



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL COPOLÍMERO DE INJERTO SILICONA-g-  
ÁCIDO ACRÍLICO PARA CARGA Y CESIÓN DE FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS.

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

PRESENTA:

**CORA SOFÍA LECONA VARGAS**



**MÉXICO, D.F.**

**2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor:** JUAN MANUEL NAVARRETE TEJERO

**VOCAL:**                   **Profesor:** SOFÍA GUILLERMINA BURILLO AMEZCUA

**SECRETARIO:**           **Profesor:** EMILIO BUCIO CARRILLO

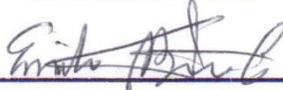
**1er. SUPLENTE:**       **Profesor:** PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LÓPEZ

**2° SUPLENTE:**         **Profesor:** MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO DE QUÍMICA DE RADIACIONES EN MACROMOLÉCULAS,  
INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES, UNAM.

**ASESOR DEL TEMA:**



Dr. Emilio Bucio Carrillo

**SUPERVISOR TÉCNICO:**



Dra. Carmen Álvarez Lorenzo

**SUSTENTANTE:**



Cora Sofía Lecona Vargas



***Nunca te des por vencida(o), porque los  
más grandes obstáculos son los que tú  
misma(o) pones enfrente.***



## Introducción

El uso de catéteres intravasculares y otros dispositivos médicos encierra el riesgo de que se produzcan infecciones hospitalarias; aumentando la morbilidad, mortalidad y costos médicos asociados (Zhang, et al., 2011).

*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y otros *Staphylococcus* coagulasa negativa son los microorganismos más comúnmente involucrados en este tipo de infecciones debido a su capacidad de adherencia y formación de biopelículas en la superficie de catéteres (Pascual, et al., 2011), además de que suelen estar presentes en la piel y las mucosas.

La susceptibilidad de las bacterias dentro de una biopelícula (sésiles) decrece entre 100 y 1000 veces con respecto a las bacterias que no forman parte de ésta (planctónicas), haciendo necesaria la administración de altas dosis de antibióticos, lo que implica un riesgo de que se produzcan reacciones adversas.

Una estrategia para prevenir la formación de biopelículas sin administrar altas dosis de fármacos antimicrobianos es la incorporación de éstos al dispositivo médico (Ruiz, et al., 2008).

La vancomicina es uno de los antibióticos de elección frente a infecciones provocadas por *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) (Nailor, 2011), por lo que su incorporación a catéteres y otros productos sanitarios puede prevenir la incidencia de infecciones nosocomiales.

Los polímeros sensibles a estímulos han atraído especial atención como componentes de sistemas que imitan algunos mecanismos de respuesta de las macromoléculas biológicas a cambios en su entorno (Tian, 2012), y encuentran interesantes aplicaciones en el ámbito de la liberación controlada de fármacos.

Se ha observado que el poli(ácido acrílico), el cual es un polímero sensible al pH, tiene la capacidad de liberar fármacos de forma controlada a pH neutro (Ramirez, 2008; Khare, 1993), que puede ser útil en un dispositivo que se encuentra en contacto con la sangre (pH 7.4).



Por otro lado, el hule de silicona (SR) es un material muy usado en dispositivos médicos debido a su alta flexibilidad y buena biocompatibilidad; si este polímero es injertado con poli(ácido acrílico) se puede obtener un material funcionalizado capaz de liberar antibiótico de forma controlada.

La síntesis de copolímeros de injerto usando radiación gamma ha demostrado ser un proceso sencillo que no requiere la adición de iniciadores químicos (Muñoz, 2012; Ramirez, 2007).

El objetivo de este trabajo fue sintetizar y caracterizar un copolímero de injerto SR-g-AAc usando radiación gamma y evaluar su capacidad para cargar y ceder vancomicina de forma controlada.



# Índice

Antecedentes.....	1
Polímeros.....	1
Clasificación.....	2
Copolímeros.....	4
Síntesis de copolímeros de injerto.....	5
Radiación gamma.....	8
Sistemas de liberación controlada de fármacos.....	10
Mecanismos de sistemas de liberación controlada.....	11
Sistemas controlados por difusión.....	12
Sistemas activados por un disolvente.....	12
Sistemas controlados químicamente.....	13
Sistemas de liberación modulada.....	14
Polímeros sensibles a estímulos.....	15
Polímeros sensibles al pH.....	16
Ácido acrílico.....	17
Silicona.....	18
Antimicrobianos.....	19
Vancomicina.....	19
Objetivos.....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos particulares.....	20
Desarrollo experimental.....	21
Síntesis del copolímero de injerto SR-g-pAAc.....	21
Método de preirradiación oxidativa.....	21
Influencia de la dosis en el porcentaje de injerto.....	22
Influencia de la temperatura de reacción en el porcentaje de injerto.....	23
Influencia del tiempo de reacción en el porcentaje de injerto.....	24
Influencia de la concentración de monómero en el porcentaje de injerto.....	24
Caracterización del copolímero de injerto.....	25
Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	25
Análisis termogravimétrico (TGA).....	25
Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR).....	26
Hinchamiento límite.....	26
Determinación del pH crítico.....	27
Microscopio electrónico de barrido.....	29



Carga y cesión de fármacos antimicrobianos: vancomicina.....	29
Carga de vancomicina .....	29
Liberación de la vancomicina.....	32
Resultados y discusión. ....	33
Síntesis del copolímero de injerto. ....	33
Influencia de la dosis de irradiación en el porcentaje de injerto. ....	35
Influencia de la temperatura de reacción en el porcentaje de injerto. ....	36
Influencia del tiempo de reacción en el porcentaje de injerto. ....	38
Influencia de la concentración de monómero en el porcentaje de injerto. ....	39
Caracterización del copolímero SR-g-pAAc.....	41
Calorimetría diferencial de barrido.....	41
Análisis termogravimétrico .....	42
Espectroscopía infrarroja (FTIR).....	43
Hinchamiento límite .....	45
Determinación del pH crítico .....	46
Microscopio electrónico de barrido.....	48
Carga y cesión de fármacos antimicrobianos: Vancomicina.....	49
Carga de vancomicina. ....	49
Liberación de vancomicina.....	50
Conclusiones.....	53
Referencias.....	54



# Antecedentes

## ***Polímeros***

Los polímeros son macromoléculas formadas a partir de la unión covalente de un gran número de moléculas mucho más pequeñas (Odian, 2004). Estas moléculas son llamadas monómeros y reaccionan entre sí a través de un proceso llamado polimerización. Para ello requieren tener una funcionalidad mayor o igual a 2, es decir, ser capaces de formar al menos 2 enlaces (Young y Lovell, 2011).

La arquitectura que pueden presentar los polímeros es muy variada y determina sus propiedades finales. Por citar algunos ejemplos, existen polímeros lineales, cíclicos, ramificados y reticulados (Fig. 1), de modo que los polímeros lineales son aquellos en los que las unidades monoméricas se unen una tras otra formando cadenas, los ramificados tienen cadenas secundarias que se unen a una principal en ciertos puntos de unión y las redes son estructuras tridimensionales en las cuales las cadenas se interconectan a otras a través de puntos de unión.

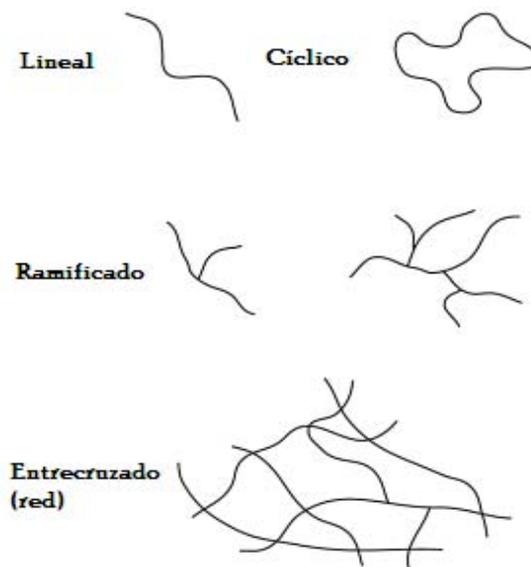


Fig. 1. Diferentes tipos de morfología de polímeros.



Como se mencionó anteriormente, la estructura que tenga el polímero afectará las propiedades del mismo. Por ejemplo, cuantas más ramificaciones posea un polímero su cristalinidad será menor, pues no podrá empaquetarse tan fácilmente como un polímero lineal. En el caso de polímeros en red, cuando el entrecruzamiento es ligero se tendrán propiedades elásticas y a mayor entrecruzamiento se tendrá mayor rigidez y alta estabilidad dimensional.

Basta con citar al polietileno para ilustrar lo anterior, el cual en su estructura lineal tiene un punto de fusión 20 °C por arriba del ramificado y su cristalinidad y densidad también son mayores (Carraher, 1995). (Tabla 1)

Tabla 1. Tipos de polietileno comercial

Tipo de polietileno	Estructura general	Punto de fusión (°C)	Cristalinidad (%)	Densidad (g cm <sup>-3</sup> )
Polietileno de baja densidad (LDPE)	Ramificado	~ 115	~ 50	0.92-0.94
Polietileno de alta densidad (HDPE)	Lineal con poca ramificación	~ 135	90	0.95

## Clasificación

Los polímeros pueden ser clasificados de diferentes maneras.

Según su origen se clasifican como:

- Polímeros naturales, que son aquellos materiales de alto peso molecular que provienen de plantas, microorganismos o animales (Ngwuluka et al., 2014), como celulosa, seda y lana.
- Polímeros sintéticos como plásticos, adhesivos, entre otros.

Según su estructura Carothers (1929) fue el primero en dividirlos como:



- a) Polímeros de adición: Aquellos en los que la unidad repetida del polímero contiene los mismos átomos que el monómero. Ejemplos de éstos son aquellos polímeros formados por monómeros vinílicos.
- b) Polímeros de condensación: La unidad repetida tiene menos átomos que el monómero debido a la eliminación de alguna pequeña molécula durante la síntesis o las unidades repetidas están unidas por grupos funcionales como éster, amidas, etcétera.

Según el mecanismo de polimerización:

- a) Polimerización por pasos: Los grupos funcionales del monómero van reaccionando entre sí formando primero dímeros, trímeros, etc. El monómero desaparece rápidamente del medio de reacción pero sólo hasta el final se obtienen cadenas de alto peso molecular.
- b) Polimerización por reacción en cadena: Una especie reactiva; la cual puede ser un anión, catión o radical libre, es formada por un iniciador. Ésta se une al monómero abriendo un enlace  $\pi$ , formando un nuevo centro reactivo el cual reacciona con otra molécula propagando el sitio reactivo hasta que se den reacciones de terminación por combinación o desproporción. Por este proceso se obtienen cadenas de alto peso molecular desde el inicio hasta el final de la reacción y la cantidad de monómero disminuye paulatinamente durante la reacción.

Según su comportamiento térmico:

- a) Termoplásticos (cristalinos y amorfos): Pueden ser polímeros lineales o ramificados, los cuales tienen la capacidad de fluir y ser moldeados al calentarse. Aquellos considerados como cristalinos se pueden caracterizar por su punto de fusión ( $T_m$ ) y los amorfos por su temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ). Ejemplos de éstos son polietilenos, polipropilenos, poliuretanos, entre otros.
- b) Elastómeros: Son polímeros en red de bajo entrecruzamiento, los cuales pueden ser deformados tras aplicar una fuerza y recuperar su forma original







- 2) Combinación de dos radicales libres poliméricos
- 3) Policondensación de un monómero en un grupo reactivo del polímero
- 4) La condensación de dos polímeros ambos conteniendo los grupos reactivos necesarios.

Los métodos de injerto usando radiación ionizante (como la radiación gamma) están basados en la formación de sitios activos, como radicales libres, de acuerdo a los procesos 1) y 2).

Método directo.

Este método consiste en irradiar el polímero a injertar en presencia del monómero (ya sea puro o en un disolvente) bajo una atmósfera inerte (sin oxígeno), teniendo como producto copolímero de injerto o en bloque (Fig. 2).

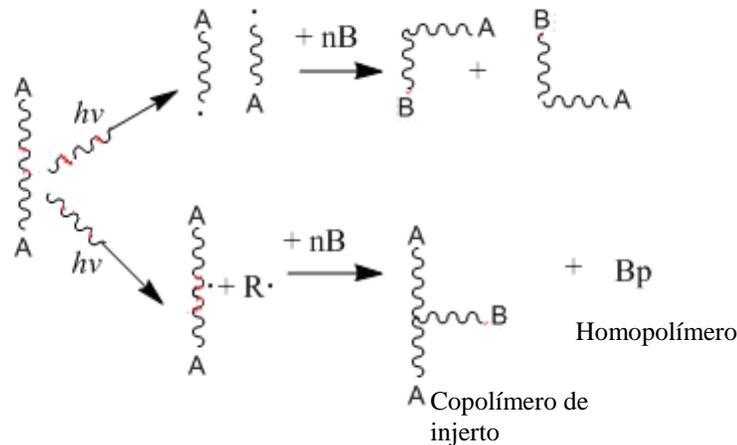


Fig. 2. Formación de copolímero de injerto por método directo.

Como se puede observar, tras la irradiación se forman radicales libres, los cuales reaccionan con el monómero del medio favoreciendo su polimerización.

Dependiendo de si el polímero utilizado sea propenso a entrecruzarse o a degradarse debido a la radiación ionizante se formará predominantemente copolímero de injerto o en bloque respectivamente.

Las variables que influyen en este método son dosis de irradiación y concentración del monómero.



Para disminuir la formación de homopolímero se pueden usar concentraciones bajas del monómero.

Preirradiación oxidativa.

Este método consiste en irradiar una matriz polimérica en presencia de aire. En una atmósfera con oxígeno, tras la generación de radicales libres, se da la formación de peróxidos e hidroperóxidos.

La polimerización ocurre por descomposición térmica de los iniciadores; pues los peróxidos sufren una ruptura homolítica debido a la aplicación de calor, formando radicales libres que reaccionan con el monómero en atmósfera inerte. En este caso, el paso determinante de la reacción es la homólisis, pues la adición del radical primario al monómero ocurre mucho más rápido (Figs. 3 y 4).

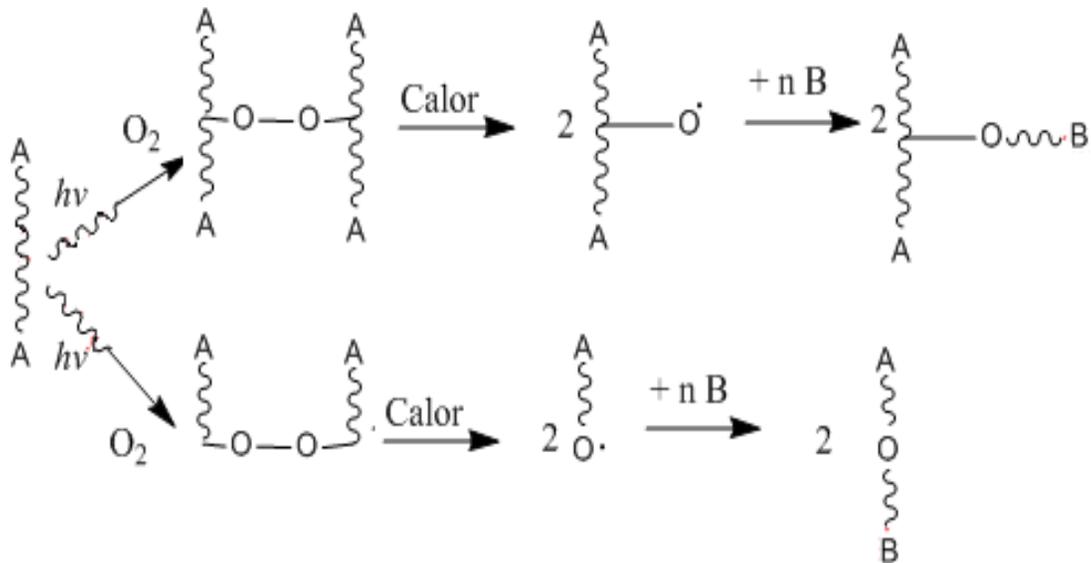


Fig. 3. Formación de peróxidos en la matriz polimérica por método de preirradiación oxidativa.

