pueden obtenerse por diferentes metodologías. Una es la “secuencial”, que consiste en polimerizar primero una mezcla de monómero, agente entrecruzante e iniciador y luego hinchar la red formada en una segunda combinación de monómero y agente entrecruzante, para obtener un *full IPN*. La otra es la “simultánea”, en la que una mezcla de monómeros y agentes entrecruzantes se colocan a reaccionar, ocurriendo la polimerización de ambas redes en forma simultánea y transcurriendo por mecanismos independientes (110).

En la siguiente sección, se detallan otros métodos químicos que se utilizan para producir hidrogeles.

2.8.2.1. Agentes químicos entrecruzantes

Agentes químicos entrecruzantes tales como el glutaraldehído, la epíclorhidrina, etc., han sido ampliamente utilizados para obtener hidrogeles reticulados, a partir de varios polímeros sintéticos y naturales. La técnica implica la introducción de nuevas moléculas entre las cadenas poliméricas, para producir entrecruzamientos (Figura 2.16).



R-OH: polímero con grupos hidroxilos

2.16. Ejemplos de reacciones de entrecruzamientos de un polímero conteniendo grupos hidroxilo y diferentes agentes químicos (glutaraldehído, epiclorhidrina o diisocianatos)

Un ejemplo, lo constituye el hidrogel preparado por el entrecruzamiento de almidón de maíz y PVA, usando glutaraldehído como agente de reticulación. El mismo fue propuesto para ser utilizado como piel artificial y para incorporar nutrientes/factores de curación y medicamentos para ser posteriormente liberados en un lugar específico de acción. La CMC pudo ser entrecruzada mediante la incorporación de 1,3 diaminopropano para producir un hidrogel adecuado para la administración de fármacos por difusión a través de los poros. Como otros ejemplos de hidrogeles, se pueden mencionar uno compuesto de xantano y PVA, entrecruzado con epiclorhidrina; otro biodegradable, en base a κ -carragenano y ácido acrílico, que fue reticulado utilizando ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico, propuesto para uso en sistemas de liberación de fármacos y otro formado a partir de carragenina que resultó prometedor para la inmovilización industrial de enzimas. Finalmente, un hidrogel fue sintetizado a partir de celulosa, en solución acuosa de NaOH/urea, usando epiclorhidrina como agente

entrecruzante o por el método de calentamiento/enfriamiento (111-114).

2.8.2.2. Reacciones de injerto

La reacción de injerto implica la polimerización de un monómero en el esqueleto de un polímero preformado. Las cadenas del polímero se activan por la acción de reactivos químicos, o de un tratamiento de radiación de alta energía. La reacción de polimerización de un monómero a partir de los macro radicales activados, conduce a ramificaciones y, además, a veces, a entrecruzamientos (Figura 2.17).

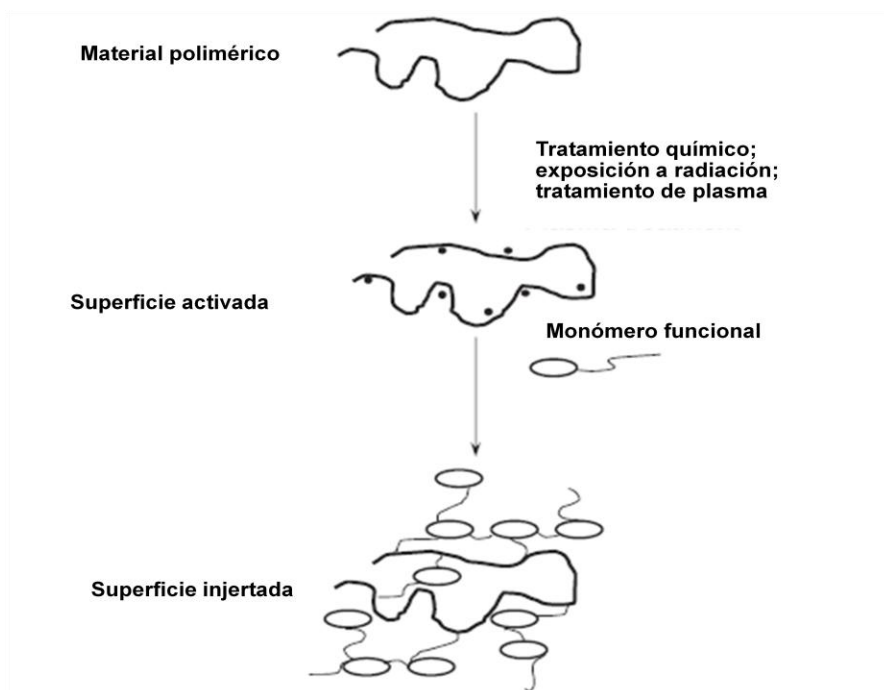


Figura 2.17. Injerto de un monómero sobre un pre-polímero, que permite la formación de largas ramificaciones y, además, a veces, de entrecruzamientos

2.8.2.2.1. Injerto químico

En este tipo de injerto, las cadenas poliméricas principales son activadas por acción de un producto químico reactivo. El almidón injertado con ácido acrílico mediante el uso de N-vinil-2-pirrolidona, es un ejemplo de este tipo de proceso (115). Tales hidrogeles muestran comportamiento de hinchamiento dependiente del pH, con características ideales para ser utilizados en liberación controlada de fármacos, en el intestino delgado.

2.8.2.2.2. Injerto por radiación

El injerto también puede ser iniciado por el uso de radiación de alta energía, tal como radiación gamma y haz de electrones. Alla y colaboradores informaron de la preparación de hidrogeles de CMC, por injerto de ácido acrílico, usando irradiación de haz de electrones, en solución acuosa (96). Los autores propusieron la aplicación del hidrogel obtenido para la recuperación de iones metálicos como el cobre, níquel, cobalto y plomo. Además, se reportó la aplicación de estos hidrogeles en vendajes, como cubierta temporal de la piel.

Zhai, Yoshii y colaboradores reportaron la preparación de un hidrogel a base de almidón con injerto de PVA (116). Se demostró que, bajo irradiación, había ocurrido una reacción de injerto entre el PVA y las moléculas de almidón, además de entrecruzamientos. Cai, Tang y colaboradores han informado de la preparación de hidrogeles termo/pH sensibles por copolimerización de injerto de CS y NIPA (117). Los resultados mostraron que el porcentaje y la eficiencia de la reacción de injerto aumentaron con el incremento en la concentración del monómero y la dosis total de irradiación. Los hidrogeles CS-g-NIPA mostraron buenas propiedades de hinchamiento termo/pH-sensibles.

2.8.2.3. Entrecruzamiento por radiación

El entrecruzamiento por radiación es una técnica que se utiliza ampliamente, ya que no implica el uso de agentes entrecruzantes químicos y, por lo tanto, se logra

retener en gran medida la biocompatibilidad de los biopolímeros. Además, la modificación y la esterilización se pueden lograr en un solo paso y por lo tanto es un proceso efectivo y de bajo costo, para modificar los biopolímeros que se usan específicamente en aplicaciones biomédicas (40, 82, 118-120). La técnica se basa, principalmente, en la producción de radicales libres en el polímero, después de la exposición a una fuente de alta energía como rayos gamma, rayos X o de electrones. La acción de la radiación (directa o indirecta) dependerá del medio ambiente del polímero, es decir, si la solución es diluida, concentrada, o si el polímero se encuentra en estado sólido.

2.9. MODIFICACIÓN DE HIDROGELES

Respecto a las modificaciones que se pueden realizar sobre los polímeros en general, se debe aclarar que todas aquellas reacciones químicas que se realizan en moléculas pequeñas, pueden ser, en su gran mayoría, usadas también en la modificación química de los polímeros. La gran diferencia, radica en el hecho de que las velocidades de reacción suelen ser muy diferentes a las que se dan entre moléculas pequeñas. Los principales factores que influyen para que se de esta situación en los polímeros, son mencionados a continuación:

- 1)- Proximidad y concentración de los grupos funcionales presentes.
- 2)- Factores electrostáticos y de interacciones débiles o fuertes entre cadenas poliméricas.
- 3)- Posibilidad de agregación de especies en medio de la reacción.
- 4)- Posibilidad de reacciones inter/intramoleculares a medida que avanza la reacción.
- 5)- Procesos de difusión que suelen ocurrir cuando la reacción ocurre en la interfase, sin agitación, incluso en ausencia de solvente.

6)- Posibilidad de existencia de diferentes estados: extendido o colapsado, según haya cambios en el entorno (pH y temperatura, entre otros).

7)- A medida que avanza la conversión, suele haber cambio gradual de reactividad, conformación, interacción entre el polímero y el solvente, y cambio de estructura, que pueden producir cambios en la solubilidad y sobre todo, aumento o disminución de la difusión y del hinchamiento.

A pesar de las varias diferencias que se dan entre las reacciones químicas, según el reactivo sea una molécula pequeña o un polímero, los hidrogeles sufren reacciones de modificación según las necesidades específicas. Una de las ventajas que poseen estas redes, cuando se colocan a reaccionar frente a diferentes reactivos, es que, si la estructura se encuentra hinchada en el medio de reacción, se favorece la expansión de la red, con la consecuente facilidad de la reacción.

En este trabajo de Tesis, se han realizado distintas estrategias de modificación a los hidrogeles obtenidos. Para ello, en los capítulos posteriores referidos a cada una de las vías sintéticas, se realizará una breve introducción con las generalidades de cada caso.

REFERENCIAS

- 1-Sperling, L. H., Introduction to physical polymer science, 4ta. Edición, Willey (2006).
- 2-Wade, L. G. Jr., Química Orgánica, 5ta. Edición, Pearson Educación (2004).
- 3-Drury, J. L., Mooney, D. J., Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 24, 4337 (2003).
- 4- Slaughter, B. V., Khurshid, S. S., Fisher, O. Z., Khademhosseini, A., Peppas, N. A., Hydrogels in regenerative medicine. *Advanced Materials* 21, 3307 (2009).
- 5- Nguyen, K. T., West, J. L., Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials* 23, 4307 (2002).
- 6-Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., Schacht, E., Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: A review. *Biomacromolecules* 12, 1387 (2011).
- 7- Yan, C., Altunbas, A., Yucel, T., Nagarkar, R. P., Schneider, J. P., Pochan, D. J., Injectable solid hydrogel: mechanism of shear-thinning and immediate recovery of injectable β -hairpin peptide hydrogels. *Soft Matter* 6, 5143 (2010).
- 8- Soares, P. A., Bourbon, A. L., Vicente, A. A., Andrade, C. A., Barros, W. J., Correia, M. T., Pessoa, A. J., Carneiro-da-Cunha, M. G., Development and characterization of hydrogels based on natural polysaccharides: Policaçu and chitosan. *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications* 42, 219 (2014).
- 9- Sahiner, N., Butun, S., Ozay, O., Dibek, B., Utilization of smart hydrogel-metal composites as catalysis media. *Journal of Colloid and Interface Science* 373, 122 (2012).
- 10- Hunt, J. A., Chen, R., Van, Veen T., Bryan, N., Hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of Materials Chemistry B* 2, 5319 (2014).
- 11- Fullenkamp, D. E., He, L., Barrett, D. G., Burghardt, W. R., Messersmith, P. B., Mussel-inspired histidine-based transient network metal coordination hydrogels. *Macromolecules* 46, 1167 (2013).

- 12- Junli, R., Weiqing, K., Runcang, S., Preparation of sugarcane bagasse/poly(acrylic acid-co-acrylamide) hydrogels and their application. *BioResources* 9, 3290 (2014).
- 13- Ekebafé, L. O., Ogbeifun, D. E., Okieimen, F. E., Removal of heavy metals from aqueous media using native cassava starch hydrogel. *African Journal of Environmental Science and Technology* 6, 275 (2012).
- 14-Numata, K., Yamazaki, S., Naga, N., Biocompatible and biodegradable dual-drug release system based on silk hydrogel containing silk nanoparticles. *Biomacromolecules* 13, 1383 (2012).
- 15- Das, D., Ghosh, P., Dhara, S., Panda, A. B., Pal, S., Dextrin and poly (acrylic acid) based biodegradable, non-cytotoxic, chemically crosslinked hydrogel for sustained release of ornidazole and ciprofloxacin. *ACS Applied Materials & Interfaces* 7, 4791 (2015).
- 16- Agostini de Moraes, M., Albrecht Mahl, C. R., Ferreira Silva, M., Beppu, M., Formation of silk fibroin hydrogel and evaluation of its drug release profile. *Journal of Applied Polymer Science* 132, 41802 (2015).
- 17-Rossi, F., Ferrari, R., Papa, S., Moscatelli, D., Casalini, T., Forloni, G., Perale Pietro Veglianese, G., Tunable hydrogel – nanoparticles release system for sustained combination therapies in the spinal cord. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 108, 169 (2013).
- 18-Yoshida, R., Okano, T., *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*, 19 (2010).
- 19- Jalani, G., Rosenzweig, D. H., Makhoul, G., Abdalla, S., Cecere, R., Vetrone, F., Haglund, L., Cerruti, M., Tough, in-situ thermogelling, injectable hydrogels for biomedical applications. *Macromol Biosci.* , 4, 473 (2015).
- 20- Hu, Z., Cai T., Chi, C., Thermoresponsive oligo(ethylene glycol)-methacrylate-based polymers and microgels. *Soft Materials* 6, 2115 (2010).
- 21- Lopresti, C., Vetri, V., Ricca, M., Tripodo, G., Spadaro, G., Dispenza, C., Pulsatile protein release and protection using radiation-crosslinked polypeptide hydrogel delivery devices. *Reactive and Functional Polymers* 71, 155 (2011).

- 22-Milašinović, N., Krušić, M. K., Knežević-Jugović, Z., Filipović, J., Hydrogels of N-isopropylacrylamide copolymers with controlled release of a model protein. *International Journal of Pharmaceutics* 383, 53 (2010).
- 23-Yue-Cheng, Q., Peng-Cheng, C., Gui-Jin, H., Xiao-Jun, H., Zhi-Kang, X., Preparation of polyphosphazene hydrogels for enzyme immobilization. *Molecules* 19, 9850 (2014).
- 24- Sahiner, N., Soft and flexible hydrogel templates of different sizes and various functionalities for metal nanoparticle preparation and their use in catalysis. *Progress in Polymer Science* 38 1329 (2013).
- 25- Okay, O., Macroporous copolymer networks. *Progress in Polymer Science* 25, 711 (2000).
- 26- Podgornik, A., Barut, M., Strancar, A., Construction of large volume monolithic columns. *Analytical Chemistry* 72, 5693 (2000).
- 27- Courtois, J., Byström, E., Irgum, K., Novel monolithic materials using poly (ethylene glycol) as porogen for protein separation. *Polymer* 47, 2603 (2006).
- 28- Yu, C., Xu, M., Svec, F., Frechet, J. M. J., Preparation of monolithic polymers with controlled porous properties for microfluidic chip applications using photoinitiated free-radical polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 40, 755 (2002).
- 29- Gokmen, M. T., Du Prez, F. E., Porous polymer particles—A comprehensive guide to synthesis, characterization, functionalization and applications. *Progress in Polymer Science* 37, 365 (2012).
- 30-Mazlan, S. Z., Rahim, F., Hanifah, S. A., Facile synthesis of magnetic copolymer microspheres based on poly(glycidyl methacrylate-co-N-isopropylacrylamide)/Fe₃O₄ by suspension photopolymerization. *International Journal of Polymer Science*, 591898 (2014).
- 31-Gupta, P., Vermani, K., Garg, S., Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discovery Today* 10, 569 (2002).
- 32-Rubinstein, M., Colby, R. H., *Polymer Physics*, Oxford University Press, Oxford (2003).

- 33- Hennink, W. E., Nostrum, C. F. V., Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 13 (2002).
- 34-Rosiak, J. M., Janik, I., Kadlubowski, S., Kozicki, M., Kujawa, P., Stasica, P., Ulanski, P., Nano-, micro- and macroscopic hydrogels synthesized by radiation technique. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 208, 325 (2003).
- 35- Hunt, J. A., Chen, R., T., Veen, V., Bryan, N., Hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of Materials Chemistry B* 2, 5319 (2014).
- 36-Adhikari, B., Majumdar, S., Polymers in sensor applications. *Progress in Polymer Science* 29, 699 (2004).
- 37- Michailova, V., Titeva, S., Kotsilkova, R., Kusteve, E., Minkov, E., Influence of hydrogel structure on the processes of water penetration and drug release from mixed hydroxypropylmethyl cellulose/thermally pregelatinized waxy maize starch hydrophilic matrices. *International Journal of Pharmaceutics* 222, 7 (2001).
- 38- Massaro, L., Zhu, X., Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids. *Progress in Polymer Science* 24, 731 (1999).
- 39- Nho, Y. C., Park, S. E., Kim, H. I., Hwang, T. S., Oral delivery of insulin using pHsensitive hydrogels based on polyvinyl alcohol grafted with acrylic acid/methacrylic acid by radiation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 236, 283 (2005).
- 40- Bhardwaj, Y. K., Kumar, V., Acharya, A., Sabharwal, S., Synthesis, characterization and utilization of radiation synthesized stimuli-responsive hydrogels and membranes. In *Radiation synthesis of stimuli-responsive membranes, hydrogels and adsorbents for separation purposes*, (ed. I. A. E. Agency). International Atomic Energy Agency, Vienna (2005).
- 41- Sen, M., Radiation synthesis of stimuli responsive hydrogels and their use for the membranes, hydrogels and adsorbents for separation purposes, (ed. I. A. E. Agency). International Atomic Energy Agency, Vienna (2005).
- 42- Bin Imran, A., Seki, T., Takeoka, Y., Recent advances in hydrogels in terms of fast stimuli responsiveness and superior mechanical performance. *Polymer Journal* 42, 839 (2010).

- 43- Stuart, M. A. C., Huck, W. T. S., Genzer, J., Müller, M., Ober, C., Stamm, M., Sukhorukov, G. B., Szleifer, I., Tsukruk, V. V., Urban, M., Winnik, F., Zauscher, S., Luzinov, I., Minko, S., Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. *Nature Materials* 9, 101 (2010).
- 44- Ramteke, K. H., Chavanke, M. S., Chavanke, P. S., Stimuli sensitive hydrogels in drug delivery systems. *International Journal Pharmaceutical Science and Research* 3, 4604 (2012).
- 45- Peppas, N. A., Wood, K. M., Blanchette, J. O., Hydrogels for oral delivery of therapeutic proteins. *Expert Opin. Biol. Ther.* 4, 6, 1 (2004).
- 46- Miyata, T., Uragami, T., Nakamae, K. Biomolecule-sensitive hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 79 (2002).
- 47- Zhao, W., Zhang, H., He, Q., Li, Y., Gu, J., Li, L., Li, H. Shi, A glucose-responsive controlled release of insulin system based on enzyme multilayers-coated mesoporous silica particles. *J. Chem. Commun.*, 47, 9459 (2011).
- 48- Schuetz, Y. B., Gurny, R., Jordan O., A novel thermoresponsive hydrogel based on chitosan. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 68, 19 (2008).
- 49- Nguyen, M. K., Lee, D. S., Injectable biodegradable hydrogels. *Macromolecular Bioscience* 10, 563 (2010).
- 50- Kabanov, A. V., Vinogradov, S. V., Nanogels as pharmaceutical carriers: finite networks of infinite capabilities. *Angewandte Chemie International Edition* 48, 5418 (2009).
- 51- Chacko, R. T., Ventura, J., Zhuan, J., Thayumanavan, S., Polymer nanogels: a versatile nanoscopic drug delivery platform. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, 9, 836 (2012).
- 52- Morimoto, N., Hirano, S., Takahashi, H., Loethen, S., Akiyoshi, K., Self-assembled pH-sensitive cholesteryl pullulan nanogel as a protein delivery vehicle. *Biomacromolecules* 14, 56 (2013).

- 53- Chen, W., Zheng, M., Meng, F., Cheng, R., Deng, C., Feijen, J., Zhong, Z., In situ forming reduction-sensitive degradable nanogels for facile loading and triggered intracellular release of proteins. *Biomacromolecules* 14, 1214 (2013).
- 54- Lou, S., Gau, S., Wang, W., Zhang, M., Zhang, J., Whang, C., Li, C., Kong, D., Zhao, Q., Galactose-functionalized multi-responsive nanogels for hepatoma-targeted drug delivery. *Nanoscale* 7, 3137 (2015).
- 55- Hoffman, A. S., Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 43, 3 (2002).
- 56- Anderson, J. M., Langone, J. J., Issues and perspectives on the biocompatibility and immunotoxicity evaluation of implanted controlled release systems. *Journal of Controlled Release* 57, 107 (1999).
- 57- Caykara, T., Kiper, S., Demirel, G., Thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide) hydrogels: Synthesis, swelling and interaction with ionic surfactants. *European Polymers Journals* 42, 348 (2006).
- 58- Ganji, F., Vasheghani-Farahani, S., Vasheghani-Farahani, E., Theoretical description of hydrogel swelling: a review. *Iranian Polymer Journal* 19, 375 (2010).
- 59- Du, J. Z., Sum, T. M., Weng, J., Synthesis and characterization of photo-cross-linked hydrogels based on biodegradable polyphosphoesters and poly(ethylene glycol) copolymers. *Biomacromolecules* 8, 3375 (2007).
- 60- Mansur, H. S., Orefice, R. L., Mansur, A. A. P., Characterization of poly(vinyl alcohol)/poly(ethylene glycol) hydrogels and PVA-derived hybrids by small-angle X-ray scattering and FTIR spectroscopy. *Polymer* 45, 7193 (2004).
- 61-Torres, R., Usall, J., Teixido, N., Abadias, M., Vinas, I., Liquid formulation of the biocontrol agent *Candida sake* by modifying water activity or adding protectants. *Journal of Applied Microbiology* 94, 330 (2003).
- 62- Aouada, F. A., de Moura, M. R., Fernandes, P. R. G., Rubira, A. F., Muniz, E. C., Optical and morphological characterization of polyacrylamide hydrogel and liquid crystal systems. *European Polymer Journal* 41, 2134 (2005).

- 63-El Fray, M., Pilasziewicz, A., Swieszkowski, W., Kurzydowski, K. J., Morphology assessment of chemically modified and cryostructured poly(vinyl alcohol) hydrogel. *European Polymer Journal* 43, 2035 (2007).
- 64-Pourjavadi, A., Kurdtabar, M., Collagen-based highly porous hydrogel without any porogen: Synthesis and characteristics. *European Polymer Journal* 43, 877 (2007).
- 65- Teratsubo, M., Measurement of stress and strain during tensile testing of gellan gum gels: effect of deformation speed. *Carbohydrate Polymers* 47, 1 (2002).
- 66- Picout, R. D., Ross-Murphy, S. B., Thermoreversible and irreversible physical gels from biopolymers. En *Polymer Gels and Networks*. Osada, Y. y Khokhlov, A.R., Eds. Marcel Dekker, New York. 27–46 (2002).
- 67- http://avanceyperspectiva.cinvestav.mx/wpcontent/uploads/2012/09/IMPRIMIBLE_Geles.pdf
- 68- Moresi, M., Bruno, M. Characterisation of alginate gels using quasi-static and dynamic methods. *Journal of Food Engineering* 82, 298-309 (2007).
- 69- Shroff, R. N., Dynamic mechanical properties of polyethylene melts: Calculation of relaxation spectrum from loss modulus. *Journal of Rheology* 15, 163 (1971).
- 70- Coviello, T., Coluzzi, G., Palleschi, A., Grassi, M., Santucci, E., Alhaique, F. Structural and rheological characterization of Scleroglucan/borax hydrogel for drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* 32, 83 (2003).
- 71- Funami, T., Hiroe, M., Noda, S., Asai, I., Ikeda, S., Nishimari, K., Influence of molecular structure imaged with atomic force microscopy on the rheological behavior of carrageenan aqueous systems in the presence or absence of cations. *Food Hydrocolloids* 21, 617 (2007).
- 72- Kumar, S. V., Sasmal, D., Pal, S. C., Rheological characterization and drug release studies of gum exudates of *Terminalia catappa* Linn. *Aaps Pharmscitech* 9, 885 (2008).
- 73-Omari, A., Tabary, R., Rousseau, D., Calderon, F. L., Monteil, J., Chauveteau, G., Soft water-soluble microgel dispersions: Structure and rheology. *Journal of Colloid and Interface Science* 302, 537 (2006).

- 74- Sahiner, N., Singh, M., De Kee, D., John, V. T., McPherson, G. L., Rheological characterization of a charged cationic hydrogel network across the gelation boundary. *Polymer* 47, 1124 (2006).
- 75- Yang, D., Zhang, J. Z., Fu, S., Xue, Y., Hu, Evolution process of polymethacrylate hydrogels investigated by rheological and dynamic light scattering techniques. *J. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 353, 197 (2010).
- 76- Kempe, S., Metz, H., Bastrop, M., Hvilstom, A., Contri, R. V., Mäder, K., Characterization of thermosensitive chitosan-based hydrogels by rheology and electron paramagnetic resonance spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 68, 26 (2008).
- 77- Reyes, Ortega, F., Rodríguez, G., Rosa Aguilar, M., García-Sanmartín, J., Martínez, A., San Román, J., Comportamiento reológico de geles biodegradables para aplicaciones en medicina regenerativa. *Biomecánica* 20, 7 (2012).
- 78- Moura, M. J., Figueiredo, M. M., Gil, M. H., Rheological study of genipin cross-linked chitosan hydrogels. *Biomacromolecules* 8, 3823 (2007).
- 79- Thévenot, C., Khoukh, A., Reynaud, S., Desbrières, J., Grassl, B., Kinetic aspects, rheological properties and mechano-electrical effects of hydrogels composed of polyacrylamide and polystyrene nanoparticles. *Soft Matter* 3 437 (2007).
- 80- Phillips G. O., Plessis T. A. D., Saphwan A. A., Williams P. A., Phillips; Hydrocolloid Research limited, UK (ed. U. S. Patent) 6, 610 810 (2003).
- 81- Lazareva, T. G., Vashuk, E. V., Features of rheological and electrophysical properties of compositions based on polyvinyl alcohol and carboxymethylcellulose. *Mechanics of Composite Materials* 31, 524 (1995).
- 82- Singh, B., Vashishth, M., Development of novel hydrogels by modification of sterculia gum through radiation cross-linking polymerization for use in drug delivery. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 266, 2009 (2008).
- 83- Janik, I., Kasprzak, E., Al-Zier, A., Rosiak, J. M., Radiation crosslinking and scission parameters for poly(vinyl methyl ether) in aqueous solution. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 208, 374 (2008).

- 84-Wach, R. A., Mitomo, H., Nagasawa, N., Yoshii, F., Radiation crosslinking of methylcellulose and hydroxyethylcellulose in concentrated aqueous solutions. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 211, 533 (2003).
- 85-Xu, G. Y., Chen, A. M., Liu, S. Y., Yuan, S. L., Wei, X. L., Effect of C12NBr on the viscoelasticity of gel containing xanthan gum/Cr(III). *Acta Physico-Chimica Sinica* 18, 1043 (2002).
- 86-Benamer, S., Mahlous, M., Boukrif, A., Mansouri, B., Youcef, S. L., Synthesis and characterisation of hydrogels based on poly(vinyl pyrrolidone). *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 248, 284 (2006).
- 87- Nho, Y. C., Lee, J. H., Reduction of postsurgical adhesion formation with hydrogels synthesized by radiation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 236, 277 (2005).
- 88-Khoylou, F., Naimian, F., Radiation synthesis of superabsorbent polyethylene oxide/tragacanth hydrogel. *Radiation Physics and Chemistry* 78, 195 (2009).
- 89-Razzak, M. T., Darwis, D., Zainuddin, Z., Sukirno, S., Irradiation of polyvinyl alcohol and polyvinyl pyrrolidone blended hydrogel for wound dressing. *Radiation Physics and Chemistry* 62, 107 (2001).
- 90-Palumbo, F. S., Pitarresi, G., Mandracchia, D., Tripodo, G., Giammona, G., New graft copolymers of hyaluronic acid and polylactic acid: Synthesis and characterization. *Carbohydrate Polymers* 66, 379 (2006).
- 91-Onuki, Y., Nishikawa, M., Morishita, M., Takayama, K., Development of photocrosslinked polyacrylic acid hydrogel as an adhesive for dermatological patches: Involvement of formulation factors in physical properties and pharmacological effects. *International Journal of Pharmaceutics* 349, 47 (2008).
- 92-Singh, A., Hosseini, M., Hariprasad, S. M., Polyethylene glycol hydrogel polymer sealant for closure of sutureless sclerotomies: a histologic study. *American Journal of Ophthalmology* 150, 346 (2010).
- 93-Coviello, T., Matricardi, P., Marianecchi, C., Alhaique, F., Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of Controlled Release* 119, 5 (2007).

- 94-Barbucci, R., Leone, G., Vecchiullo, A., Novel carboxymethylcellulose-based microporous hydrogels suitable for drug delivery. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 15, 607 (2004).
- 95-Fei, B., Wach, R. A., Mitomo, H., Yoshii, F., Kume, T., Hydrogel of biodegradable cellulose derivatives. I. Radiation-induced crosslinking of CMC. *Journal of Applied Polymer Science* 78, 278 (2000).
- 96-Said, H. M., Alla, S. G. A., El-Naggar, A. W. M., Synthesis and characterization of novel gels based on carboxymethyl cellulose/acrylic acid prepared by electron beam irradiation. *Reactive & Functional Polymers* 61, 397 (2004).
- 97-Liu, P., Peng, J., Li, J.; Wu, J., Radiation crosslinking of CMC-Na at low dose and its application as substitute for hydrogel. *Radiation Physics and Chemistry* 72, 635 (2005).
- 98-Esteban C., Severian D., Polyionic hydrogels based on xanthan and chitosan for stabilising and controlled release of vitamins, Vol. WO0004086 (A1) (ed. U. United States Patent), Kemestrie Inc [CA], USA. (2000).
- 99-Magnin, D., Lefebvre, J., Chornet, E., Dumitriu, S., Physicochemical and structural characterization of a polyionic matrix of interest in biotechnology, in the pharmaceutical and biomedical fields. *Carbohydrate Polymers* 55, 437 (2004).
- 100-Takigami, M., Amada, H., Nagasawa, N., Yagi, T., Kasahara, T., Takigami, S., Tamada, M., Preparation and properties of CMC gel. *Transactions of the Materials Research Society of Japan* 32, 713 (2007).
- 101-Williams, P. A., Phillips, G. O., Physicochemical characterisation of gum arabic arabinogalactan protein complex. *Food and Food Ingredients Journal of Japan* 211, 181 (2006).
- 102-Aoki, H., Al-Assaf, S., Katayama, T., Phillips, G. O., Characterization and properties of *Acacia senegal* (L.) Willd. var. *senegal* with enhanced properties (*Acacia* (sen) super gum(TM)): Part 2-Mechanism of the maturation process. *Food Hydrocolloids* 21, 329 (2007).
- 103-Aoki, H., Katayama, T., Ogasawara, T., Sasaki, Y., Al-Assaf, S., Phillips, G. O., Characterization and properties of *Acacia senegal* (L.) Willd. var. *Senegal* with

enhanced properties (Acacia (sen) super gum(TM)): Part 5. Factors affecting the emulsification of Acacia senegal and Acacia (sen) SUPER GUM(TM). *Food Hydrocolloids* 21, 353 (2007).

104-Al-Assaf, S., Dickson, P., Phillips, G. O., Thompson, C.; Torres, J. C., Compositions comprising polysaccharide gums. In World Intellectual property Organization, Vol. WO2009/016362 A2, (ed. PCT), Phillips Hydrocolloid Research Limited (UK), Reckitt Benckiser (UK), United Kingdom (2009).

105-Giannouli, P., Morris, E. R., Cryogelation of xanthan. *Food Hydrocolloids* 17, 495 (2003).

106-Lee, O. J., Kim, J. O., Woo Ju, H., Moon, B. M., Park, H. J., Sheikh, F. A., Park, C. H., Fabrication and characterization of silk/PVA hydrogels by sonication and freezing-thawing technique. *Polymer Korea* 37, 717 (2013).

107-Buwalda, S. J., Boere, K. W. M, Dijkstra, P. J., Feijenc, J., Vermonden, T., Hennink, W. E., Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. *Journal of Controlled Release* 190, 254 (2014).

108-Caenazzo, L., Ceola, F., Ponzano, E., Novelli, E., Human identification analysis to forensic purposes with two mitochondrial markers in polyacrilamide mini gel. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 1, 266 (2008).

109- Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Smith, P. K., Immobilized affinity ligand techniques (Paul Keith) Academic Press, San Diego, ISBN 978-1617373541 (1992).

110- Shivashankar, M., Mandal, B.K., A review on interpenetrating polymer network. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4, 5 (2012).

111-Pourjavadi, A., Zohuriaan-Mehr, M. J., Modification of carbohydrate polymers via grafting in air. 2. Ceric-initiated graft copolymerization of acrylonitrile onto natural and modified polysaccharides. *Starch-Starke* 54, 482 (2002).

112-Campo, V. L., Kawano, D. F., da Silva, D. B., Carvalho I., Carbohydrate Polymers 77, 167 (2009).

113-Chang, C., Zhang, L., Zhou, J., Zhang, L.; Kennedy, J. F., Carbohydrate Polymers 82, 122 (2010).

- 114-Chang, C., Zhang, L., Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis - A review. *Carbohydrate Polymers* 84, 40 (2011).
- 115-Spinelli, L. S., Aquino, A. S., Lucas, E., d'Almeida, A. R., Leal, R., Martins, A. L., Adsorption of polymers used in drilling fluids on the inner surfaces of carbon steel pipes. *Polymer Engineering and Science* 48, 1885 (2008).
- 116-Zhai, M. L., Yoshii, F., Kume, T., Hashim, K., Syntheses of PVA/starch grafted hydrogels by irradiation. *Carbohydrate Polymers* 50, 295 (2002).
- 117-Cai, L. B., Zuo, J., Tang, S., A study on the nonergodic behavior of kappa-carrageenan thermoreversible gel by static and dynamic light scattering. *Acta Physico-Chimica Sinica* 21, 1108 (2005)
- 118-Al-Assaf, S., Phillips, G. O., Williams, P. A., Plessis, T. A., Application of ionizing radiations to produce new polysaccharides and proteins with enhanced functionality. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 265, 37 (2007).
- 119-Byun, E. H., Kim, J. H., Sung, N. Y., Choi, J. I., Lim, S. T., Kim, K. H., Yook, H. S., Byun, M. W., Lee, J. W., Effects of gamma irradiation on the physical and structural properties of beta-glucan. *Radiation Physics and Chemistry* 77, 781 (2008).
- 120-Makuuchi, K., Critical review of radiation processing of hydrogel and polysaccharide. *Radiation Physics and Chemistry* 79, 267 (2010).

CAPÍTULO 3

Sistema de hidrogeles de acrilamida y N,N´ metilen bisacrilamida, modificados con etilendiamina

3.1. CONSIDERACIONES GENERALES

3.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4. CONCLUSIONES

REFERENCIAS

CAPÍTULO 3

3.1. CONSIDERACIONES GENERALES

Numerosos materiales de la vida diaria, están hechos preferentemente de materiales poliméricos estándar, tales como poliolefinas, poliésteres o poliamidas. Así mismo, la química de polímeros está abocada a la elaboración de nuevos “*polímeros funcionales*” (1). *Polímeros de origen natural* como la celulosa o el poliisopreno fueron modificados mediante técnicas tales como la esterificación o entrecruzamiento, para obtener las propiedades deseadas. Hoy en día, el *desarrollo de polímeros funcionales* está siendo cada vez más importante por la diversidad de áreas específicas de aplicación. Muchas de las técnicas para la *generación de polímeros funcionalizados o funcionales* se basan en reacciones de co-polimerización de monómeros con diferentes grupos funcionales ó por post-modificación de productos formados en reacciones de polimerización. La segunda opción, es generalmente preferida para preparar materiales que suelen presentar dificultad para ser obtenidos por polimerización directa de monómeros que presenten los grupos funcionales correspondientes deseados.

Particularmente, hidrogeles de poliacrilamida (PAAm) modificados han sido utilizados en diversas aplicaciones. Entre ellas, se pueden mencionar la recuperación de petróleo, la estabilización de la sedimentación de minerales, la purificación de aguas residuales y la extracción de metales. Las principales ventajas de este tipo de materiales son: la posibilidad de funcionamiento semi-continuo, y la reutilización, despojando los cationes con sustancias químicas simples. Por ejemplo, geles de PAAm iónicos han sido utilizados para dicho propósito.

Los grupos amida en PAAm, pueden ser convertidos a grupos ácido (por hidrólisis), hidroxilo (con formaldehído), amino (por reacción de Hofmann o transamidación) o sulfónico (2-3). Así mismo, es importante destacar que, materiales poliméricos entrecruzados que contienen grupos funcionales, tales como los

mencionados, pueden ser usados como agentes acomplejantes para remoción de iones metálicos a partir de soluciones acuosas (4-10). A veces, lo hacen en forma selectiva, con la posibilidad de recuperación de los iones, presentando ventajas (uso en forma semi-continua, fácil remoción del polímero acomplejado, re-usabilidad, etc.) frente a otras técnicas de remoción (2). La combinación de la adsorción física con la adsorción química, atribuida a los grupos funcionales, suele resultar en un mejoramiento del rendimiento de adsorción. En este sentido, es importante destacar que la reducción de niveles de concentración de metales de transición y cationes divalentes y, más aún, su remoción de soluciones acuosas, constituye una posible solución al problema de polución que afecta la calidad del agua. Además, los iones metálicos suelen traer aparejados problemas de salud. Como ejemplo, podemos citar al Cu^{2+} . Si está presente en soluciones acuosas y es ingerido, puede generar problemas de irritación de boca, ojos, dermatitis, hasta causar daño al hígado y riñones. En el caso del Pb^{2+} , de mayor toxicidad, una vez ingerido o frente a exposición excesiva, puede llegar a generar graves daños al organismo. Entre los más importantes, se pueden mencionar la perturbación de la biosíntesis de hemoglobina y anemia, incremento de la presión sanguínea, daño a los riñones, al cerebro y perturbación del sistema nervioso.

Hay varias interacciones posibles (aunque débiles) entre un polímero y un ion metálico, las que pueden actuar en forma múltiple y dinámica, creando en conjunto un rol importante de cooperatividad (11). Si hay grupos sulfonatos, se crean interacciones electrostáticas, mientras que si hay grupos amino presentes, se pueden formar complejos. En general, la retención de iones metálicos, involucra diferentes procesos:

- (i) de *separación*, al requerir la recuperación de iones metálicos de valor agregado;
- (ii) de *pre-concentración*, con propósitos analíticos;
- (iii) de *remoción directa*, cuando los iones metálicos están contaminando una solución.

En el caso de remoción directa, hay varios métodos útiles (intercambio iónico, precipitación química y separación usando membranas, entre otros), aunque

la adsorción constituye uno de los más utilizados. Para ello, se usan materiales tales como carbón activado, zeolitas, y productos que forman quelatos. Estos últimos, se pueden encontrar en forma de fibras, resinas, bio-adsorbentes e hidrogeles. En el caso de los hidrogeles, las ventajas más importantes del uso son las siguientes: pueden presentar grupos funcionales adecuados para la adsorción; pueden ser fácilmente removibles de una solución acuosa y pueden también ser despojados químicamente de los iones adsorbidos, con lo que poseen, además, la posibilidad de reutilización.

Además, el estudio de polímeros que contienen ligandos soportados en sus estructuras y sus complejos metálicos derivados, es relevante en el área de catálisis, de sorción de moléculas orgánicas o biológicas y en la inmovilización de enzimas. Los complejos polímero-metal suelen ser usados como catalizadores inmovilizados con alta especificidad. A veces, la matriz tridimensional macromolecular imparte selectividad e incrementa la actividad catalítica del complejo polímero-metal en comparación con la especie correspondiente de bajo peso molecular. La insolubilidad del complejo lo hace de fácil separación luego de su uso (12).

La gran variedad de aplicaciones de los *materiales poliméricos funcionalizados* (obtenidos en forma de membranas, micro-partículas, barras, micro-esferas, hidrogeles, etc.) en diversas áreas de la ciencia y la tecnología, es consecuencia de la relación estructura/propiedad. Es por ello, el gran interés en desarrollar esta área, tanto en sus aspectos básicos, como aplicados (4, 13-29). Para la mayoría de las aplicaciones, el hinchamiento, el proceso de difusión y la composición de la red son muy importantes, porque determinan el funcionamiento o comportamiento de la red y su relación con el medio (30-32).

Por otro lado, los materiales poliméricos entrecruzados que presentan grupos funcionales hidrolizables, generan grupos iónicos superficiales. Estos, producen una densidad de carga superficial sensible a estímulos tales como pH, concentración salina, solvente, etc., condicionando las interacciones físicas que puedan ocurrir entre la matriz con acomplejantes metálicos, ligandos biológicos, fármacos, etc. El estudio de carga superficial del hidrogel, junto con los estudios de hinchamiento,

ayuda a determinar cómo el hidrogel se puede comportar bajo estos estímulos, permitiendo establecer sitios “*target*” para la liberación de fármacos (33).

En esta parte del trabajo de tesis, se desarrolló el primer sistema. Se llevó a cabo la preparación de redes poliméricas entrecruzadas utilizando un monómero hidrofílico comercial, acrilamida (AAM) usando N, N´metilen bisacrilamida (BIS) como agente entrecruzante. La AAM se usó con la finalidad de que el producto contenga grupos amida para ser modificados y convertidos a grupo amino. Las reacciones de síntesis se llevaron a cabo bajo diferentes condiciones (temperatura, tipo de solvente y concentración de monómeros) y fueron evaluados los diferentes tipos de productos. Los mismos, fueron modificados con etilendiamina (EDA) por reacción de transamidación, con el objetivo de obtener grupos amino primario. Su presencia le otorga capacidad de hinchamiento a diferentes pH y la posibilidad de retención de iones metálicos (2-3).

3.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.2.1. REACTIVOS

Los siguientes compuestos químicos fueron utilizados: acrilamida (AAM); N, N' metilen bisacrilamida (BIS, Mallinckrodt); persulfato de amonio (APS, Aldrich 98%); peróxido de benzoilo (PBO, Fluka); dimetilformamida (DMF, Cicarelli) que fue purificada mediante destilación a presión reducida (84 °C/90 mm Hg); etilendiamina (EDA, Carlo Erba); ácido trinitrobenceno-sulfónico (TNBS, Fluka); ácido clorhídrico (HCl, Anedra) y KBr (Aldrich 99%).

3.2.2. SÍNTESIS DE LOS HIDROGELES

Los hidrogeles se sintetizaron mediante reacciones radicalarias, en dos condiciones experimentales diferentes:

-A: la reacción se llevó a cabo en un tubo de vidrio de 10 mL como reactor, usando AAm y diferentes concentraciones de BIS, en DMF como solvente, PBO como iniciador, a 80 °C y durante dos horas. Las condiciones experimentales se resumen en la Tabla 3.1. Los productos se obtuvieron en forma de *partículas*. Fueron lavados con exceso de solvente, a temperatura ambiente durante 24 h y luego con agua. Posteriormente, se secaron a 35 °C, hasta peso constante.

-B: la reacción se llevó a cabo en un tubo de vidrio de 10 mL como reactor, usando AAm y diferentes concentraciones de BIS, en agua como solvente, con APS como iniciador, a temperatura ambiente, durante dos horas. Las condiciones experimentales se resumen en la Tabla 3.2. Previamente, las soluciones conteniendo los monómeros, fueron sonicadas 15 min en un baño de ultrasonido, a 25 °C, para homogenizar el sistema. Luego, se agregó el iniciador bajo atmósfera inerte de nitrógeno. Una vez finalizada las reacciones, los tubos de vidrio se rompieron para extraer los productos obtenidos en forma de barras. Luego, fueron cortadas con ayuda de un bisturí, en *discos* de aproximadamente 3 mm de espesor y 14 mm de diámetro. Estos fueron lavados dos veces con exceso de agua, a temperatura ambiente, durante 24 h. Posteriormente, se secaron a 35 °C, hasta peso constante.

