



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

SÍNTESIS DE BIOMATERIALES DE INJERTO DE GLICIDIL METACRILATO Y ETILENGLICOL  
DIMETACRILATO PARA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. GUADALUPE GABRIEL FLORES ROJAS

TUTOR: DR. EMILIO BUCIO CARRILLO  
INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2018



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.

## Publicaciones

- [1] Radiation-grafting of ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and glycidyl methacrylate (GMA) onto silicone rubber. **G. G. Flores-Rojas** and E. Bucio. Radiat. Phys. Chem. 127, 21-26 (2016)
- [2] Improved covalent immobilization of lysozyme on silicone rubber-films grafted with poly(ethylene glycol dimethacrylate-co-glycidylmethacrylate). **Guadalupe G. Flores-Rojas**, Victor H. Pino-Ramos, Felipe López-Saucedo, Angel Concheiro, Carmen Alvarez-Lorenzo, and Emilio Bucio. Eur. Polym. J. 95, 27-40 (2017)
- [3] Covalent immobilization of lysozyme in silicone rubber modified by easy chemical grafting. **G. G. Flores-Rojas**, F. López-Saucedo, T. Isoshima, E. Bucio. MRS Commun. 7, 904-912 (2017)
- [4] Polypropylene-films modified by grafting-from of EGDMA and GMA using gamma-rays and antimicrobial biofunctionalization by Schiff bases. **G.G. Flores-Rojas**, F. Lopez-Saucedo, J.E. López-Barriguet T. Isoshima, M. Luna-Straffon, E. Bucio. MRS Commun. Aceptado.

## Estancia

Estancia doctoral en Nano Medical Engineering Laboratory, RIKEN, Japón.

### ***Agradecimientos***

Al proyecto PAPIIT IN201617 y CONACYT por la beca otorgada CVU: 407270 y número de becario: 26979, así como al M. en C. Benjamín Leal (ICN) y al Profesor Takashi Isoshima (Riken).



***Miembros del jurado de tesis***

Dra. Alicia Negrón Mendoza

Dra. Sofia Guillermina Burillo Amezcua

Dr. Juan Manual Navarrete Tejero

Dra. Susana Hernández López

Dra. Flora Adriana Ganem Rondero

## ***Dedicatorias***

Con especial dedicación a mi querida madre G. Rojas García y hermanos G. Flores Monterrosas, D. Flores Rojas y A. Flores Rojas quienes fueron un importante pilar a lo largo de este trayecto.

Con gran amor a mi novia K. P. Martínez Gallardo que siempre se mantuvo a mi lado sin importar la distancia, el idioma y los obstáculos, así como a toda su familia que también es la mía.

Con gran aprecio a mis amigos y en especial a F. López Saucedo.

A todos ustedes por formar parte de este trayecto en mi vida, gracias, mi triunfo también es suyo...

***“Todo gran proyecto, inicia de manera tan simple como un sueño, y solo el esfuerzo y la perseverancia pueden realizarlo”***

## **Abstract**

The materials with antimicrobial activity have several applications mainly in the medical and food areas where the inhibitions of growth as well as the adhesion of microorganisms are essential. In the case of the medical area, the inhibition of microorganisms is the utmost importance since they are capable of generating medical complications that can even cause death. In the case of the food area is required the design of containers capable of inhibiting the growth of microorganisms that may affect the quality or shelf life of food.

Designing materials with antimicrobial activity is a challenge since many of the materials used as matrices do not have the appropriate characteristics, thus needing modifications either superficially or in mass to provide them. The graft polymerization offers a great advantage since it is possible to limit it to a part of the matrix in order to obtain the material with the desired characteristics. Unfortunately, this is only limited to matrices that have a certain chemical reactivity which allows to carry out said graft polymerization.

Gamma radiation offers the possibility of modifying matrices with a low chemical reactivity, therefore it can be applied as an initiator or as a generator of reactive species in graft polymerizations with matrices of low reactivity and even controlling this by irradiation doses and concentration of monomers, thus allowing adequate control of the degree of grafting.

The graft polymer can be widely varied since gamma radiation allows the use of a wide variety of monomers where these can provide specific characteristics such as response to pH, temperature, magnetic field or simply modify their hydrophobicity or provide reactive groups which can be used in later reactions.

The specific case of this work was to make the modification of polypropylene films and silicone rubber using the direct and oxidative *pre*-irradiation method and as monomers ethylene glycol dimethacrylate and glycidyl methacrylate, which provided hydrophilicity and chemical groups which allowed the subsequent

covalent immobilization of lysozyme by the formation of Schiff's bases. The degree of grafting of the films showed dependence on the dose of irradiation, monomer concentration, as well as on the temperature and time of reaction.

The characterization of the materials was done by infrared spectroscopy, thermal analysis, as well as contact angle. Finally, the enzymatic activity of the immobilized lysozyme was studied at different pH, temperature and activity cycles. The enzymatic activity of the immobilized lysozyme showed some improvements such as a greater resistance to pH showing activity up to a pH = 11, as well as an improvement at high temperatures with an enzymatic activity up to 60 ° C.

## ***Introducción***

Los materiales con actividad antimicrobiana tienen una amplia variedad de aplicaciones principalmente en el área médica y alimenticia donde la inhibición del crecimiento, así como de la adhesión de microorganismos es indispensable. En el caso del área médica la inhibición de microorganismos es de suma importancia ya que estos pueden provocar complicaciones médicas que incluso pueden causar la muerte. En el caso del área alimenticia estos materiales son utilizados en el diseño de contenedores capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos que pueden afectar la calidad o la vida útil de los alimentos.

Diseñar materiales con actividad antimicrobiana es un reto ya que muchos de los materiales usados como matrices no cuentan con las características adecuadas, necesitando así modificaciones ya sea de manera superficial o en masa para proveerlos. La polimerización de injerto ofrece una gran ventaja ya que esta es posible de llevarla a cabo de manera superficial o interna la matriz a modo de obtener el material con las características deseadas. Lamentablemente esta solo se limita a matrices que cuentan con cierta reactividad química la cual permite realizar dicha polimerización de injerto.

La radiación gamma ofrece la posibilidad de modificar matrices con una baja reactividad química por lo tanto esta puede ser aplicada como iniciador o como generador de especies reactivas en polimerizaciones de injerto con matrices de baja reactividad e incluso controlando este mediante dosis absorbida y concentración de monómeros, permitiendo así el adecuado control del grado de injerto.

El polímero de injerto puede ser ampliamente variado ya que la radiación gamma permite el uso de una amplia variedad de monómeros donde estos pueden proveer características específicas tales como respuesta a pH, temperatura, campo magnético o simplemente modificar su hidrofobicidad o

proveer grupos reactivos los cuales pueden ser utilizados en reacciones posteriores.

El caso específico de este trabajo se realizó la modificación de películas de polipropileno y hule de silicona, usando el método directo y pre-irradiación oxidativa y como monómeros dimetacrilato de etilenglicol y metacrilato de glicidilo los cuales proporcionaron hidrofiliidad y grupos químicos los cuales permitieron la posterior inmovilización covalente de lisozima mediante la formación de bases de Schiff. El grado de injerto de las películas mostro a dependencia con la dosis absorbida, concentración, así como de la temperatura y tiempo de reacción.

La caracterización de los materiales fue realizada mediante espectroscopia de infrarrojo, análisis térmico, así como ángulo de contacto. Finalmente, la actividad enzimática de la lisozima inmovilizada fue estudiada a diferentes valores de pH, temperatura y ciclos de actividad. La actividad enzimática de la lisozima inmovilizada mostro algunas mejorías tales como una mayor resistencia a pH mostrando actividad hasta un pH=11, así como una mejoría a altas temperaturas con una actividad enzimática hasta 60 °C.

## Contenido

1. Generalidades .....	13
1.1. Polímeros .....	13
1.2. Clasificación de polímeros de acuerdo a su estructura química.....	13
1.3. Síntesis de polímeros .....	16
1.3.1. Polimerización en cadena o adición .....	16
1.3.2. Polimerización por condensación o en pasos .....	17
1.3.3. Mecanismo de reacción.....	17
1.4. Otros tipos de síntesis de polímeros .....	19
1.4.1. Polimerización iónica.....	19
1.4.2. Polimerización radicalaria viviente.....	20
1.4.3. Polimerización de reacción reversible de adición-fragmentación con transferencia de cadena (RAFT) .....	21
1.4.4. Polimerización radicalaria por transferencia de átomo (ATRP) .....	23
1.5. Polimerización de injerto .....	24
1.5.1. Método de “ <i>graftin-onto</i> ” .....	24
1.5.2. Método de “ <i>grafting-from</i> ” .....	25
1.5.3. Método de “ <i>graftig-through</i> ” .....	26
1.6. Aplicaciones médicas de los polímeros.....	27
1.7. Tratamiento de infección asociada dispositivos médicos .....	30
1.7.1. Infecciones causadas por catéteres intravasculares .....	30
1.7.2. Prótesis articulares .....	31
1.7.3. Estrategias de inhibición de microorganismos en dispositivos médicos.....	31
1.8. Inmovilización de enzimas.....	32

1.8.1. Retención física.....	32
1.8.2. Unión covalente.....	34
1.8.3. Enzimas con aplicaciones anti-microbianas .....	37
1.9. Lisozima .....	39
1.10. Radiación gamma y sus aplicaciones.....	42
1.11. Silicona.....	47
1.12. Polipropileno.....	48
1.13. Reacciones de injerto generadas por rayos gamma y sus aplicaciones .	50
2. Hipótesis.....	55
2.1. Objetivos generales.....	55
2.2. Objetivos particulares .....	56
3. Procedimiento experimental .....	56
3.1. Materiales.....	56
3.2. Equipos .....	57
3.3. Síntesis de las películas SR- <i>g</i> -(EGDMA/GMA) .....	58
3.3.1. Estudio de hinchamiento .....	58
3.4. Síntesis de las películas PP- <i>g</i> -(EGDMA/GMA) .....	59
3.5. Inmovilización de lisozima .....	60
3.5.1. Activación de películas SR- <i>g</i> -(EGDMA/GMA) .....	60
3.5.2. Inmovilización de lisozima en películas SR- <i>g</i> -Ald.....	61
3.5.3. Activación de películas PP- <i>g</i> -(EGDMA/GMA) .....	62
3.5.4. Inmovilización de lisozima en películas de PP- <i>g</i> -Ald.....	63
3.6. Ensayo de actividad enzimática en películas de SR- <i>g</i> -Lys y PP- <i>g</i> -Lys .....	63
4. Resultados y discusión.....	64
4.1. Injerto de EGDMA/GMA en las películas de SR.....	65



4.2. Injerto de EGDMA/GMA en las películas de PP .....	68
4.3. Caracterización de las películas de SR y PP injertadas con EGDMA/GMA ...	72
4.4. Inmovilización de lisozima .....	77
4.5. Caracterización de las películas de SR-g-Lys y PP-g-Lys.....	80
4.6. Actividad enzimática de las series de películas de SR-g-Lys y PP-g-Lys .....	87
4.6.1. Estudio de la actividad de las películas de SR-g-Lys y PP-g-Lys a diferentes valores de pH .....	91
4.6.2. Estudio de la actividad de las películas de SR-g-Lys y PP-g-Lys a diferentes temperaturas .....	92
4.6.3. Ciclos de actividad enzimática de las películas de SR-g-Lys y PP-g-Lys...	94
5. Conclusiones.....	96
Anexos .....	98

## **1. Generalidades**

### **1.1. Polímeros**

Los polímeros son denominados macromoléculas las cuales tienen a lo largo de su estructura molecular unidades repetitivas llamadas monómeros. Estos pueden ser de origen natural o sintético, dentro de los polímeros naturales podemos hallar una amplia variedad tales como: celulosa, quitosano, entre otros, los cuales son muy similares a los obtenidos de manera sintética por reacciones de condensación debido a que su estructura principal es generada a través de la formación de grupos funcionales tales como: éteres, ésteres, amidas, entre otros, sin embargo, existen algunas excepciones tales como el hule natural el cual solo contiene enlaces carbono-carbono a lo largo de su estructura principal, siendo todos estos polímeros son creados de manera biológica. Caso contrario ocurre con los polímeros sintéticos los cuales son creados por el hombre, ya sea a nivel laboratorio o industrial, estos polímeros pueden provenir no solo de reacciones de condensación a través de grupos funcionales sino también de reacciones en cadena dirigidas por radicales libres usando monómeros vinílicos, siendo esta última la más común proporcionando una amplia variedad de polímeros a través de modificaciones químicas de sus monómeros.

La clasificación de los polímeros sintéticos se puede hacer de varias formas, no obstante, una manera general de hacerlo es por el tipo de reacción mediante la cual se obtienen clasificándoles en polímeros de condensación (por reacción en pasos) y polímeros de adición (por reacción en cadena o radicalaria), no obstante, existen otras clasificaciones por ejemplo debido a su estructura química.

### **1.2. Clasificación de polímeros de acuerdo a su estructura química**

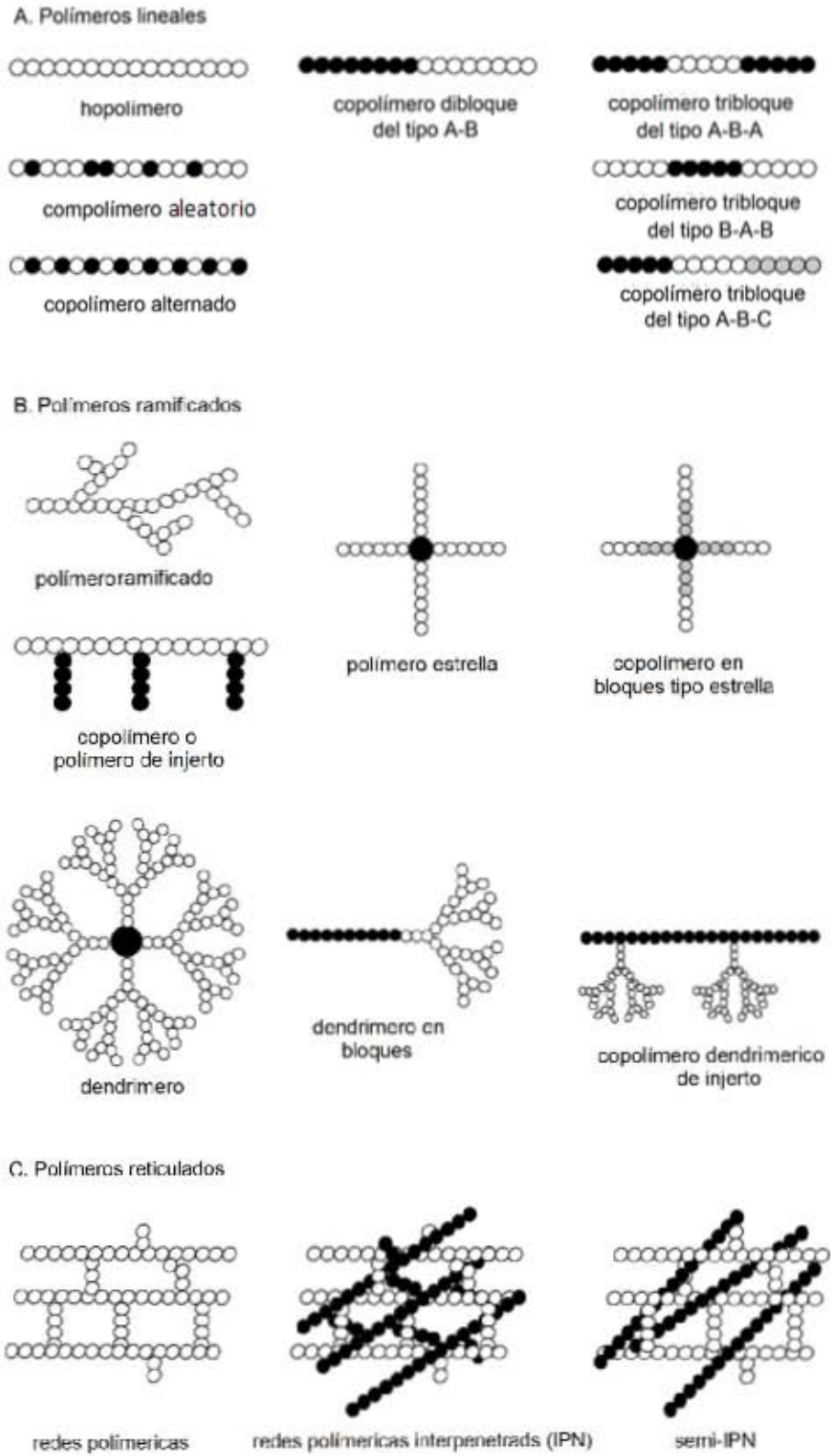
La clasificación de los polímeros de acuerdo a su estructura se puede realizar de manera general como lineal, ramificada o reticulada, siendo esta independiente del

tipo de composición química. Los polímeros lineales son estructuras que a lo largo de toda su cadena principal no presentan ninguna otra cadena polimérica a manera de ramificación o sustituyente, caso contrario sucede con los polímeros ramificados los cuales pueden presentar pequeñas y largas cadenas, que estas a su vez pueden presentar también pequeñas cadenas (ramificaciones Figura 1.1 B) ya sea o no de manera extensiva. Los polímeros reticulados a diferencia de las anteriores clasificaciones presentan estructuras en las cuales las cadenas poliméricas son entrelazadas entre ellas, de tal manera que se generan redes o estructuras 3D,<sup>1</sup> siendo estas completamente insolubles y presentando además la propiedad termofijos.<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> C. Kiparissides, Polymerization reactor modeling: a review of recent developments and future directions, Chemical Engineering Science, 1996, 51, 1637

<sup>2</sup> L. Yan Qiu, Y. Han Bae, Pharmaceutical Research, 2006, 23, 1



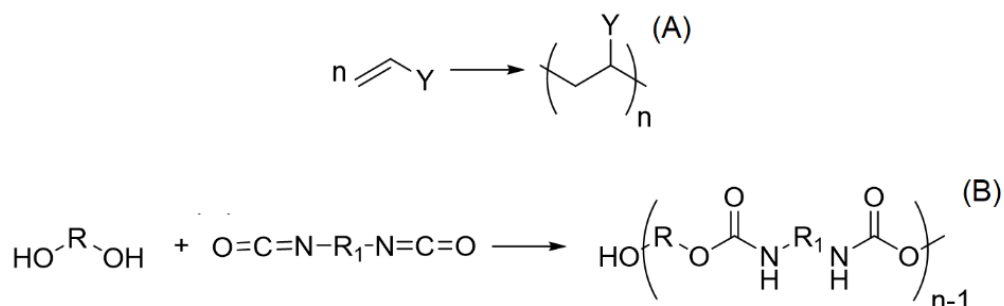
**Fig. 1.1.** Clasificación de los polímeros de acuerdo a su estructura química.

### 1.3. Síntesis de polímeros

#### 1.3.1. Polimerización en cadena o adición

La polimerización en cadena o adición es llevada a cabo mediante monómeros vinílicos y generadas a través de radicales libres usando un iniciador ya sea químico o mediante una fuente de energía capaz de generar radicales libres. Algunos de los iniciadores más comunes para realizar la polimerización por cadena o adición son por iniciadores medio químicos tales como AIBN, peróxido de cumilo, peróxido de benzoilo o físicos como UV, plasma e incluso rayos gamma siendo estos últimos los menos comunes.

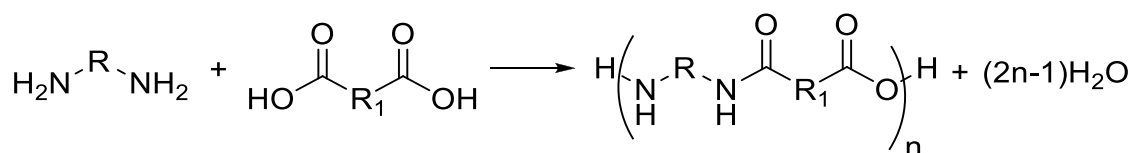
Los polímeros obtenidos mediante este tipo de reacción, casi siempre presentan únicamente enlaces carbono-carbono a lo largo de su estructura principal, sin embargo, hay algunas excepciones tal es el caso de los poliuretanos ya que estos también pueden ser obtenidos a través de una reacción de adición entre un diol y un diisocianato sin la eliminación de alguna molécula, aunque este tipo de polímeros también pueden ser obtenido mediante una reacción de condensación esta específica reacción lo ubica dentro de esta clasificación (Fig. 1.2).



**Fig. 1.2.** Polimerización en cadena o por adición (A). Además, es ejemplificado el caso único de la obtención de polímeros de poliuretano (B) el cual también se encuentra dentro de esta clasificación.

### 1.3.2. Polimerización por condensación o en pasos

La polimerización por condensación o en pasos, es un tipo de polimerización que consiste en aprovechar los grupos funcionales de un monómero bifuncional el cual puede presentar reacciones de condensación (Fig. 1.3).<sup>3</sup> Algunos de los grupos más comunes presentes en los monómeros usados para realizar este tipo de polímeros son -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, -COCl, -CON entre otros.<sup>4, 5, 6</sup>



**Fig. 1.3.** Polimerización por pasos o por condensación, en este caso específico se ilustra la reacción de formación de una poliamida.

### 1.3.3. Mecanismo de reacción

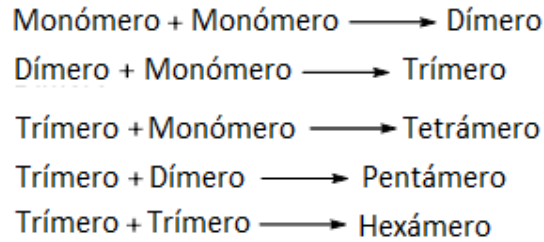
El mecanismo de reacción para los polímeros difiere del tipo de polimerización por el cual este es sintetizado, ya que para los polímeros de condensación no son necesarias algunas etapas en el mecanismo de polimerización, por ejemplo: la generación de especies de propagación, así como los tipos de terminación de polimerización no son requeridos para este tipo ya que el polímero tiene una terminación con grupos funcionales los cuales son muy estables (Fig. 1.4).

<sup>3</sup> K. Pang, R. Kotek, A. Tonelli, Review of conventional and novel polymerization processes for polyesters, Prog. Polym. Sci., 2006, 31, 1009

<sup>4</sup> P.J. Flory, Fundamental principles of condensation polymerization, Chem. Rev., 1946, 39, 137

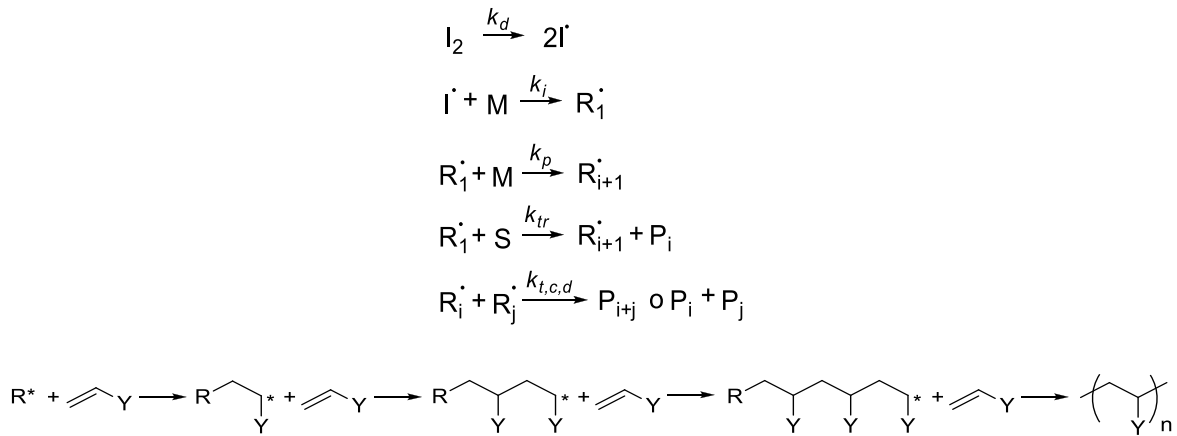
<sup>5</sup> T. Yokozawa, A. Yokoyama, Chain-Growth Condensation Polymerization for the Synthesis of Well-Defined Condensation Polymers and  $\pi$ -Conjugated Polymers, Chem. Rev., 2009, 109, 5595

<sup>6</sup> S. Mallakpour, A. Zadehnazari, Advances in synthetic optically active condensation polymers – A review, eXPRESS Polymer Letters, 2011, 5, 142



**Fig.1.4.** Pasos de crecimiento de cadena dentro de una polimerización en pasos.

El mecanismo de polimerización por adición, como ya se había mencionado necesita otros pasos dentro de su mecanismo de reacción tales como la formación del iniciador, propagación y finalmente la terminación del polímero formado (Fig. 1.5). Las formas de terminación de estos polímeros pueden ser por desproporción o por combinación (cabeza-cabeza, cola-cola), generando especies químicas altamente estables comparadas con los radicales formados en el proceso de polimerización.



**Fig. 1.5.** Pasos del mecanismo de polimerización vía radicalaria.

## **1.4. Otros tipos de síntesis de polímeros**

Algunos de los métodos de síntesis de polímeros más modernos son por ejemplo mediante reacciones de polimerización iónica (ya sea catiónica y aniónica), por transferencia de átomo o incluso por reacción radicalaria viviente ofreciendo este tipo de reacciones de polimerización considerables ventajas ya que permiten un mejor control de la polidispersidad así como en la síntesis de polímeros en bloque entre otras.<sup>7</sup>

### **1.4.1. Polimerización iónica**

Polimerización iónica es un método que se basa principalmente en la generación de iones a través de iniciadores como ácidos de Lewis (polimerización catiónica) o mediante formación de aniones (polimerización aniónica) usando como iniciadores álcalis metálicos, alcóxidos, cianuros, hidroxilos entre otros (Fig. 1.6). Para poder llevar a cabo estas reacciones es necesario que los monómeros vinílicos tengan grupos funcionales o que presenten sistemas de resonancia que sean capaces de facilitar la formación de iones y propagarlos a otros monómeros. Algunos de estos monómeros por ejemplo son estireno, acrilonitrilo y acrilatos, los cuales han sido ampliamente usados en este tipo de polimerizaciones.<sup>8, 9</sup>

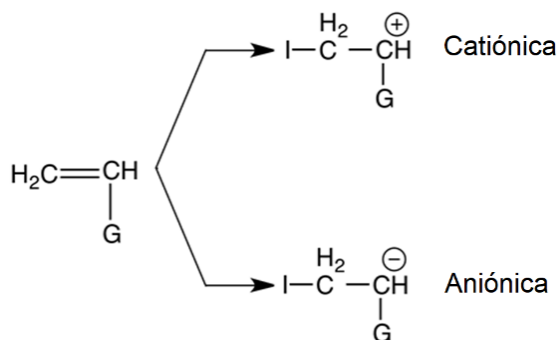
---

<sup>7</sup> C. Tonhauser, A. Natalello, H. Lôwe, H. Frey, *Microflow Technology in Polymer Synthesis*, *Macromolecules*, 2012, 45, 9551

<sup>8</sup> J. Zhao, N. Hadjichristidis, Y. Gnanou, *Phosphazene-promoted anionic polymerization*, *Polymer*, 2014, 59, 1

<sup>9</sup> K. Myung-Jin, Y. Yong-Guen, K. Nam-Goo, K. Beom-Goo, L. Jae-Suk, *Precise Synthesis of Functional Block Copolymers by Living Anionic Polymerization of Vinyl Monomers Bearing Nitrogen Atoms in the Side Chain*, *Macromol. Chem. Phys.*, 2017, 218, 1600445





**Fig. 1.6.** Representación de especies catiónica y aniónica en una polimerización iónica.

### 1.4.2. Polimerización radicalaria viviente

Este tipo de polimerización es poco particular debido a los agentes utilizados como protectores o estabilizadores de los radicales a través de la formación de un enlace covalente muy lábil usando compuestos derivados de nitroxidos por ejemplo 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO),<sup>10, 11</sup> 2,2,5-trimetil-4-fenil-3-azahexano-N-oxilo (TIPNO),<sup>12, 13</sup> y 4-(dietoxifosfinil)-2,2,5,5-tetrametil-3-azahexano-N-oxilo (SG1 o DEPN),<sup>14, 15</sup> así como el BlocBuilder® (Fig. 1.7), los cuales se disocian con un aumento de temperatura regenerando la especie radicalaria continuando así con la reacción de polimerización formando nuevamente el enlace con el estabilizador al bajar la temperatura.

<sup>10</sup> J. Jiang, D. Hua, J. Jiang, J. Tang, X. Zhu, Synthesis and property of poly(sodium 4-styrenesulfonate) grafted chitosan by nitroxide-mediated polymerization with chitosan-TEMPO macroinitiator, Carbohydrate Polymers, 2010, 81, 358

<sup>11</sup> A. Kaim, K. Pietrasik, T. Stokłosa, N,N-Diaminoethane Linked bis-TEMPO-Mediated Free Radical Polymerization of Styrene, Eur. Polym. J., 2010, 46, 519

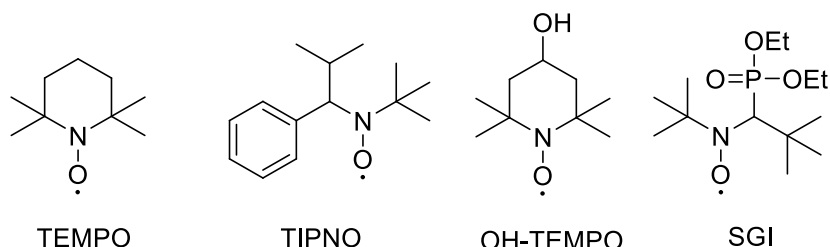
<sup>12</sup> L. Fan, Z. Lin, C. Yiwang, Approach to cross-linked polynorbornene/ZnO nanocomposites through nitroxide-mediated free radical graft polymerization and in situ hydrolysis, Optical Materials, 2012, 34, 1563

<sup>13</sup> L. Marx, H. Patrick, Synthesis and evaluation of a new polar, TIPNO type nitroxide for "Living" free radical polymerization, Polymer, 2009, 50 2752

<sup>14</sup> L. Bentein, D. D'hooge, R.M.-F. M.-F. G. Marin, Kinetic modeling of miniemulsion nitroxide mediated polymerization of styrene: Effect of particle diameter and nitroxide partitioning up to high conversion", Polymer, 2012, 53, 681

<sup>15</sup> P. O'Connor, R. Yang, W.M. Carroll, Y. Rochev, A. Fawaz, Facile synthesis of thermoresponsive block copolymers of N-isopropylacrylamide using heterogeneous controlled/living nitroxide-mediated polymerizations in supercritical carbon Dioxide, Eur. Polym. J., 2012, 48, 1279

Este tipo de polimerización permite un excelente control del proceso de polimerización permitiendo generar de manera controlada polímeros en bloques o polimerizaciones de injerto.<sup>16</sup>



**Fig. 1.7.** Iniciadores químicos de reacciones de polimerización radicalaria viviente.

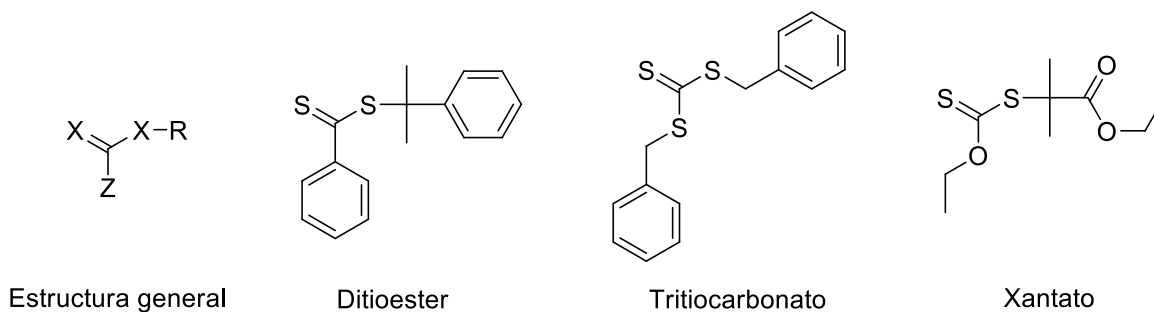
### ***1.4.3. Polimerización de reacción reversible de adición-fragmentación con transferencia de cadena (RAFT)***

Los recientes trabajos han demostrado que la polimerización de reacción reversible de adición-fragmentación con transferencia de cadena (RAFT) es un proceso extremadamente versátil ya que pueden ser aplicados en la síntesis de polímeros o copolímeros vinílicos con una estrecha polidispersidad y con alto grado de conversión (Fig. 1.8).<sup>17</sup> Además, de que estas se pueden llevar a cabo de manera heterógama (emulsión, mini-emulsión, suspensión) habiendo una gran compatibilidad con los grupos funcionales de los monómeros, disolventes e iniciadores. Los tipos de polímeros que se pueden obtener a través de esta técnica son, estrellas, bloques, microgeles, híper-ramificados entre otras complejas estructuras con un alto grado de pureza. Sin embargo, esta excepcional versatilidad

<sup>16</sup> T. Hirai, M. Kobayashi, A. Takahara, Control of the primary and secondary structure of polymer brushes by surface-initiated living/controlled polymerization, *Polym. Chem.*, 2017, 8, 5456

<sup>17</sup> M. Obata, S. Tanaka, H. Mizukoshi, E. Ishihara, M. Takahashi, S. Hirohara, RAFT Synthesis of an amphiphilic block copolymer bearing chlorin rings in the hydrophobic segment and its application in photodynamic therapy, *J. of Polym. Sci. A*, 2017, 55, 3395

no puede lograrse sin dar la debida consideración a la elección del agente RAFT así como de las condiciones de reacción.<sup>18</sup>

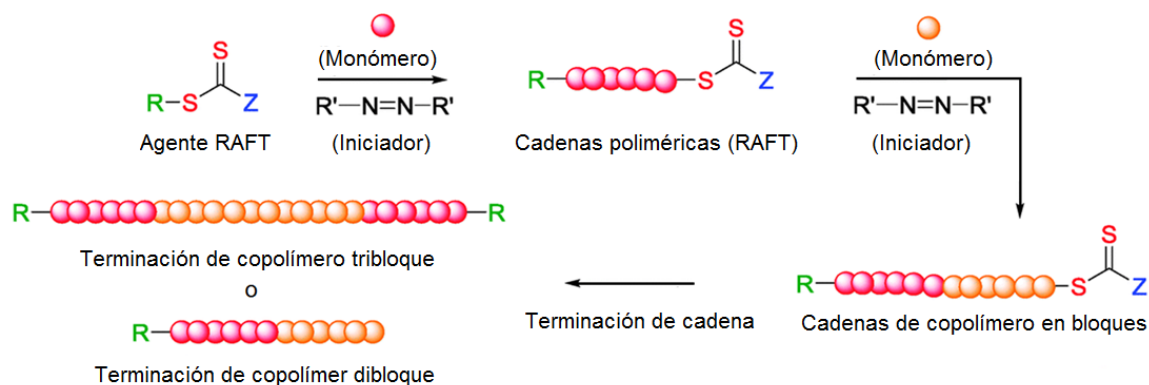


**Fig. 1.8.** Ejemplos de agentes de transferencia químicos en reacciones de polimerización RAFT de tipo tiocarbonilo.

Los agentes RAFT que mejor se han adaptado a este tipo de polimerización son los compuestos derivados de tiocarboniltilio (Fig. 1.9), aceptando este agente RAFT una amplia cantidad de grupos funcionales.<sup>19</sup>

<sup>18</sup> O. Garcia-Valdez, P. Champagne, M. F. Cunningham, Graft modification of natural polysaccharides via reversible deactivation radical polymerization, *Progress in Polymer Sci.*, xxx (2017) xxx-xxx

<sup>19</sup> G. Moad, Y.K. Chong, A. Postma, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Polymer*, 2005, 46, 8458



**Fig. 1.9.** Ejemplificación de polimerización en bloques vía RAFT.

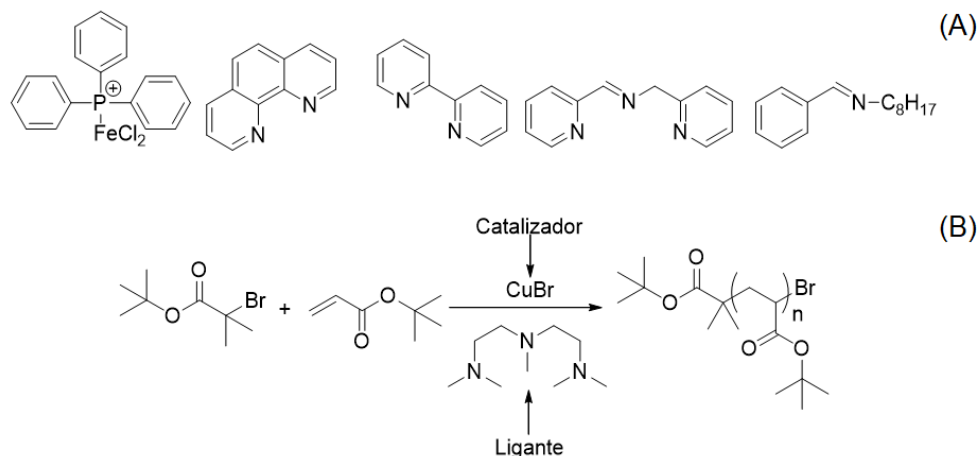
#### 1.4.4. Polimerización radicalaria por transferencia de átomo (ATRP)

La polimerización ATRP es un proceso radicalario selectivo y tolerante a la presencia de grupos funcionales de los monómeros vinílicos tales como ésteres, amidas, nitrilos, fenilos y otros derivados de estos, así como a las impurezas.<sup>20</sup> Este método se basa en un principio general el cual establece un rápido equilibrio dinámico entre una pequeña cantidad de radicales libres en el crecimiento y una gran cantidad de especies temporalmente desactivadas, llamadas especies durmientes. Esta técnica es además considerada como un sistema multicomponente, ya que está formado por monómeros, iniciadores, complejos organometálicos (catalizadores), ligantes (Fig. 1.10), aditivos o co-catalizadores y disolventes. Los catalizadores empleados son basados comúnmente en complejos de Cu<sup>21</sup> y Ru, respectivamente.<sup>22</sup>

<sup>20</sup> J. Wang, J. Wei, Functionalization of loofah fibers via surface-initiated AGET ATRP for synergic adsorption of multiple pollutants from water, *Materials Letters*, 2018, 210, 214

<sup>21</sup> G. Wang, Z. Wang, B. Lee, R. Yuan, Z. Lu, J. Yan, X. Pan, Y. Song, M.R. Bockstaller, K. Matyjaszewski, Polymerization-induced self-assembly of acrylonitrile via ICAR ATRP, *Polymer*, 2017, 129, 57

<sup>22</sup> L.A. Ramírez Mendoza, A. Sáenz Galindo, A. Castañeda Facio, L. López López, P. González Morones Afinidad: Revista de química teórica y aplicada, 2015, 72, 202



**Fig. 1.10.** Ejemplo de ligantes (A) y catalizador generado *in-situ* (B) utilizados en reacciones ATRP.

## 1.5. Polimerización de injerto

La polimerización de injerto es una técnica ampliamente usada en la obtención de nuevos polímeros. Esta técnica de polimerización se basa en el uso de una cadena principal a forma de columna vertebral la cual es injertada a manera de ramificaciones con cadenas poliméricas de menor peso molecular. Las técnicas más utilizadas para realizar dicha tarea son las siguientes:

### 1.5.1. Método de “graftin-onto”

El método *grafting-onto* (Fig. 1.11) implica el uso de una cadena principal con grupos funcionales que se distribuyen aleatoriamente a lo largo de esta misma. La formación del polímero o copolímero de injerto se origina por la reacción de acoplamiento entre la cadena principal funcionalizada y los grupos terminales de las cadenas poliméricas de injerto los cuales deben de ser muy reactivos.

Estas reacciones de acoplamiento se hacen posibles mediante la modificación química de la cadena principal o utilizando monómeros con sustituyentes que

permitan el acoplamiento con la cadena polimérica de injerto. Las técnicas de reacción más comunes para realizar las reacciones de polimerización de injerto incluyen polimerización por radicales libres, polimerización aniónica, polimerización por transferencia de átomo y polimerización radicalaria viviente.

### **1.5.2. Método de “grafting-from”**

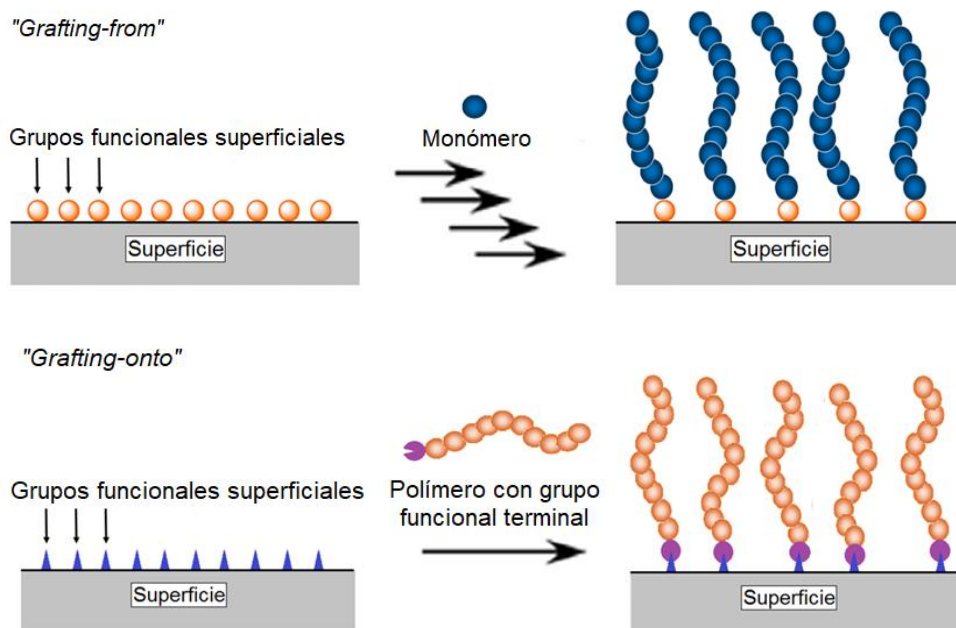
El método *grafting-from* (Fig. 1.11) consiste en una cadena principal la cual es modificada químicamente con el fin de introducir sitios reactivos o mediante el uso de un monómero adecuado capaz de iniciar la polimerización de injerto. Los sitios de iniciación se pueden incorporar de varias maneras ya sea por copolimerización, por una reacción de polimerización posterior o simplemente pueden ser sustituyentes del polímero. Este método de polimerización de injerto permite un mejor control del número de cadenas poliméricas a injertar mediante la cuantificación de sitios reactivos dentro de la cadena polimérica principal.<sup>23</sup> Sin embargo, esta no permite el control del tamaño de la cadena polimérica injertada como lo hace *grafting-onto*.

A pesar de que el número de cadenas injertadas se puede llegar a controlar, puede haber una diferencia en las longitudes de cada cadena injertada debido a los efectos de impedimento estérico y cinético.

Diferentes técnicas se han utilizado para generar dichas reacciones de injerto algunas de ellas son por ejemplo polimerización de injerto vía aniónica o catiónica, polimerización por transferencia de átomo, así como polimerización por radicales libres. Otros métodos utilizados para generar sitios reactivos en la cadena polimérica principal son mediante el uso de plasma y rayos gamma.

---

<sup>23</sup> G. Conzatti, S. Cavalie, C. Combes, J. Torrisani, N. Carrere, A. Tourrette, PNIPAM grafted surfaces through ATRP and RAFT polymerization: Chemistry and bioadhesion, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2017, 151, 143

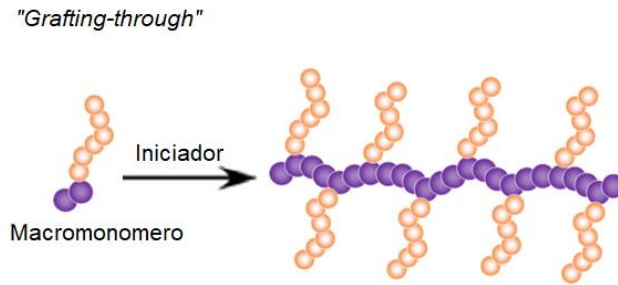


**Fig. 1.11.** Representación de los métodos de polimerización “*grafting-from*” y “*grafting-onto*”.

### 1.5.3. Método de “*grafting-through*”

El método de *grafting-through* (Fig. 1.12) también conocido como el método de macromonómero es una de las maneras más simples de sintetizar un polímero de injerto con cadenas laterales bien definidas. Normalmente, un macromonómero de un peso molecular más bajo se polimeriza o copolimeriza por radicales libres formando una cadena principal de mayor peso molecular la cual pasa ser la cadena principal.

Este método ofrece una gran ventaja ya que es posible emplear el uso de cualquier técnica de polimerización conocida. Sin embargo, la polimerización viviente ofrece un control especial sobre el peso molecular y de la distribución de las cadenas de injerto, así como la funcionalización de final de cadena.



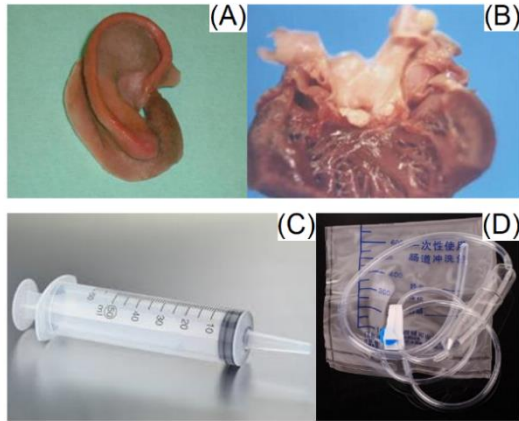
**Fig. 1.12.** Representación de los métodos de polimerización “*grafting-through*”.

### **1.6. Aplicaciones médicas de los polímeros**

Las aplicaciones de los polímeros en el área médica son diversas y estas son estrechamente relacionadas con las propiedades de dicho polímero. Los polímeros más utilizados son polipropileno (PP), polietileno (PE), poliestireno (PS), policloruro de vinilo (PVC), politetrafluoro de etileno (Teflón) y hule de silicona (SR) por mencionar algunos. La mayoría de estos polímeros son también ampliamente utilizados en la ingeniería automotriz, empaques y electrónica debido a sus excelentes propiedades mecánicas, así como aislantes.

Las cualidades que hacen idóneos estos polímeros en esta área, no solo son sus propiedades mecánicas las cuales le confieren una amplia variedad de usos, sino también sus propiedades de biocompatibilidad que en combinación los hacen excelentes candidatos para desarrollar una amplia variedad de dispositivos médicos. El área médica utiliza ampliamente SR y PP en la fabricación de válvulas, marcapasos, catéteres, componentes de hemodiálisis, inhaladores, hilos de sutura, jeringas, así como implantes percutáneos y de piel, prótesis, implantes maxilofaciales de seno, etc. (Fig. 1.13).