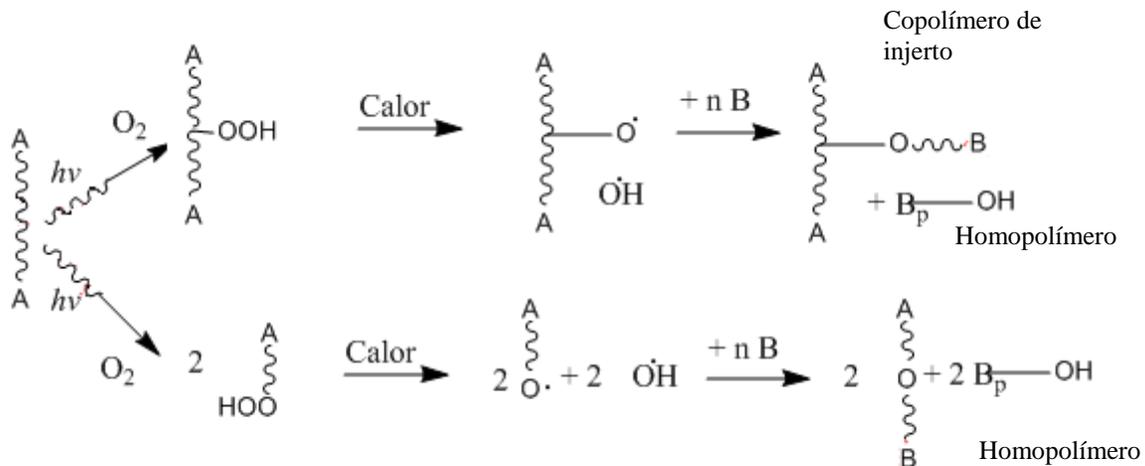


Fig. 4. Formación de hidroperóxidos en la matriz polimérica por método de preirradiación oxidativa.

Las variables que intervienen en este método son la dosis de irradiación, concentración de monómero, temperatura y tiempo de reacción.

### Radiación gamma

La radiación ionizante es capaz de modificar las propiedades físicas y químicas de los materiales irradiados y es usada en la esterilización de productos farmacéuticos y alimenticios así como en procesos de polimerización y entrecruzamiento (Drobny, 2012).

La radiación gamma es radiación electromagnética de alta energía emitida por núclidos excitados de átomos inestables al decaer (Navarrete, 1993).

La ionización de la materia se da por tres principales mecanismos:

Efecto fotoeléctrico.

Tiene lugar cuando se trata de radiaciones electromagnéticas de baja energía (<60keV). El rayo gamma incide en las capas electrónicas más internas (de menor energía), el electrón es expulsado del átomo y el fotón pierde toda su energía. Como consecuencia, un electrón de nivel energético mayor ocupa el lugar vacío y la diferencia de energía es expulsada como rayos X, efecto al cual se le llama Auger. Si esta diferencia de energía es transferida a otro electrón en una órbita cercana al núcleo y es lanzado del átomo se le llama electrón Auger.



### Efecto Compton

Este efecto predomina para energías de rayos gamma entre 60 keV y 1.5 MeV. El rayo colisiona contra un electrón de una capa externa lanzándolo fuera del núcleo. Su energía no es absorbida completamente, desvía su trayectoria y puede colisionar otra vez con otro electrón y así sucesivamente hasta tener la energía para absorberse por efecto fotoeléctrico.

### Producción de pares.

Este fenómeno ocurre cuando la energía del rayo gamma incidente es muy alta (igual o mayor a 1.02 MeV, la energía de dos masas de electrón), al ser absorbido por la materia produce dos partículas  $\beta$ , una positiva y otra negativa. La partícula negativa causa ionización y la positiva interacciona con un electrón aniquilando el par produciendo esta ocasión 2 rayos  $\gamma$  de 0.51 MeV cada uno.

Una de las fuentes de radiación gamma más usadas para propósitos industriales es el Cobalto 60, cuyo esquema de decaimiento se muestra a continuación (Fig. 5):

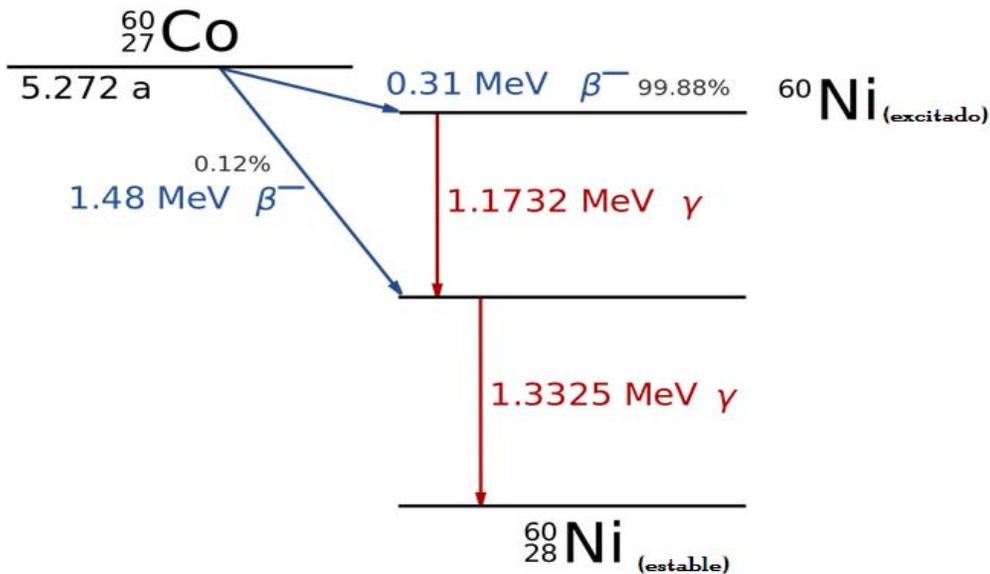


Fig. 5 Esquema de decaimiento del  $^{60}\text{Co}$ .

El cobalto decae predominantemente por la emisión de partículas  $\beta$  de 0.313 MeV resultando  $^{60}\text{Ni}$  excitado, el cual pierde energía hasta su forma estable emitiendo fotones  $\gamma$  con energías de 1.173 y 1.333 MeV respectivamente (Woods, 1994).



Los polímeros se pueden clasificar dependiendo de su respuesta a la radiación ionizante, como polímeros que en general tienden al entrecruzamiento o a la escisión de cadena.

Esto depende de su estructura; en general, aquellos polímeros cuya unidad monomérica contiene al menos un hidrógeno alfa tienden a sufrir entrecruzamiento.

### ***Sistemas de liberación controlada de fármacos***

El objetivo de cualquier sistema de administración de medicamentos es que el principio activo llegue al sitio de acción requerido, en una concentración terapéutica y por el tiempo que sea necesario.

Lo anterior puede resultar problemático en el caso de fármacos con un margen terapéutico estrecho, en los cuales el nivel mínimo efectivo y nivel de toxicidad están muy cercanos entre sí (Remington, 2000), por esta razón se han desarrollado sistemas de liberación controlada, que son capaces de mantener la concentración de fármaco entre estos dos niveles a partir de una única dosis y liberarla de forma continua en un tiempo determinado (Sáez et al., 2001).

Algunos perfiles de liberación controlada típicos se muestran en la Fig. 6 (Bajpai, et al., 2008).

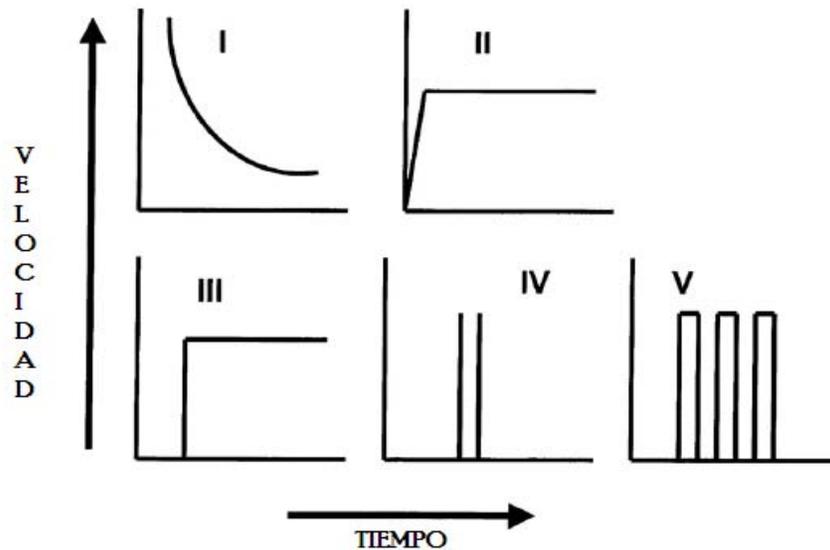


Fig. 6. Ejemplos de cinéticas de cesión de fármaco a partir de sistemas de liberación controlada

Perfil I: Liberación retardada convencional pero no a velocidad constante.

Perfil II: Liberación a velocidad constante (orden cero). La concentración de fármaco en la sangre se mantiene a un nivel terapéutico óptimo.

Perfil III: Liberación retardada seguida de una liberación constante del principio activo.

Perfil IV: Liberación retardada seguido por una rápida liberación pulsátil.

Perfil V: Múltiples pulsos en periodos específicos de tiempo.

### **Mecanismos de sistemas de liberación controlada.**

En los sistemas de liberación controlada, la cinética de liberación depende de la solubilidad del principio activo en la membrana o matriz polimérica, solubilidad en el medio (acuoso), difusión a través de la matriz o membrana, difusión a través del medio, grosor de la membrana o matriz, coeficiente de difusión del disolvente (agua) a través del polímero y grosor de la capa de difusión hidrodinámica (Razem, 2008).

Estos sistemas pueden ser clasificados de acuerdo al mecanismo que controla su liberación como sigue (Bajpai et al., 2008):



### **Sistemas controlados por difusión:**

#### a) Reservorio (sistemas de membrana)

Son sistemas en los cuales hay un núcleo que contiene el principio activo (puede estar disuelto o en suspensión) rodeado por una membrana polimérica permeable. El gradiente de concentración a ambos lados de la membrana determina que la liberación se produzca de acuerdo con un proceso de difusión que sigue la primera ley de Fick.

#### b) Matriz (sistemas monolíticos)

En estos sistemas, el fármaco está uniformemente disperso en el polímero. Tienen un comportamiento de liberación de primer orden (la velocidad de liberación decrece con el tiempo). Esto se debe a un incremento en el recorrido de difusión hacia afuera de la matriz. La difusión sigue la segunda ley de Fick.

### **Sistemas activados por un disolvente:**

En estos sistemas la liberación es controlada por la penetración de un disolvente vía ósmosis o vía hinchamiento (Sáez et al., 2001).

#### a) Sistemas controlados por hinchamiento

Son sistemas monolíticos, en los cuales el fármaco se encuentra embebido en un polímero hidrófilo que se hincha en medio acuoso sin disolverse.

Cuando estos polímeros entran en contacto con un disolvente termodinámicamente compatible, las cadenas poliméricas se relajan. Esto sucede cuando la temperatura de transición vítrea se encuentra por debajo de la temperatura experimental. En el medio de liberación, las moléculas de agua hidratan la superficie del sistema monolítico y se forma un frente de polímero hinchado que rodea al polímero no solvatado. La presencia del disolvente en la fase vítrea provoca una transición hacia el estado elastomérico. El fármaco disuelto difunde hacia la capa externa de polímero que se encuentra hinchado.



En el caso de sistemas en los que la temperatura de transición vítrea está por debajo de la temperatura experimental, el polímero se encontrará en estado elastomérico y se observará una difusión Fickiana.

Cuando esto no es así, las cadenas poliméricas no tendrán suficiente movilidad para la penetración del disolvente y se tendrá una difusión anómala o no Fickiana.

Para la liberación de hasta el 60% del fármaco a través de una malla elastomérica, se puede emplear la siguiente ecuación (Peppas, 2000):

$$M_t/M_\infty = kt^n,$$

Donde  $M_t$  y  $M_\infty$  se refieren a la cantidad de fármaco liberado al tiempo  $t$  y al equilibrio respectivamente,  $n$  es el exponente difusional relacionado al mecanismo de liberación y  $k$  es una constante de proporcionalidad.

Cuando  $n = \frac{1}{2}$  la liberación del fármaco sigue un mecanismo Fickiano y cuando  $n = 1$  la velocidad de liberación es constante e independiente del tiempo, es decir, de orden cero.

#### b) Sistemas controlados osmóticamente

Son sistemas que contienen un núcleo de fármaco rodeado por una membrana polimérica selectiva al agua (semipermeable). La entrada de agua en el sistema facilita la disolución del fármaco y de sustancias osmóticas, que incrementan la presión osmótica en el interior del sistema, lo que a su vez determina que penetre más agua. Dado que el sistema tiene una flexibilidad limitada, el fármaco disuelto abandona el sistema, a través de un pequeño orificio, a una velocidad igual a la de entrada del agua.

#### **Sistemas controlados químicamente:**

En estos sistemas la liberación se da en medio acuoso por alguno de los siguientes mecanismos:

- 1) Biodegradación paulatina del polímero que forma la matriz que contiene al fármaco.



- 2) Biodegradación de enlaces inestables a través de los cuales está acoplado el principio activo.

Se clasifican como:

- a) Sistemas bioerosionables o biodegradables:

El polímero se erosiona debido a la presencia de enlaces susceptibles al ataque enzimático o a hidrólisis. Conforme se da este proceso, el principio activo es liberado al medio.

- b) Sistemas con cadenas laterales:

En estos sistemas el fármaco está químicamente unido al polímero a través de enlaces susceptibles a hidrólisis o ataque enzimático, tras lo cual el principio activo es liberado. La liberación está controlada por la velocidad de hidrólisis.

### **Sistemas de liberación modulada:**

En estos sistemas, la liberación del principio activo es controlada por estímulos externos como temperatura, pH, fuerza iónica, campo eléctrico, radiación electromagnética entre otros.

La mayoría de los dispositivos de liberación controlada actúan por una combinación de los mecanismos antes dichos (Fig. 7).

