



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

**INMOVILIZACIÓN DE INVERTASA EN INJERTOS BINARIOS DE
N-ISOPROPILACRILAMIDA Y ÁCIDO ACRÍLICO EN POLITETRAFLUOROETILENO**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. A. LUIS GERARDO SÁNCHEZ PACHECO



TUTOR: Dra. S. GUILLERMINA BURILLO AMEZCUA

AÑO: 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de continuar mi formación académica.

Al Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM, por el apoyo para la realización de este trabajo.

A la Dra. Guillermina Burillo por compartir sus conocimientos; por abrirme las puertas de un espacio amable y cálido en su grupo de investigación; por su apoyo y confianza; pero sobre todo, por ser uno de los mejores y más cálidos seres humanos que he conocido.

A los miembros del jurado por sus amables comentarios y sugerencias.

Al proyecto DGAPA IN-200306 por los fondos para la realización del mismo.

Al CONACyT por la beca otorgada durante la realización de los estudios de maestría.

Al Dr. Emilio Bucio por sus comentarios y apoyo técnico.

Al Físico Francisco García por su apoyo técnico en la irradiación de las películas.

Al Sr. Salvador Ham Por su apoyo técnico.

Al Sr. Martín Cruz Villafañe del departamento de cómputo del ICN por su amable apoyo.

Dedico este trabajo a una mujer extraordinaria:
A Consuelo Pacheco.

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Macromoléculas perteneciente al Instituto de Ciencias Nucleares de la Universidad Nacional Autónoma de México y fue presentado en la 8th Internacional Conference on Frontiers of Polymers and Advanced Materials. Abril 22-27, 2005. Cancún, Quintana Roo, México.

ÍNDICE

	página
1.0 Objetivos	1
2.0 Introducción	2
3.0 Generalidades	3
3.1 Polímeros	3
3.2 Procesos de polimerización	5
3.2.1 Mecanismos de polimerización	5
3.2.2 Polimerización por adición	6
3.2.3 Polimerización por condensación	6
3.2.4 Polimerización en suspensión, emulsión y masa	7
3.3 Polímeros de bloque e injertos	8
3.4 Polímeros inteligentes	9
3.4.1 Polímeros termo sensitivos	11
3.4.2 Polímeros con respuesta al pH	12
3.4.3 Polímeros estímulo sensibles	12
3.5 Interacción radiación materia	13
3.6 Radiación de polímeros	20
3.7 Politetrafluoroetileno	25
3.8 Enzimas	29
3.9 Soportes poliméricos para propósitos biomédicos y biotecnológicos	32
3.10 Métodos químicos para inmovilizar covalentemente enzimas	36
3.11 Inversión de sacarosa	39
3.12 Técnicas de caracterización	40
4.0 Desarrollo experimental	43
4.1 Materiales	43
4.2 Métodos	44
4.2.1 Preirradiación oxidativa	44
4.2.3 Injerto sobre PTFE preirradiado	44
4.2.4 Injerto de ácido acrílico y N-isopropilacrilamida en PTFE pre-irradiado, efecto de relación de monómeros sobre el % de injerto	46
4.2.5. Medidas de hinchamiento	47
4.2.6. Activación de grupos –COOH para inmovilizar biomoléculas	47
4.2.7. Inmovilización de proteínas (albúmina y enzima)	48
4.2.8. Determinación cuantitativa de la proteína o enzima inmovilizada	48
4.2.9. Determinación de actividad enzimática de invertasa	49
4.2.10. Determinación de la temperatura óptima de invertasa inmovilizada	49
4.2.11 Determinación de la actividad relativa en función de pH	50
5.0 Resultados y discusión	51
5.1 Preirradiación oxidativa de PTFE	51
5.2 Efecto de irradiación gamma en las propiedades mecánicas de PTFE	52
5.3 Injertos sobre PTFE preirradiado	53
5.3.1 Injerto de ácido acrílico en PTFE pre-irradiado	53
5.3.2 Injertos binarios de ácido acrílico/N-isopropilacrilamida en PTFE	55
5.4 Hinchamiento de películas de PTFE injertadas	56
5.5 Efecto de la proporción de monómeros en el % de injerto de NiPAAm/Aac en películas de PTFE.	58
5.6 Activación de grupos –COOH.	59
5.7 Efecto del porcentaje de injerto sobre la cantidad de proteína inmovilizada	61
5.8 Efecto del pH en la enzima inmovilizada	64
5.9 Efecto del % de injerto en la cantidad de enzima inmovilizada	65
6.0 Conclusiones	66
7.0 Bibliografía	68

CAPÍTULO 1

Objetivo General

La obtención de un injerto binario de AAc/NIPAAm en PTFE mediante radiación ionizante y la inmovilización de biocompuestos en este sistema

Objetivos particulares

- Injertar AAc/NIPAAm en PTFE activado por un método de preirradiación oxidativa
- Inmovilizar albúmina de huevo como proteína modelo en las películas de PTFE modificadas con AAc y NIPAAm
- Inmovilizar invertasa de levadura (*Saccaromices cereviseae*) en las películas injertadas
- Caracterizar a la enzima inmovilizada (estabilidad térmica, pH óptimo, actividad relativa)

CAPÍTULO 2

Introducción

El empleo de biomoléculas en varios campos científicos y tecnológicos para el desarrollo de biosensores, análisis químico y clínico, catálisis enzimática, etc., es un campo de interés creciente; así como el empleo de polímeros inteligentes, los cuales responden de manera abrupta a pequeños estímulos, o cambios, en el medio ambiente, tales como concentración de iones, pH, temperatura, campos magnéticos, etc.

El injerto de monómeros en cadenas poliméricas da como resultado nuevos materiales con características que combinan propiedades de los monómeros injertados con las de las cadenas originales. Hecho que permite el desarrollo de una gran variedad de materiales poliméricos capaces de ser empleados como soportes de biomoléculas.

Las enzimas son biomoléculas capaces de catalizar reacciones químicas en condiciones relativamente suaves de presión y temperatura, es esta quizá la característica más atractiva que presentan, entre otras puede mencionarse su elevada selectividad al sustrato. Sin embargo al ser solubles en agua no permiten una catálisis heterogénea y generalmente se pierden en cada lote empleado. Existe la posibilidad de inmovilizar a las enzimas a través de los grupos reactivos residuales de la cadena polipeptídica, como $-NH_2$ de los residuos de lisina.

Este trabajo presenta los resultados de la inmovilización de albúmina de huevo e invertasa de levadura en injertos binarios de ácido acrílico (AAc) y N-isopropilacrilamida (NIPAAm) en politetrafluoroetileno (PTFE); la caracterización del injerto; las cantidades de proteína inmovilizada; y algunas de las características de la enzima inmovilizada.

CAPÍTULO 3

Generalidades

3.1. Polímeros

La palabra polímero se deriva de las palabras en griego clásico poly, que significa muchos y meros que significa partes. De manera simplificada un polímero es una cadena molecular compuesta por un gran número de unidades de repetición de idéntica estructura (Fried, 2003). Si el polímero es rigurosamente uniforme en peso y estructura molecular, su grado de polimerización es indicado por un numeral griego, de acuerdo con el número de unidades de monómero que contiene; así, hablamos de dímeros, trímeros, tetrámero, pentámero y sucesivos. El término polímero designa una combinación de un número no especificado de unidades.

Un polímero no consta, necesariamente, de moléculas individuales todas del mismo peso molecular, y no es necesario que tengan todas, la misma composición química y estructura molecular. La gran mayoría de los polímeros sintéticos y naturales importantes son mezclas de componentes poliméricos homólogos. La pequeña variabilidad en la composición química y en la estructura molecular es el resultado de la presencia de grupos finales, ramas ocasionales, variaciones en la orientación de unidades monoméricas y la irregularidad en el orden en el que se suceden los diferentes tipos de esas unidades en éstos.

La materia esta formada por moléculas que pueden ser de una gran diversidad de tamaños, ya sea de un pequeño número de Daltones o de masas de varios miles de éstos. Los polímeros se producen por la unión de cientos de miles de moléculas pequeñas denominadas monómeros que forman enormes cadenas de las formas más diversas. Las diferentes conformaciones espaciales que adquiere un polímero, dependen estrictamente de las interacciones que puedan establecer consigo mismas y el medio en el cual se generan, o se encuentran. Algunas moléculas poliméricas forman fibras, otras tienen ramificaciones, algunas más generan estructuras helicoidales o grandes cuerpos globulares, así como redes tridimensionales.

Existen polímeros naturales como el algodón, formado por fibras de celulosas. La celulosa es un homopolímero de glucosa ampliamente distribuido en los sistemas vegetales, teniendo una gran aplicación en materiales diversos tales como telas y papel. La seda y la lana son otros ejemplos de polímeros naturales, pero a diferencia de la celulosa, son heteropolímeros formados por aminoácidos. El hule de los árboles de hevea y de los arbustos de Guayule, son también polímeros naturales importantes, con unidades monoméricas isoprenóides.

Sin embargo, una gran cantidad de los polímeros que se emplean en procesos industriales y cotidianos son materiales sintéticos con propiedades y aplicaciones variadas. Lo que distingue a los polímeros de los materiales de bajo peso molecular son, principalmente, sus propiedades mecánicas. En general, los polímeros tienen una excelente resistencia mecánica debido a que

las grandes cadenas poliméricas se atraen. Las fuerzas de atracción intermoleculares dependen de la composición química del polímero y pueden ser de varias clases. Las más comunes son los puentes de hidrógeno, en los casos en que pueden establecerse y más comúnmente las fuerzas de Van der Waals.

El consumo de polímeros sintéticos ha aumentado en los últimos años. Estos productos derivados de la petroquímica han sustituido parcial, y a veces totalmente, a muchos materiales naturales como la madera, el algodón, el papel, la lana, la piel, el acero y el cemento. Los factores que han favorecido el mercado de los plásticos son los precios competitivos, y a veces inferiores, a los de los productos naturales, y el hecho de que el petróleo ofrece una mayor disponibilidad de materiales sintéticos que otras fuentes naturales.

3.2. Procesos de polimerización

Existen diversos procesos para que se generen las uniones químicas de las unidades monoméricas unas con otras para formar macromoléculas. Su clasificación se basa en el mecanismo por el cual se unen tales estructuras o en las condiciones experimentales de reacción.

3.2.1. Mecanismos de polimerización. La polimerización puede efectuarse por distintos métodos:

3.2.2. Polimerización por adición

- La adición de moléculas de monómero, del mismo tipo por apertura del doble enlace sin eliminación de ninguna parte de la molécula (polimerización de tipo vinilo.).
- Adición de pequeñas moléculas de un mismo tipo unas a otras por apertura de un anillo sin eliminación de ninguna parte de la molécula (polimerización tipo epóxi.).
- Adición de pequeñas moléculas de un mismo tipo unas a otras por apertura de un doble enlace con eliminación de una parte de la molécula (polimerización alifática del tipo diazo).
- Adición de pequeñas moléculas unas a otras por ruptura del anillo con eliminación de una parte de la molécula (polimerización del tipo α -aminocarboxianhidro.).
- Adición de birradicales formados por deshidrogenación (polimerización tipo p-xileno.).

3.2.3. Polimerización por condensación.

- Formación de poliésteres, poliamidas, poliéteres, polianhidros, etc., por eliminación de agua o alcoholes, con moléculas bifuncionales, como ácidos o glicoles, diaminas, diésteres entre otros (polimerización del tipo poliésteres y poliamidas.).
- Formación de polihidrocarburos, por eliminación de halógenos o haluros de hidrógeno, con ayuda de catalizadores metálicos o de haluros metálicos (policondensación del tipo de Friedel-Crafts y Ullmann.).

- Formación de polisulfuros por eliminación de cloruro de sodio, con haluros bifuncionales de alquilo, o arilo y sulfuros alcalinos o polisulfuros alcalinos o por oxidación de dimercaptanos (policondensación del tipo Thiokol.).

3.2.4. Polimerización en suspensión, emulsión y masa.

- a. Polimerización en suspensión. En este caso el activador de la reacción (por ejemplo un peróxido), es soluble en el monómero. La polimerización se realiza en agua, y como tanto el monómero como el polímero que participan en ella son insolubles en agua, se obtiene una suspensión. Para evitar que el polímero se aglomere en el reactor, se adicionan a la disolución pequeñas cantidades de alcohol polivinílico, el cual cubre la superficie de las gotitas del polímero y evita que se peguen.

- b. Polimerización en emulsión. La reacción se realiza también en agua, con peróxidos solubles en ésta, pero en lugar de agregarle un agente de suspensión como el alcohol polivinílico, se añade un emulsificante, que puede ser un detergente o un jabón. En esas condiciones el monómero se emulsifica, es decir, forma gotitas de unas cuantas micras. Estas microgotitas quedan estabilizadas por el jabón durante todo el proceso de la polimerización, y acaban formando un producto de aspecto lechoso, del cual se hace precipitar el polímero rompiendo la emulsión. Posteriormente se lava,

quedando siempre restos de jabón, lo que le imprime características especiales de adsorción de aditivos.

- c. Polimerización en masa. En este tipo de reacción, los únicos ingredientes son el monómero y el peróxido. El polímero que se obtiene es muy semejante al de suspensión, pero es más puro que éste, y tiene algunas ventajas en la adsorción de aditivos porque no está contaminado con alcohol polivinílico.

3.3. Polímeros de Bloque e Injertos

Se han desarrollado métodos interesantes para la síntesis de copolímeros de bloque e injertos. Estos métodos han encontrado aplicación práctica en la preparación de poliestireno de alta resistencia al impacto, de los cauchos de elevada resistencia a la abrasión y de fibras acrílicas, entre otros.

Un principio de la copolimerización por injerto consiste en polimerizar un monómero, el monómero-B, en presencia de un polímero, el poli-A, de manera tal que los centros iniciadores de las reacciones de la segunda polimerización estén situados todos en el polímero original.