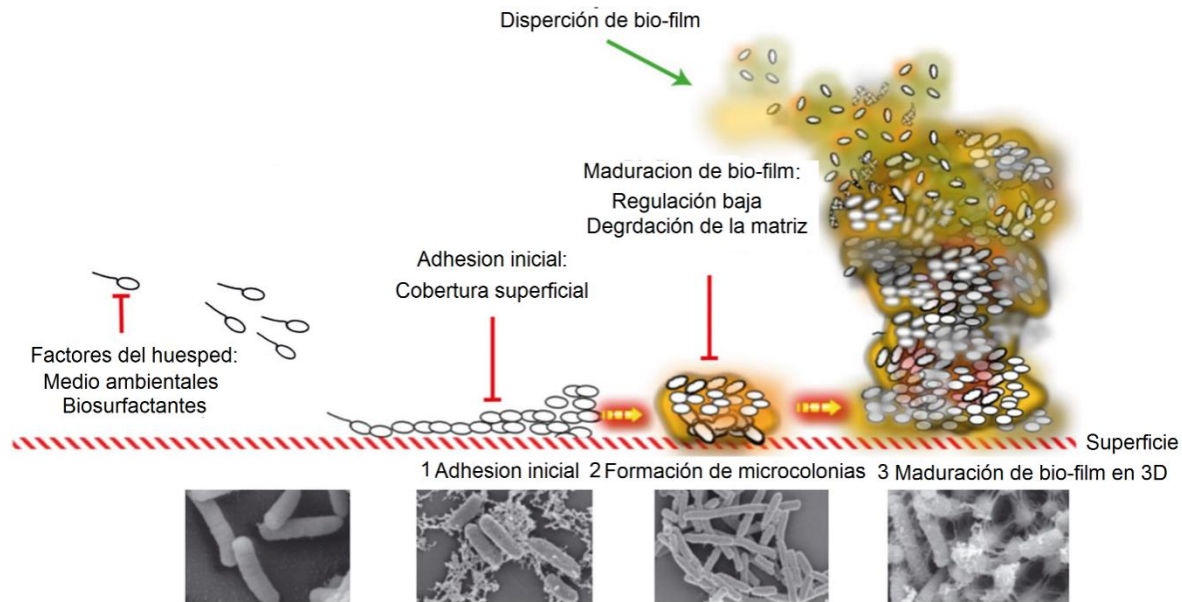


**Fig. 1.13.** Prótesis hechas con hule de silicona. A) oreja artificial, B) válvula de corazón. Dispositivos médicos de polipropileno C) y D).

Lamentablemente el desgaste del material, imperfecciones generadas por la manufactura, así como el mal manejo de estos dispositivos médicos puede generar severas consecuencias debido a la adición de material orgánico proporcionando un lugar ambiente adecuado para la proliferación de microorganismos<sup>24</sup> los cuales pueden ser patógenos provocando finalmente biopelículas (biofilms) las cuales pueden ser imposibles de eliminar una vez establecidas en el dispositivo.<sup>25</sup>

<sup>24</sup> M.E. Auler, D. Morreira, F.F. Rodrigues, Biofilm formation on intrauterine devices in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis, *Medical Mycology*, 2009, 48, 211

<sup>25</sup> M.R. Oggioni, C. Trappetti, A. Kadioglu, M. Cassone, F. Lannelli, S. Ricci, P.W. Andrew, G. Pozzi, Switch from planktonic to sessile life: a major event in pneumococcal pathogenesis, *Mol. Microbiol.*, 2006, 61, 1196



**Fig. 1.14.** Proceso de formación de una biopelícula.

La formación de biopelículas se describe a menudo como un proceso de múltiples etapas en el que las bacterias se adhieren<sup>26</sup> a una superficie abiótica o biótica, a través de cargas superficiales, así como a través de generación de pilis, fimbrias y exopolisacáridos por parte del microorganismo.<sup>27, 28</sup> Después del apego inicial, el desarrollo tridimensional comienza con la construcción de microcolonias, en las cuales pueden interactuar diferentes especies de microorganismos. El siguiente paso es la maduración de la biopelícula, siendo esta dependiente de la matriz, lo que garantiza la cohesión y la estructura tridimensional de las biopelículas maduras. La Fig. 1.14 muestra imágenes de microscopía electrónica de barrido representativas de cada paso. El paso final de la formación de biopelícula es el desprendimiento o dispersión celular, por el cual las bacterias recuperan el estilo de vida planctónico

<sup>26</sup> J.J. Harrison; R.J. Turner; L.L.R. Marquez, H. Ceri, (2006) «Biopelículas». Investigación y Ciencia [reeditado en Temas, 2016, 85, 4

<sup>27</sup> D. López, H. Vlamakis, R. Kolter, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, Biofilms, 2010, 2, 7

<sup>28</sup> L. Hall-Stoodley, J.W. Costerton, P. Stoodley, Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases, Nature Reviews Microbiology, 2004, 2, 95

para colonizar otras superficies.<sup>29, 30</sup> Las interferencias microbianas pueden inhibir la formación de biopelículas o mejorar la dispersión del a través de diferentes mecanismos y estrategias en diferentes etapas de su desarrollo.<sup>31</sup>

Algunas de las infecciones<sup>32</sup> más comunes provocadas por biopelículas generadas ya sea por bacterias *Gram*-positvas o -negativas<sup>33, 34</sup> son endocarditis, otitis media, prostatitis entre otras causadas por implantes médicos tales como catéteres intravasculares o prótesis articulares.

## **1.7. Tratamiento de infección asociada dispositivos médicos**

### **1.7.1. Infecciones causadas por catéteres intravasculares**

Cuando una infección es causada por la presencia de catéter contaminado, la remoción de este el tratamiento más efectivo de inicio además de un tratamiento con antibióticos. Sin embargo, en el caso de los catéteres intravasculares la retirada puede resultar problemática y el riesgo quirúrgico que supone la retirada puede ser mayor que el riesgo asociado a un tratamiento ineficaz con antibióticos. En estos casos se recomienda un tratamiento denominado de sellado antibiótico, que consiste en instalar en el interior del catéter una solución de anticoagulante (heparina o EDTA) y un antibiótico a una concentración entre 100 y 1000 veces mayor que la concentración mínima inhibitoria del microorganismo responsable de la infección asociada a catéter, durante al menos 8 horas diarias a lo largo de 10-14 días, siendo este tratamiento sumamente agresivo para el paciente<sup>35</sup>

---

<sup>29</sup> G. O'Toole, H. B. Kaplan, R. Kolter, Biofilm formation as microbial development, Annual Review of Microbiology, 2000, 54, 49

<sup>30</sup> D. Monroe, Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms, PLoS Biol., 2007, 5, 307

<sup>31</sup> O. Rendueles, J.M. Ghigo, FEMS, Microbiol Rev., 2012, 36, 972

<sup>32</sup> A.G. Gristina, Biofilms and chronic bacterial infections. Clin Microbiol Newsletter, 1994, 16, 171

<sup>33</sup> T. Abee, A.T. Kovács, O.P. Kuipers, S. Van Der Veen, Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria, Current Opinion in Biotechnol., 2011, 22, 172

<sup>34</sup> F. Rossi, R. De Philippis, Role of cyanobacterial exopolysaccharides in phototrophic biofilms and in complex microbial mats. Meeks JC, Haselkorn R, eds. Life. 2015, 5, 1218

<sup>35</sup> 33.Messing B. Catheter-sepsis during home parenteral nutrition: use of the antibiotic-lock technique. Nutrition 1998; 14: 466-468

### **1.7.2. Prótesis articulares**

Este tipo de biopelícula formada en la prótesis es la más peligrosa debido a que estas requieren obligatoriamente cirugía la cual incluye un completo debridamiento quirúrgico para retirar por completo el material infectado incluyendo el segmento de tejido infectado o dañado y en casos más severos el hueso aumentando el riesgo de muerte en el paciente, aunque algunas veces hay intentos por salvar la prótesis, estos son infructuosos y es necesaria la retirada del implante junto con un tratamiento antimicrobiano apropiado y de larga duración para finalmente la reimplantación de la prótesis articular<sup>36</sup> en el caso de que sea posible.

### **1.7.3. Estrategias de inhibición de microorganismos en dispositivos médicos**

Los métodos más utilizados para garantizar la integridad y esterilidad de los dispositivos son mediante el uso de empaques, así como de su esterilización mediante autoclaves, UV, tratamientos químicos e incluso mediante el uso de radiación.

Algunas otras formas de inhibir la formación de biopelícula en materiales médicos o prótesis es a través de la carga de fármacos de amplio espectro, siendo los de mejor resultado, gentamicina, levofloxacino, cotrimoxazol, minociclina, teicoplanina, vancomicina, cefazolina, chlorhex-sulfadiazina de plata, minociclina-rifampicina así como la impregnación de plata-iontoforesis.

Otras formas más avanzadas de mantener el dispositivo libre de bacterias son, la inmovilización o adhesión de enzimas e incluso mediante recubrimientos de otros polímeros los cuales tengan propiedades antimicrobianas tales como el poli(N-vinilimidazol) o quitosano.

---

<sup>36</sup> Steckelberg JM, Rouse MS, Tallan BM, Osmon DR, Henry NK, Wilson WR. Relative efficacies of broad-spectrum cephalosporins for treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* experimental infective endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 554-558)

Llevar a cabo dichas técnicas, no ha sido una tarea fácil, ya que sustituir el material polimérico original de manera parcial o por completo por uno con propiedades antibacterianas, por ejemplo el quitosano, poli(N-vinilimidazol) es prácticamente imposible debido a las propiedades mecánicas que poseen son muy pobres para dispositivos tales como mallas hernicas o prótesis las cuales requieren de excelentes propiedades mecánicas por parte del polímero y que en el caso de dispositivos médicos no cumplir con estos requerimientos las consecuencias pueden llegar a ser mortales.

### **1.8. Inmovilización de enzimas**

La inmovilización de enzimas ha llegado a tener una gran importancia en la actualidad ya que esta permite mejorar en la mayoría de los casos la estabilidad de la enzima en un amplio intervalo de temperatura, pH, así como su resistencia a diferentes disolventes. Algunas otras ventajas que presenta esta también la recuperación de la enzima en la mayoría de los casos, lo cual muchas veces llega a ser imposible cuando la enzima es usada de manera libre.

Los dos métodos generales para llevar a cabo la inmovilización de enzimas es por retención física o por unión química.

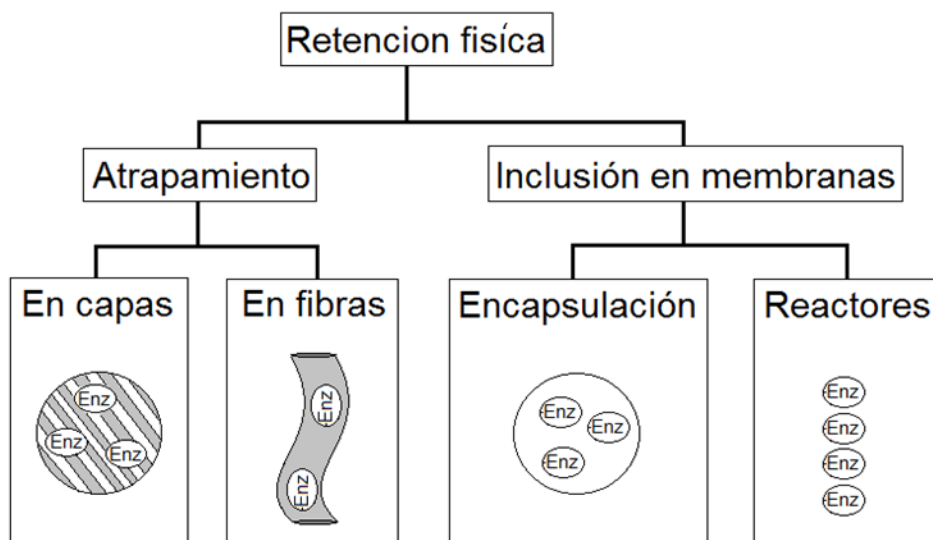
#### **1.8.1. Retención física**

Consiste en la retención de enzimas a través de las cavidades interiores de una matriz sólida porosa (Fig. 1.15) constituida generalmente por pre-polímeros foto-entrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano.<sup>37</sup>

---

<sup>37</sup> J. Lei, J. Fan, C. Yu, L. Zhang, S. Jiang, B. Tu, D. Zhao, Immobilization of enzymes in mesoporous materials: controlling the entrance to nanospace, *Micr. and Mesopo. Mater.*, 2004, 73, 121

El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero. Seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. El atrapamiento puede ser en geles o en fibras. En el primer caso, la enzima queda atrapada en el interior de un gel, mientras que en el segundo caso la enzima se encuentra ocluida dentro de las micro-cavidades de una fibra sintética. El atrapamiento es de gran sencillez desde el punto de vista experimental ya que requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos. Como ventaja adicional, la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura. De cualquier modo, el atrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como una verificación de los grupos reactivos de la proteína no se encuentren alterados debido a la naturaleza química del proceso.<sup>38</sup>



**Fig. 1.15.** Métodos de retención física de enzimas.

<sup>38</sup> L. Chang Dong, A.S. Hoffman, Thermally reversible hydrogels: III. Immobilization of enzymes for feedback reaction control, J. Control. Release, 1986, 4, 223

### **1.8.2. Unión covalente**

La unión covalente de una enzima a un soporte es quizá (Fig. 1.16) el método de inmovilización más interesante desde el punto de vista industrial. La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con los grupos nucleofílicos de las proteínas. De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina, el ácido aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos en la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente<sup>39</sup>. Este método presenta las siguientes ventajas:

1. La manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla;
2. La carga de enzima permanece constante después de la inmovilización;
3. Los derivados pueden utilizarse en reactores de flujo constante o en tanques agitado, así como empaques.
4. Ofrece una mayor resistencia a la desactivación por efecto de la temperatura, disolventes orgánicos o del pH, al tener estabilizada su estructura terciaria.

Sin embargo, la inmovilización por enlace covalente también presenta una serie de inconvenientes:

1. Es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría, que puede ser distorsionante y conducir a derivados inactivos.
2. El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo, para evitar esta posible alteración, algunas veces es necesario realizar la

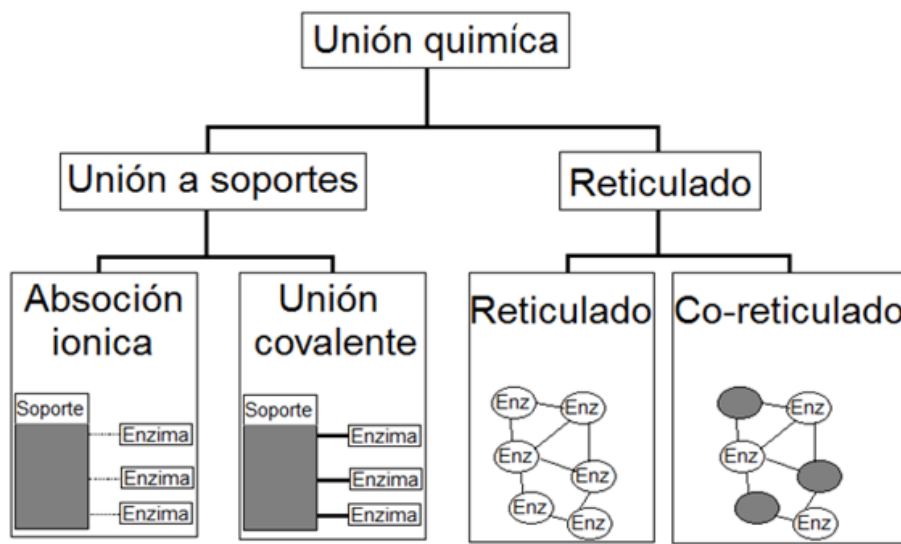
---

<sup>39</sup> E. Katchalski-Katzir, D.M. Kraemer, Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential, J. Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2000, 10, 157

inmovilización en presencia de un inhibidor que bloquee o proteja el centro activo.<sup>40</sup>

3. La inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas enzimas muy sensibles a las condiciones de reacción tales como a cambios de pH, fuerza iónica y temperatura.

A pesar de todas estas desventajas la comunidad científica se sigue esforzando en el diseño de nuevos materiales los cuales faciliten la inmovilización de enzimas causando el menor daño a esta.



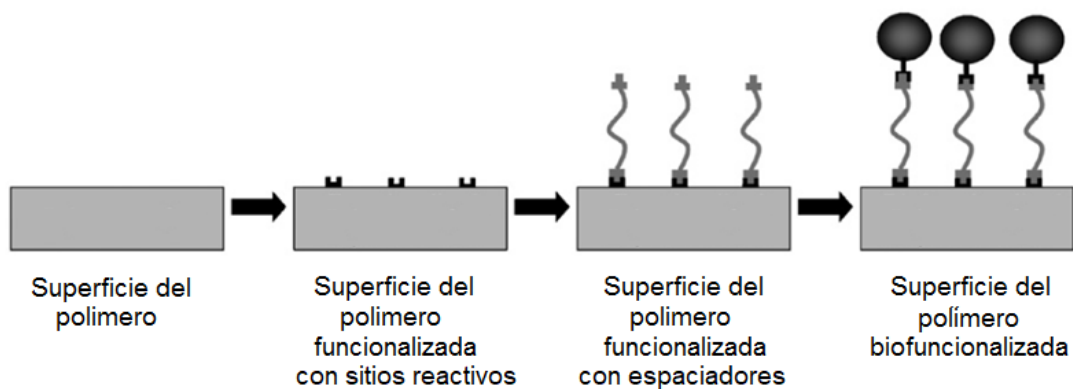
**Fig. 1.16.** Métodos comunes de inmovilización de enzimas por unión química.

El primer paso para llevar a cabo la inmovilización covalente de enzimas es la selección del material el cual debe cumplir con ciertos requisitos (Fig. 1.17), tales como una compatibilidad con la biomolécula, ya que si el material es muy hidrofóbico este puede causar la desnaturalización de la enzima, por la tanto la adecuada

<sup>40</sup> M. ARROYO, Inmovilización de enzimas, Fundamentos, métodos y aplicaciones, Ars Pharmaceutica, 1998, 39, 23



selección de estos materiales es indispensable. Lamentablemente la mayoría de los polímeros comerciales llegan a ser muy hidrofóbicos por lo tanto es necesario llevar a cabo modificaciones en el material ya sea de manera superficial o en masa antes de tratar de llevar a cabo la inmovilización.



**Fig. 1.17.** Concepto de modificación superficial.

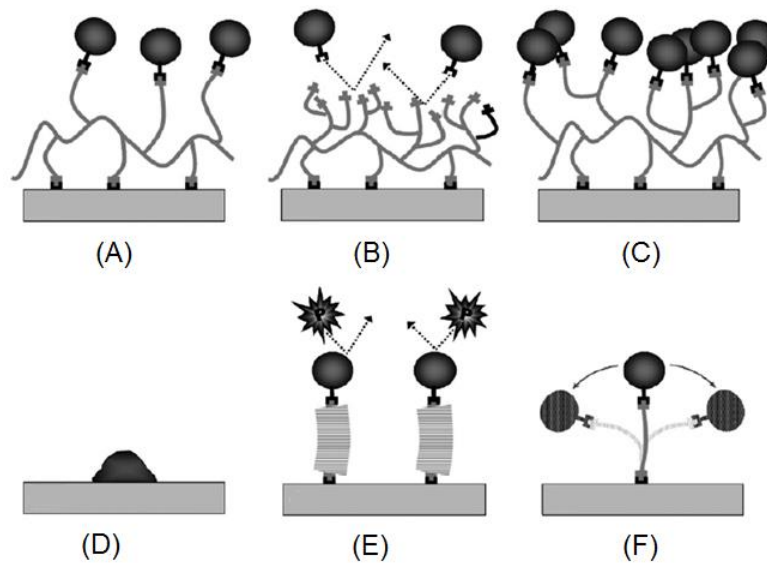
Las modificaciones se pueden ser llevadas a cabo por polimerizaciones de injerto el cual puede generar una modificación polifuncional en la superficie o en masa, el cual incrementa el número de grupos reactivos por unidad de área o masa.

La inmovilización de biomoléculas a un sólido o matriz usando un espaciador, puede mejorar la actividad por reducción del impedimento estérico, así como de la formación de una cobertura de la molécula con una capa hidrofílica impidiendo su desnaturalización.

Algunos de los problemas más comunes al llevar a cabo la inmovilización de covalente de biomoléculas (Fig. 1.18) son:

- a) Reducción de la inmovilización debido a la sobrefuncionalidad de la matriz
- b) Reducción de la actividad debido a la sobreinmovilización de la enzima en la matriz

- c) Desnaturalización inducida por la matriz
- d) Reducción de la inmovilización de enzima debido a la hidrofobicidad del espaciador o matriz.
- e) Incremento de la movilidad debido al espaciador.



**Fig. 1.18.** Efecto de la inmovilización en la bioactividad de la enzima. A) sobre funcionalizada, B) sobreinmovilización, C) Desnaturalización, D) efecto de la hidrofobicidad, E) efecto del espaciador y F) incremento de movilidad.

### 1.8.3. Enzimas con aplicaciones anti-microbianas

Las enzimas con actividad anti-microbiana se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, siendo en parte responsables de la defensa de los organismos vivos contra infecciones causadas por los microorganismos patógenos. Las enzimas con actividad anti-microbiana pueden ser de diferentes tipos ya sea bacteriolíticas, fungolíticas y oxido-reductasas. Siendo más comunes las enzimas bacteriolíticas y fungolíticas las cuales actúan degradando componentes

estructurales de la pared microbiana o fúngica, mientras que las enzimas oxido-reductoras ejercen un efecto directamente sobre las moléculas necesarias para el metabolismo del microorganismo.<sup>41</sup>

### ***Enzimas bacteriolíticas***

El péptido glicano de la membrana celular es el responsable de su rigidez estructural. Su alteración puede producir la lisis de la bacteria debido a la presión osmótica interna de la misma, en el caso de las bacterias Gram-negativa hay que contar también con la presencia de una pared externa que habrá que alterar previamente, por medios físicos o químicos.<sup>42</sup>

### ***Las enzimas bacteriostáticas pueden ser:***

- Lisozima
- N-acetilmidasa
- Endopeptidasas

Las últimas dos sintetizadas por *Streptomyces* y otros microorganismos

### ***Enzimas fungolíticas***

La pared de los hongos es diferente a la de las bacterias. Su principal componente es la quitina, asociada a  $\beta$ -glucano y manosas. Las enzimas que tienen acción hidrolítica sobre ellas son.

- Quitinasas
- $\beta$ -Gluconasas

---

<sup>41</sup> S. Ramesh, N. Mathivanan, Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes, *World J Microbiol Biotechnol*, 2009, 25, 2103

<sup>42</sup> C.C. Fuglsang, C. Johansen, S. Christgau, J. Adler-Nissen, Antimicrobial enzymes: Applications and future potential in the food industry, *Trends in Food Science & Technology*, 1995, 61

Ambas se encuentran en vegetales y pueden ser sintetizadas por algunos microorganismos.

### **Oxido-reductasas**

Son enzimas que intervienen directamente sobre moléculas implicadas en el metabolismo de los microorganismos:

-Glucosaoxidasa

-Lactoperoxidasa

-Mieloperoxidasa

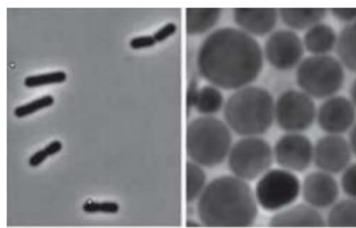
De todos estos tipos de enzimas con actividad anti-microbiana la lisozima es una de las enzimas más utilizadas para proporcionar a la matriz polimérica con propiedades anti-microbianas ya que esta provee una gran actividad antimicrobiana contra un gran número de microorganismos patógenos para el ser humano siendo principalmente aquellos microorganismos *Gram*-positivo. Además, esta es de fácil almacenamiento y de un costo muy accesible comparado con otras enzimas.

### **1.9. Lisozima**

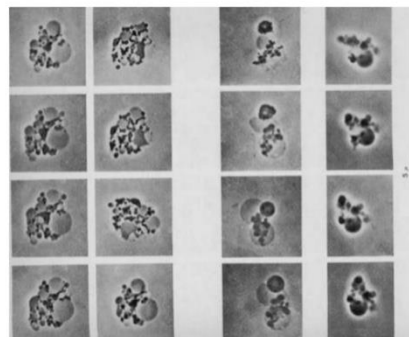
La lisozima también llamada muramidasa, es una enzima de 14,4 kD fue descubierta por Fleming, el mismo que descubrió la penicilina. Esta enzima daña las células bacterianas catalizando la hidrólisis del peptidoglicano de la bacteria, actuando como una barrera frente a infecciones. La lisozima es abundante en numerosas secreciones como la saliva, las lágrimas y el moco, la lisozima también esta presente incluso en el bazo, los pulmones, los leucocitos, el plasma, la leche y el cartílago, así como en los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos polimorfonucleares PMN. Finalmente, esta enzima se extrae principalmente para uso industrial de las claras de huevo las cuales contienen una gran cantidad de esta.

Muchas de las bacterias afectadas por lisozimas no son patogénicas, siendo en algunos casos, la lisozima, la razón principal por la cual estos organismos no llegan a ser patógenos. La lisozima también altera la pared celular de bacterias patógenas transformándolas en esferoplastos o protoplastos, denominados formas L (Fig. 1.19 y 1.20). La lisozima puede actuar ya sea como una enzima catalítica o como una opsonina innata uniéndose a la superficie bacteriana, reduciendo la carga negativa y facilitando la fagocitosis de las bacterias, todo esto antes de la llegada de las opsoninas del sistema inmunitario. En otras palabras, la lisozima hace que las células fagocíticas puedan absorber más fácilmente a la bacteria

## FORMAS "L"



Comparación de células normales de *Bacillus subtilis* a la izquierda con las respectivas formas L a la derecha.



Crecimiento de formas pleomórficas (formas L) de *Mycobacterium tuberculosis*. Note la tinción más oscura de las formas cocoides y los grandes globos translúcidos. Fotografía con microscopio electrónico.

**Fig. 1.19.** Imágenes de bacterias en forma de esfeplastos o protoplastos (formas L).<sup>43</sup>

El mecanismo de hidrólisis de la lisozima esta específicamente dado entre el enlace glucosídico del carbono 1 (C1) del residuo de ácido *N*-acetilmurámico (NAM) y el carbono 4 (C4) de la *N*-acetil-*D*-glucosamina (NAG)<sup>44</sup>. La hidrólisis se realiza uniendo la molécula de peptidoglicano en el sitio activo de la lisozima la cual es una

<sup>43</sup> <https://es.slideshare.net/marugarrocho/estructura-bacteriana-8422208>

<sup>44</sup> A. Waecziel, M. Levitt, Theoretical studies of enzymic reactions: Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme, J. Mol. Biol., 1976,103, 227

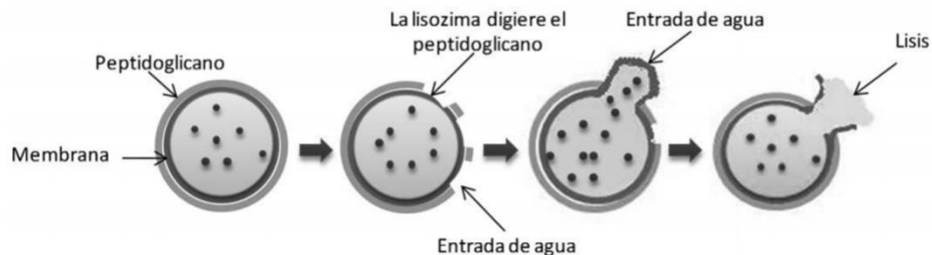
prominente hendidura entre sus dos dominios, provocando que la molécula sustrato adopte una conformación muy tensa, similar a la de un estado de transición.<sup>45</sup> Según el mecanismo de Phillips, la lisozima se une a un hexasacárido deformando el cuarto azúcar (el anillo D) que adopta una conformación de media silla. En este estado de tensión el enlace glucosídico es fácilmente roto mediante un ataque nucleofílico.<sup>46</sup>

Se ha descubierto que el ácido glutámico 35 (Glu35) y el ácido aspártico 52 (Asp52) son indispensables para la actividad de esta enzima ya que el Glu35 actúa como donador de protones para el enlace glucosídico, cortando el enlace -C-O- en el sustrato mientras que el Asp52 actúa como nucleófilo para generar el intermediario enzimático-glucosídico (complejo enzima-sustrato) el cual reacciona con una molécula de agua para volver a dejar intacta a la enzima y liberar el producto de la hidrólisis (Fig.1.21).<sup>47, 48, 49</sup>

---

**Formación de protoplastos: en una solución diluida, la rotura de la pared libera el protoplasto que inmediatamente se lisa al ser muy débil la membrana citoplasmática.**

---



---

**Fig. 1.20.** Mecanismo de acción de la lisozima en la pared celular de una bacteria.

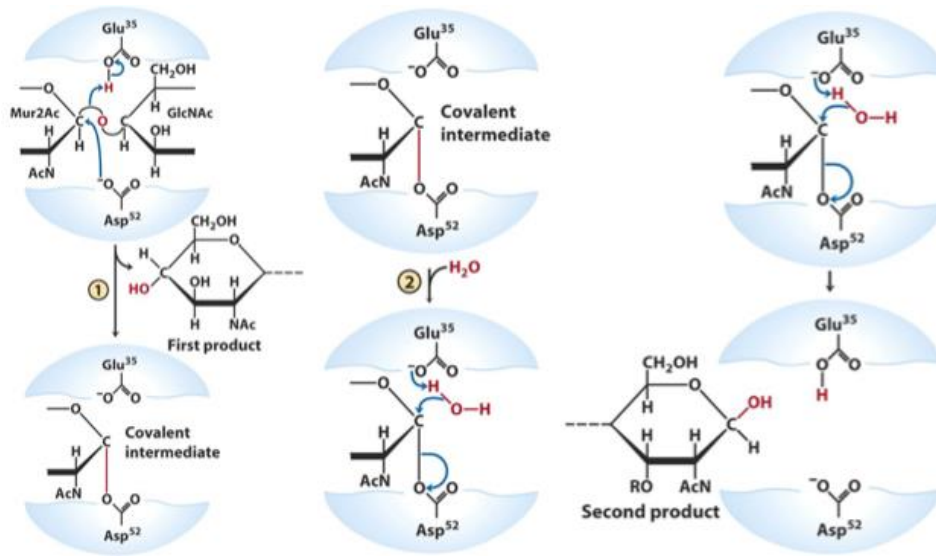
<sup>45</sup> G.P. Manchenko, *Lysozyme*, Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels. Boca Raton, Fla.: CRC 1994, 223

<sup>46</sup> C.C.F. Blake, L.N. Johnson, G.A. Mair, A.C.T. North, D.C. Phillips, V.R. Sarma, Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme, Proc. Roy. Soc. B, 167, 40

<sup>47</sup> W. Carrillo, Lisozima: Actividad antibacteriana, Actualización en nutrición, 2013, 14

<sup>48</sup> C.M. Grisham, R.H. Garrett, *Chapter 14: Mechanism of enzyme action*, Biochemistry. Australia: Thomson Brooks/Cole, 2007, 467

<sup>49</sup> D.E. Koshland, Stereochemistry and the Mechanism of Enzymatic Reactions, Biological Reviews, 1953, 28, 416



**Fig. 1.21.** Mecanismo de hidrolisis de la lisozima.<sup>50</sup>

### 1.10. Radiación gamma y sus aplicaciones

La radiación gamma desde su descubrimiento ha generado una gran cantidad de estudios acerca de esta, sin embargo, en la actualidad ha comenzado a dejar de ser estudiada no solo como un fenómeno, sino también en sus aplicaciones. Actualmente han tenido gran avance debido a que es una energía ionizante, la cual por este simple hecho puede llevar a cabo un sin número aplicaciones en ramas como la medicina e industria médica, así como la alimentaria donde su principal uso es la esterilización de insumos médicos, así como de alimentos. Sin embargo, sus aplicaciones también van más allá ya que también es comúnmente utilizada en la detección de fallas estructurales, así como en generar reacciones químicas sobre compuestos químicamente inertes o que son muy difíciles de llevar a cabo mediante reacciones químicas convencionales.

Una de las fuentes de radiación gamma más común es el <sup>60</sup>Co debido a que aunque esta presenta una vida media razonablemente larga, tiene una intensidad de

<sup>50</sup> <https://www.studyblue.com/notes/note/n/lecture-8-enzymes-catalysis/deck/1668319>

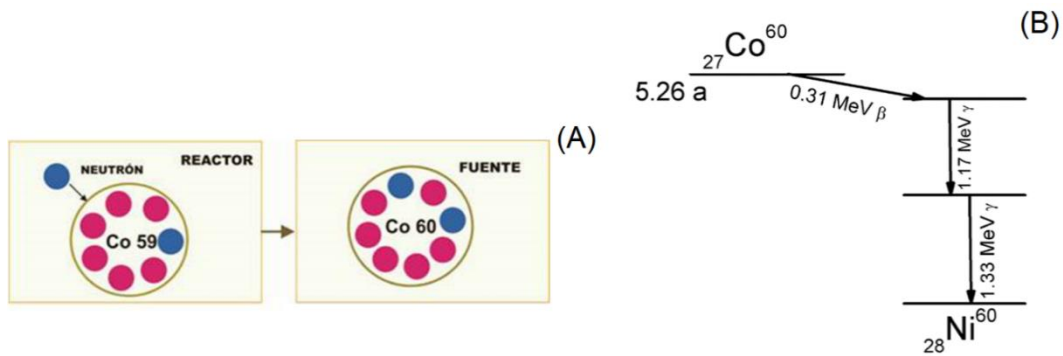
radiación muy alta en comparación con otras fuentes de radiación, como las mostradas en la Fig. 1.22,<sup>51</sup> siendo además producido ampliamente de una manera sintética disminuyendo su costo (Fig. 1.23).

Isotopo	Media vida	Energía emitida MeV	
		Beta	Gamma
H <sup>3</sup>	12 años	0.018	----
C <sup>14</sup>	6400 años	0.156	----
Co <sup>60</sup>	5.3 años	0.306	1.17 1.33
Sr <sup>90</sup>	19.9 años	0.61	----
↓			
Y <sup>90</sup>	61h	2.18	----
Cs <sup>134</sup>	2.3 años	0.658 (75%) 0.09 (25%)	0.561 0.794
Cs <sup>137</sup>	33 años	0.53 (95%) 1.19 (5%)	---- ----
↓			
Ba <sup>137</sup>	2.6 min	----	0.67
Ta <sup>182</sup>	111 días	0.525	0.006 1.223
Ir <sup>192</sup>	74.5 días		0.15 0.65

**Fig. 1.22.** Radioisótopos más comunes y decaimiento.

<sup>51</sup> A. Chapiro, Radiation Chemistry, (Paris, France. J. Wiley) pag. 4

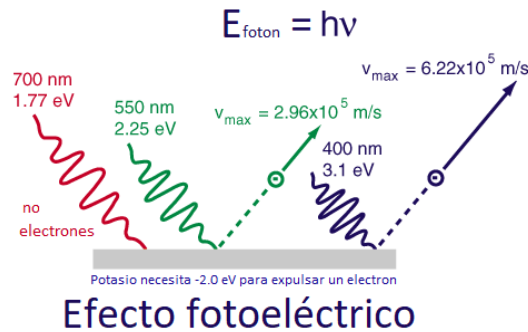




**Fig. 1.23.** A) síntesis de  $^{60}\text{Co}$ , B) decaimiento del  $^{60}\text{Co}$  y liberación de dos rayos gamma.

Las interacciones de los rayos gamma con la materia pueden ser distintas debido a que estas dependen de su energía. Los principales efectos causados cuando los rayos gamma pasa a través de la materia son: efecto fotoeléctrico, efecto Compton y creación de pares.

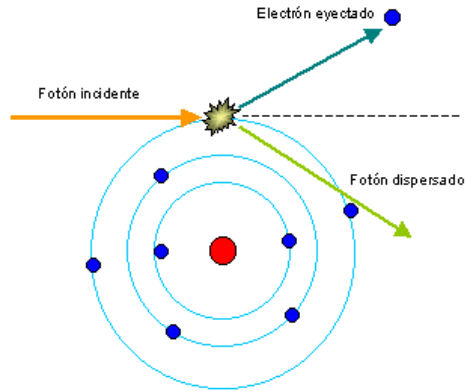
**Efecto fotoeléctrico.** Cuando un fotón gamma interactúa con un electrón atómico, este le transfiere su energía y lo expulsa del átomo. La energía cinética resultante, del fotoelectrón, es igual a la energía del fotón gamma incidente menos la energía de enlace del electrón. El efecto fotoeléctrico es el proceso de transferencia de energía dominado por rayos X y fotones de rayos gamma de energías inferiores a 0.5 MeV (Fig. 1.24).



**Fig.1.24.** Representación de efecto foto-eléctrico.

**Efecto Compton.** Es una interacción donde un fotón gamma incidente aumenta la energía de un electrón atómico lo suficiente para provocar su expulsión. La energía restante del fotón original emite un nuevo fotón gamma de baja energía con dirección de emisión diferente a la del fotón gamma incidente. La probabilidad del efecto Compton decrece según se incrementa la energía del fotón, siendo este relativamente independiente del número atómico del material absorbente y predominante en agua y compuestos orgánicos.

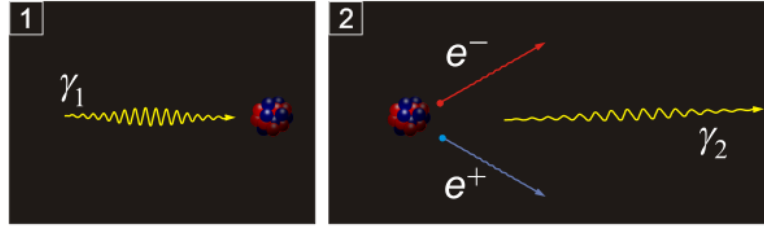
Se considera que el efecto Compton es el principal procedimiento de absorción de rayos gamma en el rango de energía intermedio entre 100 keV a 10 MeV, el cual incluye la mayor parte de la radiación gamma presente en explosiones nucleares (Fig. 1.25).



**Fig.1.25.** Representación de efecto Compton.

**Creación de pares.** Debido a la interacción de la fuerza de Coulomb, en la vecindad del núcleo la energía del fotón incidente se convierte espontáneamente en la masa de un par electrón-positrón donde el positrón es la antipartícula equivalente a un electrón. Por lo tanto, su masa y carga es de igual magnitud, pero de signo opuesto a la de un electrón y con una «vida» del positrón es muy corta: del orden de 8-10 segundos. Al final de su periodo se combina con un electrón libre.

La energía excedente (ejemplo 1,02 MeV) del equivalente a la masa en reposo de las dos partículas aparece como energía cinética del par y del núcleo. Toda la masa de estas dos partículas se convierte entonces en dos fotones gamma de 0,51 MeV de energía, cada uno (Fig. 1.26).



**Fig. 1.26.** Representación de formación de pares electrónicos mediante rayos gamma.

De estos tres fenómenos el efecto fotoeléctrico y Compton son los principales fenómenos por los cuales se llevan a cabo las reacciones químicas a través de rayos-gamma.

### 1.11. *Silicona*

La silicona (SR) es un elastómero estable a alta temperatura y resistente a la gran mayoría de disolventes, así como álcalis y ácidos, lo que la hace útil en gran variedad de aplicaciones industriales, como lubricantes, adhesivos, moldes, e incluso en aplicaciones médicas y quirúrgicas o como prótesis valvulares, cardíacas e implantes de mamas pudiéndose esterilizar con óxido de etileno, radiación y procesos de autoclave.<sup>52, 53, 54</sup>

La característica esencial de las siliconas es la de presentar en su estructura molecular, además del enlace silicio-carbono, el enlace silicio-oxígeno a manera de cadena principal el cual da origen a su nombre: siliconas. Los polímeros de la silicona fueron descubiertos por el químico inglés F. S. Kipping, a quien se considera un

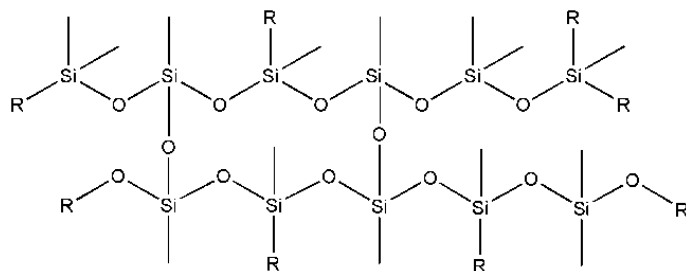
<sup>52</sup> Y. Zhang, W. Yu, L. Zhang, J. Yin, J. Wang, H. Xie, Thermal conductivity and mechanical properties of low-density silicone rubber filled with Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and graphene nanoplatelets, J. of Thermal Sci. and Eng. App., 2018, 10, 011014-3.

<sup>53</sup> L. Chien-Chou, H. Chang-Wei, Z. Tong-Yuan, H. Chih-Chun, F. Yiin-Kuen, Multiple vibrating plates of sound suppression mask for minimizing tics impulse acoustics of Tourette's patients, Applied Acoustics, 2018, 129, 27.

<sup>54</sup> N. Nadiah Azmi, I.I. Shahrul Azhar, J. Mahmud, A brief review and framework towards synthesising silicone hydrogel materials that mimic skin deformation behaviour, App. Mech. and Mater., 2014, 680, 70.

pionero en el tema. Se encontraba buscando elementos estereoisoméricos, para poder obtener uno que fuera compatible con los fluidos hidráulicos capaces de repeler al agua y que además fuera útil para la guerra, puesto que pretendía encontrar una forma de hacer menos pesados los equipos.

Desde 1903 Kipping trabajó en buscar nuevas técnicas para la síntesis de una variedad de compuestos orgánicos que contenga silicio (Fig. 1.27). A estas nuevas sustancias, las llamó siliconas y al principio se destinaron como lubricantes, en especial durante la Segunda Guerra Mundial. Se comenzaron a obtener industrialmente a partir de 1930. Donde esencialmente se trataba de combinar las propiedades de los compuestos de carbono con los compuestos de silicio, un investigador de Corning Inc. (EE.UU.), J.F. Hyde inventó las siliconas en 1938. La empresa Dow Corning fue fundada en 1943 para explotar la invención que condujo a un gran número de resinas, barnices, elastómeros y otros usos humanos. En 1949, cuando murió Kipping, ya había publicados cerca de 51 artículos sobre el tema.<sup>55</sup>



**Fig.1.27.** Estructura del polidimetilsiloxano y su reticulación.

### 1.12. Polipropileno

El polipropileno (PP) es un polímero termoplástico, parcialmente cristalino, que se obtiene a través de la polimerización del propileno (o propeno), clasificándolo como

<sup>55</sup> <https://es.wikipedia.org/wiki/Silicona#Origen>

un homopolímero el cual tiene gran resistencia contra diversos disolventes químicos, así como contra álcalis y ácidos. Pertenece al grupo de las poliolefinas y es utilizado en una amplia variedad de aplicaciones que incluyen empaques para alimentos, tejidos, equipo de laboratorio, componentes automotrices, implantes médicos, prótesis, dispositivos médicos<sup>56, 57</sup> y películas transparentes (de baja cristalinidad o delgadas del orden de micras).<sup>58</sup>

El PP obtenido mediante la polimerización de propileno puede ser obtenido con diferente estereoquímica denominada tacticidad a lo largo de su cadena polimérica. Según su tacticidad, se distinguen tres tipos (Fig. 1.28):

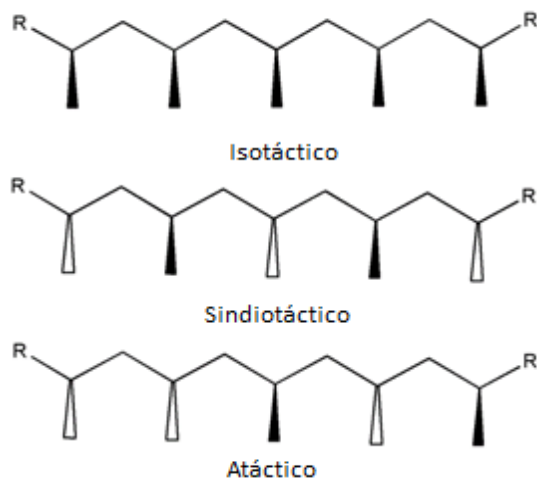
- **PP isotáctico.** La distribución regular de los grupos metilo le otorga una alta cristalinidad entre 70 y 85%, gran resistencia mecánica y gran tenacidad. Es el tipo más utilizado hoy día en inyección de piezas y en extrusión.
- **PP sindiotáctico.** Muy poco cristalino, teniendo los grupos metilos acomodados en forma alterna, lo cual le hace ser más elástico que el PP isotáctico pero también menos resistente.
- **PP atáctico.** Material de propileno que polimeriza dejando los metilos laterales espacialmente en desorden tal como se muestra en la Fig. 1.28. Este polímero tiene una "pegajosidad" que permite adherirse en superficies aun en presencia de polvo, por lo cual se utiliza como una goma en papeles adheribles, o como base para los adhesivos en fundido ("hot melt" o barras de "silicón").

---

<sup>56</sup> V. Iakovlev, S. Guelcher, R. Bendavid, Degradation of polypropylene in vivo: A microscopic analysis of meshes explanted from patients, J. Biom. Mater. Res.B: Applied Biomaterials, 2015, 105, 237

<sup>57</sup> UPDATE on Serious Complications Associated with Transvaginal Placement of Surgical Mesh for Pelvic Organ Prolapse: FDA Safety Communication, FDA, July 13, 2011

<sup>58</sup> P. Collinet, F. Belot, P. Debodinance, E.H. Duc, Jean-Philippe, M. Cosson, Transvaginal mesh technique for pelvic organ prolapse repair: mesh exposure management and risk factors, Inter. Urogynecology Journal, 2006, 17, 315



**Fig.1.28.** Estructuras químicas del polipropileno isotáctico, sindiotáctico y atáctico.

### **1.13. Reacciones de injerto generadas por rayos gamma y sus aplicaciones**

La polimerización de injerto ofrece algunas ventajas en comparación con otras formas de obtener nuevos materiales poliméricos siendo una de las más importantes la modificación superficial del polímero matriz. La manera de realizar polimerizaciones de injerto es dependiente del tipo de polímero matriz ya que ciertas matrices poliméricas permiten polimerizaciones de injerto mediante iniciadores químicos tales como AIBN, peróxidos, así como la combinación de estos con iones metálicos que favorecen la formación de radicales libres sobre el material matriz, por ejemplo,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ce}^{4+}$ , etc. Lamentablemente este tipo de iniciadores no garantizan el éxito de dicha reacción ya que en materiales que son demasiado inertes químicamente tales como PP (polipropileno), PE (polietileno), SR (hule de silicona), PTF (politetrafluoroetileno) y Nylon (poliamida) siendo estos los más utilizados en consumibles médicos tales como catéteres, mallas, jeringas, prótesis, hilos de sutura, etc., esta llega a ser prácticamente imposible.

A pesar de dicha dificultad otro tipo de iniciadores han permitido llevar a cabo dicha tarea exitosamente, siendo estos iniciadores plasma, bombardeo de electrones, luz

UV,<sup>59</sup> rayos X y rayos gamma, aunque estos no son propiamente iniciadores químicos pueden realizar dicha tarea facilitando la formación de radicales libres sobre la matriz debido a la alta energía de estos. Esta forma de llevar a cabo la reacción de polimerización ofrece ciertas ventajas ya que no requiere otro compuesto químico como iniciador o catalizador, permitiendo obtener el producto de manera más pura ya que este no contamina el polímero obtenido siendo una ventaja enorme en aplicaciones médicas y alimenticias. Los métodos que ofrece los rayos gamma para llevar a cabo reacciones de polimerización de injerto son básicamente dos, ya sea de manera directa o mediante *pre*-irradiación oxidativa.

