



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**MODIFICACION DE MEMBRANAS DE PVDF MEDIANTE RADIACION GAMMA COMO
SISTEMA DE LIBERACION DE FARMACOS CON RESPUESTA AL pH**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. GETHZEMANI MAYELI ESTRADA VILLEGAS

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. EMILIO BUCIO CARRILLO
ISNTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. RAFAEL HERRERA NÁJERA
FACULTAD DE QUÍMICA

Dr. ALBERTO RUÍZ TREVIÑO
UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA

MÉXICO, D.F. DICIEMBRE 2013



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.

Agradecimientos

Agradezco enormemente a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Químicas por la educación recibida.

Al Instituto de Ciencias Nucleares por brindarme un espacio en donde desenvolver este trabajo.

Al Dr. Emilio Bucio Carrillo por su dirección en este trabajo, los consejos y el apoyo brindado.

Al Dr. Ryann Donnelly de la Queen's University por tenerme la confianza de albergarme en su laboratorio. Su ayuda fue de gran valor en la culminación de este proyecto.

A mi jurado:

Presidente	Dra. Alicia Negrón Mendoza
Vocal	Dr. Mikhail Zolotukhin
Vocal	Dr. Francisco Alberto Ruiz Treviño
Vocal	Dra. Flora Adriana Ganem Rindero
Secretario	Dr. Juan Manuel Navarrete

Por su dedicación al leer la tesis y sus recomendaciones para mejorarla.

A la Dra. Susana Castillo donde quiera que se encuentre, por haberme transmitido el amor a la investigación, por su calidez humana, por cada vez me hizo una corrección para mejorar y por haberme brindado su amistad.

Al Fis. Francisco García y al M. en C. Benjamín Leal del ICN-UNAM por el apoyo técnico en la irradiación de las muestras.

Este trabajo fue apoyado por DGAPA-UNAM IN202311, CONACYT-CNPq 174378, y "Red iberoamericana de nuevos materiales para el diseño de sistemas avanzados de liberación de fármacos en enfermedades de alto impacto socioeconómico" (RIMADEL), CYTED 211RT0423. También se recibió el apoyo de CONACYT con la beca escolar 223432.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Macromoléculas del Departamento de Química de Radiaciones y Radioquímica del Instituto de Ciencias Nucleares de la Universidad Nacional Autónoma de México.

También se realizó una estancia de investigación en el Departamento de Pharmaceutical Sciences and Practice de la School of Pharmacy en la Queen's University; Belfast, Irlanda del Norte del Reino Unido.

Este trabajo se presentó en los siguientes congresos

Participación oral

Congreso Nacional de polímeros. Sociedad Polimérica de México. Tijuana México. 2010.

Tercer congreso de la Sociedad Mexicana de Membranas. Zacatecas México 2012.

Participación poster

Peaceful Uses of Nuclear Energy. National Institute for Nuclear Research ININ. Toluca Estado de México 2011.

Second meeting of posgraduate in UNAM. . México D.F. 2012.

International Symposium on Ionizing Radiation and Polymers. Cracow Poland 2012.

QIMIUNAM 2013. México DF 2013.

Y produjo el trabajo

Comparative study of grafting a polyampholyte in a fluoropolymer membrane by gamma radiation in one or two-steps G.M. Estrada-Villegas and E. Bucio. Radiation Physics and Chemistry 92 (2013) 61–65.

Dedicatorias

Ninguna cosa tiene sentido en el mundo si las cosas que hacemos las hiciéramos sin dedicárselas a aquél que nos mira y nos cuida desde los cielos.

Este trabajo no sería el mismo sin el amor y apoyo de mi esposo Giovanni, a tí amor que le has dado otro sentido a mi vida. Gracias.

A mis amados Padres que aún cuando he crecido sigo siendo su niña. Los amo Ismael y Rita.

A mis queridos hermanos Ailin, Jamin, Esaú e Israel que me quieren tanto y aún en los tiempos difíciles me hacen reír.

A todas las personas que contribuyeron con un consejo, una sonrisa o una palabra de ánimo para poder concluir este trabajo.

Contenido

Resumen

Summary

Índice de abreviaturas

Introducción

Justificación

Hipótesis

Objetivo

Antecedentes

I-IX

Capítulo 1. Generalidades

1. Polímeros. Características generales	1
1.1 Polímeros estímulo responsivos	2
<i>1.1.1 Tipos y características</i>	2
2. Injerto	3
2.1 Creación de las superficies de injerto	3
<i>2.1.1 Reacciones poliméricas de acoplamiento</i>	4
<i>2.1.2 Polimerización por injerto de monómeros</i>	4
2.2 Formas de obtener los injertos	4
<i>2.2.1 Factores que afectan a los injerto por radiación</i>	6
2.3 Síntesis de copolímeros de injerto por radiación ionizante	8
<i>2.3.1 Técnicas para producir Injerto mediante radiación ionizante</i>	9
3. Interacción de la radiación con la materia y los polímeros	12
3.1 Efectos químicos de la radiación en los polímeros	13

4. Liberación de fármacos a partir de polímeros estímulo responsivos

(PER)	15
4.1 Sistemas modulados de liberación	15
4.1.1 <i>Sistemas de liberación sensibles a la temperatura</i>	15
4.1.2 <i>Polímeros sensibles al pH en la liberación de fármacos</i>	16
4.1.3 <i>Sistemas poliméricos sensibles a la fuerza iónica</i>	17
4.1.4 <i>Sistemas sensibles a campo magnético</i>	17
4.1.5 <i>Sistemas sensibles a campo eléctrico</i>	18
4.2 pH en el cuerpo y la acción de los polímeros	18
4.2.1 <i>pH</i>	18
4.2.2 <i>Mecanismos de control en la liberación de fármacos por medio de polímeros</i>	19
5. Sistemas de liberación de fármacos en piel	20
5.1 Tipos de difusión	20
5.2 Criterios de elección de un polímero como sistema liberador de fármacos	23
5.3 Estructura, función y tratamiento tópico de la piel humana	23
5.3.1 <i>Liberación de fármacos en piel</i>	24

Capítulo 2. Desarrollo experimental

1. Materiales y reactivos	25
1.1 Materiales	25
1.2 Reactivos	27
1.2.1 <i>Fármacos</i>	27
2. Desarrollo experimental	28
2.1 Síntesis de los copolímeros binarios	28
2.1.1 Primer paso	28
2.1.2 Segundo paso	29
2.2 Caracterización de las membranas	30
2.2.1 <i>Caracterización mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)</i>	30
2.2.2 <i>Caracterización mediante Análisis Termogravimétrico (TGA)</i>	31

2.2.3	<i>Caracterización mediante Infrarrojo (FT-IR)</i>	31
2.2.4	<i>Análisis de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)</i>	31
2.2.5	<i>Rompimiento a la tracción</i>	31
2.2.6	<i>Angulo de contacto</i>	31
2.3	Determinación del pH crítico	32
2.3.1	<i>Hinchamiento Límite.</i>	32
2.3.2	<i>Preparación de los amortiguador de intervalo 2 a 12</i>	32
2.3.3	<i>pH crítico</i>	33
2.3.4	<i>Estudio de reversibilidad</i>	34
2.4	Carga y liberación de fármacos	34
2.4.1	<i>Curva de calibración de cafeína, lidocaína y 5-ALA</i>	34
2.4.2	<i>Carga de los fármacos estudio</i>	35
2.4.3	<i>Liberación de los de 5-ALA y cafeína</i>	37

Capítulo 3 Resultados

1.	Síntesis de los copolímeros binarios	39
1.1	Primer paso	39
1.1.1	<i>Síntesis de PVDF-g-AAc</i>	39
1.1.2	<i>Síntesis de PVDF-g-DMAEMA</i>	42
1.2	Segundo Paso	45
1.2.1	<i>Síntesis de (PVDF-g-DMAEMA)-g-AAc</i>	45
1.2.2	<i>Síntesis de (PVDF-g-AAc)-g-DMAEMA</i>	50
2.	Caracterización de las membranas	51
2.1	Caracterización mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	51
2.2	Caracterización mediante Análisis Termogravimétrico (TGA)	51
2.3	Caracterización mediante Infrarrojo (FT-IR)	52
2.4	Análisis de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	54
2.5	Rompimiento a la tracción	54
2.6	Angulo de contacto	55
3.	Determinación del pH crítico	56
3.1	Hinchamiento Límite	56

3.2 Determinación de pH crítico	57
3.3 Estudio de reversibilidad al pH	60
3.4 Sensibilidad al pH	62
4. Carga y liberación de fármacos	62
4.1 Curva de calibración, carga y liberación de cafeína	62
4.1.1 Curva de calibración	62
4.1.2 Carga de cafeína	64
4.1.3 Liberación de cafeína	65
4.2 Curva de calibración, carga y liberación de 5-ALA	66
4.2.1 Calibración de 5-ALA	66
4.2.2 Carga de ala pH 9, pH5 membrana pre tratada y agua	67
4.2.3 Carga de ala e hidrogel de Gantrez®	69
4.2.4 Liberación de 5-ALA	70
Conclusiones	73
<hr/>	
Referencias	75
<hr/>	

Resumen

Se llevó a cabo la síntesis de los injertos de N,N-dimetil aminoetil metacrilato (DMAEMA) sobre membranas de polifloruro de vinilideno (PVDF) PVDF-g-DMAEMA además de injertos de ácido acrílico (AAc) sobre PVDF; PVDF-g-AAc y del injerto binario de (PVDF-g-DMAEMA)-g-AAc en dos pasos individuales usando una fuente de radiación gamma (^{60}Co) mediante los métodos directo y pre irradiación oxidativa. Los injertos se realizaron sobre membranas DURAPORE[®] (PVDF) de tamaño de poro 0.22 y 0.45 μm . Ciertas condiciones como concentración de monómero, dosis, solvente, tiempo y temperatura de reacción fueron estudiadas. Las membranas obtenidas fueron caracterizadas mediante técnicas de análisis como Espectroscopía de Infrarojo (IR-ATR), Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Análisis Termogravimétrico (TGA), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), y se determinó la propiedad mecánica de rompimiento a la tracción. Las membranas modificadas con diversos porcentajes de injerto y tamaño de poro fueron sometidas a pruebas de hinchamiento en agua y amortiguador para determinar tanto su tiempo de hinchamiento máximo como su pH crítico. También se realizaron estudios de reversibilidad y sensibilidad al pH. Por último, se realizó la carga y liberación de cafeína y 5-ALA variando el pH, el tamaño de poro y el porcentaje de injerto de AAc a partir de membranas de injerto binario con ~100% de DMAEMA.

Summary

The synthesis of the grafted PVDF-g-DMAEMA, PVDF-g-AAc and binary graft (PVDF-g-DMAEMA)-g-AAc in two steps using a source of gamma radiation (^{60}Co) were carried out by direct and oxidative pre-irradiation method. The grafts were performed on DURAPORE[®] PVDF membranes pore size and 0.45–0.22 μm , certain conditions such as monomer concentration, dose, solvent, reaction time and temperature were studied. The obtained films were characterized by analytical techniques such as Infrared Spectroscopy (IR-ATR), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermogravimetric Analysis (TGA), Scanning Electron Microscopy (SEM), and Tensile stress. Films modified with various percentages of grafting and pore size were tested for swelling in water and buffer to determine both maximum swelling time and critical pH. Studies were also conducted on reversibility and pH sensitivity. Finally, we performed the loading and release of 5-ALA and caffeine varying the pH, the pore size and percentage of AAc grafted in membranes from binary graft with graft percentage of $\sim 100\%$ DMAEMA.

Índice de abreviaturas

(¹³⁷Cs)	Cesio 137
(5-ALA)	Acido 5- aminolevulínico
(⁶⁰Co)	Cobalto 60
(DHPY)	Dihidro ciclopirazina
(DMAEMA)	N,N-dimeti amino etil metacrilato
(DSC)	Calorimetría diferencial de barrido
(EU)	Endotoxinas bacterianas
(G)	Rendimiento radioquímico
(HPLC)	Cromatografía líquida de alta resolución
(IR-ATR)	Infrarrojo de reflectancia atenuada
(kGy)	Kilo Gray
(LCST)	Temperatura crítica baja de solución
(LIC)	Límite inferior de cuantificación
(LID)	Límite inferior de detección
(MA)	Anhídrido maléico
(MAAc)	Acido metacrílico
(M_B)	Monómero B
(MeV)	Mega electronvolts
(NIPAAm)	N-isopropil acrilamida
(P_A)	Polímero A
(PAN)	Poli acrilonitrilo
(PE)	Polietileno
(PER)	Polímero estímulo responsivo
(PET)	Tereftalato de polietileno
(pH_c)	pH crítico
(PHEMA)	poli 2- hidroxí metacrilato
(PP)	Polipropileno
(PVDF)	Fluoruro de polivinilideno
(PY)	Pirazina
(SEM)	Microscopía electrónica de barrido
(SNC)	Sistema nervioso central
(T_g)	Temperatura de transición vítrea
(TGA)	Análisis termo gravimétrico
(T_m)	Temperatura de fusión
(TPM)	Tripropilén glicol metil éter
(UV-VIS)	Ultravioleta visible
(Yg %)	Porcentaje de injerto

Introducción

Es conocido que desde hace 50 años se usa radiación de alta energía para obtener copolímeros de injerto. Una excelente descripción de este trabajo fue descrito por Chapiro en 1962 en su monografía clásica. La radiación puede interactuar con la materia orgánica y otras moléculas para producir radicales libres, cationes y aniones. Una metodología para producir copolímeros de injerto es la creación de centros activos por irradiación en la cadena de un polímero previamente sintetizado [Chapiro, 1962]. Esta estrategia permite la generación de radicales libres en la base polimérica, a la cual se le agregan monómeros que se injertan y propagan, generando así un copolímero de injerto.

Algunas de las tecnologías que han sido introducidas para la modificación de superficies, es la de modificar la química de los polímeros, de esta forma las nuevas funcionalidades introducidas permiten modificar la hidrofiliidad, hidrofobicidad, biocompatibilidad, conductividad, superficies con dureza, superficies con rugosidad, adhesión, lubricación y propiedades antiestáticas o bien generar polímeros de injerto estímulo sensibles [Roy and Gupta, 2003].

Los materiales poliméricos estímulo sensibles responden con un cambio considerable en su volumen a pequeños cambios en su entorno. Los estímulos ambientales incluyen la temperatura, pH, productos químicos, y la luz. Entre las ventajas potenciales que ofrecen estos materiales están el de resolver problemas biológicos, como bioseparación, liberación de fármacos, el diseño de biosensores o la ingeniería de tejidos [Schmaljohann, 2006].

Ciertos monómeros injertados en matrices poliméricas, pueden proveer de funcionalidades estímulo-responsivas para crear nuevos materiales, tal como el injerto de PoliNIPAN en PVDF [Fan et al., 2006].

La síntesis del polielectrolito de poli(AAc) (que exhibe un pH crítico de 4.0 a 4.8) [Bruining et al., 2000] y poli(DMAEMA) (que es una polibase cuyo pH crítico se encuentra alrededor de 8.0 en solución neutra o básica) [Aoki et al., 1994] sobre PVDF puede funcionar como un acarreador y liberador de fármacos neutros o con carga como la cafeína, o bien el ácido 5-aminolevulinico (5-ALA) este último es un fármaco utilizado para el tratamiento de ciertos desórdenes de piel incluyendo carcinoma de células basales, células escamosas y queratosis actínica [Fonseca et al., 2004]. Este tipo de fármacos son capaces de atravesar la piel y por tanto es posible dosificarlos de manera controlada a través de la misma mediante un dispositivo transdérmico con respuesta al pH. El injerto de dos monómeros de naturaleza ácida y básica sobre una matriz biocompatible genera un novedoso material sensible al pH en un intervalo cercano al pH fisiológico que no se observa con el

injerto de los monómeros por separado, además de generar una estructura afin a los fármacos antes mencionados, mismos que pueden interactuar fuertemente a través de cargas electrostáticas con el material.

En este trabajo se modifica una película de PVDF injertando sobre ella dos monómeros pH sensibles utilizando como iniciador de reacción a una fuente de rayos gamma de ^{60}Co , el material sintetizado tiene una respuesta ante el estímulo externo del pH y es capaz de cargar y liberar fármacos con carga electrostática ante ese estímulo, algunos de alta importancia en materia de salud como el 5-ALA. Este material ayudará en el estudio, innovación y mejoramiento de las formas farmacéuticas tal como el parche transdérmico o bien en síntesis de materiales para el diagnóstico.

Justificación

Actualmente la forma de administración más común para 5-ALA es la tópica en formulación de cremas y suspensiones. Sin embargo, tiene algunos inconvenientes ya que no se controla la velocidad de administración y suele ser incómoda para el paciente puesto que se coloca con la ayuda de un vendaje oclusivo rígido auxiliado de terapia fotodinámica.

La síntesis de este nuevo material, se convertirá en un posible candidato a sustituir estas formulaciones y generar en un futuro una de las formas farmacéuticas más cómodas y seguras conocidas, que es el parche transdérmico.

La capacidad de cargar y liberar un fármaco como respuesta ante el estímulo de cambio de pH de una matriz polimérica flexible y biocompatible, permite que la administración de los mismos sea más controlada y cómoda. Es posible la liberación de 5-ALA en piel para el tratamiento de cáncer de piel de células basales y epidermoide por este método de administración, debido a que la mayoría de estos tumores cancerosos tienden a disminuir su pH por debajo del valor fisiológico del tejido normal, haciendo este método más selectivo.

Uno de los problemas de salud pública que más afectan a la ciudad de México es el aumento de la incidencia en casos de personas que adquieren algún tipo de cáncer de piel, siendo el más frecuente el carcinoma de células basales, debido a la exposición prolongada de la radiación UV.

Hipótesis

La funcionalización de de la matriz polimérica de PVDF con el injerto de DMAEMA y AAc cambiará las propiedades fisicoquímicas de la misma y presentará respuesta al pH en un intervalo de 6.5 a 7.4. Será posible cargar la matriz modificada con ALA y fármaco modelo (cafeína) por medio de interacciones iónicas y liberarlo *in vitro* para su posible aplicación en el tratamiento de cáncer de piel, esto será posible gracias a la naturaleza y afinidad tanto de la matriz como del fármaco. La proporción en porciento de injerto de los monómeros permitirán manipular el pH de respuesta del copolímero así como la velocidad de liberación.

Objetivo

Sintetizar un copolímero de injerto binario utilizando radiación gamma. Este copolímero presentará respuesta al pH para su aplicación en la liberación de fármacos modelo como la cafeína además del fármaco de 5-ALA. Se utilizarán películas de PVDF como matriz, a la cual se le injertará DMAEMA y AAc. Se estudiará el pH crítico de respuesta del injerto a partir de la obtención del copolímero. La caracterización del sistema de injerto se realizará por calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis termogravimétrico (TGA), espectroscopia de infrarrojo (FTIR-ATR), microscopia electrónica de barrido (SEM) e hinchamiento.

Antecedentes.

El presente trabajo tiene como precedente la modificación de una película de polipropileno con DMAEMA y AAc realizada en el trabajo de maestría y debido a su funcionalidad y respuesta al pH se decidió darle una aplicación farmacéutica realizando un cambio de matriz a una membrana de PVDF con mejores propiedades de biocompatibilidad.

Los parámetros previos para la modificación de PVDF mediante radiación gamma, fueron realizados por Qi Liu en 2006 cuando injertó N-isopropil acrilamida (NIPAAm) en membranas DURAPORE de PVDF [Liu et al., 2007], Liu determinó las condiciones de injerto de un monómero termosensible para su posible aplicación en la liberación de fármacos en el cuerpo humano, por otro lado Fan Q. y Tabary N. realizaron por separado la modificación de membranas de PVDF injertando por métodos químicos diversos monómeros, funcionalizando los poros de la misma para liberar un antibiótico llamado clorexidina usado en el tratamiento de infecciones bucales. Así pues la funcionalización de esta membrana hizo posible la liberación de fármaco a través de la respuesta de la temperatura bucal del cuerpo humano [Fan et al., 2006; Tabary et al., 2007].

Previamente Clochard en 2004 sintetizó un injerto de AAc de sobre una membrana de PVDF por la técnica de electrones acelerados y describió los pasos a seguir para obtener altos porcentajes de injerto, también realizó la cuantificación del monómero formando complejos de inclusión con cobre [Clochard et al., 2004]

Más tarde en 2007 Jouni Karppi sintetizó el mismo injerto de PVDF-g-AAc con membranas DURAPORE usando un acelerador de electrones en condiciones oxidativas [Karppi et al., 2007]. Con esta membrana estudió la separación de fármacos de naturaleza ácida y básica tales como el diazepam o la doxepina respectivamente, diferentes hormonas como la albúmina, esto con el fin de obtener un material capaz de retener ciertos fármacos y poder separarlos de fluidos biológicos tales como el suero sanguíneo o la orina y obtener una membrana auxiliar en el diagnóstico y separación de fármacos. En ese mismo año Karppi desarrolló otra membrana con DMAEMA para obtener el injerto de PVDF-g-DMAEMA y así realizar el estudio anterior con 48 fármacos de naturaleza ácida y básica, llegando a la conclusión de que la membrana de PVDF-g-AAc separa de manera más eficaz a los fármacos de naturaleza básica y la membrana de PVDF-g-DMAEMA retiene fuertemente a los fármacos de naturaleza ácida. Todo esto depende del pH en el que se encuentre la membrana y la carga electrostática del fármaco (positiva o negativa). Así pues Karppi determinó que la membrana de PVDF modificada con AAc actúa como una membrana de intercambio catiónico y la modificada con DMAEMA es una membrana de intercambio aniónico [Karpi et al.,

2007]. La liberación de los fármacos atrapados por las membranas la realizó cambiando el ambiente de pH de la membrana.

En se mismo año Loo-teck N. sintetizó un material mediante fotocurado de poli (2-hidroxietil metacrilato) (PHEMA) con UV incluyendo en la síntesis una cantidad conocida de tres moléculas modelo; (cafeína neutro, azul de metileno básico y amarillo de metanilo ácido) [Loo-Teck and Kheng-Seong, 2008]. Este material incluía en un segundo paso una capa de los monómeros de AAc y DMAEMA de composición variable esperando obtener un poli anfólito pH responsivo en ambientes ácidos y básicos. Evaluó la respuesta de las tres moléculas modelo en la liberación en un ambiente ácido y básico alternado. El resultado que obtuvo fue que tanto la molécula neutra como la básica mostraron una respuesta ante la liberación en diversos ambientes, pero la molécula ácida no presentó un buen perfil de liberación. Además que la forma de sintetizar el material genera problemas con las propiedades mecánicas ya que se trataba de un hidrogel rugoso que también afecta la biocompatibilidad del material para aplicaciones en diagnóstico o bien tecnología farmacéutica.

En 2010 en el trabajo de maestría, se desarrolló el sistema del doble copolímero de injerto de polipropileno (PP) que presumía mejores propiedades mecánicas y así, con ese precedente y los antecedentes mostrados arriba se decidió realizar el mismo sistema de injerto pero cambiando la película de PP por la de PVDF DURAPORE ampliamente usada en biotecnología como membrana de filtración de soluciones biológicas.

En el año 2005 y 2006 Paul McCarron y Rayan Donnelly desarrollaron parches a partir de materiales biodegradables no estímulo sensibles para liberar 5-ALA que a cierto intervalo de pH es un anfólito, sin embargo el control de la liberación no fue óptimo, además que el porcentaje de fármaco liberado después de 6 horas es cercano al 50 %. [McCarron et al., 2006; Donnelly et al., 2006]

Todos éstos factores nos llevaron a plantear el desarrollo una membrana de intercambio iónico pH sensible de PVDF para obtener (PVDF-g-DMAEMA)-g-AAc, investigar las posibles rutas de síntesis usando como iniciador una fuente de rayos gamma, caracterizarla, estudiar su respuesta ante el pH además de cargar y liberar un fármaco tipo anfólito y uno neutro, evaluar su capacidad de retención y liberación para posibles aplicaciones en tecnología farmacéutica o bien en la separación de analitos.

Capítulo 1

Generalidades

1.-Polímeros. Características Generales

Los polímeros son macromoléculas (generalmente orgánicas) formadas por la unión de moléculas más pequeñas llamadas monómeros. Su estructura molecular corresponde a cadenas compuestas de pequeñas moléculas unidas por enlaces químicos covalentes, las cuales pueden ser iguales o diferentes.

Los polímeros sintéticos se preparan mediante la reacción de monómeros o sus derivados bajo condiciones controladas. Cuando se emplea solo un monómero, el resultado es un homopolímero, pero cuando se usan dos monómeros diferentes o más se obtiene un copolímero.

Todos los polímeros se componen de una cadena principal larga aunque también existen polímeros ramificados que contienen otras largas cadenas unidas en donde existen diversos puntos de la cadena principal. Otros tipos de polímero son los entrecruzados en diversas y pequeñas cadenas unidas comúnmente por enlaces covalentes [Fried, 2003; Campbell, 2003]. Una estructura un poco más reciente son los copolímeros de injerto a los que nos enfocaremos más adelante.

1.1 Polímeros estímulo responsivos

1.1.1 Tipos y características

Los polímeros sintéticos han sido clasificados en diferentes categorías basados en sus propiedades químicas y aplicaciones en diversas áreas, esos polímeros llamados estímulo responsivos tienen la habilidad de responder en cambios ligeros en su ambiente que los rodea. La singularidad de estos materiales no solo reside en los rápidos cambios macroscópicos que se producen en su estructura sino en la habilidad de ser reversibles. Las respuestas son manifestadas en uno o más de las siguientes propiedades: forma, características de la superficie, solubilidad, transición sol-gel entre otras. Y otras transiciones pueden ser iniciadas debido a un cambio en el pH, aumento de la fuerza iónica, presencia de metabolitos químicos, formación de un complejo polianion-polication, cambios en los campos eléctrico y magnético, fuerzas de luz o radiación.[Kumara et al., 2007] (Fig. 1.1). Estos estímulos físicos como la temperatura o los campos eléctrico y magnético pueden alterar interacciones moleculares en sus puntos críticos, se someten a cambios rápidos y reversibles en su microestructura por ejemplo de un estado hidrofílico a hidrofóbico, una adecuada proporción de hidrofobicidad e hidrofiliicidad es requerida en la estructura molecular del polímeros para que pueda ocurrir una transición de fase.

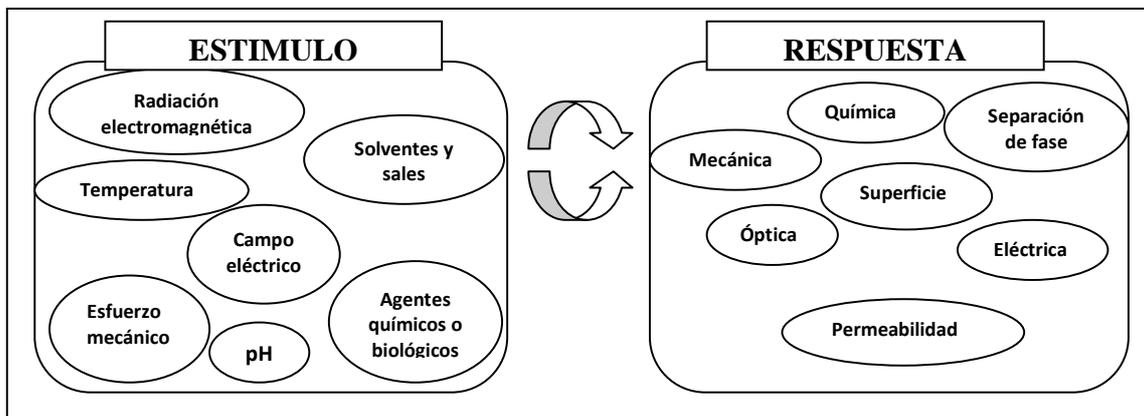


Fig. 1.1. Potenciales respuestas y estímulos de los polímeros sintéticos

Los polímeros sensibles a la temperatura exhiben una temperatura crítica de solución baja o (LCST), donde la fase de separación es inducida por un aumento en la temperatura. Polímeros con esta característica, son térmicamente inducidos a una transición de fase reversible donde a bajas temperaturas son solubles en agua pero insolubles a temperaturas por encima de la LCST. La LCST corresponde a la región en el diagrama de fases en el cual la contribución entálpica de los puentes

de hidrogeno de la cadena polimérica, comienza a ser menor que la ganancia entrópica del sistema. En principio es posible mover la LCST de un polímero como se desee con la variación de los grupos hidrofílico o hidrofóbico de un co-monómero. La LCST específica de los polímeros termosensibles muestra potenciales aplicaciones en la bioingeniería y la biotecnología.

