



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**FORMACIÓN DE REDES INTERPENETRANTES DE N-ISOPROPILACRILAMIDA Y N-
ACRILOXISUCCINIMIDA PARA LA INMOVILIZACIÓN DE LÍPIDOS**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

I.Q. ALEJANDRA ORTEGA ARAMBURU

TUTOR: Dra. S. Guillermina Burillo Amezcua



AÑO: 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO

Presidente Dra. Martha Eugenia Albores Velasco

Primer Vocal Dr. Joaquín Palacios Alquisira

Segundo Vocal Dr. Rafael Herrera Nájera

Tercer Vocal Dr. Roberto Olayo González

Secretario Dr. Luis Felipe del Castillo Dávila

Primer Suplente Dra. Larissa Alexandrova Zarubina

Segundo Suplente Dr. Emilio Bucio Carrillo

Dra. S. Guillermina Burillo Amezcua I.Q. Alejandra Ortega Aramburu

Asesora

Sustentante

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Macromoléculas perteneciente al Departamento de Química de Radiaciones y Radioquímica del Instituto de Ciencias Nucleares de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo se presentó en los siguientes congresos:

- ✓ 8th Internacional Conference on Frontiers of Polymers and Advanced Materials (ICFPAM) que se llevó a cabo en Cancún Quintana Roo, México del 22 al 28 de abril del 2005

- ✓ 7th International Symposium on Ionizing Radiation and Polymers (IraP2006), realizado en Antalya, Turquía del 23 al 28 de septiembre del 2006.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, hermanos y sobrinos por que siempre me han apoyado en todo lo que he hecho sin importar que parezca una locura.

A Mauricio y Andi por ser la última fuerza impulsora para finalizar esta etapa de mi vida y empezar una nueva con su apoyo y comprensión.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por la beca otorgada durante mis estudios de doctorado en el Programa de Ciencias Químicas.

A DGAPA, UNAM proyecto IN200306 por el apoyo económico otorgado.

A CONACyT por el apoyo económico recibido por medio del programa Apoyos Integrales para la Formación de Doctores en Ciencias.

A la Dra. Burillo por su valiosa ayuda durante la realización de mis estudios, por haber confiado en mi y por brindarme su amistad. Gracias.

A todos mis compañeros del Instituto de Ciencias Nucleares que siempre estuvieron conmigo para apoyarme tanto con su amistad como con sus conocimientos.

Al Fis. Francisco García Flores y al Dr. Epifanio Cruz Zaragoza del Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM por su colaboración y autorización del Irradiador de ^{60}Co .

A los técnicos administrativos Q.F.B. Claudia Consuelo Camargo Raya y Sr. Saúl Trujillo Arias por su ayuda prestada en el Laboratorio.

A Gerardo Cedillo del Instituto de Investigación en Materiales, UNAM por su colaboración en las pruebas de Cromatografía por Exclusión de Tamaño.

A Carlos Magaña del Instituto de Física, UNAM por su colaboración en las pruebas de Microscopia Electrónica de Barrido.

Al Personal administrativo del Posgrado de Ciencias Químicas por el apoyo recibido durante mi estancia en este programa.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado la oportunidad de terminar una formación académica con la más alta calidad y por haberme albergado durante tantos años sólo esperando como recompensa formar a una profesionista más al servicio de su país.

INDICE

Abreviaturas	i
Índice de Tablas	iii
Índice de Figuras	iv
Resumen/ Abstract	vii
Introducción	1
Capítulo 1. Generalidades	7
1.1 Polímeros	7
1.2 Radiación	9
1.2.1 Clasificación	9
1.2.2 Interacción de la radiación con la Materia	10
1.2.3 Fuentes de Radiación γ	12
1.3 Efectos de la Radiación en los Polímeros	13
1.3.1 Modificación de Polímeros por Injerto	15
1.3.1.1 Métodos de injerto	16
1.3.1.1.1 Transferencia de Cadena	16
1.3.1.1.2 Fotoquímico	16
1.3.1.1.3 Peróxidos	17
1.3.1.1.4 Electroquímico	17
1.3.1.1.4 Radiación	17
1.3.2 Entrecruzamiento	18
1.3.2.1 Tipos de Entrecruzamiento	18
1.3.3 Degradación	19
1.3.4 Entrecruzamiento y Degradación: Procesos Simultáneos	19

1.4 Redes Interpenetrantes	21
1.4.1 Clasificación de las Redes Interpenetrantes	22
1.4.2 Termodinámica de las IPNs	24
1.5 Polímeros Inteligentes	25
1.5.1 Polímeros Inteligentes	27
1.5.2 Polímeros Inteligentes Solubles	27
1.5.3 Hidrogeles Sensibles a Estímulos	28
1.6 Inmovilización de Biomoléculas	30
1.6.1 Retención Física	30
1.6.2 Unión Química	31
1.6.2.1 Unión a Soportes	31
1.6.2.2 Reticulación	33
1.6.3 Elección del Método de Inmovilización	33
1.6.4 Las Biomoléculas y los Polímeros Inteligentes	34
1.7 Bioconjugación	35
1.7.1 N-acriloxisuccinimida	38
1.7.2 N-isopropilacrilamida	40
1.7.3 Lípidos	41
1.7.3.1 Clasificación de los Lípidos	43
1.7.3.2 Comportamiento en Solución	44
1.8 Métodos de Caracterización	47
1.8.1 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	47
1.8.2 Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR-ATR)	48
1.8.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	50
1.8.4 Cromatografía por Exclusión de Tamaños (SEC)	52
1.8.5 Análisis Elemental	53
1.8.6 Técnicas Espectroscópicas	54

Capítulo 2. Desarrollo Experimental	55
2.1 Síntesis del Gel de Poli(N-isopropilacrilamida)	56
2.1.1 Purificación de la N-isopropilacrilamida	56
2.1.2 Polimerización y reticulación de la N-isopropilacrilamida	56
2.2 Síntesis de la Poli(N-acriloxisuccinimida)	58
2.2.1 Síntesis del NAS	58
2.2.2 Polimerización del NAS	60
2.2.2.1 Método químico	60
2.2.2.2 Método por Radiación	62
2.3 Formación de las Redes Interpenetrantes (IPNs)	63
2.4 Inmovilización de lípidos	64
2.4.1 Formación de las vesículas	64
2.4.2 Inmovilización	66
2.5 Caracterización de los materiales	67
Capítulo 3. Resultados y discusión	70
3.1 Formación de la Red de NIPAAm	70
3.2 Polimerización del NAS	84
3.3 Síntesis de la Red Interpenetrante	93
3.4 Inmovilización	106
3.4.1 Caracterización de las vesículas	106
3.4.2 Cuantificación	109
Capítulo 4. Conclusiones	114
Artículos Publicados	118
Referencias	138

ABREVIATURAS

Para el presente trabajo se utilizaron algunas abreviaturas que son explicadas a continuación.

AA	Ácido acrílico
AC	Cloruro de acrililo
AIBN	Azoisobutironitrilo
ATR	Reflectancia total atenuada
BIS	N,N-metilenbisacrilamida
CHCl ₃	Cloroformo
Co	Cobalto
Cs	Cesio
DMF	Dimetilformamida
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
e ⁻ _{aq}	Electrón acuoso
EPDM	Monómero de etileno-propileno-dieno
NEt ₃	Trietilamina
FTIR	Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier
GPC	Cromatografía de permeación en gel
H [•]	Radical hidrógeno
ID	Código de referencia
IPN	Red interpenetrante
IR	Infrarrojo
kGy	Kilogray
LCST	Temperatura mínima de solución crítica
MES	Ácido morfoetanosulfónico
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
Mw	Peso molecular en peso
NAS	N-acriloxisuccinimida

NHCO ₃	Carbonato ácido de sodio
NHS	N-hidroxisuccinimida
NIPAAm	N-isopropilacrilamida
OH [•]	Radical hidroxil
PDMS	Polidimetilsiloxano
PE	Polietileno
PLy	Polilisina
PMMA	Poli(metilmetacrilato)
PNAS	Poli(N-acriloxisuccinimida)
PNIPAAm	Poli(N-isopropilacrilamida)
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
POPG	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol
PP	Polipropileno
PTFE	Poli(tetrafluoroetileno)
SEBS	Copolímero de estireno-etileno/butileno-estireno
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SR	Relación de hinchamiento
Tg	Temperatura de transición vítrea
TGA	Análisis Termogravimétrico
THF	Tetrahidrofurano
ton	Tonelada

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag	
Tabla 1.1	Ejemplo de Polímeros Injertados	16
Tabla 1.2	Redes Interpenetrantes Comerciales	24
Tabla 1.3	Estímulos de los Polímeros Inteligentes	26
Tabla 1.4	Respuestas de los Polímeros Inteligentes	26
Tabla 1.5	Diferentes Métodos de Inmovilización	33
Tabla 1.6	Biomoléculas	34
Tabla 1.7	Aplicación de Biomateriales Poliméricos Inteligentes	35
Tabla 2.1	Condiciones de reacción del NIPAAm	57
Tabla 2.2	Condiciones de reacción del NAS	62
Tabla 3.1	Parámetros Radioquímicos del PNIPAAm	72
Tabla 3.2	Temperaturas de Transición del PNIPAAm	75
Tabla 3.3	Condiciones de Polimerización de la Red de PNIPAAm	80
Tabla 3.4	Transiciones Térmicas del PNIPAAm en Solución	83
Tabla 3.5	Análisis Elemental del NAS	86
Tabla 3.6	Condiciones de Síntesis y Polimerización del NAS	92
Tabla 3.7	Condiciones de Síntesis para las IPNs	93
Tabla 3.8	Temperaturas de Transición de las IPNs	99

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag
Figura 1.1 Tipos de cadenas poliméricas	9
Figura 1.2 Espectro electromagnético	9
Figura 1.3 Mecanismos de interacción de la radiación	11
Figura 1.4 Decaimiento del ^{60}Co	13
Figura 1.5 Tipos de redes interpenetrantes	21
Figura 1.6 Métodos para preparar redes interpenetrantes	23
Figura 1.7 Ejemplos de polímeros inteligentes	26
Figura 1.8 Polímeros inteligentes en superficie	27
Figura 1.9 Representación esquemática de un gel	29
Figura 1.10 Aplicación de los hidrogeles	29
Figura 1.11 Métodos de inmovilización mediante retención física	31
Figura 1.12 Métodos de inmovilización mediante unión química	32
Figura 1.13 Amplificación de la actividad biológica	34
Figura 1.14 Separación de una enzima	35
Figura 1.15 Biomoléculas utilizadas para bioconjugación	36
Figura 1.16 Ruta de síntesis del NAS	39
Figura 1.17 Estructura de una membrana lipídica	42
Figura 1.18 Estructura de los lípidos en contacto con agua	45
Figura 1.19 Liposomas	45
Figura 1.20 Esquema de una celda de DSC	48
Figura 1.21 Ruta del haz de luz infrarroja	50
Figura 1.22 Esquema de un equipo de SEM	51
Figura 1.23 Relación entre tiempo de elusión y peso molecular	53
Figura 2.1 Polimerización por radiación	58
Figura 2.2 Reacción de la N-acriloxisuccinimida	59
Figura 2.3 Esquema de reacción del NAS	60

Figura 2.4	Polimerización del NAS	61
Figura 2.5	Proceso de desgasificación	63
Figura 2.6	Estructuras de los lípidos utilizados	65
Figura 2.7	Esquema de caracterización	67
Figura 3.1	Irradiador Gammbeam 651 PT	71
Figura 3.2	Comportamiento del NIPAAm frente a la radiación gamma	72
Figura 3.3	% de gel para el NIPAAm a diferentes presiones	73
Figura 3.4	LCST del PNIPAAm en solución acuosa	76
Figura 3.5	LCST del PNIPAAm en estado sólido	76
Figura 3.6	LCST del PNIPAAm determinada por medio de DSC	77
Figura 3.7	Micrografías del PNIPAAm	78
Figura 3.8	Comportamiento del PNIPAAm	79
Figura 3.9	Estructuras químicas del BIS, NIPAAm y PNIPAAm	81
Figura 3.10	Espectro de IR del PNIPAAm	82
Figura 3.11	Termograma del PNIPAAm	83
Figura 3.12	Espectro de IR del NAS	85
Figura 3.13	Termograma del NAS	86
Figura 3.14	Variación del peso molecular del NAS obtenido por reacción	88
Figura 3.15	Variación del peso molecular del NAS obtenido por radiación	89
Figura 3.16	Espectro de IR del PNAS	90
Figura 3.17	DSC del PNAS	91
Figura 3.18	Análisis térmico del PNAS	92
Figura 3.19	Estructura química de la polilisina	94
Figura 3.20	Hinchamiento límite	95
Figura 3.21	Estructura química de la red interpenetrante	96
Figura 3.22	LCST de las IPNS determinada por hinchamiento (serie 1)	97
Figura 3.23	LCST de las IPNs determinada por hinchamiento (serie 2)	98
Figura 3.24	Determinación de la LCST por medio de DSC	98
Figura 3.25	Espectro de IR del PNIPAAm, PNAS , IPN	100
Figura 3.26	Espectro de IR de las IPNs (polilisina Mw=500-2000)	101
Figura 3.27	Espectro de IR de las IPNs (polilisina Mw=4000)	101

Figura 3.28	Termograma del PNIPAAm, PNAS, IPN	102
Figura 3.29	Micrografías de los hidrogeles de PNIPAAm y las IPNs	104
Figura 3.30	Micrografías de la red interpenetrante	105
Figura 3.31	Espectro de IR del POPG	107
Figura 3.32	DSC del POPG	108
Figura 3.33	Curva de calibración para la espectrometría de UV	110
Figura 3.34	Determinación del tiempo de inmovilización	111
Figura 3.35	Inmovilización de las vesículas del fosfatidilglicérido	112
Figura 3.36	Inmovilización de las vesículas de la fosfatidilcolina	113

RESUMEN

En años recientes, los polímeros se han aplicado al área biomédica debido a la creciente demanda de materiales apropiados para realizar transplantes y crear sistemas más específicos de distribución de medicamentos. Un ejemplo es la poli(N-isopropilacrilamida), un polímero termosensitivo capaz de presentar un cambio en su hidrofobicidad en respuesta a un cambio en la temperatura del medio confiriéndole la cualidad de formar sistemas inteligentes (sensitivos). Otro ejemplo es la poli(N-acriloxisuccinimida), un polímero utilizado para inmovilizar moléculas con actividad biológica (biomoléculas) debido a que contiene un grupo labil que reacciona fácilmente con aminas terciarias, las cuales están presentes en la mayoría de este tipo de moléculas.

En el presente trabajo se formó y caracterizó un nuevo sistema compuesto por estos dos polímeros en forma de una red interpenetrante de tal manera que este posee las propiedades de ambos materiales debido a un efecto de sinergia conferido por el arreglo estructural propuesto.

Summary

In latter years, the polymers have been introduced in the biomedical area due to increasing demand of materials to carry out transplants and to create more specific systems of release of drugs. An example is the poly(N-isopropylacrylamide), a thermosensitive polymer which is able to present a change in its hydrophobicity in response to a little change in the environmental temperature. Another example is the poly(N-acryloxysuccinimide), a polymer used to immobilize molecules with biological activity (biomolecules) because it contains a labile group that reacts easily with tertiary amines, which are present in most of this kind of molecules.

At the present work, we formatted and characterized a new system that containing both polymers in form of interpenetrating network, with the properties of both materials, due to a synergy effect conferred by the new structural arrangement.

INTRODUCCIÓN

La química de radiaciones es un área bien establecida de la ciencia que estudia los cambios químicos y fisicoquímicos producidos cuando la radiación de alta energía (ionizante) interacciona con la materia. Esta área ha tenido un gran seguimiento durante mucho tiempo por parte de la comunidad científica debido a su importancia en la modificación de materiales, principalmente los polímeros. Los factores que más han influido en la implementación del uso de la radiación son las grandes ventajas que presenta con respecto a los demás métodos como son su rapidez y versatilidad.

La radiación ionizante está definida como la radiación con energía suficiente para ionizar moléculas o átomos a su paso sobre el medio. Dicha radiación tiene una frecuencia entre 3×10^{15} - 1×10^{27} Hz y es producida de dos formas: por rutas nucleares y rutas eléctricas. Entre los primeros se encuentran los elementos radioactivos naturales como el Radio o Radon y los isótopos radioactivos como son el ^{137}Cs y el ^{60}Co , los cuales emiten radiación Gamma. Otra forma de obtener radiación ionizante es por medio de rutas eléctricas como los aceleradores de electrones, ciclotrones y partículas aceleradas.

Al pasar la radiación a través de la materia, ésta pierde energía al interactuar con los electrones y el núcleo del medio, produciendo muchas reacciones de las cuales se desprenden dos de gran importancia: la ionización y excitación de los átomos o moléculas. Las especies que se desprenden de dichas reacciones son capaces de iniciar reacciones, las cuales son reacciones en cadena y se llevan a cabo por medio de un mecanismo de radicales libres, en la mayoría de los casos, o por un mecanismo iónico. El que predomine uno u otro depende tanto de la naturaleza del polímero como de las condiciones de reacción.

Existen diversas aplicaciones de la radiación a nivel industrial pero entre las más importantes se encuentran la modificación de polímeros mediante su injerto, por curado, el entrecruzamiento y degradación. Aunque también se pueden polimerizar

monómeros por esta vía, a nivel industrial esto todavía no es aplicable. Otros usos son la esterilización de alimentos, material quirúrgico y demás materiales que puedan contener elementos patógenos que afecten de alguna manera al ser humano.

De manera general, un polímero se puede definir como una gran molécula construida por la repetición de pequeñas unidades químicas simples llamadas monómeros. Cuando un polímero se forma por medio de uniones entre sí de un sólo tipo de molécula pequeña o monómero, se le llama *homopolímero*. En cambio, cuando dos o más tipos diferentes de monómeros están unidos a la misma cadena polimérica, es denominado *copolímero*. En algunos casos la repetición es lineal, de forma semejante a como una cadena la forman sus eslabones; en otros casos las cadenas son ramificadas o interconectadas formando retículos tridimensionales. Dentro de la clasificación de los polímeros existen las llamadas redes interpenetrantes (IPNs), las cuales tienen diversas aplicaciones como son las partes de autos, prótesis dentales, materiales de alta resistencia, etc. Se pueden definir como una combinación de dos o más polímeros reticulados sin que una cantidad importante de las cadenas poliméricas entre sí, se encuentren unidas por entrecruzamiento, injerto o copolimerización.

Por otro lado, en los últimos años se han descubierto polímeros que responden a pequeños estímulos físicos o químicos con grandes cambios en sus propiedades a los cuales se les nombró polímeros sensitivos o inteligentes. Estos polímeros pueden estar en varias formas tales como en solución o en estado sólido. Un gran número de moléculas biológicamente activas (biomoléculas) pueden inmovilizarse en sistemas poliméricos (polímeros entrecruzados, copolímeros o injertos), que contengan grupos funcionales capaces de unirse en una forma covalente, iónica o por puentes de hidrógeno.

La inmovilización de biocompuestos en membranas o soportes sólidos tiene muchas aplicaciones como por ejemplo: la liberación controlada de fármacos, como fase estacionaria para dispositivos cromatográficos o como órganos artificiales, entre otros. Para ello, se utilizan copolímeros e injertos de monómeros hidrofílicos que sean capaces de inmovilizar biocompuestos como enzimas, anticuerpos, etc.

La adición de un polímero inteligente, como es el caso de la poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), la cual presenta un cambio en su propiedad hidrofílica (absorción de agua) al pasar por una temperatura crítica llamada “*Low critical solution temperature*” (LCST), en donde se contrae y libera el agua absorbida, mejora la capacidad de inmovilización cuando se encuentra hinchada y libera el biocompuesto en su forma contraída dando así un efecto reversible al sistema.

En este trabajo sintetizamos una red interpenetrante compuesta de poli(N-isopropilacrilamida) y poli(N-acriloxisuccinimida) con el fin de formar un novedoso sistema que tenga una respuesta a la temperatura y sea capaz de inmovilizar lípidos en forma de vesículas.

La radiación ionizante utilizada en este trabajo fue proveída por la fuente de ^{60}Co (Gamma-beam) que se encuentra en el Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM. Por medio de la radiación proveniente de este radioisótopo, se llevó a cabo la polimerización y reticulación de la N-isopropilacrilamida así como la polimerización de la N-acriloxisuccinimida, las cuales fueron utilizadas para formar la red interpenetrante. Esta red tiene grupos capaces de retener o inmovilizar biomoléculas debido a la activación efectuada con la polilisina. La caracterización se realizó por diversos métodos analíticos como la espectroscopia de IR, análisis térmico, microscopia electrónica de barrido y pruebas de hinchamiento, entre otras. La eficiencia del sistema para inmovilizar lípidos se probó mediante espectrofotometría de luz ultravioleta.

JUSTIFICACIÓN

Debido a la particular morfología que presentan las vesículas, éstas han atraído un gran interés dentro de distintos campos como la biología, química y física ya que se les han encontrado diferentes aplicaciones prácticas en la industria. Algunos ejemplos son su uso como dispositivos de liberación de diversas sustancias (fármacos y sustancias activas), biomineralización así como la reconstitución de moléculas biológicas, entre otros. Estos sistemas pueden prepararse de diversos compuestos como fosfolípidos, surfactantes y copolímeros pero sólo los primeros son biocompatibles e ideales para su uso en sistemas biológicos. Sin embargo, las vesículas de lípidos (liposomas) tienen muy poca estabilidad y alta permeabilidad, lo cual limita su aplicación. Una manera de mejorarlos, es trabajando en sistemas que los protejan del medio y los liberen controladamente para que lleguen íntegros a su destino. En los últimos años se han investigado diferentes materiales, principalmente polímeros, que inmovilizan biomoléculas y posteriormente las liberan cuando responden a un estímulo. No obstante el mayor problema que se presenta son las propiedades mecánicas de los polímeros ya que se hinchan en demasía y pierden estabilidad mecánica impidiendo su adecuado manejo. Se ha demostrado que los polímeros con morfología de microfases separadas son capaces de mejorar dichas propiedades. Entre los polímeros que presentan estas microfases se encuentran los copolímeros y las redes interpenetrantes.

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es la formación de redes interpenetrantes de N-acriloxisuccinimida, que contenga lisina, y N-isopropilacrilamida, con el fin de inmovilizar lípidos.

Entre los objetivos particulares de este trabajo se encuentran:

- 1) Encontrar las condiciones adecuadas de polimerización para la N-isopropilacrilamida mediante radiación gamma.
- 2) Encontrar las condiciones adecuadas de síntesis para la N-acriloxisuccinimida así como un método eficiente para polimerizarlo mediante radiación gamma y por catálisis química.
- 3) Formación de la red interpenetrante de Poli(N-isopropilacrilamida) y Poli(N-acriloxisuccinimida).
- 4) Caracterizar la red interpenetrante.
- 5) Realizar la inmovilización de lípidos en la red formada.

HIPÓTESIS

La formación de un sistema interpenetrado compuesto de poli(N-acriloxisuccinimida) reticulado con polilisina, y poli(N-isopropilacrilamida) tendría que mejorar:

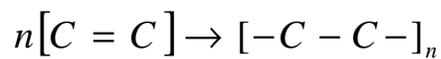
- 1) La capacidad de inmovilización, debido a la inserción de cargas por parte de los residuos de aminas.
- 2) La rapidez de liberación de biocompuestos, en este caso, los lípidos 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC) y el 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol (POPG).
- 3) Las propiedades mecánicas del material.

CAPITULO 1. GENERALIDADES

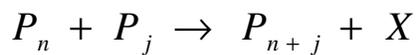
1.1 Polímeros^{1, 2, 3}

Los polímeros son macromoléculas, componentes de alto peso molecular, que contienen unidades repetitivas llamadas monómeros, componentes de bajo peso molecular. Estas macromoléculas son producidas por la adición sucesiva de los monómeros a un sitio activo al final de una cadena polimérica. Dichas reacciones se denominan reacciones de polimerización y pueden llevarse a cabo por medio de dos mecanismos:

- ◆ Polimerización por crecimiento de cadena (aniónica, catiónica y por radicales libres): Esta polimerización (poliadición) se da cuando existe una reacción química entre las especies activas, las cuales pueden ser cationes, aniones o radicales libres, y la cadena polimérica. Es decir, la reacción involucra básicamente la adición sucesiva del monómero a una forma activa o iniciada. De esta forma, la polimerización de un compuesto puede representarse de la siguiente manera:



- ◆ Polimerización por crecimiento en etapas: Esta se produce por reacciones entre dos monómeros que tienen grupos bifuncionales, se caracteriza porque el grupo funcional de uno de los monómeros reacciona con el grupo funcional del otro monómero de manera sucesiva para formar especies de bajo peso molecular como el dímero, trímero, tetrámero, etc., llamados oligómeros. Una característica importante es que en muchas de estas reacciones (policondensación) existe un producto secundario de condensación de bajo peso molecular, usualmente agua o ácido clorhídrico. Este mecanismo se puede generalizar de la siguiente manera:



De acuerdo al tipo de monómero presente en el proceso se distinguen dos clases de polímeros: los homopolímeros, los cuales involucran un sólo monómero, y los copolímeros, los cuales involucran dos o más monómeros diferentes. Los productos de alto peso molecular de este último son llamados copolímeros y se clasifican de la siguiente manera:

Cuando dos o más monómeros están dispuestos según un ordenamiento alternado, el polímero es denominado obviamente, un copolímero alternante:



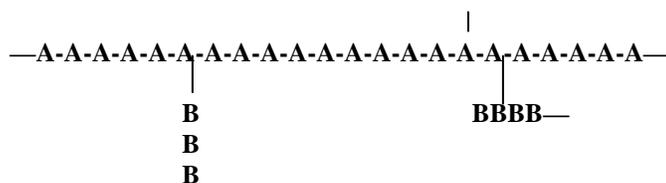
En un copolímero al azar, los monómeros no siguen ningún orden específico:



En un copolímero en bloque, todos los monómeros de un mismo tipo se encuentran agrupados entre sí, al igual que el otro tipo de monómeros. Un copolímero en bloque puede ser imaginado como dos homopolímeros unidos por sus extremos.



Cuando pequeñas cadenas de un polímero formado a partir del monómero B se encuentran injertadas en una cadena polimérica de monómeros del mismo tipo (A), tenemos un copolímero de injerto:



Los homopolímeros al igual que los copolímeros pueden ser lineales, de forma semejante a una cadena formada por sus eslabones, o las cadenas pueden presentar ramificaciones o interconexiones que crean retículos tridimensionales, comúnmente llamados redes poliméricas.

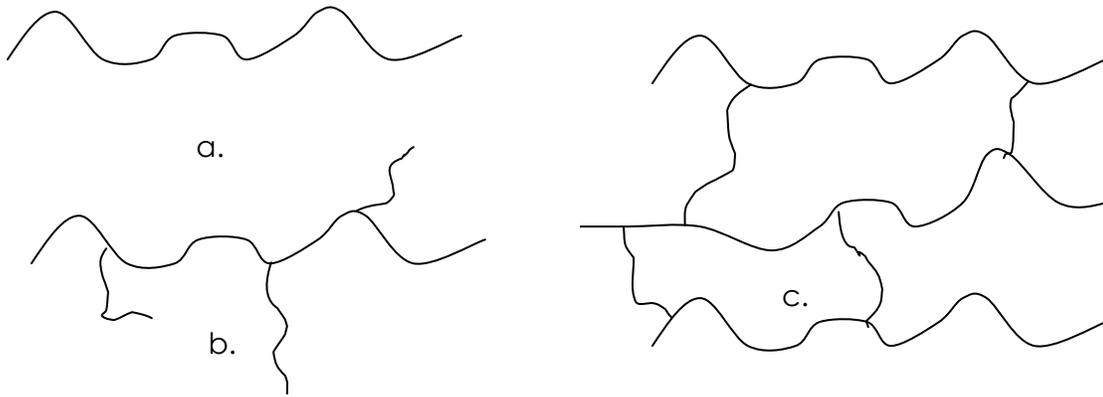


Figura 1.1. Diferentes tipos de cadena polimérica; (a) Polímero lineal, (b) Polímero ramificado, (c) Polímero entrecruzado (red).

1.2 RADIACIÓN⁴

La radiación es el fenómeno que presentan ciertos átomos, consistente en la emisión de partículas y radiaciones, debido a la desintegración que sufre el núcleo atómico para alcanzar una configuración más estable energéticamente.

1.2.1 CLASIFICACIÓN⁵

El espectro electromagnético se divide según su frecuencia y energía en radiación ionizante y no ionizante. En la figura 1.2 se presenta el espectro electromagnético donde es posible observar los diferentes tipos de radiación dependiendo de su energía y longitud de onda.

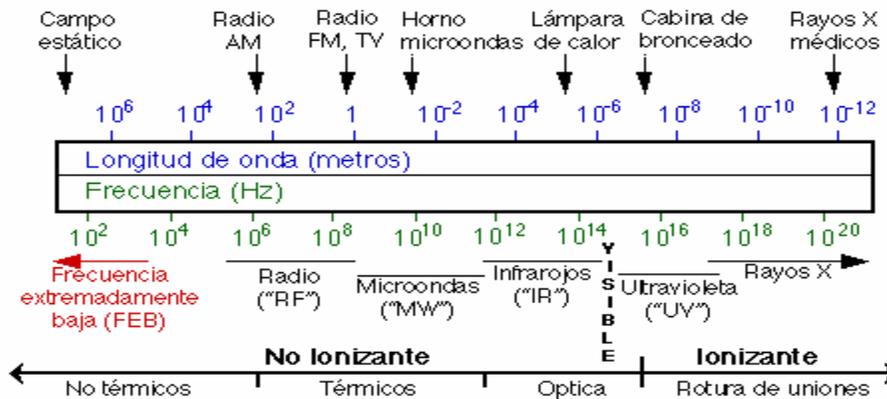


Figura 1.2 Espectro electromagnético.

Las radiaciones ionizantes se extienden desde los 3×10^{16} hasta por encima de 1×10^{24} Hz. Sus características principales son:

- ◆ Sus niveles de energía se incrementan con sus altas frecuencias.
- ◆ Longitud de ondas pequeñas.
- ◆ Tiene la capacidad de ionizar materiales.

La radiación no ionizante tiene frecuencias desde 1 Hz hasta aproximadamente 3×10^{16} Hz. Sus características principales son las siguientes:

- ◆ Sus niveles de energía decrecen con sus bajas frecuencias.
- ◆ Longitud de ondas grandes.
- ◆ Las radiaciones no ionizantes, aun cuando sean de alta intensidad no pueden causar ionización.

1.2.2 INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN CON LA MATERIA^{4,5}

Cuando la radiación ionizante pasa a través de un material, ésta produce un efecto sobre los átomos y cambia sus propiedades. Los cambios observados se dan tanto en la materia como en el rayo incidente y dependen tanto del tipo de radiación como de las características de la materia involucrada.

Los principales mecanismos de interacción son el efecto fotoeléctrico, el efecto Compton y la producción de pares. Lo que determina principalmente que predomine uno de los tres procesos depende de la energía del fotón y del número atómico del material que sufre la interacción.

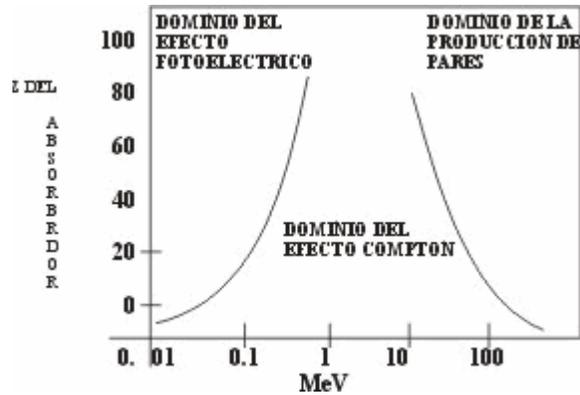


Figura 1.3 Mecanismos de interacción de la radiación.

Efecto fotoeléctrico: es la interacción de un fotón incidente sobre los electrones de un átomo absorbente. El fotón incidente transfiere toda su energía al electrón atómico de una capa interna. Si la energía suministrada es superior a la energía de ligadura del electrón al átomo, aquel es expulsado. Si el lugar vacante es ocupado por un electrón externo, se puede liberar la energía sobrante en forma de rayos X (fenómeno de fluorescencia).

El proceso fotoeléctrico es el que predomina con radiaciones de baja energía (<0.1 MeV) y sustancias absorbentes de alto número atómico.

Efecto Compton: en este proceso el fotón incidente interacciona con un electrón, cediendo parte de su energía a este. El resultado es un fotón de menor energía y un electrón desviado de su orbita. Entre mayor es el ángulo de desviación, mayor es la energía cedida al electrón.

A menudo este efecto es el mecanismo predominante de interacción en el intervalo de energía de 0.1 a 1 MeV así como con materiales con número atómico bajo.

Formación de pares: si la energía del fotón excede el doble de la energía equivalente a la masa del electrón (1.022 MeV), entonces el proceso de producción de pares es energéticamente posible. Esta interacción consiste en la transformación del fotón en energía cinética de un electrón y un positrón, debido a la interacción del fotón con el campo magnético del núcleo. Para que se produzca este fenómeno debe haber un núcleo o electrón cerca para cumplir los principios de conservación de la energía y de impulso.

1.2.3 FUENTES DE RADIACIÓN γ ^{4,5}

Los rayos gamma son radiaciones electromagnéticas similares a la luz u ondas de radio pero con menor longitud de onda y en consecuencia de mayor energía. Estos rayos, al igual que los rayos X, tienen energías bien definidas ya que son producidas por la transición entre niveles de energía del átomo; pero mientras los rayos gamma son emitidos por el núcleo, los rayos X resultan de las transiciones de energía de los electrones fuera de los orbitales. Los rayos gamma son a menudo llamados fotones ya que se consideran cuantos de energía con valor constante emitidos por un núcleo radiactivo al decaer.

La radiación gamma carece de carga eléctrica y por lo tanto no sufre desviaciones en su trayectoria como producto de la acción de campos eléctricos de núcleos atómicos o electrones. Tales características le permiten ser capaz de traspasar grandes espesores de material e ionizar indirectamente las sustancias que encuentra en su recorrido. Un rayo gamma es capaz de sacar un electrón de su orbita atómica; el electrón arrancado producirá ionización en nuevos átomos circundantes, lo que volverá a suceder hasta que se agote toda la energía de la radiación incidente.

Existen dos fuentes principales de producción de rayos gamma: el ¹³⁷Cs y ⁶⁰Co, siendo más utilizada este último debido a que la energía de la radiación emitida es mucho mayor.

El cobalto ⁶⁰Co es un radioisótopo producido del cobalto en estado natural (⁵⁹Co), cuando es expuesto a un flujo de neutrones térmicos por medio de la siguiente reacción:



La representación gráfica de la desintegración radiactiva de los núclidos se muestra en un esquema de decaimiento, donde se detalla la energía y el porcentaje de los rayos por medio de los cuales decae a un elemento estable.

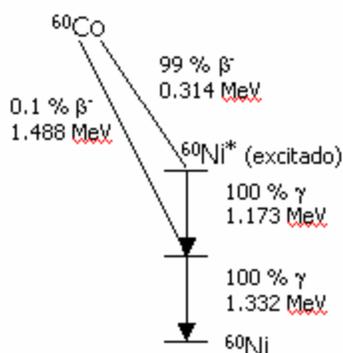


Figura 1.4 Esquema de decaimiento del ^{60}Co .

La unidad más conveniente para medir la energía de las radiaciones nucleares es el mega electrón voltio (MeV), que se define como un millón de veces la energía adquirida por un electrón cuando es acelerado por una diferencia de potencial de 1 voltio.

La dosis absorbida es la cantidad de energía que la radiación deposita en una unidad de masa del material irradiado.

1.3 EFECTOS DE LA RADIACIÓN EN LOS POLIMEROS^{1, 5, 6}

La química de radiaciones se define como el estudio de los efectos químicos causados por el paso de la radiación ionizante a través de la materia. La radiación no es selectiva y puede interactuar con cualquier molécula que se encuentre en su trayectoria así como llevarla a cualquiera de sus posibles estados excitados. Las radiaciones incluyen rayos α , β y γ de núcleos radioactivos, rayos X y partículas cargadas como protones y deuterones.

Desde los comienzos de la química de radiaciones, se han investigado una amplia variedad de reacciones; sin embargo, en los últimos años la investigación ha estado orientada hacia el área de polímeros. La radiación ionizante produce ionización, excitación y cambios químicos en los polímeros por medio de la formación de intermediarios reactivos: radicales libres, iones y moléculas excitadas. Esto afecta

sus propiedades notablemente dependiendo de una serie de factores como son la dosis, el tipo de radiación, los aditivos, las condiciones de irradiación y la naturaleza del polímero mismo. La modificación estructural consiste en la transformación de la estructura molecular del polímero con la retención de su estructura química. La modificación química es la formación de un sistema de enlaces covalentes entre las macrocadenas o la introducción de fragmentos de macromoléculas a otra estructura química unida por enlaces químicos.

Las reacciones químicas en los polímeros irradiados desde luego dan lugar a cambios importantes en sus propiedades macroscópicas, como son la cristalinidad, densidad, coeficiente de expansión térmica, módulo de elasticidad, y permeabilidad a los gases. En el polietileno, por ejemplo, se ha observado un aumento de la estabilidad a altas temperaturas, un aumento en la resistencia a la corrosión y una mayor resistencia a quebrarse. En general, algunas propiedades útiles que se han observado son: mayor resistencia a la abrasión, mejores propiedades de corte, resistencia a solventes, cambios en la combustión, mayor estabilidad mecánica y nuevas propiedades a altas temperaturas. También se pueden diseñar materiales para aplicaciones específicas; por ejemplo, poniendo aditivos como antioxidantes o retardadores de flama que la irradiación haga resaltar. Por lo tanto, la química de radiación de polímeros incluye las siguientes secciones:

- ◆ Polimerización por Radiación; formación de polímeros por la irradiación de los monómeros con energía ionizante.
- ◆ Transformaciones químicas en sistemas poliméricos.
- ◆ Copolimerización de injerto: modificación de polímeros y materiales poliméricos mediante el injerto de uno o más monómeros.
- ◆ Entrecruzamiento: formación de oligómeros lineales o ramificados para formar redes poliméricas tridimensionales y ciclización de macromoléculas.
- ◆ Degradación: rompimiento de las macromoléculas en unidades más pequeñas.

De esta manera, usando la radiación ionizante es posible sintetizar, modificar, entrecruzar o degradar polímeros.

1.3.1 MODIFICACIÓN DE POLÍMEROS POR INJERTO^{7, 8}

La polimerización de injerto inducida por radiación es un método importante para alterar las propiedades de los polímeros. La copolimerización de injerto es una modificación química de los polímeros que involucra la formación en estos de cadenas ramificadas consistentes en monómeros de otro tipo.

En la copolimerización de injerto por radicales, la irradiación produce macroradicales (PA*) en el polímero A y este inicia la polimerización del monómero B, lo cual produce el polímero de injerto. La radiación también genera radicales B*, lo que inicia la homopolimerización, con un polímero de peso molecular bajo.