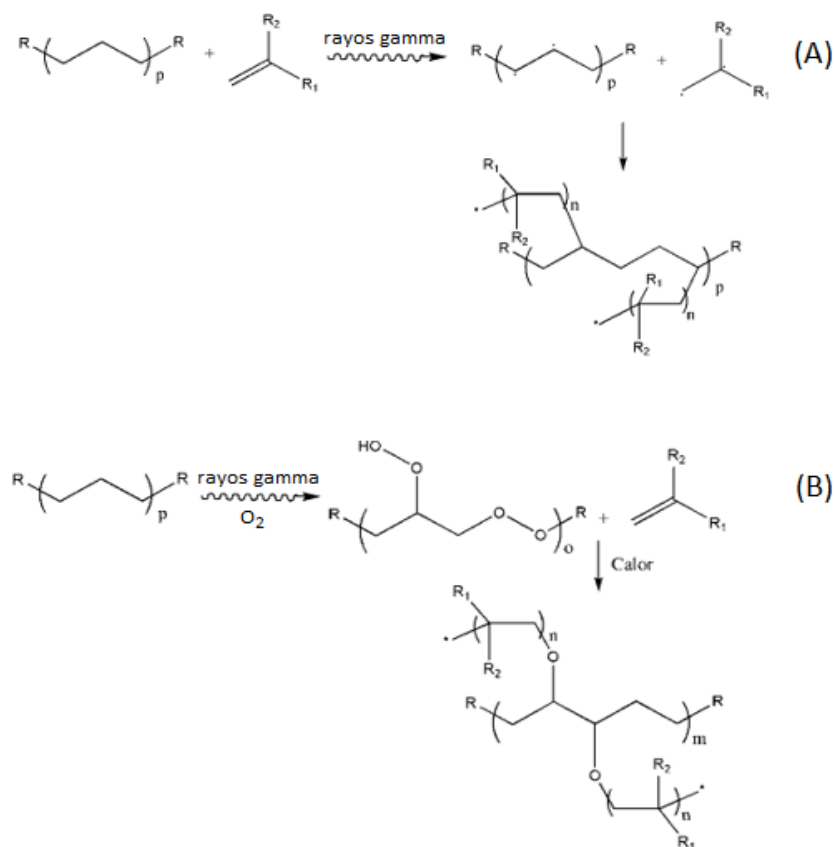
El método directo, es realizado mediante el mezclado de la matriz con los monómeros o solución de monómeros para después ser expuestos a rayos gamma los cuales cumplen el papel de llevar a cabo la polimerización de injerto (Fig. 1.29A). El segundo método que se puede utilizar para realizar dicha polimerización de injerto es mediante uso de *pre*-irradiación oxidativa, esta técnica bastante diferente al método directo ya que es necesario generar una oxidación de la muestra en presencia de oxígeno y rayos gamma, produciendo especies reactivas tales como peróxidos e hidroperóxidos, los cuales actúan como iniciadores químicos de la reacción de injerto en la matriz (Fig. 1.29B).

Sin embargo, este método puede llegar a ser limitado a cierto tipo de monómeros debido a que es necesario proporcionar al sistema de reacción una alta temperatura para poder realizar dicha reacción, pudiendo así modificar ciertos monómeros sensibles a temperaturas altas.

---

<sup>59</sup> D. He, H. Susanto, M. Ulbricht, Photo-irradiation for preparation, modification and stimulation of polymeric membranes, Progress in Polymer Science, 2009, 34, 62





**Fig. 1.29.** Esquemas de probable mecanismo de reacción de las polymerizaciones por método directo (A) y método de *pre*-irradiación oxidativa (B).

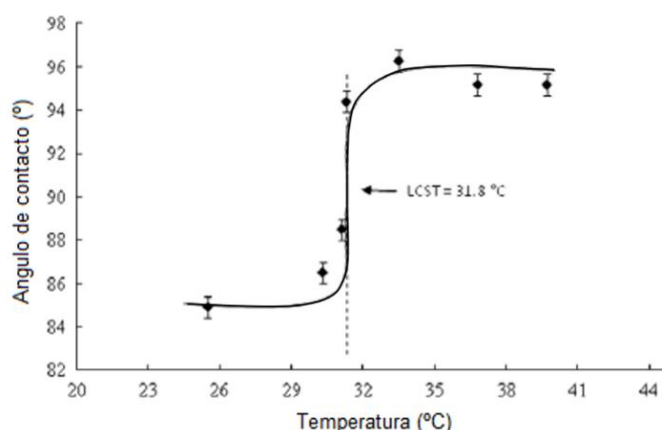
La polymerización de injerto mediante rayos gamma ha permitido la modificación de una gran variedad de matrices poliméricas sintéticas especialmente aquellas que tiene una baja reactividad, así como naturales usando una amplia variedad de monómeros debido a su versatilidad ya que como se había mencionado anteriormente, es posible usar el método directo o el método de *pre*-irradiación oxidativa para realizar dicha polymerización de injerto. A partir de estas reacciones de polymerización de injerto se pueden mejorar las propiedades químicas,<sup>60</sup> físicas<sup>61, 62</sup> así como de biocompatibilidad de la matriz.

<sup>60</sup> B. Penga, X. Hanb, H. Liub, R.C. Berryc, K.C. Tama, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 2013, 421, 142

<sup>61</sup> F. Liu, R. Wang, Y. Cheng, X. Jiang, Q. Zhang, M. Zhu, Thin Solid Films, 2010, 518, 4136

<sup>62</sup> C.M. Cirtiu, T. Raychoudhuryb, S. Ghoshalb, A. Moores, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 2011, 390, 95

En algunos casos también es posible modificar la hidrofiliidad del material mediante un polímero de injerto inteligente, tal es el caso de las películas de polipropileno desarrolladas por García-Uriostegui *et al.*<sup>63</sup> las cuales fueron injertadas con un copolímero de NIPAAm y acriloxisuccinimida. En la Fig. 1.30. se puede observar el cambio del ángulo de contacto que se encuentra fuertemente relacionado con la hidrofiliidad del material en función de la temperatura, siendo esto debido a la LSCT que presenta el copolímero de injerto.



**Fig. 1.30.** Comportamiento de la hidrofiliidad de un polímero termosensible en función de la temperatura.<sup>63</sup>

Las aplicaciones de estos nuevos materiales son amplias, siendo aplicados en secuestrar metales pesados, liberación de fármacos,<sup>64</sup> inmovilización de enzimas o simplemente para mejorar algunas de sus propiedades que de otra forma sería prácticamente imposible. Los monómeros más utilizados para modificar la hidrofiliidad del polímero matriz han sido, por ejemplo, ácido acrílico (AAc), ácido metacrilico (MAAc), *N*-isopropilacrilamida (NIPAm), *N*-vinilimidazol entre otros, los cuales han sido injertados mediante radiación gamma ya sea por método directo o

<sup>63</sup> L. García-Uriostegui, G. Burillo, E. Bucio, Radiation grafting of NIPAAm and acryloxysuccinimide onto PP films and sequent crosslinking with polylysine, *Eur. Polym. J.*, 2010, 46, 1074

<sup>64</sup>J.F. Almeida, P. Ferreira, P. Alves, A. Lopes, M.H. Gil, Synthesis of a dextran based thermo-sensitive drug delivery system, *Inter. J. of Biol. Macromol.*, 2013, 61, 150

por el método de *pre*-irradiación oxidativa, usando como matrices polisilanos,<sup>65</sup> yute,<sup>66</sup> celulosa,<sup>67</sup> poli(floruro de vinilo),<sup>68</sup> entre otros.

Sin embargo, estos monómeros no solo han sido utilizados para modificar la hidrofiliidad de los materiales matriz sino también para generar polímeros de injerto inteligentes. Los cuales son ampliamente aplicados en la carga y liberación de fármacos tales como vancomicina,<sup>69</sup> diclofenaco,<sup>70</sup> etc. La carga de los fármacos es posible ya que estos interactúan químicamente con los grupos funcionales del copolímero de injerto en condiciones adecuadas para posteriormente ser liberados a través de un cambio en su medio el cual es llevado a cabo por pH, temperatura, o campo magnético, siendo estas formas de liberación no solo únicas ya que existen otras tales como la competencia por el fármaco tal es el caso del material diseñado por Segura et al.<sup>71</sup> en el cual el fármaco no se libera sino hasta estar en presencia de microorganismo. Sin embargo es posible generar polímero de injerto con actividad antimicrobiana tales como *N*-vinil imidazol<sup>72</sup> el cual inhibe la formación o el crecimiento de microorganismos.

Por otra parte, los polímeros de injerto también son ampliamente aplicados en la quelación de metales pesados o iones presentes en el agua, tales como arsénico,<sup>73</sup>

---

<sup>65</sup> H. Tanaka, Y. Kawade, N. Sato, T. Matsuyama, Synthesis of pH-responsive polysilane with polyelectrolyte side chains through  $\gamma$ -ray-induced graft polymerization, *Radiation Physics and Chemistry*, 2012, 81, 185

<sup>66</sup> M. S. Hassan, Removal of reactive dyes from textile waste water by immobilized chitosan up on grafted Jute fibers with acrylic acid by gamma irradiation, *Radiation Physics and Chemistry*, 2015, 115, 55

<sup>67</sup> J.F. Madrid, L.V. Abad, Modification of microcrystalline cellulose by gamma radiation-induced grafting, *Radiation Physics and Chemistry*, 2015, 115, 143

<sup>68</sup> I. Kaur, V. Kumari, B. Sharma, N. Gupta, Characterization and applications of PVF film grafted with binary mixture of methacrylic acid and 4-vinylpyridine by gamma radiations: Effect of swift the heavy ions, *Applied Radiation and Isotopes*, 2013, 79, 118

<sup>69</sup> F. Muñoz-Muñoz, E. Bucio, B. Magariños, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, Temperature- and pH-sensitive IPNs grafted onto polyurethane by gamma radiation for antimicrobial drug-eluting insertable devices, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2014, 39992

<sup>70</sup> H. Magaña, K. Palomino, J.M. Cornejo-Bravo, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, E. Bucio, Radiation-grafting of acrylamide onto silicone rubber films for diclofenac delivery, *Radiation Physics and Chemistry*, 2015, 107, 164

<sup>71</sup> T. Segura, A.M. Puga, G. Burillo, J. Llovo, G. Brackman, T. Coenye, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, Materials with fungi-inspired surface for efficient binding and fungi-sensitive release of antifungal agents, *Biomacromolecules*, 2014, 15, 1860

<sup>72</sup> H. El-Hamshary, M.M.G. Fouda, M. Moydeen, M.H. El-Newehy, S.S. Al-Deyab, A. Abdel-Megeed, Synthesis and antibacterial of carboxymethyl starch-grafted poly(vinyl imidazole) against some plant pathogens, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 72, 1466

<sup>73</sup> T. Thi Hanh, H. ThucHuy, N. Quoc Hien, Pre-irradiation grafting of acrylonitrile onto chitin for adsorption of arsenic in water, *Radiation Physics and Chemistry*, 2015, 106, 235

fosfatos,<sup>74</sup> hierro, níquel, cadmio, plomo, uranio, cobre,<sup>75</sup> calcio, magnesio, entre otros.

Los polímeros de injerto también son utilizados para proveer grupos químicos reactivos los cuales son empleados en la síntesis de nuevas estructuras químicas en el polímero matriz siento esta una enorme ventaja ya que de otro modo sería prácticamente imposible hacerlo solo a través del monómero usado para generar el polímero de injerto. Algunos de estos monómeros usados para proveer grupos químicos reactivos son por ejemplo metacrilato de glicidilo (GMA)<sup>76</sup>, cloruro de metacrilato, los cuales permiten una gran variedad de reacciones de nucleofílicas, permitiendo así unir covalentemente moléculas o biomoléculas complejas tales como  $\beta$ -ciclodextrinas,<sup>30</sup> enzimas, quelantes, partículas metálicas.

## **2. Hipótesis**

La modificación de las películas de hule de silicona (SR) y polipropileno (PP) mediante injerto de dimetacrilato de etilenglicol y metacrilato de glicidilo (EGDMA/GMA) podrá permitir mediante posteriores reacciones la inmovilización covalente de lisozima.

### **2.1. Objetivos generales**

- 1 Realizar la modificación de las películas de SR y PP con injerto de EGDMA/GMA mediante radiación gamma.
- 2 Llevar a cabo la inmovilización de lisozima en las películas modificadas de SR y PP.

---

<sup>74</sup> M.M.H. Senna, Y.K. Abdel-Moneam, O.A. Gamal, A. Alarifi, Preparation of membranes based on high-density polyethylene graft copolymers for phosphate anion removal, J. Indus. and Eng. Chem., 2013, 19, 48

<sup>75</sup> T.T. Hong, H. Okabe, Y. Hidaka, K. Hara, Removal of metal ions from aqueous solutions using carboxymethylcellulose/sodium styrene sulfonate gels prepared by radiation grafting, Carbohydrate Polymers, 2017, 157, 335

<sup>76</sup> C.A.B Nava-Ortiz, G. Burillo, A. Concheiro, E. Bucio, N. Matthijs, H. Nelis, T. Coenye, C Alvarez-Lorenzo, Cyclodextrin-functionalized biomaterials loaded with miconazole prevent Candida albicans biofilm formation in vitro, Acta Biomaterialia, 2010, 6, 1398

- 3 Evaluar la actividad enzimática de las películas con lisozima inmovilizada.

## **2.2. Objetivos particulares**

- 1- Realizar el estudio del grado de injerto de EGDMA/GMA en las películas de SR y PP en función de la dosis absorbida, concentración de monómeros, así como del tiempo de reacción y temperatura, si el método lo permite.
- 2- Encontrar las condiciones óptimas para poder llevar a cabo la activación química de las películas de hule de silicona y polipropileno injertadas a través de la adición de grupos amino y formilo, así como las condiciones óptimas de inmovilización de lisozima.
- 3- Llevar a cabo la caracterización de los materiales mediante ángulo de contacto, análisis térmico mediante termogravimetría (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) así como análisis infrarrojo (FTIR-ATR).
- 4- Realizar el estudio de actividad enzimática de la lisozima inmovilizada en las series de películas de SR y PP a diferentes valores de pH, temperatura y mediante ciclos de reusabilidad del material.

## **3. Procedimiento experimental**

### **3.1. Materiales**

Las películas de SR, con una densidad de 1.1 a 1.5 g cm<sup>-3</sup> y 1 mm de espesor, se adquirieron de Goodfellow (Huntingdon, RU), películas de PP isotácticas con 71% de cristalinidad y 1 mm de espesor fueron adquiridas de PEMEX, México. Se adquirió dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), metacrilato de glicidilo (97%), 1,6-diaminohexano, ácido clorhídrico (35%), tetrahidrofurano (THF), glutaraldehído (50%), etilendiamina y cianoborohidruro sódico de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU). La lisozima se obtuvo de MP Biomedicals (Alemania), tolueno y etanol de J.T. Baker (México).

Todos los monómeros se purificaron bajo destilación al vacío antes de ser usados. El etanol, THF y el tolueno fueron de calidad analítica y se obtuvieron de Baker México y estos se usaron sin purificación adicional.

Al glutaraldehído (50%) se eliminó el agua por destilación al vacío antes de su uso en las síntesis de 5,5-dietoxipentanal. La síntesis se realizó usando las siguientes condiciones: 18 g de glutaraldehído, 17 mL de etanol, 18 mL de THF y 100  $\mu$ L de ácido clorhídrico. La mezcla se agitó magnéticamente durante 3 h a una temperatura constante de 65 °C. Después del tiempo de reacción la mezcla de reacción fue pasada por una columna de silica y se usó sin otra purificación adicional.

### **3.2. Equipos**

Los espectros FTIR-ATR se realizaron en las películas previamente secas utilizando un Perkin-Elmer Spectrum 100 (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk CT, EE.UU.) equipado con un accesorio de muestreo ATR universal (cristal DiComp<sup>TM</sup> compuesto por un diamante ATR con selenuro de cinc elemento de enfoque en contacto directo con el diamante). Los análisis termogravimétricos se realizaron usando una TGA Q50 (TA Instruments, New Castle, DE) a una velocidad de calentamiento de 10 °C min<sup>-1</sup> en el intervalo de temperatura de 25 a 800 °C bajo atmósfera de nitrógeno. Los análisis de calorimetría diferencial de barrido se llevaron a cabo en un DSC 2010 (TA Instruments, New Castle, DE) de 25 a 450 °C en atmósfera de nitrógeno con un flujo de 60 mL min<sup>-1</sup> y una velocidad de calentamiento de 10 °C min<sup>-1</sup>. Para medir el ángulo de contacto mediante gota de agua, se utilizó un analizador de forma de gota Kruss DSA 100 (Matthews NC, EE.UU.), el ángulo se registró a 1 y 5 minutos después de que se depositó la gotita de agua bidestilada sobre las películas secas.

### **3.3. Síntesis de las películas SR-g-(EGDMA/GMA)**

Una película SR (1 x 2,5 cm) se colocó en una ampolleta con 8 mL de una solución de EGDMA/GMA (1: 1 molar) en tolueno, variando la concentración de monómeros en tolueno de 10 a 100% vol. Las ampolletas se desgasificaron mediante ciclos repetidos de congelación y descongelación (3 veces por 10 minutos cada una) sellándose a vacío. Por último, se expusieron a rayos gamma, a temperatura ambiente, con una intensidad de dosis promedio de 9.5 kGy h<sup>-1</sup> y una dosis de 10 a 100 kGy.<sup>77</sup>

Para extraer los monómeros residuales y el homopolímero formados durante la polimerización de injerto, las muestras se lavaron con etanol durante 48 h (el disolvente se cambió tres veces), seguido por secado a vacío y una temperatura ambiente hasta peso constante.

#### **3.3.1. Estudio de hinchamiento**

El estudio de hinchamiento se realizó para muestras de SR prístinas antes de llevar a cabo la polimerización de injerto. Las muestras prístinas de SR se colocaron en una solución de monómeros-tolueno a diferentes concentraciones como medios de hinchamiento, durante un tiempo de 4 h a temperatura ambiente. Después del tiempo de hinchamiento, las películas se retiraron de la solución y se secaron con papel de filtro y finalmente se pesaron. El porcentaje de hinchamiento se calculó de la siguiente manera:

$$S(\%) = 100 \frac{W_s - W_i}{W_i} \quad (\text{Ec. 1})$$

---

<sup>77</sup> G. Albarrán, E. Mendoza, E. Cruz-Zaragoza, Dosimetría Química de irradiadores gamma de <sup>60</sup>Co y <sup>137</sup>Cs de uso semi-industrial e investigación. Chemical dosimetry in gamma irradiators of <sup>60</sup>Co and <sup>137</sup>Cs for semi-industrial and research purpose, Nova Scientia, 2017, 9, 113 - 133

donde  $W_i$  es el peso de la muestra seca y  $W_s$  es el peso de la muestra hinchada, respectivamente.

### **3.4. Síntesis de las películas PP-g-(EGDMA/GMA)**

Se prepararon las películas de PP injertadas usando el método de *pre*-irradiación oxidativa, para ello fueron colocadas las películas de PP de 1 x 5 cm en una ampollita de vidrio y posteriormente fueron irradiadas en aire con rayos gamma a diferentes dosis absorbidas con una intensidad de dosis promedio de 10.9 kGy h<sup>-1</sup>. A las muestras previamente irradiadas se le agregaron 8 mL de disolución de monómero (EGDMA/GMA, 1:1 mol) a una concentración del 50% vol. en tolueno. Las ampollitas se desgasificaron mediante ciclos repetidos de congelación y descongelación (3 veces por 10 min cada una), finalmente, se sellaron a vacío posteriormente las ampollitas se calentaron en baño maría. El grado de injerto fue estudiado usando diferentes dosis absorbidas (10 a 120 kGy), concentración de monómeros (10 a 100% vol. en tolueno), así como, temperatura (40 a 80 °C) y tiempo de reacción (4 a 24 h). Para extraer los monómeros residuales y el copolímero formado durante la polimerización de injerto, las muestras fueron lavadas con etanol durante 48 h (cambiando el disolvente varias veces), seguido por secado a vacío y a temperatura ambiente hasta peso constante.

En ambos métodos, el porcentaje de injerto también se investigó con diferentes concentraciones de monómero variando el porcentaje molar de GMA de 50 a 100% en mol.

El rendimiento de injerto ( $Y_g$ ) se calculó usando la ecuación 2:

$$Y_g(\%) = 100 \frac{W_g - W_o}{W_o} \quad \text{Ec. 2}$$

donde  $W_o$  y  $W_g$  son los pesos de la película inicial e injertada, respectivamente.



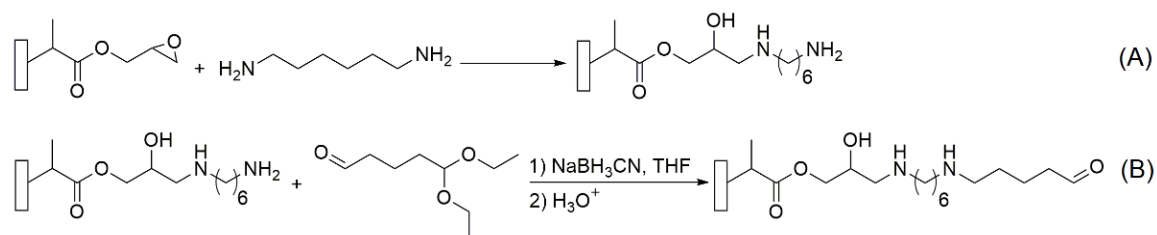
### **3.5. Inmovilización de lisozima**

#### **3.5.1. Activación de películas SR-g-(EGDMA/GMA)**

Se añadieron las 2 muestras circulares de un diámetro de 0.5 cm de SR-g-(EGDMA/GMA) en 3.5 mL de THF y 1.5 mL de 1,6-diaminohexano (0.5 g/1.5 mL), la reacción se llevó a cabo a 85 °C en agitación constante durante 1.5 horas (Fig. 3.5.1A). Cuando se completó la reacción, las películas obtenidas (SR-g-NH) se lavaron con etanol acidificado, y finalmente se continuaron lavando solo con etanol (cambio el disolvente tres veces).

Después, las muestras SR-g-NH se hicieron reaccionar con 1 mL de 5,5-dietoxipentanal mezclado con 1 mL de THF a 25 °C durante un tiempo de reacción de 1 hora. Cuando las películas se retiraron de la reacción se lavaron con THF. Posteriormente, la reducción del grupo imino se realizó en 5 mL de THF seco y 50 mg de cianoborohidruro de sodio durante 1 hora a 20 °C con agitación constante, posteriormente las películas obtenidas (SR-g-Ald) fueron lavadas con agua a temperatura ambiente por 12 h.

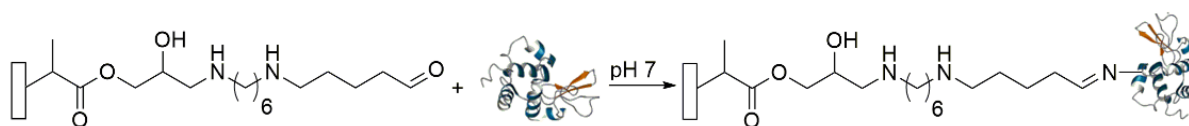
Finalmente, se hidrolizó el grupo cetral utilizando 5 mL de agua destilada y 250 µL de ácido clorhídrico a 65 °C durante 1.5 horas con agitación constante, seguido por lavados de la película (SR-g-Ald) con agua destilada (Fig. 3.5.1B).



**Fig. 3.5.1.** A) esquema de reacción de los grupos epóxidos de la matriz con 1,6-diaminohexano y B) esquema de reacción de los grupos amino de la matriz con 5,5-dietoxipentanal y regeneración del grupo formilo. Las cadenas poliméricas del injerto, así como el EGDMA has sido omitidas para una mejor claridad de imagen.

### 3.5.2. Inmovilización de lisozima en películas SR-g-Ald

Se colocaron dos muestras circulares de SR-g-Ald con un diámetro de 0.5 cm en 2,5 mL de una solución de lisozima con una concentración de  $4 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $\text{pH}=7$ ,  $0.01\text{M}$  a  $5^\circ\text{C}$  durante 72 horas (Fig. 3.5.2.). Después del tiempo de reacción las muestras obtenidas (SR-g-Lys) se lavaron con una solución  $0.1\text{M}$  de  $\text{NaCl}$  tres veces durante 10 minutos cada una, para remover la lisozima no inmovilizada.



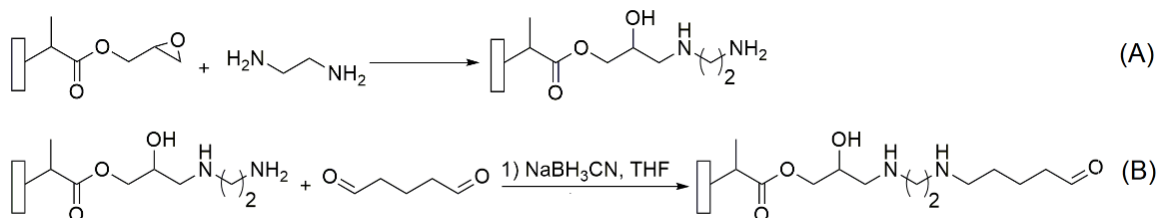
**Fig. 3.5.2.** Esquema de inmovilización de lisozima en la matriz activada con grupos formilo. Las cadenas poliméricas del injerto, así como el EGDMA has sido omitidas para una mejor claridad de imagen.

### 3.5.3. Activación de películas PP-g-(EGDMA/GMA)

La activación de PP-g-(EGDMA/GMA) se dividió en dos etapas, el primer paso fue la reacción con etilendiamina y la segunda fue la reacción con glutaraldehído y reducción de grupos imina.

Se colocó una muestra de PP-g-(EGDMA/GMA) de 1x0.5 cm en 3 mL de THF usando 100  $\mu$ L de etilendiamina, la reacción se llevó a cabo a 60 °C bajo agitación constante durante 4 h (Fig. 3.5.3A). Cuando se completó la reacción, las películas (PP-g-NH) se lavaron primero con agua y posteriormente con etanol.

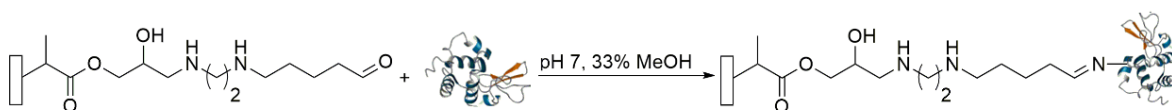
El segundo paso fue la reacción con glutaraldehído, usando 100 mg de solución de glutaraldehído (50%), en 4 mL de THF durante 24 h, la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente en constante agitación. Finalmente, se hizo la reducción de grupos imina usando 50 mg de NaBH<sub>3</sub>CN en 4 mL de THF con un tiempo de reacción de 2 h, después del tiempo de reacción la película (PP-g-Ald) fue lavada con agua destilada (Fig. 3.5.3.B).



**Fig. 3.5.3.** A) esquema de reacción de los grupos epóxidos de la matriz con etilendiamina y B) esquema de reacción de los grupos amino de la matriz con glutaraldehído. Las cadenas poliméricas del injerto, así como el EGDMA han sido omitidas para una mejor claridad de imagen.

### 3.5.4. Inmovilización de lisozima en películas de PP-g-Ald

Finalmente, las películas de PP-g-Ald se colocaron en una solución de lisozima con una concentración de  $2.6 \text{ mg mL}^{-1}$ , usando como medio amortiguador de fosfato pH=7 0.01M con un 33% vol. de metanol. La reacción de inmovilización se mantuvo durante 72 h a  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Después del tiempo de reacción las muestras obtenidas (PP-g-Lys) se lavaron con una solución 0.1M de NaCl tres veces durante 10 minutos cada una, para remover la lisozima no inmovilizada (Fig. 3.5.4).



**Fig. 3.5.4.** Esquema de inmovilización de lisozima en la matriz activada con grupos formilo. Las cadenas poliméricas del injerto, así como del EGDMA han sido omitidas para una mejor claridad de imagen.

### 3.6. Ensayo de actividad enzimática en películas de SR-g-Lys y PP-g-Lys

Las pruebas de actividad enzimática de la lisozima inmovilizada en las películas se llevaron a cabo utilizando  $0.2$  y  $0.5 \text{ cm}^2$  de SR-g-Lys y PP-g-Lys respectivamente lavadas previamente con una solución de NaCl,  $0.1\text{M}$ .

-Las condiciones iniciales para el estudio de selección de la mejor película con actividad enzimática fueron:  $4 \text{ mL}$  de suspensión de *M. lysodeikticus* conteniendo  $0.62 \text{ mg mL}^{-1}$  a pH=7,  $0.01\text{M}$ , monitoreando la disminución de absorbancia a una longitud de onda de  $450 \text{ nm}$ , después de  $4 \text{ h}$ .

-Una vez seleccionada la muestra con la mejor actividad enzimática, los siguientes estudios de actividad fueron realizados usando  $4 \text{ mL}$  de suspensión de *M. lysodeikticus* conteniendo  $0.62 \text{ mg mL}^{-1}$  variando pH ( $5-10$ ), así como la

temperatura (20-70 °C) monitoreando la disminución de absorbancia mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 450 nm, después de 4 h.

La actividad enzimática relativa se calculó utilizando como referencia la película con la mejor actividad enzimática observada de los estudios iniciales realizados utilizando las series de SR-g-Lys y PP-g-Lys. La siguiente ecuación fue utilizada para llevar el cálculo de la actividad enzimática:

$$\text{Actividad enzimática relativa } \% = \frac{Ab_i - Ab_f}{Ab_{iop} - Ab_{fop}} 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

donde  $Ab_i$  es la inicial y  $Ab_f$  es la absorbancia final medida en el medio donde se llevó a cabo el ensayo de actividad enzimática para una película determinada de SR-g-Lys y PP-g-Lys. Las variables  $Ab_{iop}$  y  $Ab_{fop}$  son las absorbancias iniciales y finales registradas para la actividad enzimática óptima de la película de SR-g-Lys y PP-g-Lys.

#### **4. Resultados y discusión**

La metodología aplicada permitió obtener con éxito el polímero de injerto utilizando como monómeros EGDMA y GMA en películas de SR y PP, usando los métodos directo y de *pre*-irradiación mediante rayos gamma.

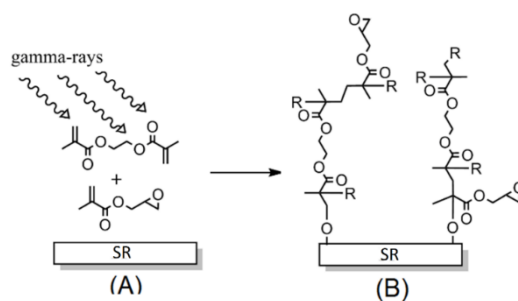
Las películas modificadas por injerto de EGDMA/GMA fueron caracterizadas mediante espectroscopía de infrarrojo, así como de análisis termogravimétrico y por calorimetría diferencial de barrido. Tales técnicas de caracterización corroboraron el éxito de la polimerización de injerto mostrando en el caso del infrarrojo las bandas correspondientes al injerto siendo la banda más característica la correspondiente al grupo carbonilo. En el caso del análisis térmico el TGA ofreció información de la estabilidad térmica del nuevo material obtenido el cual resultó en una combinación de las temperaturas de degradación del injerto de EGDMA/GMA, así como de la matriz utilizada. Este análisis también mostró el grado de injerto de la película, el cual

confirmó el éxito de la cuantificación mediante diferencia de peso usando la ecuación 1. Por otra parte, el DSC solo mostró la transición provocada por el injerto además del punto de fusión en el caso de la matriz de PP.

Por otra parte, algunos experimentos tales como el grado de hinchamiento en las películas de PP no fueron realizados ya que las películas de PP mostraron un grado de hinchamiento despreciable en un tiempo de 2 h, por lo tanto, su grado de hinchamiento no fue estudiado y relacionado con el grado de injerto.

#### 4.1. Injerto de EGDMA/GMA en las películas de SR

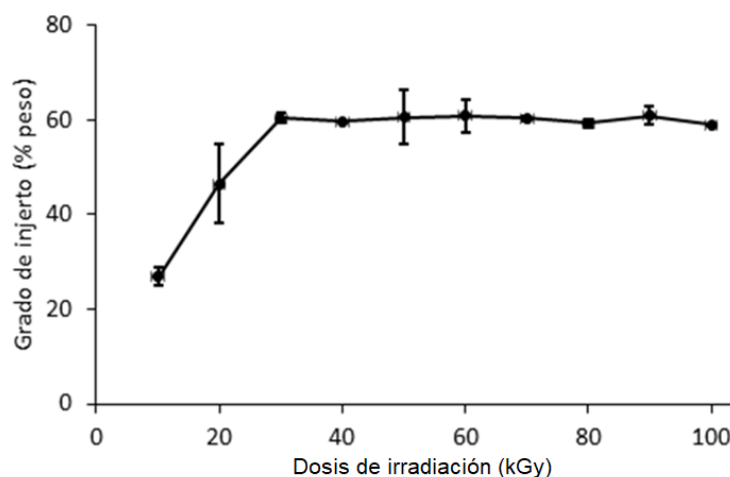
Las películas de SR fueron modificadas por injerto de EGDMA/GMA, mediante el método directo (Fig. 4.1) utilizando diferentes concentraciones de monómeros en tolueno y dosis absorbida, mostrando una considerable dependencia de estas dos variables.



**Fig. 4.1.** Esquema de reacción para la polimerización por injerto de EGDMA/GMA en SR usando radiación gamma como iniciador.

El efecto de la dosis absorbida en el grado de injerto (Fig. 4.2), muestra que al aumentar la dosis de 10 a 30 kGy se genera un aumento del grado de injerto del 27 al 60% respectivamente. Sin embargo, el porcentaje de injerto se mantuvo

considerablemente constante a partir de una dosis absorbida 30 a 100 kGy con un valor promedio de 60.5%, siendo este comportamiento probablemente debido a que en este punto los monómeros fueron consumidos por la reacción de polimerización y por lo tanto el exceso de irradiación gamma solamente provoca reacciones secundarias tales como reticulación o degradación, contribuyendo a la pérdida de las propiedades originales de la matriz de SR.



**Fig. 4.2.** Porcentaje de injerto en función de la dosis de irradiación con una concentración de monómeros en tolueno de 30% vol.

El porcentaje de injerto en la película de SR también fue estudiado variando la concentración de monómeros en tolueno, para ello fue utilizada una dosis absorbida de 30 kGy, ya que utilizando esta dosis se obtiene el máximo porcentaje de injerto con la menor dosis absorbida lo cual garantiza un menor daño a la matriz debido a que no hay un exceso de irradiación gamma.

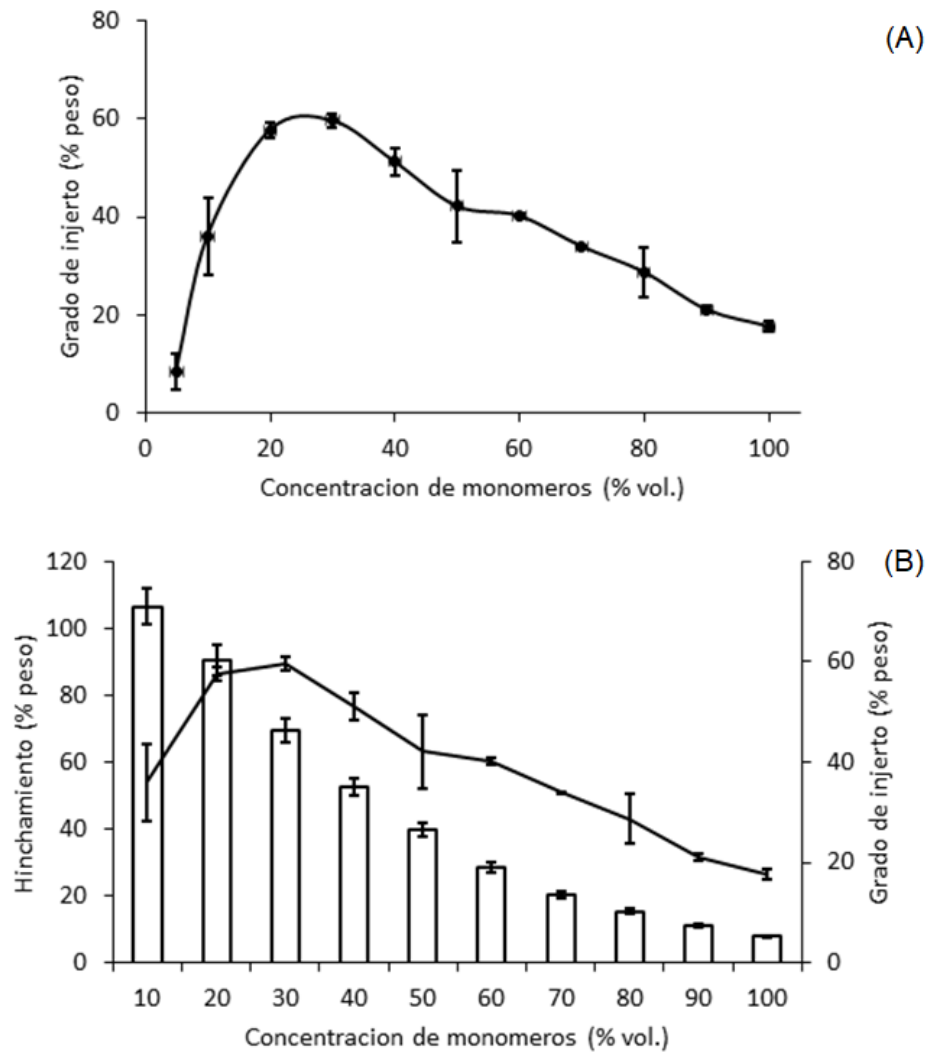
Los resultados muestran que el porcentaje de injerto más alto en relación con la concentración de monómeros fue obtenida a una concentración de 5 a 30% vol. de monómeros en tolueno, y a partir de una concentración del 30% vol. de monómeros comienza haber una disminución del porcentaje de injerto debido a la mala difusión

de los monómeros en la matriz. La difusión de los monómeros en la matriz se ve afectada principalmente por el grado de hinchamiento de la matriz de SR la cual también se ve afectado por la concentración de monómeros dentro del sistema de reacción, además del hecho de que la copolimerización se ve beneficiada aumentando la concentración de monómeros. Este comportamiento se puede observar de manera clara en la Figura 4.3A donde se aprecia el efecto de la concentración de monómeros en el grado de injerto.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede decir que la concentración al 30% vol. de monómeros en tolueno, es la concentración óptima donde la película se hincha lo suficiente para permitir una buena difusión de los monómeros y la concentración es la adecuada para generar la polimerización de injerto (Fig. 4.3B). Por último, un aumento en la concentración de monómeros llevó a injertos que eran visiblemente no homogéneos, probablemente debido a la mala difusión de estos en la película.

Es importante mencionar que, para obtener una buena reproducibilidad del porcentaje de injerto, es esencial permitir que la película de SR llegara a su límite de hinchamiento antes de iniciar la polimerización de injerto; de otro modo, el grado de reproducibilidad llega a ser muy malo mostrando una desviación estándar de hasta un 15%.



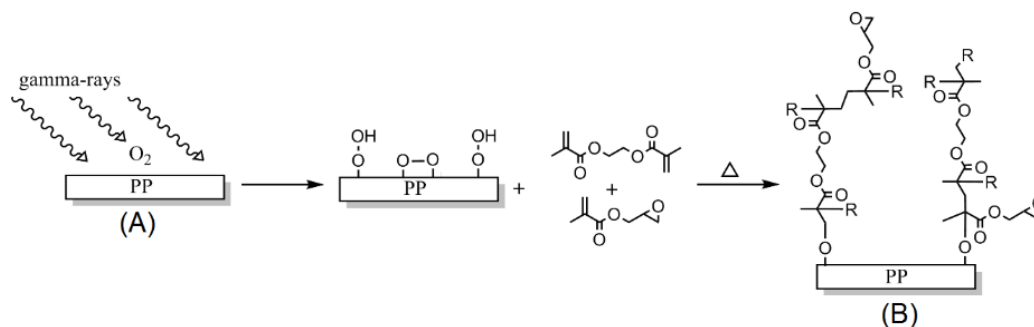


**Fig. 4.3.** A) porcentaje de injerto en función de la concentración de monómeros usando una dosis absorbida de 30 kGy y B) porcentaje de hinchamiento y porcentaje de injerto como una función del medio en el que la polimerización de injerto se llevó a cabo.

#### 4.2. Injerto de EGDMA/GMA en las películas de PP

Para el caso de las películas de PP, el injerto fue llevado a cabo de manera diferente usando el método de *pre-irradiación oxidativa*, ya que los primeros intentos para generar el injerto de EGDMA/GMA se hicieron mediante el método directo,

lamentablemente, no fue posible debido a la baja reactividad de las películas de PP en comparación con las películas de SR, dando como resultado sólo la formación de copolímero sin llevar a cabo la polimerización de injerto en las películas de PP.

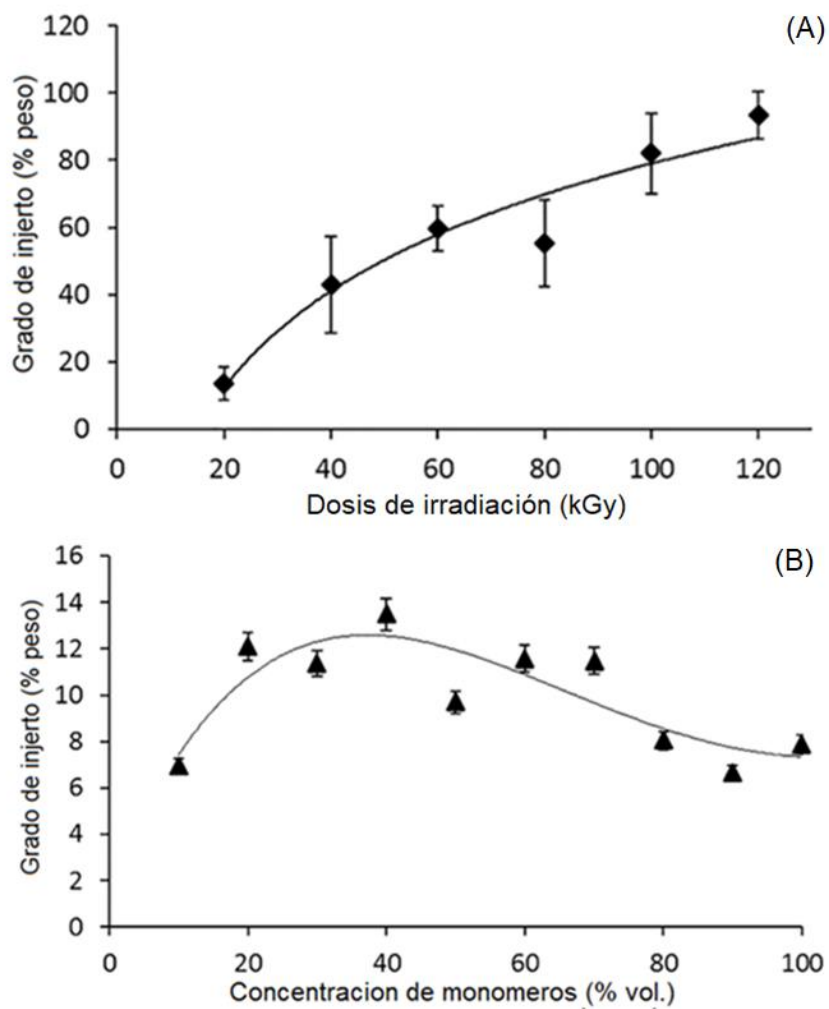


**Fig. 4.4.** Esquema de reacción de injerto por el método de *pre*-irradiación oxidativa. A) PP-film y B) PP-*g*-(EGDMA/GMA).

Por lo tanto, el método de *pre*-irradiación oxidativa ofreció una enorme ventaja debido a que los sitios reactivos son generados antes de iniciar la polimerización de injerto la cual se llevó a cabo posteriormente de manera térmica (Fig. 4.4.). Los sitios reactivos tienen una doble función ya que estos actuaron como el iniciador, así como el lugar de crecimiento de la cadena polimérica de injerto, garantizando de este modo el injerto en la matriz de PP.

La polimerización de injerto fue realizada usando diferentes dosis absorbidas, concentración de monómeros, así como tiempo y temperatura de reacción. El grado de injerto mostro una clara dependencia con cada una de estas variables permitiendo así modificar el grado de injerto cambiando alguna de estas variables. El efecto de la dosis absorbida (Fig. 4.5A) en el grado de injerto mostro una dependencia aparentemente lineal, obteniéndose el máximo grado de injerto a una dosis de irradiación de 120 kGy. La dependencia del grado de injerto fue de acuerdo con lo esperado, ya que altas dosis de irradiación generan una cantidad mayor de sitios

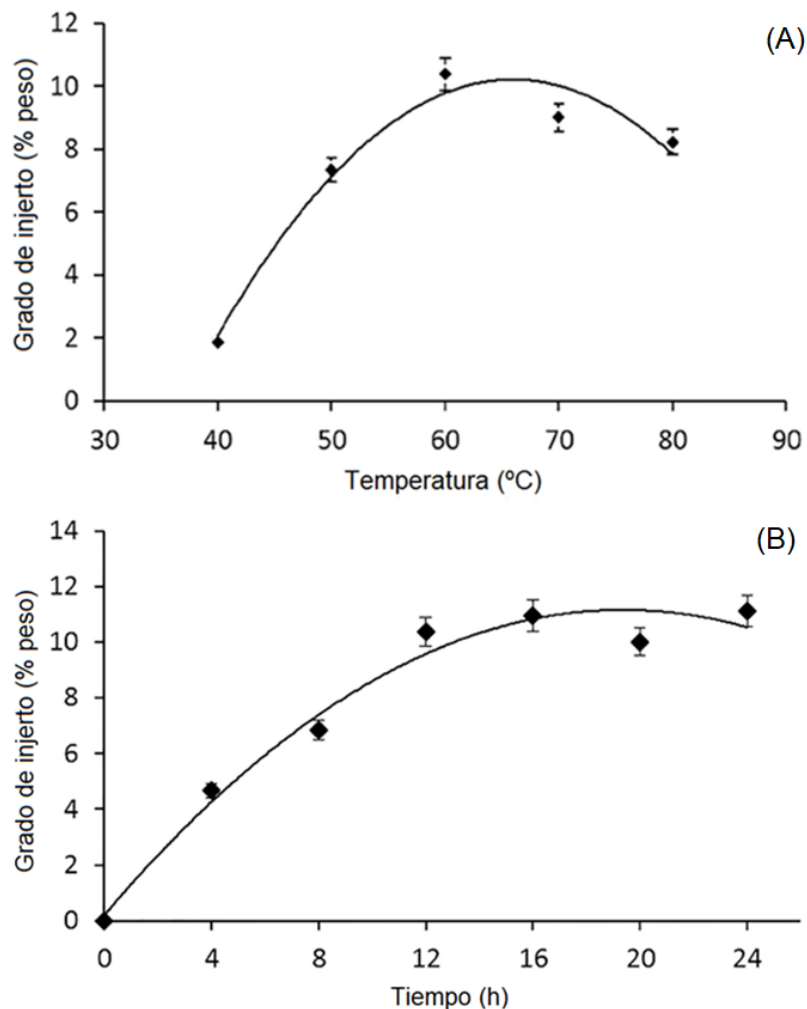
reactivos (peróxidos e hidroperóxidos) en la película de PP los cuales benefician la reacción de injerto.



**Fig. 4.4.** A) porcentaje de injerto en función de la dosis de irradiación, con una concentración de monómeros al 50%, 70 °C y un tiempo de reacción de 22 h y B) porcentaje de injerto en función de la concentración de monómeros, 70 °C, 20 kGy y un tiempo de reacción de 22 h.

Por otra parte, el efecto de la concentración de monómeros en el grado de injerto (Fig. 4.5B) mostró que un intervalo del 20 al 70% vol. de monómeros tuvo un grado de injerto similar de aproximadamente el 11.6% en peso, siendo éste el injerto máximo promedio para este intervalo, donde las películas de PP injertadas fuera de este intervalo de concentración de monómeros no alcanzaron este grado de injerto. Este comportamiento se debe a la baja concentración de monómeros (10% en volumen de monómeros) y en caso contrario a altas concentraciones (80-100% en volumen de monómeros) el grado de injerto es afectado por la mala difusión de los monómeros y la rápida reticulación de estos. En el caso del efecto de la temperatura y tiempo (Fig. 4.6A y B) de reacción en el grado de injerto mostraron que a mayor temperatura y tiempo de reacción la polimerización de injerto es beneficiada incrementando el grado de injerto.

Los estudios realizados demostraron que el grado de injerto tiene una dependencia más estrecha con respecto a la dosis de irradiación que con la concentración de monómeros, temperatura y tiempo de reacción ya que la dosis irradiación es la encargada de limitar el grado máximo de injerto en la película, modulado el grado de injerto mediante otras variables como concentración, tiempo y temperatura de reacción.



**Fig. 4.6.** A) Porcentaje de injerto en función de la temperatura de reacción a una concentración de monómeros al 50% vol., 20 kGy y un tiempo de reacción de 22 h y B) Porcentaje de injerto en función del tiempo de reacción a una concentración de monómeros del 50% vol., 20 kGy y una temperatura de reacción de 70 °C.