Por otro lado en los típicos polímeros pH sensibles, los eventos de protonación-desprotonación ocurren y definen la carga sobre la molécula (generalmente grupos carboxilo o amino) y esto depende fuertemente del pH, otros tipos de polímeros estímulo responsivos como ciertos geles se hinchan y colapsan como una respuesta ante un campo eléctrico o magnético.

Estos polímeros responsivos tienen numerosas aplicaciones como sistemas de liberación de fármacos, bioseparación, cromatografía y cultura celular. Algunos sistemas han sido combinados para generar dos o más mecanismos estímulo responsivos en un sistema polimérico, por ejemplo ciertos polímeros sensitivos pueden responder a cambios en el pH. Dos o más señales pueden ser simultáneamente aplicadas para producir una respuesta llamada responsiva dual. Estímulos bioquímicos han sido considerados como otra estrategia la cual involucra respuestas a antígenos, enzimas y agentes bioquímicos [Galaev and Mattiasson, 1999; Roy and Gupta, 2003].

Los polímeros estímulo responsivos pueden ser clasificados en tres categorías de acuerdo a su forma física:

- i) Cadenas lineales libres en solución. Donde el polímero se somete a un colapso reversible después de que un estímulo externo es aplicado
- ii) Geles entrecruzados covalentemente que pueden ser cadenas macro o microscópicas en la que sus cadenas tienden a hincharse en un solvente
- iii) Superficies de injerto donde la superficie del polímero se hincha o colapsa reversiblemente convirtiendo la interfase de hidrofílica a hidrofóbica cuando un parámetro externo específico es modificado.

2.- Injerto

2.1 Creación de las superficies de injerto

Existen dos formas para producir el injerto. Esquemáticamente se muestra en la Fig. 1.2, la reacción directa de acoplamiento y la polimerización por injerto de monómeros. Cada una de estas tiene sus ventajas y sus desventajas.

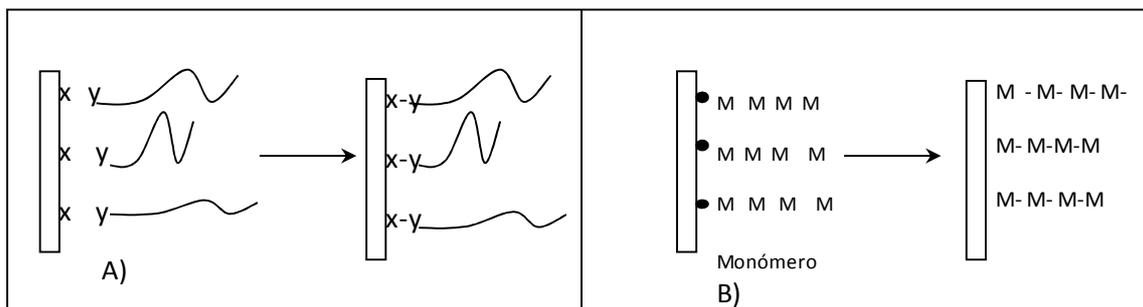


Fig. 1.2 Creación de superficies de injerto. A) Reacción de acoplamiento. B) Injerto por monómero.

2.1.1 Reacciones poliméricas de acoplamiento

Si la superficie del polímero a ser modificada posee grupos reactivos capaces de combinarse con otros compuestos, tales como moléculas poliméricas hidrofílicas, la modificación de polímero puede ser conducida por reacciones de acoplamiento. Numerosas síntesis de acoplamiento son posibles, por ejemplo Bergbreiter revisó varias tecnologías y métodos analíticos asociados con la modificación química de polímeros. Kramer propone expresiones de cinética de injerto de grupos funcionales terminales de fusión a interfaces reactivas asumiendo que la energía libre de reacción es grande y negativa. Kishida inmoviliza directamente cadenas de polietilenglicol en superficie de celulosa por esterificación [Uyama et al., 1998].

2.1.2 Polimerización por injerto de monómeros

Existe una gran variedad de métodos para esta técnica en diferentes sustratos que han sido reportados, los métodos incluyen polimerización química e injerto por el uso de radiación de alta energía o el uso de agentes oxidantes, para este último se puede usar ozono, tratamientos ácidos y radiación de alta energía [Uyama et al., 1998].

2.2 Formas de obtener los injertos

Los recursos energéticos más comúnmente usados en la obtención de injerto por radiación son electrones de alta energía, radiación gamma los rayos X, ultravioleta (UV) y la luz visible, también es empleada la modificación química. La radiación con electrones acelerados, la radiación gamma y los rayos X clasifican como radiación ionizante. El estudio de los efectos químicos causados por la radiación ionizante se llama química de radiaciones. La radiación ionizante no es selectiva y

produce un gran número de moléculas excitadas y ionizadas. El estudio de los efectos químicos producidos por luz UV- visible se conoce como fotoquímica en donde la adsorción de un fotón causa excitación en la molécula reactante y a este fenómeno usualmente se le conoce como estado electrónico excitado. La diferencia principal entre radiación ionizante y fotoquímica es que la energía de ionización es mucho mayor que la empleada en fotoquímica.

A continuación se muestra la consistencia de cada uno de los métodos utilizados para la obtención de un injerto [Chan, 1994].

- a) Modificación química directa: los materiales poliméricos como el polipropileno (PP), el poliacrilonitrilo (PAN) y el nylon pueden ser oxidados por inmersión en una solución de agentes oxidantes como el peróxido de potasio bajo un burbujeo de nitrógeno a altas temperaturas.
- b) Ozono: las películas de PET, PP y PE pueden ser pre tratadas con ozono para introducir grupos peróxido en su superficie y poder injertar ácido acrílico o bien sulfonato estireno de sodio para obtener un injerto auxiliado con la técnica de UV cercano.
- c) Electrones acelerados: polímeros de metacrilato de metilo y ácido acrílico pueden ser injertados en polietileno de alto peso molecular, después de un tratamiento con electrones acelerados.
- d) Descarga de luz: los plasmas de baja temperatura han sido extensivamente aplicados para la modificación de las propiedades superficiales de un polímero, la energía involucrada va de 0.5 a 5 eV y esta genera un gran número de fragmentos moleculares cargados y neutros.
- e) Descarga de Corona: el tratamiento por descarga de corona es más simple que descarga de luz, sin embargo el tratamiento por corona puede generar un gran daño a la película de polímero y las condiciones de descarga son más difíciles de controlar que el tratamiento por plasma. Este tratamiento se hace generalmente en condiciones de presión reducida. El propileno isotáctico es más fácil de oxidar cuando posee una alta cristalinidad y bajo esta técnica es posible injertar acrilamida.
- f) Irradiación UV: el uso de irradiación con UV puede ser un excelente método para obtener injertos porque es simple y limpio, además es capaz de producir foto químicamente estados triplete en compuestos carbonílicos por ejemplo que pueden abstraer un átomo de hidrógeno de algunos sustratos. Altas concentraciones de especies activas pueden producirse localmente entre el sustrato y la solución de monómero. Además de la simplicidad del procedimiento el costo del recurso de energía es más bajo que la ionización de alta energía.

g) Rayos gamma (γ): Este tipo de energía induce el injerto por los siguientes métodos 1) Método directo, 2) Método de pre irradiación y 3) Método de pre irradiación oxidativa, los tres anteriores se explicaran a detalle más adelante. La Fig. 1.3, muestra un esquema de los diferentes métodos de modificación de superficies.

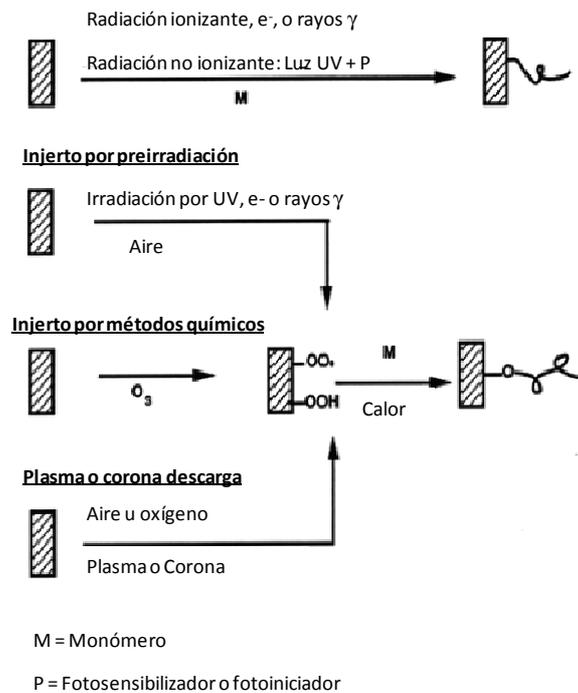


Fig. 1.3 Varios métodos de obtención de injerto

2.2.1 Factores que afectan a los injerto por radiación

a) Naturaleza de la cadena principal (matriz)

Como el injerto involucra la formación de un enlace covalente de la cadena polimérica con un monómero la naturaleza de la cadena principal juega un rol importante en el proceso. La matriz debe interactuar de manera adecuada con el solvente, es decir, debe favorecer la difusión del mismo. Se sabe que la cristalinidad del polímero decrece conforme aumenta el grado de sustitución y como la cristalinidad disminuye, el estado desordenado facilita la formación del injerto. Los polímeros amorfos son más susceptibles a la formación de injerto debido a la movilidad de los mismos y al desorden, por tanto mientras más amorfo, más aumenta la velocidad de injerto. Existen diversos reportes que muestran que la composición química de la matriz es importante, ya que la naturaleza de grupos funcionales que acompañen a la matriz puede aumentar o disminuir el grado de injerto, ya que algunos interactúan con los monómeros mientras que otros lo impiden estéricamente.

b) Efecto del monómero.

Así como la naturaleza de la matriz, la reactividad del monómero es importante en el injerto, la reactividad del monómero depende de varios factores como la naturaleza estérica y polar, la concentración y la capacidad para difundirse. El injerto proveniente de la mezcla de monómeros es un proceso más complejo que el injerto de un solo monómero, por los efectos sinérgicos de las diferencias de la reactividad de los monómeros. La estructura del monómero también es importante en la reactividad, por ejemplo si el monómero forma un radical estable o no, la movilidad del monómero en la solución puede reducirse si el monómero contiene más grupos metileno u otros grupos que aumenten su volumen.

Se ha publicado que la eficiencia del injerto mejora cuando la concentración del monómero aumenta, sin embargo tiene un límite y en este punto el injerto comienza a decrecer conforme la concentración aumenta. Este comportamiento puede reflejar un incremento inicial de la concentración del monómero en las proximidades de la cadena principal, después a cierto límite, el aumento en la concentración del monómero favorece la reacción de homopolimerización sobre la de injerto.

c) Efectos del disolvente.

En los mecanismos de injerto el disolvente es el medio en el cual los monómeros son transportados hacia la cadena. La elección del disolvente depende de diversos parámetros tales como, la solubilidad del monómero, las propiedades de hinchamiento de la matriz, la miscibilidad de los disolventes si se usa más de uno y la generación de radicales libres en presencia de estos disolventes.

La eficiencia del injerto en una solución dependerá de la reactividad relativa del monómero y el solvente en competencia por los radicales inducidos en la matriz del polímero, aunque también será importante controlar los parámetros de densidad y viscosidad del solvente para que éste pueda acercar los monómeros al polímero aumentando su movilidad. La penetración de los solventes en la película aumenta con el tratamiento de la temperatura y el tiempo.

Para el mecanismo de injerto, la generación de los radicales libres en el solvente es muy importante además de la formación de los radicales libres en la matriz o en el monómero. Por ejemplo algunos porcentajes de injerto son mayores cuando se realizan en disolventes orgánicos que cuando se elige al agua, debido a que algunos disolventes orgánicos forman menos radicales en el medio.

d) Efecto de la temperatura.

La temperatura es uno de los factores más importantes en el control de la cinética de injerto. En general el rendimiento del injerto se incrementa cuando aumenta la temperatura hasta que se alcanza cierto límite, un factor de esto puede ser que el proceso de difusión monomérica en la matriz es rápido con el aumento de la temperatura.

El aumento inicial en el injerto se debe a la descomposición de los peróxidos formados como resultado de la irradiación en la matriz polimérica en aire cumpliendo el requisito de radicales disponibles para el injerto. El subsecuente decremento es debido al aumento del movimiento molecular con el aumento de la temperatura, resultando en un decaimiento del número de radicales. Una observación interesante es que el máximo rendimiento de injerto tiene lugar a una temperatura cercana a la temperatura de transición vítrea. Para temperaturas por debajo de temperatura de transición vítrea T_g los radicales formados en las cadenas poliméricas reaccionan débilmente debido a una reducción en la difusión del monómero, considerando que para T por encima de T_g el número de radicales disponibles disminuirá con el incremento de la temperatura y con ello la combinación de los radicales del monómero causará en un bajo rendimiento de injerto [Bhattachayra and Misra, 2004 ; Stannett, 1990].

2.3 Síntesis de copolímeros de injerto por radiación ionizante

La radiación ionizante como los electrones de alta energía, rayos X y rayos gamma puede desplazar electrones de átomos y moléculas produciendo iones. En general, la radiación ionizante pueden clasificarse en dos categorías radiación: ionizante directa y radiación ionizante indirecta. Ejemplos de la primera categoría incluyen las partículas α , partículas β electrones y protones, este tipo de radiación ionizante posee una carga eléctrica y suficiente energía cinética para producir ionización través de interacciones coulombicas con los electrones del material irradiado. Los rayos X y γ son ejemplos de radiación ionizante indirecta que no produce ninguna ionización sobre la materia irradiada pero interacciona de una manera que produce efectos similares a los de la radiación ionizante directa.

Las fuentes de radiación ionizante industriales y más comunes son electrones de alta energía (0.1-10 MeV) y fuentes de cobalto 60 (~ 1.25 MeV). La radiación gamma se usa para estudios fundamentales utilizando dosis bajas con penetración profunda. Los haces de electrones de 0.1 a

varios MeV son usados para irradiación de dosis altas y altas velocidades de ionización en diversos procesos industriales, con una penetración de varios milímetros en el material [Navarrete y Cabrera, 1993].

2.3.1 Técnicas para producir Injerto mediante radiación ionizante

Se sabe que desde hace 50 años se usa radiación de alta energía para obtener copolímeros de injerto. Una excelente descripción de este trabajo fue descrito por Chapiro en 1962 en su monografía clásica [Chapiro, 1962]. Debido a que la radiación puede interactuar con la materia para producir radicales libres, cationes y aniones.

En un inicio los copolímeros de injerto pueden formarse por la unión de dos diferentes cadenas de polímero. La otra alternativa ha sido la creación de centros activos en la cadena de polímero por irradiación y la reacción de esos centros con monómeros, los cuales se van propagando para formar el injerto y así cadenas de diferentes estructuras. Los radicales libres pueden encontrarse solo como intermediarios reactivos.

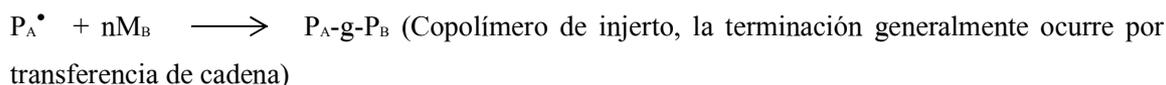
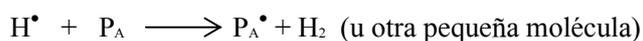
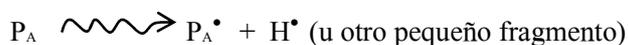
Tres métodos estándar de injerto fueron desarrollados tempranamente y hoy en día se siguen utilizando. Esos son el mutuo, directo o simultáneo, la pre irradiación ó consecutiva y la pre irradiación oxidativa o en aire. Las reacciones de injerto en sí mismas pueden ser llevadas a cabo en solución, sin embargo los rendimientos pueden llegar a ser bajos. Muchos estudios de injerto por radiación se han trabajado de manera heterogénea, es decir, la cadena principal es un sólido tal como una película, mientras que el monómero se encuentra en estado líquido o vapor.

El proceso heterogéneo presenta grandes ventajas y beneficios comparados con trabajar en el estado gel. El copolímero de injerto está formado por la existencia de una matriz polimérica, a la cual se le otorgan características específicas del polímero que se forma a través del monómero. La reacción de injerto presenta una difusión controlada y las reacciones de polimerización abren la posibilidad de restringir el injerto solo a superficies. Sin embargo, un cambio correcto en la condiciones el injerto solo se pueden obtener uniformemente alrededor de una película o una fibra.

a) Método de pre irradiación

En este método la cadena principal del polímero P_A es irradiada en ausencia de oxígeno (aire) antes de la exposición al monómero M_B el cual puede estar en forma líquida o en vapor, si el polímero es semicristalino o por debajo de su temperatura de transición vítrea, los radicales formados por la

radiación serán capaces de reaccionar con el monómero para formar la cadena de injerto. Las reacciones que ocurren se resumen a continuación:



El monómero M_B necesita incluir un solvente que permita hinchar a la matriz para facilitar la difusión en la misma P_A en los sitios activos del sustrato y los radicales libres.

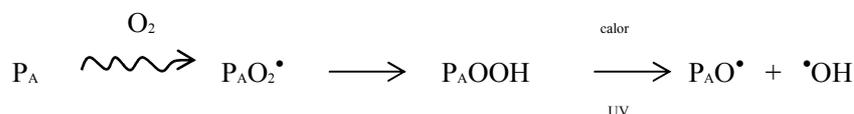
Una ventaja de este método es que un acelerador de electrones puede ser usado como una etapa para irradiar un sustrato alimentado por una línea de operación directamente hacia el monómero. Esto ha demostrado en una planta piloto con polietileno (PE) como P_A y ácido acrílico (AAc) como M_B . El PE ha sido satisfactoriamente injertado en película y en forma de polvo. Una segunda ventaja es que prácticamente cualquier monómero vinílico o dieno reactivo puede ser injertado a diferencia de cuando se usa el método directo. El sustrato de polímero en otras palabras debe ser capaz de atrapar los radicales por el suficiente tiempo para que se forme el injerto de manera eficiente. Debe notarse que cuando se generan los radicales libres en el polímero después de la irradiación, estos pueden comenzar a decaer por recombinación. Es por ello necesario diseñar un procedimiento en el cual se llegue a una concentración de radicales libres máxima y usarlos en ese periodo de tiempo.

Una desventaja de este método es que, a diferencia del método directo, esta técnica no tiene protección para el polímero, el monómero y el agente de hinchamiento. Esto puede provocar la degradación, entrecruzamiento u otros cambios en el polímero. Una segunda desventaja es que este proceso es muy susceptible a la presencia de aire, lo que puede tornarse en un factor importante, ya que conduce a la formación de peróxidos que pueden usarse en el inicio de nuevo injerto.

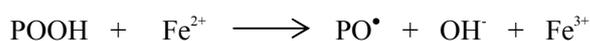
b) Método de Pre irradiación oxidativa.

Aquí el polímero es irradiado en presencia de aire para producir peróxidos e hidroperóxidos, estos grupos que son relativamente estables pueden ser descompuestos en contacto del monómero para producir el injerto. Si los hidroperóxidos son la mayor especie, entonces los radicales hidroperóxido formados pueden llevar a la homopolimerización.

Las reacciones se describen a continuación.



Si inicialmente los radicales peróxido reaccionen entre sí, se producen peróxidos P-OO-P, esta formación es estable y no produce homopolimerización. Si se agrega un agente reductor al monómero, la homopolimerización es mínima debido a la siguiente reacción:



Este método como el de pre irradiación presenta ventajas y desventajas; es posible adaptarlo a la irradiación por electrones acelerados. La degradación del polímero puede ser considerablemente más pronunciada en presencia de aire, sin embargo, esta técnica evita el uso de gas inerte durante la irradiación.

Una diferencia muy eficiente entre los dos métodos es que la pre irradiación en aire genera radicales peróxido que inician la reacción de injerto, pero el método de pre irradiación puede llevarse a cabo inclusive a temperatura ambiente.

c) *El método directo*

En este procedimiento el polímero P_A es irradiado en contacto con el monómero M_B , el cual está presente ya sea en forma vapor o en solución. La irradiación puede llevarse a cabo en presencia de aire o de mejor manera bajo atmósfera inerte y conduce directamente a la formación de radicales libres en el polímero P_A y el monómero M_B , que dan como resultado el copolímero de injerto. Este es el método de injerto más eficiente, en donde los radicales pueden reaccionar más rápidamente tal como son producidos, sin embargo los rendimientos de homopolímero formado, pueden ser apreciables. Especies iónicas pueden iniciar el injerto vía método directo y el mecanismo es análogo a las ecuaciones que envuelven intermediarios iónicos positivos y negativos. Las ecuaciones relevantes son las siguientes:



El método directo es el más eficiente pero tiene un buen número de limitaciones. El primer conflicto es que está limitado solo a ciertos pares de polímero monómero. Por ejemplo, si el polímero P_A tiene un buen rendimiento en radicales, es decir tienen un alto número de radicales formados (G) y el valor que tiene el monómero M_B en radicales el bajo entonces se producirá poca cantidad de homopolímero y mayor de injerto. Un buen ejemplo de esto es el par polietileno estireno. Si en el caso contrario se tiene un par cuyo monómero forma mucho homopolímero, entonces el polímero quedara prácticamente inafectado. Un buen ejemplo de esto es el sistema ácido acrílico polietileno, donde se produce mucho poliácido acrílico, al contrario que si se usara este par por el método de pre irradiación y pre irradiación oxidativa. Este problema del método directo se ha solucionado parcialmente adicionando un inhibidor a la solución de monómero lo cual lleva a la reducción del homopolímero. Si un disolvente o un agente de hinchamiento necesitan usarse, deben buscar cuidadosamente ya que el disolvente puede generar radicales que pueden predominar y dirigir el proceso hacia la homopolimerización. Un camino eficiente para evitar el problema del homopolímero en el método directo es agregar el monómero en forma de vapor, ya que la reacción se absorbe de acuerdo a la densidad.

La intensidad de dosis tiene importantes efectos en esta técnica, a altas intensidades las cadenas crecen rápidamente y de igual manera terminan y se obtienen bajos rendimientos de injerto, por esa razón se prefieren las fuentes de cobalto ^{60}Co o cesio ^{137}Cs .

Disolventes o agentes de hinchamiento se agregan normalmente para aumentar la difusión del monómero y alcanzar una uniformidad en el injerto. Algunos disolventes han sido usados para restringir el injerto y reducirlo a ciertas superficies. Esta técnica ha sido empleada por ejemplo para obtener adhesivos, en estas situaciones también conviene usar la tecnología de electrones acelerados [Stannett, 1990; Hegazy et al., 2001].

3.- Interacción de la radiación con la materia y los polímeros

La radiación γ carece de carga eléctrica por lo que no puede ser desviada por campos eléctricos o magnéticos, esto permite que la radiación penetre grandes espesores de material, además de ionizar indirectamente a los materiales que encuentra en su trayectoria. Al irradiar una material se arrancan

electrones produciendo la ionización de los átomos constituyentes, el proceso se repite hasta que la radiación se interrumpa de alguna manera.

Durante la irradiación de los polímeros con radiación ionizante una gran parte de la energía se transfiere al medio a través de electrones secundarios formados por la radiación primaria, consecuentemente los efectos químicos producidos en los polímeros por la radiación ionizante son esencialmente idénticos.

Existen tres tipos de interacciones importantes durante la irradiación de los materiales con los fotones de alta energía: la formación de pares, el efecto Compton y el efecto fotoeléctrico. La probabilidad de que cada uno de esos efectos ocurra, depende de la energía de irradiación y del material a través del cual está pasando [Chan, 1994].

3.1 Efectos químicos de la radiación en los polímeros

La irradiación de polímeros con radiación ionizante puede causar varios efectos químicos como el entrecruzamiento y la degradación, además del injerto y la polimerización en presencia de un monómero (Figura 1.4).

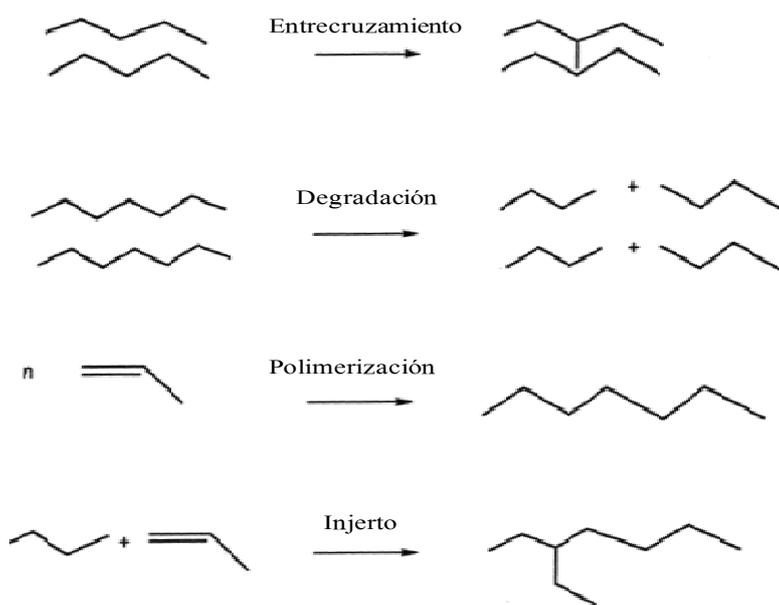
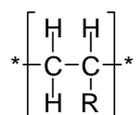
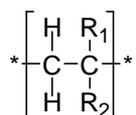


Fig. 1.4. Efectos químicos causados por la irradiación de polímeros.

Charlesby y Lawton observaron que algunos polímeros pueden degradarse y otros se pueden entrecruzar dependiendo de su estructura química, cuando son expuestos a un haz de electrones o a radiación gamma. Aunque los procesos toman lugar simultáneamente, el entrecruzamiento puede dominar en polímeros que generalmente poseen la siguiente estructura:



El polipropileno, poliestireno, la goma natural y las poliamidas tienden a entrecruzarse más que a degradarse, mientras que los polímeros que se degradan con mayor preferencia poseen la siguiente estructura:



Ejemplos de estos polímeros son, poliisobutileno, poli(metacrilato de metilo), politetrafluoroetileno y celulosa.

El injerto de un monómero vinilo en un polímero puede llevarse a cabo por irradiación simultánea o por pre irradiación del polímero seguido por la exposición del monómero. Cuando se usa la radiación ionizante para el injerto la degradación o el entrecruzamiento pueden ocurrir de manera simultánea, y estos factores también afectan al sustrato y causando una disminución en el rendimiento [Chan, 1994].

4.-Liberacion de fármacos a partir de polímeros estímulo responsivos (PER).

4.1 Sistemas modulados de liberación

En estos sistemas, la liberación del fármaco se controla mediante estímulos externos tales como temperatura, pH, fuerza iónica, campo eléctrico, radiación electromagnética o radiación UV, etc. Los PER que responden a estos estímulos externos se pueden utilizar como dispositivos de liberación controlada [Bajpai et al, 2008].

4.1.1 Sistemas de liberación sensibles a la temperatura

La temperatura es la señal más utilizada en el desencadenamiento para la administración de una variedad de fármacos. El uso de la temperatura como una señal ha sido justificado por el hecho de que la temperatura real del cuerpo a menudo se desvía del valor fisiológico (37 ° C) en presencia de agentes patógenos o pirógenos. Esta desviación puede ser un estímulo útil para activar la liberación de agentes terapéuticos de diversos sistemas de liberación de fármacos sensibles a la temperatura, para diversas enfermedades que vienen acompañadas por fiebre.

El suministro de fármacos sistemas sensibles a la temperatura utilizan las propiedades de diversos polímeros, incluyendo la transición térmica reversible de las moléculas del polímero, el cambio al hinchamiento de las redes entrecruzadas, la temperatura de transición vítrea (Tg) y el punto de fusión (Figura 1.5).

Por conveniencia, los PER sensibles a la temperatura tienen temperatura crítica de solución baja (LCST) por sus siglas en ingles la cual puede ser definida como la temperatura crítica por debajo del cual el polímero se hincha en la solución y por encima de ella, el polímero se contrae.

Por debajo de la LCST, el término entálpico, relacionado con el enlace de hidrógeno entre el polímero y las moléculas del agua, es responsable del hinchamiento del polímero. Cuando la temperatura se eleva por encima de la LCST, el término entrópico (que son las interacciones hidrofóbicas) dominan, lo que lleva a polímero a contraerse [Traitel et al., 2008]

Una estrategia común para modificar el valor de la LCST de un polímero, es la incorporación de unidades hidrofóbicas a la cadena principal del polímero en cuestión.