Una forma particularmente efectiva de conseguir este resultado es someter el poli-A a la degradación mecánica en presencia del mono-B. Si las cadenas del polímero se rompen por la acción mecánica, se forman dos radicales libres en el punto de ruptura de la cadena. Estos dos radicales pueden utilizarse si se evita que se recombinen o

desproporcionen uno con el otro o que sean consumidos por alguna otra impureza reactiva, como el oxígeno y en presencia de un monómero vinílico. Muchos tipos de agitación mecánica, particularmente el prensado en calandria, la molienda, la compresión en estado plástico y la agitación con sacudimiento en solución, conducen a la unión química del segundo monómero y el primer polímero. Para que la degradación mecánica sea efectiva, conviene que el poli-A tenga un peso molecular relativamente alto. Se han hecho grandes progresos en el injerto del estireno, ésteres acrílicos, acrilonitrilo al caucho y a muchos elastómeros sintéticos; los monómeros vinílicos también se han injertado a la celulosa y derivados de esta; poliésteres, poliamidas, poliéteres y proteínas. Los productos resultantes combinan en forma muy interesante las propiedades de los dos compuestos.

Los trabajos sobre obtención de injertos por medio de radiación han progresado considerablemente, sobre todo mediante el empleo de mejores fuentes de radiación (aparato de Van der Graff, aceleradores lineales, fuentes de ^{60}Co y de ^{137}Cs) y por el descubrimiento de que la luz ultravioleta es capaz también de producir enlaces transversales e injertos en presencia de sensibilizadores. En muchos casos se ha reducido substancialmente la degradación indeseable del poli-A producida por la acción de la radiación ionizante, mediante la aplicación de estabilizadores del tipo amina aromática, disulfuro aromático o bien mediante el empleo de dosis bajas de radiación.

3.4. Polímeros inteligentes (Gil et al., 2004; Hoffman, 2000)

Polímeros como proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos están presentes como componentes básicos en los sistemas orgánicos vivos. Polímeros sintéticos, diseñados para mimetizar estos biopolímeros, han sido ampliamente desarrollados en un campo muy activo debido a su valor científico e industrial.

Las propiedades que presentan los biopolímeros en los organismos vivos están basadas en las interacciones cooperativas que se generan por pequeños cambios ambientales. Tales interacciones microscópicas pueden generar fuerzas directrices significativas en nivel macromolecular.

Los biocompuestos son materiales que involucran compuestos biológicamente activos tales como enzimas, anticuerpos, hormonas y diversas proteínas; se han preparado por conjugación aleatoria de un polímero con grupos amino de la superficie de las proteínas de interés, o bien por conjugación específica de polímero con grupos funcionales de las proteínas -tiol, hidroxilo, etc.- seleccionados por medio de ingeniería genética.

Los polímeros inteligentes se definen como polímeros que exhiben cambios

físicos o químicos relativamente grandes, y de manera abrupta, en respuesta a cambios pequeños que ocurren en las condiciones del medio.

Los estímulos a los cuales responden estos sistemas inteligentes pueden ser muy variados y clasificados como físicos y químicos. De entre los estímulos químicos pueden citarse al pH, factores iónicos, agentes químicos, los cuales pueden cambiar la interacción molecular entre las cadenas poliméricas, o entre las cadenas y el disolvente. Los estímulos físicos como temperatura, campos eléctricos, magnéticos, y estrés mecánico pueden afectar el nivel de varias fuentes de energía al alterar las interacciones en puntos críticos disparadores.

Las respuestas de los sistemas poliméricos a estos estímulos han sido ampliamente utilizadas en aplicaciones bio-relacionadas, como liberación controlada de fármacos, biotecnología y cromatografía. Se han desarrollado sistemas capaces de responder a dos o más estímulos en el mismo polímero, como en el caso de sistemas sensibles a la temperatura y pH.

3.4.1 Polímeros termo sensitivos (Gil et al., 2004)

Dentro de los polímeros que exhiben respuesta a la temperatura, las poli(N-acrilamidas) sustituidas son representativas de este grupo. Presentan una temperatura mínima crítica de solución (lower critical solution temperature, LCST por sus siglas en inglés), es decir que exhiben una transición de fase de una forma soluble a otra insoluble en agua alrededor de un valor estrecho de temperatura. El polímero

poli (N-isopropilacrilamida) es el más popular de los polímeros termo-responsivos y su LCST está alrededor de 32°C. El comportamiento de este sistema ha sido ampliamente estudiado, no sólo para elucidar el mecanismo de acción sino para desarrollar aplicaciones tecnológicas específicas.

La temperatura es el estímulo más ampliamente utilizado en sistemas sensibles al medio. El cambio de temperatura no sólo es relativamente fácil de controlar sino que puede emplearse exitosamente en sistemas *in vivo* e *in vitro*.

3.4.2 Polímeros con respuesta al pH

Una conformación en respuesta al pH, con cambios en la solubilidad es un comportamiento común en los biopolímeros. Los polímeros pH-sensitivos están constituidos de cadenas capaces de aceptar y donar protones en respuesta a cambios ambientales de pH. Los polímeros que contienen grupos ionizables en sus cadenas carbonadas son polielectrolitos en medios acuosos y se caracterizan por su rápido cambio en el estado de ionización cuando se alcanza su pKa. Existen poliácidos y polibases (Gil et al, 2004). Se han estudiado sistemas de polímeros inteligentes con más de una respuesta a un tipo de estímulo. Esta combinación de copolímeros puede manifestar propiedades muy interesantes con muchos nuevos campos de aplicación (Hoffman, 1995)

3.4.3 Polímeros estímulo sensibles

El injerto de sistemas de copolímeros es muy usual para obtener polímeros con varias funcionalidades, porque podemos esperar funciones de la cadena soporte y de las cadenas injertadas (Takeuchi, et al, 1993). Los polímeros inteligentes pueden ser químicamente injertados o físicamente adsorbidos en soportes poliméricos sólidos, entonces pueden apreciarse cambios en la superficie del soporte, tales como espesor, hinchamiento o carga superficial en respuesta a pequeños estímulos como temperatura de solución, pH o concentración específica de iones. Estas respuestas pueden ser mucho más rápidas que en los sistemas sólidos o hidrogeles debido a que las coberturas, o los injertos, de las superficies pueden ser muy finas. (Hoffman, 1995)

3.5 Interacción radiación materia

El término radiación de alta energía se aplica indistintamente a partículas que se mueven con alta velocidad –electrones, partículas β , protones, neutrones y partículas α , aceleradas- y a radiación electromagnética de longitud de onda corta -rayos x y rayos γ -. Los procesos mediante los cuales estas diferentes formas de radiación reaccionan con los átomos del espécimen cuando pasan a través del el, son muy diferentes.

En su paso a través de la materia, todas estas formas de radiación pierden energía al interactuar con los electrones y núcleos del medio, dando lugar a desplazamiento de núcleos, liberación de electrones, ionización de átomos o moléculas, y a moléculas o átomos excitados, cuando un electrón es desplazado a un nivel

energético superior. Sólo ocurren cambios en la estructura nuclear cuando las partículas energéticas, o fotones, tienen energía suficiente, pero estos cambios no tienen importancia para los fines de este trabajo.

Desde el punto de vista químico, las diferencias más importantes entre las diferentes formas de radiación de alta energía dependen de la relación de energía perdida por unidad de distancia recorrida, lo cual determina la penetración del haz incidente así como la densidad y distribución de iones o moléculas excitadas relacionadas con cada partícula incidente. El parámetro cuantitativo para la evaluación de la capacidad de un medio para hacer perder energía al haz incidente se denomina transferencia lineal de energía (linear energy transfer, LET, por sus siglas en inglés), L_{Δ} :

$$L_{\Delta} = \frac{dE_{LET}}{dl}$$

Donde dE_{LET} es la energía transferida a la sustancia por la partícula cargada a lo largo de la ruta dl .

La LET depende de la naturaleza del material y de la energía de la partícula. La unidad en el Sistema Internacional para la LET es joule por metro ($1\text{keV}/\mu\text{m}=0.16\text{nJ}/\text{m}$).

La interacción de la radiación de alta energía con la materia procede a través de tres procesos principales- la reacción con el núcleo: produciendo nuevos arreglos nucleares o estructuras; el desplazamiento de núcleos: dando lugar a un nuevo arreglo

atómico o molecular; y la interacción con los electrones de los orbitales. Estos procesos no involucran un cambio en la estructura nuclear, y cualquier rearrreglo ocurre indirectamente debido a diferencias electrónicas. El primer proceso no es de incumbencia del objeto de estudio de la Química de radicales, disciplina que, únicamente, está relacionada con la tercera de estas interacciones básicas. No obstante, muchos de dichos cambios, de hecho aquellos que le dan origen, (absorción energética y repartición, así como la ionización y excitación), son usualmente considerados como de interés primordial a los físicos que estudian las relaciones entre las propiedades físicas -mecánicas, eléctricas y ópticas- y cómo se ven influidas por la exposición a radiación de alta energía.

La interacción de la radiación de alta energía y la materia, puede generar efectos importantes sobre las nubes electrónicas de los átomos y moléculas del medio, generando iones positivos al arrancar electrones de los orbitales atómicos o moleculares, o bien especies excitadas, en las cuales se promueve un electrón a estados energéticos superiores. El retorno a niveles energéticos basales tendrá como consecuencia la emisión de energía por parte del electrón.

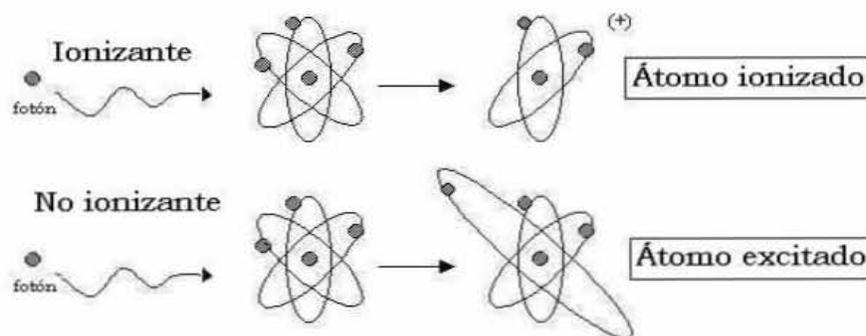


Figura 3.5.1. Efecto de radiación electromagnética con un átomo

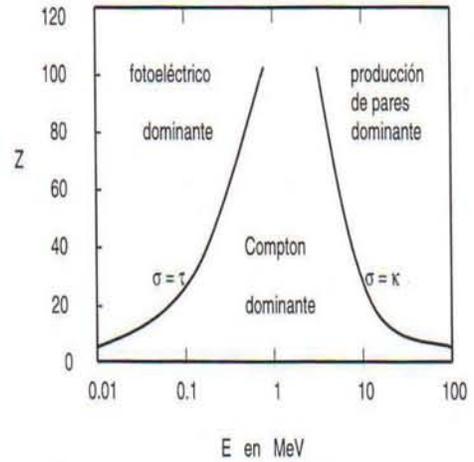
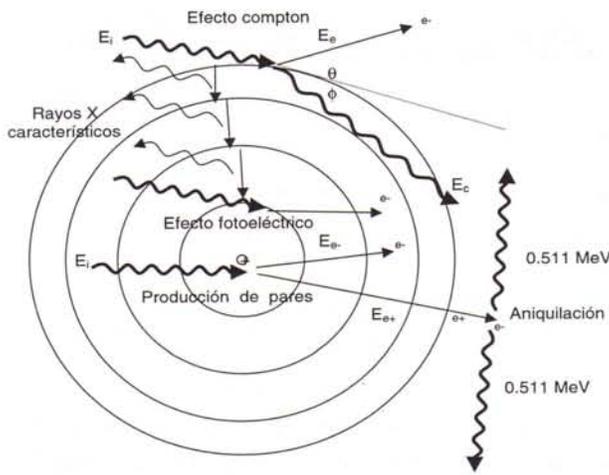


Figura 3.5.2. Izq. Principales efectos de la radiación sobre la materia. Der. Efectos que se observan en función de la energía y el número atómico

Efecto fotoeléctrico. Ocurre cuando un fotón transfiere toda su energía a un electrón atómico de una capa interna. Si la energía suministrada es superior a la energía de ligadura del electrón al átomo, aquél es expulsado. Si el lugar vacante es ocupado por un electrón externo, se puede liberar la energía sobrante en forma de un rayo X (fenómeno de fluorescencia) o expulsando un electrón periférico (efecto Auger).

Efecto Compton. Ocurre cuando el fotón incidente, cede parte de su energía a un electrón periférico. El resultado es un fotón de menor energía y un electrón desviado de su órbita.

Creación de pares: Consiste en la transformación de un rayo γ con energía superior a 1.02 MeV, en un par electrón-positrón, por la

interacción del fotón con el campo magnético del núcleo. Para que se produzca debe haber un núcleo o electrón cerca, para que se cumplan los principios de conservación de la energía y el impulso.

Fuentes de radiación (Ivanov, 1992)

De acuerdo con su origen, las fuentes de radiación, pueden clasificarse dentro del siguiente esquema

Se puede observar claramente que el primer y tercer grupo están relacionados directamente con el uso de reactores nucleares.

El proceso de radiación de diversos materiales es llevado a cabo en unidades con radioisótopos, las cuales pueden estar constituidas por radionúclidos duraderos, o efímeros, relativamente.

Los reactores nucleares han sido diseñados para suministrar calor y energía eléctrica, no obstante, las barras de combustible son fuente no sólo de calor y energía eléctrica, sino también de radionúclidos que pueden emplearse en la Química de radiaciones.