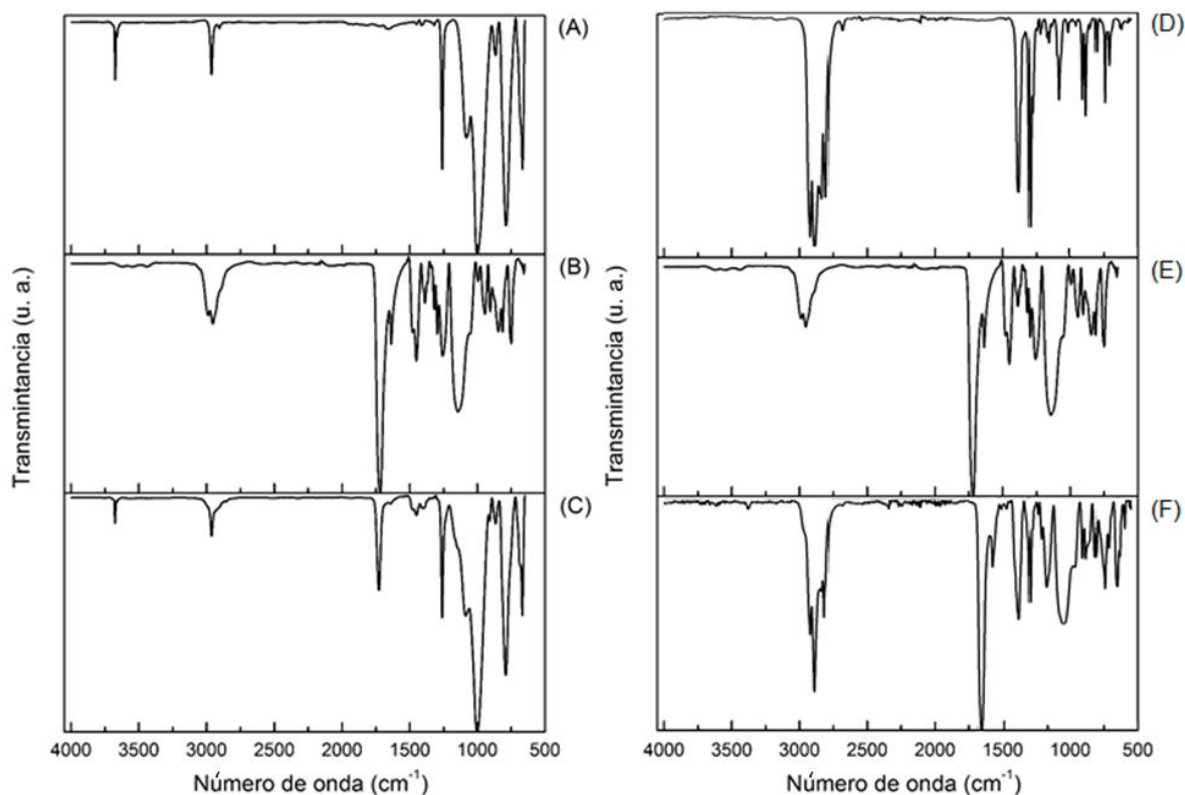
### 4.3. Caracterización de las películas de SR y PP injertadas con EGDMA/GMA

La modificación de las películas de SR y PP fue confirmada inicialmente por FTIR-ATR. Los espectros obtenidos de las películas de SR y PP modificadas confirmaron la incorporación del injerto de EGDMA/GMA (Fig. 4.7C y F) ya que estos mostraron

las bandas características del injerto (Fig. 4.7B y E) siendo la banda más característica la perteneciente a los grupos carbonilo debido a que esta banda solo es particular del injerto de EGDMA/GMA.

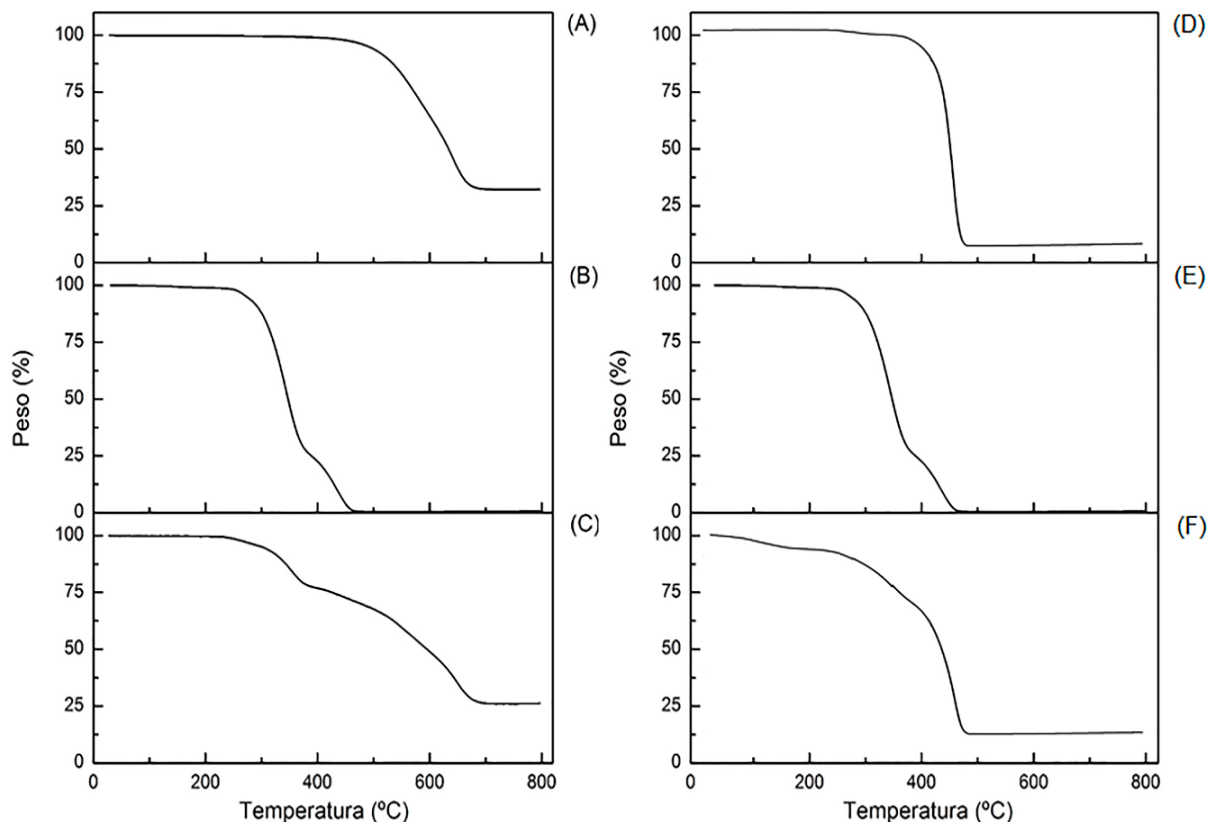
En el espectro de infrarrojo de las películas de SR (Fig. 4.7.C) se observaron las bandas asignadas a los enlaces de -Si-O-Si- ubicadas de 1000 a 1263  $\text{cm}^{-1}$ , y de 1390 a 1486  $\text{cm}^{-1}$  las bandas correspondientes a la vibración de -C-O-. En el caso del espectro de infrarrojo de las películas de PP (Fig. 4.7F) solo se pueden observar las bandas correspondientes a los enlaces alifáticos a 1400  $\text{cm}^{-1}$  C-C y 2900  $\text{cm}^{-1}$  a los enlaces C-H.

Sin embargo, los espectros de infrarrojo de las películas de SR y PP injertadas con EGDMA/GMA mostraron nuevas bandas ubicadas en 1745 y 1728  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a las vibraciones de los grupos carbonilo -C=O del injerto en las películas de SR y PP, en 1646  $\text{cm}^{-1}$  la banda correspondiente los dobles enlaces remanentes del injerto realizado en las películas de PP.



**Fig. 4.7.** Espectros de infrarrojo en condiciones secas, A) SR, B) injerto de EGDMA/GMA, C) SR-*g*-(EGDMA/GMA), D) PP, E) injerto de EGDMA/GMA y F) PP-*g*-(EGDMA/GMA).

El análisis TGA (Fig. 4.8) mostró que el hule de silicona tuvo un proceso de descomposición simple (Fig. 4.8A), mientras que las películas de PP (Fig.4.8D) tuvieron un proceso de descomposición en dos pasos. Las películas injertadas tuvieron una descomposición en varias etapas, donde los dos primeros pasos de descomposición corresponden al injerto de EGDMA/GMA como lo demuestra el termograma del copolímero de EGDMA/GMA en la Figura 4.8B y E, en ambos casos la última etapa de descomposición corresponde a la matriz de SR y PP la cual exhibió una descomposición intermedia inestable para las películas de SR.



**Fig. 4.8.** Análisis de TGA en atmosfera de N<sub>2</sub>, con una rapidez de calentamiento de 10 °C min<sup>-1</sup>, A) SR, B) injerto de EGDMA/GMA, C) SR-*g*-(EGDMA/GMA), D) PP, E) injerto de EGDMA/GMA y F) PP-*g*-(EGDMA/GMA).

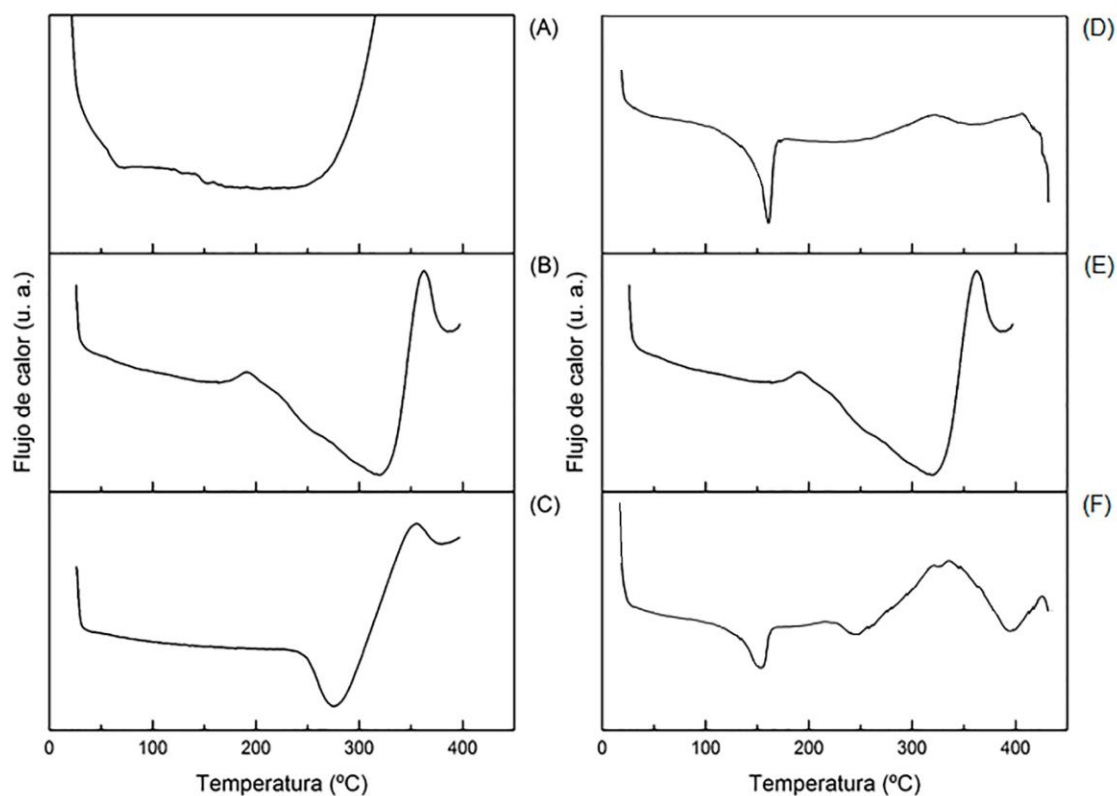
Las temperaturas de descomposición al 10% de pérdida en peso fueron 523.7 y 317.3 °C para la película de SR inicial e injertada respectivamente, finalmente en 411.7 y 276.6 °C para las películas de PP y PP injertadas.

Similares resultados fueron obtenidos del análisis de DSC (Fig. 4.9) el cual mostró que las películas de SR no tuvieron ninguna transición térmica (Fig. 4.9A), mientras que los termogramas de las películas de PP mostraron una temperatura de fusión con un punto de inicio a 150.3 °C (Fig.4.9D). En el caso de las películas de SR injertadas, (Fig. 4.9C), estas tuvieron una transición a una temperatura de 317.3 °C mientras las películas de PP injertadas presentaron una transición adicional a la del



punto de fusión a una temperatura de 235.7 °C (Fig. 4.9F), las cuales fueron asignadas a la descomposición del injerto de EGDMA/GMA, siendo en este caso la temperatura mucho menor para el injerto sobre la película de PP comparado con la del copolímero de EGDMA/GMA.

El estudio DSC además indicó que las propiedades en bulto de la matriz de PP permanecieron a través de todo el proceso de injerto, puesto que los máximos de punto de fusión de las películas mostraron una diferencia media de 12 °C en comparación con las películas de PP modificadas. Lo que indica que el injerto se realizó principalmente en la superficie de PP.



**Fig. 4.9.** Análisis de DSC en atmosfera de N<sub>2</sub> y rapidez de calentamiento de 10 °C min<sup>-1</sup>, A) SR, B) injerto de EGDMA/GMA, C) SR-*g*-(EGDMA/GMA), D) PP, E) injerto de EGDMA/GMA y F) PP-*g*-(EGDMA/GMA).

La Tabla 1 resume los resultados obtenidos del estudio DSC y TGA, las temperaturas de inicio y temperatura máxima de DSC, así como las temperaturas al 10% de pérdida en peso y residuos para TGA.

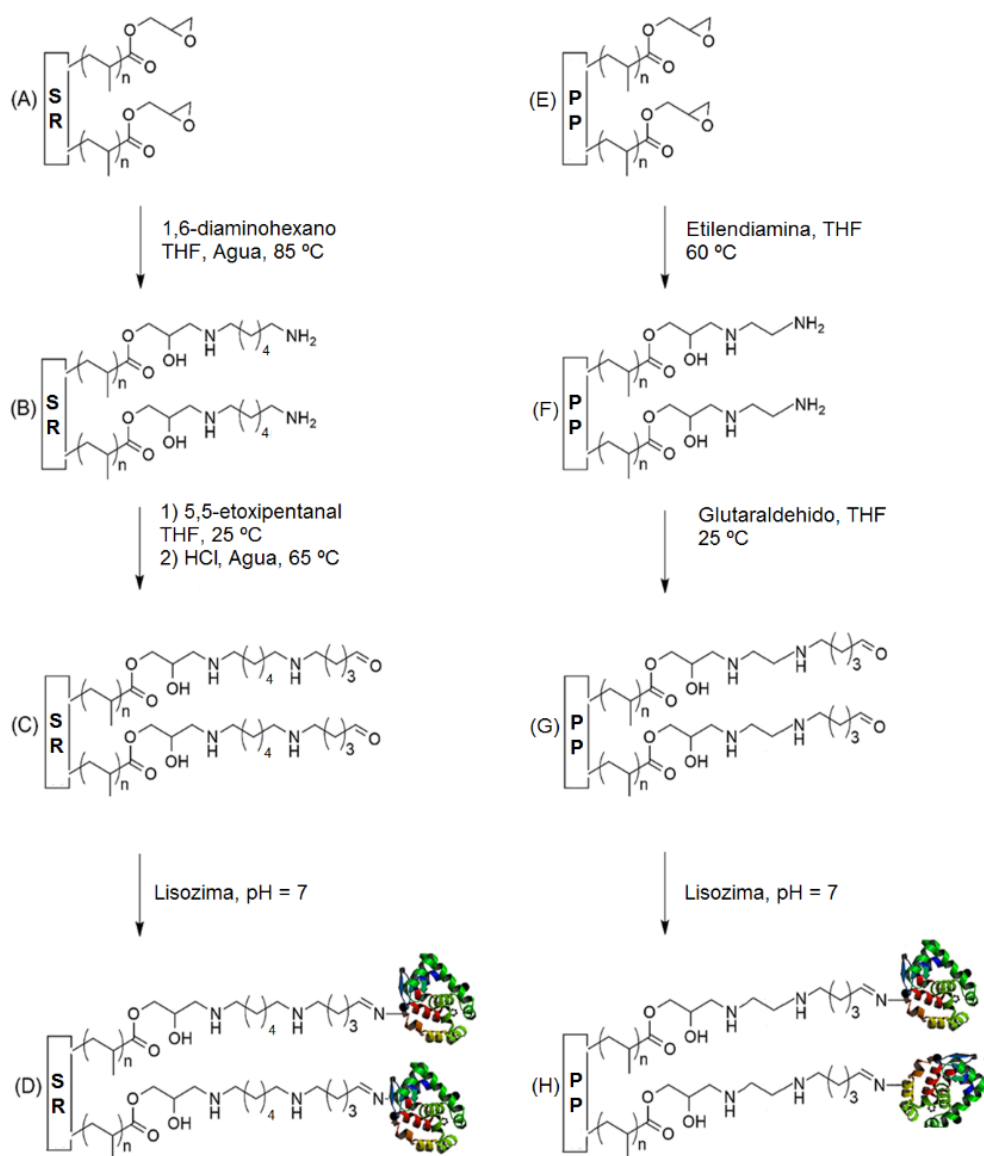
**Tabla 1.** Temperaturas de transición (DSC) y descomposición al 10% de pérdida en peso (TGA) de las películas de SR y PP, así como las películas modificadas por EGDMA/GMA.

<b>Muestra</b>	<b>Análisis DSC punto de fusión (°C)</b>	<b>Análisis TGA temperatura al 10% de pérdida en peso (°C)</b>
<b>Injerto de EGDMA/GMA</b>	294.3	276.6
<b>SR</b>	523.7	523
<b>SR-g-(EGDMA/GMA)</b>	317.3	317
<b>PP</b>	150.3	411.7
<b>PP-g-(EGDMA/GMA)</b>	138.1, 235.7	276.6

#### **4.4. Inmovilización de lisozima**

La activación química fue llevada a cabo usando las películas de SR-g-(EGDMA/GMA) y PP-g-(EGDMA/GMA) obtenidas a diferentes concentraciones de monómeros, en el caso de las películas de PP-g-(EGDMA/GMA) también fueron utilizadas las obtenidas a diferentes dosis de irradiación. La activación química fue realizada mediante reacciones químicas llevadas a cabo en el injerto las cuales proporcionaron grupos formilo, el cual es mucho más reactivo con las aminas de la enzima en comparación con los grupos epóxidos. Este grupo permitió llevar a cabo la inmovilización en condiciones menos agresivas para la enzima (Fig. 4.10).

Sin embargo, a pesar de que el injerto fue realizado usando los mismos monómeros para ambas películas, la reactividad no fue la misma para estas películas, viéndose afectada por el tipo de matriz usada para realizar dicho injerto. Por lo tanto, la activación química, así como la inmovilización de la lisozima fue realizada mediante dos metodologías, donde la activación de las películas de SR-*g*-(EGDMA/GMA) fue realizada mediante 1,6-diaminohexano y 5,5-dietoxipentanal, mientras en el caso de las películas de PP-*g*-(EGDMA/GMA) esta misma metodología no fue posible usarla debido a que todos los intentos realizados no fueron exitosos, probablemente a la hidrofobicidad del material el cual no permitió realizar la apertura de los grupos epóxido mediante 1,6-diaminohexano, en este caso fue necesario utilizar etilendiamina en THF como medio de reacción el cual permitió una mejor interacción con la etilendiamina dando como resultado una reacción exitosa. En el caso de 5,5-dietoxipentanal, al momento de realizar la reacción de formación del aldehído esta resultaba imposible, probablemente debido a que también se llevaba a cabo la hidrólisis del grupo éster, provocando una pérdida total de los grupos que serían utilizados en la inmovilización de la enzima.



**Fig. 4.10.** Esquema general de inmovilización covalente de lisozima en las películas de SR-*g*-(EGDMA/GMA) y PP-*g*-(EGDMA/GMA), A) SR-*g*-(EGDMA/GMA), B) SR-*g*-NH, C) SR-*g*-Ald, D) SR-*g*-Lys, E) PP-*g*-(EGDMA/GMA), F) PP-*g*-NH y G) PP-*g*-Ald y H) PP-*g*-Lys.

La inmovilización de la lisozima fue realizada con las películas de SR-*g*-Ald y PP-*g*-Ald. En el caso de las películas de SR-*g*-Ald estas solo fueron colocadas en una disolución de lisozima ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) a pH=7 (disolución amortiguadora de fosfatos, 0.01M), para el caso de las películas de PP-*g*-Ald la disolución de lisozima ( $1.3 \text{ mg mL}^{-1}$ ) fue realizada al 33% vol. de metanol en disolución amortiguadora de fosfatos (0.01M) pH=7 siendo estas las condiciones con la cuales se obtuvieron los mejores resultados de actividad enzimática.

#### **4.5. Caracterización de las películas de SR-*g*-Lys y PP-*g*-Lys**

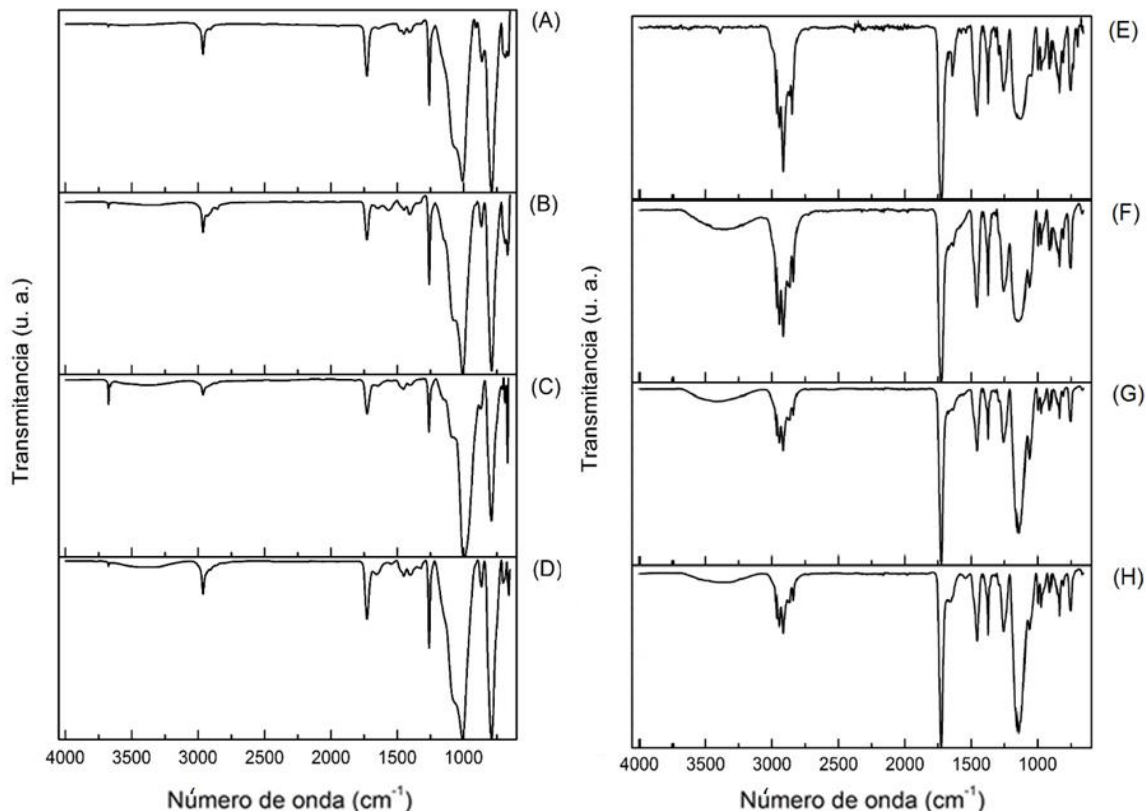
Una vez inmovilizada la lisozima en las películas de SR-*g*-Ald y PP-*g*-Ald a través de enlaces covalentes, estas fueron caracterizadas por distintas técnicas, donde inicialmente se llevó a cabo la caracterización por FTIR-ATR, la cual mostró satisfactoriamente la modificación de la película mediante las reacciones químicas realizadas, así como la inmovilización de la lisozima.

Los espectros de FTIR-ATR se muestran en la Fig. 4.11B donde las bandas más importantes de la incorporación de grupos amino en la película se encontraron en  $3350$  y  $3279 \text{ cm}^{-1}$  asignadas a la vibración de tensión de  $-\text{NH}_2$  y grupos  $-\text{OH}$ , también se observaron las bandas complementarias a las vibraciones de flexión de los enlaces  $-\text{OH}$  y  $-\text{NH}_2$  en  $1560\text{-}1401 \text{ cm}^{-1}$ .

El segundo paso de la activación de las películas de SR-*g*-(EGDMA/GMA) fue llevado a cabo al realizar la reacción de condensación de 5,5-dietoxipental con la película previamente modificada con 1,6-diaminohexano, así como, su posterior reducción con  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  e hidrólisis (SR-*g*-Ald). El espectro de FTIR-ATR es mostrado en la Fig. 4.11C. Para este paso de la activación no fue posible observar diferencias significativas en el espectro de infrarrojo debido a la similitud de grupos funcionales presentes en la película, siendo este el paso final de la activación de las películas para llevar a cabo la inmovilización de lisozima.

Del mismo modo las películas de PP-*g*-(EGDMA/GMA) activadas químicamente mostraron las bandas características de los grupos amino incorporados. La Figura 4.11E muestra el espectro FTIR-ATR para la reacción con etilendiamina que muestra una banda a  $3384\text{ cm}^{-1}$  indicando la presencia de grupos amino a partir de la reacción de adición con etilendiamina, también este espectro mostró las bandas de vibración del enlace  $\text{-NH}_2$  a  $1606$  y  $1546\text{ cm}^{-1}$ . El espectro correspondiente a la reacción de condensación con glutaraldehído en la Figura 4.11D no mostró cambios significativos ya que al igual que las películas de SR, esto es debido a la similitud en las bandas de los grupos funcionales químicos. Sin embargo, la única diferencia se observó en la intensidad de bandas correspondientes al grupo  $\text{-NH}$ , así como, también la banda asignada a los  $\text{-C=C-}$  situada a  $1646\text{ cm}^{-1}$  la cual exhibió una disminución de su intensidad, así como el traslape con la banda situada a  $1728\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al  $\text{-C=O}$ , siendo este comportamiento debido a la presencia de nuevo grupo carbonilo a partir de la reacción con glutaraldehído.

Por otro lado, el espectro de las películas de SR-*g*-Lys y PP-*g*-Lys (Fig. 4.11D y H) mostraron nuevas bandas de intensidad débil en  $1689$  y  $1652\text{ cm}^{-1}$  asignadas a la vibración de tensión del grupo amida I correspondiente a la lisozima, siendo esta banda la más característica de la lisozima, finalmente en  $3350\text{ cm}^{-1}$  la banda muestra un incremento de la intensidad debido a la vibración de tensión de  $\text{-OH}$  y grupos  $\text{-NH}_2$  de la lisozima.



**Fig. 4.11.** Espectro de infrarrojo de las películas de SR y PP en cada paso del proceso de inmovilización de lisozima. A) SR-*g*-(EGDMA/GMA), B) SR-*g*-NH, C) SR-*g*-Ald, D) SR-*g*-Lys, E) PP-*g*-(EGDMA/GMA), F) PP-*g*-NH, G) PP-*g*-Ald y H) PP-*g*-Lys.

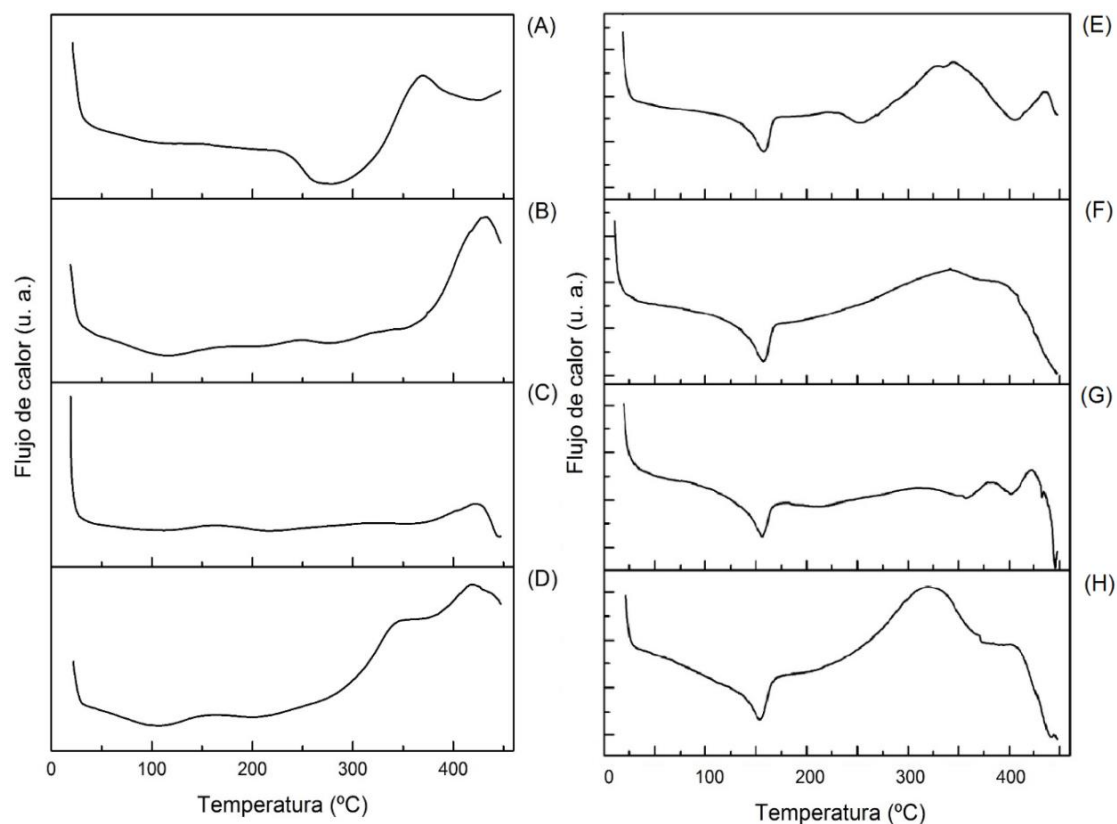
El análisis térmico de las películas injertadas y modificadas por las reacciones químicas se realizó mediante análisis DSC y TGA. El termograma de DSC de las películas de SR injertadas mostró una transición seguida por descomposición a 277.8 °C (Fig. 4.12A), en el caso de las películas de PP injertadas estas mostraron dos transiciones, la primera en 158.0 °C y la segunda transición a 251.8 °C correspondientes al punto de fusión y al injerto de EGDMA/GMA (Fig. 4.12E) seguida al igual que las películas de SR injertadas por descomposición del injerto de EGDMA/GMA.

El proceso de activación química provocó, en el caso de la película de PP-*g*-(EGDMA/GMA), la pérdida de la transición térmica correspondiente al injerto de EGDMA/GMA (Fig. 4.12 F y G), permaneciendo considerablemente constante la temperatura de fusión del PP (Fig. 4.12F y G). Sin embargo, las películas de SR-*g*-Lys mostraron nuevas transiciones (Fig. 4.12D) a 104.0 y 196.9 °C, siendo estas transiciones atribuidas a lisozima inmovilizada en las películas. En el caso de las películas de PP-*g*-Lys (Fig. 4.12H) estas solo mostraron una transición térmica a 153.7 °C.

El estudio DSC además indicó que las propiedades de la matriz de PP permanecieron a través de todo el proceso de funcionalización con lisozima, puesto que los puntos de fusión del PP inicial y del testigo mostraron una diferencia media de 12 °C mostrando que el injerto y la modificación química se realizaron principalmente en la superficie de PP.

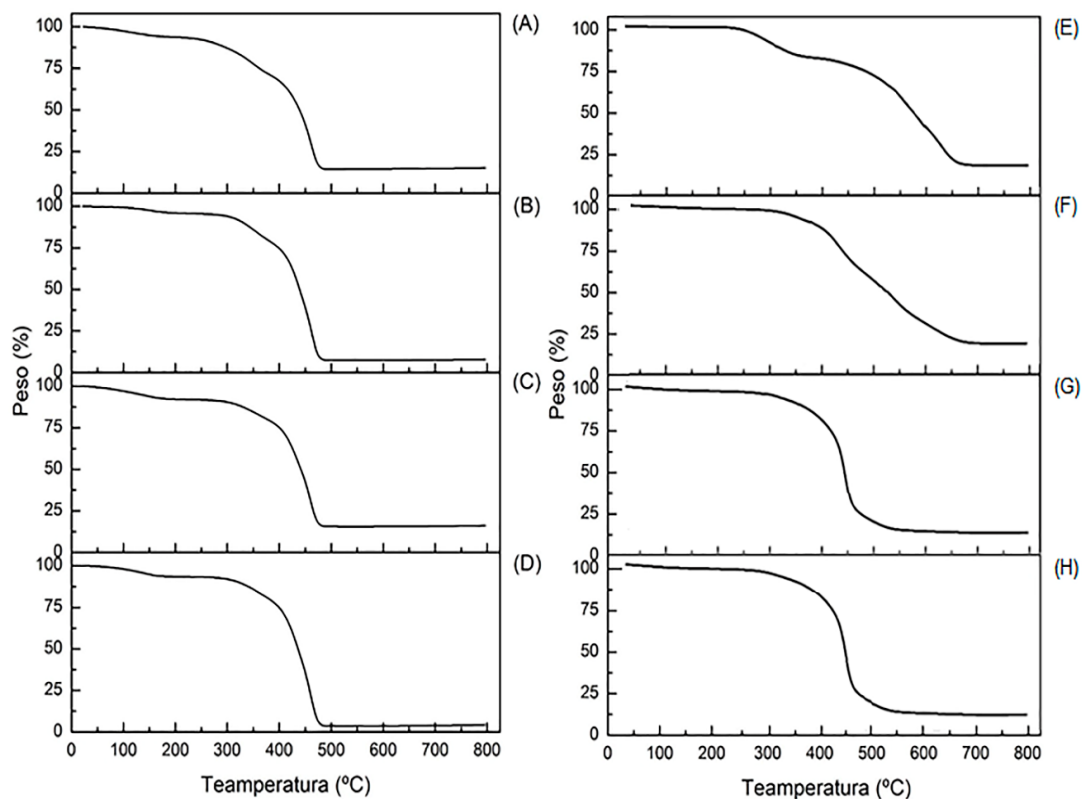
Los estudios de TGA para las películas modificadas mostraron (Fig. 4.13A y E) una descomposición en dos etapas las etapas donde la primera etapa de descomposición térmica corresponde al injerto de EGDMA/GMA en la película (previamente descrito en la sección 4.3), seguida por la descomposición de la matriz (SR y PP). Sin embargo, los termogramas de las películas activadas químicamente (Fig. 4.13B, C, F y G) presentaron temperaturas de descomposición diferentes, mostrando de manera general una mayor estabilidad térmica causada por la modificación química del injerto.





**Fig. 4.12.** Termogramas de DSC de las películas de SR y PP en el proceso de inmovilización de lisozima. A) SR-*g*-(EGDMA/GMA), B) SR-*g*-NH, C) SR-*g*-Ald, D) SR-*g*-Lys, E) PP-*g*-(EGDMA/GMA), F) PP-*g*-NH, G) PP-*g*-Ald y H) PP-*g*-Lys.

Las temperaturas al 10% en pérdida de peso para las películas de SR-*g*-Lys (Fig. 4.13D) mostraron que el injerto es más estable a una temperatura de 57.6 °C. De igual manera, cuando se comparó esta temperatura en las películas de PP-*g*-Lys (Fig. 4.13H) y del PP, se observó una menor estabilidad térmica para el PP mostrando una diferencia de temperatura de 89.3 °C con una pérdida de peso del 10%.



**Fig. 4.13.** Termogramas de TGA de las películas de SR y PP en cada paso del proceso de inmovilización de lisozima. A) SR-*g*-(EGDMA/GMA), B) SR-*g*-NH, C) SR-*g*-Ald, D) SR-*g*-Lys, E) PP-*g*-(EGDMA/GMA), F) PP-*g*-NH, G) PP-*g*-Ald y H) PP-*g*-Lys.

La Tabla 2 resume los resultados obtenidos del estudio DSC y TGA, las temperaturas de inicio y temperatura máxima de DSC, así como las temperaturas a 10% de pérdida de peso y residuos para el estudio de TGA.

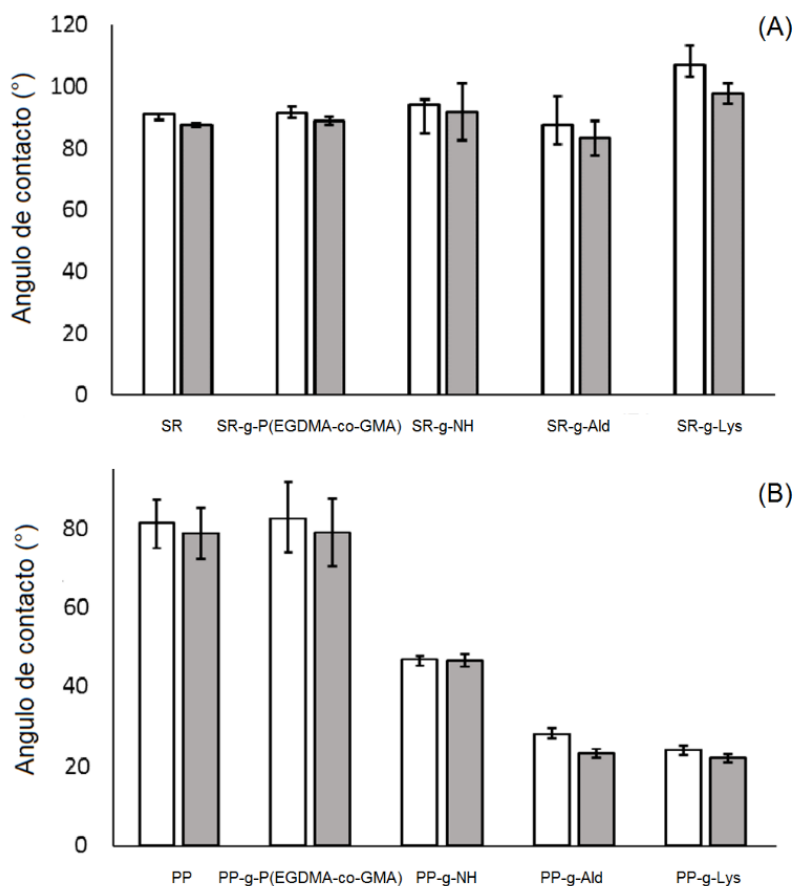
**Tabla 2.** Temperaturas de transición (DSC) y descomposición al 10% de pérdida en peso (TGA) de las películas de SR y PP en el proceso de inmovilización de lisozima.

<b>Muestra</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Temperatura al 10% de pérdida de peso (°C)</b>
<b>SR-g-(EGDMA/GMA)</b>	277.8	317.0
<b>SR-g-NH</b>	118.1, 293.8	379.9
<b>SR-g-Ald</b>	112.0, 194.4	352.3
<b>SR-g-Lys</b>	104.5, 198.6	368.6
<b>PP-g-(EGDMA/GMA)</b>	158.0, 251.8	276.6
<b>PP-g-NH</b>	157.5	331.4
<b>PP-g-Ald</b>	157.0	306.2
<b>PP-g-Lys</b>	153.7	322.4

El estudio de la hidrófilicidad de las películas mediante ángulo de contacto por gota en el proceso de inmovilización de lisozima, no mostró una diferencia significativa de éste para las películas de SR (Fig. 4.14A), incluso en la película SR-g-Lys llego a presentar un ángulo de contacto ligeramente más alto en comparación con las películas anteriores. Las películas de SR inicial y SR-g-(EGDMA/GMA) mostraron un ángulo de contacto de 91.2 ° y 91.4 ° respectivamente. Después del proceso químico, las películas SR siguieron manteniendo un ángulo alto.

En caso de las películas de PP (Fig. 4.14B), el ángulo de contacto por gota de agua mostró los cambios de hidrofobicidad en la superficie del PP provocada por el injerto y las modificaciones químicas, donde el PP testigo y el PP-g-(EGDMA/GMA) mostraron un ángulo de contacto similar de 80 °. Sin embargo, para las películas de PP-g-(EGDMA/GMA) y modificadas químicamente por el proceso de activación, así como la PP-g-Lys mostraron una importante disminución de su ángulo de contacto

siendo este comportamiento acorde a los nuevos grupos químicos incorporados a la superficie de matriz los cuales son más hidrofílicos.



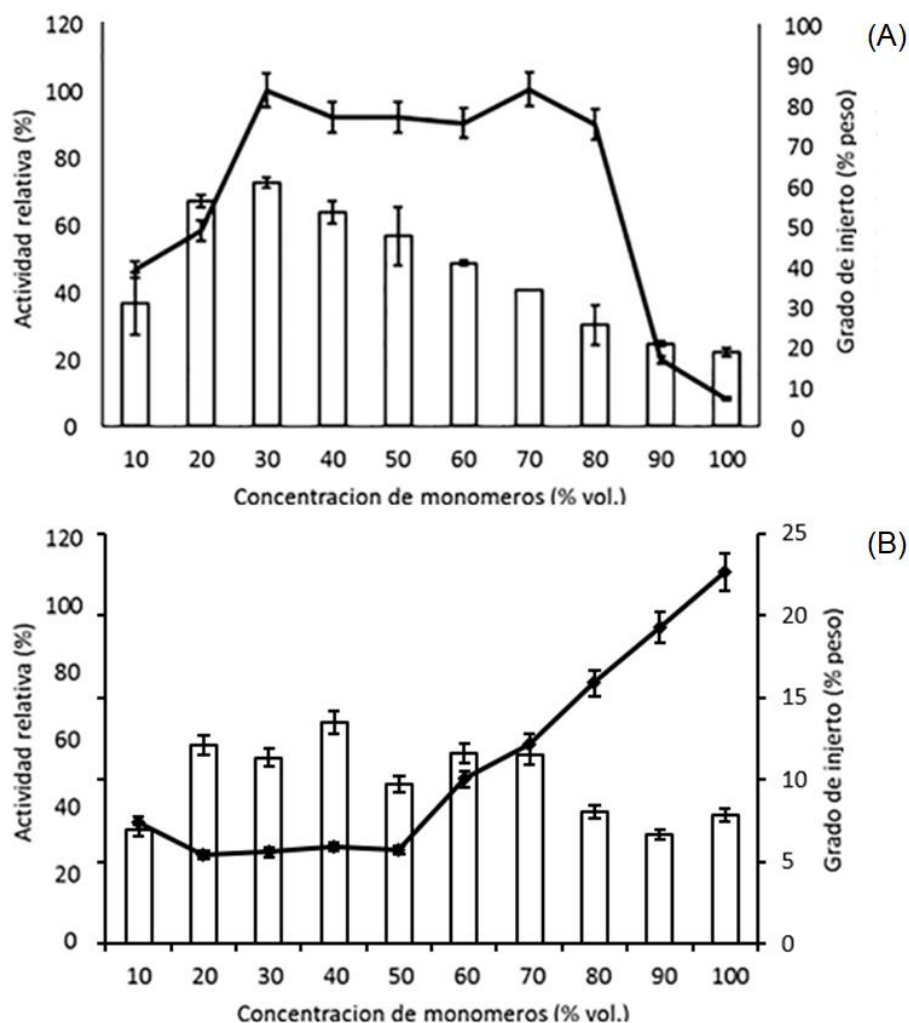
**Fig. 4.14.** Angulo de contacto para las películas de SR (A) y PP (B) en cada paso del proceso de inmovilización de lisozima.

#### **4.6. Actividad enzimática de las series de películas de SR-g-Lys y PP-g-Lys**

El estudio de actividad enzimática inicial fue realizado usando las series de SR-g-Lys y PP-g-Lys. En el caso de las películas de SR-g-Lys éstas fueron sintetizadas con la serie de SR injertadas a diferentes concentraciones de monómeros y para las películas de PP a partir de las series de PP injertadas a diferentes concentraciones

de monómeros y dosis de irradiación. Las condiciones estándar utilizadas fueron 4 mL de una suspensión de *M. Lysodeccticcus* a pH=7 y una temperatura de 30 °C y monitoreada por la disminución de la absorbancia a 450 nm.

Los resultados mostraron que las películas de SR obtenidas usando una concentración de monómeros entre 30 a 80% vol., tuvieron actividades enzimáticas similares (Fig.4.15A); este comportamiento en la actividad de la enzima es debido a que sólo la actividad enzimática se expresó en la superficie de ésta, por lo tanto, la enzima que llegó a ser inmovilizada en la parte interna de la película no benefició la actividad enzimática y lejos de ser útil, esta generó la pérdida de la superficie de la película. Siendo observada esta pérdida de superficie sólo se observó en las películas obtenidas en los sistemas con una concentración de monómero entre 10 a 70% vol., de modo que se utilizó como mejores películas las obtenidas en el sistema con 80% vol., de monómeros en tolueno, ya que estas no mostraron la pérdida de superficie y además presentaron una excelente actividad enzimática.

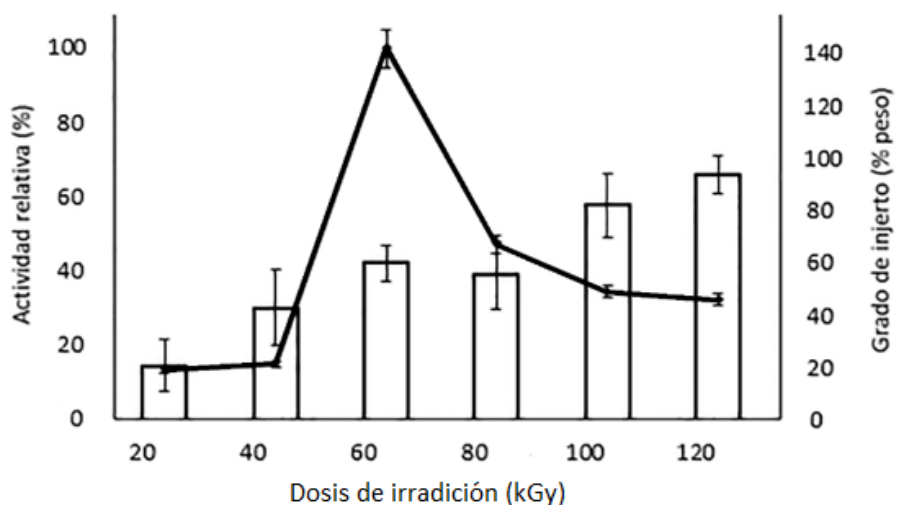


**Fig. 4.15.** Actividad enzimática relativa de las películas injertadas en diferentes concentraciones de monómeros. A) actividad enzimática de las películas de SR-g-Lys y B) actividad enzimática de las películas de PP-g-Lys.

La actividad enzimática de la serie de PP-g-Lys (Fig. 4.15B) mostró una actividad enzimática constante en las películas de PP-g-Lys sintetizadas con las películas de PP-g-(EGDMA/GMA) obtenidas en un intervalo de 10 al 50% vol., posteriormente la actividad enzimática mostró un aumento progresivo (con las películas PP-g-(EGDMA/GMA) obtenidas a partir de una concentración de 60 al 100% vol.). Contrario

a las películas de SR las películas de PP no mostraron una pérdida de la superficie para ninguna de las películas de PP.

En el caso de la serie de PP-*g*-Lys sintetizada con las películas de PP-*g*-(EGDMA/GMA) sintetizadas con diferentes dosis de irradiación, la actividad enzimática no mostró una relación clara con el porcentaje de injerto en la película de PP, ya que solo se observó la máxima actividad enzimática para la película obtenida a una dosis de 60 kGy (Fig. 4.16).