Tabla 3.1. Condiciones experimentales de síntesis **A** (productos *particulados*)

Hidrogel	AAm (g)	BIS (g)	PBO (g)	DMF (mL)
AAm 100% I	0,607	0,067	0,035	4,3
AAm 100% II	0,607	0,660	0,035	4,3
AAm 100% III	0,607	1,030	0,035	4,3

Tabla 3.2. Condiciones experimentales de síntesis B (productos en forma de *barra*)

Hidrogel	AAm (g)	BIS (g)	APS (g)	H₂O (mL)
AAm 100% IV	2,0	0,01	0,01	8,0
AAm 100% V	2,0	0,02	0,01	8,0
AAm 100% VI	2,0	0,04	0,01	8,0

3.2.3. MODIFICACIÓN

En un balón de 3 bocas, se colocó 1 g de cada uno de los hidrogeles sintetizados con 20 mL de EDA, en atmósfera inerte de nitrógeno, a reflujo, durante 3 y 9 h. Los productos de reacción sintetizados en la condición experimental B (cortados en discos) fueron previamente hinchados durante 3 días en EDA, a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, cada muestra se filtró y se lavó con solución de HCl 0,001 M hasta pH neutro. Posteriormente, se realizaron sucesivos lavados con NaCl 0,2 M hasta que el sobrenadante dió reacción negativa con TNBS. Este último, reacciona con grupos amina primaria dando un complejo coloreado naranja (34).

3.2.4. CUANTIFICACIÓN DE GRUPOS AMINO

El contenido de grupos amino se determinó por duplicado, utilizando el método de HCl (35). Para ello, se suspendió 0,1 g de muestra seca en 5 mL de HCl 0,5 M, con agitación, a reflujo y durante 1,5 h. Luego, la mezcla se centrifugó a 1.000 rpm, durante 15 min. A continuación, se tomó 1 mL del sobrenadante y se valoró usando una solución de NaOH 0,1 M, en presencia de 2 gotas de solución indicadora de fenolftaleína. El contenido de grupos amino de los productos, se

calculó a partir de las diferencias en la cantidad de ácido de las soluciones iniciales y finales.

3.2.5. CARACTERIZACIÓN POR FT-IR

Para la adquisición de los espectros, se utilizó un espectrofotómetro Nicolet 5-SXC FT-IR. En todos los casos se usó bromuro de potasio seco como soporte. Los polímeros fueron pulverizados y aproximadamente 3 mg de cada uno fue mezclado con KBr y comprimidos en una prensa hidráulica.

3.2.6. CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA

Las propiedades viscoelásticas de los hidrogeles fueron medidas en un reómetro rotacional Anton Paar Physica MCR 301, en platos paralelos de 25 mm de diámetro y distancias entre plato y plato (*gaps*) de aproximadamente 2 mm. Los módulos dinámicos, de almacenamiento G' y de pérdida G'' se midieron en dos tipos de ensayos. En el primero, se realizaron los barridos dinámicos de deformación (% strain) a cada muestra en su máximo hinchamiento en agua, a temperatura ambiente, para determinar la región viscoelástica lineal (RVL). Se llevaron a cabo en un rango de entre 0,1 a 20 % de deformación, a una frecuencia angular constante de 10 s^{-1} . Además, fue realizado un barrido dinámico de frecuencias, en un rango entre 0,1 y 400 s^{-1} , para cada uno de los polímeros hinchados en agua, a temperatura ambiente, utilizando un valor de deformación constante (entre 0,5-1%, dependiendo de cada hidrogel). La deformación (% strain) constante aplicada en este ensayo fue seleccionada previamente del gráfico de barrido de amplitudes (G' y G'' vs % strain). Se eligió de manera tal que fuera la mayor deformación aplicada dentro del RVL, en el cual G' y G'' son constantes. Durante ambos ensayos no se observaron evidencias de deshidratación de las muestras.

3.2.7. DETERMINACIÓN DE INDICES DE HINCHAMIENTOS

3.2.7.1. Determinación de índices de hinchamiento en el equilibrio

El índice de hinchamiento en el estado de equilibrio (q_w) en agua, aplicable a los productos obtenidos en forma de *barra*, se determinó de acuerdo al cociente de peso entre el hidrogel hinchado ($m_{h,e}$) y el hidrogel en estado seco (m_s), según ecuación 2.1 (Capítulo 2).

Para determinar $m_{h,e}$, las muestras secas fueron colocadas en agua destilada y se mantuvieron a 25 °C hasta su máximo hinchamiento. Para ello, las muestras hinchadas se fueron retirando del baño de agua en intervalos regulares de tiempo, se secaron superficialmente con papel *tissue*, para obtener sus masas en una balanza electrónica. Posteriormente, las muestras se colocaron nuevamente en el baño, y así sucesivamente hasta que se logró peso constante.

El índice de hinchamiento en el estado de equilibrio (q_v) en agua, para los productos obtenidos en forma de *partículas o polvos*, se determinó de acuerdo al cociente de los volúmenes del hidrogel hinchado en el equilibrio y el hidrogel en estado seco. Para determinar, q_v , se colocó 0,1 mL del hidrogel seco en un tubo cónico graduado y se agregó agua destilada hasta un volumen final de 10 mL a 25 °C. El estado de hinchamiento en el equilibrio, se determinó una vez que el hidrogel alcanzó un volumen constante.

3.2.7.2. Determinación de índices de hinchamiento a diferentes pH

Para los estudios de hinchamiento en respuesta a los cambios en el pH, los hidrogeles se hincharon hasta el equilibrio en un rango de pH entre 3 y 10 por 24 h. Los discos secos, previamente pesados (80-100 mg aproximadamente), se colocaron dentro de un recipiente conteniendo 15 mL de cada solución de *buffer* citrato (pH = 3; 4; 5 y 6) y *buffer* fosfato (pH = 7; 8; 9 y 10) a 25 °C. Luego, los discos

hinchados fueron secados superficialmente con papel *tissue* y pesados en una balanza electrónica para realizar el cálculo de q_w . Para calcular los q_v a diferentes valores de pH, se colocó 0,1 mL del hidrogel seco en tubos cónicos graduados y se agregó cada una de las soluciones *buffer* (pH = 3-10) hasta un volumen final de 10 mL, a 25 °C.

3.2.8. DETERMINACIÓN DE LA CARGA SUPERFICIAL

Basándose en el fenómeno de la movilidad electroforética, se puede obtener información de la carga superficial que presentan las partículas. Para ello, se realizan medidas de velocidad de migración de las partículas, cuando se aplica una diferencia de potencial entre los dos electrodos de la celda en la que están contenidas.

Para los estudios de determinación de carga superficial se procedió a realizar la molienda de los productos obtenidos en forma de *discos*, hasta pulverizarlos, para tamizarlos posteriormente y obtener partículas de tamaño similar, eligiéndose la fracción de *partículas* más pequeñas. A su vez, los productos obtenidos en forma de *partículas* sólo fueron tamizados. Posteriormente, todos los productos fueron sumergidos en soluciones *buffers* a diferentes pH (entre 3 y 9) por 24 h a 25 °C. Luego, las partículas se colocaron en la celda electroforética, a la cual se le aplicó una diferencia de potencial, determinando el tiempo y el sentido en que las partículas realizan una trayectoria fija.

3.2.9. RETENCIÓN DE Cu^{2+}

Los hidrogeles se colocaron en sistema *batch*, en contacto con soluciones de CuSO_4 0,017 M, a pH 4,75. Para ello, 50 mg de cada matriz se puso en contacto con 10 mL de soluciones acuosas de dicha sal, por 96 h a temperatura ambiente y con agitación. Luego, se tomaron 5 mL de cada sobrenadante y se determinó la

cantidad de ion metálico quelado, utilizando absorción atómica, por diferencia entre la cantidad de ion metálico agregado y la cantidad de iones libres en cada solución. Para ello, se utilizó un equipo Perkin-Elmer 3110.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 3.1 muestra las estructuras químicas de los materiales de partida utilizados para la preparación de los hidrogeles y de la molécula con la cual se los modificó.

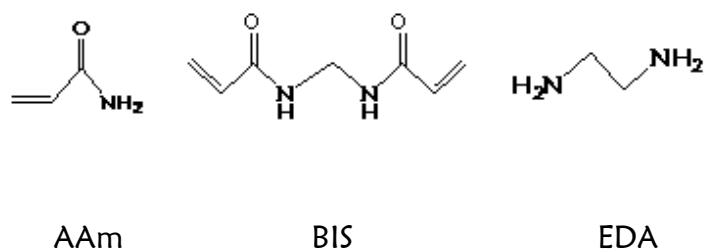


Figura 3.1. Estructura química de los monómeros de partida (AAm y BIS) y del agente modificante (EDA). AAm: acrilamida; BIS: N, N' metilen bisacrilamida; EDA: etilendiamina

3.3.1. SÍNTESIS Y MODIFICACIÓN DE LOS HIDROGELES

La Figura 3.2 muestra el esquema de preparación de los hidrogeles, llevadas a cabo bajo dos condiciones diferentes, A y B, que conducen a productos particulados y en forma de barra, respectivamente. Cada síntesis fue realizada por copolimerización de AAm y BIS, variando la relación monomérica. Para la reacción A, se utilizó DMF como disolvente, PBO como iniciador, 80 °C, durante 2 h. Para la reacción B, se usó agua como disolvente, APS como iniciador y temperatura ambiente, durante 24 h.

Luego de la síntesis de los hidrogeles, se determinaron los valores de hinchamiento, notándose una disminución a medida que incrementó la cantidad de agente entrecruzante BIS en la red. Los resultados obtenidos con ambos tipos de productos (particulados y barra), mostraron la misma tendencia en cuanto a los índices de hinchamiento, determinados según q_v y q_w , respectivamente (Tablas 3.3 y 3.4).

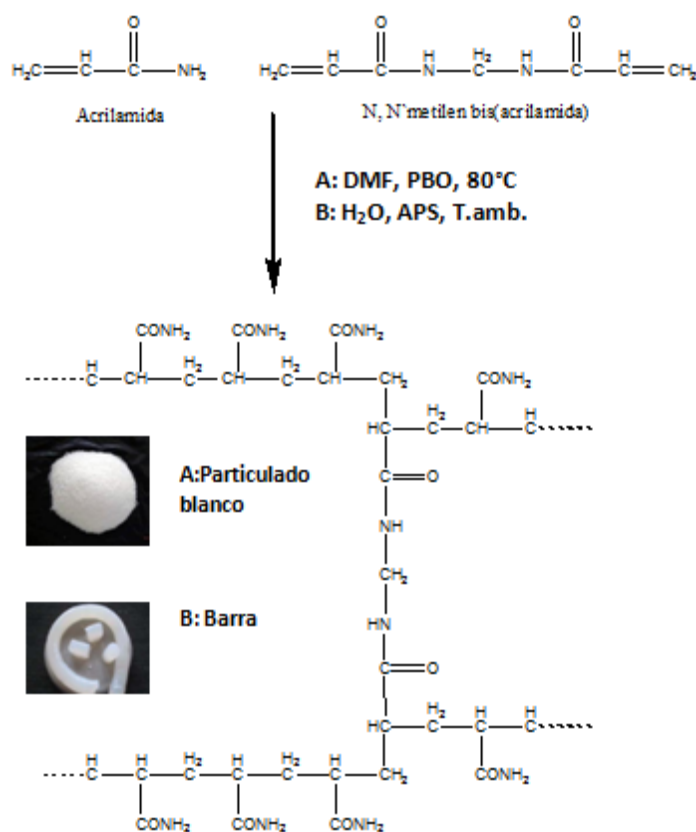


Figura 3.2. Esquema de síntesis de los hidrogeles

Tabla 3.3. Cantidad de grupos amino, valores de índices de hinchamiento y cantidad de Cu^{2+} retenido con hidrogeles obtenidos según condiciones experimentales de síntesis **A** (particulados)

Hidrogel	qv	Cu^{2+} (mmol/g)	Cantidad de grupos amino luego de 3h de reacción (mm/g)	Cantidad de grupos amino luego de 9h de reacción (mm/g)	qv ^a	$\text{Cu}^{2+ a}$ (mmol/g)
AAm 100% I	6,0	0,34	1,12	1,46	7,0	1,13
AAm 100% II	5,5	0,20	1,25	1,42	6,0	0,97
AAm 100% III	5,0	0,20	0,97	1,25	5,3	0,87

a-Valores determinados en los productos con grupos amino luego de 9 h de reacción

Tabla 3.4. Cantidad de grupos amino, valores de índices de hinchamiento y cantidad de Cu^{2+} retenido con hidrogeles obtenidos según condiciones experimentales de síntesis **B** (en forma de barra)

Hidrogel	qw	Cu^{2+} (mmol/g)	Cantidad de grupos amino luego de 3h de reacción (mm/g)	Cantidad de grupos amino luego de 9h de reacción (mm/g)	qw ^a	$\text{Cu}^{2+ a}$ (mmol/g)
AAm 100% IV	11,4	0,30	1,23	3,50	15,2	2,35
AAm 100% V	9,6	0,29	1,27	3,44	13,8	2,65
AAm 100% VI	7,6	0,34	1,15	3,20	12,1	2,25

a-Valores determinados en los productos con grupos amino luego de 9 h de reacción

Los hidrogeles fueron sometidos a reacción de transamidación (Figura 3.3) para lograr la funcionalización con grupos amino primario.

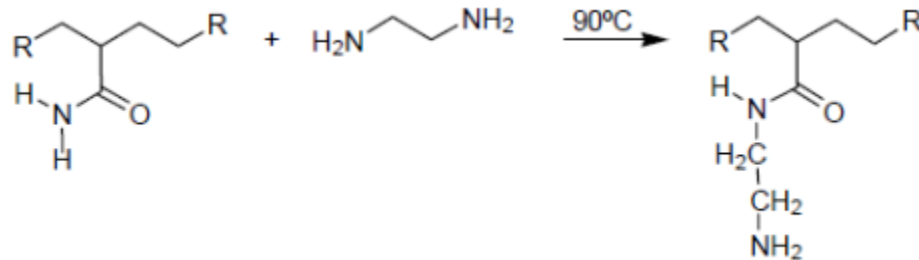


Figura 3.3. Esquema de reacción de transamidación

Luego de la reacción de transamidación, se realizó la cuantificación de grupos amino presentes en la red. En ambos casos, se observó que, en general, a menor porcentaje de entrecruzante, se logra mayor cantidad de grupos amino. Esto fue debido posiblemente a que las redes más expandibles facilitarían el contacto entre los reactivos. Además, a mayor tiempo de reacción (9 h), se observó que la cantidad de grupos amino también aumenta, sobre todo en los productos de tipo barra. En este último caso, antes de someter a los reactivos a la temperatura y tiempo de reacción, los discos habían sido previamente hinchados con EDA, durante 72 h, lo que posiblemente favoreció el ingreso del reactivo a la red polimérica.

En las reacciones de transamidación, existe la posibilidad de que los dos grupos amino del EDA reaccionen, generando entrecruzamientos covalentes adicionales. Para analizar esta posible situación, los productos obtenidos luego de 9 h de reacción (para la formación de grupos amino), fueron sometidos a estudios de hinchamiento. En todos los casos se observó que aumentaron, especialmente en los productos de tipo barra. Este último resultado podría estar indicando que no se produjeron reacciones de entrecruzamiento adicionales. En general, si luego de una reacción ocurren entrecruzamientos adicionales, el índice de hinchamiento disminuye por el aumento en el grado de entrecruzamiento. En este caso, la cantidad de diamina puesta a reaccionar en exceso, evitó posiblemente que los grupos amino reaccionen generando nuevos entrecruzamientos (36).

Los ensayos de retención de Cu^{2+} se llevaron a cabo con los hidrogeles sin modificar y con los productos obtenidos luego de 9 h de reacción de transamidación. Se determinó que todos los productos tienen capacidad de retener el ion metálico. Aquellos modificados (que contienen grupos amino), retienen entre cuatro y ocho veces más respecto a los no-modificados, según sean los particulados o en barra, respectivamente. A su vez, a medida que aumenta la cantidad de grupos amino por gramo, incrementa la retención de Cu^{2+} . Otro dato a destacar es que los hidrogeles en forma de barra retuvieron aproximadamente el doble de ion metálico respecto a los particulados.

3.3.2. ESTUDIOS DE FT-IR

En la Figura 3.4 se muestran los espectros infrarrojos correspondientes a AAm 100% V, antes y después de la reacción con EDA. Se observan los picos de absorción característicos de poliacrilamida: a 1650-1660 cm^{-1} , correspondiente al $\text{C}=\text{O}$ de amida (Amida I); a 1615 cm^{-1} por la vibración de deformación de NH_2 (amida II); a 1450 cm^{-1} correspondiente al CH_2 ; a 1400-1420 cm^{-1} y 1170-1190 cm^{-1} , por la vibración de deformación de $-\text{NH}$; a 1315-1320 cm^{-1} por la vibración de estiramiento de $-\text{NH}$ y a 1120 cm^{-1} por la vibración de estiramiento de N-H (amida III) (37). En el espectro de AAm 100% V, luego de la modificación, se observó, además, la aparición de una señal a 980-1040 cm^{-1} , asignada a la vibración de estiramiento del C-N de la amina primaria. Se observó también la aparición de señales a 1543 y 1388 cm^{-1} , debido a la presencia de $\text{C}=\text{O}$ del carboxilato, indicando que posiblemente ocurre hidrólisis, durante la modificación.

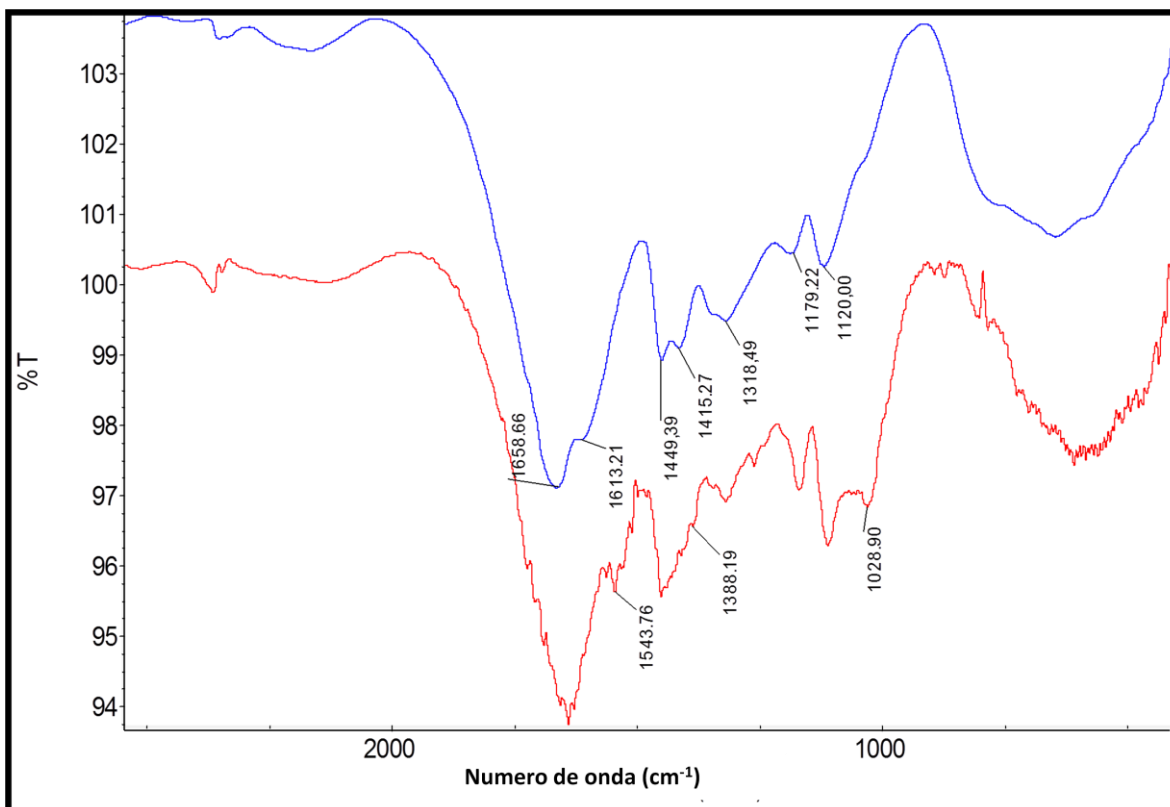


Figura 3.4. FT-IR de AAm 100% V antes (azul) y después (rojo) de la reacción con EDA

3.3.3. ESTUDIOS DE HINCHAMIENTO A DISTINTOS VALORES DE pH

Los estudios de hinchamiento a diferentes pH de los productos, antes y después de modificar, se muestran en las Figuras 3.5 y 3.6. Las mismas, corresponden a los productos *particulados* y en forma de *barra*, respectivamente. Dichos estudios mostraron que, en general, los mayores hinchamientos se obtienen a pH ácidos, ya que los grupos amino se encuentran protonados, generando repulsión de carga, lo que produciría mayor expansión de la red y mayores hinchamientos.

A su vez, a pH altos y, especialmente en los productos modificados en forma de barra, se observó aumento del hinchamiento, debido posiblemente a la presencia

de aniones carboxilatos, como se mencionó anteriormente, por la posible reacción de hidrólisis.

Contrariamente, y como era de esperar, los productos sin modificar no sufrieron, en general, modificación significativa del índice de hinchamiento con los cambios de pH.

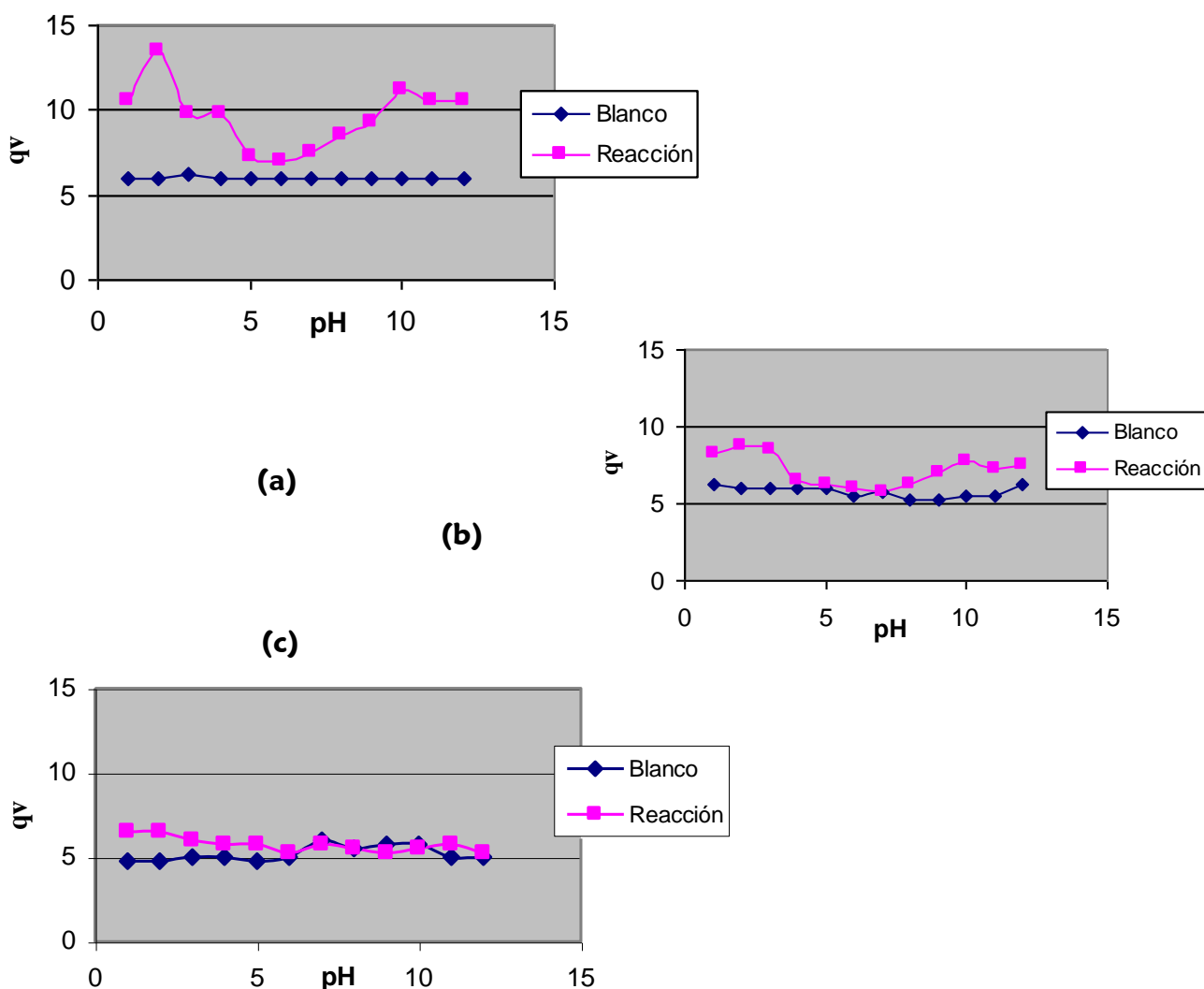
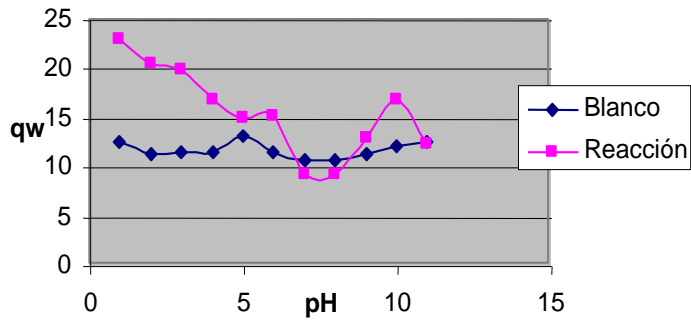
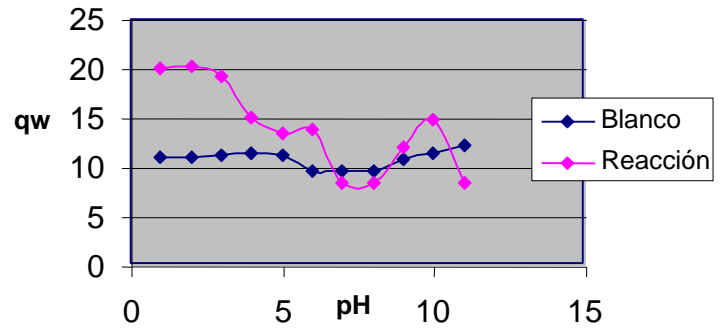


Figura 3.5. Estudios de hinchamiento a distintos pH de AAm 100% I; II y III, particulados, (a-c, respectivamente) antes (blanco) y después (reacción) de la reacción con EDA



a)

(b)



(c)

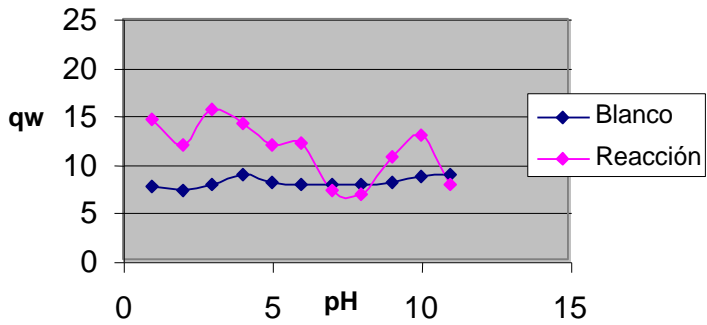


Figura 3.6. Estudios de hinchamiento a distintos pH de productos AAm 100% IV; V y VI, en forma de barra, (a-c, respectivamente) antes (blanco) y después (reacción) de la reacción con EDA

3.3.4. ESTUDIOS REOLÓGICOS

La Figura 3.7 muestra el barrido de amplitud para los productos AAm 100% IV; V y VI, en forma de barra. Como se puede observar, a medida que aumenta el entrecruzamiento de la red, se incrementa el valor de G' , siendo mayor que G'' , mostrando mejores propiedades reológicas. Además, se pudo determinar el RVL, que resultó amplio en todos los casos.

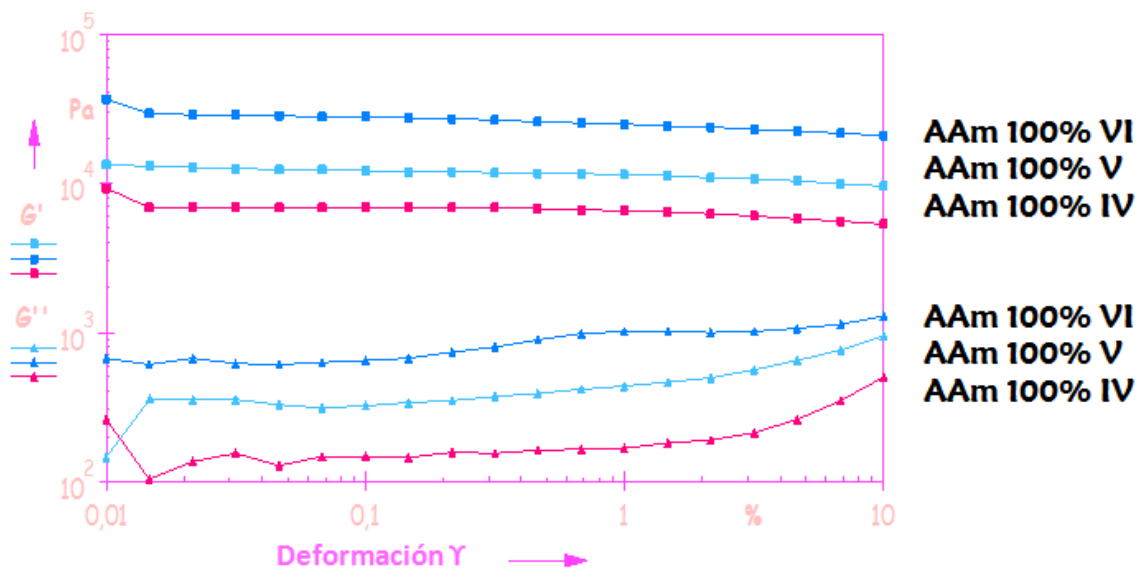


Figura 3.7. Barrido de amplitud para productos AAm 100% IV; V y VI, en forma de barra

3.3.5. DETERMINACIÓN DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA

La determinación de la movilidad electroforética no brinda información sobre la carga que puede tener el interior del hidrogel, si no que informa acerca de la carga que puede existir en la superficie, la que a su vez produce la formación de una doble capa eléctrica dependiente del pH, de la fuerza iónica y del solvente, entre otros. Al aplicar un voltaje, se produce la movilidad de las partículas, condicionada por la carga presente en la doble capa eléctrica. De esta forma,

determinando la dirección de migración de la partícula, se puede predecir el signo de la carga que posee.

Los resultados de movilidad electroforética, permitieron determinar ciertas tendencias. En la Figura 3.8, correspondiente al producto AAm 100% V antes de la modificación química, se observa un punto isoeléctrico cercano a pH 4. Por debajo de ese valor, el hidrogel presenta una movilidad electroforética hacia el polo negativo resultante de la doble capa eléctrica. Esta, estaría causada por la carga superficial positiva de la partícula, debido posiblemente a la protonación del grupo carbonilo de la amida, generando una estructura resonante con carga positiva. A mayores valores de pH, la movilidad electroforética es hacia el polo positivo debido, en este caso, a la formación de una doble capa eléctrica por la partícula cargada negativamente. Esto podría atribuirse a la presencia de grupos carboxilatos, producto de la hidrólisis parcial de la amida.

Estas tendencias se pueden relacionar con los valores obtenidos en los estudios de hinchamiento de AAm 100% V, en los que no se observó variación significativa de q_w a diferentes pH (Figura 3.6, b). Se podría suponer que los grupos funcionales hidrolizables presentes en la partícula se encuentran mayormente presentes en la superficie del hidrogel. Si los presentara en su interior, al ingresar el solvente se debería generar una repulsión entre las cargas de los grupos, que se reflejaría en un aumento del índice de hinchamiento. Al no observarse dicho aumento, permite suponer que la carga presente en AAm 100% V, antes de la modificación química, representa grupos hidrolizables principalmente a nivel superficial. De todas formas, la carga superficial de estas partículas podría ser relativamente pequeña.

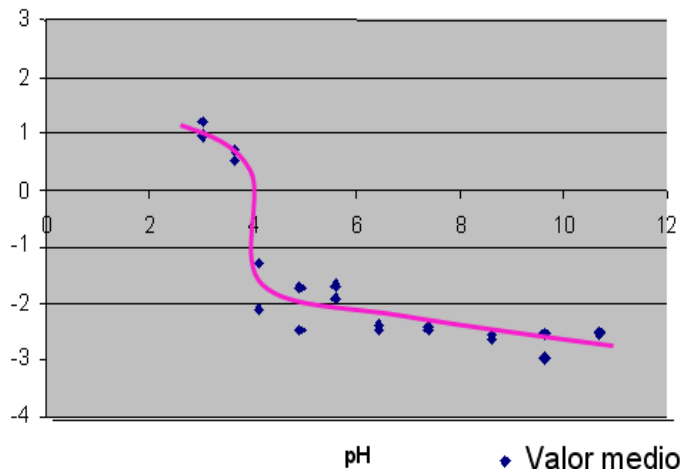


Figura 3.8. Variación de la movilidad electroforética de AAm 100% V (um/s)/(volt/cm) sin modificar, en función del pH

En el caso de AAm 100% V modificado con grupos amino, se observó un punto isoeléctrico cercano a 7,5 (Figura 3.9). En este caso, la movilidad electroforética hacia el polo negativo, a menores valores de pH se puede atribuir a la carga positiva debida a la protonación de los grupos amino. Por otro lado, la movilidad electroforética hacia el polo positivo a valores de pH básico se debería a la carga negativa de grupos carboxilato, provenientes de la hidrólisis parcial del grupo amida durante la reacción. Cabe recordar que el hidrogel se somete a un medio fuertemente básico durante varias horas a alta temperatura.

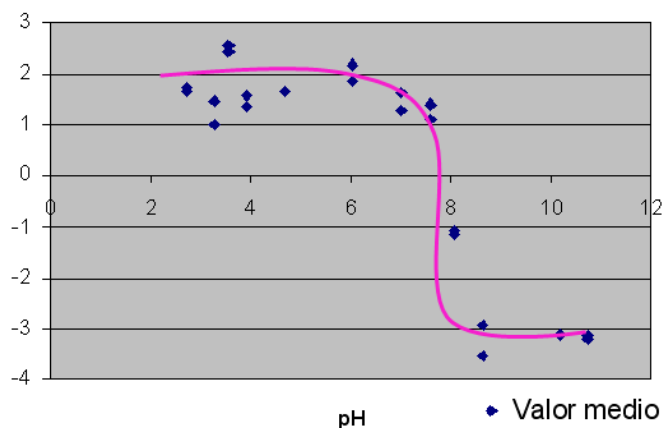


Figura 3.9. Variación de la movilidad electroforética de AAm 100% V (um/s)/(volt/cm) modificado con grupos aminos, en función del pH

Las tendencias antes descritas se pueden relacionar con los índices de hinchamiento. Se puede suponer que los grupos superficiales hidrolizables de la partícula corresponden sólo a una parte de los grupos funcionales hidrolizables totales presentes en el hidrogel modificado. La Figura 3.6 muestra que, al variar el pH, efectivamente ocurrió una variación en los valores de q_w . Este efecto, se atribuye a la presencia de mayor cantidad de grupos cargados en el interior del hidrogel, lo que condiciona el hinchamiento según el pH. En el caso de AAm 100% V modificado con grupos amino, se podría suponer que los grupos hidrolizables no sólo se encuentran a nivel superficial, si no distribuidos también en el interior.

El hecho de poder conocer de qué manera varía la carga superficial en función del pH, resulta útil cuando se debe unir un ligando, más aún, en condiciones específicas (10). Por otro lado, la superficie representa la “*interfase*” entre lo que ocurre en el interior y el exterior del hidrogel. Al conocer el comportamiento ó cambios de esta interfase, junto con otros estudios de la matriz polimérica, facilitan poder entender el comportamiento físico-químico del hidrogel.

3.4. CONCLUSIONES

Los hidrogeles obtenidos resultaron homogéneos, expandibles e hinchables en agua. En ambos tipos de productos, *particulados* y en forma de *barra*, se observó que, a medida que disminuye la cantidad de agente entrecruzante, se logra un producto con mayor índice de hinchamiento.

Las reacciones de transamidación sobre los productos fueron realizadas con el objetivo de convertir grupos funcionales amida en amino. En este sentido, dicha reacción resultó efectiva sobre ambos tipos de productos obtenidos. Las reacciones se realizaron con exceso de EDA con la finalidad de disminuir la posibilidad de reacciones de entrecruzamiento. Los productos fueron analizados por IR

observando una nueva señal del estiramiento C-N correspondiente a la amina primaria (980-1040 cm^{-1}) formada.

Los estudios de hinchamiento a diferentes pH de los productos que contienen grupos amino, demostraron que, en general, los mayores hinchamientos se obtienen a pH ácidos. Paralelamente, los productos sin modificar no sufrieron modificación con los cambios de pH.

La cantidad de grupos amino resultó superior en los productos de tipo barra, sintetizadas en agua, debido probablemente al hinchamiento previo de los hidrogeles en el medio de reacción. La retención de Cu^{2+} , en ambos tipos de productos que contienen amino, resultó superior a la de los hidrogeles no modificados. A su vez, los mayores valores de retención de Cu^{2+} resultaron superiores en los productos de tipo barra.

Los estudios de electroforesis demostraron que el hidrogel presenta grupos superficiales hidrolizables dependientes del pH, ya que se observó la presencia de cargas positivas y negativas. Se pudo estimar aproximadamente el punto isoeléctrico de AAm 100% V antes y después de modificar. Hubo variación significativa entre ambos, causada principalmente por la incorporación de grupos amino. Relacionando los análisis de hinchamiento con los estudios de movilidad electroforética, se pudo predecir si los grupos hidrolizables se encuentran mayormente en la superficie o distribuidos entre la superficie y el interior del hidrogel.

La desventaja que presentó la reacción de modificación usada para la incorporación de grupos amino, fue la reacción de hidrólisis mencionada. La misma, se produce posiblemente como reacción secundaria, resultando prácticamente incontrolable. Dado que la modificación propuesta para el primer sistema de hidrogeles presentado no resultó apropiada, se propuso la preparación de hidrogeles a partir de monómeros que ya contengan incorporados los grupos amino en su estructura.

REFERENCIAS

- 1-Drury, J. L., Mooney, D. J., Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 24, 4337 (2003).
- 2- Turan, E., Demirci, S., Caykara, T., Preparation of polyacrylamide hydrogels at various charge densities by postmodification. *J. Appl. Polym. Sci.* 111, 108 (2009).
- 3- Singhal, R., Regenerable hydrogels based on poly(acrylic acid-sodium acrylate-acrylamide) modified by sodium humate for high removal of Pb^{2+} and Fe^{2+} ions: metal adsorption kinetics and thermodynamic studies. *Desalination and Water Treatment* 52, 28, 5611 (2014).
- 4- Moradi, O., Aghaie, M., Zare, K., Monajjemi, M., Aghaie, H., J. The study of adsorption characteristics Cu^{2+} and Pb^{2+} ions onto PHEMA and P(MMA-HEMA) surfaces from aqueous single solution. *Hazard. Mater.* 170, 673 (2009).
- 5- Zhu, S., Yang, N., Zhang, D., Poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) modification of activated carbon for copper ions removal. *Mater. Chem. Phys.* 113, 784 (2009).
- 6- Huang, S.H, Chen, D.H., Rapid removal of heavy metal cations and anions from aqueous solutions by an amino-functionalized magnetic nano-adsorbent. *J. Hazard. Mater.* 163, 174 (2009).
- 7-Samarkandy, A. R., Mostafa, K. M., Synthesis and development of novel aminated chelating resin and its application in industrial waste water treatment. *Australian Journal of Basis and Applied Sciences* 3, 3, 1772 (2009).
- 8-Yu, Z., Wu, R., Wu, M., Zhao, L., Li, R., Zou, H., Preparation of polyamine-functionalized copper specific adsorbents for selective adsorption of copper. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 78, 222 (2010).
- 9- Guibal, E., Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. *Separation and Purification Technology* 38, 43 (2004).

- 10- Huang, S.H., Chen, D.H., Rapid removal of heavy metal cations and anions from aqueous solutions by an amino-functionalized magnetic nano-adsorbent. *Journal of Hazardous Materials* 163, 174 (2009).
- 11- Caykara, T., Recai, I., Determination of the complex formation constants for some water-soluble polymers with trivalent metal ions by differential pulse polarography. *Colloid Polym. Sci.* 282, 1282 (2004).
- 12- Vinodkumar, G., Mathew, B., Polymer-metal complexes of glycine functions supported on N,N'-methylene-bis-acrylamide (NNMBA)-crosslinked polyacrylamides: synthesis, characterisation and catalytic activity. *Eur. Polym. J.* 34, 8, 1185 (1998).
- 13- Fullenkamp, D. E., He, L., Barrett, D. G., Burghardt, W. R., Messersmith, P. B., Mussel-inspired histidine-based transient network metal coordination hydrogels. *Macromolecules* 46, 3, 1167 (2013).
- 14- Ramírez, E., Burillo, S. G., Barrera-Díaz, C., Roaa, G., Bilyeuc, B., Use of pH-sensitive polymer hydrogels in lead removal from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials* 192, 432 (2011).
- 15- Orozco-Guareño, E., Santiago-Gutiérrez, F., Morán-Quiroz, J. L., Hernandez-Olmos, S., Soto, V., De la Cruz, W., Manríquez, R., Gomez-Salazar, S., Removal of Cu(II) ions from aqueous streams using poly(acrylic acid-co-acrylamide) hydrogels. *Journal of Colloid and Interface Science* 349, 2, 583 (2010).
- 16- Sharaf, M. A., Arida, H. A., Sayed, S. A., Younis, A. A., Farag A. B., Separation and preconcentration of some heavy-metal ions using new chelating polymeric hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science* 113, 2, 1335 (2009).
- 17- Rivas, B. L., Canessa, G. S., Martinez, E., Poly [3-(methacryloylamino)propyl]trimethylammonium chloride hydrogel. Synthesis and water-absorption capacity. *Bol. Soc. Chil. Quím.* 45, 2, 283 (2000).
- 18- Çavuş, S., Gürda, G., Noncompetitive removal of heavy metal ions from aqueous solutions by poly[2-(acrylamido)-2-methyl-1-propanesulfonic acid-co-itaconic acid] hidrogel. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, 5, 2652 (2009).

- 19- Ekebafé, L. O., Ogbeifun, D. E., Okieimen, F. E., Removal of heavy metals from aqueous media using native cassava starch hydrogel. *African Journal of Environmental Science and Technology* 6, 7, 275 (2012).
- 20- Kalagasidis Krušić, M., Milosavljević, N., Debeljković, A., Üzüm, Ö. B., Karadağ E., Removal of Pb²⁺ ions from water by poly(acrylamide-co-sodium methacrylate) hydrogels. *Water, Air & Soil Pollution* 223, 4355 (2012).
- 21- Morán-Quiroz, J. L., Orozco-Guareño, E., Manríquez, R., Carbajal-Arízaga, G. G., de la Cruz, W., Gomez-Salazar, S., Polymeric hydrogels obtained using a redox initiator: Application in Cu(II) ions removal from aqueous solutions. *Journal of Applied Polymer Science* 131, 4, 39933 (2014).
- 22- Lopez-Ureta, L. C., Orozco-Guareño, E., Cruz-Barba, L. E., Gonzalez-Alvarez, A., Bautista-Rico, F., Synthesis and characterization of acrylamide/acrylic acid hydrogels crosslinked using a novel diacrylate of glycerol to produce multistructured materials. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 46, 2667 (2008).
- 23- Yang, Q., Adrus, N., Tomicki, F., Ulbricht, M. Composites of functional polymeric hydrogels and porous membranes. *J., Mater. Chem.* 21, 2783 (2011).
- 24- Chen, F., Wu, Z., Wang, Q., Wu, H., Zhang, Y., Nie, X., Jin, Y., Preparation and biological characteristics of recombinant human bone morphogenetic protein-2-loaded dextran-co-gelatin hydrogel microspheres, *in vitro* and *in vivo* studies. *Pharmacology* 75, 3, 133 (2005).
- 25- Thiele, J., Ma, Y., Foschepoth, D., Hansen, M.M., Steffen, C., Heus, H.A., Huck, W.T. DNA-functionalized hydrogels for confined membrane-free *in vitro* transcription/translation. *Lab Chip* 14, 15, 2651 (2014).
- 26- Xiao, L., Theses and Dissertations-Chemical and Materials Engineering. Paper 32, http://uknowledge.uky.edu/cme_etds/32 (2014).
- 27- Pauly, A. C., Schöller, K., Baumann, L., Ross, R. M., Dustmann, K., Ziener, U., de Courten, D., Wolf, M., Boesel, L.F., Scherer, L., ATRP-based synthesis and characterization of light-responsive coatings for transdermal delivery systems. *J. Sci. Technol. Adv. Mater.* 16, 1 (2015).