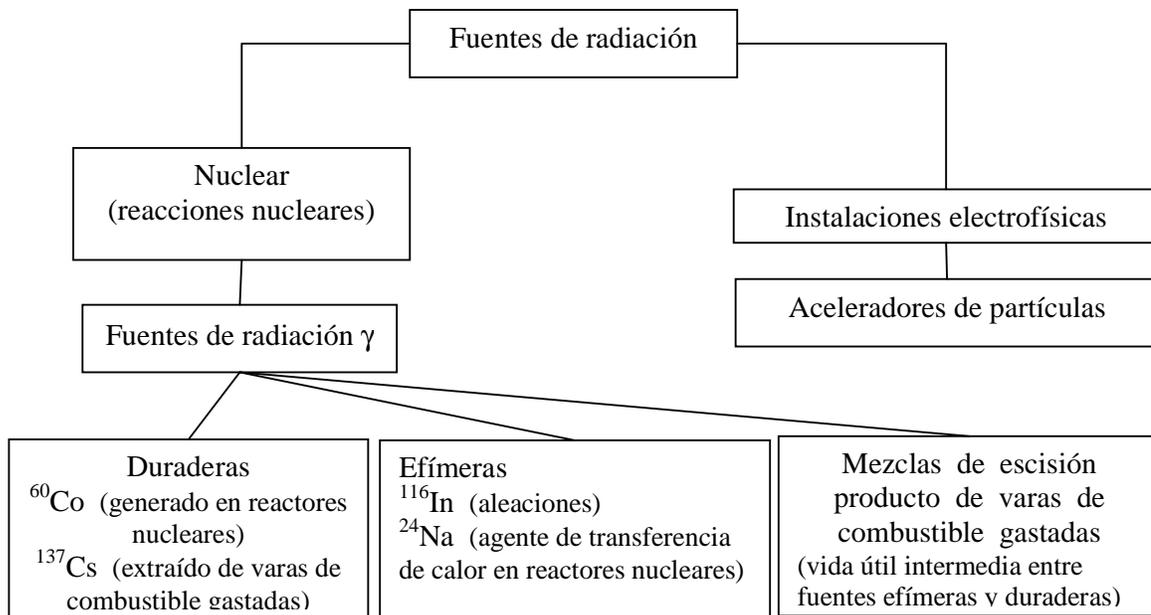


Figura 3.5.3. Fuentes de radiación de alta energía

Aceleradores de electrones

De entre las fuentes de radiación ionizante, los aceleradores de electrones han sido empleados exitosamente en la química de polímeros. Para este propósito también se han empleado fuentes de rayos X, los cuales presentan un espectro energético continuo, a diferencia de las fuentes de radionúclidos y sus emisiones γ monoenergéticas.

Los aceleradores de electrones (y en general de partículas), presentan algunas ventajas considerables, como pueden ser el bajo riesgo de radiación (dado que pueden ser apagadas y eso las hace muy seguras); el poder y geometría de los haces, así como la intensidad, pueden ser modificados y controlados en un rango

bastante amplio; es posible proporcionar dosis de radiación en varios ordenes de magnitud por encima de lo que los radionúclidos pueden permitir. Los aceleradores son ampliamente usados para llevar a cabo procesos inducidos por radiación sobre polímeros, tales como entrecruzamiento, curado e injerto.

La limitación principal de usar aceleradores de partículas cargadas, es la longitud tan pequeña, que pueden atravesar éstas, en los medios condensados: alrededor de 0.5cm/MeV, lo que da como resultado que su empleo se reduzca a casos en los que se trabajan películas o capas finas. Huelga decir que son ideales para recubrimientos y curado de pinturas en películas.

Los aceleradores de partículas cargadas hacen posible llevar a cabo procesos de radiación continuos o pulsados de los materiales. La frecuencia de los pulsos puede variar de 10^{-12} a 10^{-6} s.

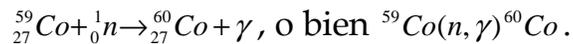
Fuentes de radiación duraderas

En la química de radiaciones en polímeros, la radiación α prácticamente no se emplea debido a su bajo poder de penetración. Debido a la misma razón las fuentes de radiación β , son raramente usadas, aunque en los casos de curado en películas finas estas fuentes son muy adecuadas.

El radionúclido ^{60}Co y, menos frecuentemente ^{137}Cs se emplean en Química de radiaciones como fuente de radiación γ . La radiación de estas especies es monoenergética, o bien, característica, es decir que

presentan valores discretos de energía. El ^{60}Co genera dos tipos de fotones, con energías de 1.33 y 1.17 MeV. El tiempo de vida media del ^{60}Co es de 5.3 años (Navarrete y Cabrera, 1993); el del ^{137}Cs es de 30 años, con una energía fotónica de 0.66MeV.

En un reactor nuclear la reacción nuclear que da origen al ^{60}Co es la siguiente:



Siendo esta fuente de radiación γ la más ampliamente utilizada en la química de radiaciones sobre polímeros. El radioisótopo producido (de forma metálica), puede alcanzar una actividad entre $1.85 \times 10^{12}\text{Bq}$ y $3.7 \times 10^{12}\text{Bq/g}$, dependiendo del tiempo que permanezca enriqueciéndose en el reactor nuclear (Woods y Pikaev, 1994)

3.6. Radiación de polímeros

La química de radiaciones de polímeros comprende las siguientes secciones

- 1) Polimerización inducida por radiación. Formación de polímeros por irradiación de los monómeros.
- 2) Transformación química de polímeros por radiación. Aquí se incluye: a) injerto de co-polímeros: modificación de polímeros o materiales poliméricos por injerto de un monómero (o monómeros)., b) reticulación: la formación de sistemas

tridimensionales a partir de polímeros de cadenas lineales o ramificadas o la ciclización de macromoléculas, c) radiólisis: degradación o escisión de cadenas poliméricas.

- 3) Protección de polímeros contra la radiación y resistencia a la radiación.

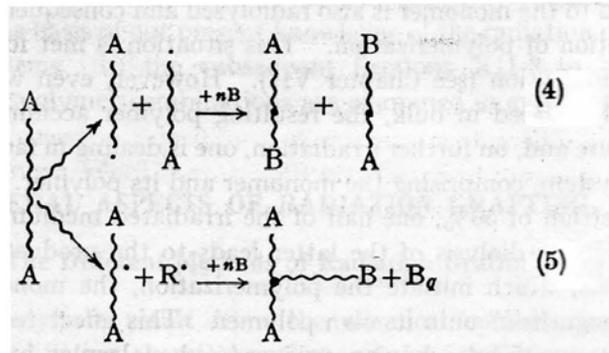
De donde puede observarse que por medio de la radiación es posible sintetizar, modificar, reticular o degradar polímeros.

Polímeros injertados por medio de radiación

La producción de polímeros injertados es un excelente ejemplo de la capacidad de la radiación para iniciar reacciones en el estado sólido. En el material injertado, la estructura del polímero, con unidades monoméricas A, se unen en un número de sitios determinados a cadenas de unidades monoméricas B. Las propiedades fisicoquímicas de los polímeros A y B pueden ser completamente diferentes.

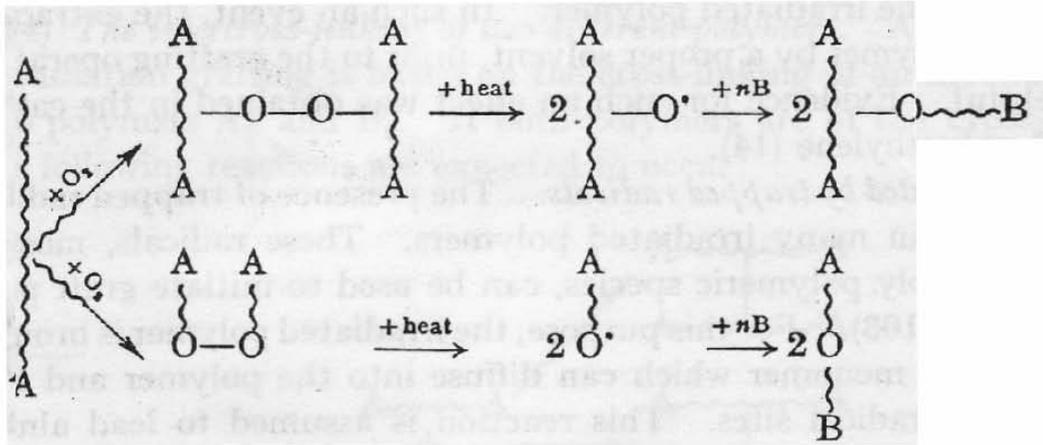
Existen muchos métodos disponibles para generar estos injertos por medio de radiación. En forma simple, el polímero A es irradiado en presencia del monómero B, pero en este caso algo del monómero B reacciona consigo mismo, formando polímero B puro, lo cual no es deseable. En caso de que se trate de un polímero degradable (4), predominarían los productos de bloque, en tanto que si se trata de un polímero que reticula bajo radiación es más probable que ocurra

igual número de copolímero de injerto y homopolímero (Chapiro, 1962)

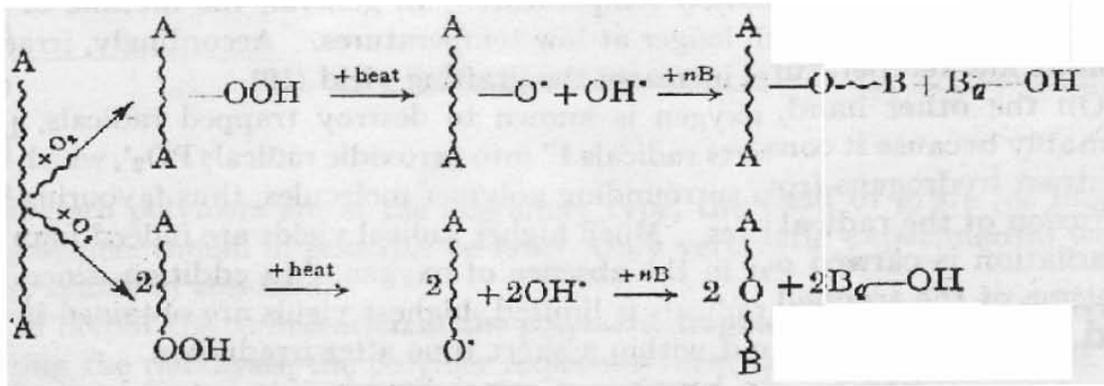


El polímero A puede ser irradiado para formar radicales consigo mismo y se introduce en el monómero B. La reacción puede ocurrir rápidamente, para evitar que los radicales reaccionen con A, pero la limitada penetración de A en B puede hacer que el injerto no sea uniforme.

La tercera técnica consiste en irradiar A en presencia de oxígeno del aire, con lo que se generan grupos óxidos y peróxidos, los cuales son térmicamente inestables. Cuando se coloca en el monómero B y el sistema se calienta, los grupos formados pueden romperse y reaccionar con el monómero B, con lo cual se propaga una polimerización convencional:



O bien puede ocurrir la formación de hidroperóxidos, térmicamente inestables, con lo cual se espera que ocurran las reacciones siguientes:



El cuarto método es irradiar el polímero A en presencia de una solución acuosa del monómero B. La formación del homopolímero B se evita por presencia, en solución, de iniciadores como sales de Fe.

La combinación covalente de dos cadenas poliméricas muy diferentes promete el uso en nuevos productos y el desarrollo de muchos otros. Una de las aplicaciones es en forma de membranas

empleadas para filtraciones químicas. En estos sistemas es común proveer un carácter hidrofílico injertando ácido acrílico.

Polímeros con injertos binarios

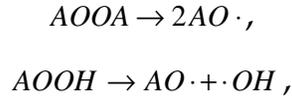
La posibilidad de llevar a cabo el injerto de cadenas poliméricas binarias, alternadas o en bloques, cuando se lleva a cabo una polimerización en presencia de una solución de dos monómeros, está estrechamente relacionada con la reactividad que cada monómero presenta hacia el otro y hacia si mismo. Es posible llevar a cabo polimerizaciones en el seno de soluciones de uno o más monómeros, de donde se pueden generar sistemas alternados o en bloque y puede, además, favorecerse el predominio de sistemas en bloques o intercalados por medio de la modificación de condiciones de reacción

Es posible obtener sistemas totalmente en bloques si se llevan a cabo reacciones en dos o más pasos, en las cuales el monómero A se injerta primero en las cadenas soporte, posteriormente se pone en contacto el sistema con un segundo polímero B y así se forma un segundo bloque. Es fácil apreciar que el proceso permite la inclusión de bloques de una infinidad de monómeros y las veces que sean necesarias dependiendo de la aplicación buscada.

Activación de polímeros por formación de peróxidos (peroxidación)

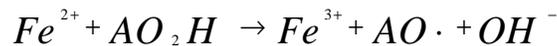
Esta técnica involucra preirradiación del polímero en presencia de aire u oxígeno para que los macrorradicales formados se transformen en peróxidos e hidroperóxidos. Cuando el polímero preirradiado es

subsecuentemente calentado en presencia del monómero (en ausencia de aire), los peróxidos (A₂O₂) y los hidroperóxidos (A₂O₂H) se descomponen:



De donde los macroradicales AO. Sirven como sitios activos para el injerto. Los hidroperóxidos son más activos que los dialquilperóxidos, los cuales requieren mayor temperatura para su descomposición. Los peróxidos e hidroperóxidos pueden iniciar injertos cuando se descomponen en presencia de luz ultravioleta.

Una desventaja de la técnica de peróxidos es que la presencia de radicales hidroxilo (.OH) induce homopolimerización del monómero. Esto puede evitarse con la adición de metales de transición, los cuales inhiben la formación de radicales hidroxilo. Por ejemplo, por medio de la adición de compuestos de Fe(II), los cuales reaccionan con los hidroperóxidos para formar radicales alcoxi, pero no radicales hidroxilo.



3.7. Politetrafluoroetileno (Charlesby, 1960)

Politetrafluoroetileno (PTFE) es una larga cadena polimérica (CF₂-CF₂)_n de gran simetría que puede ordenarse en una estructura altamente cristalina. Sus diversas aplicaciones en diversos campos son debidas a su alta temperatura de fusión, su amplio intervalo

térmico de trabajo (-100 - 300°C), es químicamente inerte y presenta un bajo coeficiente de fricción; propiedades suficientemente importantes para pasar por alto los costos y dificultades técnicas para su manufactura.

El punto de fusión (temperatura a la que los cristales funden y el polímero adquiere una estructura amorfa), está alrededor de 330°C. Estudios de difracción de rayos X han puesto en evidencia algunas transiciones por debajo de esta temperatura 20 y 30°C la ocurrencia de estos cambios en la estructura, por demás imprevistos, y tan alejados del pf es probablemente único en polímeros de cadena larga y puede ser explicado en términos de la relativa linealidad y forma cilíndrica de la molécula polimérica. Los cambios en el patrón de difracción de rayos X a estas temperaturas son consistentes con un desplazamiento rotacional y longitudinal a lo largo de los ejes de la cadena. El arreglo de cada molécula permanece altamente inalterado.