**Fig. 4.16.** Actividad enzimática relativa de las películas de PP-*g*-Lys sintetizadas con las películas de PP-*g*-(EGDMA/GMA) injertadas con diferentes dosis de irradiación.

A partir de estos resultados preliminares de actividad enzimática de las películas de SR-*g*-Lys y PP-*g*-Lys, se seleccionaron las películas de SR-*g*-Lys sintetizadas con las películas injertadas a una concentración de 80% vol. de monómeros y las películas de PP-*g*-Lys injertadas a una dosis de irradiación de 60 kGy, como las muestras óptimas de las series para continuar los estudios de actividad enzimática a diferentes temperaturas y valores de pH. Todos los resultados de actividad enzimática fueron

relacionados con la actividad obtenida en las películas seleccionadas (muestras óptimas) y reportada como actividad enzimática relativa.

#### **4.6.1. Estudio de la actividad de las películas de SR-g-Lys y PP-g-Lys a diferentes valores de pH**

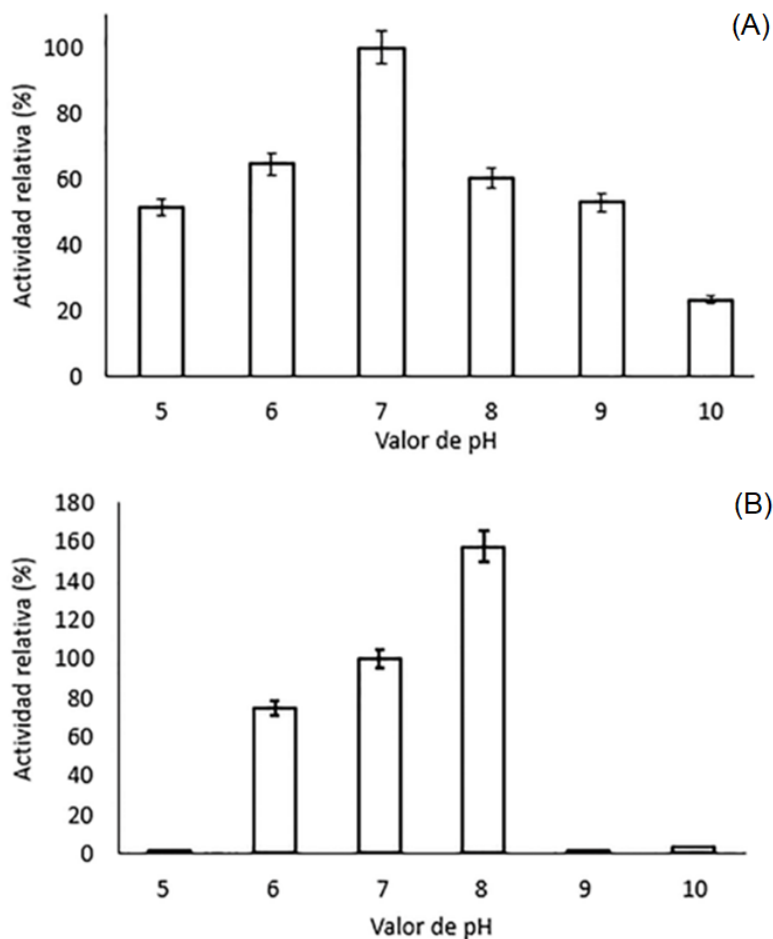
El estudio de actividad enzimática para las películas de SR-g-Lys y PP-g-Lys fue llevado a cabo usando una suspensión de *M. Lysodeccticus* a diferentes valores de pH y una temperatura de 30 °C y monitoreada por la disminución de la absorbancia a 450 nm.

La actividad enzimática de las películas SR-g-Lys a diferentes valores de pH (Fig. 4.17A) mostró su máxima actividad enzimática a un valor de pH=7, siendo considerablemente menor para los demás valores de pH los cuales presentaron una actividad alrededor del 50% con excepción del estudio llevado a cabo a un valor de pH=10, ya que este presentó la menor actividad enzimática relativa con un 20%.

Por otra parte, el estudio de la actividad enzimática a diferentes valores de pH para las películas PP-g-Lys (Fig. 4.17B) mostró un incremento de su actividad enzimática en un intervalo de pH de 6 a 8, obteniéndose a pH=8 la actividad máxima. Sin embargo, a pH =5 y 10 las películas no mostraron actividad enzimática.

Este estudio mostró el efecto de la matriz en la actividad enzimática de la lisozima inmovilizada ya que la lisozima inmovilizada en las películas de SR mostró actividad en un intervalo más amplio de pH comparada con la actividad enzimática de las películas de PP, sin embargo, la actividad enzimática de las películas de SR-g-Lys no aumentó con el incremento del valor de pH.





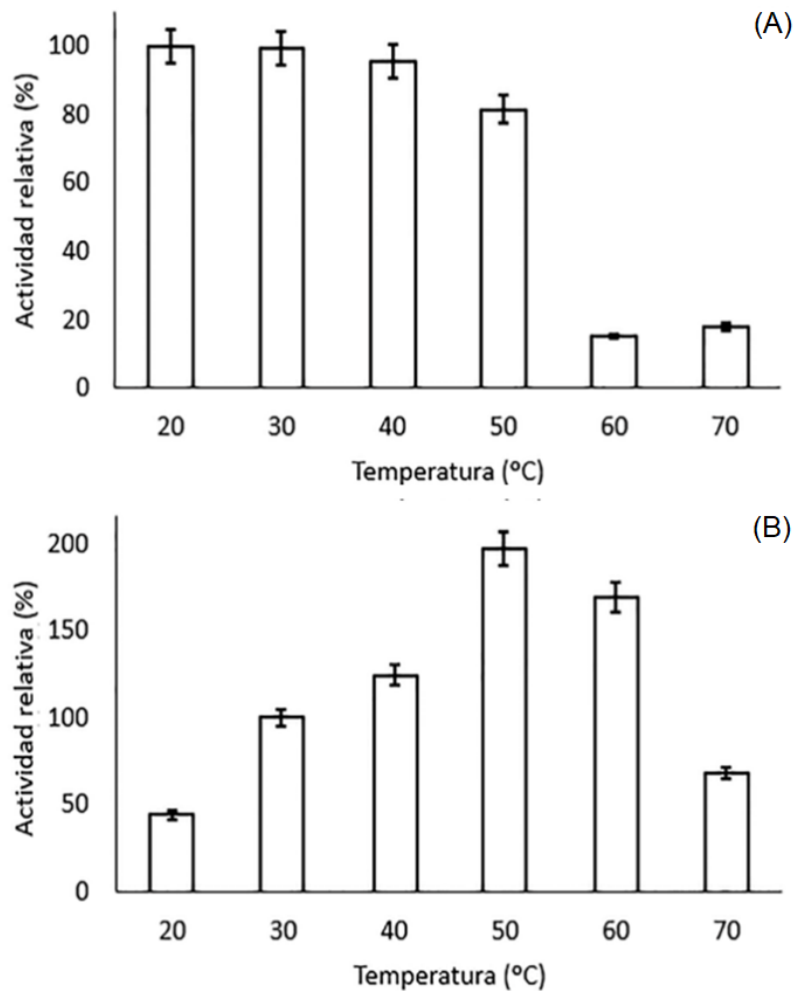
**Fig. 4.17.** Actividad enzimática relativa para las películas de: A) SR-g-Lys y B) PP-g-Lys, a diferentes valores de pH a una temperatura de 30 °C.

#### **4.6.2. Estudio de la actividad de las películas de SR-g-Lys y PP-g-Lys a diferentes temperaturas**

El estudio térmico fue realizado a diferentes temperaturas en un rango de 20 a 70 °C usando 4 mL de suspensión de *M. Lysodeciticus* a un valor de pH=7. Los resultados obtenidos mostraron un comportamiento completamente diferente donde la película de SR-g-Lys mostró una excelente actividad enzimática en un intervalo de temperatura de 20-50 °C mostrando posteriormente a 60 y 70 °C una pérdida de la

actividad hasta un aproximado del 20%, indicando un daño de la lisozima debido a la alta temperatura (Fig. 4.18A).

Por otra parte, la actividad enzimática de la PP-*g*-Lys mostró de manera general un aumento de la actividad enzimática de la lisozima incrementando la temperatura, alcanzando esta su máxima actividad a una temperatura de 50 °C para posteriormente disminuir en las temperaturas de 60 y 70 °C siendo este comportamiento similar al de las películas de SR-*g*-Lys y por lo tanto indicando probablemente a un daño de la lisozima provocado por la alta temperatura. El comportamiento de la actividad enzimática se muestra en la Fig. 4.18B.

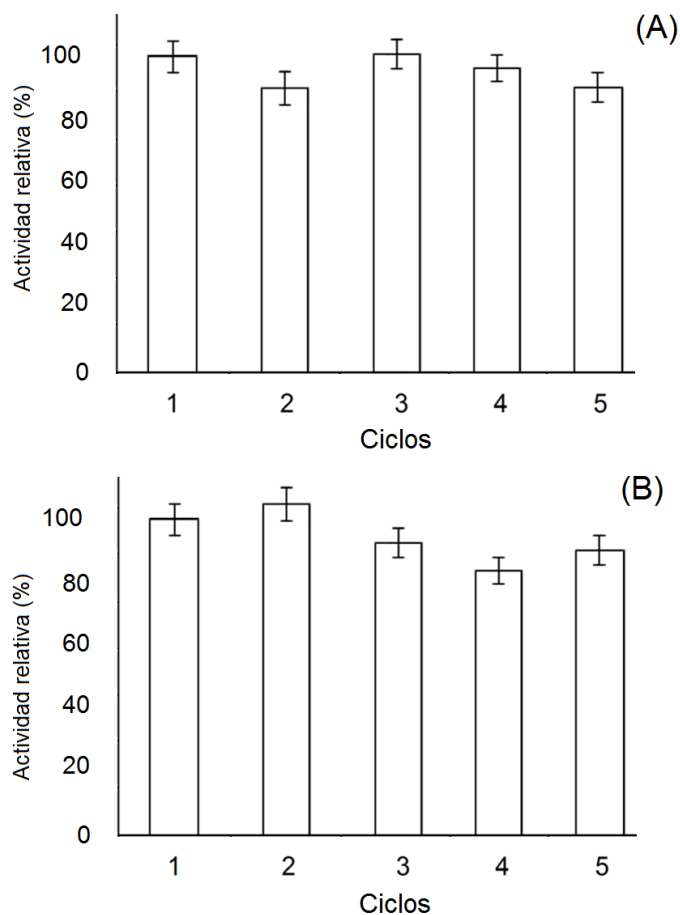


**Fig. 4.18.** Actividad enzimática relativa para las películas de: A) SR-*g*-Lys y B) PP-*g*-Lys, a diferentes temperaturas a un valor de pH=7.

#### **4.6.3. Ciclos de actividad enzimática de las películas de SR-*g*-Lys y PP-*g*-Lys**

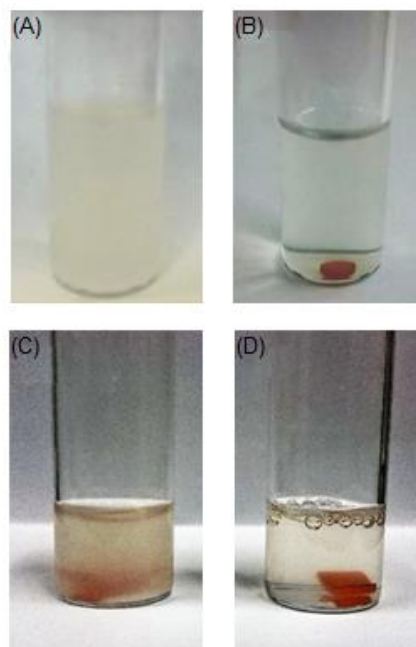
El estudio de reutilización de las SR-*g*-Lys y PP-*g*-Lys (Fig. 4.19) se realizó mediante ciclos utilizando como condiciones pH=6.2 y una temperatura de 30 ° C, los resultados obtenidos no mostraron un cambio considerable en la actividad enzimática después de varios ciclos y este comportamiento fue consistente con la inmovilización de la lisozima sobre las películas debido a que la actividad enzimática no se perdió

después del primer ciclo permitiendo la recuperación de ésta, siendo esta reutilización una ventaja ya que en la mayoría de los casos no es posible recuperar la lisozima libre de medio.



**Fig. 4.19.** Actividad enzimática relativa en diferentes ciclos a pH=6.2, 30 °C, A) SR-g-Lys y B) PP-g-Lys.

La Fig. 4.20 muestra las fotografías de las suspensiones de *M. Lysodeikticus* a tiempo 0 min y después de 100 minutos de haber agregado las películas de SR-g-Lys y PP-g-Lys. La claridad de la suspensión a 100 min se debe a la lisis del *M. Lysodeikticus* causada por la lisozima inmovilizada en las películas.



**Fig. 4.20.** Fotografías de suspensiones de *M. Lysodeikticus* antes (A) y después de la lisis generada por la película de SR-g-Lys (B). Fotografías de suspensiones de *M. Lysodeikticus* antes (C) y después (D) de la lisis generada por la película de PP-g-Lys.

## 5. Conclusiones

El injerto de EGDMA y GMA en las películas de SR y PP se realizó exitosamente mediante radiación gamma utilizando dos métodos diferentes: el método directo y el método de *pre*-irradiación oxidativa para cada una de las matrices debido a la diferencia de reactividad por parte de la matriz, dejando de manera clara la versatilidad de la radiación gamma para poder llevar a cabo de manera directa o indirecta reacciones de polimerización de injerto en matrices sintéticas.

El método de radiación gamma directo en el caso de las películas de SR generó rendimientos de injerto máximo del 60.5% en peso a una dosis de irradiación de 30 kGy y una concentración de monómeros de 30% vol., siendo este grado de injerto

inferior comparado con el obtenido por método de *pre*-irradiación oxidativa para las películas de PP donde el injerto alcanzó hasta un 100% en peso con una dosis de irradiación de 120 kGy con un 50% vol. de monómeros en tolueno, realizándose con éxito el injerto de EGDMA/GMA en las películas de PP por método de *pre*-irradiación oxidativa.

De manera general el grado de injerto mostró una dependencia de la dosis absorbida y la concentración de monómeros, donde altas dosis de irradiación generaron un aumento en el grado de injerto, en el caso de concentración de monómeros el grado máximo de injerto se obtuvo a una concentración de 30 y 50% vol. de monómeros en tolueno para las películas de SR y PP, respectivamente.

Por otra parte, la actividad enzimática de las películas de SR-*g*-Lys y PP-*g*-Lys películas no mostró una dependencia con el grado de injerto en el caso de las películas de SR de la película debido a que sólo la superficie se utilizó para realizar esta tarea, sin embargo, para las películas de PP la actividad enzimática sí mostró una dependencia con el sistema donde se generó el injerto de EGDMA/GMA, no así para su grado de injerto. La actividad de la lisozima en ambas matrices mostró una excelente actividad a un valor de pH=7 y 8, y una temperatura óptima de 40 °C.

Como conclusión final, las películas SR-*g*-Lys y PP-*g*-Lys pueden tener aplicaciones en la manufactura de dispositivos médicos o sistemas de almacenamiento de alimentos.

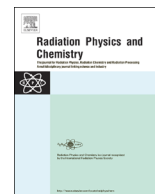
## ***Anexos***



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Radiation Physics and Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/radphyschem](http://www.elsevier.com/locate/radphyschem)

## Radiation-grafting of ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and glycidyl methacrylate (GMA) onto silicone rubber

G.G. Flores-Rojas\*, E. Bucio

Departamento de Química de Radiaciones y Radioquímica, Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México DF 04510, Mexico

## HIGHLIGHTS

- EGDMA/GMA onto SR were obtained by direct gamma-radiation and the chemical method.
- Grafting of SR-g-(EGDMA/GMA) depends on dose, temperature, and monomer concentration.
- SR-g-(EGDMA/GMA) may be suitable for development of the immobilization of enzymes.

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 29 September 2015

Received in revised form

9 May 2016

Accepted 13 May 2016

Available online 14 May 2016

## Keywords:

Graft copolymer

 $\gamma$ -Irradiation

Ethylene glycol dimethacrylate

Glycidyl methacrylate

Radical graft

## ABSTRACT

Silicone rubber (SR) was modified with a graft of ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and glycidyl methacrylate (GMA) using either gamma-radiation or azobisisobutyronitrile (AIBN). The graft efficiency was evaluated as a function of monomer concentration, absorbed dose, reaction temperature, and concentration of AIBN. The hydrophilicity of the grafted films was measured by contact angle and their equilibrium swelling time in ethanol. Additional characterization by infrared (FTIR-ATR) spectroscopy, thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC) is also reported.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

In recent years, there has been remarkable growth in the research and development of synthetic polymers for biomedical, microelectronics, and other advanced technological applications (Rosiak et al., 2003; Lafarge et al., 2013). In the particular case of biomaterials, most polymers that have the desired mechanical properties needed for biological applications tend to have a hydrophobic character, which makes them prone to the attachment of platelets and bacteria, and opens up the necessity to attempt the modification of their surface properties (Uyama et al., 1999). In this context, graft-processing technology represents a useful tool for the modification of polymeric materials because it enables their surface modification with different functional groups such as amides, amines, carboxylic acids or epoxies, without changing their mechanical properties (Muñoz-Muñoz et al., 2012; Alvarez-

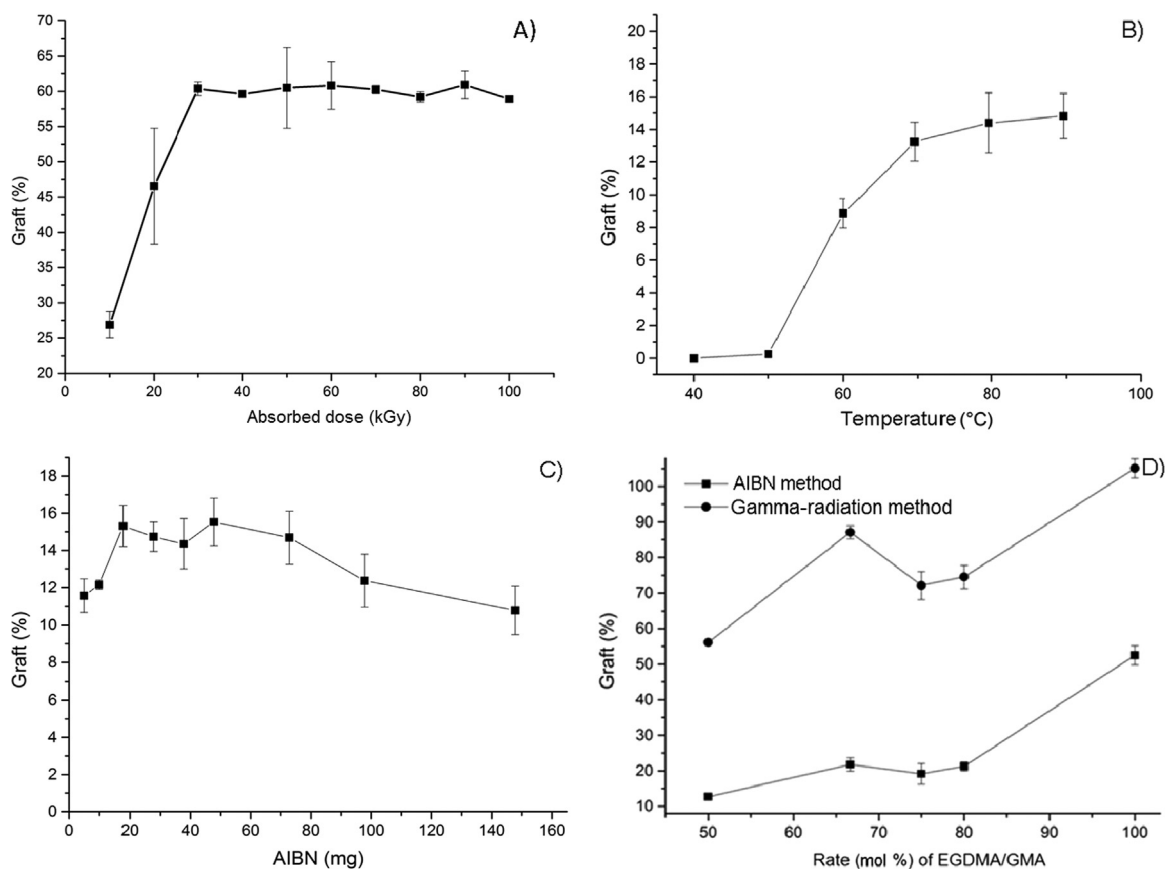
Lorenzo et al., 2010). Furthermore, unlike other surface modification methods such as coatings, graft-processing offers the advantage that the grafted polymer layer is more stable, there is a better control of the grafted polymer chains, and several different polymers can be grafted onto the same substrate (Minko, 2008).

The process of carrying out a graft polymerization revolves around the creation of active sites on the surface of the substrate material (*grafting-from*), or on the polymer chains that will be grafted onto the substrate (*grafting-to*). In the particular case of *grafting-from*, these active sites can be created through the surface-activation of the substrate via chemical pathways, or using high energy sources such as UV-radiation, plasma treatments, electron beams, and gamma radiation (Minko, 2008; Dargaville et al., 2003). In this regard, the use of gamma radiation for graft polymerization is a well-known alternative method to chemical approaches because it circumvents the use of initiators that will have to be removed at later stages (e.g. azobisisobutyronitrile (AIBN), benzoyl peroxide, dicumyl peroxide, or mixes of Ce(IV) and Fe(II) with peroxides), and it also serves as a way to sterilize the material while it is being irradiated (Jenkins et al., 2001). Thereupon, it is not surprising that radiation-induced copolymerization

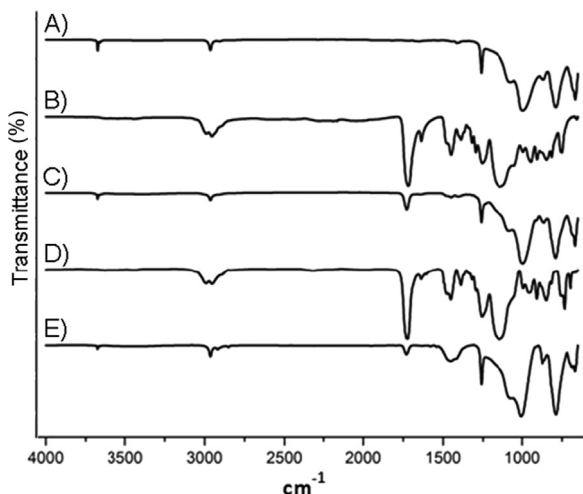
\* Corresponding author.

E-mail address: [guadalupe.flores@correo.nucleares.unam.mx](mailto:guadalupe.flores@correo.nucleares.unam.mx) (G.G. Flores-Rojas).





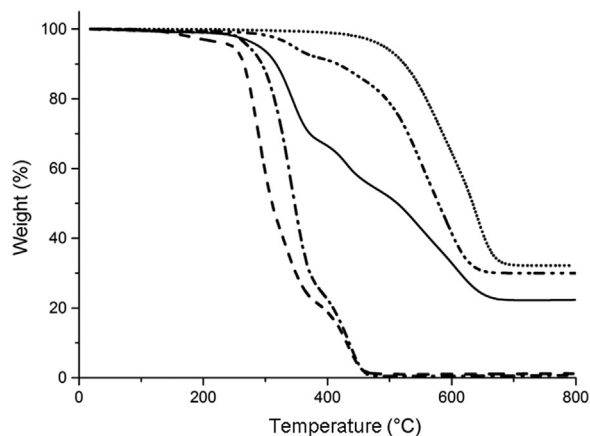
**Fig. 1.** Grafting yield as a function of (A) adsorbed dose with a monomers-toluene concentration of 20 vol% and a 1:1 EGDMA/GMA mol ratio; (B) temperature, for the chemical method (AIBN), using a 40 vol% monomers-toluene concentration and a 1:1 EGDMA/GMA mol ratio; (C) milligrams of AIBN initiator using a 40 vol% monomers-toluene concentration and EGDMA/GMA 1:1 mol ratio; and (D) different EGDMA/GMA mol ratios for both methods, with a monomers-toluene concentration of 20 and 40 vol% for the gamma-radiation and chemical method, respectively.



**Fig. 2.** FT-IR spectrum of (A) pristine silicone film, (B) poly(EGDMA-co-GMA) and (C) SR-g-(EGDMA-co-GMA), both obtained using the gamma-radiation method; and (D) poly(EGDMA-co-GMA) and (E) SR-g-(EGDMA-co-GMA), both obtained using the chemical method with AIBN as initiator.

and crosslinking has been increasingly used for the creation of novel biomaterials (Estrada-Villegas and Bucio, 2012).

In general, there are two pathways towards radiation induced graft polymerization: the pre-irradiation and the direct method. The pre-irradiation method can be further classified into either a trapped radical or peroxide method. The use of either method will depend upon the materials used, taking into consideration



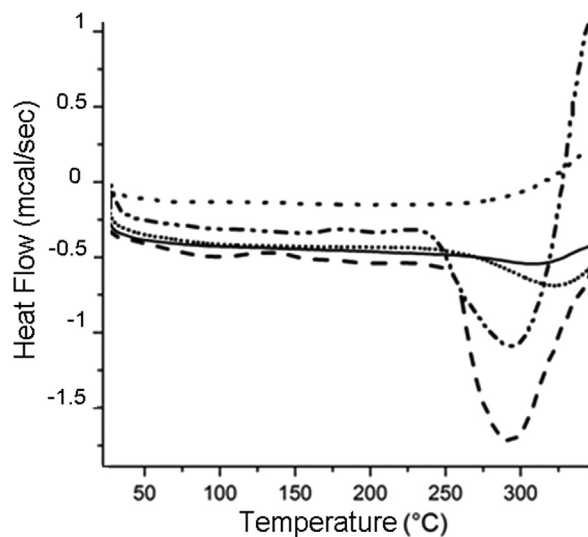
**Fig. 3.** TGA analysis of (—) SR-g-(EGDMA-co-GMA) (60.5%) modified using the gamma-radiation method; (---) SR-g-(EGDMA-co-GMA) (15.4%) modified using the chemical method, (.....) pristine silicone; (- - -) poly(EGDMA-co-GMA) obtained by the gamma-radiation method; and (—) poly(EGDMA-co-GMA) obtained by the chemical method (AIBN).

whether the compounds are susceptible towards degradation or crosslinking, or if they favor homopolymerization rather than grafting (Ivanov, 1992).

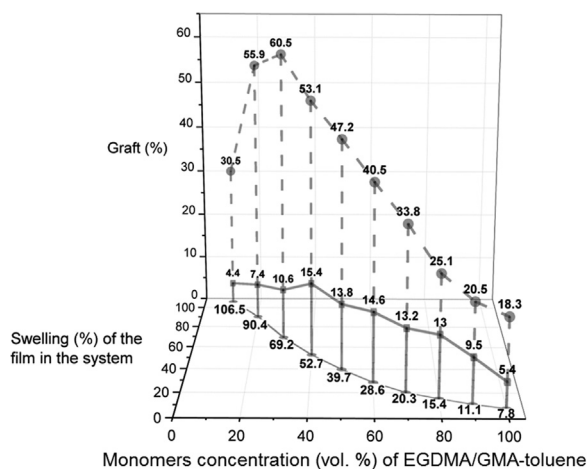
In this work, silicone rubber (SR) was modified with a binary graft of ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and glycidyl methacrylate (GMA) using two different methods: 1) the direct radiation method, and 2) the chemical method using AIBN as an initiator. This graft will allow the immobilization of enzymes by subsequent reactions using the epoxy group from GMA.

**Table 1.** 10% Weight-loss temperature of pristine and modified SR-films, and EGDMA/GMA copolymers.

Sample	Weight loss temperature (at 10 wt%, °C)
Copolymer obtained by gamma-radiation method	294.3
Copolymer obtained by chemical method	265.2
Silicone pristine	523.7
Grafted film (60.5%) of EGDMA/GMA (gamma-radiation method)	317.3
Grafted film (15.5%) of EGDMA/GMA (AIBN method)	416.3



**Fig. 4.** DSC analysis of (---) pristine silicone, (- · - · -) poly(EGDMA-co-GMA) and (.....) SR-g-(EGDMA-co-GMA) (53.3%) obtained using the gamma-radiation method; (—) poly(EGDMA-co-GMA) and (——) SR-g-(EGDMA-co-GMA) (15.4%) obtained by the chemical method.

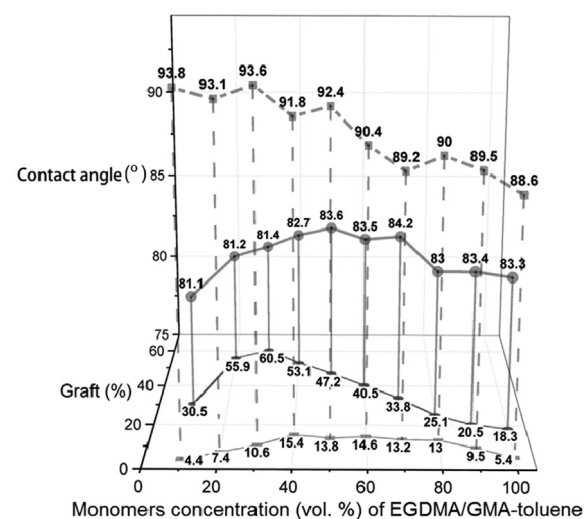
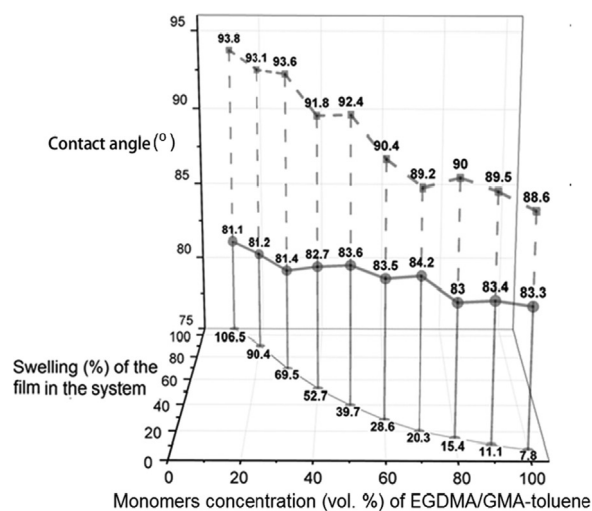


**Fig. 5.** Graft degree of as a function of the swelling percentage, in the medium where the graft was carried out, and as a function of monomers concentration.

## 2. Experimental part

### 2.1. Materials

Silicone rubber films (SR-film), with density from 1.1 to 1.5 g cm<sup>-3</sup> and 1 mm in thickness, were purchased from Goodfellow (Huntingdon, UK). Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), glycidyl methacrylate (97%) (GMA), and azobisisobutyronitrile



**Fig. 6.** Contact angle as a function of monomers concentration, grafting degree, and swelling of the film in the medium where the graft was carried out.

(AIBN) were acquired from Sigma-Aldrich Co. (St Louis MO, USA); all the monomers were purified under vacuum distillation before used. Ethanol and toluene were analytical grade and were obtained from Baker Mexico; they were used without further purification.

### 2.2. Grafting by radiation

The SR-films (1 × 2.5 cm) were placed in an ampoule containing 8 mL of an EGDMA/GMA (1:1 mol) solution, varying the monomer concentration from 10 to 100 vol% in toluene. The ampoules were degassed by repeated freeze-thaw cycles (6 times per 10 min) and sealed. Lastly, they were exposed to the radiation field of a <sup>60</sup>Co γ-source (Gammabeam 651 PT, MDS Nordion, USA), at room temperature, at an average dose rate of ≈ 9.5 kGy/h and a dose from 10 to 100 kGy. To extract the residual monomers and copolymer formed during grafting, the samples were soaked in ethanol for 24 h (changed solvent two times), followed by drying under vacuum at room temperature to constant weight.

### 2.3. Grafting by free radicals obtained with AIBN

The SR-films (1 × 2.5 cm) were placed in an ampoule containing 8 mL of an EGDMA/GMA (1:1 mol) solution, varying the monomer concentration from 10 to 100 vol% in toluene, and 50 mg of AIBN added as initiator. The ampoules were degassed by

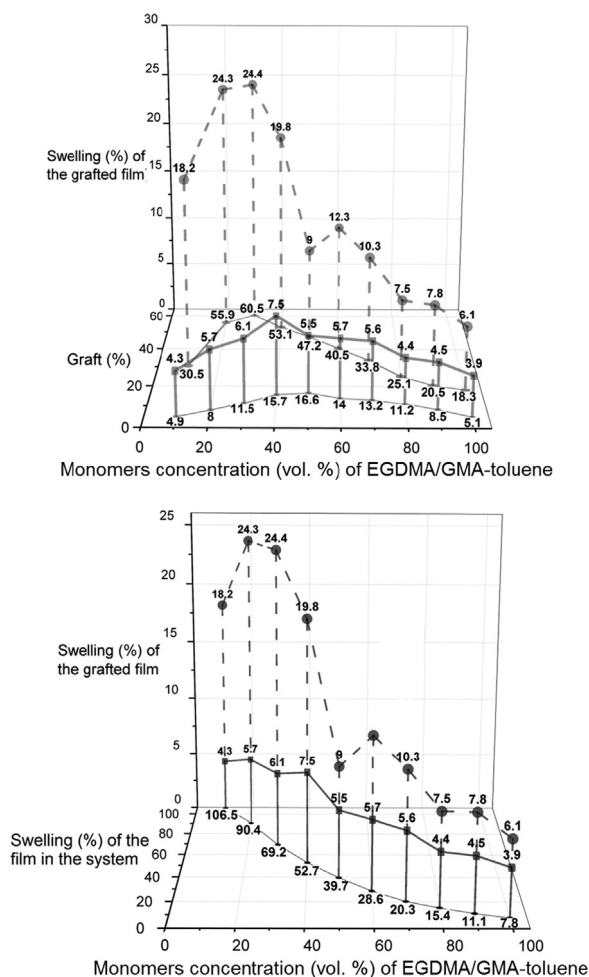


Fig. 7. Behavior of swelling percent of the film in ethanol versus monomers concentration, graft degree and the swelling of the film in each graft system where the graft was carried out.

repeated freeze-thaw cycles (6 times per 10 min) and sealed. Afterwards, the ampoules were heated at different temperatures from 40 to 90 °C with a reaction time of 1 h. To extract the residual monomers and copolymer formed during the graft, the samples were treated as previously mentioned in Section 2.2. In addition, the grafting yield obtained using the AIBN method was also investigated by varying the amounts of AIBN from 5 to 150 mg. In both methods, the grafting percentage was also investigated with different monomer concentrations by varying the GMA mol percentage from 50 to 100 mol%.

The grafting yield ( $Y_g$ ) was calculated using Eq. (1):

$$Y_g(\%) = 100 \frac{(W_g - W_0)}{W_0} \quad (1)$$

where  $W_0$  and  $W_g$  are the weights of the initial and grafted film, respectively.

#### 2.4. Characterization of grafted SR films

FTIR-ATR spectra were recorded on previously dried films using a Perkin-Elmer Spectrum 100 (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk CT, USA) fitted with a Universal ATR sampling accessory (DiComp™ crystal, which is composed of a diamond ATR with a zinc selenide focusing element in direct contact with the diamond). Thermogravimetric analyses were performed using a TGA Q50 (TA Instruments, New Castle, DE) at a heating rate of

10 °C min<sup>-1</sup> in the temperature interval of 25–800 °C under a nitrogen atmosphere. Differential scanning calorimetry analyses were carried out in a DSC 2010 (TA Instruments, New Castle, DE) from 25 to 350 °C, under a nitrogen atmosphere at a flow rate of 60 mL min<sup>-1</sup> and a heating rate of 10 °C min<sup>-1</sup>.

A Kruss DSA 100 drop shape analyzer (Matthews NC, USA) was used to measure the water contact angle, which was recorded 1 min after a bidistilled water droplet had been deposited onto the dry films. The equilibrium swelling time was obtained by allowing the films to swell in ethanol for a certain time interval. After this time interval had passed, the films were removed from the solvent, their surface gently wiped with filter paper, and weighted. Afterwards, the films were immersed in ethanol again and the process repeated until a constant weight was reached. The swelling percentage ( $S$ ) was calculated as follows:

$$S(\%) = 100 \frac{(W_S - W_g)}{W_g} \quad (2)$$

where  $W_g$  and  $W_S$  are the weights of the dry and the swollen films, respectively.

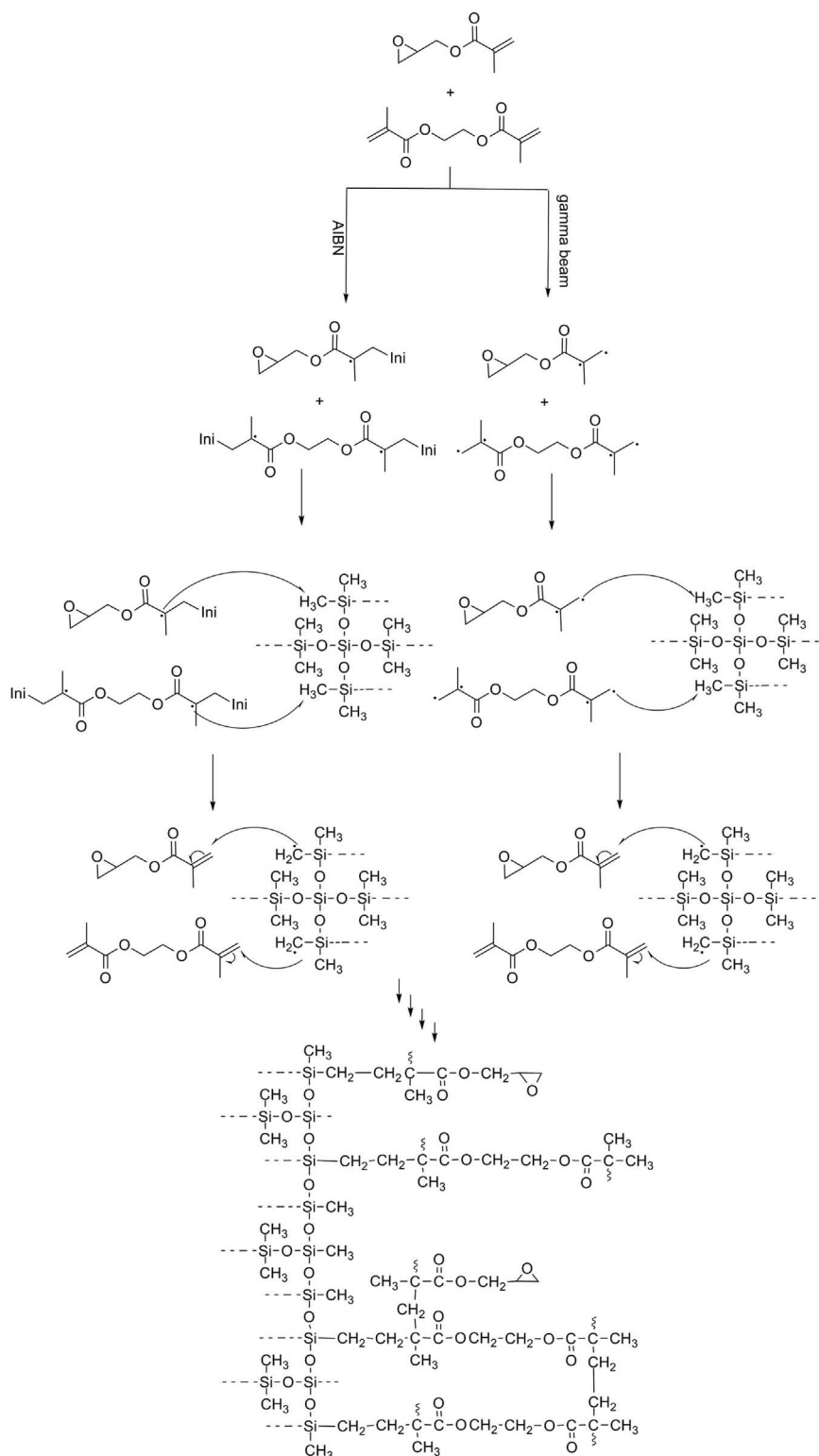
### 3. Results and discussion

The SR-films grafted with EGDMA-co-GMA were obtained using the direct gamma-radiation method and the chemical method, where AIBN was used as an initiator (Scheme 1). The effect of the absorbed dose on the grafting degree of the silicone matrix is seen in Fig. 1A, where it is initially observed that increasing the absorbed dose from 10 to 30 kGy led to an increase in the average grafting yield from 27 to 60%. However, the average grafting yield remained more-or-less constant at a value of 60.5% when the absorbed dose was increased from 30 to 100 kGy, which could be explained by the complete consumption of the monomers by the graft-polymerization reaction. When all the monomers are consumed, excess gamma-radiation induces other secondary reactions, such as crosslinking and degradation.

Using AIBN as the initiator did not yield grafting degrees similar to those observed using the gamma-radiation method (Fig. 1D). Increasing the reaction temperature and milligrams of AIBN yielded a maximum grafting degree of 15.4%, which was observed for a reaction temperature of 90 °C and a monomer concentration of 40 vol% in toluene (Fig. 1B). Another important difference was the hardness of the modified SR-films, which was higher for films that were modified using the gamma-radiation method. The increase in film hardness could be due to factors such as a higher grafting degree and/or degree of crosslinking/degradation, this last one being induced only by the gamma-radiation method due to the enormous amount of energy that is provided to the system.

Finally, by varying the monomers' molar ratio of EGDMA and GMA in the system, the grafting degree began to increase with increasing concentration of GMA. These results can be observed in Fig. 1D, where it is seen that there was a slight decrease in the grafting degree for monomer concentrations in between 75 and 80 mol% GMA, and afterwards the grafting degree increased again. It is important to mention that to obtain a good reproducibility of the grafting degree, it was essential to allow the SR-film to reach its swelling limit before starting the graft polymerization; otherwise, the reproducibility degree had standard deviations of up to 15%.

The FTIR-ATR spectrum of pristine and modified SR-films is shown in Fig. 2, where the incorporation of the EGDMA-co-GMA graft is confirmed by the appearance of the peak(s) at 1000–1263 cm<sup>-1</sup> belonging to –Si–O–Si– bonds, at 1390–1486 cm<sup>-1</sup> to



**Scheme 1.** Proposal of the reaction mechanism for the graft polymerization of EGDMA and GMA onto SR using either gamma-radiation or AIBN as the initiator.

the vibration of  $-C-O-$ , at  $1745\text{ cm}^{-1}$  to the vibrations of carbonyl groups ( $-C=O$ ), and at  $2097\text{--}2978\text{ cm}^{-1}$  to the vibration of the  $-C-H$  bond.

The TGA (Fig. 3) analysis showed that pristine silicone had a simple decomposition process, whereas the grafted films had a multistage decomposition. The first two thermal decomposition steps of the grafted films correspond to the EGDMA-co-GMA graft, and the final decomposition step to the silicone matrix, which

exhibited an unstable intermediate. Table 1 summarizes the 10% weight loss temperature ( $T_{10\%}$ ) of the samples. Pristine SR had a  $T_{10\%}$  at  $523\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; and films modified with either gamma-radiation or the chemical method had a  $T_{10\%}$  at 317 and  $416\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectively. Furthermore, the copolymers (EGDMA-co-GMA) obtained by these methods exhibited less stability in nitrogen than the graft copolymer.

The DSC analysis (Fig. 4) showed that pristine SR-film did not have any thermal transitions, while the grafted films did. The

temperature where the thermal transition (decomposition) occurred increased from 257.6 °C, for films grafted via the gamma-radiation method, to 270.4 °C for films grafted with AIBN as the initiator. This behavior was also observed in the obtained copolymers (EGDMA-co-GMA), which had their thermal transition temperatures at 244.5 and 257.6 °C for the radiation and chemical method, respectively, with an approximate temperature difference of 13 °C.

The grafting degree showed a relationship with the film's swelling percentage in the reaction medium, which is dependent on the monomer concentration (Fig. 5). Low monomer concentrations increased the film's swelling degree and therefore a higher grafting yield was obtained. When higher monomer concentrations were used, from 30 vol% and up, a lower grafting yield was observed. This behavior is most likely explained by the poor diffusivity the monomers have within the film, which is due to the gel effect caused by high monomer concentrations. The maximum grafting percentages were obtained with monomer concentrations up-to 30 and 40 vol% in toluene for gamma radiation and AIBN respectively, for the gamma-radiation and chemical method, respectively. This indicates that at around these monomer concentrations there is an optimum where the film swells enough to allow for good diffusivity of the monomers, and the gel-effect is not pervasive. Lastly, an increase in the monomer concentration led to grafts that were visibly less homogeneous, probably due to poor diffusion of the monomers into the film.

The hydrophobicity of the grafted films was measured through the water contact angle (Fig. 6). The results show that there is no apparent relationship between the films' hydrophobicity and their swelling degree in GMA-EGDMA-toluene. The fact that there was not a significant change in the contact angle as a function of grafting degree could be an indication that the graft was initially carried out on the surface of the film and then in bulk, this latter one being benefited by systems of low monomer concentrations. This idea was reinforced with the results shown in Fig. 7, where it is observed that the films with a higher swelling percentage were those that had been grafted using low monomer concentrations, regardless of their grafting degree. The opposite was observed for films grafted using high monomer concentrations. This behavior indicates that films with a higher swelling percentage had bulk and surface grafting (Scheme 1).

#### 4. Conclusions

The graft copolymerization of EGDMA/GMA onto SR-films was

performed using two different methods: the gamma-radiation method and the chemical method using AIBN as the initiator. The gamma-radiation method generated higher grafting yields, obtaining a maximum of up to 60.5% grafted copolymer, which is much higher than the 15.4% grafting yield obtained using AIBN. Another important aspect to mention is that using the chemical method resulted in films with better flexibility than films obtained by radiation-induced graft polymerization. This change in flexibility is probably due to differences in the film's grafting degree, crosslinking, or degradation. According to the obtained results, it will be possible to carry out subsequent reactions using the epoxy group from GMA, which will allow for the immobilization of enzymes or other compounds.

#### Acknowledgements

The authors thank to Dirección General Asuntos del Personal Académico-UNAM (DGAPA-UNAM) Grant IN200714 for supported.

#### References

- Alvarez-Lorenzo, C., Bucio, E., Burillo, G., Concheiro, A., 2010. Medical devices modified at the surface by  $\gamma$ -ray grafting for drug loading and delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 7, 173–185.
- Dargaville, T.R., George, G.A., Hill, D.J.T., Whittaker, A.K., 2003. High energy radiation grafting of fluoropolymers. *Prog. Polym. Sci.* 28, 1355–1376.
- Estrada-Villegas, G.M., Bucio, E., 2012. Temperature- and pH-responsive behavior of a novel copolymer of (PP-g-DMAEMA)-g-AAc. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 292, 1–6.
- Ivanov, V.S., 1992. *Radiation Chemistry of Polymers*. VSP, Utrecht, The Netherlands.
- Jenkins, D.W., Hudson, S.M., 2001. Review of vinyl graft copolymerization featuring recent advances toward controlled radical-based reactions and illustrated with chitin/chitosan trunk polymers. *Chem. Rev.* 101, 3245–3273.
- Lafarge, J., Kébir, N., Schapman, D., Burel, F., 2013. Design of self-disinfecting surfaces using click chemistry. *React. Funct. Polym.* 73, 1464–1472.
- Minko, S., 2008. Grafting on solid surfaces: "Grafting-to" and "grafting-from" methods, Chapter from the book: *Polymer surfaces and interfaces*, pp. 215–134.
- Muñoz-Muñoz, F., Ruiz, J.C., Alvarez-Lorenzo, 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. *Radiat. Phys. Chem.* 81, 531–540.
- Rosiak, J.M., Janik, I., Kadlubowski, S., Kozicki, M., Kujawa, P., Stasica, P., Ulanski, P., 2003. Nano-, micro- and macroscopic hydrogels synthesized by radiation technique. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res.* 208, 325–330.
- Uyama, Y., Kato, K., Ikada, Y., 1999. Surface modification of polymers by grafting. Grafting/characterization techniques/kinetic modeling. *Adv. Polym. Sci.* 137, 1–39.