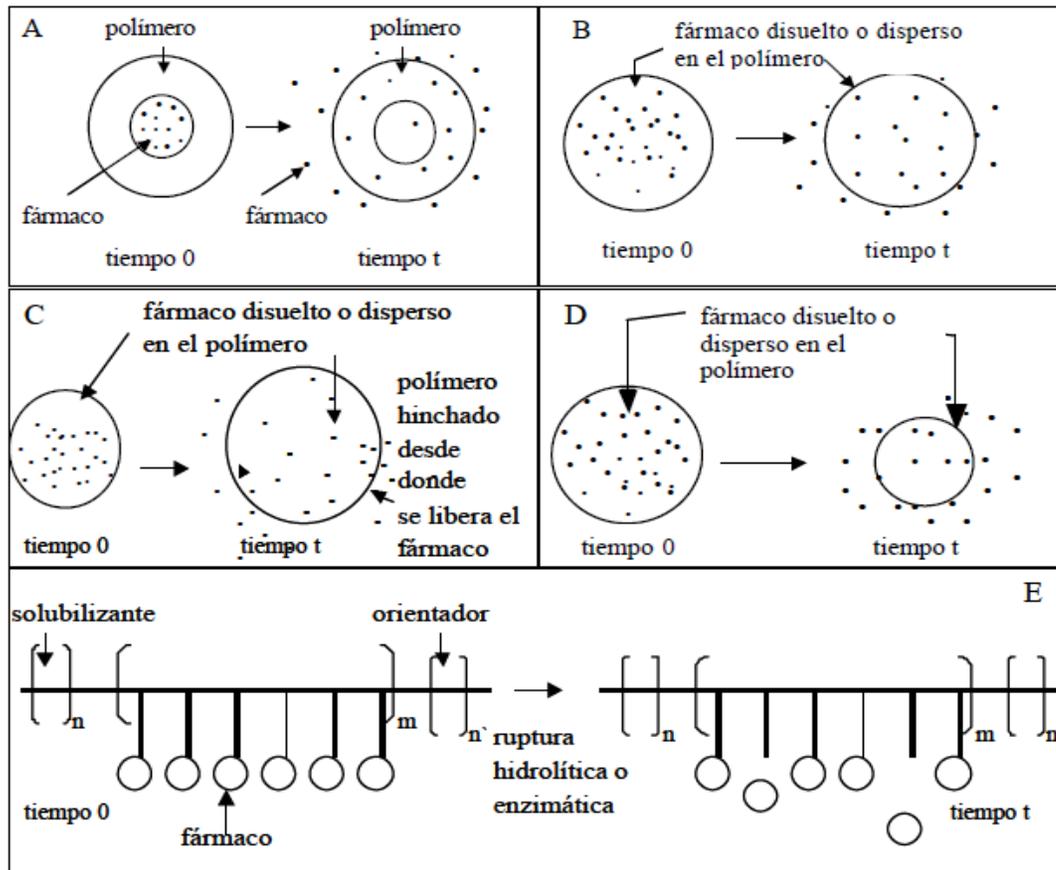


Fig. 7. Tipos de sistemas de liberación controlada. A. Sistema reservorio. B. Sistema matriz. C. Liberación controlada por hinchamiento. D. Liberación controlada por erosión. E. Liberación controlada químicamente. (Sáez et al. 2001)

### **Polímeros sensibles a estímulos**

Los polímeros sensibles a estímulos, también llamados polímeros inteligentes, son aquellos que presentan un cambio abrupto en sus propiedades como respuesta a pequeñas variaciones físicas o químicas del medio (Honey et al., 2014).

La Tabla 2 es una lista de estímulos a los cuales pueden responder este tipo de polímeros (Hoffman, 2013).



Tabla 2. Estímulos a los que pueden responder los polímeros inteligentes.

Estímulos del medio	
Físicos	Temperatura, fuerza iónica, solventes, radiación (UV-visible), campo eléctrico, estrés mecánico, alta presión, campo magnético.
Químicos	pH, iones específicos, agentes químicos.
Bioquímicos	enzimas, ligandos afines.

Estos polímeros pueden ser combinados con moléculas bioactivas como proteínas, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas pequeñas como fármacos, carbohidratos entre otros, que pueden conferirles diversas aplicaciones.

Las áreas en las que ha habido mayor cantidad de aplicaciones biomédicas de los polímeros inteligentes son la liberación de fármacos, superficies de cultivos celulares y el diagnóstico.

### ***Polímeros sensibles al pH***

El cuerpo humano exhibe variaciones de pH a lo largo del tracto gastrointestinal así como en tejidos específicos, áreas tumorales y compartimentos celulares, lo cual hace a este tipo de polímeros (junto con los sensibles a la temperatura) de gran importancia para aplicaciones biomédicas.

Se pueden definir como polielectrolitos que contienen en su estructura grupos ácidos o básicos débiles, los cuales aceptan o liberan protones en respuesta a un cambio en el pH del medio. Cuando se manipulan las cargas del polímero; ya sea por el pH, fuerza iónica o tipo de contraiones; las fuerzas de repulsión electrostáticas crean un incremento en el volumen hidrodinámico del polímero. (Reyes-Ortega, 2014).



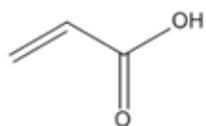
Un polímero sensible al pH tendrá un mayor hinchamiento cuando el pH externo aumenta, en el caso de aquellos que contienen grupos ácidos débiles; pero su hinchamiento será menor en el caso de aquellos con grupos básicos.

Por otro lado, cuando la fuerza iónica de la solución aumenta, el polímero puede intercambiar iones con la solución. Al hacer esto mantiene la neutralidad de carga y el aumento en la concentración de contraiones libres dentro del polímero provoca un aumento en la diferencia de presión osmótica entre el polímero y la solución, causando su hinchamiento. Sin embargo, cuando la fuerza iónica es muy grande (1-10M) éste se colapsa, pues la diferencia de presión osmótica será menor (Bajpai et al., 2008).

Se han desarrollado sistemas de liberación controlada de fármacos usando copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, observándose que la rapidez inicial de liberación depende del pH y fuerza iónica del medio y que son capaces de liberar el fármaco a pH neutro (Khare y Peppas, 1993).

### Ácido acrílico

El ácido acrílico (Fig. 8) es el ácido carboxílico insaturado más pequeño. Es una molécula polar de gran interés industrial debido al uso de sus polímeros como floculantes y dispersantes, así como las sales de sodio como materiales súper absorbentes en productos como pañales y toallas higiénicas femeninas.



Ácido acrílico  
 $C_3H_4O_2$   
PM = 72.06

Fig. 8. Estructura del ácido acrílico.

También se ha usado con propósitos de investigación aprovechando su carácter ácido y facilidad de polimerización para crear hidrogeles (Ende y Peppas, 1997), redes interpenetrantes (Ruiz et al., 2007) o copolímeros de injerto (Ruiz et al., 2008)

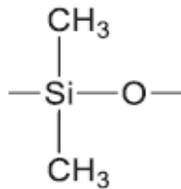


sensibles al pH con diversas aplicaciones biomédicas, así como su polaridad para lograr la dispersión de polímeros hidrófobos en agua mediante su injerto (Changqiao et al., 2014).

A temperatura ambiente es un líquido incoloro de olor acre muy soluble en agua, pKa de 4.35 y punto de ebullición de 141 °C a 1 atmósfera de presión y puede polimerizar por exposición a la luz (BASF, n.d.).

## Silicona

Aquellos polímeros compuestos por un esqueleto de (-Si-O-) con dos radicales orgánicos monovalentes unidos a cada átomo de Si son llamados siliconas (Fig. 9). La unidad repetida (-Si-O-) es llamada enlace siloxano.



Dimetilsiloxano

Fig. 9. Estructura de la unidad repetida del dimetilsiloxano.

Los polímeros de silicona han sido usados por décadas como biomateriales en la práctica clínica en dispositivos como catéteres, drenajes, pequeños implantes de articulaciones e implantes estéticos (Henstock, 2015).

Ha habido un importante interés en copolímeros de silicona o redes de silicona modificada, debido a la interesante combinación de propiedades ofrecidas por éstos materiales, como alta flexibilidad, baja temperatura de transición vítrea ( $T_g \sim -120^\circ\text{C}$ ), estabilidad térmica y oxidativa, alta permeabilidad a gases, propiedades dieléctricas excelentes y buena biocompatibilidad (Yilgör, 2014).

Se ha observado que la silicona tiene buena resistencia a la radiación gamma, sin embargo, a dosis por encima de 200 kGy, el material sufre daño significativo (Huang et al., 2001).



## Antimicrobianos

Los antimicrobianos o antibióticos son sustancias producidas por microorganismos (bacterias, hongos), modificaciones químicas de éstas o sintéticos que poseen acción tóxica selectiva sobre estructuras o funciones de otros microorganismos. Pueden ser bacteriostáticos si inhiben su crecimiento o bactericidas si ejercen acción letal (Goodman, 2003; Fernández et al., 1994).

### Vancomicina

La vancomicina (Fig. 10) es un glucopéptido producido por *Streptococcus orientalis* con una masa molecular de aproximadamente 1500 Da, es usada para el tratamiento de infecciones graves por bacterias Gram-positivas, especialmente de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA).

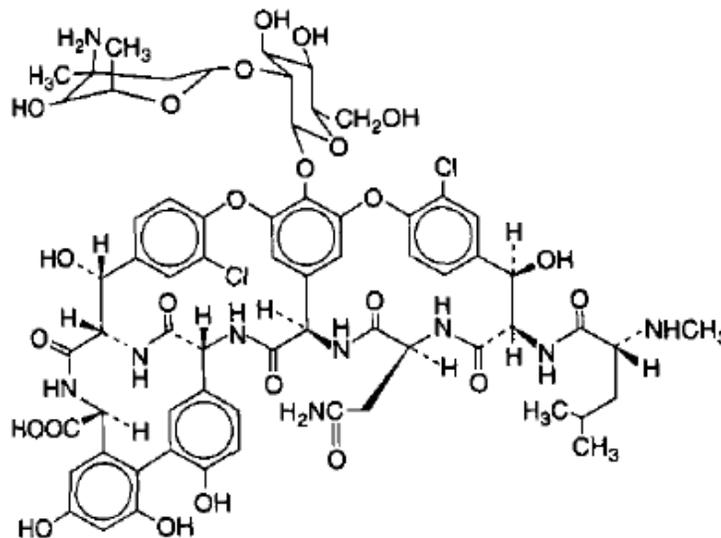


Fig. 10. Estructura de la vancomicina.

Inhibe la síntesis de la pared celular, uniéndose a la porción D-alanil-D-alanina de los péptidos precursores, de manera que se inhiben las reacciones de polimerización y transpeptidación. Esto impide el entrecruzamiento del peptidoglicano de la pared celular, que ocurre durante la segunda fase de la síntesis de pared celular (Nailor, 2011).



# Objetivos

## ***Objetivo general.***

- Sintetizar un nuevo biomaterial polimérico de injerto por medio de radiación gamma a partir de silicona y ácido acrílico para potencial aplicación como sistema de liberación controlada de fármacos antimicrobianos

## ***Objetivos particulares.***

- Sintetizar el copolímero de injerto SR-g-AAc por el método de preirradiación oxidativa.
- Evaluar el efecto de la dosis de irradiación, temperatura, concentración del monómero y tiempo de reacción en el porcentaje de injerto.
- Caracterizar el copolímero de injerto por espectroscopía de infrarrojo (FT-IR), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA).
- Determinar el tiempo de hinchamiento límite del copolímero de injerto en medio acuoso.
- Determinar el pH crítico mediante su hinchamiento con respecto al pH.
- Estudiar la carga y cesión de vancomicina en el biomaterial sintetizado a diferentes porcentajes de injerto.

## Desarrollo experimental

### *Síntesis del copolímero de injerto SR-g-pAAc.*

#### **Método de preirradiación oxidativa.**

Se utilizó hule de silicona (SR) de 1 mm de espesor marca Goodfellow. Se cortaron láminas de 2.5 cm x 1 cm, las cuales se lavaron en etanol 3 veces durante 3 h en agitación constante y se secaron en estufa de vacío toda la noche. Posteriormente se registró el peso.

El ácido acrílico marca Aldrich se destiló al vacío antes de usar.

Se utilizó tolueno marca Baker como disolvente.

Las muestras se irradiaron en presencia de oxígeno en un irradiador gamma con fuentes de  $^{60}\text{Co}$ , Gammabeam 651 PT (GB 651PT) ubicado en el Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM (Fig. 11) a una razón de dosis (I) de  $9.90 \text{ kGy h}^{-1}$  al 12 de agosto del 2014.

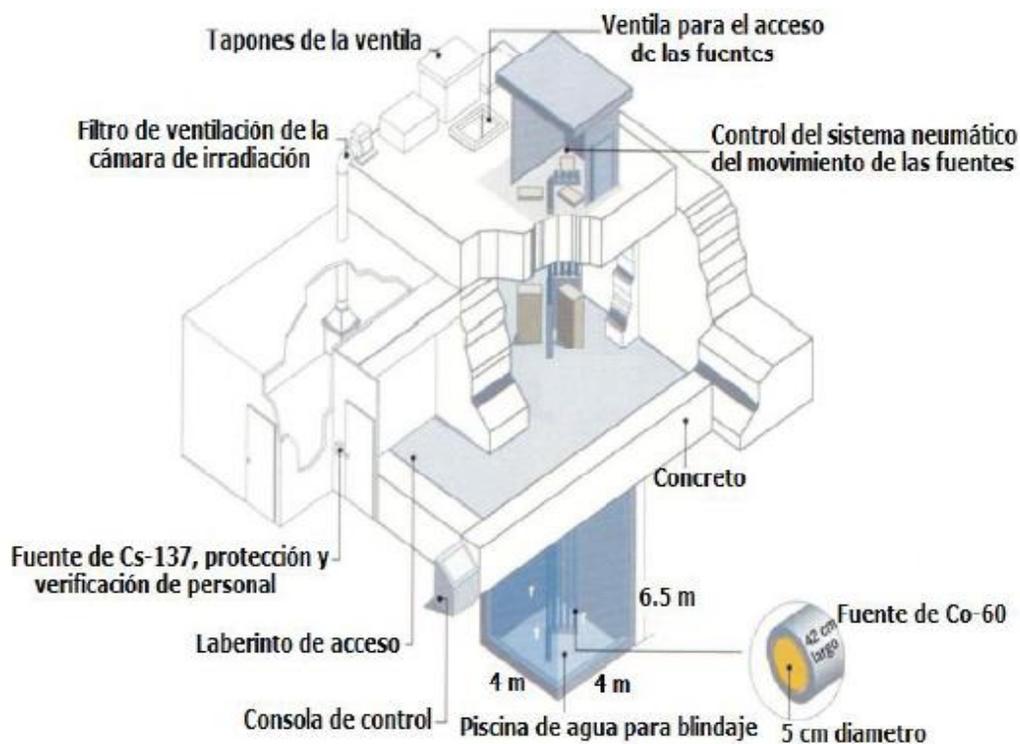


Fig. 11 Esquema del Irradiador Gammabeam 651 PT ubicado en el ICN.