- 28- He, D., Susanto, H., Ulbricht, M., ATRP-based synthesis and characterization of light-responsive coatings for transdermal delivery systems. *Progress in Polymer Science* 34, 62 (2009).
- 29- Wang, X., Hu, H., Yang, Z., He, L., Kong, Y., Fei, B., Xin, J. H., Smart hydrogel-functionalized textile system with moisture management property for skin application. *Smart Mater. Struct.* 23, 125027 (2014).
- 30- Michailova, V., Titeva, S., Kotsilkova, R., Kusteva, E., Minkov, E., Influence of hydrogel structure on the processes of water penetration and drug release from mixed hydroxypropylmethyl cellulose/thermally pregelatinized waxy maize starch hydrophilic matrices. *Int. J. Pharm.* 222, 7 (2001).
- 31- Massaro, L., Zhu, X., Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids. *Prog. Polym. Sci.* 24, 731 (1999).
- 32- Kill, S., Dam-Jahansen, K., Controlled drug delivery from swellable hydroxypropylmethylcellulose matrices: model-based analysis of observed radial front movements. *J. Control. Release* 90, 1, 1 (2003).
- 33- Ng, T. Y., Hua Li, Y. K. Y., Lam, K. Y., Effects of initial-fixed charge density on pH-sensitive hydrogels subjected to coupled pH and electric field stimuli: a meshless analysis. *Journal of Biomechanical Engineering* 129, 148 (2007).
- 34- Arrua, R. D., Moya, C., Bernardi, E., Zarzur, J., Strumia, M., Alvarez Igarzabal, C. I., Macroporous monolithic supports for affinity chromatography. *Eur. Polym. J.* 46, 4, 663 (2010).
- 35- Huisden, R. E., Kraak, J. C., Poppe, H., Modification of silica with glucose for the separation of proteins by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 508, 289 (1990).
- 36- Latha, A. G., George, B. K., Kannan, K. G., Ninan, K. N., Synthesis of a polyacrylamide chelating resin and applications in metal ion extractions. *J. Appl. Polym. Sci.* 43, 6, 1159 (1991).
- 37-H.A.W., *Infra-Red analysis of polymers, resins and additives - an atlas*: D.O. Hummel and F. Scholl, Wiley-Interscience, New York, 1969, Vol. 1, Part 2: Plastics,

Elastomers, Fibres and Resins. Spectra, Tables and Index, 616, J. Mol. Struct. 12, 1, 153 (1972).

CAPÍTULO 4:

**Sistema de hidrogeles de
N-acrilóil-tris (hidroximetil) aminometano,
2-aminoetil metacrilato y
N, N'-metilen bisacrilamida**

4.1. CONSIDERACIONES GENERALES

4.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4. CONCLUSIONES

REFERENCIAS

CAPÍTULO 4

4.1. CONSIDERACIONES GENERALES

Los polímeros, dentro de los cuales incluimos las redes entrecruzadas hidrofílicas, pueden poseer grupos funcionales que confieren a la estructura características y propiedades útiles para distintas aplicaciones. A veces, es necesario realizar modificaciones en la superficie del polímero por diversas razones: (i) para incrementar la hidrofílicidad o la hidrofobicidad (1); (ii) para mejorar la humectación, la adhesión y la impresión de superficies de polímeros mediante la introducción de grupos polares; (iii) para obtener superficies con grupos funcionales específicos (2); (iv) para incrementar o disminuir la rigidez de la superficie; (v) para mejorar la coloración en polímeros usados en recubrimientos o en envoltorios; (vi) para mejorar la biocompatibilidad de la superficie; (vii) para crear superficies inteligentes en la superficie de un material con respuesta a estímulos externos; ó (viii) para llevar a cabo la inmovilizar de moléculas (3-6), entre otras.

Hay diversos métodos que se pueden llevar a cabo para la modificación superficial de polímeros, entre los que se pueden enumerar los siguientes:

1)-Tratamientos con agentes químicos: en este tipo de tratamiento, se usan agentes químicos tales como ácidos, disolventes, bases, oxidantes, etc. En la superficie del polímero se producen reacciones de oxidación, sustitución, eliminación, reducción, ciclización y adición, según cada tipo de agente. El ataque del reactivo se produce en la interfase sólido/líquido, por lo que ocurre preferentemente en las zonas amorfas de la superficie polimérica. Si el solvente la hincha, la modificación ocurrirá más profundamente. Como ejemplo, se puede citar a la modificación de fibras de poliamida, en las que se produce hidrólisis parcial de los grupos amida. Si dicha superficie se hace reaccionar con diepóxidos, se logra mayor adhesividad.

2)-Modificación inducida por plasma: el plasma (estado gaseoso) está formado por mezcla de iones, radicales, átomos y moléculas en estado excitado. Se genera

cuando un gas (O_2 , aire, N_2 , gases nobles) se somete a descargas eléctricas o radiaciones de alta energía a presión reducida (vacío). Se forman especies de alta energía que rompen enlaces, produciendo varios procesos que crean grupos funcionales. Por ejemplo, forma macro-radicales, que a su vez permiten reacciones (recombinaciones, ramificaciones, entrecruzamientos, etc.). Así, un polímero fluorado puede ser sometido a plasma de gases nobles, produciendo desfluoración parcial y entrecruzamientos, lo que mejora las propiedades adhesivas (7-10).

3)-Modificación empleando descarga corona: en este caso, se pasa corriente de alto voltaje entre dos electrodos. Dicha descarga activa a moléculas de un gas (por ejemplo, aire) y luego, esas especies activas reaccionan con la superficie del polímero y lo modifican. En este proceso se mejoran propiedades de auto-adhesión y adhesión a otros polímeros, a tintas, a metales, etc. Como ejemplo, el poli(etilentereftalato) (PET) puede ser sometido a descarga corona de aire, produciendo incorporación de oxígeno en la superficie, en forma de hidroperóxidos, grupos hidroxilos, ácidos, cetona, etc. (11-13).

4)-Tratamientos de injerto (“*grafting*”) en la superficie del polímero

Este último método, suele ser el elegido cuando es necesario llevar a cabo injerto de nuevas cadenas poliméricas laterales sobre superficies poliméricas ya formadas. Para ello, se pueden usar dos metodologías.

La primera, consiste en injertar polímeros (por ejemplo, de tipo lineal) sobre una superficie polimérica (14-17). La misma, se lleva a cabo vía reacción de grupos funcionales presentes en la superficie del polímero, con los del polímero pre-formado (terminales o en grupos laterales de cadena). Esta metodología se denomina “*grafting to*”, ya que el injerto de cadenas en este caso es hacia la superficie. Las ventajas que presenta esta metodología son: (i) posibilita el manejo de las propiedades del polímero pre-formado a unir, y (ii) los productos son estables por la unión covalente formada. La desventaja suele estar dada por problemas estéricos, debido a la unión de un polímero sobre otro, aunque sea superficialmente.

La segunda metodología consiste en llevar a cabo la iniciación de una polimerización sobre la superficie de un polímero formado, que se denomina comúnmente “*grafting from*”, ya que en este caso el injerto es desde la superficie. Las ventajas están relacionadas con el posible control de la densidad y del espesor del injerto. Esto es porque se crean “sitios o puntos de iniciación” desde la superficie a partir de los cuales los monómeros agregados comienzan a reaccionar, creando cadenas poliméricas. La mayor desventaja de este método es que se suelen producir reacciones de homo-polimerización en solución, que consumen monómeros. De esta manera, no se contribuye a la modificación del polímero y se disminuye la eficiencia del injerto. En el tratamiento por co-polimerización de injerto en la superficie del polímero (“*grafting from*”) se producen radicales libres. A su vez, crearán un recubrimiento de polímero injertado sobre la superficie. Las etapas involucradas en dicha reacción son:

- a-Formación de una especie reactiva (por ejemplo, radical).
- b-Exposición a un monómero mono-vinílico de cierta concentración.
- c-Formación de un polímero sobre la superficie.

A su vez, los macro-radicales se forman por diferentes reacciones: (i) de injerto común, usando rayos de alta energía, radiaciones ionizantes, método de plasma o descarga corona; (ii) de foto-injerto, usando luz UV y (iii) por uso de iniciadores redox. En el caso (iii), se puede realizar la reacción de injerto sobre grupos amida, usando, por ejemplo, diperiodatocuproso ($K_5[Cu(HIO_6)_2]$), que se forma a partir de $CuSO_4$, KIO_4 , KOH y $K_2S_2O_8$, para dar radicales amidilos (Figura 4.1) (18-19). También, la reacción se da sobre grupos hidroxilo, por reacción con Ce IV (Figura 4.2), para dar Ce III y radicales que iniciarán la reacción de polimerización. La ventaja de esta reacción es que es solamente superficial y no hay formación de homopolímero. Un ejemplo, es la reacción de injerto de AAC sobre almidón de maíz. En este caso, aumenta la hidrofiliidad confiriéndole mayor estabilidad, por formación de puente hidrógeno entre los grupos ácido y los hidroxilos del almidón.

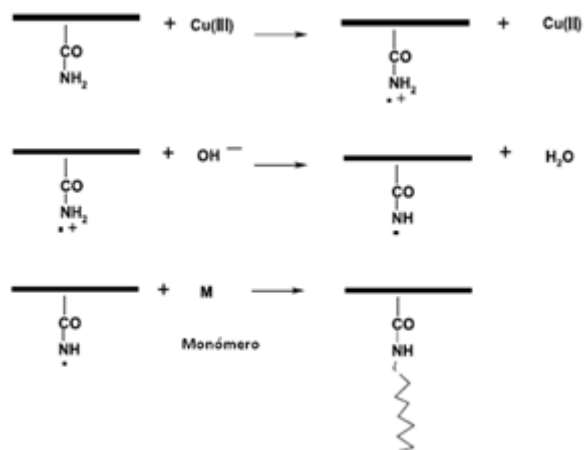


Figura 4.1. Reacción de injerto sobre grupos amida, con iniciadores redox

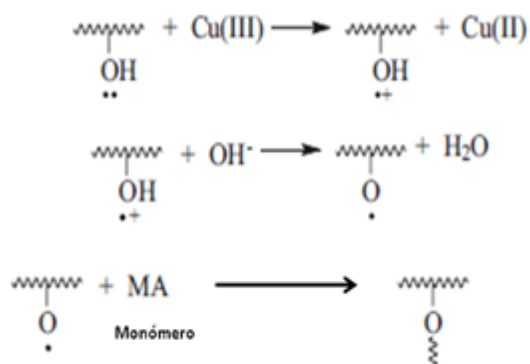


Figura 4.2. Reacción de injerto sobre grupos hidroxilo, con iniciadores redox

La Figura 4.3 muestra un esquema de injerto sobre una superficie polimérica (injerto “hacia”: “*grafting to*”; injerto “desde”: “*grafting from*”) (20). En general, las cadenas injertadas son comúnmente llamados “tentáculos” ya que son flexibles. En el caso de que posteriormente sean usados para unir una molécula biológica, se adaptan a su superficie, en particular cuando dichas moléculas son voluminosas. Dichos “tentáculos” aumentan la velocidad de unión a una molécula biológica; confieren mayor selectividad-capacidad (que puede aumentar por el largo de la

cadena) por la mayor área superficial producida; brindan un efecto cooperativo y tienen la particularidad de “imitar” a los polímeros en solución (21).

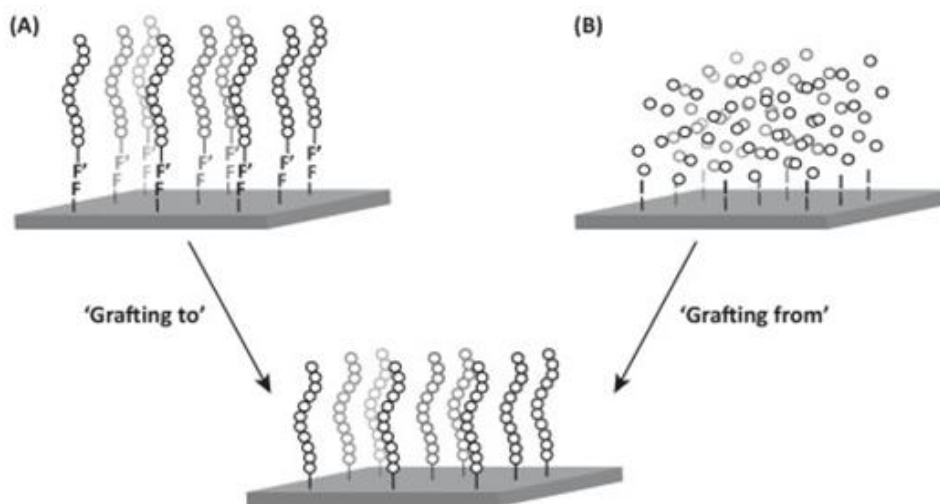


Figura 4.3 Esquema de reacciones de “*grafting to*” y “*grafting from*” sobre una superficie polimérica

Varios sistemas para lograr el control de las propiedades de la superficie, están diseñados con polímeros. A veces, sus superficies son modificadas con sustancias bioactivas tales como las enzimas. Esta tecnología se utiliza en el campo de la biomedicina para la separación, purificación, diagnóstico y análisis (22-28).

Las enzimas son especies poliméricas naturales que se caracterizan por tener alta actividad, especificidad, selectividad y capacidad de catalizar muchas reacciones, bajo condiciones suaves y compatibles con el medio ambiente. Actualmente, el uso de enzimas aplicadas a la síntesis orgánica está creciendo. Los compuestos que son particularmente difíciles de preparar por métodos de la síntesis clásica, son a veces fáciles de obtener con la ayuda de enzimas. Estas, han demostrado ser eficaces, especialmente para la resolución de compuestos quirales y proporcionan una alternativa sostenible a los catalizadores tradicionales. Sin embargo, el proceso de extracción y purificación de la enzima usada como catalizador es caro y complejo.

Además, debido a su inestabilidad en solución, pierde la actividad después de unas pocas horas.

A pesar de sus ventajas, hay bio-catalizadores que no suelen ser utilizados en procesos industriales. Las razones se relacionan con su alto costo, con la dificultad de la purificación del producto, por la inestabilidad de las enzimas y porque, además, no permiten su reutilización. Por lo tanto, se están analizando diferentes formas de mejorar el rendimiento de las enzimas.

La inmovilización de una enzima en un soporte sólido adecuado, puede permitir la recuperación y reutilización de la enzima facilitando la separación de los productos, generando así una tecnología de proceso de bio-conversión económicamente viable. Además, se puede obtener un producto no contaminado con la enzima, y lograr el incremento de la estabilidad operacional del biocatalizador (29-35). Las enzimas inmovilizadas están protegidas por la matriz sólida, ya que limita sus cambios conformacionales, disminuyendo la posibilidad de variaciones en sus propiedades. Para la formación de estos sistemas, se cuenta con diferentes métodos y una gran variedad de soportes poliméricos. Por ejemplo, pueden ser adsorbidas sobre polímeros insolubles, encapsuladas en geles, incorporadas en forma de reticulación con un reactivo bifuncional y acopladas covalentemente o atrapadas dentro de una matriz polimérica insoluble en forma de hidrogel (30, 36-44).

Las lipasas (glicerol-éster hidrolasas; EC 3.1.1.3) son enzimas que se encuentran en animales, plantas y microorganismos. Son probablemente los biocatalizadores con uso más extendido por sus propiedades. Pueden catalizar la hidrólisis o síntesis de un grupo amplio de ésteres carboxílicos. También, bajo determinadas condiciones, pueden catalizar otras reacciones químicas como transesterificación, alcoholisis, acidólisis y aminólisis. Una característica de las lipasas, es que son enzimas solubles en agua, que actúan sobre sustratos insolubles y agregados. Constan de entre 270 y 641 aminoácidos, tienen pesos moleculares que oscilan entre 20 y 60 kDa y sus puntos isoeléctricos se encuentran entre 3,8 y 7,3. Las lipasas presentan un dominio estructural compuesto por ocho cadenas β que

forman una hoja β . Estas cadenas están conectadas por hélices α , que quedan empaquetadas a ambos lados de la hoja β . Este núcleo central es el responsable directo de la actividad catalítica y define el plegamiento α/β -hidrolasa (32, 45-47).

La lipasa de *Candida rugosa*, también conocida como *Candida cylindracea* es una de las más utilizadas en biotransformaciones. Es de estructura tridimensional, tiene un peso molecular de 60 kDa y un punto isoeléctrico de 4,80-5,04. Se comercializa en diferentes preparados enzimáticos que contienen un porcentaje proteico bajo (aproximadamente un 16% de proteínas). Estos preparados se diferencian en la actividad enzimática pero no en la estereoselectividad de esta lipasa (47).

Un hidrogel típico, capaz de absorber e hincharse en agua manteniendo su forma hasta que se alcanza un cierto equilibrio, puede crear un medio o un microambiente adecuado para la protección de la enzima (38-46; 48-50). En los últimos años, la inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa* en hidrogeles, ha sido estudiada con diferentes propósitos. Como ejemplo, hay antecedentes de su inmovilización en hidrogeles sensibles al pH y a la temperatura, basados en NiPA y ácido itacónico (AI). Los hidrogeles, que fueron sintetizados en presencia de la lipasa, demostraron eficiencia de hasta 95 % en la carga de la proteína. La mayor actividad fue lograda para las muestras con la mayor cantidad de AI y de lipasa inmovilizada, cuando la actividad específica de la lipasa fue alrededor de 38 UI/g (51). Posteriormente, un sistema similar al descrito, fue utilizado para catalizar la síntesis de *n*-amil isobutirato (52). En condiciones optimizadas, el rendimiento del éster resultó mayor al 90%, lográndose a las 48 h de reacción. La estabilidad del sistema en la reacción de esterificación resultó ser atractivo, con una actividad residual de 67,4 %.

La misma enzima fue inmovilizada por atrapamiento durante la reacción de polimerización de un hidrogel de poli (N-vinil-2-pirrolidona-co-estireno) [poli (PVP-co-ST)] usando etilenglicoldimetacrilato (EGDMA) como agente entrecruzante (53). Los productos con la enzima inmovilizada, se utilizaron en la reacción de

esterificación de ácido oleico y butanol en hexano. La actividad de la enzima inmovilizada resultó alta, al igual que la estabilidad térmica y al disolvente usado.

Por otro lado, geles derivados de polisacáridos (agarosa, alginato y CS) fueron seleccionados para inmovilizar la lipasa *Candida rugosa* por atrapamiento. Los geles de agarosa mostraron hinchamiento indeseable y desintegración, en el medio usado para el ensayo de actividad. En los geles de alginato y CS, la enzima fue inmovilizada exitosamente, mostrando eficiencia de hasta 40-50%. La actividad enzimática resultó mayor en los geles de CS en comparación con los de alginato. Esta situación, puede ser debida posiblemente a interacciones físicas o iónicas que ocurren entre la enzima y el alginato (54). Por su lado, dos tipos de CS fueron usados para la inmovilización de la lipasa, por medio de activación de los grupos hidroxilo con carbodiimidas. Las propiedades de la lipasa inmovilizada usando partículas de CS, en estado seco y húmedo, fueron analizadas y comparadas. Según los resultados del estudio, la inmovilización aumenta la estabilidad de la enzima hacia cambios de pH y temperatura. Cuando la enzima se encuentra inmovilizada sobre CS en estado húmedo, la estabilidad de almacenamiento y la actividad enzimática aumentan notablemente. En ambos casos, estado seco y húmedo, la lipasa inmovilizada retuvo 78 y 85 % de la actividad, respectivamente, luego de varios ciclos (55).

Esta parte del trabajo de tesis, se centró en la síntesis, modificación y estudio de las propiedades de nuevos hidrogeles obtenidos por co-polimerización radicalaria, a partir de: N-acriloil-tris (hidroximetil) aminometano (NAT) y 2-aminoetil metacrilato (AEMA), usando BIS como agente entrecruzante. Los hidrogeles fueron caracterizados y modificados, para la posterior inmovilización de la lipasa *Candida rugosa*. Con este fin, la matriz NAT-co-AEMA se modificó de dos maneras diferentes. Por un lado, se incorporaron grupos epóxido directamente sobre la matriz, para la posterior inmovilización de la enzima. Por otro lado, se realizaron reacciones de injerto sobre la matriz, mediante la incorporación de AEMA, y luego, de grupos epóxido para inmovilizar la enzima. Estas modificaciones llevadas a cabo a partir de soportes activados con grupos epóxido, resultaron

simples para la inmovilización de la enzima (56-57). Los grupos epóxido pueden reaccionar fácilmente con enzimas que contienen grupos amino, dando un enlace estable. La actividad hidrolítica de la enzima de las matrices resultantes se determinó a partir de la hidrólisis de palmitato de p-nitrofenilo (p-NPP).

De esta manera, se logró una importante innovación en la comparación en la eficiencia de la actividad de la enzima cuando fue inmovilizada sobre *grupos funcionales* en la superficie de la matriz con aquellas que contenían *el mismo grupo funcional* pero formando parte de las cadenas poliméricas formadas a partir de reacciones de *grafting* o injerto.

4.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.2.1. REACTIVOS

Los siguientes compuestos fueron utilizados: N-[tris(hidroximetil)metil]-acrilamida (NAT; Aldrich); 2-aminoetil metacrilato (AEMA; Aldrich); N, N'-metilen bisacrilamida (BIS; Mallinckrodt); persulfato de amonio (APS; Anedra); tetrametiletilendiamina 99% (TEMED; Anedra); epiclorhidrina (ECH; Mallinckrodt); 1,4 butanodiol diglicidil éter (BDGE; Sigma); lipasa *Candida rugosa* (Lip; Biochemika); reactivo de Ellman's (Aldrich); reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich); sulfato de amonio cérico [Ce(IV)] (Merck) y palmitato de p-nitrofenilo (p-NPP; Sigma-Aldrich).

4.2.2. SINTESIS DE LOS HIDROGELES

Para la síntesis de las matrices se colocaron los monómeros AEMA y NAT y el agente entrecruzante BIS en agua Milli-Q en un tubo de vidrio (14 mm de diámetro

interno y 15 cm de largo), utilizado como reactor de polimerización. La solución se agitó durante 15 min por medio de un baño de ultrasonido hasta obtener un aspecto homogéneo. Luego, a cada solución se le incorporó el iniciador (APS, 0,01 g) y el activador (TEMED, 0,1 mL) dejándola reaccionar durante 24 h, a temperatura ambiente. La Tabla 4.1 resume las condiciones experimentales usadas para obtener los productos. Allí, se detalla la nomenclatura de cada producto, según las proporciones (en %) de cada monómero y su nombre abreviado. Una vez obtenidos los hidrogeles, los tubos de vidrio se rompieron para extraer el producto obtenido, en forma de barras poliméricas. Estas, fueron posteriormente cortadas con un bisturí, en *discos* de aproximadamente 3 mm de espesor y 14 mm de diámetro. Posteriormente, fueron lavados exhaustivamente con agua a temperatura ambiente, durante 24 h. Por último, se secaron a 45 °C, hasta peso constante. El producto NAT 100% (T0), contiene sólo NAT ($3,00 \text{ mol} \times 10^{-3}$) y BIS ($1,69 \text{ mol} \times 10^{-3}$) en su estructura. Fue estudiado y comparado posteriormente con los productos TOB y TOC obtenidos usando mayores proporciones de BIS ($3,38$ y $5,07 \text{ mol} \times 10^{-3}$, respectivamente) y similares condiciones de reacción de tiempo, temperatura y volumen de agua, usadas para NAT 100% (T0).

Tabla 4.1. Condiciones experimentales de síntesis para los productos

Nomenclatura del Hidrogel	Nombre abreviado	NAT ($\text{mol} \times 10^{-3}$)	AEMA ($\text{mol} \times 10^{-3}$)	BIS ($\text{mol} \times 10^{-4}$)	H ₂ O (mL)
NAT 100%	T0	3,00	-	1,69	4
NAT 96%-co-AEMA 4%	T1	2,78	0,22	1,69	4
NAT 86%-co-AEMA 14%	T2	2,60	0,40	1,69	4
NAT 80%-co-AEMA 20%	T3	2,40	0,60	1,69	4
NAT 70%-co-AEMA 30%	T4	2,06	0,94	1,69	4
NAT 55%-co-AEMA 45%	T5	1,75	1,25	1,69	4

NAT:N-[tris(hidroximetil)metil]-acrilamida; AEMA:2-aminoetil metacrilato; BIS:N, N'-metilen bisacrilamida

4.2.3. DETERMINACIÓN DE LOS PARAMETROS DE RED

El *índice de hinchamiento en estado de equilibrio*, q_w , fue determinado de acuerdo a la ecuación 2.1 (Capítulo 2). Para determinar $m_{h,e}$, las muestras secas (m_s) fueron colocadas en agua destilada y se mantuvieron a $25\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su máximo hinchamiento. Para ello, las muestras hinchadas se fueron retirando del baño de agua en intervalos regulares de tiempo, se secaron superficialmente con papel *tissue*, para obtener sus masas en una balanza electrónica. Posteriormente las muestras se colocaron nuevamente en el baño, y así sucesivamente hasta que se logró peso constante.

El *índice de hinchamiento en estado relajado*, q_r (después de la preparación) se determinó de acuerdo a la ecuación 2.2 (Capítulo 2).

La *fracción de volumen de la red de polímero en el estado relajado* (inmediatamente después de la síntesis del polímero, pero antes del hinchamiento), V_{2r} se obtuvo de la ecuación 2.5 (Capítulo 2), donde ρ_1 es la densidad del polímero, y ρ_2 es la densidad del agua ($1,0\text{ g/mL}$). La determinación de la densidad de los hidrogeles se realizó midiendo el peso en heptano usando el principio de Arquímedes (58-59).

Dicho parámetro fue también calculado en forma teórica, a partir de la ecuación 2.6 (Capítulo 2). V_r es el volumen promedio molar de las unidades repetidas del polímero, que se calcula según la ecuación 2.7 (Capítulo 2). En este caso, M_1 es la masa molecular de AEMA, f_1 es la fracción molar de AEMA, M_2 es la masa molecular de NAT y f_2 es la fracción molar de NAT en el sistema.

La *fracción de volumen de la red de polímero en el hidrogel hinchado en el equilibrio* (V_{2s}) se calculó según la ecuación 2.8 (Capítulo 2).

El *peso molecular de la cadena de polímero entre puntos de entrecruzamiento*, M_c , se calculó de acuerdo a la ecuación 2.10 (Capítulo 2), basada en el modelo de red de Phantom (60). En este caso, ϕ es 4, V_1 es el volumen molar del agua (18 mL / mol) y χ (parámetro de interacción de disolvente de polímero), se calcula utilizando la ecuación 2.11 (Capítulo 2) (61).

Además, el *tamaño de poro de la red* ξ se calculó usando la ecuación 2.12 (Capítulo 2), en la que C_n es la relación característica de Flory del polímero lineal

(7,6 para AEMA) y l es el largo de la cadena del polímero (1,54 Å para polímeros vinílicos) (62). Este parámetro fue determinado a 25 °C.

4.2.4. ESTUDIOS REOLOGICOS

Las medidas reológicas se realizaron en un reómetro rotacional Physica MCR 301, Anton Paar TA Instrument Inc. Para realizar los estudios, los hidrogeles se hincharon en agua Milli-Q durante 24 h, hasta el equilibrio, a 20 °C. Los módulos elástico, G' y viscoso, G'' de las muestras se midieron en el reómetro rotacional, usando placas en paralelo de 8 mm de diámetro con una separación de 2 mm, aproximadamente. Los barridos de amplitud fueron realizados a una frecuencia de 10 s^{-1} , a 20 °C, para determinar los valores de G' y la RVL. Posteriormente, los barridos de frecuencia fueron realizados a una deformación constante, correspondiente a la RVL de cada muestra, a temperatura constante. Las muestras fueron estudiadas en un amplio rango de frecuencias (0,1 a 100 s^{-1}) para determinar el comportamiento viscoelástico de los hidrogeles. Cabe destacar que no se encontró evidencia de deshidratación durante las pruebas.

4.2.5. MODIFICACION DE LOS HIDROGELES

4.2.5.1. Incorporación de grupos epóxido

Después de la purificación de los hidrogeles, la cantidad de grupos amino se determinó colorimétricamente utilizando el reactivo de Ellman (63). A continuación, los hidrogeles (100 mg) se modificaron con ECH en una relación (en equivalentes) de 16:1, de grupos epóxido por grupo amina, respectivamente, en 4 mL de NaOH 0,6 M, durante 24 h, a temperatura ambiente. Por otro lado, se usó BDGE, en una relación (en equivalentes) de 16:1, de grupos epóxido por grupo amina, respectivamente. La reacción se llevó a cabo en 4 mL de NaOH 0,6 M, durante 8 h a temperatura ambiente. El objetivo de ambas reacciones fue asegurar la presencia de grupos epóxido para la subsiguiente inmovilización de la enzima

(38). El hidrogel T0, también fue modificado con ambos reactivos, mientras que TOB y TOC solo fueron modificados con BDGE. En este caso, los hidrogeles se hicieron reaccionar con la misma proporción de ECH o de BDGE que se utilizó para T1. La cantidad de equivalentes de grupo epóxido se determinó usando el método de HCl/piridina (64). En este medio, el HCl produce la apertura del anillo. Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado. Para ello, 100 mg de polímero seco se pusieron en contacto con 3 mL de una solución de HCl 0,06 M, en piridina, con agitación, a reflujo, por 1,5 h. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se dejó enfriar la mezcla y se agregaron 2 mL de metanol a través del refrigerante para arrastrar posibles restos de HCl. Para cada una de las muestras, el exceso de HCl fue cuantificado titulando la mezcla de reacción con una solución de NaOH 0,06 M, en presencia del indicador fenolftaleína. La cantidad total de HCl agregada se determinó mediante la titulación de un blanco de 1 mL de la solución de HCl/piridina. De esta manera, empleando el volumen consumido de NaOH, se calculó el número de moles de HCl en exceso y así, el número de moles de grupo epóxido en cada muestra (ecuación 4.1).

$$\text{Moles}_{\text{epóxido}} = \text{moles}_{\text{HCl total}} - \text{moles}_{\text{HCl exceso}} \quad (4.1)$$

4.2.5.2. Reacciones de injerto

Las reacciones de injerto se llevaron a cabo sobre la matriz T3, utilizando AEMA como monómero de injerto. Las reacciones se realizaron bajo atmósfera de N₂, en un balón de 3 bocas de 250 mL, equipado con un refrigerante de reflujo y agitador mecánico. La matriz seca, previamente pesada (200 mg) fue colocada en un balón con 40 mL de agua por g de matriz, durante 24 h, hasta lograr su hinchamiento máximo. Luego, el balón se colocó en un baño, a temperatura constante de 30 °C, se purgó el contenido con N₂ durante 1 h manteniendo el sistema cerrado y se agregó 5 mL una solución de 0,05 M de sulfato de amonio cérico, Ce (IV), en HNO₃ 0,4 M, utilizando una jeringa. Posteriormente, el sistema

se purgó con N₂ nuevamente bajo agitación. El monómero se adicionó con una jeringa, 30 min después de agregar el iniciador. El hidrogel fue modificado con tres concentraciones finales diferentes del monómero AEMA [0,03; 0,06 y 0,18 M]. Se dejó reaccionar durante 2,5 h y la posterior purificación se realizó lavando exhaustivamente los productos con agua Milli-Q, manteniendo la agitación. El porcentaje de injerto (% G) se determinó gravimétricamente utilizando la ecuación 4.2, donde m_{msu} corresponde a la masa del sustrato modificado y m_{su} corresponde a la masa del sustrato antes de la reacción de modificación.

$$\% G = [(m_{msu} - m_{su}) / m_{su}] \times 100 \quad (4.2)$$

Los hidrogeles injertados se caracterizaron por FT-IR. Cada muestra (3 mg) se mezcló con KBr seco para posteriormente hacer las pastillas y realizar el estudio en un equipo Nicolet 5-SXC FT-IR. Luego de la reacciones de injerto sobre T3, se realizó la posterior modificación con ECH utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente en 4.2.5.1. Sus equivalentes de epóxido se determinaron también usando el método de HCl/piridina (64).

4.2.6. INMOVILIZACIÓN Y CUANTIFICACION DE LA ENZIMA LIPASA CANDIDA RUGOSA

La inmovilización de la enzima se llevó a cabo colocando cada una de las matrices (1 g aproximadamente) en contacto con 3,9 mg de lipasa a partir de una solución de 1 mg/mL de lipasa en *buffer* fosfato 0,05 M (pH 7,25) durante 24 h. La cuantificación de lipasa unida a los hidrogeles, se determinó por diferencia de la proteína no unida (en el sobrenadante) con respecto a la proteína total, correspondiente a la concentración inicial. Luego de la reacción de inmovilización de la enzima, los hidrogeles se lavaron exhaustivamente con agua Milli-Q. Las concentraciones de la enzima fueron determinadas usando el reactivo de Bradford.

La determinación de proteínas por este método consiste en la cuantificación de la unión de un colorante, el Azul de Coomassie G-250, a la proteína, comparando esta unión con la de diferentes cantidades de una proteína estándar (albúmina de suero bovino). La cuantificación se hace midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro, a 595 nm, y graficando la absorbancia vs la concentración de proteínas, obteniendo una curva de calibración de la proteína estándar. Con esta curva de calibración, se puede interpolar la concentración de proteínas en una muestra al medir su absorbancia a 595 nm.

4.2.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad enzimática se determinó a partir de la hidrólisis del sustrato palmitato de p-nitrofenilo (p-NPP). Para dicho ensayo, 0,2 g de p-NPP se disolvieron en 100 mL de etanol a temperatura ambiente. Luego, 0,1 mL de lipasa libre (0,1 mg/mL) o 300 mg del hidrogel con la enzima inmovilizada, fueron incubados 1 h en 4 mL de *buffer* fosfato 0,05 M (pH 8,00) a 37 °C, seguido por la adición de 4 mL del sustrato (disuelto en etanol). Después de 5 min, la reacción se terminó mediante la adición de 2 mL de solución acuosa de Na₂CO₃ (0,25 M) seguido por centrifugación, durante 20 min. El aumento en la absorbancia a 410 nm, provocada por la liberación de p-nitrofenol en la hidrólisis de p-NPP, se midió espectrofotométricamente a partir del sobrenadante extraído de los medios de reacción. La cuantificación se realizó utilizando una curva de calibración de acuerdo a la ley de Lamber-Beer.

4.2.8. ALMACENAMIENTO Y REUSABILIDAD

La actividad remanente de la enzima libre e inmovilizada, fue medida utilizando las condiciones experimentales descritas anteriormente. La actividad

remanente se ensayó después del almacenamiento de los productos T0-BDGE-Lip; T5-BDGE-Lip; T3-g-AEMA1-ECH-Lip; T3-g-AEMA2-ECH-Lip y T3-g-AEMA3-ECH-Lip durante tres semanas en *buffer* fosfato (0,05 M, pH 8,0) a 4 °C.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 4.4 muestra las fórmulas de los materiales de partida (monómeros y entrecruzante) utilizados para la preparación de los hidrogeles.

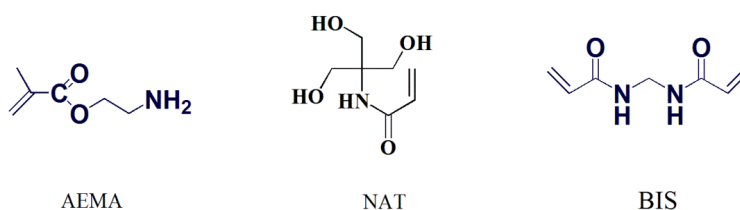


Figura 4.4 Estructura química de los monómeros y el agente entrecruzante de partida para la preparación de los hidrogeles

4.3.1. PARÁMETROS DE RED

La estructura de la red polimérica se caracterizó en función de sus principales parámetros: índice de hinchamiento en estado de equilibrio (q_w); densidad (ρ); fracción de volumen de la red de polímero en el estado hinchado (V_{2s}); fracción de volumen de la red de polímero en el estado relajado (V_{2r}); parámetro de interacción de polímero-disolvente (χ); peso molecular efectivo de la cadena de polímero entre los puntos de entrecruzamiento (M_c) y el tamaño de poro de red (ξ) (40, 65). Dichos parámetros se resumen en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Resumen de los principales parámetros de red de los productos T1-T5

Hidrogel	q_w	ρ (g/mL)	ν_{2s}	ν_{2r}^a	ν_{2r}^b	χ	M_c (g x 10^4 /mol)	ξ (nm)
T1	10±1	1,55	0,092	0,093	0,085	0,5305	6,39	20
T2	12±1	1,55	0,084	0,090	0,084	0,5281	8,52	40
T3	15±1	1,55	0,057	0,088	0,084	0,5191	36,3	90
T4	19±1	1,55	0,034	0,086	0,084	0,5113	103	160
T5	22±1	1,55	0,025	0,082	0,083	0,5083	793	560

a- ν_{2r} : valor experimental; b- ν_{2r} :valor teórico

Como se puede observar en la Tabla 4.2, a medida que aumenta la proporción de NAT en los hidrogeles (siendo T1 el que tiene mayor cantidad de NAT; Tabla 4.1), q_w disminuye. Esto es debido posiblemente a que la presencia de los tres grupos hidroxilo presentes en el monómero NAT podría causar uniones físicas intra-moleculares a través de la formación de enlaces puente hidrógeno. Estas uniones actúan como entrecruzamientos físicos dentro de la red provocando también disminución en las interacciones de los monómeros presentes con las moléculas de agua. La incorporación de AEMA como co-monómero en las redes, estaría evitando o disminuyendo la posibilidad de las interacciones intra-moleculares entre los grupos hidroxilo del monómero NAT. Posiblemente, se interpone en la estructura de la red, permitiendo la obtención de redes más expandibles, en concordancia con los resultados obtenidos por otros autores (66). Por lo tanto, el aumento de la proporción del monómero AEMA, dentro de la red polimérica, genera disminución en los valores ν_{2s} e incremento en los valores de los parámetros q_w , M_c y ξ .

4.3.2. CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA

La Figura 4.5 muestra el barrido de amplitud para cada muestra. Se determinó el rango de deformación, donde la misma es impuesta a la estructura de

los hidrogeles en los experimentos reológicos de manera completamente reversible. Después de medir el RVL, se seleccionó un rango de valor apropiado de amplitud, de aproximadamente 1%. Este, se mantuvo constante cuando se realizó el barrido de frecuencia (Figura 4.6). En el barrido de frecuencia, la variación de G' y G'' de las matrices se determinó en función de la frecuencia, a temperatura ambiente. El módulo de almacenamiento G' aumentó ligeramente, siendo mayor que G'' para todas las muestras en el rango de frecuencia ensayado. Esto indica que el comportamiento elástico del material es más fuerte que la respuesta viscosa, mostrando un comportamiento predominantemente sólido.

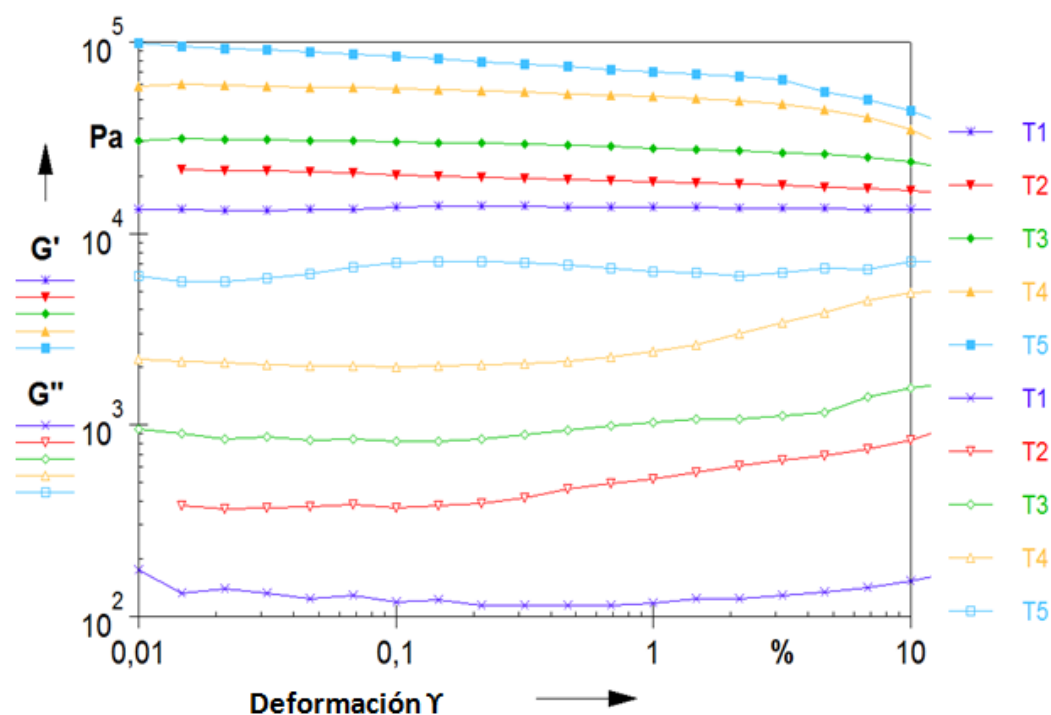


Figura 4.5 Barrido de amplitud para cada muestra (T1-T5)

En general, cuando se comparan hidrogeles, con la misma composición y diferente grado de entrecruzamiento, aquellos de mayor grado de entrecruzamiento y menor hinchamiento son los que suelen presentar mejores propiedades mecánicas. En este caso, la situación es diferente, porque los productos se prepararon con la misma proporción de agente entrecruzante (Tabla 4.1), pero con diferente

composición de monómeros (NAT y AEMA). Los grados de hinchamiento resultaron influenciados, en gran medida, según la composición, ya que T1 y T5, contienen la menor y la mayor proporción de AEMA, respectivamente. En este caso particular, se observó que G' incrementó con el aumento de la proporción de AEMA en los productos, indicando un aumento en la rigidez de los materiales.

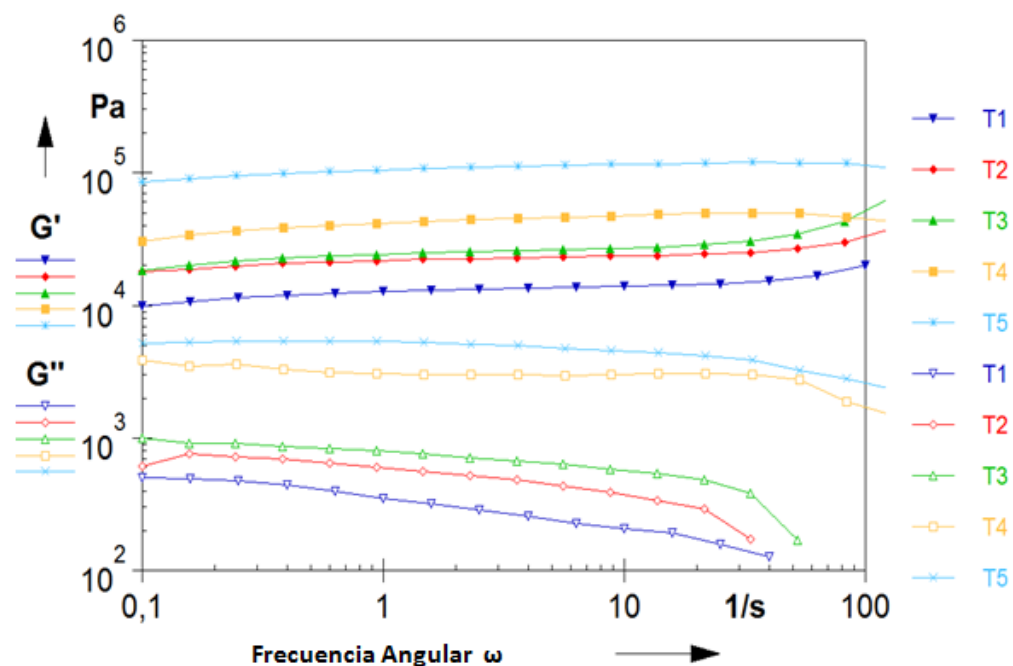


Figura 4.6 Barrido de frecuencia para cada muestra (T1-T5)

4.3.3. MODIFICACIÓN DE LOS HIDROGELES

4.3.3.1. Incorporación de grupos epóxido

La modificación directa de los hidrogeles se llevó a cabo con epíclorhidrina (ECH) o 1,4 butanodiol diglicidil éter (BDGE). El objetivo fue incorporar grupos epóxido en las estructuras para posteriormente inmovilizar la enzima y para evaluar la influencia de la longitud de la cadena en su inmovilización. Por lo tanto, se

modificaron dos tipos de materiales: la matriz T0, que contiene sólo grupos hidroxilo (con ECH y BDGE para producir T0-ECH y T0-BDGE, respectivamente) y las matrices T2-T5, que contienen grupos amino e hidroxilo (con ECH y BDGE para dar (T2-T5)-ECH y (T2-T5)-BDGE, respectivamente).