# Improved covalent immobilization of lysozyme on silicone rubber-films grafted with *poly*(ethylene glycol dimethacrylate-co-glycidylmethacrylate)

Guadalupe G. Flores-Rojas<sup>a,\*</sup>, Victor H. Pino-Ramos<sup>a</sup>, Felipe López-Saucedo<sup>a</sup>,  
Angel Concheiro<sup>b</sup>, Carmen Alvarez-Lorenzo<sup>b</sup>, Emilio Bucio<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química de Radiaciones y Radioquímica, Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, CDMX 04510, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, R + DPharmaGroup (GI-1645), Facultad de Farmacia, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Lysozyme immobilization  
Glutaraldehyde method  
Ethylene glycol dimethacrylate  
Glycidyl methacrylate  
Silicone  
Radiation-grafting

## ABSTRACT

Silicone rubber (SR) is widely used in medical and food sectors due to its excellent mechanical properties. Either as component of medical devices or surfaces in contact with food, there is a current demand to endow SR with antimicrobial activity. Although promising, covalent immobilization of lysozyme on SR is not an easy task and the yield of current approaches should be improved in terms of both amount and stability of the enzyme. The goal of this work was to implement an optimized approach to immobilize lysozyme through the formation of multiple bonds on SR-films. The SR-films were first grafted with poly(ethylene glycol dimethacrylate-co-glycidylmethacrylate), *poly*(EGDMA-co-GMA), by gamma-rays radiation and then chemically modified to provide them with a formyl group, which was later used to immobilize lysozyme. Two synthetic routes were investigated. Properties of grafted SR-films with immobilized lysozyme were characterized by means of attenuated total reflection infrared spectroscopy (ATR-FTIR), differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA), and viscoelasticity. The enzymatic activity of the immobilized lysozyme on the grafted SR-films was studied by following the decrease in absorbance at 450 nm using a suspension of lyophilized *Micrococcus lysodeikticus*. The enzymatic activity of immobilized lysozyme was tested covering a wide range of pH values and temperatures as well as under reuse cycles. The results show that immobilized lysozyme maintains good activity in the 6–11 pH range and withstands several reuse cycles.

## 1. Introduction

Silicone rubber (SR) is widely used in areas such as medicine and engineering due to its excellent mechanical properties and chemical and thermal stability. In the medical area, SR is manufacturing component of medical devices such as implants, prosthesis and catheters [1–7]. The food industry uses SR as material contact and their applications include conveyor belting for food transportation, seals, and gaskets used with processing equipment, gloves for handling food, teats and soothers for babies, food hoses, kitchen utensils, food molds and meat netting [8]. For either of these applications, the avoidance of bacteria adhesion and biofilm formation is a critical issue. As a consequence, SR is demanded to have other extra-specific-properties, such as antimicrobial activity,

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [ggabofo@hotmail.com](mailto:ggabofo@hotmail.com) (G.G. Flores-Rojas), [ebucio@nucleares.unam.mx](mailto:ebucio@nucleares.unam.mx) (E. Bucio).



that can both prolong its shelf-life and prevent dangerous colonization. Methods to endow SR with biocide surface include the incorporation of groups with antimicrobial behavior, or the loading of drugs and enzymes, such as imidazole [9], vancomycin [10], ciprofloxacin [11], lysozyme [12], and peroxidases [13], in the polymer matrix. Biocidal enzymes, particularly lysozyme [14–17], are gaining an increasing interest as they can resemble one of the natural mechanisms of defense of human body without risk of triggering microorganism resistance.

Regrettably, the characteristics that make SR suitable for medical applications (inert, non-porous, non-swelling material) hinder the efficient and selective loading of drugs or enzymes by adsorption [18] or entrapment [19]. An adequate modification of SR can allow the formation of multi-covalent bonds with enzymes being this technique by far the most effective, as it involves the direct binding of the enzyme on a solid matrix [20–23], thus providing the enzyme with an enhanced activity, stability, and reusability [24,25]. Therefore, it is necessary to modify SR to endow its surface with adequate chemical groups whilst the bulk retains the original properties. To perform these modifications, a variety of grafting polymerization techniques have been explored [26]. Active sites can be easily created applying gamma-rays radiation, either pre-irradiating SR or directly exposing both SR and the monomers. These methods are quite versatile in terms of monomers to be grafted. Specifically on SR, grafting of glycidyl methacrylate (GMA) [27], N-vinyl caprolactam (NVCL) [28], styrene (St), 2-vinylnaphthalene (2VN) [29], acrylamide (AAm) [30], and acrylic acid (AAc) [31], among others, has been accomplished by means of gamma-rays radiation. In particular, GMA has been widely investigated because the glycidyl groups of the resultant grafted polymer may serve as an intermediate for subsequent functional chemical modifications that will allow the functionalization of SR with new chemical groups [32].

The goal of this work was to implement an optimized approach to immobilize lysozyme by means of multiple bonds on SR-film. To accomplish that, first SR-films were grafted with poly(EGDMA-co-GMA) applying gamma-rays radiation. Then, the obtained grafted SR-films were chemically modified to provide them with a formyl group, which was later used to immobilize the lysozyme. Two synthetic routes were investigated, and the activity and stability of the immobilized lysozyme were evaluated in aqueous medium covering a wide range of pH values. Importantly, one of the immobilization routes allowed the enzyme being active in the pH range of 3–11, which is notably broader than that observed for previously reported methods [33–35].

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

Silicone rubber (SR) film (1.1–1.5 g cm<sup>-3</sup> density; 1 mm thickness) was purchased from Goodfellow (Huntingdon, UK). 1,6-Diaminohexane, potassium cyanide, potassium carbonate, hydrochloric acid (35%), lithium aluminum hydride, tetrahydrofuran (THF), glutaraldehyde (50%), and sodium cyanoborohydride were from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) and used as received. Water was removed from glutaraldehyde (50%) by vacuum distillation before being used. Lysozyme was from MP Biomedicals (Germany), and ethanol from J.T. Baker (Mexico).

5,5-diethoxypentanal was synthesized by mixing, under constant magnetic stirring, glutaraldehyde (18 g), ethanol (17 mL), THF (18 mL), and hydrochloric acid (100  $\mu$ L) for 3 h at a fixed temperature of 65 °C. The obtained 5,5-diethoxypentanal was used without further purification. <sup>13</sup>C-NMR spectrum was recorded in a Jeol 300 MHz apparatus in CDCl<sub>3</sub> using TMS as internal reference; chemical displacement ( $\delta$ ) was expressed in parts per million (ppm).

### 2.2. Synthesis of SR-g-poly(EGDMA-co-GMA)

Two series of SR-g-poly(EGDMA-co-GMA) were prepared. For the first series, SR films (1 × 2.5 cm) were placed in ampoules containing 8 mL of an EGDMA/GMA (1:1 mol/mol) solution, varying the monomer concentration from 10 to 100 vol.% in toluene (Table 1). The ampoules were degassed by repeated freeze-thaw cycles (6 times/10 min), sealed and exposed to the radiation field of a <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -source (Gammabeam 651 PT, MDS Nordion, USA), at room temperature, at an average dose rate of  $\approx$  9.5 kGy h<sup>-1</sup> and an absorbed dose of 30 kGy. To extract the residual toluene and monomers and the copolymer formed during grafting, the films were soaked in ethanol for 24 h (solvent was replaced two times), and then dried under vacuum at room temperature to constant weight

**Table 1**

Concentration of EGDMA/GMA (1:1 mol/mol) solutions in toluene used in the direct grafting from SR films, and grafting percentage of the obtained SR-g-(EGDMA-co-GMA) films. Mean values and, in parenthesis, standard deviation.

Code	Monomer concentration (EGDMA/GMA) in toluene (vol.%)	Grafting percentage (wt.%)
SR-1	10	30.5 (1.5)
SR-2	20	56.0 (2.8)
SR-3	30	60.5 (3.0)
SR-4	40	53.1 (2.6)
SR-5	50	47.2 (2.3)
SR-6	60	40.6 (2.0)
SR-7	70	33.8 (1.6)
SR-8	80	25.2 (1.3)
SR-9	90	20.2 (1.0)
SR-10	100	18.3 (0.9)

**Table 2**  
Percentage of poly(EGDMA-co-GMA) grafted on SR-films when exposed to a total monomers concentration of 20 vol.% in toluene but different EGDMA/GMA mol ratios (34/66, 25/75, 20/80 and 0/100 mol/mol).

Code	GMA (mol.%)	Grafting percentage (wt.%)
SR-1R	66	81.6 (4.0)
SR-2R	75	75.0 (3.7)
SR-3R	80	63.4 (3.1)
SR-4R	100	98.3 (4.9)

[36].

The second series of grafted SR-film was obtained using a solution of monomers with a concentration 20 vol.% in toluene varying the mol percentage rate of GMA versus EGDMA. The applied protocol was the same as above.

The grafting percentage ( $Y_g$ ) was calculated as follows

$$Y_g = \frac{W_f - W_i}{W_i} 100 \quad (1)$$

In this equation,  $W_i$  and  $W_f$  represent the weights of the film before and after grafting, respectively. The grafting percentages of obtained SR-g-(EGDMA-co-GMA) films are reported in Tables 1 and 2.

### 2.3. Activation of SR-g-(EGDMA-co-GMA)

Before enzyme immobilization, the grafted SR-films were cut as discs (0.5 cm in diameter) and activated using the following methods (Fig. 1).

#### 2.3.1. Method I

Two discs of grafted SR-film were placed in 3.5 mL of THF and 1.5 mL of water and finally 0.5 g of 1,6-diaminehexane was added. The reaction was carried out at 85 °C under fixed stirring for 1.5 h. Afterwards, the films were washed with acidified ethanol, and then with ethanol, changing the solvent three times. The treated samples were reacted with 1 mL of 5,5-diethoxypentanal mixed with 1 mL of THF at 25 °C for 1 h. When the films were removed from the reaction medium, they were washed with THF. The reduction of imine groups was carried out in 5 mL of dried THF and 100 mg of sodium cyanoborohydride for 1 h at 20 °C under constant stirring. Then, the films were washed firstly with water and then with ethanol. Finally, the acetal group was hydrolyzed using 5 mL of distilled water and 100  $\mu$ L of hydrochloric acid (33 vol.%) at 65 °C for 1.5 h under constant stirring. Lastly, the films were washed three times with distilled water.

#### 2.3.2. Method II

Two discs of grafted SR-films were first placed in a mixture of 3.5 mL of THF and 1.5 mL of distilled water; and then, 50 mg of potassium carbonate and 100 mg of potassium cyanide were added to the reaction vessel. The reaction took place at 85 °C for 1.5 h. Afterwards, the films were washed with acidified ethanol and then with ethanol, and lastly dried under vacuum. Reduction of nitrile groups was made in 5 mL of dried THF and 100 mg of lithium aluminum hydride at 0 °C for 1 h. Reaction was stopped by adding 1 mL of distilled water, and then the films were washed with ethanol. The reaction with 5,5-diethoxypentanal, reduction of the imine group, and hydrolysis of acetal group were performed as described for method I (Section 2.3.1).

### 2.4. Enzyme immobilization and activity tests

The activated SR-g-(EGDMA-co-GMA) films were placed in 2.5 mL of lysozyme solution (4 mg mL<sup>-1</sup> in 0.01 M phosphate buffer pH 7) at 5 °C during 72 h. Then, the films were washed with distilled water three times (for 10 min each to remove physically adsorbed lysozyme) before use.

The enzymatic assay was carried out in 4 mL of a 0.62 mg mL<sup>-1</sup> *M. lysodeikticus* suspension ( $Ab_i \approx 0.6$ ), at various temperatures and pH values (obtained with 0.01 M phosphate buffer) and monitoring the decrease of the absorbance at 450 nm after 4 h. The obtained absorbances were referred to that recorded for the SR-8 film.

The activity observed for the lysozyme immobilized on SR-8 film (Table 1) in 4 mL of *M. lysodeikticus* suspension (0.62 mg mL<sup>-1</sup>) at 30 °C, pH = 7, 0.01 M buffer (time needed to complete the hydrolysis of *M. lysodeikticus* was 4 h) was used as reference. The relative activity was calculated using Eq. (2),

$$\text{Relative activity \%} = \frac{Ab_i - Ab_f}{Ab_{iop} - Ab_{fop}} 100 \quad (2)$$

where  $Ab_i$  is the initial and  $Ab_f$  is the final absorbance measured in the medium where the enzymatic assay was carried out for a given lysozyme-immobilized SR-g-(EGDMA-co-GMA) film, and  $Ab_{iop}$  and  $Ab_{fop}$  are the initial and final absorbances recorded for the enzymatic activity of lysozyme-immobilized SR-8 film under optimal conditions (30 °C, 4 h).



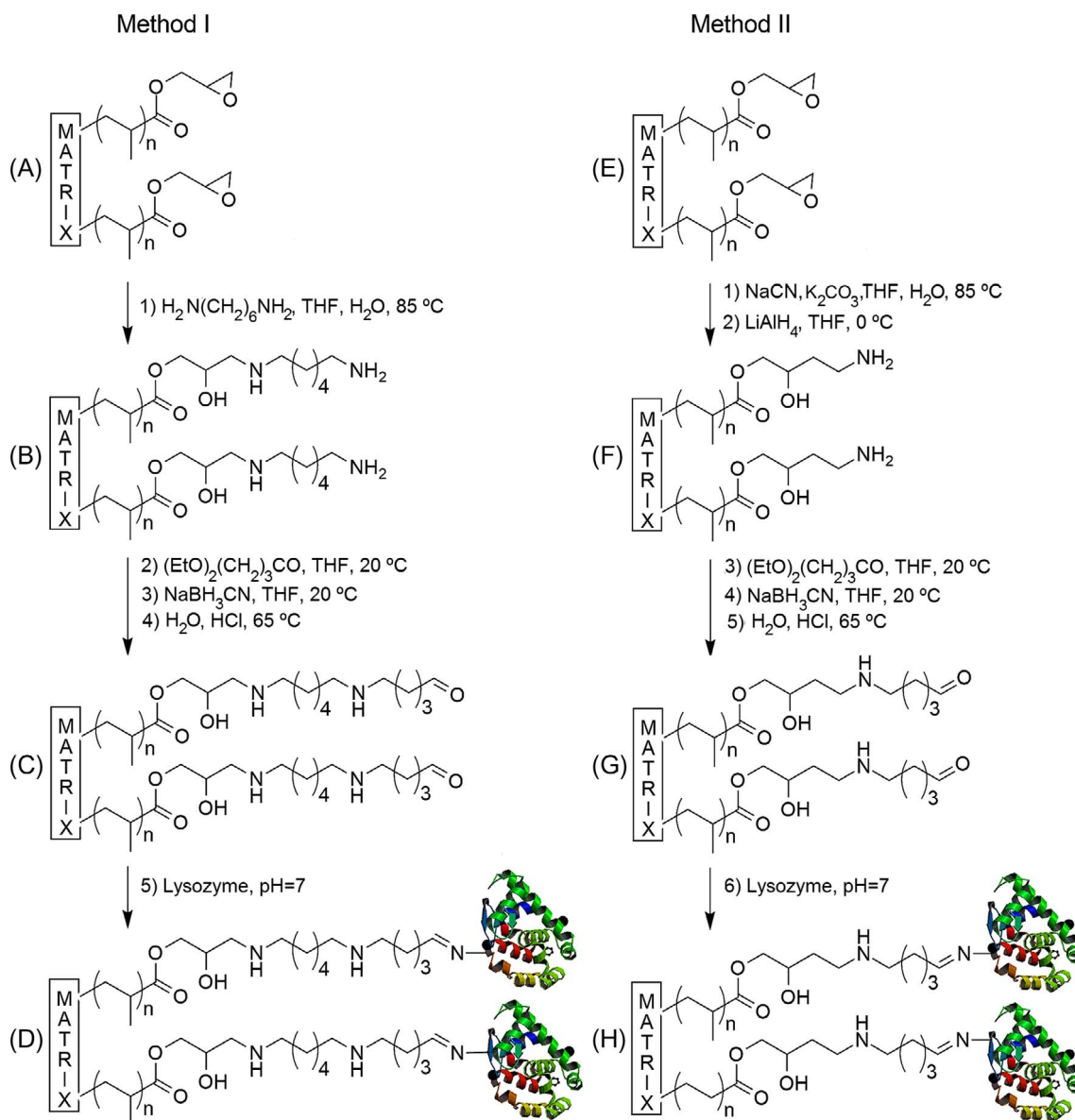


Fig. 1. Scheme of the general reactions for the two lysozyme immobilization methods (EGDMA chains were omitted for sake of clarity).

Reusability was evaluated from cycles of enzymatic activity carried out using previously tested films that were washed three times, 10 min each one with distilled water, and then placed again in 4 mL of *M. lysodeikticus* suspension ( $0.62 \text{ mg mL}^{-1}$ ) at  $30^\circ\text{C}$  in media of pH 7 and 11 ( $0.01 \text{ M}$  buffer). After 4 h, the absorbance of the suspension was measured.

### 2.5. Characterization of lysozyme-immobilized grafted SR-films

FTIR-ATR spectra were recorded using a Perkin-Elmer Spectrum 100 (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk CT, USA) fitted with a Universal ATR sampling accessory (DiComp™ crystal, which is composed of a diamond ATR with a zinc selenide focusing element in direct contact with the diamond). Thermogravimetric analyses were performed using a TGA Q50 (TA Instruments, New Castle, DE) at a heating rate of  $10^\circ\text{C min}^{-1}$  in the  $25\text{--}800^\circ\text{C}$  interval under nitrogen atmosphere. Differential scanning calorimetry analyses were carried out in a DSC 2010 (TA Instruments, New Castle, DE) from 25 to  $450^\circ\text{C}$ , under nitrogen atmosphere at a flow rate of  $60 \text{ mL min}^{-1}$  and a heating rate of  $10^\circ\text{C min}^{-1}$ .

Kruss DSA 100 drop shape analyzer (Matthews NC, USA) was used to measure the water contact angle, which was recorded 1 and 5 min after a bidistilled water droplet had been deposited on the dry films. The swelling percentage was recorded after immersion of films in bidistilled water for 24 h. After this time interval had passed, the films were removed from the water, their surface gently wiped with filter paper, and weighted. The swelling percentage was calculated as follows:

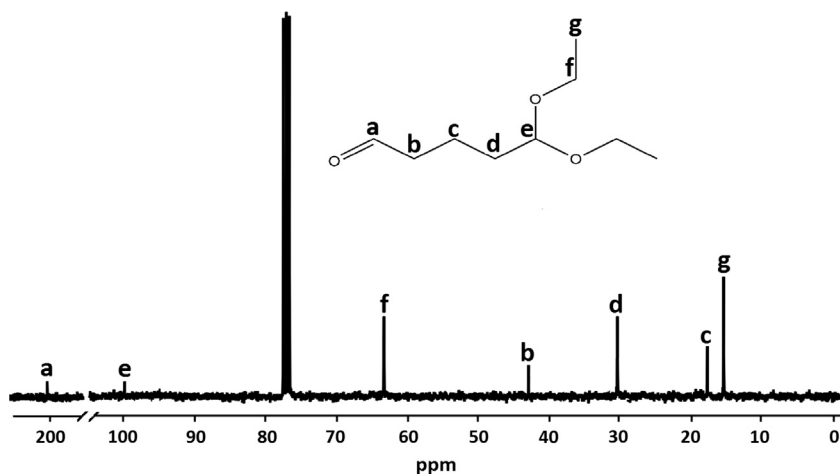


Fig. 2.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) of 5,5-diethoxypentanal in  $\text{CDCl}_3$ ;  $\delta_c$  (ppm): 15.2 ( $\text{CH}_3$ , g), 17.5 ( $\text{CH}_2$ , c), 30.2 ( $\text{CH}_2$ , d), 42.7 ( $\text{CH}_2$ , b), 63.2 ( $\text{CH}_2$ , f), 99.9 ( $\text{CH}$ , e), 201.3 ( $\text{CH}$ , a).

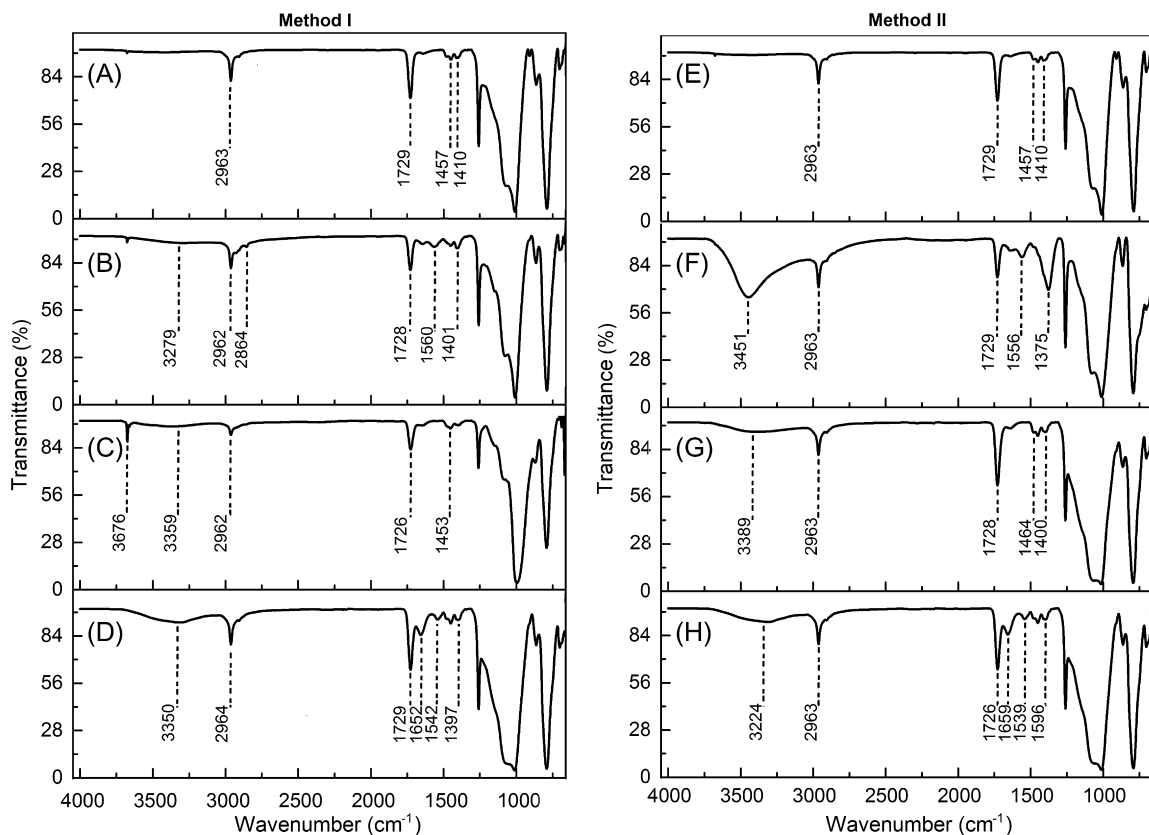


Fig. 3. FTIR-ATR spectrum of the grafted SR-film (SR-8) and their different chemical modifications using Method I and II. The assigned letter corresponds to the modification showed in Fig. 1.

$$S(\%) = \frac{W_s - W_i}{W_i} 100 \quad (3)$$

where  $W_i$  and  $W_s$  are the weights of the dried and the swollen films, respectively.

Immobilized lysozyme was quantified as the difference between initial amount of lysozyme in the loading solution and amount remaining in solution after incubation with the films (Eq. (4)). The amounts were estimated from the concentrations determined spectrophotometrically at 280 nm, using a calibration curve in phosphate buffer pH 7, 0.01 M.

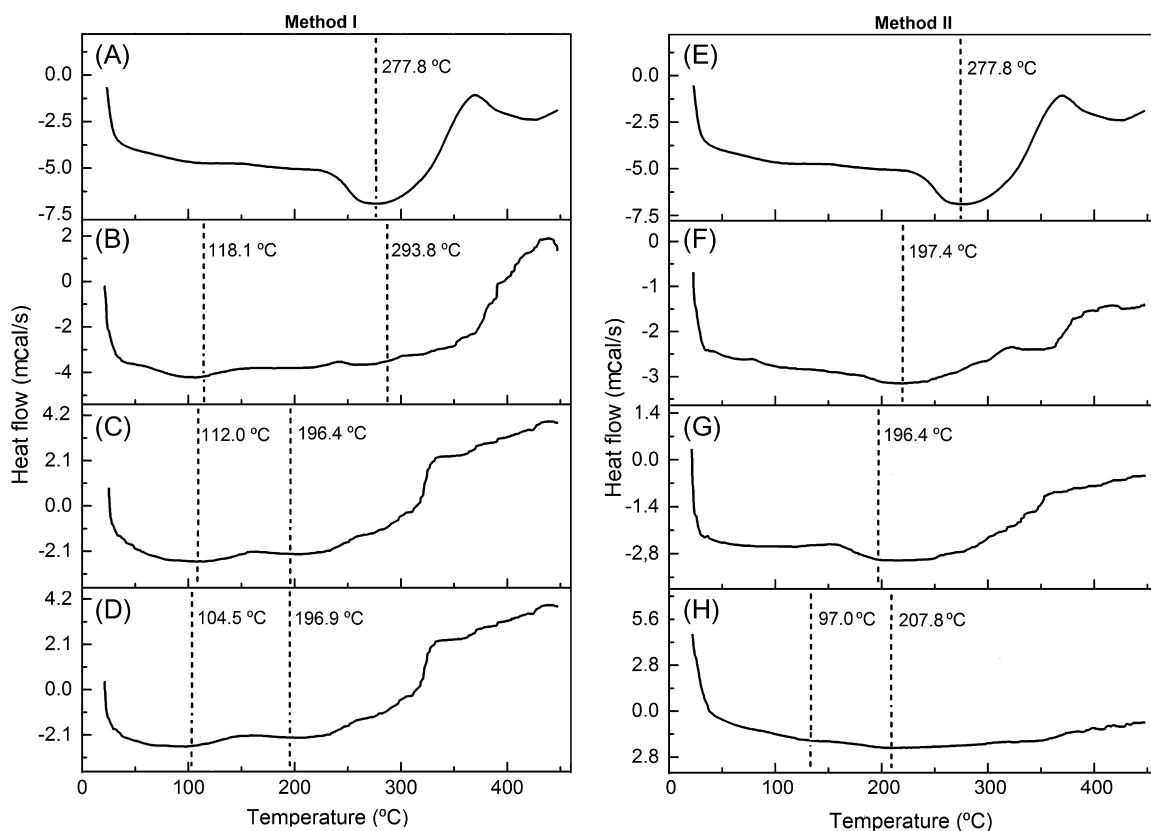


Fig. 4. DSC of grafted SR-film (SR-8) and their chemical modifications using the Method I and II. The assigned letter corresponds to modification showed in Fig. 1.

$$Ly_m \text{ (mg)} = Ly_{fi} - Ly_{ff} \quad (4)$$

In this equation  $Ly_m$  is the lysozyme immobilized on the film and  $Ly_{fi}$  and  $Ly_{ff}$  are the amounts of free lysozyme in solution before and after immobilization, respectively.

**Viscoelastic properties.** Storage ( $G'$ ) and loss ( $G''$ ) moduli of SR films at the different steps of chemical modification were recorded in a rheometer Rheolyst AR 1000 N (TA Instruments, New Castle, DE, USA) equipped with an environmental test chamber, a solid torsion kit and a data analyser (AR2500). The films were analysed in duplicate at 20 °C in the 0.05–50 rad s<sup>-1</sup> angular frequency range at 0.5% strain.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Grafting and activation of SR-films

Experimental conditions for the grafting of poly(EGDMA-co-GMA) on SR-films by means of gamma-ray radiation were previously reported [36]. Here, applying the most favorable conditions for grafting while avoiding SR damage (namely, direct method, room temperature, dose rate of 9.5 kGy h<sup>-1</sup>) [36], fourteen sets of SR-g-(EGDMA-co-GMA) films with grafting percentages covering from ≈ 18 to 100 wt.% were prepared in two series. The first series was obtained simply modifying the monomers/toluene ratio (while keeping the EGDMA/GMA ratio constant) in the reaction medium (Table 1). The second series was obtained modifying the EGDMA/GMA ratio using a fix monomers concentration of 20 vol.% in toluene (Table 2). A complex dependence of the grafting percentage on the monomers concentration and EGDMA/GMA ratio was found. The grafting in the first series was maximum when the SR-films were exposed to 30 vol.% monomers medium (SR-3 in Table 1) and then progressively decreased as the monomers concentration increased. Indeed, SR-films exposed to 100 vol.% monomers medium showed the lowest grafting percentage (SR-10 in Table 1), which can be related to the fact that in the absence of toluene SR-films did not swell and the monomers only interacted with free radicals at the very surface of SR-film. In the second series (Table 2), we observed that the grafting percentage increased as the GMA proportion in the EGDMA/GMA mixture increased. This behavior is related to the fact that EGDMA acts as cross-linker hindering the growth of polyGMA chains and thus limiting the grafting process on the SR-film. Nevertheless, a certain proportion of EGDMA is needed to regulate the grafting and to create a hydrophilic network on the silicone rubber surface that may favor the binding of lysozyme.

Direct reaction of lysozyme (through its amine groups) with the glycidyl groups of SR-g-(EGDMA-co-GMA) films at room

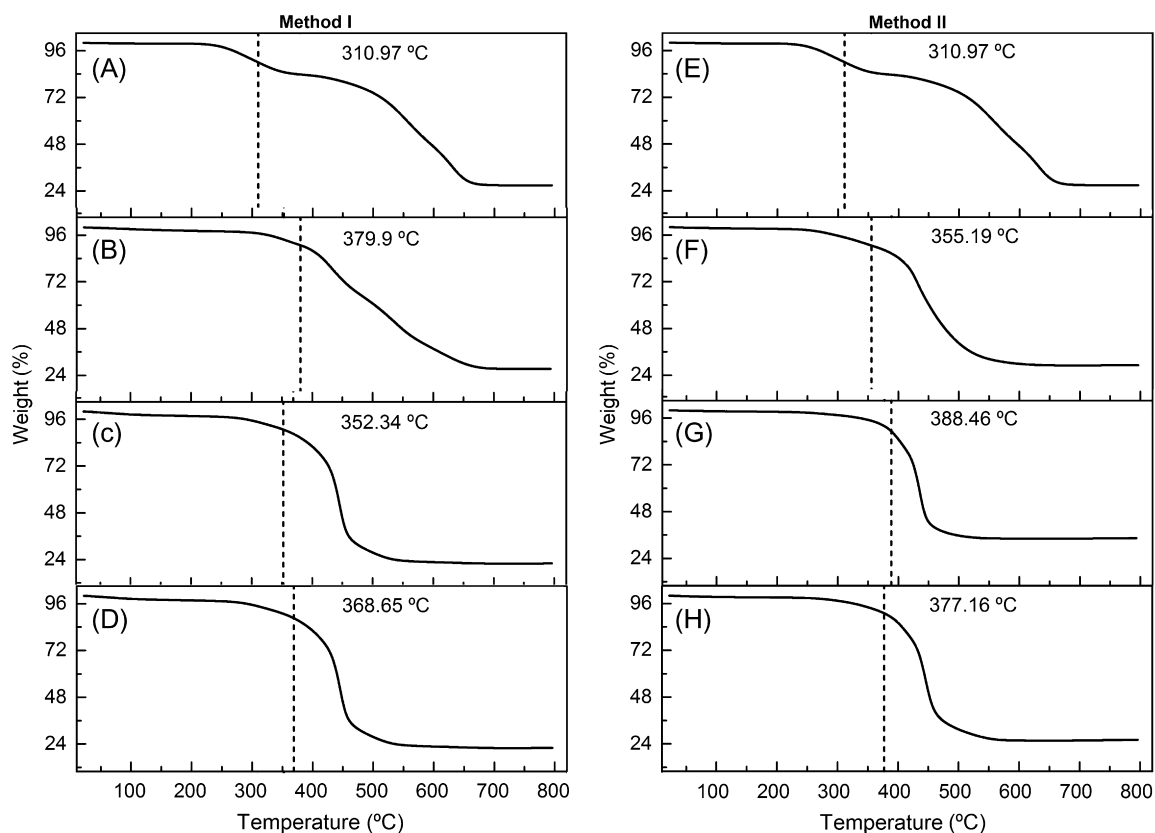


Fig. 5. TGA of the grafted SR-films (SR-8) and their chemical modification using Method I and II. The dashed line indicates the temperature at which 10% loss weight occurred. The assigned letter corresponds to the modification showed in Fig. 1.

temperature and neutral pH has a poor yield. Therefore, SR-g-(EGDMA-co-GMA) films were chemically activated to introduce more reactive groups (i.e., formyl groups) that allowed for carrying out the immobilization of lysozyme under milder conditions [37,38]. However, functionalization with formyl groups was not an easy task. During the chemical reactions some films lost part of the grafting, and also some competing reactions occurred using 1,6-diaminohexano and glutaraldehyde mainly due to the insolubility of the matrix (Method I). It is also important to mention that the excess of reagent for some reactions specially for the reaction with 1,6-diaminohexano was a key factor. Equimolar amounts did not allow for continuing the chemical activation insomuch as the two amino groups of 1,6-diaminohexano reacted with GMA epoxy groups.

In our attempts to optimize the immobilization and to eliminate these competing reactions, one group of glutaraldehyde was first protected by formation of acetal group (5,5-diethoxypentanal) and subsequently it was hydrolyzed to formyl group. The 1,6-diaminohexano was replaced by cyanide, which later was reduced to obtain amino group (Method II). The 5,5-diethoxypentanal was identified by  $^{13}\text{C}$ -NMR (Fig. 2); the sample of 5,5-diethoxypentanal was purified by column chromatography ( $\text{SiO}_2$ , hexane) using  $\text{CDCl}_3$  as solvent.

Chemically modified grafted SR-films processed by Method I and Method II acquired brown and white color, respectively. In the case of the Method I the brown color is due to the incomplete reduction of inner imine groups using sodium cyanoborohydride. This reducing agent is poorly soluble in THF and thus only the imine groups at the film surface were reduced. Conversely, the white color of SR-films chemically modified by Method II indicated a complete reduction of previously formed imine groups. This finding may be related to the fact that, because the limited solubility of lithium aluminum hydride in THF, nitrile groups were only formed on the surface of the films and thus were more accessible to reduction by sodium cyanoborohydride.

### 3.2. FTIR-ATR analysis

FTIR-ATR spectra of the films (Fig. 3) were recorded to obtain information about the new chemical groups incorporated on the grafted SR-films. The most important bands that provided evidence for the incorporation of the amino group on the surface of the grafted SR-film were at  $3279$  and  $3451\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 3B and F), which were assigned to the stretching vibration of the  $-\text{NH}_2$  and  $-\text{OH}$  groups, and also the corresponding bands of the flexion vibration bonds of  $-\text{O}-\text{H}$  and  $-\text{N}-\text{H}$  at  $1560$ – $1401\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 3B) and  $1556$ – $1375\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 3F).

Other important changes on the FTIR-ATR spectra were observed after the reaction with 5,5-diethoxypentanal took place, because this reaction triggered a decrease in the corresponding bands of the amino group at  $3359$  and  $1453\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 3C), and  $3389$  and

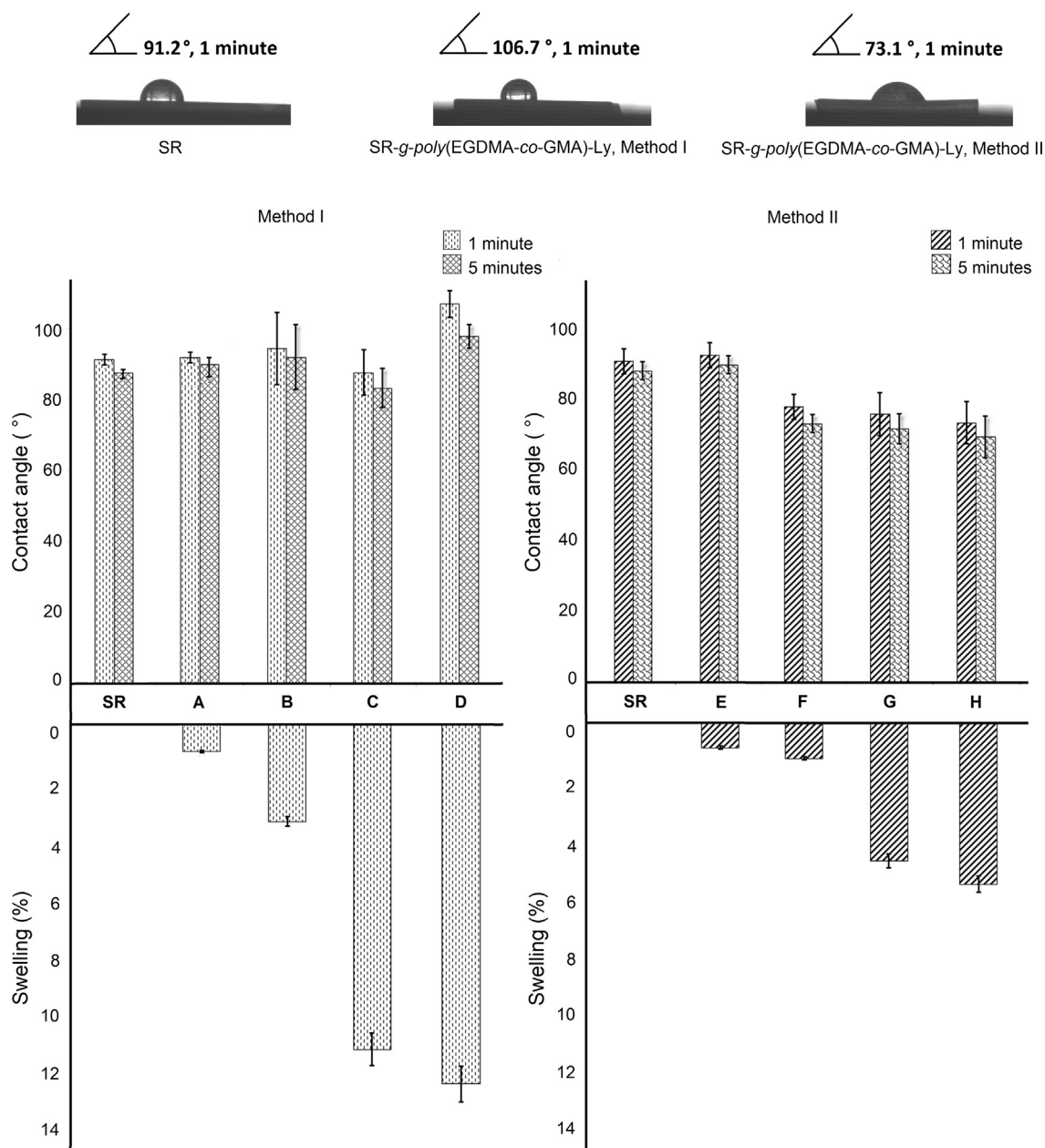


Fig. 6. Contact angle and swelling percentage in water at 20 °C of grafted SR-films (SR-8) and their chemical modifications by Method I and II. The contact angle was measured at 1 and 5 min and the swelling percentage after 24 h. The assigned letter corresponds to the modification showed in Fig. 1.

1464–1400  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 3G). This behavior was attributed to the formation of a secondary amine. In addition, an increase of the band located at 3676  $\text{cm}^{-1}$  was observed in Fig. 3C, which could correspond to the stretching vibrations of  $-\text{SiO}-\text{H}$  bonds due to the partial surface loss of the film by the hydrolysis.

The spectra of lysozyme-immobilized grafted SR-films (Fig. 3D and H) evidenced new bands of weak intensity at 1652 and 1659  $\text{cm}^{-1}$ , which can be assigned to the stretching vibrations of the amide groups of lysozyme in  $\alpha$ -helical structure [39,40]. The band at 3350–3224  $\text{cm}^{-1}$  showed an increment in its intensity due to the stretching vibrations of the  $-\text{OH}$  and  $-\text{NH}_2$  groups of lysozyme [41].

### 3.3. Thermal properties and viscoelastic behavior

The DSC thermogram of SR-g-(EGDMA-co-GMA) film showed decomposition at 277.8 °C, while films that underwent the chemical reactions and immobilization of lysozyme exhibited additional thermal events due to the incorporation of the amino and formyl

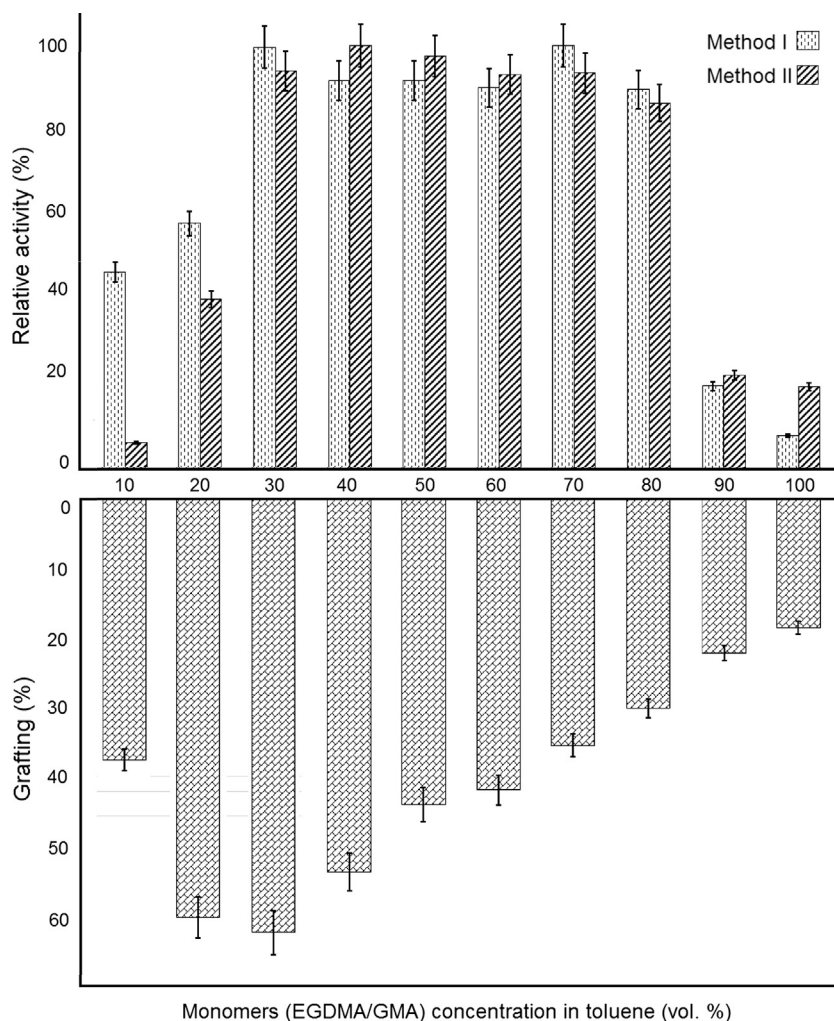


Fig. 7. Relative enzymatic activity of lysozyme-immobilized films which were processed using Method I and II (Series 1 in Table 1). The optimal activity was taken from the lysozyme immobilized on the grafted SR-8 film at pH = 7 and 30 °C, for 4 h.

groups (Fig. 4). Nevertheless, the most important changes were observed after immobilization of lysozyme on grafted SR-films (Fig. 4D and H). DSC scans of lysozyme-immobilized films were quite similar disregarding the method applied to activate the SR-g-(EGDMA-co-GMA) surface. In both cases, transitions at 104 and 196.9 °C for films processed applying Method I, and at 97 and 207.8 °C for films processed applying Method II can be attributed to the immobilized lysozyme.

Regarding the TGA runs, SR-g-(EGDMA-co-GMA) films (Fig. 5A and E) showed decomposition in two steps. The first step corresponded to the thermal decomposition of the *poly*(EGDMA-co-GMA) grafting, and the second one to the decomposition of the silicone rubber. The thermograms of the chemically modified grafted SR-films did not present a multistep decomposition, but an unstable simple decomposition. Compared to initial grafted SR-film, lysozyme-immobilized grafted SR-films exhibited better thermal stability and lost 10% weight at 57.7 °C (Method I) and 66.2 °C (Method II) higher temperature.

Chemical modification of SR film caused an increase in stiffness. For a fix angular frequency of 2 rad s<sup>-1</sup>, pristine SR and SR-g-(EGDMA-co-GMA) films had G' values of 1.12 · 10<sup>6</sup> and 9.61 · 10<sup>6</sup> Pa, and G'' values of 1.19 · 10<sup>5</sup> and 4.96 · 10<sup>5</sup> Pa, respectively. After application of Method I steps B, C and D, G' values raised to 1.89 · 10<sup>7</sup>, 1.29 · 10<sup>7</sup> and 2.06 · 10<sup>7</sup> Pa, and G'' values were 6.96 · 10<sup>5</sup>, 6.77 · 10<sup>5</sup> and 1.35 · 10<sup>6</sup>, respectively. In the case of Method II, application of steps F, G and H led to G' values of 6.18 · 10<sup>6</sup>, 1.51 · 10<sup>7</sup> and 1.08 · 10<sup>7</sup> Pa, and G'' values of 3.47 · 10<sup>5</sup>, 7.32 · 10<sup>5</sup> and 5.55 · 10<sup>5</sup> Pa, respectively. Finally, after immobilization of lysozyme, Method I SR films had G' and G'' values of 1.47 · 10<sup>7</sup> and 9.26 · 10<sup>5</sup> Pa, while Method II SR films had G' and G'' values of 1.17 · 10<sup>7</sup> and 6.49 · 10<sup>5</sup> Pa. Overall, compared to pristine SR film, dried lysozyme-immobilized films had one-order of magnitude greater G' and G'' values. Nevertheless, viscoelastic properties of lysozyme-immobilized films processed applying Method II were similar to those of SR-g-(EGDMA-co-GMA) films, which also suggests that the subsequent functionalization mainly occurred at the surface.



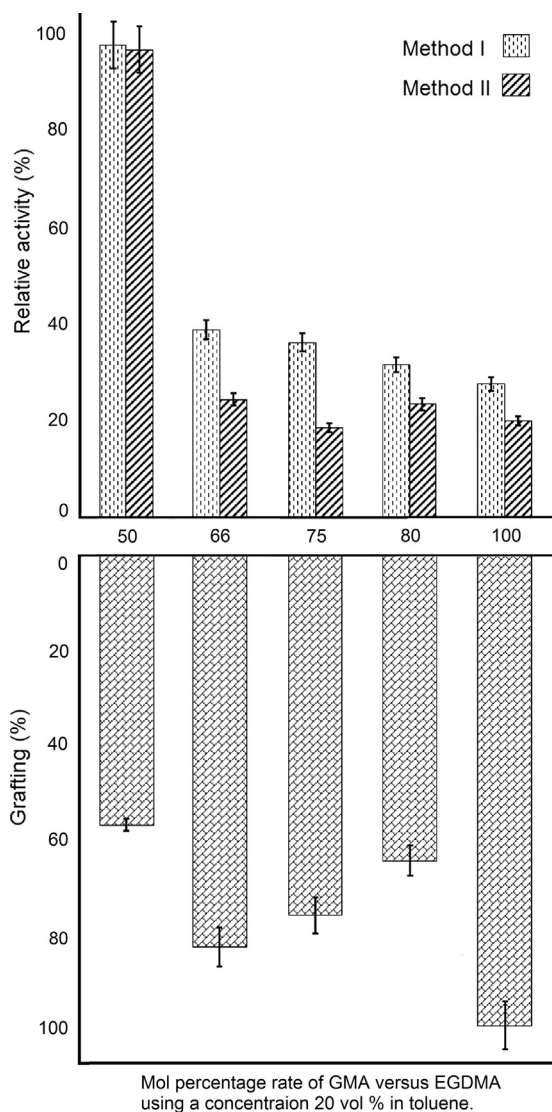


Fig. 8. Relative enzymatic activity of SR-films (upper plot) grafted using different mol percentages of GMA versus EGDMA (Series 2 in Table 2) and then processed by Method I and II to immobilize lysozyme. The optimal activity was taken from the lysozyme immobilized on the grafted SR-8 film at pH = 7 and 30 °C, for 4 h.