Cambios inducidos por radiación en politetrafluoroetileno

Existe mucha información publicada acerca de los cambios producidos en PTFE por exposición a radiación altamente energética. Muchos de los cambios observados no terminan cuando la radiación se detiene sino que continúan progresivamente a lo largo de semanas. Este comportamiento puede deberse a la reacción de radicales atrapados en el sistema, a partir del oxígeno se pueden dar ataques en estos radicales. Ocurre que la fractura de los enlaces internos genera estrés por la oclusión de gases los cuales tienen una

velocidad baja de difusión. Deterioros estructurales similares pueden observarse en polimetilmetacrilato.

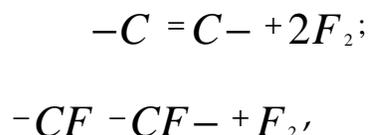
Cambio en propiedades químicas

En dosis de radiación tan bajas como 50kGy de radiación gamma el PTFE pierde parte de sus capacidades mecánicas. Un marcado deterioro en la fuerza de tensión de películas delgadas para dosis tan bajas como 10kGy de radiación electrónica puede observarse para este sistema, pero este deterioro no se incrementa con el tiempo después de la exposición.

El decremento en la fuerza de tensión de PTFE (prueba de fractura llevada a cabo por debajo de su T_m) se ha empleado para medir el cambio por radiación. Se observan decrementos significativos en dosis tan bajas como 0.01kGy, de radiación gamma de ^{60}Co . Cambios similares pueden observarse en la viscosidad que puede decrecer en un factor de 200 para dosis de sólo 3kGy. Estas dosis son considerablemente menores a las necesarias para producir cambios perceptibles en las propiedades mecánicas de otros polímeros los cuales se degradan bajo radiación, por ejemplo metilmetacrilato. Si, por ejemplo, el valor G para degradación es alrededor de 3 (para muchos polímeros), una dosis de radiación de 1kGy puede producir sólo una fractura por 6.4×10^4 átomos de carbono.

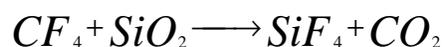
Cambios químicos

La naturaleza química inerte del PTFE dificulta la determinación de los cambios químicos producidos por la radiación, empleando métodos químicos convencionales. Por medio de espectroscopia de IR se han podido detectar cambios, los cuales señalan hacia la formación de insaturaciones,



aunque la relación entre la insaturación y la dosis, o razón de dosis, no se ha determinado. La presencia de insaturaciones puede ser determinada por medición directa de la oxidación.

Los gases generados cuando el PTFE se somete a radiación, en viales de sílica sellados al vacío, al estudiarse por medio de espectrometría de masas, muestran una composición principal de SiF₄ y CF₄ en cantidades aproximadamente iguales. La presencia de SiF₄ se debe al ataque del fluor al contenedor de vidrio. Se ha demostrado que también se genera la siguiente reacción, la cual se lleva a cabo rápidamente. La presencia de pequeñas cantidades de CO₂ en los gases analizados puede confirmar esta reacción.



3.8. Enzimas

En los últimos años, la biotecnología ha experimentado grandes avances, paralelamente a sus aplicaciones para la obtención de productos para las industrias química, alimentaria y farmacéutica. Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos, tales como son una gran actividad catalítica; gran especificidad de sustrato (incluso estereoselectividad y regioespecificidad); son muy activos a temperatura ambiente y presión atmosférica. Las enzimas son catalizadores biológicos que incrementan las velocidades de reacción, teniendo lugar estas en las células vivas por medio de energías de activación bajas (Erginer et al, 2000)

A pesar de estas claras ventajas, el empleo de enzimas no se ha generalizado en los procesos químicos industriales debido a que la mayoría de las enzimas no son estables en las condiciones de trabajo. Por otra parte al ser solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil, y por tanto, no se pueden reutilizar.

Ventajas de la bioconversión

Las ventajas que representan la bioconversión son:

- Especificidad de sustrato: normalmente un enzima cataliza una única etapa específica de reacción.
- Regioespecificidad: si existen en la molécula varios grupos funcionales de un tipo determinado se afecta solamente una posición específica.

- Estereoespecificidad: si se utiliza una mezcla racémica como material de partida, solamente es convertido un enantiómero.
- Condiciones de reacción: las reacciones enzimáticas no causan la destrucción de los sustratos sensibles debido a las suaves condiciones de conversión. Las reacciones enzimáticas también causan menos daños ambientales ya que tienen lugar principalmente en agua.

En las bioconversiones de compuestos orgánicos pueden ser utilizados cultivos en crecimiento, células en reposo, enzimas, células inmovilizadas o enzimas inmovilizadas.

En los procesos con cultivos en crecimiento la cepa utilizada se cultiva en un medio adecuado y después del crecimiento del cultivo (6-24h) se añade una solución concentrada del sustrato. Este tipo de bioconversiones deben llevarse a cabo en condiciones estériles. La esterilidad es necesaria porque la contaminación puede suprimir la reacción deseada, inducir la formación de falsos productos de transformación o producir la degradación total del sustrato.

Si no es necesaria la inducción de la enzima por el sustrato que se añade se recurre a las células en reposo. Esto tiene la considerable ventaja de que se elimina la inhibición del crecimiento por el sustrato; además pueden ser utilizadas concentraciones altas de células, lo que facilita el aumento de productividad y al mismo tiempo se reduce el riesgo de contaminación. Puesto que la reacción de transformación se produce predominantemente en la solución

del buffer, la recuperación del producto es relativamente difícil debido a los metabolitos involucrados en el desarrollo de las células.

Una variante mejorada es el uso de células inmovilizadas en un soporte polimérico, lo que ofrece la ventaja de que el proceso puede ser llevado a cabo continuamente ya que las células pueden ser utilizadas una y otra vez. Las células bacterianas inmovilizadas que catalizan reacciones de una o múltiples etapas se utilizan actualmente en la producción comercial de ácido aspártico, L-alanina y ácido málico.

Los extractos enzimáticos libres de células suponen generalmente el uso de enzimas inmovilizadas en aquellas reacciones de biotransformación en las cuales deben evitarse reacciones indeseadas o la degradación adicional de los productos de reacción o cuando la velocidad de la reacción es entorpecida por el transporte del sustrato o de los productos a través de la membrana celular. Finalmente, muchas enzimas tienen un pH y/o temperatura óptimos diferentes a los de las células intactas y vegetativas; por lo que al aplicar estos sistemas se puede optimizar el incremento de la velocidad de reacción.

Los productos finales de las reacciones de transformación pueden encontrarse disueltos o en suspensión. Para el procesamiento adicional, el material celular separado debe ser lavado repetidamente con agua o solventes orgánicos, ya que una parte significativa del producto de reacción puede estar adsorbida en las células. Dependiendo de la solubilidad de los productos, la

recuperación se lleva a cabo por precipitación, como sal cálcica, por adsorción en intercambiadores iónicos, por extracción con solventes apropiados o en el caso de sustancias volátiles, por destilación directa a partir del medio de cultivo.

3.9. Soportes poliméricos para propósitos biomédicos y biotecnológicos (Ivanov, 1992)

Los soportes poliméricos o matrices para inmovilización (fijación o disminución de movilidad), de varios fármacos, enzimas, etc., pueden obtenerse por medio de reticulación de polímeros inducida por radiación, o bien por su modificación por medio de injertos. Como resultado de la inmovilización la acción de la droga se prolonga dependiendo de la velocidad de separación del fármaco de la matriz. Es posible controlar el grado de reticulación, o injerto, en estos sistemas.

Se aprecian dos grandes tendencias en la aplicación de energía ionizante a los sistemas poliméricos para inmovilización. (1) Método físico de preparación de *biocomposites* (métodos de atrapamiento o adhesión) y (2) Enlace Químico de los biocomponentes a los acarreadores poliméricos insolubles.

Las ventajas de la primera tendencia descrita es un alto rendimiento de la preparación activa, lo simple de la operación para obtenerse y que presenta una aplicabilidad general para una amplia gama de biocompuestos, aunado a la gran variedad de acarreadores

disponibles. Las ventajas de la segunda variante son la fijación confiable de biocomponentes como resultado de la formación de enlaces químicos, y la actividad superficial determinada por la naturaleza de la película. Las desventajas del segundo método son un rendimiento pobre de la preparación activa, la selectividad con respecto a las condiciones de reacción, el material de soporte, y su inaplicabilidad para organismos vivos o sustancias químicamente inertes.

Ambos métodos son empleados para la preparación de biocompuestos. En el método físico, el polímero es empleado como soporte. En el método químico el biocompuesto se basa en injertos de copolímeros. Los biocompuestos fueron obtenidos por primera vez en Hungría en 1970 al inmovilizar tripsina en acrilamida polimerizada por radiación.

Los biocomponentes siguientes, junto con soportes poliméricos, son usados en la preparación de biocompuestos por adhesión:

- Biocomponentes de peso molecular bajo: antibióticos, enzimas, feromonas, vitaminas y sustancias inmunológicas.
- Biocomponentes de peso molecular alto: enzimas, hemoglobina, globulinas, clorofila, polipéptidos y ácidos nucleicos.

- Organismos vivos: células de microorganismos, tejidos celulares, organelos y virus.

Los biocompuestos son usados en biotecnología, agricultura, medicina, farmacología y tecnología genética. Biocomposites con enzimas, proteínas y células de microorganismos pueden emplearse como biomasa (o aditivos para esta) para bioreactores energéticos. La acción prolongada de biocompuestos con fármacos hace posible el uso de éstos, por ejemplo, en implantes para quimioterapia. El empleo de biocompuestos con tejidos vivos es promisorio en medicina para el desarrollo de órganos artificiales, y biocompuestos con biomateriales genéticos pueden ser empleados en biotecnología genética.

Dependiendo de las condiciones de síntesis, los polímeros ofrecen, una amplia variación en los grupos funcionales introducidos, en la posición estérica de éstos, y desde luego, en las características fisicoquímicas del soporte (hidrofilicidad, polaridad, etc.) y en sus formas (tubos, membranas, recubrimientos, etc.).

Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas hace posible una catálisis enzimática heterogénea, con lo cual se obtienen grandes ventajas: es posible emplear un mismo lote de enzima repetidas veces y detener la reacción por medio de una remoción física de la enzima inmovilizada del seno de reacción.

Adicionalmente, en muchas ocasiones, la inmovilización brinda estabilidad adicional a la enzima, así como un incremento en la vida media de la forma biológicamente activa y una estabilización térmica.

Ventajas adicionales son la determinación más simple de analitos en mezclas complejas a partir de volúmenes pequeños. La enzima permanece activa y no contaminada para usos posteriores. Por estas razones, los estudios de técnicas de inmovilización, para su empleo industrial en membranas catalíticas, ha tenido un rápido incremento en años recientes.

Las enzimas inmovilizadas brindan la posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la forma inmovilizada; estos reactores permiten el empleo de cargas elevadas de enzima, la cual mantendrá su actividad durante más tiempo. Tales sistemas pueden incluir el reciclado, lo que permite la obtención de productos con mayor pureza.

Las propiedades fisicoquímicas del soporte polimérico, por lo tanto, afectan directamente la elección del procedimiento para inmovilizar, y consecuentemente el comportamiento bioquímico y biofísico de las enzimas inmovilizadas.

Los principales inconvenientes del proceso de inmovilización pueden ser:

1. La alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo.
2. Siempre suele haber una pérdida de actividad de la enzima durante la inmovilización.
3. El biocatalizador inmovilizado es más caro que la enzima nativa (Arroyo, 1998)

3.10. Métodos químicos para inmovilizar covalentemente enzimas (Wingard et al. 1976)

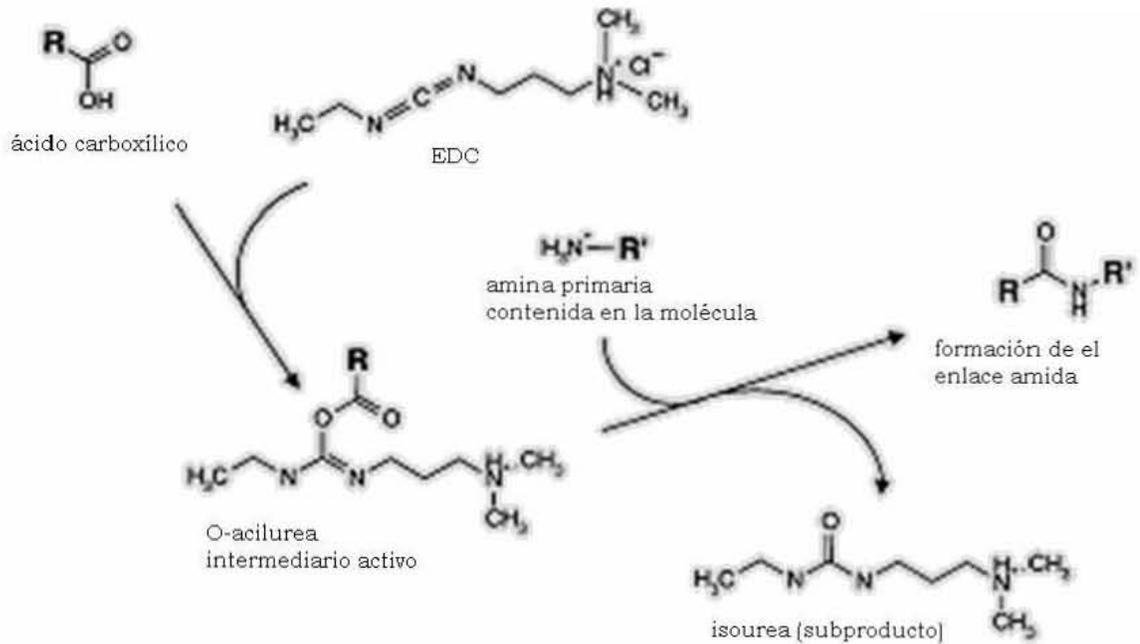
Los grupos funcionales que pueden ser empleados para enlazar covalentemente enzimas a un soporte polimérico contemplan, en primera instancia a aquellos a través de los cuales la proteína puede enlazarse, los cuales son, a saber: (1) grupos ϵ -amino de lisina o α -NH₂ terminales de cadenas polipeptídicas; (2) grupos carboxilo, de los ácidos aspártico y glutámico, así como los α -carboxilos terminales; (3) anillos fenólicos de tirosina; (4) grupos sulfhidrilo de cisterna; (5) grupos hidroxilo de serina, treonina y tirosina; (6) grupos imidazol de histidina; (7) grupos indol de triptófano. En la práctica la mayoría de las reacciones que generan acoplamiento covalente se llevan a cabo a través de grupos amino, carboxilo, o los anillos aromáticos de tirosina e histidina.