Esta clase de copolimerización se usa para modificar las propiedades de muchos polímeros incluyendo películas, fibras, polvos, copolímeros en bloque y látex, también para injertar polímeros en superficies sólidas. Algunas de las aplicaciones incluyen procesos de acabado de textiles, la manufactura de polietileno con ácido acrílico y la producción de membranas de intercambio iónico. Un área en crecimiento es la preparación de materiales biocompatibles y la inmovilización de sustancias activas. Algunos ejemplos de este tipo de polímeros se muestran en la tabla 1.1

Tabla 1.1 Ejemplos de polímeros injertados

Polímero	Monómero Injertado	Aplicaciones
Policloruro de vinilo	Butadieno	Material de alto impacto
Politetrafluoroetileno	Acrilamida	Membranas
Polipropileno	Estireno	Absorbente de amonio
Etileno/Tetrafluoroetileno	Acrilonitrilo	Absorbente
Acetato de celulosa	Ácido acrílico	Retención de agua
Polietileno	Ácido metacrílico	Altamente hidrofílico

1.3.1.1 MÉTODOS DE INJERTO

La preparación de copolímeros de injerto se pueden realizar utilizando métodos químicos, fotoquímicos, radioquímicos y hasta mecánicos. Dentro de los copolímeros de injerto existe cierta clasificación de acuerdo al mecanismo por el que fueron activadas las cadenas.

1.3.1.1.1 TRANSFERENCIA DE CADENA

Consiste en poner en presencia de una macromolécula A, un iniciador R y un monómero vinílico B. Del polímero A se liberan átomos, generalmente de hidrógeno o halógeno, donde se forman los sitios activos para injertar el monómero B. Este mecanismo depende fuertemente de la temperatura.

1.3.1.1.2 FOTOQUÍMICO

Este método puede utilizarse cuando el homopolímero contiene átomos que puedan liberarse fácilmente mediante una radiación ultravioleta de longitud de onda conveniente, formando sobre la macromolécula lugares que tengan carácter de radicales libres, sobre los cuales se pueda realizar el injerto del monómero B. Como fotosensibilizadores se utilizan cetonas alifáticas, benzofenona, benzoína, etc.

1.3.1.1.3 PERÓXIDOS

Los peróxidos se utilizan para originar sobre una cadena macromolecular, sitios activos de radicales libres que inician polimerizaciones vinílicas, creando cadenas laterales. Estas reacciones se han utilizado para injertar cadenas de Poliestireno o Polimetacrilato de Metilo sobre caucho natural.

1.3.1.1.4 ELECTROQUÍMICO

Consiste en la oxidación de un ácido polimérico sobre un ánodo en la presencia del monómero.

1.3.1.1.5 RADIACIÓN

Las radiaciones ionizantes como son los rayos X y los rayos gamma así como las radiaciones con partículas aceleradas (electrones, neutrones, protones, α , y β), se han utilizado recientemente para preparar copolímeros de injerto. La radiación gamma (γ) proveniente de una fuente de cobalto 60 es la que se emplea con más frecuencia.

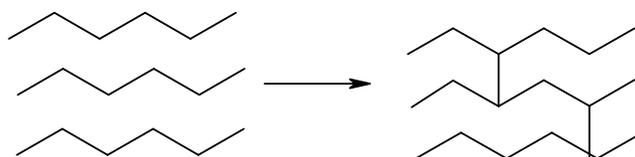
Los polímeros de injerto por radiación comúnmente involucran dos procesos consecutivos o simultáneos en los cuales los sitios activos se forman en la superficie del polímero debido a la irradiación, seguido por la polimerización del monómero en estos sitios. Este es uno de los métodos de mayor empleo debido a las ventajas que presenta como son:

- Es aplicable para todo tipo de polímeros en un amplio intervalo de temperatura.
- Se logran altas velocidades de reacción.
- Los injertos se encuentran libres de remanentes químicos.

Sin embargo una de las desventajas es la falta de disponibilidad de las fuentes de radiación y el equipo asociado.

1.3.2 ENTRECruzAMIENTO^{6,9}

Los pequeños cambios químicos producidos por dosis moderadas de radiación pueden causar grandes cambios en las propiedades del polímero. La efectividad de la radiación en polímeros es influenciada por la presencia de oxígeno, aditivos, tipo de radiación, el grado de cristalinidad del polímero y la presencia de disolventes. El entrecruzamiento toma lugar cuando se forman estructuras tridimensionales a partir de las macromoléculas iniciales. El resultado neto del entrecruzamiento es incremento del peso molecular del polímero cuando se aumenta la dosis hasta que se forma la red tridimensional, donde cada una de las cadenas de polímero esta unida a otra cadena.



La estructura final representa a un polímero que no fundirá si la temperatura no se aumenta considerablemente arriba de su punto de fusión normal. Un polímero entrecruzado no puede disolverse en los disolventes usuales del polímero y sólo sufre hinchamiento.

1.3.2.1 TIPOS DE ENTRECruzAMIENTO

El entrecruzamiento se puede clasificar en cuatro títulos principales:

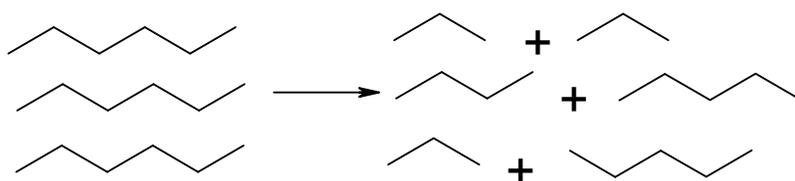
A/B: La unión del polímero A al polímero B, algunas veces llamado Inter-entrecruzamiento.

A/A: Es la unión del polímero A consigo mismo.

A/M/A: La unión del polímero A consigo mismo por la adición de un monómero M u otra molécula orgánica.

1.3.3 DEGRADACIÓN

Charlesby y Lawton observaron que los polímeros pueden degradarse o entrecruzarse, lo cual depende de su naturaleza química y ambos procesos se llevan a cabo simultáneamente. Cuando la degradación predomina en un polímero irradiado, el peso molecular decrece cuando la dosis incrementa. La degradación inducida por la radiación a temperatura ambiente no es una reacción en cadena y su rendimiento es muy bajo.

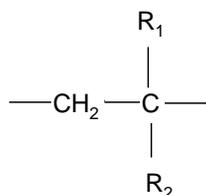


La degradación por radiación en muchos de los polímeros y materiales poliméricos es observada principalmente en:

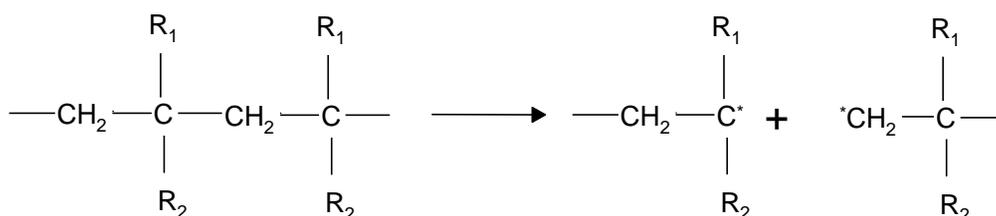
- 1) Macromoléculas que contienen átomos de carbono cuaternarios.
- 2) En polímeros que sufren fácilmente despolimerización en termólisis con la formación de un monómero puro.
- 3) En cadenas de hidrocarburos ramificados.
- 4) En polímeros con grupos C-O repetidos (acetales) en la cadena o este presente como puente en la cadena principal.

1.3.4 DEGRADACIÓN Y ENTRECruzAMIENTO: PROCESOS SIMULTÁNEOS

Algunas teorías han tratado de explicar porque predomina la degradación en ciertos polímeros y el entrecruzamiento en otros. Se ha observado que los polímeros en los que predomina la degradación se tiene la siguiente estructura:

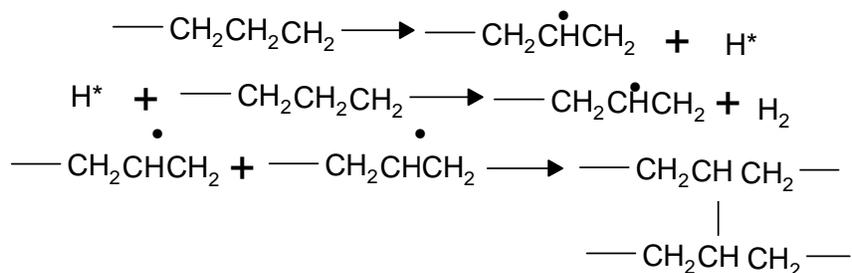


La explicación implica que R_1 y R_2 producen una tensión que rompe los enlaces de la matriz polimérica.



donde la magnitud de la degradación podría ser influenciada por la tendencia de los radicales resultantes para (1) recombinarse por desproporción o llegar a inactivarse con un hidrógeno abstraído de otra molécula ó (2) recombinarse y acoplarse.

El mecanismo de entrecruzamiento posiblemente involucra la producción de radicales poliméricos en lugares vecinos de las cadenas adyacentes, acompañado por la pérdida de un hidrógeno molecular.



Aunque algunos investigadores han postulado un mecanismo iónico para el entrecruzamiento, Charlesby argumenta contra esta hipótesis las siguientes razones:

- El entrecruzamiento toma lugar en soluciones acuosas diluidas donde la oportunidad de que dos iones poliméricos estén en la posición apropiada para unirse durante el pequeño tiempo de vida de un ion es mínima.
- Los radicales poliméricos han sido observados en polímeros sólidos irradiados por espectroscopia y en soluciones acuosas con concentraciones similares a la densidad de entrecruzamiento.
- Existen otros efectos químicos de la radiación sobre los polímeros aparte de la degradación y el entrecruzamiento como son producción o remoción de insaturaciones, formación de color y la evolución de gases. Los polímeros cristalinos pierden una fracción de su cristalinidad.
- Si la degradación se lleva al mismo tiempo que el entrecruzamiento, las dosis requeridas para alcanzar el punto de gelación debe ser incrementada.

1.4 REDES INTEPENETRANTES¹⁰

Las redes interpenetrantes (IPNs) son una combinación de dos o más polímeros en forma de red que son sintetizadas en yuxtaposición y forman parte de una amplia gama de mezclas de polímeros. Se pueden definir como una combinación de dos o más polímeros reticulados sin que una cantidad importante de las cadenas poliméricas se encuentren unidas entre sí, por entrecruzamiento, injerto o copolimerización.

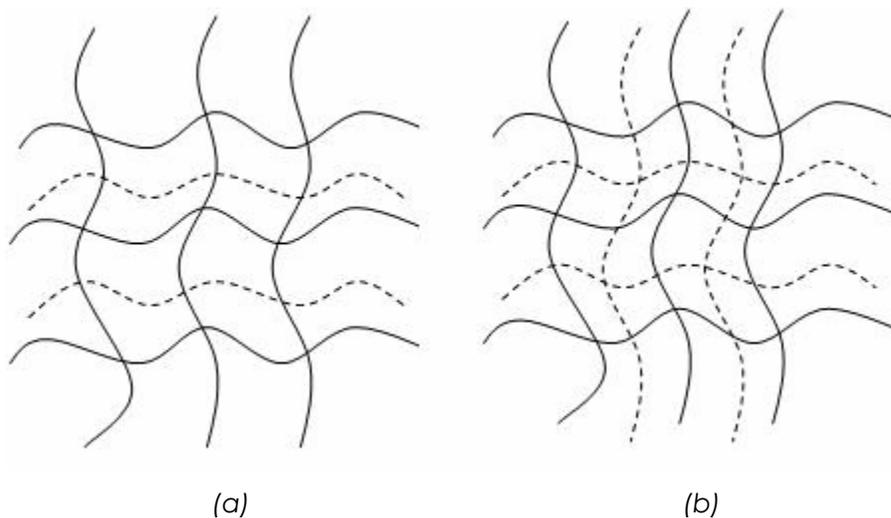


Figura 1.5 Tipo de redes interpenetrantes. (a) Semi-IPN, (b) IPN.

1.4.1 CLASIFICACIÓN DE LAS REDES INTERPENETRANTES^{10, 11}

Existen dos tipos de redes interpenetrantes: las IPNs y las semi IPNs. La figura 1.5(a) ilustra una semi-IPN, también llamada pseudo-IPN, la cual esta compuesta de un polímero entrecruzado y un polímero lineal o ramificado. La figura 1.5(b) muestra un IPN, compuesta de dos polímeros entrecruzados. Las redes interpenetrantes pueden ser sistemáticamente clasificadas dependiendo del método empleado para sintetizarlas:

- 1) IPN secuencial (SIPN): La red del polímero I es sintetizada. Posteriormente dicha red (polímero I) es hinchada con el monómero II, el agente entrecruzante y el activador con lo cual se polimeriza *in situ* la segunda red.
- 2) Redes interpenetrantes simultaneas (SIN): Los monómeros, los agentes entrecruzantes y los activadores de ambas redes son mezclados. Enseguida se llevan a cabo las polimerizaciones simultáneas e independientes, es decir, se realizan las dos reacciones al mismo tiempo sin que una interfiera con la otra.
- 3) Redes interpenetrantes elastoméricas (IENs): Los polímeros elastoméricos (polímeros con una temperatura de transición vítrea por debajo de la temperatura ambiente) sintetizados por separado en forma de emulsiones o látex son mezclados y posteriormente entrecruzados.
- 4) Látex-IPNs: Los polímeros son sintetizados en forma de látex. Así la polimerización por emulsión del monómero II junto con el entrecruzador y el iniciador se realiza en el látex del polímero I entrecruzado.

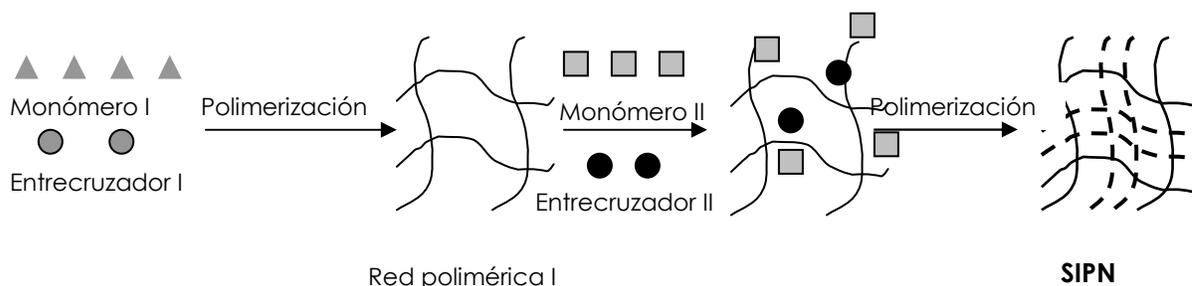




Figura 1.6 Dos métodos para preparar redes interpenetrantes.

Algunas características importantes que ocurren durante la síntesis de las IPNs son: (a) un incremento en el porcentaje de entrecruzamiento en ambos polímeros limita la separación de fase y reduce el tamaño del dominio, (b) la polimerización se acompaña simultáneamente por una separación de fase, (c) el producto final es frecuentemente un termofijo, restringiendo los movimientos difusionales. Consecuentemente la morfología de las IPNs frecuentemente estabiliza en un estado de cuasi-equilibrio determinado por el balance entre algunos factores cinéticos y termodinámicos.

Hasta el año de 1979, había alrededor de 125 artículos y 75 patentes relacionadas con las redes interpenetrantes poliméricas, al mismo tiempo había ya algunas aplicaciones probadas. En la actualidad, aproximadamente se generan ese número de artículos y patentes cada año. Una aplicación de este tipo de materiales es el Silon[®], manufacturado por BioMed Sciences, el cual está compuesto por politetrafluoroetileno (PTFE) y elastómeros de sílice. Este material se usa como una película para contener sustancias médicas. Otro ejemplo es el material llamado Trubyte y el Bioform, de la compañía Dentsply International, los cuales se usan para dientes postizos y están basados en homo-IPNs de polimetilmetacrilato (PMMA-PMMA). Otros ejemplos más son ilustrados en la tabla 1.2

Tabla 1.2 Algunos materiales (IPN) comerciales

Compañía	Nombre comercial	Composición	Aplicación
Shell Chemical Co.	Kraton IPN	SEBS - Poliester	Partes para autos
Du Pont	Somel	EPDM – PP	Material al aire libre
Dentsply Inter.	Trubyte, Bioform	Basados en AA	Dientes artificiales
BioMed Sciences	Silon	PDMS - PTFE	Vendas medicas
Sun Marketing	--	PE - PP	Plásticos de baja Temp.
Hercules	Profax	EPDM - PP	Materiales ultraligeros de alto impacto

1.4.2 TERMODINÁMICA DE LAS IPNS^{7, 11, 12}

Se ha encontrado que la formación de las redes interpenetrantes está caracterizada por dos procesos: una reacción química de entrecruzamiento y un proceso físico de separación de fases, el cual puede proceder por un mecanismo de nucleación y crecimiento o por un mecanismo de descomposición sinusoidal. Por lo tanto, las propiedades y la morfología de las IPNs dependen tanto de la cinética de formación de la red como del grado de separación de las fases, donde este último está relacionado principalmente con la miscibilidad de los polímeros que la conforman. La miscibilidad de dos componentes cualesquiera es gobernada por la ecuación de Gibbs para la energía de mezclado:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S_{mix}$$

el término $T\Delta S_{mix}$ es siempre positivo ya que siempre hay un aumento en la entropía de mezclado. El alto peso molecular de los polímeros y las subsecuentes restricciones de contiguidad dan una entropía de mezclado muy baja. Llega a ser tan baja que un pequeño calor positivo de mezclado es suficiente para generar una energía de Gibbs positiva, lo cual traería como consecuencia la inmiscibilidad.

De acuerdo con la teoría de Flory-Huggins, la entalpía de mezclado es:

$$\Delta H_{mix} = V\phi_A\phi_B(\delta_A - \delta_B)$$

donde V es el volumen, ϕ_A y ϕ_B son las fracciones del volumen de los polímeros, δ_A y δ_B son los parámetros de solubilidad de los polímeros A y B, que reflejan su estructura química. Cuanto más pequeño sea el valor absoluto de la diferencia entre δ_A y δ_B , mejor será la miscibilidad de los dos polímeros.

En las redes formadas por polímeros altamente incompatibles existe una separación de fases desde antes de que se formen ya que la cinética de la reacción no lo puede evitar. En el caso de que los polímeros sean más miscibles, la separación puede ser prácticamente evitada por medio de diversos métodos como la agitación mecánica. Cuando la miscibilidad es completa, no hace falta realizar una mezclado ya que el mismo arreglo de la red interpenetrante puede prevenirlo.

1.5 POLÍMEROS INTELIGENTES¹³

Los polímeros inteligentes se pueden definir como polímeros que responden a pequeños estímulos físicos y químicos con grandes cambios en sus propiedades. Estos polímeros, también llamados polímeros sensibles, pueden estar en varias formas tales como en solución o en estado sólido (figura 1.7).

Existen diferentes propiedades del polímero inteligente que pueden cambiar cuando responden a un estímulo dado. Por ejemplo, se puede estimular un polímero soluble para precipitarlo modificando la temperatura. En la tabla 1.3 se encuentran listados algunos de los estímulos que pueden ser aplicados a los polímeros y en la tabla 1.4 los posibles cambios que se pueden generar en ellos.

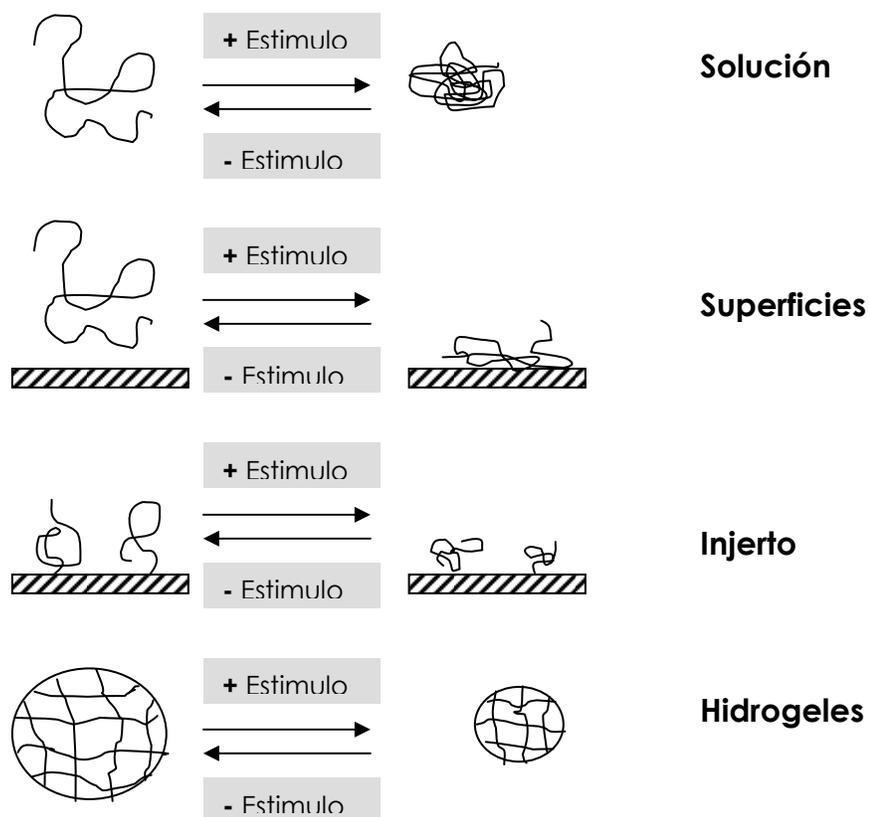


Figura 1.7 Ejemplos esquemáticos de polímeros inteligentes.

Tabla 1.3 Estímulos de los polímeros inteligentes

Estímulos
◆ Δ Temperatura
◆ Δ pH
◆ Δ Iones
◆ Δ Luz U.V.
◆ Δ Solventes
◆ Δ Reactantes
◆ Δ Campos eléctricos

Tabla 1.4 Respuestas de los polímeros inteligentes

Respuestas
◆ Fase
◆ Forma
◆ Óptica
◆ Mecánica
◆ Campo eléctrico
◆ Energía de Superficie
◆ Velocidad de reacción

1.5.1 POLÍMEROS INTELIGENTES

Los polímeros inteligentes pueden absorberse física o químicamente en soportes sólidos y cambiar la capacidad de absorción o la carga de la superficie en respuesta a estímulos externos. Por ejemplo, si una proteína es expuesta a una superficie cubierta con un polímero inteligente, el cual puede estar hinchado o contraído, dicha proteína preferirá absorberse en la superficie que tenga la composición más hidrofóbica.

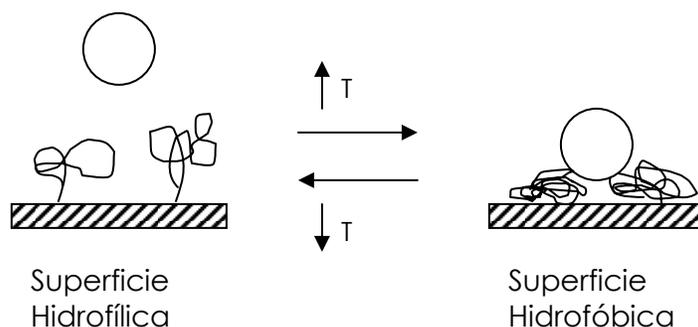


Figura 1.8 Ejemplo de los polímeros inteligentes en superficies.

Una aplicación de este tipo de polímeros es una válvula de permeación que puede ser preparada depositando un polímero inteligente en la superficie de los poros en una membrana, estimulando el hinchamiento, para bloquear el flujo a través del poro, o el colapso, para permitir el flujo por los poros, por medio de algún estímulo externo.

1.5.2 POLÍMEROS INTELIGENTES SOLUBLES

Los polímeros inteligentes sensibles a la temperatura (termosensitivos) exhiben, en solución acuosa, un punto de turbidez llamado “Cloud Point” (CP) o una “Low Critical Solution Temperature” (LCST). La LCST es la temperatura a la cual el polímero inteligente presenta un cambio en su propiedad hidrofílica (absorción de agua), teniendo como consecuencia la contracción del polímero y la liberación del agua absorbida. De este modo, pueden ser precipitados a condiciones específicas.

Una característica en los polímeros solubles-insolubles es que tienen un balance entre sus grupos hidrofílicos e hidrofóbicos y el mecanismo principal de la separación inducida térmicamente es el rompimiento de dicho balance. Por lo tanto, si uno aumenta o disminuye el contenido hidrofílico relativo del polímero, usualmente causa un aumento o descenso, respectivamente, en la temperatura crítica. Este tipo de sistemas tiene diversas aplicaciones como por ejemplo indicadores de temperatura o pH así como válvulas de control “on-off”.

También existen polímeros inteligentes que presentan más de una respuesta a un estímulo. Esta combinación de polímeros puede exhibir muchas propiedades interesantes así como nuevas y novedosas aplicaciones. Por ejemplo, si uno combina un monómero sensible a la temperatura con uno sensible al pH en un mismo polímero inteligente, entonces la LCST del copolímero será especialmente sensible al pH. Sin embargo, esto tiene algunas limitaciones ya que una pequeña fracción mol del monómero sensible al pH puede ser suficiente para eliminar completamente el fenómeno de temperatura crítica del otro monómero. Esto sucede cuando el pH se encuentra por arriba del pK del componente sensible al pH.

1.5.3 HIDROGELES SENSIBLES A ESTIMULOS^{12, 13}

Los geles son polímeros entrecruzados que forman redes tridimensionales que al ser sumergidos en un líquido (el disolvente usual del polímero no reticulado), retienen grandes cantidades de él, sin disolverse. El líquido impide que la red polimérica se colapse mientras que la red impide que el líquido fluya libremente.

La formación de un gel partiendo de un polímero entrecruzado seco y un líquido, es un fenómeno fisicoquímico en donde el líquido al ponerse en contacto con el polímero entrecruzado (sólido) intentará disolverlo siempre y cuando sean químicamente compatibles. Para ello el líquido solvatará a las macromoléculas intentando separarlas unas a otras, provocando el hinchamiento progresivo de la red polimérica (figura 1.9).

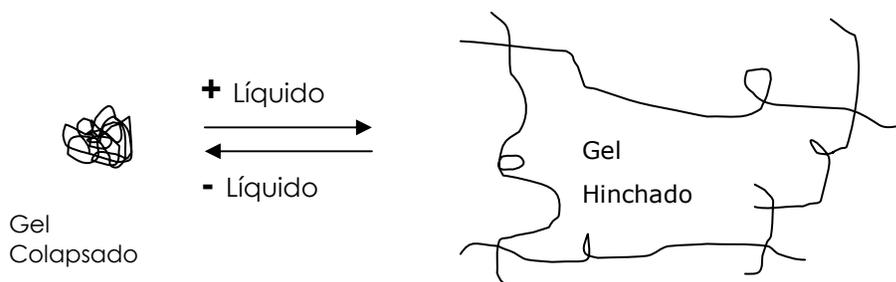


Figura 1.9 Representación esquemática de un gel.

En el caso de que el líquido sea agua, el material se denomina hidrogel. Las estructuras de los hidrogeles no están sustentadas sólo por el típico enlace covalente sino también por enlaces iónicos, puentes de hidrógeno e interacciones de Van der Waals. Los hidrogeles tienen una gran afinidad por el agua, es decir, son hidrofílicos, poseen gran estabilidad térmica así como una extensa biocompatibilidad. Algunos geles poliméricos hidrofílicos pueden experimentar una variación de volumen (grado de hinchamiento) y una transición de fase en función de variables físicas o químicas tales como la composición, temperatura, pH, campos eléctricos, intensidad de luz, etc. A este tipo de hidrogeles se les denomina inteligentes o sensibles y tienen diversas aplicaciones en liberación de medicamentos, músculos artificiales, bioreacciones, absorción de líquidos y sensores, entre otras.

Un ejemplo es la siguiente bioreacción, representada en la figura 1.10, donde las enzimas u otro tipo de biomoléculas son inmovilizadas dentro de hidrogeles inteligentes, que al aplicarles un estímulo cíclico nos conducen a una actividad “on-off” para la liberación y captura de la enzima a través de los poros del hidrogel, al contraerse e hincharse. De este modo, se produce una reacción entre las enzimas y los reactantes externos que da como resultado la liberación de un producto.

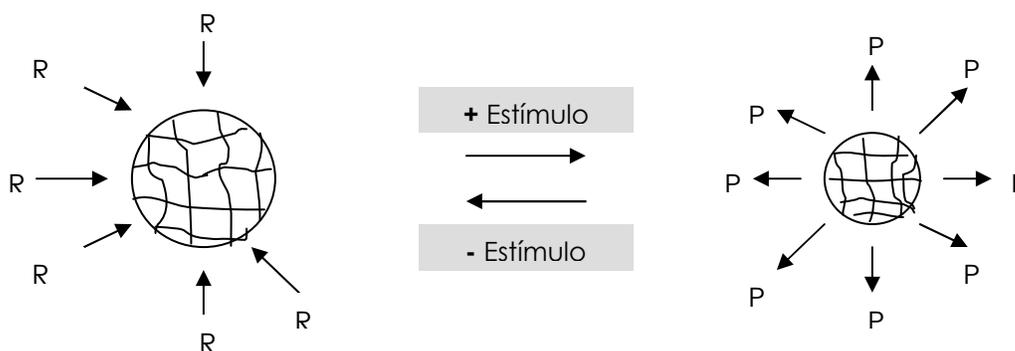


Figura 1.10 Aplicación de los hidrogeles inteligentes.

1.6 INMOVILIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS^{13,14}

La inmovilización es un proceso en el que se confina alguna biomolécula (moléculas biológicamente activas) en una región definida del espacio. En biomedicina, los polímeros multifuncionales sintéticos han sido usados como soportes para uniones covalentes de carbohidratos o entidades biológicas como péptidos o fragmentos de ADN. Entre los numerosos monómeros funcionales existentes, los ésteres activados representan una clase muy interesante dado que promueven reacciones de un paso con aminas o alcoholes, grupos funcionales que están presentes en casi todas las biomoléculas [14].

Las biomoléculas se conjugan para su inmovilización con los grupos colgantes, como son las ramificaciones y los injertos, o con los grupos terminales de la cadena polimérica. Esto permite mejorar significativamente su estabilidad, lo que hace posible su empleo en la producción industrial de productos químicos, farmacéuticos, alimentos y en muchas otras aplicaciones. En general existen dos métodos generales de inmovilización: la retención física y la unión química.

1.6.1 Retención Física

La retención física se puede dividir en dos: atrapamiento e inclusión de membranas (figura 1.11). La primera consiste en retener a la molécula en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables del tipo poliacrilamida, colágeno o resina de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la biomolécula en una solución del monómero donde posteriormente se inicia la polimerización. El atrapamiento puede ser por geles o fibras donde las biomoléculas quedan atrapadas en el interior del gel o se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de la fibra.

En la inclusión en membranas, se tiene una micro-encapsulación, donde las moléculas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto pero no a la biomoléculas.

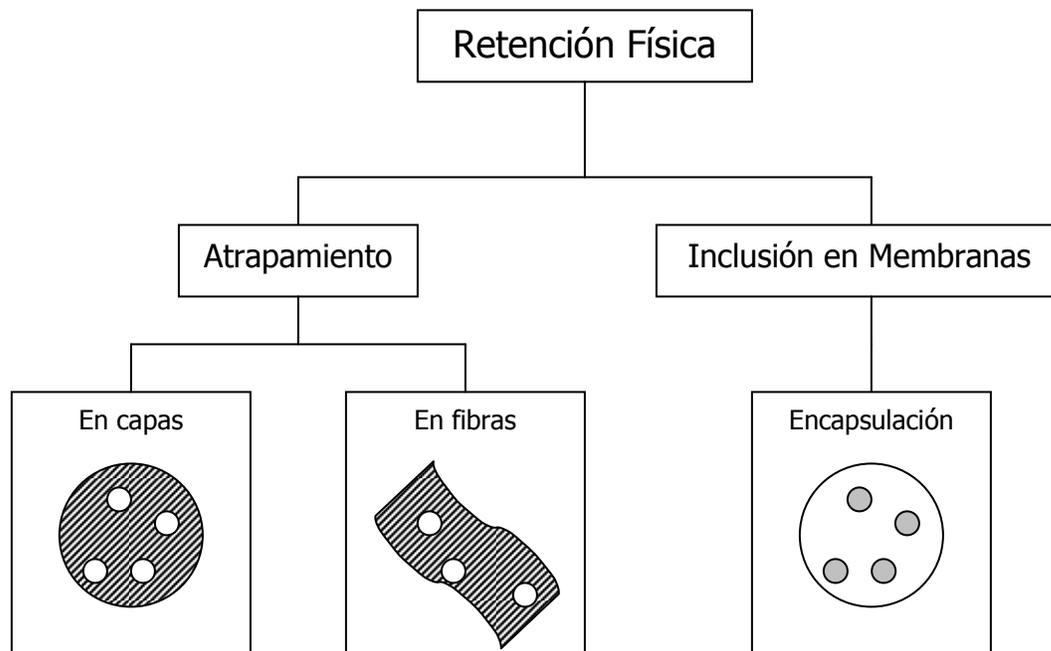


Figura 1.11 Métodos de inmovilización mediante retención física.

1.6.2 UNIÓN QUÍMICA

Al igual que el anterior, se puede dividir en dos grandes grupos: unión a soportes y reticulado.

1.6.2.1 UNIÓN A SOPORTES

Son los métodos de inmovilización más utilizados y de los que se dispone de mayor información. La elección del soporte y el tipo de enlace son determinantes para obtener las propiedades deseadas. Los soportes pueden clasificarse en:

- ❖ Soportes inorgánicos: los cuales pueden ser naturales (arcillas, piedra pómez, sílice, etc.) o manufacturados (óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.)
- ❖ Soportes orgánicos: los cuales están conformados por polímeros naturales (polisacáridos y proteínas fibrosas) y sintéticos (poliolefinas, acrílicos, poliamidas, etc.)

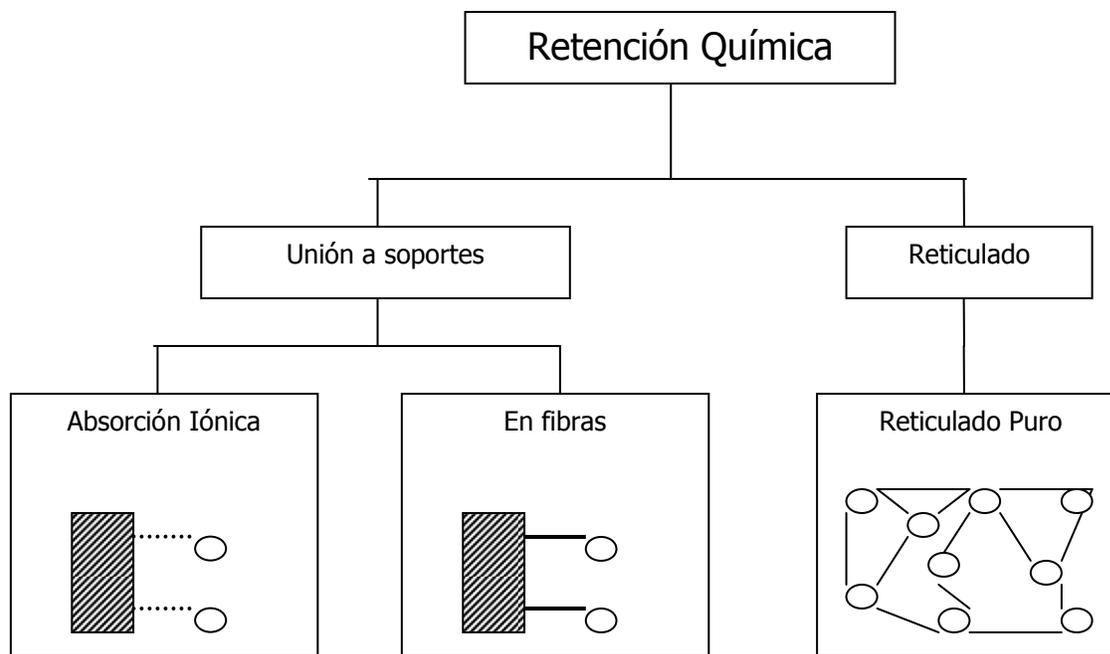


Figura 1.12 Métodos de inmovilización mediante unión química.

Las biomoléculas se pueden unir a estos soportes por absorción o unión covalente. En el primero, la molécula se une al soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals o por puentes de hidrógeno. Los factores que más afectan este proceso son el pH del medio, la fuerza iónica, el diámetro de poro y la presencia de iones. Una variante de este método son las resinas de intercambio iónico, las cuales tienen grupos funcionales y contraiones móviles. Estos contraiones se pueden intercambiar irreversiblemente por otros iones de la misma carga, sin que se produzcan cambios en la matriz.

La unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con los nucleófilos de las proteínas. De entre los aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la

formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, cisteína, la tirosina y la histidina.

1.6.2.2 RETICULACIÓN

El método de reticulación consiste en el uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las biomoléculas. El resultado son enlaces intermoleculares capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura.

1.6.3 ELECCIÓN DEL MÉTODO DE INMOVILIZACIÓN

Aunque se han desarrollado y aplicado muchas técnicas de inmovilización, no existe un método universal válido para todas las biomoléculas. Por lo tanto debemos seleccionar el más adecuado para cada aplicación específica. En la siguiente tabla se muestra una comparación de los diferentes métodos de inmovilización.

Tabla 1.5 Diferentes métodos de inmovilización.

Método	Membranas	Atrapamiento	Reticulado	Adsorción	Covalente
Preparación	Intermedia	Difícil	Intermedia	Sencilla	Difícil
Fuerza de unión	Débil	Media	Débil-Media	Media	Fuerte
Regeneración del soporte	Posible	Imposible	Imposible	Posible	Difícil
Costo	Medio-Alto	Medio	Medio	Bajo	Alto
Estabilidad	Media	Alta	Alta	Baja	Alta
Validez	General	General	Limitada	General	Limitada

1.6.4 LAS BIOMOLÉCULAS Y LOS POLÍMEROS INTELIGENTES^{13, 15}

Un gran número de moléculas biológicamente activas pueden ser inmovilizadas por sistemas poliméricos (polímeros entrecruzados, copolímeros e injertos) que contengan grupos funcionales capaces de unirse de una forma covalente, iónica o por puentes de hidrógeno.

Tabla 1.6 Biomoléculas que pueden ser inmovilizadas.

Proteínas/Péptidos	Medicamentos	Sacarídos	Lípidos
Enzimas	Agentes anticancerígenos	Azucares	Ácidos grasos
Anticuerpos	Antibióticos	Oligosacarídos	Fosfolípidos
Antígenos	Anticonceptivos	Polisacarídos	Glicolípidos
Proteínas en bloque	Antitrombogénicos		

Uno de los aspectos más importantes de la inmovilización de biomoléculas en una matriz polimérica, es la posibilidad de que diferentes moléculas puedan ser inmovilizadas en la misma cadena de polímero logrando una amplificación significativa de su actividad biológica.

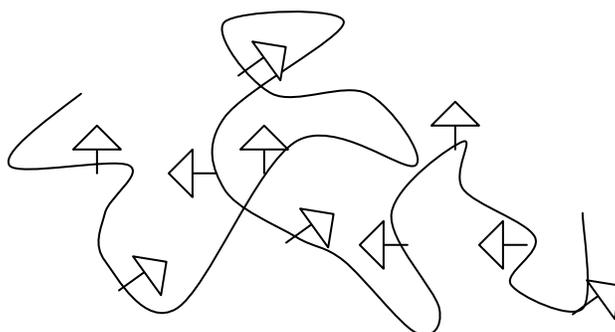


Figura 1.13 Amplificación de la actividad biológica.