Las reacciones de los grupos hidroxilo con ECH o BDGE, en medio básico se presentan en la Figura 4.7. Como ejemplo, Hermanson y colaboradores presentaron la reacción de activación de grupos hidroxilo presentes en Sepharose 4B con ECH para producir Sepharose 4B-ECH (Figura 43.7 a) (67). A su vez, bisoxiranos, como BDGE, reaccionan con polímeros hidroxílicos para producir derivados que contienen una cadena hidrofílica larga con un grupo epóxido reactivo en el extremo. Dicho agente, actúa, a su vez, como “brazo espaciador” (Figura 4.7 b). El enlace entre el bisoxirano y la matriz es un enlace éter estable, mientras que el otro extremo proporciona un grupo funcional apto para acoplamiento o unión de una molécula, llamada también “ligando”. Este terminal con grupo epóxido puede reaccionar, entonces, con ligandos que contienen grupos hidroxilo, amina o tiol (67).

Las reacciones llevadas a cabo para incorporar grupos epóxido en las matrices se llevaron a cabo a través de diferentes ensayos hasta alcanzar los mejores resultados. Sin embargo, fueron realizadas teniendo en cuenta las condiciones experimentales estudiadas en el grupo de investigación, sobre otras matrices poliméricas que condujeron a buenos resultados (68-70).

Por otro lado, los grupos epóxido reaccionan con nucleófilos (tales como compuestos que contienen grupo amina) a través de la apertura del anillo en medio básico para dar el producto final. Diferentes autores reportaron ensayos para llevar a cabo la reacción entre compuestos que contienen grupos amina con matrices que contienen grupos epóxido, en diferentes condiciones experimentales (71-73).

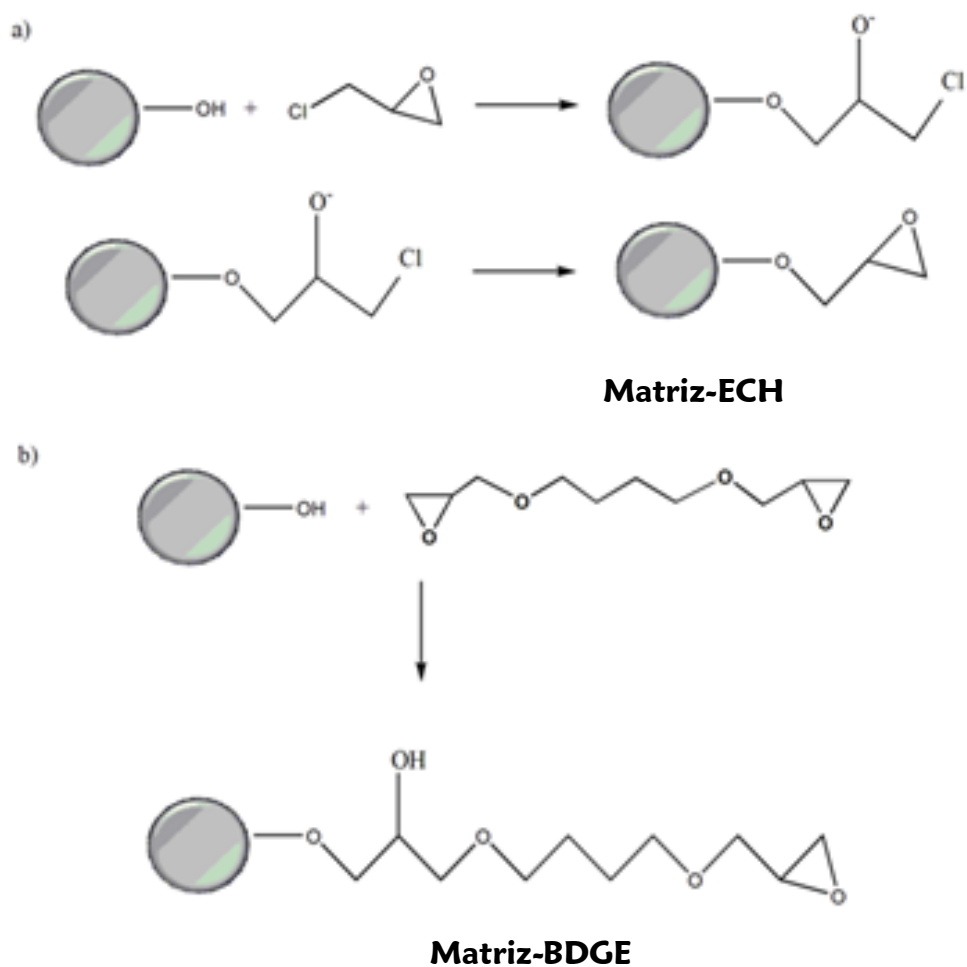


Figura 4.7. Mecanismo de incorporación de grupos epóxido en matrices con: (a) ECH y (b) BDGE

Como se ve en la Tabla 4.3, hay una proporción importante de AEMA incorporada en las estructuras (T2 - T5) ya que, aumenta la cantidad de grupos amino en cada matriz, sus índices de hinchamiento (q_w) y la cantidad de grupos epóxido producidos por modificación con ECH o BDGE (T2-ECH - T5-ECH y T2-BDGE - T5-BDGE). La matriz que contiene sólo grupos hidroxilo (T0) también se modificó con ECH y BDGE para producir T0-ECH y T0-BDGE, respectivamente.

Tabla 4.3. Cuantificación de los grupos funcionales y variación de las proporciones de hinchamiento

Producto	Grupos amino (mol x 10⁻⁴/g)	Grupos epóxido (mol x 10⁻⁴/g)	q_w
T0	-	-	8±1
T0-ECH	-	3,1	34±1
T0-BDGE	-	1,9	42±1
T2	0,71	-	12±1
T3	1,10	-	15±1
T4	1,81	-	19±1
T5	2,05	-	22±1
T2-ECH	N.D.	1,8	28±1
T3-ECH	N.D.	2,6	22±1
T4-ECH	N.D.	3,6	16±1
T5-ECH	N.D.	3,9	12±1
T2-BDGE	N.D.	1,8	27±1
T3-BDGE	N.D.	2,5	26±1
T4-BDGE	N.D.	3,5	24±1
T5-BDGE	N.D.	4,3	23±1

N.D.: no determinado

El producto T0 (cuya composición corresponde a un 100% de NAT entrecruzado con BIS) alcanzó un valor bajo de q_w probablemente debido a la interacción intra-molecular de enlace de puente hidrógeno por sus tres grupos hidroxilo, como se describió anteriormente. Cuando estos grupos reaccionaron con ECH o BDGE, se formaron grupos epóxido y la posibilidad de dichas interacciones físicas intra-moleculares fue probablemente disminuida, favoreciendo la expansión de la red. Por otro lado, la disminución de q_w en los productos T4-ECH y T5-ECH (obtenidos a partir de T4 y T5, respectivamente), podría surgir de posibles entrecruzamientos covalentes, aunque se mantuvo una alta cantidad de grupos

epóxido presentes. La modificación con BDGE provocó aumento en q_w en la mayoría de los casos debido a que, como se describió anteriormente, es menos probable que ocurran las interacciones físicas intra-moleculares y porque, además, el aumento de la longitud de la cadena en todos los casos podría inhibir la formación de enlaces entrecruzados.

4.3.3.2 Reacciones de injerto

Como ya se comentó anteriormente, sistemas redox usando reactivos tales como nitrato de amonio cérico y persulfato de potasio, suelen ser utilizados para llevar a cabo reacciones de “*grafting from*” para producir los sitios radicales libres en variados tipos de polímero (74). El uso de iones cérico para iniciar reacciones de co-polymerización por injerto de monómeros vinílicos sobre polímeros sintéticos y naturales, ha sido reportado en varias referencias bibliográficas (75-77). La reacción de injerto procede a través del mecanismo redox, en el cual, los iones $Ce(IV)$ se reducen a iones $Ce(III)$ (Figura 4.8), por transferencia de electrones desde los grupos hidroxilo de la molécula, generando los sitios radicales libres en la superficie en la que el monómero agregado atacará para formar co-polímeros de injerto, llamados también “tentáculos” (78-80).

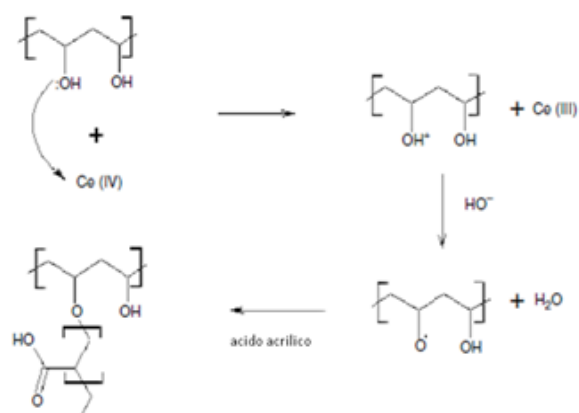


Figura 4.8 Mecanismo de reacción de injerto de un monómero (ácido acrílico) sobre un polímero con grupos hidroxilo, usando $Ce(IV)$

El método de iniciación redox usando Ce (IV) para las reacciones de injerto fueron llevadas a cabo sobre el producto T3, variando la concentración de AEMA (0,03-0,18 M). El producto T3 fue seleccionado porque presentó valores intermedios de: índice de hinchamiento en estado de equilibrio, peso molecular entre puntos de entrecruzamiento, tamaño de poro de la red, cantidad de grupos amina y buenas propiedades mecánicas.

Los resultados de esta modificación se resumen en la Tabla 4.4. La ganancia en el peso de los productos finales T3-g-AEMA 1-3 da una fuerte evidencia de la incorporación de AEMA por injerto sobre el producto T3. Como se observa en la Tabla 4.4, el aumento en la concentración de monómero añadido en el medio de reacción, elevó el porcentaje de injerto producido (% G).

Los índices de hinchamiento en estado de equilibrio, q_w se determinaron nuevamente (después de las reacciones de injerto en T3) y no se observaron cambios significativos respecto a la matriz inicial, por lo que probablemente las reacciones de injerto no estarían cambiando las propiedades dentro de la matriz.

Tabla 4.4. Porcentaje de injerto logrado sobre producto T3

Producto	Concentración de AEMA (M)	G (%)
T3-g-AEMA 1	0,03	7,2
T3-g-AEMA 2	0,06	17,5
T3-g-AEMA 3	0,18	92,4

AEMA: 2-aminoetil metacrilato; G (%): porcentaje de *grafting*

Las matrices injertadas se analizaron mediante FT-IR (Figura 4.9). Los espectros muestran aumento relativo de las bandas a 1735 cm^{-1} correspondiente a la vibración de estiramiento del grupo carbonilo (C=O, del grupo éster de AEMA) y en 1385 cm^{-1} correspondiente a la vibración de deformación de CH (de C-CH₃ del grupo metilo de AEMA) con respecto a la banda de estiramiento de carbonilo (C = O, del grupo amida) a 1650 cm^{-1} , a medida que aumenta el porcentaje de injerto.

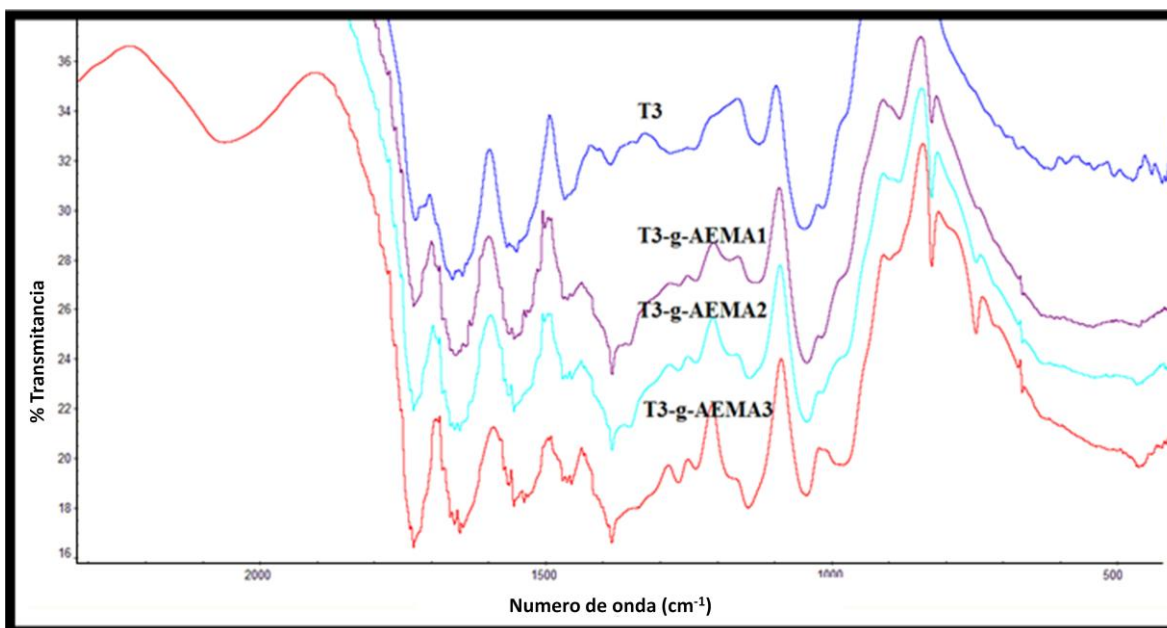


Figura 4.9 Espectros IR de los hidrogeles T3 y T3 modificados por injerto

4.3.4. CUANTIFICACIÓN DE LA ENZIMA UNIDA Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad de la enzima inmovilizada sobre las matrices se determinó a partir de la hidrólisis de palmitato de p-nitrofenilo (Figura 4.10).

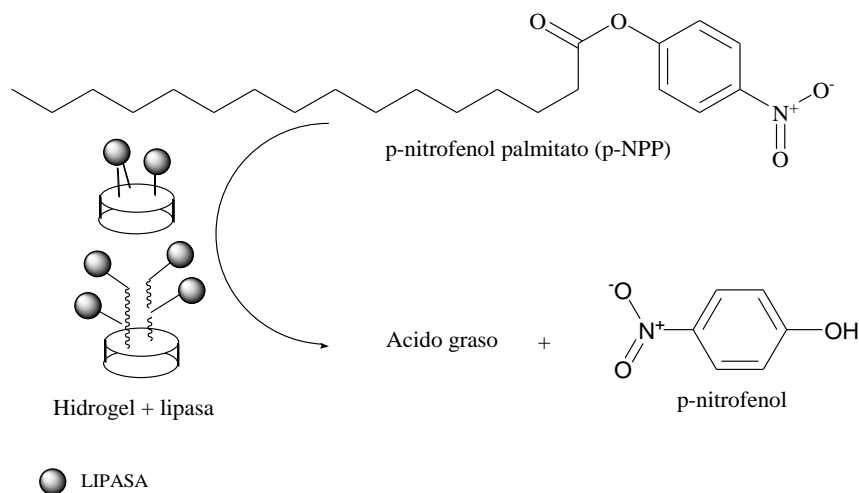


Figura 4.10. Esquema de la determinación de la actividad de lipasa mediante la hidrólisis de palmitato de p-nitrofenilo

La Tabla 4.5 resume la cantidad de enzima inmovilizada sobre los hidrogeles previamente modificados con grupos epóxido.

Tabla 4.5. Cantidad de enzima inmovilizada sobre los productos y actividad enzimática

Producto	Lipasa ^a (mg)	Lipasa inmovilizada (mg/g hidrogel)	Actividad de la lipasa inmovilizada (Ux10 ⁻² /g hidrogel)	Actividad ^b (%)
T0-ECH-Lip	3,9	1,30	42,5	40,8
T2-ECH-Lip	3,9	1,54	14,0	11,4
T3-ECH-Lip	3,9	1,93	16,0	8,3
T4-ECH-Lip	3,9	1,80	12,0	8,3
T5-ECH-Lip	3,9	1,67	16,0	12,0
T0-BDGE-Lip	3,9	0,74	53,0	89,5
T2-BDGE-Lip	3,9	1,28	47,0	45,9
T3-BDGE-Lip	3,9	1,71	63,0	46,0
T4-BDGE-Lip	3,9	1,30	80,0	57,5
T5-BDGE-Lip	3,9	1,33	94,0	88,3
T3-g-AEMA 1-ECH-Lip	3,9	1,59	16,0	12,6
T3-g-AEMA 2-ECH-Lip	3,9	1,20	27,5	28,6
T3-g-AEMA 3-ECH-Lip	3,9	0,75	52,0	86,7

a) Cantidad de lipasa *Candida rugosa* en contacto con 1 g de polímero.

b) Porcentaje de actividad de 1 mg de enzima inmovilizada con respecto a 1 mg de enzima libre, tomando en cuenta que 1 mL de lipasa libre (0,4 mg de enzima), tiene una actividad de 32 U x 10⁻².

Los resultados mostraron aumento de la actividad en aquellos sistemas en los que la enzima está inmovilizada a través de BDGE, en comparación con lo realizado a través de ECH, posiblemente debido a la longitud de cadena. La enzima acoplada a los hidrogeles modificados con BDGE, cuyo brazo espaciador aleja a la enzima de

la matriz polimérica tendría mayor libertad de movimiento, lo que permitiría una mayor probabilidad de interacción con el sustrato. Las matrices injertadas y modificadas con ECH son: T3-g-AEMA1 -ECH-Lip; T3-g-AEMA 2-ECH-Lip y T3-g-AEMA 3-ECH-Lip. En este caso, se observó que la actividad de la enzima aumenta de acuerdo al incremento en el porcentaje de injerto de las matrices, aunque presentaron menores valores en la cantidad de enzima inmovilizada. En las reacciones de injerto, el monómero se incorpora habitualmente en los sitios activos, generados por el iniciador. El polímero injertado se forma sobre la superficie, lo que conduciría a la separación de la enzima de la matriz, permitiendo mejor interacción con el sustrato. Por otra parte, en la Tabla 4.5 se muestran los porcentajes de actividad para cada matriz con respecto a la actividad de la enzima libre. Los mejores resultados logrados fueron con los productos T0-BDGE-Lip, T5-BDGE-Lip y T3-g-AEMA 3-ECH-Lip, que conservan 89,5; 88,3 y 86,7% de la actividad correspondiente a la enzima soluble y libre, respectivamente. Las Figuras 4.11 (a-c) muestran a modo comparativo estas tendencias, en los gráficos correspondientes a la actividad de la enzima inmovilizada usando los hidrogeles modificados con BDGE, ECH, e injertados con AEMA, respectivamente.

Es importante señalar que, en todos los casos, los grupos epóxido se incorporaron con la finalidad de realizar posteriormente el acoplamiento covalente con la proteína. Sin embargo, se presume que esta inmovilización es promovida a través de la adsorción física de la proteína con otros grupos funcionales y permanece en las matrices (como amino o hidroxilo) antes de la unión. Otros autores informaron el uso de soportes poliméricos multifuncionales que tienen, además, grupos epóxido (81).

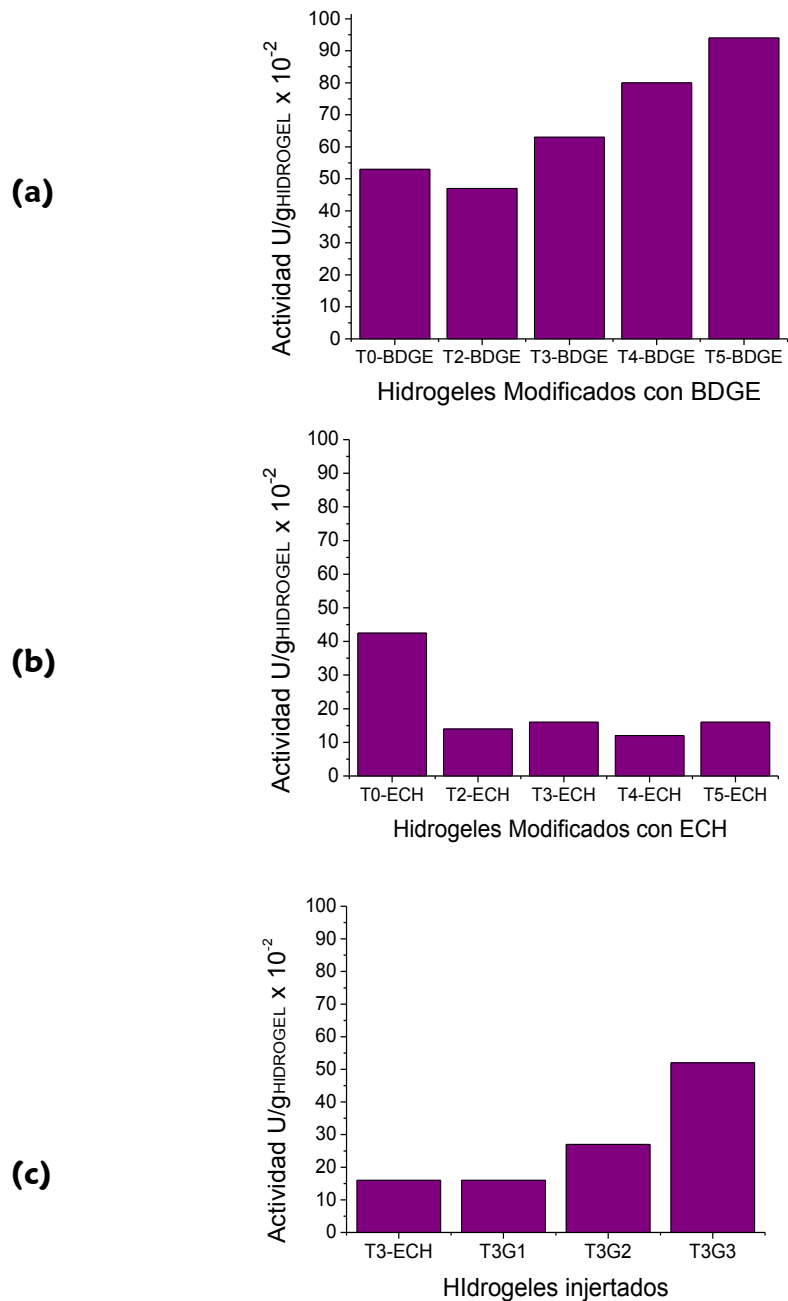


Figura 4.11. Actividad de la lipasa inmovilizada, usando los hidrogeles modificados con: BDGE (a); ECH (b), y sobre hidrogeles injertados con AEMA (c)

4.3.5. ESTABILIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO Y REUTILIZACIÓN

De lo descripto hasta aquí, es importante remarcar los altos porcentajes de actividad enzimática alcanzados por los hidrogeles modificados con BDGE y por los injertados, sobre los que se inmovilizó la lipasa. Ahora bien, uno de los parámetros más importantes a tener en cuenta, cuando una enzima se inmoviliza sobre un soporte, es su estabilidad durante el almacenamiento y su posterior reutilización. La estabilidad de la lipasa (libre) y de los productos con la enzima inmovilizada, se midió después del almacenamiento para T0-BDGE-Lip; T5-BDGE-Lip; T3-g-AEMA1-ECH-Lip; T3-g-AEMA2-ECH-Lip y T3-g-AEMA3-ECH-Lip en *buffer* fosfato a 4 °C durante tres semanas.

Los resultados indicaron que T0-BDGE-Lip; T5-BDGE-Lip; T3-g-AEMA1-ECH-Lip; T3-g-AEMA2-ECH-Lip y T3-g-AEMA3-ECH-Lip conservaron la actividad (respecto a la actividad de la lipasa inmovilizada por g de hidrogel) con valores de 70; 60; 98; 97 y 88%, respectivamente. La enzima libre conservó solamente el 40% de su actividad inicial. Con estos resultados, se puede concluir que la inmovilización covalente mantiene definitivamente a la enzima en una posición estable, en comparación con la enzima libre.

4.3.6. REUTILIZACIÓN

Con los resultados obtenidos, se pudo demostrar que la enzima conserva hasta 89,5 % de actividad con respecto a la enzima libre, como en el caso específico de T0-BDGE-Lip. Si bien la actividad de la enzima fue conservada en altos porcentajes, los productos no fueron lo suficientemente estables mecánicamente para la reutilización en varios ciclos. Por lo tanto, se intentó mejorar las propiedades mecánicas de la matriz T0, que había presentado muy buenos resultados (incluyendo los de inmovilización de la enzima y el ensayo de actividad). Para ello, se aumentó la cantidad de agente entrecruzante, obteniéndose los productos TOB y TOC, que fueron analizados por reología (Figuras 4.14 y 4.15). Se

comprobó que, a medida que se incrementó la cantidad del agente entrecruzante, aumentó consecuentemente la componente sólida del hidrogel ya que los valores de G' resultaron mayores. Estos productos, fueron modificados con BDGE, para inmovilizar la lipasa. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.6.

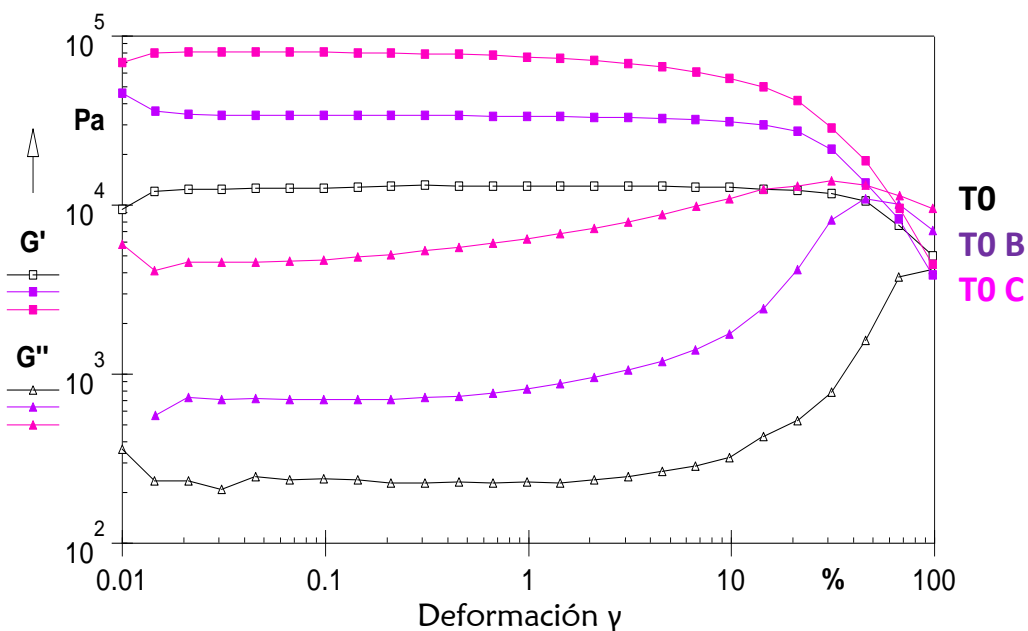


Figura 4.14. Barrido de amplitud para productos T0, T0B y T0C

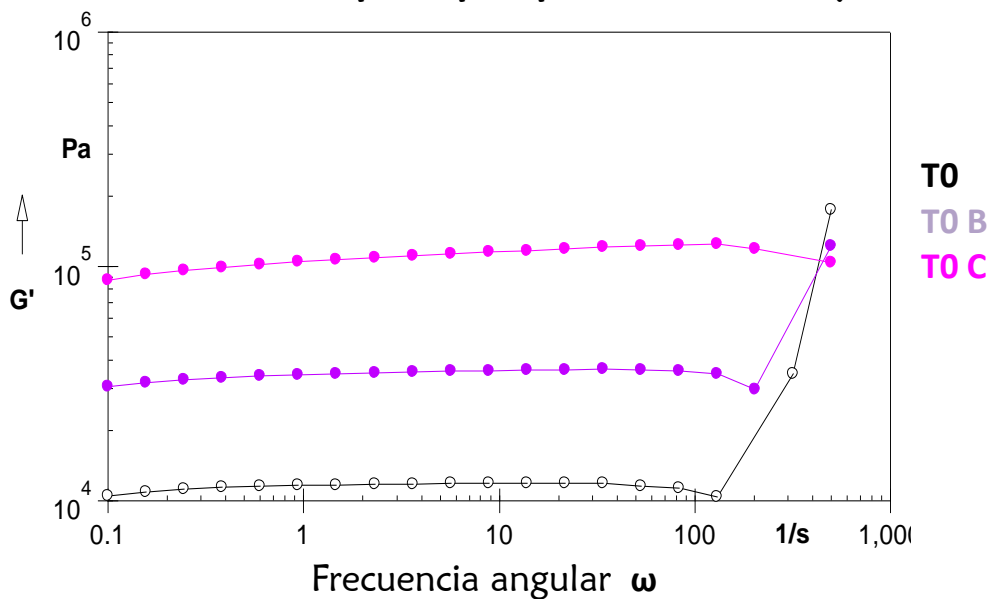


Figura 4.15 Barrido de frecuencia para productos T0, T0B y T0C

Tabla 4.6. Resultados de modificación e inmovilización de la lipasa sobre T0, TOB y TOC.

Hidrogel	qw	Epóxidos (mol x 10 ⁻⁴ /g)	qw de Hidrogel-BDGE	Lip ^a (mg)	Proteína inmovilizada (mg/g hidrogel)	Actividad de lipasa inmovilizada (Ux10 ⁻² /g hidrogel)	Actividad (%) ^b
T0	7,9±0,5	1,9	22±1	3,9	0,74	53	89,5
TOB	6,1±0,5	2,8	21±1	3,9	0,76	48	78
TOC	4,3±0,5	1,0	14±1	3,9	0,54	38	88

a) Cantidad de lipasa (*Lip Candida rugosa*) en contacto con 1 g de polímero.

b) Porcentaje de actividad de 1 mg de enzima inmovilizada con respecto a 1 mg de enzima libre tomando en cuenta que 1 mL de lipasa libre (0,4 mg de enzima), tiene una actividad de 32 U x 10⁻².

Con los resultados obtenidos, se puede concluir que fue posible inmovilizar la enzima sobre los hidrogeles TOB y TOC, que poseen mejores propiedades mecánicas respecto a T0. Esto, facilitaría la posibilidad de reutilización (más de un ciclo). En la Tabla 4.6 se puede observar que, a medida que aumentó la cantidad de BIS, disminuyó el hinchamiento del hidrogel, como ocurrió para TOC. Para este último, la cantidad de proteína inmovilizada fue menor respecto a TOB y T0. Así mismo, la actividad porcentual de la enzima inmovilizada sobre TOC sigue siendo alta con respecto a la enzima libre. En el caso de las matrices más entrecruzadas y, por ende, con menor índice de hinchamiento, como es el caso de TOC, la enzima está posiblemente unida en la superficie del hidrogel, y se generaría mayor disponibilidad para interactuar con el sustrato.

4.4. CONCLUSIONES

Nuevos hidrogeles, en forma de barras, fueron preparados por copolimerización de NAT, AEMA y BIS. Todos los productos fueron homogéneos y resultaron hinchables en agua. Las modificaciones químicas realizadas sobre los

hidrogeles permitieron la inmovilización de la enzima lipasa. En los productos en los que la enzima se inmovilizó sobre las matrices que contienen BDGE y sobre las que resultaron de las reacciones de injerto de AEMA, se alcanzaron altos porcentajes de actividad. Aunque en ambos casos, la enzima se encuentra unida en menor proporción respecto a las demás, se halla mas separada de la matriz y por ende, con menor impedimento y mayor facilidad para la interacción con el sustrato. Los mejores productos mantienen entre el 86,7-89,5% de la actividad correspondiente a la enzima soluble y libre. Los ensayos de estabilidad de almacenamiento y de reutilización, permitieron concluir que varias de las matrices que contienen la lipasa inmovilizada, conservan la actividad con mayores valores en porcentaje, en comparación con la enzima libre.

REFERENCIAS

- 1- Cunha, A. G., Gandini, A., Turning polysaccharides into hydrophobic materials: a critical review. Part 2. Cellulose. *Cellulose* 17, 6, 1045 (2010).
- 2- Wong, L., Ho, C.-M., Surface molecular property modifications for poly(dimethylsiloxane) (PDMS) based microfluidic devices. *Microfluidics and Nanofluidics* 7, 3, 291 (2009).
- 3- Plunkett, K. N., Chatterjee Aveek, N., Aluru, N. R., Moore, J. S., Surface-Modified Hydrogels for Chemoselective Bioconjugation. *Macromolecules* 36, 8846 (2003).
- 4- Yoshida, R., Okano, T., Biomedical Applications of Hydrogels Handbook, 19, R. M. Ottenbrite et al. (Eds.), Springer Science, LLC (2010).
- 5- Yeh, P.-Y., Rossi, N. A. A., Kizhakkedathu, J. N., Chiao, M., A silicone-based microfluidic chip grafted with carboxyl functionalized hyperbranched polyglycerols for selective protein capture. *Microfluidics and Nanofluidics* 9, 2-3, 199 (2010).
- 6- Goddard, J. M., Hotchkiss, J. H., Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polymer Science* 32, 7, 698 (2007).
- 7- Benhadi, S., Ragoubi, M., Joly, J.-P., Molina, S., George, B., Brosse, N., Corona discharge treatment route for the grafting of modified [β]-cyclodextrin molecules onto cellulose. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 70, 1-2, 143 (2011).
- 8- Lei, J., Liao, X., Surface graft copolymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate onto low-density polyethylene film through corona discharge in air. *J. Appl. Polym. Sci.*, 81, 2881 (2001).
- 9- Dumitrascu, N., Balau, T., Tasca, N., Popa, G., Corona discharge treatment of the plastified PVC films obtained by chemical grafting. *Materials Chemistry and Physics*, 65, 3, 15, 339 (2000).

- 10-Kathryn, M., McGinty, W. J., Hydrophilic surface modification of poly(vinyl chloride) film and tubing using physisorbed free radical grafting technique. *Brittain Polymer*, 49, 20, 4350 (2008).
- 11-Gupta B, Plummer C, Bisson I, Frey P, Hilborn J., Plasma-induced graft polymerization of acrylic acid onto poly(ethylene terephthalate) films: characterization and human smooth muscle cell growth on grafted films. *Biomaterials*, 23, 3, 863 (2002).
- 12-Wei, Y., Wang, X., Gao, J., Chen, Y., Plasma-induced graft polymerization of poly(ethylene glycol) on poly(methyl methacrylate) surfaces for improving antistatic property. *J. Appl. Polym. Sci.*, 118, 943 (2010).
- 13- Gupta, B., Srivastava, A., Grover, N., Saxena, S., Plasma induced graft polymerization of acrylic acid onto poly(ethylene terephthalate) monofilament. *Indian Journal of Fibre & Textile Research* 35, 9 (2010).
- 14- Dang, A., Hui, C. M., Ferebee, R., Matyjaszewski, K., Bockstaller, M. R., Thermal properties of particle brush materials: effect of polymer graft architecture on the glass transition temperature in polymer-grafted colloidal systems. *Macromol. Symp.* 9, 331 (2013).
- 15- Qu, J.-B., Huan, G.-S., Chen, Y.-L., Zhou, W.-Q., Liu, J.-G., Huang, F., Coating gigaporous polystyrene microspheres with cross-linked poly(vinyl alcohol) hydrogel as a rapid protein chromatography matrix. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6, 15, 12752 (2014).
- 16- Hamer, M. J., Iyer, B. V. S., Yashin, V. V., Kowalewski, T., Matyjaszewski, K., Balazs, A. C., Modeling polymer grafted nanoparticle networks reinforced by high-strength chains. *Soft Matter* 10, 1374 (2014).
- 17- Ayres, N., Polymer brushes: Applications in biomaterials and nanotechnology. *Polym. Chem.* 1, 769 (2010).
- 18-Savina, I., Mattiasson, B., Galaev, I. Y., Graft polymerization of acrylic acid onto macroporous polyacrylamide gel (cryogel) initiated by potassium diperiodatocuprate. *Polymer* 46, 23, 9596 (2005).

- 19-Bai Libin, W. C., Jin Jia, L., Yinghai, I., Graft copolymerization of styrene onto poly(vinyl alcohol) initiated by potassium diperiodatocuprate(III). *Iranian Polymer Journal* 18, 11, 847 (2009).
- 20- Salwiczek, M., Qu Yue, G. J., Strugnell, R. A., Lithgow, T., Mc Lean, K. M., Thissen, H., Emerging rules for effective antimicrobial coatings. *Trends in Biotechnology* 32, 2, 82 (2014).
- 21-Savina, I. N., Galaev, I. Y., Mattiasson, B., Anion-exchange supermacroporous monolithic matrices with grafted polymer brushes of N,N-dimethylaminoethyl-methacrylate. *J Chromatogr A*, 1092, 2, 199 (2005).
- 22- Mohd Ishak, Z. A., Rezaei, S. M., Grafting of collagen onto interpenetrating polymer networks of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and poly(dimethyl siloxane) polymer films for biomedical applications *eXPRESS Polymer Letters* 8, 1, 39 (2014).
- 23- Liu, X., Guana, Y., Shen, R., Liu, H., Iyer, P. V., Ananthanarayan, L., Immobilization of lipase onto micron-size magnetic beads. *Journal of Chromatography B* 822, 91 (2005).
- 24- Bayramoglu Gulay, Y., Aric, M., Preparation of poly(GMA-MMA) magnetic beads: application in lipase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 55, 76 (2008).
- 25- Hoffmann, M., Lang, M., Sommer J.-U., Gelation threshold of cross-linked polymer brushes. *Phys. Rev. E* 83, 020803 (2011).
- 26- Lang, M., Hoffmann, M., Dockhorn, R., Werner, M., Sommer, J.-U., Excluded volume effects in polymer brushes at moderate chain stretching. *Journal of Chemical Physics* 141, 104901 (2014).
- 27- Zhu, X., Ma, Y., Zhao, C., Lin, Z., Zhang, L., Chen, R., Yang, W., A mild strategy to encapsulate enzyme into hydrogel layer grafted on polymeric substrate. *Langmuir* 30, 50, 15229 (2014).
- 28- Qu, J.-B., Huan, G.-S., Chen, Y.-L., Zhou, W.-Q., Liu, J.-G., Huang, F., Coating gigaporous polystyrene microspheres with cross-linked poly(vinyl alcohol) hydrogel

- as a rapid protein chromatography matrix. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6, 15, 12752 (2014).
- 29- Manecke, G., Storck, W., Polymeric catalysts. *Angew. Chem. Intern. Ed.* 17, 657 (1978).
- 30- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J., Fernandez-Lafuente, R., Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilisation techniques. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1451 (2007).
- 31- Miletic, N., Rohandi, R., Vukovic, Z., Nastasovic, A., Loos, K., Effect of *Candida antarctica* lipase B immobilization on the porous structure of the carrier. *React. Funct. Polym.* 69, 68 (2009).
- 32- Yakup Arica, M., Soydogan, H., Bayramoglu, G., Reversible immobilization of *Candida rugosa* lipase on fibrous polymer grafted and sulfonated p(HEMA/EGDMA) beads. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 33, 227 (2009).
- 33- Ansari, S. A., Husain, Q., Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnol Adv.* 30, 3, 512 (2012).
- 34- Hernandez, K., Fernandez-Lafuente R., Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. *Enzyme Microb Technol.* 48, 2, 107 (2011).
- 35- Barbosa, O., Torres, R., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, A., Rodrigues, R. C., Fernandez-Lafuente, R., Heterofunctional supports in enzyme immobilization: from traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. *Biomacromolecules* 14, 8, 2433 (2013).
- 36- Cao, L., Immobilised enzymes: science or art?. *Current Opinion in Chemical Biology* 9, 217 (2005).
- 37- Betancor, L., Lopez-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Dellamora-Ortiz, G., Mateo, C., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J., Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 877 (2006).

- 38- Nasratun, M., Said, H. A., Noraziah, A., Abd Alla, A. N., Immobilization of lipase from candida rugosa on chitosan beads for transesterification reaction. American Journal of Applied Sciences 6, 1653 (2009).
- 39- Betigeri, S. S., Neau, S. H., Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. Biomaterial 23, 3627 (2002).
- 40- Datta, S., Christena, L. R., Rani, Y., Rajaram, S., Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. Biotech. 3, 1 (2013).
- 41-Qian, Y. C., Chen, P. C., He, G. J., Huang, X. J., Xu, Z. K., Preparation of polyphosphazene hydrogels for enzyme immobilization. Molecules 8, 19, 7, 9850 (2014).
- 42-Wang, S. G., Jiang, X., Chen, P. C., Yu, A. G., Huang, X. J., Preparation of coaxial-electrospun poly[bis(p-methylphenoxy)]phosphazene nanofiber membrane for enzyme immobilization. Int. J. Mol. Sci. 2, 13, 11, 14136 (2012).
- 43-Fang, Y., Huang, X. J., Chen, P. C., Xu, Z. K., Polymer materials for enzyme immobilization and their application in bioreactors. BMB Rep. 44, 2, 87 (2011).
- 44- Idris, A., Bukhari, A., Immobilized Candida antarctica lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. Biotechnol Adv. 30, 3, 550 (2012).
- 45-González-Bacerio, J., Rodríguez Hernández, J., del Monte Martínez, A., Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. Rev. Colomb. Biotecnol. XII, 1, 124 (2010).
- 46- Zhang, S., Shang, W., Yang, X., Zhang, S., Zhang, X., Chen, J., Immobilization of lipase using alginate hydrogel beads and enzymatic evaluation in hydrolysis of p-nitrophenol butyrate. Bull. Korean Chem. Soc. 34, 9, 2741 (2013).
- 47- Domínguez de María, P., Sánchez-Montero, J.M., Sinisterra, J.V., Alcantara, A.R., Understanding Candida rugosa lipases: an overview. Biotechnol. Adv. 24, 180 (2006).
- 48- Milasinovic, N., Milosavljevic, N., Filipovic, J., Kneuevic-Jugovic, Z., Kalagasidis Krusic, M., Catalyzed ester synthesis using candida rugosa lipase entrapped by

poly(N-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) hydrogel. *Reactive and Functional Polymers* 70, 807 (2010).

49- Orrego, C. E., Salgado, N., Valencia, J. S., Giraldo, G. I., Giraldo, O. H., Cardona, C. A., Novel chitosan membranes as support for lipases immobilization: Characterization aspects. *Carbohydrate Polymers* 79, 9 (2010).

50- Huang, X. J., Yu, An G., Xu Z.-K., Covalent immobilization of lipase from *Candida rugosa* onto poly (acrylonitrile-co-2-hydroxyethylmethacrylate) electrospun fibrous membranes for potential bioreactor application. *Bioresource Technology* 99, 5459 (2008).

51- Milašinović, N., Milosavljević, N., Filipović, J., Knežević-Jugović, Z., Kalagasidis Krušić, M., Synthesis, characterization and application of poly(N-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) hydrogels as supports for lipase immobilization. *Reactive and Functional Polymers*, 70, 10, 807 (2010).

52- Milašinović, N., Knežević-Jugović, Z., Jakovljević, Z., Filipović, J., Kalagasidis Krušić, M., Synthesis of n-amil isobutyrate catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized into poly(N-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) hydrogels. *Chemical Engineering Journal*, 181–182, 614 (2012).

53- Basri, M., Harun, A., Ahmad, M. B., Razak, C. N. A., Salleh A. B., Immobilization of lipase on poly(N-vinyl-2-pyrrolidone-co-styrene) hydrogel. *Journal of Applied Polymer Science*, 82, 6, 1404 (2001).

54- Betigeri, S., Neau, H., Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of beads. *Biomaterials*. *Biomaterials*, 23, 17, 3627 (2002).