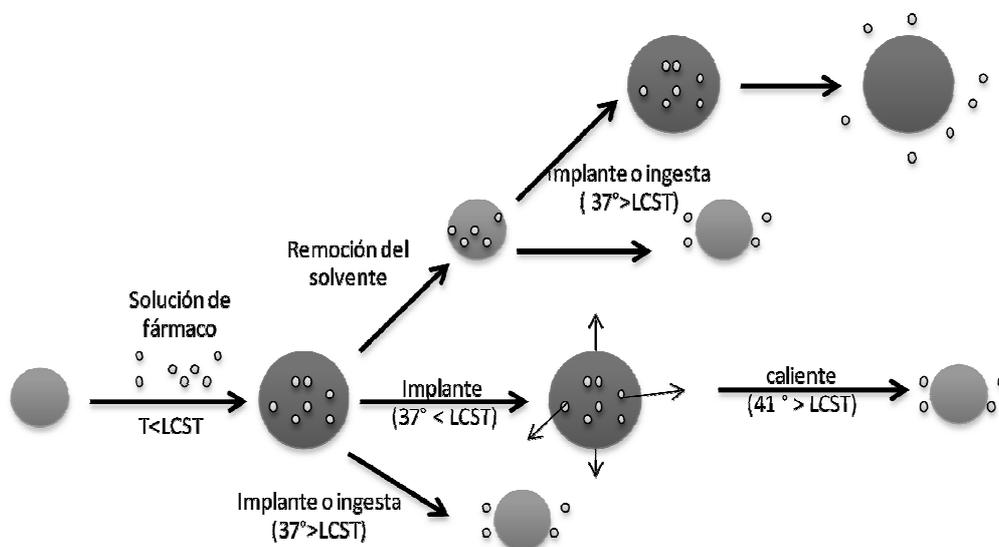


Fig. 1.5 Propiedades de los sistemas sensibles a la temperatura usados como rutas de liberación por los fármacos.

4.1.2 Polímeros sensibles al pH en la liberación de fármacos

Un polielectrolito es una macromolécula que se disocia para dar iones poliméricos que se disuelven en agua o en otro disolvente ionizante. Debido a la repulsión entre las cargas en la cadena de polímero, ésta se expande cuando se ioniza en un disolvente adecuado. Sin embargo, si el disolvente impide la ionización del polielectrolito, la cadena permanece en un estado compacto [Schmaljohann, 2006]. La interacción entre la energía de superficie hidrófoba y la repulsión electrostática entre cargas dicta el comportamiento del polielectrolito. Puesto que el grado de ionización de un polielectrolito débil es controlado por el pH, y la composición iónica del medio acuoso, los PER pH responsivos cambian drásticamente su conformación en respuesta a cambios en el pH del medio acuoso. Todos los PER sensibles al pH contienen grupos colgantes ácidos o básicos que aceptan o donan protones en respuesta al pH del medio [Bartil et al., 2007]. El hinchamiento de un PER aumenta a medida que hay una aumento externo en el pH del medio en el caso de polímeros que contienen grupos ácidos débiles (aniónicos), pero disminuye si el polímero contiene grupos básicos débiles (catiónicos) o bien zwitterionicos si poseen ambos grupos en la misma cadena.

Los polímeros ionizables con un valor de pK_a entre 3 y 10 son candidatos para ser sistemas pH sensibles. Ácidos y bases débiles como los ácidos carboxílicos, el ácido fosfórico y las aminas, representan respectivamente un cambio en el estado de ionización e la variación del pH. Esto conduce a un cambio conformacional, afecta la solubilidad de los polímeros y el comportamiento del hinchamiento de los hidrogeles, cuando esos grupos ionizables están vinculados en la estructura del polímero.

Los monómeros clásicos son el ácido acrílico (AAc), el ácido metacrílico (MAAC) el anhídrido maléico (MA) y el dimetilaminoetilmacrilato (DMAEMA), pero también los polímeros que contienen derivados del ácido fosfórico se han sintetizado para este fin. El comportamiento de hinchamiento y colapso de los sistemas pH sensibles se ha usado para controlar la liberación de compuestos modelo, tales como la cafeína, drogas como la indometacina o proteínas catiónicas como el lisosoma. El diseño de las poliamidoaminas es ligeramente diferente, ya que combinan cargas positivas y negativas dentro del esqueleto del polímero.

4.1.3 Sistemas poliméricos sensibles a la fuerza iónica.

Cuando la fuerza iónica de la solución aumenta, los PER pueden intercambiar iones con la solución. Al hacerlo, los mantienen la neutralidad de carga y la concentración de iones libres dentro del polímero aumenta, esto provoca una diferencia de la presión osmótica entre el polímero y la solución, promoviendo el hinchamiento del polímero. Cuando la fuerza iónica se incrementa a niveles altos (1-10M), el polímero se contrae. Esto se debe a la disminución de la presión osmótica entre el polímero y la solución (Figura 1.6).

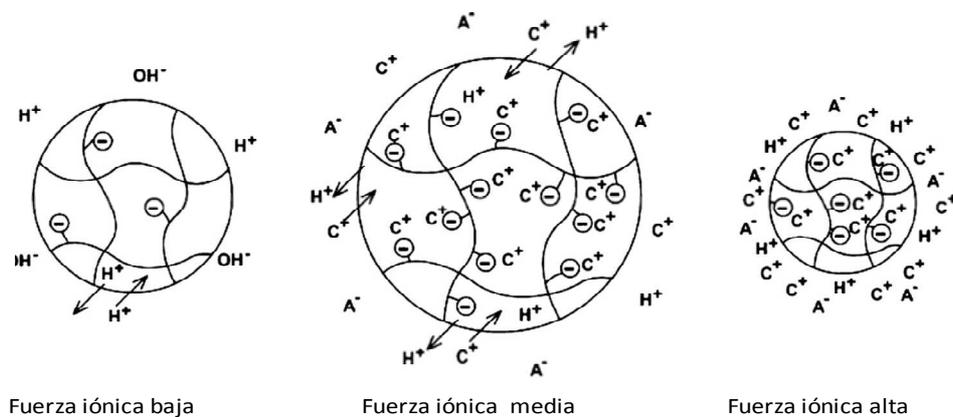


Fig. 1.6 Influencia de la fuerza iónica en la liberación de fármacos

4.1.4 Sistemas sensibles a campo magnético.

El magnetismo tiene una profunda influencia en los organismos vivos. La hemoglobina en la sangre que contiene hierro es magnética. Bacterias magnetotácticas son quizás los primeros organismos vivos que orientan su campo magnético con el de la tierra. Ahora hay pruebas sustanciales de que todos los seres vivos, incluyendo animales y seres humanos, contienen partículas que actúan como receptores magnéticos [Bahadur et al., 2003]. La combinación de partículas finas y el magnetismo en el campo de la biología y de los biomateriales ha encontrado sofisticadas aplicaciones biomédicas tales como la separación de células y la liberación de fármacos.

Pankhurst y sus colaboradores [Pankhurst et al., 2003] estudiaron los principios físicos subyacentes a algunas aplicaciones biomédicas actuales de nanopartículas magnéticas, es decir, la física relevante de los materiales magnéticos y sus respuestas a campos magnéticos aplicados. Los investigadores estudiaron la forma en que estas propiedades son controlados con referencia a (a) la separación magnética de células marcadas y otras entidades biológicas, (b) métodos de radio frecuencia para el catabolismo de los tumores mediante hipertermia, y (c) agentes de mejora de imagen de resonancia magnética.

4.1.5 Sistemas sensibles a campo eléctrico.

Sistemas de liberación sensibles a campos eléctricos se preparan a partir de polielectrolitos (polímeros que contienen una relativamente una alta concentración de grupos ionizables a lo largo de la cadena principal) y por tanto son sensibles al pH también. Bajo la influencia de un campo eléctrico, polímeros electroresponsivos generalmente se comprimen o se doblan, dependiendo de la forma y orientación del polímero. El polímero se dobla cuando este generalmente es paralelo a los electrodos, mientras que se comprimen, cuando se encuentra perpendicular a éstos.

Tanaka sugirió que el campo eléctrico produce una fuerza tanto en los contraiones móviles como en los grupos cargados que pertenecen a la cadena polimérica [Tanaka et al., 1982]. Por ejemplo, en un gel de poli(acrilamida) parcialmente hidrolizado fijado a uno de los electrodos. Los iones móviles H^+ migran hacia él, mientras que los grupos acrilato inmóviles en el polímero, cargados negativamente son atraídos y tirados hacia el ánodo, por tanto todo el polímero es tirado hacia el ánodo, el estiramiento crea una tensión uni-axial a lo largo del eje de gel, el estrés aumenta en el ánodo y es más pequeño en el cátodo.

4.2 pH en el cuerpo y la acción de los polímeros

4.2.1 pH

Diferentes órganos, tejidos y compartimientos celulares pueden tener grandes diferencias en el pH, lo cual hace que el pH sea una característica para que un material inteligente sea estimulado en estos tejidos para liberación de fármacos.

Los cambios de pH en el cuerpo pueden ser usados como una respuesta directa de un estímulo externo para el material polimérico; algunos valores de pH de varios tejidos se muestran en la Tabla número 1

Tabla 1 Valores de pH en diversos compartimentos celulares y tejidos

Tejido / Compartimento celular	pH
Sangre	7.35 -7.45
Estómago	1.0 – 3.0
Duodeno	4.8 – 8.2
Colon	7.0 – 7.5
Endosoma temprano	6.0 – 6.5
Endosoma tardío	5.0 – 6.0
Lisosoma	4.5 - 5.0
Aparato de Golgi	6.4
Tumor, extra célula	7.2 – 6.5
Estrato corneo	5.2-6.4

El cambio evidente en el pH a lo largo del tracto intestinal del ácido del estómago (pH=2) al pH básico en el intestino (pH=5-8), tiene que considerarse para liberación de cualquier tipo de fármaco o bien la administración oral aunque también hay más cambios sutiles de pH en diversos tejidos. Ciertos tipos de cáncer así como la inflamación de heridas o exposición de tejidos de exhiben un pH diferente de 5.8 que es el común en la piel. Por ejemplo, se sabe que algunas heridas cónicas tienen un pH entre 7.4 y 5.4, también se ha reportado que el tejido canceroso puede tener un pH ácido, lo anterior también es válido para los diferentes compartimentos celulares. Así la caída en el pH, se ha empleado con el fin de liberar moléculas o fármacos de los lisosomas al citosol [Schmaljohann, 2006].

4.2.2 Mecanismos de control en la liberación de fármacos por medio de polímeros

Administración controlada de fármacos se puede utilizar para lograr:

- (1) La concentración sostenida constante de compuestos activos terapéuticos en la sangre con fluctuaciones mínimas.
- (2) Tasas de liberación predecible y reproducible por un largo período de tiempo.
- (3) Protección de compuestos bioactivos que tienen una vida media corta.
- (4) Eliminación de los efectos secundarios, residuos de fármacos y la dosificación frecuente.
- (5) Tratamiento optimizado .
- (6) Mejor estabilidad de fármaco.

Actualmente, esto se puede lograr por diversos sistemas. Se sabe que los niveles de concentración de fármaco en el plasma sanguíneo dependen de la cantidad de fármaco liberado desde el dispositivo debido a que la absorción del fármaco se determina por su solubilidad en los tejidos y la disponibilidad de flujo local de la sangre en el tejido. Incluso si la concentración de fármaco en plasma fuera razonablemente constante, pequeñas fluctuaciones a corto plazo se podrían deber a

diversos factores como la actividad física, estimulación emocional (estrés), comer y dormir, etc. [Bruck, 1983].

Las vías de administración de base de formulaciones de hidrogeles o polímeros modificados incluyen transdérmica, oral, nasal o parenteral. Los sistemas de liberación de fármacos se pueden clasificar de acuerdo con el mecanismo el control de la liberación del fármaco en:

- (1) Sistemas controlados por difusión.
 - (a) Reservorio (sistemas de membrana)
 - (b) Matriz (sistemas monolíticos)
- (2) Sistemas químicamente controlados
 - (a) sistemas bioerosionables y biodegradable
 - (b) sistemas de cadenas colgantes
- (3) Sistemas activados por disolvente
 - (a) sistemas controlados osmóticamente
 - (b) sistemas controlados por hinchamiento
- (4) sistemas de liberación modulada

Muchos sistemas de liberación de fármacos pueden actuar en combinación de varios mecanismos.

5.0 Sistemas de liberación de fármacos en piel

5.1 Tipos de difusión

a) Difusión normal

En sistemas de difusión, los fármacos se difunden a través del polímero; éste puede sufrir subsecuente biodegradación posterior al agotamiento del fármaco. El ejemplo más simple de un sistema de fusión es uno en el que el fármaco se encuentra encapsulado en un reservorio (núcleo) en el que puede difundirse. Mientras el fármaco es mantenido en el núcleo en un estado saturado de liberación, seguirá cinética de orden cero hasta que esté casi agotado. Dos tipos de difusión controlada por los dispositivos se han utilizado en la administración de fármacos [Chandy and Sharma, 1992]. Estos son los dispositivos de depósito (o dispositivos de matriz laminada) y dispositivos de matriz, como se muestra en la Figura 1.7.

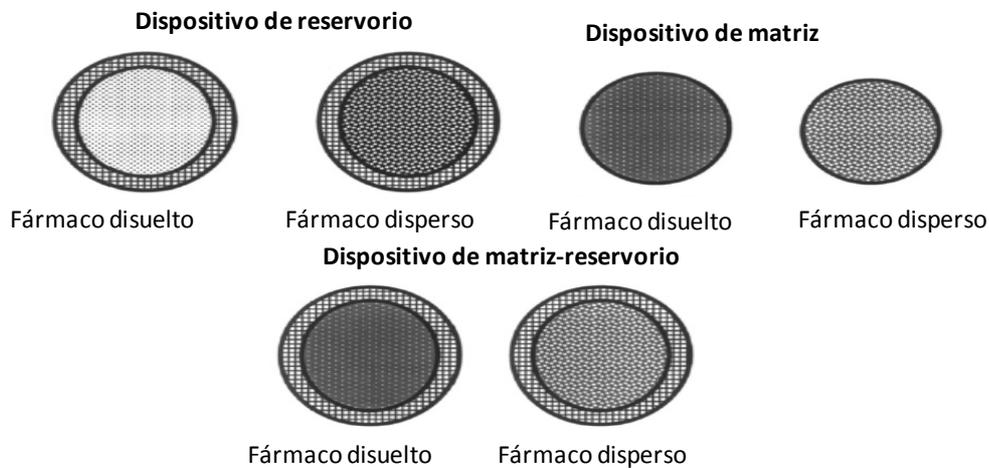


Fig.1.7. Esquemas de dos tipos de dispositivos poliméricos para liberación de fármacos basados en la difusión

b) Sistemas de reservorio (membrana)

Sistemas de reservorio son dispositivos de huecos en los que un núcleo interno es disuelto y un fármaco suspendido, se encuentra rodeado por una membrana de polímero. En este dispositivo, un fármaco es encapsulado en el núcleo de una membrana polimérica. La difusión del fármaco a través de la membrana es el paso limitante de la velocidad y controla la velocidad de liberación. La concentración saturada del fármaco dentro del depósito es esencial para mantener una concentración constante, para formar un gradiente a través de la membrana. El mecanismo de transporte de fármacos a través de la membrana es generalmente un mecanismo de solución-difusión. El transporte del fármaco se produce primero por disolución del mismo en la membrana en un lado de ésta, seguida por la difusión a través de la membrana y la desorción desde el otro lado de la membrana [Kim et. al., 1992].

c) Sistema de Matriz (monolítico)

En sistemas de matriz, el fármaco se dispersa uniformemente en un dispersante. Una desventaja inherente de los sistemas de matriz es su comportamiento de liberación de primer orden continuamente decreciente. Esto es debido a la trayectoria de difusión creciente, la longitud y el área de la disminución del área de penetración de difusión frontal como el producto de la matriz de liberación. Un dispositivo de matriz (o monolito) es fácil de formular y genera una velocidad inicial de liberación alta y se puede formular para liberar un fármaco a una velocidad casi constante. Un dispositivo monolítico en solución contiene una solución de fármaco dentro del polímero, mientras que un monolítico en dispersión contiene fármaco sólido dispersado en polímero de matriz limitante, [Khan and Zhu, 1999] como muestra la Fig.1.8



Fig. 1.8. Sistema de matriz monolítico

d) Sistemas químicamente controlados

En los sistemas químicamente controlados de administración de fármacos, la liberación de un agente farmacológicamente activo generalmente toma lugar en un ambiente acuoso por uno o más de los siguientes mecanismos.

- (i) la biodegradación gradual de un medicamento que contiene el polímero sistema.
- (ii) La biodegradación de los enlaces inestables por que el fármaco se acoplado al sistema de polímero.
- (iii) La difusión de un fármaco desde inyectable y biodegradable microperlas.

e) Sistemas bioerosionables y biodegradable

En estos sistemas, el polímero se erosiona debido a la presencia de hidrolítica o enzimática de enlaces lábiles. Como el polímero se erosiona, el fármaco se libera al ambiente que lo rodea. La erosión puede ser de superficie o masiva. Las principales ventajas de estos sistemas biodegradables son la eliminación de la necesidad de extirpación quirúrgica, tienen gran potencial por su tamaño pequeño y bajo costo. Por otra parte, todos productos biodegradables, así como sus metabolitos no deben ser tóxicos, carcinógenos o teratológicos. Estos requisitos no se cumplen fácilmente y deben ser objeto de cuidadoso estudio.

5.2 Criterios de elección de un polímero como sistema liberador de fármacos.

Los polímeros sintéticos muestran normalmente una mejor farmacocinética comparada con las pequeñas moléculas de los fármacos en función del tiempo de circulación; estos materiales están siendo utilizados como liberadores de fármacos o en combinación con biomacromoléculas como proteínas y poli ácidos nucleicos.

Existe una extensa lista de los criterios que un polímero tiene que cumplir para que sea aplicado con seguridad a la actividad terapéutica o como agente de regeneración de tejidos y reparación. Si el polímero no es un fármaco en sí, a menudo proporciona una función pasiva como un portador de fármacos, la reducción de la inmunogenicidad, la toxicidad o la degradación deben ser una de sus características.

Si el polímero va a ser introducido al cuerpo como un transportador del fármaco (degradable) debe cumplir con ser soluble en agua, no tóxico, no inmunogenico y tiene que ser seguro en todas las etapas de la entrega del fármaco, seguido de una excreción segura. Si el polímero es no degradable por ejemplo los polimetacrilatos, el tamaño debe estar por debajo del umbral renal para garantizar que no se acumula en el cuerpo. Si el polímero es degradable, los productos de degradación deben ser tomados en cuenta. Por otro lado, los polímeros terapéuticos (como los parches) son nuevas entidades químicas eso significa que tienen que evaluarse como tal, además de su aplicación pasiva los polímeros sintéticos a menudo adoptan un papel más activo en la liberación de fármacos y péptidos [Elvira et al., 2002].

5.3 Estructura, función y tratamiento tópico de la piel humana

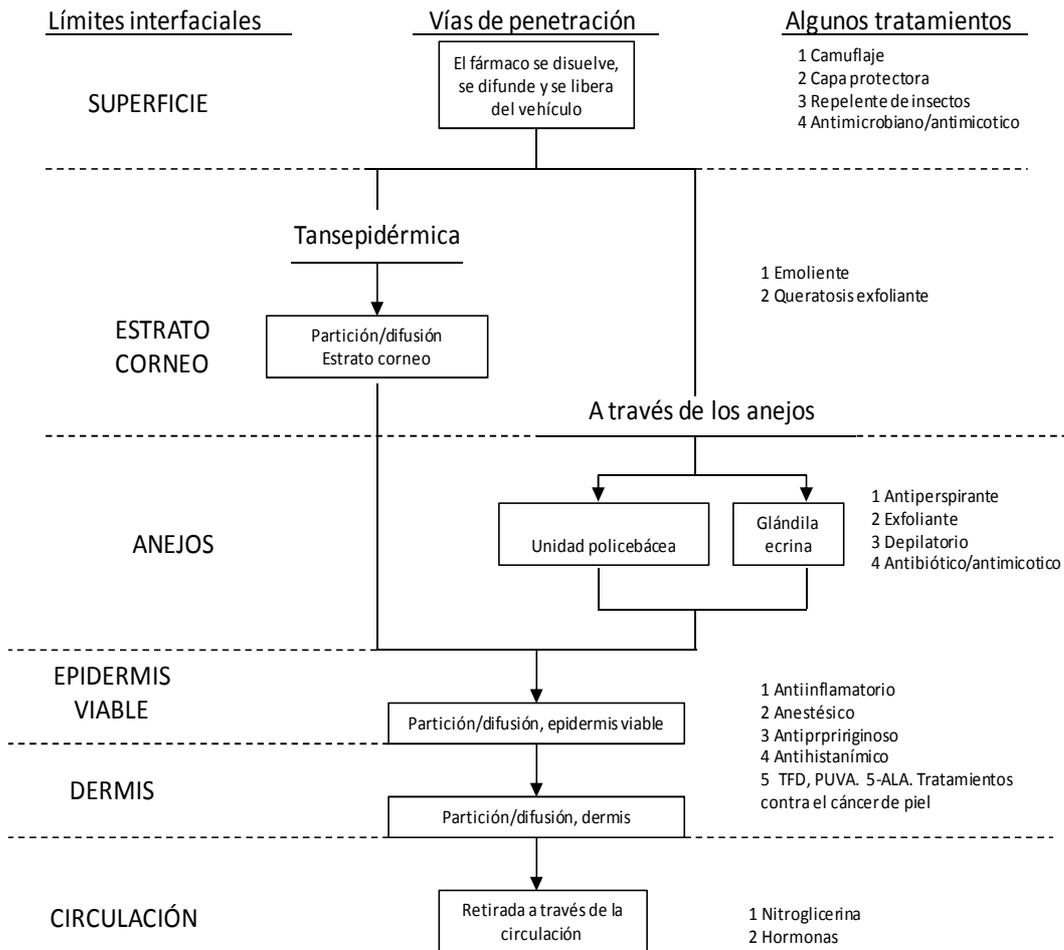
La piel salvaguarda los órganos internos limitando la entrada y salida, de las sustancias químicas, estabiliza la tensión arterial y la temperatura y mide las sensaciones de calor frío, presión y dolor. La piel humana está formada por tres capas: la epidermis estratificada, vascular y celular la dermis subyacente de tejido conjuntivo y la grasa subcutánea. La piel con pelo contiene folículos pilosos y glándulas sebáceas, y realiza varias funciones como:

Función mecánica. La dermis proporciona propiedades mecánicas a la piel como la elasticidad, pero esta depende de la edad y la hidratación.

Función protectora. Barrera microbiológica, química, frente a la radiación, frente al calor y la regulación de la temperatura, barrera eléctrica y contra el shock mecánico [Auton, 2004]

5.3.1 Liberación de fármacos en piel

Los dermatólogos se dirigen a cinco regiones principales: la superficie cutánea, el estrato corneo, la epidermis viable y la dermis superior, las glándulas cutáneas y la circulación sistémica (Esquema 1). Nuestra zona de interés es el tratamiento dirigido hacia la epidermis viable y la dermis.



Esquema 1 Capas de la piel humana y sitios donde algunos fármacos penetran

Capítulo 2

Desarrollo

Experimental

1.- Materiales y reactivos

1.1 Materiales

Para la obtención de los injertos, se utilizaron los siguientes materiales:

Matriz soporte

Membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) hidrófilas DURAPORE de Millipore® de dos tamaños de poro 0.45 μm y 0.22 μm Tabla 1

Especificaciones generales

Color: blanco

Superficie: lisa

Grosor: 125 μm

Esterilización: en autoclave (121 °C a 1 bar), EO o gamma

Temperatura de funcionamiento: 85 °C máx.

Endotoxinas bacterianas: 0,5 EU/ml

Extraíbles gravimétricos: < 0,5%

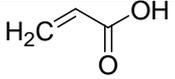
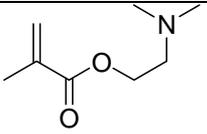
Capítulo 2 | Desarrollo Experimental

Tabla 1 Especificaciones generales de las membranas de PVDF

Aplicaciones	Poros, μm	Humectabilidad	Punto de burbuja	Caudal de agua (ml/min/cm ²)	Caudal de aire (l/min/cm ²)	Adsorción proteica (μg/cm ²)
Filtración esterilizante de soluciones biológicas	0,22	Hidrófila	≥3,45 bar	6,7	2	4
Clarificación de soluciones biológicas	0,45	Hidrófila	≥1,55 bar	29	4	4

Las características fisicoquímicas de los monómeros injertados son las siguientes (Tabla 2):

Tabla 2 Características generales de los monómeros empleados

Monómeros Estructura	Masa molar (g/mol)	Densidad a 25°C (g/mL)	Temperatura de Ebullición (°C)	Solubilidad
 Acido acrílico CAS [100-43-6]	72.06	1.05	139	Agua, alcohol éter
 DMAEMA CAS [2867-47-2]	157.21	0.93	182-192	Tolueno DMSO

Capítulo 2 | Desarrollo Experimental

1.2 Reactivos

Para la determinación del pH crítico de las membranas injertadas se utilizaron los siguientes reactivos:

Sal de ácido bórico, ácido cítrico y ortofostato trisódico 12 H₂O de Baker (USA)

Agua bidestilada

Para la carga y cesión de fármacos los reactivos y fármacos utilizados fueron los siguientes:

Fosfato ácido de potasio

Bórax

Ácido clorhídrico

Hdróxido de sodio

Formaldehído

Acetil cetona

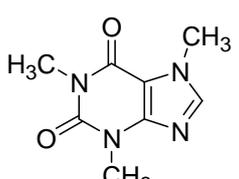
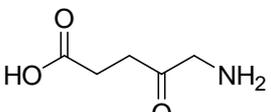
Etanol

Tripropilen glicol metil eter (TMP)

Gantrez AN119[®] al 30 % en agua como estabilizador de 5-ALA

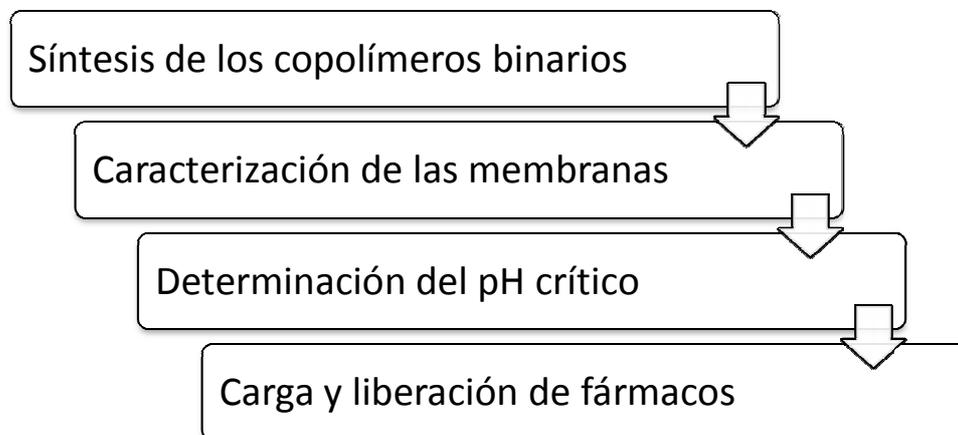
1.2.1 Fármacos:

Tabla 3. Características generales de los fármacos utilizados

Fármaco	pKa	Logp (o/w)	Peso molecular (g/mol)	Uso
Cafeína				
	1.5	-0.79	194.19	Estimulante del sistema nervioso central
5-ALA				
	4.0, 8.3	-1.4	167.6	Tratamiento en cáncer de piel no melanómico

2 Desarrollo experimental.

El esquema generalizado se desarrolla en cuatro etapas y esto observa en la siguiente figura:



2.1 Síntesis de los copolímeros binarios

La síntesis se realizó en dos pasos:

2.1.1 Primer paso

Síntesis de PVDF-g-AAc

Las membranas de PVDF previamente pesadas con un tamaño de poro de 0.22 μ m y 0.45 μ m fueron preirradiadas en aire a dosis de 10 y 20 kGy a una intensidad de 9.2 kGy/h en ampollas de vidrio. Junto con el monómero debido a la alta reactividad del AAc. Las muestras no fueron irradiadas. Las muestras fueron irradiadas con una fuente de ^{60}Co Gammabeam (651 PT, Nordion International). Después del tiempo de preirradiación, se colocó en las ampollas 7mL de una solución de ácido acrílico de concentración variable (desde 5 hasta 40% en agua). El sistema fue desgasificado y burbujeado con gas argón por 20 min, sellado y puesto en un baño de agua a temperatura variable (de 30 a 50°C), con un tiempo de reacción variado (desde 5 hasta 40 min). Una vez transcurrido el tiempo de reacción a las condiciones propuestas, las ampollas se abrieron y se extrajeron las membranas injertadas con poliAAc y se sumergieron en agua destilada por 24 h en agitación constante. Después de ese tiempo el agua se cambió cada 24 h hasta 5 días para la remoción completa de homopolímero. Las membranas se sumergieron después en acetona por 2 horas y se colocaron en un desecador a vacío por 24 h más.