Reacciones de acilación

Los métodos más generales para la activación de grupos carboxilo involucran el uso de carbodiimidas solubles en agua o reactivos similares. Las carbodiimidas reaccionan con los grupos carboxilo en valores de pH ligeramente ácidos (pH 4.75-5) para la generación de

derivados de O-acil isourea. Estos intermediario altamente reactivos pueden rearrreglarse hasta acil ureas o bien condensarse con aminas para generar la amida correspondiente. Los grupos carboxilo activados pueden reaccionar también con otros nucleófilos como -OH y SH, para generar los diversos derivados carboxilatos, sin embargo la rapidez relativa de las reacciones con éstos nucleófilos es muy pequeña.

El acoplamiento vía grupos amino en la proteína es comúnmente llevada a cabo con polímeros que contienen grupos acilo como acil azida o anhídridos de ácidos y con grupos que contengan grupos carboxilos, los cuales son activados con carbodiimidias N,N'-disustituidas. El mecanismo de desarrollo en las reacciones de acilación se da por el ataque nucleofílico (en el caso de proteínas a través de grupos -NH₂, -OH o -SH) al grupo carbonilo activado. Los nucleófilos son más activos en sus formas desprotonadas (R-NH₂, PhO⁻, RS⁻), es decir en valores de pH más bajos que sus valores de pK_a. Valores de pH elevados pueden provocar la desnaturalización irreversible de la proteína.



Esquema general de acilación por medio de activación de -COOH con una carbodiimida soluble en agua

Reacciones de arilación y alquilación

El acoplamiento vía arilación, presumiblemente de grupos amino de la proteína, es efectuada primeramente en polímeros con grupos funcionales aromáticos halogenados con grupos activadores, por ejemplo, grupos nitro.

El método de bromuro de cianógeno

Este es un método muy popular y probablemente es el más utilizado para la preparación en el laboratorio de derivados enzimáticos inmovilizados con adsorbentes insolubles en agua para cromatografía de afinidad, basado en la activación de polisacáridos insolubles en agua, celulosa, dextranas entrecruzadas y agarosa, con bromuro de cianógeno.

3.11. Inversión de Sacarosa (Groves, R., 1998)

Invertir es el término que se utiliza para describir la hidrólisis del azúcar (sacarosa), en sus monosacáridos glucosa y fructosa. Esto puede ocurrir en una variedad de vías que pueden ser, o no, benéficas para el producto.

La inversión de la sacarosa puede generarse por calentamiento en el proceso de cocción, por condiciones ácidas, o por una combinación de éstas. También en algunas ocasiones puede llevarse a cabo la inversión del azúcar por medio de la enzima invertasa.

a) Inversión por calor

Temperaturas de calentamiento en un intervalo de 107.22-148.88 °C, son suficientes para causar una inversión significativa.

Si los tiempos de calentamiento son excesivamente prolongados, o el producto es mantenido muy caliente después de la cocción, puede obtenerse como resultado una elevada inversión.

El azúcar invertido puede obtenerse deliberadamente por medio de la adición de ácido a una solución caliente de sacarosa. La inversión es llevada a cabo durante un período de tiempo controlado y entonces el ácido es neutralizado con un álcali de grado alimentario, generalmente bicarbonato de sodio.

b) Inversión por enzima

La enzima invertasa puede emplearse para preparar azúcar invertido a partir de una solución de sacarosa. El proceso es más lento que cuando se emplea ácido, pero es más fácil de controlar. La enzima puede ser desactivada por calentamiento del jarabe de azúcar invertido por encima de 71.11°C.

El empleo más común de invertasa es para la obtención de centros cremosos suaves o líquidos, o cordiales que se recubren de chocolate. La invertasa actúa específicamente sobre la sacarosa en solución. No tiene efecto sobre la sacarosa cristalina.

3.12. Técnicas de Caracterización

Calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Rabeck, J. 1983)

Es una técnica en la que se registra la energía necesaria para establecer una diferencia cero de temperatura entre una muestra y un material de referencia, ya sea contra tiempo o temperatura. Como las dos muestras están sometidas a condiciones idénticas de temperatura en un ambiente calentado, o enfriado a una velocidad constante, la ordenada representa la diferencia de temperaturas entre la muestra y la referencia, por lo que el área de cualquier pico es proporcional al cambio de la entalpía en la muestra.

Esta técnica usa la medición del flujo de calor basado sobre la potencia de compensación. Se pueden analizar muestras sólidas y líquidas. Las muestras sólidas pueden ser películas, polvos, cristales o estar en forma granular. La magnitud de la muestra debe ser del

orden de 0.5 a 10 mg. La ventaja de esta técnica es que: permite corridas de alta velocidad, tiene una alta resolución dando muy buenos resultados cuantitativos, produce formas regulares en la respuesta y permite un buen contacto con la muestra, con atmósfera controlada, además de una mejor remoción de productos de descomposición.

Entre los datos que es posible obtener de esta técnica están los siguientes: temperaturas de transición vítrea (T_g), puntos de fusión (T_m), temperaturas de descomposición y puede ser empleada para medidas directas de energía absorbidas en el estudio de calores de fusión, de vaporización, de cristalización, de reacción, descomposición, de solución, de absorción, calores específicos, energías de activación, entropías de transición y energías de transición del estado sólido.

Espectroscopia de Infrarrojo con transformadas de Fourier y reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) (Rabeck, J. 1983)

Esta técnica nos permite identificar grupos funcionales de compuestos, en este caso de los monómeros y de la base involucrada, debido a que el injerto, como se puede suponer, está en toda la superficie y volumen del PTFE. En términos generales se analizan los modos vibracionales de los grupos involucrados, como resultado de la absorción de radiación infrarroja. Para la técnica de ATR-IR se utiliza un dispositivo en el cual un haz de infrarrojos incide sobre cuatro espejos, lo que propicia la entrada en un ángulo dado en la muestra y el rayo resultante sólo penetra unas micras (6-

8 μm) en la superficie del material. Por lo tanto el análisis es representativo sólo de esta capa superficial. El cristal que se utiliza como soporte para la muestra es de ZnSe.

CAPÍTULO 4

Desarrollo experimental

4.1. Materiales

Reactivo	Proveedor
Politetrafluoroetileno en películas de 1.5 x 4 cm, con densidad de 2.2 g/cm ³ , ¹ las cuales se lavaron con acetona y metanol antes de emplearse.	Goodfellow
Ácido acrílico, el cual es bidestilado en presión reducida a 25°C antes de usarse.	Materiales plásticos S. A de C. V.
N-isopropilacrilamida 97%, se recristalizó de hexano-tolueno antes de ser ocupada.	Aldrich
Hydrocloruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida*	
D-Glucosa (reactivo)*	
Tartrato doble de sodio potasio (reactivo)*	J. T. Baker
Citrato de sodio dihidratado (reactivo)*	
Ácido cítrico monohidratado (reactivo)*	
Fosfato de sodio dibásico anhidro (reactivo)*	
Ácido 3,5-Dinitrosalicílico 99.97% *	
Fosfato de potasio monobásico (reactivo)*	
Albúmina de huevo de gallina	MP-Biomedicals
Invertasa de levadura de panificación en grado práctico (<i>Saccaromices cereviseae</i>)*	Sigma
Sacarosa grado alimentario*	Productos básicos Alianza S. A.
Argón 99.997% de pureza*	Infra

*Sustancias empleadas como se adquirieron del proveedor

Equipo	Marca y modelo
Espectrómetro de infrarrojo con transformadas de Fourier	Paragon 500 de Perkin Elmer
Espectrofotómetro UV-visible	Cary 100 Scan de Varian
Fuente de irradiación de 60Co	Gammabeam 651 PT diseñada por Nordion International Inc.
Baño de agua con precisión de $\pm 0.2^\circ\text{C}$	Fisher Isotemp 1016S
Balanza Analítica digital	OHAUS Analytical Standard AS200

4.2. Métodos

4.2.1. Preirradiación oxidativa

Las películas de PTFE, una vez lavadas y secadas con agua y jabón primero y posteriormente con etanol grado reactivo, fueron sometidas a irradiación en aire empleando una fuente de ^{60}Co con una razón de dosis de 2.23 kGy/h. La formación de peróxidos se comprueba por estudio espectrométrico de FT-IR con ATR.

4.2.3. Injertos sobre PTFE preirradiado

Una vez llevada a cabo la preirradiación oxidativa de las películas de PTFE (ver figura 4.2.3.), fueron sumergidas en soluciones acuosas de los monómeros (ácido acrílico y N-sisopropilacrilamida 3/3M) que se desean injertar, dentro de ampollitas de vidrio pyrex (1). Se hace pasar un burbujeo intenso de argón en las soluciones para desplazar el oxígeno durante 15 minutos (2). Una vez transcurrido el tiempo de desplazamiento de oxígeno las ampollitas son selladas y llevadas a la condición de temperatura adecuada para activar los peróxidos de las películas (3).

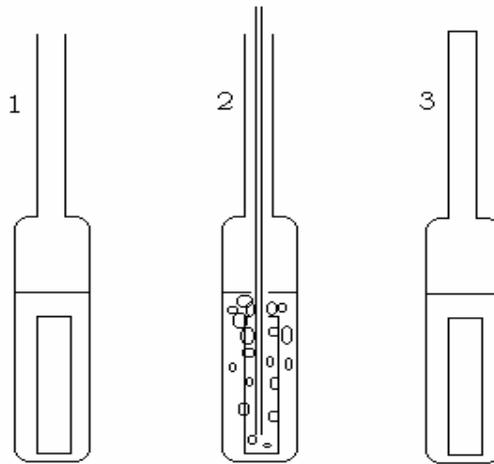


Figura 4.2.3. Representación esquemática de las ampollas para injertar monómeros vinílicos en atmósfera inerte

Las películas preirradiadas, inmediatamente después de salir del irradiador, son expuestas a la solución acuosa de monómero(s), en ampollas de vidrio(1); a las cuales se les burbujea argón durante 15 minutos(2); y selladas libres de oxígeno mantenidas a temperatura constante de 50°C durante tiempos determinados para llevar a cabo el injerto(3).

Tras los tiempos de calentamiento que se decidieron para cada una de las ampollas se determinó el % de injerto de acuerdo con la relación siguiente:

$$\%injerto = \frac{peso_{final} - peso_{inicial}}{peso_{inicial}} \times 100,$$

donde: peso final es el peso de la película injertada
 peso inicial es el peso de la película irradiada.

De acuerdo con lo reportado en estudios previos se trabajó con soluciones de ácido acrílico 3M, concentración en la cual se obtiene

un máximo de ácido acrílico injertado. La dependencia existente en el % de ácido acrílico injertado como función del tiempo de reacción (50°C), se determinó trabajando en tiempos de 6, 7, 9, 14, 18, 19 y 24 horas

4.2.4. Injerto de ácido acrílico y N-isopropilacrilamida en PTFE pre-irradiado, efecto de relación de monómeros sobre el % de injerto

La evaluación del efecto que tiene la relación de concentración de monómeros de ácido acrílico/N-isopropilacrilamida, sobre el porcentaje de injerto en películas preirradiadas de PTFE, se llevó a cabo variando los volúmenes de soluciones de cada uno de los monómeros, de acuerdo con la Tabla 2. La concentración total de ambas soluciones empleadas es 3M. Las condiciones de reacción para todas las películas son: 24 horas; 50°C, en atmósfera de Argón.

Tabla 2. Porcentaje de soluciones de monómeros ác. acrílico y N-isopropilacrilamida empleadas para los injertos

Película	Ácido acrílico (3M)	N-isopropilacrilamida (3M)
1	10	90
2	20	80
3	40	60
4	50	50
5	60	40
6	80	20

4.2.5. Medidas de hinchamiento

Para conocer el tiempo mínimo para lograr el hinchamiento límite de las cadenas injertadas, se hicieron pruebas de hinchamiento en películas con injertos de ácido acrílico y binarios. Las pruebas se llevaron a cabo en el valor de pH óptimo de inmovilización que es de 3.52, fijado con una solución de ácido cítrico 0.075M en una temperatura de 18°C. El cálculo del % de hinchamiento se lleva a cabo con la siguiente relación:

$$\% \text{Hinchamiento} = \left(\frac{\text{Peso}_{\text{final}} - \text{Peso}_{\text{inicial}}}{\text{Peso}_{\text{inicial}}} (\times 100) \right),$$

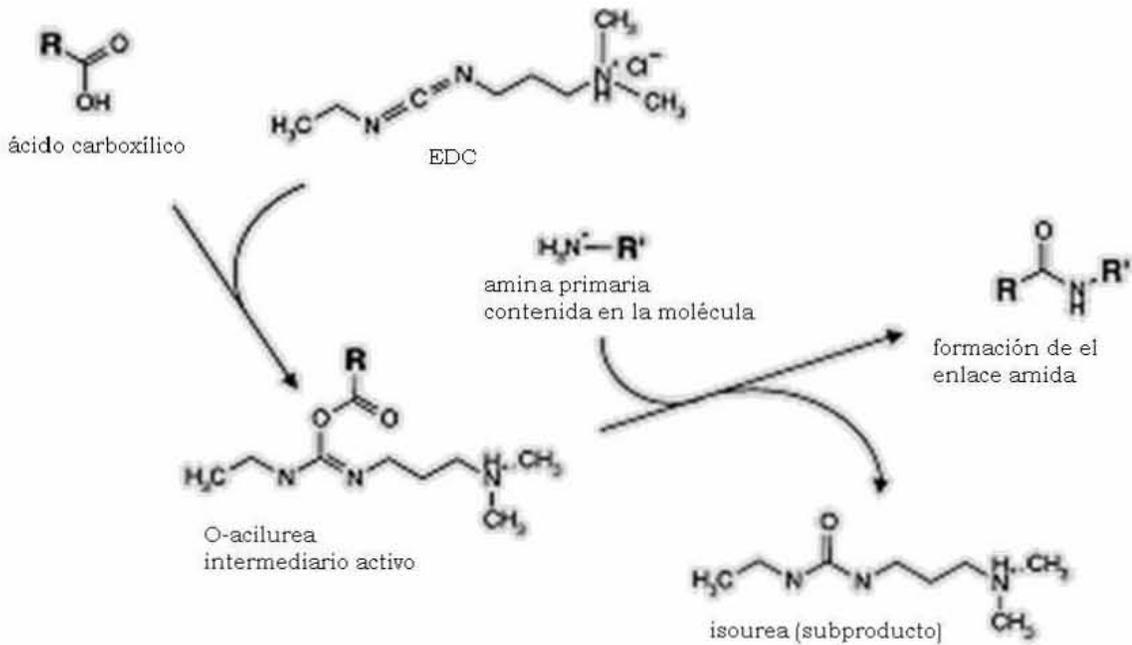
donde : peso final es el peso de la muestra hinchada
peso inicial es el peso de la muestra seca.