Para calcular la razón de dosis, de acuerdo al tiempo de vida media del  $^{60}\text{Co}$  de 5.24 años, se tomó en cuenta que después de 15 días,

$$I = 0.9945 I_0$$

Después de la irradiación, se colocaron las películas de silicona en ampollitas de vidrio. Se les añadió 7 mL de una mezcla de ácido acrílico con tolueno, posteriormente se desgasificaron en una línea de vacío para eliminar el oxígeno, pues éste inhibe la reacción de polimerización. Para ello, se congelaron en nitrógeno líquido y se dejó abierta la llave de vacío durante 5-10 min, después se descongelaron sumergiéndolas en agua (llave de vacío cerrada) y se repitió el proceso 4 veces en total. Tras la eliminación del oxígeno proveniente del aire, se sellaron las ampollitas con calor y se dejaron en baño maría para permitir la formación de injerto a una temperatura y tiempo de reacción controlada.

Después de la reacción, las películas injertadas se lavaron en etanol 3 veces durante 3 h en agitación constante. Posteriormente se secaron en estufa de vacío y se registró el peso final.

Para calcular el porcentaje de injerto ( $Y_g$ ) formado se utilizó la siguiente relación:

$$Y_g (\%) = 100[(W_g - W_0) / W_0]$$

Donde  $W_g$  y  $W_0$  son los pesos de las películas injertadas y sin injertar, respectivamente.

Se realizó el siguiente diseño experimental para determinar la influencia de la dosis de irradiación, concentración de monómero, temperatura y tiempo de reacción de la formación del copolímero de injerto.

### **Influencia de la dosis en el porcentaje de injerto.**

Se siguió el procedimiento descrito anteriormente, variando la dosis de irradiación y bajo las siguientes condiciones de concentración, temperatura y tiempo de reacción (Tabla 3):



Tabla 3. Condiciones experimentales para evaluar el efecto de la dosis.

Dosis (kGy)	Concentración AAc / tolueno [%]	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
20	50	60	180
40			
60			
80			
100			

### **Influencia de la temperatura de reacción en el porcentaje de injerto.**

La dosis de irradiación fue de 40 kGy para todas las películas, usando una concentración de AAc 50% v/v, con un tiempo de reacción de 180 min pero variando la temperatura de acuerdo a la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones experimentales para evaluar el efecto de la temperatura.

Dosis (kGy)	Concentración AAc / tolueno [%]	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
40	50	180	50
			60
			70
			80

**Influencia del tiempo de reacción en el porcentaje de injerto.**

La dosis de irradiación fue de 40 kGy para todas las películas, usando una concentración de AAc 50% v/v, con una temperatura de 60 °C pero variando el tiempo de reacción de acuerdo a la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones experimentales para evaluar el efecto del tiempo de reacción.

Dosis (kGy)	Concentración AAc / tolueno [%]	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
40	50	60	30
			60
			90
			120
			150
			180

**Influencia de la concentración de monómero en el porcentaje de injerto.**

La dosis de irradiación fue de 40 kGy para todas las películas, con una temperatura de 60 °C, tiempo de reacción de 180 min pero variando la concentración del monómero de acuerdo a la Tabla 6.



Tabla 6. Condiciones experimentales para evaluar el efecto de la concentración.

Dosis (kGy)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Concentración AAc / tolueno [%]
40	60	180	30
			40
			45
			50
			60
			70
			80

### ***Caracterización del copolímero de injerto***

#### **Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Se utilizó un equipo de análisis diferencial de barrido TA Instruments, ubicado en el laboratorio de macromoléculas del Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM.

Para determinar las transiciones de fase del material se evaluaron muestras de poli(ácido acrílico), hule de silicona y 3 muestras del material sintetizado SR-g-AAc con diferentes porcentajes de injerto (15, 66 y 166%).

Se tomaron muestras de entre 5 y 10 mg. El análisis se llevó a cabo a una velocidad de calentamiento de 10 °C min<sup>-1</sup> en atmósfera de nitrógeno partiendo de temperatura ambiente hasta 350 °C.

#### **Análisis termogravimétrico (TGA)**

Se utilizó un equipo de análisis termogravimétrico Q50, TA Instruments, ubicado en el laboratorio de macromoléculas del Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM.



Para analizar la estabilidad térmica del material se evaluaron muestras de poli(ácido acrílico), hule de silicona y 3 muestras del material sintetizado SR-g-AAc con diferentes porcentajes de injerto (15, 66 y 166%).

Las muestras a analizar se secaron en estufa durante al menos 24 h para asegurar la eliminación de agua u otro disolvente presente.

Se tomaron muestras de entre 5 y 10 mg. El análisis se llevó a cabo a una velocidad de calentamiento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  bajo atmósfera de nitrógeno, partiendo de temperatura ambiente hasta  $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)**

Se utilizó un espectrómetro por transformada de Fourier marca Perkin-Elmer modelo Spectrum One, acoplado con un accesorio de reflectancia total atenuada con punta diamante (FTIR-ATR) ubicado en el Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM.

Las muestras a analizar se secaron en estufa durante al menos 24h para asegurar la eliminación de agua u otro disolvente presente.

Se analizaron muestras de poli(ácido acrílico), hule de silicona y 3 muestras del material sintetizado SR-g-AAc con diferentes porcentajes de injerto (15, 66 y 166%).

Se realizaron 16 barridos en un rango de número de onda de  $650\text{ a }4000\text{ cm}^{-1}$ .

### **Hinchamiento límite**

Para la determinación del tiempo de hinchamiento límite, se secaron en estufa de vacío una muestra de silicona y tres muestras de SR-g-AAc de diferentes porcentajes de injerto (13, 30 y 51%) y se registraron los pesos iniciales.

Las muestras se sumergieron en agua para iniciar el hinchamiento y se monitoreó su peso en función del tiempo, secándolas cuidadosamente con papel absorbente para retirar el agua de la superficie. Las mediciones se hicieron cada 15 minutos durante los primeros 90 minutos de la medición, posteriormente cada 30 minutos hasta las 4 h y posteriormente se midió cada hora por un total de 9 h, hasta que el peso se mantuviera constante. Se registró el peso al día siguiente para corroborar



que se había alcanzado el máximo hinchamiento, el cual no cambio significativamente a las 24 h.

El porcentaje de hinchamiento se obtuvo con la siguiente relación:

$$\text{Hinchamiento (\%)} = 100 ((W_s - W_d) / W_s)$$

Donde  $W_s$  es el peso del material hinchado a un tiempo determinado y  $W_d$  es el peso del material seco (peso inicial).

### **Determinación del pH crítico**

Para la determinación del pH crítico se prepararon soluciones buffer en un rango de pH de 2 a 11 a partir de dos soluciones:

#### **Solución I:**

- Ácido bórico 0.2M
- Ácido cítrico 0.05M

#### **Solución II:**

- $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  Ortofosfato trisódico 0.1M

Los buffers se prepararon de acuerdo a la Tabla 7.



Tabla 7. Preparación de las soluciones buffer usadas para determinar el pH crítico.

pH	Solución I (mL)	Solución II (mL)
2	195	5
3	176	24
4	155	45
4.5	144	56
5	134	66
5.5	126	74
6	118	82
6.5	109	91
7	99	101
7.5	92	108
8	85	115
9	69	131
10	54	146
11	44	156

Se ajustó el pH con ayuda de un pHmetro HI4212 marca Hanna Instruments de Ag/AgCl.

Las muestras del material injertado se dejaron hinchar en pH 11 por 24 h, después de lo cual se registró su peso, retirando cuidadosamente el agua de la superficie con papel absorbente. Posteriormente se dejaron en el buffer de pH 10 por 24 h y así hasta el buffer pH 2 registrando en cada ocasión el peso obtenido.



### **Microscopio electrónico de barrido**

Muestras (1 x 1 cm) de hule de silicona sin modificar y de láminas denominadas CS40, 8CSLV y CS45, se introdujeron en agua Milli-Q durante 24 horas. A continuación, se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido y se liofilizaron. Una vez secas, las láminas se cortaron transversalmente utilizando un bisturí. Los fragmentos se montaron en soportes cilíndricos, se sombrearon con oro y se observaron mediante microscopía electrónica de barrido (FESEM Ultra Plus, Zeiss, Alemania) a diferentes aumentos (100, 200 y 500X).

### ***Carga y cesión de fármacos antimicrobianos: vancomicina.***

#### **Carga de vancomicina**

Para la carga de vancomicina en el copolímero SR-g-AAc se escogieron películas de 15, 24 y 35% de injerto. No se utilizaron películas de mayor injerto debido a su rigidez, lo cual las hace poco prácticas para el fin deseado.

Se utilizó vancomicina HCl de Fagron (Colombia). Se usó como se recibió.

Se realizó una curva patrón de vancomicina para poder determinar su concentración en un espectrofotómetro UV-Vis marca Analytikjena ubicado en el Laboratorio de Macromoléculas del Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM.

Para ello, se prepararon disoluciones de vancomicina entre 0.500 y 0.025 mgmL<sup>-1</sup> de concentración, usando diluciones a partir de una solución madre.

Se usaron celdas de cuarzo de 1 cm de longitud, se utilizó agua como blanco y a partir de la disolución 0.025 mg mL<sup>-1</sup> se hizo un barrido espectral para determinar la longitud de onda de máxima absorción, la cual fue de 281 nm.

Se midió la absorbancia para todas las disoluciones a 281 nm de acuerdo a la Tabla 8.



Tabla 8. Curva patrón de la vancomicina.

Concentración de vancomicina (mg mL <sup>-1</sup> )	Absorbancia a 281 nm
0.025	0.1155
0.05	0.2333
0.1	0.4549
0.2	0.9216
0.25	1.1395
0.5	2.2493

De acuerdo a la ley de Lambert y Beer:

$$A = abC$$

Donde A es la absorbancia, a es el coeficiente de extinción, b es la longitud de la celda y C es la concentración de vancomicina.

Para este ensayo se obtuvo la siguiente relación:

$$A = (4.5236 \text{ cm}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ mL})(1 \text{ cm}) C [\text{mg mL}^{-1}] \quad R^2 = 0.9998$$

Despejando C, se puede conocer la concentración en mg mL<sup>-1</sup> de cualquier muestra a partir de la Absorbancia.

Las muestras seleccionadas se cortaron en cuadros de alrededor de 0.2 g (tres cuadros por cada porcentaje de injerto como repetición) y se enjuagaron bajo agitación magnética en etanol, agua, buffer de fosfatos pH 7.4 y agua por 24 h cada ocasión.

Se dejaron secar en estufa de vacío por 24 h, tras lo cual se pesaron, se midió el largo y ancho de cada una con un vernier, se calculó el área y se colocaron por separado en frascos lavados y etiquetados color ámbar, pues debido a que la vancomicina es fotosensible, se debe evitar su contacto con la luz. Se hizo lo mismo para una muestra de silicona virgen (Tabla 9).



Tabla 9. Peso y área de las muestras utilizadas para el ensayo de carga y cesión de vancomicina.

% Injerto	Medición	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
15%	Peso (g)	0.186	0.177	0.184
	Largo (mm)	12.700	12.140	13.050
	Ancho (mm)	11.220	11.540	11.090
	Área (cm <sup>2</sup> )	2.850	2.802	2.894
24%	Peso (g)	0.243	0.206	0.189
	Largo (mm)	17.840	13.030	12.390
	Ancho (mm)	11.530	13.110	12.450
	Área (cm <sup>2</sup> )	4.114	3.416	3.08510
35%	Peso (g)	0.215	0.195	0.18730
	Largo (mm)	15.44	14.180	13.080
	Ancho (mm)	11.26	11.030	11.070
	Área (cm <sup>2</sup> )	3.477	3.128	2.896
Silicona virgen	Peso (g)	0.224	0.207	0.228
	Largo (mm)	17.640	17.220	17.340
	Ancho (mm)	10.660	9.960	10.740
	Área (cm <sup>2</sup> )	3.761	3.430	3.725

Para la carga de vancomicina se preparó una disolución de 0.3 mg mL<sup>-1</sup> de vancomicina y se añadieron 20 mL de ésta disolución a cada frasco. Los frascos se dejaron con agitación magnética, protegidos de la luz y se monitoreó la disminución de la concentración de vancomicina del medio, hasta llegar a un valor constante (hasta las 72 h).



### **Liberación de la vancomicina**

Para llevar a cabo el estudio de liberación de vancomicina, las muestras cargadas se enjuagaron un poco con agua para retirar el fármaco físicamente adsorbido en las paredes y se dejaron secar en estufa de vacío por 48 h para asegurar la eliminación de agua.

Este estudio se llevó a cabo en una solución buffer de fosfatos de pH 7.4 el cual corresponde al pH de la sangre.

Para preparar el buffer se tomaron 50 mL de una disolución de fosfato monobásico de potasio 1M y 34.7 mL de una disolución de NaOH 1M previamente preparadas y se aforó a 200 mL. Esta disolución concentrada se guardó en refrigeración y se diluyó 1 a 5 antes de ser utilizada. Se ajustó el pH a 7.4

Se hizo una curva patrón igual a la anterior usando buffer como blanco para asegurar que no hubiera variación o interferencias.

A las muestras secas se les añadió 20 mL de solución buffer de fosfatos, se dejaron en agitación magnética, protegidas de la luz y se monitoreó el aumento de la concentración de vancomicina en el medio con respecto al tiempo, hasta 123 h que se observó una concentración constante.

## Resultados y discusión.

### *Síntesis del copolímero de injerto.*

La radiación gamma incidente en las películas de silicona provoca la excitación de las moléculas y posterior formación de radicales libres por efecto Compton, ya sea en un enlace Si-CH<sub>3</sub> o un enlace C-H de algún metilo. Estos radicales libres, en presencia de aire, reaccionan con el oxígeno; dando lugar a la formación de peróxidos e hidroperóxidos (Fig. 12).

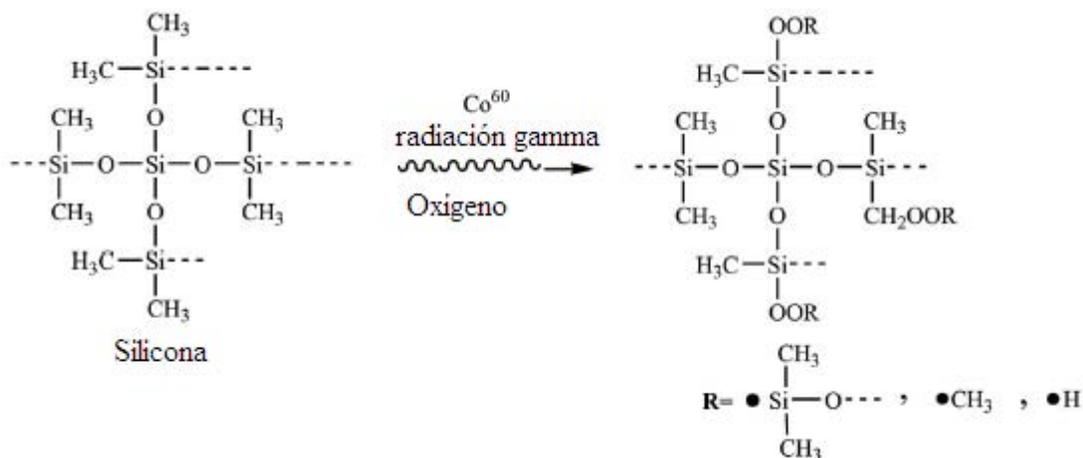


Fig 12. Formación de peróxidos e hidroperóxidos en hule de silicona. Imagen tomada de (Segura y Burillo 2013)

La reacción de copolimerización de injerto tiene lugar cuando la muestra es calentada en presencia del monómero (ácido acrílico) en un disolvente (tolueno) y en ausencia de oxígeno.