55- Chiou, S.-H., Wu, W. T., Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials*, 25, 2, 197 (2004).

56- Mateo, C., Fernandez-Lorente, G., Torres, R., Ortiz, C., Fuentes, M., Hidalgo, A., Lopez-Gallego, F., Abian, O., Palomo, J. M., Betancor, L., Pesela, B. C. C., Guisan, J., Fernandez-Lafuente, R., Epoxy-amino groups: a new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. *Biomacromol.* 4, 772 (2003).

57- Vaidka, B. K., Ingavle, G. C., Ponrathram, S., Kulkarni, B. D., Nene, S. N., Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(allyl glycidyl ether-co-ethylene

glycol dimethacrylate) macroporous polymer particles. *Bioresour. Technol.* 99, 3623 (2008).

58- Caykara, T., Kiper, S., Demirel, G., Thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide) hydrogels: synthesis, swelling and interaction with ionic surfactants. *Eur. Polym. J.* 42, 348 (2006).

59- Peppas, N., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H., Hydrogels in pharmaceutical formulations.. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 27 (2000).

60- Caykara, T., Inam, R., Determination of average molecular weight between crosslinks and polymer–solvent interaction parameters of poly(acrylamide-g-ethylene diamine tetraacetic acid) polyelectrolyte hydrogels. *J. Appl. Polym. Sci.* 91, 2168 (2004).

61- Champ, S., Xue, W., Huglin, M. B., A novel semi-automated apparatus to concentrate aqueous polymer solutions with a thermosensitive hydrogel. *Polymer* 42 6439 (2001).

62- Du, J. Z., Sun, T. M., Weng, S. Q., Chen, X. S., Wang, J., Synthesis and characterization of photo-cross-linked hydrogels based on biodegradable polyphosphoesters and poly(ethylene glycol) copolymers. *Biomacromol.* 8, 3375 (2007).

63- Tyllianakis, E., Kakabakos, E., Evangelatos, P., Ithakissios, S., Colorimetric determination of reactive primary amino groups of macro- and microsolid supports. *App. Biochem. Biotechnol.* 38, 15 (1993).

64- Lee, M., Neville, K., Handbook of epoxy resins, New York: Mc Graw Hill (1967).

65- Çaykara, T., Akçakaya, I., Synthesis and network structure of ionic poly(N,N-dimethylacrylamide-co-acrylamide) hydrogels: comparison of experiment with theory. *Eur. Polym. J.* 42, 1437 (2006).

66- Saito, N., Sugawara, T., Matsuda, T., Synthesis and hydrophilicity of multifunctionally hydroxylated poly(acrylamides). *Macromol.* 29 313 (1996).

67- Hermanson G. T., Mallia A., Smith P. K., Immobilized affinity ligand techniques, Academic Press, London (1992).

- 68-Gomez, C., Alvarez I., C. I., Strumia, M. C., Rivas, B., Reyes P., Effects of experimental variables on the synthesis of porous matrices. *J. Appl. Polym. Sci.* 79, 920 (2001).
- 69- Gomez, C., Alvarez I., C. I., Strumia, M. C., J. Influence of the polymeric morphology of Poly(EGDMA-HEMA) on the chemical modifications and in the retention of O-phosphothreonine. *Biochem. Biophys. Methods* 55, 23 (2003).
- 70-Arrua, R. D., Alvarez I., C. I., Strumia, M. C., Serrano D., Pastrana, G., Synthesis of macroporous polymer rods based on an acrylamide derivative monomer. *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* 44, 6616 (2006).
- 71- Wei, Y., Huang, X., Liu, R., Shen, Y., Geng, X., Preparation of a monolithic column for weak cation exchange chromatography and its application in the separation of biopolymers. *J. Sep. Sci.* 29, 5 (2006).
- 72-Samarkandy, A. R., Mostafa, K. M., Synthesis and development of novel aminated chelating resin and its application in industrial waste water treatment. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3 1772 (2009).
- 73- Tennikova, T., Effect of porous structure of macroporous polymer supports on resolution in high-performance membrane chromatography of proteins. *J Chromatog. A*, 798, 55 (1998).
- 75- Zhang, J., Yuan, Y., Shen, J., Lin, S., Synthesis and characterization of chitosan grafted poly(N,N-dimethyl-N-methacryloxyethyl-N-(3-sulfopropyl) ammonium) initiated by ceric (IV) ion. *European Polymer Journal* 39, 847 (2003).
- 76- Jayakumar, R., Prabakaran, M., Reis, R. L., Mano, J. F., . Graft-copolymerized chitosan – Present status and applications. *Carbohydrate Polym.* 62, 142 (2005).
- 77- Mishara, A., Clark, J. H., Sunita, P., Modification of Okra mucilage with acrylamide: Synthesis, characterization and swelling behavior. *Carbohydrate Polym.* 72, 608 (2008).
- 78- Trivedi, J. H., Kalia, K, Patel, N. K., Trivedi, H. C., Ceric-induced grafting of acrylonitrile onto sodium salt of partially carboxymethylated guar gum. *Carbohydrate Polym.* 60, 117 (2005).

- 79- Singha, A. S., Rana R. K., Enhancement of hydrophobic character of lignocellulosic fibers through graftcopolymerization. *Adv. Mat. Lett.* 1, 156 (2010).
- 80- Kurkuri, M. D., Lee J.-R., Han, J. H., Lee, I., Electroactive behavior of poly(acrylic acid) grafted poly(vinyl alcohol) samples, their synthesis using a $Ce^{(IV)}$ glucose redox system and their characterization. *Smart Mater. Struct.* 15, 417 (2006).
- 81-Mateo, C., Fernandez-Lorente, G., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *J., Biomacromol.* 1, 739 (2000).

CAPÍTULO 5:

**Sistema de hidrogeles de
N-[3-(dimetilamino) propil]
metacrilamida con (i) diferentes
cantidades de agente entrecruzante y
(ii) co-polimerizados con
N-[3-(dimetilamino)etil] metacrilato**

5.1. CONSIDERACIONES GENERALES

5.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4. CONCLUSIONES

REFERENCIAS

CAPÍTULO 5

5.1. CONSIDERACIONES GENERALES

Existen varias interacciones posibles entre un polímero y un ion metálico, que pueden actuar en forma múltiple, dinámica y cooperativa. Los polímeros con grupos amida, amino y ácido carboxílico, interactúan con los iones metálicos a través de mecanismos de intercambio iónico o complejamiento. Esto representa un área promisoría en la purificación y tratamiento de agua contaminada con metales pesados. La capacidad de estos polímeros de interactuar con los iones metálicos, están determinadas por la variedad de características estructurales y posibles, tales como la presencia y naturaleza de agente entrecruzante, tamaño de poro, grado de entrecruzamiento y estructura adecuada para la difusión del ion hacia el sitio de intercambio o coordinación, entre otros (1). En la Figura 5.1 se muestran ejemplos de interacción de tipo electrostática y de formación de complejos.

Los monómeros conteniendo grupos amino secundario o terciario han sido usados en la preparación de productos poliméricos con distintas finalidades. Por ejemplo, N-[3-(dimetilamino) propil] metacrilamida (DMAPMD) fue co-polimerizado con AAc para formar un hidrogel en forma de membrana para el uso en celdas, como electrolito (2). La alta conductividad iónica lograda a bajo y alto pH (2,2 y 10,6, respectivamente) indica que la membrana puede ser usada como conductor de protones e hidroxilos. También, el DMAPMD fue co-polimerizado con AAm, dando hidrogeles cuya capacidad de hinchamiento depende del pH, del solvente y de la temperatura (3).

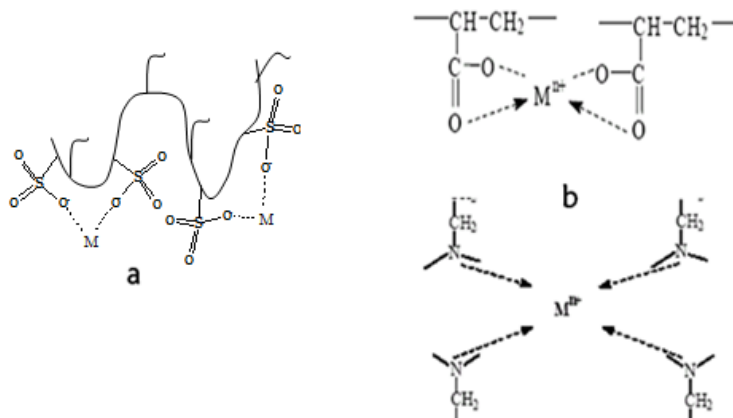


Figura 5.1 Esquema de interacción de tipo electrostática entre un ion metálico y un polímero con grupos tales como sulfonatos (a), y formación de complejos con grupos tales como carboxilato o amino (b) (1).

Por otro lado, polímeros que contiene N-[3-(dimetilamino)etil] metacrilato (DMAEMT), forman quelatos con iones metálicos. DMAEMT fue usado para modificar y funcionalizar carbón activado para su uso como adsorbente en la remoción de iones Cu²⁺ desde soluciones acuosas (4-5). Hidrogeles formados entre DMAEMT y etilenglicoldimetacrilato (EGDMA) fueron preparados mediante irradiación con rayos gamma. Los productos se utilizaron en retención de iones metálicos, tales como Pb²⁺, Cd²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ y Co²⁺. Los estudios de adsorción mostraron que tanto el pH como la concentración de las especies iónicas en el medio influyen notablemente en el comportamiento de los hidrogeles (4). Además, hidrogeles obtenidos tanto a partir de 3(dimetilamino)propil acrilato (DMAPA) o co-polimerizado con AAc, con BIS como agente entrecruzante, mostraron alta capacidad de adsorción hacia Pb²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Hg²⁺ y Cr³⁺ (6).

En esta parte del trabajo, se presenta la síntesis y caracterización de hidrogeles en base a DMAPMD con (i) diferentes cantidades de agente entrecruzante (BIS) y (ii) co-polimerizado con DMAEMT, para ser usados en la remoción de iones metálicos divalentes (Cu²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺ y Hg²⁺) desde soluciones acuosas. Como se observa en la Figura 5.2, ambos monómeros poseen el mismo

grupo amino, capaz de actuar en la retención de iones metálicos, aunque difieren en la presencia de los grupos amida y ester en sus estructuras químicas. La incorporación de DMAEMT en las estructuras poliméricas, se realizó para comparar los resultados con los productos que sólo poseen el monómero DMAPMD. Además, se analizó su influencia en las propiedades mecánicas de los productos finales.

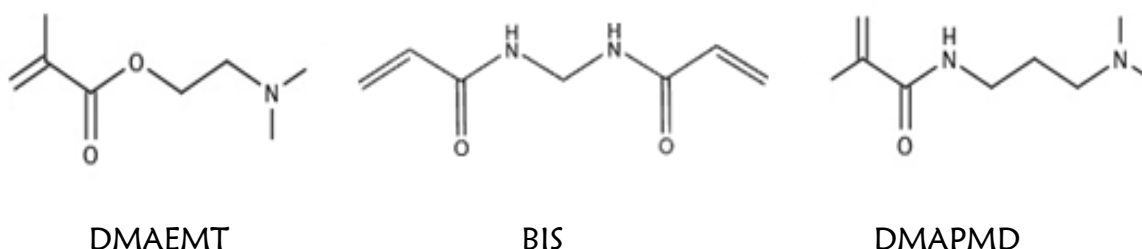


Figura 5.2. Monómeros y agente entecruzante usados en las síntesis de los hidrogeles. DMAEMT: N-[3-(dimetilamino)etil] metacrilato; BIS: N, N' metilenbisacrilamida; DMAPMD: N-[3-(dimetilamino) propil] metacrilamida

5.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.2.1. REACTIVOS

Se emplearon los siguientes reactivos: N-[3-(dimetilamino) propil] metacrilamida (DMAPMD, Aldrich); N, N' metilenbisacrilamida (BIS, Mallinckrodt); N-[3-(dimetilamino)etil] metacrilato (DMAEMT, Aldrich) persulfato de amonio (APS, Anedra); N,N,N',N' tetrametiletilendiamina (TEMED, Anedra); $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (Merck); $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Anedra).

5.2.2. SÍNTESIS DE LOS HIDROGELES

Los hidrogeles fueron sintetizados por polimerización a radicales libres a partir de DMAPMD y BIS como agente entrecruzante, en diferentes proporciones. Se utilizó APS como iniciador de la reacción y TEMED como activador. Además, la co-polimerización de DMAPMD con DMAEMT se llevó a cabo variando la relación monomérica y usando, en este caso una cantidad fija de BIS. En un procedimiento típico, los monómeros, agente entrecruzante y APS fueron disueltos en agua Milli-Q en un tubo de ensayo y agitados por 20 min en un equipo de ultrasonido, tras lo cual se burbujeó N_2 por 5 min. Por último, se adicionó la solución acuosa de TEMED y posteriormente, la mezcla se trasvasó a una jeringa, usada como reactor, donde la reacción se llevó a cabo por 24 h, a 25 °C. Las condiciones experimentales se muestran en las Tablas 5.1 y 5.2. Una vez finalizada la reacción, los hidrogeles fueron extraídos. Los productos en forma de barra fueron cortados en discos de 3-4 mm de espesor, fueron lavados repetidas veces con agua destilada y se dejaron secar por 2 días a 35 °C.

5.2.3. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE RED

Los índices de hinchamiento en el equilibrio (q_w); índices de hinchamiento en el estado relajado, luego de la preparación (q_r); la fracción de volumen de red polimérica luego de la preparación (v_{2r}); la densidad; la fracción de volumen de red polimérica en el hidrogel hinchado en el equilibrio (v_{2s}); la masa molecular entre dos puntos de entrecruzamiento (M_c), la interacción polímero-solvente (χ) y el tamaño de poro (ξ) se determinaron según lo descrito en la sección 4.2.3 del Capítulo 4 (DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE RED) (7-8).

5.2.4. CARACTERIZACIÓN POR FTIR

Los espectros infrarrojo (FT-IR) fueron obtenidos en un equipo Nicolet 5-SXC FT-IR Spectrometer utilizando pastillas de KBr.

5.2.5. CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA

La RVL de los hidrogeles hinchados en agua se determinó a frecuencia constante ($\omega=10 \text{ s}^{-1}$). El barrido de frecuencia se determinó a una deformación constante correspondiente a la RVL de cada muestra, en un rango de 0,1 a 100 s^{-1} . Las determinaciones se realizaron en platos planos de 8 mm a 20 °C. Las medidas reológicas se realizaron en un reómetro rotacional Physica MCR 301, Anton Paar TA Instrument Inc.

5.2.6. TEST DE COMPRESIÓN

Muestras cilíndricas (10 mm de diámetro y altura variable) de algunos hidrogeles seleccionados se colocaron entre las superficies planas de metal en un equipo Instron MODELO 3342, (Norwood, MA, EEUU) para realizar el test electromecánico de compresión uniaxial. Este fue realizado con control de desplazamiento de 0,1 mm/s, con una fuerza de compresión de intensidad creciente hasta la ruptura total de cada muestra. La fuerza de gel se caracterizó por la máxima deformación, la máxima tensión de deformación y el módulo de Young inicial. Este último se calculó a partir de la pendiente del gráfico de tensión vs. deformación (con valores de tensión no superiores al 6%). Todas las mediciones se realizaron por septuplicado y los valores están dados por sus promedios.

5.2.7. RETENCIÓN DE METALES

Los hidrogeles se colocaron en contacto con soluciones de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ de diferentes concentraciones iniciales (C_0), en sistema *batch*. Las soluciones se prepararon con valores de concentraciones iniciales de 30-600 ppm aproximadamente. Para ello, 50 mg de cada matriz polimérica se pusieron en contacto con 10 mL de soluciones acuosas de dichas sales, por 96 h, a

temperatura ambiente y con agitación. El pH de las soluciones iniciales fue en un rango de 4,5-5,0, a excepción del Hg^{2+} , en el que la solución se llevó a pH 2,5. Luego, se tomaron 5 mL de cada sobrenadante y la cantidad de ion metálico quelado se determinó, mediante absorción atómica, por diferencia entre la cantidad de ion metálico agregado y la cantidad de iones libres en cada solución. Los ensayos de recuperación de Pb^{2+} y de Hg^{2+} , se llevaron a cabo poniendo en contacto las muestras con 5 mL de HNO_3 2 M, durante 72 h, a temperatura ambiente. Posteriormente, los sobrenadantes se analizaron por absorción atómica usando un espectrofotómetro Perkin-Elmer 3110 y se determinó la cantidad de ion metálico recuperado.

5.2.8. ESTUDIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Con la finalidad de analizar la morfología del hidrogel, se realizaron estudios de SEM usando un equipo Sigma FE-SEM (Laboratorio de Microscopia Electrónica, LAMARX, FAMAF, UNC). Las imágenes fueron obtenidas sobre muestras de hidrogeles (con y sin Cu^{2+} adsorbido) hinchadas en agua y posteriormente liofilizadas, a una magnificación de 100, 250 y 600x.

5.2.9. ESTUDIO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE ^{13}C DE SÓLIDOS

Las muestras de hidrogeles (con y sin Cu^{2+} adsorbido) fueron estudiadas por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C de sólidos con un espectrómetro Bruker Avance II 300, en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios de Resonancia Magnética en Sólidos (LaNAIS de RMS), FAMAF, UNC.

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. SÍNTESIS DE LOS HIDROGELES

Las reacciones se llevaron a cabo variando la cantidad del agente entrecruzante en la matriz (Tabla 5.1) y la cantidad de co-monómeros (Tabla 5.2). En todos los casos, se obtuvieron productos de tipo barra.

Tabla 5.1. Condiciones de síntesis para los productos obtenidos a partir de DMAPMD

Hidrogel	DMAPMD (mol x 10 ⁻³)	BIS (mol x 10 ⁻³)	APS (mol x 10 ⁻⁵)	H ₂ O (mL)
DMAPMD 100% (I)	5,6	1,1	5,6	4
DMAPMD 100% (II)	5,6	1,4	5,6	4
DMAPMD 100% (III)	5,6	1,7	5,6	4

Tabla 5.2. Condiciones de síntesis para los productos DMAPMD-co-DMAEMT, en comparación con DMAPMD 100% (I)

Hidrogel	DMAPMD (mol x 10 ⁻³)	DMAEMT (mol x 10 ⁻³)	BIS (mol x 10 ⁻³)	APS (mol x 10 ⁻⁵)	H ₂ O (mL)
DMAPMD 100% (I)	5,6	-	1,1	5,6	4
DMAPMD-co-DMAEMT 20%	2,24	3,36	1,1	5,6	4
DMAPMD-co-DMAEMT 60%	4,48	1,12	1,1	5,6	4
DMAEMT 100%	-	5,6	1,1	5,6	4

Los parámetros de red determinados para la caracterización, se resumen en las Tablas 5.3 y 5.4. En la Tabla 5.3, se observa que a medida que disminuye la cantidad de agente entrecruzante en los productos, aumentan q_w , ξ y M_c . En la Tabla 5.4, se observa que al aumentar la proporción de DMAEMT en la red polimérica (a igual cantidad de BIS incorporado), disminuyen los valores de q_w y M_c , debido posiblemente a la diferencia de hidrofiliidad entre el grupo amida presente en DMAPMD y el grupo éster presente en DMAEMT.

Tabla 5.3. Parámetros de red para los productos obtenidos a partir de DMAPMD

Hidrogel	ρ	χ	v_{2r}	v_{2s}	$M_c \times 10^6$ (g/mol)	ξ (nm)	qw
DMAPMD 100% (I)	1,23	0,5055	0,194	0,017	14,00	1450	45,9
DMAPMD 100% (II)	1,23	0,5109	0,194	0,033	3,60	310	25,0
DMAPMD 100% (III)	1,45	0,5225	0,164	0,068	0,27	70	10,5

Tabla 5.4. Parámetros de red de los productos DMAPMD-co-DMAEMT, en comparación con DMAPMD 100% (I)

Hidrogel	ρ	χ	v_{2r}	v_{2s}	$M_c \times 10^6$ (g/mol)	ξ (nm)	qw
DMAPMD 100%(I)	1,23	0,5055	0,194	0,017	14,00	1450	45,9
DMAPMD-co-DMAEMT 20%	1,31	0,5061	0,129	0,018	2,80	1402	42,0
DMAPMD-co-DMAEMT 60%	1,31	0,5073	0,108	0,022	1,30	980	35,0
DMAEMT 100%	1,31	0,5156	0,081	0,047	0,63	450	16,0

5.3.2. CARACTERIZACIÓN POR FT-IR

En los espectros infrarrojo correspondientes a los productos obtenidos a partir de DMAPMD, aparecen las bandas de absorción a 3400, 1680 y 1550 cm^{-1} atribuidas a los estiramientos N-H, C=O y C-N del grupo amida, respectivamente. Las bandas de absorción a 1270 y 2820 cm^{-1} , se atribuyen a los estiramientos de los enlaces C-N y C-H, respectivamente, correspondientes al grupo $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ presente en el monómero DMAPMD. En la Figura 5.3 se puede observar que, cuando aumenta la cantidad de DMAEMT incorporado en las estructuras de los productos, hay un aumento relativo de la banda a 1730 cm^{-1} , correspondiente al grupo C=O del éster, respecto a la señal a 1680 cm^{-1} , correspondiente al C=O del grupo amida.

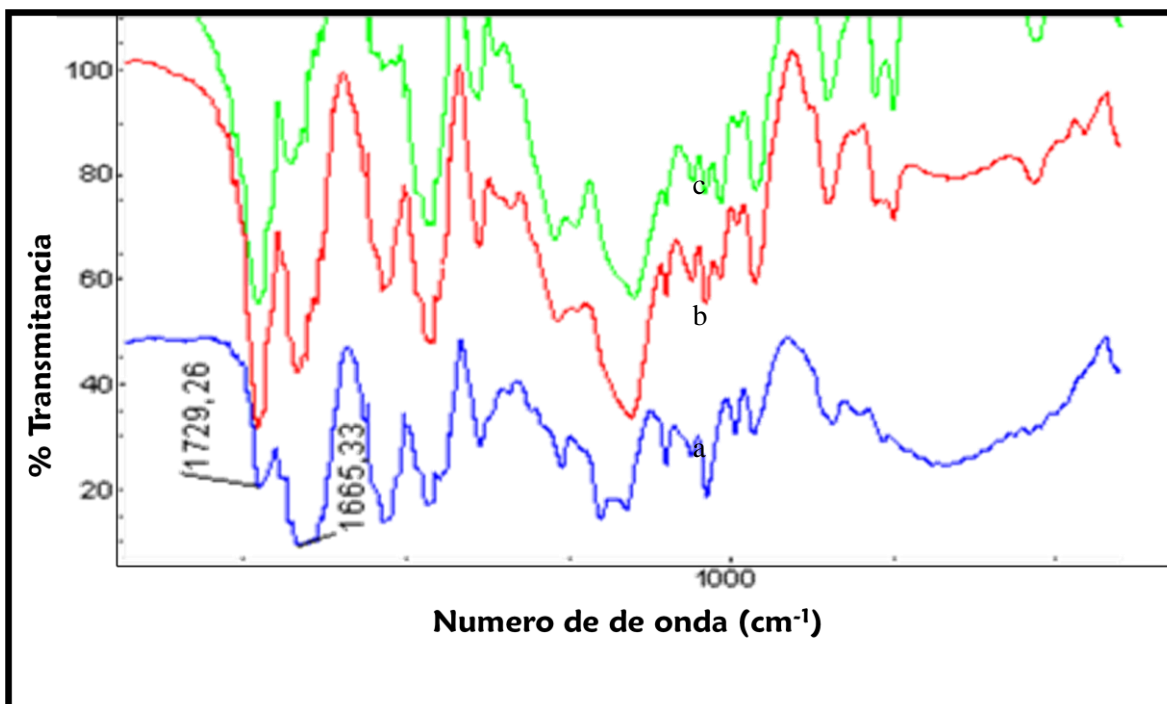


Figura 5.3. FT-IR de (a) DMAPMD-co-DMAEMT 20%; (b) DMAPMD-co-DMAEMT 60% y (c) DMAEMT 100%

5.3.3. ESTUDIOS REOLÓGICOS Y MECÁNICOS

En la Figura 5.4 se puede observar el barrido de amplitud correspondiente a los productos con diferentes cantidades de BIS, el cual se llevó a cabo en un determinado rango de deformación. Se determinó la RVL y se observó que se hace menos extensa a medida que hay menor cantidad de agente entrecruzante y, por ende, menor grado de entrecruzamiento en las estructuras. El módulo G' decae porque posiblemente la estructura se va rasgando por la deformación impuesta. Luego, se eligió un valor adecuado de amplitud (aproximado al 1%), el cual se mantuvo constante al realizar el barrido de frecuencia (Figura 5.5). Así, se determinó la variación de G' en función de la frecuencia (a 20 °C) para los productos, y se observó que incrementa al aumentar los entrecruzamientos en la red, debido posiblemente a que le otorgan a la matriz un comportamiento más rígido. Cabe destacar que, en todos los casos, el G' se va elevando, conforme a que la frecuencia va aumentando, debido a que incrementa el comportamiento sólido

de los productos. Este comportamiento resultó más notorio en el producto de menor grado de entrecruzamiento [DMAPMD 100% (I)] debido posiblemente a que las cadenas que conforman la red se re-ordenan, asumiendo un comportamiento tipo sólido cada vez más rígido.

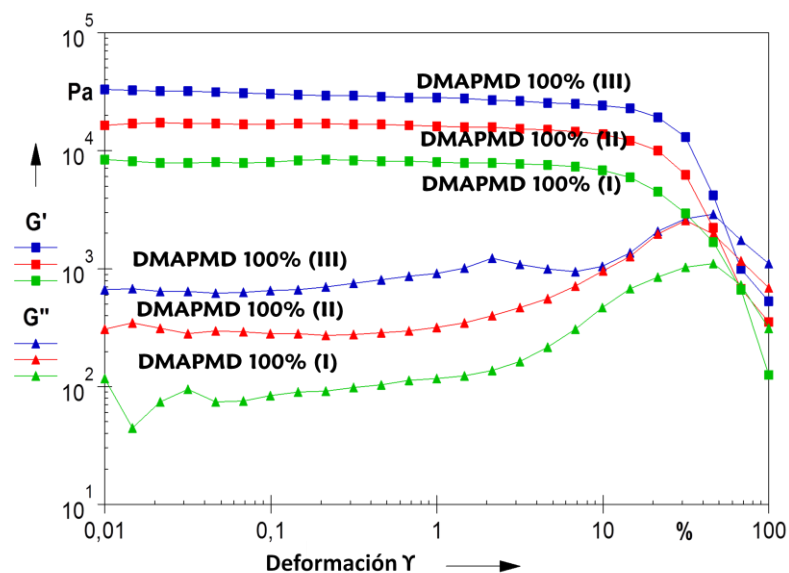


Figura 5.4. Barrido de amplitud de productos obtenidos a partir de DMAPMD

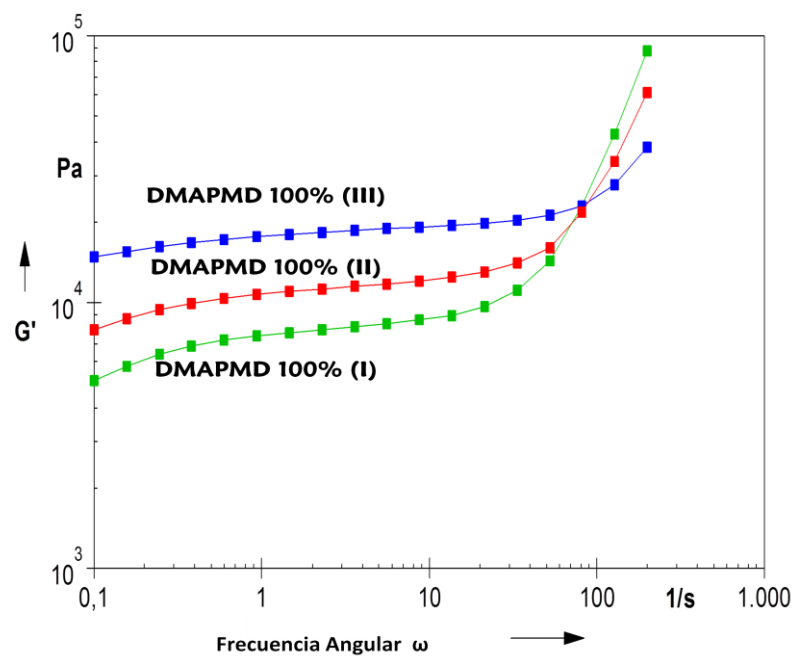


Figura 5.5. Barrido de frecuencia de productos obtenidos a partir de DMAPMD

En las Figuras 5.6 y 5.7 se puede observar que la incorporación del comonomero DMAEMT disminuye la componente sólida respecto a DMAPMD 100% (I). Además, es evidente que la incorporación de dicho monómero permite que la red polimérica soporte mayor deformación. En la Figura 5.7, que corresponde al barrido de frecuencia, se observa que los productos incrementan su componente sólida a medida que aumenta la frecuencia de deformación, debido probablemente a que, a altas frecuencias, las cadenas poliméricas de la red tienen la posibilidad de re-ordenarse de forma más ordenada y compacta.

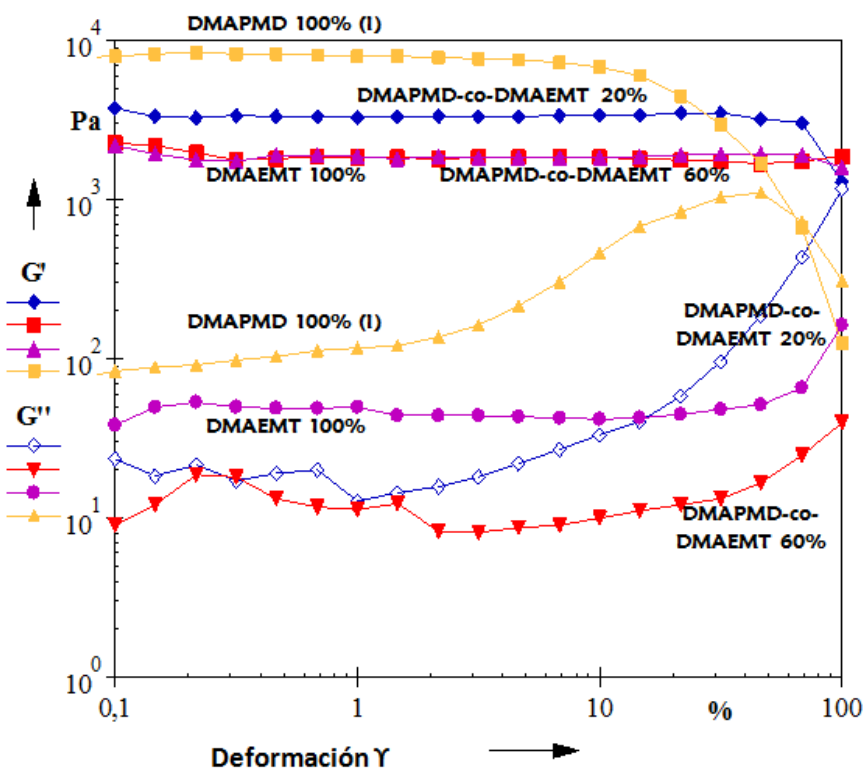


Figura 5.6. Barrido de amplitud de productos DMAPMD-co- DMAEMT

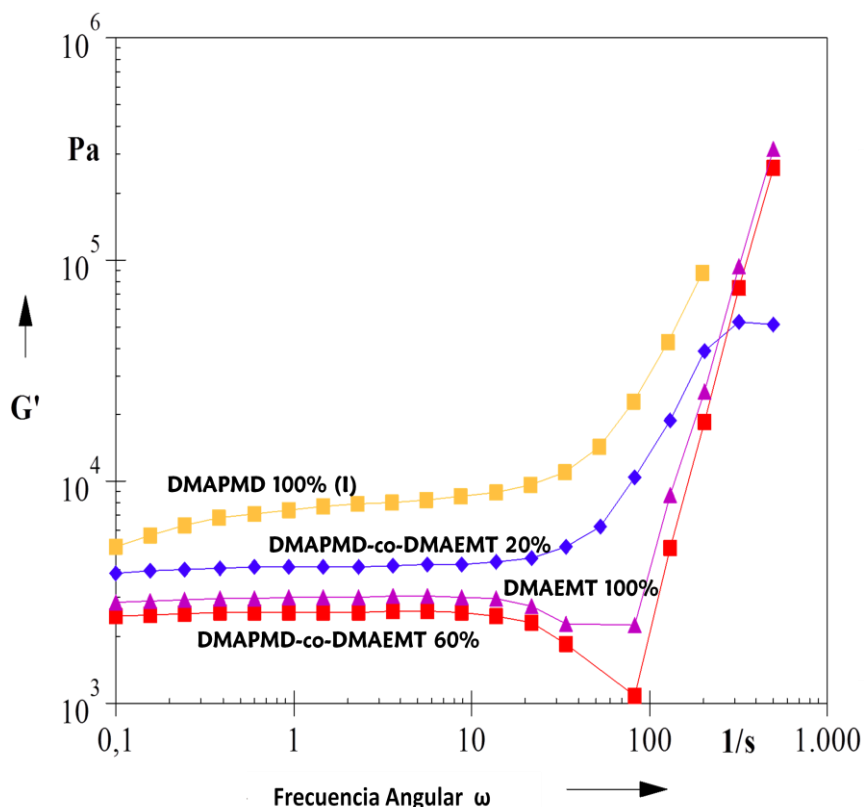


Figura 5.7. Barrido de frecuencia de productos DMAPMD-co-DMAEMT

Debido a la naturaleza viscoelástica de los materiales, la caracterización mecánica revela información importante. El módulo de Young, llamado también elasticidad, representa la deformación reversible que es capaz de sufrir un material. Por otra parte, la máxima carga de compresión indica la fuerza máxima que es capaz de soportar un dado material antes de fracturarse. Los estudios mecánicos se pueden realizar mediante ensayos de compresión y pueden ser relacionados con la fuerza de los hidrogeles, mediante la determinación de la máxima deformación, la máxima tensión de deformación y el módulo de Young inicial.

Se realizaron los estudios sobre los productos seleccionados: DMAPMD 100% (I); DMAPMD-co-DMAEMT 20%; DMAPMD-co-DMAEMT 60% y DMAEMT 100%, cuyos resultados se muestran en la Tabla 5.5. Se puede observar que la incorporación de DMAEMT en las redes poliméricas disminuye el módulo de Young pero aumenta el porcentaje de deformación máxima. Esto, estaría indicando que dicha incorporación disminuye la componente sólida de la red y que, aplicando la

misma fuerza de compresión, se logra aumentar la capacidad de deformación del material. Por lo tanto, los materiales que contienen DMAEMT resultaron menos rígidos pero más deformables. Esta conclusión, está de acuerdo con los resultados mencionados previamente en cuanto al análisis reológico.

Tabla 5.5. Valores de máxima deformación, máxima tensión de deformación y módulo de Young inicial de los hidrogeles seleccionados

Hidrogel	Pendiente inicial (MPa)	Máxima tensión de deformación (MPa)	Máxima deformación (%)
DMAPMD 100% (I)	0,0150	0,0209	44
DMAPMD-co-DMAEMT 20%	0,0104	0,0157	50
DMAPMD-co-DMAEMT 60%	0,0058	0,0156	67
DMAEMT 100%	0,0061	0,0508	82

Se realizó un análisis de varianza (Anova) y test de Tukey con nivel de significancia del 5 %

5.3.4. RETENCIÓN DE METALES

En general, las resinas poliméricas que contienen ligandos con grupos amino, suelen presentar excelente capacidad para adsorber cationes metálicos polivalentes, por la fuerte afinidad entre el átomo de nitrógeno (como coordinante, por la disponibilidad del par electrónico sin compartir) y dichos cationes. También, son capaces de adsorber especies aniónicas, luego de su protonación. Para el estudio de esta parte del trabajo, se seleccionó DMAPMD para preparar los productos ya que contiene un grupo amida que confiere hidrofiliidad y un grupo amino, para el acomplejamiento de los metales. A su vez, este último se encuentra en una cadena relativamente larga, que actúa probablemente como espaciador, facilitando la captura de los iones metálicos (5). En la preparación de los productos, también se utilizó DMAEMT como co-monómero, por los grupos funcionales que posee.

Al poner en contacto un adsorbente con una solución que contiene un ion metálico, la adsorción resulta en la remoción del soluto desde la solución, sobre la

superficie sólida. Esto, ocurre hasta que el soluto remanente en la solución está en equilibrio dinámico con el soluto en la superficie sólida, alcanzando un equilibrio de distribución del metal entre el adsorbente y la solución. Por lo tanto, la capacidad de adsorción de metal (X) se puede determinar por medio de la diferencia de concentración del metal antes y después de la adsorción, según la ecuación 5.1, donde C_0 es la concentración inicial del metal, C es la concentración en el equilibrio del metal en solución, V es el volumen de reacción y W es el peso del hidrogel.

$$X = (C_0 - C) V / W \quad (5.1)$$

El equilibrio de distribución depende de varios factores, tales como: tipo de grupo funcional presente en el adsorbente, separación de la función ligante de la cadena principal, clase de metal involucrado y de las características del material. Entre estas últimas, se puede mencionar la estructura adecuada de la red, es decir, que posea alta posibilidad de expansión por el hinchamiento en agua, para la mejor difusión del ion hacia el sitio de coordinación.

Si se grafica X en función de C , se obtienen las isothermas de adsorción, cuya ecuación más frecuentemente usada para describirla es la correspondiente al modelo de Langmuir (ecuación 5.2), basado en adsorción física (5, 9-13).

$$C / X = (C / X_{\max}) + (1 / X_{\max} b) \quad (5.2)$$

En la ecuación 5.2, X_{\max} es la cantidad máxima de iones metálicos adsorbidos en la monocapa (mg/g) y b es la constante de adsorción en el equilibrio de Langmuir (mL/mg), relacionada con la afinidad de los sitios de unión y la energía de adsorción. C se expresa en ppm y X en miligramos de metal adsorbido en el equilibrio por gramo de hidrogel seco (mg/g). Aplicando el modelo lineal de Langmuir, se suele graficar C/X en función de C . Mediante la representación de los valores de las isothermas de adsorción experimentales, ajustados en forma linealizada de la ecuación seguidos de regresión lineal, se pueden obtener X_{\max} y b , a partir de la pendiente y la ordenada al origen, respectivamente. En este modelo, el metal

adsorbido cubre una monocapa en la superficie homogénea del sólido, donde todos los sitios de unión en la superficie tienen energía uniforme de adsorción, sin interacción entre las moléculas adsorbentes (14).

En la Figura 5.8 se muestra un ejemplo del gráfico recientemente descrito. En el caso mostrado, se analizó la adsorción de iones metálicos desde hidrogeles de carboximetil quitina (CMChT) y carboximetil quitosano (CMChTs) (11).

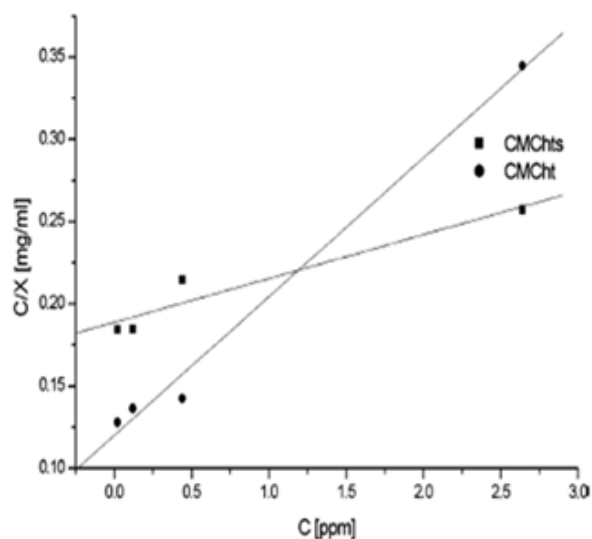


Figura 5.8. Ejemplo del gráfico de C/X en función de C, aplicando el modelo lineal de Langmuir (11).

Otro modelo utilizado para describir las isothermas de adsorción es el de Freundlich, cuya expresión se muestra en la ecuación 5.3. K_F es la constante de Freundlich (mg/g), relacionada con la adsorción en el equilibrio y $1/n$ es un factor de heterogeneidad, siendo n la intensidad de la adsorción. Si $1/n$ resulta mayor que 1, la interacción metal-adsorbente es mala, mientras que si es menor que 1, es buena. La ecuación 5.4 muestra la forma linealizada, a partir de la cual n y K_F pueden ser obtenidos (14-16).

$$X = K_F C^{1/n} \quad (5.3)$$

$$\ln X = (1/n) \ln C + \ln K_F \quad (5.4)$$

El modelo de Freundlich es también un modelo no lineal. A diferencia del modelo de Langmuir, asume una distribución energética heterogénea, para la activación de los sitios de unión en la superficie, con interacción entre las moléculas del adsorbente. En este modelo, se considera que la afinidad de los sitios de unión en la superficie de la masa, varía con la interacción entre las moléculas adsorbentes, pudiendo asumir adsorción multicapa. Consecuentemente, los sitios con mayor afinidad son los que se ocupan primero.

En esta parte del trabajo, se presentan los resultados provenientes de la determinación de X , de las isothermas de adsorción y de la linealización según las ecuaciones 5.2 ó 5.4.

La capacidad de retención de los productos obtenidos a partir de DMAPMD, fueron comparadas a través de los valores de X_{\max} para Cu^{2+} , Zn^{2+} y Pb^{2+} (Tablas 5.6-5.8). De acuerdo a los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta que, en general, los valores de los coeficientes de correlación (R^2) están comprendidos entre 0,95 y 0,99, se puede aceptar que, en estos casos, los resultados se ajustan y obedecen al modelo de Langmuir. Dicho modelo postula que la superficie tiene un número fijo de centros activos idénticos y definidos, que la adsorción es en monocapas, uniforme, sobre una superficie homogénea, sin interacción lateral entre las moléculas del adsorbente, y que todos los centros activos tienen la misma energía de adsorción (17-18). En general, se observó que los valores de retención de los metales son altos, comparables o mayores a los obtenidos con matrices poliméricas similares y que aumentan al incrementar el tamaño de poro de la matriz, el volumen de poro y el contenido de agua (15, 19). Esto puede ser atribuido a que, al haber menor densidad de entrecruzamiento en la matriz, hay mayor posibilidad de difusión, densidad de sitios de adsorción y capacidad volumétrica de adsorción. Además, los grupos funcionales capaces de acomplejar el metal, pueden reacomodarse con mayor facilidad.

Cabe destacar que, en todos los casos de retención analizados, la coloración de los hidrogeles cambió durante los procesos de adsorción, mostrando interacción (20-21). Previo a los ensayos, los hidrogeles eran transparentes, volviéndose celestes

luego de los ensayos de retención de Cu^{2+} (Figura 5.9) o blancos luego de los ensayos de retención de Zn^{2+} y Pb^{2+} .

Tabla 5.6. Parámetros obtenidos de la retención de Cu^{2+} , utilizando el modelo lineal de Langmuir para los productos obtenidos a partir de DMAPMD

Hidrogel	Retención de Cu^{2+}			
	R^2	X_{\max} (mg/g)	X_{\max} (mmol/g)	b (L/mg)
DMAPMD 100% (I)	0,962	117,65	1,87	0,040
DMAPMD 100% (II)	0,988	91,8	1,44	0,093
DMAPMD 100% (III)	0,987	63,5	1,00	0,116

Tabla 5.7. Parámetros obtenidos de la retención de Pb^{2+} , utilizando el modelo lineal de Langmuir para los productos obtenidos a partir de DMAPMD

Hidrogel	Retención de Pb^{2+}			
	R^2	X_{\max} (mg/g)	X_{\max} (mmol/g)	b (L/mg)
DMAPMD 100% (I)	0,860	173,91	0,99	0,040
DMAPMD 100% (II)	0,986	90,9	0,44	0,201
DMAPMD 100% (III)	0,981	90,1	0,43	0,073

Tabla 5.8. Parámetros obtenidos de la retención de Zn^{2+} , utilizando el modelo lineal de Langmuir para los productos obtenidos a partir de DMAPMD

Hidrogel	Retención de Zn^{2+}			
	R^2	X_{\max} (mg/g)	X_{\max} (mmol/g)	b (L/mg)
DMAPMD 100% (I)	0,972	81,6	1,25	0,049
DMAPMD 100% (II)	0,980	87,3	1,33	0,041
DMAPMD 100% (III)	0,970	62,7	0,96	0,098



Figura 5.9. Coloración de los hidrogeles antes y después de la retención de Cu^{2+}

En la Tabla 5.9 se muestra los parámetros obtenidos de la retención de Cu^{2+} y de Pb^{2+} , utilizando el modelo lineal de Langmuir para los productos DMAPMD-co-DMAEMT 20% y DMAEMT 100%, en comparación con DMAPMD 100% (I). Los resultados indican que todos tienen capacidad de retener ambos iones metálicos, pero los mayores valores se alcanzan con DMAPMD 100% (I). Probablemente, DMAPMD-co-DMAEMT 20% tuvo menor capacidad de retención ya que resultó menos hinchable. La conclusión más importante es que dicho producto, que resultó mejorado mecánicamente, siguió dando altas retenciones de los iones metálicos.