### 3.4. Contact angle and swelling study

Pristine SR (Fig. 6) and SR-g-(EGDMA-co-GMA) films showed high contact angle (91.2° and 91.4°) and low swelling percentage (0 and 0.87%) in water due to the material hydrophobicity. After the chemical processing, grafted SR-films processed applying Method I (Fig. 1B–D) had higher contact angle but also swelling percentage than ones prepared using Method II (Fig. 1F–H). As explained above (Section 3.1), Method II may generate hydrophilic groups mainly on the very surface of the films allowing immobilization of lysozyme only on the surface of the grafted layer of the film and not in the bulk. Therefore, the surface exhibited low contact angle values, but the internal hydrophobicity of the film remained and the swelling percentage was low.

### 3.5. Enzymatic activity of grafted SR-films with immobilized lysozyme

A first screening of the enzymatic activity was carried out in *M. lysodeikticus* suspension using SR-films with different grafting degrees as indicated in Tables 1 and 2. Lysozyme-immobilized SR-8 films showed the highest enzymatic activity at 30 °C and pH = 7, and for the sake of comparison activity of all other films was referred to it. Lysozyme immobilized on grafted SR-films that were obtained using a concentration of monomers between 30 and 80 vol.% (Table 1) had similar enzymatic activity regardless of the method used for the activation of SR-g-(EGDMA-co-GMA) films (Fig. 7). This finding suggests that the enzymatic activity is due to lysozyme immobilized on the surface of the grafted SR-films, which can enter into contact with the substrate more easily. The inner grafting inside the SR films, which is facilitated by the presence of toluene (see in Fig. 7 large grafting percentages for films exposed to

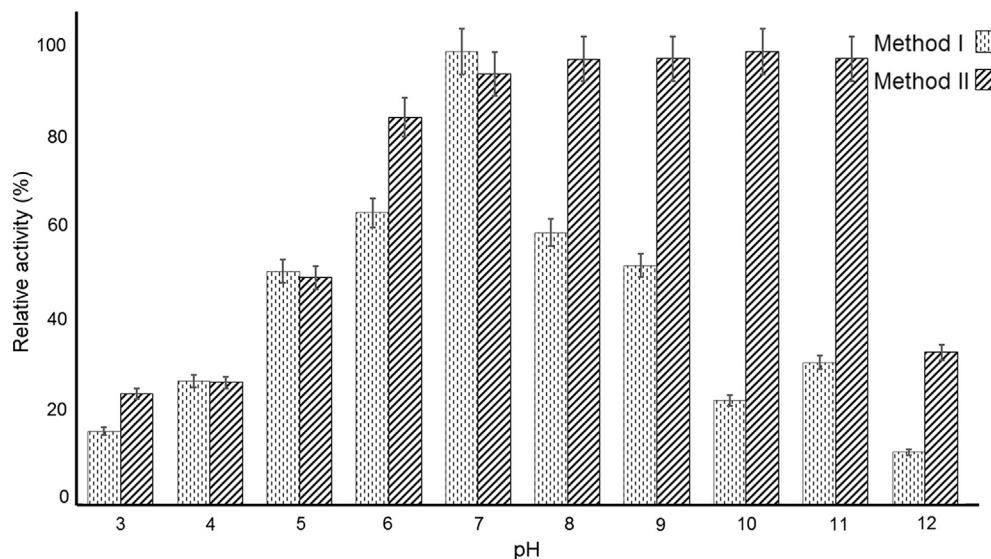


Fig. 9. Relative enzymatic activity at different pH values (30 °C, for 4 h) of lysozyme-immobilized SR-8 film, prepared using Method I and II. The optimal activity was taken from the lysozyme immobilized on the grafted SR-8 film at pH = 7, 30 °C, for 4 h.

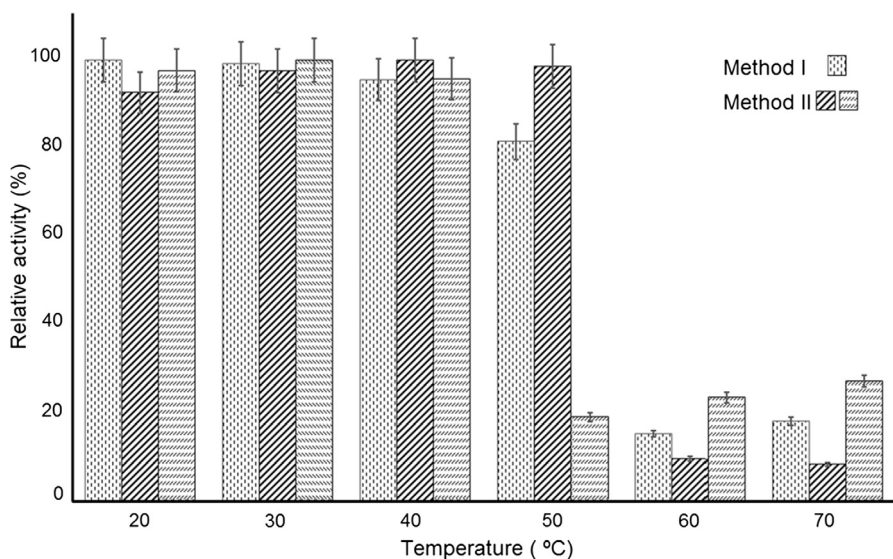


Fig. 10. Relative enzymatic activity at different temperatures of lysozyme-immobilized SR-8 film, prepared using Method I (pH = 7) and Method II (pH = 7; and pH = 11). The optimal activity was taken from the lysozyme immobilized on the grafted SR-8 film at pH = 7 and 30 °C, for 4 h.

medium with low content in monomers) did not benefit the immobilization of the lysozyme. Moreover, contrary to being useful for the immobilization, inner grafting provoked damage into the film (showed as surface erosion) when the chemical reactions were carried out, having a detrimental effect on the original properties of the SR film.

The surface loss was only observed when Method I was used with SR-g-(EGDMA-co-GMA) films of the first series that were obtained using monomer concentrations between 10 and 70 vol.%; namely those with a major inner grafting. Therefore, in the case of Method I SR-g-(EGDMA-co-GMA) films obtained using monomers:toluene 80:20% v/v medium (SR-8 in Table 1) exhibited the best balance between grafting percentage (25.2%) and lysozyme activity (one of the highest recorded; see Fig. 7) while allowing the films to retain the original properties.

A second series of SR-g-(EGDMA-co-GMA) films was prepared using higher GMA/EGDMA ratios (Series 2 in Table 2) with the aim of elucidating whether an increase in reactive groups in the film surface could improve lysozyme activity. However, films processed by either Method I or Method II showed a considerable decrease of the enzymatic activity (Fig. 8). The activity loss suggests that lysozyme is immobilized more tightly, with the participation of an increased number of covalent bonds, altering the enzyme conformation or blocking the active site [27,30,31].



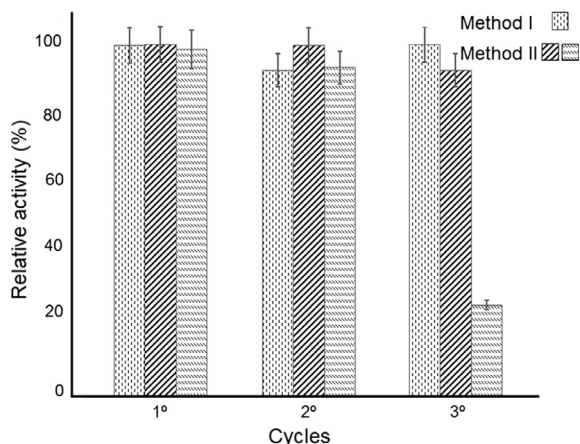


Fig. 11. Relative activity of lysozyme-immobilized SR-8 film in reused cycles, prepared using Method I (pH = 7 and 30 °C, 4 h) and Method II (pH = 7 and 30 °C, 4 h; pH = 11 and 30 °C, 4 h).

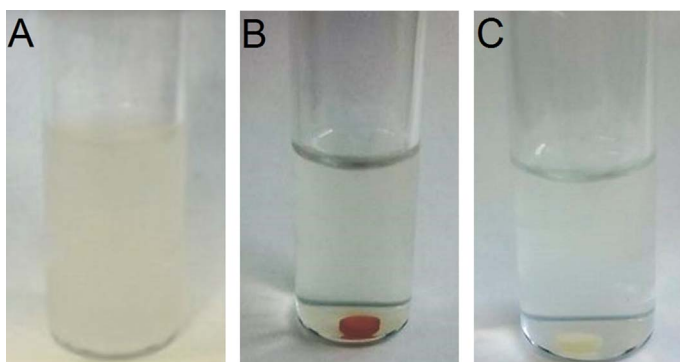


Fig. 12. Photographs of *M. lysodeikticus* suspensions before (A) and after the enzymatic activity assay of (B) lysozyme-immobilized on grafted SR-8 by Method I (5 mm dark disc), and (C) lysozyme immobilized on grafted SR-8 by Method II (5 mm white disc). Grafted SR-8 films with immobilized lysozyme were stored for 2 months in a pH 7 phosphate buffer at 5 °C and then tested in 4 mL of *M. lysodeikticus* suspensions at 30 °C for 4 h.

### 3.5.1. Effect of pH on the activity of immobilized lysozyme

Grafted SR-8 films processed by Method I and II were chosen for a detailed analysis of the effects of pH and temperature on the enzymatic activity. The amount of immobilized lysozyme for SR-g-(EGDMA-co-GMA) films with  $25 \pm 2\%$  graft was  $1.35 \pm 0.23 \text{ mg cm}^{-2}$  for Method I, and  $1.80 \pm 0.65 \text{ mg cm}^{-2}$  for Method II.

The enzymatic activity of SR-8 films processed by Method I and II was similar when the pH was between 3 and 7, at 30 °C. Method I showed the highest lysozyme activity at pH 7. Differently, lysozyme immobilized using Method II exhibited high activity in a wider pH range of pH from 6 to 11 (Fig. 9), which indicates that the bonds generated in this method enhance the stability of the lysozyme even in medium of high pH. It should be noted that free lysozyme in solution has higher enzymatic activity than after being immobilized (heterogeneous system) when the tests were carried out in buffer pH 7.0. However, free lysozyme rapidly lost its activity at pH higher than 8, while after immobilization enzymatic activity was recorded even at pH 12. Immobilization has the additional advantage of an easier handling and recycling, as explained below.

### 3.5.2. Effect of temperature on the activity of immobilized lysozyme

Activity of lysozyme-immobilized SR-8 films was evaluated at temperatures ranging from 20 to 70 °C (Fig. 10). Films that were processed according to Method I were evaluated at a fix pH of 7, while for those functionalized applying Method II the effect of temperature was tested at pH 7 and 11. Films processed by either method performed similarly in the 20–40 °C range at the tested pH conditions. At 50 °C and pH 7, Method II rendered films with higher activity than those obtained from Method I, which confirms that Method II confers greater stability to the enzyme. At pH 11, the activity dramatically dropped down at 50 °C, indicating lysozyme denaturalization.

The perceptible activity at 60–70 °C of lysozyme-immobilized SR-8 films (Fig. 10) could be due to the instantaneous activity of the lysozyme (in an interval of time from 30 to 60 s) before denaturation. To corroborate this hypothesis, films exposed at 60 or 70 °C were washed with cold water and tested again under the same conditions as before. The results showed that these films did not exhibit any enzymatic activity. A similar result was observed when films tested at pH = 11 and 50 °C were evaluated again.

### 3.5.3. Reusability of immobilized lysozyme

Reusability of lysozyme-immobilized SR-8 films was tested using films that had been stored for 2 months in phosphate buffer pH 7 at 5 °C. There were no differences in activity at 30 °C between the stored films and the freshly prepared ones (Figs. 11 and 12). This behavior is consistent with the enhanced stability of lysozyme after immobilization. Only the films obtained by Method II and tested at pH 11 suffered loss of activity after three test cycles, which was provoked by the higher pH.

## 4. Conclusions

Lysozyme can be efficiently immobilized onto SR-g-(EGDMA-co-GMA) films after transformation of glycidyl groups into more reactive formyl groups applying two different approaches. Advantages of Method II compared to Method I refer to derivatization only at the surface of the films without damage of the inner structure. The activity of the immobilized lysozyme does not depend on the grafting percentage of the films, which can be modified by tuning the concentration of the monomers, because only the surface of the film is used for the immobilization. Overall, films obtained using monomers:toluene 80:20 vol.% medium (SR-8) have the best balance between grafting percentage (25.2%), lysozyme activity (one of the highest recorded) and mechanical properties. From a practical point of view, either method provides lysozyme-immobilized films that maintain an excellent activity against *Micrococcus lysodeikticus* at pH 7 in the temperature range of 20–50 °C. Method II provides lysozyme-immobilized films that maintain the hydrolytic activity even up to pH values of 11 at 30 °C. Importantly, storage of the films for several months in phosphate buffer pH 7 at 5 °C does not diminish the activity, and the lysozyme-immobilized films can withstand several test cycles at pH 7 at 30 °C. In sum, the developed SR-g-(EGDMA-co-GMA)-lysozyme system may allow controlling the risk of microbial proliferation (mainly Gram-positive bacteria) on medical devices or food processing/storage materials.

## Acknowledgements

This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México under Grant IN201617 (Mexico); MICINN under Grant SAF2014-52632-R (Spain); FEDER. The authors thank Luisa Islas from ICN-UNAM and Magdalena Quezada from IQ-UNAM for their technical assistance.

## Conflict of interest

The authors have no conflict of interest.

## References

- [1] M.J. Whitford, The chemistry of silicone materials for biomedical devices and contact lenses, *Biomaterials* 5 (1984) 298–300.
- [2] A. Rahimi, A. Mashak, Review on rubbers in medicine: natural, silicone and polyurethane rubbers, *Plast. Rubber Compos.* 42 (2013) 223–230.
- [3] R. Yoda, Elastomers for biomedical applications, *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.* 9 (1998) 561–626.
- [4] A. Formes, B. Diehl, Investigation of the silicone structure in breast implants using <sup>1</sup>H NMR, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 93 (2014) 95–101.
- [5] A.J.T. Teo, A. Mishra, I. Park, Y.J. Kim, W.T. Park, Y.J. Yoon, Polymeric biomaterials for medical implants and devices, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2 (2016) 454–472.
- [6] R.R. Saxon, R.E. Barton, R.M. Katon, P.C. Lakin, H.A. Timmermans, B.T. Uchida, F.S. Keller, J. Rösch, Treatment of malignant esophagorespiratory fistulas with silicone-covered metallic Z stents, *J. Vasc. Inter. Radiol.* 6 (1995) 237–242.
- [7] Z.Y. Lei, T. Liu, W.J. Li, X.H. Shi, D.L. Fan, Biofunctionalization of silicone rubber with microgroove-patterned surface and carbon-ion implantation to enhance biocompatibility and reduce capsule formation, *Int. J. Nanomed.* 11 (2016) 5563–5572.
- [8] J. Sidwell, Global legislation for rubber materials in contact with food, in: J.S. Baughan (Ed.), *Global Legislation for Food Contact Materials*, Elsevier, Shrewsbury, UK, 2015, pp. 141–160.
- [9] H.I. Melendez-Ortiz, C. Alvarez-Lorenzo, G. Burillo, B. Magarinos, A. Concheiro, E. Bucio, Radiation-grafting of N-vinylimidazole onto silicone rubber for antimicrobial properties, *Rad. Phys. Chem.* 110 (2015) 59–66.
- [10] B. Vazquez-Gonzalez, H.I. Melendez-Ortiz, L. Diaz-Gomez, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, E. Bucio, Silicone rubber modified with methacrylic acid to host antiseptic drugs, *Macromol. Mat. Eng.* 299 (2014) 1240–1250.
- [11] S.L. Steffensen, M.H. Vestergaard, M. Groenning, M. Alm, H. Franzyk, H.M. Nielsen, Sustained prevention of biofilm formation on a novel silicone matrix suitable for medical devices, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 94 (2015) 305–311.
- [12] N. Hadjesfandiari, K. Yu, Y. Mei, J.N. Kizhakkedathu, Polymer brush-based approaches for the development of infection-resistant surfaces, *J. Mater. Chem. B* 2 (2014) 4968–4978.
- [13] Al. Kreider, K. Richter, S. Sell, M. Fenske, C. Tornow, V. Stenzel, I. Grunwald, Functionalization of PDMS modified and plasma activated two-component polyurethane coatings by surface attachment of enzymes, *Appl. Surf. Sci.* 273 (2013) 562–569.
- [14] D. Boyaci, F. Korel, A. Yemenicioğlu, Development of activate-at-home-type edible antimicrobial films: an example pH-triggering mechanism formed for smoked salmon slices using lysozyme in whey protein films, *Food Hydrocoll.* 60 (2016) 170–178.
- [15] Q. Yu, L.K. Ista, G.P. Lopez, Nanopatterned antimicrobial enzymatic surfaces combining biocidal and fouling release properties, *Nanoscale* 6 (2014) 4750–4757.
- [16] K. Liu, Z. Su, S. Miao, G. Ma, S. Zhang, UV-curable enzymatic antibacterial waterborne polyurethane coating, *Biochem. Eng. J.* 113 (2016) 107–113.
- [17] S.J. Yuan, J. Yin, W. Jiang, B. Liang, S.O. Pehkonen, C. Choong, Enhancing antibacterial activity of surface-grafted chitosan with immobilized lysozyme on bioinspired stainless steel substrates, *Colloid. Surf. B* 106 (2013) 11–21.
- [18] T. Mizutani, Estimation of protein and drug adsorption onto silicone-coated glass surfaces, *J. Pharm. Sci.* 70 (1981) 493–496.
- [19] A.M. Ragheb, O.E. Hileman, M. Brook, The use of poly(ethylene oxide) for the efficient stabilization of entrapped  $\alpha$ -chymotrypsin in silicone elastomers: a chemometric study, *Biomaterials* 26 (2005) 6973–6983.
- [20] M. Asgher, M. Shahid, S. Kamal, H.M.N. Iqbal, Recent trends and valorization of immobilization strategies and lignolytic enzymes by industrial biotechnology, *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* 101 (2014) 56–66.
- [21] A. Rekuć, J. Bryjak, K. Szymańska, A.B. Jarzębski, Laccase immobilization on mesostructured cellular foams affords preparations with ultra high activity, *Proc. Biochem.* 44 (2009) 191–198.
- [22] M. Hartmann, X. Kostrov, Immobilization of enzymes on porous silicas- benefits and challenges, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6277–6289.
- [23] Y. Poojari, A.S. Palsule, S.J. Clarson, R.A. Gross, Immobilization and activity of pepsin in silicone elastomers, *Silicon* 1 (2009) 37–45.

- [24] J.M. Guisan, G. Alvaro, R.F. Lafuente, C.M. Rosell, A. Tagliani, Stabilization of heterodimeric enzyme by multipoint covalent immobilization: penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila*, *Biotechnol. Bio-eng.* 42 (1993) 455–464.
- [25] C.A. Malpass, K.W. Millsap, H. Sidhu, L.B. Gower, Immobilization of an oxalate-degrading enzyme on silicone elastomer, *J. Biomed. Mater. Res. A* 63 (2002) 822–829.
- [26] S. Minko, Grafting on solid surfaces: “Grafting-to” and “grafting-from” methods, in: M. Stamm (Ed.), *Polymer Surfaces and Interfaces*, Germany, 2008, pp. 215–234.
- [27] T. Segura, G. Burillo, Radiation modification of silicone rubber with glycidylmethacrylate, *Rad. Phys. Chem.* 91 (2013) 101–107.
- [28] R.A. Valencia-Mora, E. Zavala-Lagunes, E. Bucio, Grafting of thermo-sensitive N-vinylcaprolactam onto silicone rubber through the direct radiation method, *Rad. Phys. Chem.* 124 (2016) 155–158.
- [29] G. Gonzalez-Perez, G. Burillo, T. Ogawa, M. Avalos-Borja, Grafting of styrene and 2-vinylnaphthalene onto silicone rubber to improve radiation resistance, *Polym. Degrad. Stab.* 97 (2012) 1495–1503.
- [30] H. Magaña, K. Palomino, J.M. Cornejo-Bravo, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, E. Bucio, Radiation-grafting of acrylamide onto silicone rubber films for diclofenac delivery, *Rad. Phys. Chem.* 107 (2015) 164–170.
- [31] C.C. Ferraz, G.H.C. Varca, J.C. Ruiz, P.S. Lopes, M.B. Mathor, A.B. Lugão, E. Bucio, Radiation-grafting of thermo- and pH-responsive poly(N-vinylcaprolactam-co-acrylic acid) onto silicone rubber and polypropylene films for biomedical purposes, *Rad. Phys. Chem.* 97 (2014) 298–303.
- [32] C.A.B. Nava-Ortiz, G. Burillo, E. Bucio, C. Alvarez-Lorenzo, Modification of polyethylene films by radiation grafting of glycidyl methacrylate and immobilization of  $\beta$ -cyclodextrin, *Rad. Phys. Chem.* 78 (2009) 19–24.
- [33] K. Liburdi, R. Straniero, I. Benucci, A.M. Vittoria Garzillo, M. Esti, Lysozyme immobilized on micro-sized magnetic particles: kinetic parameters at wine pH, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166 (2012) 1736–1746.
- [34] M.M. Lynch, J. Liu, M. Nigra, M.O. Coppens, Chaperonin-inspired pH protection by mesoporous silica SBA-15 on myoglobin and lysozyme, *Langmuir* 32 (2016) 9604–9610.
- [35] H. Noritomi, R. Ishiyama, R. Kai, D. Iwai, M. Tanaka, S. Kato, Immobilization of lysozyme on biomass charcoal powder derived from plant biomass wastes, *J. Biomat. Nanobiotech.* 3 (2012) 446–451.
- [36] G.G. Flores-Rojas, E. Bucio, Radiation-grafting of ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and glycidyl methacrylate (GMA) onto silicone rubber, *Rad. Phys. Chem.* 127 (2016) 21–26.
- [37] A.A. Homaei, R. Sariri, F. Vianello, R. Stevenato, Enzyme immobilization: an update, *J. Chem. Biol.* 6 (2013) 185–205.
- [38] Y.H. Tan, M. Liu, B. Nolting, J.G. Go, J. Gervay-Hague, G. Liu, A nanoengineering approach for investigation and regulation of protein immobilization, *ACS Nano* 25 (2008) 2374–2384.
- [39] M. van de Weert, R. van’t Hof, J. van der Weerd, R.M.A. Heeren, G. Posthuma, W.E. Hennink, D.J.A. Crommelin, Lysozyme distribution and conformation in a biodegradable polymer matrix as determined by FTIR techniques, *J. Control. Release* 68 (2000) 31–40.
- [40] Y. Yokoyama, R. Ishiguro, H. Maeda, M. Mukaiyama, K. Kameyama, K. Hiramoto, Quantitative analysis of protein adsorption on a planar surface by Fourier transform infrared spectroscopy: lysozyme adsorbed on hydrophobic silicon-containing polymer, *J. Colloid Interf. Sci.* 268 (2008) 23–32.
- [41] A. Barth, Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1767 (2007) 1073–1101.

## Covalent immobilization of lysozyme in silicone rubber modified by easy chemical grafting

**G. G. Flores-Rojas**, Departamento de Química de Radiaciones y Radioquímica, Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México CDMX 04510, México; Nano Medical Engineering Laboratory, RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan

**F. López-Saucedo** and **E. Bucio**, Departamento de Química de Radiaciones y Radioquímica, Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México CDMX 04510, México

**T. Isoshima**, Nano Medical Engineering Laboratory, RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan

Address all correspondence to G. G. Flores-Rojas at [ggabofo@hotmail.com](mailto:ggabofo@hotmail.com) and E. Bucio at [ebucio@nucleares.unam.mx](mailto:ebucio@nucleares.unam.mx)

(Received 18 August 2017; accepted 2 October 2017)

### Abstract

Functionalization of silicone rubber films with lysozyme was achieved by grafting copolymerization and its chemical activation allowing the covalent immobilization of the enzyme. The new materials were characterized by means of Fourier-transform infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry, thermogravimetric analysis, contact angle, atomic force microscopy, and mechanical properties of films. The enzymatic activity of films was studied by a suspension of lyophilized *Micrococcus lysodeikticus*. The activity test was inquired at different pH and temperatures, exhibiting enzymatic activity 20 °C above the free lysozyme, and at pH = 5 where the free lysozyme did not show activity.

### Introduction

The antimicrobial materials are the utmost importance in areas such as medical and food industry<sup>[1]</sup> and other areas where the bacteria growth is potential and require to inhibit it,<sup>[2]</sup> to preventing the bacterial attachment and improving the functionality, lifetime of devices.

The medical area employs these materials in the prevention of clinic complications provoked by bacterial infections that sometimes even leading to death<sup>[3, 4]</sup> But in the case of food area, the antimicrobial materials are mainly required for the packaging and processing materials to hinder the accumulation of bacteria with a severe impact on the food quality, productivity, and processing efficiency.<sup>[5]</sup>

The covalent immobilization of enzymes offers the possibility to provide to material with antimicrobial activity using the adequate enzyme<sup>[6]</sup> avoiding the growth of microorganism by passive antimicrobial activity. Preventing the formation of surface biofilms, and even though improving the enzymatic stability at a wide range of pH and temperature<sup>[7]</sup> due to the enzyme has its tertiary structure stabilized by the covalent bonds with the matrix.

Lysozyme is the most commonly used enzyme to provide high antimicrobial activity<sup>[8]</sup> to materials,<sup>[7]</sup> using a moderate amount. Some methods applied for the enzyme immobilization has been by means of exchange reactions of thiol-disulfide,<sup>[9]</sup> formation of Schiff bases,<sup>[7]</sup> through the peptide<sup>[8]</sup> or diazo bonds<sup>[10]</sup> and alquilation reactions.<sup>[11]</sup> However, the best method is through the formation of a Schiff base using a formyl

and amino groups from the matrix and the enzyme. The formyl groups are possible to provide either to the enzyme by modification with periodate or to the matrix with glutaraldehyde.<sup>[12]</sup> This reaction offers the advantage to carry out the enzyme immobilization using less aggressive conditions such as at low temperature and the use of water as a medium of reaction, which is a natural medium for the enzymes that also allows the control of pH and ionic strength, guaranteeing the integrity of the enzyme.

Despite there are several methods of enzyme immobilization, these sometimes are difficult because the matrix does not have adequate chemical groups.<sup>[13]</sup> Hence, it is necessary to make the redesign of the matrix through of blends,<sup>[14]</sup> composites,<sup>[15]</sup> and grafting polymerization<sup>[16]</sup> providing the suitable characteristics such as hydrophilicity and reactive functional groups that allow the immobilization of lysozyme.<sup>[7, 17]</sup>

The grafting polymerization is a useful method to obtain materials with the tailored surface or bulk.<sup>[18]</sup> Therefore, a less number and amount of reagents are required to the redesign one part of the matrix.<sup>[19]</sup> This technique has allowed the use of several monomers, which have provided to the matrix pH, thermal and magnetic responsiveness.<sup>[20]</sup> Other possible improvements are the modification of hydrophilicity, the addition of biocompatibility<sup>[21]</sup> as well as the endowment of chemical groups through the grafting polymer allowing new chemical reactions.<sup>[22]</sup>

The majority of the grafting polymerizations are made with gamma-rays<sup>[23]</sup> or different energy sources such as plasma<sup>[24,25]</sup>

or UV<sup>[26]</sup> as pre-treatment or as initiators because many of matrices have a low chemical reactivity, for example, polypropylene (PP),<sup>[21]</sup> silicone rubber (SR).<sup>[20,22]</sup> Nevertheless, the fair conditions might enable to perform the grafting polymerization by chemical initiators, which have certain advantages since this does not require specialized and expensive equipment and dangerous energy sources as the gamma-rays, allowing standard conditions of reaction.

In this research, we report the lysozyme immobilization in SR-film modified through grafting copolymer performed by a chemical initiator. The used monomers were ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), and glycidyl methacrylate (GMA), providing adequate functional groups from GMA for subsequent chemical activation and immobilization of lysozyme.

## Results and discussion

### Synthesis of materials

SR were modified successfully by grafting of P(EGDMA-*co*-GMA), using azobisisobutyronitrile (AIBN) as an initiator<sup>[22]</sup> (The complete procedure is in Supplementary information S1.). The monomers provided reactive chemical groups such as epoxide groups from GMA allowing the chemical activation. In the case of EGDMA, this was used to provide non-reactive hydrophilic groups, which also facilitated the removal of copolymer formed in the grafting polymerization since the grafting copolymer and the copolymer were not compatible.

The grafting degree was controlled by the monomer concentration and the swelling degree of the matrix, obtaining a grafting range from 3.8 to 14.8 wt.%. The grafting degree increased as the monomer concentration increased, reaching the maximum grafting degree in at a monomer concentration from 40 to 60 vol.% (Table I) as it was indicated by statistical analysis using the Tukey method [see Supplementary information section ANOVA of the grafting degree at different monomers concentration (vol.%)]. Posteriorly the grafting degree showed a progressive decrease as the monomer concentration increased, giving about 4% of grafting at a monomer concentration of 100 vol.%, being this statistically the same obtained at a monomer concentration of 10 vol.%. The behavior of grafting degree was related to the swelling degree of SR in the monomer solution, as decreasing the area of grafting increased the monomer concentration (Table I).

Moreover, the use of toluene as reaction medium allowed to keep the epoxide groups in the grafting polymerization as this was not a nucleophilic solvent. However, it was not possible to observe the corresponding band of epoxide group in the infrared spectrum because of overlapping with the band assigned to  $\nu_s(\text{OC})$  from SR. Therefore, it was confirmed indirectly after the reaction with ethylenediamine, exhibiting the characteristic bands of  $\nu_{\text{as}}(\text{NH}_2)$  and  $\nu(\text{OH})$  groups. Also, the mechanical properties of the SR remained after the grafting polymerization (see the section Mechanical properties) since this method is less aggressive with the matrix as the gamma-rays are able to break the polymer chains of the matrix leading to a loss of mechanical properties of the material.

**Table I.** Percentage of P(EGDMA-*co*-GMA) grafted in SR at different monomer concentration and the swelling percentage of the pristine SR in the grafting medium.

Code	Monomer concentration (EGDMA/GMA) in toluene (vol.%)	Swelling (wt.%) in the grafting system	Grafting percentage (wt.%)
SR-1	10	105.1 ± 5.2	3.8 ± 0.2
SR-2	20	91.2 ± 4.5	6.8 ± 0.3
SR-3	30	70.2 ± 3.5	10.0 ± 0.4
SR-4	40	53.5 ± 2.6	14.8 ± 0.6
SR-5	50	40.8 ± 2.0	13.2 ± 0.5
SR-6	60	29.4 ± 1.4	14.0 ± 0.6
SR-7	70	21.9 ± 0.8	12.6 ± 0.5
SR-8	80	16.7 ± 0.5	12.4 ± 0.5
SR-9	90	11.3 ± 0.2	8.9 ± 0.5
SR-10	100	8.8 ± 0.4	4.8 ± 0.2

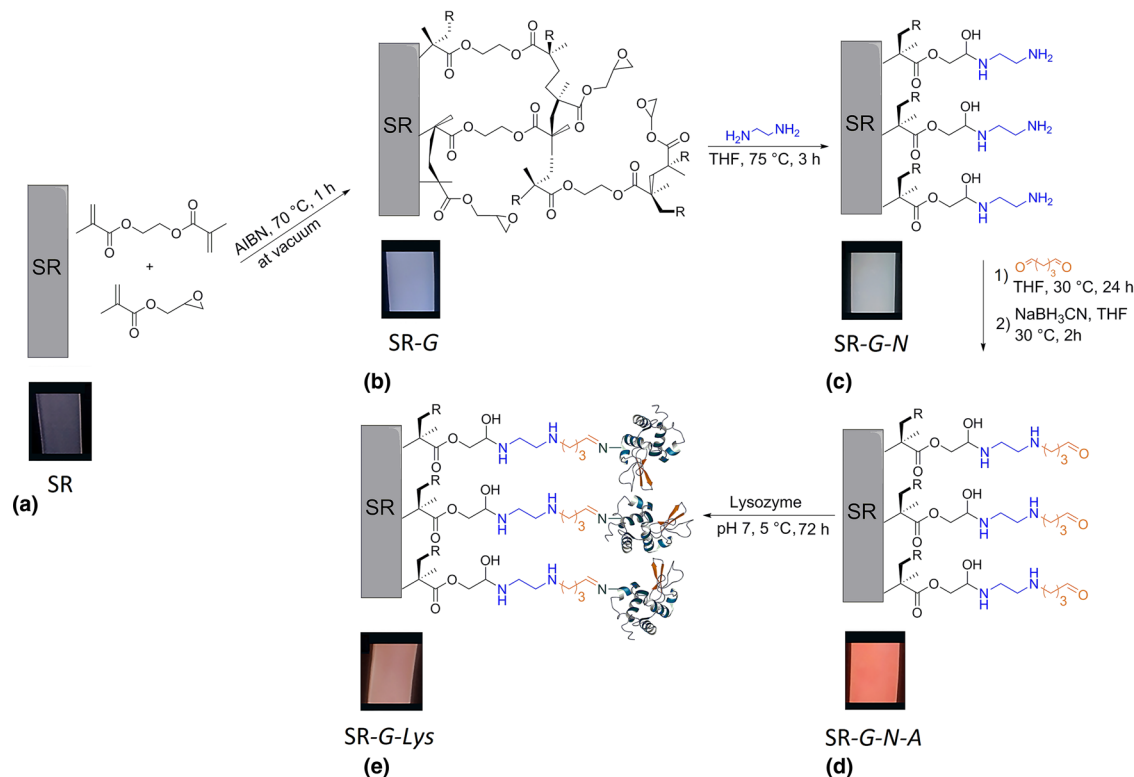
On another hand, the chemical modifications of grafting copolymer were necessary to facilitate the immobilization of lysozyme. Despite there are several reports on enzyme immobilization through the opening of the epoxide groups with amine groups from the enzyme, this sometimes is difficult to accomplish ending in a denaturalization of the enzyme due to aggressive conditions used. Therefore, we chose the formyl group as an excellent group to carry out this task because of its high chemical reactivity with amine groups from lysozyme in conditions of low temperature, allowing the use of water as a medium of reaction in presence of other chemical species without hindering the immobilization process.

The lysozyme immobilization success was confirmed with Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB), as described in the section Confirmation of lysozyme immobilization. Moreover, it was possible to observe by simple view the appearance changes of the SR in the immobilization process of lysozyme (Fig. 1), but, the most characteristic change was observed with the glutaraldehyde reaction showing an orange color.

### Attenuated total reflection infrared spectroscopy (ATR-FTIR) analysis

ATR-FTIR analysis provided general information about modifications of SR in the immobilization process of lysozyme. The study was carried out using dry and swollen samples. In the case of swollen samples, these exhibited new bands in the spectrum as they were not possible to observe in dry ones. However, some spectra did not have considerable changes in the shown bands due to overlapping of these provoked by the similitude of the chemical groups. This is the case of the reaction





**Figure 1.** Scheme of the immobilization process of lysozyme in SR. (a) Reaction of grafting polymerization using EGDMA and GMA as monomers, and pristine SR as a matrix (SR-G), (b) Reaction of SR-G with ethylenediamine (SR-G-N), (c) SR-G-N made react with glutaraldehyde (SR-G-N-A), the chains of PEGDMA on the image were omitted for a better clarity, (d) SR-G-N-A made react with lysozyme (SR-G-Lys), (e) obtaining of SR-G-Lys.

performed with glutaraldehyde since its spectrum did not evidence the corresponding band to the formyl group. Therefore, we only did the discussion on the most significant bands that provided information about chemical modification and immobilization of lysozyme.

The ATR-FTIR spectrum of SR-G shown in the Fig. 2(b) exhibited the characteristic band of carbonyl groups at 1727/cm corresponding to grafting copolymer (see Supplementary information section Experimental) in the SR. The spectra of chemical modifications [Figs. 2(c) and 2(d)] just provided information about the first chemical reaction carried out with ethylenediamine. The most important bands of the incorporation of the amino groups to the grafted SR [Fig. 2(c)] were located at 3346 and 1488–1409/cm assigned to  $\nu_{\text{as}}(\text{NH}_2)$ ,  $\nu(\text{OH})$ , as well as the corresponding bands of the  $\delta(\text{OH})$  and  $\delta(\text{NH}_2)$ .

The spectrum of SR-G-Lys [Fig. 2(e)] evidenced a new band of weak intensity at 1656/cm, assigned to the vibrations of the “amide I” corresponding to the lysozyme. Also, the band at 3350/cm showed an increase of its absorbance because of the additional hydroxyl and amine groups from the immobilized lysozyme [Supplementary Fig. S1(b)].

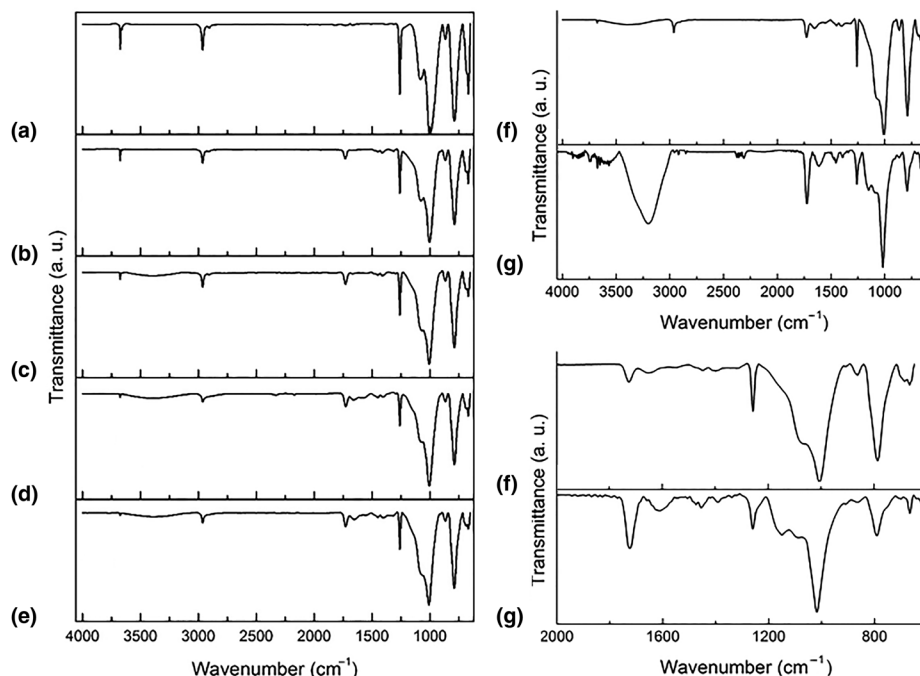
In the case of the spectra recorded with swollen SR-G-Lys samples [Fig. 2(g)], it was observed an increase of the absorbance in the bands located at 3368 and 1609/cm due to the

presence of water as well as the presence of the band at 2312/cm corresponding to  $\nu(\text{CO}_2)$ . However, the corresponding band of “amide I” for the swollen SR-G-Lys sample was not observed clearly due to overlapping with the band of water located at 1609/cm.

Moreover, the spectrum showed an increase in the absorbance in the bands located from 1727 to 1338/cm assigned to the carbonyl, carboxyl and “amide III” groups from lysozyme [Fig. 2(g)] where the last two groups are associated with hydrogen-bonding between carbonyl and hydrogens from amide.<sup>[27–29]</sup> Additionally, it was observed better the band located at 1248/cm corresponding to  $\nu(\text{CO})$  bonds, which showed a slight shift to a higher frequency, as shown in Fig. 2(g).

The new bands observed in the spectrum of the swollen SR-G-Lys samples were attributed to the chemical groups exposed from immobilized lysozyme since these bands were not observed in any of the previous infrared spectrum of SR in the immobilization process of lysozyme.

These all groups from immobilized lysozyme were not observed in the SR-G-Lys sample in the dry conditions because these groups are hydrophilic. Therefore, lysozyme retains a compact structure at low hydration level<sup>[30]</sup> overlapping the bands of the groups or adopting a conformational structure preventing their exposition.



**Figure 2.** ATR-FTIR study was performed in dry and swollen conditions using water as a solvent at 25 °C. The spectra were recorded from the SR-4 (with a grafting degree of 14.8%, Table I) in each step of immobilization process of lysozyme. Dry samples: (a) SR, (b) SR-G, (c) SR-G-N, (d) SR-G-N-A, (e) SR-G-Lys, (f) SR-G-Lys, and swollen sample: (g) SR-G-Lys.

### Differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric (TGA) analysis

The thermal analyses provided information about the transition and thermal decomposition of the grafted SR and confirmed the grafting copolymer by comparison with the copolymer. Also, the thermal analysis exhibited the changes mainly in the grafting copolymer provoked through the chemical activation and the covalent immobilization of lysozyme.

The DSC thermogram of SR-G showed decomposition at 288.9 °C [Fig. 3(b)] corresponding to P(EGDMA-co-GMA) (Supplementary Fig. S2a), while SR-G made react with ethylenediamine (SR-G-N) exhibited additional thermal transition at 180 °C due to the incorporation of the amino groups [Fig. 3(c)]. However, any clear thermal transition was observed for the next chemical reaction with glutaraldehyde (SR-G-N-A), as shown the Fig. 3(d). Nevertheless, the most important changes were observed in the SR-G-Lys with a transition at 120.1 °C [Fig. 3(e)], attributed to the immobilized lysozyme [Supplementary Fig. S2(b)] followed by decomposition.

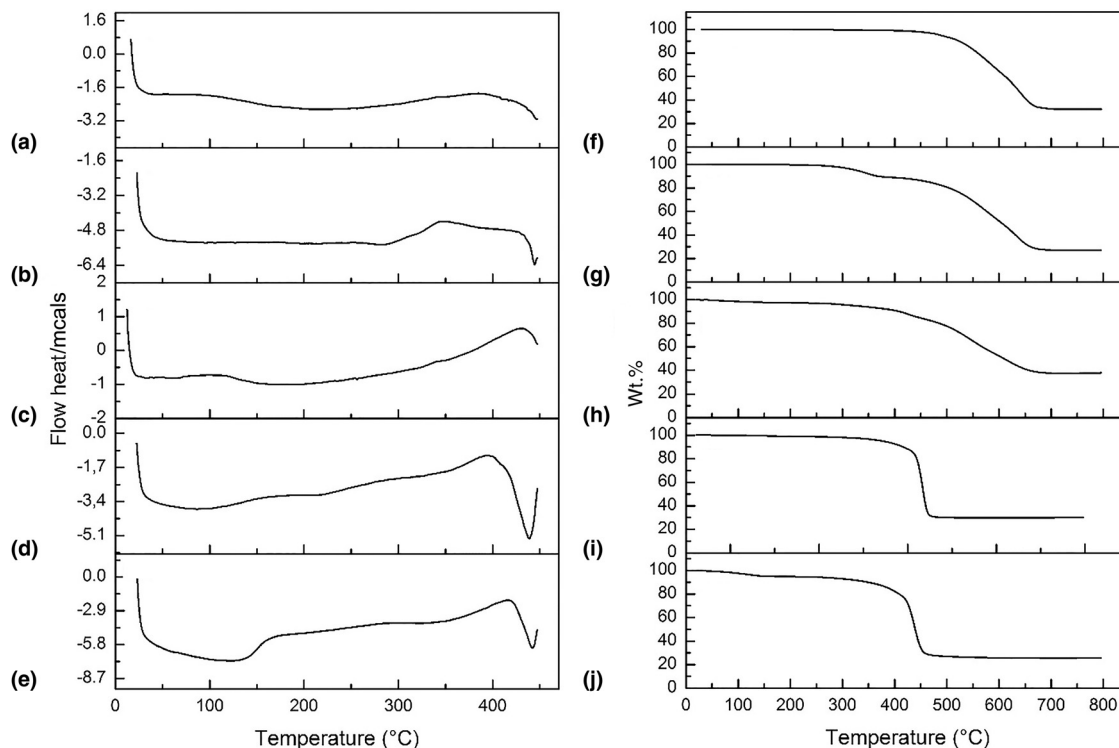
The TGA analysis performed with SR-G [Fig. 3(g)] showed two-step decomposition with a temperature of 412.7 °C at 10% weight loss. The first step corresponds to the thermal decomposition of the P(EGDMA-co-GMA) grafting [Supplementary Fig. S3(a)], and the second one to the SR with an unstable decomposition step.

The TGA thermograms of the films in the chemical activation process (SR-G-N and SR-G-N-A) exhibited less thermal stability

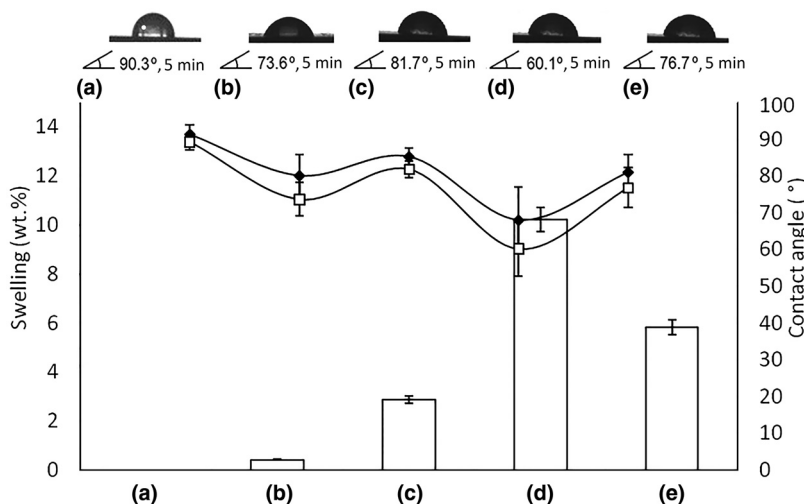
compared with SR-G, with an unstable decomposition for the chemical modification with ethylenediamine [Fig. 3(h)] at 408.6 °C (10% weight loss). In the case of the second reaction with glutaraldehyde (SR-G-N-A), the films had a process of decomposition in one stage [Fig. 3(i)] with a decomposition temperature at 390.3 °C (10% weight loss). Finally, SR-G-Lys had two decomposition steps Fig. 3(j) with a 10% weight loss temperature at 349.2 °C. The first decomposition temperature was attributed to lysozyme [Supplementary Fig. S3(b)]. In addition, these all decomposition temperatures were consistent with those of DSC thermograms.

### Contact angle and swelling study

The contact angle of the SR in the immobilization process of lysozyme (Fig. 4) exhibited a considerable change for the SR-G-N-A as the statistical analysis indicated (see Supplementary information section ANOVA of the contact angle study in the immobilization process of lysozyme), which had the least contact angle indicating a major hydrophilicity due to the hydrophilic groups added such as amines, hydroxyl, and formyl groups. In the case of swelling study, this showed in a general way a progressive increase of swelling of the films as the new hydrophilic groups were provided to the matrix. However, the SR-G-Lys had a decrease of swelling percentage attributed to the lysozyme immobilized in the SR-G-N-A, which provoked a higher cross-linking degree, restricting the swelling of this.



**Figure 3.** DSC and TGA thermograms were recorded from the SR-4 (with a grafting degree of 14.8%, Table I) in the immobilization process of lysozyme in dry conditions under a flow of  $N_2$  and a rate of  $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ . DSC thermograms: (a) SR, (b) SR-G, (c) SR-G-N, (d) SR-G-N-A and (e) SR-G-Lys. TGA thermograms: (f) SR, (g) SR-G, (h) SR-G-N, (i) SR-G-N-A, and (j) SR-G-Lys.