4.2.6. Activación de grupos -COOH para inmovilizar biomoléculas (Kang, et al, 1993)

La inmovilización covalente de biomoléculas a través de residuos amino primario de lisina, se consigue por una reacción de sustitución nucleofílica, para lo cual el grupo -COOH se hace reaccionar con N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida ($4.18 \times 10^{-4} \text{M}$), en citrato de sodio 0.075M y pH 3.5), durante 30 minutos a una temperatura de 2°C. La figura 2. 1., muestra la ruta simplificada de la activación e inmovilización de proteínas.

4.2.7. Inmovilización de proteínas (albúmina y enzima)

Cada película injertada, con los grupos $-\text{COOH}$ activados, se pone en contacto con una alícuota de 10 ml de una solución de proteínas disueltas (1mg/mL), en ácido cítrico 0.075M en pH de 3.5, en la cual se mantiene a una temperatura de 2°C durante 24 horas para asegurar la inmovilización de las proteínas.



4.2.8. Determinación cuantitativa de la proteína o enzima inmovilizada

Se construye una curva patrón con una solución conocida de albúmina de huevo, aprovechando la absorción que presentan a una longitud de onda de 280 nm los residuos de triptófano de las proteínas. A partir de la curva estándar se determina la densidad óptica de la solución de proteínas, antes y después de reaccionar con las películas injertadas con los grupos $-\text{COOH}$ activados y la cantidad de proteína inmovilizada se determina por diferencia de las concentraciones inicial y final en solución.

4.2.9. Determinación de actividad enzimática de invertasa

Tanto las formas libres como las inmovilizadas, al ser activas, hidrolizan sacarosa, por lo que se puede determinar la actividad enzimática, de ambas formas enzimáticas, por medio de la cuantificación de azúcares reductores en soluciones de sacarosa expuestas a las películas con enzima inmovilizada, o bien a soluciones de la forma libre. Se construye una curva patrón de glucosa que ha reaccionado con ácido 2, 3-dinitrosalicílico, aprovechando la absorción que el complejo formado exhibe en 540 nm, así como la respuesta lineal de incremento de color en función de la concentración, y se emplea para determinar las cantidades de azúcar invertido enzimáticamente, a partir de soluciones de sacarosa.

4.2.10. Determinación de la temperatura óptima de invertasa inmovilizada

La enzima inmovilizada se deja actuar durante períodos discretos de tiempo en soluciones de sacarosa con pH óptimo, en diferentes temperaturas. Una vez determinadas las actividades en cada valor de temperatura se refieren al valor en el cual la enzima presenta una actividad máxima, pudiendo construir un gráfico de actividades relativas de invertasa inmovilizada vs. temperatura. Los valores en los cuales se trabajó fueron de 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 y 80 °C.

4.2.11. Determinación de la actividad relativa como función de pH

Las cantidades de azúcar invertido que se obtienen, en un tiempo determinado, a partir de soluciones de sacarosa mantenidas en diferentes valores de pH , y temperatura óptima, ponen en evidencia la actividad de la enzima en tales valores de pH. Se refiere la actividad al valor máximo y así se determina la actividad relativa como función de pH. Los valores de las soluciones amortiguadoras, de fosfatos, empleadas fueron de 3, 4, 5, 6, 7 y 8

CAPÍTULO 5

Resultados y Discusión

5.1. Preirradiación oxidativa de PTFE

La formación de peróxidos en las cadenas del sistema polimérico PTFE puede seguirse fácilmente por medio de espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR). La composición simple del teflón -únicamente carbono y flúor- permite observar con una gran facilidad y precisión la inclusión de grupos funcionales en la superficie de las películas por medio del dispositivo de reflectancia total atenuada (ATR).

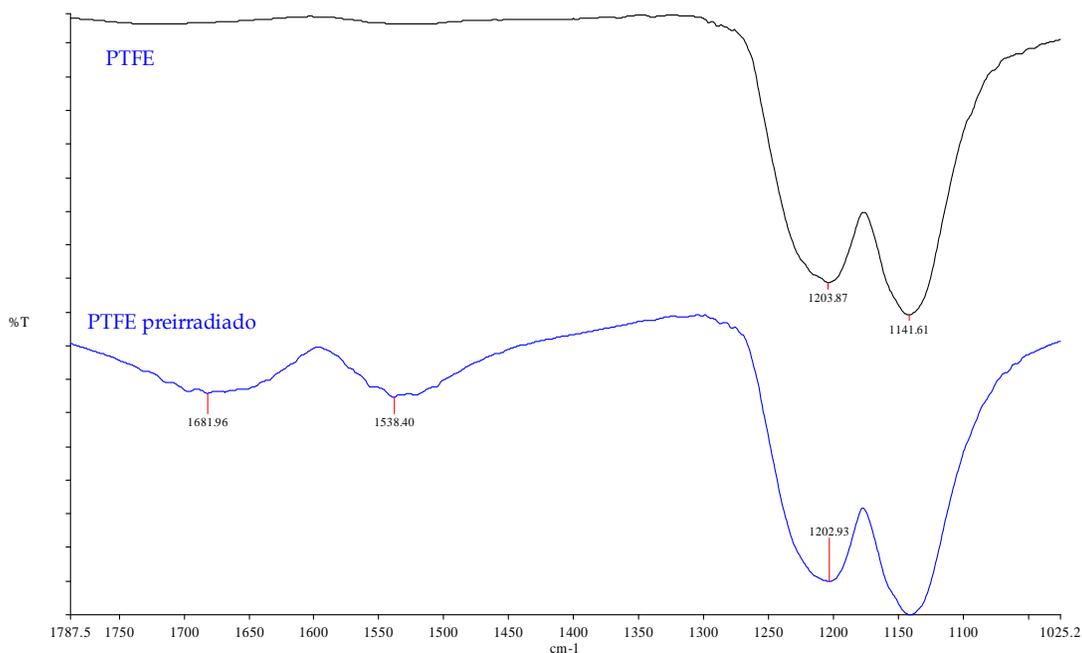


Gráfico 5.1.1. Espectros FTIR-ATR para muestras de PTFE y PTFE sometido a irradiación oxidativa (10kGy).

El gráfico 5.1.1 muestra las variaciones que se presentan en las bandas de la región de interés. Puede apreciarse la aparición de dos bandas, en 1538 cm^{-1} y en 1682 cm^{-1} , que se generan por los grupos $\text{C}=\text{O}$, y las banda en 1207 cm^{-1} y 1145 cm^{-1} , ambas correspondientes a los modos vibracionales de los enlaces C-F.

5.2. Efecto de irradiación gamma en las propiedades mecánicas de PTFE

La pérdida de propiedades mecánicas en politetrafluoroetileno sometido a radiación gamma es un hecho ampliamente conocido y documentado (Ivanov, 1992), que ocurre por la fragmentación de las cadenas de PTFE. Para llevar a cabo la inmovilización de biomoléculas en películas con el injerto binario propuesto es necesario que la degradación sea menor a 50% para que éstas sean capaces de resistir la manipulación a que son sometidas para alcanzar este fin, y eventualmente, la agitación en un sistema-reactor, esto puede lograrse con dosis de radiación de no más que 10 kGy.

Las películas con el injerto binario de NIPAAm y AAc, se sometieron a condiciones similares a las del proceso de inmovilización, observándose las dosis que son adecuadas para conservar propiedades mecánicas, entendidas éstas como aquellas en las cuales no se rompen las películas injertadas al cabo del todo el proceso.

Tabla 5.1. Efecto de tiempo y dosis, con una razón de dosis: 2.23kGy/h, para determinar conservación de propiedades mecánicas en películas de PTFE

Dosis (kGy)	Tiempo de irradiación (minutos)	Resistencia al proceso
7	188	Adecuada
10	269	Adecuada
13	350	Inadecuada
18	484	Inadecuada
24	646	inadecuada

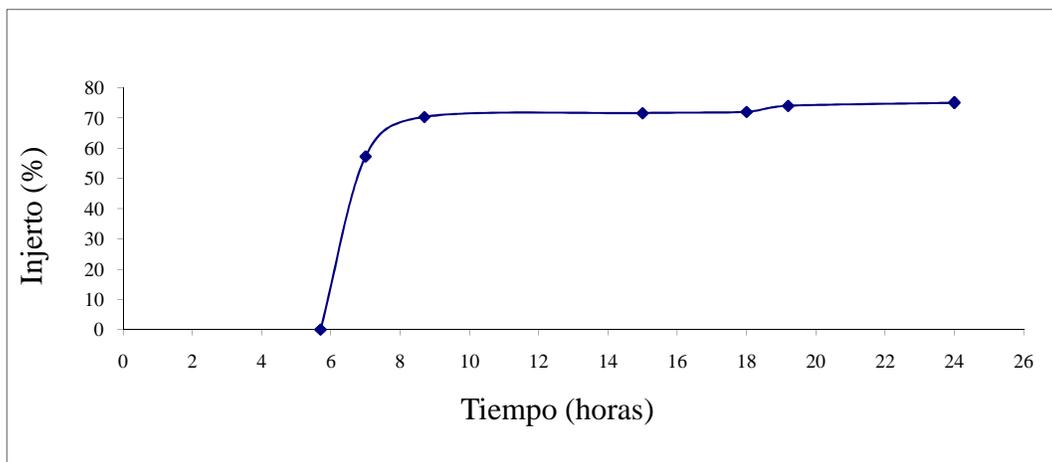
De la tabla 5.1, puede observarse que la dosis de 10kGy permite la manipulación de las películas sin que estas sufran rupturas aparentes. Las películas expuestas a dosis de de 13, 18 y 24 kGy son extremadamente frágiles, a tal grado que las de 18 y 24 kGy son fragmentadas por las cadenas en crecimiento del copolímero de injerto y las de 13 kGy no soportan agitación en agua (aprox., 300 rpm), esto está de acuerdo con la literatura en donde se menciona que en una dosis de 10 kGy la degradación es del 50% (Ivanov, 1992).

5.3 Injertos sobre PTFE preirradiado

5.3.1 Injerto de ácido acrílico en PTFE pre-irradiado

De acuerdo con lo reportado en estudios previos se trabajó con soluciones de ácido acrílico 3M, concentración en la cual se obtiene un máximo de ácido acrílico injertado en PTFE. La dependencia existente en el % de ácido acrílico injertado como función del tiempo

de calentamiento a 50°C, se determinó trabajando en tiempos de 6, 7, 9, 14, 18, 19 y 24 horas, para determinar el tiempo óptimo para obtener el máximo de injerto, toda vez que se esperaba demostrar que la cantidad de enzima inmovilizada en las películas injertadas tenía relación con el % de ácido acrílico en el injerto.



*Gráfico 5.3.1.1. Injerto de AAc-g- en función del tiempo de reacción
(D=10kGy, I=2.23kGy/h).*

Puede apreciarse en la gráfica 5.3.1.1, el efecto que tiene el tiempo de reacción sobre la cantidad de ácido acrílico injertado, se aprecia una abrupta pendiente en la curva alrededor de seis horas (estudios previos demostraron que los % de injerto máximos se obtienen después de 10 horas de reacción). Los porcentajes de injerto conseguidos son relativamente bajos si se comparan con otros sistemas poliméricos, este hecho puede deberse a que se trata de una preirradiación oxidativa y no un injerto con irradiación directa. Recordando nuevamente que se trata de un polímero con alta

propensión a la degradación cuando se expone a radiación gamma y más aún en presencia de oxígeno.

5.3.2. Injertos binarios de ácido acrílico/N-isopropilacrilamida en PTFE

La evolución que el porcentaje de injerto binario, de ácido acrílico/N-isopropilacrilamida sobre PTFE, presenta fue llevada a cabo empleando soluciones acuosas de ambos monómeros vinílicos en concentración 3M de solución acuosa de cada uno de ellos. La temperatura de reacción óptima en la cual los peróxidos se rompen para formar radicales libres, e iniciar el injerto, fue de 50°C, temperatura que permite el injerto.