Cuando Cu^{2+} y Pb^{2+} se colocaron, en competencia y a bajas concentraciones iniciales, en contacto con los hidrogeles, estos sólo retuvieron Cu^{2+} , probablemente debido a que su menor radio iónico permitió mayor difusión y menor impedimento hacia la retención.

Tabla 5.9. Parámetros obtenidos de la retención de Cu^{2+} y Pb^{2+} , para DMAPMD-co-DMAEMT 20% y DMAEMT 100%, en comparación con DMAPMD 100% (I)

Hidrogel	Cu^{2+}		Pb^{2+}		Remoción Competitiva de Cu^{2+} (en presencia de Pb^{2+})	
	X_{\max} (mg/g)	b (L/mg)	X_{\max} (mg/g)	b (L/mg)	X_{\max} (mg/g)	b (L/mg)
DMAPMD 100% (I)	117,65	0,040	173,91	0,044	43,84	0,190
DMAPMD-co-DMAEMT 20%	80,38	0,070	140,85	0,016	61,35	0,167
DMAEMT 100%	90,42	0,026	34,48	0,011	42,74	1,293

Una vez que se realizó la determinación de la constante de Langmuir (b), para Cu²⁺, Zn²⁺ y Pb²⁺, se pudo calcular el factor de separación R_L (correspondiente a la intensidad de adsorción), según la ecuación 5.5. Dicho factor está basado en la ecuación de Langmuir, y predice que si R_L=0, el sistema de adsorción es irreversible; si 0 < R_L < 1, la adsorción es favorable y si R_L > 1, es desfavorable (11, 17). Los resultados se muestran en las Tablas 5.10, 5.11 y 5.12 con los productos obtenidos a partir de DMAPMD, para Cu²⁺, Pb²⁺ y Zn²⁺, respectivamente. El ΔG de la unión metal-hidrogel se puede calcular según ecuación 5.6, usando el parámetro b (constante de adsorción en el equilibrio de Langmuir, relacionada con la afinidad de sitios de unión y con la energía de adsorción), en unidades de L/mol, siendo R la constante universal de gases (8,314 J/mol K), y T la temperatura absoluta, en Kelvin. Los resultados del cambio de energía libre (ΔG) para los productos obtenidos a partir de DMAPMD, para Cu²⁺, Zn²⁺ y Pb²⁺, se muestran en la Tabla 5.13.

$$R_L = 1 / (1 + b C_0) \quad (5.5)$$

$$\Delta G = - RT \ln b \quad (5.6)$$

Tabla 5.10. Valores de R_L para sistemas de adsorción de Cu²⁺ con los productos obtenidos a partir de DMAPMD

C₀ de Cu²⁺ (ppm)	R_L DMAPMD 100%(I)	R_L DMAPMD 100% (II)	R_L DMAPMD 100% (III)
39,0	0,370	0,210	0,180
213,0	0,096	0,048	0,039
335,5	0,063	0,031	0,025
546,5	0,040	0,019	0,016

Tabla 5.11. Valores de R_L para sistemas de adsorción de Pb^{2+} con los productos obtenidos a partir de DMAPMD

C_0 de Pb^{2+} (ppm)	R_L DMAPMD 100% (I)	R_L DMAPMD 100% (II)	R_L DMAPMD 100% (III)
32,0	0,397	0,113	0,260
173,0	0,107	0,023	0,060
236,0	0,071	0,015	0,039
454,0	0,045	0,009	0,024

Tabla 5.12. Valores de R_L para sistemas de adsorción de Zn^{2+} con los productos obtenidos a partir de DMAPMD

C_0 de Zn^{2+} (ppm)	R_L DMAPMD 100% (I)	R_L DMAPMD 100% (II)	R_L DMAPMD 100% (III)
52,6	0,279	0,317	0,162
179,2	0,102	0,120	0,054
216,0	0,086	0,101	0,045
350,0	0,058	0,065	0,028

Tabla 5.13. ΔG determinada para DMAPMD 100% (I-III) y Cu^{2+} , Zn^{2+} y Pb^{2+}

Hidrogel	ΔG para Cu^{2+} (Kj/mol)	ΔG para Pb^{2+} (Kj/mol)	ΔG para Zn^{2+} (Kj/mol)
DMAPMD 100% (I)	-19,23	-22,35	-19,38
DMAPMD 100% (II)	-20,86	-25,53	-18,95
DMAPMD 100% (III)	-21,39	-23,10	-21,07

En la Tabla 5.14, se muestran los resultados del cambio de energía libre (ΔG) determinada usando la constante de Langmuir (b) para los productos DMAPMD-co-

DMAEMT 20% y DMAEMT 100%, en comparación con DMAPMD 100% (I), para Cu^{2+} y Pb^{2+} .

Tabla 5.14. ΔG determinada para DMAPMD-co-DMAEMT 20% y DMAEMT 100%, en comparación con DMAPMD 100% (I) y Cu^{2+} y Pb^{2+}

Hidrogel	ΔG para Cu^{2+} (Kj/mol)	ΔG para Pb^{2+} (Kj/mol)	ΔG (Kj/mol) para Cu^{2+} en remoción competitiva
DMAPMD 100% (I)	-19,23	-22,35	-23,06
DMAPMD-co-DMAEMT 20%	-20,61	-19,86	-22,74
DMAEMT 100%	-18,18	-18,95	-27,76

De acuerdo a los resultados obtenidos respecto al valor R_L se puede afirmar que, en todas las matrices, la retención corresponde a sistemas de adsorción favorables, especialmente en los casos donde las concentraciones iniciales son bajas (Tablas 5.10-5.12). Por otro lado, se puede afirmar que los valores de ΔG obtenidos son altos y que sugieren fuertes interacciones entre el ion metálico y el grupo funcional amino (Tablas 5.13 y 5.14) (21-22).

Por otro lado, se determinaron los porcentajes de recuperación de plomo en los productos obtenidos a partir de DMAPMD. Los porcentajes de retención fueron altos, especialmente en los ensayos en los que se utilizaron soluciones de Pb^{2+} de concentraciones iniciales bajas (Tabla 5.15) [Figuras 5.10-5.12, para DMAPMD 100% (I; II y III)]. En dicha Tabla, se puede observar que, en todos los casos, se lograron altos porcentajes de recuperación del metal, llegando a valores cercanos al 100%.

Tabla 5.15. Porcentajes de retención y de recuperación de Pb^{2+}

C_0 DMAPMD 100% (I) (ppm)	% ^a	% ^b	C_0 DMAPMD 100% (II) (ppm)	% ^a	% ^b	C_0 DMAPMD 100% (III) (ppm)	% ^a	% ^b
32,0	100	98	32,0	100	97	32,0	100	99
173,0	100	94	173,0	100	96	173,0	100	80
236,0	100	94	236,0	96	97	236,0	100	94
454,0	93	88	454,0	93	93	454,0	94	80

a- Porcentaje de retención de Pb^{2+} ; b- Porcentaje de recuperación de Pb^{2+}

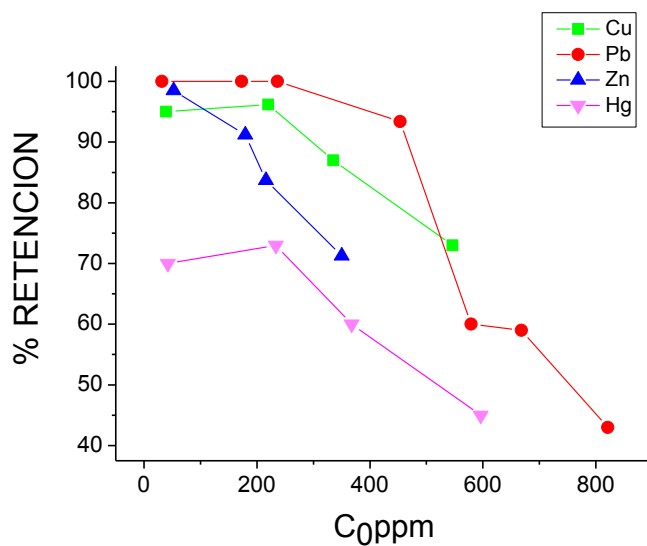


Figura 5.10. Porcentaje de retención de iones vs C_0 para DMAPMD 100% (I)

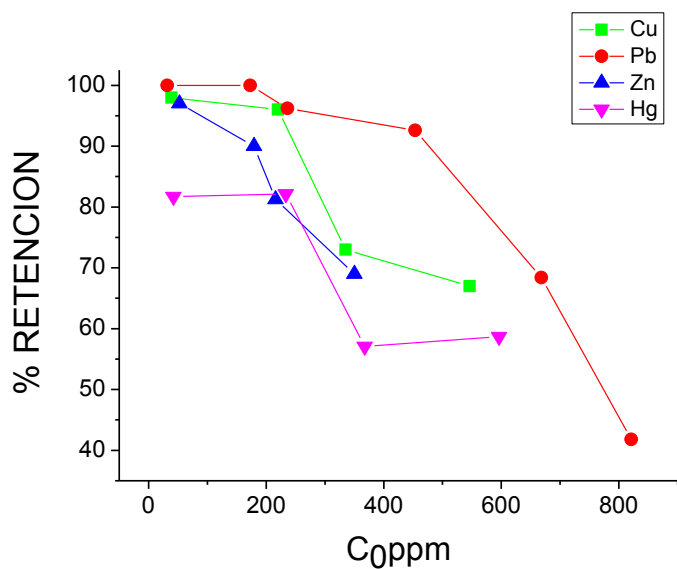


Figura 5.11. Porcentaje de retención de iones vs C₀ para DMAPMD 100% (II)

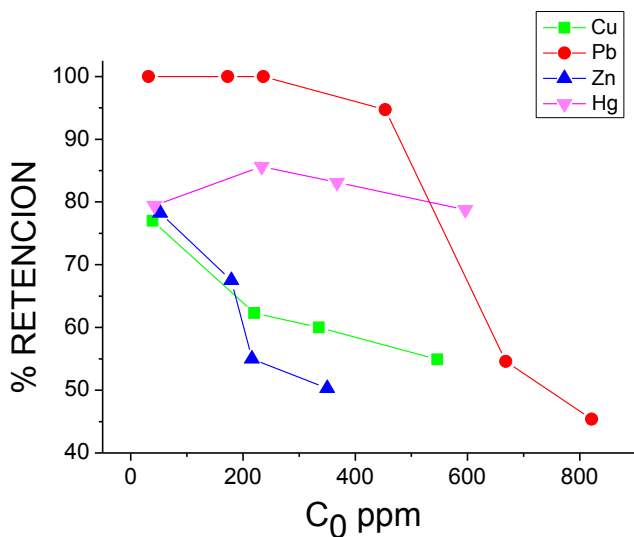


Figura 5.12. Porcentaje de retención de iones vs C₀ para DMAPMD 100% (III)

El caso de la retención del ion Hg^{2+} presentó una particularidad. Los resultados de la capacidad de retención de los productos obtenidos a partir de DMAPMD fueron, en general, más bajos respecto a los otros iones (Figuras 5.10-

5.12) y no se ajustaron ni obedecieron al modelo de Langmuir. En este caso, los valores correspondientes a los coeficientes de correlación (R^2) ajustaron al modelo de Freundlich. La Figura 5.13 muestra la isoterma de adsorción de Hg^{2+} para los productos formados a partir de DMAPMD y, la Tabla 5.16 muestra los valores obtenidos, que resultaron comprendidos entre 0,94 y 0,98 (14-15). Como ya se mencionara, dicho modelo, que describe el equilibrio sobre una superficie heterogénea, no asume la adsorción en forma de monocapa, si no que plantea un modelo “no ideal” de adsorción en multicapas, en el que los centros activos no tienen el mismo calor o energía de adsorción.

El ensayo de adsorción de Hg^{2+} se realizó a pH 2,5 para lograr una solución homogénea (a diferencia del resto de los metales cuyos ensayos de adsorción fueron realizados a pH 4,5-5). La diferencia de comportamiento se explicaría por el hecho de que, a ese bajo valor de pH el hidrogel (pH-dependiente) se encuentra en su forma protonada originando una superficie diferente de adsorción. La Tabla 5.17 muestra la cantidad de Hg^{2+} retenido, de acuerdo a las concentraciones iniciales usadas, y recuperado (en mg y en %). A diferencia del Pb^{2+} , en este caso los porcentajes de recuperación de Hg^{2+} fueron considerablemente menores.

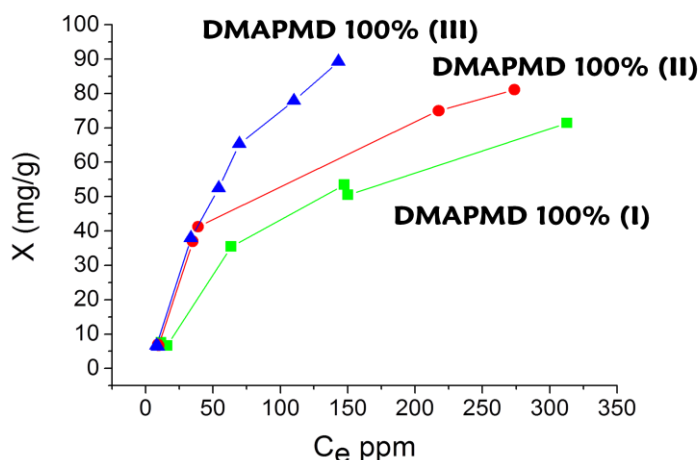


Figura 5.13. Isoterma de adsorción de Hg^{2+} para los productos formados a partir de DMAPMD (X =Cantidad de metal adsorbido en equilibrio por g)

Tabla 5.16. Parámetros obtenidos de la retención de Hg^{2+} , utilizando el modelo lineal de Freundlich para los productos formados a partir de DMAPMD

Hidrogel	R^2	1/n	K_F
DMAPMD 100% (I)	0,942	0,68	1,65
DMAPMD 100% (II)	0,984	0,72	1,35
DMAPMD 100% (III)	0,971	0,98	0,82

Tabla 5.17. Cantidad de Hg^{2+} retenido y recuperado (en mg y en %)

Hidrogel	Hg^{2+} retenido (mg)	Hg^{2+} recuperado (mg)	Recuperación (%)
DMAPMD 100% (I)	0,266	0,082	31
	1,704	0,764	44
	2,173	0,778	36
	2,579	1,400	54
DMAPMD 100% (II)	0,333	0,071	21
	1,944	0,627	32
	2,252	0,656	29
	3,786	1,962	52
DMAPMD 100% (III)	0,344	0,064	19
	2,050	0,546	27
	3,132	0,680	22
	4,864	1,422	30

5.3.5. ESTUDIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

En la Figura 5.14 se muestran las imágenes obtenidas sobre DMAPMD 100% (I) (con y sin Cu^{2+} adsorbido) hinchadas en agua y posteriormente liofilizadas, a distintas magnificaciones. En ellas, se observan diferencias en la morfología. DMAPMD 100% (I) muestra las paredes de la superficie porosa y lisa. En el caso de la muestra con Cu^{2+} , la morfología de la superficie cambia notablemente, observándose la adsorción del mismo.

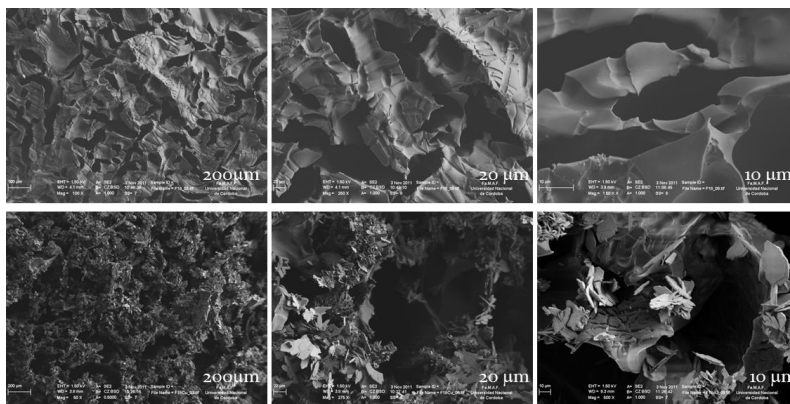


Figura 5.14. Imágenes de SEM, obtenidas sobre DMAPMD 100% (I) (arriba) y DMAPMD 100% (I) con Cu^{2+} adsorbido (abajo), hinchadas en agua y posteriormente liofilizadas, con una magnificación de 100, 250 y 600x.

5.3.6. ESTUDIO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE ^{13}C DE SÓLIDOS

Se realizaron espectros de RMN de ^{13}C de sólidos sobre DMAPMD 100% (I) y DMAPMD 100% (I) con dos concentraciones iniciales de Cu^{2+} (C_0 1: 20 mg/g y C_0 2: 90 mg/g) (Figura 5.15). El objetivo fue analizar los grupos funcionales que estarían interviniendo en la interacción polímero-metal (21, 23).

En la Figura 5.16 se muestran los mismos espectros, pero ampliados en la zona de 0 a 80 ppm y el esquema del monómero DMAPMD (que está incorporado

a la estructura del hidrogel) con la asignación de los carbonos (A-F). Como se puede observar en los espectros (Figura 5.15, y más claramente en la Figura 5.16), la presencia del metal genera corrimiento de las señales asignadas a los carbonos cercanos al amino terciario terminal del monómero, siendo más notorio el corrimiento del carbono (A) correspondiente a los metilos unidos a dicho amino.

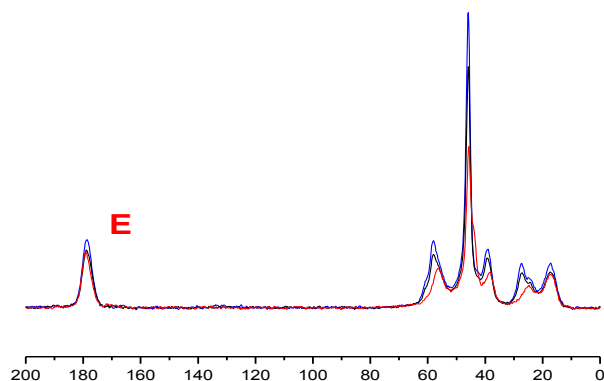


Figura 5.15. Espectros de RMN de ^{13}C de sólidos sobre DMAPMD 100% (I) (en azul) y con dos concentraciones iniciales de Cu^{2+} (C_0 1: 20 mg/g, en negro y C_0 2: 90 mg/g, en rojo)

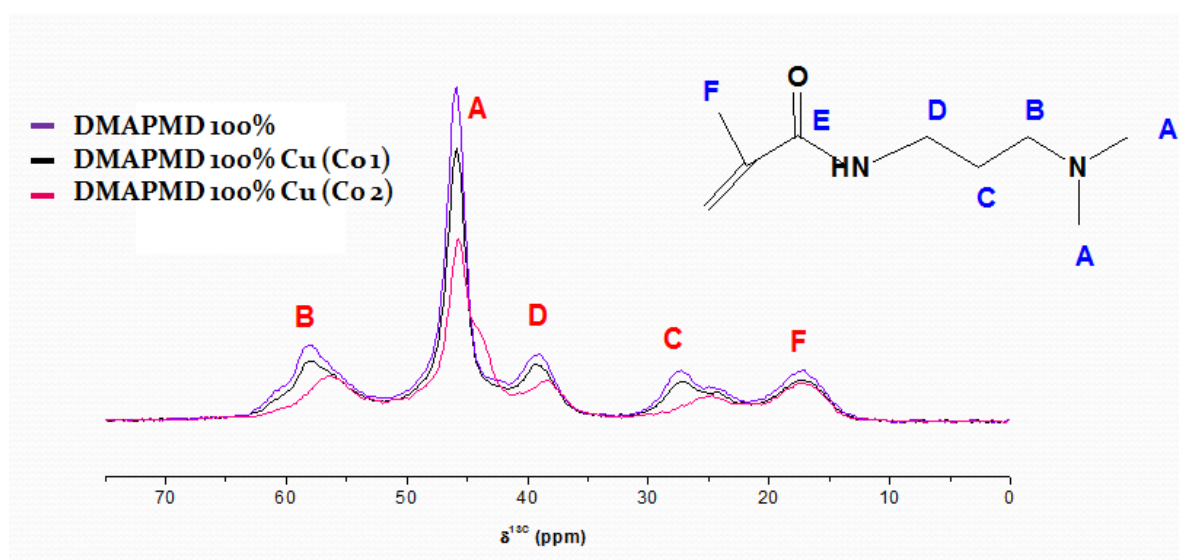


Figura 5.16. Espectros de RMN de ^{13}C de sólidos sobre DMAPMD 100% (I) (en azul), y DMAPMD 100% (I) con dos concentraciones iniciales de Cu^{2+} (C_0 1: 20 mg/g, en negro y C_0 2: 90 mg/g, en rojo), ampliados en 0-80 ppm y esquema de DMAPMD con la asignación de los carbonos (A-F)

A medida que aumenta la cantidad de Cu^{2+} adsorbido al hidrogel, el corrimiento de las señales es mayor, lo que podría significar que un mayor porcentaje de los grupos amino presentes en el polímero podrían interactuar con el metal. Además, se observa mayor disminución relativa en la intensidad de dicha señal a medida que aumenta la cantidad de Cu^{2+} adsorbido (23). Cabe destacar que no se observa corrimiento de las señales asignadas al carbono del carbonilo (E) ni a la señal asignada al metilo (F), por lo que se podría inferir que esta parte de la molécula no estaría involucrada en la interacción con el metal.

A partir de dicho estudio se planteó una hipótesis de la posible interacción entre las cadenas del polímero y el metal (Figura 5.17).

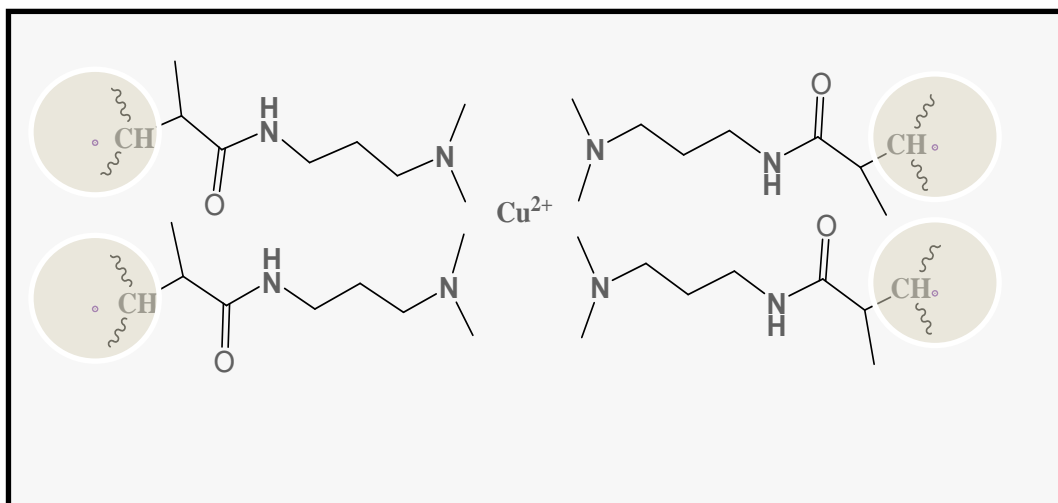


Figura 5.17. Esquema de la posible interacción entre las cadenas del polímero y el metal

5.4. CONCLUSIONES

Todos los hidrogeles sintetizados resultaron de tipo homogéneos, expandibles e hinchables en agua. A menor cantidad de agente entrecruzante incorporado en la estructura, se obtuvieron productos con mayor q_w , ξ y M_c . Los estudios de propiedades mecánicas mostraron que la incorporación de DMAEMT en

las estructuras poliméricas aumentó la capacidad de deformación respecto a los hidrogeles basados en DMAPMD. En todos los casos analizados, la retención de los iones metálicos a partir de sus sales en solución acuosa, resultó especialmente efectiva y alta hacia Cu^{2+} y Pb^{2+} . A su vez, se pudo concluir que a bajas concentraciones iniciales de Cu^{2+} y Pb^{2+} , los valores de retención fueron muy altos, especialmente para el Pb^{2+} , en donde los valores son cercanos al 100%, y que, a medida que las concentraciones iniciales aumentan, las retenciones van disminuyendo posiblemente por saturación de los sitios de adsorción. Los valores de coeficientes de correlación, indican que los datos experimentales para Cu^{2+} , Zn^{2+} y Pb^{2+} ajustan al modelo de Langmuir, mientras que para el caso del Hg^{2+} ajustan al modelo de Freundlich.

Por otro lado, los valores de R_L y de ΔG determinados, indicaron que los sistemas de adsorción son favorables y que las interacciones entre el ion metálico y el adsorbente, son fuertes. Además, a bajas concentraciones iniciales de mezclas de Cu^{2+} y Pb^{2+} , los productos mostraron selectividad para Cu^{2+} .

Se realizaron ensayos de recuperación de Pb^{2+} , utilizando los sistemas de adsorción donde la retención fue cercana al 100% (a bajas concentraciones iniciales de Pb^{2+}) y se obtuvieron valores de recuperación cercanos al 100 %, lo que indicaría que los mismos podrían ser reutilizables en la retención de metales.

REFERENCIAS

- 1-Rivas, B. L., Polimeros funcionales con capacidad para retener iones metalicos con impacto en el medio ambiente. *Ciencia Ahora* 10, 70 (2007).
- 2- Das, A., Basu, S., Verma, A., Scott, K., Characterization of low cost ion conducting poly(AAc-co-DMAPMA) membrane for fuel cell application. *Materials Science and Applications* 6, 234 (2015).
- 3- Pooley, S. A., Rivas, B. L., Riquelme, F. J., Hydrogels from acrylic acid with N,N-dimethylacrylamide: synthesis, characterization, and water absorption properties. *J. Chil. Chem. Soc.* 52, 2, 1160 (2007).
- 4- Kavakli, P. A., Yilmaz, Z., Sen, M., Investigation of heavy metal ion adsorption characteristics of poly (N,N-dimethylamino ethylmethacrylate) hydrogels. *Sep. Sci.Technol.* 42, 1245 (2007).
- 5- Zhu, S., Yang N., Zhang D., Poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) modification of activated carbon for copper ions removal. *Mater. Chem. Phys.* 113, 784 (2009).
- 6- Rivas, B. L., Pooley, S. A., Aceiton, E., Metal ion adsorption behavior of poly[3-(dimethylamine)propyl acrylate] and poly[3-(dimethylamine)propylacrylate-co-acrylic acid] resins. *J. Appl. Polym. Sci.* 84, 1251 (2002).
- 7-Caykara, T., Kiper, S., Demirel, G., Thermosensitive poly(N-Isopropylacrylamide-co-acrylamide) hydrogels: synthesis, swelling and interaction with ionic surfactants. *Eur. Polym. J.* 42, 348 (2006).
- 8-Du, J. Z., Sum, T. M., Weng, J., Synthesis and characterization of photo-cross-linked hydrogels based on biodegradable polyphosphoesters and poly(ethylene glycol) copolymers. *Biomacromol.* 8, 3375 (2007).
- 9- Moradi, O., Aghaie, M., Zare, K., Monajjemi, M., Aghaie, H., The study of adsorption characteristics Cu^{2+} and Pb^{2+} ions onto PHEMA and P(MMA-HEMA) surfaces from aqueous single solution. *J. Hazard. Mater.* 170, 673 (2009).

- 10-Shih-Hung, H., Dong-Hwang, C., Rapid removal of heavy metal cations and anions from aqueous solutions by an amino-functionalized magnetic nano-adsorbent. *J. Hazard. Mater.* 163, 174 (2009).
- 11-Wasikiewicz, J., Nagasawa, N., Tamada, M., Mitomo, H., Yoshii, F., Adsorption of metal ions by carboxymethylchitin and carboxymethylchitosan hydrogels. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* 236, 617 (2005).
- 12-Yu, Z., Wu, R., Wu, M., Zhao, L., Li, R., Zou, H., Preparation of polyamine-functionalized copper specific adsorbents for selective adsorption of copper. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 78, 222 (2010).
- 13-Wu, X. I. N., Zhao, D., Yang, S. T., Impact of solution chemistry conditions on the sorption behavior of Cu(II) on Lin'an montmorillonite. *Desalination* 269, 84 (2011).
- 14-Orozco-Guareño, E., Santiago-Gutiérrez, F., Morán-Quiroz, J. L., Hernandez-Olmos, S., Soto, V., De la Cruz, W., Manríquez, R., Gomez-Salazar, S., Removal of Cu(II) ions from aqueous streams using poly(acrylic acid-co-acrylamide) hydrogels. *Journal of Colloid and Interface Science* 349, 2, 583 (2010).
- 15- Ramírez, E., Burillo, S. G., Barrera-Díaz, C., Roaa, G., Bilyeuc, B., Use of pH-sensitive polymer hydrogels in lead removal from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials* 192, 432 (2011).
- 16- Chen, C.-Y., Lin, M.-S., Hsu, K.-R., Recovery of Cu(II) and Cd(II) by a chelating resin containing aspartate groups. *Journal of Hazardous Materials* 152, 986 (2008).
- 17- Lin, S. H., Juang, R. S., Heavy metal removal from water by sorption using surfactant-modified montmorillonite. *J. Hazard. Mater.* 92, 315 (2002).
- 18-Romero-Gonzalez, J., Peralta-Videa, J. R., Rodriguez, E., Ramirez, S. L., Gardea-Torresdey, J. L., Determination of thermodynamic parameters of Cr (VI) adsorption from aqueous solution onto Agave lechuguilla biomasa. *J. Chem. Thermodyn.* 37, 343 (2005).
- 19-Lázaro Martínez, J. M., Leal Denis, M. F., Campo Dall' Orto, V., Buldain, G. Y., Synthesis, FTIR, solid-state NMR and SEM studies of novel polyampholytes or

polyelectrolytes obtained from EGDE, MAA and imidazoles. *European Polymer Journal* 44, 2, 392 (2008).

20- Kavakhli, P. A., Yilmaz, Z., Sen, M., Investigation of heavy metal ion adsorption characteristics of poly(N,N dimethylamino ethylmethacrylate) hydrogels. *Separ. Sci. Technol.* 42, 1245 (2007).

21-Lombardo Lupano, L. V., Lázaro Martínez, J. M., Piehl, L. L., Rubín de Celis, E., Torres Sánchez, R. M., Campo Dall'Orto, V., Synthesis, characterization, and catalytic properties of cationic hydrogels containing copper(II) and cobalt(II) ions. *Langmuir*, 30, 10, 2903 (2014).

22-Ramani, S. P., Sabharwal, S., Adsorption behavior of Cr(VI) onto radiation crosslinked chitosan and its possible application for the treatment of wastewater containing Cr(VI). *React. Funct. Polym.* 66, 902 (2006).

23- Lázaro Martínez, J. M., Chattah, A. K., Monti, G. A., Leal Denis, M. F., Buldain, G. Y., Campo Dall'Orto, V., New copper(II) complexes of polyampholyte and polyelectrolyte polymers: Solid-state NMR, FT-IR, XRPD and thermal analyses. *Polymer*, 49, 25, 5482 (2008).

CAPÍTULO 6:

Sistema de hidrogeles de N-[3-(dimetilamino) propil] metacrilamida co-polimerizados con N-[3-(dimetilamino)etil] metacrilato y 1-vinilimidazol

6.1. CONSIDERACIONES GENERALES

6.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.4. CONCLUSIONES

REFERENCIAS

CAPÍTULO 6

6.1. CONSIDERACIONES GENERALES

Tal como se mencionara anteriormente, los hidrogeles tienen capacidad de absorber grandes cantidades de agua y son prometedores en numerosos usos aunque a veces las aplicaciones específicas resultan restringidas, debido a las pobres o malas propiedades mecánicas que poseen dichos materiales (1-8). La estructura, consiste de agua en su mayoría, lo que no contribuye a la resistencia mecánica del gel. Debido a su alta capacidad de retención de agua, las cadenas de polímero tienen generalmente baja capacidad de respuesta a una fuerza aplicada, convirtiéndose en materiales particularmente frágiles (9-11). Sin embargo, la fuerza de los hidrogeles se puede mejorar mediante el uso de diferentes estrategias. Algunas, consisten en aumentar la densidad de los enlaces entrecruzados; otras, en la adición de monómeros hidrofóbicos a la arquitectura del polímero, con el fin de generar áreas de mayor densidad o mayor cantidad de interacciones intermoleculares que contribuyan a incrementar el módulo o la rigidez de los hidrogeles (12-15). Estas modificaciones, dan como resultado la reducción de la cantidad de agua absorbida, para lo cual, las composiciones deben diseñarse de manera tal de generar un equilibrio y un compromiso entre la optimización de la hidrofiliidad y el mejoramiento de las propiedades mecánicas (10).

Como ejemplo, Rubin y colaboradores estudiaron la estabilización de *films* o películas de gelatina por reticulación con genipina (agente entrecruzante natural) a diferentes concentraciones, para ser usados como biomateriales (16). Otros métodos también se han utilizado para conseguir hidrogeles robustos y fuertes. Chen y colaboradores desarrollaron hidrogeles nanocompuestos con arcilla, con respuesta a distintos estímulos externos. Atapulgita, un mineral de silicato, se introdujo en un hidrogel de poli (2-(2-metoxietoxi)etil metacrilato-co-oligo(etilenglicol)metacrilato-

co-ácido acrílico), en el que las fibrillas de atapulgita, de tamaño nanométrico, actuaron como relleno y agente de reticulación, para mejorar las propiedades mecánicas de los hidrogeles (17). Liu y colaboradores prepararon un tipo de hidrogel mecánicamente fuerte por polimerización fotoiniciada de oligo (etilenglicol)metacrilato, 2-vinil-4,6-diamino-1, 3, 5-triazina (VDT) y BIS como agente entrecruzante. La introducción del monómero VDT fortaleció las propiedades mecánicas del hidrogel mediante las uniones puente de hidrógeno de la diaminotriazina, y mejoró la adsorción de iones de cobre sobre el hidrogel por quelación entre grupos amino y los iones (18). Compuestos de tipo tiol-norbornenos se usaron para entrecruzar poli (etilenglicol) y cadenas de polidimetilsiloxano y formar hidrogeles sintéticos altamente resistentes (19). En otro reporte, hidrogeles fuertes pero muy extensibles fueron preparados mediante una mezcla de dos tipos de polímeros entrecruzados: alginato entrecruzado iónicamente y PAAm covalentemente entrecruzada. A partir de los estudios realizados, se sugirió que la fuerza de los hidrogeles se puede aumentar en gran medida mediante la combinación de enlaces de entrecruzamiento de tipo débiles y fuertes (20). Como otro ejemplo, Kim y colaboradores realizaron un estudio comparativo sobre las propiedades mecánicas de pericardio bovino después de distintos tratamientos de entrecruzamiento, con la finalidad de una aplicación clínica. Para ello, analizaron las diferencias en entrecruzamientos, simple o doble, entre grupos amino primario, glutaraldehído y genipina (21).

Por otra parte, los hidrogeles de doble red (DN-geles) son una clase de redes de polímeros reticulados con excelentes propiedades mecánicas, mientras que contienen 80-90% en volumen de agua. En el reporte, se presentaron condiciones experimentales óptimas para lograr un DN-gel duro a partir de poli (ácido sulfónico 2-acrilamido-2-metil-1-propano) y PAAm. Los resultados indicaron que los constituyentes de la doble red interactúan favorablemente, mientras permanecen en agua (22-23).

Una de las mejores alternativas que se exploran para reforzar las estructuras de los hidrogeles, es la utilización de grupos funcionales aromáticos, presentes en los

monómeros constitutivos. En estos sistemas, las interacciones aromáticas juegan un papel importante en el mantenimiento de las propiedades mecánicas, debido a la rigidez de la estructura y la hidrofobicidad del segmento aromático (24-25).

La búsqueda de estructuras reticuladas con alta resistencia, rigidez y dureza para evitar la fragilidad, que surge a veces como desventaja para ciertos propósitos de uso, es un desafío muy importante (26-29). El 1-vinilimidazol (VI) es un monómero con propiedades prometedoras para la modificación de hidrogeles (30). Su estructura aromática y la posibilidad de respuesta al pH han atraído la atención, sobre todo por las numerosas aplicaciones, tales como agente catalítico, formador de complejos con iones metálicos y para unión con colorantes, entre otros (31-32). Varias de estas aplicaciones han sido ensayadas con polímeros lineales y entrecruzados en los que VI se ha conformado como monómero constitutivo. Así mismo, se conocen pocos casos en los que VI se ha utilizado como monómero modificador de redes entrecruzadas, con el propósito de mejorar las propiedades mecánicas de los materiales finales (33-44). La mayoría de las veces, la incorporación de VI en las estructuras de hidrogeles ha sido utilizada para la formación de complejos de polímero-metal, que han sido posteriormente utilizados como catalizadores inmovilizados (45-48).

El uso de monómeros basados en acrilatos y en acrilamida es más común en la formación de materiales entrecruzados (49). En particular, DMAEMT y DMAPMD, usados en la preparación de hidrogeles (descrita en capítulos anteriores), son monómeros con características similares, excepto en su funcionalidad (éster y amida, respectivamente). Por lo tanto, DMAEMT actúa como aceptor de enlaces de hidrógeno y DMAPMD actúa como aceptor y donante de enlaces de hidrógeno (50).

En este caso, se discutirán los estudios de los cambios en las propiedades de los productos, basado en las diferentes interacciones posibles de dos de los monómeros anteriormente usados (DMAPMD y DMAEMT) con VI en las redes formadas (51).

Los hidrogeles con VI incorporado, son usados como acomplejantes de iones metálicos. Una vez que se obtiene el complejo polímero-metal, pueden ser utilizados como soportes para la inmovilización de enzimas (52). El interés en el uso de estos complejos en catálisis heterogénea se ha incrementado, debido a sus potenciales ventajas, tales como fácil separación, recuperación y reutilización. Se conoce que la reacción de descomposición de H_2O_2 es acelerada ante la presencia de iones divalentes, por lo que, en nuestro caso, ha sido usada como reacción modelo para el estudio de la actividad catalítica de los complejos metálicos.

El objetivo de esta parte del estudio, fue el análisis de co-polímeros entrecruzados hidrofílicos preparados a partir de DMAPMD, DMAEMT y VI como monómeros mono-vinílicos y BIS como agente entrecruzante. Diferentes proporciones de VI fueron incorporados en las estructuras a fin de producir hidrogeles mecánicamente fuertes. La caracterización físico-química completa de los productos se llevó a cabo por diferentes métodos, evaluando particularmente la incorporación de VI en las propiedades mecánicas de los productos. Posteriormente, los hidrogeles seleccionados fueron utilizados como soportes para la retención de Cu^{2+} y Pb^{2+} . Los productos con Cu^{2+} adsorbido (polímero-metal), se usaron para ensayar la efectividad en la descomposición de H_2O_2 , y se las comparó con matrices que contienen metal adsorbido y que contienen además, la enzima catalasa inmovilizada.

6.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

6.2.1. REACTIVOS

Se utilizaron los siguientes reactivos: N,N'- dimetilaminoetilmetacrilato (DMAEMT; Sigma); N-(3-dimetilamino)propilmetacrilamida (DMAPMD; Aldrich); vinilimidazol (VI; Aldrich); N, N'- metilen bisacrilamida (BIS; Mallinckrodt);

persulfato de amonio (APS; Anedra); N,N,N',N'- tetrametilenetilendiamino (TEMED; Anedra); Cu(NO₃)₂ (Merck); Pb(NO₃)₂ (Anedra); peróxido de hidrógeno (H₂O₂, Anedra); ácido acético glacial (CH₃COOH, Cicarelli); ácido fosfórico (H₃PO₄, Cicarelli); ácido bórico (H₃BO₃, Cicarelli) e hidróxido de sodio (NaOH, Cicarelli). Los *buffers* Britton Robinson (BR) se prepararon según referencia bibliográfica (53), disolviendo 2,3 mL de CH₃COOH glacial; 2,7 mL de H₃PO₄ y 2,4720 g de H₃BO₃ en 1000 mL de agua destilada. Se tomaron alícuotas de 100 mL y el pH de cada solución se ajustó al valor de pH deseado (3,02; 5,01; 7,00; 9,00 y 11,06), con una solución de hidróxido de sodio 2M.

6.2.2. SÍNTESIS DE LOS HIDROGELES

Los hidrogeles fueron sintetizados por co-polimerización radicalaria en solución. Los monómeros DMAEMT ó DMAPMD y BIS fueron disueltos en 4 mL de agua Milli-Q, en un tubo de ensayo. La mezcla fue sonicada durante 10 min y se le burbujeó N₂ durante 5 min. Luego, se agregó el co-monómero VI, el iniciador radicalario APS y el activador redox TEMED (al 50%). La mezcla se trasvasó a una jeringa hipodérmica descartable, usada como reactor y se dejó gelificar a temperatura ambiente durante 48 h. Cada hidrogel obtenido en forma de barra fue cortado en discos de aproximadamente 1 cm de espesor; se realizaron varios lavados de los mismos con agua Milli-Q y se dejaron secar por 2 días a 35 °C.

Las condiciones experimentales se muestran en la Tabla 6.1 mientras que las estructuras de los monómeros usados se muestran en la Figura 6.1.

Los productos finales fueron nombrados como DMAPMD 100%; DMAPMD-co-VI 20%; DMAPMD-co-VI 60%; VI 100%; DMAEMT 100%; DMAEMT-co-VI 20% y DMAEMT-co-VI 60%, dependiendo de la composición molar de los co-monómeros.

6.2.3. PARÁMETROS DETERMINADOS

Los índices de hinchamiento en peso (q_w) se determinaron según lo descrito en la sección 4.2.3 del Capítulo 4 (DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE RED).

El porcentaje de relación de hinchamiento (% SR), se determinó en agua Milli-Q en función del tiempo, según la ecuación 6.1, donde M_t es peso del disco con fluido a tiempo t y M_d es peso del disco seco.

$$SR\% = [(M_t - M_d) / M_d] \times 100 \quad (6.1)$$

Tabla 6.1. Condiciones experimentales de síntesis de los hidrogeles

Hidrogel ^a	DMAPMD (mol x 10⁻³)	VI (mol x 10⁻³)
DMAPMD 100%	5,6	-
DMAPMD-co-VI 20%	4,48	1,12
DMAPMD-co-VI 60%	2,24	3,36
VI 100%	-	5,6
Hidrogel	DMAEMT (mol x 10⁻³)	VI (mol x 10⁻³)
DMAEMT 100%	5,6	-
DMAEMT-co-VI 20%	4,48	1,12
DMAEMT-co-VI 60%	2,24	3,36
VI 100%	-	5,6

^a 1,1 x 10⁻³ mol de BIS; 0,0128 g de APS; 0,5 mL de solución al 50% de TEMED y 4 mL de agua

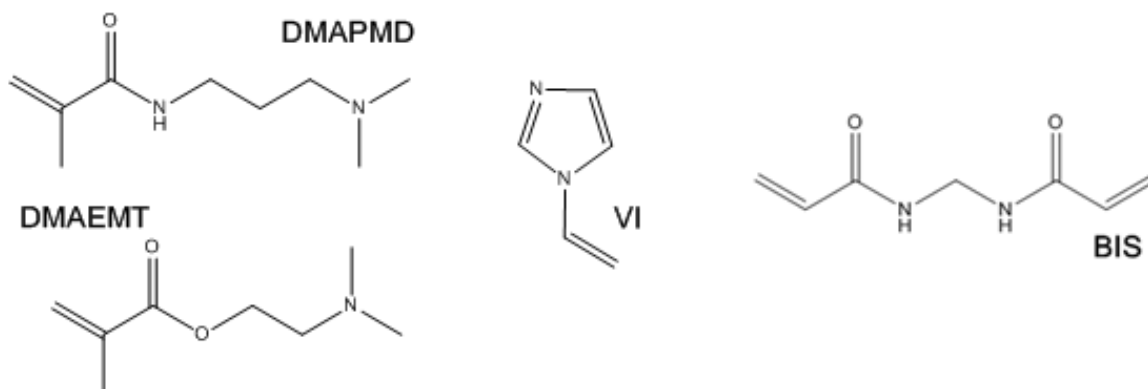


Figura 6.1. Monómeros y agente entrecruzante usados

La difusión de agua dentro de los hidrogeles se determinó utilizando la ecuación 2.9 (Capítulo 2). De los valores de n y k determinados usando dicha ecuación, se puede obtener el coeficiente de difusión (D) de agua a través de la red, a partir de la ecuación 6.2 donde r es el radio del hidrogel en el estado seco.

$$D = \pi r^2 (k / 4)^{1/n} \quad (6.2)$$

La determinación de la densidad de los hidrogeles se realizó midiendo el peso en n -heptano, usando el principio de Arquímedes.