Una aplicación de la inmovilización de una biomolécula es la separación selectiva de una solución por un pequeño cambio en las condiciones ambientales. De esta manera, una enzima que se encuentre en solución junto con el producto en un bioproceso, puede ser fácilmente separada y reciclada permitiendo recuperar el producto al mismo tiempo (figura 1.14).

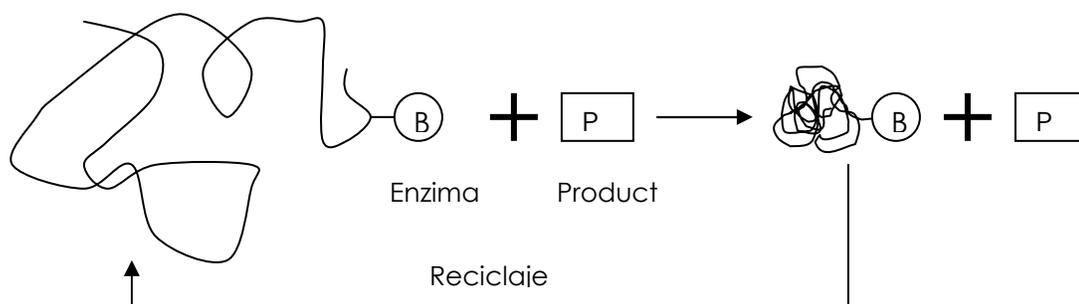


Figura 1.14 Separación de una enzima.

Existen muchas aplicaciones biomédicas y tecnológicas para los biomateriales poliméricos inteligentes, que pueden o no tener biomoléculas inmovilizadas, de las cuales algunas se encuentran enlistadas en la tabla 1.7

Tabla 1.7 Aplicaciones de los biomateriales poliméricos inteligentes.

Polímeros en Solución	Polímeros en Superficies	Hidrogeles
Indicadores Ópticos (sensores)	Permeabilidad	Separaciones
Separaciones por precipitación	Superficies bioactivas	Liberación de medicamentos
Transferencia de fase	Separaciones por afinidad	Inmovilización de enzimas

1.7 BIOCONJUGACIÓN^{16, 17, 18}

Cada modificación química o proceso de conjugación involucra la reacción de un grupo funcional con otro, dando como resultado la formación de un enlace covalente. La creación de reactivos de bioconjugación con grupos funcionales reactivos espontánea o selectivamente, es la base para moléculas de entrecruzamiento o anclaje. Existen cientos de reactivos descritos en la literatura pero la mayoría utiliza principios químicos orgánicos que pueden ser resumidos en unas docenas de reacciones primarias.

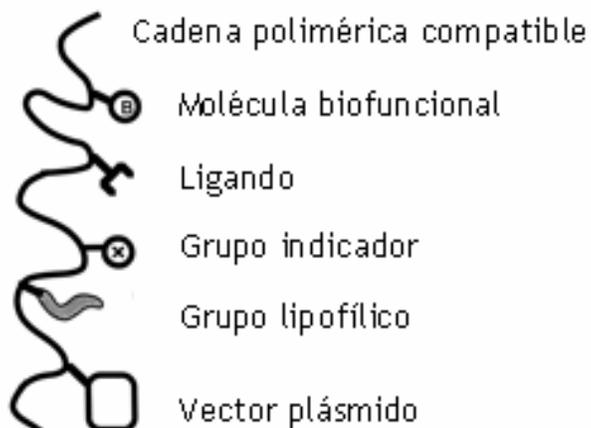


Figura 1.15 Biomoléculas utilizadas para bioconjugación.

Los grupos funcionales capaces de acoplarse a moléculas que contienen aminas son por mucho los grupos más comunes que se encuentran presentes en agentes de entrecruzamiento o modificación. Muchas de estas reacciones son rápidas y ocurren con eficiencias de reacción muy altas para formar amidas estables o enlaces amino secundarios. Entre estos grupos se encuentran:

Isocianatos: estos pueden ser formados de la reacción de una amina aromática con fosgeno. Los isocianatos pueden reaccionar con moléculas que contienen grupos amino para formar enlaces de isourea estables. La reactividad de estos es más grande que la de los isotiocianatos.

Acil azidas: estas son activadas con grupos carboxilato que pueden reaccionar con aminas primarias para formar enlaces amida. La azida es un buen grupo saliente al igual que el grupo succinimida de los compuestos éster. Las condiciones óptimas para la reacción se encuentran en un intervalo de pH entre 8.5 y 10 en buffers que no contengan aminas u otros nucleófilos. La mayor reacción de competencia en el acoplamiento del grupo es la hidrólisis. Las reacciones se llevan a cabo en 2-4 h a temperatura ambiente.

Ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS): este grupo es quizás el más comúnmente utilizado para crear agentes reactivos. Un éster de NHS se forma por la reacción de un carboxilato con NHS en presencia de una carbodiimida. Para preparar derivados de éster de NHS estables, la reacción de activación debe ser realizada en condiciones no acuosas usando carbodiimidias insolubles en agua o agentes de condensación como el DCC.

Los ésteres de NHS reaccionan con nucleófilos para obtener un grupo saliente (NHS), la reacción con aminas primarias y secundarias crean enlaces amida e imida respectivamente, los cuales son estables. De este modo, los reactivos de entrecruzamiento de este tipo de ésteres, se acoplan principalmente con α -aminas en los N-terminales y con ϵ -aminas de la lisina.

Estos ésteres tienen una vida media del orden de horas bajo condiciones fisiológicas de pH. Sin embargo, la hidrólisis y la reactividad se incrementa cuando aumenta el pH; por ejemplo a pH 8 y 25°C la vida media es de 1 h pero si aumentamos el pH a 8.6 la vida media es de sólo 10 minutos. Esto es debido a la hidrólisis que sufren los ésteres, la cual puede ser medida por el incremento en la absorbividad. Para maximizar la modificación de aminas y minimizar los efectos de esta reacción, se necesita mantener una alta concentración de proteínas u otra molécula objetivo en el medio de reacción.

Los reactivos disponibles más pequeños para los sistemas de bioconjugación son los llamados entrecruzadores de longitud cero. Estos compuestos intervienen en la conjugación de dos moléculas formando un enlace que no contiene átomos adicionales. Así uno de los átomos de la molécula es unido covalentemente a un átomo de la segunda molécula sin la intervención de un espaciador o grupo unión.

Un interés considerable se ha estado enfocando en los últimos 20 años a polímeros multifuncionales que puedan ser empleados en el campo biomédico. Una manera de obtener macromoléculas con funciones especializadas es preparar polímeros o copolímeros de N-acrilamidas sustituidas o metacrilamidas, las cuales contengan los grupos de anclaje deseados como sustituyentes [19]. Uno de los

polímeros más utilizado para este tipo de bioconjugaciones es el PNAS ya que el grupo succinimida reacciona fácilmente con grupos nucleófilos permitiendo así la activación de la cadena polimérica o la inmovilización de moléculas con interés biológico.

1.7.1 N-acriloxisuccinimida^{19, 20, 21}

Los polímeros multifuncionales han despertado un gran interés debido a la capacidad que estos presentan para inmovilizar biomoléculas, lo cual puede ser aplicado en biotecnología, medicina, etc.

Una manera de obtener macromoléculas con funciones especializadas es preparar polímeros o copolímeros que contengan los grupos de anclaje deseados como sustituyentes. La síntesis de los monómeros correspondientes, o la polimerización de éstos a polímeros lineales de alto peso molecular es muy difícil; mas aún si se requiere una estructura compleja. Estas dificultades pueden ser evitadas si son sintetizados con grupos funcionales laterales que pueden ser transformados en grupos amida vía condensación con aminas primarias o secundarias. De hecho, las aminas con estructuras adecuadas son más fáciles de obtener que los derivados correspondientes de acrililo o metacrililo.

La N-acriloxisuccinimida (NAS) es un compuesto químico altamente utilizado en bioquímica debido a su facilidad para reaccionar con electrófilos y ser un buen grupo saliente. Esto es debido a que el enlace éster es muy labil permitiendo que pueda romperse y así introducir el grupo que nos interesa. EL NAS también es muy socorrido como comonomero reactivo dado que el grupo succinimida es químicamente estable pero muestra una amplia reactividad y selectividad hacia nucleófilos amino, lo cual hace posible la síntesis de polímeros multifuncionales que pueden ser usados en el área farmacéutica o biomédica. Entre las aplicaciones de este polímero se encuentran la liberación de medicamentos, inmovilización de enzimas así como de péptidos [22, 23].

La N-acriloxisuccinimida se obtiene fácilmente acoplando ácido acrílico con N-hidroxisuccinimida en presencia de diciclohexilcarbodiimida:

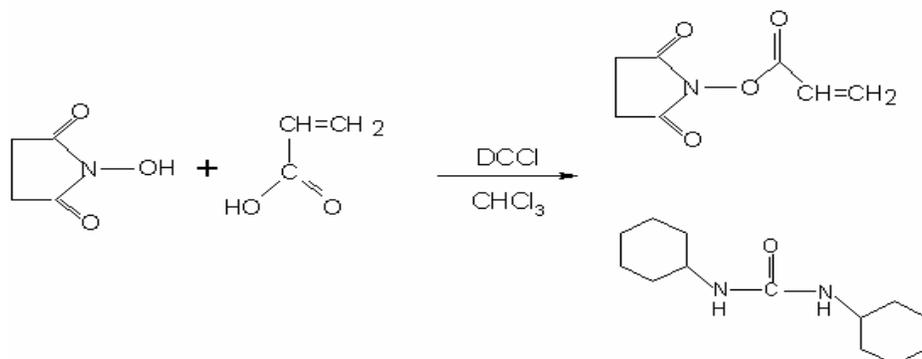


Figura 1.16 Ruta de síntesis del NAS.

Sin embargo, el porcentaje de recuperación es muy bajo (45-50%) debido a que se polimeriza parcialmente durante su purificación, lo cual no puede ser evitado totalmente por los inhibidores.

Pollak [20] reportó un método más conveniente para la síntesis del NAS, el cual utilizó para inmovilizar enzimas, basado en una reacción de condensación.

Recientemente un gran número de métodos de acoplamiento de proteínas a liposomas preformadas han sido descritos en varios artículos. Pero básicamente utilizan un método de conjugación vía grupos amino de la proteína por activación de la carbodiimida en presencia de NHS.

La poli(N-acriloxisuccinimida) ha sido usada como un éster activo para enlazar proteínas a soportes sintéticos a través de la formación de un enlace amida con residuos de lisina [24]. La inmovilización de membranas en soportes sólidos poliméricos permite grandes aplicaciones como sistemas contenedores de liberación controlada, como fase estacionaria para dispositivos cromatográficos o como órganos artificiales [15].

El monómero (NAS) es altamente utilizado en la bioconjugación por su capacidad para reaccionar fácilmente con diferentes biomoléculas, funcionalizando el

polímero. Esta conjugación produce un nuevo híbrido que puede sinérgicamente combinar las propiedades individuales de los dos componentes para producir otro con propiedades inusuales.

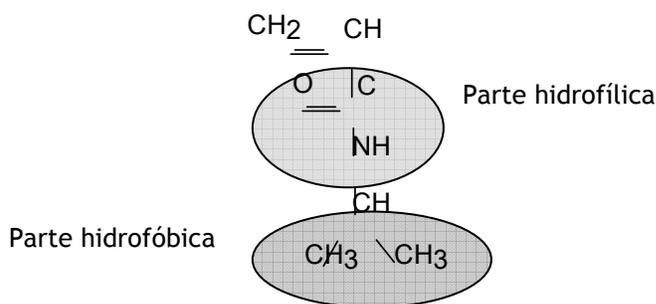
1.7.2 N-isopropilacrilamida^{13, 25, 26, 27}

Los materiales que responden a estímulos exhiben cambios en su comportamiento con respuesta a un estímulo externo. Tales polímeros han llegado a ser de gran interés ya que con ellos se pueden desarrollar materiales suaves y biomédicos. Entre los polímeros más utilizados está la N-isopropilacrilamida (NIPAAm) ya que posee una solubilidad inversa; es decir, se vuelve insoluble aumentando la temperatura, una propiedad contraria al comportamiento de la mayoría de los polímeros en disolventes orgánicos bajo presión atmosférica. Una solución acuosa muestra un cambio de fase debido a que presenta un coeficiente de solubilidad negativo en agua, haciendo que a temperaturas menores a su temperatura crítica el material se comporte como un hidrofílico y por lo tanto sea soluble mientras por arriba de esta se comporta como un hidrofóbico y el material precipita [13].

Esta transición macromolecular de una estructura hidrofílica a una hidrofóbica ocurre abruptamente a una cierta temperatura conocida como “Lower Critical Transition Temperature” (LCST), la cual se encuentra entre los 30 y 35°C; la temperatura exacta es una función de la microestructura de la macromolécula. Debido a esta termosensibilidad, se han usado homo y copolímeros de NIPAAm en inmunoensayos, para bioseparaciones, sistemas de distribución controlada y bioreactores [13, 28].

Este comportamiento ha sido explicado por medio de las fuerzas moleculares que se dan entre el disolvente y las moléculas. Cuando la temperatura esta por debajo de la LCST, el monómero o polímero lineal esta disuelto debido a que la parte hidrofílica de la molécula (grupo amino) forma puentes de hidrógeno con las moléculas de agua que la rodean, cubriendo de esta manera los grupos hidrofóbicos

(grupo isopropil) y solvatándolos. Cuando la temperatura empieza aumentar, los puentes de hidrógeno se debilitan y se van rompiendo haciendo que los grupos hidrofóbicos de la moléculas estén cada vez más expuestos al agua que los rodea hasta que las fuerzas de repulsión son tan grandes que el NIPAAm tiene que doblarse sobre si para repeler el agua, por lo que se convierte en un material hidrofóbico

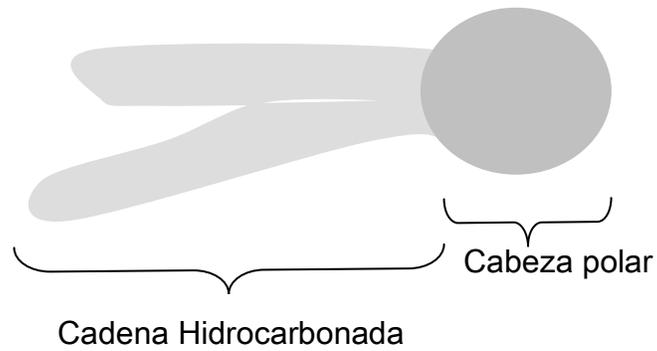


Esta propiedad puede ser utilizada para numerosas aplicaciones ya que dichos polímeros se pueden funcionalizar por polimerización o copolimerización con otros monómeros para unirse covalente o iónicamente con diferentes biómoleculas, como los lípidos, alterando su bioactividad y permitiendo la formación de sistemas que tengan respuesta al ambiente junto con una actividad biológica.

1.7.3 Lípidos²⁹

Los lípidos son una clase de moléculas biológicas definidas por su baja solubilidad en agua y su alta solubilidad en disolventes no polares. Durante su oxidación producen grandes cantidades de energía, por tanto son moléculas que almacenan energía metabólica.

Una característica básica de los lípidos y de la que derivan sus principales propiedades biológicas es la hidrofobicidad. La baja solubilidad de los lípidos se debe a que su estructura química es fundamentalmente hidrocarbonada. Por su parte, el agua al ser una molécula muy polar, forma con gran facilidad puentes de hidrógeno y no es capaz de interactuar con estas moléculas.



Los lípidos encontrados en los sistemas biológicos son anfipáticos, lo cual significa que poseen una parte polar y una no polar. La parte polar típicamente se encuentra en la superficie de las membranas, donde interactúan con el agua. Las proteínas interactúan con los lípidos de diferentes maneras, algunas se asocian vía interacciones electrostáticas con los grupos polares de la superficies de la membrana mientras otras son embebidas en el centro hidrofóbico de la membrana. Otras más son unidas vía enlaces covalentes entre las moléculas de lípidos y las proteínas que se asocian fuertemente con el centro hidrofóbico de la membrana.

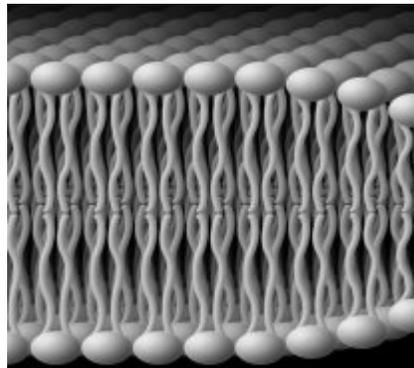


Figura 1.17 Estructura de una membrana lipídica.

1.7.3.1 Clasificación de los Lípidos^{29, 30}

Los lípidos se pueden clasificar de diversas maneras: por su polaridad, por su estructura o por su facilidad para hidrolizarse. Sin embargo una forma de integrar todos los lípidos puede ser la siguiente:

Ácidos grasos: están compuestos por ácidos carboxílicos que contienen 4 átomos de carbono o más. La cadena hidrocarbonada se le llama tallo y al grupo carboxilo terminal cabeza. El grupo carboxilo se encuentra normalmente ionizado bajo condiciones fisiológicas. Los ácidos grasos pueden ser saturados (enlaces sencillos carbono-carbono) o insaturados (uno o más enlaces dobles).

Glicéridos: están constituidos por ácidos grasos de alto peso molecular y glicerina. Estos se dividen en glicéridos neutros que son ésteres del glicerol (triacilglicéridos, diacilglicéridos y monoacilglicéridos) así como en fosfoglicéridos que son ésteres de fosfato (lecitinas y cefalinas).

Lípidos que no contienen colesterol: entre ellos se encuentran los esfingolípidos, esteroides, ceras y terpenos (lípidos compuestos por unidades de isopreno). Cada miembro de este grupo tiene su propia estructura fundamental.

Los lípidos son compuestos muy importantes dentro del área bioquímica y desempeñan cuatro tipos de funciones:

- 1.- Función de reserva. Son la principal reserva energética del organismo. Un gramo de grasa produce 9.4 kilocalorías en las reacciones metabólicas de oxidación, mientras que proteínas y glúcidos sólo producen 4.1 kilocaloría/g.
- 2.- Función estructural. Forman las bicapas lipídicas de las membranas; recubren órganos y los protegen mecánicamente como el tejido adiposo de pies y manos.
- 3.- Función biocatalizadora. En este papel los lípidos favorecen o facilitan las reacciones químicas que se producen en los seres vivos.

- 4.- Función transportadora. El transporte de lípidos desde el intestino hasta su lugar de destino se realiza mediante una emulsión gracias a los ácidos biliares y a los proteolípidos, asociaciones de proteínas específicas con triacilglicéridos, colesterol, fosfolípidos, etc.; que permiten su transporte por sangre y linfa.

1.7.3.2 Comportamiento en solución^{29, 31 32}

Los lípidos anfipáticos espontáneamente forman una variedad de estructuras cuando se añaden a soluciones acuosas (figura 1.18). En presencia de agua, las moléculas de lípidos adoptan una estructura muy ordenada que maximiza las interacciones entre ellas, forzando que la parte hidrofóbica de la molécula se repliegue al interior de una estructura en forma de jaula, lo cual también reduce la movilidad del lípido. Todo ello supone una configuración de baja entropía que resulta energéticamente desfavorable. Esta disminución de entropía es mínima si las moléculas lipídicas se agregan entre sí e interaccionan mediante fuerzas de corto alcance, como las fuerzas de Van der Waals. Este fenómeno recibe el nombre de efecto hidrofóbico.

Por ejemplo cuando se agregan pequeñas cantidades de ácido graso a una solución acuosa, una monocapa es formada en la interfase aire-agua, con la cabeza polar en contacto con el agua y los tallos hidrofóbicos en contacto con el aire. Si se sigue adicionando eventualmente se forman micelas, esto sucede cuando se alcanza la concentración micelar crítica (CMC).

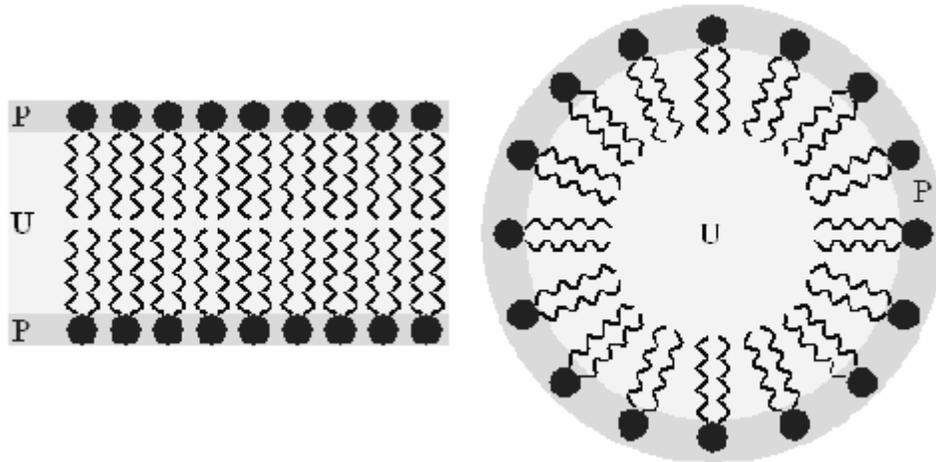


Figura 1.18 Estructura de los lípidos en contacto con agua. (a) Bicapa y (b) Micela.

La bicapas de lípidos consisten en arreglos “back to back” de monocapas. Los fosfolípidos prefieren formar estructuras de bicapas en solución acuosa porque las cadenas no polares no se acomodan o empaquetan bien dentro del interior de una micela. Estas bicapas se forman rápida y espontáneamente cuando son añadidas en agua y llegan a ser estructuras muy estables. Dado que la exposición de las bicapas en solventes es altamente desfavorable, muchas de las bicapas normalmente se enrollan alrededor de si mismas y forman vesículas cerradas llamadas liposomas.

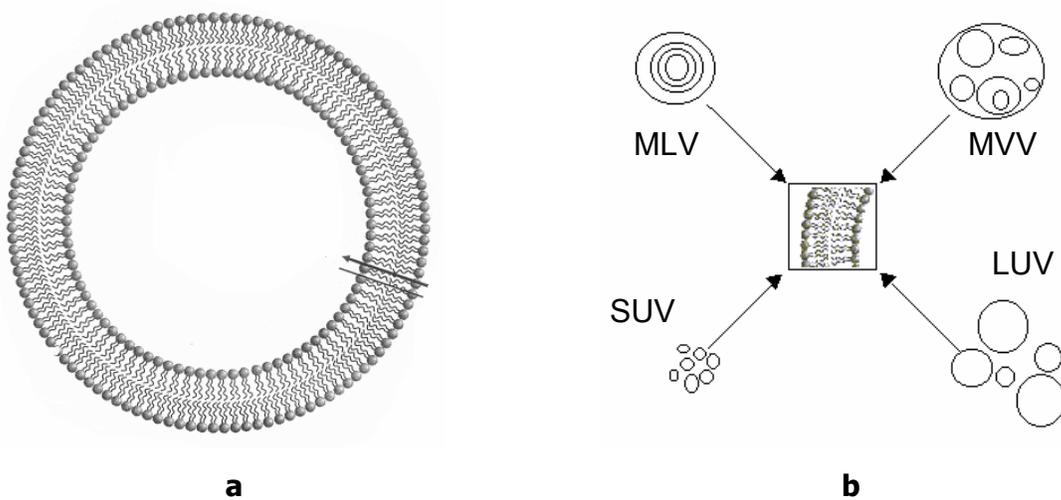


Figura 1.19 Liposomas. (a) estructura, (b) clasificación.

Los liposomas se pueden definir como vesículas de lípidos en los cuales un volumen acuoso está completamente encerrado por una membrana compuesta de moléculas de lípidos. Con respecto al número y tamaño de las membranas (lamelas), se distinguen las vesículas multilamelares grandes (MLV) y las vesículas unilamelares (UV) que pueden ser pequeñas (SUV), grandes (LUV) o gigantes (GUV).

Los lípidos utilizados para la formación de vesículas pueden extraerse de fuentes naturales o sintetizados químicamente. Los lípidos naturales más comunes son lecitinas (fosfatidilcolinas PC, esfingomelinas y fosfatidiletanolaminas PE), los cuales son zwitterionicos (tienen una parte aniónica y otra catiónica) a un pH de 7.4. Las fuentes más comunes son las yemas de los huevos, sojas y sesos de buey.

Los lípidos aniónicos naturales incluyen fosfatidilserinas (PS), fosfatidilglicerol (PG) y fosfatidilinositol (PI). Un serio inconveniente de los lípidos naturales es que contienen una mezcla de cadenas de diferente tamaño y heterogéneas. Por el contrario, la síntesis química puede producir lípidos con cadenas bien definidas (número de carbonos en la cadena y grado de saturación) unidos a las mismas cabezas polares. El colesterol es un importante componente en las vesículas de lípidos para mejorar la estabilidad mecánica de las bicapas y así incrementar la retención de los agentes encapsulados [31].

Estas partículas coloidales se pueden formar naturalmente o ser preparadas artificialmente; la naturaleza e integridad de estas vesículas dependen mucho de la composición de los lípidos. El hecho de que formen micelas y vesículas es una consecuencia de la naturaleza anfipática de las moléculas. Las interacciones entre los grupos polares y el agua son maximizadas, mientras las interacciones hidrofóbicas facilitan la asociación de las cadenas hidrocarbonadas en el interior de la bicapa. La formación de las vesículas resulta en un incremento favorable en la entropía de solución dado que las moléculas de agua no son requeridas alrededor de las cadenas de lípidos. En consecuencia, son estructuras estables que pueden ser sujetas a manipulación con cromatografía de filtración de gel o diálisis, y ser usadas como sistemas de distribución de enzimas o medicamentos en aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, los liposomas pueden ser usados para introducir agentes de contraste

(mejoran el contraste luz/oscuridad de los objetos en una imagen) para diagnósticos de imagen incluyendo tomografía computarizada y resonancia magnética.

1.8 Métodos de Caracterización

Los polímeros, como se mencionó con anterioridad, son materiales ampliamente utilizados en la vida cotidiana debido a las propiedades que presentan, entre ellas mencionamos la conjugación con moléculas biológicamente activas. Sin embargo, para poder determinar que polímeros pueden utilizarse y darles un uso apropiado, debemos caracterizarlos adecuadamente por medio de diversas técnicas entre las cuales destacan el infrarrojo, la cromatografía de permeación en gel, espectrometría de masas, análisis térmico, etc.

1.8.1 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)³³

Es una técnica que se emplea para estudiar lo que ocurre cuando un polímero es calentado, es decir, analizamos las transiciones térmicas del material y medimos la energía necesaria para establecer una diferencia de temperatura cercana a cero entre una muestra y el material de referencia.

El equipo se compone de dos platillos de calentamiento, en uno de ellos se coloca la muestra y en el otro el material de referencia, el cual permanece vacío. Como los dos están sujetos a condiciones idénticas de temperatura y a una rapidez de calentamiento constante, lo que se mide es el calor adicional que debe suministrarse a la muestra para que ésta tenga la misma temperatura que la referencia. Esto es debido a que el platillo de referencia está vacío y el otro no, por lo que se necesita suministrar más calor para lograr que el calentamiento en ambos platos sea idéntico. Por ende, el DSC mide el calor adicional que debe suministrarse en función de la temperatura. Como es conocido, cuando agregamos una cantidad de calor a algo, su temperatura se incrementa en una cierta cantidad y a dicha cantidad de calor necesario para producir ese incremento se le llama capacidad calorífica (C_p). La C_p se obtiene dividiendo el calor suministrado por el incremento de resultante de

temperatura. Por lo tanto cuando tenemos un incremento en el flujo de calor obtenemos un incremento en la capacidad calorífica, lo cual se puede asociar a un cambio de fase en el material.

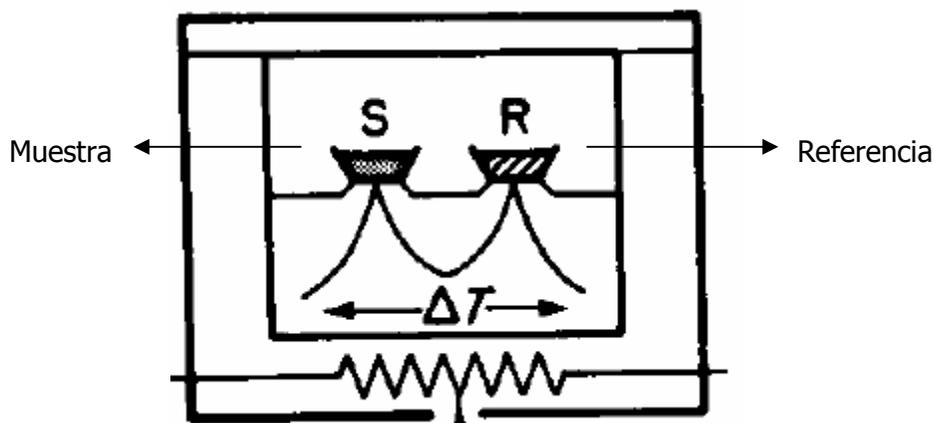


Figura 1.20 Esquema de una celda de DSC.

Las muestras pueden ser sólidas o líquidas, y la magnitud de la muestra debe ser del orden de 1 a 10 mg. La ventaja de esta técnica es que permite corridas de alta velocidad, tiene una alta resolución dando buenos resultados cuantitativos y produce formas regulares en la respuesta.

Entre los datos que es posible obtener están la temperatura de transición vítrea, punto de fusión, temperatura de descomposición y puede ser empleado para medir directamente los calores de fusión, vaporización, cristalización, descomposición, calores específicos así como energías de activación y entropías de transición.

1.8.2 Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR-ATR)^{33, 34}

La espectroscopia infrarroja es un tipo de *espectroscopia vibracional* donde se analizan las vibraciones moleculares. Para comprender cabalmente la espectroscopia IR, primeramente se debe entender los principios del *movimiento armónico simple*. Si tenemos dos esferas o masas conectadas por medio de un resorte, una vez puestas en movimiento, las esferas comenzarán a oscilar o vibrar de un lado al otro a lo largo

del resorte a una cierta frecuencia que dependerá de la masa de las esferas y de la rigidez del resorte.



Una esfera de masa pequeña se moverá con mayor facilidad que otra de masa mayor. En consecuencia, las masas más pequeñas oscilan a mayor frecuencia que las masas más grandes. Por otro lado, un resorte sumamente rígido es difícilmente deformable y rápidamente retorna a su forma original cuando se deja de aplicar la fuerza mientras un resorte débil se deforma fácilmente y demora mucho tiempo en volver a su forma original; de ahí que un resorte más rígido oscilará a mayor frecuencia que uno débil. El enlace químico entre dos átomos puede ser considerado como un oscilador armónico simple. El enlace sería el resorte y los dos átomos o grupos de átomos conectados por el enlace, serían las esferas. Cada átomo tiene una masa diferente y los enlaces simples, dobles o triples poseen distinta rigidez, por lo que cada combinación de átomos y enlaces posee su propia frecuencia armónica característica.

Por tanto la espectroscopia de infrarrojo estudia la interacción entre la radiación infrarroja y la materia. Como sucede con otros tipos de energía, las moléculas son excitadas a estados de alta energía cuando absorben radiación infrarroja, la cual comprende un intervalo de número de onda de 13000 a 10 cm^{-1} (0.75 a $1000\text{ }\mu\text{m}$); sin embargo en la práctica se utiliza el infrarrojo intermedio que va de 4000 a 400 cm^{-1} . Para fines prácticos, solamente se consideran los procesos de absorción de energía radiante por parte de la materia que afectan a las vibraciones fundamentales de las moléculas, sus armónicos o sobretonos y combinaciones, vibraciones de enlaces de hidrógeno, movimientos reticulares de los cristales, rotaciones internas de las moléculas, rotaciones de moléculas ligeras, etc.

La espectroscopia de IR nos permite identificar los grupos funcionales de los compuestos, en este caso de los polímeros, debido a que cada tipo de enlace tiene una frecuencia de vibración diferente y ninguna molécula tiene exactamente el mismo espectro de infrarrojo.

Para la técnica de ATR (Reflectancia Total Atenuada) se utiliza un dispositivo en el que la radiación infrarroja incide sobre 4 espejos, lo que propicia que el haz incida sobre el cristal. El cambio del índice de reflexión en la superficie del cristal causa que el haz sea reflejado algunas veces a lo largo del cristal y finalmente se dirija hacia el detector. Como la muestra está en contacto con la superficie del cristal, el rayo interacciona con ésta en algunos puntos y sólo penetra unas cuantas micras del material. Por lo tanto el análisis es representativo únicamente de la capa superficial. El cristal que se utiliza como soporte de las muestras es de selenuro de zinc (ZnSe) ya que no absorbe radiación por arriba de 700 cm^{-1} .

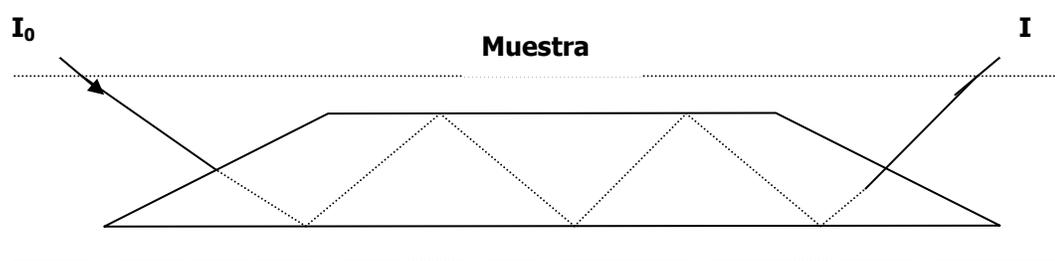


Figura 1.21 Esquema de la ruta del haz de radiación infrarroja.

1.8.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)³³

Es una técnica en la que se forma la imagen de una región microscópica de la superficie de una muestra. Esto se logra cuando un haz de electrones de entre 5 y 10 nm choca con el material. La interacción de los electrones con la muestra produce varios fenómenos: electrones retrodispersados de alta energía, electrones secundarios de baja energía y absorción de electrones, los cuales pueden producirse en su conjunto como corriente en la muestra, rayos X y luz visible. Una fracción de los electrones emitidos pueden ser colectados por detectores apropiados y ser usados para modular el brillo o claridad de un cátodo (CRT) cuyas entradas son manejadas en sincronismo con los voltajes del haz de electrones. Uno de los detectores más comunes es el de electrones secundarios. Los mismos son emitidos desde la muestra como consecuencia de las ionizaciones surgidas de las

interacciones inelásticas. Por esta razón, poseen baja energía (50 eV) y brindan una imagen de la morfología superficial de la muestra.

De esta manera, una imagen es producida en el CRT; cada punto que el haz golpea en la muestra es mapeado directamente sobre un punto correspondiente de la pantalla. Las muestras que no son buenas conductoras tienen que recubrirse con oro, plata, carbón u oro-paladio, por evaporación a alto vacío para poder tener una buena resolución en las imágenes formadas.

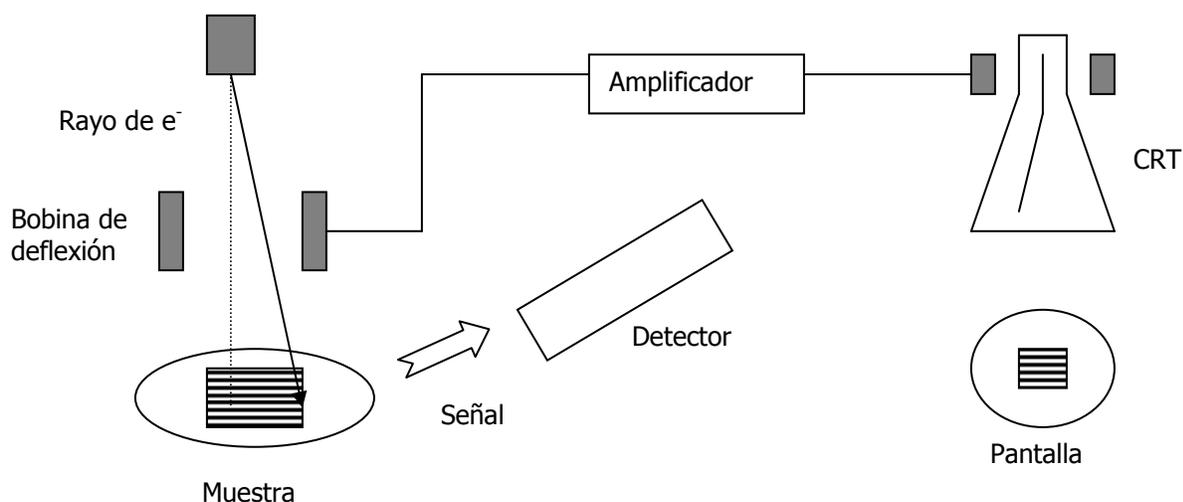


Figura 1.22 Esquema un equipo de SEM

Entre las aplicaciones de esta técnica tenemos el estudio de las morfologías de polímeros, copolímeros y polimezclas, la microestructura de fases de polímeros, redes de polímeros, rugosidad de superficie, superficies fracturadas, recubrimientos orgánicos, entre otros.

En nuestro caso los electrones retrodispersados son utilizados para obtener imágenes de la superficie de la red interpenetrante (IPN) así como de los hidrogeles de PNIPAAm. Como las muestras no son buenas conductoras de la electricidad, se recubrieron con oro al vacío y posteriormente fueron tomadas las imágenes a diferentes ampliaciones, las imágenes transversales se lograron fracturando por enfriamiento con nitrógeno.

1.8.4 Cromatografía por exclusión de tamaño (SEC)³³

Cuando hablamos de un polímero, no nos referimos a un solo peso molecular, sino a una *distribución* de pesos moleculares, como puede observarse en figura 23; lo mejor es hablar de un peso molecular promedio y describir la distribución de pesos moleculares alrededor del promedio. Eso significa contar cuántas moléculas de polímero tienen realmente el peso molecular promedio, cuántas tienen peso superior o inferior al promedio y en qué cantidad.

La cromatografía de exclusión, también llamada de filtración en gel o cromatografía de permeación en gel (GPC), se basa en el diferente poder de penetración que poseen las moléculas para adentrarse en los poros de la fase estacionaria, ya que la separación de ellas depende del tamaño de la molécula; además el tiempo de elución es proporcional al peso molecular de los mismos. Este tipo de separación por tamaño difiere de las demás técnicas cromatográficas en que no existen interacciones químicas entre el analito y la fase estacionaria. Es una técnica reproducible, escalable y rápida.

En esta técnica lo primero es disolver el polímero en un disolvente adecuado, generalmente tetrahidrofurano (THF) o cloroformo, luego la solución del polímero se inyecta en la columna del cromatógrafo, la cual está formada por partículas poliméricas o de sílice que contienen una red de poros por los que pueden penetrar las moléculas de pequeño tamaño. Las moléculas de tamaño grande se excluyen totalmente y son eluidas en primer lugar, mientras que las de pequeño tamaño tienen acceso a todo el volumen poroso y son las últimas en eluir; de esto se deduce que el volumen disponible para las moléculas pequeñas es mayor que para las grandes por lo que las moléculas se eluyen por su tamaño decreciente. En resumen, los factores que determinan la separación de las moléculas son el tamaño del poro, el tamaño de la partícula y el flujo de elución.