El calor provoca la ruptura homolítica de los peróxidos e hidroperóxidos de la silicona irradiada, dando lugar a la formación de un macrorradical, el cual puede reaccionar con algún monómero del medio, produciendo el primer radical de la cadena (Fig 13).

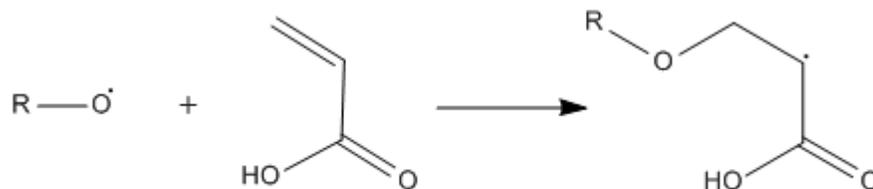


Fig. 13. Iniciación de la reacción de polimerización. Los radicales formados tras la ruptura homolítica de los peróxidos reaccionan con el grupo vinílico del ácido acrílico.

La reacción continúa por un proceso llamado propagación, el cual consiste en la adición sucesiva de cientos o miles de monómeros a la cadena en crecimiento (Fig. 14).

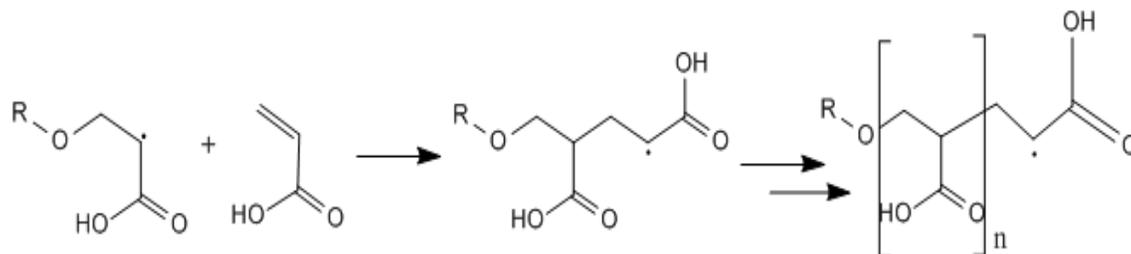


Fig 14. Propagación del centro reactivo durante la reacción de polimerización.

La reacción puede terminar por combinación de los radicales libres o por desproporción (Fig. 15).

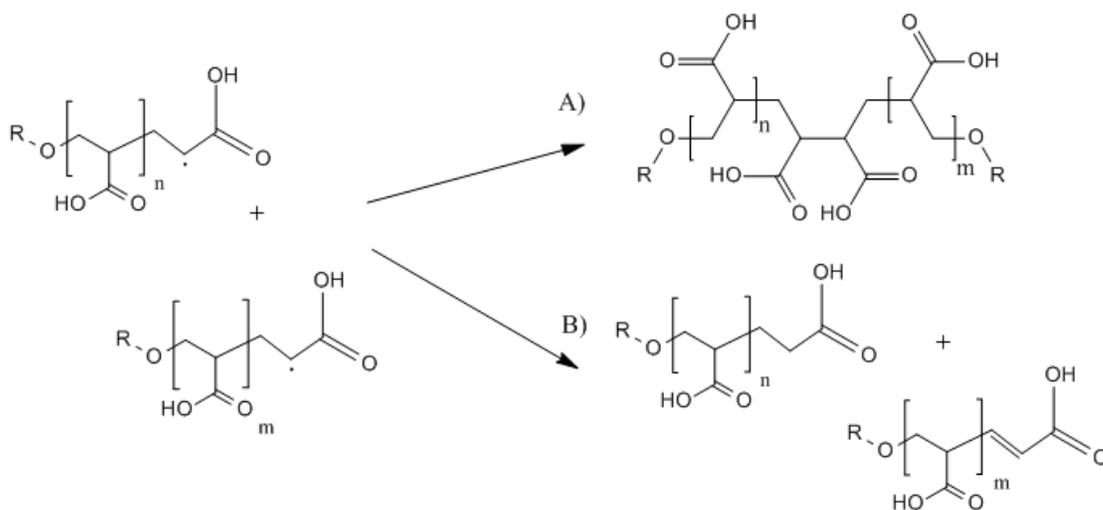


Fig. 15. Terminación de la polimerización por A) Combinación o B) Desproporción.

Mientras los radicales  $RO\cdot$  permiten la iniciación de la reacción de injerto, los radicales hidroxilo  $HO\cdot$  presentes en el medio son los responsables de la formación de homopolímero, el cual hasta cierto punto es un producto indeseable, pues puede mermar la eficiencia de injerto.

El oxígeno actúa como inhibidor de la polimerización, por esta razón es necesaria su eliminación, pues compite con el monómero al reaccionar con los radicales en formación.

### **Influencia de la dosis de irradiación en el porcentaje de injerto.**

Como se puede observar en la Fig. 16, en un rango de 20 a 100 kGy, el porcentaje de injerto aumenta con respecto a la dosis. Esto es debido a que a mayor exposición a la radiación gamma, se formarán más peróxidos e hidroperóxidos en la matriz, los cuales funcionarán como sitios reactivos en donde se podrá injertar el poli(ácido acrílico).

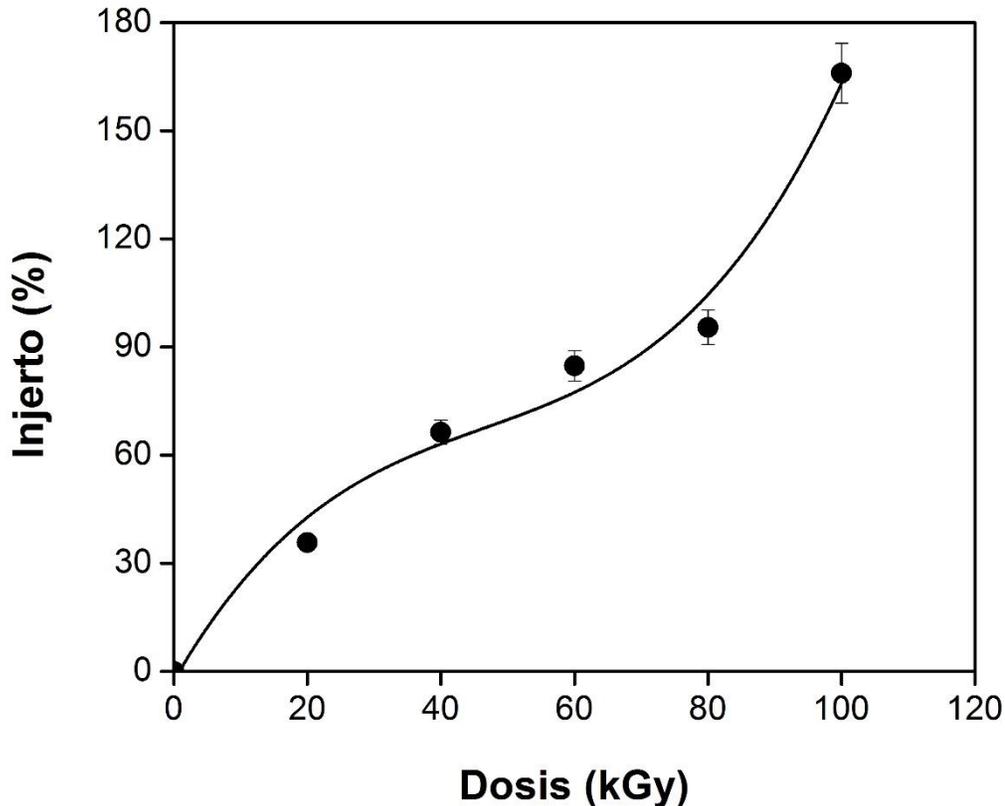


Fig. 16. Porcentaje de Injerto con respecto a la dosis de irradiación.

De acuerdo a la literatura (Li, et al. 1999) a dosis mayores a 120 kGy, las películas de silicona irradiadas en presencia de oxígeno alcanzan un límite de saturación de peróxidos, lo cual puede provocar un comportamiento asintótico por encima de esta dosis en la curva, pues no se crearán más sitios reactivos que den lugar a la formación de injerto. Por otro lado, a dosis altas se podrían favorecer reacciones de degradación tras la ruptura del enlace siloxano.

### **Influencia de la temperatura de reacción en el porcentaje de injerto.**

Se puede apreciar (Fig. 17) que, conforme se aumenta la temperatura, el porcentaje de injerto es mayor, esto se debe a que la descomposición térmica de los peróxidos



e hidroperóxidos se da más rápidamente y es éste el paso determinante en la reacción.

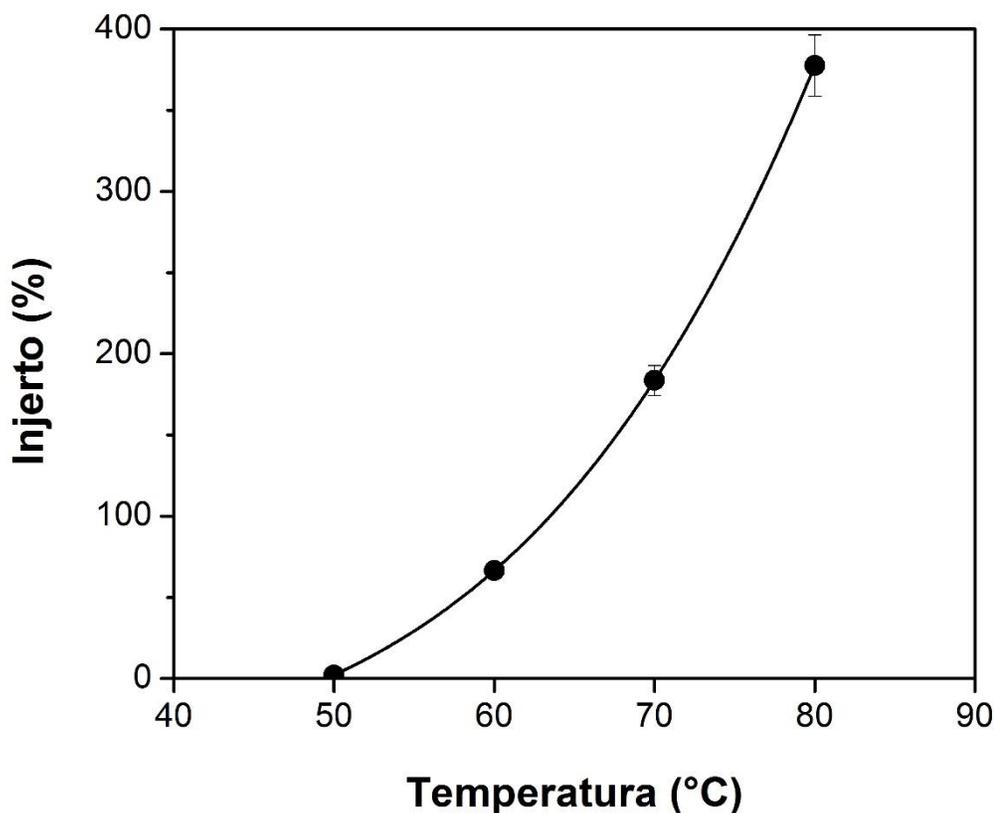


Fig. 17. Porcentaje de Injerto con respecto a la temperatura

Por otro lado, a una mayor temperatura, la energía cinética del medio es mayor, facilitando la colisión de las especies y reacción de las mismas.

Por debajo de los 50 °C no se observa un porcentaje de injerto considerable formado durante las 3 h de reacción, es posible que se requiera mucho más tiempo para que haya suficiente formación de radicales libres que puedan reaccionar con el monómero o que la energía no sea suficiente para romper el enlace peróxido. Por otro lado, el rendimiento aumentó considerablemente entre los 70 y 80 °C.

A una temperatura de 80 °C se observa un porcentaje de injerto superior al 350%, lo cual puede ser señal de la presencia de cadenas muy largas de poli(ácido acrílico)



injertadas en la matriz, es posible que tras la formación del homopolímero, éste haya reaccionado con las cadenas crecientes de injerto.

La descomposición de los peróxidos e hidroperóxidos de la matriz a una cierta temperatura con respecto al tiempo hace necesario almacenar la silicona irradiada a bajas temperaturas y no se debe dejar pasar mucho tiempo entre la exposición a la radiación gamma y la reacción de copolimerización, pues esto podría resultar en un menor rendimiento.

### **Influencia del tiempo de reacción en el porcentaje de injerto.**

Conforme transcurre el tiempo de reacción (Fig. 18), el porcentaje de injerto aumenta, siendo más veloz por encima de los 120 minutos. Es en éste lapso de tiempo cuando el medio de reacción comienza a verse más turbio y viscoso, lo cual puede relacionarse con la formación de homopolímero.

El homopolímero formado en el medio puede ser capaz de incrementar más rápidamente el porcentaje de injerto, debido a que éste puede reaccionar con las cadenas crecientes por combinación (una de las posibles reacciones de terminación).

La curva tenderá a una constante cuando ya no haya más radicales libres en el medio (por combinación o desproporción) o cuando ya no haya monómero suficiente en el medio para seguir reaccionando, tras lo cual se dé la terminación de la reacción.

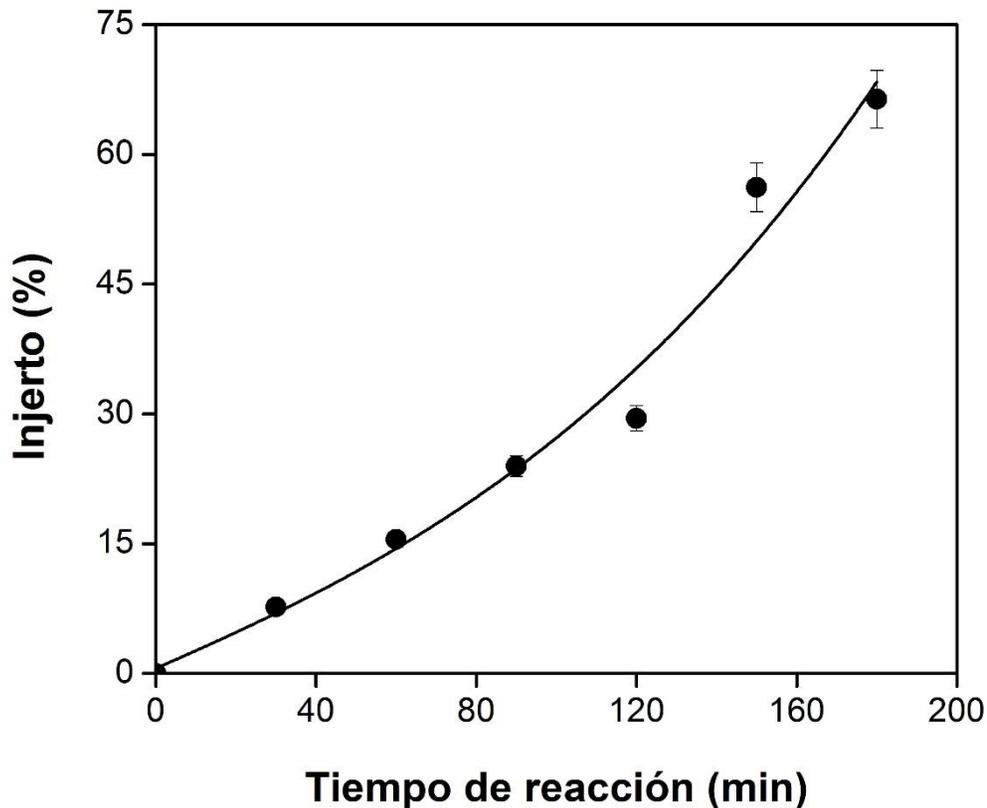


Fig. 18. Porcentaje de Injerto con respecto al tiempo de reacción.