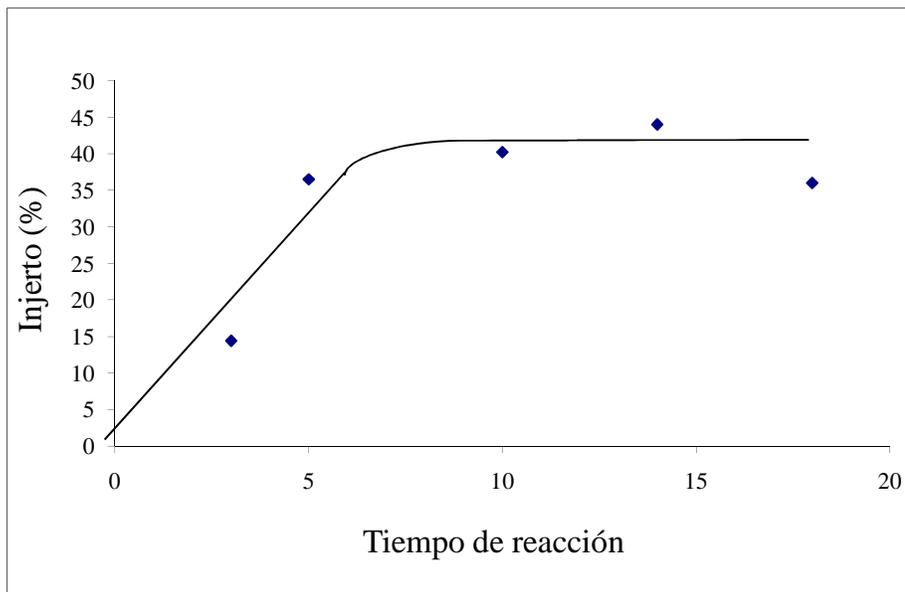


Gráfico 5.3.1.1. Injerto de PTFE-g-(AAc-co-NIPAAM) en función del tiempo de reacción ($D=10\text{kGy}$; $I=2.23\text{kGy/h}$).

Puede apreciarse que en las condiciones de reacción los valores máximos de injerto obtenidos no superan el 50%, valor muy bajo si se compara con los obtenidos con ácido acrílico y los que pueden obtenerse en otros sistemas poliméricos. Se desea reiterar la imposibilidad de llevar a cabo una radiación directa debido a la velocidad de reacción que presenta el ácido acrílico sometido a radicación gamma.

5.4 Hinchamiento de películas de PTFE injertadas

El hinchamiento límite de un sistema polimérico, se observa al cabo de un tiempo determinado. Se entiende que a partir del tiempo de hinchamiento límite todas las cadenas hidrofílicas presentes están hidratadas en su máxima capacidad, es decir que ocupan el volumen máximo posible en un medio polar. Es importante conocer el tiempo de hinchamiento límite ya que la inmovilización de biomateriales, particularmente enzimas, que ha de llevarse a cabo en soluciones acuosas, se ve afectada por la cantidad de grupos funcionales existentes en las cadenas poliméricas, disponibles para reaccionar, es decir que para que la exposición de los grupos -COOH sea máxima, las cadenas de nuestro sistema deberán estar lo más extendidas para evitar impedimentos estéricos en las reacciones de inmovilización.

Las películas injertadas se sometieron a pruebas de hinchamiento límite en las condiciones de pH en que se efectuó la activación de los grupos -COOH, e inmovilización de invertasa, es decir, en soluciones de citrato de sodio 0.075M y una temperatura de 21°C.

Si bien las reacciones de activación de $-\text{COOH}$ e inmovilización de invertasa se llevan a cabo en una temperatura de 4°C , las películas, antes de ser sometidas a las reacciones antes mencionadas fueron mantenidas en temperaturas de 21°C por un período mínimo de seis horas.

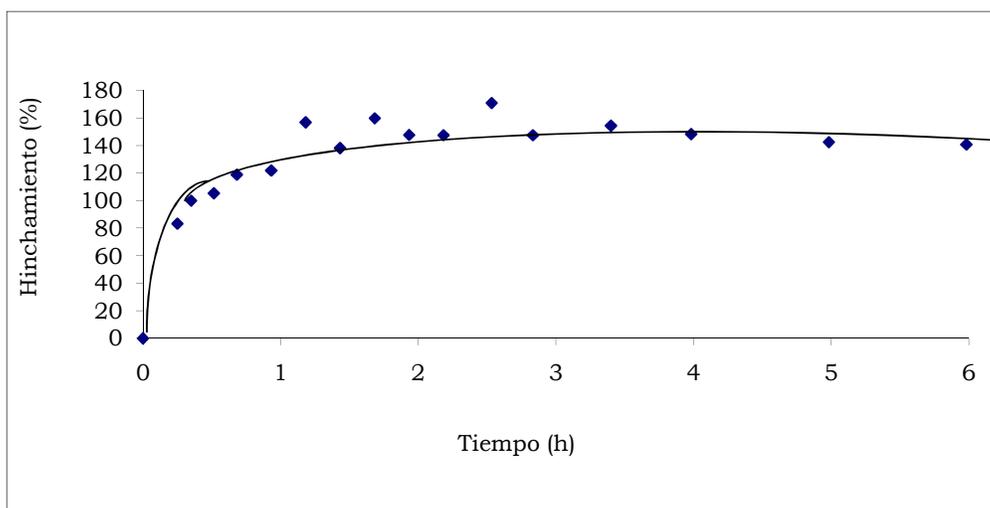


Gráfico 5.4.1. Hinchamiento límite del injerto PTFE-Ác. Acrílico. Citrato de sodio 0.75M, 21°C (99.8% de injerto; 10kGy; 2.23kGy/h).

El tiempo de hinchamiento límite para las películas de PTFE injertadas únicamente con ácido acrílico se determinó en alrededor de 2.5 horas (Gráfico 5.4.1.), en tanto que para películas con un injerto binario de N-iPAAM y Aac., el tiempo es de alrededor de dos horas para lograr el mismo efecto en la película (Gráfico 5.4.2.).

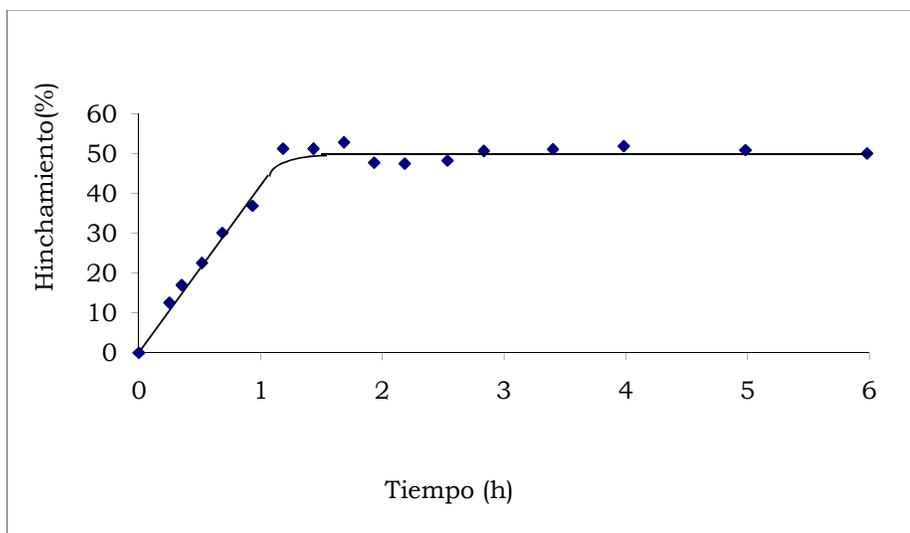


Gráfico 5.4.2. Hinchamiento límite Injerto PTFE-Ác. Acrílico-N-isopropilacrilamida. Citrato de sodio 0.075M, 21°C (40.3% de injerto; 10kGy; 2.23kGy/h).

5.5. Efecto de la proporción de monómeros en el % de injerto de NIPAAm/AAc en películas de PTFE.

La relación de monómeros vinílicos en solución tiene un efecto probado sobre los porcentajes de injerto en películas de PTFE, sin embargo, estudios previos determinaron que la relación de concentración no tiene efecto en la proporción de cada monómero que se adiciona a las cadenas injertadas, en nuestro sistema.

Dado que se pretende obtener una cantidad máxima posible de ácido acrílico injertado en las películas, para lograr inmovilización a través de grupos -NH_2 , mediante la reacción propuesta, y que la relación monomérica no cambia, se tendrá un número máximo de grupos -COOH , cuando se tenga un porcentaje máximo de injerto.

En la figura 5.5 puede apreciarse el comportamiento del sistema reactivo al modificar la relación de monómeros en solución, resaltando que la condición, para la cual el porcentaje de injerto es máximo, es 1:1, con soluciones 3M de cada una de las soluciones y final de 6M.

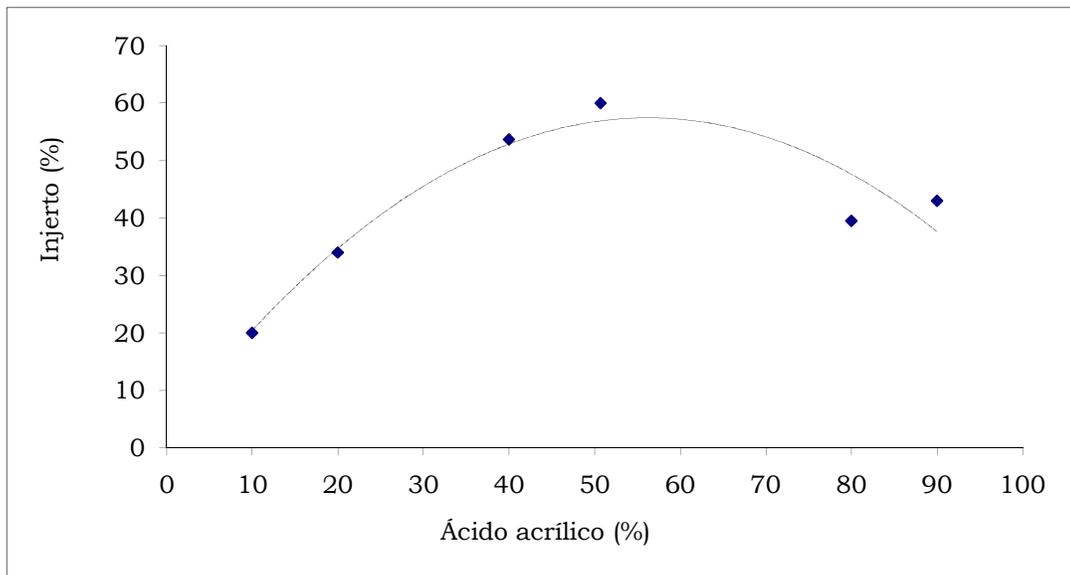


Figura 5.5. Efecto de la proporción de monómeros en el % de injerto de NIPAAm/AAC en películas de PTFE (24h, 50°C, 6M)

5.6 Activación de grupos -COOH.

La activación de los grupos -COOH por medio de una derivatización con hidrocloreuro de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida soluble en agua ocurre en un valor de temperatura de 2°C, y un pH de 4.52, condición fijada por medio de una solución de citrato de sodio .075M. El tiempo necesario para que la reacción entre la carbodiimida y los grupos -COOH se lleve a cabo es menor de treinta minutos. Del gráfico 5.6.1. es posible apreciar que no

existen diferencias significativas, cuando los tiempos de activación se modifican de 30 a 60 minutos, sobre la cantidad de proteína enlazada covalentemente a las películas injertadas.

El empleo de albúmina de huevo de gallina como modelo para inmovilización presenta ventajas dignas de consideración, entre ellas destaca la ausencia de agentes dispersantes, es decir que la preparación es completamente soluble; presenta residuos de triptófano en sus cadenas polipeptídicas, lo que permite cuantificarla fácilmente por absorción en una longitud de onda de 280 nm; posee residuos de lisina a través de los cuales reaccionar covalentemente; y finalmente tiene un bajo costo, entre otras.

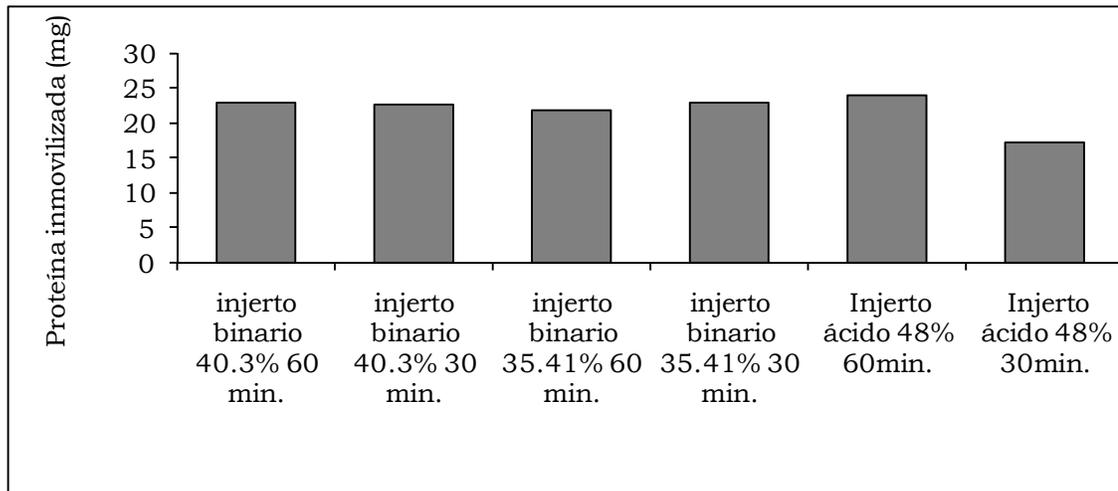


Figura 5.6.1. Efecto del tiempo de activación con carbodiimida soluble en agua en la cantidad de proteína inmovilizada en películas de PTFE injertadas.

La cuantificación de la proteína inmovilizada se hizo espectrofotométricamente empleando la ley de Lambert y Beer, aprovechando la absorción que presentan en 280 nm los residuos de

triptofano. La curva de calibración construida, gráfico 5.6.2., exhibe una región lineal con un elevado coeficiente de correlación. Los valores de proteína inmovilizada se obtuvieron determinando la absorción de las soluciones de proteína antes y después de la inmersión durante 24h en 2°C, de las películas injertadas con los grupos -COOH activados.