El porcentaje de injerto (Yg) se determinó usando la siguiente ecuación 2.1

$$Yg(\%) = 100[(Wg - Wo)/Wo] \quad (2.1)$$

Donde Wo y Wg representan el peso inicial y final de las membranas antes y después del injerto.

Síntesis de PVDF-g-DMAEMA

El injerto de DMAEMA sobre las membranas de PVDF con tamaño de poro de 0.22 μ m y 0.45 μ m fue llevado a cabo mediante el método directo de irradiación. Las membranas de PVDF fueron previamente pesadas y puestas en ampollas de vidrio, a éstas se les adicionó 7 mL de una solución de DMAEMA/ (EtOH: H₂O, 1:1 v/v) o bien de DMAEMA/tolueno a diferentes concentraciones. Las ampollas fueron burbujeadas con gas argón por 20 min, selladas y posteriormente irradiadas a una dosis variable desde 5 kGy hasta 25 kGy a una intensidad de 9.0 kGy/h. Después del tiempo de irradiación las membranas fueron lavadas con tolueno por 24 h hasta remoción total del homopolímero formado en el medio y secadas bajo presión reducida. El porcentaje de injerto fue calculado mediante la ecuación 2.1.

2.1.2 Segundo paso

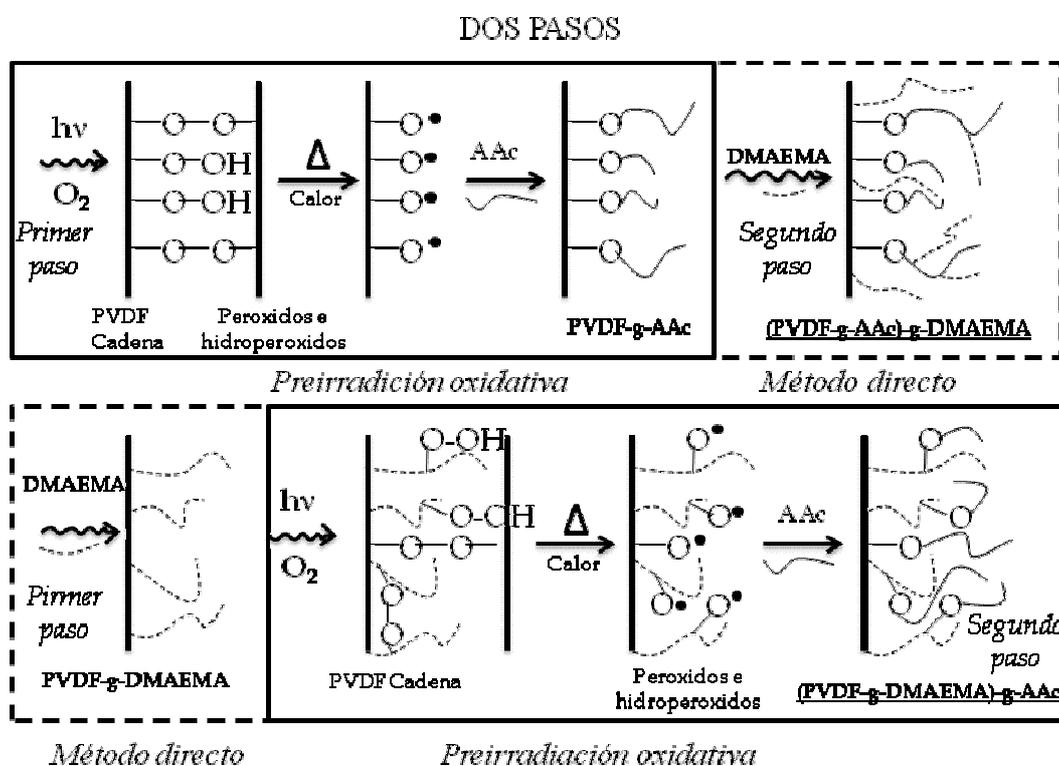
Síntesis de (PVDF-g-DMAEMA)-g-AAc

Para obtener (PVDF-g-DMAEMA)-g-AAc las membranas sintetizadas previamente de PVDF-g-DMAEMA con aproximadamente 100 % de injerto de poliDMAEMA fueron tratadas de la misma manera que la síntesis de (PVDF-g-AAc) a las condiciones fijas de 8 kGy con una solución de AAC en agua del 20% (v/v) y condiciones variables de tiempo de reacción (de 10 a 60 min) y temperatura de reacción (de 40°C a 70°C).

Síntesis de (PVDF-g-AAc)-g-DMAEMA

Para obtener (PVDF-g-AAc)-g-DMAEMA, las membranas previamente injertadas con AAC, PVDF-g-AAc con aproximadamente 100% de injerto, fueron tratadas según la síntesis de PVDF-g-DMAEMA, con soluciones de concentración variable de DMAEMA (de 20% a 50% en tolueno) y a una dosis fija de 10 kGy

El Esquema 2.1 resume la síntesis y los métodos usados.



Esquema 1 Esquema simplificado de los pasos a seguir para la obtención de los copolímeros de injerto binario.

Se estudiaron las cinéticas de reacción así como se establecieron las condiciones para obtener el 100 % de injerto de ambos monómeros sobre la membrana de PVDF, misma que será objeto de estudio en la siguiente fase.

2.2 Caracterización de las membranas.

Las membranas se caracterizaron mediante diferentes técnicas analíticas para determinar entre otras propiedades, su estabilidad térmica, mecánica así como su morfología.

2.2.1 Caracterización mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Se cortó un pedazo pequeño de las membranas de PVDF virgen e injertadas de aproximadamente 5 mg y se colocaron en unas charolas herméticas de aluminio para realizar el estudio. Las muestras fueron calentadas a una velocidad de 10 °C /min bajo una atmósfera de nitrógeno hasta una

Capítulo 2 | Desarrollo Experimental

temperatura de 250 °C. Esto se realiza con el fin de determinar el punto de fusión de los injertos y se realizaron dos calentamientos por muestra.

2.2. Caracterización mediante Análisis Termogravimétrico (TGA)

Se utilizó un equipo TGA Q50 (TA Instruments, New Castle, DE). Se pesaron las muestras (aproximadamente 10 mg) y se colocaron en una charola de platino, ésta a su vez se colocó en la plataforma del equipo y se calibró a cero. Los experimentos fueron llevados a cabo en atmósfera de nitrógeno y a una velocidad de calentamiento de 10 °C por minuto, hasta una temperatura de 600 °C. Con esta técnica, se determina la estabilidad de los injertos ante un incremento de la temperatura, o bien su resistencia a la misma.

2.2.3 Caracterización mediante Infrarrojo (FT-IR)

Las membranas con el injerto de la membrana virgen y las membranas obtenidas en ambos pasos de síntesis fueron caracterizadas por FTIR en un espectrofotómetro Perkin- Elmer Spectrum 100 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) equipado con el accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) con punta de diamante. Las muestras se colocan en la celda de ATR y se realiza presión sobre ellas con la punta de diamante. Se realizó el barrido entre los 600cm^{-1} y los 4000cm^{-1} , buscando los grupos funcionales que caracterizan a cada uno de los monómeros injertados en la matriz de PVDF y así poder evaluar si se ha obtenido el copolímero.

2.2.4 Análisis de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El análisis por (SEM) fue llevado a cabo con el microscopio EVO LS Series Scanning Electron Microscopes de Carl Zeiss Microscopy, LLC Thornwood, NY 10594 United States a 1.5 kV para observar imágenes a $10\ \mu\text{m}$ y 1.0 KX. Las muestras se analizaron a alto vacío sin necesidad de recubrimiento de oro.

2.2.5 Rompimiento a la tracción.

El análisis de rompimiento a la tracción se realizó en un equipo TA.XT Plus para las membranas vírgenes y membranas injertadas con dos diferentes porcentajes de injerto y tamaño de poro. Esta prueba es comúnmente realizada a los materiales con potencial uso a parche transdérmico o bien materiales de diagnóstico en piel. Para ello las muestras se cortaron en piezas de aproximadamente 8 mm de ancho por 28mm de largo y fueron sumergidas por 5 minutos en un amortiguador 4.5 (condición de liberación de fármaco), debido a que las membranas son quebradizas al estirarlas en

estado seco. La velocidad del ensayo fue de 0.1mm/s a una distancia de trabajo de 10 mm. Los resultados se analizaron con el software TEE32 Exponent Micro System.

2.2.6 Angulo de contacto.

El estudio de ángulo de contacto fue llevado a cabo a temperatura ambiente usando un drop shape analyzer Kruss DSA 100 apparatus (Matthews NC, USA). Pequeñas gotas de agua bidestilada fueron depositadas en membranas secas. La determinación se realizó a 1 y 5 segundos para membranas con diferentes tamaños de poro y porcentaje de injerto.

2.3 Determinación del pH crítico

2.3.1 Hinchamiento Límite

Una vez que las membranas con el doble injerto fueron pesadas (W_o) y secadas, se sumergieron en agua destilada a temperatura ambiente, después de 2 min se retiró la película, se eliminó el exceso de agua y se pesó (W_s). Se repitió el experimento cada determinado tiempo, pesando la membrana cada vez que se cumpla el lapso de tiempo hasta completar 2 horas.

Se construyó una gráfica de porcentaje de hinchamiento, en función del tiempo, el porcentaje se determina mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de hinchamiento} = (W_s - W_o) / W_o \times 100 \dots (2.2)$$

El tiempo de hinchamiento límite, se encuentra determinado por el punto en el cual el porcentaje de hinchamiento es constante.

2.3.2 Preparación de los amortiguadores de intervalo 2 a 12.

Se preparó una solución de amortiguador universal con las sales de ácido bórico 0.02 M-ácido cítrico 0.05M y otra solución de ortofosfato trisódico dodecahidratado 0.1 M. Los amortiguadores se obtienen mezclando las proporciones de las soluciones según la tabla 4.

Tabla 4. Alícuotas necesaria para preparar amortiguador pH 2 a 12

pH esperado	X (mL)*	pH Real	pH esperado	X (mL)*	pH Real
2.0	48.75	1.95	8.0	21.25	8.03
3.0	44	3.03	9.0	17.25	9.21
4.0	38.75	4.10	10.0	13.5	10.19
5.0	33.5	4.98	11.0	11	11.22
6.0	29.5	5.99	12.0	4.25	12.14
7.0	24.75	7.02			

X * = mL de la solución madre de la mezcla de ácidos.,

Aforo a 50 mL con la solución de ortofosfato trisódico 0.1M

2.3.3 pH crítico.

La determinación del pH crítico, se realizó hinchando las membranas (dos tamaños de poro y diferentes porcentajes de injerto) en soluciones de amortiguador de diferente pH a 36°C a un tiempo correspondiente al tiempo de hinchamiento máximo de las membranas. Cada vez que la solución amortiguador se cambia, se retira la membrana, se secó y se pesó. Se determinó el porcentaje de hinchamiento con la ecuación

$$S_w (\%) = 100 \frac{(W_s - W_0)}{W_0} \quad (2.3)$$

Donde W_0 y W_s so los pesos de las membranas secas y húmedas respectivamente.

Se trazo una grafica de porcentaje de hinchamiento en función del pH. El pH crítico se determinó calculando el punto de inflexión obtenido de sacar la segunda derivada.

2.3.4 Estudio de reversibilidad.

Para este estudio se sumergieron membranas con diferentes por ciento de injerto y dos tamaños de poro en dos soluciones amortiguador de pH 2 y 12 de manera alternada por un tiempo correspondiente al de hinchamiento límite hasta cumplir 10 períodos. Las membranas fueron secadas y pesadas en cada intervalo y se determinó el factor de sensibilidad mediante la siguiente ecuación.

$$pH_s = W_{mayor}/W_{menor} \quad (2.4)$$

Capítulo 2 | Desarrollo Experimental

donde W_{mayor} y W_{menor} son los pesos de hinchamiento mayor y menor registrados a los valores de pH 2 y 12

2.4 Carga y liberación de fármacos

2.4.1 Curva de calibración de cafeína, lidocaína y 5-ALA

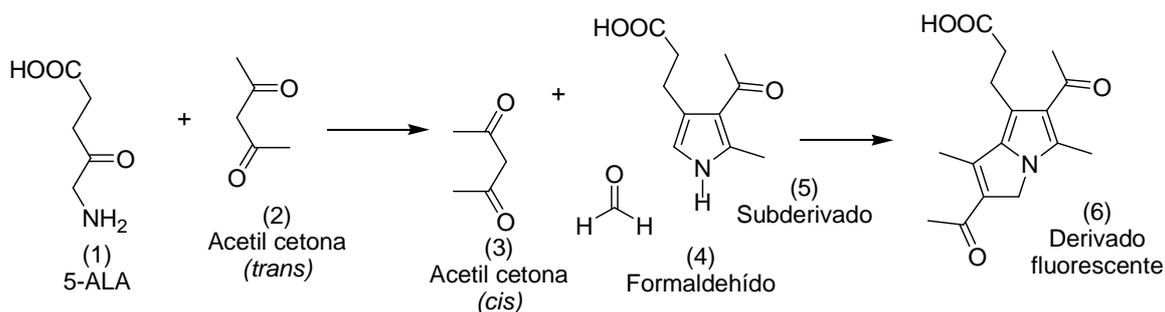
Para realizar la curva de calibración de cafeína se preparó 25 mL de una solución de cafeína 50 $\mu\text{g/mL}$ en amortiguador pH 9 a la que se le llamó solución madre y a partir de ella, se realizaron diluciones en matraces de 10 mL para obtener diferentes concentraciones de cafeína como indica la Tabla 5. Esto se realizó por triplicado y se cuantificó en un espectrofotómetro Cary UV 200 a una longitud de onda de 273 nm.

Tabla 5. Alícuotas necesarias para preparar la curva de calibración de cafeína a partir de una solución madre de 50 $\mu\text{g/mL}$

Solución	Concentración final	Alicuota
	$\mu\text{g/mL}$	mL
1	2	0.4
2	5	1
3	10	2
4	30	6
5	50	0

También se realizaron curvas de calibración en amortiguador pH 7 y 9 por triplicado.

Para realizar la curva de calibración de 5-ALA se preparó una solución madre del fármaco de 500, 300, 100, 50 y 5 $\mu\text{g/mL}$ en amortiguador pH 5 y se cuantificó mediante fluorimetría con la previa derivatización de 5-ALA con formaldehído y acetil cetona como sigue, siendo el analito número (6) del esquema 2 la especie que se cuantifica. Un mol del derivado (6) equivale a un mol de 5-ALA.



Esquema 2. Reacción de derivatización de 5-ALA

La composición de la mezcla de reacción se compone de tres reactivos

Reactivo de acetil cetona; reactivo (A):

Se mezclan 15 mL de acetil cetona, 10 mL de etanol y 75 mL de agua destilada

Dilución del reactivo (A); reactivo (B)

Se pesan 3.7 g de la solución (A) y se disuelven en 6.3 g de agua destilada.

Reactivo de formaldehído; reactivo (C)

Se pesa 1 g de formaldehído y se disuelve en 9 g de la solución (B)

Así pues 50µL de analito se mezclaron con 3.5 mL del reactivo (A) y 0.45 mL del reactivo (C), la mezcla se coloca por 10 segundos en vortex y se calienta a 100 °C por 20 minutos. Esto se repite para cada punto de la curva por triplicado.

300µL de la reacción anterior se colocaron en un microplato Nun 96 de tapa y fondo claro y paredes oscuras. Se cubrió con papel aluminio y se midió inmediatamente en un fluorometro Fluorostar Optima BMGLABTECH a una longitud de excitación de 370 nm y de emisión de 460 nm

Por último se graficaron las curvas de calibración y se determinó la ecuación de la recta y los límites de cuantificación (LIC) y detección del fármaco (LID).

2.4.2 Carga de los fármacos estudio.

Carga de Cafeína

La carga de cafeína en membranas de PVDF modificadas se desarrollo utilizando 2 membranas del injerto binario de (PVDF-g-DMAEMA-g-AAc) de 0.45µm de tamaño de poro, dos porcentajes de

Capítulo 2 | Desarrollo Experimental

injerto variables de AAc (100 y 50 %) y 100 % de injerto de DMAEMA, es decir se mantuvo constante el porcentaje de injerto de DMAEMA y se varió el de AAc.

Las muestras completamente limpias se humedecieron y se cortaron en círculos de 1cm de diámetro 6 de cada una (total de 12) y se colocaron en 5mL de solución de cafeína de 50 μ g/mL preparada con solución amortiguador pH 9. El experimento se llevó a cabo a una temperatura controlada de 37 °C por 24 horas en agitación constante (80 rpm). Después de ese tiempo se sacaron las muestras y se colocaron en un papel adsorbente por 24 horas. Se cuantificó la cafeína absorbida por las membranas determinando por UV la concentración final a 273 nm de la solución residual a las 24 horas de haberlas sumergido y restando este valor a la concentración inicial de 50 μ g/mL de cafeína en amortiguador.

Carga de 5-ALA

Debido a la inestabilidad del fármaco en amortiguador pH 9 la carga de 5 ALA se realizó suspendiendo el fármaco en un gel de Gantrez AN119 ® con la siguiente composición y orden:

Gantrez AN119 ® al 30 % en agua 2g, Agua destilada 3.5 g, Tripropilen glicol metil elter (TMP); 0.3g, 5-ALA; 0.2 g

Lo anterior da un total de 6 gramos de fórmula, de éstos 4.5 g se colocaron en una placa de hierro y se dejó inmóvil hasta la formación de un gel. (Figura 2.2)

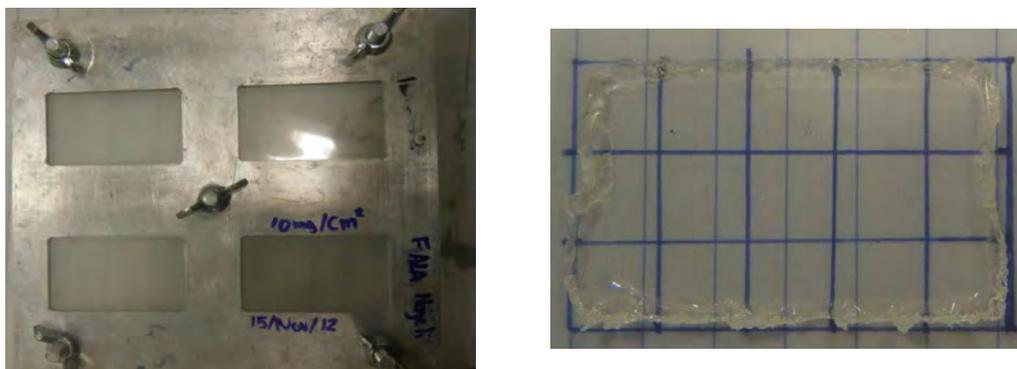


Figura 2.1. Suspensión de 5-ALA en gel de Gantrez®

El área total del rectángulo es de 15 cm² y cada cm² tiene un total de 0.3 g de fórmula que corresponde a 10 mg de 5-ALA, después 24 horas el gel formado se cortó en cuadros de área de 1 cm². El resto de la fórmula se repartió en placas de 1 cm²

2.4.3 Liberación de los de 5-ALA y cafeína

Liberación de cafeína

Una vez que las membranas fueron cargadas con el fármaco, se realizó la cuantificación del mismo atrapado por las membranas, éstas se colocaron en 2 mL de amortiguador pH 5 y 7 y cada determinado tiempo se tomó una alícuota de 100 μ L de amortiguador y se reemplazó con la misma cantidad de amortiguador fresco hasta 24 horas. El estudio se realizó a una temperatura de 37 °C en una cámara de agitación a 80 rpm. Las alícuotas extraídas se analizaron por UV-VIS a 273 nanómetros para determinar la cantidad de fármaco liberado en el medio.

Liberación de 5-ALA

Una vez que el gel de Gantrez[®] fue cargado con el fármaco, 1cm² del mismo se adhirió con 100 μ L de agua a membranas de PVDF modificadas y éstas se adhirieron con pegamento a unos discos huecos que se adaptaron a celdas de Franz (Figura 2.3), la liberación se realizó adaptando unos pesos sobre el gel y cubriendo con parafilm el sistema para evitar pérdidas de líquido por evaporación. El medio receptor fue amortiguador pH 4.5 en un volumen total de 12 mL. A intervalos de tiempo se tomó una alícuota de 100 μ L del medio receptor y se devolvió al medio la misma cantidad de amortiguador fresco, hasta completar 24 horas, el sistema se encontraba a temperatura constante de 36°C en agitación. La cuantificación del fármaco se realizó como en la curva de calibración por derivatización del fármaco por medio de la técnica de fluorometría.

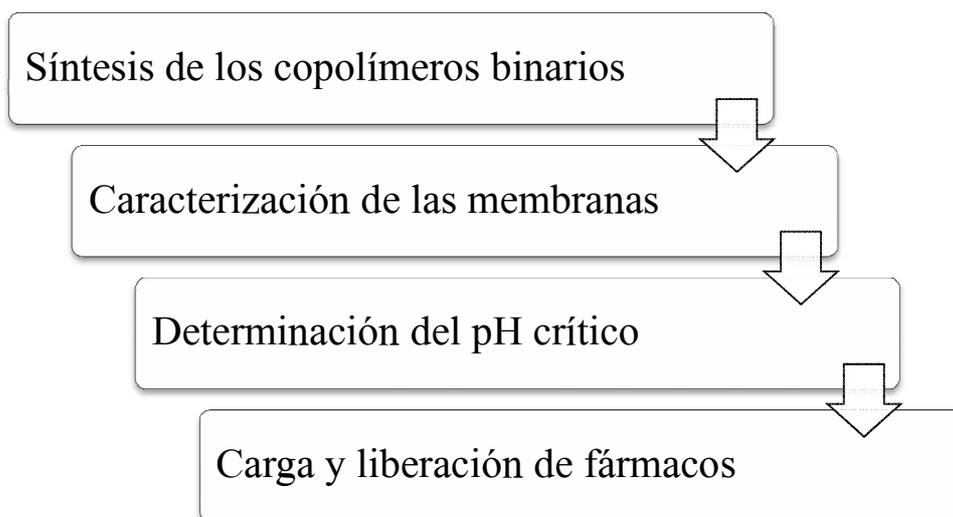


Figura 2.2 Celdas de Franz modificadas para la liberación in vitro de 5-ALA a un medio receptor de amortiguador pH 4.5

Capítulo 3

Resultados

Se retomará el esquema generalizado de cuatro etapas de la sección experimental



1. Síntesis de los copolímeros binarios

Para la obtención del copolímero de injerto de AAc y DMAEMA sobre PVDF es necesario estudiar los parámetros de reacción para la obtención de diferentes porcentajes de injerto en la formación de PVDF-g-AAc y PVDF-g-DMAEMA que puedan ser usados en la síntesis del respectivo copolímero binario. A continuación se muestran las gráficas del porcentaje de monómero en función de ciertos parámetros de estudio, para dos tamaños de poro (0.22 y 0.45 μ m).

1.1 Primer paso

1.1.1 Síntesis de PVDF-g-AAc

Para realizar la síntesis de PVDF-g-AAc las membranas fueron pre-irradiadas a dos dosis diferentes. Es conocido que en polímeros semicristalinos el método de pre-irradiación oxidativa mediante radiación ionizante tiene diversas ventajas, incluyendo la formación de radicales capaces de iniciar en un segundo paso el injerto de ciertos monómeros. La dosis absorbida que es proporcional al número de sitios activos que induce el injerto, permite un control en la concentración del radical iniciador [Clochard et al., 2004]. Cuando las membranas irradiadas están en contacto con el aire –durante o después de la irradiación- los radicales formados pueden reaccionar con el oxígeno, dando lugar a los radicales peróxido (POO^{\bullet}) que pueden recombinarse para formar peróxidos (POOP), hidroperóxidos (POOH), ácidos, alcoholes o cetonas como lo describió Chapiro [Chapiro, 1962] sin embargo la naturaleza de los sitios activos disponibles para iniciar una polimerización depende fuertemente de la composición química del polímero, en PVDF los sitios activos disponibles para iniciar la polimerización son: los radicales alquilo (mitad de la cadena $-\text{CF}_2-\text{C}^{\bullet}\text{H}-\text{CF}_2-$ y final de la cadena $-\text{CF}_2-\text{C}^{\bullet}\text{H}_2$), radicales peroxi ($-\text{CF}_2-\text{CH}_2-\text{OO}^{\bullet}$) e hidroperóxidos primarios ($-\text{CF}_2-\text{CH}_2-\text{OOH}$). En polímeros fluorados como el politetrafluoroetileno (PTFE) o el copolímero de tetrafluoroetileno/ hexafluoroetileno (FEP) la iniciación de la polimerización ocurre en los radicales alquílicos resultado de la desoxigenación de los radicales peróxido estables [Dmitrenko et al., 1992; Bozzi and Chapiro, 1987; Ranby and Rabek, 1977] En membranas de PVDF los radicales peróxido son estabilizados en las zonas cristalinas [Betz et al., 1996].

Las membranas pre-irradiadas que contienen los radicales estabilizados fueron inmersas en una solución acuosa de AAc. Los experimentos de la formación de injerto fueron llevados a una temperatura de 40 °C por 30 minutos. A esta temperatura dos reacciones pueden ocurrir: i) homopolimerización térmica de AAc en solución o ii) reacción de injerto en el substrato sólido.

Las Figuras 3.1 y 3.2 muestran la variación del porcentaje de injerto con la concentración del AAc para dos diferentes tamaños de poro y dosis. Las figuras muestran que la irradiación de la membrana generan mayor porcentaje de de injerto a una dosis mayor (20 kGy), pero en ambas membranas el porcentaje de injerto de AAc aumenta con la concentración.

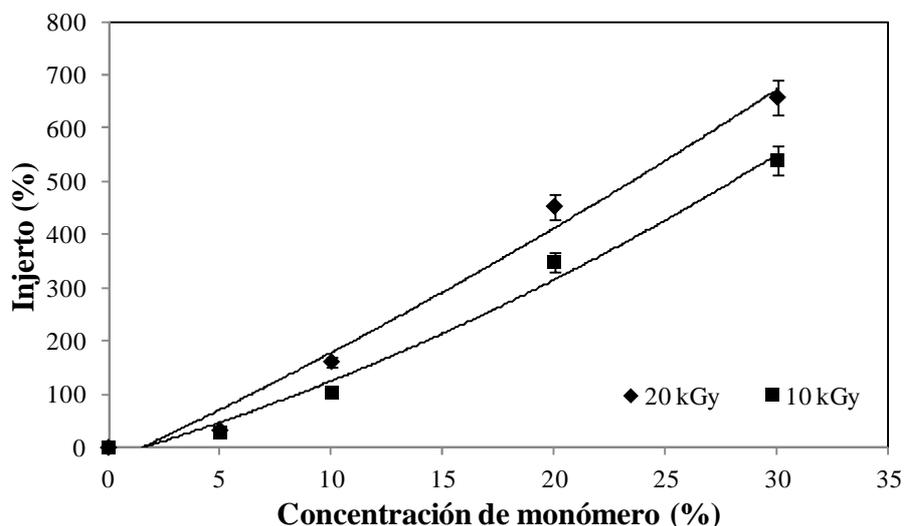


Fig. 3.1. Tamaño de poro 0.22 μm , tiempo de reacción 30 min temperatura de reacción 40 $^{\circ}\text{C}$ en membranas pre irradiadas de PVDF

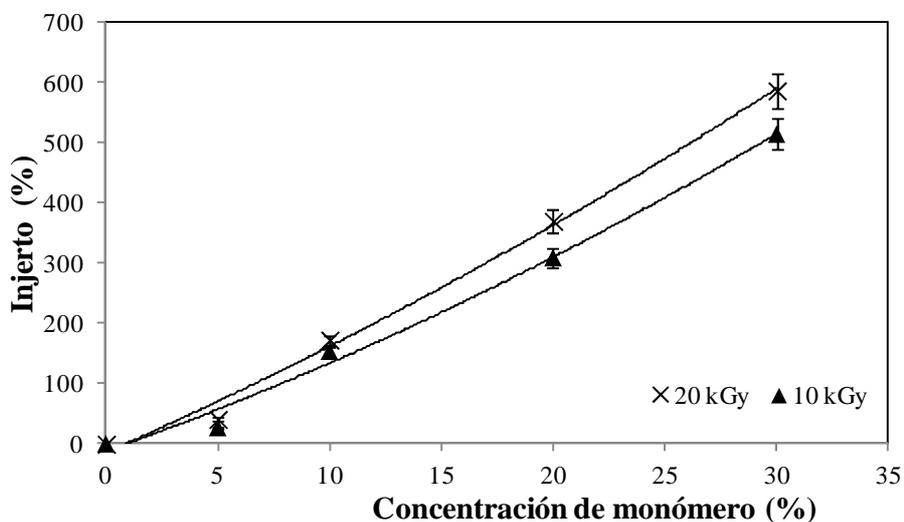


Fig. 3.2 Tamaño de poro 0.45 μm , tiempo de reacción 30 min temperatura de reacción 40 $^{\circ}\text{C}$ en membranas de PVDF pre irradiadas.