Los diferentes tipos de partículas usadas deben ser estables, mecánica y químicamente, tener bajo contenido en grupos iónicos, uniformidad de poro y tamaño. Los compuestos pueden ser derivados de dextranos (Sephadex), derivados

de agarosa (Sepharosa), derivados de acrilamidas (Biogel P) y esferas de vidrio. Hay diferentes tamaños de partícula para un gel: a menor tamaño mayor resolución y menor gasto en la columna.

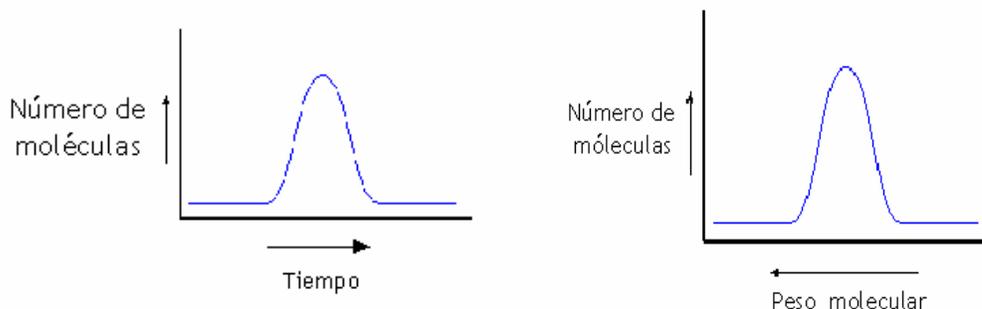


Figura 1.23 Relación entre el tiempo de elusión y el peso molecular.

Sin embargo, el SEC presenta algunas desventajas pues no medimos masa sino el *volumen hidrodinámico* de las moléculas poliméricas, es decir, el espacio que ocupa una molécula particular cuando se encuentra en solución. A partir del SEC podemos hacer una aproximación al peso molecular puesto que conocemos la relación exacta entre peso molecular y volumen hidrodinámico para el poliestireno, el cual se utiliza como un estándar pero la relación entre volumen hidrodinámico y peso molecular no es la misma para todos los polímeros, de modo que sólo obtenemos una medición aproximada. Es importante mencionar que para poder utilizar esta técnica se necesita realizar una calibración con dicho polímero, por lo que es necesario suponer que el volumen hidrodinámico del polímero es igual o parecido al del estándar que se utiliza para calibrar, lo cual no es cierto. Actualmente, los equipos de SEC utilizan un método absoluto acoplado al GPC de tal forma que ya no es necesario realizar una calibración previa.

1.8.5 Análisis Elemental

El análisis elemental es una técnica que permite llevar a cabo la determinación cuantitativa del contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno presente en una muestra, la cual puede ser tanto sólida como líquida y de naturaleza orgánica e inorgánica. La técnica está basada en la completa e

instantánea oxidación de la muestra mediante una combustión con oxígeno puro a una temperatura aproximada de 1000°C. Los diferentes productos de combustión (CO₂, H₂O y N₂) son transportados mediante el gas portador (He) a través de un tubo de reducción y después selectivamente separados en columnas específicas para ser desorbidos térmicamente. Finalmente, los gases pasan de forma separada por un detector de conductividad térmica que proporciona una señal proporcional a la concentración de cada uno de los componentes individuales de la mezcla.

1.8.6 Otras Técnicas espectroscópicas³⁵

Además del infrarrojo, existen algunas otras técnicas espectroscópicas que se utilizan ampliamente para caracterizar a los polímeros. Una de ellas es la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), la cual es utilizada para obtener información microestructural del material. Aquí se distingue la estructura de las moléculas involucradas en la formación de resinas, especies que aparecen durante el curado, la estructura final en copolímero, etc.

Las nuevas técnicas de RMN con ¹³C proporcionan también una buena información microestructural, tanto de carbonos alifáticos como de aromáticos, número de puntos de ramificación y grupos terminales así como de enlaces químicos.

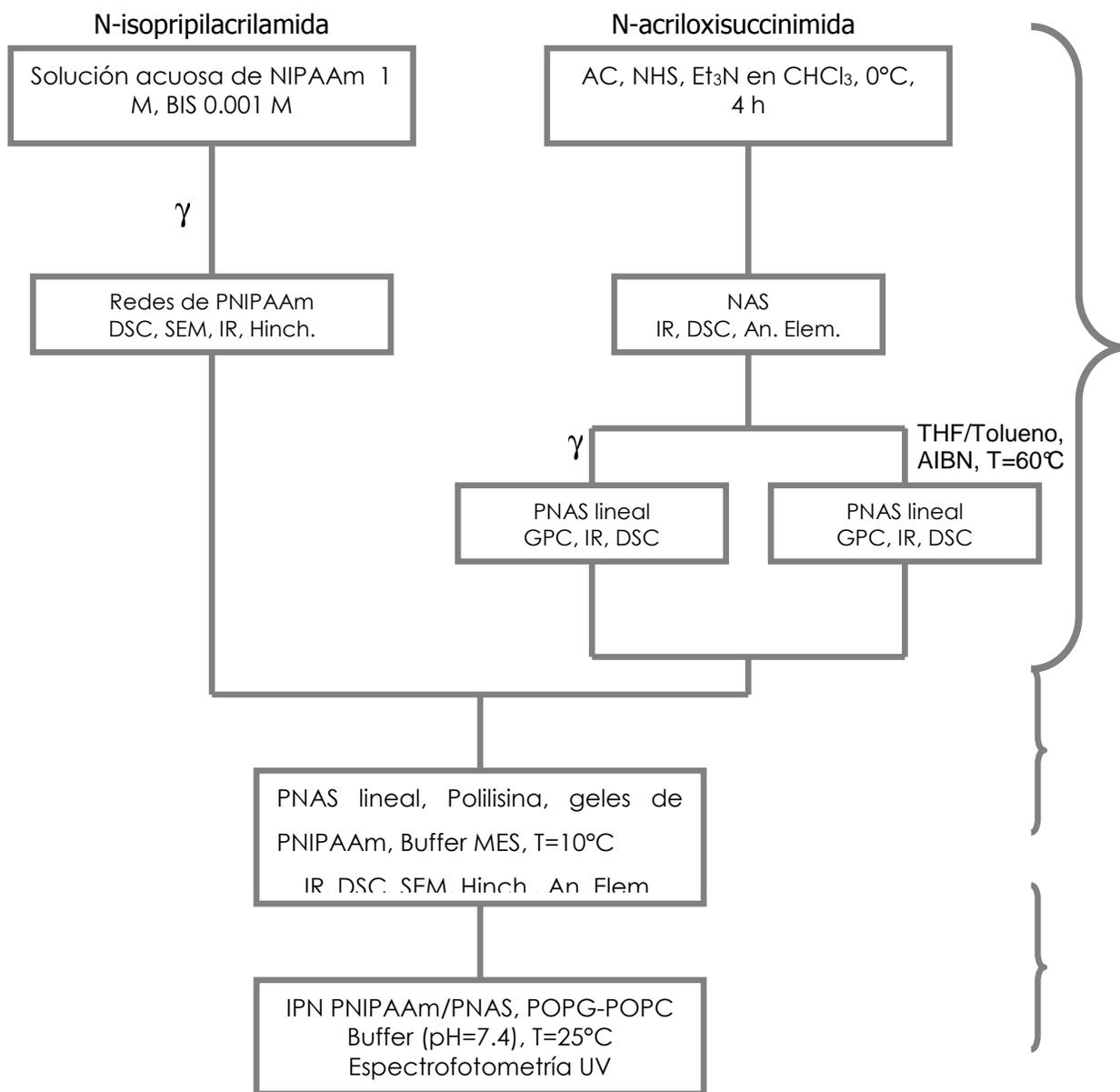
La espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS) es una técnica analítica para la identificación de elementos distribuidos en un polímero y para analizar la estructura así como la composición de la superficie de compuestos químicos (sólidos). El XPS también proporciona información sobre la energía de enlace o ionización.

La espectrometría de masas se usa para la caracterización de componentes poliméricos individuales y mezclas de polímeros comerciales. Esta técnica se aplicó en la identificación de especies moleculares en lacas.

Otras técnicas como la difracción por rayos X (determina la conformación molecular), STM (Microscopía de Efecto Tunnel) y AFM (Microscopía de Fuerza Atómica), se utilizan en la actualidad para estudiar superficies.

CAPITULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para conseguir los objetivos planteados en este proyecto se realizó el siguiente plan de trabajo, el cual se divide en tres partes principales:



- 1) Síntesis de la red 1 (PNIPAAm) y formación del polímero lineal 2 (PNAS).
- 2) Formación de la red interpenetrante por el método simultáneo.
- 3) Inmovilización de lípidos.

2.1 SÍNTESIS DEL GEL DE PNIPAAM

Para sintetizar la poli(N-isopropilacrilamida) reticulada se utilizó el método de irradiación directa en atmósfera inerte. Para ello el primer paso es purificar el monómero por medio de una recristalización, esto con el fin de eliminar posibles impurezas. Posteriormente se hacen disoluciones acuosas al 10% w/w de NIPAAm con y sin agente reticulante, en este caso la N,N-metilenbisacrilamida (BIS), y se irradian con radiación gamma .

2.1.1 PURIFICACIÓN DE LA N-ISOPROPILACRILAMIDA

Para la purificación de NIPAAm (pureza 96%, Aldrich), se realiza una recristalización con una mezcla de Hexano/Tolueno (50/50 %v):

- ✓ La mezcla de disolventes se calienta hasta 40°C, posteriormente se agrega la NIPAAm con agitación constante hasta que se disuelva por completo.
- ✓ Se filtra en caliente para retirar las impurezas que tenga y el líquido resultante se cristaliza disminuyendo la temperatura hasta los 0°C.
- ✓ Cuando se tiene cristalizado el producto, se filtra al vacío y se seca para retirar todo el posible disolvente que pueda contener.
- ✓ Se almacena en un lugar seco.

2.1.2 POLIMERIZACIÓN Y RETICULACIÓN DE LA N-ISOPROPILACRILAMIDA

Para realizar la polimerización del NIPAAm se utilizó el método de irradiación directa por tres rutas: i) disoluciones acuosas de NIPAAm al 10% w/w, ii) disoluciones acuosas de NIPAAm al 10% w/w con N,N-metilenbisacrilamida (BiS), el cual actúa como agente reticulante y iii) en estado sólido bajo presión.

- ✓ Las disoluciones acuosas se colocan en ampollas de vidrio y se burbujan con argón durante 15 minutos para eliminar el oxígeno presente (figura 2.1)
- ✓ Se irradian en atmósfera inerte a diferentes dosis con las condiciones mostradas en la tabla 2.1
- ✓ Se lavan con agua durante un periodo de 48 h para eliminar el homopolímero formado y el monómero que no reaccionó.
- ✓ Se secan a peso constante.

Tabla 2.1 Condiciones de reacción del NIPAAm

Fuente	Co-60
Intensidad de dosis	3.85 kGy/h
Dosis	1, 5, 10, 25, 40, 50, 100, 150, 200 kGy
Solvente	Agua
Monómero	10% w/w NIPAAm
Agente reticulante	1% mol BIS

- ✓ Para la polimerización en estado sólido, se forman pastillas de aproximadamente de 1 mm de espesor a una presión de 8 ton/ Kg.
- ✓ Se colocan en ampollas de vidrio y se burbujea argón para retirar el oxígeno presente.
- ✓ Los demás pasos son idénticos a los descritos anteriormente.

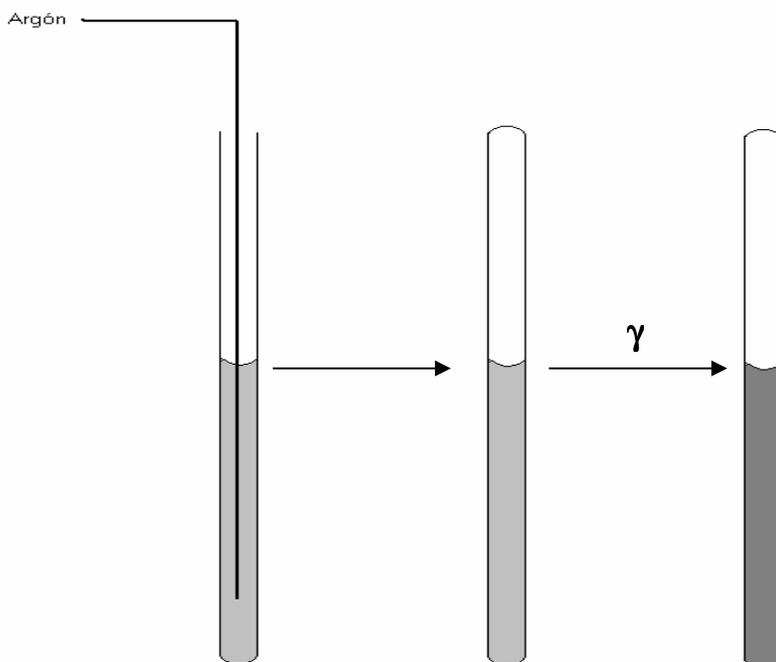


Figura 2.1 Esquema de Polimerización por Radiación.

2.2 SÍNTESIS DE LA POLI(N-ACRILOXISUCCINIMIDA)

La formación del segundo polímero, la poli(N-acriloxisuccinimida), se realizó en dos pasos:

- 1) Síntesis del monómero
- 2) Polimerización

2.2.1 SÍNTESIS DE LA N-ACRILOXISUCCINIMIDA (NAS)

Para sintetizar éste monómero se han reportado diversos métodos como la reacción de NHS en presencia de carbodiimida por medio de una reacción nucleofílica. Sin embargo, el rendimiento de este método es muy bajo y presenta complicaciones en cuanto a recuperación y purificación del producto. Por otro lado, el método reportado por Pollak [20] presenta algunas ventajas debidas a su

sencillez, a un menor tiempo de reacción y a un rendimiento del producto mayor. Por lo tanto, se utilizó el método de Pollak como se describe a continuación:

- ✓ Se colocan cantidades equimolares de N-hidroxisuccinimida, trietilamina y cloruro de acrililo en un matraz con agitación constante.
- ✓ Se deja reaccionar durante 4 horas a una temperatura de 0°C.
- ✓ Posteriormente se lava 4 veces con una disolución saturada de NaHCO₃, se agrega MgSO₄ y se deja con agitación constante durante toda la noche.
- ✓ La disolución resultante se filtra y el disolvente se evapora, en presencia de hidroquinona para evitar que polimerice, hasta obtener un volumen residual muy pequeño (10-15 ml).
- ✓ Se precipita el producto agregando lentamente una mezcla de hexano/ éter (1:1 v/v). La recristalización se repite dos veces.

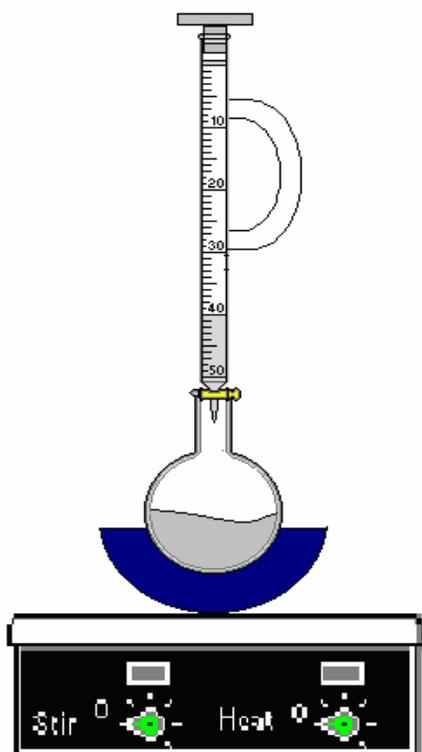


Figura 2.2 Esquema de reacción del NAS.

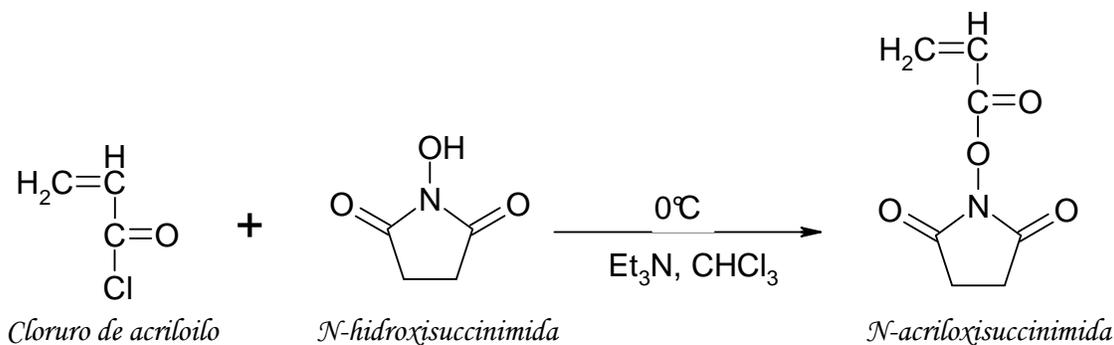


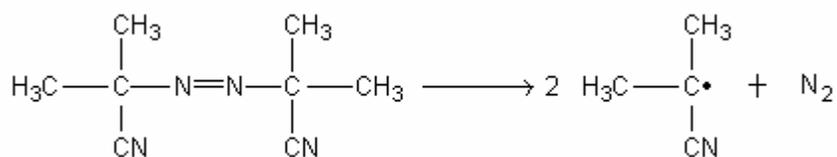
Figura 2.3 Reacción de la N-acriloxisuccinimida.

2.2.2 POLIMERIZACIÓN DE LA N-ACRILOXISUCCINIMIDA

La polimerización del NAS se realizó mediante un método químico, donde se hizo reaccionar el monómero con azoisobutironitrilo, el cual funciona como iniciador. Además, debido a la poca información sobre el efecto que tiene la radiación ionizante sobre este monómero, se probó la polimerización mediante radiación ionizante.

2.2.2.1 MÉTODO QUÍMICO

El primer paso necesario para comenzar la polimerización, es la producción de radicales libres que sean capaces de iniciar la reacción. Para esto se utilizan iniciadores que se descomponen térmicamente, generalmente un peróxido o un compuesto azo que sea capaz de producir dos radicales, los cuales reaccionan con el monómero para formar un radical polimérico. Es decir, estos radicales son los que inician la polimerización.



Azo-isobutironitrilo (AIBN)

La rapidez de descomposición de los iniciadores sigue generalmente una cinética de 1^{er} orden y dependen del disolvente y la temperatura de polimerización. Sin embargo, cuando se realiza un balance de materia en el que, la cantidad de iniciador que se descompone es comparado con la cantidad inicial, se demuestra que el iniciador está siendo utilizado ineficientemente ya que una parte de estos radicales reacciona entre si debido a la cercanía entre ellos. Por lo tanto, no todos los radicales producidos son utilizados para iniciar cadenas poliméricas, sino que algunos participan en reacciones laterales, haciendo que la eficiencia de la obtención de dos radicales a partir de cada molécula de iniciador no sea 1 [3].

La polimerización se llevó a cabo de la siguiente manera:

- ✓ En un sistema como el que se muestra en la figura 2.4, se coloca 1 g de NAS en 15 ml de disolvente (THF/Tolueno). La disolución se burbujea con argón para eliminar el oxígeno.
- ✓ Se calienta hasta llegar a una temperatura de 60°C y se agrega el iniciador, en este caso AIBN (1% wt en base al monómero).
- ✓ La reacción se llevó a cabo bajo una atmósfera inerte a diferentes tiempos de reacción.
- ✓ El producto obtenido se purifica por medio de una recristalización, precipitándolo en un exceso de hexano (250 ml). Posteriormente se filtra y se deja evaporar el disolvente en un desecador.

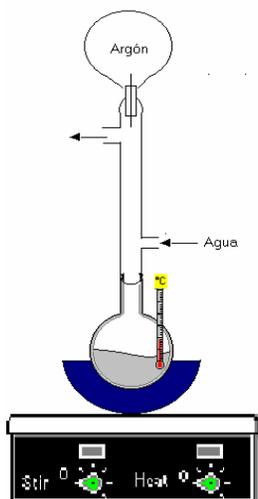


Figura 2.4 Esquema de polimerización del NAS.

2.2.2.2 MÉTODO POR RADIACIÓN

Los efectos que tiene la radiación sobre este monómero no son del todo conocidos por lo que se realizó un estudio sobre el efecto que tiene la radiación gamma sobre el NAS por el método de irradiación directa.

La polimerización se realizó siguiendo el esquema mostrado a continuación:

- ✓ Las disoluciones de NAS/THF con una concentración de 1g/ 15 ml se colocan en ampolletas de vidrio como las mostradas en la figura 2.1
- ✓ Se realiza un procedimiento de desgasificación a vacío, en el cual las disoluciones se someten a ciclos de congelamiento/ descongelamiento en presencia de vacío para eliminar el oxígeno presente en la muestra (figura 2.5).
- ✓ Una vez desgasificadas, se mandan a irradiar a diferentes dosis (1 kGy-200 kGy) a las condiciones mostradas en la tabla 2.2
- ✓ Posteriormente el polímero resultante se lava con THF y después con metanol para eliminar el monómero que no reaccionó.
- ✓ Se seca a peso constante.

Tabla 2.2 Condiciones de reacción del NAS

Fuente	Co-60
Intensidad de dosis	3.85 kGy/h
Dosis	1, 3, 5, 10, 20, 40, 80, 100, 150 kGy
Solvente	THF
Monómero	7% w/w NAS

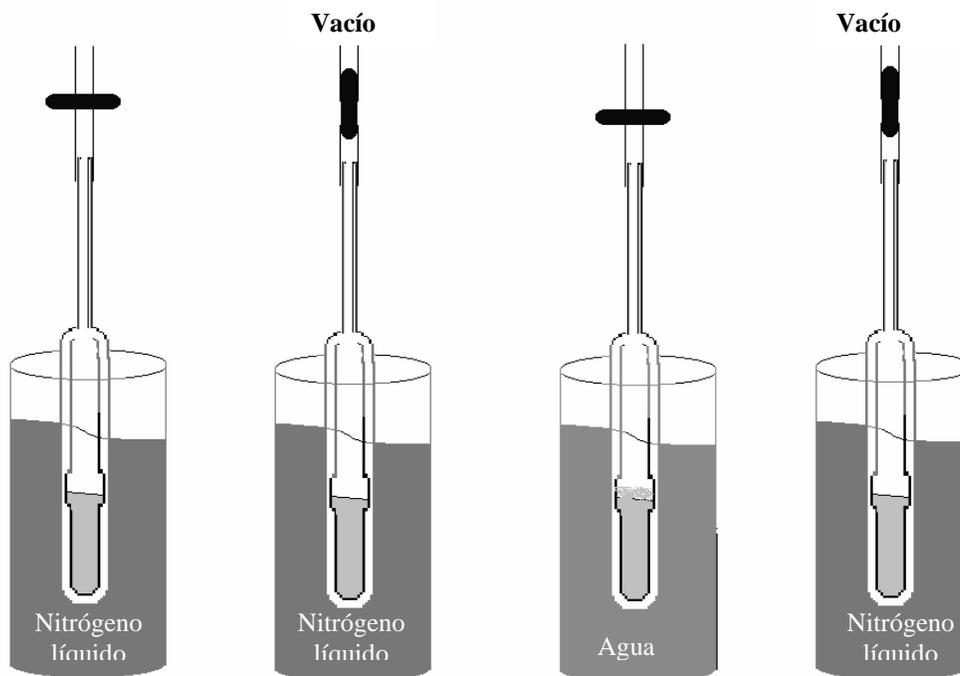


Figura 2.5 Proceso de desgasificación de las soluciones de NAS.

2.3 FORMACIÓN DE LAS REDES INTERPENETRANTES (IPNs)

Debido a que las redes interpenetrantes son una mezcla de polímeros que se encuentran entrelazados uno con otro sin tener puntos de entrecruzamiento del tipo químico entre ellos, se optó por formar una del tipo secuencial en la que primero se forma una red y posteriormente la otra [36-38]. Para ello se hincha el polímero entrecruzado 1 (PNIPAAm) en una disolución que contiene al polímero lineal 2 (PNAS) y al agente entrecruzante, la polilisina, para entrecruzar al polímero 2 consigo mismo dentro de la primera (red interpenetrada). Para ello se llevo a cabo el siguiente protocolo:

- ✓ Se disuelven 200 mg de PNAS en 1 ml DMF.
- ✓ Se pesa una cantidad igual del PNIPAAm y se hincha en la disolución de PNAS/DMF por tres horas.

- ✓ Se prepara una solución buffer con el ácido 2-N-morfolinoetanosulfónico (MES, 0.05 M) al que se le agregan 50 mg de polilisina (se utilizó polilisina con 2 pesos moleculares diferentes de 500-2000 y 4000).
- ✓ Se agregan 4 ml del buffer al PNIPAAm hinchado en DMF y se incuba a 10 °C durante 48 h con agitación mecánica (59 RPM).
- ✓ Se lava con DMF y agua para extraer lo que no reaccionó.
- ✓ Se seca a peso constante.
- ✓ Se sintetizaron 4 series de IPNs siguiendo este procedimiento.

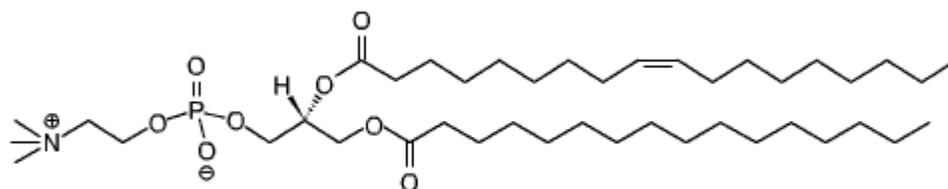
2.4 INMOVILIZACIÓN DE LÍPIDOS

Los lípidos, como se mencionó en el capítulo anterior, son de gran interés debido a que son componentes esenciales en las membranas celulares y procesos de interés biológico. Sin embargo, el énfasis de hacer liposomas no va encaminado hacia ensamblar la membrana, puesto que las bicapas lipídicas se forman espontáneamente por hidratación, sino al hinchamiento de las membranas para formar vesículas/liposomas del tamaño y estructura deseada, para lograr atrapar eficientemente una gran cantidad de soluto y así obtener buenas propiedades farmacológicas del sistema de liberación liposomal [31].

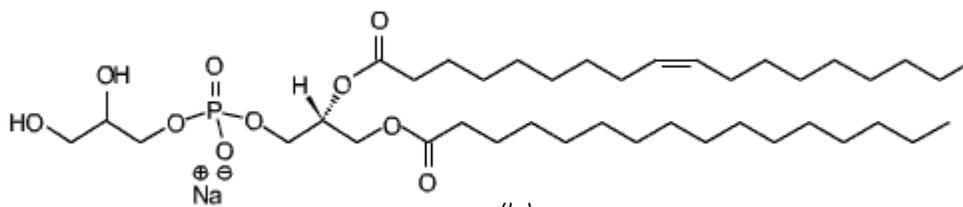
2.4.1 FORMACIÓN DE VESÍCULAS

Los procedimientos comunes para generar varios tipos de vesículas lipídicas son variados pero la mayoría involucra la solubilización inicial de los lípidos en disolventes orgánicos o detergentes que son removidos posteriormente.

En esta tesis, nosotros utilizamos dos tipos de lípidos el 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC) y el 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol (POPG), cuyas estructuras se encuentran en la figura 2.6. Se escogieron estos lípidos ya que el primero es aniónico y el otro es zwitterionico permitiendo comparar cual de ellos interacciona mejor con la red ya que su estructura es idéntica y sólo varían las cargas que poseen.



(a)



(b)

Figura 2.6 Estructura de dos lípidos, (a) POPC y (b) POPG.

La formación de las vesículas se realizó de la siguiente manera:

- ✓ Los lípidos se disuelven en cloroformo y se elimina el disolvente por evaporación rotatoria para forma una delgada capa en la pared del matraz.
- ✓ El disolvente residual se retira por medio de vacío.
- ✓ Se agrega agua al matraz para hidratar los lípidos con agitación constante por 1 hora, a una temperatura de 30-35°C.
- ✓ Posteriormente, la disolución se coloca en un aparato de ultrasonido a una temperatura 5-10 °C mayor que la temperatura de transición gel-líquido del lípido, que es de -2°C tanto para el POPC como para el POPG, por 20 minutos, distribuido en intervalos de 10 minutos con un descanso de 5 minutos entre ellos.

2.4.2 INMOVILIZACIÓN

Durante los últimos años se ha hecho énfasis en el desarrollo de nuevos sistemas de inmovilización que permitan prolongar el tiempo de vida de una sustancia así como mejorar su eficacia. En la actualidad los sistemas más utilizados para la liberación de principios activos son los sistemas de encapsulación (liposomas) y los sistemas de secuestro o matriciales (nanoesferas). Ambos constituyen una alternativa de inmovilización por su composición química, la posibilidad de incorporar sustancias con características químicas bien definidas, la modificación de la superficie de estas estructuras así como la incorporación de grupos funcionales. Este tipo de sistemas pueden ser utilizados tanto en biomedicina para diagnóstico y de forma terapéutica para diversas enfermedades [32].

El aspecto que se estudió para la inmovilización de lípidos en las redes interpenetrantes fue la cantidad de lípidos que se unieron a ella.

- ✓ A 2 ml de una solución buffer del ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES, 50 mM, pH 7.4), se le agrega una cantidad conocida de vesículas (5 mg).
- ✓ Una cierta cantidad de la IPN (5-10 mg) se hincha en 5 ml del buffer por 2 h a 25 °C con agitación constante.
- ✓ Se retira la IPN de la solución buffer y se deja secar.
- ✓ La disolución restante se coloca en un espectrofotómetro a 223 nm para calcular la concentración de lípidos presentes que no fueron retenidos en la red.
- ✓ Este procedimiento se realizó tres veces para cada serie de IPNs.

Para llevar a cabo la espectrofotometría de UV, primero se realizó una curva de calibración, la cual se construye para cada uno de los lípidos con los que se trabajó de la siguiente manera:

- ✓ Se preparan disoluciones de los lípidos de concentración conocida, donde el disolvente utilizado es el buffer (MES, 0.05 M, pH 7.4) usado en la inmovilización.
- ✓ El buffer se toma como blanco durante en el experimento para que no interfiera durante la determinación de la absorción del soluto (lípidos).
- ✓ Se realiza un barrido en un intervalo de longitud de onda de 500-200 nm para encontrar la longitud a la que absorben los lípidos probados. Esto último se repite para cada una de las disoluciones preparadas.
- ✓ Cada absorbancia obtenida se relacionan con la concentración de la muestra por medio de la ley de Beer-Lambert para obtener una ecuación que relacione la concentración de la muestra con la absorbancia medida.

2.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES

Las técnicas para caracterizar los materiales utilizados en la síntesis de las IPNs, se muestran en forma resumida en el siguiente esquema. Cabe señalar que las técnicas se aplicaron dependiendo de la muestra a caracterizar.

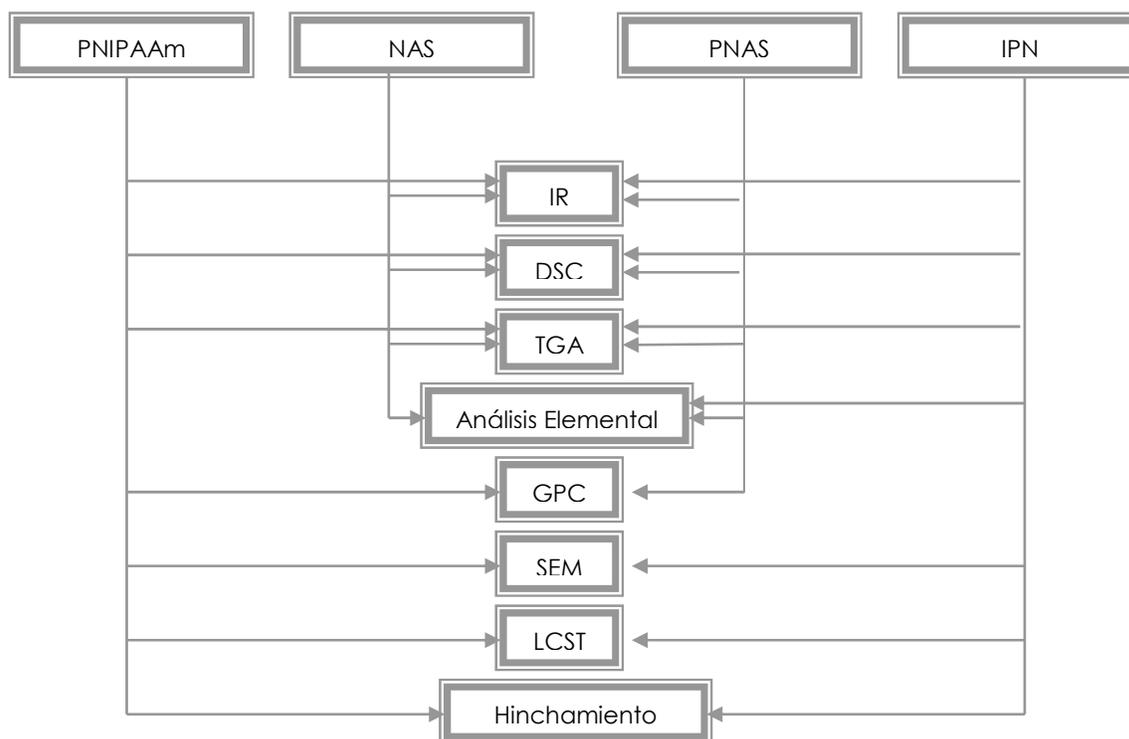


Figura 2.7 Esquema de caracterización de los materiales sintetizados.

Infrarrojo (FTIR): se utilizó un espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier Perkin-Elmer Paragon 500, con una celda de reflexión total atenuada (ATR). La caracterización se realizó en el Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM.

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC): el equipo utilizado en el análisis fue un TA Instrument 2010 calibrado con indio en celdas herméticas de aluminio, ubicado en el Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM.

Análisis Termogravimétrico (TGA): Se utilizó un analizador del TA Instrument, modelo Q50 con charolas de platino, este se encuentra en el Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM): la caracterización se llevó a cabo en un microscopio Joel JSM-5600 LV con electrones secundarios, ubicado en el Instituto de Física, UNAM.

Cromatografía de Permeación en Gel (GPC): esta técnica se realizó empleando un equipo Varian 9002 acoplado a un detector de índice de refracción modelo RI-4 y un integrador modelo 4400, ambos de la marca Varian. El equipo se encuentra en el Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM.

Espectrofotometría: se realizó en un espectrofotómetro de UV-visible, modelo Cary 100 scan de Varian, ubicado en el Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM.

Análisis elemental: esta técnica se realizó en Tucson, Arizona por Desert Analytics bajo la supervisión del Dr. Richard C. Johnson.

Las pruebas de hinchamiento y de temperatura crítica (LCST) se realizaron en el laboratorio de Macromoléculas del Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM.

Para determinar el hinchamiento se pesa una cantidad conocida del polímero, posteriormente se sumerge en el disolvente, en este caso agua, y después de un tiempo establecido se saca, se le quita el exceso de agua de la superficie y se pesa. El porcentaje de hinchamiento se calcula de la siguiente manera:

$$\% = \left[\frac{(M_t - M_i)}{M_t} \right] * 100$$

donde M_i y M_t son la peso inicial y el peso a un determinado tiempo.

Para determinar el tiempo de hinchamiento límite, este procedimiento se repite hasta que se alcance el equilibrio (no varíe la cantidad de agua absorbida por el material).

Para determinar la temperatura crítica (LCST), se realiza el mismo procedimiento pero a diferentes temperaturas.

CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSION

La red interpenetrante fue sintetizada por el método secuencial donde primero se forma la red de uno de los polímeros y posteriormente el segundo polímero se entrecruza a si mismo en presencia inmediata de la primera red. La IPN está compuesta por dos polímeros entrecruzados: la poli(N-isopropilacrilamida) y la poli(N-acriloxisuccinimida), la primera polimerizada y reticulada mediante radiación mientras la última fue polimerizada por radiación y entrecruzada consigo misma por medio de una reacción con polilisina.

La red inicial, el polímero de NAS y la IPN fueron caracterizados por diversas técnicas para poder comparar su desempeño.

3.1 PRIMERA RED: HIDROGEL DE PNIPAAm

Las condiciones óptimas para formar la red de PNIPAAm fueron encontradas estudiando tres sistemas: disoluciones acuosas de NIPAAm (10% w/w) con y sin agente entrecruzante (N,N-metilenbisacrilamida) así como en estado sólido bajo presión, los cuales se irradian a diferentes dosis para conocer su comportamiento frente a la radiación gamma proveniente de una fuente de ^{60}Co (figura 3.1), y así poder seleccionar las mejores condiciones para polimerizar y entrecruzar el PNIPAAm.

En la figura 3.2 podemos observar que en los dos sistemas acuosos se obtiene un porcentaje de gel muy alto a dosis pequeñas en contraste con el sistema sólido que requiere grandes dosis para obtener porcentajes cuantificables de polímero entrecruzado. Esta diferencia en la velocidad de polimerización y entrecruzamiento entre el NIPAAm en estado sólido y en disolución acuosa es debida al papel que juegan los reactivos intermediarios formados por la radiólisis del agua (OH^\bullet , H^\bullet , e^-_{aq}) ya que la reacción se inicia tanto por radicales primarios, los cuales se forman directamente de la interacción de la radiación con la materia, como por los

secundarios que se forman de la interacción entre los radicales primarios y la materia circundante. En el sistema acuoso se tiene una difusión mayor de éstos para generar más radicales y llevar a cabo la reacción con mayor rapidez que en el estado sólido, donde los radicales no tienen tanto movimiento y la probabilidad de encontrarse con otro radical es menor, además el volumen libre del sistema cambia al aplicar una presión externa.

Con base en esto, se realizó un estudio del rendimiento radioquímico de entrecruzamiento, encontrando que la menor dosis de gelación (0.18 kGy), dosis incipiente de formación de gel, la presenta el sistema de disolución acuosa que contiene el agente entrecruzante, el cual es una sustancia que promueve los enlaces intermoleculares uniendo a las cadenas entre sí para crear una estructura más rígida. Enseguida está el sistema acuoso sin dicho agente (0.74 kGy) y el que presenta la dosis de gelación mayor es el sistema en estado sólido (9.1 kGy, Tabla 3.1). Esto último puede ser debido a, como se mencionó con anterioridad, la falta de movilidad de las cadenas poliméricas dentro del sistema reduciendo de este modo las posibilidades de que dos radicales se encuentren y polimericen a bajas dosis. Por tanto, el estudio está en concordancia con el comportamiento mostrado en la figura 3.2 donde se observa que a una misma dosis se obtiene un porcentaje de gel mayor en el sistema acuoso con agente entrecruzante, seguido del sistema acuoso sin dicho agente y al último el sistema sólido.