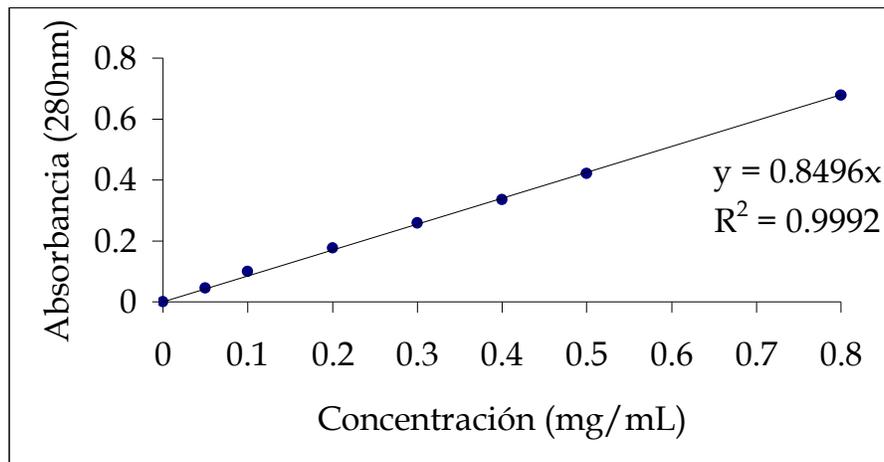


Figura 5.6.2. Curva patrón de albúmina de huevo de gallina en citrato de sodio 0.075M.

5.7. Efecto del porcentaje de injerto sobre la cantidad de proteína inmovilizada

Los valores máximos de NIPAAm/AAC que se lograron injertar en películas de PTFE están alrededor de 60%. Como ya se ha mencionado anteriormente la cantidad de proteína que puede inmovilizarse dependerá de la cantidad de grupos -COOH disponibles para ser atacados nucleofílicamente, de donde se desprende fácilmente que el porcentaje de injerto tiene que jugar un

papel importante sobre la cantidad de proteína que puede fijarse covalentemente a la matriz soporte.

La composición de las proteínas no es constante, sino que cada una presenta composición y forma diferentes, lo cual influye en la cantidad de proteína que pueda ser inmovilizada en determinada matriz. El empleo de albúmina de huevo de gallina como proteína modelo en los ensayos de inmovilización responde a la necesidad de una proteína capaz de ser inmovilizada a través de grupos $-NH_2$, la cual pueda conocerse directamente por algún método físico, químico o fisicoquímico.

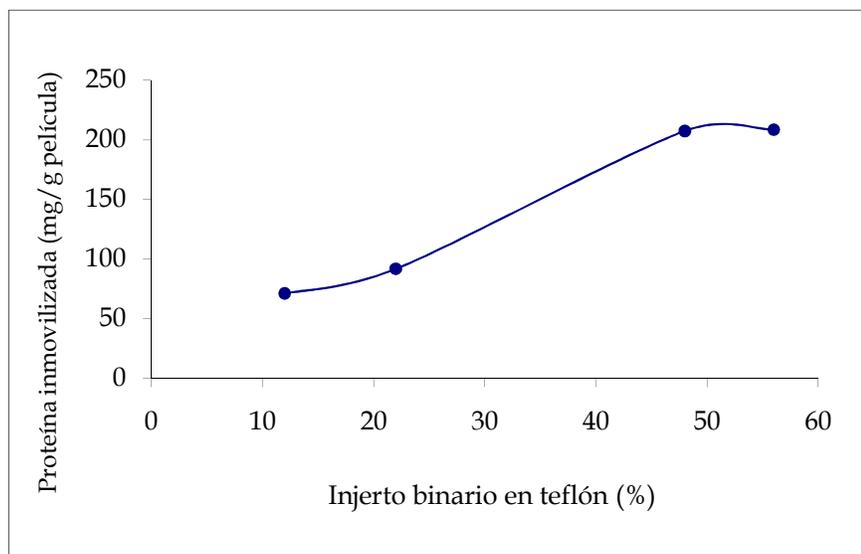


Figura 5.7. Efecto del % de injerto en las cantidades de proteína inmovilizada (AHG)

Se desea resaltar de la gráfica 5.7., que en los valores máximos de % de injerto que se alcanzan con el método de preirradiación oxidativa, las cantidades máximas de proteína inmovilizada (empleando albúmina de huevo de gallina como modelo), que se

logran obtener, están alrededor de 200mg por cada gramo de película injertada.

5.8. Efecto del pH en la enzima inmovilizada

Uno de los parámetros más importantes de una enzima es el pH óptimo, valor en el cual la actividad es máxima. Como efecto de la inmovilización puede ocurrir que la actividad relativa de las formas libre e inmovilizada varíe, ocurriendo un incremento –o decremento- en diferentes valores de pH.

En nuestro sistema, empleando invertasa de levadura, el valor óptimo de las formas libre e inmovilizada no varía, teniendo un máximo en 4.5, pero la curva que se genera tiende a aplanarse para la forma inmovilizada, con respecto a la de la forma libre en valores comprendidos en el intervalo 3.0-6.0.

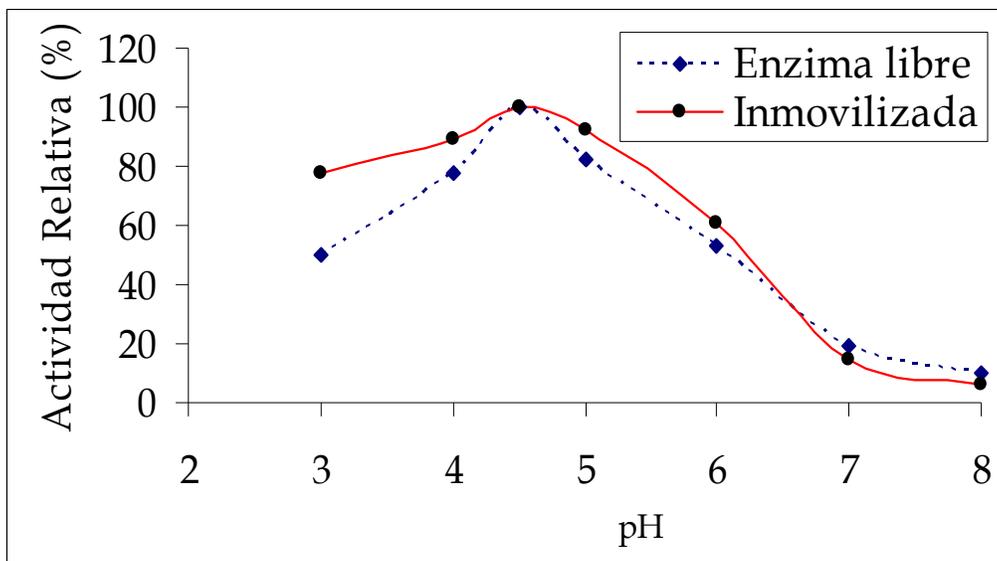


Figura 5.8. Actividades relativas de las formas libre e inmovilizada de invertasa como función de pH (película 70.30% de injerto, 10 min)

5.9 Efecto del % de injerto en la cantidad de enzima inmovilizada

Como consecuencia directa del % de injerto podemos apreciar en la gráfica 5.9.1. la actividad de dos películas diferentes, una con

70.30% de injerto y la segunda con 19.20% de injerto. La cantidad de enzima que se haya inmovilizado en cada película se debe al número de sitios que ofrece cada una de ellas a las moléculas de enzima, más particularmente a los grupos $-NH_2$ de los residuos de aminoácidos, es decir, a la cantidad de grupos $-COOH$ del injerto binario, pudiendo apreciarse una actividad proporcional al % de injerto de las películas.

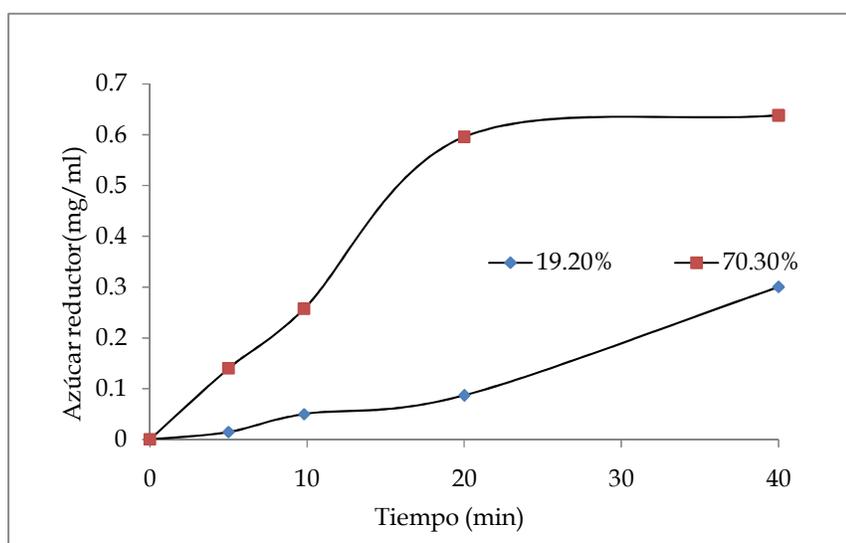


Figura 5.9.1. Efecto del % de injerto binario en la actividad de invertasa en dos películas con 70.3 y 19.2% de injerto

CAPÍTULO 6.0

Conclusiones

La preirradiación oxidativa es un método eficiente para activar PTFE e iniciar injertos al insertar grupos peróxido en las cadenas de PTFE.

La preirradiación oxidativa, si bien activa al PTFE, es un agente fuertemente destructivo para la estructura del polímero, ya que a dosis bajas, como 10kGy, se pierde alrededor del 50% de las propiedades mecánicas del teflón.

Se logró injertar ácido acrílico en porcentajes cercanos al 70%, trabajando con soluciones 3M del monómero, en atmósfera inerte y en tiempos de reacción superiores a 10 horas. Los porcentajes de injerto tan bajos que se obtienen se deben a que se trata de un método de preirradiación y no a una irradiación directa.

Al injertar AAC./N-IPAAm en PTFE los porcentajes no superan el 50%.

El sistema presenta un hinchamiento límite en citrato de sodio, a 21°C, al cabo de dos horas, tanto cuando se trata del sistema AAc-PTFE, como AAc./ NIPAAm-PTFE. Cabe señalar que la curva de hinchamiento presenta una pendiente más pronunciada cuando se trata del injerto binario.

El porcentaje de monómeros en solución tiene efecto en el % de injerto. Se alcanza un máximo cuando la relación monomérica es 1:1, en solución acuosa 3M de cada uno de estos.

Se logró inmovilizar covalentemente albumina de huevo de gallina como proteína modelo, empleando una carbodiimida soluble en agua como

activador de grupos –COOH y cuantificando la proteína inmovilizada por absorción UV directa de soluciones de albúmina, antes y después de exponerse a películas de los diferentes injertos.

Se logró probar el efecto del porcentaje de injerto sobre la cantidad de proteína inmovilizada, siendo el valor máximo de injerto de albúmina de huevo de gallina de cerca de 200mg por gramo de película injertada.

La invertasa de *Saccaromyces cerevisiae* fue inmovilizada covalentemente, observándose que no existe cambio en el pH óptimo de las formas libre e inmovilizada. Se conserva alrededor del 60-70% de la actividad de la forma libre una vez que es inmovilizada.

Existe una dependencia entre la cantidad de enzima inmovilizada y el porcentaje de monómeros injertados: a mayor porcentaje de injerto, mayor cantidad de enzima inmovilizada.

Se cumplieron todos los objetivos planteados para la tesis, desarrollando un nuevo sistema soporte para la inmovilización de biomoléculas, partiendo de monómeros vinílicos y una película de PTFE, y mediante el uso de la técnica de preirradiación oxidativa de la misma. Es posible apreciar que el sistema es capaz de emplearse en aplicaciones biotecnológicas con buenos resultados.

CAPÍTULO 7.0

Bibliografía

- Arroyo, M., 1998. *Ars. Pharmaceutica*, 39:2
- Chapiro, A., 1962. *Radiation Chemistry of polymeric systems*. Interscience publishers. Gran Bretaña.
- Charlesby, A., 1960. *Atomic Radiation and Polymers*. Pergamon Press LTD. Gran Bretaña.
- Erginer., R., Toppare, L., Alkan, S., & Bakir, U. 2000. *Reactive & Functional Polymers*. 45, 227-233
- Farhataziz and Rodgers, M. A. J. 1987. *Radiation Chemistry Principles and applications*. VCH Publishers. New York, USA.
- Fried., J. R. 2003. *Polymer Science and technology*. Prentice Hall PTR.
- Forsythe, J. S., Hill D. J. T. *Progress in polymer science*. 2000; 25, 101:136.
- Gil, E. S., Hudson, S. M. *Progress in Polymer Science* 2004; 29:1173-1222.
- Groves, R., *Candy Industry*. 1998; 163, 10: 18.
- Hoffman, A., S., 1995. *Macromol. Symp.* 98, 645-664
- Kang, I. K., Kwon. B. K., Lee, J. H. & Lee, H. B., *Biomaterials*. 14:10
- Mohy Eldin, M. S., et al. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzimatic /* 1999; 251-261.
- Navarrete, J., & Cabrera, L., 1993. *Introducción al estudio de los radiosótopos*. México. Ed. UNAM. México D. F.

-
-
- Oshima, A., Tabata, Y., Kudoh, H., Seguchi, T. Radiation Physical Chemistry. 1995; 45-2; 269-273.
 - Rabeck, J. 1983. Experimental methods in polymer chemistry. Wiley interscience publication pp 483-486.
 - Sthilman, M. I., Immobilization on polymers. 1993. VSP, Utrecht, The Netherlands.
 - Takeuchi, S., Omodaka, I., Hasegawa, K., Maeda, Y., y Kitano, H., 1993 Makromol. Chem. 194, 1991-1999
 - Ivanov., V. S., New concepts in polymer science. Radiation Chemistry of polymers, 1992. VSP. Utrecht, The Netherlands.
 - Woods R. J. and Pikaev A. K., 1994. Applied Radiation Chemistry: Radiation Processing. John Wiley & Sons, Inc. New York.
 - Wingard, L. B., 1972. Enzyme Engineering, Interscience Publishers, New York.
 - Wingard, L.B., Katchalski-Katzir, E. and Goldstein L., 1976 Applied Biochemistry and Bioengineering. Vol 1 Immobilized Enzyme principles. Academic Press London.
 - Woods, R. & Pikaev, A., 1994, Applied radiation Chemistry: Radiation processing. USA. John Wiley & sons.