La variación del porcentaje de injerto de AAc con respecto al tiempo de reacción se presenta en la Figura 3.3 el experimento fue realizado a una temperatura de 40 $^{\circ}\text{C}$, una concentración del 20 % de

AAC en agua y dosis de 10 kGy. Para ambos tamaños de poro, el porcentaje de injerto aumenta, pero después de 30 min la mayor parte del monómero de AAC ha sido consumido ya sea en la reacción de injerto o bien en la homopolimerización ya que se llega a una meseta. Para los dos tamaños de poro estudiados y a los 30 minutos existe una diferencia del 50 % de injerto de AAC entre ambas membranas, sugiriendo que para un tamaño de poro mayor (0.45 μm) el porcentaje de injerto será menor debido a que existe un área superficial menor o un volumen libre mayor disponible para formar radicales y subsecuentemente injerto.

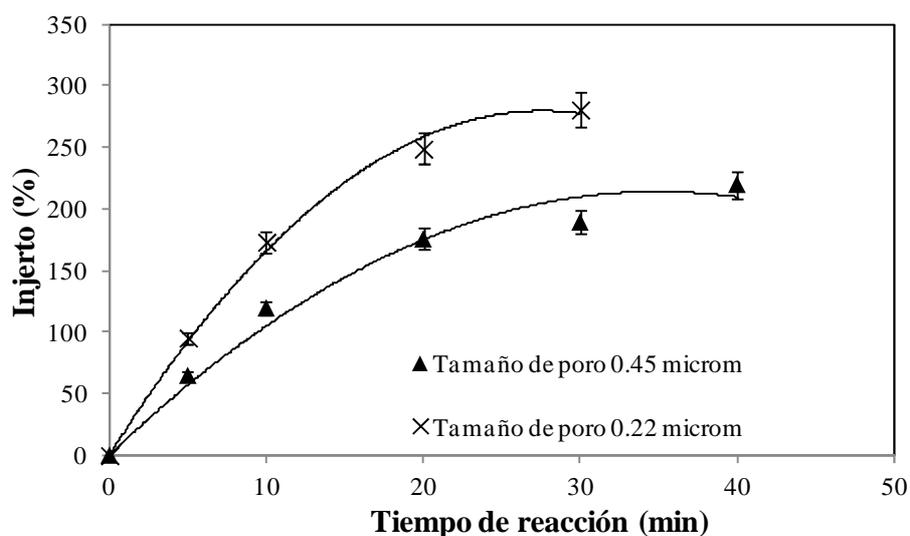


Fig. 3.3 Concentración de monómero 20% AAC n agua, dosis de 10 kGy, tamaño de poro 0.22 y 0.45 μm , temperatura de reacción 40 $^{\circ}\text{C}$ en PVDF pre irradiadas.

Figura 3.4, representa la variación de porcentaje de injerto de AAC con la temperatura de reacción, estableciendo un tiempo de 30 minutos, concentración de monómero del 20 % para dos diferentes tamaños de poro y dosis de 10 kGy. Similarmente que la figura anterior el mayor porcentaje de injerto obtenido se encuentra para un menor tamaño de poro (0.22 μm). El porcentaje de injerto aumenta ligeramente con la temperatura, esto quiere decir que el aumento de la temperatura, aumenta la movilidad en las cadenas de PVDF y el monómero puede difundirse más eficientemente sobre el material.

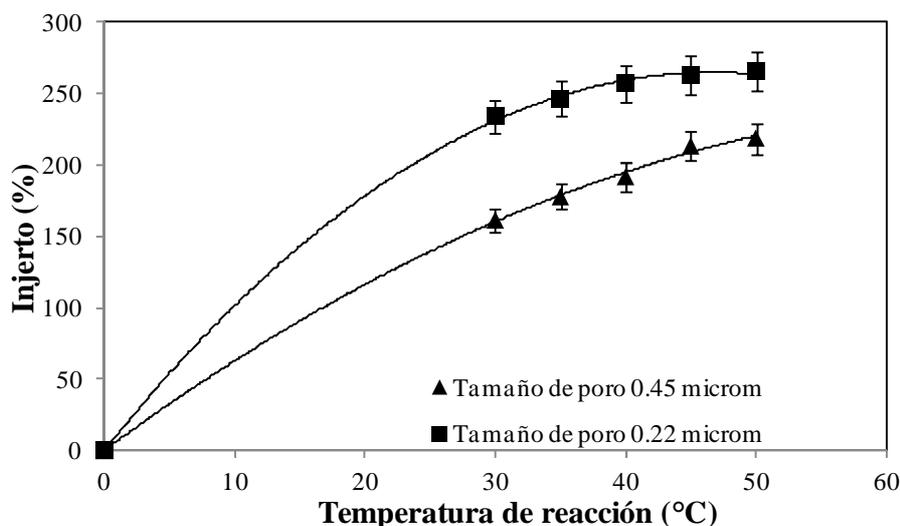


Fig. 3.4. Concentración de monómero del 20 % AAc en agua, dosis de 10 kGy, tamaño de poro 0.22 y 0.45 μm , y temperatura de reacción 30 min PVDF pre irradiadas

1.1.2 Síntesis de PVDF-g-DMAEMA

En este caso las membranas fueron irradiadas junto con el monómero debido a la baja reactividad del mismo, promoviendo la formación del injerto sobre los radicales formados en las zonas cristalinas del polímero.

La variación del porcentaje de injerto con la concentración del monómero de DMAEMA en dos diferentes solventes e muestra en la Figuras 3.5 y 3.6 a una dosis de 10 kGy. En ambas gráficas el porcentaje de injerto aumenta con la concentración de monómero y similar que en el injerto de AAc, el porcentaje de injerto en las membranas es mayor para el tamaño de poro menor. El máximo porcentaje de injerto para una concentración del 50 % en ambos solventes es similar (entre 110 y 120%) pero las membranas modificadas en la mezcla de etanol-agua se mostraron quebradizas al tacto, este tipo de disolvente protónico promueve la degradación del material por la creación de un exceso de especies radicales libres en el medio [Kimura et al., 2008] mientras que el tolueno es capaz de generar una protección ante la radiación debido a la resonancia de los electrones en el anillo aromático [Shigehicko et al., 2001].

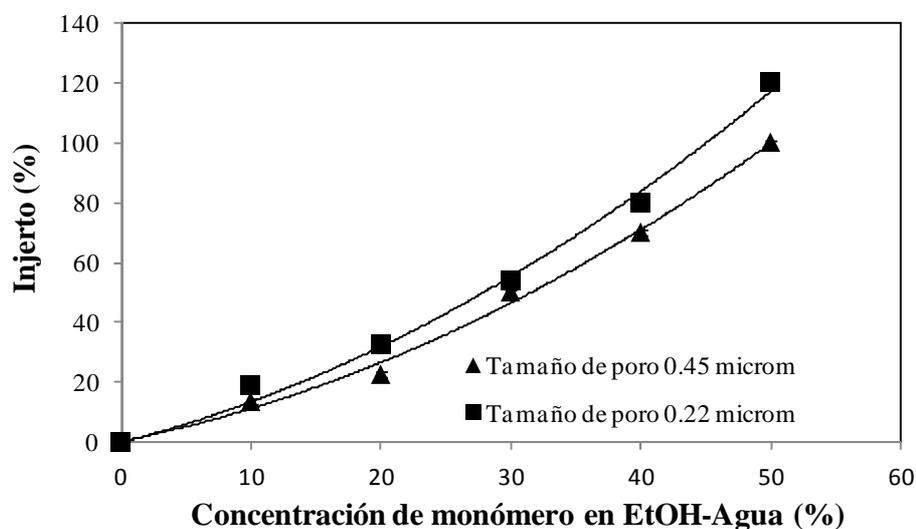


Fig. 3.5. Porcentaje de injerto en función de la concentración de DMAEMA en Etanol-agua 1:1, dosis de 10 kGy, tamaño de poro 0.22 y 0.45 μm en membranas de PVDF

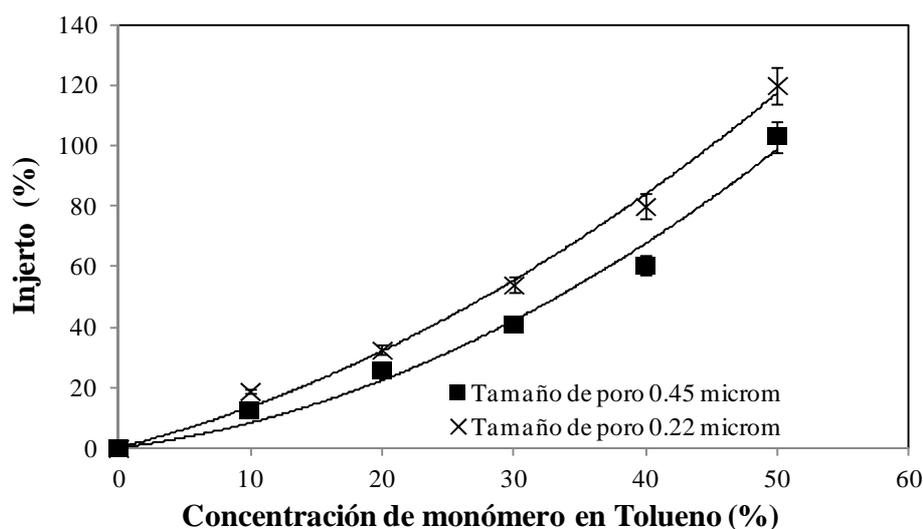


Fig. 3.6 Porcentaje de injerto en función de la concentración de DMAEMA en tolueno, dosis de 10 kGy, tamaño de poro 0.22 y 0.45 μm en membranas de PVDF

Una evidencia física cualitativa se puede apreciar en la Figura 3.7 que corresponde a las membranas modificadas de la Figura 3.6. En ésta figura se observa que el diámetro de las membranas modificadas crece desde 25 mm que es el diámetro original hasta 35 mm a una dosis de 10 kGy y 50 % de concentración de monómero. Este comportamiento también se encontró en las membranas de PVDF-g-AAc 0.22 y 0.45 μm .

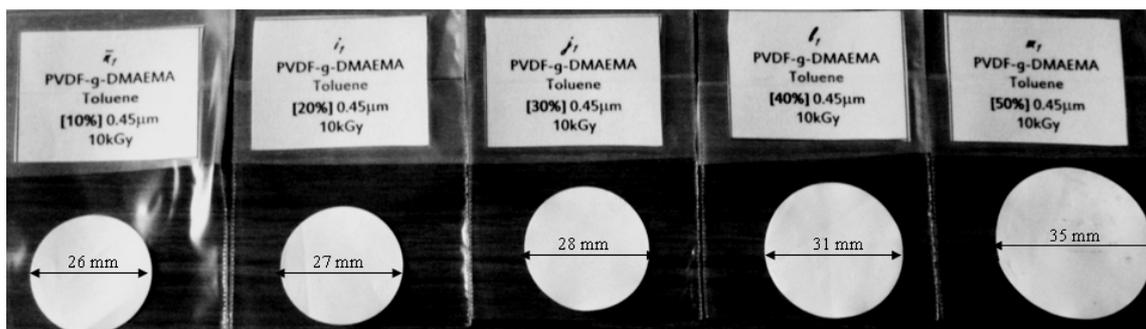


Fig. 3.7. Crecimiento del diámetro de las membranas en función del porcentaje de injerto y la concentración de monómero de DMAEMA.

La variación del porcentaje de injerto con respecto a la dosis se aprecia en la Figura 3.8, el experimento fue llevado a cabo en tolueno a una concentración de monómero del 50 %. El porcentaje de injerto de DMAEMA aumenta gradualmente con la dosis de irradiación, debido a que a mayores dosis se forma una mayor cantidad de radicales libres en la membrana de PVDF y por tanto hay más sitios activos en los que el monómero puede reaccionar. También se observó el efecto de mayor porcentaje de injerto en membranas de tamaño de poro menor.

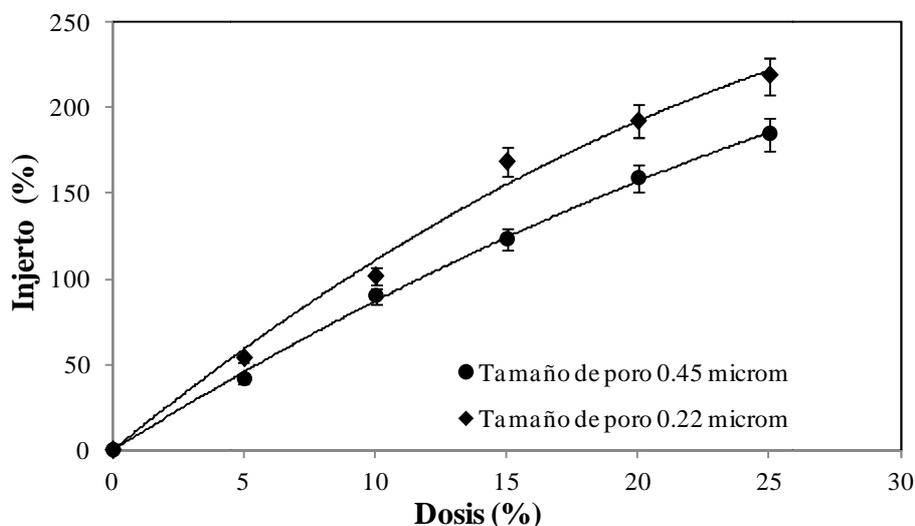


Fig. 3.8 Porcentaje de injerto en función de la dosis de irradiación. Concentración de monómero 50% DMAEMA en tolueno

Al igual que la Figura 3.7, la Figura 3.9 muestra el crecimiento en el diámetro de las membranas modificadas de PVDF con diferentes porcentajes de injerto de DMAEMA, en este caso las membranas corresponden al experimento de la gráfica 3.8 en el cual se tiene una variación en la dosis aplicada y se mantiene fija la concentración de monómero en un 50 %. El crecimiento del

diámetro de la membrana puede indicar que el injerto está ocurriendo tanto en la superficie como en el seno de la membrana.

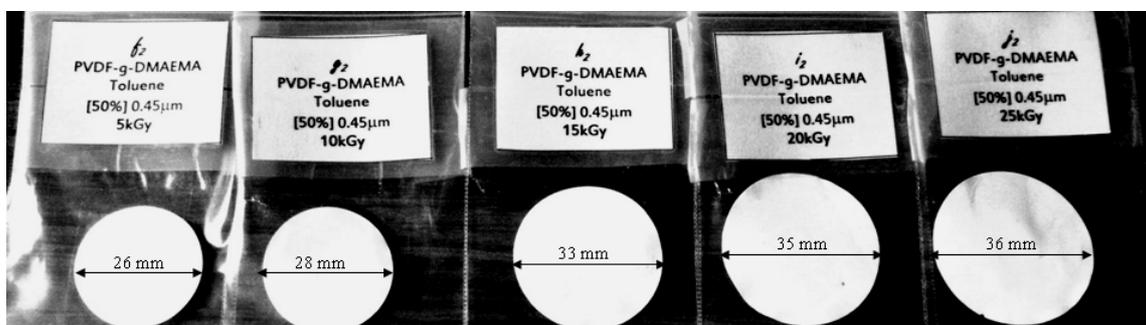


Fig. 3.9 Crecimiento del diámetro de las membranas en función del porcentaje de injerto y la dosis de irradiación

1.2 Segundo Paso

1.2.1 Síntesis de (PVDF-g-DMAEMA)-g-AAc

Una vez que se realizaron los injertos tanto de AAc como de DMAEMA sobre membranas de PVDF por separado, se procede al paso 2 en el que se injertará el segundo monómero. Se usaron las condiciones óptimas de para obtener aproximadamente el 100 % de injerto de cada uno de los monómeros.

En el caso de la obtención de (PVDF-g-DMAEMA)-g-AAc solo se varió el tiempo y la temperatura reacción, a una dosis fija de 8 kGy una concentración de monómero del 20 % de DMAEMA en tolueno. La concentración de monómero y la dosis no se modificaron para evitar la gran formación de homopolímero a altas concentraciones y no perjudicar las propiedades mecánicas del polímero fluorado con la exposición de altas dosis de irradiación. Para la síntesis se eligieron membranas de PVDF modificadas con aproximadamente el 100 % de injerto y se pre-irradiaron.

La variación del tiempo de reacción para ambos tamaños de poro se aprecia en la Figura 3.10, en ella se observa una ligera dependencia entre el porcentaje de injerto y el tiempo de reacción, el porcentaje de injerto es 10 % menor para membranas con tamaño de poro de 0.45 μm que para las membranas de 0.22 μm. En la síntesis de PVDF-g-AAc bajo las mismas condiciones anteriormente descritas, el monómero de AAc se consume a los primero 30 min de reacción ya sea en la formación de homopolímero o bien injerto y el porcentaje de injerto a ese tiempo es mayor a 200 %, sin embargo en la síntesis de (PVDF-g-DMAEMA)-g-AAc a ese mismo tiempo el porcentaje de injerto de AAc es alrededor del 50% , esto nos dice que no es posible obtener los mismos

porcentajes de injerto de AAc usando como matriz PVDF-g-DMAEMA que usando PVDF pre irradiados puesto que la membrana de PVDF ha cambiado sus propiedades físicas y químicas y ahora se parece más a poliDMAEMA.

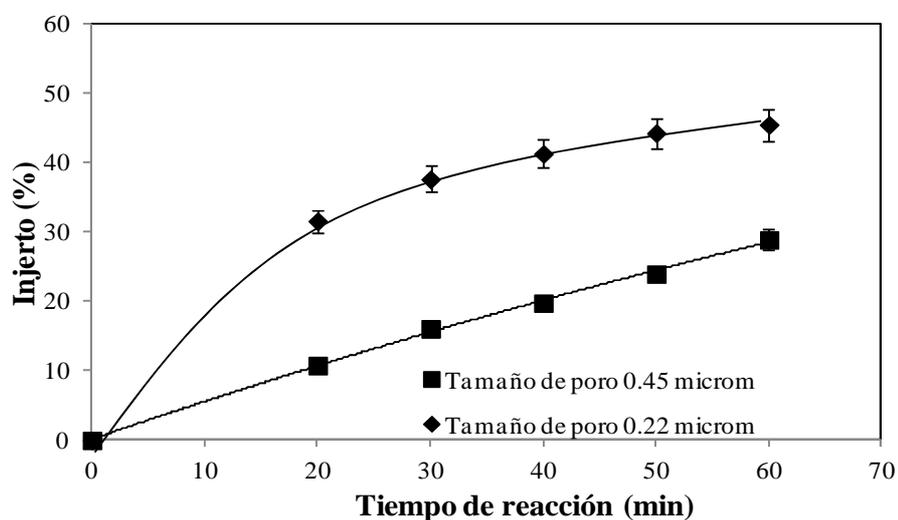


Fig. 3.10. Concentración de monómero del 20 % AAc en agua, dosis de 8 kGy, temperatura de reacción de 40°C en membranas pre irradiadas de PVDF-g-DMAEMA

En la Figura 3.11 hay una fuerte dependencia entre el porcentaje de injerto y la temperatura debido a que hay un aumento en la movilidad de las cadenas de poliDMAEMA y PVDF mejorando la difusión del monómero de AAc y facilitando el injerto sobre las cadenas de PVDF y las de DMEMA.

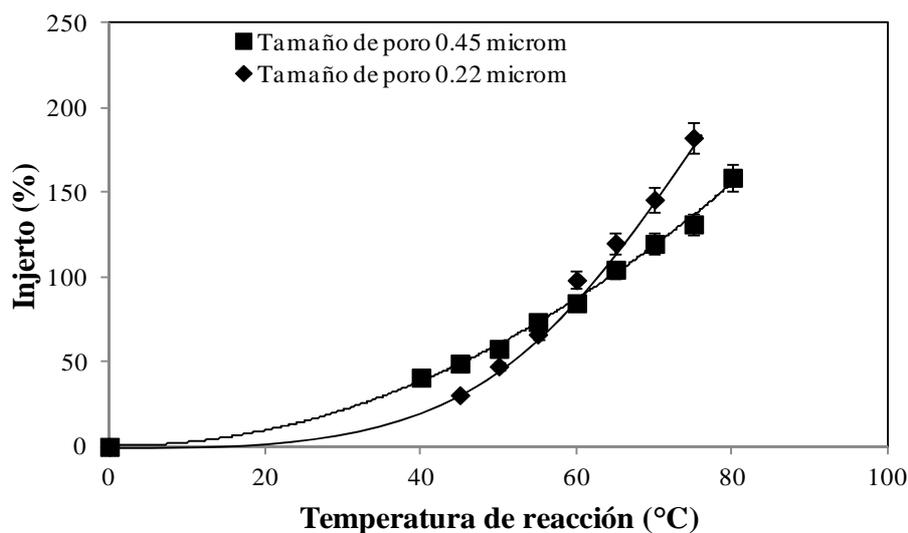


Fig. 3.11. Concentración del 20% AAc en agua, dosis de 8 kGy, y tiempo de reacción de 60 min, en membranas pre irradiadas de PVDF-g-DMAEMA

Al realizar la síntesis del injerto binario se observó que al aumentar el porcentaje de AAc no sólo la variación del diámetro era evidente sino también el espesor. La tabla 3.1 muestra los valores de diámetro y espesor de la membrana virgen, la injertada con DMAEMA y el copolímero binario en diferentes porcentajes de injerto de AAc, los datos muestran que al aumentar el porcentaje de injerto también aumenta el espesor de la membrana evidenciando que el injerto no sólo se encuentra en la superficie de la misma o bien puede indicar que el injerto está creciendo en todas direcciones.

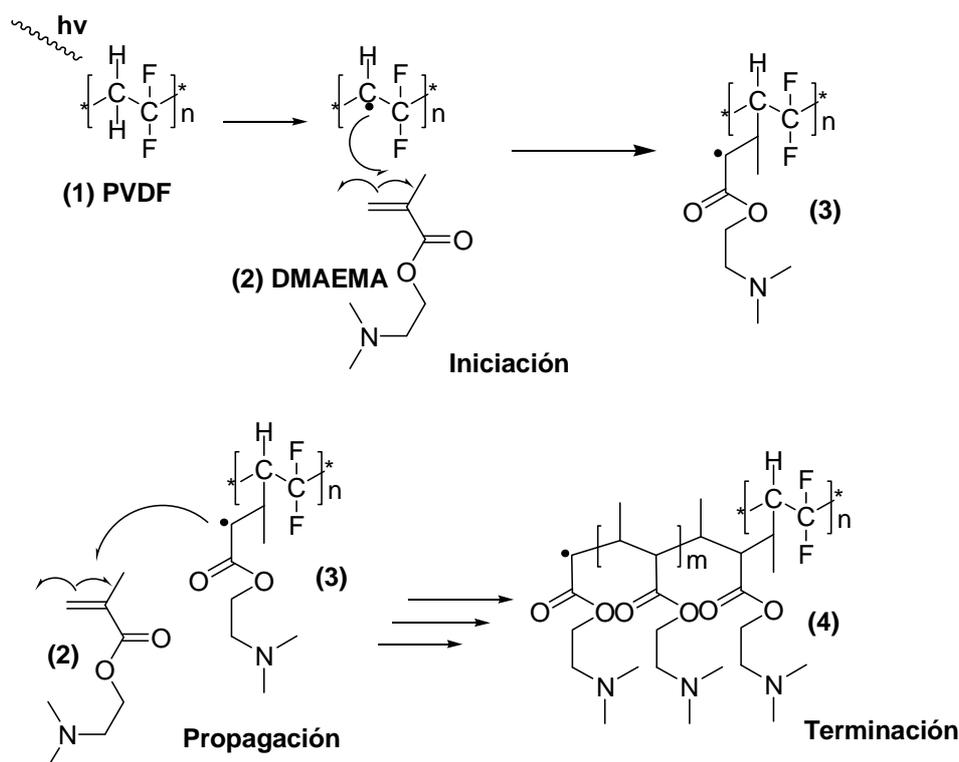
Tabla 3.1. Espesor y diámetro de membranas modificadas con diferentes porcentajes de AAc

Muestra	Espesor μm	Diámetro mm
PVDF	0.05	25.08
PVDF-g-DMAEMA 100%	0.10	27.85
(PVDF-g-DMAEMA)-g-AAc 30 %	0.12	30.13
(PVDF-g-DMAEMA)-g-AAc 60 %	0.13	30.84
(PVDF-g-DMAEMA)-g-AAc 100 %	0.15	32.95

El mecanismo de reacción simple planteado para la obtención del copolímero binario en dos pasos es el siguiente:

a) Primer paso

Las membranas de PVDF son irradiadas (1) en presencia del monómero de DMAEMA (2), es conocido que la radiación ionizante como la radiación gamma puede generar radicales y iones en los polímeros. Al irradiar la membrana de PVDF sin la presencia de oxígeno se genera una especie radical libre en el átomo de carbono que contiene el enlace C-H que juega un papel importante como sitio activo. Este radical promueve la formación del injerto cuando los electrones del doble enlace de la molécula de DMAEMA interactúan con el radical libre formando un nuevo enlace (3). Los radicales libres del DMAEMA pueden reaccionar con otros en la etapa de propagación adicionando mas y mas moléculas de monómero hasta formar macroradicales. La adición termina cuando dos macroradicales se encuentran o cuando el macroradical abstrae un radical hidrógeno y la cadena deja de crecer siendo esta etapa la terminación por acoplamiento o desproporción (4). Pueden existir otras reacciones en el medio como la formación de homopolímero o ionización del disolvente pero esto dependerá de la concentración de monómero y la dosis de irradiación, mientras que el tamaño de la cadena dependerá principalmente de la intensidad ya que se conoce que a mayor intensidad el tamaño de la cadena es menor. [Sanju et al., 2009]



Esquema 1. Mecanismo de reacción simplificado para la obtención del injerto de (PVDF-g-DMAEMA)-g-AAc

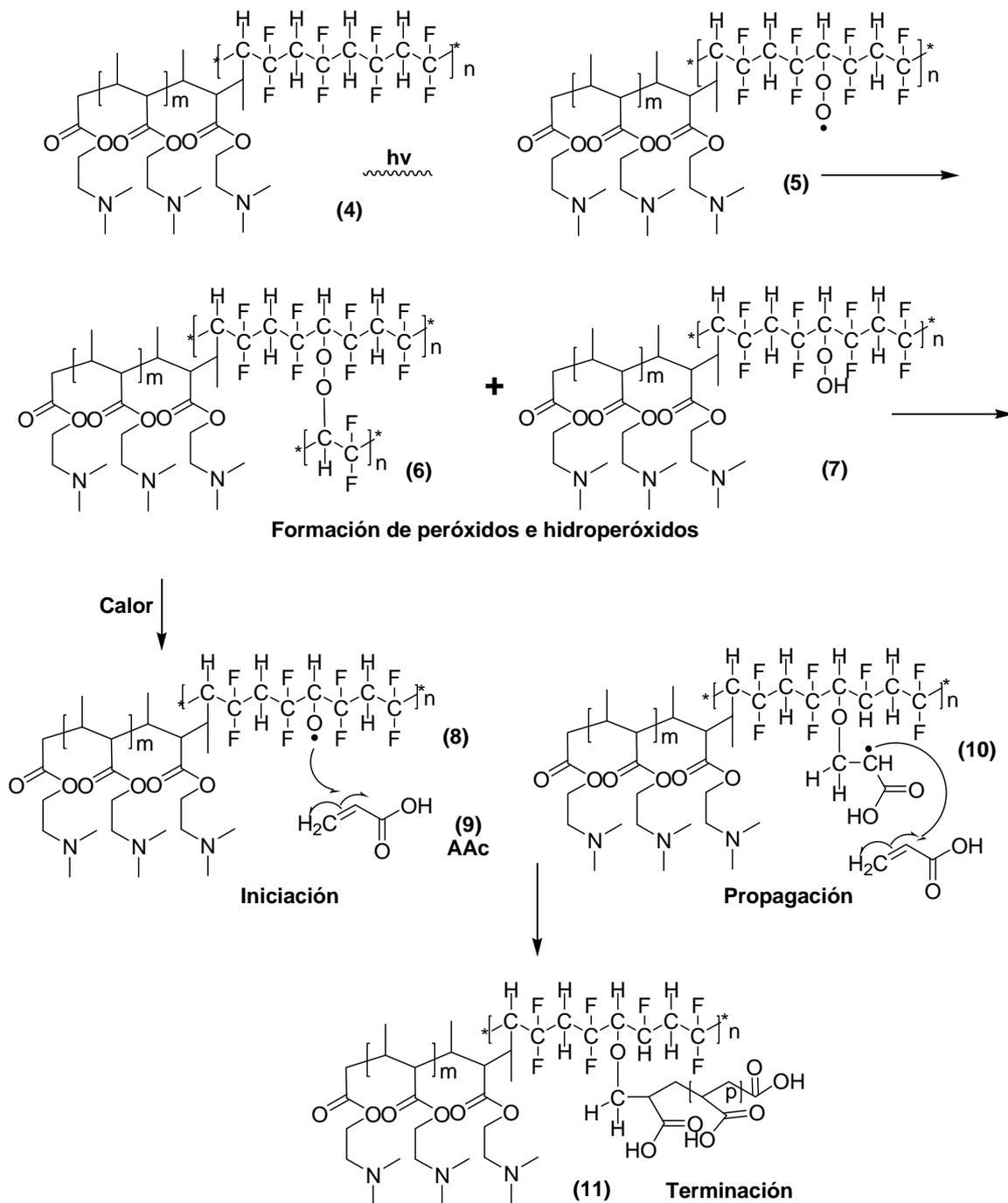
b) Segundo paso.