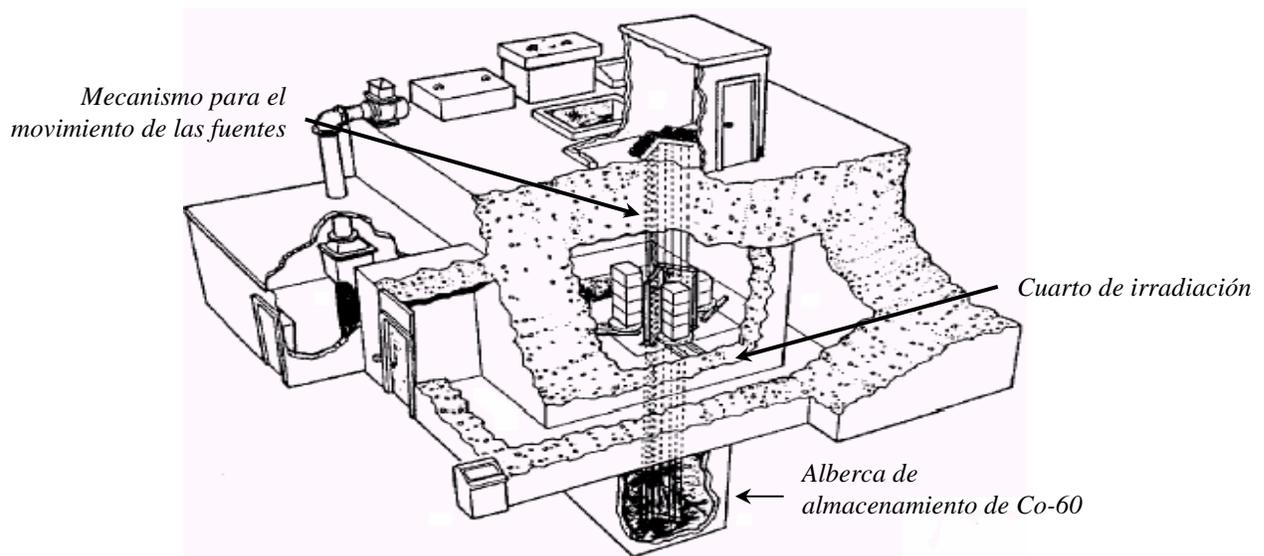


Figura 3.1 Irradiador Gammabeam 651 PT.

Tabla 3.1 Parámetros radioquímicos del PNIPAAm.

Sistema	Mw	Dg (kGy)	q/r
Acuoso	880000	0.73	0.4327
Acuoso + BIS	-	0.18	0.4343
Sólido	5600	9.40	0.6492

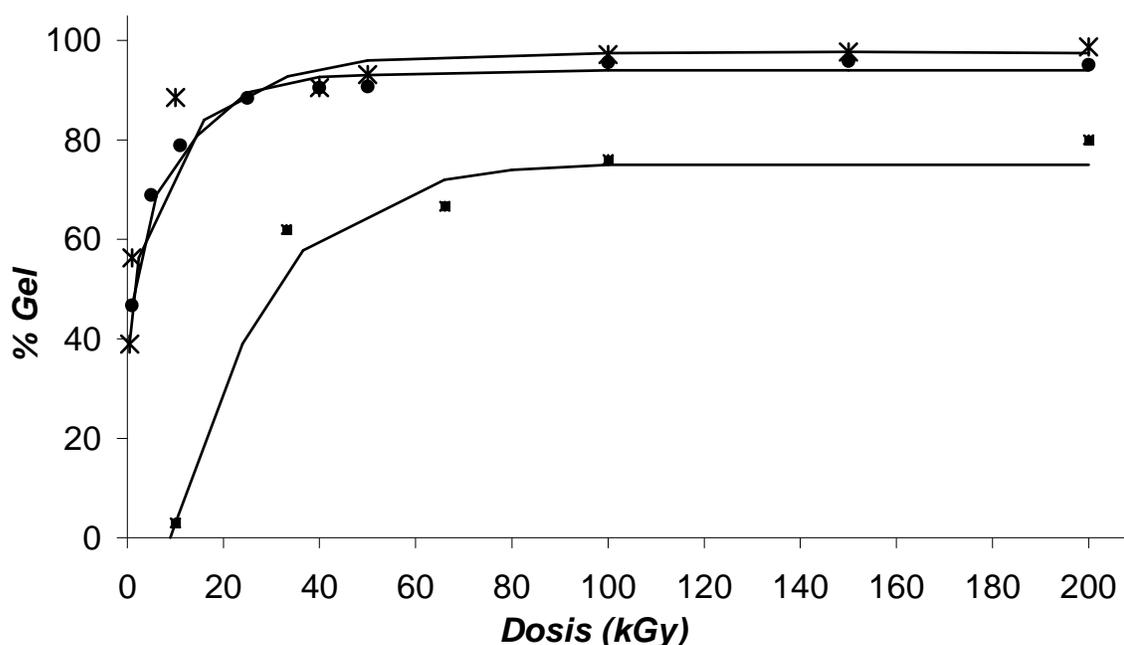


Figura 3.2 Comportamiento del PNIPAAm frente a la radiación gama, (●) en disolución acuosa, (✕) en disolución acuosa con agente entrecruzante, (■) NIPAAm compactado (8 ton/m²).

Sin embargo, para el sistema en estado sólido no es posible afirmar qué está ocurriendo realmente ya que su alta dosis de gelación y por ende su bajo rendimiento de entrecruzamiento pueden ser debido a dos cosas: 1) se está trabajando a una presión inadecuada en la cual no se obtiene el mayor rendimiento de la reacción y/o 2) el PNIPAAm polimeriza a velocidades menores en estado sólido debido a la falta de movilidad y a la ausencia de los radicales acuosos. Por lo tanto para explicar este fenómeno fue necesario realizar un estudio del efecto de la presión sobre la polimerización del monómero en estado sólido (figura 3.3),

encontrándose que la polimerización del PNIAPAm aumenta con presiones de 4 hasta 8 ton/cm² y a partir de esta presión prácticamente el rendimiento de la reacción no varía. Esto nos indica que el volumen libre del monómero decrece, provocando una falta de movilidad de los radicales e impidiendo que se encuentren con más cadenas que terminarán reaccionando con otro radical antes de encontrar una cadena polimérica en crecimiento. Esto es parecido al efecto de jaula que se presenta en las reacciones que utilizan iniciadores químicos, donde el confinamiento de pares de radicales en un espacio cerrado da como resultado que estos se recombinen antes de que puedan difundirse.

En la tabla 3.1 también se encuentra la relación q/r , donde q y r son la probabilidad de degradación y entrecruzamiento, respectivamente. Por tanto, un valor alto de q/r nos indica que predomina la degradación o que se requieren dosis más altas para que este fenómeno ocurra. En este caso el PNIPAAm se degrada más fácilmente cuando se irradia en ausencia de agua y por ende su polimerización se lleva a cabo a dosis altas de radiación.

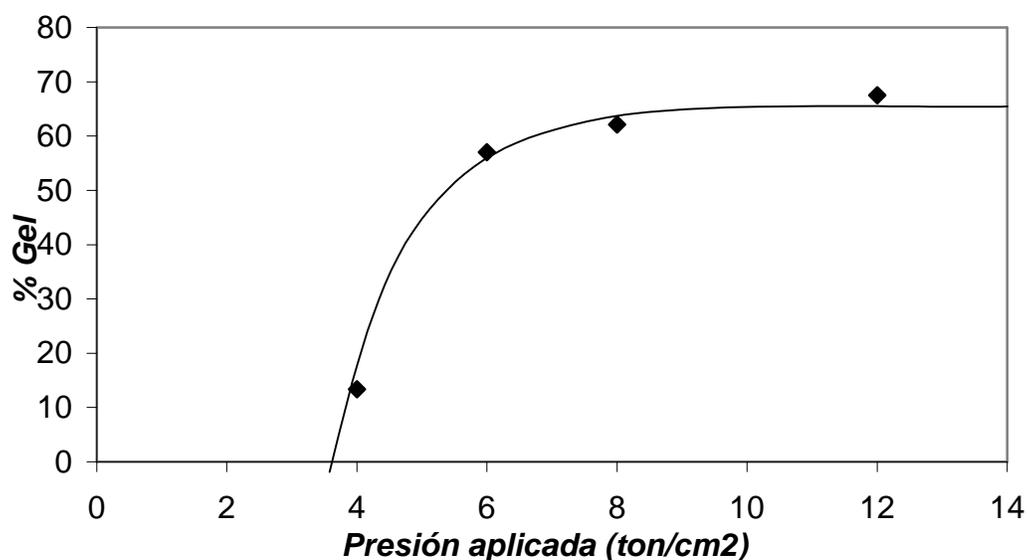


Figura 3.3 % de gel obtenido para una muestra irradiada a 100 kGy en ausencia de agente entrecruzante a diferentes presiones.

La caracterización de los hidrogeles de PNIPAAm sintetizados fue muy importante para decidir en que condiciones trabajar la formación de la red interpenetrante. Una de las propiedades de mayor relevancia para este trabajo es la temperatura crítica de solución (LCST), la cual se determinó mediante dos técnicas: por una prueba de hinchamiento a diferentes temperaturas y por calorimetría diferencial de barrido (DSC) en muestras húmedas, las cuales se hincharon en agua por 24 horas antes de realizar el experimento. En ambos casos se obtuvieron resultados similares para los sistemas estudiados. La LCST que reportaron los sistemas acuosos fue de aproximadamente 32 °C, lo que está en concordancia con los valores reportados en la literatura [39-42] mientras que en el sistema sólido disminuyó hasta 25 °C. Este abatimiento de la LCST puede ser importante para formar sistemas que requieran temperaturas menores sin la introducción de alguna parte hidrofóbica en la cadena, ya que un incremento o decremento en el contenido hidrofílico del polímero causa un incremento o decremento en la LCST respectivamente [13]. Este no es nuestro caso, pues se quiere conservar igual su termosensitividad para poder hacer el sistema aplicable en dispositivos biomédicos.

En las figuras 3.4 y 3.5 se puede observar la discrepancia entre la LCST de los tres sistemas con los que se trabajó así como su grado de hinchamiento en agua a temperatura ambiente. Esta diferencia en la temperatura de transición se debe principalmente al arreglo estructural que se obtiene durante el proceso de polimerización pues primero se forma el polímero no entrecruzado que se encuentra disuelto en agua y cuando se entrecruza precipita, produciendo un gel con una microestructura diferente al obtenido de un sistema sólido, donde el gel formado no tiene interacción con ningún disolvente. Estudios anteriores revelan que el comportamiento de hinchamiento en geles con respecto a la temperatura es atribuido al balance hidrofóbico-hidrofílico entre sus cadenas poliméricas, el cual es influenciado por el tamaño, configuración y movilidad de los grupos alquilo adyacentes [13, 37]. Las posibles interacciones en el primer caso son los puentes de hidrógeno de los grupos polares del hidrogel de PNIPAAm y el agua del medio.

Por otro lado, el distinto grado de hinchamiento que se observa en los tres sistemas (figura 3.5) es debido al porcentaje de entrecruzamiento que exhibe el

polímero pues entre mayor sea el grado de entrecruzamiento menor es el hinchamiento, por lo que el sistema menos reticulado (el sistema sólido) presenta un hinchamiento superior con respecto a los otros dos que contienen un porcentaje de reticulación muy parecido entre ellos. Evidentemente no es posible comparar esta propiedad ya que para ello tendríamos que cotejar muestras que exhibieran porcentajes de entrecruzamiento similares para que la comparación tuviera validez. Para corroborar los valores mostrados por la prueba de hinchamiento en agua, se determinó la LCST por medio de DSC [22,35,40] (figura 3.6) donde las muestras fueron hinchadas por 24 horas en agua y posteriormente se colocaron en el equipo donde se realizó el experimento a las condiciones explicadas en el capítulo anterior. Cabe destacar que la forma de determinación por este medio es mucho más rápida y precisa ya que se hace un análisis de la muestra a diferentes temperaturas en un sólo paso y no se incurre en demasiados errores como en el primer método, en el cual la muestra debe estar libre de exceso de agua superficial en cada medición. Los resultados varían en poca medida a los obtenidos por el primer método por 1 o 2 °C de diferencia (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Temperaturas de transición del PNIPAAm

Sistema	LCST (°C)^a	LCST (°C)^b	Tg (°C)
Acuoso	30.2	29.7	144.8
Acuoso + BIS	29.0	31.8	143.9
Sólido	24.5	25.3	129.2

a. Estimada por medio de pruebas de hinchamiento en un intervalo de temperatura de 10-50°C

b. Estimada por medio de calorimetría diferencial de barrido a muestras hinchadas

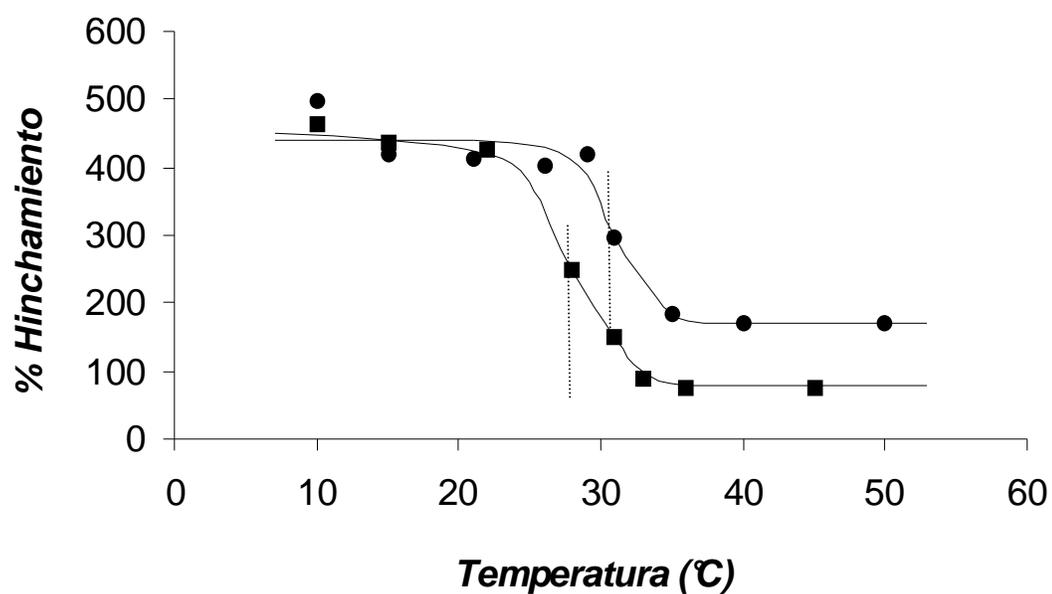


Figura 3.4 LCST de los geles de PNIPAAm irradiados a una dosis de 100 kGy. (●) PNIPAAm reticulado en un sistema acuoso con agente y (■) sin agente entrecruzante.

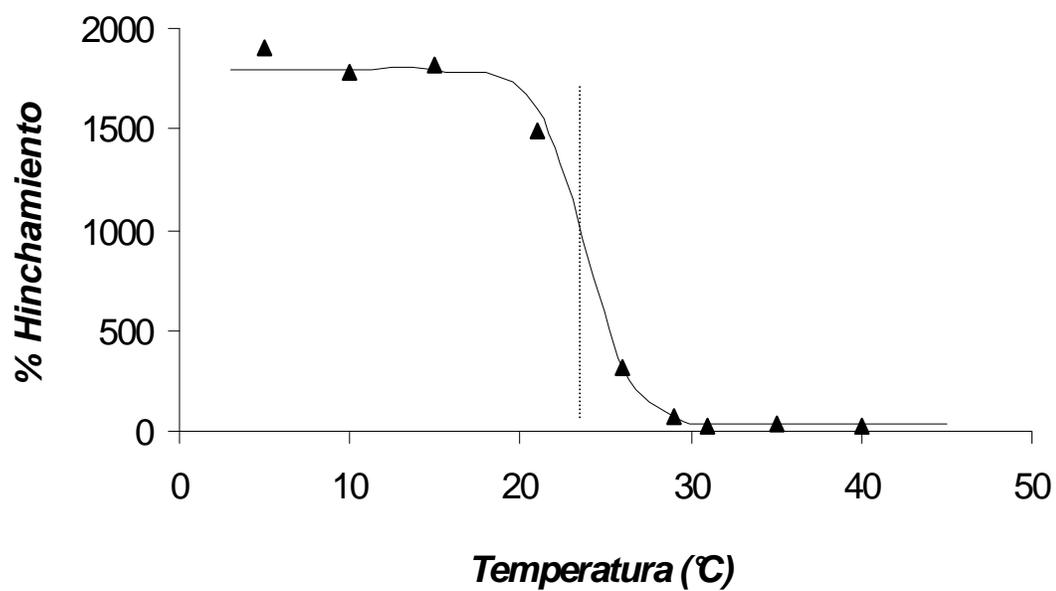


Figura 3.5 Determinación de la LCST del PNIPAAm obtenido en estado sólido, muestra irradiada a 100 kGy (8 ton/m²).

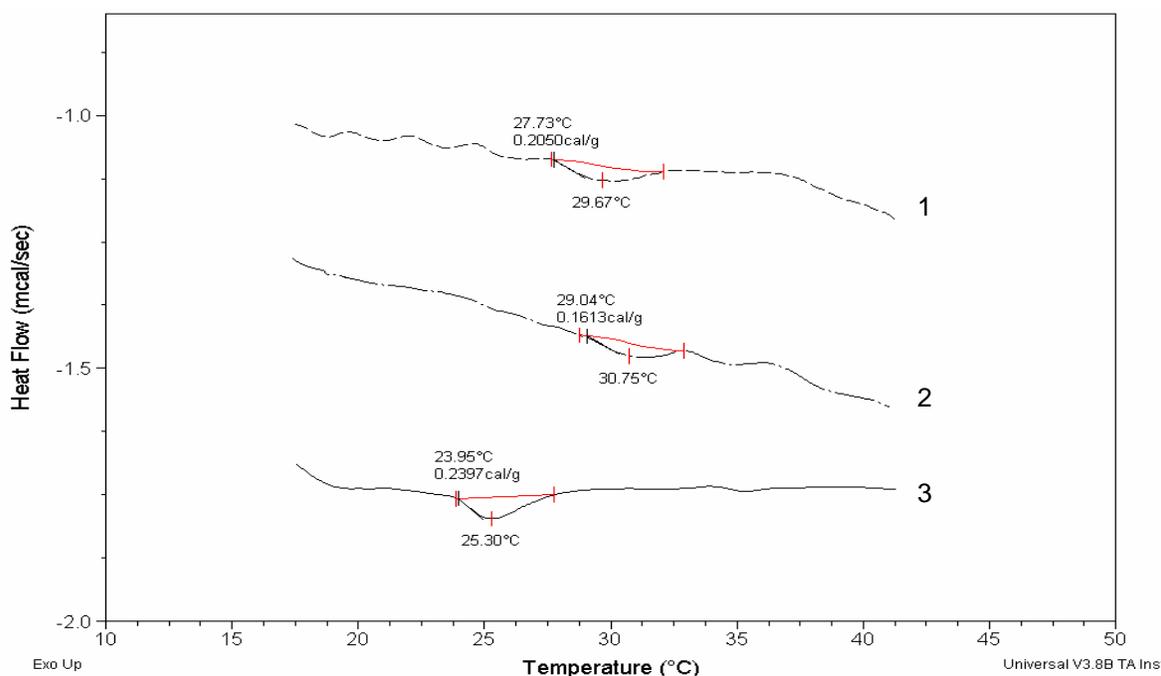


Figura 3.6 LCST del PNIPAAm determinada por medio de calorimetría (DSC). (1) Sistema acuoso con agente, (2) Sin agente, (3) Estado sólido.

El hecho de que la LCST se vea disminuida en el sistema sólido puede explicarse con base en la conformación final que presenta el polímero al sintetizarlo en ausencia de agua. Para ello se estudió la morfología de los geles sintetizados por medio de SEM (figura 3.7), donde observamos que la densidad de entrecruzamiento, el grosor de las paredes así como la simetría entre los sistemas acuosos y el sistema en estado sólido varían. La característica más distintiva es la diferencia de tamaño y uniformidad de los huecos, identificados por SEM, pues las muestras irradiadas en disolución exhiben una arquitectura homogénea (figura 3.7a y b), mientras en estado sólido presentan una estructura menos regular con paredes más delgadas (figura 3.7c). El tamaño de los huecos también varía de acuerdo al sistema con el que se trabaje; los más pequeños son los del sistema acuoso que contiene agente entrecruzante y los más grandes con paredes más delgadas los tiene el sistema sólido debido a que la densidad de entrecruzamiento en este es mucho menor que los otros dos sistemas. Con esto es posible afirmar la importancia que tiene el método para sintetizar el hidrogel con respecto a la propiedades que puede presentar ya que se ha visto que están intrínsecamente relacionadas.

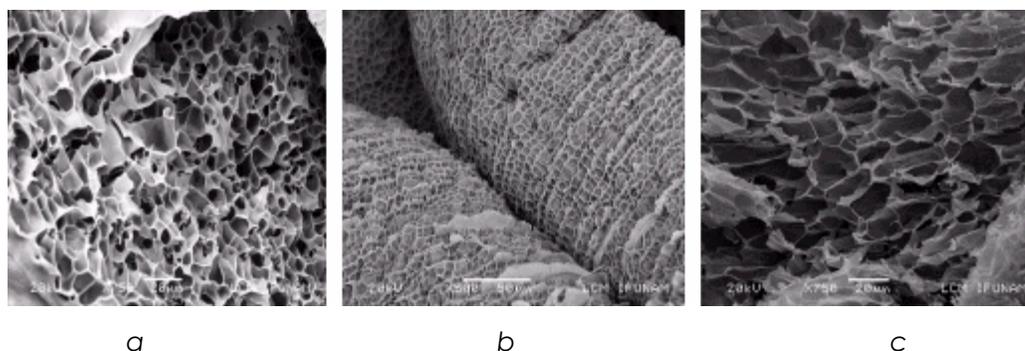
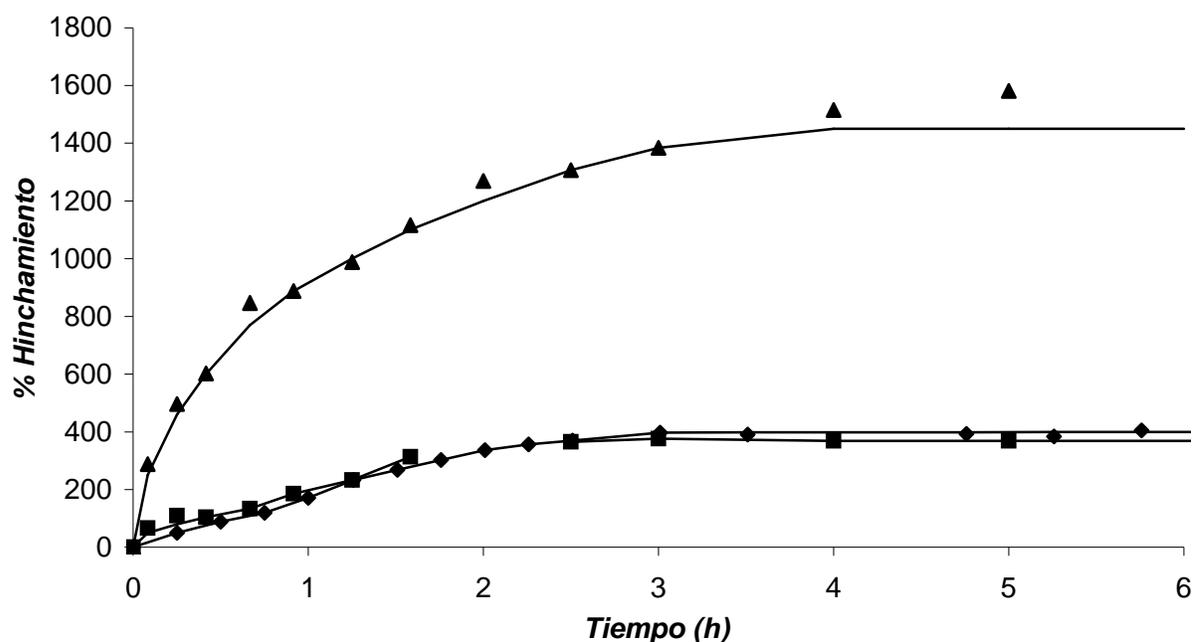


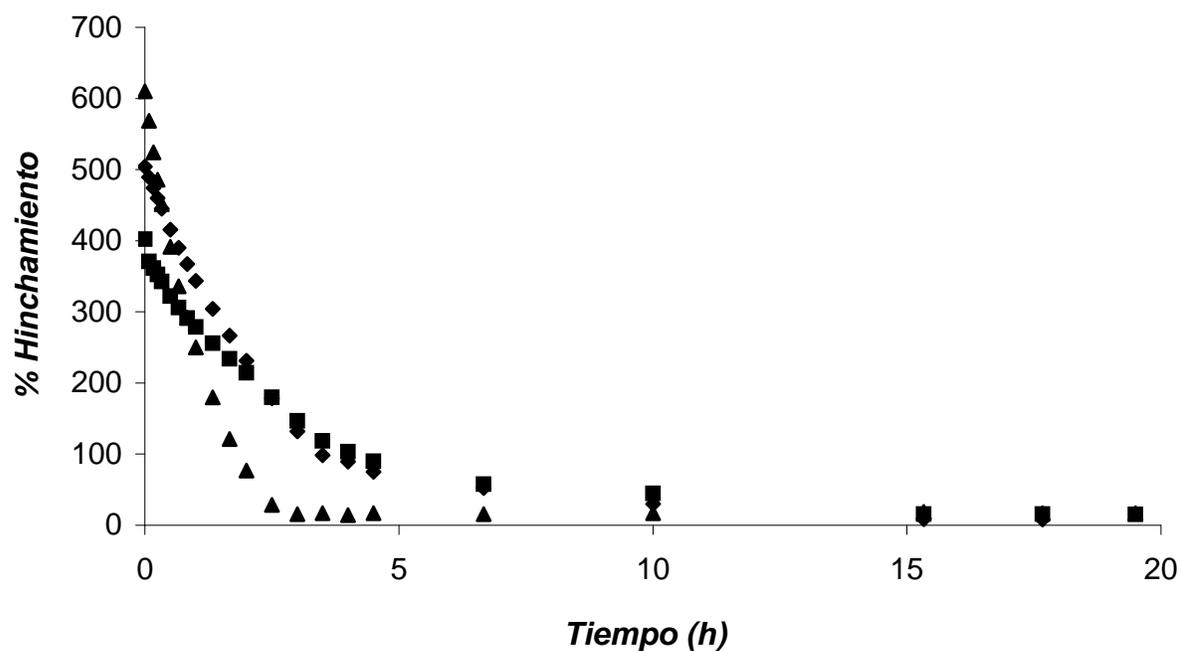
Figura 3.7 Micrografías de PNIPAAm. (a) sistema acuoso, (b) sistema acuoso con BIS, (c) sistema sólido bajo presión.

Otra propiedad de suma importancia en este tipo de sistema es el hinchamiento máximo que pueden alcanzar los hidrogeles así como el tiempo que tardan en hacerlo ya que nos proporcionan información sobre la rapidez con que el sistema termosensible se hincha. Esto es un factor trascendental ya que entre menor sea el tiempo que requiera el sistema para llegar al equilibrio mecánico será mejor (figura 3.8) pues actualmente existen muchos dispositivos biomédicos que tienen como limitante el tiempo de respuesta a los estímulos, el cual suele ser muy lento [25,39,42-46], provocando que su implementación y desarrollo mercantil se vea obstaculizado. En la figura 3.8(a) vemos que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio (tiempo límite) es igual para cualquiera de las muestras, concluyendo que esta propiedad no se ve influenciada por el método de obtención del hidrogel de PNIPAAm como sucede con la LCST. Al igual que en la prueba anterior, la diferencia de hinchamiento que se muestra en los tres sistemas es debida al porcentaje de entrecruzamiento que exhibe el polímero.

Sin embargo, la razón de deshinchamiento no es la misma (figura 3.8 (b)) pues el sistema sólido necesita alrededor de 3 h para eliminar el agua absorbida mientras los dos sistemas entrecruzados en presencia de agua ,necesitan aproximadamente 5 h para hacer lo mismo. Esto se debe a las diferencias morfológicas que presentan los sistemas ya que el deshinchamiento es dramáticamente influenciado por los cambios estructurales en la superficie del gel y la formación de una delgada capa polimérica, la cual previene que el gel colapse rápidamente [47].



(a) Hinchamiento



(b) Contracción

Figura 3.8 Comportamiento del PNIPAAm, (◆) reticulada en solución acuosa, (■) reticulada en solución acuosa con agente entrecruzante, (▲) reticulado en estado sólido (8 ton/m²).

En general podemos decir que las condiciones óptimas para obtener el PNIPAAm son por medio de los dos sistemas acuosos evaluados en esta tesis debido a su alto

rendimiento a bajas dosis de radiación y porque su LCST se mantiene sin alteraciones, entre los 30 y 32°C. Sin embargo, no es conveniente usar geles con un entrecruzamiento muy denso ya que el segundo monómero tiene que difundirse en esta red para reticularse dentro y sin el espacio adecuado puede quedarse en la superficie o incluso puede no formarse la red interpenetrante. Por lo tanto es conveniente utilizar dosis entre 50-90 kGy ya que debajo de estas dosis el material es poco manejable, pegajoso y muy frágil (propiedades mecánicas pobres), y arriba de éstas se tienen densidades de entrecruzamiento muy grandes que impiden la difusión del segundo monómero.

Las condiciones para sintetizar la primera red se muestran en forma resumida en la tabla 3.3, donde se observan las dosis de trabajo utilizadas: 50, 60 y 70 kGy debido a que según el estudio realizado, a estas condiciones los geles de NIPAAm son manejables físicamente y todavía tienen porcentajes de entrecruzamiento adecuados, lo cual es importante. Se escogieron geles sintetizados tanto en el sistema con agente entrecruzante como el que no lo tiene para observar el efecto que puede tener este parámetro en las IPNs formadas.

Tabla 3.3 Condiciones de polimerización para la red de PNIPAAm

Sistema	Dosis (kGy)	NIPAAm(%)	Agua (%)	Agente BIS (%)
	50			
Acuoso I	60	5.35	94.65	0
	70			
	50			
Acuosos II	60	10	89.70	0.3
	70			

No obstante, la caracterización no terminó aquí pues una vez que se escogieron las condiciones y se obtuvieron los geles de PNIPAAm que serían usados para sintetizar la red interpenetrante, dichos materiales se caracterizaron con otras técnicas para ser comparados con las IPNs una vez formadas estas.

Entre dichas técnicas se encuentra el infrarrojo, la cual se practicó a los geles de los dos sistemas a diferentes dosis, mostrando dos cosas importantes: 1) que no existe una degradación del material que pueda ser adjudicada a la dosis de radiación con la que se trabaja y 2) que el espectro no varía al usar el agente reticulante (BIS) debido a que se utiliza en cantidades muy pequeñas. Sin embargo, en el infrarrojo se debería esperar cambios en las bandas asociadas al grupo amida (N-H y C=O) que indicara la presencia del agente entrecruzante ya que ésta molécula varía la cantidad de grupos amida presentes en las cadenas poliméricas. En la figura 3.9 podemos observar que su estructura es muy similar a la del N-isopropilacrilamida, por lo que su presencia sólo afecta la intensidad de las bandas asociadas al grupo amida.

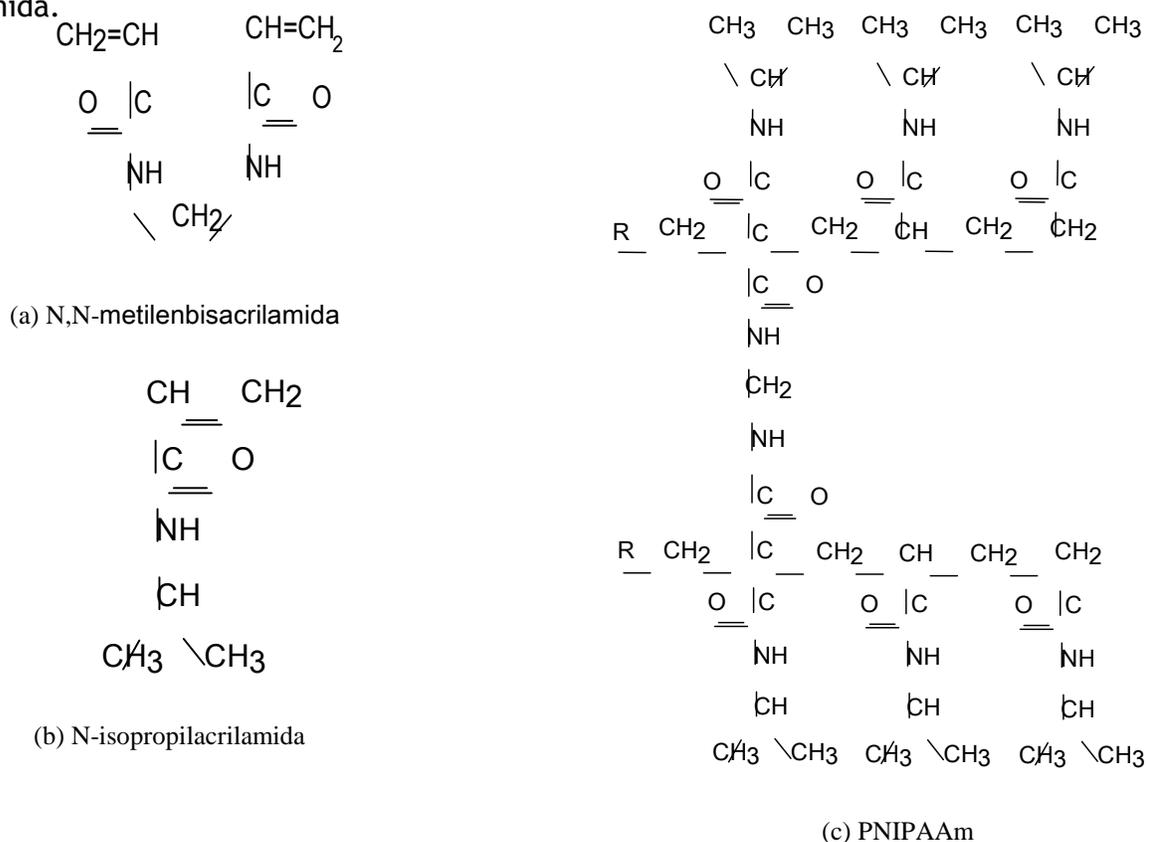


Figura 3.9 Estructuras químicas del (a) BIS, (b) NIPAAm, (c) PNIPAAm.

Por tanto, en la figura 3.10 sólo se muestra uno de los espectros del polímero ya que la variación entre ellos es mínima; además nos permite apreciar fácilmente las bandas características del PNIPAAm como son la vibración de estiramiento del N-H en 3276 cm^{-1} y del C=O en 1656 cm^{-1} así como la de deformación correspondiente al N-H en 1543 cm^{-1} . Otro grupo característico de este compuesto es el isopropilo, el cual presenta una doble banda en 1385 y 1370 cm^{-1} . Cabe destacar que existen desplazamientos en estos valores para cada muestra debido a que las interacciones presentes en cada una y pueden variar con el grado de entrecruzamiento pero si son muy similares ya que corresponden a las vibraciones de los mismos grupos químicos.

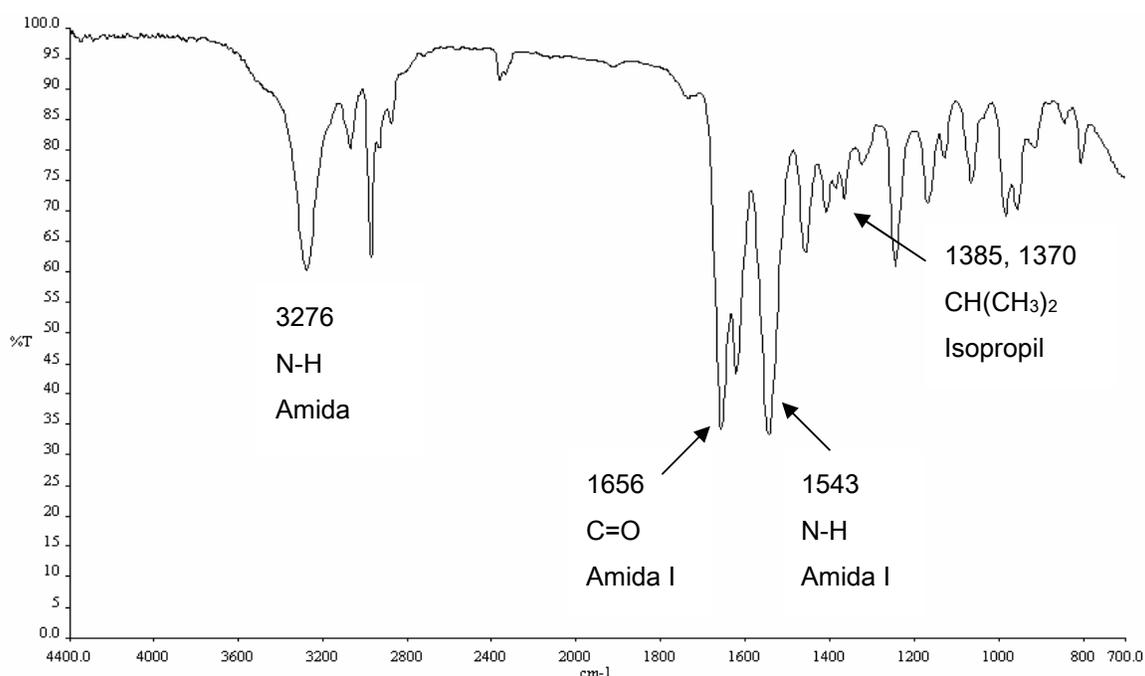


Figura 3.10 Espectro del PNIPAAm (60 kGy).

También se logró determinar la temperatura de transición vítrea de cada gel por medio de calorimetría, mostrándonos que se encuentra alrededor de los $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ (figura 3.11), tomando el punto medio como el valor de T_g , pues el valor no es único y se encuentra dentro de intervalo de temperaturas. A pesar de esto, generalmente se toma como T_g el punto medio de esta región. La T_g nos da información sobre la facilidad que tienen las cadenas de moverse o deslizarse; entre mayor impedimento encuentren (más cadenas entrecruzadas) esta propiedad tendrá una corrimiento a

temperaturas mayores, como vemos que sucede con nuestras muestras. Esto es fácilmente apreciable en la tabla 3.4 y coinciden con valores reportados en trabajos anteriores [38,43].