Para estudiar el hinchamiento en respuesta a cambios en el pH, los hidrogeles fueron colocados en soluciones *buffers Britton Robinson*, BR en equilibrio, en un rango de pH 2-11, para asegurarse que la fuerza iónica sea constante ($I = 0,1 \text{ M}$) y que los iones involucrados sean los mismos (53). Los valores de q_w se determinaron en cada pH y se representaron vs pH.

Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado y los valores fueron promediados.

6.2.4 CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROSCOPIA IR

Las muestras, en estado seco, fueron mezcladas con KBr y, luego de morterear, se prepararon las pastillas para tomar los espectros.

6.2.5. ESTUDIOS REOLÓGICOS

La RVL de los hidrogeles hinchados en agua se determinó a frecuencia constante ($\omega=10$ Hz). El barrido de frecuencia se determinó a deformación constante, correspondiente a la RVL de cada muestra, en un rango de 0,1 a 100 Hz para estudiar el comportamiento viscoelástico de los hidrogeles. Las determinaciones se realizaron en platos planos rugosos de 8 mm a 20 °C.

Los módulos elástico (G') y viscoso (G'') de los materiales se midieron utilizando experimentos oscilatorios de baja amplitud. No se encontró evidencia de deshidratación durante las pruebas realizadas. Todas las mediciones fueron por triplicado y los valores se informan promediados.

6.2.6. TEST DE COMPRESIÓN

Se tomaron muestras cilíndricas de los geles (10 mm de diámetro y altura variable) y se colocaron entre las superficies planas de metal en el equipo Instron (Modelo 3342). Los geles se comprimieron a 0,1 mm/s con una fuerza de compresión de intensidad creciente hasta la ruptura total de cada muestra. A continuación, se registró la tensión vs deformación. La fuerza de gel se caracterizó por la máxima deformación, la máxima tensión de deformación y el módulo de Young inicial. Este último, se calculó a partir de la pendiente del gráfico de tensión vs deformación (con valores de tensión no superiores al 6%). Todas las mediciones se realizaron en septuplicado y los valores informados por sus promedios.

6.2.7. ESTUDIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO EN MODO DE PRESIÓN VARIABLE (VP-SEM)

Las muestras fueron colocadas en un porta-muestra y fueron observadas sin metalizar. Las imágenes fueron obtenidas con la finalidad de analizar la morfología, con una magnificación de 400x. Se usó un equipo LEO 1450 VP.

6.2.8. RETENCIÓN DE METALES, INMOVILIZACIÓN DE ENZIMA CATALASA SOBRE EL COMPLEJO HIDROGEL/ Cu^{2+} Y ENSAYO DE DESCOMPOSICIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO CON EL COMPLEJO HIDROGEL/ Cu^{2+} Y EL COMPLEJO HIDROGEL/ Cu^{2+} /ENZIMA CATALASA

Los hidrogeles se colocaron, en sistema *batch*, en contacto con soluciones de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ de diferentes concentraciones iniciales (40 a 550 ppm). Para ello, un disco seco de hidrogel (aproximadamente 50 mg) se hinchó con 10 mL de soluciones acuosas de las sales, por 96 h, a temperatura ambiente y con agitación. Luego, se tomaron 5 mL de cada sobrenadante y la cantidad de ion metálico quelado se determinó mediante absorción atómica. Para ello, se calculó la diferencia entre la cantidad de ion metálico agregado y la cantidad de iones libres remanentes en cada solución, por cada disco ensayado. Se usó un equipo Perkin Elmer 3110. A partir de las isotermas de adsorción se pudo determinar el modelo que mejor explica el proceso y, además, calcular los parámetros correspondientes.

Algunos de los hidrogeles con Cu^{2+} adsorbido (complejo hidrogel/ Cu^{2+}) fueron seleccionados y se colocaron en soluciones de concentración conocida (0,5 mg/mL) de enzima catalasa en *buffer* fosfato (pH 7,00) durante 24 h a 4 °C. Luego, se tomó 1 mL de cada sobrenadante y la cantidad de enzima remanente se determinó por absorción UV-Visible mediante el método de Bradford, con la respectiva curva de calibración realizada previamente. Para ello, se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Posteriormente, se realizó un lavado con *buffer* fosfato (pH 7,00). La cantidad de enzima retenida se obtuvo por diferencia, entre la cantidad agregada inicialmente y la cantidad remanente en cada solución.

Posteriormente, se realizaron ensayos de descomposición de peróxido de hidrógeno con hidrogeles acomplejados con Cu^{2+} (complejo hidrogel/ Cu^{2+}) y con hidrogeles acomplejados con Cu^{2+} sobre los cuales posteriormente se inmovilizó la enzima (complejo hidrogel/ Cu^{2+} /enzima catalasa). Para ello, los discos de hidrogeles (50 mg aproximadamente) se colocaron en contacto con 10 mL de solución 15 mM de H_2O_2 , en buffer fosfato de pH 7,00. Luego, se tomaron alícuotas de 1 mL, a diferentes tiempos y la cuantificación se llevó a cabo por titulación redox, con KMnO_4 . Finalmente, se graficó la descomposición de H_2O_2 en función del tiempo.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

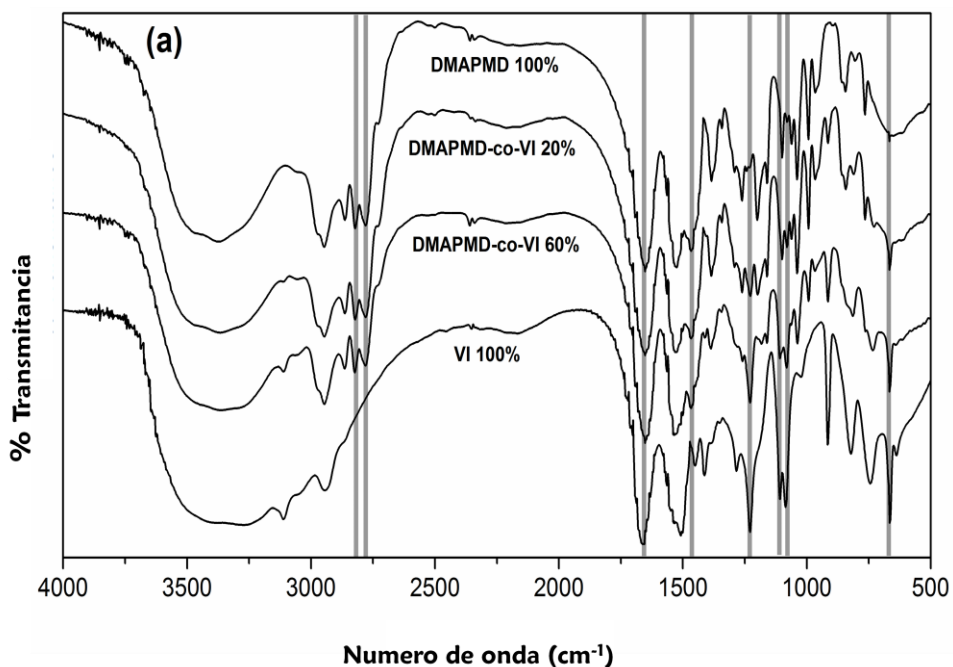
Nuevos hidrogeles fueron preparados variando la relación de co-monómeros usados. Los productos DMAPMD 100%; DMAPMD-co-VI 20%; DMAPMD-co-VI 60%; VI 100%; DMAEMT 100%; DMAEMT-co-VI 20% y DMAEMT-co-VI 60% resultaron en forma de barra y mantuvieron su forma, luego de extraerlos de las jeringas usadas como reactor. La Tabla 6.1 resume las condiciones experimentales usadas.

6.3.1. CARACTERIZACIÓN POR FT-IR

Para caracterizar los productos y analizar la presencia de VI, se realizaron espectros de FT-IR (Figura 6.2). Los productos formados usando DMAPMD como monómero base, presentan una señal fuerte en 1680 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de $\text{C} = \text{O}$ del grupo amida (Figura 6.2 a). Por otra parte, los hidrogeles basados en DMAEMT, muestran una señal fuerte a 1730 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de $\text{C} = \text{O}$ del carbonilo del grupo éster (Figura 6.2 b). La señal en 1680 cm^{-1} también se puede observar en este último debido a que el agente entrecruzante BIS contiene un grupo amida y forma parte, por ende, de todos los productos

(Figura 6.2). En todos los productos, excepto en 100% VI, se pueden observar las señales a 2800 y 2900 cm^{-1} (vibración de N-CH₂ y N-CH₃, respectivamente).

Para los espectros de los polímeros que contienen VI, se puede observar el aumento relativo en las señales a 1430 y 610 cm^{-1} (debido al estiramiento de C=N del anillo y C-N-C de VI, respectivamente) a medida que el porcentaje de VI aumenta. Además, a mayores proporciones de DMAPMD o DMAEMT, se pueden observar más claramente los picos a 2800 y 2900 cm^{-1} (debido al estiramiento de N-CH₂ y N-CH₃, respectivamente). En los espectros de los productos con proporciones crecientes de VI, especialmente en el caso de DMAEMT-co-VI 60%, la señal a 1230 cm^{-1} (también presentes en VI 100%) se observa claramente, debido a la vibración de estiramiento del enlace C-N y la deformación (en el plano) de C-H, ambas del anillo de VI. Además, se pueden observar las señales a 1110 y 1084 cm^{-1} , debidas a la vibración de estiramiento del enlace C-H del anillo de VI.



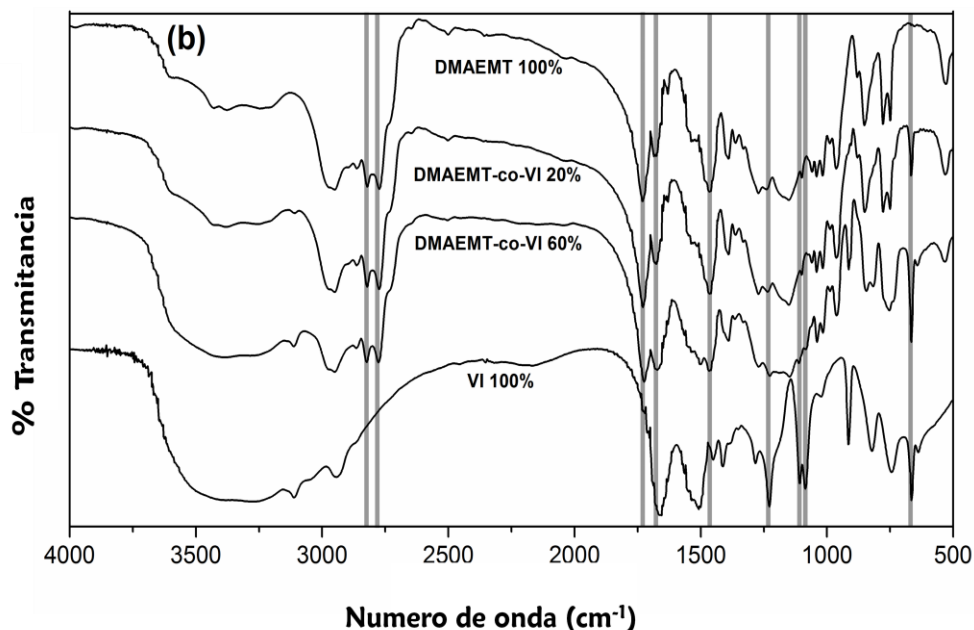


Figura 6.2. Espectros de FT-IR de (a) DMAPMD 100 %, VI 100% y co-polímeros; (b) DMAEMT 100 %, VI 100% y co-polímeros

6.3.2. PROPIEDADES DE HINCHAMIENTO Y PARÁMETROS DE DIFUSIÓN DEL AGUA

En la Tabla 6.2, se muestran las propiedades de hinchamiento y los parámetros de difusión de agua. Con respecto a los q_w , los hidrogeles que contienen DMAPMD presentan, en general, mayores valores de hinchamiento en agua. Para el hidrogel VI 100%, el valor de hinchamiento determinado fue el menor. Se podría inferir que las cadenas se encuentran más compactas, como consecuencia de la interacción entre los anillos imidazolínicos. Al modificar polímeros de DMAPMD con VI, los índices de hinchamiento van disminuyendo a medida que va aumentando la proporción de VI, debido probablemente a los cambios estructurales que producen los anillos aromáticos. En el caso de los hidrogeles con DMAEMT, menos hinchables en agua, la incorporación de VI

produce disminuciones menos marcadas en el hinchamiento respecto a los anteriores.

Tabla 6.2. Parámetros determinados para DMAPMD-co-VI, DMAEMT-co-VI y VI 100%

Hidrogel	ρ (g mL⁻¹)	q_w	n	D (10⁻⁸ m² s⁻¹)
DMAPMD 100%	(1,11 ± 0,01)	(44 ± 1)	0,89	1,46
DMAPMD-co-VI 20%	(1,13 ± 0,01)	(30 ± 2)	0,79	1,97
DMAPMD-co-VI 60%	(1,15 ± 0,01)	(18 ± 1)	0,76	0,86
VI 100%	(1,18 ± 0,05)	(5 ± 2)	0,86	0,08
DMAEMT 100%	(1,10 ± 0,01)	(17 ± 2)	0,60	0,93
DMAEMT-co-VI 20%	(1,12 ± 0,01)	(14 ± 1)	0,58	0,75
DMAEMT-co-VI 60%	(1,16 ± 0,01)	(10 ± 1)	0,71	0,43

ρ : densidad del polímero; q_w : índice de hinchamiento en el equilibrio; n : número que indica el tipo de difusión de agua; D : coeficiente de difusión de agua

La cinética de hinchamiento, en agua Milli-Q, a 25 °C y pH neutro, permite identificar el tiempo durante el cual la matriz y el disolvente alcanzan el equilibrio de hinchamiento, en esas condiciones experimentales. Como se muestra en la Figura 6.3, los productos que contienen DMAPMD y los hidrogeles VI 100% alcanzaron su máximo hinchamiento en 1500 min (24 h aproximadamente), mientras que los productos que contienen DMAEMT lo alcanzaron en 2800 min (48 h aproximadamente).

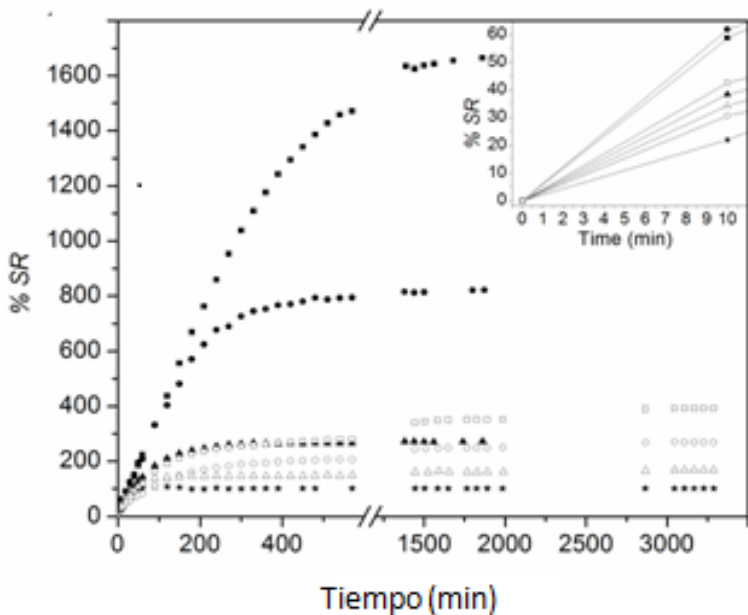


Figura 6.3. Cinéticas de hinchamiento en agua Milli-Q para (■) DMAPMD 100%; (●) DMAPMD-co-VI 20%; (▲) DMAPMD-co-VI 60%; (□) DMAEMT 100%; (○) DMAEMT-co-VI 20%; (△) DMAEMT-co-VI 60% y (★) VI 100%

Además, determinar el coeficiente de difusión (D) y el tipo de difusión de agua (n), dentro del hidrogel, implica conocer parámetros importantes para poder predecir la interacción que se produce entre el disolvente de hinchamiento y las cadenas de polímero. El parámetro n puede tomar diferentes valores. Para n entre 0,45 y 0,5, corresponde al tipo de difusión de Fick (el ingreso de agua es por difusión). En caso que $0,5 < n < 1$, corresponde a la difusión anómala (el ingreso de agua es por difusión y relajación de las cadenas) y si $n = 1$ responde al tipo de difusión II (el ingreso de agua es por relajación de las cadenas poliméricas). Finalmente, si $n > 1$, corresponde al caso Súper tipo II (la velocidad de ingreso de agua es independiente del tiempo). En las muestras analizadas, n osciló entre 0,58 y 0,89 indicando que el mecanismo de penetración de agua es controlado por la difusión y la relajación de las cadenas de polímero (de tipo anómala, no-Fickiana) (Tabla 6.2) (54).

Los hidrogeles en estado seco mantienen mayormente interacciones hidrofóbicas entre las cadenas. Al entrar en contacto con ellas, las moléculas de agua deben romper estas interacciones, para favorecer las interacciones polímero-agua que generan mayor incorporación. Así, cada molécula de agua que entra en la matriz produce una presión neta en la estructura general de la red. Las cadenas del hidrogel necesitan tiempo para responder a la presión del hinchamiento y ordenarse a sí mismas, para poder reordenar las moléculas de agua que entran y permitir el ingreso de mayor cantidad de agua.

Los D , determinados para los hidrogeles (Tabla 6.2) muestran valores más bajos, en varios órdenes de magnitud, respecto a los que se encuentran comúnmente para electrolitos en solución ($10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) (55). En estos sistemas, las moléculas de agua tienen que difundir dentro de una matriz polimérica, por lo tanto, el impedimento que ocurre a veces, provoca la consecuente disminución de D . El VI 100% tiene el coeficiente de difusión más bajo, producido probablemente por las fuertes interacciones que tienen lugar entre los anillos imidazólicos.

La Tabla 6.2 muestra los valores de densidad de los productos. Esta aumenta con la adición de VI, posiblemente debido a que las interacciones hidrofóbicas estarían favorecidas, generando mayor compactación de cadenas y resultando en mayor cantidad de material por unidad de volumen.

6.3.3. HINCHAMIENTO CON RESPUESTA AL pH

La respuesta macroscópica de los hidrogeles a diferentes pH del medio se muestra en la Figura 6.4. A medida que aumenta, los productos muestran una marcada disminución en el tamaño. Se observó el cambio más importante, en volumen, para DMAEMT-co-VI 20%, en el intervalo de pH 7-11. En cuanto a los grupos funcionales en cada matriz (Figura 6.1), los grupos funcionales de imidazol y amida están protonados a pH menor a 7, generando repulsiones electrostáticas y causando mayor estiramiento de las cadenas poliméricas debido a la carga neta

soportada. A valores de pH muy bajos, sufren mayor estiramiento. En la Figura 6.4, se puede observar que, la repulsión generada por los grupos funcionales a un pH bajo es lo suficientemente alta para producir un alto grado de fragmentación o ruptura. A excepción de los productos basados en DMAEMT, no fue posible llevar a cabo los estudios de hinchamiento (q_w) a valores de pH menores a 7, debido a que se produjo pérdida de material en el proceso de secado.

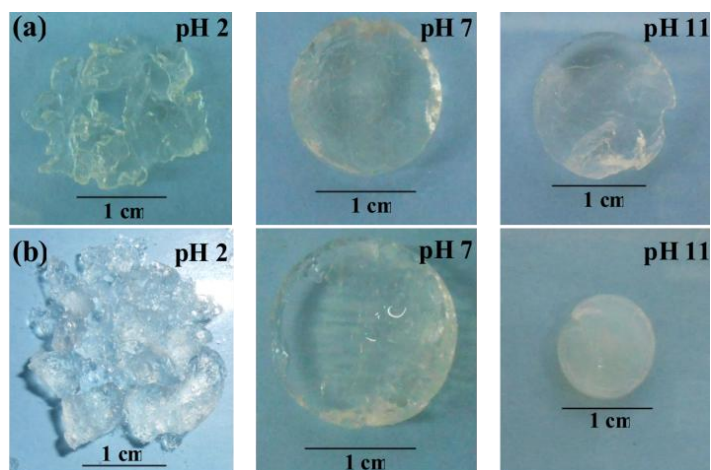


Figura 6.4. Respuesta macroscópica de (a) DMAPMD-co-VI 20% y (b) DMAEMT-co-VI 20% sometidos a cambios en el pH

La Figura 6.5 muestra el comportamiento de hinchamiento de los productos con el cambio en el pH. Al aumentar, los hidrogeles absorben menor cantidad de agua. Además, se observó disminución de volumen con el aumento de pH en DMAPMD 100% y también cuando se polimeriza con VI, mientras que se observó una fuerte disminución de volumen entre pH 7 y 9 para DMAEMT 100% y para los co-polímeros DMAEMT-co-VI.

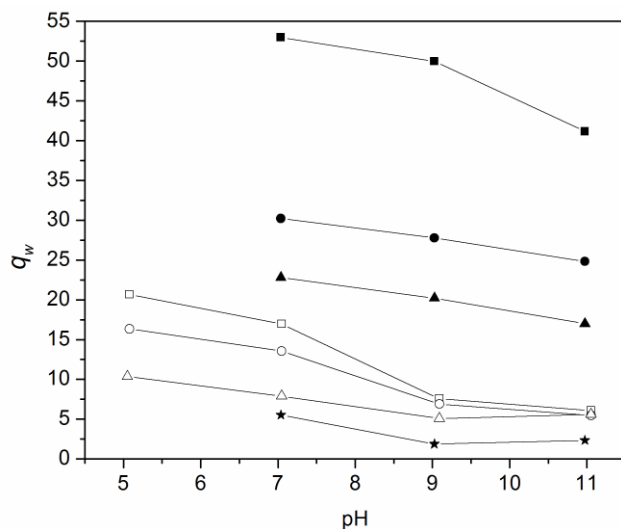


Figura 6.5. Hinchamiento en respuesta al pH para (■) DMAPMD 100%; (●) DMAPMD-co-VI 20%; (▲) DMAPMD-co-VI 60%; (□) DMAEMT 100%; (○) DMAEMT-co-VI 20%; (△) DMAEMT-co-VI 60% y (★) VI 100%

Para los hidrogeles basados en DMAEMT, la variación del pH genera diferentes respuestas. La diferencia en q_w para todos los valores de pH medidos, permite concluir que los materiales que contienen DMAEMT son menos hidrofílicos en comparación con los preparados con DMAPMD.

La variación de pH no produjo cambios significativos en RVL para DMAPMD 100%, DMAPMD-co-VI 20% y DMAPMD-co-VI 60% (Figura 6.6). En cambio, la incorporación de VI en los productos generó una marcada disminución en RVL. El monómero VI aumenta el módulo elástico G' , sin embargo, la disminución en la RVL en forma concomitante, podría indicar interacciones atractivas de corto alcance entre VI y DMAPMD (no electrostáticas, ya que son independientes del pH).

La RVL de DMAEMT 100% aumenta en respuesta del aumento del pH. La incorporación de VI en los hidrogeles que contienen DMAEMT, disminuye la RVL y la sensibilidad, en el rango de pH estudiado. El efecto combinado del imidazol y del grupo acrilato en DMAEMT-co-VI 20%, le estaría confiriendo capacidad de resistir a la fuerza aplicada, al aplicar grandes deformaciones.

La RVL del DMAPMD-co-VI 60% resultó menos extensa, a medida que aumentó el pH. Los anillos aromáticos imidazolínicos producirían un efecto dominante, así como la capacidad de cambiar de forma con los cambios en el pH.

El DMAPMD-co-VI 60% y el DMAEMT-co-VI 60% presentan valores especialmente bajos de deformación reversible, con valores de hasta el 68,1 y 46,4%, respectivamente. La respuesta observada puede atribuirse al hecho de que los anillos aromáticos producirían una fuerte interacción, disminuyendo la flexibilidad de las cadenas. Por lo tanto, la red tridimensional se compacta y se limita en el desplazamiento. Cuando se rompen las interacciones, el efecto se extiende a lo largo de la estructura, provocando su ruptura.

Una vez que la interacción de resonancia entre las cadenas es interrumpida por la fuerza aplicada, pueden reordenarse rápidamente y superar la fuerza aplicada alcanzando un valor en el cual la fuerza es tan grande que el material colapsa completamente.

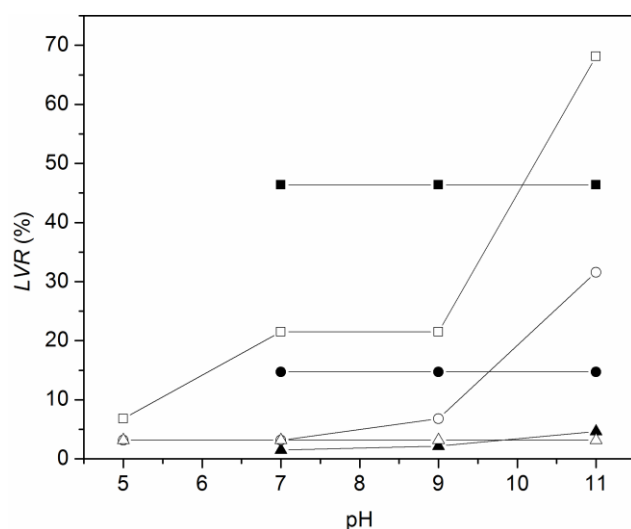


Figura 6.6. RVL de los productos a diferentes pH: (■) DMAPMD 100%; (●) DMAPMD-co-VI 20%; (▲) DMAPMD-co-VI 60%; (□) DMAEMT 100%; (○) DMAEMT-co-VI 20% y (△) DMAEMT-co-VI 60%

6.3.4 ESTUDIOS REOLÓGICOS

En la Figura 6.7 se muestran los gráficos de barrido de amplitud de los copolímeros DMAPMD-co-VI. Se puede observar que el agregado de VI (en 20 y 60%) generó un aumento en el módulo de almacenamiento G' , con respecto al de los hidrogeles DMAPMD 100% y VI 100% (ambos sin co-polimerizar). Esto indicaría que, al estar presente ambas estructuras, se produce un aumento en la rigidez del material, ya que, a mayor G' el material es más duro y se requerirá mayor energía para deformarlo. Paralelamente, la presencia de VI en los copolímeros DMAPMD-co-VI produce otros efectos. En primer lugar, su incorporación aumenta la RVL de los productos. Esto es esperable, si se considera que los anillos aromáticos de tipo imidazolínicos otorgarían mayor resistencia a la fuerza de deformación, como consecuencia del aumento de interacción entre las cadenas. En segundo lugar, los módulos G'' aumentan frente al agregado de VI como co-monómero, manteniéndose independiente de la proporción que se agregue. Esta respuesta se puede atribuir a la baja probabilidad de las cadenas a fluir, como consecuencia de la interacción entre los anillos imidazolínicos, anteriormente mencionada.

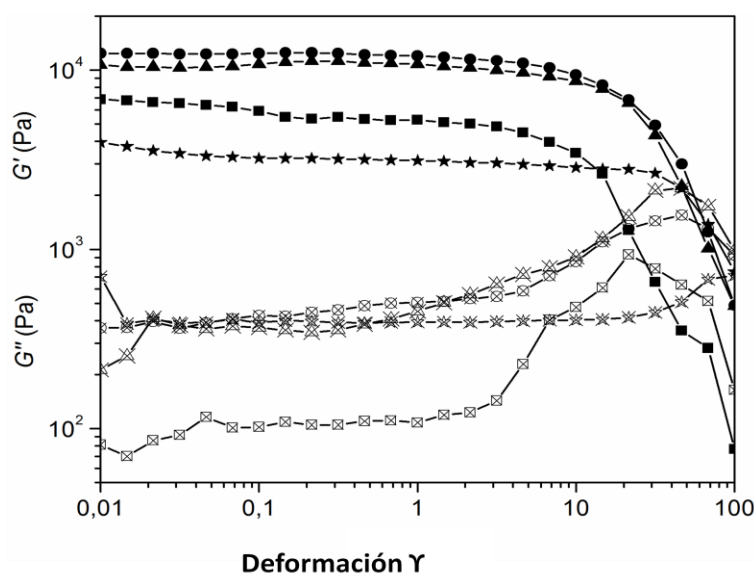


Figura 6.7. Barridos de amplitud de productos (■ □) DMAPMD 100%; (● ⊗) DMAPMD-co-VI 20%; (▲ ⊗) DMAPMD-co-VI 60%; y (★ ☆) VI 100%; G' (lleno) G'' (vacío)

En la Figura 6.8, se muestran los gráficos de barrido de amplitud de los copolímeros DMAEMT-co-VI. En este caso, el módulo de almacenamiento también presenta incrementos frente a agregados de VI como co-monómero. La proporción de 60% de VI, es la máxima concentración capaz de generar mejores propiedades mecánicas. Si bien el agregado del co-monómero genera aumento en la fuerza capaz de soportar la deformación, la RVL disminuye respecto al del polímero sin copolimerizar. A su vez, se mantiene la tendencia general en el módulo de pérdida G'' , mencionada para el caso del DMAPMD.

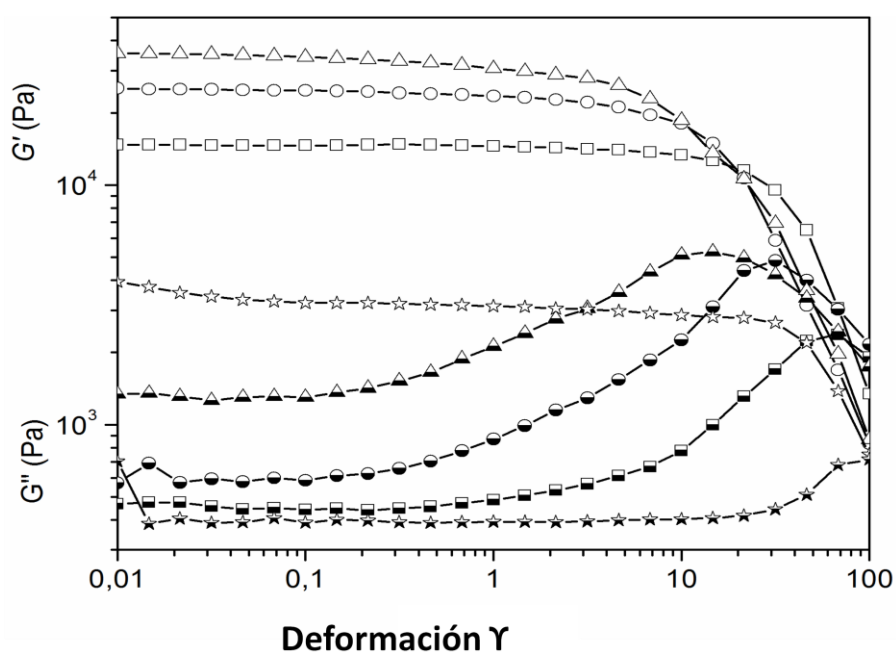


Figura 6.8. Barridos de amplitud de productos (□ ▣) DMAEMT 100%; (○ ●) DMAEMT-co-VI 20%; (△ ▲) DMAEMT-co-VI 60% y (☆ ☆) VI 100%; G' (lleno) G'' (vacío)

Realizando un análisis comparativo entre ambos tipos de hidrogeles, DMAEMT 100% presenta mayor resistencia a la deformación y mayor RVL respecto a DMAPMD 100%. La diferencia en resistencia se atribuye a la presencia de los grupos acrilato y amida, respectivamente. Los mismos propician propiedades disímiles, generadas por la diferencia en la naturaleza de las interacciones que

producen los grupos funcionales. A su vez, la incorporación de mayores cantidades de VI en los hidrogeles preparados con DMAEMT, genera mayor incremento en la resistencia de los materiales, respecto a los que contienen DMAPMD. La tendencia de los módulos de pérdida se mantiene similar para ambos casos, tal como fuera anteriormente discutido.

En las Figuras 6.9 y 6.10 se puede observar la respuesta de cada matriz frente a la variación en la frecuencia de la fuerza oscilatoria aplicada.

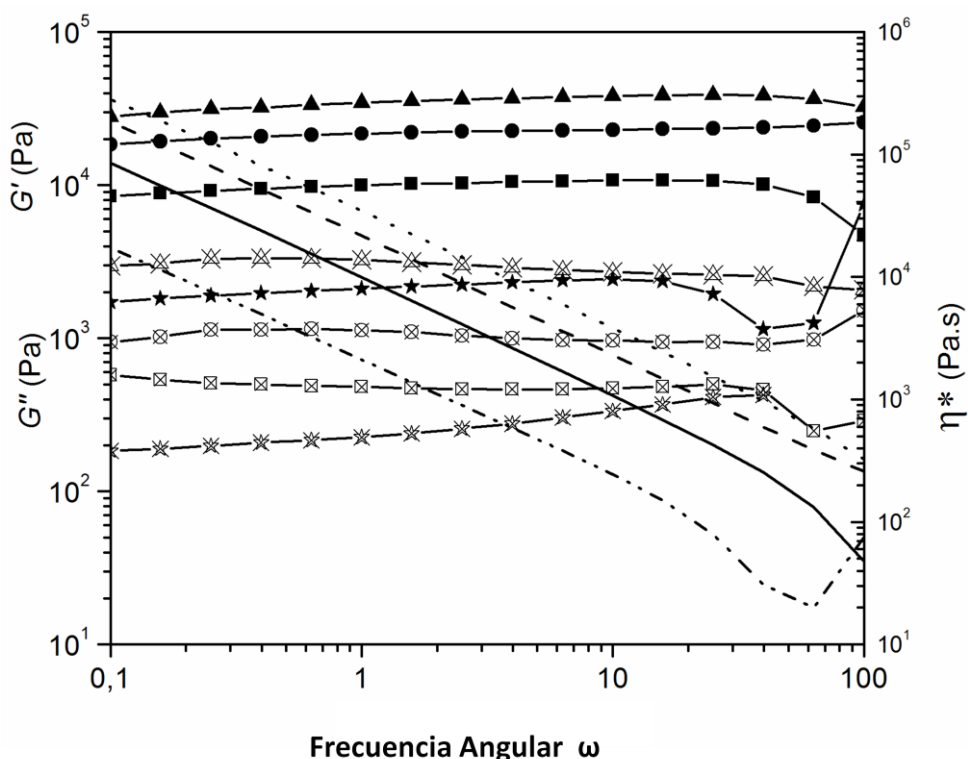


Figura 6.9. Barrido de frecuencia para (■ □ —) DMAPMD 100%; (● ⊗ ---) DMAPMD-co-VI 20%; (▲ ⊗ ...) DMAPMD-co-VI 60%; y (★ ✱ ----) VI 100%; G' (lleno); G'' (vacío); η^* (líneas)

A partir de la combinación de los valores de los módulos de almacenamiento y pérdida, se puede calcular la viscosidad compleja, η^* (Pa s) relacionada con la respuesta del material ante esfuerzos de corte oscilatorio, definida por la ecuación

6.3. Dicha viscosidad, mide la resistencia del material al flujo, como una función de la velocidad de deformación en cizallas (56-60).

$$|\eta^*(\omega)| = [(G'^2 + G''^2)^{1/2}] / \omega \quad (6.3)$$

La viscosidad compleja decae proporcionalmente con la frecuencia, lo que indica que el componente elástico del material es mayor que el viscoso (60). Por lo tanto, los materiales exhiben un marcado componente sólido, con relación al líquido, y son independientes de la frecuencia aplicada. Además, en comparación con la adición de VI, la misma respuesta puede observarse en el análisis de los barridos de amplitud, lo que confirma el aumento de la resistencia de los copolímeros.

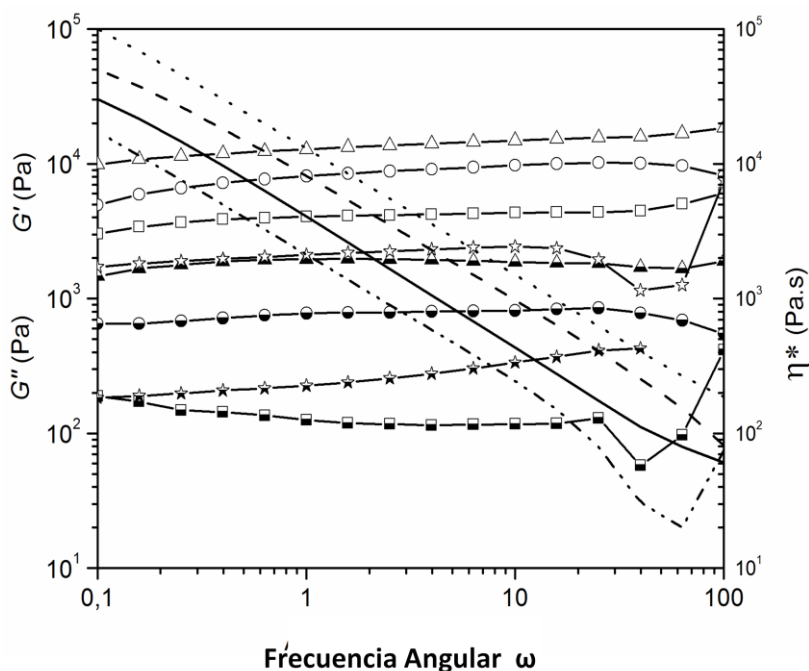


Figura 6.10. Barrido de frecuencia para (\square \blacksquare —) DMAEMT 100%; (\circ \bullet ---) DMAEMT-co-VI 20%; (\triangle \blacktriangle ...) DMAEMT-co-VI 60% y (\star \blackstar -.-) VI 100%; G' (lleno); G'' (vacío); η^* (líneas)

El VI 100% merece un análisis particular porque, a frecuencias muy altas, G' decae, elevándose luego abruptamente, mientras que el módulo de pérdida, G'' , no

se detecta. Aunque este comportamiento es atípico, podría ser el resultado de la resistencia proporcionada por los anillos imidazolínicos en los materiales. De este modo, se presume que al aumentar la frecuencia en la fuerza oscilatoria, las cadenas sufrirían un proceso de reacomodamiento, generando un incremento en la componente sólida, como consecuencia de la gran estabilidad de las interacciones entre cadenas, generada por los anillos. Inicialmente, la caída podría atribuirse a que, la frecuencia oscilatoria generaría movimiento entre las cadenas, produciendo repulsión por la elevada densidad electrónica de los anillos de imidazol. Entonces, la estabilidad podría ser predominante sobre el efecto repulsivo, dando lugar al incremento en la componente sólida, y con ello en la viscosidad dinámica, mencionado anteriormente. Finalmente, cabe mencionar que los materiales no muestran variación significativa frente a la frecuencia en la fuerza aplicada. Por lo tanto, la discusión anterior en base a los barridos de amplitud podría aplicarse a otros valores de frecuencia entre 0,1 a 100 Hz, no sólo para $\omega = 10$ Hz.

6.3.5. PROPIEDADES MECÁNICAS

Como ya se mencionó anteriormente, el módulo de Young (pendiente inicial) representa la deformación reversible que es capaz de sufrir un material. Por otro lado, la máxima carga de compresión indica la fuerza máxima que es capaz de soportar un dado material, antes de fracturarse. La Tabla 6.3 muestra las características mecánicas de los diferentes hidrogeles. Se puede observar que, a medida que la proporción de VI es mayor, la pendiente inicial se incrementa, generando un mayor comportamiento sólido, haciendo a los hidrogeles más resistentes frente a una fuerza de compresión. Las propiedades mecánicas mejoran notablemente por la adición de VI, ya que se genera un claro aumento en la resistencia a la fuerza de compresión. El anillo imidazol podría producir una gran interacción entre las cadenas del polímero por efecto resonante, generando el aumento en la resistencia a una dada fuerza de compresión.

Por otra parte, la incorporación de VI mejora la resistencia de los materiales y aumenta la tensión o fuerza a la que se debe someter el material para deformarlo (Figura 6.11). La Tabla 6.3 detalla la máxima deformación antes de la rotura que pueden soportar los productos. Se puede observar que los más deformables fueron los que contienen DMAEMT en su estructura. Los más resistentes fueron el DMAPMD-co-VI 60% y el DMAEMT-co-VI 60%. Por la adición de VI, se produce un marcado efecto sinérgico. Sus pendientes iniciales aumentaron 5 y 10 veces, respectivamente, con respecto a los hidrogeles producidos a partir de los monómeros puros.

Tabla 6.3. Propiedades mecánicas de los materiales

Hidrogel	Pendiente Inicial (MPa)	Máxima tensión de deformación (MPa)	Máxima deformación (%)
DMAPMD 100%	0,0150	0,0209	44
DMAPMD-co-VI 20%	0,0220	0,0350	39
DMAPMD-co-VI 60%	0,0645	0,0591	36
DMAEMT 100%	0,0061	0,0508	82
DMAEMT-co-VI 20%	0,0180	0,0511	67
DMAEMT-co-VI 60%	0,0675	0,0587	58
VI100	0,0116	0,0309	55

Se realizó un análisis de varianza (Anova) y test de Tukey con nivel de significancia del 5 %

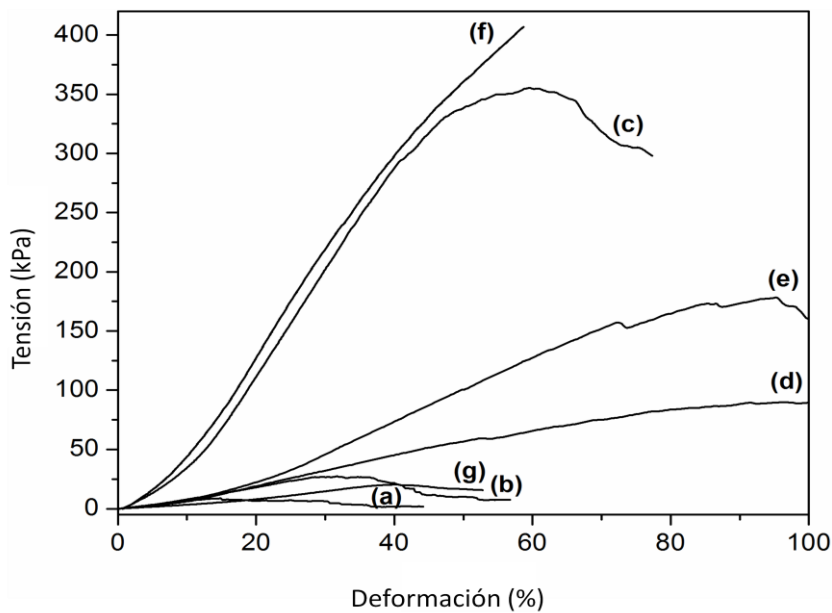


Figura 6.11. Respuesta mecánica para (a) DMAPMD 100%; (b) DMAPMD-co-VI 20%; (c) DMAPMD-co-VI 60%; (d) DMAEMT 100%; (e) DMAEMT-co-VI 20%; (f) DMAEMT-co-VI 60% y (g) VI 100%

6.3.6. ESTUDIO DE VP-SEM

Teniendo en cuenta la morfología de cada material, se puede afirmar que los hidrogeles que contienen DMAPMD (Figuras 6.12 a, b y c) tienen poros más grandes que los que contienen DMAEMT (Figuras 6.12 d, e y f). A su vez, la incorporación de VI en los productos generó una gran disminución en el tamaño de poros hasta el colapso completo de VI 100%, donde no se observó la presencia de poros.