El segundo paso para la obtención del copolímero binario es la adición del AAc a la membrana previamente sintetizada de PVDF-g-DMAEMA (4) con aproximadamente 100 % de injerto pre irradiada a 8 kGy (5). Se eligió el método de preirradiación oxidativa frente al directo debido a la naturaleza del monómero que es muy reactivo y tiende a homopolimerizarse sobre la formación del injerto.

La irradiación en aire afecta tanto a la membrana como el oxígeno presente alrededor de ésta, la condición anterior ocasiona que el oxígeno triplete forme un enlace covalente con los sitios activos de la membrana y radical que puede ser estabilizado ya sea por el acoplamiento con otro macrorradical o la extracción de un radical hidrógeno. Dichos peróxidos son estables a temperaturas menores a 15 °C (6) y (7) pero pueden descomponerse al aumentar la temperatura (8) [Kaur et al., 1999].

En una segunda etapa las membranas previamente irradiadas se colocan en una ampollita que contiene la solución acuosa de AAc (9) y se calientan. Los peróxidos se descomponen por efecto del aumento de la temperatura para formar radicales peróxido que interactúan con el doble enlace del AAc y forman el injerto en la etapa de iniciación. Después se llega a la etapa de propagación al

unirse más moléculas de AAc (10) hasta la etapa de terminación como en una polimerización por radicales libres común (11).



Esquema 1 continuación... Mecanismo de reacción simplificado para la obtención del injerto de (PVDF-g-DMAEMA)-g-AAc

1.2.2 Síntesis de (PVDF-g-AAc)-g-DMAEMA

Para éste experimento se usó membranas de PVDF-g-AAc con aproximadamente 100% de injerto utilizando método directo y pre irradiación oxidativa.

No fue posible obtener el injerto binario de DMAEMA sobre PVDF-g-AAc en las mismas condiciones en que se obtuvo PVDF-g-DMAEMA ni por preirradiación oxidativa, el porcentaje de injerto de DMAEMA fue menor al 1 %.

Este resultado tiene la posible explicación de que la reacción de entrecruzamiento de las cadenas de AAc fue mayor que la del injerto por efecto de la irradiación directa. Aunque se intentó la preirradiación de la membrana, el efecto del entrecruzamiento de los macroradicales peróxido también se favoreció sobre el injerto de DMAEMA. La reacción de injerto frente el entrecruzamiento se puede evitar probablemente disminuyendo la dosis para provocar menor entrecruzamiento o bien usando membranas de PVDF-g-AAc con menores porcentajes de injerto [Lazo and Burillo, 2010] que para los fines de este trabajo no serán usadas. Por lo cual se decidió trabajar sólo con las membranas de (PVDF-g-DMAEMA)-g-AAc siguiendo los objetivos del presente trabajo.

Los tipos, rendimientos de los radicales formados y los cambios estructurales que tienen lugar en la irradiación de fluoropolímeros han sido objeto de recientes estudios [Forsythe and Hill, 2000; Hill and Whittaker, 2002]. Los fluoropolímeros generalmente se someten a escisión de la cadena neta en irradiación a temperatura ambiente y los radicales estables formados son predominantemente al final de cadena y a la mitad de la misma.

Los valores G para la formación de radicales varían de polímero a polímero y con la temperatura de irradiación, el medio ambiente y la naturaleza de la fuente de radiación. (El valor de G es el número de especies formadas o el número de cambios químicos de un tipo particular inducida por la deposición de 16 ajes (100 eV) de energía). El valor de G típico para la formación de radicales en g-radiólisis a vacío a temperatura ambiente es para PVDF de 3.3 [Seguchi et al., 2003] Estos rendimientos radicales son comparables con los rendimientos observados para las poliolefinas en condiciones de radiólisis similares, y los radicales son relativamente de larga duración. Esto significa que estos fluoropolímeros son susceptibles tanto para usar los métodos simultáneo o de preirradiación oxidativa para obtener el injerto [Dargavillea et al., 2003].

2. Caracterización de las membranas.

2.1 Caracterización mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La tabla 3.2 muestra los valores de transición térmica de la membrana virgen y modificada. La temperatura de transición vítrea (Tg) para los homopolímeros amorfos de poliDMAEMA y poliAAc fueron encontradas a 110 y 125 °C respectivamente. Para el PVDF su Tg (de la parte amorfa) se encuentra por debajo de la temperatura ambiente en -40 °C, el Tm de la parte cristalina (fasesβ) [Ebnessajjad, 2003] se encontró en 163 °C, éste valor no cambió con respecto a la modificación de la membrana sin embargo lo que pudo haber cambiado fue el porcentaje de cristalinidad por efecto de la radiación y el injerto. Para la muestra modificada de PVDF no fue posible observar los valores de Tg probablemente a la falta de sensibilidad del equipo o las condiciones de la muestra empleadas para o determinarla. El análisis para (PVDF-g-AA)-g-DMAEMA muestra una respuesta (Tm) en 161 °C pero esta prueba no es concluyente para saber si existe modificación o no.

Tabla 3.2. Análisis térmico por Calorimetría Diferencial de Barrido

Muestra	Tg (°C)	Tm(°C)
	1 ^{er} Calentamiento	1 ^{er} Calentamiento
PVDF	-40	163
PDMAEMA	110	N/A
PAAc	125	N/A
PVDF-g-DMAEMA	N/O	162
PVDF-g-AAc	N/O	163
(PVDF-g-DMAEMA)-g-AAc	N/O	161

N/A = no aplicable, N/O = no observable

2.2 Caracterización mediante Análisis Termogravimétrico (TGA)

La Figura 3.12 muestra un termograma pequeño que compara los termogramas de las materia primas de PVDF y los homopolímeros de AAc y DMAEMA, en ambos homopolímeros la molécula se descompone en dos fases ya que se observan dos pérdidas en cada uno que corresponde a la descarboxilación de los homopolímeros en una primera fase y la descomposición de la cadena hídricarbonada como segunda fase (descomposición al 10% 290 y 340 °C respectivamente),

mientras que el PVDF se descompone en una sola etapa (descomposición al 10% 405 °C). Aunque no se muestran los termogramas para la membrana modificada con solo uno de los homopolímeros (PVDF-g-DMAEMA y PVDF-g-AAc) se encontró que el perfil de descomposición es el mismo que para sus análogos sin injertar pero tienen la primera y segunda pérdida 20 °C después que sus respectivos, esto sucede porque el material en conjunto adquiere las propiedades de ambos polímeros, el homopolímero correspondiente y la membrana.

El termograma grande muestra los efectos de la temperatura sobre el copolímero binario sintetizado en dos etapas con respecto a la membrana sin modificar. El termograma que corresponde al copolímero de (PVDF-g-DMAEMA)-g-AAc presenta el perfil esperado de descomposición de las cadenas de AAc y DMAEMA empezando por súbita pérdida de peso correspondiente a la descarboxilación de los grupos carbonilo de ambos monómeros, para después a los 450 °C degradarse completamente. La pérdida en peso al 10% de descomposición para esta membrana se da a los 275 °C que aunque es menor que los homopolímeros y el injerto de un solo monómero, sí es aceptable para las aplicaciones pretendidas.

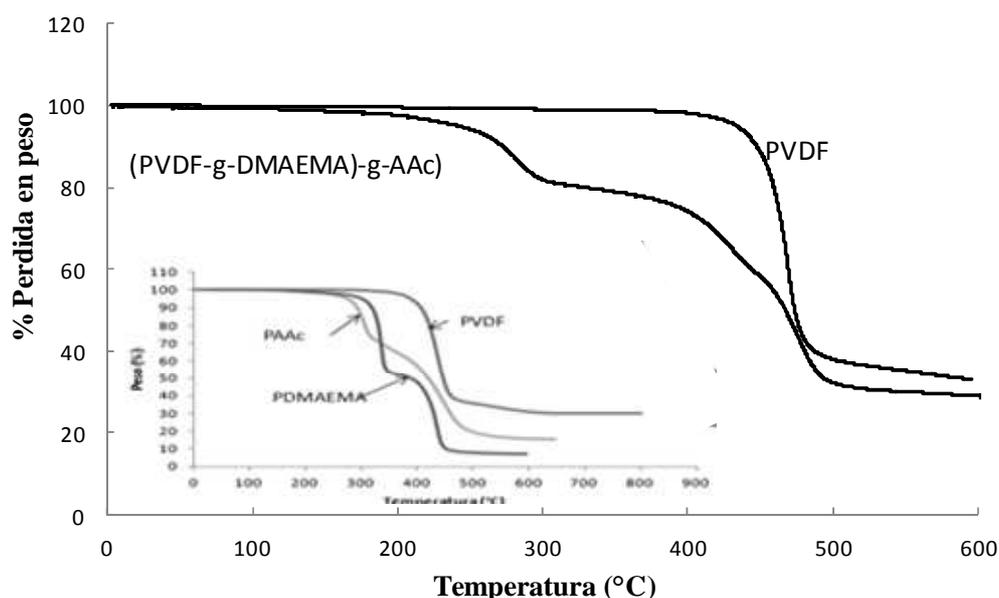


Fig. 3.12. Caracterización térmica de las membranas virgen, modificada y homopolímeros de DMAEMA y AAc

2.3 Caracterización mediante Infrarrojo (FT-IR)

La Figura 13.13 muestra las diferencia esenciales del espectro de FT-IR de la membrana virgen y las modificadas. Las bandas de absorción características de PVDF son para -CH₂ (778, 976 y 3000

cm^{-1}) y CF_2 (615 , y 1279 cm^{-1}) [Bormashenko et al., 2003], mismas que se observan en el espectro de la membrana sin modificar. El espectro de poliAAc presenta una pequeña protuberancia alrededor de los 3300 cm^{-1} de la vibración del grupo OH, sin embargo la banda de absorción es relativamente débil debido posiblemente a la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares que promueven la formación de tetrámeros que en conjunto disminuyen la vibración. También se observa la banda en 1710 cm^{-1} proveniente de la vibración del carbonilo de ácido presente en la molécula. PVDF-g-AAc se repiten las mismas bandas que PVDF y AAc lo que indica que probablemente hay un injerto. El espectro correspondiente a poliDMAEMA presenta una banda característica de grupos alquilo a los 3000 cm^{-1} y otra banda en 1730 cm^{-1} que representa al grupo carbonilo de ester del DMAEMA. El espectro del injerto de PVDF-g-DMAEMA muestra las mismas bandas de absorción que PVDF y poliDMAEMA. El siguiente espectro corresponde al injerto binario sintetizado en dos pasos, en este espectro se muestran las bandas características de PVDF, poliDMAEMA y poliAAc sin embargo se presenta un corrimiento de la banda de AAc por la presencia del otro grupo carbonilo, es probable que el corrimiento se deba por la interacción del grupo carbonilo con átomos de hidrógeno adyacentes que forman un puente de hidrógeno y estiran el enlace del grupo carbonilo de ácido. Esta es una evidencia más de que se tiene la formación del injerto.

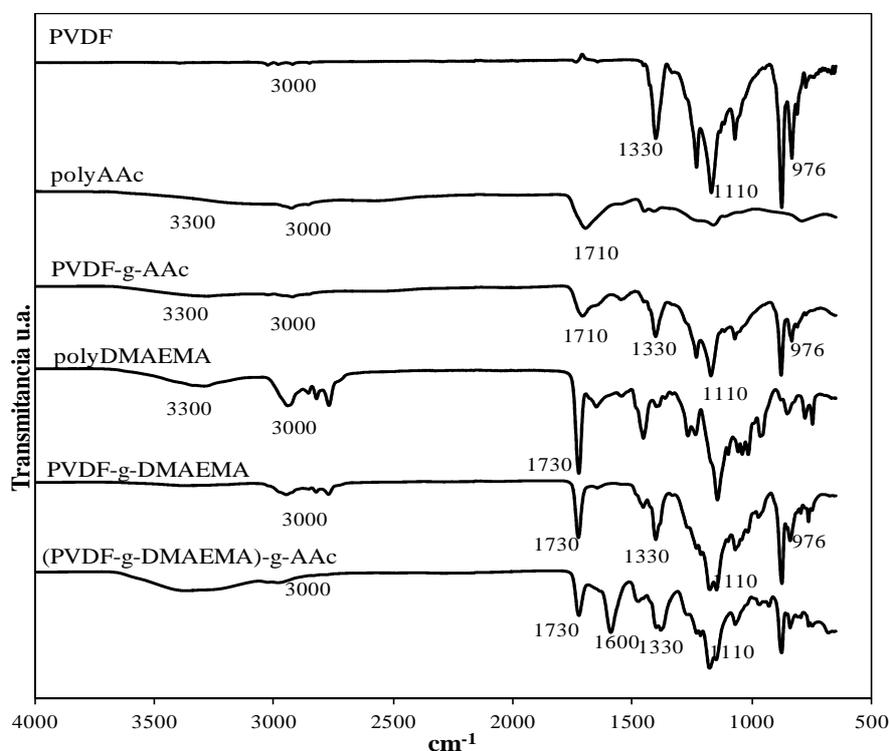


Fig. 3.13 Principales bandas de absorción en FT-IR ATR de las membranas vírgenes y modificadas

2.4 Análisis de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Membranas de 0.45 μm de tamaño de poro modificadas y sin modificar y 100 % de injerto. Micrografía (a) muestra la membrana de PVDF virgen con un tamaño de poro homogéneo. Cuando la membrana es injertada con un 100 % de AAc (b) o DMAEMA (c) los microporos crecen, a consecuencia del método de síntesis en la cual el solvente hincha tanto la membrana, que ésta se rompe en ciertos sitios. El injerto se da homogéneamente tanto en los poros de la membrana de manera superficial y en el interior de la misma. Cuando la membrana es injertada con un 100 % de DMAEMA y AAc (d) toda la superficie se encuentra cubierta con cadenas de ambos monómeros y la morfología cambia consistentemente.

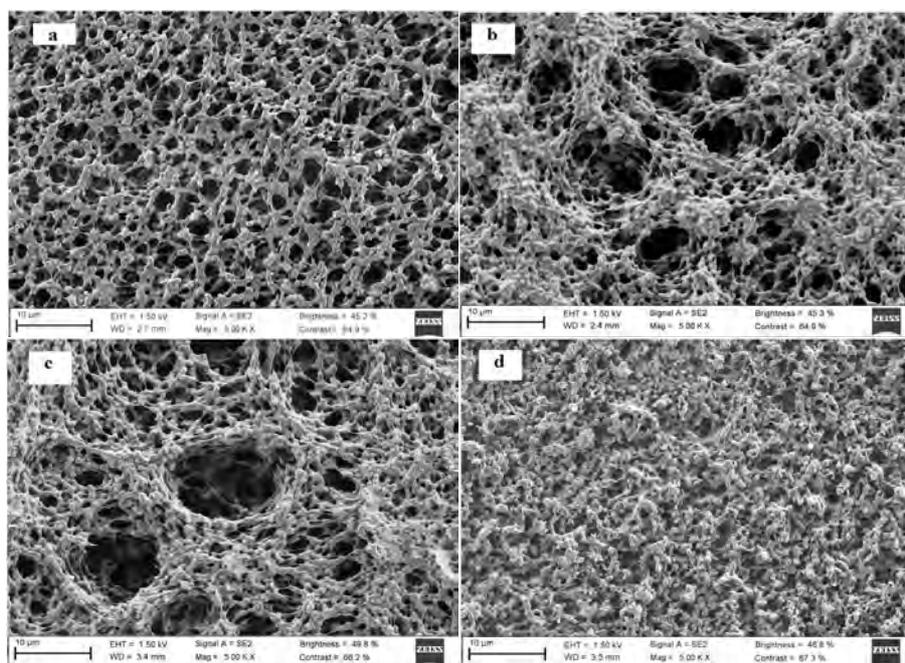


Fig. 3.14. Microscopías de a) PVDF virgen, b) PVDF-g-AAc , c) PVDF-g-DMAEMA, d) (PVDF-g-DMAEMA)-g-AAc para membranas de tamaño de poro de 0.45 μm y 100 % de injerto

2.5 Rompimiento a la tracción.

Una propiedad mecánica que se midió de las muestras modificadas y sin modificar se fue el rompimiento a la tracción, tanto para el copolímero binario con dos tamaños de poro diferentes y dos porcentajes de injerto se compararon con respecto a la membrana sin modificar, los resultados se muestran en la Tabla 3.3. Las muestras fueron sumergidas en amortiguador 4.5 por 5 minutos. Las membranas húmedas aparentan mejorar sus propiedades mecánicas además que el uso que se les dará será en este estado. Cambios en las propiedades mecánicas después del injerto pueden

afectar la respuesta en aplicaciones biomédicas o farmacéuticas. El copolímero binario de (PVDF-g-DMAEMA)-g-AAc con aproximadamente 100 % de ambos homopolímeros conserva buenas propiedades mecánicas respecto a la membrana no modificada, sin apreciable dependencia en el tamaño de poro. Sin embargo el rompimiento a la tracción sí presenta una dependencia con respecto al porcentaje de injerto de AA ya que cuando éste disminuye también lo hace su resistencia. Lo anterior sugiere que la propiedad se encuentra gobernada en su mayoría por el injerto más que por la membrana misma en estas condiciones de trabajo.

Tabla 3.3. Rompimiento a la tracción de membranas de PVDF virgen y modificadas con diferentes porcentajes de injerto de AAc

Sistema	Esfuerzo a la Tracción kPa	Tamaño de poro μm
PVDF 0.22	26.159	0.22
PVDF 0.45	34.773	0.45
PVDF-g-DMAEMA-g-AAc Injerto 96/51%	10.057	0.22
PVDF-g-DMAEMA-g-AAc Injerto 100/49%	10.472	0.45
PVDF-g-DMAEMA-g-AAc Injerto 100/106%	22.607	0.22
PVDF-g-DMAEMA-g-AAc Injerto 102/98%	21.310	0.45

2.6 Angulo de contacto.

El análisis del ángulo de contacto para las membranas no modificadas muestra que son de naturaleza hidrofílicas debido a un pre tratamiento de fábrica que se desconoce, aunque la literatura muestra que es posible la adición de un injerto de un monómero altamente hidrofílico con porcentaje de injerto es muy pequeño para ser detectado [Fu et al., 2001]. El ángulo de contacto para las muestras no modificadas disminuye con el tamaño de poro ($0.22 \mu\text{m} \rightarrow 25^\circ$ y $0.45 \mu\text{m} \rightarrow 11^\circ$ a un $t = 1\text{s}$). El ángulo de contacto a los 5 s fue $\sim 0^\circ$ debido a la hidrofiliidad de la superficie de la membrana. Ángulos de contacto pequeños promueven la difusión en las matrices de los monómeros hidrofílicos en el proceso de injerto e incrementa la carga y liberación de ciertos fármacos de naturaleza hidrofílica.

Para los sistemas injertados el ángulo de contacto fue mayor al segundo 1 ($0.22 \mu\text{m} \rightarrow 50^\circ$ y $0.45 \mu\text{m} \rightarrow 45^\circ$ a un $t = 1\text{s}$) pero a los 5 s el ángulo fue de $\sim 0^\circ$. Aunque los monómeros injertados son de naturaleza hidrofílica es probable que al segundo 1 exista una baja mojabilidad de la superficie debido a que la superficie no es homogénea o bien las cadenas de ambos monómeros se encuentren interaccionando entre ellas, sin embargo al segundo 5 se da una mojabilidad completa. Así pues al ángulo de contacto para el copolímero binario depende de la modificación de la superficie después de la irradiación y de la interacción rápida o lenta entre las gotas de agua y los monómeros injertados.

3. Determinación del pH crítico

3.1 Hinchamiento Límite

El tiempo de hinchamiento límite fue determinado gravimétricamente usando la ecuación 2.2. Las Figuras 3.15 y 3.16 muestran el porcentaje de hinchamiento como una función del tiempo para tres diferentes sistemas y dos tamaños de poro. El tiempo de hinchamiento límite para las membranas modificadas con diferentes porcentajes de injerto fue de 5 minutos. El porcentaje de hinchamiento fue menor para membranas con porcentajes de AAc menor ya que al pH del agua destilada (5.4) las cadenas que contienen al grupo $-\text{COOH}$ interactúan fuertemente con las cadenas de DMAEMA. El tamaño de poro también influyó en el porcentaje de hinchamiento, siendo mayor para las membranas de $0.45 \mu\text{m}$, probablemente a la rápida difusión de las moléculas de agua en la membrana.

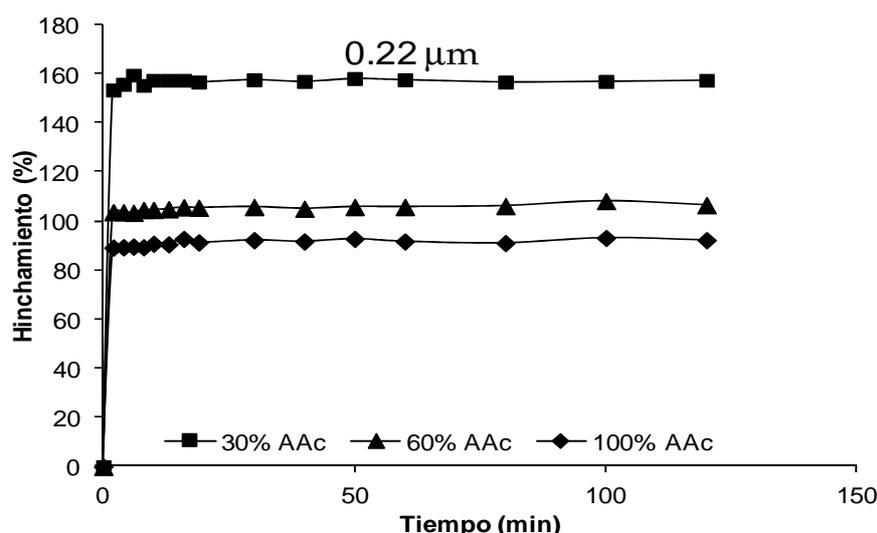


Fig. 3.15. Tiempo de hinchamiento límite para membranas de (PVDF-g-DEMAEMA)-g-AAc con 100 % de DMAEMA y porcentaje variable de AAc. Membranas de tamaño de poro de $0.22 \mu\text{m}$

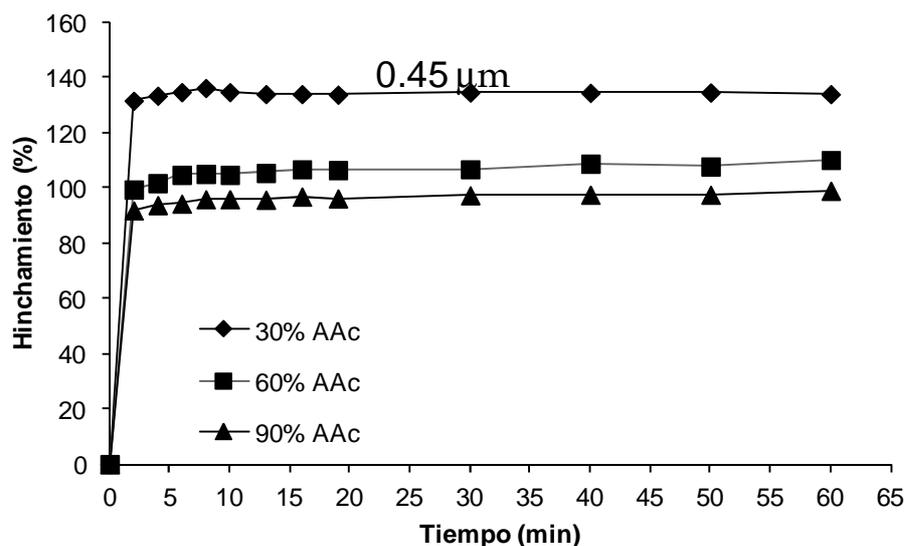


Fig. 3.16. Tiempo de hinchamiento límite para membranas de (PVDF-g-DEMAEMA)-g-AAc con 100 % de DMAEMA y porcentaje variable de AAc. Membranas de tamaño de poro de 0.45 μm

3.2 Determinación de pH crítico.

Las Figuras 3.17 y 3.18 muestran el comportamiento de hinchamiento en función del pH para tamaños de poro 0.22 μm y 0.45 μm respectivamente, para las membranas de PVDF-g-DMAEMA y PVDF-g-AAc. El pH crítico (pH_c) fue determinado para copolímeros con el 100 % de injerto usando el método de hinchamiento en soluciones amortiguador y la ecuación 2.3. El punto de inflexión de la curva sigmoidea obtenida se determinó calculando la segunda derivada. En estas figuras se observa que a un pH por debajo de 5.4 AAc se encuentra protonado y DMAEMA ionizado solvatado y con una carga positiva. A valores de pH por encima de 8.4 AAc se encuentra cargado negativamente y solvatado por un mayor número de moléculas de agua, el aumento en el porcentaje de hinchamiento de las membranas modificadas con AAc se debe al aumento en la presión osmótica y la repulsión entre cargas de las cadenas de AAc [Said, 2005]. El comportamiento opuesto se observa en el injerto con DMAEMA ya que su porcentaje de hinchamiento disminuye cuando el pH aumenta y los grupos amino del homopolímero pierden su carga positiva por tanto, el sistema pierde al agua de solvatación. Se considera que el comportamiento en el hinchamiento y el pH_c de las membranas modificadas dependerán principalmente de la ionización de los grupos ácido o amino de los monómeros en cuestión.