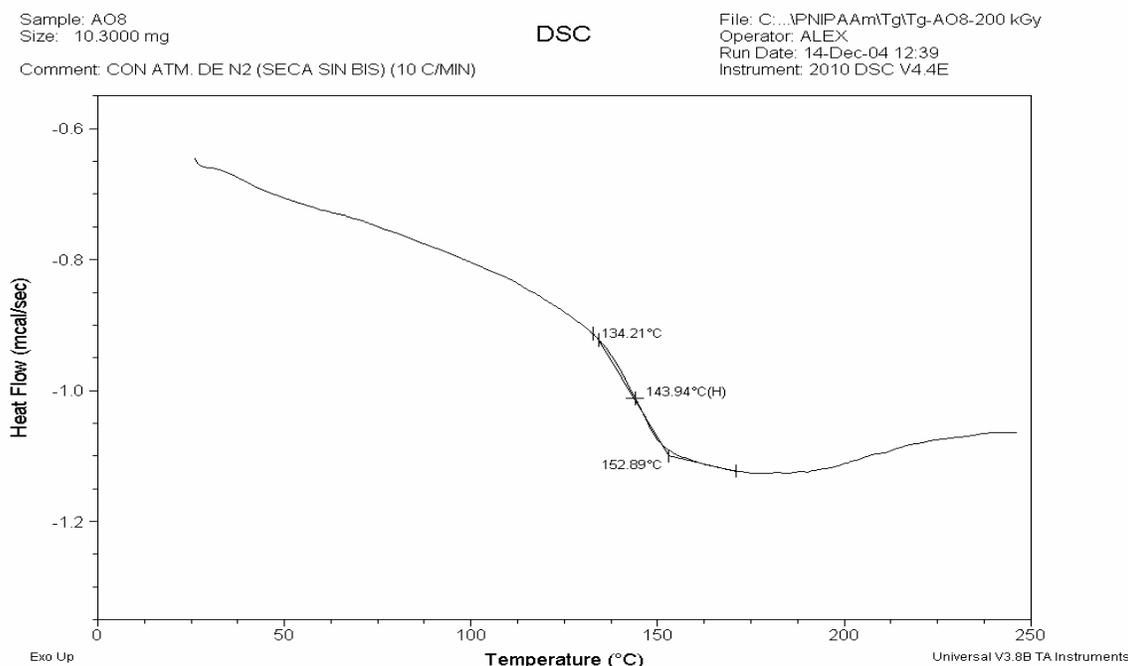


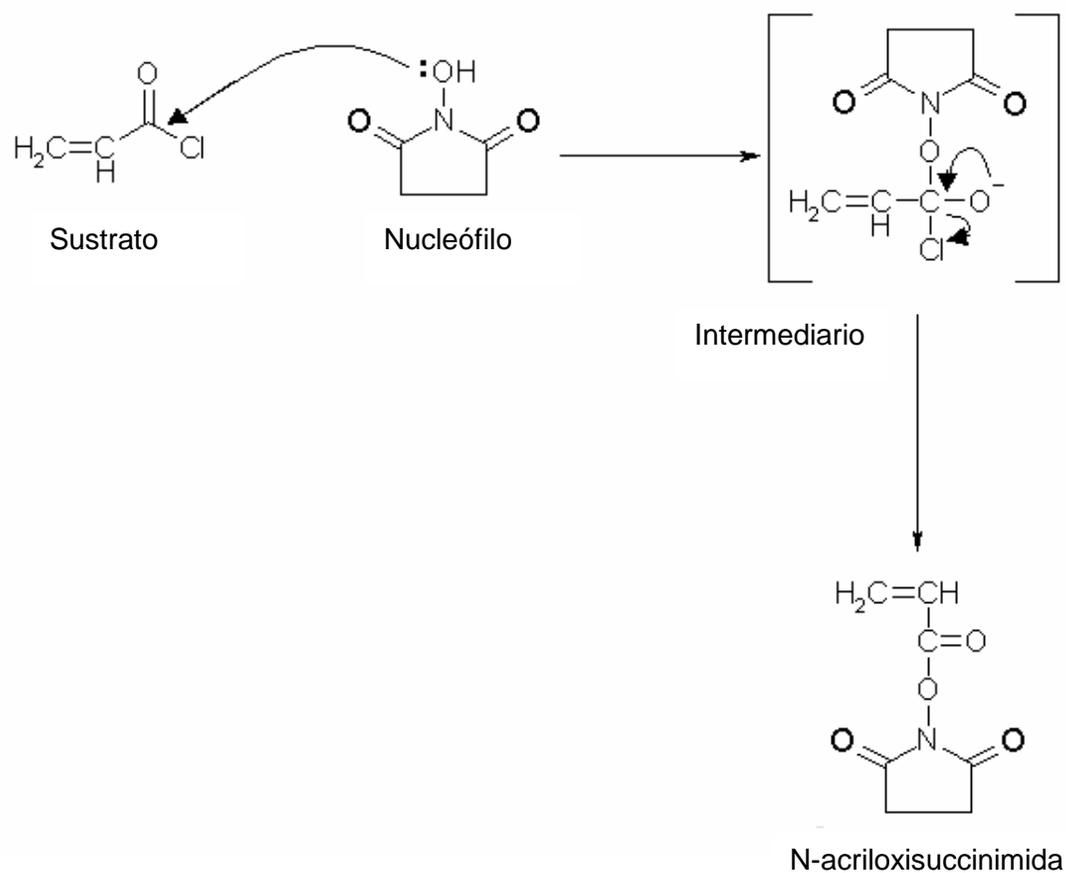
Figura 3.11 Termograma del PNIPAAm sin agente entrecruzante (200 kGy).

Tabla 3.4 Transiciones del PNIPAAm reticulados en disolución

Sistema	Dosis (kGy)	Tg (°C)	LCST (°C)
Acuoso I	50	140.1	30.1
	60	139.0	30.0
	70	143.9	29.5
Acuosos II	50	144.0	29.8
	60	143.1	31.0
	70	144.4	30.5

3.2 POLIMERIZACIÓN DEL NAS

El monómero NAS usado para formar la red interpenetrante (NAS), obtenido por la reacción de Pollak [20], se caracterizó y comparó con el producto comercializado por Aldrich (90% pureza) por infrarrojo y DSC para cotejar la pureza del mismo. Se obtuvo un monómero con suficiente pureza para ser polimerizado.



Esquema 3.1 Mecanismo de reacción del NAS.

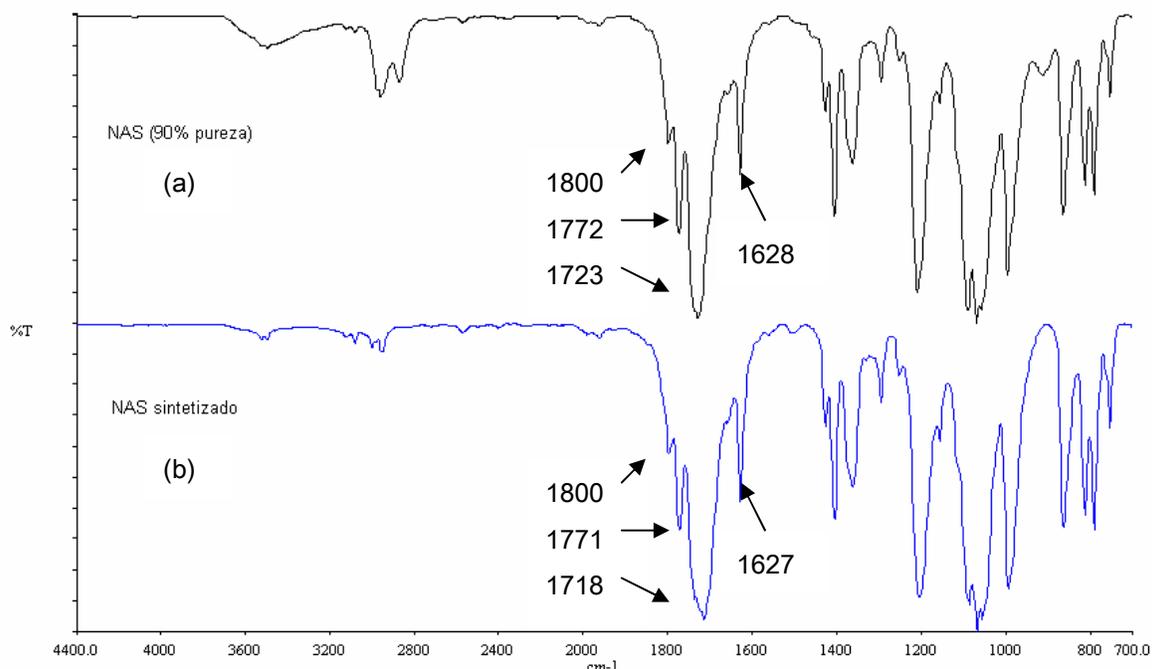


Figura 3.12 Espectro de IR del a) NAS comercial y b) NAS sintetizado.

Como podemos ver en la figura 3.12, las bandas de absorción en el infrarrojo para los dos compuestos son muy similares tanto en forma como en posición además de presentar las bandas de absorción características para el grupo succinimida del monómero (1810, 1778 y 1735 cm⁻¹). Con esto podemos afirmar que se obtuvo el monómero deseado pero no se puede asegurar la pureza de la muestra sin realizar otro tipo de análisis. Para ello fue necesario determinar su temperatura de fusión por medio de calorimetría diferencial de barrido (figura 3.13).

Por otro lado, los termogramas del NAS comercial y del sintetizado en el laboratorio no son tan similares ya que presenta diferencias asociadas a la pureza del producto; por ejemplo podemos observar que el ancho del pico de transición y la entalpía de proceso de fusión es mayor para el que sintetizamos y no es tan definido como el comercial. Además la temperatura de fusión varía entre 2 y 4°C indicándonos que el producto comercial presenta una pureza superior. Pese a esto, se llegó a la conclusión de que el material serviría para sintetizar el PNAS ya que la reacción se lleva a cabo por medio de radicales libres, los cuales atacan a las dobles

ligaduras del compuesto y a menos que las impurezas tuvieran instauraciones, estas no influirán en la reacción de polimerización.

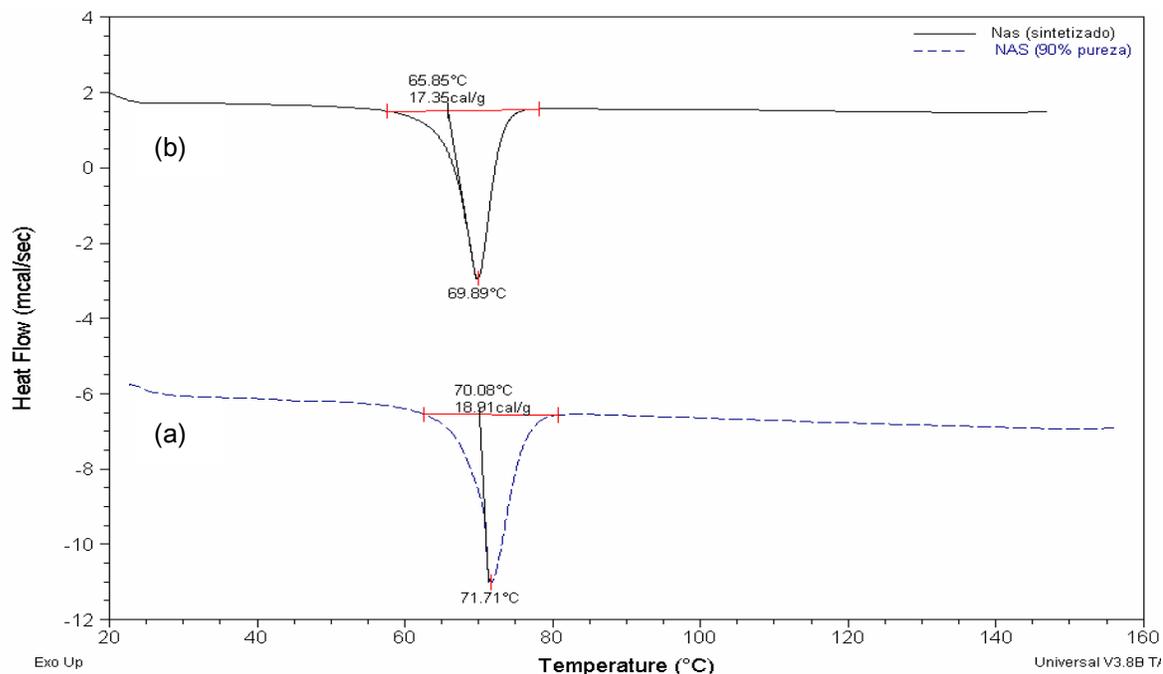


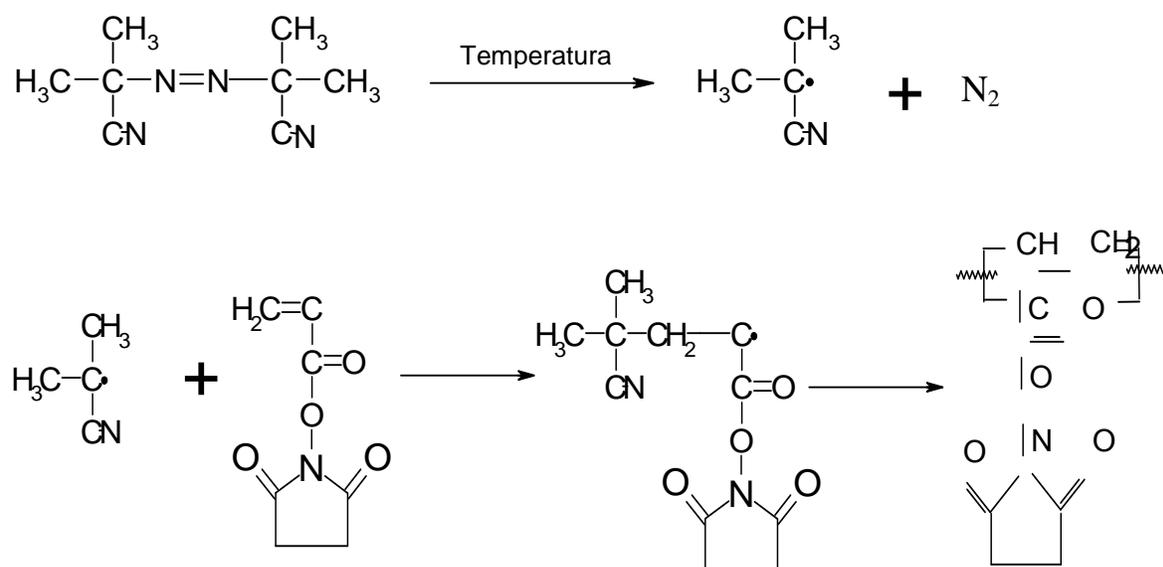
Figura 3.13 Termograma del NAS. (a) comercial, (b) sintetizado.

Por último, se realizó un análisis elemental al producto sintetizado para comparar los porcentajes experimentales con los teóricos, que son los que debería presentar la muestra si estuviera pura. Se encontraron pequeñas diferencias entre ellos con un error mínimo (en promedio de aproximadamente 3%), demostrándonos que el producto no es 100% puro. Sin embargo, el producto tiene una pureza aceptable ya que los valores son muy cercanos (Tabla 3.5).

Tabla 3.5 Análisis elemental del NAS

NAS	%C	%O	%N
Teórico	49.70	37.87	8.28
Experimental	49.64	37.54	8.92

El polímero del NAS (PNAS) se obtuvo por medio de dos métodos, uno que implica el uso de radiación y otro el uso de un iniciador (AIBN). El PNAS sintetizado es un polímero no reticulado, lo cual es necesario para poder disolverlo y formar la segunda red dentro de los hidrogeles de PNIPAAm. Naturalmente la propiedad estudiada del polímero obtenido por las dos rutas fue el peso molecular debido a que esta propiedad puede afectar la formación de la red interpenetrante. Dicha propiedad fue evaluada por SEC, especialmente en el caso del sintetizado por radiación ya que también nos da información acerca de si el polímero se degrada o no con la radiación.



Esquema 3.2 Mecanismo de polimerización del NAS mediante el catalizador AIBN.

Al PNAS sintetizado por vía química se le determinó el peso molecular a diferentes tiempos de reacción, lo cual mostró que dicha propiedad aumenta rápidamente durante las primeras horas hasta llegar a mantenerse en un valor constante a partir de las 12 h de reacción. Esto es un comportamiento atípico para reacciones que se llevan a cabo por radicales libres ya que el peso molecular incrementa desde el principio y prácticamente no varía durante toda la reacción (figura 3.14). Dicho comportamiento puede deberse a un impedimento estérico por la presencia del grupo succinimida, el cual puede obstaculizar el acoplamiento de las cadenas y hacer que el peso molecular aumente más lentamente de lo usual.

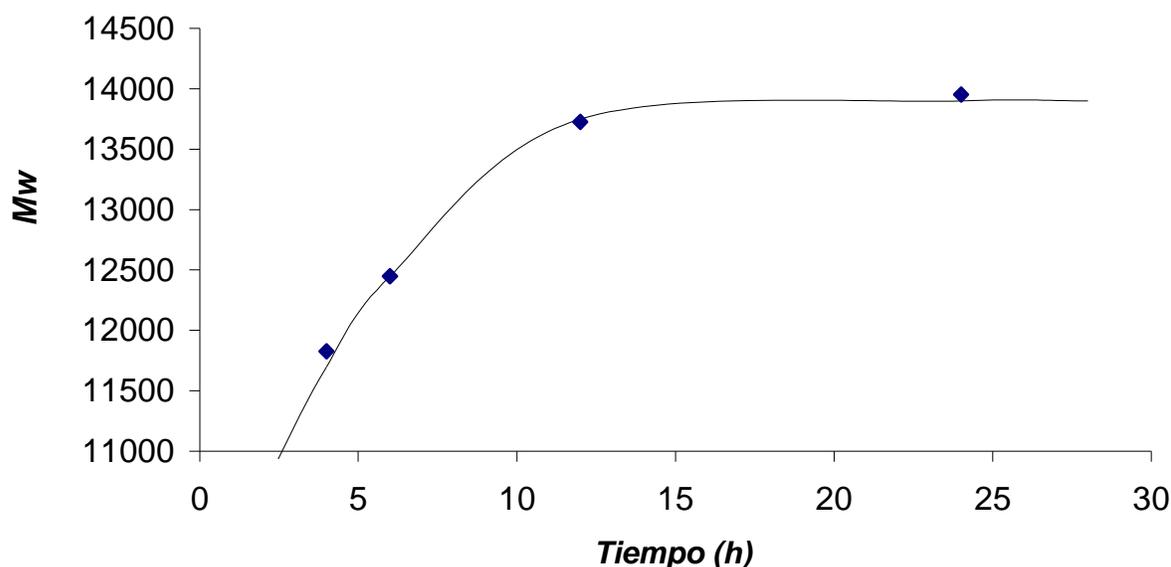
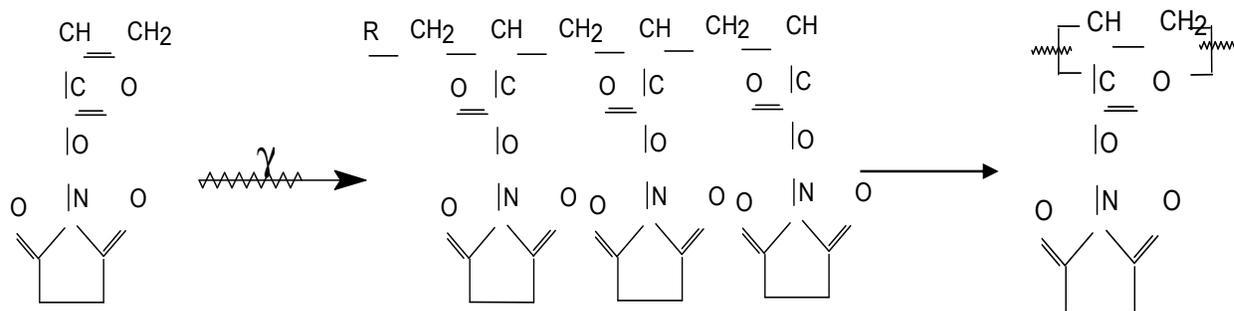


Figura 3.14 Variación del peso molecular del PNAS a diferentes tiempos de reacción, mediante el catalizador AIBN.

En el caso del PNAS obtenido por radiación las mediciones fueron realizadas en polímeros sintetizados a diferentes dosis, mostrando que el peso molecular aumenta hasta los 10 kGy y luego se mantiene en un valor constante (7900-8100) hasta los 80 kGy donde comienza a disminuir levemente hasta los 150 kGy (la dosis más alta con la que se trabajó) debido a que el polímero posiblemente comienza a degradarse por efecto de la radiación (figura 3.15). Comparando el peso molecular de los polímeros sintetizados por ambos métodos, se encontró que por el método químico se obtienen polímeros con mayor peso molecular que los obtenidos por radiación; por tanto se concluyó que el método de iniciación para polimerizar el NAS tiene un efecto importante sobre esta propiedad.



Esquema 3.3 Mecanismo de polimerización del NAS por medio de radiación gamma.

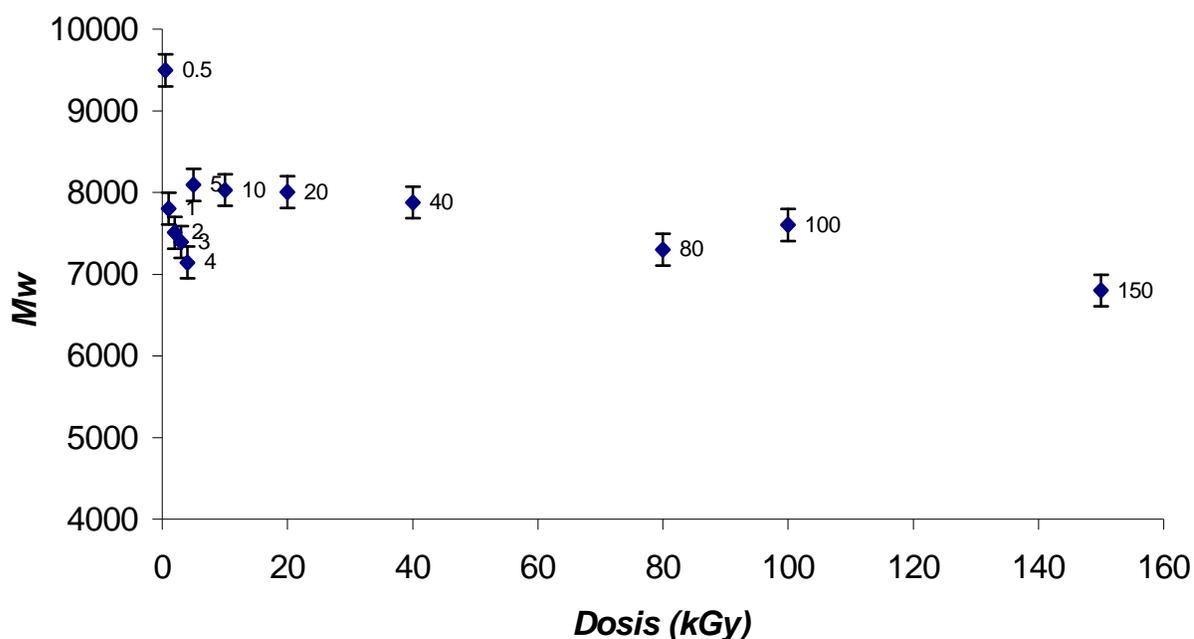
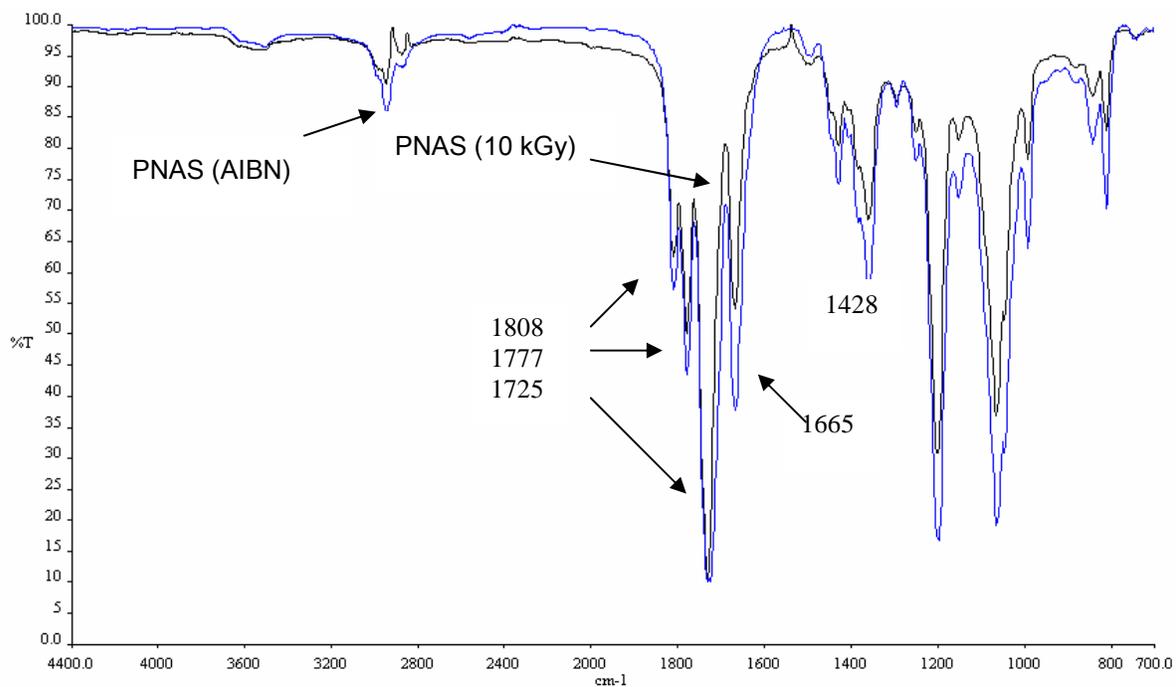
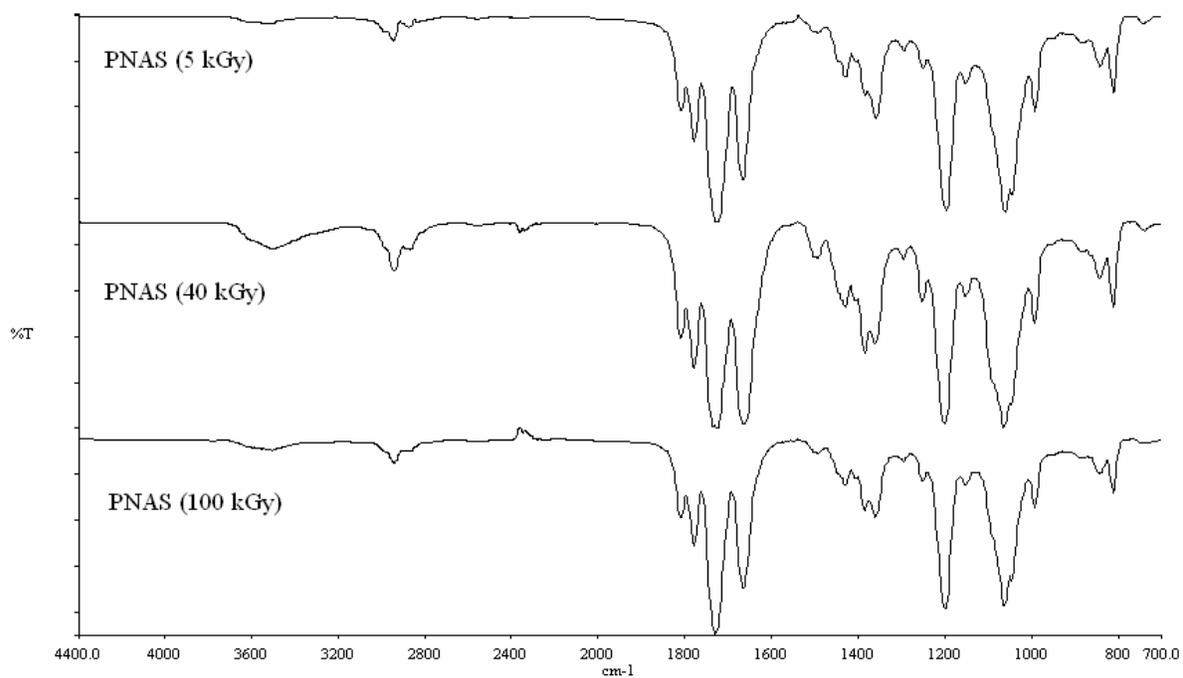


Figura 3.15 Variación del Peso molecular del PNAS obtenido a diferentes dosis de radiación.

También se realizó un análisis por medio del infrarrojo para ver que la radiación no estuviera afectando al material. Para ello se tomó como patrón al espectro del PNAS sintetizado por vía química y lo comparamos con el espectro del PNAS obtenido a una dosis de radiación dada (figura 3.16 (a)) mostrándonos que no existe diferencia alguna y concluyendo que se está obteniendo el polímero requerido, además presenta las bandas características del grupo succinimida que incluyen la de la imida cíclica (1808 , 1777 y 1725 cm^{-1}), la vibración del carbonilo (1665 cm^{-1}) y la vibración el del N-H (1428). Asimismo se compararon los espectros del PNAS obtenidos a diferentes dosis. Los resultados nos confirmaron que la radiación, por lo menos hasta las dosis trabajadas, no afecta significativamente la estructura y propiedades del material (figura 3.16 (b)).



(a) Espectro del PNAS sintetizado por dos rutas: radiación y un catalizador.



(b) Espectro del PNAS a diferentes dosis de radiación.

Figura 3.16 Espectros de Infrarrojo del PNAS.

Como complemento se realizaron determinaciones de DSC en dicho material en donde se observa la Tg del polímero obtenido por ambos métodos, la cual no varía significativamente. El análisis termogravimétrico nos muestra que la estabilidad térmica es la misma, es decir, no se ve afectada por el método de polimerización.

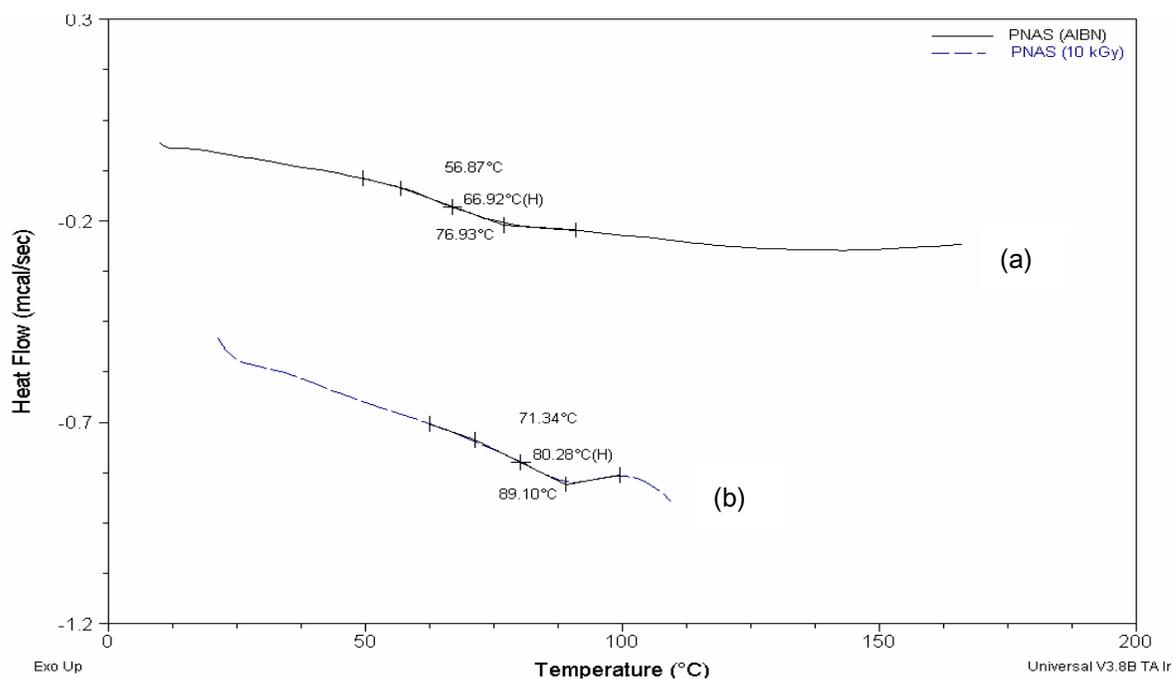


Figura 3.17 DSC del PNAS sintetizado (a) vía química, (b) por radiación (10 kGy)

En la figura 3.17 observamos que el comportamiento térmico del material se ve afectado ligeramente por el método de polimerización utilizado ya que se tiene un material amorfo que presenta un transición vítrea en 67°C para el polímero obtenido por vía química y una de 80°C para el obtenido por radiación ($\Delta T_g = 13^\circ\text{C}$).

Además podemos advertir que lo mismo sucede cuando se realiza el análisis termogravimétrico (figura 3.18) donde los dos polímeros presentan una estabilidad térmica muy similar. Ambos presentan dos temperaturas de descomposición; la primera comienza en 255, pérdida del 10% de la masa total, y hasta los 310°C, donde cambia la pendiente de la curva debida principalmente a la ruptura del grupo succinimida. La segunda parte de la descomposición empieza en el punto de donde la pendiente cambia (310°C) y hasta que el peso residual se mantiene constante (460°C), debido a la descomposición de la cadena principal del polímero.

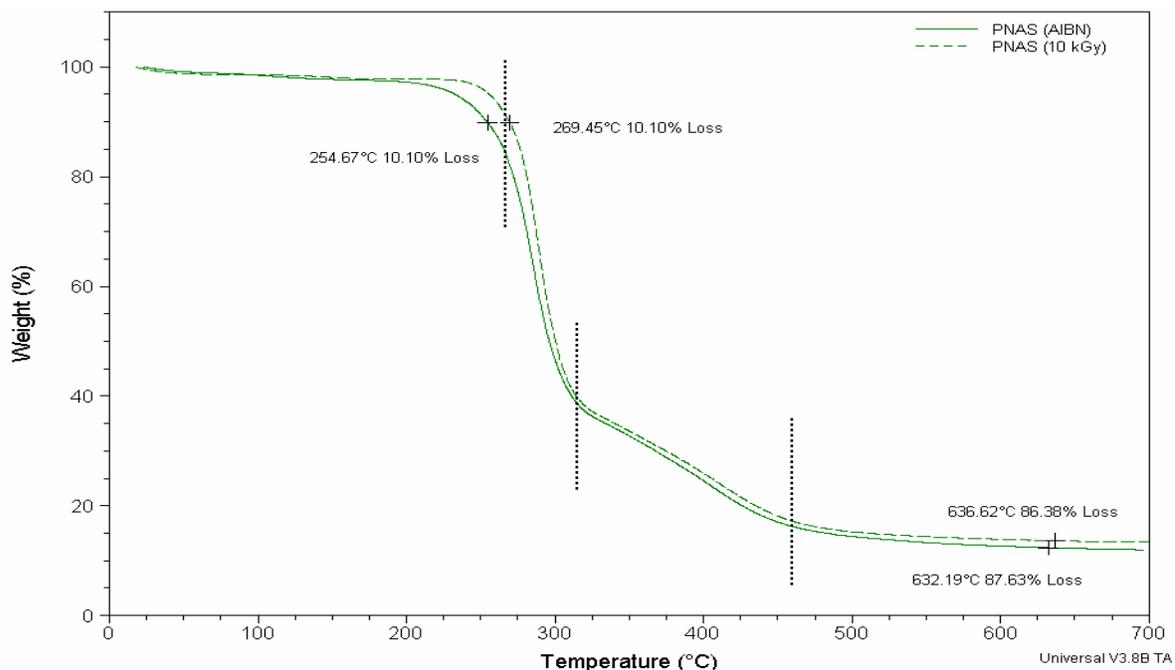


Figura 3.18 Análisis térmico del PNAS.

Con base en los resultados presentados, se eligió trabajar con el PNAS sintetizado por radiación debido a la simpleza y rapidez del método así como a la facilidad de recuperar el polímero puro. Las condiciones de obtención se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3.6 Condiciones de síntesis y polimerización para la obtención del NAS.

Material	Reacción	Condiciones	% Rendimiento
NAS	Pollak [20]	AC, NHS, NEt_3	70 %
		Disolvente: CHCl_3	
		Temperatura: 0°C	
PNAS	Radiación	Fuente: ^{60}Co	75-80 %
		Dosis: 10 kGy	
		Disolvente: THF	

3.3 RED INTERPENETRANTE

Un parámetro de suma importancia para la formación de la red interpenetrante fue el peso molecular de la polilisina, el agente entrecruzante del PNAS, el cual se disuelve junto con este polímero en dimetilformamida(DMF); y el hidrogel de PNIPAAm se hincha posteriormente en dicha disolución. Con base en el estudio de formación de redes, se cree que conforme el peso molecular aumente le será más difícil entrar a través de los huecos del PNIPAAm y entrecruzar al PNAS, mientras que con un peso molecular menor tendrá mejor movilidad dentro del polímero. No obstante, la capacidad de inmovilización de la red se puede ver afectada dependiendo del tamaño de la polilisina pues es el elemento de anclaje de las biomoléculas. Por tanto, se decidió probar esta variable dentro de la formación de las redes interpenetrantes. Para ello se formaron dos series de IPNs donde lo único que varía entre ellas es el peso molecular de la polilisina usada como agente reticulante del PNAS.

Tabla 3.7 Condiciones de síntesis de las redes interpenetrantes

	ID	Dosis (kGy)	Agente BIS (%)	Polilisina (Mw)
Serie 1	IPN1-S1	50	0.0	500-2000
	IPN2-S1	60	0.3	
	IPN3-S1	70	0.0	
	IPN4-S1	50	0.3	
	IPN5-S1	60	0.0	
	IPN6-S1	70	0.3	
Serie 2	IPN1-S2	50	0.0	4000
	IPN2-S2	60	0.3	
	IPN3-S2	70	0.0	
	IPN4-S2	50	0.3	
	IPN5-S2	60	0.0	
	IPN6-S2	70	0.3	

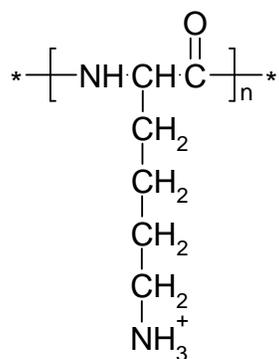


Figura 3.19 Estructura química de la polilisina.

La caracterización de las redes sintetizadas es de suma importancia debido a que debemos comprobar y/o confirmar la formación de la red interpenetrante; además las propiedades que presenten serán importantes para determinar como utilizarla adecuadamente.

La termosensibilidad es un factor trascendental para este sistema ya que la introducción de un segundo polímero puede disminuir o incluso anular por completo la respuesta a la temperatura que presenta el PNIPAAm. Por tanto, se evaluaron dos propiedades fundamentales: el hinchamiento y la temperatura de solución crítica (LCST), como se describe en el desarrollo experimental (pagina 69).

La prueba de hinchamiento límite nos da información sobre el tiempo que se requiere para que el sistema alcance el equilibrio (máximo hinchamiento). Al formarse las redes, este tiempo disminuyó de 3 h que necesitaba el hidrogel de PNIPAAm a 1.5-2.0 h que requiere la red interpenetrante sintetizada. Esto lo podemos observar en la figura 3.20, donde comparamos el comportamiento de las IPNs de la serie 1 y 2 con el hidrogel del que se partio (PNIPAAm, 60 kGy). Se advierte que el tiempo disminuye al igual que la capacidad de hinchamiento debido a la inserción de la segunda red. Esto último es una consecuencia del nuevo arreglo estructural pues al insertar una segunda red dentro del PNIPAAm estamos disminuyendo los poros o huecos que tiene la estructura principal provocando que el hinchamiento sea menor y se lleve a cabo en menos tiempo. Esto también es debido a la perturbación del equilibrio hidrofílico-hidrofóbico del PNIPAAm ya que el PNAS

es menos hidrofílico (figura 3.21). Todas las redes interpenetrantes sintetizadas presentan el mismo comportamiento que el observado en los hidrogeles de PNIPAAm, donde el tiempo de hinchamiento es igual para todas las muestras sin importar la dosis de radiación o el peso molecular de la polilisina. Esto nos indica que la estructura del material sufrió una modificación que se está viendo reflejada en la rapidez para alcanzar el equilibrio en el proceso de hinchamiento. Esta modificación se puede ver en las imágenes de SEM presentadas más adelante (página 104).