El tiempo de reacción está relacionado con la temperatura en el contexto de que ésta última es la que impone la velocidad de reacción, pues dependiendo de qué tan rápido se dé la descomposición térmica del iniciador, será la velocidad con la que se injertará el ácido acrílico en la matriz.

### **Influencia de la concentración de monómero en el porcentaje de injerto.**

El porcentaje de injerto aumenta conforme la concentración de monómero, como se muestra en Fig 19.

A mayor concentración, habrá más monómero disponible para reaccionar con la matriz, de forma que si la concentración es muy baja, la probabilidad de colisión



entre las moléculas y posterior reacción será menor, obteniéndose como resultado injertos bajos.

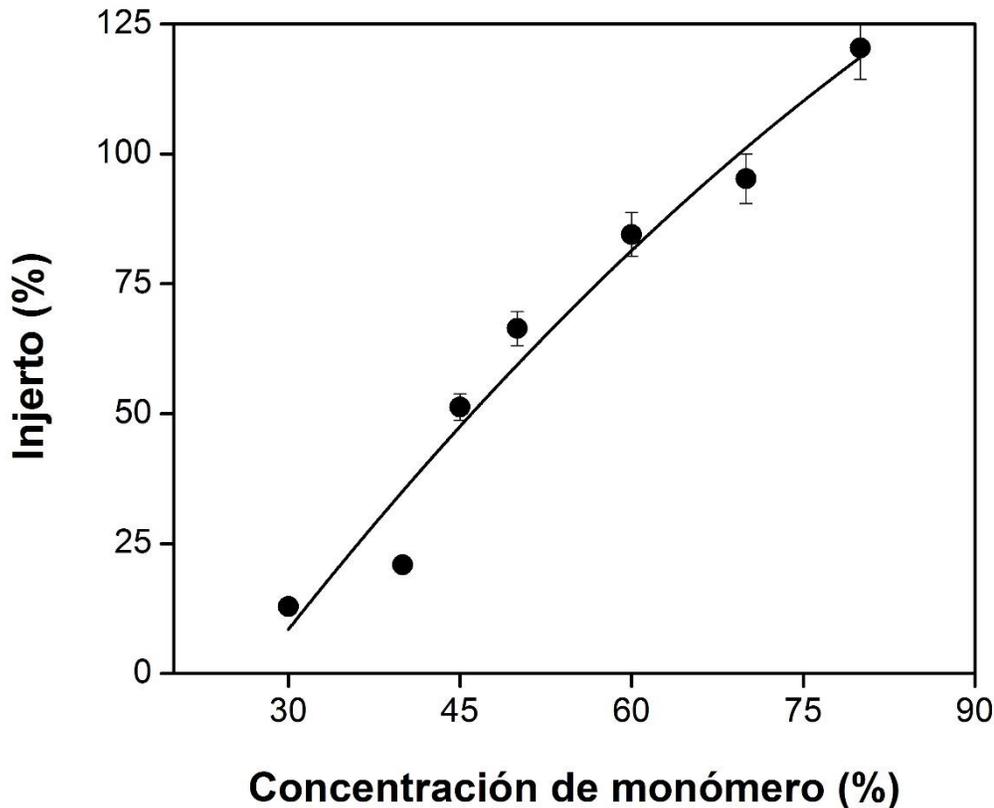


Fig. 19. Porcentaje de Injerto con respecto a la concentración del monómero.

En el caso contrario, cuando la concentración de monómero es muy alta, se favorecerá la formación de homopolímero, el cual, como se ha explicado antes, podría injertarse en la matriz. Sin embargo, el homopolímero confiere una viscosidad muy alta, dificultando la extracción de la matriz del medio al término de la reacción.

En general, se puede decir que la dosis estará relacionada con la cantidad de sitios activos que se formen, la temperatura con la velocidad de descomposición de los mismos y por tanto de formación de injerto, lo cual se verá reflejado en el tiempo de reacción, y la concentración con la disponibilidad de monómero en el medio.



## Caracterización del copolímero SR-g-pAAc

### Calorimetría diferencial de barrido

En la Fig. 20 se muestra el termograma obtenido por DSC entre 25 y 350 °C para la silicona, poli(ácido acrílico) e injerto SR-g-AAc. Como es de esperarse, la silicona no presenta transiciones en ese rango de temperatura, mientras que los injertos presentan una Tg alrededor de 120 °C, la cual es debida a la presencia de poli(ácido acrílico) en su estructura. Este valor concuerda con el reportado en la literatura entre 105 y 133 °C (García, 2014; Paredes, 2011).

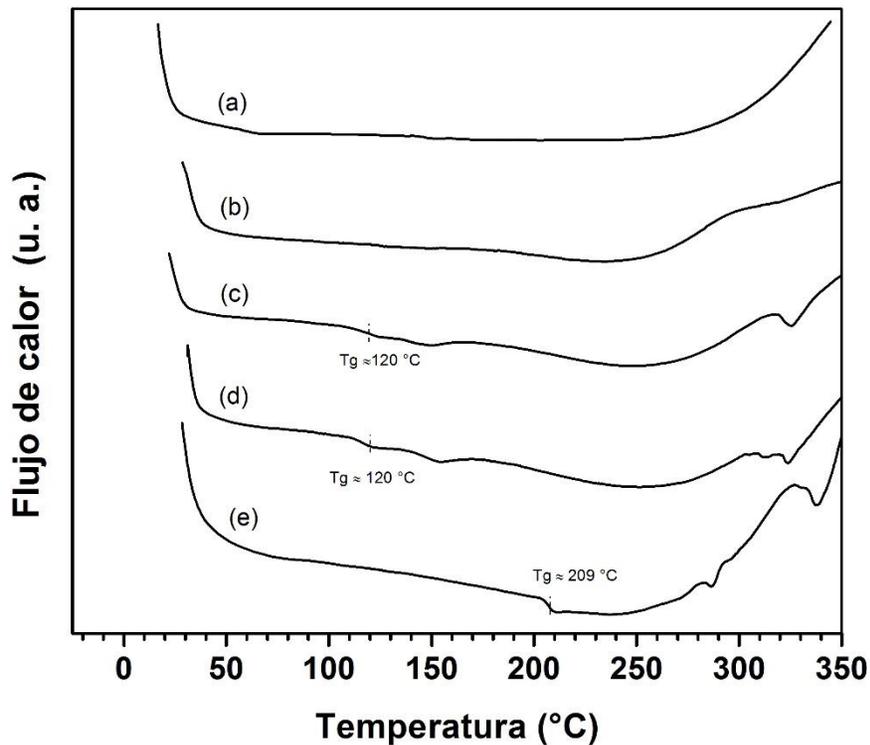


Fig. 20. Termogramas del DSC para (a) SR (b) SR-g-PAAc 15% (c) SR-g-PAAc 66% (d) SR-g-PAAc 166% (e) poli(AAc)



## Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico (TGA) se llevó a cabo en un intervalo de temperatura de 25 a 800 °C en atmósfera inerte de N<sub>2</sub>. Como se puede apreciar en la Fig. 21, la silicona muestra una sola zona de degradación alrededor de 450 °C, mientras que el poli(ácido acrílico) presenta 3 zonas diferentes de descomposición.

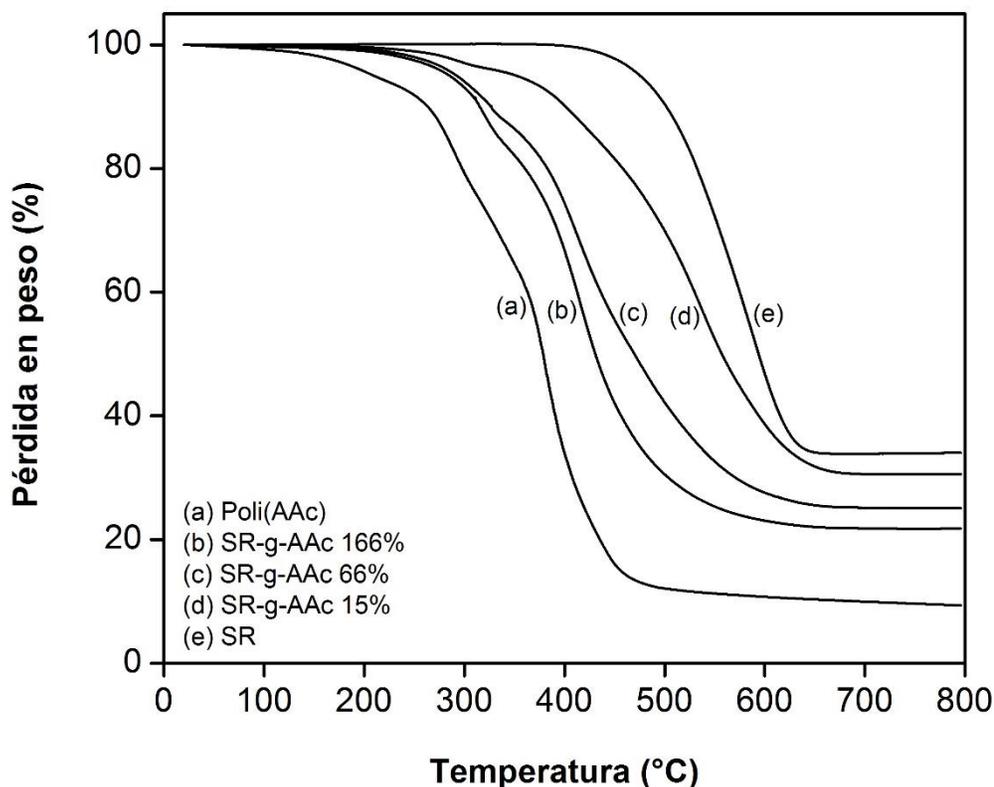


Fig. 21. Diagrama TGA de SR, SR-g-PAAc y poli(AAc)

Según la literatura (Paredes, 2011; Dubisky, 2004) la primera etapa de degradación del poli(AAc) ocurre alrededor de los 200 °C y corresponde a la pérdida de agua tras la formación de anillos anhidros a partir de reacciones inter o intramoleculares. Esta curva de degradación se puede observar alrededor de 200 °C en el caso del poli(AAc).

La segunda etapa de degradación ocurre a partir de los 250 °C y es debida a una descarboxilación tras la apertura de los anillos formados anteriormente. En la Figura



21 se observa a partir de 270 °C, tanto en el poli(AAc) como en los injertos SR-g-AAc.

La tercera etapa consiste en reacciones de escisión de cadena y ocurre a partir de los 350 °C, formando oligómeros de ácido acrílico. Esta etapa se puede apreciar tanto en el poli(AAc) como en los injertos.

La descomposición de la silicona que ocurre a partir de los 450 °C sólo se observa en el injerto SR-g-AAc de 15%, en los demás injertos se observa simultáneo con la tercera etapa de descomposición del poli(AAc).

Tabla 10. Descomposición térmica del SR, SR-g-PAAc y poli(AAc)

Muestra	Temperatura 10% pérdida en peso (°C)	Residuo (%) [700 °C]
Poli(AAc)	263.49	9.96
SR-g-AAc 166%	315.51	21.81
SR-g-AAc 66%	327.09	25.15
SR-g-AAc 15%	401.22	30.59
SR	501.69	33.87

La estabilidad térmica de la silicona disminuye al ser injertada con ácido acrílico (Tabla 10) sin embargo, la temperatura de pérdida del 10% en peso ocurre por encima de los 315°C, incluso con injertos altos.

### **Espectroscopía infrarroja (FTIR)**

En la Fig. 22 se grafican los espectros de infrarrojo de la silicona testigo (SR), de los injertos SR-g-AAc de 15, 66 y 166% y del poli(ácido acrílico).

En el caso de la silicona, se observa una banda a 2920 y otra a 1235  $\text{cm}^{-1}$  las cuales corresponden a la vibración de los grupos metilos. Las bandas a 1053 y 842  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a las señales características del enlace siloxano Si-O.



En el espectro del poli(ácido acrílico) se observa una señal ancha alrededor de  $3000\text{ cm}^{-1}$ , la cual se debe a la presencia de  $-\text{OH}$  en la muestra. Las bandas  $2924$ ,  $2853$  y  $1449\text{ cm}^{-1}$  corresponden a vibraciones y movimiento de tijera del  $\text{CH}_2$ . La banda que está a  $1697\text{ cm}^{-1}$  es la banda característica del  $\text{C}=\text{O}$  del grupo carboxilo, y la banda a  $1412\text{ cm}^{-1}$  se debe a la deformación en el plano del enlace  $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ .

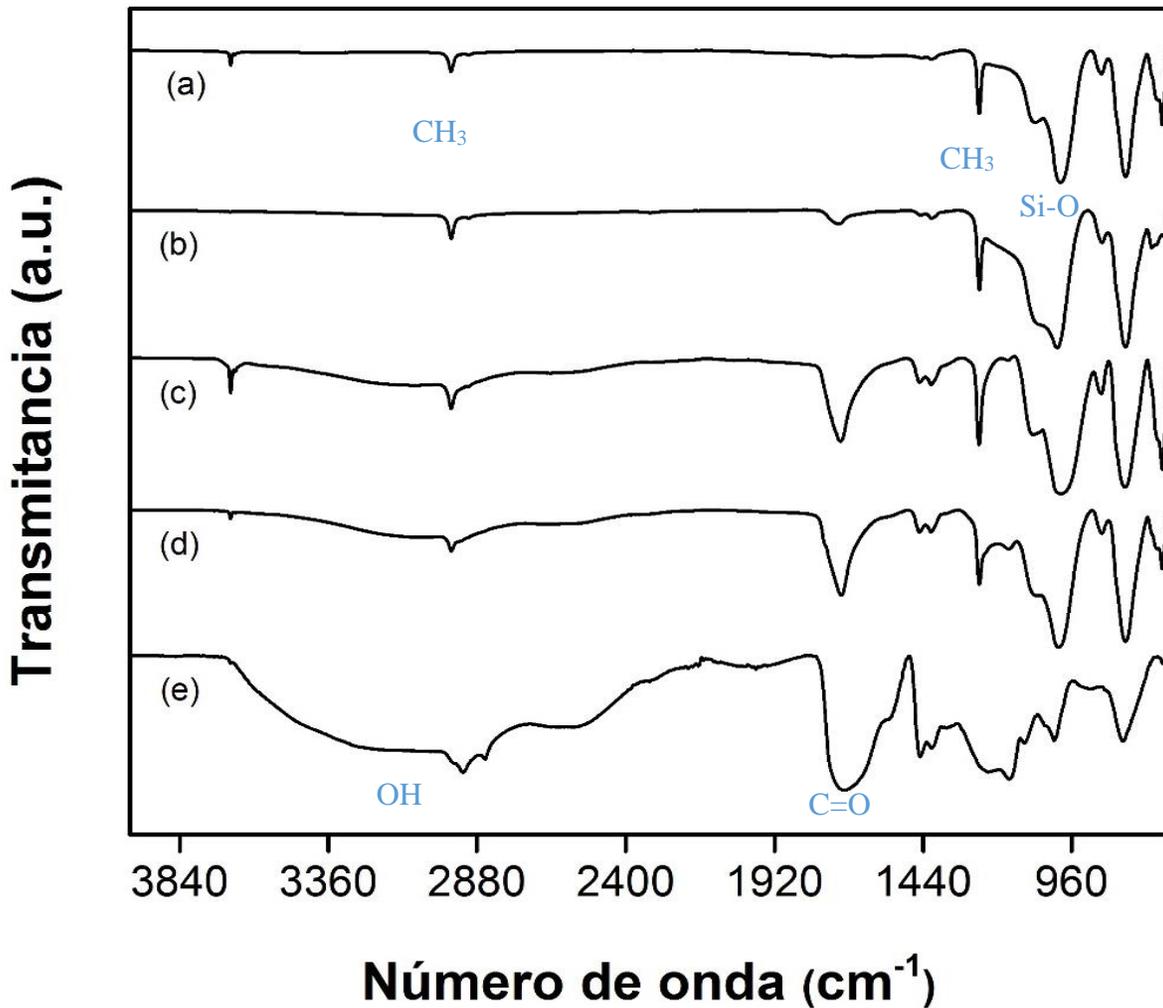


Fig. 22. FT-IR espectros de (a) SR (b) SR-g-PAAc 15% (c) SR-g-PAAc 66% (d) SR-g-PAAc 166% (e) poli(AAc)



Los espectros del SR-g-AAc presentan tanto la banda característica del carboxilo como la del enlace siloxano, lo que confirma el injerto del poli(ácido acrílico) en la silicona.