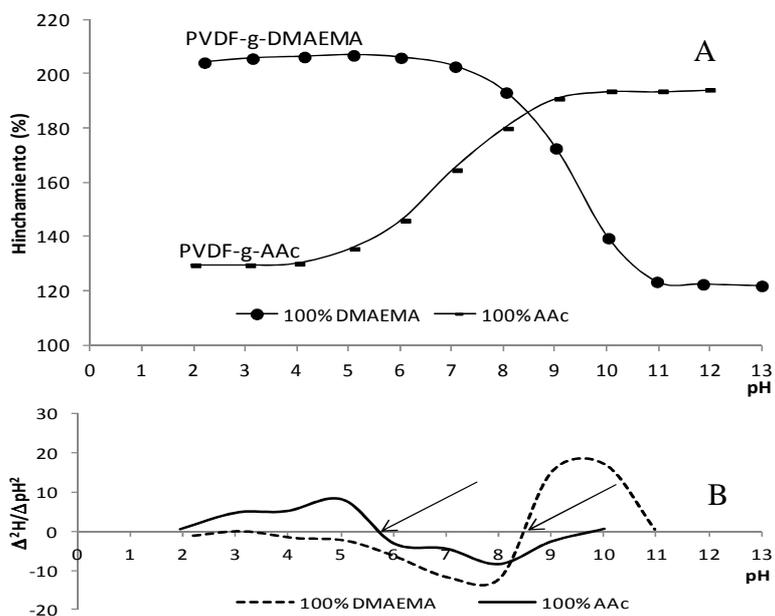


Fig. 3.17. A) Gráfica de hinchamiento en función de pH de membranas modificadas de PVDF con AAc y DMAEMA respectivamente. B) Determinación de pH crítico por la determinación del punto de inflexión a través de la obtención de la segunda derivada. Tamaño de poro 0.22 μm

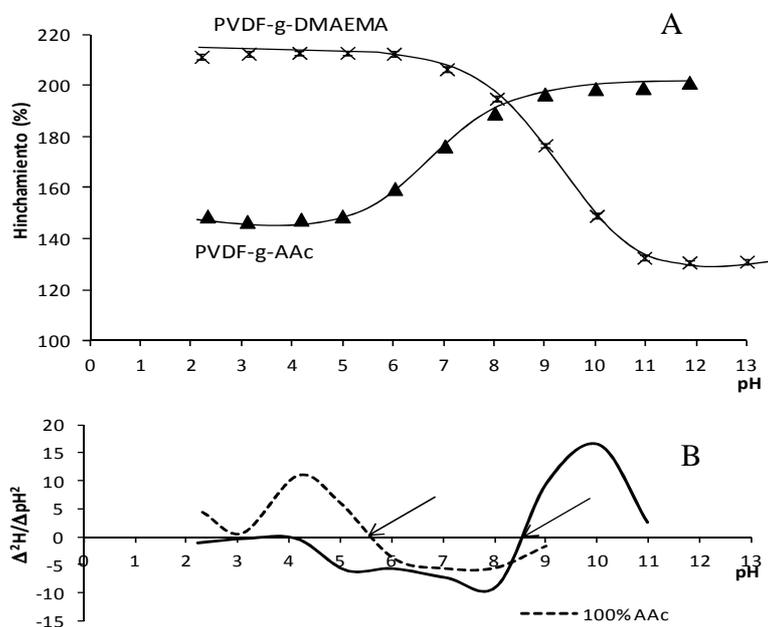


Fig. 3.18. A) Gráfica de hinchamiento en función de pH de membranas modificadas de PVDF con AAc y DMAEMA respectivamente. B) Determinación de pH crítico por la determinación del punto de inflexión a través de la obtención de la segunda derivada. Tamaño de poro 0.45 μm

El comportamiento de hinchamiento para el copolímero binario de (PVDF-g-DMAEMA)-g-AAc para dos tamaños de poro, 100 % de DMAEMA y concentración variable de AAc se observan en las Figuras 3.19 y 3.20. El copolímero binario exhibe un comportamiento de hinchamiento similar al de PVDF-g-AAc, pero el pH_c del copolímero binario se encuentra abatido ya que éste se encuentra entre el pH_c de ambos monómeros (pH_c 7.2 para 0.22 y pH_c 6.8 para 0.45 μ m). Este fenómeno ocurre en las cadenas de AAc a pH mayor que 5.4 ya que dominan el hinchamiento debido a que atrae una mayor cantidad de moléculas de agua que DMAEMA, sin embargo la interacción entre los dos monómeros convierten al material mas hidrofóbico a un pH menor que 5.4. El aumento en el pH_c con el comportamiento del monómero de AAc puede promover la carga y liberación de fármacos macromoléculas o proteínas a valores de pH en los cuales tienen mayor estabilidad.

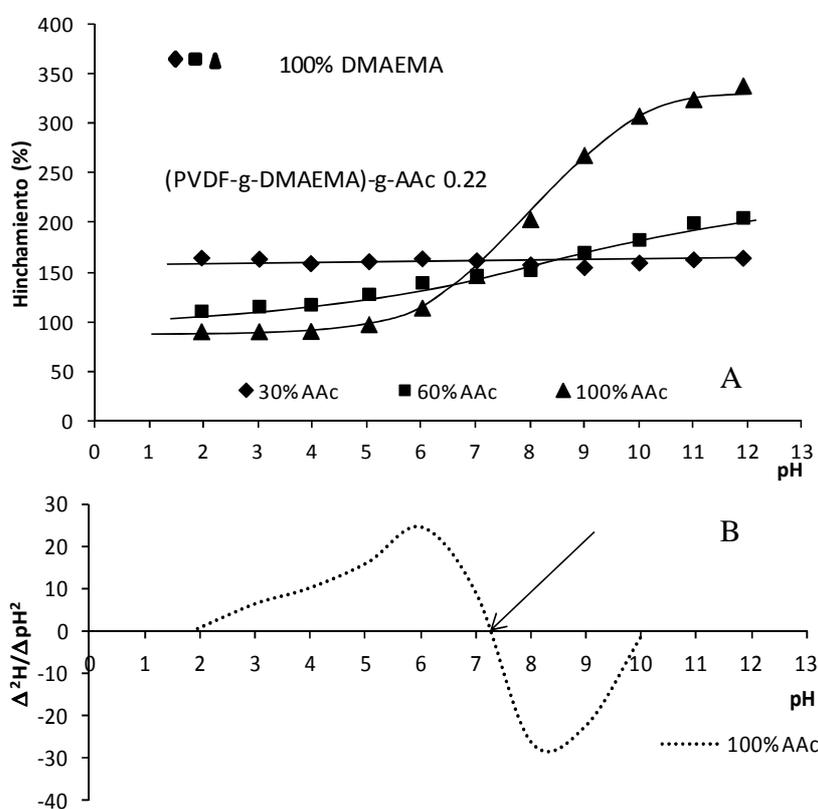


Fig. 3.19. A) Gráfica de hinchamiento en función de pH de membranas modificadas de PVDF con AAc y DMAEMA con 100 % de DMAEMA y porcentaje variable de AAc. B) Determinación de pH crítico por la determinación del punto de inflexión a través de la obtención de la segunda derivada. Tamaño de poro 0.22 μ m

La influencia del porcentaje de AAc se ve reflejada en el comportamiento de hinchamiento. Para ambos tamaños de poro se observa a que a mayor porcentaje de AAc la respuesta de la membrana es más rápida y marcada e inclusive a un 30 % de AAc la respuesta al hinchamiento es nula. Las membranas con una mayor respuesta al pH son las que se usaran en el ensayo de carga y liberación de fármacos.

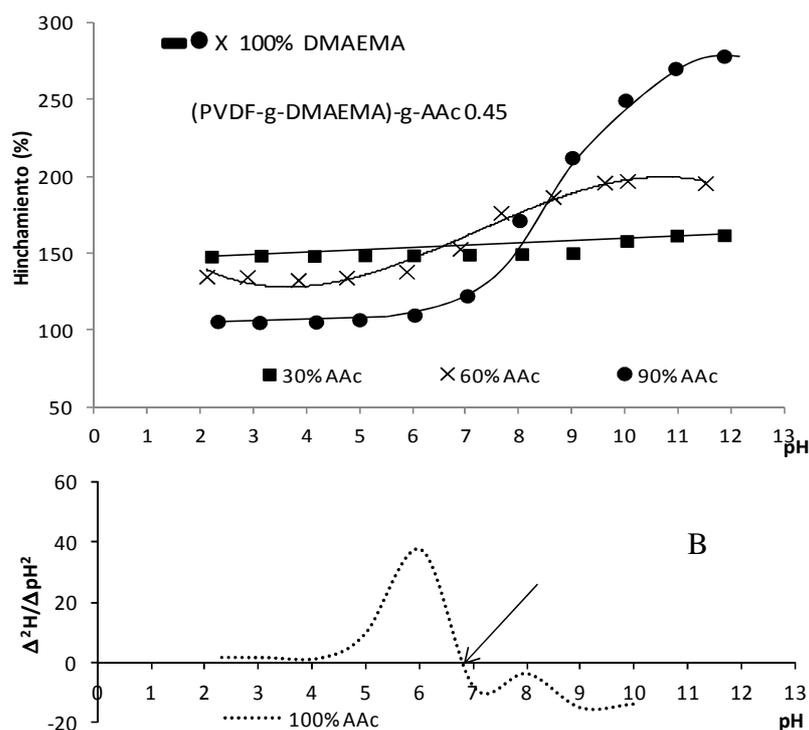


Fig. 3.20. A) Gráfica de hinchamiento en función de pH de membranas modificadas de PVDF con AAc y DMAEMA con 100 % de DMAEMA y porcentaje variable de AAc. B) Determinación de pH crítico por la determinación del punto de inflexión a través de la obtención de la segunda derivada. Tamaño de poro 0.45 μm

3.3 Estudio de reversibilidad al pH.

Dependiendo de la aplicación es necesario saber cuántas veces se puede reutilizar la membrana. Por ejemplo si se requiere como membrana para empaque de cromatografía o bien como membrana de filtración. La reversibilidad de los estados expandido y colapsado de los diferentes copolímeros a valores de pH 2 y 12 se muestran en las Figuras 3.21 y 3.22 las medidas se realizaron después de hinchar las muestras por 5 minutos a temperatura ambiente comenzado con el amortiguador pH 2 y alternando con amortiguador pH 12 hasta completar varios ciclos, los resultados muestran que para

los tres sistemas la reversibilidad es una función del tiempo hasta por lo menos 5 ciclos. La respuesta a la reversibilidad no difiere significativamente para los dos tamaños de poro

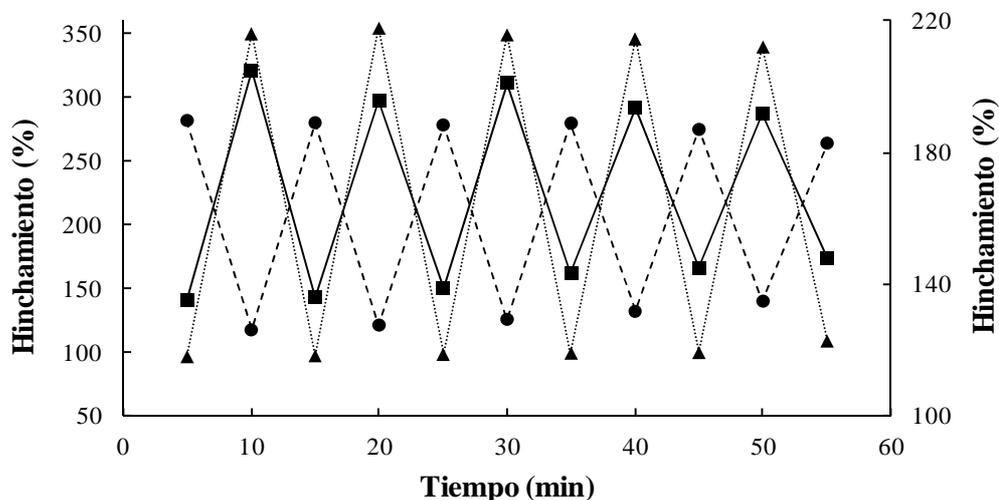


Fig. 3.21. Respuesta de reversibilidad al pH de los injertos de ■PVDF-g-AAc, ●PVDF-g-DMAEMA y ▲(PVDF-g-DMAEMA)-g-AAc a 100 % de injerto y tamaño de poro de 0.22 μm. El valor de pH fue alternado entre los valores, pH 2 y pH 12, para varios ciclos. El eje derecho corresponde al copolímero binario y el izquierdo a los copolímeros con sólo DMAEMA ó AAC

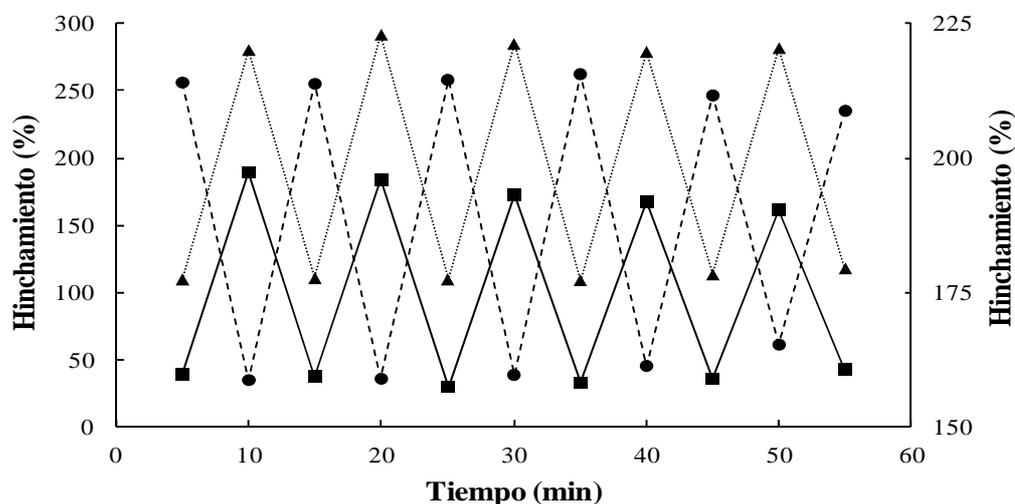


Fig. 3.22. Respuesta de reversibilidad al pH de los injertos de ■PVDF-g-AAc, ●PVDF-g-DMAEMA y ▲(PVDF-g-DMAEMA)-g-AAc a 100 % de injerto y tamaño de poro de 0.45 μm. El valor de pH fue alternado entre los valores, pH 2 y pH 12, para varios ciclos. El eje derecho corresponde al copolímero binario y el izquierdo a los copolímeros con sólo DMAEMA ó AAC

Los valores de sensibilidad al pH que fueron determinados con la ecuación 2.4 para los dos tamaños de poro y 100 % de injerto se muestran en la tabla 3.4. El comportamiento de hinchamiento que muestra las membranas modificadas ya sea con el monómero de AAc ó DMAEMA presentan una baja respuesta a la sensibilidad al pH mientras que el copolímero binario tiene una mejor respuesta con respecto al injerto por separado. Este punto puede derivarse de que el porcentaje de injerto del copolímero binario es de 100 % de DMAEMA y 100% de AAc es decir del 200 % en total y es capaz de absorber una mayor cantidad de agua. El tamaño de poro influye aparentemente en la sensibilidad, siendo mayor para el de 0.22 μm aunque esto podría ser casi despreciable.

3.4 Sensibilidad al pH

Tabla 3.4 Sensibilidad al pH para los diversos sistemas con 100 % de injerto. El experimento fue llevado a cabo en pH 2 y pH 12

Sistema	Tamaño de poro μm	Sensibilidad al pH
PVDF-g-DMAEMA	0.22	0.80
	0.45	0.88
PVDF-g-AAc	0.22	0.79
	0.45	0.83
PVDF-g-DMAEMA-g-AAc	0.22	0.44
	0.45	0.54

4. Carga y liberación de fármacos

4.1 Curva de calibración, carga y liberación de cafeína.

4.1.1 Curva de calibración

Se realizaron las correspondientes curvas de calibración para cafeína con soluciones de la misma en tres diferentes amortiguadores para garantizar el valor de la absorbancia y por ende la concentración adecuada para la correspondiente cuantificación del fármaco. La Figura 3.23 muestra los valores de la curva para 5 puntos por triplicado hasta una concentración máxima de 50 $\mu\text{g/mL}$. La absorbancia no parece cambiar con la variación de pH sin embargo se usarán los valores de pendiente y ordenada al origen de cada una de las curvas realizadas a diferente pH para la cuantificación.

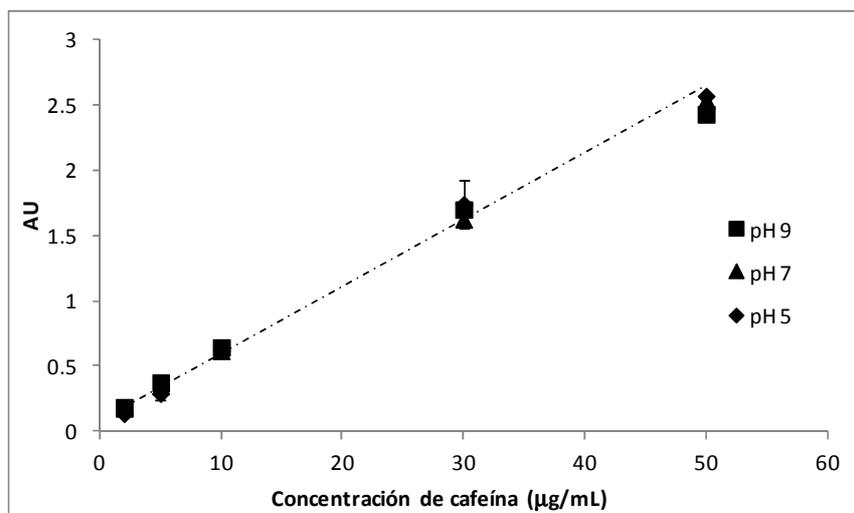


Fig. 3.23. Curva de calibración de cafeína a tres diferentes valores de pH n=3

A partir de las curvas de calibración se obtuvieron los datos necesarios para determinar los límites de cuantificación (LiC) y detección (LiD) mediante las ecuaciones 2.6 y 2.7

$$LiC = 10\sigma / S \dots\dots(2.6)$$

$$LiD = 3\sigma / S \dots\dots\dots(2.7)$$

Donde σ es la desviación estándar del promedio de la ordenada al origen y S es la pendiente de esa línea

Esto se realizó para el analito en cuestión, a los 3 valores de pH de trabajo. Lo anterior se ve reflejado en la tabla 3.5 en la que los LiD y LiC son relativamente bajos para los tres valores de pH.

Tabla 3.5. Límites de detección y cuantificación de cafeína según datos obtenidos de la curva de calibración a tres diferentes valores de pH

pH	Ordenada al origen n=3	Desviación estándar de la ordenada n=3	r ²	pendiente	LiD	LiC	Intervalo lineal µg
5	0.0892	0.0065	0.9958	0.0491	0.4401	1.3337	2-50
7	0.1087	0.0021	0.9988	0.0491	0.1394	0.4225	2-50
9	0.1529	0.0074	0.9922	0.0471	0.5157	1.5627	2-50

4.1.2 Carga de cafeína

Las membranas modificadas de PVDF con ambos monómeros fueron sometidas a la carga de cafeína sumergiéndolas en una solución amortiguador pH 9 para promover el máximo hinchamiento de la membrana. Se espera que la máxima carga en este caso (en que la cafeína no posee carga electrostática a las condiciones de trabajo) sea dependiente de la concentración tanto de la cafeína, como la de la capacidad de absorción de la membrana, mas no de la interacción electrostática con los grupos amida y ácido del DMAEMA y el AAc.

Es conocido que la cantidad de fármacos absorbido se ve afectado por diferentes parámetros tales como:

La concentración del fármaco en solución: altas concentraciones de fármaco promueve un aumento en el fármaco adsorbido.

La máxima capacidad de enlace de la membrana.

El contraíón original atrapado en el sitio de cambio.

El tamaño, carga y complejidad del fármaco: moléculas complejas con altos pesos moleculares pueden ocupar más de un sitio de enlace, reduciendo la capacidad de la membrana. También pueden actuar como entrecruzantes que reducirán el flujo del fármaco a través de la membrana.

Se han realizado ciertos estudios que demuestran la interacción entre la carga del fármaco y las cargas de DMAEMA y AAc a diferentes valores de pH y este es el factor más importante que afecta la absorción del fármaco en la membrana [Akerman et al., 1999^a; Akerman et al., 1999^b]. Además de las interacciones iónicas podrían existir también interacciones no iónicas como las fuerzas de Van der Waals o interacciones hidrofóbicas que afecten o aceleren la absorción [Sung et al., 1990].

La tabla 3.6 muestra la carga promedio de las membranas modificadas (injerto binario) de tamaño de poro 0.45 μm cargadas en una solución amortiguador de cafeína de pH 9 con dos porcentajes de injerto de AAc diferentes preparadas para liberar a pH 5 y 7. La carga media después de 24 h fue de aproximadamente 30-34 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para las membranas con porcentaje de injerto de $\sim 100\%$ de AAc y $\sim 100\%$ de DMAEMA y de 23 a 24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para las membranas con porcentaje de injerto de $\sim 50\%$ de AAc y $\sim 100\%$ de DMAEMA. Cabe mencionar que las muestras se sumergieron en 5mL de solución 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, así que en la solución habían 250 μg de cafeína de los cuales sólo un máximo del 14 % fue absorbido por la membrana, siendo la capacidad de carga muy baja debido a que la cafeína en estas condiciones carece de carga electrostática y por tanto es incapaz de interaccionar fuertemente con la membrana. Con respecto al porcentaje de injerto, la capacidad de carga de la

membrana a pH 9 aumenta cuando el porcentaje de injerto de AAc aumenta ya que el hinchamiento de la membrana con más alto porcentaje de injerto es mayor y probablemente el tamaño de poro a ese pH también sea mayor debido a la repulsión entre cadenas del AAc.

Tabla 3.6. Carga promedio de cafeína a pH 9 en membranas modificadas de PVDF con 100 % de DMAEMA y porcentaje variable de AAc después de 24 horas.

Muestra	%DMAEMA	% AAc	Poros μm	liberar a pH	Carga media 24 h en pH 9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ n=3
1	100	105	0.45	7	31.31
2	112	49	0.45	7	24.63
3	100	105	0.45	5	34.5
4	112	49	0.45	5	22.92

4.1.3 Liberación de cafeína

El perfil de liberación de cafeína a pH 5 y 7 de las membranas anteriormente cargadas se aprecian en las Figuras 3.24 y 3.25. En el perfil a pH 5 la liberación máxima se alcanza a las 3 horas pero el porcentaje de injerto de AAc refleja una diferencia del 7 % en el grado de liberación. Es decir, las membranas que obtuvieron una carga promedio de $34.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ sólo liberaron $11 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ que equivale al 31% de su carga total y las que se cargaron con un promedio de $22.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ sólo liberaron $5.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ equivalente al 24 %de su carga total. La liberación en este caso está regida por el porcentaje de injerto de AAc y esto puede estar sujeto a que el colapso de las cadenas de AAc es mayor a porcentajes de injerto mayores.

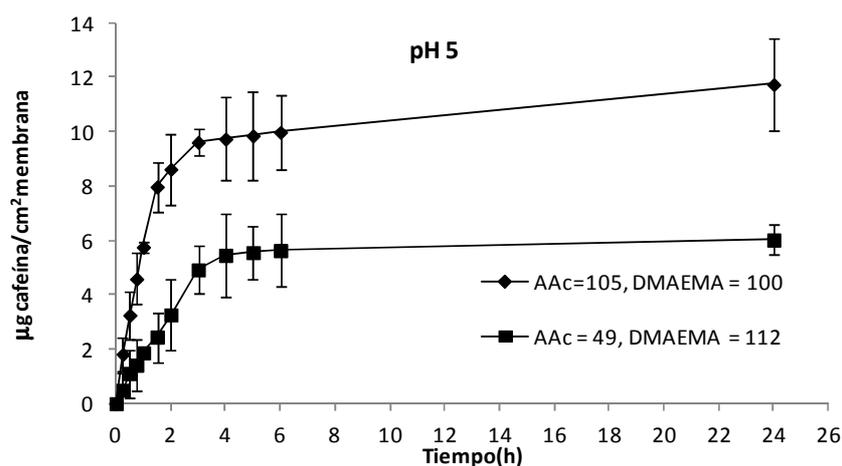


Fig. 3.24. Liberación de cafeína en amortiguador pH 5 de membranas de PVDF modificadas con 100 % de DMAEMA y porcentaje variable de AAc. Tamaño de poro $0.45 \mu\text{m}$.

A diferencia de la liberación a pH 5, la liberación máxima a pH 7 se alcanza a las 5 horas aunque el porcentaje de liberación de cafeína es el mismo a las 24 horas. Para el caso de la cafeína el pH sólo hace una diferencia en cuanto a la velocidad de la liberación pero no en la liberación máxima al menos hasta 24 horas. Por estos motivos, el ensayo del perfil de liberación del 5-ALA, sólo se realizará a pH 4.5

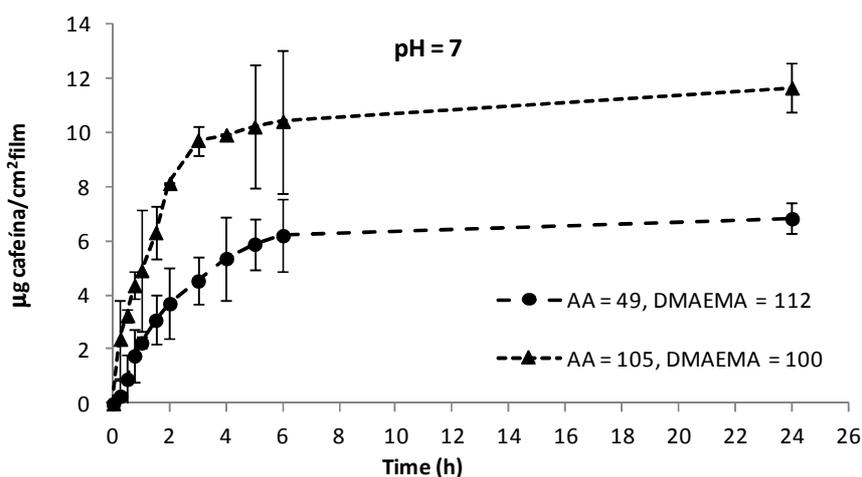


Fig. 3.25. Liberación de cafeína en amortiguador pH 7 de membranas de PVDF modificadas con 100 % de DMAEMA y porcentaje variable de AA. Tamaño de poro 0.45 µm.

4.2 Curva de calibración, carga y liberación de 5-ALA

4.2.1 Calibración de 5-ALA

De igual manera que la cafeína se realizó la curva de calibración a pH 9 y 4.5 a partir de soluciones recién preparadas de fármaco para detectar variaciones en la intensidad con respecto al cambio de pH. La Figura 3.26 muestra que a mayor valor de pH y concentración se observa una intensidad mayor. Posiblemente el fármaco que se encuentra derivatizado tiene una interacción diferente con el amortiguador y genera una respuesta mayor a pH 9

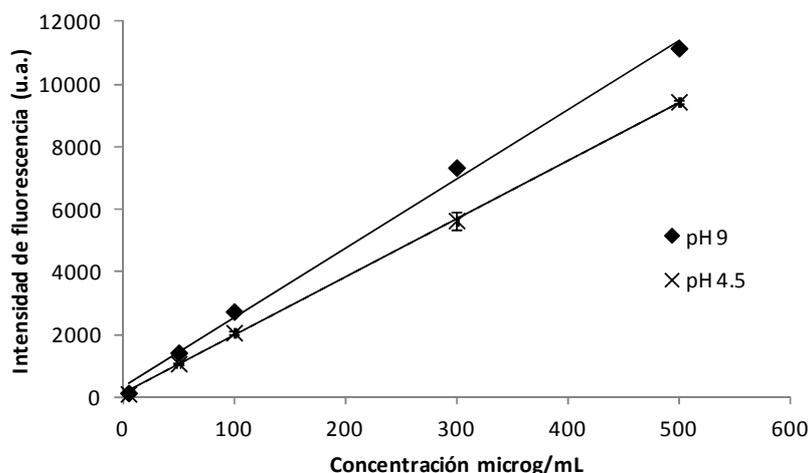


Fig. 3.26. Curva de calibración de 5-ALA a dos diferentes valores de pH, n=3

A partir de las curvas de calibración se obtuvieron los datos necesarios para determinar los límites de cuantificación (LiC) y detección (LiD) mediante las ecuaciones 2.6 y 2.7 del analito en cuestión a 2 valores de pH de trabajo, lo anterior se ve reflejado en la tabla 3.7

Tabla 3.7. Límites de detección y cuantificación de 5-ALA según datos obtenidos de la curva de calibración a dos diferentes valores de pH

pH	Ordenada al origen n=3	Desviación estándar de la ordenada n=3	r2	pendiente	LiD	LiC	Intervalo lineal µg
5	109.24	16.68	0.9994	18.64	2.953	8.951	20-500
9	341.66	36.47	0.9972	22.20	5.421	16.429	20-500

4.2.2 Carga de 5-ALA a pH 9, pH5 membrana pre tratada y agua

Como parte de la metodología experimental se realizó la carga de fármaco en el estado hinchado de la membrana (pH 9, n=3). La cuantificación a los 15 y 30 min; 1, 3, 5, 8, y 24 horas mostraron un decaimiento en la concentración acumulada de 5-ALA por tanto esas muestras fueron descartadas.

En un segundo intento se realizó un pre-tratamiento de la membrana sumergiéndola a pH 9 (n=3) y dejándola secar por 24 horas. La solución de fármaco se hizo tanto en amortiguador pH 5, 100 y 500 µg/mL, se sumergió la membrana en 10 mL de solución de fármaco observado que:

Tanto para membranas de tamaño de poro 0.45 y 0.22 µm y porcentajes de injerto de 100 % de AAc/100% de DMAEMA y 100% de DMAEMA/50% de AAc, el fármaco se carga rápidamente en

la primera hora, pero después de 3, y 6 horas el fármaco se liberaba de nuevo de la membrana al entrar en equilibrio con el pH.