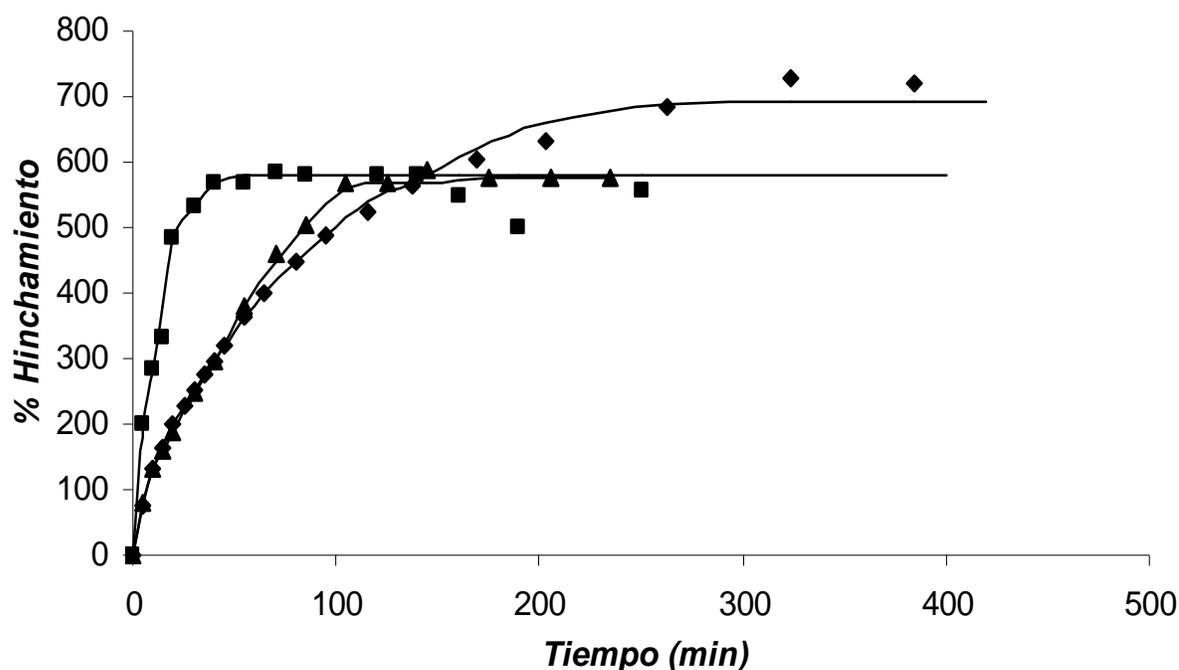


Figura 3.20 Hinchamiento límite (◆) PNIPAAm (■) IPN2-S1, (▲) IPN2-S2, Dosis: 60kGy.

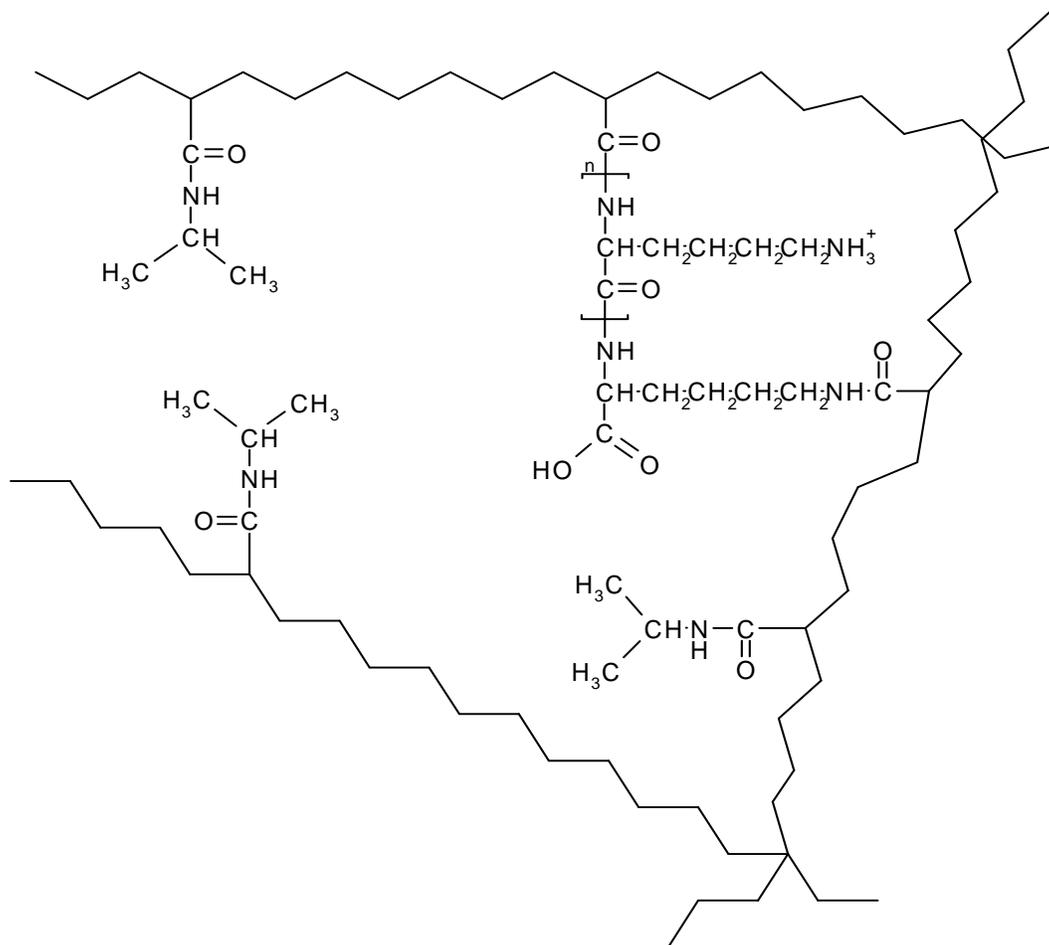


Figura 3.21 Estructura química de la red interpenetrante

Se evaluó la LCST, al igual que en los geles de PNIPAAm, tanto con la prueba de hinchamiento como por medio de DSC. Los resultados muestran que la LCST de los hidrogeles de PNIPAAm y las redes interpenetrantes sintetizadas (serie S1 y S2) fueron muy similares, alrededor de los 30-32 °C, lo cual es satisfactorio pues esta propiedad no cambia al introducir la segunda red, dejándonos una termorespuesta similar a la del hidrogel de PNIPAAm del que se partió e indicándonos que no se está formando un copolímero pues se ha reportado que la formación de este tipo de sistemas cambia dicha respuesta dependiendo de la relación molar presente en el material llegando incluso a eliminarla [13]. Tanto en la figura 3.22 como en la 3.23 es posible observar como varía el grado de hinchamiento de ambas series con respecto al grado de entrecruzamiento que presentan. Esto es normal ya que las

redes interpenetrantes que se formaron con geles de PNIPAAm sintetizados a mayores dosis de radiación presentan mayor entrecruzamiento, lo cual hace que el grado de hinchamiento disminuya. También se aprecia que el hinchamiento máximo de la serie 1 es menor que en la serie 2 para la mayoría de las IPNs, esto debido a que el tamaño de la polilisina influye en la capacidad de difusión dentro del PNIPAAm, logrando un menor grado de entrecruzamiento en esta serie que contiene la polilisina de mayor peso molecular (serie 2). Igualmente, en la figura 3.24 se aprecia el termograma para dos de las redes interpenetrantes y no se observa ninguna diferencia significativa en cuanto a la respuesta ya que se encuentran en el mismo intervalo de temperaturas que presentaron los hidrogeles de PNIPAAm (figura 3.4). Sin embargo, no se puede concluir nada sobre el efecto que tiene la presencia del agente entrecruzante ya que la prueba es poco sensible pero sirve para corroborar los valores de LCST obtenidos mediante la prueba de hinchamiento.

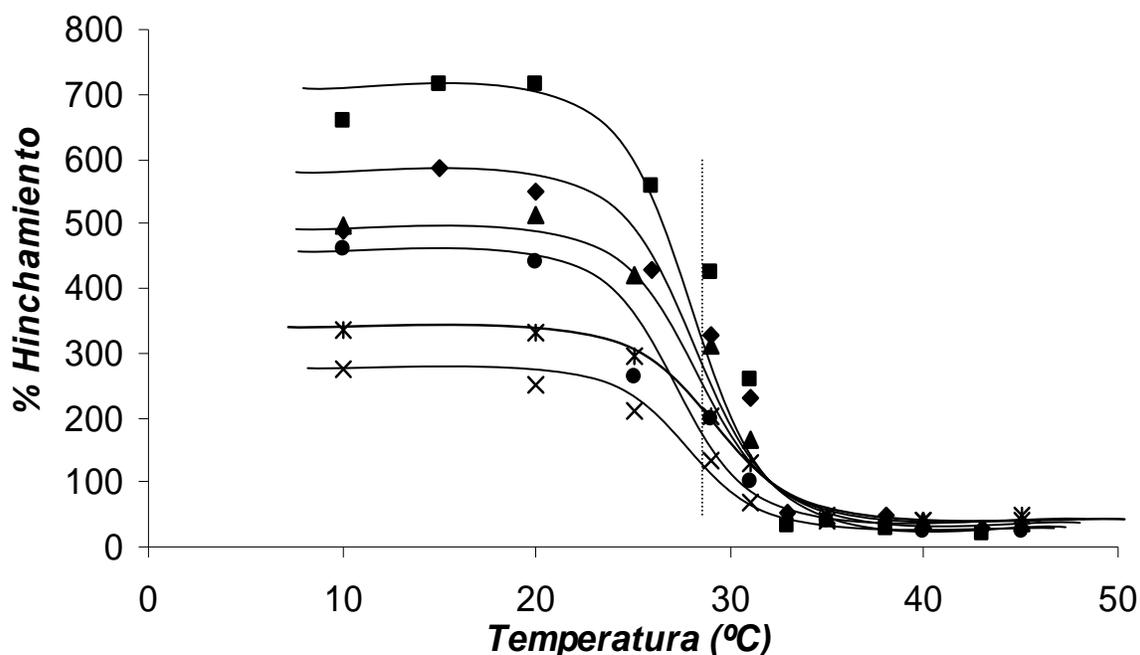


Figura 3.22 LCST determinada mediante hinchamiento para las IPNs sintetizadas con polilisina $M_w=500-2000$. (◆) 50 kGy; (■) 50 kGy, BIS; (▲) 60 kGy; (●) 60 kGy, BIS; (*) 70 kGy; (x) 70 kGy, BIS.

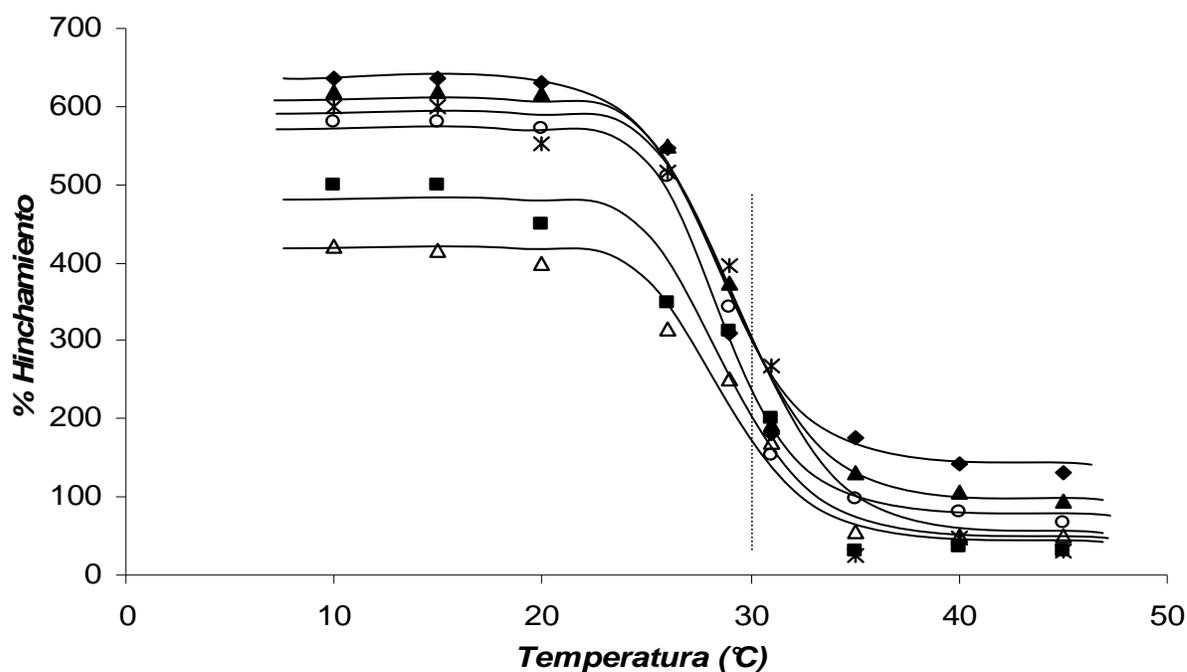


Figura 3.23 LCST determinada mediante hinchamiento para la serie de IPNs sintetizadas con polilisina Mw=4000. (♦)50 kGy; (■)50 kGy, BIS; (▲)60 kGy; (○)60 kGy, BIS; (*)70 kGy; (Δ)70 kGy, BIS.

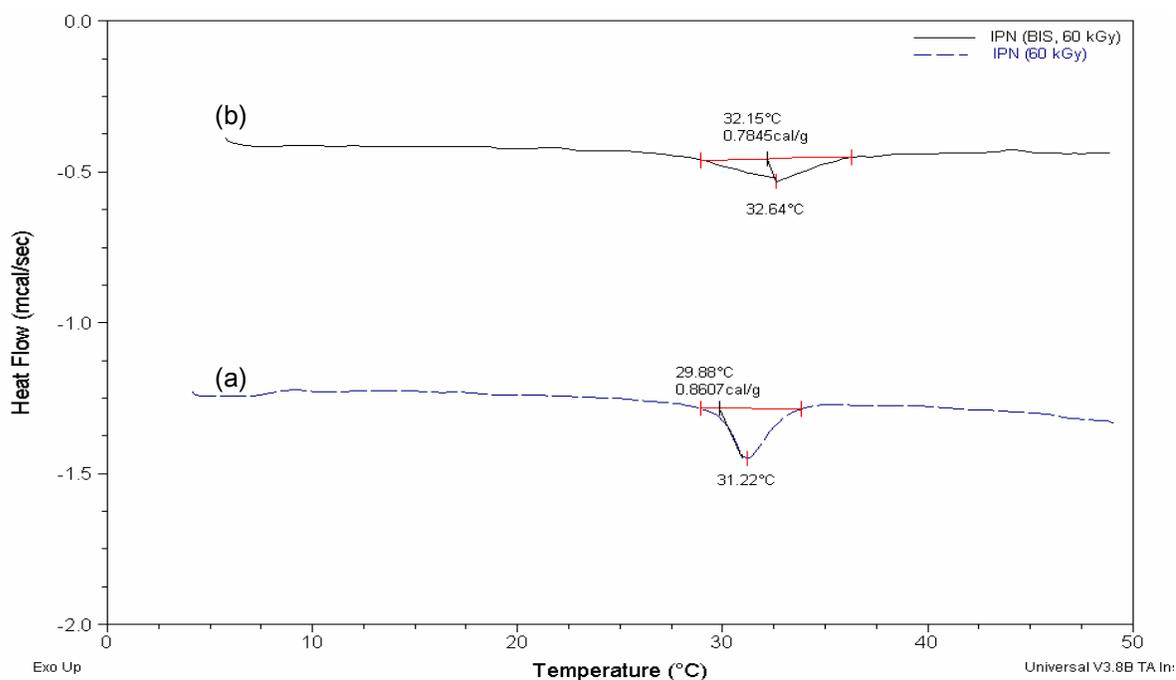


Figura 3.24 Determinación de LCST mediante DSC en IPN formadas con polilisina Mw= 500-2000. (a)60 kGy, (b)60 kGy, BIS.

Se examinó la termosensibilidad para determinar la dependencia del proceso de hinchamiento/colapso con la temperatura. Como se muestra en la figura 3.22 y 3.23, todas las muestras presentan un perfil de hinchamiento similar, es decir, la razón de hinchamiento decrece dramáticamente a medida que se incrementa la temperatura hasta alcanzar la LCST y entonces ocurre el cambio de fase.

En la tabla 3.8 se muestra la razón de hinchamiento (SR) a temperatura ambiente para las IPNS y los hidrogeles de PNIPAAm. Todos los hidrogeles tienen valores mayores de hinchamiento (mayor SR) que las redes correspondientes, lo cual es lógico ya que al formar la red su capacidad para absorber agua se ve reducida debido al entrecruzamiento de la segunda red (PNAS) dentro de éste. Sin embargo, la disminución es mínima ya que los residuos de polilisina presentes en el PNAS son hidrofílicos produciendo que esta capacidad no se vea tan abatida.

Aunque las LCSTs de las IPNs no se vieron afectadas por la nueva estructura, la razón de hinchamiento (SR) se fue reduciendo en el siguiente orden para cada serie: PNIPAAm>IPN1>IPN2>IPN3>IPN4>IPN5>IPN6, además la magnitud de la pendiente de hinchamiento decrece de la misma manera debido a la razón discutida arriba.

Tabla 3.8 Temperaturas de transición de la redes interpenetrantes

<i>Ply</i> (Mw)	<i>Dosis</i> (kGy)	<i>SR</i>	<i>LCST</i> (°C)	<i>Tg1</i> (°C)	<i>Tg2</i> (°C)
500-2000	50	16.6	29.0	52.6	120.4
4000	50	5.16	29.0	50.5	149.4
500-2000	50 + BIS	33.4	30.5	54.3	136.8
4000	50 + BIS	5.4	30.5	52.4	137.4
500-2000	60	14.0	29.0	53.7	139.5
4000	60	6.5	30.0	48.0	130.1
500-2000	60 + BIS	13.2	30.0	56.4	143.1
4000	60 + BIS	5.8	31.0	50-0	134.2
500-2000	70	6.7	30.7	55.3	127.3
4000	70	5.4	29.4	51.4	132.2
500-2000	70 + BIS	6.6	28.9	55.3	149.8
4000	70 + BIS	4.6	29.0	50.3	125.9

**Ply*: polilisina

La espectroscopia de infrarrojo también nos arrojó resultados sobre la formación de la red interpenetrante pues podemos confirmar la presencia de la polilisina en el sistema ya que al reaccionar con el PNAS, las bandas de absorción características de este polímero (grupo succinimida) tienden a desaparecer y las asociadas al aminoácido se hacen presentes. El sistema exhibe bandas características de la polilisina como son la vibración de estiramiento y deformación del NH_3^+ (3335 y 1510 cm^{-1}) y la vibración del carbonilo (1740 cm^{-1}). Sin embargo, no es posible verlas con claridad ya que se empalman con algunas bandas de absorción relacionadas al PNIPAAm, entre ellas la vibración de estiramiento del N-H (3400 cm^{-1}); también es posible observar la banda asociada a la deformación del grupo isopropilo (1374 cm^{-1}). Además las bandas correspondientes a la vibración del grupo succinimida no desaparecen por completo debido a una reacción incompleta del PNAS con la polilisina pues no es posible detectar claramente la banda del carbonilo del grupo amida en 1656 cm^{-1} debido a que se sobrepone a la vibración del C=O del grupo éster (1627 cm^{-1}) del PNAS (figura 3.25). Este análisis se le realizó a todas las redes interpenetrantes sintetizadas encontrándose con resultados similares. Algunos ejemplos se pueden apreciar en las figuras 3.26 y 3.27.

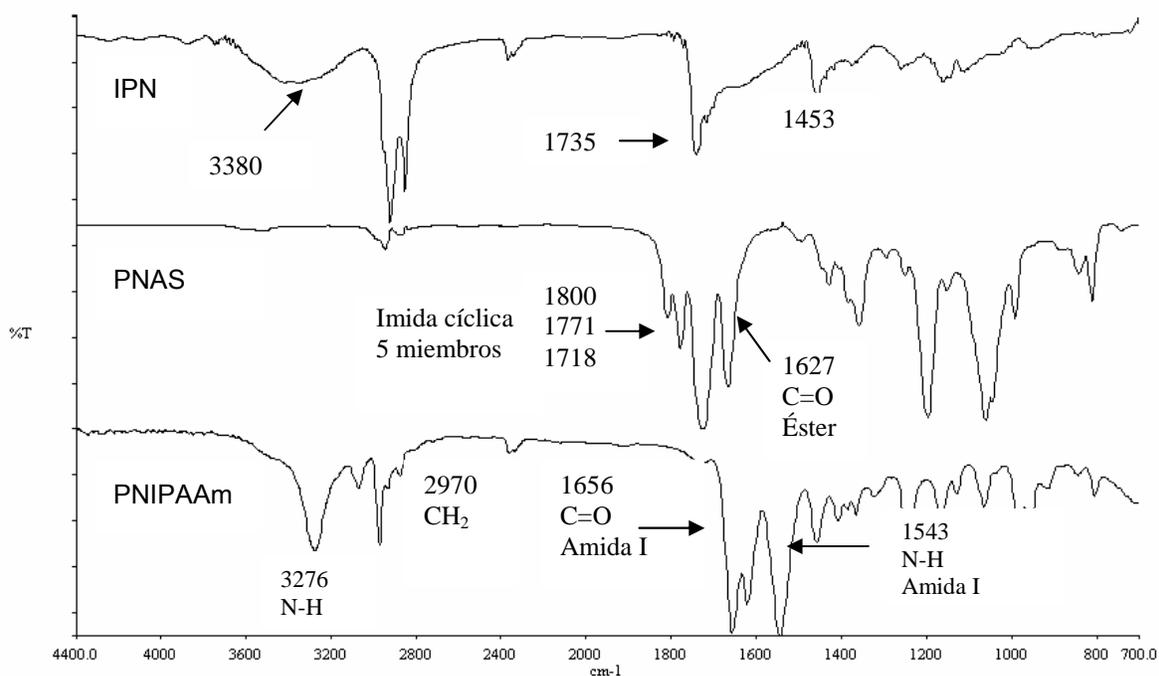
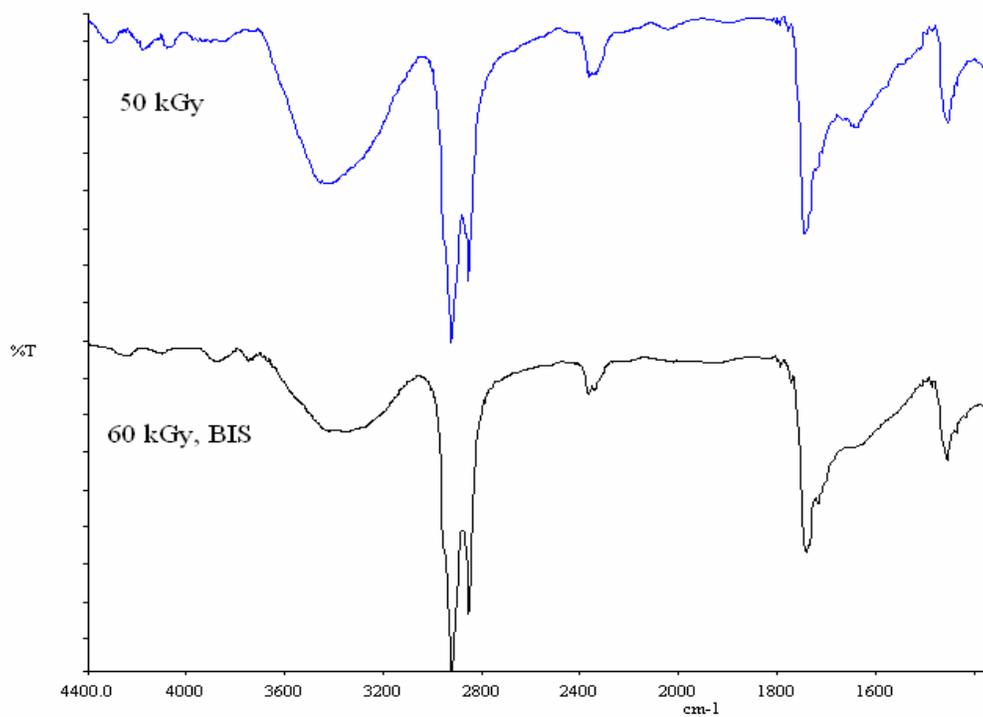
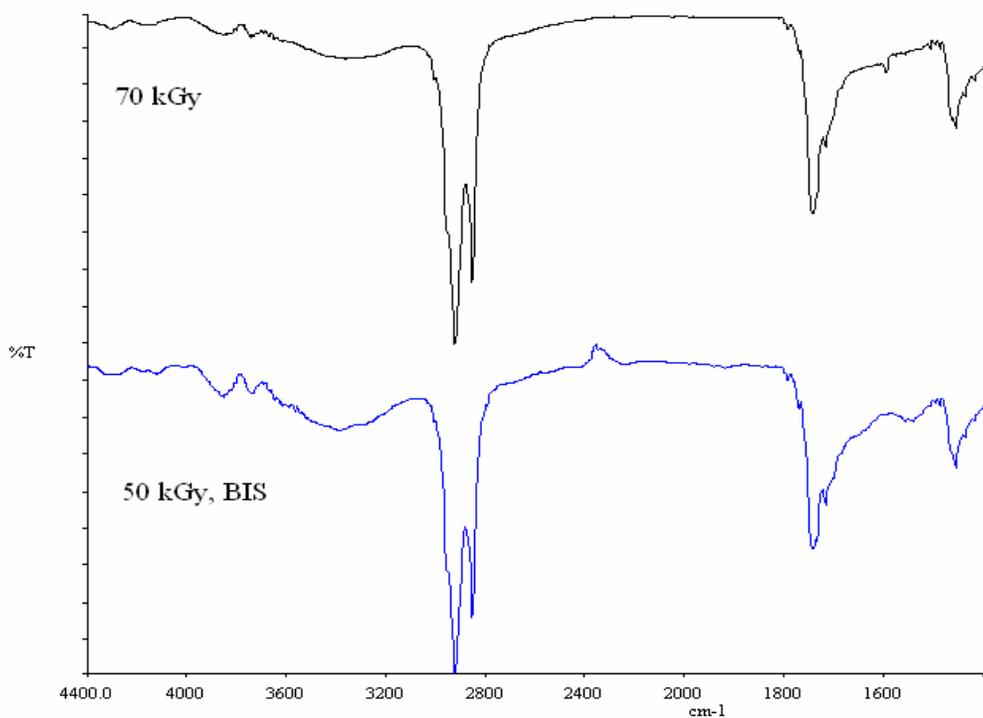


Figura 3.25 Espectro de infrarrojo del PNIPAAm (60 kGy), PNAS (10 kGy), IPN3-S1.



3.26 Espectro de FTIR de la IPNs reticuladas con polilisina Mw=500-2000 a diferentes dosis.



3.27 Espectro de FTIR de la IPNs reticuladas con polilisina Mw=4000 a diferentes dosis.

En cuanto a la medición de la temperatura de transición vítrea (T_g), todas las muestras exhibieron dos valores que fueron atribuidos a los componentes de la red interpenetrante (PNAS y PNIPAAm). La primera transición se encontró entre los 56-60 °C aproximadamente y la otra entre los 145-160 °C; aunque estas temperaturas subsisten, ocurre un corrimiento a temperaturas mayores debido al cambio que hay entre las interacciones polímero-polímero al estar presente la segunda red dentro del PNIPAAm, las cuales pueden actuar como promotores de entrecruzamientos físicos, provocando que se necesite suministrar una mayor cantidad de energía para poder mover las cadenas poliméricas (tabla 3.8). Además, es fácil entender que la T_g de las IPNs son mayores comparadas con la de los materiales de partida ya que las interacciones moleculares esperadas son mayores para el material IPN.

Sin embargo, el hecho de que nuestro material exhiba dos T_g indica que las ambas redes de la IPN no tienen una miscibilidad completa entre si, generalmente esto es una característica de este tipo de sistemas pues la razón de unirlos en forma de una red interpenetrante es para poder obtener las propiedades de ambos polímeros, como el de una mezcla, pero sin la desventaja de que lleguen a separarse pues el arreglo estructural los mantiene unidos a pesar de que termodinámicamente sean incompatibles.

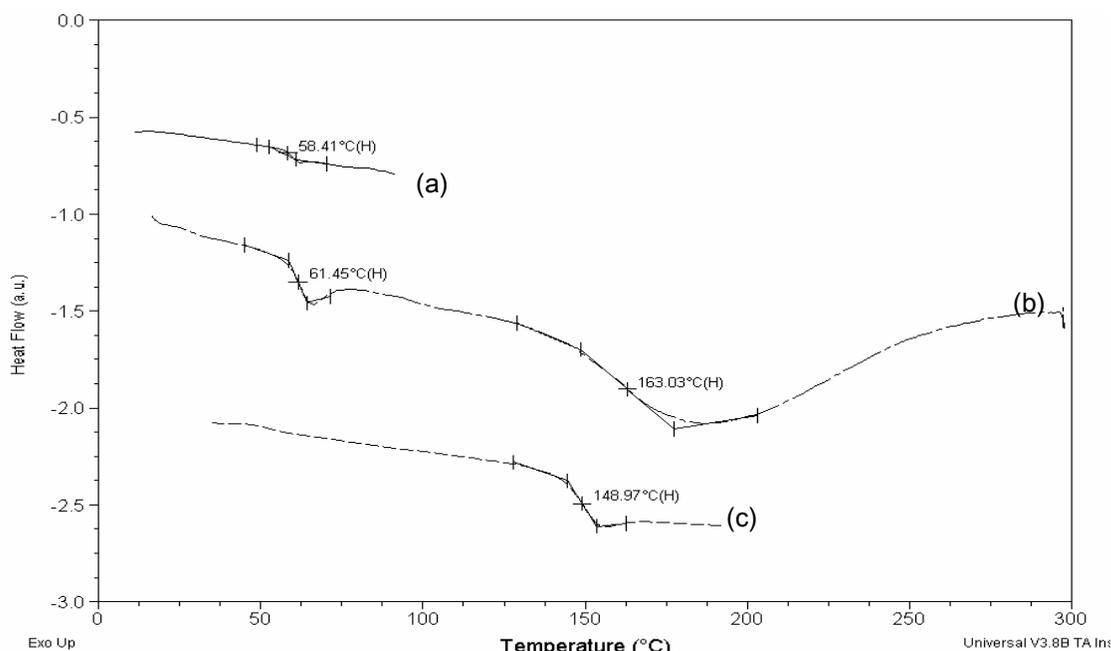


Figura 3.28 Termograma del (a) PNAS (10 kGy), (b) IPN3-S1, (c) PNIPAAm (60 kGy).

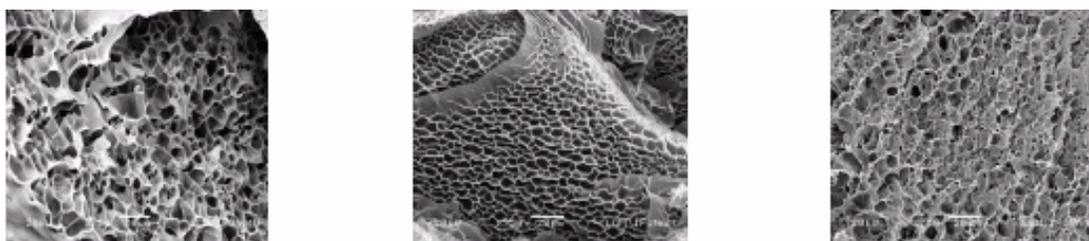
La morfología de los hidrogeles de PNIPAAm y de las IPNs hinchadas se muestra en la figura 3.29. Las muestras fueron investigadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) y podemos percibir que entre ellas existen grandes diferencias, por ejemplo las IPNs muestran una superficie menos uniforme y homogénea. El tamaño de los huecos se reduce dada la presencia de la segunda red y presentan una estructura más fibrosa que contiene nodos interconectados por pequeños filamentos. Conjuntamente se observa que no hay una miscibilidad completa entre los polímeros, presentándose en ciertas regiones una separación de fase dentro de la matriz.

Las diferentes morfologías observadas entre estos especímenes resultan de las diferencias que se existen entre las dos partes que componen la IPN y las interacciones entre las redes durante el proceso de entrecruzamiento. Durante este proceso es posible que el entrecruzamiento no se lleve a cabo uniforme y simultáneamente a través de todo el sistema debido a fluctuaciones de concentración dentro de la red de PNIPAAm, lo cual está regido por la difusión del PNAS y la PLY. De esta forma, el entrecruzamiento de las cadenas de PNAS puede realizarse dentro de dominios localizados de la primera red y subsecuentemente llevar a una distribución desigual de la masa. Cabe mencionar que no se creyó necesario incluir una foto del PNAS ya que este es un polvo y no una red, por lo que su morfología es bidimensional (no sirve para compararla con la IPN).

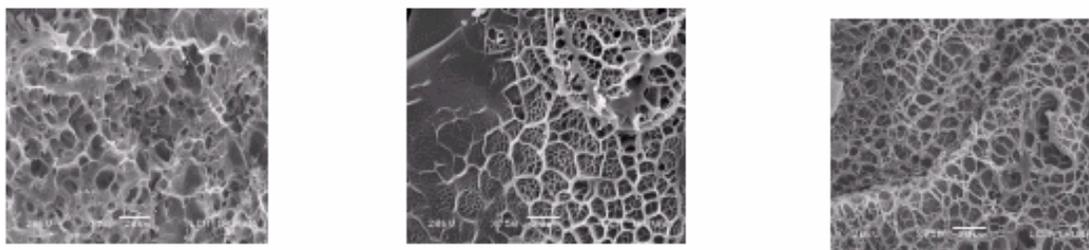
El tamaño de los huecos en la red interpenetrante también fue determinado por microscopía electrónica de barrido ya que este es un factor de vital importancia para la inmovilización. Las vesículas que se formen deben ser capaces de entrar en la red por lo que deben ser de un tamaño menor que el hueco. En la figura 3.30 se muestran dos micrografías a x3000 de magnificación para dos redes interpenetrantes (60 y 70 kGy). Podemos observar que el tamaño es poco variable pero se va reduciendo con el aumento de la dosis pues en el primer caso (60 kGy) encontramos un tamaño promedio de 9-10 μm mientras en la IPN5-S2 (70 kGy) el tamaño disminuye a 2 μm aproximadamente. Esto también es debido a que al aumentar la dosis de irradiación del PNIPAAm, la densidad de entrecruzamiento es mayor y por lo tanto el tamaño del hueco disminuye, a pesar de que el tamaño de la polilisina fue

mayor en el segundo caso. Podemos concluir que el factor determinante fue el % de reticulación de la primera red formada.

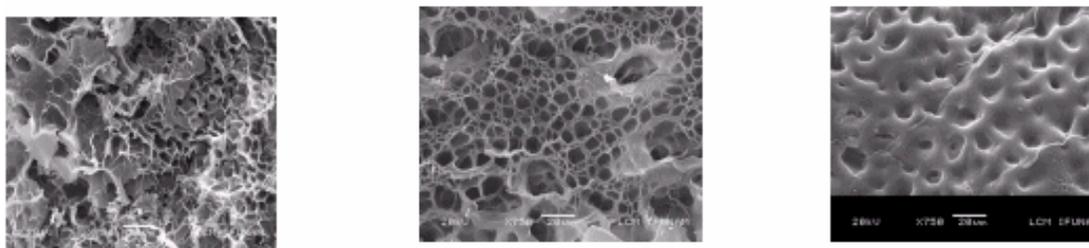
Finalmente se realizó el análisis elemental a cada una de las redes sintetizadas para determinar la proporción que se tiene de cada polímero en el sistema, dándonos una relación molar $\left(\frac{PNIPAAm}{PNAS}\right)$ de 3 en todos los casos. Esto era de esperarse ya que el sistema sigue actuando como si sólo se tratara del hidrogel de PNIPAAm pues sus propiedades de respuesta no se ven alterados así como su estabilidad térmica. Pero aunque se tenga en menor proporción el PNAS, este es el que le confiere la propiedad de inmovilizar y representa una parte esencial del sistema brindándole la capacidad de interactuar con biomoléculas.



Hidrogeles de PNIPAAm



Redes interpenetrantes (polilisina Mw= 500-2000)



Redes interpenetrantes (polilisina Mw=4000)

(a)

(b)

(c)

Figura 3.29 Micrografías los hidrogeles de PNIPAAm y de las IPNs a diferentes dosis

(a) 50 kGy, (b) 60 kGy, (c) 70 kGy.

3.4 INMOVILIZACIÓN

La inmovilización de los lípidos realizó en dos partes: 1) la formación y caracterización de las vesículas (liposomas), 2) la inmovilización de ellas en la red así como su cuantificación.

Para ello se partió dos lípidos, la fosfatidilcolina (POPC) y el fosfatidilglicérido (POPG) ya que la primera presenta una doble carga (zwiterionico) y el otro, una carga negativa (aniónico). La inmovilización de las vesículas lipídicas en la red polimérica se lleva a cabo por interacciones iónicas debidas al grupo amino del residuo de lisina (NH_3^+) presente en la IPN. Por esta razón, se propusieron lípidos que presentaran una parte cargada para que la inmovilización pudiera llevarse a cabo.

El método utilizado para cuantificar la cantidad inmovilizada en el sistema fue la espectroscopia UV, partiendo de una curva de calibración. Los dos lípidos mostraron una absorción en 223 nm.

3.4.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS VESÍCULAS

Las vesículas se formaron por sonificación ya que se determinó que era el método más conveniente por dos razones: 1) permite obtener vesículas con un tamaño entre los 15-50 nm, según esta reportado en la literatura [31,48] y 2) es una manera fácil de obtenerlos. Su principal desventaja radica en que durante el proceso es posible que el lípido se degrade debido al aumento de la temperatura. Por tanto, se realizaron estudios previos para comprobar la integridad de las vesículas así como su tamaño.

Primeramente se determinó por medio de infrarrojo si ocurría alguna cambio en la estructura del lípido durante la formación de la vesícula debido a que los lípidos sufren fácilmente una degradación. Para ello se realizó la prueba de infrarrojo antes y después de formar la vesícula con el fin de determinar si existía alguna diferencia que indicara el degradamiento de este. En la figura 3.31 se muestran estos espectros, donde observamos que ambos son similares y sólo muestran un

corrimiento de las bandas del COO y del P=O debido a la nueva conformación obtenida (vesículas, página 45). Sin embargo, las demás absorciones permanecen iguales y confirman que el lípido no se degrada por la aplicación de ultrasonido.

Comparando el espectro de los dos lípidos utilizados podemos ver que no existe una diferencia significativa ya que sus estructuras químicas son básicamente la misma y únicamente cambia el grupo polar (página 65).