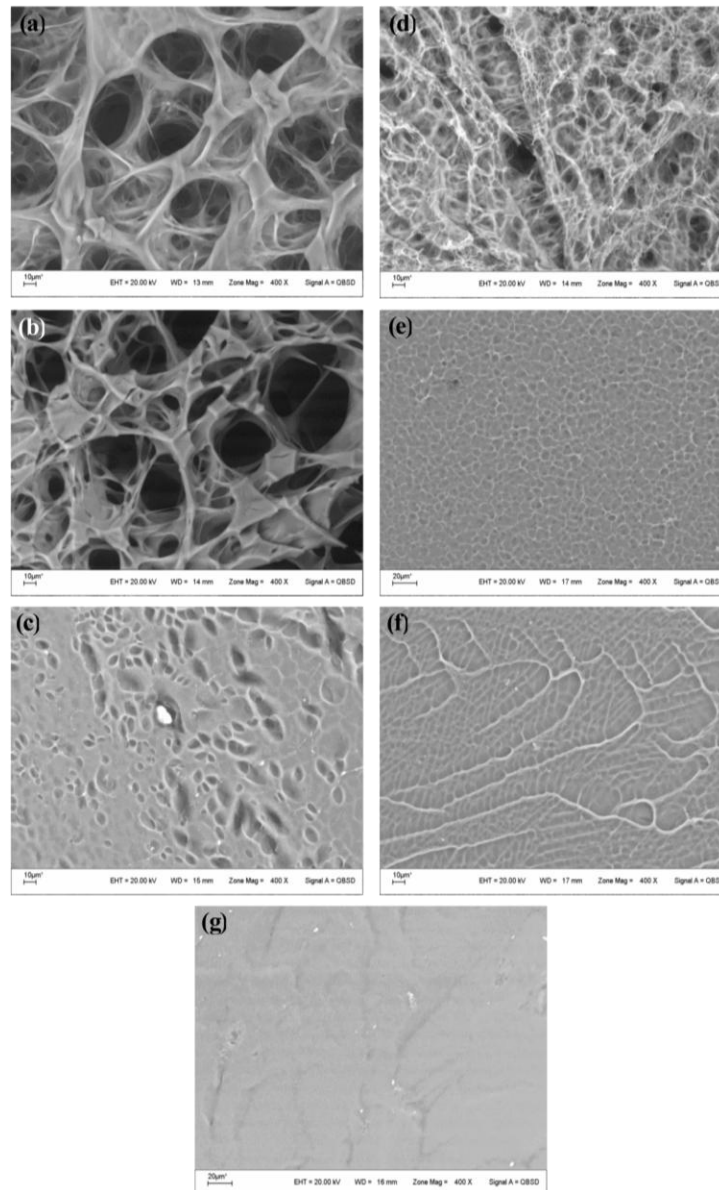


Figura 6.12. Imágenes de VP-SEM (400x) de (a) DMAPMD 100%, (b) DMAPMD-co-VI 20%, (c) DMAPMD-co-VI 60%, (d) DMAEMT 100%, (e) DMAEMT-co-VI 20%, (f) DMAEMT-co-VI 60% y (g) VI 100%

Los hidrogeles que contienen DMAPMD, tienen los valores más altos de q_w (Tabla 6.2), en concordancia con los tamaños de poro más grandes observados (Figura 6.12). Con la adición de VI, q_w y el tamaño de poros disminuyen. Los hidrogeles que contienen DMAEMT tienen poros más pequeños y menores valores de q_w respecto a los que contienen DMAPMD, lo que refleja su arquitectura

estructural. Por lo tanto, el tamaño de poro está relacionado con el espacio disponible para la entrada de agua en el material. Por ejemplo, el observado por VP-SEM está de acuerdo con los valores de coeficientes de difusión que se mostraron en la Tabla 6.2.

El VI 100% presenta el mayor valor de densidad (Tabla 6.2) y esta propiedad disminuye con la incorporación de los co-monómeros. Esto concuerda con los resultados que se muestran en la Figura 6.12 (g): en un volumen dado, la cantidad de VI 100% se encuentra más compacta respecto a aquellos materiales con estructura porosa. En resumen, la Tabla 6.2 y la Figura 6.12 muestran la consecuencia de la incorporación del VI en la porosidad de los productos. El VI crea interacciones atractivas en los hidrogeles que contienen DMAPMD y DMAEMT y, como consecuencia, el tamaño de poro disminuye. Por lo tanto, los datos mostrados en la Tabla 6.2 son consistentes con los de estudios de la morfología de cada material.

6.3.7. RETENCIÓN DE METALES, INMOVILIZACIÓN DE ENZIMA CATALASA SOBRE EL COMPLEJO HIDROGEL/ Cu^{2+} Y ENSAYO DE DESCOMPOSICIÓN DE PERÓXIDO DE HIDROGENO CON EL COMPLEJO HIDROGEL/ Cu^{2+} Y EL COMPLEJO HIDROGEL/ Cu^{2+} /ENZIMA CATALASA

Los hidrogeles DMAPMD 100%, DMAPMD-co-VI 20% y DMAPMD-co-VI 60% fueron puestos en contacto con cuatro soluciones de concentraciones conocidas de cobre y plomo (en forma individual y en forma competitiva). Se dejaron en contacto durante 48 h, hasta alcanzar el equilibrio de hinchamiento. Luego, se tomaron alícuotas de cada sobrenadante, para determinar la concentración del ion metálico, por medio de absorción atómica. Se realizó una curva de calibración con seis concentraciones estandarizadas y, a partir de ella se procedió a medir la concentración de los iones no retenidos. A partir de estos valores de concentración, fueron construidas las isothermas de adsorción. Los parámetros de adsorción fueron obtenidos a partir del modelo que mejor explicó el

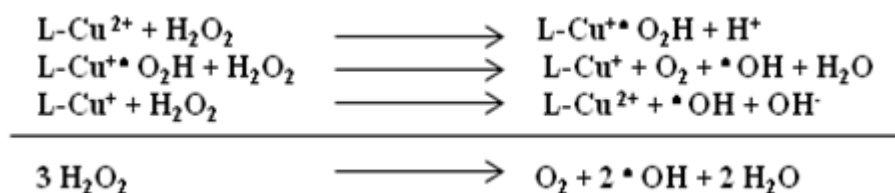
fenómeno adsortivo, siendo en todos los casos, el de Langmuir. Los resultados ajustaron a dicho modelo, a partir del cual se pudo calcular la retención máxima de cada hidrogel. Los resultados, demostraron que la capacidad máxima de adsorción de Cu^{2+} y Pb^{2+} de DMAPMD 100%, fue de 117,65 mg de Cu^{2+} /g de polímero y 173,91 mg de Pb^{2+} /g de polímero. El DMAPMD-co-VI 20% retuvo 135,63 mg de Cu^{2+} /g de polímero y 105,82 mg de Pb^{2+} /g de polímero, mientras que el DMAPMD-co-VI 60% retuvo 163,90 mg de Cu^{2+} /g de polímero y 100,87 mg de Pb^{2+} /g de polímero. En la Tabla 6.4 se puede observar que, a medida que aumenta la proporción del VI en la red, aumenta la retención de Cu^{2+} y disminuye la de Pb^{2+} . Cuando ambos metales están en competencia, la selectividad de las matrices por la retención de Cu^{2+} aumenta al aumentar la proporción de VI en la red.

El DMAPMD-co-VI 20% y el DMAPMD-co-VI 60% tuvieron capacidad de retener ambos metales. Además, tienen mejores propiedades mecánicas respecto al DMAPMD 100 %, lo que genera mejores características como adsorbentes, y como complejo polímero-metal, para su posterior uso en inmovilización de enzimas.

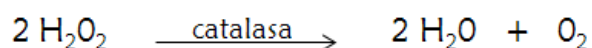
Tabla 6.4. Valores de retención de Cu^{2+} y Pb^{2+} a partir de los hidrogeles

Hidrogel	Cu^{2+}		Remoción competitiva de Cu^{2+}	
	X_{\max} (mg/g)	b (L/mg)	X_{\max} (mg/g)	b (L/mg)
DMAPMD 100%	117,65	0,040	43,84	0,190
DMAPMD-co-VI 20%	135,63	0,232	47,15	2,090
DMAPMD-co-VI 60%	163,90	0,108	48,92	0,860
	Pb^{2+}		Remoción competitiva de Pb^{2+}	
	X_{\max} (mg/g)	b (L/mg)	X_{\max} (mg/g)	b (L/mg)
DMAPMD 100%	173,91	0,044	-	-
DMAPMD-co-VI 20%	105,82	0,028	-	-
DMAPMD-co-VI 60%	100,87	0,018	51,36	0,12

Por otra parte, se estudió la efectividad de los nuevos hidrogeles acomplejados con Cu^{2+} en la descomposición de peróxido de hidrógeno, según el siguiente esquema, para poder ser aplicados en catálisis heterogénea (61):



Por otro lado, la catalasa, que es una enzima perteneciente a la categoría de las oxidoreductasas, se encuentra en las células de los tejidos animales y vegetales. Su función en los tejidos es necesaria porque durante el metabolismo celular, cataliza la descomposición del H_2O_2 que se forma, en agua y oxígeno según el siguiente esquema (62):



Por esto, las matrices con Cu^{2+} adsorbido se usaron para ensayar la efectividad en la descomposición de H_2O_2 , y se las comparó con matrices que contienen metal adsorbido y la enzima catalasa inmovilizada.

La Figura 6.13 muestra los valores, en moles, de descomposición de peróxido de hidrógeno en función del tiempo. En los casos en los que se usaron los complejos polímero-metal, la descomposición de H_2O_2 fue efectiva. En general, a mayor cantidad de Cu^{2+} adsorbido (DMAPMD-co-VI 60%- Cu^{2+}), la descomposición resultó mayor.

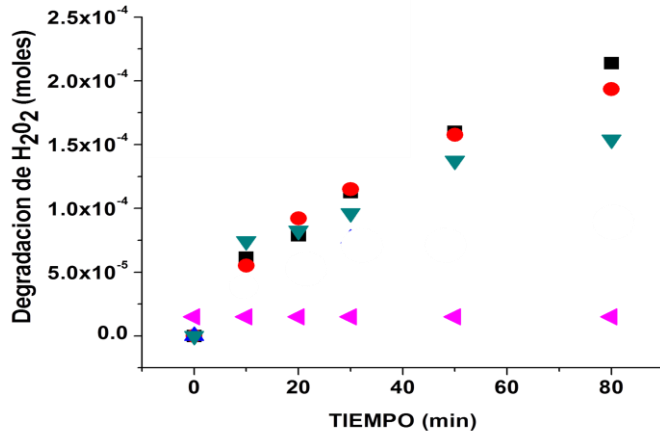


Figura 6.13 Valores en moles de descomposición de H₂O₂ en función del tiempo usando: (■) DMAPMD-co-VI 60%-Cu²⁺; (●) DMAPMD-co-VI 20% Cu²⁺; (▼) DMAPMD 100% Cu²⁺; (◄) Blanco, sin hidrogel (Control)

Los productos DMAPMD 100%, DMAPMD-co-VI 20% y DMAPMD-co-VI 60% que habían retenido 117,65; 135,63 y 163,90 mg de Cu²⁺/g de polímero, respectivamente, inmovilizaron a su vez 50, 44 y 37 mg de enzima catalasa por gramo de hidrogel, respectivamente. Esto indica que, a menor cantidad de Cu²⁺ adsorbido, mayor fue la proporción de enzima inmovilizada. Así mismo, en los casos de las matrices que tienen catalasa, la mayor eficiencia en la descomposición se observó en las matrices que fueron capaces de inmovilizar mayor cantidad de la enzima (Figura 6.14). Cabe destacar que la descomposición de peróxido de hidrógeno resultó eficiente en todos los casos.

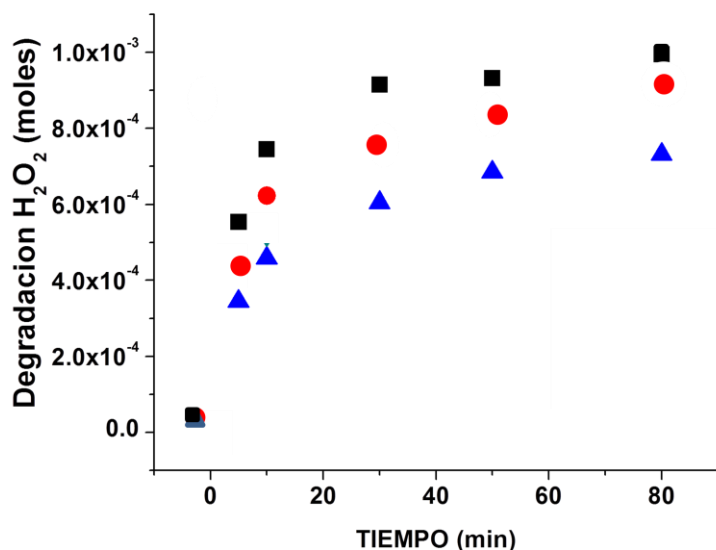


Figura 6.14. Valores en moles de descomposición de H₂O₂ en función del tiempo usando: (■) DMAPMD 100% Cu²⁺/catalasa; (●) DMAPMD-co-VI 20%-Cu²⁺/catalasa y (▲) DMAPMD-co-VI 60% Cu²⁺/catalasa

6.4. CONCLUSIONES

Todos los hidrogeles sintetizados resultaron con grupos funcionales específicos en sus estructuras ya que se utilizó DMAPMD, DMAEMT y VI como monómeros mono-vinílicos y BIS como agente entrecruzante. Diferentes proporciones del VI se incorporaron en las estructuras del polímero, a fin de producir hidrogeles mecánicamente fuertes. Los productos resultaron novedosos, de tipo barra, homogéneos, expandibles e hinchables en agua. Los estudios de propiedades mecánicas mostraron que la incorporación del VI aumentó la rigidez de los materiales.

La tensión máxima de deformación, el módulo de Young y el módulo elástico (G') aumentaron cuando la fracción del VI fue de 0,6 en ambos casos, ya sea que el co-monómero fuera DMAEMT o DMAPMD. Los valores de q_w disminuyeron

con el aumento de la fracción molar del VI, independientemente del co-monómero, lo que indica que las interacciones entre cadenas se intensifican por la presencia del VI.

Probablemente, el efecto sinérgico no es causado por los grupos amida o éster presentes en el DMAPMD y el DMAEMT, respectivamente, ya que el aumento es similar en ambos casos. Es probable que las interacciones favorables se produzcan entre el VI y los monómeros DMAPMD y DMAEMT, porque las determinaciones de tensión máxima de deformación resultaron más altas que las de sus respectivos homo-polímeros.

La relación de 3:2 (VI:co-monómero) es la que otorga mayor sinergia, lo que podría indicar que el DMAEMT o el DMAPMD podrían actuar como espaciadores o separadores de los anillos de imidazol, aumentando el módulo y la tensión máxima de deformación. Esto podría explicar la presencia de la menor RVL, basada en el corto alcance de las interacciones del anillo VI.

Los materiales optimizados, con alto efecto sinérgico, fueron usados en retención de iones metálicos. Los hidrogeles que contienen VI (tal como DMAPMD-co-VI 20%) fueron capaces de retener ambos metales, destacando que tienen mejores propiedades mecánicas respecto a DMAPMD 100%. Esto genera mejores características como adsorbente, confiriéndole además mejores propiedades finales al complejo polímero-metal formado, para posterior uso en inmovilización de enzimas.

Las matrices con Cu^{2+} adsorbido, se usaron para ensayar la efectividad en la descomposición de H_2O_2 , y se las comparó con matrices que contienen metal adsorbido y la enzima catalasa inmovilizada. En los casos en los que se usaron los complejos polímero-metal, la descomposición de peróxido de hidrógeno fue efectiva y, a mayor cantidad de Cu^{2+} adsorbido, la descomposición, en general, resultó mayor. Así mismo, en los casos de las matrices que tienen catalasa inmovilizada, la mayor eficiencia en la descomposición se observó en las matrices que fueron capaces de inmovilizar mayor cantidad de la enzima. Cabe destacar que, la descomposición de H_2O_2 resultó efectiva en todos casos.

REFERENCIAS

- 1- Osman, B., Kara, A., Uzun, L., Besirli, N., Denizli, A., Vinyl imidazole carrying metal-chelated beads for reversible use in yeast invertase adsorption. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 37, 88 (2005).
- 2- Ramírez, E., Burillo, S. G., Barrera-Díaz, C., Roa, G., Bilyeu, B., Use of pH-sensitive polymer hydrogels in lead removal from aqueous solution. *J. Hazard. Mater.* 192, 432 (2011).
- 3- Carvalho, B. M. A., Da Silva, S. L., Da Silva, L. H. M., Minim, V. P. R., Da Silva, M. C. H., Carvalho, L. M., Minim L. A., Cryogel poly(Acrylamide): synthesis, structure and applications. *Sep. Purif. Rev.* 43, 241 (2014).
- 4- Kowalczyk, A., Fau, M., Karbarz, M., Donten, M., Stojek, Z., Nowicka, A. M., Hydrogel with chains functionalized with carboxyl groups as universal 3D platform in DNA biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 54, 222 (2014).
- 5- Morán-Quiroz, J. L., Orozco-Guareño, E., Manríquez, R., Carbajal-Arízaga, G. G., de la Cruz, W., Gomez-Salazar, S., Polymeric hydrogels obtained using a redox initiator: Application in Cu(II) ions removal from aqueous solutions. *J. Appl. Polym. Sci.* 131 (2014).
- 6- Mao, R., Tang, J., Swanson, B. G., Texture properties of high and low acyl mixed gellan gels. *Carbohydr. Poly.* 41, 331 (2000).
- 7- Kloxin, A. M., Kloxin, C. J., Bowman, C. N., Anseth, K. S., Mechanical properties of cellularly responsive hydrogels and their experimental determination. *Adv. Mater.* 22, 3484 (2010).
- 8- Sakai, T., Matsunaga, T., Yamamoto, Y., Ito, C., Yoshida, R., Suzuki, S., Sasaki, N., Shibayama, M., Chung U., Design and fabrication of a high-strength hydrogel with ideally homogeneous network structure from tetrahedron-like macromonomers. *Macromolecules* 41, 5379 (2008).
- 9- Li, D. M., Zhang, Z., Liew, K. M., A numerical framework for two-dimensional large deformation of inhomogeneous swelling of gels using the improved complex

variable element-free Galerkin method. *Comput. Methods Appl. Mech. Eng.* 274, 84 (2014).

10- Nielsen, L. E., Landel, R. F., in *Mechanical properties of polymers and composites*, Ed. M. Dekker, New York, 2da. Ed. (1994).

11- Shibayama, M., *Spatial inhomogeneity and dynamic fluctuations of polymer gels. Macromol. Chem. Phys.* 199, 1 (1998).

12- Straccia, M. C., Romano, I., Oliva, A., Santagata, G., Laurienzo, P., *Cross linker effects on functional properties of alginate/N-succinylchitosan based hydrogels. Carbohydr. Polym.* 108, 321 (2014).

13- Papageorgiou, D. G., Bikiaris, D. N., Chrissafis, K., *Effect of crystalline structure of polypropylene random copolymers on mechanical properties and thermal degradation kinetics. Thermochim. Acta* 543, 288 (2012).

14- Cram, S., Brown, H., Spinks, G., Hourdet, D., Creton, C., *Hydrophobically modified acrylamide-based hydrogels, Proc. SPIE 5648, Smart Materials III, 153, Sydney, Australia (2004).*

15- Li, Y., Qin, M., Cao, Y., Wang, W., *Designing the mechanical properties of peptide-based supramolecular hydrogels for biomedical applications. Sci. China: Phys., Mech. Astron.* 57, 849 (2014).

16- Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Roveri, N., Rubin, K., *Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. Biomaterials* 23, 4827 (2002).

17- Wang, Y., Chen, D., *Preparation and characterization of a novel stimuli-responsive nanocomposite hydrogel with improved mechanical properties. J. Colloid Interface Sci.* 372, 245 (2012).

18- Wang, N., Han Y., Liu, Y., Bai, T., Gao, H., Zhang, P., Wang, W., Liu, W., *High-strength hydrogel as a reusable adsorbent of copper ions. J. Hazard. Mater.* 258, 213 (2012).

19- Cui, J., Lackey, M. A., Madkour, A.,E., Saffer, E. M., Griffin, D. M., Bhatia, S. R., Crosby, A. J., Tew, G. N., *Synthetically simple, highly resilient hydrogels. Biomacromolecules* 13, 3, 584 (2012).

- 20- Sun, J.-Y., Zhao, X., Illeperuma, W. R. K., Chaudhuri, O., Oh, K. H., Mooney, D. J., Vlassak, J. J., Suo, Z., Highly stretchable and tough hydrogels. *Nature* 489, 133 (2012).
- 21- Jang, W., Choi, S., Kim, S. H., Yoon, E., Lim, H.-G., Kim, Y. J., A Comparative study on mechanical and biochemical properties of bovine pericardium after single or double crosslinking treatment. *Korean Circ J* 154 (2012).
- 22- Gong, J. P., Why are double network hydrogels so tough?. *Soft Matter* 6, 12, 2583 (2010).
- 23- Tominaga, T., Tirumala, V. R., Lin, E. K., Gong, J. P., Furukawa, H., Osada, Y., Wu, W.-L. The molecular origin of enhanced toughness in double network hydrogels: A neutron scattering study. *Polymer* 48, 7449 (2007).
- 24- Jayawarna Vineetha, R., Stephen, M., Hirst Andrew, R., Hodson, N. W., Saiani, A., Gough, J. E., Ulijn Rein, V., Introducing chemical functionality in Fmoc-peptide gels for cell culture. *Acta Biomaterialia* 5, 934 (2009).
- 25- Tronci, G., Doyle, A., Russell, S. J., David J., Triple-helical collagen hydrogels via covalent aromatic functionalisation with 1,3-phenylenediacetic acid. *J. Mater. Chem. B* 1, 5478 (2013).
- 26- Bayramoglu, G., Bitirim, V., Tunali, Y., Arica, M. Y., Akcali, K. C., Poly(hydroxyethyl methacrylate-glycidyl methacrylate) films modified with different functional groups: In vitro interactions with platelets and rat stem cell. *Materials Science and Engineering C* 33, 801 (2013).
- 27- Di Rienzo, A. L., Yakacki, C. M., Frensemeier, M., Schneider, A. S., Safranski, D. L., Hoyt, A. J., Frick, C. P., Porous poly(para-phenylene) scaffolds for load-bearing orthopedic applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 30, 347 (2014).
- 28- Kavianiina, I., Pliegera, P. G., Kandileb, N. G., David, R. K. New hydrogels based on symmetrical aromatic anhydrides: Synthesis, characterization and metal ion adsorption evaluation. *Carbohydrate Polymers* 87, 881 (2012).
- 29- He, J., Machida, S., Kishi, H., Horie, K., Furukawa, H., Yokota, R., Preparation of novel, high-modulus, swollen- or jungle-gym-type polyimide gels end-crosslinked

with 1,3,5-tris(4-aminophenyl)benzene. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 40, 2501 (2002).

30- Rivas, B. L., Maturana, H. A., Molina, M. J., Gómez-Antón, M. R., Piérola, I. F., Metal ion binding properties of poly(N-vinylimidazole) hydrogels. *J. Appl. Polym. Sci.* 67, 1109 (1998).

31- Chen, G., Lau, K. K. S., Gleason, K. K., iCVD growth of poly(N-vinylimidazole) and poly(N-vinylimidazole-co-N-vinylpyrrolidone). *Thin Solid Films* 517, 3539 (2009).

32- Wahdan, M. H., Gomma, G. K., Effect of copper cation on electrochemical behaviour of steel in presence of imidazole in acid medium. *Mater. Chem. Phys.* 47, 176 (1997).

33- Zhang, W., Wang, H., Shentu, B., Gu, C., Weng Z., Aerobic oxidative polymerization of 2,6-dimethylphenol in water with a highly efficient copper(II)-poly(N-vinylimidazole) complex catalyst. *J. Appl. Polym. Sci.* 120, 109 (2011).

34- Pekel, N., Savas, H., Güve, O., Complex formation and adsorption of V^{3+} , Cr^{3+} and Fe^{3+} ions with poly (N-vinylimidazole). *Colloid Polym. Sci.* 280, 46 (2002).

35- Caner, H., Yilmaz, E., Yilmaz, O., Synthesis, characterization and antibacterial activity of poly(N-vinylimidazole) grafted chitosan. *Carbohydr. Poly.* 69, 318 (2007).

36- El-Hamsharya, H., Foudaa, M. M. G, Moydeena, M., Al-Deyab, S. S., Synthesis and antibacterial of carboxymethyl starch-grafted poly(vinyl imidazole) against some plant pathogens. *Int. J. Biol. Macromol.* 66, 289 (2014).

37- Ibrahim Unal, H., Erol, O., Yunus Gumus, O., Quaternized-poly(N-vinylimidazole)/montmorillonite nanocomposite: Synthesis, characterization and electrokinetic properties. *Colloids Surf. A* 442, 132 (2014).

38- Shin, J., Han, S. G., Lee, W., Inverse opal pH sensors with various protic monomers copolymerized with polyhydroxyethylmethacrylate hydrogel. *Anal. Chim. Acta* 752, 87 (2012).

39- Domján, A., Fodor, C., Kovács, S., Marek T., Iván B., Süvegh K., Anomalous swelling behavior of poly(N-vinylimidazole)-l-poly(tetrahydrofuran) amphiphilic

conetwork in water studied by solid-state NMR and positron annihilation lifetime spectroscopy. *Macromolecules* 45, 7557 (2012).

40- Molina, M. J., Gómez-Antón, M. R., Piérola, I. F., Factors driving the protonation of poly(N-vinylimidazole) hydrogels. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* 42, 2294 (2004).

41- Üzümlü, Ö. B., Karadağ, E., Swelling characterization of poly (acrylamide-co-N-vinylimidazole) hydrogels crosslinked by TMPTA and semi-IPN's with PEG. *J. Polym. Res.* 14, 483 (2007).

42- Isik, B., Dogantekin, B., Swelling behavior of poly(acrylamide-co-N-vinylimidazole) hydrogels under different environment conditions. *J. Appl. Polym. Sci.* 96, 1783 (2005).

43- Anderson, E. B., Long, T. E., Imidazole and imidazolium-containing polymers for biology and material science applications. *Polymer* 51, 2447 (2010).

44- Carr, L., Cheng, G., Xue, H., Jiang, S., Engineering the polymer backbone to strengthen nonfouling sulfobetaine hydrogels. *Langmuir* 26, 14793 (2010).

45- Pekel, N., Salih, B., Güven, O., Enhancement of stability of glucose oxidase by immobilization onto metal ion-chelated poly(N-vinyl imidazole) hydrogels. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 16, 253 (2005).

46- Pekel, N., Salih, B., Güven, O., Activity studies of glucose oxidase immobilized onto poly(N-vinylimidazole) and metal ion-chelated poly(N-vinylimidazole) hydrogels. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 21, 273 (2003).

47- Akgöl, S., Öztürk, N., Karagözler, A. A., Uygun, D. A., Uygun, M., Denizli, A., A new metal-chelated beads for reversible use in uricase adsorption. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 51, 36 (2008).

48- Park, K. H., Lee, D. H., Na K., Transplantation of poly(N-isopropylacrylamide-co-vinylimidazole) hydrogel constructs composed of rabbit chondrocytes and growth factor-loaded nanoparticles for neocartilage formation. *Biotechnol. Lett.* 31, 337 (2009).

49- Amidon, G., Lee, P. I., Topp, E. M., en *Transport Process in Pharmaceutical Systems*, Ed. Marcel Dekker Inc. (2000).

- 50- De Ruiter, J., en *Principles of Drug Action*, Ed. Springer (2005).
- 51- Cammers, A., Parkin, S., Solid state hydrogen bonding in imidazole derivatives: a persistent tape motif. *Cryst. Eng. Comm.* 6, 168 (2004).
- 52- Sahiner, N., Butun, S., Ozay, O., Dibek, B., Utilization of smart hydrogel–metal composites as catalysis media. *J. Colloid Interface Sci* 373, 122 (2012).
- 53-Çaykara, T., İnam, R., Determination of average molecular weight between crosslinks and polymer–solvent interaction parameters of poly(acrylamide-g-ethylene diamine tetraacetic acid) polyelectrolyte hydrogels. *J. Appl. Polym. Sci.* 91, 2168 (2004).
- 54- Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H., Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 27 (2000).
- 55- Friedman, M. H., en *Principles and Models of Biological Transport*, Ed. Springer, 2da Ed. (2008).
- 56- Braihi, A. J., Salih, S. I., Hashem, F. A., Viscoelastic and rheological properties of carboxymethyl cellulose /starch/graphite oxide as superabsorbent hydrogel nano composites (SHNCs). *International Journal of Materials Science and Applications* 4, 2-1, 30 (2015).
- 57- Soares, P. A. G., Bourbon, A. I., Vicente, A. A., Andrade, C. A. S., Barros Jr., W., Correia, M. T. S., Pessoa Jr., A., Carneiro-da-Cunha, M. G., Development and characterization of hydrogels based on natural polysaccharides: Policaçu and chitosan. *Materials Science and Engineering C* 42, 219 (2014).
- 58- Akihiro, T., Baiju, J., Shuichi, A., Masami, O., Structure and rheology of nanocomposite hydrogels composed of DNA and clay. *European Polymer Journal* 49, 923 (2013).
- 59- Jiao, Y., Gyawali, D., Stark, J. M., Akcora, P., Nair, P., Tran, R. T., Yang, J., A rheological study of biodegradable injectable PEGMC/HA composite scaffolds. *Soft Matter* 8, 1499 (2012).
- 60- Lawal, O. S., Storz, J., Storz, H., Lohmann, D., Lechner, D., Kulicke, W-M. Hydrogels based on carboxymethyl cassava starch cross-linked with di- or polyfunctional carboxylic acids: Synthesis, water absorbent behavior and rheological

characterizations. *European Polymer Journal* 45, 12, 3399 (2009).

61- Lázaro Martínez, J. M., Rodríguez-Castellón, E., Torres Sánchez, R. M., Denaday, L. R., Buldain, G. Y., Campo Dall'Orto, V. XPS studies on the Cu(I,II)-polyampholyte heterogeneous catalyst: An insight into its structure and mechanism. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 339, 43 (2011).

62- Raducan, A., Cantemir, A. R., Puiu, M., Oancea, D. Kinetics of hydrogen peroxide decomposition by catalase: Hydroxylic solvent effects. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35, 1523 (2012).

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES GENERALES DEL TRABAJO DE TESIS

CONCLUSIONES GENERALES

El objetivo principal de este trabajo de Tesis, fue obtener nuevos hidrogeles con grupos funcionales específicos en sus estructuras, que sean efectivos para la inmovilización de moléculas biológicas o para la retención de iones metálicos. La búsqueda de propiedades mecánicas óptimas, fue de gran importancia debido a que la reutilización de estos sistemas poliméricos, es fundamental para su relevancia en las áreas de biocatálisis, catálisis y descontaminación de efluentes. Para lograr el objetivo de este trabajo de Tesis, se planteó entonces la combinación de numerosos monómeros, considerando las ventajas que aportan cada uno de ellos.

En el primer sistema estudiado, se logró la síntesis de hidrogeles de acrilamida (AAm) entrecruzados con N, N'-metilen bisacrilamida (BIS) utilizando distintas condiciones experimentales de síntesis, que dieron lugar a dos productos diferentes, barras y partículas. Ambos productos fueron modificados químicamente para obtener grupos amino primario. La incorporación de dichos grupos, le confirió a los productos la capacidad de hinchamiento dependiente del pH, y fundamentalmente la capacidad de retener alta cantidad de Cu^{+2} . Cabe destacar, que las mejores retenciones se lograron a partir de las matrices poliméricas obtenidas en forma de barra. Esto, fue posiblemente debido a la presencia de canales, que le otorgarían a la matriz una gran superficie de contacto con el ion metálico. Es importante destacar que, a pesar de la simplicidad de dicho sistema, se lograron retenciones de Cu^{+2} comparables o aún mayores, respecto a los de trabajos previos donde se estudiaron sistemas similares.

La principal desventaja de este sistema, fue la falta reproducibilidad, debido posiblemente a la reacción de hidrólisis secundaria, producida paralelamente a la reacción de modificación de las matrices.

Posteriormente, se planteó partir de los monómeros 2-aminoetil metacrilato (AEMA), para incorporar directamente los grupos amino primario en la estructura de la red, y N-acrilóil-tris (hidroximetil) aminometano (NAT), que posee tres grupos hidroxilo que estabilizan la red a partir de la formación de puentes de hidrogeno. La

presencia de los grupos amino, fue considerada de importancia debido a la factibilidad de derivatización para luego inmovilizar una molécula biológica.

Sobre este sistema, se logró la síntesis de matrices basadas en NAT, y de tipo NAT-co-AEMA, donde AEMA fue incorporado en diferentes proporciones. Todos los productos resultaron hidrogeles de tipo homogéneos, expandibles e hinchables en agua.

Posteriormente, se logró la incorporación de grupos epóxido mediante el uso de epicloridina (ECH) y 1,4 butanodiol diglicidil éter (BDGE). Sobre ambas matrices activadas con los grupos epóxido, se logró la inmovilización de la enzima *Candida rugosa*. Los mayores porcentajes de actividad de la enzima, se lograron cuando se usó BDGE, de mayor longitud, actuando además, como “brazo” espaciador.

También, a través de la técnica de modificación superficial de *grafting* o injerto, se incorporaron cadenas laterales poliméricas, a partir de AEMA, logrando grupos amino que permitieron la inmovilización de la enzima. Estos productos, donde la enzima se encuentra más alejada de la red polimérica, arrojaron resultados de porcentajes de actividad enzimática aún mayores, con respecto a la enzima libre.

Si bien se logró la reutilización del sistema, conservando altos porcentajes de actividad enzimática, se intentó optimizar más aun las propiedades mecánicas de los productos, incorporando mayor cantidad de agente entrecruzante. Las propiedades mecánicas se vieron efectivamente mejoradas, manteniéndose altos porcentajes de actividad enzimática. De esta forma, se obtuvieron hidrogeles resistentes y promisorios a ser utilizados en varios ciclos de catálisis.

Posteriormente, el trabajo fue enfocado hacia la búsqueda de un nuevo sistema eficaz para la retención de iones metálicos, en base a antecedentes de polímeros con grupos amida, amina y ácido, entre otros, que interactúan con iones metálicos a través de la formación de complejos. Se realizó la síntesis de hidrogeles de N-[3-(dimetilamino) propil] metacrilamida (DMAPMD), lográndose condiciones de síntesis óptimas para alcanzar alta retención y recuperación de Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} y Hg^{2+} . Los estudios evidenciaron que el grupo amino terciario presente en las redes poliméricas, sería el responsable de la formación del complejo.

Al realizar las isotermas de adsorción y analizar valores de coeficientes de correlación, se determinó que los datos experimentales para Cu^{2+} , Zn^{2+} y Pb^{2+} ajustan al modelo de Langmuir, que postula que la superficie tiene un número fijo de centros activos idénticos y definidos y que la adsorción es en monocapas, uniforme y sobre una superficie homogénea. Para el caso del Hg^{2+} , ajustan al modelo de Freundlich. Este último, describe el equilibrio sobre una superficie heterogénea y plantea un modelo “no ideal” de adsorción en multicapas, en el que los centros activos no tienen la misma energía de adsorción. Este comportamiento diferente, fue posiblemente debido a que los ensayos de retención de los iones metálicos fueron realizados a partir de soluciones de distinto pH: la retención de Hg^{2+} fue llevada a cabo a pH menor a 3, por problemas de solubilidad de la sal usada, mientras que la adsorción de Cu^{2+} , Zn^{2+} y Pb^{2+} , se llevó a cabo a pH mayor a 5. Cabe destacar que los hidrogeles utilizados en estos ensayos habían demostrado ser sensibles a los cambios de pH, mostrando diferente hinchamiento según el pH.

Considerando las excelentes características del sistema anterior en cuanto a retención y recuperación de los iones metálicos estudiados, y, en la búsqueda de mejorar las propiedades mecánicas manteniendo buena efectividad, se incorporó el monómero N-[3-(dimetilamino) etil] metacrilato (DMAEMT) en los productos.

Su incorporación a la red, otorgó mejoras considerables en las propiedades mecánicas de los productos, manteniéndose altos los porcentajes de retención de los iones metálicos. Una particularidad a destacar, fue que la incorporación de DMAEMT en la red polimérica, otorgó a los hidrogeles selectividad hacia la retención de Cu^{2+} , cuando los ensayos fueron realizados con una mezcla de Pb^{2+} y Cu^{2+} en bajas concentraciones.

DMAEMT y DMAPMD, usados en la preparación de los hidrogeles anteriores, son monómeros con características similares, excepto en su funcionalidad (éster y amida, respectivamente). En la última parte del trabajo de tesis, se analizó la alternativa de la utilización de grupos funcionales de tipo aromáticos para reforzar las propiedades mecánicas. Con este fin, se incorporó el monómero vinilimidazol (VI) en las redes poliméricas. Dicho monómero con características hidrofóbicas y

estructura aromática le otorgó mayor rigidez a los productos, encontrándose óptimas propiedades mecánicas. Además, en todas las matrices en las cuales se incorporó VI, se mantuvieron altos porcentajes en la retención de los iones metálicos.

Por otro lado, es importante destacar que, sobre las matrices que poseen Cu^{2+} adsorbido, se logró la inmovilización de la enzima *Catalasa* de forma efectiva.

Los productos DMAPMD-VI- Cu^{2+} (polímero-metal), se usaron para ensayar la efectividad en la descomposición de H_2O_2 , y se las comparó con matrices que contienen la enzima catalasa inmovilizada. En los casos en los que se usaron los complejos polímero-metal, la descomposición de H_2O_2 fue efectiva. También, se observó que, en general, a mayor cantidad de Cu^{2+} adsorbido, la descomposición resultó mayor. Así mismo, en los casos de las matrices con catalasa inmovilizada, la mayor eficiencia en la descomposición se logró con aquellas que fueron capaces de inmovilizar mayor cantidad de la enzima. Cabe destacar, que la descomposición de H_2O_2 resultó efectiva en todos casos.

Trabajos publicados durante el Trabajo de Tesis

-“Síntesis de hidrogeles de n-[3-(dimetilamino) propil] metacrilamida para retención de metales”. Trabajo realizado por María Florencia García Manzano y Cecilia I. Alvarez Igarzabal*, “*Revista Iberoamericana de Polímeros*”, 11 (7), 428-441 (2010) (ISSN 1988-4206).

-“Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on synthesized hydrogel for hydrolysis reaction”. Trabajo realizado por María Florencia García Manzano y Cecilia I. Alvarez Igarzabal*, “*Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*” 72, 28–35 (2011) (ISSN: 1381-1177).

-“Synthesis and characterization of hydrogels from 1-vinylimidazole. Highly resistant co-polymers with synergistic effect”. Trabajo realizado por Gastón A. Primo, María Florencia Garcia Manzano, Marcelo R. Romero y Cecilia I. Alvarez Igarzabal*, “*Materials Chemistry and Physics*” 153, 365-375 (2015) (ISSN: 0254-0584).

Presentación de trabajos en reuniones científicas

Nacionales:

-Síntesis y Caracterización de matrices hidrofílicas entrecruzadas para la inmovilización de Lipasa Rugosa. Garcia Manzano, M. Florencia; Alvarez Igarzabal, Cecilia I.; Cuartas Jornadas de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas. 23 y 24 de Septiembre de 2009, Facultad de Ciencias Químicas. Ciudad Universitaria. Córdoba.

-Hidrogeles: síntesis, modificación y estudio de propiedades. Garcia Manzano, M. Florencia y Alvarez Igarzabal, Cecilia I.; Workshop: Materia Blanda II- Rio Cuarto- 14 y 15 de Diciembre 2009.

-Síntesis y modificación de hidrogeles para la inmovilización de enzimas. María Florencia García Manzano y Cecilia Alvarez Igarzabal; Tercer Encuentro de Jóvenes

Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales que se realizó el 12 y 13 de Agosto de 2010 en Concepción del Uruguay.

-Síntesis de hidrogeles de N-[3-(dimetilamino) propil] metacrilamida para retención de Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} y Hg^{2+} . M. Florencia García Manzano, Gastón Primo y Cecilia Alvarez Igarzabal; IX Simposio Argentino de Polímeros (SAP 2011) que se llevó a cabo en el predio del Centro Científico Tecnológico de Conicet en la ciudad de Bahía Blanca entre el 15 y el 18 de Noviembre de 2011.

-Síntesis y caracterización de hidrogeles de n-[3-(dimetilamino)propil]metacrilamida-co-vinilimidazol para retención de metales. Aplicación en la descomposición de peróxido de hidrógeno. M. F. García Manzano, C. I. Alvarez Igarzabal, G. A. Primo; Cuarto Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia de Materiales (Cuarto JIM), que se realizó los días 8-10 de Octubre de 2012 en Mar del Plata, organizado por la Asociación Argentina de Materiales (SAM), la Facultad de Ingeniería de Mar del Plata y el Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA).

-Nuevos hidrogeles a partir de vinil-imidazol: síntesis, caracterización y uso en retención de metales pesados. Gastón A. Primo, Florencia García Manzano y Cecilia Inés Álvarez Igarzabal; X Simposio Argentino de Polímeros, que tuvo lugar del 28 al 30 de Agosto de 2013, en el Centro Cultural Borges en la Ciudad de Buenos Aires.

Internacionales:

-Materiales poliméricos funcionalizados: síntesis modificación y estudio de propiedades. M. Florencia García Manzano y Cecilia I. Alvarez I.; IV Simposio Binacional de Polímeros Argentino-Chileno Archipol IV, Viña del Mar (Chile) del 2 al 5 de Diciembre de 2007.

-Hidrogeles: Síntesis, caracterización y aplicaciones. Cecilia I. Alvarez Igarzabal, Julio Cuggino y Florencia García Manzano; XI Simposio Latinoamericano y IX Congreso Iberoamericano de Polímeros (SLAP-2008) que se llevó a cabo del 15 al 18 de Julio del 2008 en Lima-Perú.

-Síntesis y Caracterización de Matrices Hidrofílicas Entrecruzadas para la Inmovilización de Lipasa Rugosa. García Manzano, M.F.; Álvarez Igarzábal, C.I.; Archipol V (Simposio Binacional de Polímeros Argentino-Chileno Archipol V) que se realizó en octubre de 2009 en la Ciudad de Los Cocos, Córdoba.

-Síntesis de hidrogeles de N-[3-(dimetilamino)propil]metacrilamida para retención de metales (oral). Alvarez Igarzabal, Cecilia I., García Manzano, M. Florencia, Primo, Gastón A., XII Simposio Latinoamericano de Polímeros (SLAP 2010), X Congreso Iberoamericano de Polímeros (CIP 2010), I Congreso Centroamericano de Nanotecnología, I Congreso Nacional de Nanotecnología y I Congreso Nacional de Polímeros que se llevó a cabo en la ciudad de San José de Costa Rica, entre los días 13 y 16 de Julio de 2010.

-Synthesis and characterization of N-[3-(dimethylamine) propyl] methacrylamide copolymers for metals retention. María Florencia García Manzano y Cecilia Ines Alvarez Igarzabal; ACS Summer School on Green Chemistry and Sustainable Energy, que se llevo a cabo en Colorado School of Mines en Golden, Colorado del 25 Junio al 2 de Julio de 2012.

-Síntesis y caracterización de nuevos hidrogeles con potenciales aplicaciones en la retención selectiva de metales. María Florencia García Manzano, Gastón A. Primo, Cecilia Inés Alvarez Igarzabal (oral); XIII Simposio Latinoamericano de Polímeros y XI Congreso Iberoamericano de Polímeros (SLAP 2012) que se llevo a cabo en Bogotá, Colombia, del 23 al 26 de Septiembre de 2012.

-Preparación de nuevas matrices poliméricas entrecruzadas a partir de vinil-imidazol para la retención de metales pesados. Gastón A. Primo, Florencia Garcia Manzano y Cecilia Inés Alvarez Igarzabal; 13 Congreso Internacional en Ciencia y Tecnología de Metalurgia y Materiales 2013, Congreso SAM / CONAMET 2013, que tuvo lugar entre el 20 y 23 de Agosto, en Iguazú, Argentina.