### Hinchamiento límite

La silicona es un polímero hidrófobo, sin embargo al ser injertada con un polímero hidrofílico, el sistema SR-g-AAc presenta afinidad al agua debido a los grupos carboxilos que contiene el poli(ácido acrílico).

En la Fig. 23 se muestra la cinética de hinchamiento para injertos SR-g-AAc de 13, 30 y 51%.

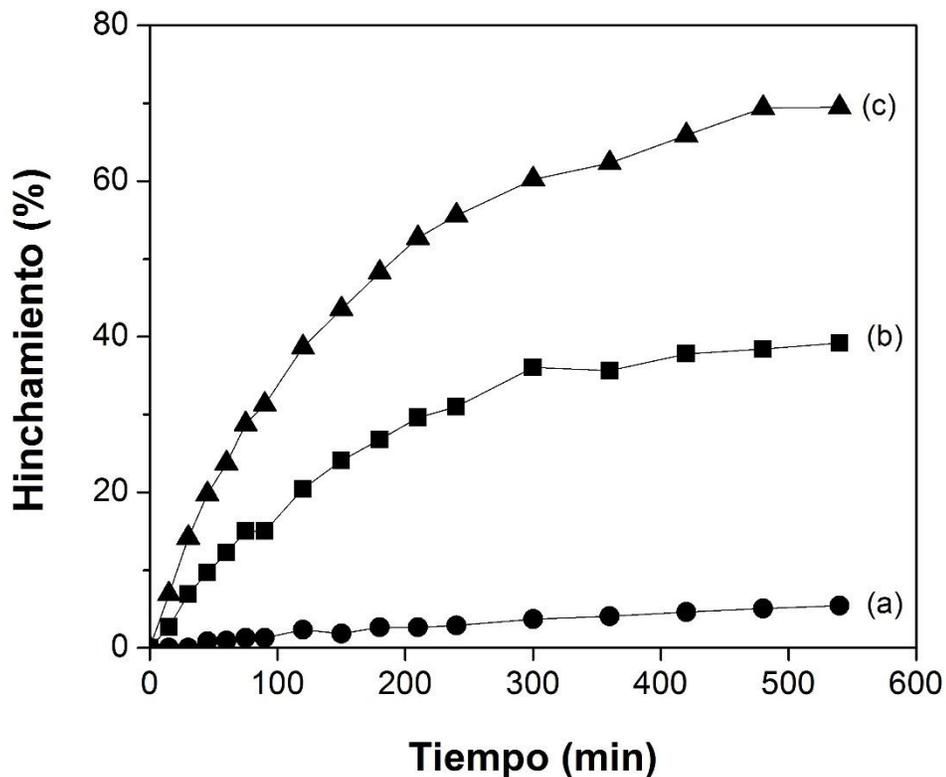


Fig. 23. Hinchamiento límite en agua de a) SR-g-AAc 13% b) SR-g-AAc 30% y c) SR-g-AAc 51%



Se observa que conforme el porcentaje de injerto aumenta, el sistema absorbe mayor cantidad de agua, no obstante, el tiempo en el que alcanza el máximo hinchamiento es el mismo en los tres sistemas, siendo de alrededor de 500 minutos (8 h).

Diversos factores estructurales, como la carga, pKa y concentración del grupo ionizable, grado de ionización, hidrofiliidad y entrecruzamiento del polímero afectarán el grado de hinchamiento que éste presente. (Mahdavinia, et al. 2004).

### **Determinación del pH crítico**

El poli(ácido acrílico) es un polielectrolito con un carácter ácido débil, lo cual le confiere características muy interesantes en diversos campos, entre ellos el biomédico, pues tiene la capacidad de liberar fármacos en pH neutro de forma controlada. (Ramirez, 2008; Khare, 1993).

La Fig. 24 muestra el grado de hinchamiento con respecto al pH del medio para injertos SR-g-AAc del 13, 30 y 51%. Se observa un punto de inflexión a pH 4.5, el cual representa el pH crítico. Por encima de éste, el sistema tiene un hinchamiento mucho mayor.

Conforme el porcentaje de injerto aumenta, el cambio en el hinchamiento del sistema alrededor del pH crítico se hace más abrupto, sin embargo, éste valor no es función del porcentaje de injerto, si no que va relacionado con el pKa del ácido acrílico, el cuál es de 4.35.

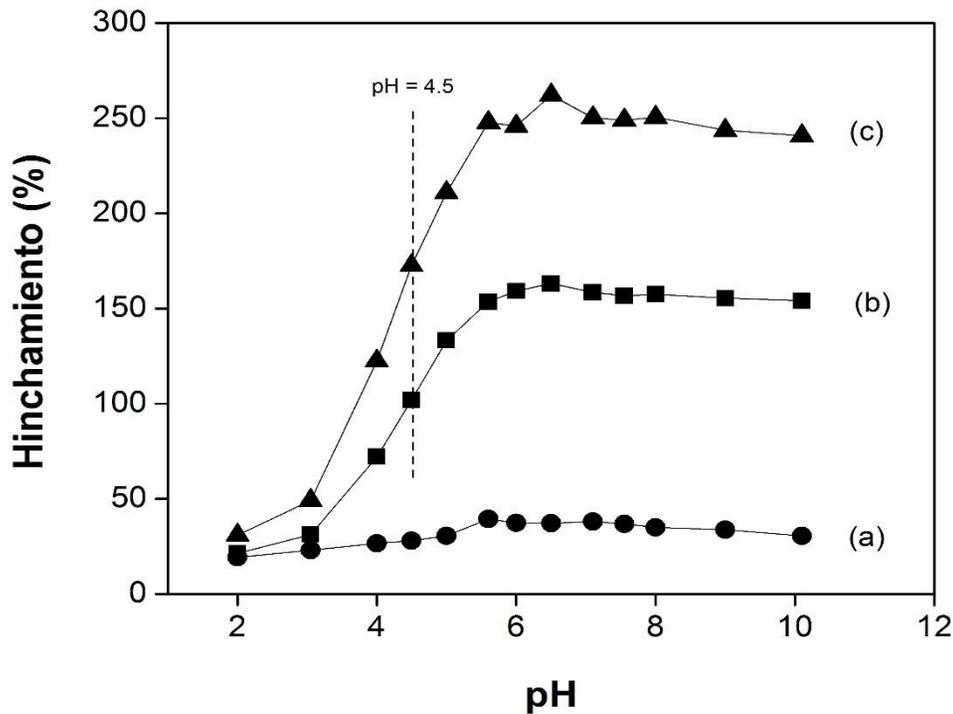


Fig. 24. Determinación del pH crítico de a) SR-g-AAc 13%, b) SR-g-AAc 30% y c) SR-g-AAc 51%

Esto significa que a pH 4.5, el copolímero de injerto tiene un grado de ionización de alrededor del 50%, en pH básico gran parte del copolímero estará ionizado, lo cual favorecerá la entrada de agua en el mismo, debido principalmente a dos procesos:

1) La repulsión entre las cargas generadas en las cadenas de poli(ácido acrílico) en medio básico permite que éstas se extiendan, generando una mayor interacción con el agua del medio. Esto explica por qué a medida que el porcentaje de injerto es mayor, el cambio en el grado de hinchamiento es más abrupto, pues al tener más grupos ionizados la repulsión electrostática entre las cadenas será mayor.

2) El polímero ionizado absorberá iones del medio, manteniendo la neutralidad de carga dentro de sí. De acuerdo a la fuerza iónica del medio, se creará una diferencia entre la presión osmótica dentro y fuera del gel, lo cual se contrarrestará con el flujo de agua hacia dentro del polímero, causando su hinchamiento.

## Microscopio electrónico de barrido

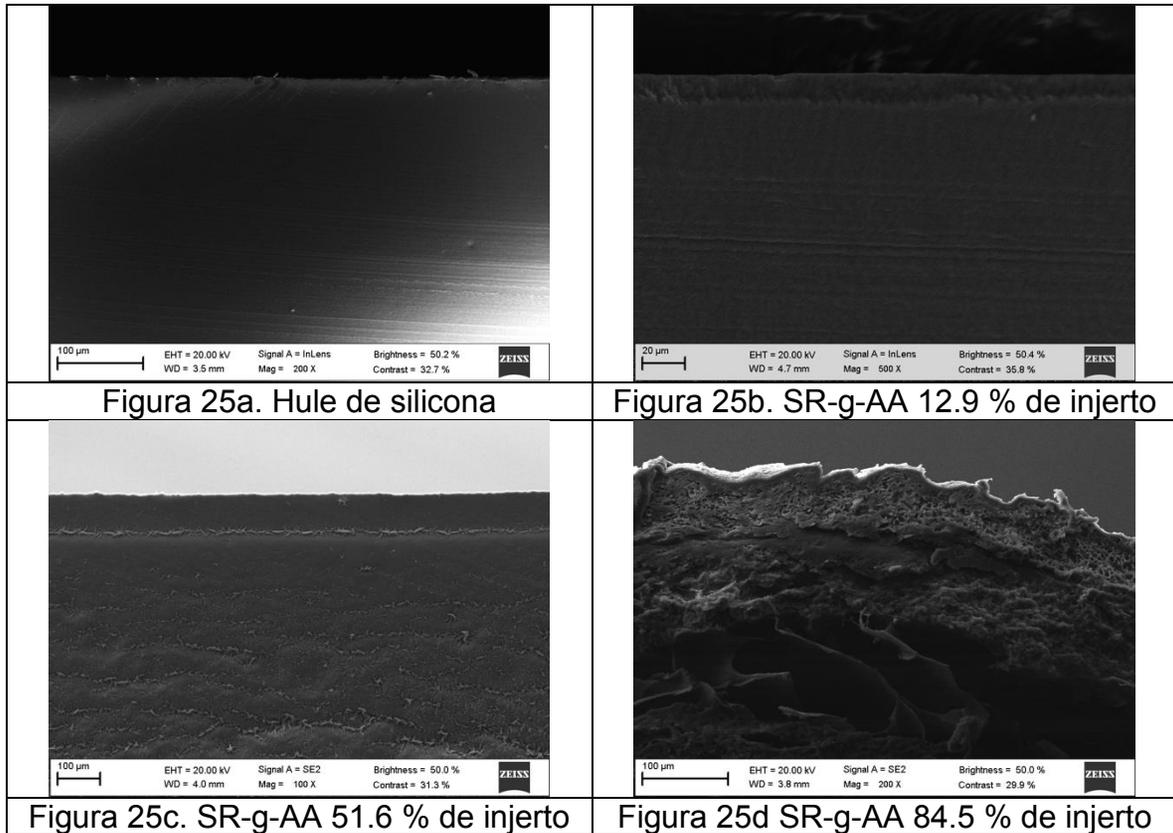


Fig. 25. Microscopio electrónico de barrido del hule de silicona inicial y modificado

Se realizó corte transversal de las películas de silicona testigo y modificadas con poli(ácido acrílico), la silicona sin modificar (Fig. 25a) mostró una matriz homogénea, las Figs. 25b (12.9% de injerto) y 25c (51.6 % de injerto) presentan cambios entre 10 y 20  $\mu$ m debido a la presencia del injerto de poli(ácido acrílico) en las láminas de silicona, la Fig. 25d presenta un cambio en la morfología debido al hinchamiento de la lámina atribuido a la presencia del poli(ácido acrílico) sobre la silicona; por esta técnica se confirmó que se llevó a cabo con éxito el injerto del poli(ácido acrílico) sobre las películas de silicona.



## ***Carga y cesión de fármacos antimicrobianos: Vancomicina.***

### **Carga de vancomicina.**

Como se puede observar en la Fig. 26, conforme aumenta el porcentaje de injerto del poli(ácido acrílico) la carga de vancomicina es mayor, mientras que el hule de silicona no absorbe cantidades cuantificables del fármaco.

Lo anterior se debe a que la vancomicina tiene un carácter básico débil lo cual le permite interaccionar con el copolímero de injerto, pues éste contiene cadenas con grupos ácidos. De acuerdo a un estudio de calorimetría de titulación isotérmica (ITC), la vancomicina interactúa preferentemente con el ácido acrílico cuando éste se encuentra ionizado (Ruiz et al., 2008), por lo que el pretratamiento de las películas con buffer de fosfatos pH 7.4 pudo favorecer la ionización de los grupos carboxilo y por tanto su afinidad con la vancomicina durante la carga en medio acuoso.

El copolímero con 15% de injerto absorbió  $0.14 \text{ mg cm}^{-2}$  ( $2.2 \text{ mg g}_{\text{AAC}}^{-1}$ ) de vancomicina, mientras que los copolímeros de 24 y 35 % absorbieron 1.2 y 1.4  $\text{mg cm}^{-2}$  respectivamente (más de  $20 \text{ mg g}_{\text{AAC}}^{-1}$ ), alcanzando el equilibrio tras 48 h de carga.