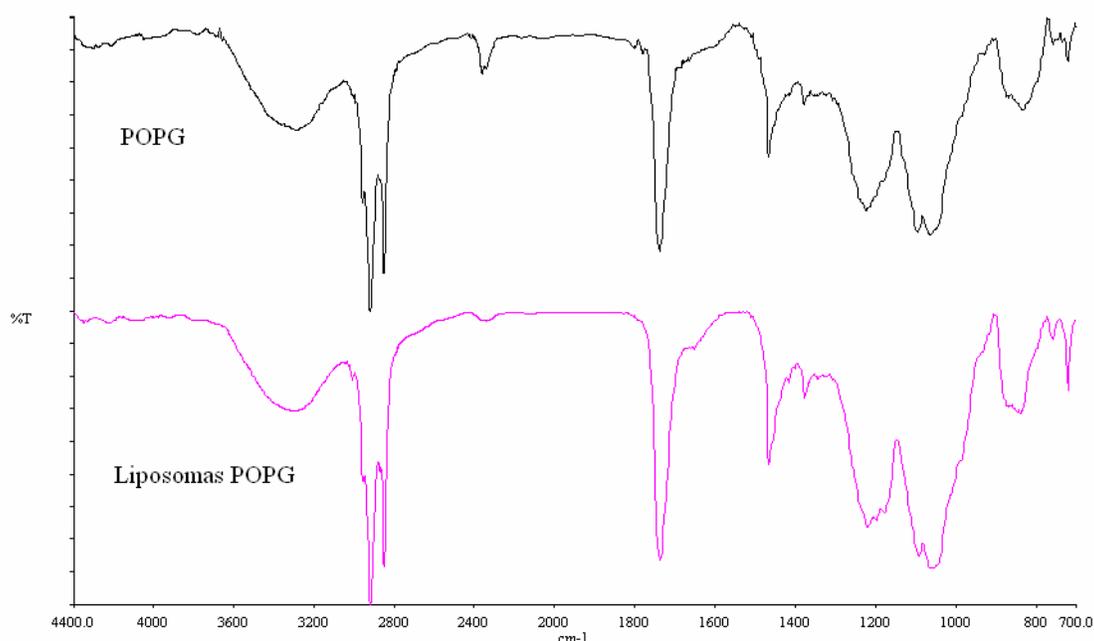


Figura 3.31 Espectro de infrarrojo del POPG.

De igual forma se realizó un estudio térmico tanto al lípido como las vesículas por medio de la calorimetría diferencial de barrido, donde se determinó la temperatura de fusión. En la figura 3.32 se muestran el termograma resultante donde se observa que el lípido tiene una temperatura de fusión a los 90°C mientras la vesícula también presenta una transición a esta temperatura pero además exhibe una transición a una temperatura de 36°C, la cual se asocia a la energía necesaria para romper las esferas de lípido formadas (vesículas) ya que al aumentar la temperatura, las interacciones de repulsión también aumentan hasta que la vesícula es disgregada. Se descarta que esta transición esté asociada al cambio sol-gel ya que para los lípidos usados el cambio se da a los -2°C [48].

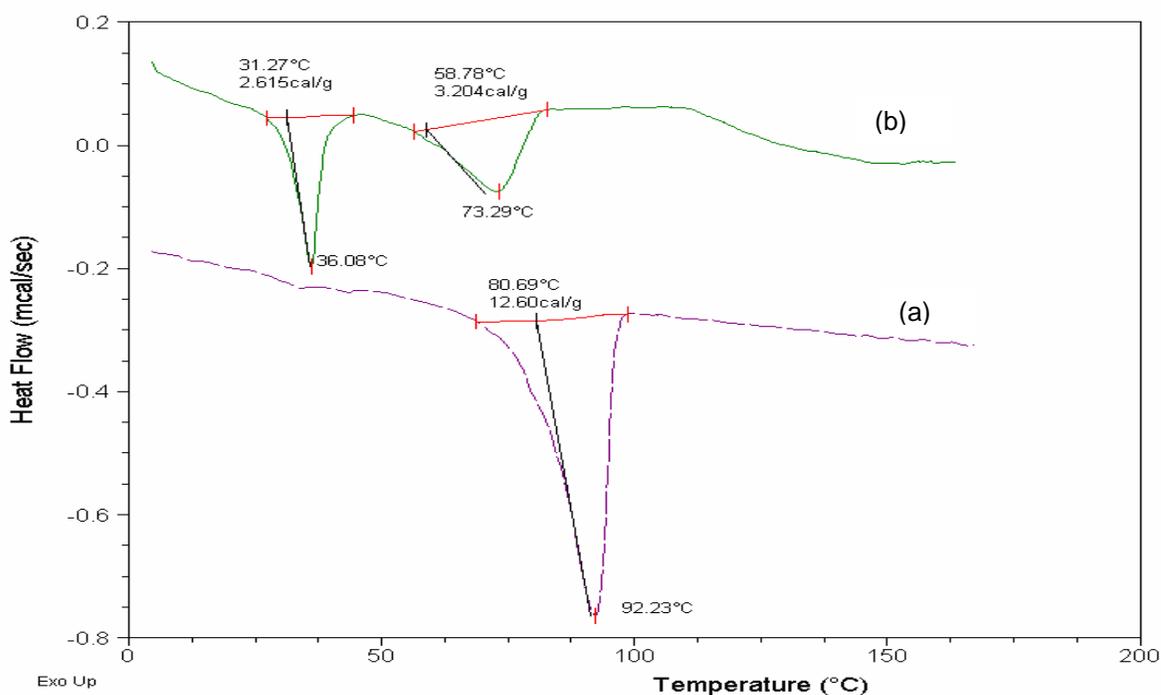


Figura 3.32 DSC del POPG. (a) Lípido, (b) Vesículas.

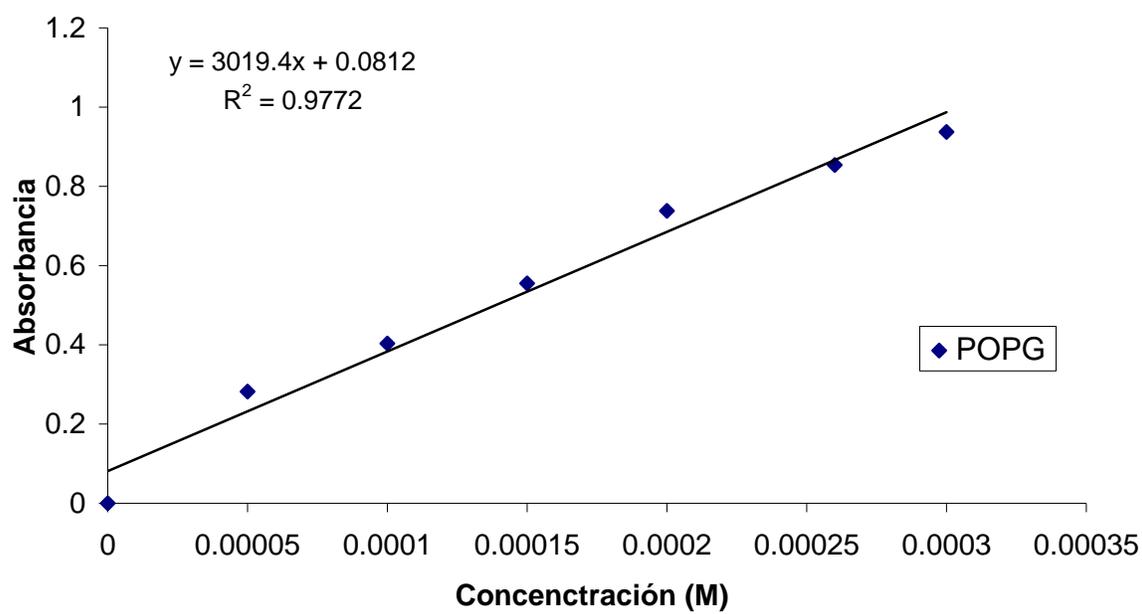
No fue posible determinar el tamaño de las vesículas debido a que las técnicas utilizadas para ello requieren de equipo especializado como un citofluorómetro o realizar una extrusión por medio de membranas, lo cual no se dispone en el lugar de trabajo. Inicialmente se había pensado utilizar la microscopia SEM o TEM para medirlo pero no fue posible observar y determinar el tamaño de las vesículas ya que se necesita una capa muy fina de la muestra la cual no se pudo obtener. Otra forma es por medio de microscopia de luz polarizada pero el tamaño de partículas que permite observar este equipo (micrometros) no es el adecuado pues se requiere un tamaño de vesícula mucho más pequeño (nanometros) para realizar la inmovilización. Esto debido a que las redes obtenidas presentan un tamaño de hueco muy variable que depende del porcentaje de entrecruzamiento de la muestra y el tamaño de la polilisina utilizada. En la figura 3.30 nos podemos percatar que los tamaños varían de 3-10 μm para la mayoría de las muestras.

3.4.2 CUANTIFICACIÓN

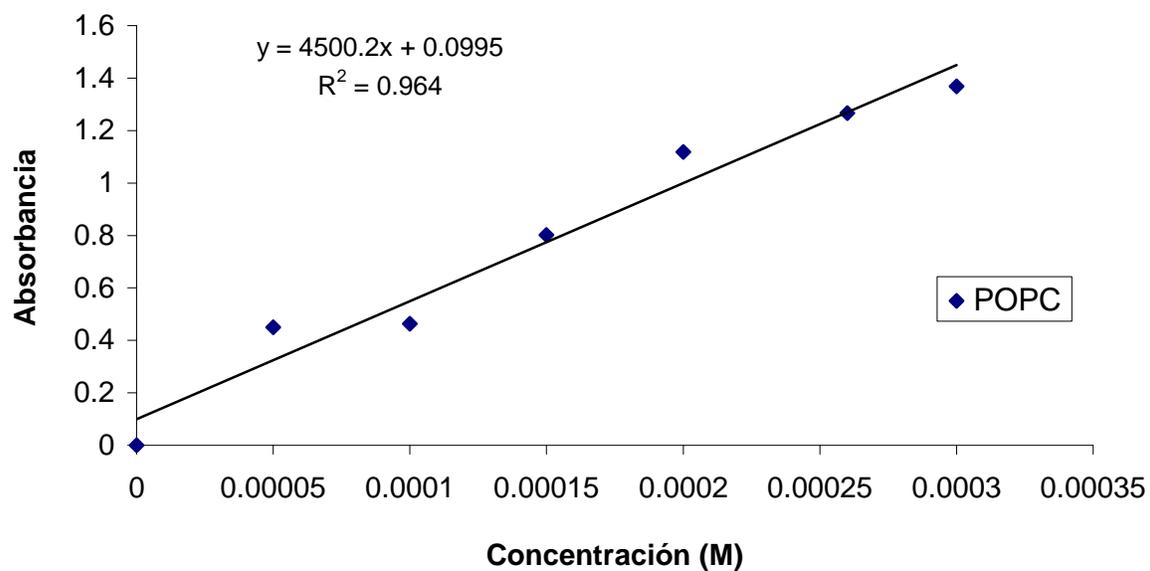
No obstante la incompleta caracterización de las vesículas, se decidió realizar la prueba de inmovilización para demostrar que el sistema es capaz de inmovilizar lípidos. Para ello fue necesario suponer dos cosas 1) que las vesículas obtenidas tienen un tamaño adecuado y 2) que las vesículas son totalmente miscibles en el buffer utilizado, a bajas concentraciones.

La inmovilización de las vesículas se cuantificó por medio de espectroscopia de UV. Para ello se realizó la curva de calibración del POPC y POPG en un buffer de MES (pH=7.4), en un intervalo de 200-500 nm. Los lípidos trabajados presentan una absorción característica en 223 nm usando el buffer como disolvente (blanco). Se trabajó con disoluciones muy diluidas para asegurar que el lípido se encontraba totalmente disuelto.

Las curvas de calibración para los dos lípidos (figura 3.33) nos muestran un grado de correlación aceptable en ambos casos, por lo que se decidió que el método era adecuado para cuantificar (con buenos resultados) las vesículas inmovilizadas por la red interpenetrante. Como primer paso, se determinó el tiempo óptimo para realizar la inmovilización en las redes; la figura 3.34 nos muestra que a partir de 7 h de reacción la cantidad de vesículas inmovilizadas ya no varía por lo que se decidió que el mejor tiempo se encontraba entre 8 y 12 h, escogiéndose esta última como el tiempo necesario para obtener una saturación de la red. En cuanto a la concentración que se maneja, se preparó una disolución saturada del lípido (10 mg/ml) de tal forma que en el líquido remanente de la inmovilización siempre quedara una cantidad de vesículas que se pudiera cuantificar.



(a)



(b)

Figura 3.33 Curva de calibración. (a) Fosfatidilglicero, (b) Fosfatidilcolina

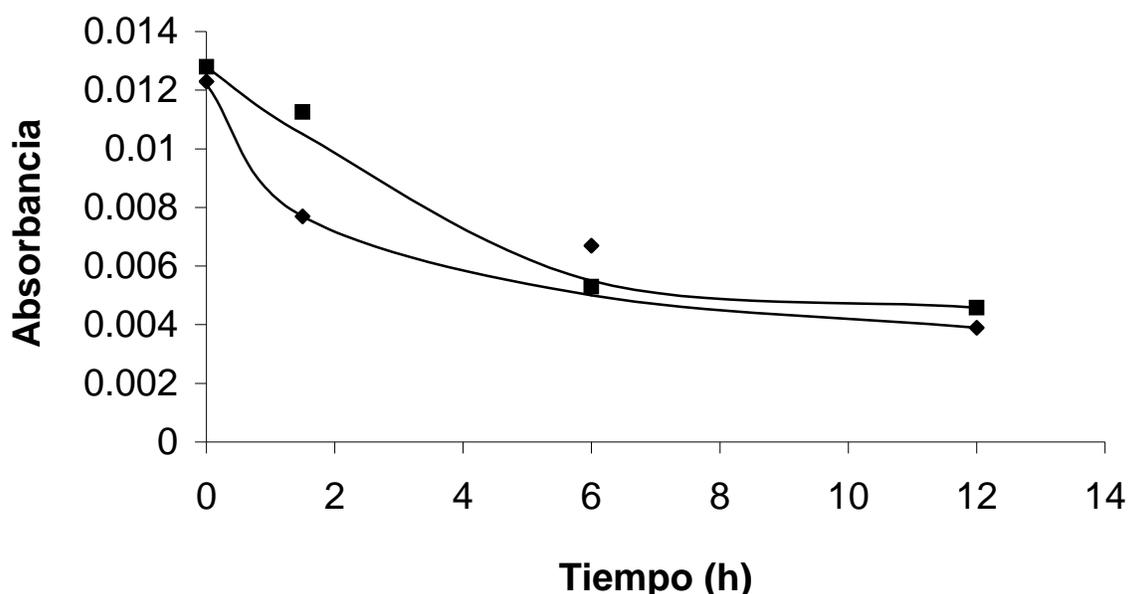


Figura 3.34 Determinación del tiempo de inmovilización (♦)IPN 60 kGy, polilisina Mw=500-2000, (■)IPN 60 kGy, polilisina Mw=4000.

En las figuras 3.35 y 3.36 observamos los resultados de la inmovilización para ambos fosfolípidos, obteniéndose tendencias muy interesantes ya que lo primero que se concluye es que el sistema si es capaz de inmovilizar las vesículas. Sin embargo, las vesículas del fosfatidilglicerido (POPG) son inmovilizadas en mayor cantidad que las de la fosfatidilcolina (POPC), ésto es debido a que las fuerzas iónicas son las responsables de la inmovilización y dado que el primero es un lípido aniónico, las IPNs retienen más vesículas del POPG por unidad de masa que las vesículas de POPC, el cual es un lípido con doble carga que posiblemente tiene neutralizadas sus cargas intramolecularmente debido a la forma estructural de la vesícula. Otro punto importante fue que la cantidad de vesículas inmovilizadas en ambos casos disminuyó con respecto a la dosis utilizada, es decir, a mayor % de reticulación menor cantidad de lípido inmovilizado. Esto es debido a la difusión del PNAS y la Polilisina dentro del PNIPAAm, la cual se ve obstaculizada cuando la densidad de entrecruzamiento aumenta; por tanto la red contiene menor cantidad de sitios activos para llevar a cabo la inmovilización. Esto lo vemos reflejado en algunos resultados obtenidos de la caracterización del material pues en las figura 3.22 y 3.23 vimos que el hinchamiento de la IPNS sintetizadas con la polilisina de alto peso molecular

(Mw=4000) es mayor al hinchamiento de las IPNs sintetizadas con polilisina de bajo peso molecular (Mw=500-2000) debido a que el entrecruzamiento del PNAS por la polilisina no fue el mismo ya que la difusión dentro de la red se vio afectada por su tamaño, dándonos un menor entrecruzamiento de las cadenas de PNAS y así disminuyendo el número de sitios de anclaje para los lípidos.

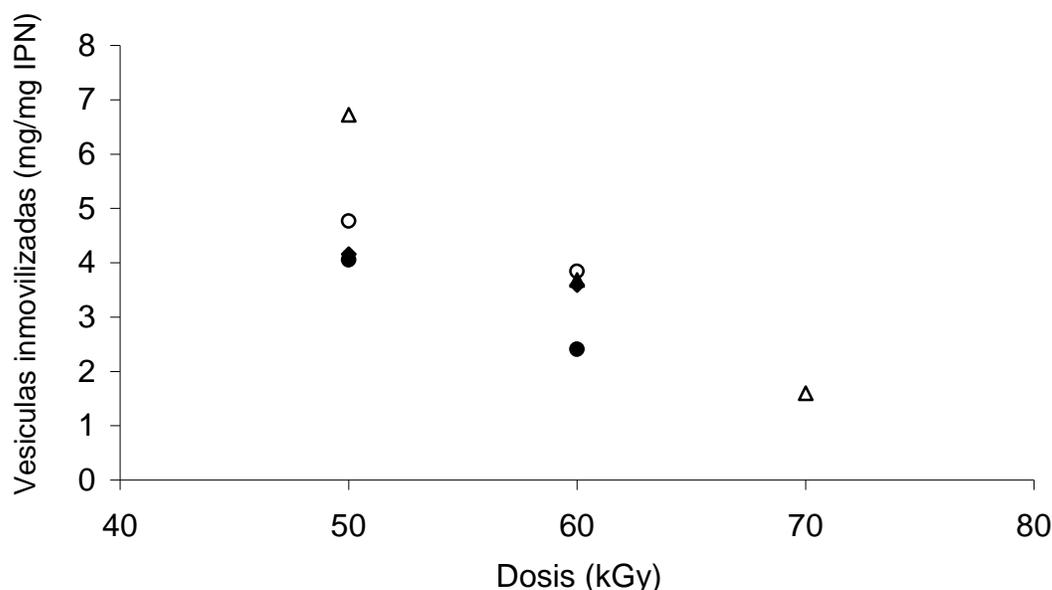


Figura 3.35 Inmovilización de las vesículas del fosfatidilglicérido (POPG). IPN (Δ) sin y (▲) con agente, Polilisina Mw:4000. IPN (○) sin y (●) con agente, Polilisina Mw: 500-2000.

Se puede concluir que la red reticulada con la polilisina de alto peso molecular es capaz de inmovilizar una cantidad mayor de vesículas siempre y cuando el tamaño de la primera red le permita una buena difusión, lo cual se logra cuando se trabaja a bajas dosis (50 kGy). Esto es lógico ya que al aumentar el peso molecular de la polilisina aumentan los sitios activos con respecto a una red formada con la misma dosis pero reticulada con una polilisina de menor peso molecular. Sin embargo cuando se aumenta la dosis, la polilisina ya no es capaz de introducirse en la red PNIPAAm para entrecruzar al PNAS y por tanto no existe una buena difusión, lo que se ve reflejado en la disminución de vesículas inmovilizadas debido a la incompleta reacción entre el PNAS y la polilisina, obteniéndose un menor número de sitios activos dentro de la IPN.

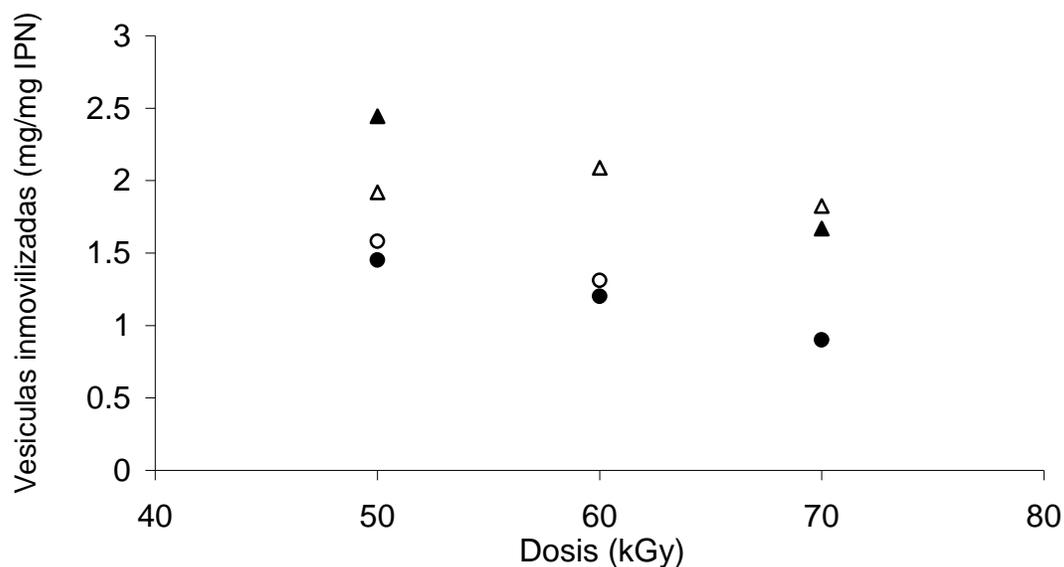


Figura 3.36 Inmovilización de las vesículas de fosfatidilcolina (POPC-IPN (Δ) sin y (\blacktriangle) con agente, Polilisina Mw:4000. IPN (\circ) sin y (\bullet) con agente, Polilisina Mw: 500-2000.

En cuanto se aumenta la dosis tanto para la polilisina de alto y bajo peso molecular se ve disminuida su capacidad de inmovilizar hasta llegar a una mínimo en las IPNs sintetizadas a dosis altas (70 kGy) y con agente entrecruzante, esto debido a las razones anteriormente explicadas. Además el comportamiento es el mismo tanto para el glicérido como para la colina.

CAPITULO 4. CONCLUSIONES

Se sintetizó y caracterizó una serie de redes interpenetrantes basadas en poli(N-isopropilacrilamida) y poli(N-acriloxisuccinimida) para desarrollar sistemas capaces de inmovilizar vesículas lipídicas (liposomas). Durante la síntesis de estas se variaron diferentes parámetros para probar como influyen en las propiedades del nuevo material sintetizado, llegando a las siguientes conclusiones:

- Se logró formar un nuevo sistema de redes interpenetrantes compuesto de PNIPAAm y PNAS que presenta:
 - ✓ Termorespuesta, determinada por hinchamiento y DSC
 - ✓ Capacidad de inmovilizar biomoléculas, determinado por UV.
- Como se esperaba, el sistema PNIPAAm/PNAS en forma de red interpenetrante presentó una mayor rapidez en su propiedad de termorespuesta a la encontrada en sistemas de copolímeros reticulados estudiados en trabajos anteriores. Además la capacidad de inmovilizar vesículas y sus propiedades mecánicas también se ven favorecidas por el arreglo interpenetrado de los polímeros.
- Se confirmó que existe una relación contundente entre el arreglo estructural de los polímeros y las propiedades que presentan.

El estudio detallado de este sistema, nos condujo a determinar los factores que afectan su síntesis y desempeño:

- Las condiciones de entrecruzamiento de la red I (PNIPAAm) son de vital importancia para la formación del sistema (tamaño de poro), pues conforme aumenta la densidad de entrecruzamiento, la formación de la IPN se ve desfavorecida debido a la falta de espacio que tiene el segundo polímero para difundirse y entrecruzarse dentro de ella.

- La inserción de la segunda red polimérica en el PNIPAAm, no afecta la propiedad de termorespuesta (30-32°C) a pesar de que se ha reportado que la introducción de una entidad hidrofóbica al sistema cambia dicha respuesta llegando incluso a desaparecerla.
- El tamaño del agente entrecruzante (polilisina) influye en la morfología de la IPNs pues a mayor peso molecular se dificulta su difusión dentro del PNIPAAm y le es más difícil entrecruzar al PNAS que se encuentra en el interior de dicho polímero, haciendo que el entrecruzamiento del PNAS sea incompleto.
- El peso molecular de la polilisina influye en las propiedades de inmovilización del sistema:
 - ✓ A bajas densidades de entrecruzamiento (dosis bajas y sin agente entrecruzante), la polilisina de alto peso molecular ($M_w=4000$) inmoviliza una mayor cantidad de vesículas que su homólogo sintetizado con polilisina de bajo peso molecular ($M_w=500-2000$).
 - ✓ Sin embargo, al aumentar la densidad de reticulación en la red ésta característica se revierte, mostrando una menor capacidad de inmovilización en las IPNs sintetizadas con la polilisina de alto peso molecular.
- Las IPNs presentan microfases compuestas por los polímeros que la constituyen ya que las micrografías muestran una separación de fase, lo cual es normal en éste tipo de sistemas. A pesar de esto, el sistema no presenta incompatibilidad pues la separación es parcial (sistema semi-compatible).
- Las propiedades mecánicas que mostraron las IPNs sintetizadas mejoraron con respecto a las presentadas por el hidrogel de PNIPAAm. Los hidrogeles presentan dificultades en su manejo llegando a romperse o despedazarse debido a su alto hinchamiento y a sus propiedades mecánicas pobres. Una vez formada la red interpenetrante, es posible manejar adecuadamente el material aunque se encuentre en un estado altamente hinchado.

- El tiempo para alcanzar el equilibrio en el proceso de hinchamiento disminuyó para el sistema sintetizado (IPN), comparándolo con el de los hidrogeles de PNIPAAm. Esto es debido a la nueva conformación morfológica proporcionada por el re-arreglo estructural que sufrieron las redes al formarse la red interpenetrante. Sin embargo, no se puede explicar porque el tiempo de equilibrio sigue esta tendencia, pues para ello se tendría que realizar un estudio sobre el mecanismo de hinchamiento de los hidrogeles y las IPNs y determinar las variables que afectan el proceso.
- Con los resultados obtenidos en este trabajo, podemos decir que las mejores condiciones para formar las IPNs son a partir de hidrogeles de PNIPAAm sintetizados sin utilizar agente entrecruzante (BIS) y a bajas dosis de radiación (50 kGy).

La capacidad de inmovilizar biomoléculas se caracterizó por UV y los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Las vesículas del fosfolípido aniónico (POPG) presentan mayor afinidad con el sistema sintetizado debido a que la inmovilización se lleva a cabo por interacciones iónicas. Dado que los sitios de anclaje (lugar donde se lleva a cabo la inmovilización) son los grupos amina de la polilisina, es de esperarse que los lípidos con cargas contrarias sean inmovilizados en mayor cantidad que otro tipo de lípidos.

Aunque el trabajo fue completado en su totalidad, existen algunos factores que podrían ser explorados en trabajos posteriores para tener una visión más clara del alcance de este tipo de investigaciones. Por tanto se proponen algunos puntos que podrían ser refinados:

- Buscar mejores formas de caracterizar los liposomas para evitar suposiciones en cuanto a tamaño y tipo de vesículas obtenidas.

- Realizar pruebas de carga y liberación de medicamentos en este sistema que incluya los tiempos de liberación y estabilidad de los liposomas una vez que están en contacto con fluidos biológicos.

- Realizar más pruebas de inmovilización con diferentes biomoléculas para conocer si la red interpenetrante de PNIPAAm/ PNAS puede tener otras aplicaciones.

REFERENCIAS

1. Woods, Robert J., Pikaev Alexei K. Applied Radiation Chemistry: Radiation Processing. John Wiley & Sons Inc., New York, 1994.
2. Aburto Linares Susana (2003). Tesis de Licenciatura. Injerto por Radiación de Cloruro de Acriloilo en Policarbonato (CR-39), Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
3. Odian G. Principles of Polimerization. 3^{ra} edition, John Wiley & Sons Inc., U.S.A., 1991.
4. Navarrete Manuel y Cabrera Luis. Introducción al Estudio de los Radioisotopos. 2^{da} edición, UNAM, México, 1993.
5. Wilson Joseph E. Radiation Chemistry of Monomers, Polymers and Plastics. Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 1974.
6. Charlesby A. Atomic Radiation and Polymers. Pergamon Press, Oxford, 1960.
7. Shirodkar D., and Burford Robert (2001). Interpenetrating Polymer Networks Based on a Thermoplastic Elastomer Using Radiation Techniques. Radiation Physics and Chemistry, Vol. 62, 99-105.
8. Noriyasu, Masaru, Hideki, Hitoshi and Ryoichi (1993). Synthesis of Poly(N-isopropylacrylamide) Hydrogels by Radiation Polymerization and Cross-Linking. Macromolecules, Vol. 26, 7386- 7388.
9. Clegg D.W. and Collyer A.A. Irradiation Effects on Polymers. Elsevier Science Inc., England, 1991

10. Kim, S. C., Sperling L.H. IPNs Around the World Science and Engineering. John Wiley & Sons Ltd., England, 1997.
11. Stepto R.F.T. Polymer Networks Principles, of their Formations, Structure and Properties. Blackie Academic & Professional, London UK, 1998.
12. Rogel Hernández Eduardo, Licea Claverie Ángel, Cornejo Bravo, José Manuel y Friedrich Arndt, Karl (2003). Preparación de hidrogeles anfifílicos sensibles a diferentes valores de PH utilizando monómeros ácidos con espaciadores hidrofóbicos. Revista de la Sociedad Química de México, Vol. 47, Num. 3, 251-257.
13. Hoffman Allan S., (1995). Intelligent Polymers in Medicine and Biotechnology. Macromol. Symp., Vol. 68, 645-664.
14. Arroyo Miguel (1998). Immobilized Enzymes: Theory, Methods of Study and Applications. Ars Pharmaceutica, Vol. 39, 23-39.
15. Percot, A., Lafleur, M. y Zhu X.X. (2000). New Hydrogels Based on N-isopropylacrylamide Copolymers Crosslinked with Polylysine: Membrane Immobilization Systems. Polymer, Vol. 41, 7231-7239.
16. Hoffman S. Allan (2000). Bioconjugates of Intelligent polymers and Recognition Proteins for Use in Diagnostics and Affinity Separations. Clinical Chemistry, Vol. 46, 1478-1486.
17. Greg T. Hermanson. Bioconjugate Techniques. Academic Press, United Kingdom, London, 1996.
18. Hoffman Allan S. (2002). Hydrogels for Biomedical Applications. Advanced Drug Delivery Reviews. Vol. 43, 3-12.

19. Ferruti P., Bettelli A. and Angelino Feré (1972). High Polymers of Acrylic and Methacrylic esters of N-hydroxysuccinimide as Polyacrylamide and polymethacrylamide precursors. *Polymer*, Vol. 13, 462-464.
20. Pollak A., Blumenfeld H., Wax M., Baughn R.L. and Whitesides G.W. (1980). Enzyme Immobilization by Condensation Copolymerization into Cross-Linked Polyacrylamide Gels. *Journal of American Chemical Society*, Vol. 102, 6324-6336.
21. De-Yu G., Yoshida M., Asano M., Fukuzaki H. and Kaetsu I. (1988). Radiation Induced Polymerization of Acrylic and Methacrylic Esters of N-hydroxysuccinimide. *Journal of European Polymer*, Vol. 24, 1037-1040.
22. Yang J. Heung, Cole Carole-Ann, Nobuo Monji and Hoffman Allan (1990). Preparation of thermally Phase Separating Copolymer, poly(N-isopropylacrylamide-co-N-Acryloxysuccinimide), with Controlled Number of Active Esters per Polymer Chain. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, Vol. 28, 219-226.
23. Otake Katsuto, Inomata Hiroshi, Konno Mikio, and Saito S. (1990). Thermal Analysis of the Volume Phase Transition with N-isopropylacrylamide Gels. *Macromolecules*, Vol. 23, 283-289.
24. *Macromol. Biosci.* 200017 322-328.
25. Zhang Xian-Zheng, Yang Yi-Yan, Tai-Shung Chung and Kui-Xiang Ma (2001). Preparation of Characterization of Fast Response Macroporous Poly(N-isopropylacrylamide) Hydrogels. *Langmuir*, Vol. 17, 6094-6099.
26. Eun Seo Gil and Hudson Samuel M. (2004). Stimuli-reponsive Polymers and Their Bioconjugates. *Progress in Polymer Science*. Vol. 29, 1173-1222.

27. Kopecek Jindrich (2003). Smart and Genetically Engineered Biomaterials and Drug Delivery Systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 20, 1-16.
28. Noriyasu N., Masura Y., Masaharu A., Takeshi S., Hitoshi K. and Ryoichi K. (1997). Simultaneously Occurring Process Of Radiation-Induced Polymerization, Crosslinking and Degradation of N-isopropylacrylamide. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, Vol. 35, 3075-3077.
29. Reginald H. Garrett and Charles M. Grisham. *Biochemistry*. Saunders College Publishing, 1995.
30. Christopher K. Mathews and K.E. van Holde. *Biochemistry*. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., USA. 1990
31. Severion Dumitriu. *Polymeric Biomaterials*, 2^{da} edition Marcel Dekker Inc., New York, USA, 2002.
32. Matandu M. F., Umakoshi H., Shimanuoshi T., Yoshimoto M. and Kuboi R. (2002). Characterization and Control of Stimuli-induced Membrane Fusion of Liposomes in the Presence of Proteins and Stimuli Responsive Polymers. *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 12, 7-19.
33. Craver Clara D., Provder Theodore. *Polymer properties, spectroscopic and chromatographic methods*. American Chemical Society, Washington D.C., 1990.
34. Gregoriou V. G. (2000). *Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Polymer*. Applied Polymer Science. Elsevier Science, 709.
35. Koenig L. Jack. *Spectroscopy of Polymers*. 2^{da} edición, Elsevier Science Inc., Netherlands, 1999.

36. Kim Seon Jeong, Lee Ki Jung, Kim In Young, An Kay Hyeok, and Kim Sun I. (2003). Preparation and Characteristics of Poly(propylene glycol) and Poly(acrylic acid) Interpenetrating Network Hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science*. Vol. 90, 1384-1388.
37. Zhang X., Wu D., and Chu C. (2004). Synthesis, Characterization and Controlled Drug Release of Thermosensitive IPN-PNIPAAm Hydrogels. *Biomaterials*, Vol. 25, 3793-3805.
38. Hong Chen and you-lo Hsieh (2001). Temperature and PH Sensitive IPN Hydrogels. *Polymer Preprints*, Vol. 42, 558-559.
39. Shen Sue, Hoffman Allan S., and Yager Paul (1992). Synthesis and Characterization of Thermally Reversible Macroporous Poly(N-isopropylacrylamide) Hydrogels. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, Vol.30, 2121-2129.
40. Minghong Wu, Bao Borong, Chen Ji, Xu Yinjuan, Zhou Shiru, and Ma Zue-the (1999). Preparation of thermosensitive hydrogels (PP-g-NIPAAm) with on-off Switching for Controlled Release of Drugs. *Radiation Physics and Chemistry*, Vol. 56, 341-346.
41. Panda Anjali, Manohar S.B., Sabharbal S., Bhardwaj Y.K., and Majali A.B. (2000). Synthesis and Swelling Characteristics of poly(N-Isoprpylacrylamide) Temperature Sensitive Hydrogels Crosslinked by Electron Beam Irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, Vol. 58, 101-110.
42. X. Zhang, R. Zhuo, Y. Yang (2002). Using Solvent to Synthesize Temperature Sensitive Poly(N-isopropylacrylamide) gel with Rapid Dynamics Properties. *Biomaterials*, Vo. 23, 1313-1318.

43. Marsano E., Bianchi E., and Viscardi A. (2004). Stimuli Responsive Gels Based on Interpenetrating Networks of Hydroxypropylcellulose and Poly(N-isopropylacrylamide). *Polymer*, Vol. 45, 157-163.
44. Zhang Kai, and Wu X. (2004). Temperature and pH-Responsive Polymeric Composite Membranes for Controlled Delivery of Proteins and Peptides. *Biomaterials*, Vol. 25, 5281-5291.
45. Zhang Xian-Zheng, Yang Yi-Yan and Tai-Shung Chung (2002). Effect of Mixed Solvents on Characteristics of Poly(N-isopropylacrylamide) Gels. *Langmuir*, Vol. 18, 2538-2542.
46. Kobra BG, Gehrke S.H. (1991) Synthesis of Fast Response Temperature Sensitive Poly(N-Isopropylacrylamide) gel. *Polym. Commun.*, Vol. 32, 322-323.
47. Zhang Xian-Zhen, Chu Chih-Chang (2003). Synthesis and Properties of the Semi-Interpenetrating Polymer Network-Like, Thermosensitive Poly(N-isopropylacrylamide) Hydrogel. *Journal of Applied Polymer Science*. Vol. 89, 1935-1941.
48. <http://www.avantilipids.com>
49. Kim Seon Jeong, Lee Chang Kee, Lee Young Moo, and Kim Sun I. (2003). Preparation and Characterization of Thermosensitive Poly(N-isopropylacrylamide)/Poly(ethylene oxide) Semi-Interpenetrating Polymer Networks. *Journal of Applied Polymer Science*. Vol. 90, 3032-3036.
50. Kim Dukjoon and Park Kinam (2004). Swelling and Mechanical Properties of Superporous Hydrogels of Poly(acrilamide-co-acrylic acid)/ Polyethylenimine Interpenetrating Polymer Networks. *Polymer*, Vol. 45, 189-196.

51. Kuckling Dirk and Wohlrab Sebastian (2002). Synthesis and Characterization of Biresponsive Graft Copolymer Gels. *Polymer*, Vol. 43, 1533-1536.
52. Scarpa Joannis S., Mueller Delbert D. and Klotz Irving M. (1967). Slow Hydrogen-Deuterium Exchange in a Non- α -Helical Polyamide. *Journal of American Chemical Society*, Vol. 24, 6024-6030.
53. Hiroshi Inomata, Shuichi Goto and Shozaburo Saito (1990). Phase Transition of N-Substituted Acrylamide Gels. *Macromolecules*, Vol, 23, 4887-4888.
54. Guangzhao Zhang and Chi Wu (2001). Reentrant Coil-to-Globule-to-Coil Transition of a Single Linear Homopolymer Chain in Water/ Methanol Mixture. *Physical Review Letters*, Vol. 86, 822-825.
55. Fujishige Shoei (1987). Intrinsic Viscosity-Molecular Weight Relationships for poly(N-isopropylacrylamide) Solutions. *Polymer Journal*, Vol. 19, No. 3, 297-300.
56. Boutris C., Chatzi E.G. and Kiparissides C. (1997). Characterization of the LCST Behaviour of Aqueous Poly(N-isopropylacrylamide) Solutions by Thermal and Cloud Point Techniques. *Polymer*, Vol. 38, no. 10, 2567-2570.
57. Guillerme M.R., Silva R., Rubira A.F., Geuskens G. and Muniz E.C. (2004). Thermo-sensitive Hydrogels Membranes from PAAm Networks and Entangled PNIPAAm: Effect of Temperature, Cross-Linking and PNIPAAm Contents on the Water Uptake and Permeability. *Reactive and Functional Polymers*, Vol. 61, 233-243.
58. Schild H.G. (1992). Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. *Progress in Polymer Science*, Vol. 17, 163-249