El pH final de la solución después de 6 horas era de 5.7 y debido a esto los poros de la membrana colapsaron dejando salir al fármaco. La carga total de fármaco a las 6 horas fue del 10 % de la concentración inicial es decir de 0.1 y 0.5 mg/cm² y dado que las posibles aplicaciones para éste fármaco se encuentran entre los 4 y los 30 mg/cm² la cantidad de 5-ALA atrapada en la membrana es insignificante.

Se decidió realizar un tercer ensayo con soluciones de 5-ALA 500 y 100 µg/mL en agua en membranas pre tratadas como en el caso anterior esperando que el sistema sea estable por al menos 6 horas. Los resultados mostraron degradación del fármaco desde la segunda hora siendo mayor para la solución de 500 µg/mL, esto se debe a la dimerización del 5-ALA por el efecto de la concentración [Elfssona et al., 1998].

En la literatura se reconoce que la estabilidad del 5-ALA en solución acuosa es dependiente del pH, la concentración, la temperatura y el grado de oxigenación de la solución. Dos moléculas de 5-ALA pueden reaccionar para formar 3,6,-dihidropirazina ácido 2,5-dipropiónico (DHPY) cuando el grupo amino del 5-ALA se encuentra desprotonado, para después oxidarse y transformarse en pirazina ácido 2,5-dipropiónico (PY) en un medio aerobio. La dependencia al pH de la reacción de 5-ALA puede ser explicado a la luz del equilibrio ácido-base del aminoácido como muestra la Figura 3.25

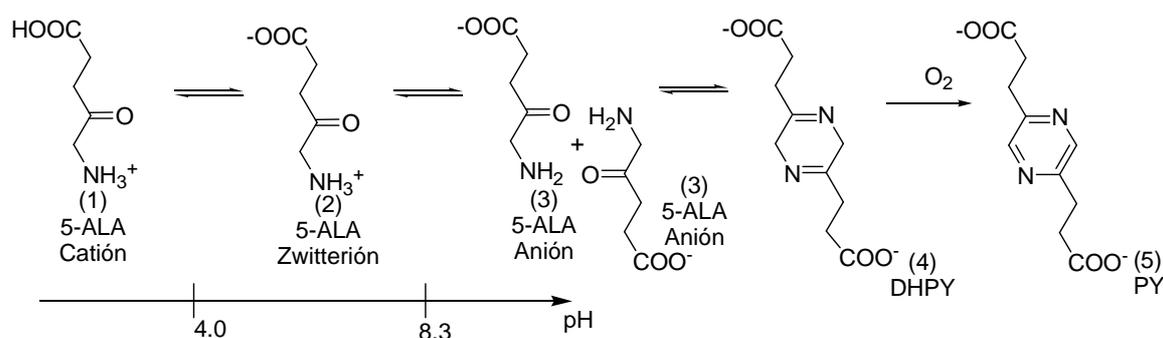


Figura 3.25. Equilibrio pH dependiente en soluciones acuosas de 5-ALA

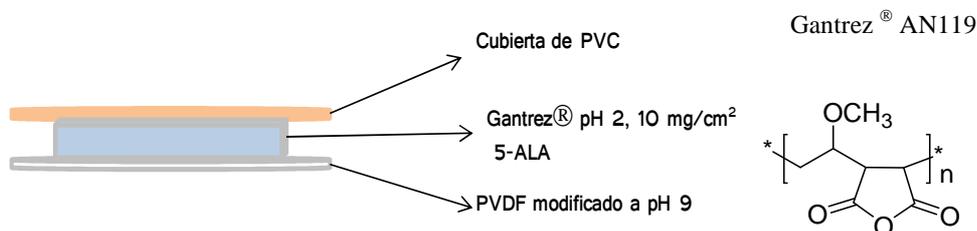
Los valores de la constante de acidez (pKa) del 5-ALA se encuentran alrededor de pK1=4.0, pK2 = 8.3, la mayor especie presente en un intervalo de pH entre 5 y 7.5 es el zwitterion. El anión, que es la especie en la cual el grupo amino se encuentra desprotonado es capaz de reaccionar con el grupo cetona vecino para formar la dihidrociclopirazina (DHPY) para después formar la ciclopirazina (PY) (producto 5 degradado), esto también explica la fuerte dependencia de a la concentración

debido a la presencia del anión que también aumenta con el pH y la degradación del 5-ALA [Novo et al., 1996].

4.2.3 Carga de 5-ALA e hidrogel de Gantrez®

Los productos Gantrez® son una familia de copolímeros sintéticos provenientes del metilviniléter y el anhídrido maléico. Estos productos son suministrados en forma de polvo anhídrido o en otras formas químicas derivadas del anhídrido, diferenciándose los distintos productos en su forma anhídrida por el peso molecular. El Gantrez® está constituido por monómeros viniléter y se obtiene mediante la reacción de acetileno con alcoholes además de tener un pH en solución acuosa de 2 a 3. Los copolímeros Gantrez son ampliamente utilizados en aplicaciones farmacéuticas por sus excelentes propiedades laminares y su alta calidad en su actuación bioadhesiva y también son usados como viscosizantes, agentes complejantes, coloides hidrófilos, parches transdérmicos y excipientes en comprimidos bucales. Su estructura es la siguiente.

Debido a los problemas de inestabilidad del 5-ALA a valores de pH mayor a 5 y el colapso de las cadenas de AAc a valores de pH menores que 5 se decidió cambiar la estrategia de carga de 5-ALA fabricando un dispositivo sándwich como indica el esquema 3.2



En el esquema anterior el fármaco (10 mg/cm^2) fue suspendido en una solución del Gantrez® TPM y agua para obtener un gel pH 2 en el cual el fármaco es estable, este se adhirió a la membrana pre-tratada de PVDF y encima se colocó un recubrimiento adherible de PVC. Todo el sistema se colocó en una celda de Franz modificada.

La tabla 3.8 resume las características de los dispositivos generados, se utilizaron dos tamaños de poro de membrana y 2 porcentajes de injerto de AAc diferentes. En todos los sistemas el fármaco se liberó a un pH de 4.5 en un sistema receptor con 12 mL de volumen total

Tabla 3.8. Carga promedio de 5-ALA en gel de Gantrez® pH 2 en membranas modificadas de PVDF con 100 % de DMAEMA y porcentaje variable de AAc.

Muestra	% DMAEMA	% AAc	Poros μm	liberar a pH	Carga media en Gantrez® pH 2 mg/cm^2 n=3
1	91	95	0.45	4.5	10
2	101	48	0.45	4.5	10
3	99	105	0.22	4.5	10
4	99	53	0.22	4.5	10

4.2.4 Liberación de 5-ALA

La liberación en este caso dependió de factores como el pH, el tamaño de poro y el porcentaje de injerto de AAc. La Figura 3.27 muestra el perfil de liberación para el tamaño de poro de $0.45\mu\text{m}$ y dos porcentajes de injerto de AAc diferentes. Para ambos porcentajes de injerto el tiempo de liberación máxima se alcanza aproximadamente a las 2 horas cuando el 75 y 90 % del fármaco se ha liberado de la membrana al medio receptor lo que equivale a 7.5mg para el injerto de $\sim 50\%$ de AAc y 9.0mg de 5-ALA para el porcentaje de injerto de $\sim 100\%$ de AAc manteniendo constante el DMAEMA a $\sim 100\%$ de injerto. La diferencia en mg liberados de 5-ALA $/\text{cm}^2$ de gel de Gantrez® que pasa a través de la membrana es de apenas 8 % entre ambos porcentajes de injerto, lo que quiere decir que a diferencia de la cafeína el porcentaje de liberación es ligeramente dependiente del porcentaje de injerto de AAc.

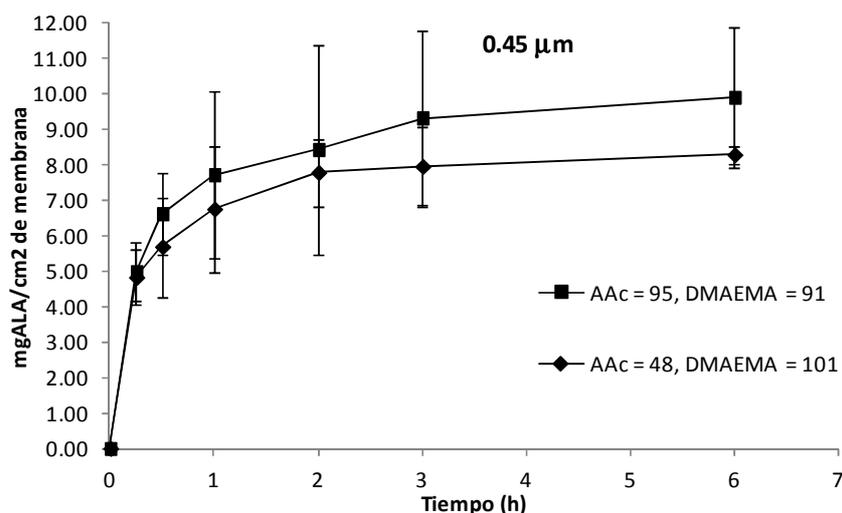


Fig. 3.27. Liberación de 5-ALA en amortiguador pH 4.5 de membranas de PVDF modificadas con 100 % de DMAEMA y porcentaje variable de AAc. Tamaño de poro $0.45\mu\text{m}$

El perfil de liberación de 5-ALA con respecto al tamaño de poro de la membrana modificada se aprecia en la Figura 3.28 para este caso la liberación máxima ocurre a las 3 horas en la que el 78 y el 84 % del fármaco se encuentra en la fase receptora, es decir 7.8 mg para la de porcentaje de AAc menor y 8.4 mg para la de porcentaje de AAc mayor. Comparando el porcentaje de injerto para ambos tamaños de poro se puede decir que la de tamaño de poro inicial de $0.45\mu\text{m}$ y mayor porcentaje de injerto en este caso es la mejor ya que libera el 90% de su carga total en aproximadamente 2 horas.

El porcentaje de injerto puede jugar un papel importante en la carga y la liberación del fármaco pero esto va a depender del tipo de fármaco y la carga que éste posea. Por ejemplo Akerman estudió una gran variedad de fármacos con diferentes características y encontró que tanto el tamaño del fármaco, la carga y su lipofiliidad pueden afectar el porcentaje de carga y liberación y que el porcentaje de injerto de determinados monómeros (de acuerdo a la afinidad membrana fármaco) podrá retener o no retener según sea el caso [Akerman et al., 1999^a].

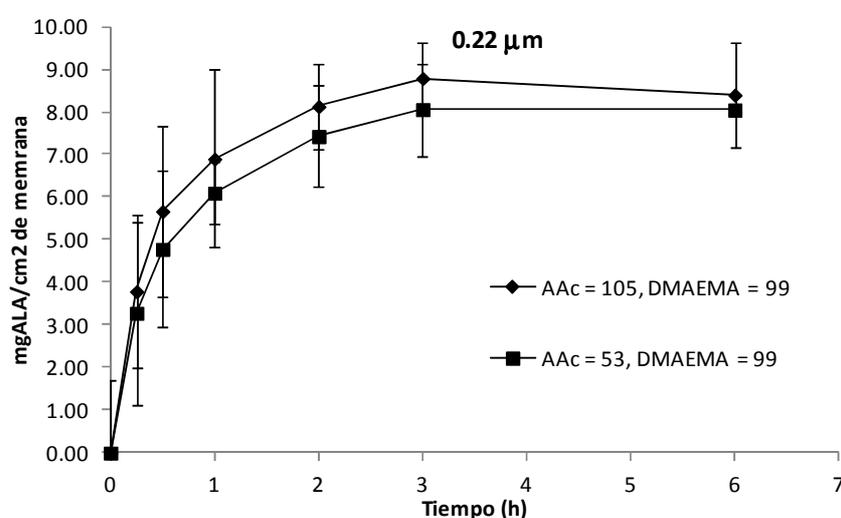


Fig. 3.28. Liberación de 5-ALA en amortiguador pH 4.5 de membranas de PVDF modificadas con 100 % de DMAEMA y porcentaje variable de AAc. Tamaño de poro $0.22\mu\text{m}$

La liberación de 5-ALA in vitro fue buena sin tomar en cuenta que estos resultados pueden variar si colocamos al sistema por ejemplo piel de cerdo u otra membrana que simule las condiciones de la piel, sin embargo el uso de este fármaco en condiciones de patologías que involucren cáncer de piel

tienden a facilitar la absorción del fármaco ya que por lo general el estrato córneo se encuentra dañado y tiene un pH menor al valor fisiológico normal.

En comparación con otros sistemas de liberación, el presente dispositivo fue mejor, esto considerando que la formulación comercial en crema Porphin[®] sólo libera el 41.85 % en 6 horas y un parche desarrollado a base de un bioadhesivo hidrosoluble libera el 57% en las mismas 6 horas %. [McCarron et al., 2006]. Los resultados anteriores para el 5-ALA y la cafeína muestran que, para conocer una posible tendencia tanto en la carga como en la liberación de los fármacos es necesario realizar más pruebas con diferentes moléculas ya que la membrana cargará o liberará fármacos de acuerdo a la afinidad de ésta con las moléculas de estudio. Entre las características que estas moléculas deben tener es: un alto valor de Logp para facilitar la permeación en patologías cuyo estrato corneo se encuentre intacto, alta estabilidad en diferentes valores de pH (ácido y básico) y al menos un valor de pKa por encima de 7.

Por último, dadas las características de la membrana también puede ser usada en diferentes aplicaciones tales como membrana de separación de proteínas y analitos a diferentes valores de pH y llevando esto a gran escala podría ser adaptada como empaques de columnas para HPLC.

Conclusiones

- Se modificaron membranas de dos tamaños de poro de PVDF para obtener los injertos de PVDF-g-AAc y PVDF-g-DMAEMA con la variación de diversos parámetros tales como la concentración de monómero, dosis, solvente, tiempo y temperatura de reacción encontrando que para todos los casos en las condiciones establecidas el porcentaje de injerto es una función de todos los parámetros mencionados. En las mismas condiciones de síntesis el porcentaje de injerto para las películas de tamaño de poro de $0.22\mu\text{m}$ fue mayor. Es posible desarrollar la síntesis del copolímero binario de (PVDF-g-DMAEMA)-g-AAc, pero no el de su homólogo (PVDF-g-AAc)-g-DMAEMA debido a ciertos impedimentos estéricos y la irradiación directa del AAc.
- La caracterización por IR muestra las bandas correspondientes a los grupos funcionales en las membranas vírgenes y modificadas, el esfuerzo a la tracción revela que las propiedades mecánicas no disminuyen pero dependen del porcentaje de injerto de AAc. El análisis termogravimétrico muestra dos descomposiciones para los injertos mientras que para la película virgen sólo muestra una. Los datos obtenidos del termograma correspondiente a la calorimetría diferencial de barrido no muestra cambios en la temperatura de fusión para las membranas modificadas. La microscopía SEM refleja el cambio en la porosidad de las membranas cuando se les injerta un monómero y se observa también un cambio en su morfología cuando aumenta la cantidad de injerto. Las propiedades mecánicas se mantienen constantes antes y después del injerto.
- El tiempo de hinchamiento límite encontrado para las membranas modificadas sin importar el porcentaje de injerto fue de 5 minutos. El pH crítico determinado para los injertos de AAc o DMAEMA corresponden a los reportados en la literatura para sus respectivos homopolímeros, mientras que para el injerto binario fue de 7.2 y 6.8 para 0.22 y $0.45\mu\text{m}$. El porcentaje de injerto no es una función del pH crítico pero sí del hinchamiento. La reversibilidad de la membrana es constante hasta al menos 5 ciclos y la sensibilidad de la misma aumenta de membrana virgen \rightarrow membrana modificada con un monómero \rightarrow copolímero binario en ese orden.
- La carga y liberación de cafeína sobre el copolímero binario se vio afectada por la neutralidad del fármaco, la concentración y la naturaleza de la membrana más no por el pH. La carga máxima se alcanza a las 3 horas y para este fármaco el porcentaje de injerto de AAc es un factor determinante en la carga y liberación del fármaco. Para la carga de 5-ALA

fue necesario suspender el fármaco en un gel de Gantrez[®] para evitar su degradación por el efecto del pH. La carga máxima se alcanza a las 2 y las 3 horas dependiendo del tamaño de poro inicial de la membrana modificada aunque ambas membranas alcanza más del 80 % de liberación de su contenido a las 3 horas que comparado con las formulaciones convencionales existentes en el mercado, este prototipo resultó ser más efectivo y podría ser estudiado para mejorar la formulación del fármaco y llegar a sitios del cuerpo que requieran de movimiento.

- Finalmente la síntesis del copolímero binario en dos pasos generó un material sensible al pH que es capaz de cargar y liberar fármacos con la capacidad de convertirse en el prototipo de una membrana de liberación estímulo sensible o bien según las propiedades encontradas mediante la caracterización del material y su respuesta al pH podría utilizarse como membrana reversible de separación de proteínas o bien como un empaque potencial estímulo sensible para columnas de HPLC.

Referencias

- Akerman, S., A° kerman, K., Karppi, J., Koivu, P., Sundell, A., Paronen, P., Jarvinen, K.; Adsorption of drugs onto a poly(acrylic) grafted cation exchange membrane.; *European Journal of Pharmaceutical Science*; 1999a (9) 137–143.
- Akerman, S., Svarfvar, B., Kontturi, K., Nasman, J., Urtti, A., Paronen, P.; Influence of ionic strength on drug adsorption onto and release from a poly(acrylic acid) grafted poly(vinylidene fluoride) membrane.; *International Journal of Pharmaceutics*; 1999b (178) 67–75.
- Aoki T., Kawashima M., Katono H.; Temperature-Responsive Interpenetrating Polymer Networks Constructed with Poly(acrylic acid) and Poly(N,N-dimethylacrylamide).; *Macromolecules*.; 1994 (27) 947-952.
- Auton M. *Farmacia, La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*; Elsevier Madrid 2004.
- Bahadur D., Jyotsnendu G. *Biomaterials and magnetism*; *Sadhana*; 2003 (28) 639–656.
- Bajpai A.K., Shukla S. K., Bhanu S., Kankane S.; Responsive polymers in controlled drug delivery *Progress in Polymer Science*; 2008 (33) 1088–1118.
- Bartil T., Bounekhel M., Cedric C., Jerome R. Swelling behavior and release properties of pH-sensitive hydrogels based on methacrylic derivatives. *Acta Pharmaceutica*; 2007 (57) 301–314.
- Betz, N., Petersohn E., Moël A.; Free radicals in swift heavy ion irradiated fluoropolymers: An electron spin resonance study; *Radiation Physics and Chemistry* 1996 (47) 411-414.
- Bhattachayra A. and Misra B.N.; Grafting: A versatile means to modify polymers techniques, factors and applications; *Progress in Polymer Science*.; 2004 (29) 767-814.
- Bormashenko Y., Pogreb R., Stanevsky O., Bormashenko E.; Vibrational spectrum of PVDF and its interpretation *Polymer Testing*; 2004 (23) 791–796.

- Bozzi A., Chapiro A.; The nature of the initiating centers for grafting in air irradiated perfluoro polymers. *European Polymer Journal*; 1987 (23) 255–257.
- Bruck SD. Pharmacological basis of controlled drug delivery. In: Bruck SD,. *Controlled drug delivery. Basic concepts*; Boca Raton (FL): CRC Press; 1983. (1) p. 1–15.
- Bruining M. J., Blaauwgeers H. G. T., Kuijter R., Pels E. R., Nuijts M.M.A., Koole L. H.; Biodegradable three dimensional networks of poly(dimethylaminoethyl methacrylate). Synthesis characterization and in vitro studies of structural degradation and cytotoxicity; *Biomaterials.*; 2000 (21) 595-604.
- Campbell I. M.; *Introduction to Synthetic Polymers; Second Edition*; Oxford University Press; 2003 (1) 1-77.
- Chan Ch-Mi.; *Polymer surface modification and characterization*; Hanser Publishers; 1994 (1) 193-222.
- Chandy T., Sharma C.P.; Prostaglandin E1-immobilized poly(vinyl alcohol)-blended chitosan membranes: blood compatibility and permeability properties.; *Journal of Applied. Polymer Science*; 1992 (44) 2145–2156.
- Chapiro A.; *Radiation chemistry of polymeric systems*, Interscience, New York; First ed.; 1962.
- Clochard M.-Cl., Bègue J., Lafon A., Caldemaison D., Bittencourt C., Pireaux J.-J., Betz N. Tailoring bulk and surface grafting of poly(acrylic acid) in electron-irradiated PVDF; *Polymer*; 2004 (45) 8683-8694.
- Dargavillea T. R., Georgeb G. A., Hilla D. J.T., Whittakerc A. K. High energy radiation grafting of fluoropolymers; *Progress in Polymer Science*; 2003 (28) 1355–1376.
- Dmitrenko A.V., Serushkin M.I., Mesh A.M., Agnivitseva T.G., Ivanchev S.S.; *Polymer Science USSR* 1992 (34) 319–323.
- Donnelly R. F., Morrow D.I.J., McCarron P. A. Juzenas P., Woolfson A. D.; Pharmaceutical analysis of 5-aminolevulinic acid in solution and in tissues; *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*; 2006 (82) 59–71.

- Ebnessejjad S. Fluoroplastics melt precesible fluoropolymer . The definitive users guide and data book. Plastics design library, 2003.
- Elfssona B., Wallina I., S Eksborga., Rudaeusa K., Rosb A.M., Ehrssona H., Stability of 5-aminolevulinic acid in aqueous solution; European Journal of Pharmaceutical Sciences; 1998 (7) 87–91.
- Elvira C., Mano J.F., Roman J.S., Reis R.L.; Starch-based biodegradable hydrogels with potential biomedical applications as drug delivery systems; Biomaterials; 2002 (23) 1955–1966.
- Fan Q., Kamalesh K. S., Wu J.; A thermo-sensitive release system based on polymeric membrane for transdermal delivery of doxycycline HCl; Journal of Membrane Science; 2009 (337) 175–181.
- Fonseca R., Lopez V., Lange N., Guy R.; Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters; Advanced Drug Delivery Reviews.; 2004 (56) 77-94.
- Forsythe J.S., Hill D.J.T.; The radiation chemistry of fluoropolymers.; Progress Polymer Science 2000 (25) 101–36.
- Fried J. R.; Polymer Science and Technology; Second Edition; Pretince Hall Professional Technical Reference; 2003 (1) 1-67.
- Fu L., Yutie L., Moghareh M.R., Li K.; Progress in the production and modification of PVDF membranes; Journal of Membrane Science; 2011 (375) 1–27.
- Galaev I.Y. and Mattiasson B.; Smart polymers and what they could do in biotechnology and medicine; Trends in Biotechnology; 1999 (17) 335–340.
- Hegazy El-sayed A., El-Rehim H.A. , Kamal H., Kandeel K.A. Advances in radiation grafting Beam interactions with materials and atoms Nuclear instruments and methods in physics research B 2001 (185) 235-240.

- Hill D.J.T., Whittaker A.K.; NMR studies of the radiation modification of polymers. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*; 2002 (46)1–35.
- Karppi, J., Åkerman, S., Åkerman, K., Sundell, A., Nyssönen, K., Penttilä, I.; Isolation of drugs from biological fluids by using pH sensitive poly(acrylic acid) grafted poly(vinylidene fluoride) polymer membrane in vitro; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*; 2007 (67) 562-568.
- Karppi, S., Åkerman, K., Sundell, A., Nyssönen, K., Penttilä, I.,. Adsorption of drugs onto a pH responsive poly(N,N-dimethyl aminoethyl methacrylate) grafted anion-exchange membrane in vitro. *International Journal Pharmaceutics*. 2007 (338) 7-14.
- Kaur I., Kumar S., Ghanshyam S. Chauhan B., Misra N.; Radiation induced graft-copolymerization of 2-Vinylpyridine and Styrene onto isotactic Polypropylene fiber.; *Journal of Applied Polymer Science*. ;1999 (73) 2959-2969.
- Khan G.M., Zhu J.B. Studies on drug release kinetics from ibuprofen–carbomer hydrophilic matrix tablets: influence of coexcipients on release rate of the drug; *Journal of Control Release*; 1999 (57) 197–203.
- Kim J.H., Kim J.Y., Lee Y.M., Kim K.Y.; Controlled release of riboflavin and insulin through crosslinked poly(vinyl alcohol)/chitosan blend membrane. *Journal of Applied. Polymer Science* ;1992 (14) 1823–1828.
- Kimura Y., Asano M., Chen J., Maekawa Y., Katakai R., Yoshida M.; Influence of grafting solvents on the properties of polymer electrolyte membranes prepared by γ -ray preirradiation method.; *Radiation Physics and Chemistry*; 2008. (77) 864-870.
- Kumara A., Srivastavaa A., Galaevb I. Y., Mattiasson B.; Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications *Progress in Polymer Science*; 2007(32) 1205–1237.
- Lazo L.M., Burillo G.; Novel comb-type hydrogels of net-[PP-g-AAc]-g-4VP synthesized by gamma radiation, with possible application on Cu²⁺ immobilization; *Radiation Physics and Chemistry*; 2010 (79) 1–8.

- Liu Q., Zhu Z., Yang X., Chen X., Song Y.; Temperature-sensitive porous membrane production through radiation co-grafting of NIPAAm on/in PVDF porous membrane; *Radiation Physics and Chemistry*; 2007 (76) 707–713.
- Loo-Teck N., Kheng-Seong N.; Photo-cured pH-responsive polyampholyte-coated membranes for controlled release of drugs with different molecular weights and charge; *Radiation Physics and Chemistry* 2008 (77) 192–199.
- McCarron P. A., Donnelly R. F., Zawislak A., Woolfson A. D., Design and evaluation of a watersoluble bioadhesive patch formulation for cutaneous delivery of 5aminolevulinic acid to superficial neoplastic lesions; *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; 2006 (27) 268–279.
- Navarrete M. y Cabrera L.; *Introducción al estudio de los radioisótopos*; Segunda Edición; Universidad Nacional Autónoma de México 1993 (1) 141-183.
- Novo M., Huttmann G., Diddens H.; Chemical instability of 5-aminolevulinic acid used in the fluorescence diagnosis of bladder tumours.; *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*; 1996 (34) 143-148.
- Pankhurst Q.A., Connolly J., Jones S.K., Dobson J.; Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine.; *Journal of Physics D: Applied Physics* ; 2003(36) 167–81.
- Ranby B., Rabek J.F.; *ESR spectroscopy in polymer research*. Springer; Berlin; 1977.
- Roy I. and Gupta M. N.; *Smart Polymeric Materials: Emerging Biochemical Applications; Chemistry and Biology*. 2003 (10) 1161-1171.
- Said A.E.A.; Radiation synthesis of interpolymer polyelectrolyte complex and its application as a carrier for colon-specific drug delivery system; *Biomaterials*. 2005 (26) 2733–2739.
- Sanju F., Dhanawade B.R., Mitra D., Varshney Lalit, Sabharwal S., Radiation Induced Grafting of diallyl dimethyammonium chloride onto acrylic acid grafted polyethylene; *Radiation Physics and Chemistry*. 2009; (78); 42-47.
- Schmaljohann D.; Thermo and pH responsive polymers in drug delivery; *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006 (58) 1655-1670.

- Seguchi T., Makuuchi K., Suwa T., Tamura N., Abe T., Takehisa M.J.; Radiation effects on poly(vinylidene fluoride). III. Electron spin resonance study on irradiated poly(vinylidene fluoride).; Chemical Society of Japan: Chemical Ind. Chem. 1974; 7: 1309-1315.
- Shigehiko T., Yoshinobu I., Takao K., Yoichi Y., Takahiro K., Miyako M., Seiichi T.; Radiation protection effects by addition of aromatic compounds to n-dodecane; Radiation Physics and Chemistry; 2001 (62) 179–187.
- Stannett V. T.; Copolymerization and grafting; radiation grafting state of the art; Radiation Physics and Chemistry 1990 (35) 82-87.
- Sung C., Raeder J., Merrill E.W.; Drug partitioning and release characteristic of tricyclic antidepressants drugs using a series of related hydrophilic–hydrophobic copolymers.; Journal. Pharmaceutical Science; 1990 (79) 829–834.
- Tabary N., Lepretre S., Boschini F., Blanchemain N., Neut C., Delcourt-Debruyne E., Martel B., Morcellet M., Hildebrand H.F.; Functionalization of PVDF membranes with carbohydrate derivatives for the controlled delivery of chlorhexidine; Biomolecular Engineering 2007 (24) 472–476.
- Tanaka T., Nishio I., Sun S.T., Ueno-Nishio S. Collapse of gels in an electric field; Science; 1982 (218) 467–469.
- Traitel T., Goldbart R. and Kost J.; Smart polymers for responsive drug-delivery systems; Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition; 2008 (19) 755–767.
- Uyama Y., Kato K., Ikada Y.; Surface modification of polymers by grafting; Advances in Polymer Science; 1998 (37) 1-39.