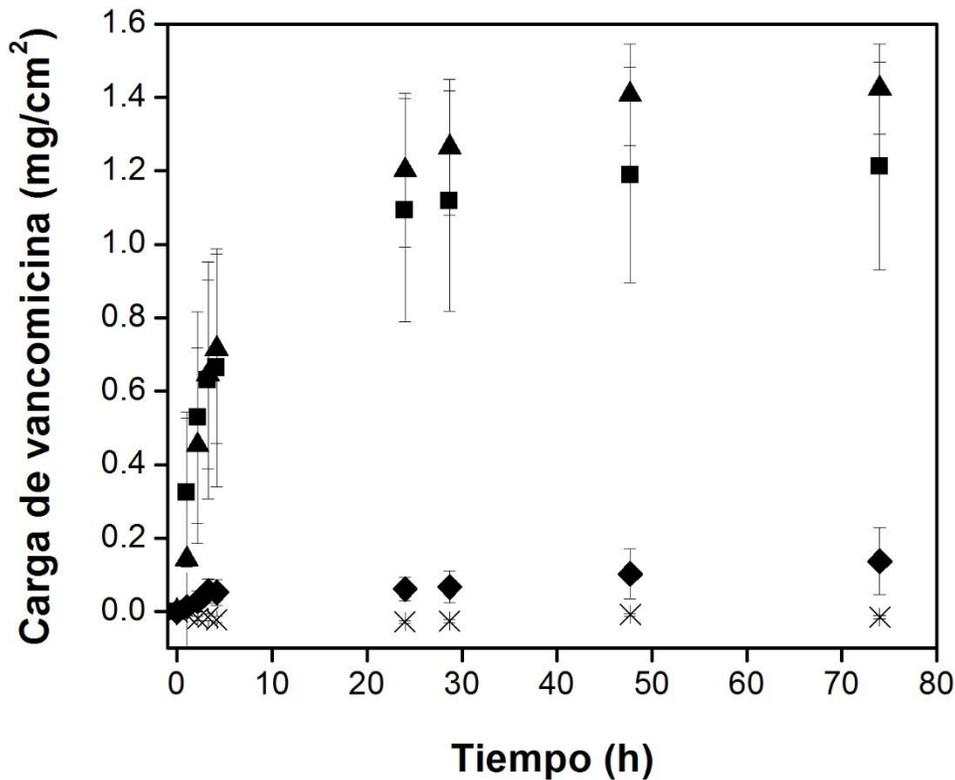


Figura 26. Carga de vancomicina. Silicona testigo (X), SR-g-AAc 15% (♦), SR-g-AAc 24% (■), SR-g-AAc 35% (▲).

### Liberación de vancomicina

El estudio de liberación de vancomicina fue llevado a cabo en buffer de fosfatos pH 7.4, el cual coincide con el pH de la sangre. A éste pH el ácido acrílico se encuentra predominantemente ionizado, lo cual retarda la liberación de la vancomicina, pues la afinidad por ésta es mayor y el hinchamiento de las cadenas hará que el fármaco tenga que recorrer cada vez una mayor distancia para salir al medio circundante, por lo que la velocidad de liberación decrece con el tiempo como puede apreciarse en la Fig. 27.

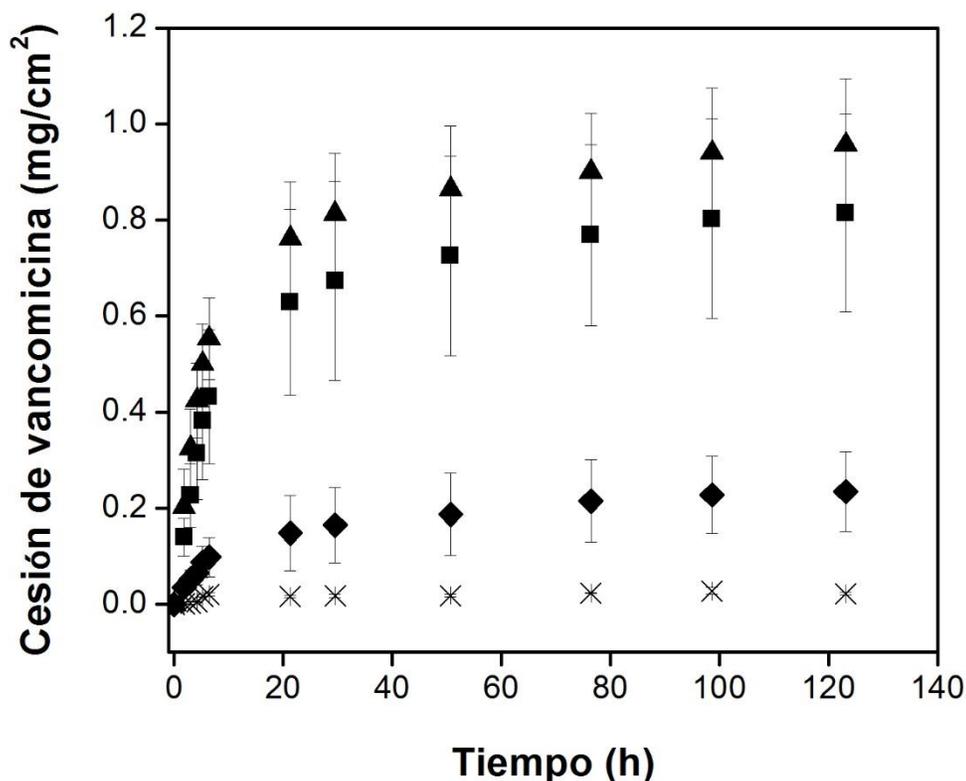


Fig. 27. Cesión de vancomicina. Silicona testigo (X), SR-g-AAc 15% (◆), SR-g-AAc 24% (■), SR-g-AAc 35% (▲).

Durante las primeras 10 h del ensayo, la cesión de fármaco ocurre con una velocidad mucho mayor (se observa una pendiente pronunciada), sin embargo aún después de las 20 h sigue habiendo una liberación del antimicrobiano, la cual se sostuvo hasta las 76 h. Este tipo de perfil de cesión que muestra una cesión rápida seguida de una liberación sostenida resulta adecuado para prevenir la colonización bacteria de los dispositivos médicos implantables o insertables, ya que es durante los primeros días cuando el riesgo de contaminación y crecimiento de microorganismos es mayor.

De acuerdo a la literatura (Rouse, 2007), la concentración mínima inhibitoria (MIC) de vancomicina contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) es de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , concentración que puede ser alcanzada incluso con 1 g del copolímero



con 15 % de injerto en 1 L de agua, mientras que los copolímeros con 24 y 35 % de injerto rebasan incluso la mínima concentración bactericida (MBC) la cual es de 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



## Conclusiones.

El copolímero de injerto SR-g-AAc pudo sintetizarse utilizando radiación gamma por el método de preirradiación oxidativa usando tolueno como disolvente. Esto se pudo corroborar por medio de análisis FT-IR, DSC y TGA.

Una dosis de irradiación de 40 kGy es suficiente para producir copolímeros de 10 hasta 200 % de injerto en un tiempo de reacción entre 0.5 y 3 h, con temperaturas entre 60 y 80°C por lo que resulta, en términos de tiempo y energía, una reacción poco costosa.

La prueba de hinchamiento límite en agua mostró que a las 9 h el sistema alcanzó un comportamiento casi constante, sin embargo hasta las 24 h ya no se observó ningún incremento en el peso, por lo que fue éste el tiempo que se usó para la prueba de pH crítico, el cual fue a pH 4.5.

El estudio de carga y cesión de vancomicina se hizo con injertos menores al 35 %, debido a que los injertos mayores eran demasiado rígidos. Incluso con injerto del 15% se logró cargar suficiente fármaco para alcanzar la concentración mínima inhibitoria para *S. aureus* resistente a meticilina, obteniendo una liberación controlada hasta por 76 h.

El copolímero obtenido tiene potenciales aplicaciones como sistema de liberación controlada de fármacos, sin embargo se requieren más estudios para asegurar su posible aptitud de uso.



## Referencias

- Bajpai, A., Shukla, S., Bhanu, S., Kankane., 2008. Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science* 33, 1088–1118
- BASF., n.d. Ácido acrílico. Resumen de seguridad y manejo. Obtenida el 13 de enero del 2015 en [http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh\\_004c/0901b8038004ca4e.pdf?filepath=acrylates/pdfs/noreg/745-00121.pdf&fromPage=GetDoc](http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_004c/0901b8038004ca4e.pdf?filepath=acrylates/pdfs/noreg/745-00121.pdf&fromPage=GetDoc)
- Besednjak, A., 2005. *Materiales compuestos. Procesos de fabricación de embarcaciones*, (1ra ed.). Barcelona: UPC.
- Changqiao Y., Xu, L., Zeng, H., Tang, Z., Zhong, L., Wu, G., 2014. Water dispersible polytetrafluoroethylene microparticles prepared by grafting of poly(acrylic acid). *Radiation Physics and Chemistry*. 103, 103-107.
- Chapiro, A., 1962. *Radiation Chemistry of Polymeric Systems*, (1ra ed.). London: Interscience Div. John Wiley & Sons.
- Drobny, J., 2012. *Ionizing Radiation and Polymers: Principles, Technology, and Applications*, Elsevier.
- Dubinsky, S., Grader, G., Shter, G., Silverstein, M., 2004. Thermal degradation of poly(acrylic acid) containing copper nitrate. *Polymer Degradation and Stability* 86, 171-178.
- Ende, M., Peppas, N., 1997. Transport of ionizable drugs and proteins in crosslinked poly(acrylic acid) and poly(acrylic acid-co-2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. II. Diffusion and release studies. *Journal of Controlled Release* 48, 47–56
- Fernández, Paredes, M., García, P., Paredes, F., Fernández, M., 1994. *Microbiología clínica práctica*. (2° ed.) Cádiz: Servicio Publicaciones UCA
- García, M., González, C., Magariños, B., Concheiro, A., Alvarez, C., Bucio, E., 2014. Acrylic polymer-grafted polypropylene sutures for covalente immobilization or



reversible adsorption of vancomicina. *International Journal of Pharmaceutics* 461, 286–295

Goodman A., Goodman L., 2003. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (10° ed.). McGraw Hill Interamericana.

Henstock, J., Canham, L., Anderson, S., 2015. Silicon: The evolution of its use in biomaterials *Acta Biomaterialia* 11, 17–26

Hoffman, A., 2013. Stimuli-responsive polymers: Biomedical applications and challenges for clinical translation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65, 10–16.

Honey, P., Rijo, J., Anju, A., Anoop, K., 2014. Smart polymers for the controlled delivery of drugs- a concise overview. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 4(2), 120–127.

Huang, W., Yibei, F., Chaoyang, W., Yunshu, X., Zhishang B., 2002. A study on radiation resistance of siloxane foam containing phenyl. *Radiation Physics and Chemistry* 64, 229–233.

Khare, A., Peppas, N., 1993. Release behaviour of bioactive agents from pH-sensitive hydrogels. *Journal of Biomaterial Science. Polymer Edition* 4, 275–289.

Li, J., Zhai, M., Yi, M., Gao, H., Ha, H., 1999. Radiation grafting of thermo-sensitive poly(NIPAAm) onto silicone rubber. *Radiation Physics and Chemistry* 55, 173-178.

Mahdavinia, G., Pourjavadi, A., Hosseinzadeh, H., Zohuriaan, M., 2004. Modified chitosan 4. Superabsorbent hydrogels from poly(acrylic acid-co-acrylamide) grafted chitosan with salt- and pH-responsiveness properties. *European Polymer Journal* 40, 1399–1407.

Muñoz, F., Ruiz, J., Alvarez, C., Concheiro, A., Bucio, E., 2012. Temperature- and pH-sensitive interpenetrating polymer networks grafted on PP: Cross-linking irradiation dose as a critical variable for the performance as vancomycin-eluting Systems. *Radiation Physics and Chemistry* 81, 531–540.

Nailor, M., Sobel, J., 2011. Antibiotics for Gram-Positive Bacterial Infection: Vancomycin, Teicoplanin, Quinupristin/ Dalfopristin, Oxazolidinones, Daptomycin, Telavancin, and Ceftaroline. *Medical Clinics of North America* 95, 723–742.



Navarrete, M., Cabrera, L., 1993. Introducción al estudio de los radioisótopos. (2da ed.). México: Porcia Editores.

Ngwuluka, N., Ocheke, N., Aruoma, O., 2014. Naturapolyceutics: The Science of Utilizing Natural Polymers for Drug Delivery. *Polymers* 6, 1312-1332.

Odian, G., 2004. Principles of Polymerization, (4ta ed.). New Jersey: John Wiley & Sons.

Paredes, M., Galego, N., Gastón, C., Rapado, M., Altanés, S., 2011. Synthesis and characterization of a new semi-interpenetrating polymer network hydrogel obtained by gamma radiations. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 106, 725–730.

Pascual, A., Cercenado, Salavert, E., 2011. Update on pathogenesis and diagnosis of intravascular catheter-related infections. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 29, 16-21.

Peppas, N., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H., 2000. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50, 27-46.

Ramirez, Y., Bucio, E., Burillo, G., 2007. Radiation-induced grafting of N-isopropylacrylamide and acrylic acid onto polypropylene films by two step method. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. B* 265, 183–186.

Ramírez, Y., Bucio, E., Burillo, G., 2008. Thermo and pH Sensitive Copolymer Based on Acrylic Acid and N-Isopropylacrylamide Grafted onto Polypropylene. *Polymer Bulletin* 60, 79–87.

Razem, D., Katusin-Razem, B., 2008. The effects of irradiation on controlled drug delivery/controlled drug release systems. *Radiation Physics and Chemistry* 77, 288–344.

Remington, 2000. Remington: The science and practice of pharmacy 20° ed. Philadelphia: Williams & Wilkins.



Reyes-Ortega, F., 2014. pH-responsive polymers: properties, synthesis and applications en Aguilar, M., Román, J., *Smart Polymers and their Applications* (45-92). Cambridge: Woodhead Publishing

Rouse, M., Steckelberg, J., Pate, R., 2007. In vitro activity of ceftobiprole, daptomycin, linezolid, and vancomycin against methicillin-resistant staphylococci associated with endocarditis and bone and joint infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 58, 363–365.

Ruiz, J., Alvarez-Lorenzo, C., Taboada, P., Burillo, G., Bucio, E., Prijck, K., Nelis, H., Coenye, T., Concheiro, A., 2008. Polypropylene grafted with smart polymers (PNIPAAm/PAAc) for loading and controlled release of vancomycin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 70, 467–477.

Ruiz, J., Burillo, G., Bucio, E., 2007. Interpenetrating Thermo and pH Stimuli-Responsive Polymer Networks of PAAc/PNIPAAm Grafted onto PP. *Macromolecular Materials and Engineering* 292, 1176–1188.

Sáez, V., Estíbaliz, H., Y Sanz, L., 2004. Mecanismos de liberación de fármacos desde materiales polímeros. *Iberoamericana de Polímeros* 5 (1).

Segura, T., Burillo, G., 2013. Radiation modification of silicone rubber with glycidylmethacrylate. *Radiation Physics and Chemistry* 91, 101–107.

Seymour, R., Carraher, C., 1995. *Introducción a la química de los polímeros*, (1ra ed.). Reverté

Tian, H., Tang, Z., Zhuang, X., 2012. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Progress in Polymer Science* 37, 237– 2804.

Woods, R., Pikaev, A., 1994. *Applied Radiation Chemistry: Radiation Processing*, New York: John Wiley & Sons.

Yilgör, E., Yilgör I., 2014. Silicone containing copolymers: Synthesis, properties and applications. *Progress in Polymer Science* 39(6), 1165–1195.

Young, R., Lovell, P. 2011. *Introduction to Polymers*, (3ra ed.). Florida: CRC Press.



Zhang L., Gowardman, J., Rickard, C., 2011. Impact of microbial attachment on intravascular catheter-related infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* 38, 9–15.