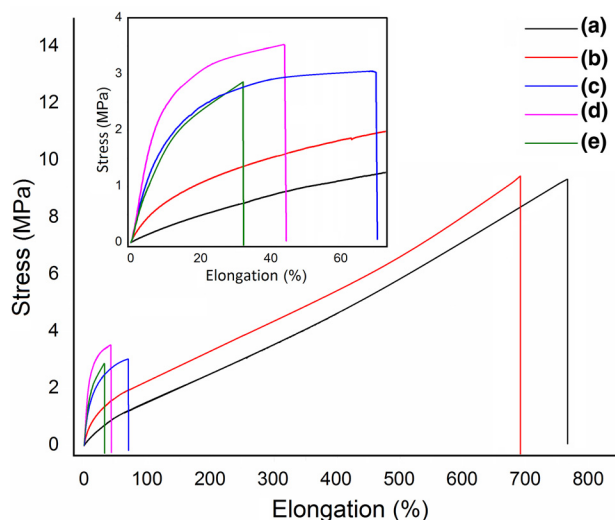
**Figure 4.** Contact angle by drop and the swelling percentage were performed using water at  $25\text{ }^\circ\text{C}$  with the SR-4 (with a grafting degree of 14.8%, Table I) in each step of immobilization process of lysozyme, (a) SR, (b) SR-G, (c) SR-G-N, (d) SR-G-N-A, and (e) SR-G-Lys.  $\square$  swelling percentage,  $\blacklozenge$  contact angle at 1 minute and  $\square$  5 minutes.

### Mechanical properties

The study of mechanical properties showed that the grafting polymerization did not affect considerably the mechanical properties of SR [Figs. 5(a) and 5(b)]. However, there was a

considerable change when the SR-G were made to react with ethylenediamine [Fig. 5(c)] increasing its hardness given as Young's modulus from 2.98 to 35.54 MPa and decreasing the maximum load from 45.09 N to 15.77 N for SR-G and





**Figure 5.** Mechanical properties were recorded using a sample with a grafting degree of 14.8% (SR-4, Table I) in each step of immobilization process of lysozyme in dry conditions at 23 °C and a speed of 10 mm/min, (a) SR, (b) SR-G, (c) SR-G-N, (d) SR-G-N-A, and (e) SR-G-Lys.

SR-G-N, respectively. These changes were also observed in the tensile strength and elongation at break of SR-G and SR-G-N, respectively (Table II). All the changes in the mechanical properties were probably due to strong interactions by the hydrogen bonds generated by the amine and hydroxyl groups of the film. After the first chemical reaction, the mechanical properties did not have considerable changes in the next reactions [Figs. 5(d) and 5(e)].

### AFM study

Figure 6 shows the AFM images indicating the changes in the surface morphology of SR provoked by the P(EGDMA-co-GMA) grafting as well as the immobilization process of lysozyme. The SR and SR-G showed a partial change in their surface nanostructures [Figs. 6(a) and 6(b)]. Nevertheless, the chemical modification by the ethylenediamine and glutaraldehyde [Figs. 6(c) and 6(d)] exhibited a more homogeneous surface covered with small particle-like nanostructures. Finally,

the image of SR-G-Lys [Fig. 6(e)] showed the formation of spherical nanostructures covering the surface. This nanostructure seems to be homogeneous along the surface, even though it was possible to observe few aggregates of larger size on the surface, possibly generated by the lysozyme immobilized on the surface of SR-G-N-A.

### Confirmation of lysozyme immobilization

The immobilization of lysozyme was confirmed by several studies and also for a non-specific qualitative test by CBB, which gave positive for the presence of lysozyme showing the characteristic blue color (Fig. 7). Moreover, this test indicated that the immobilization of lysozyme was not limited on the surface of SR-G-N-A since the blue color was observed throughout the sample, suggesting the lysozyme immobilization was carried out in bulk.

### Enzymatic activity of lysozyme immobilized in the SR

A first screening of the enzymatic activity of the films was performed using the series of SR-G-Lys synthesized from the SR-G films with different grafting degrees as indicated in Table I. The initial conditions were using 4 mL of *M. lysodeikticus* suspension at pH = 6.2, 30 °C.

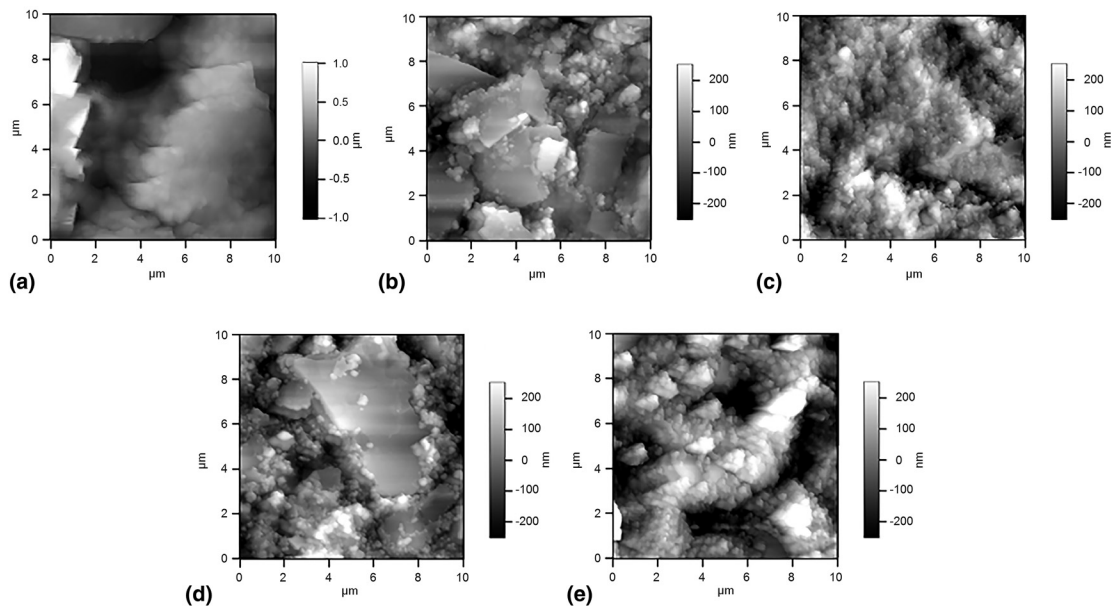
The enzymatic activity of lysozyme immobilized in the series of SR-G showed a dependence on the grafting degree, exhibiting an enzymatic activity from 9.9 to 11 (0.001/min/cm<sup>2</sup>) [Fig. 8(a)] for the SR with a grafting degree between 13.2% and 14.8%, which were obtained in a concentration range from 40 to 60 vol.% of monomer.

### Study of the enzymatic activity at different temperatures and pH values

Supported by the statistical analysis (see Supplementary information section ANOVA of the enzymatic activity of the immobilized lysozyme in the series of SR-G) we chose from the screening the SR-G-Lys sample synthesized with SR-4 grafted at 40 vol.% monomer concentration (SR-4 in Table I) was chosen as the best sample for a detailed analysis of the effects of pH and temperature on the enzymatic activity, and quantification of lysozyme immobilized. The quantification of lysoszyme for

**Table II.** Mechanical properties of the SR in the immobilization process of lysozyme, with a grafting degree of 14.2 wt.% (SR-4, Table I).

Attemp	Young's modulus	Tensile strength (MPa)	Elongation at break (%)	Maximum load (N)
SR	2.11 ± 1.17	9.01 ± 1.15	768.54 ± 87.83	45.09 ± 5.77
SR-G	2.98 ± 0.23	8.75 ± 0.77	694.70 ± 61.64	45.95 ± 4.08
SR-G-N	35.54 ± 6.20	3.32 ± 0.28	72.73 ± 43.73	15.77 ± 1.37
SR-G-N-A	45.62 ± 10.13	3.60 ± 0.05	45.76 ± 5.80	17.47 ± 0.28
SR-G-Lys	34.71 ± 6.61	2.57 ± 0.47	31.06 ± 24.38	12.21 ± 2.23



**Figure 6.** AFM images in air and dry conditions by tapping mode using a sample with a grafting degree of 14.8% (SR-4, Table I) in each step of immobilization process of lysozyme, (a) SR, (b) SR-G, (c) SR-G-N, (d) SR-G-N-A, and (e) SR-G-Lys.

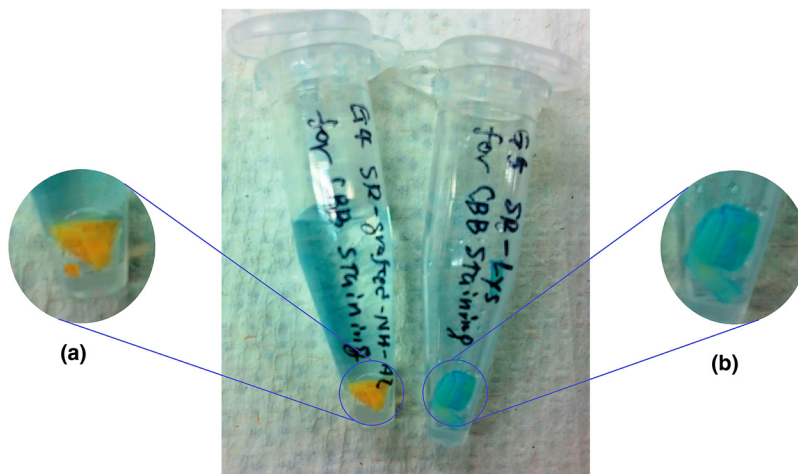
this sample was performed by calibration curve giving an immobilized amount of 160  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

The temperature study was carried out from 20 to 70 °C at pH = 6.2 [Fig. 8(b)]. The results indicated an increase in enzymatic activity as increased the temperature, being about 10 times greater at 60 °C compared with the observed at 20 °C. However, at 70 °C the enzymatic activity had a considerable decrease, probably due to a denaturalization of lysozyme.

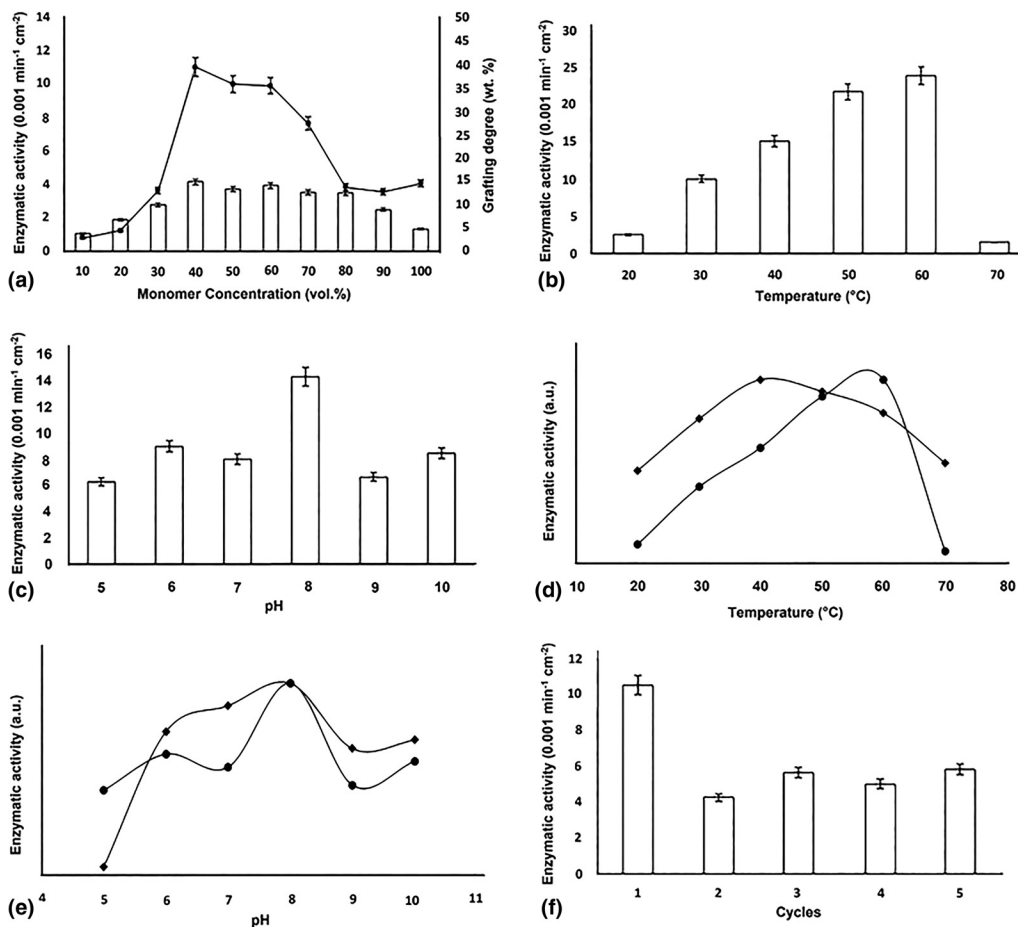
In the case of the enzymatic activity study performed at different pH values from 5 to 10 [Fig. 8(c)], there were insignificant differences in all the pH values [Statistical analysis see

Supplementary information section ANOVA of the enzymatic activity study in different pH values (0.01 M)] except for the pH = 8, which showed the maximum enzymatic activity, matching with the enzymatic activity of free lysozyme [Fig. 8(e)].

The studies carried out at different temperature and pH, and the statistical analysis of these (see Supplementary information section Statistical analysis) exhibited an improvement of enzymatic activity when this was immobilized the lysozyme. The material presented an enzymatic activity at up to 20 °C higher than free lysozyme [Fig. 8(d)], and this had enzymatic activity at pH = 5 where the free lysozyme did not.



**Figure 7.** Confirmation of lysozyme immobilized in the SR with a grafting degree of 14.8% (SR-4, Table I), using CBB where the blue color indicates a positive presence of lysozyme, (a) SR-G-N-A and (b) SR-G-Lys.



**Figure 8.** Enzymatic activity study of the lysozyme immobilized in the SR-G. All the studies were carried out with 4 mL of a suspension of *Micrococcus lysodeikticus*, 0.62 mg/mL. (a) Enzymatic activity of lysozyme immobilized in the series of SR-G with different grafting degrees synthesized with different monomer concentration (Table I) using as initial conditions a temperature of 30 °C and a pH = 6.2,  $\blacksquare$  enzymatic activity,  $\square$  grafting degree. From the previous study it was chosen the SR-G with a grafting degree of 14.8% (SR-4, obtained at 40% of monomer) as the best film with enzymatic activity for the studies of temperature, pH, cycles as well as the comparison with the free lysozyme using 160  $\mu$ g: (b) enzymatic activity of at different temperatures at pH = 6.2, 0.01 M, (c) enzymatic activity at different pH values, 0.01 M at 30 °C. For a better comparison with free lysozyme, all the enzymatic activities were normalized, (d) comparison of enzymatic activity between free and the immobilized lysozyme at different temperatures.  $\blacklozenge$  free lysozyme,  $\bullet$  immobilized lysozyme, at pH = 6.2, 0.01M, (e) comparison of enzymatic activity between free and immobilized lysozyme at different pH values (0.01 M) at 30 °C,  $\blacklozenge$  free lysozyme,  $\bullet$  immobilized lysozyme. (f) enzymatic activity in different cycles at pH 6.2 and 30 °C.

### Reusability

The reusability study of the SR-G-Lys was made by cycles. The results showed a considerable change in the enzymatic activity after the first cycle, remaining slight constant (see Supplementary information section ANOVA of the enzymatic activity study in different cycles) for the next one. Despite the decrease of enzymatic activity, this behavior was consistent with the immobilization of lysozyme in the films since the enzymatic activity was keeping after each cycle. This reusability is an advantage due to most of the cases the recovery of free lysozyme is impossible. The results are shown in the Fig. 8(f).

### Conclusion

In conclusion, the grafting in SR was carried out successfully by the chemical method using toluene as a solvent, since the

toluene solution swells the SR matrix increasing the contact area and therefore improving the grafting degree. The grafting degree showed a dependence on the monomer concentration, reaching the maximum grafting degree in a concentration range from 40% to 60% vol. of monomers.

The infrared study with the swollen samples exhibited new bands corresponding to hydrophilic groups exposed from the immobilized lysozyme. The mechanical properties of the SR did not show a considerable change after the grafting polymerization. However, there was an appreciable change when it was carried out the opening of the epoxide groups by the ethylenediamine, keeping these new mechanical properties through the following steps of the immobilization process of lysozyme.

The AFM study showed the changes in the surface morphology of SR through lysozyme immobilization process indicating a

homogenous surface for SR-*G-Lys* with spherical nanostructures. Finally, the studies of enzymatic activity carried out at different temperatures, and pH values demonstrated an improvement of enzymatic activity at a higher temperature and lower pH value compared with free lysozyme.

The supplementary information provides the methodologies of synthesis, characterization, and enzymatic activity test as well as the statistical analysis of the results. Also, this contains the ATR-FTIR, DSC, and TGA studies of the copolymer [P(EGDMA-*co*-GMA)] and free lysozyme.

## Supplementary material

The supplementary material for this article can be found at <https://doi.org/10.1557/mrc.2017.115>

## Acknowledgments

This work supported by DGPA-UNAM Grant IN201617. The authors thank Dr. Seiichi Tada and Dr. Yoshihiro Ito from Nano Medical Engineering Lab., RIKEN and E. Hernández-Mecinas, G. Cedillo, and M.A. Canseco from IIM-UNAM for their technical assistance.

## References

- E. Cappannella, I. Benucci, C. Lombardelli, K. Liburdi, T. Bavaro and M. Esti: Immobilized lysozyme for the continuous lysis of lactic bacteria in wine: Bench-scale fluidized-bed reactor study. *Food Chem.* **210**, 49 (2016).
- J. Wang, L. Qin, J. Lin, J. Zhu, Y. Zhang, J. Liu and B. Van der Bruggen: Enzymatic construction of antibacterial ultrathin membranes for dyes removal. *Chemical Eng. J.* **323**, 56 (2017).
- J.L. Harding and M.M. Reynolds: Combating medical device fouling. *Trends Biotechnol.* **32**, 140 (2014).
- C.R. Arciola, D. Campoccia, P. Speziale, L. Montanaro and J. W. Costerton: Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials* **33**, 5967 (2012).
- T. Mérian and J.M. Goddard: Advances in nonfouling materials: perspectives for the food industry. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 2943 (2012).
- Y. Kacar and M.Y. Arica: Preparation of reversibly immobilized lysozyme onto Procion Green H-E4BD-attached poly(hydroxyethylmethacrylate) film for hydrolysis of bacterial cells. *Food Chem.* **75**, 325 (2001).
- G.G. Flores-Rojas, V.H. Pino-Ramos, F. López-Saucedo, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo and E. Bucio: Improved covalent immobilization of lysozyme on silicone rubber-films grafted with poly(ethylene glycol dimethacrylate-coglycidylmethacrylate). *European. Polymer J.* **95**, 27 (2017).
- Y. Guadarrama-Zempoalteca, L. Díaz-Gómez, H.I. Meléndez-Ortiz, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo and E. Bucio: Lysozyme immobilization onto PVC catheters grafted with NVCL and HEMA for reduction of bacterial adhesion. *Rad. Phys. Chem.* **126**, 1 (2016).
- M.T. Neves-Petersen, T. Snabe, S. Klitgaard, M. Duroux and S. B. Petersen: Photonic activation of disulfide bridges achieves oriented protein immobilization on biosensor surfaces. *Protein Sci.* **15**, 343 (2006).
- M. Masoom and A. Townshend: Simultaneous determination of sucrose and glucose in mixtures by flow injection analysis with immobilized enzymes. *Anal. Chim. Acta* **171**, 185 (1985).
- R.A. Sheldon: Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Adv. Synth. Catal.* **349**, 1289 (2007).
- O. Prodanović, M. Prokopijević, D. Spasojević, Ž. Stojanović, K. Radotić, Z.D. Knežević-Jugović and R. Prodanović: Improved covalent immobilization of horseradish peroxidase on Macroporous Glycidyl methacrylate-based copolymers. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **168**, 1288 (2012).
- J. Jin, Y. Han, C. Zhang, J. Liu, W. Jiang, J. Yin and H. Liang: Effect of grafted PEG chain conformation on albumin and lysozyme adsorption: a combined study using QCM-D and DPI. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **136**, 838 (2015).
- P. Xu, Q. Zeng, Y. Cao, P. Ma, W. Dong and M. Chen: Interfacial modification on polyhydroxyalkanoates/starch blend by grafting in-situ. *Carboh. Polym.* **174**, 716 (2017).
- L. Wang, Y. Shi, S. Chen, W. Wang, M. Tian, N. Ning and L. Zhang: Highly efficient mussel-like inspired modification of aramid fibers by UV-accelerated catechol/polyamine deposition followed chemical grafting for high-performance polymer composites. *Chemical Eng. J.* **314**, 583 (2017).
- J.S. Ko, K. Cho, S.W. Han, H.K. Sung, S.W. Baek, W.-G. Koh and J. S. Yoon: Hydrophilic surface modification of poly(methyl methacrylate)-based ocular prostheses using poly(ethylene glycol) grafting. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **158**, 287 (2017).
- D. Saeki, S. Nagao, I. Sawada, Y. Ohmukai, T. Maruyama and H. Matsuyama: Development of antibacterial polyamide reverse osmosis membrane modified with a covalently immobilized enzyme. *J. Membr. Sci.* **428**, 403 (2013).
- S. Minko: Grafting on solid surfaces: "Grafting-to" and "grafting-from" methods, in *Polymer Surfaces and Interfaces*, edited by M. Stamm (Springer, Berlin, 2008), pp. 215, 234.
- L. Noein, V. Haddadi-Asl and M. Salami-Kalajahi: Grafting of pH-sensitive poly (N,N-dimethylaminoethyl methacrylate-*co*-2-hydroxyethyl methacrylate) onto HNTS via surface-initiated atom transfer radical polymerization for controllable drug release. *Inter. J. Polymeric Mater. Polymeric Biomater.* **66**, 123 (2017).
- V.H. Pino-Ramos, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro and E. Bucio: One-step grafting of temperature- and pH-sensitive (N-vinylcaprolactam-*co*-4-vinylpyridine) onto silicone rubber for drug delivery. *Design. Monomers Polymers* **20**, 33 (2017).
- F. López-Saucedo, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro and E. Bucio: Radiation-grafting of vinyl monomers separately onto polypropylene monofilament sutures. *Rad. Phys. Chem.* **132**, 1 (2017).
- G.G. Flores-Rojas and E. Bucio: Radiation-grafting of ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and glycidyl methacrylate (GMA) onto silicone rubber. *Rad. Phys. Chem.* **127**, 21 (2016).
- G.M. Meaburn, J.L. Hosszu and C.M. Cole: Radiation Grafting of Methacrylates onto Silicone Rubber: Prototype Burn Wound Dressing. *Inter. J. Appl. Rad. Isotope* **29**, 233 (1978).
- H. Tokuyama, S. Naohara, M. Fujioka and S. Sakohara: Preparation of molecular imprinted thermosensitive gels grafted onto polypropylene by plasma-initiated graft polymerization. *React. Funct. Polymers* **68**, 182 (2008).
- F. Khelifa, S. Ershov, Y. Habibi, R. Snyders and P. Dubois: Free-radical-induced grafting from plasma polymer surfaces. *Chem. Rev.* **116**, 3975 (2016).
- I. Domenichelli, S. Coiai, C. Pinzino, S. Taddei, E. Martinelli and F. Cicogna: Polymer surface modification by photografting of functional nitroxides. *European Polymer J.* **87**, 24 (2017).
- F. Mallamace, C. Corsaro, D. Mallamace, S. Vasi, C. Vasi and G. Dugo: The role of water in protein's behavior: The two dynamical crossovers studied by NMR and FTIR techniques. *Comp. Struct. Biotechnol. J.* **13**, 33 (2015).
- E.-J. Castillo, J.L. Koenig and J.M. Anderson: Protein adsorption on hydrogels: II. Reversible and irreversible interactions between lysozyme and soft contact lens surfaces. *Biomaterials* **6**, 338 (1985).
- P.W. Yang, H.H. Mantsch, J.L.R. Arrondo, I. Saint-Girons, Y. Guillou, G. N. Cohen and O. Barzu: Fourier transform infrared investigation of the *Escherichia coli* methionine aporepressor. *Biochemistry* **26**, 2706 (1987).
- G. Careri and A. Giansanti: Lysozyme film hydration events: an IR and gravimetric study. *Biopolymers* **18**, 1187 (1979).



**Polypropylene-films modified by grafting-from of EGDMA/GMA using gamma-rays and antimicrobial biofunctionalization by Schiff bases**

Journal:	MRS Communications
Manuscript ID:	MRSCOM-2017-0174.R2
Manuscript Type:	Research Letters
Date Submitted by the Author:	10-Jan-2018
Complete List of Authors:	Flores-Rojas, G.; Instituto de Ciencias Nucleares, Macromoleculas y quimica de radiaciones López-Saucedo, Felipe; Instituto de Ciencias Nucleares, Chemistry López-Barriguete, Jesús; Instituto de Ciencias Nucleares, Chemistry Isoshima, Takashi; Riken Nokagaku Sogo Kenkyu Center, Physics Luna-Straffon, Marco; Instituto de Ciencias Nucleares, Chemistry Bucio, Emilio; Instituto de Ciencias Nucleares, Chemistry
Keyword:	biomaterial, chemical reaction, polymerization, radiation effects

SCHOLARONE™  
Manuscripts

**Polypropylene-films modified by grafting-from of EGDMA/GMA using gamma-rays and antimicrobial biofunctionalization by Schiff bases**

G.G. Flores-Rojas<sup>1,2,\*</sup>, F. López-Saucedo<sup>1</sup>, J.E. López-Barriguete<sup>1,2</sup>, T. Isoshima<sup>2</sup>, M. Luna-Straffon<sup>1</sup>, E.

Bucio<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química de Radiaciones y Radioquímica, Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México CDMX 04510, México.

<sup>2</sup>Nano Medical Engineering Laboratory, RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan.

**Abstract**

The goal of this work was to provide antimicrobial activity to polypropylene by covalent immobilization of lysozyme. The first step was the grafting of ethylene glycol dimethacrylate and glycidyl methacrylate through *grafting-from* method by means of gamma-rays. Then those chemical groups were activated to allow the immobilization of lysozyme by Schiff bases. The activity of lysozyme showed an improvement by the remaining double bonds from the grafting. Finally, the presence of lysozyme confirmed by the hydrolysis of *Micrococcus lysodeikticus* at different temperatures, pH values, and cycles. The new materials were characterized by infrared spectroscopy, thermal analysis, contact angle, and by the surface morphology.

\* Corresponding author: Tel.: +52 (55) 5622-4674  
E-mail address: ggabofo@hotmail.com (G.G. Flores-Rojas), ebucio@nucleares.unam.mx (E. Bucio)



**Keywords:** Polypropylene (PP); Grafting-from; Radiation-grafting; Lysozyme.

## 1. Introduction

Polypropylene (PP) is widely used in medical and food industries for manufacturing of catheters, syringes, sutures or packaging in contact with food, due to its excellent mechanical properties, chemical stability, and low reactivity. However, many of these applications are subject to the proliferation of microorganisms which might produce infections or affect the product shelf life.<sup>[1]</sup> Providing antimicrobial features to the material is an excellent strategy to increase their value. Some methods reported to provide the antimicrobial properties to PP are by loading of drugs,<sup>[2]</sup> metallic nanoparticles,<sup>[3]</sup> enzymes, and functional groups or molecules with antimicrobial and bacteriostatic activity such as polyvinylimidazole.<sup>[4]</sup>

The immobilization of antimicrobial enzymes such as lysozyme offers several advantages since an enzyme is a biomolecule able to afford biocompatibility<sup>[5]</sup> and to control on the attachment of a broad variety of Gram positive pathogenic and non pathogenic bacteria<sup>[6]</sup> to the material.

The enzyme immobilization was performed by means of thiol-disulfide,<sup>[7]</sup> peptide,<sup>[8]</sup> and diazo bonds<sup>[9]</sup> or by the formation of imines<sup>[10]</sup> (Schiff bases). However, the best method is the last one since this is achieved at low or high

temperature, being not affected by the presence of other chemical groups such as hydroxy, thiols, esters, amides, etc. which are part of many types of enzymes.<sup>[10]</sup> Unfortunately, the direct immobilization on PP-film is not likely, requiring a prior modification of PP to provide the formyl groups to achieve the immobilization by Schiff bases.

Nowadays, there have been remarkable advances in the research and development of materials either by new molecular design<sup>[11]</sup> or by modification of conventional polymers. One of the most common methods to obtain these new materials is by grafting polymerization, categorized in three: *grafting-from*, *grafting-to*, and *grafting-through*<sup>[12]</sup> methods. The *grafting-from* method offers an enormous advantage, since the modification occurs on the surface of the material, retaining the bulk properties, as in this approach the growth of polymer chains take place from initiating sites on the backbone polymer.<sup>[13]</sup>

In the specific case of the PP, the modification by *grafting-from* method is impossible because this material does not have any groups as initiator so that it is chemically inert in the grafting conditions. Therefore, it is essential to provide the reactive sites as initiators on the surface. The gamma-rays offer an easy method to endow radical precursors with low reactive backbone polymers. The *pre*-irradiation method in presence of air leads to creating the initiator<sup>[14]</sup> on the polymeric surface either as peroxides or hydroperoxides species,<sup>[8]</sup> enabling the grafting polymerization of the monomers with adequate conditions.<sup>[15]</sup>

This methodology has provided the matrix with responsiveness to pH,<sup>[16]</sup> temperature,<sup>[16, 17]</sup> magnetic field, and also with functional groups for subsequent chemical reactions<sup>[18]</sup> in less aggressive conditions which may damage the matrix.

Based on this background, the goal of this work was to make the surface modification of PP-films with EGDMA/GMA grafting by means of the *grafting-from* method. Where the poly(glycidyl methacrylate) poly(GMA) allowed the chemical activation and the antimicrobial biofunctionalization with lysozyme; and the case of poly(ethylene glycol dimethacrylate) poly(EGDMA), also employed to provide non-reactive hydrophilic groups, being biocompatible this pair of polymers<sup>[19-21]</sup> doing them excellent candidates to achieve this task. The enzymatic activity assays were carried out with a *Micrococcus. Lysodeikticus* (coccus, Gram-positive bacteria) suspension as a bacterium model and investigated at different temperatures and pH values.

## 2. Results and analysis

The first attempts to graft the PP-films were performed by the direct irradiation method. However, it was not successful due to the low chemical reactivity of PP-films compared to the chemical reactivity of monomers leading to copolymerization of the monomers. Therefore, the *grafting-from* method was employed to take an advantage that this method requires the initiator put in the matrix ensuring the grafting. The initiator on the PP-film was generated as peroxides and hydroperoxides by the *pre*-irradiation method in presence of air. Those chemical

species are precursors of free radicals at high temperatures, guaranteeing the grafting onto the matrix (FIG. 1).

Additionally, using the *grafting-from* method, the effect of different solvents on the grafting degree was examined. The results exhibited that toluene was the best medium for the grafting polymerization because the copolymer was soluble. Hence, toluene was used as a medium of reaction for the effect of absorbed dose, monomer concentration, and reaction temperature and time on the grafting degree.

On the other hand, the lysozyme immobilization was achieved with the series of PP-*g*-(EGDMA/GMA) obtained at different monomer concentration and absorbed doses, in which addition of formyl groups was used for activation. This is because these groups are more reactive to lysozyme than epoxide groups, so that the lysozyme immobilization was performed using less aggressive conditions at low temperature (5 °C) (FIG. 2).

### 2.1. Synthesis and characterization of materials

Grafting degree of the PP-film had a simple dependence on the absorbed dose that increase of the absorbed doses resulted in the increase of the grafting degree (FIG. 3a). This is because high absorbed doses generated a major number of active sites (peroxides and hydroperoxides). In the case of a constant absorbed dose, the grafting degree was only depending on the monomer concentration and the EGDMA ratio which is able to hinder the grafting degree by the cross-linking provoked by this.

The effect of monomer concentration (FIG. 3b) on the grafting degree showed no significant change in the range from 20 to 70 vol.%, with a maximum grafting degree of 13 wt% at 40 vol.% of monomer concentration. However, the grafting degree decreased at low monomer concentration of 10% vol.% and at high concentration (80-100 vol.%). The latter is possible due to the poor diffusion and the fast cross-linking of the monomers.

The effect of reaction temperature is shown in FIG. 3c: the grafting degree showed an increase as the temperature increased, reaching the maximum at 60 °C, and decreased with further increase of temperature. This behavior was attributed to an increase of free radicals from the reactive sites (peroxides and hydroperoxides) of the irradiated PP-film<sup>[22]</sup> that not only benefited the grafting degree, but also the copolymerization resulting in the decrease of the grafting degree at high temperature. On the other hand, the effect of reaction time in grafting showed simple increasing dependence at shorter reaction time and saturation after 12 h of reaction onwards (FIG. 3d).

All kinetic studies indicated that it is possible to have an excellent control on grafting degree, leading to the procurement of PP-films with tailored grafting degree.

Once obtained the PP-*g*-(EGDMA/GMA) films, the series synthesized with different monomer concentrations and absorbed doses were chosen for the chemical activation and then the lysozyme immobilization. The chemical activation was carried out using THF as reaction medium. Other solvents such as methanol,

ethanol, and water were also tried in the chemical activation but the results were not satisfactory since the reaction did not take place with these solvents.

The first reaction endowed amine groups to the grafting copolymer film by the reaction of PP-*g*-(EGDMA/GMA) with ethylenediamine (PP-*g*-NH). The next reaction was the condensation reaction with glutaraldehyde and the amine groups from PP-*g*-NH followed by reduction of the imine groups. The visual change of the films in the chemical activation process was the appearance of orange color in the film after the reaction with glutaraldehyde (PP-*g*-Al), this is due to the incorporation of formyl groups to the grafting copolymer.

Despite addition of the formyl groups to the films, the immobilization of lysozyme (PP-*g*-Lys) was evidently limited using only the buffer solution as the reaction medium. Therefore, it was tried to use enzyme solutions mixed with other solvents such as acetonitrile, methanol, and THF. The best results were obtained in methanol (33 vol.%) as solvent, although this formed some precipitate.

## 2.2. FTIR-ATR analysis

FTIR-ATR study provided evidence of the film modification through the immobilization process of lysozyme (FIG. 4). This study was performed in dry and swollen conditions with the PP-*g*-Lys. In the case of swollen conditions, the samples were immersed in water for 24 h before the spectrum was acquired.



The spectrum of PP-*g*-(EGDMA/GMA) (FIG. 4b) shows the corresponding bands of the carbonyl groups and the remaining C=C from EGDMA/GMA grafting at 1728 and 1646  $\text{cm}^{-1}$ , respectively (FIG. S1a). The spectrum also exhibits the band of the epoxide groups from GMA at 975  $\text{cm}^{-1}$ , indicating that these groups were not affected by the grafting polymerization process.

The spectra of the films modified for the chemical activation (PP-*g*-NH and PP-*g*-Al) are shown in FIG. 4c and d, where the spectrum of PP-*g*-NH exhibits a band at 3384  $\text{cm}^{-1}$  attributed to amine and hydroxyl groups as well as the complementary bands at 1606 and 1546  $\text{cm}^{-1}$ , respectively. However, the spectrum of the PP-*g*-Al (FIG. 4d) did not clearly show the band of the carbonyl from the formyl groups due to overlapping with the bands located at 1728 and 1648  $\text{cm}^{-1}$  assigned to carbonyl groups and C=C from the grafting copolymer.

Finally, the PP-*g*-Lys spectrum (FIG. 4e) evidenced a new band of weak intensity at 1664  $\text{cm}^{-1}$ , attributed to the stretching of the "amide I groups" from lysozyme. This band is the most characteristic bands of immobilized lysozyme.<sup>[23]</sup> Regrettably, other bands of lysozyme groups were not observed due to the overlapping with the bands of PP-*g*-Al (FIG. S1b).

Infrared study of swollen PP-*g*-Lys sample (FIG. 4g) showed new bands in a range from 1724 to 1051  $\text{cm}^{-1}$ . The bands were assigned to functional groups of lysozyme since these were not observed on another spectrum of PP-film through immobilization process. The corresponding band of the "amide I groups" in swollen PP-*g*-Lys indicates that the lysozyme keeps its globular structure since this band

is associated with the perturbations of the secondary structure of proteins.<sup>[24]</sup> Also, the spectrum showed the bands corresponding to the carboxyl and "amide II" groups of lysozyme in a range from 1554 to 1519  $\text{cm}^{-1}$  associated to hydrogen-bonding.<sup>[25]</sup> These bands were observed in the swollen samples because these groups are hydrophilic, therefore, the groups interact better with the water resulting in their exposition, while in dry condition they are not exposed due to compact structure and low hydration level.<sup>[26]</sup>

### 2.3. DSC and TGA analysis

Thermal analysis DSC of PP-film (FIG. 5a) show an endothermic peak with an onset point at 150.3 °C, while the thermogram of PP-*g*-(EGDMA/GMA) (FIG. 5b) exhibited the onset point at 138.1 °C corresponding to melting point of PP-film matrix and an additional transition at 235.7 °C corresponding to decomposition of EGDMA/GMA grafting which had a lower decomposition temperature compared to P(EGDMA/GMA), due to combination of surface chains of PP matrix and the grafting (FIG. S2), where this combination also changed the form of the melting point peak of the PP matrix.

In the case of the PP-*g*-NH and PP-*g*-Al thermograms (FIG. 5c and d), they did not show a decomposition of the grafting, presenting only the onset point corresponding to the melting point of PP-film at 135.7 and 131.2 °C, respectively. Finally, the thermogram of PP-*g*-Lys (FIG. 5e) had the highest melting point temperature of the grafted samples with an onset point at 140.2 °C. Also, the DSC

showed the changes on the enthalpies where the most significant change occurred after the grafting polymerization which is in accordance with to the grafting and immobilization process.

The thermal stability of PP-*g*-(EGDMA/GMA) was lower than that of the pristine PP-film, showing a multistage decomposition where the first one corresponds to the EGDMA/GMA grafting (FIG. S3). Also, the TGA analysis exhibited that the chemical activation and the lysozyme immobilization improved the thermal stability of the grafting copolymer since the decomposition temperature of the PP-*g*-NH, PP-*g*-Al, and PP-*g*-Lys were higher at 10% weight loss compared to PP-*g*-(EGDMA/GMA). Table 1 summarizes the transition and decomposition temperatures from DSC and TGA studies.

The thermal analysis indicated that the bulk properties of PP-film were kept because the melting point was not considerably affected, suggesting that only the surface intervened through the grafting and immobilization processes.

#### **2.4. Contact angle**

The water contact angle (FIG. 6) confirmed the changes of hydrophobicity on the surface of PP-film caused by the grafting and further chemical modifications. The pristine PP-film (FIG. 6a) and PP-*g*-(EGDMA/GMA) (FIG. 6b) had a similar hydrophobicity with a contact angle of about 80°. On the other hand, the contact angle for PP-*g*-NH and PP-*g*-Al (FIG. 6c and d) had a significant decrease, indicating a high hydrophilicity provoked by the incorporation of hydrophilic groups

on the surface of the film. PP-*g*-Lys film presented further less contact angle, suggesting the immobilization of hydrophilic lysozyme.

#### **2.5. Surface morphology**

The surface morphology obtained by AFM (FIG. 7) showed that PP-films do not have a surface completely flat and homogeneous, covered with small platelet structures (FIG. 7a). The surface of PP-*g*-(EGDMA/GMA) sample evidenced a coverage of small nanoparticle-like structures (FIG. 7b). The surface of PP-*g*-NH and PP-*g*-Al was covered by more nanoparticle-like structures with slightly different morphology (FIG. 7c and d). The PP-*g*-Lys surface presented slightly larger nanoparticle-like structures (FIG. 7e). The surface morphologies study indicated the formation of different nanostructures through immobilization process of lysozyme. Considering the grafting degree (~ 10 wt %), the surface is mostly covered by the grafted compounds, resulting in difference of surface nanostructures.

#### **2.6. Study of enzymatic activity**

##### **2.6.1. Screening results of enzymatic activity of the PP-*g*-Lys series**

The screening of enzymatic activity was carried out with a sample of PP-*g*-Lys (0.5 cm<sup>2</sup>) synthesized from PP-*g*-(EGDMA/GMA) series obtained at different monomer concentration and absorbed doses. The conditions were 4 mL of

*Micrococcus. Lysodeikticus* suspension with an initial absorbance ( $A_0$ )  $\approx$  0.55. The loss of absorbance at 450 nm was monitored at 30 °C and pH 7, 0.01 M.

The results of enzymatic activity were almost constant in the series obtained at different monomer concentration in a range from 10 to 50 vol.%, while the enzymatic activity showed an increase in a range from 60 to 100 vol.% of monomer concentration (FIG. 8a). In the case of the PP-*g*-Lys synthesized from the PP-film grafted at different absorbed doses, the enzymatic activity was not significantly improved with an increase of the grafting degree, giving the maximum enzymatic activity for the PP-*g*-Lys synthesized with the PP-film grafted with an absorbed dose of 60 kGy (FIG. 8c). These screening results indicated that the enzymatic activity is independent of the grafting degree. However, the enzymatic activity suggested a dependence on the remaining double bonds (from the EGDMA/GMA grafting) which were calculated by FTIR-ATR and related to the carbonyl groups to obtain a ratio (*Supplementary material S4*).

The results exhibited that enzymatic activity improved with the increase of remaining double bonds in the grafting copolymer which was depending on the monomer concentration and the absorbed dose. In the case of series obtained at different monomer concentration, the remaining double bonds increased as the monomer concentration increased. However, in the series grafted at different absorbed doses, only the film grafted at 60 kGy had the highest ratio of double bonds. These results agree with the enzymatic behavior that supposes that the presence of double bonds improves the enzymatic activity, either by the stabilization of the enzyme in the immobilization process which hinders the

denaturation of the enzyme or by a probable unknown chemical reaction during the immobilization process of lysozyme (FIG. S4).

Based on the screening results, the PP-*g*-Lys synthesized from PP-film grafted with a dose of 60 kGy was chosen as the best sample to continue the enzymatic activity study at different temperatures and pH values. For this sample, the surface density of amine groups in the film was calculated to be 0.099 mmol cm<sup>-2</sup> by the difference of weight. Unfortunately, the quantification of lysozyme immobilized on the film was impeded by the formation of precipitate.

### **2.6.2. Enzymatic activity study at different temperatures and pH values**

The thermal study exhibited a progressive increase of enzymatic activity in a range from 20 to 50 °C and decreasing at 60 °C or higher temperatures (FIG. 9a). Interestingly, in a range from 50 to 70 °C, the absorbance decreased just in the first 30 min. and thereafter no significant decrease in the absorbance of the system was observed (FIG. 9b). This indicates damage on the immobilized lysozyme at higher temperature. The results showed a slight stability improvement of the immobilized lysozyme compared with free one, since the immobilized lysozyme exhibited the maximum enzymatic activity at 50 °C, being 10 °C higher compared to maximum activity from free lysozyme (FIG. S5a). Nevertheless, the minimum remaining absorption and thus the maximum efficiency of the enzymatic activity was observed between 20 and 40 °C at longer time (>200 min.), suggesting a better hydrolysis of *M. Lysodeikticus* at these lower temperatures.

The enzymatic activity was also studied at different pH values in a range from 5 to 10. The study showed that the PP-*g*-Lys had enzymatic activity in a range from 6 to 8 with a maximum enzymatic activity at pH = 8 (FIG. 9a). This study also exhibited the important effect of lysozyme immobilization since this did not show enzymatic activity at pH = 9 and 10 while free lysozyme exhibited enzymatic activity at these pH values (FIG. S5b).

### 2.6.3. Reusability

The reusability study of the PP-*g*-Lys (FIG. 10) was made by cycles at pH = 6.2 and a temperature of 30 °C. The obtained results did not show a considerable change in the enzymatic activity after several cycles. This reusability is an advantage of the immobilized lysozyme over the free one since in the most of the cases it is impossible to recover the free lysozyme.

### 3. Conclusion

Biofunctionalization of PP-films with lysozyme was successfully achieved on the PP-*g*-(EGDMA/GMA) obtained by *grafting-from* method and successive chemical modifications with ethylenediamine and glutaraldehyde.

The grafting on PP-films was carried out by the formation of the initiator with the *pre*-irradiation method. The grafting showed a clear dependence on the absorbed dose, increasing the grafting degree with an increase of the absorbed

dose. In the case of monomer concentration study, the maximum grafting degree was obtained at 40 vol.% of monomer in toluene, but the grafting degree did not exhibit a considerable dependence on monomer concentration as shown for the absorbed dose.

The enzymatic activity of the PP-*g*-Lys showed a non-dependence on grafting degree of the PP-*g*-EGDMA/GMA, but was observed an improvement caused by the increase of the remaining double bonds of EGDMA/GMA grafting, being the best enzymatic activity for the PP-*g*-Lys synthesized from the PP-*g*-(EGDM/GMA) obtained with an absorbed dose of 60 kGy which had the highest amount of remaining double bonds. The thermal and pH studies showed the effect of the immobilization of lysozyme and the optimal conditions were in a range of temperature from 20 to 40 °C and pH values from 6 to 8.

In conclusion, this work demonstrated that the enzymatic activity was improved by the assistance of adequate chemical groups such as double bonds. Furthermore, the immobilization of lysozyme on the PP-films allowed its recovery conserving the enzymatic activity, being this an advantage over the free lysozyme. These types of materials could be applied in the design of antimicrobial devices.

### Supplementary material

The supplementary material provides the methodologies of synthesis, characterization, and enzymatic activity assays of the materials, as well as the quantification of remained double bonds in the PP-*g*-(EGDMA/GMA). Also, this

contains the ATR-FTIR, DSC, and TGA studies of the P(EGDMA/GMA) and free lysozyme.

### Acknowledgements

This work was supported by DGAPA-UNAM Grant IN201617. The authors thank to B. Leal and M. Cruz from ICN-UNAM, and E. Hernández-Mecinas and Carlos Flores from IIM-UNAM for their technical assistance.

### References

1. F.E. Cunningham, V.A. Proctor and S.J. Goetsch: Egg-white lysozyme as a food preservative: an overview. *World's Poultry Sci. J.* **47**, 141 (1991).
2. F. Muñoz-Muñoz, J.C. Ruiz, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro and E. Bucio: Novel interpenetrating smart polymer networks grafted onto polypropylene by gamma radiation for loading and delivery of vancomycin. *Eur. Polym. J.* **45**, 1859 (2009).
3. W.L. Oliani, D. Fernandes Parra, L.F.C. Pedrosa Lima, N. Lincopan and A.J. Benevololugao: Development of a nanocomposite of polypropylene with biocide action from silver nanoparticles. *Appl. Polym. Sci.* **132**, 42218 (2015).
4. F. López-Saucedo, G.G. Flores-Rojas, E. Bucio, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro and O. González-Antonio: Achieving antimicrobial activity through poly(N-methylvinylimidazolium) iodide brushes on binary-grafted polypropylene suture threads. *MRS Commun.* **7**, 938 (2017).

5. P. Thevenot, W. Hu and L. Tang: Surface chemistry influence implant biocompatibility. *Curr. Top. Med. Chem.* **8**, 270 (2008).
6. A. Caro, V. Humblot, C. Méthivier, M. Minier, M. Salmain and C.M. Pradier: Grafting of Lysozyme and/or Poly(ethylene glycol) to Prevent Biofilm Growth on Stainless Steel Surfaces. *J. Phys. Chem. B.* **113**, 2101 (2009).
7. M.T. Neves-Petersen, T. Snabe, S. Klitgaard, M. Duroux and S.B. Petersen: Photonic activation of disulfide bridges achieves oriented protein immobilization on biosensor surfaces. *Protein Sci.* **15**, 343 (2015).
8. Y. Guadarrama-Zempoalteca, L. Díaz-Gómez, H.I. Meléndez-Ortiz, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo and E. Bucio: Lysozyme immobilization onto PVC catheters grafted with NVCL and HEMA for reduction of bacterial adhesion. *Radiat. Phys. Chem.* **126**, 1 (2016).
9. M. Masoom and A. Townshend: Simultaneous determination of sucrose and glucose in mixtures by flow injection analysis with immobilized enzymes. *Anal. Chim. Acta.* **171**, 185 (1985).
10. G.G. Flores-Rojas, V.H. Pino-Ramos, F. López-Saucedo, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo and E. Bucio: Improved covalent immobilization of lysozyme on silicone rubber-films grafted with poly(ethylene glycol dimethacrylate-co-glycidylmethacrylate). *Eur. Polym. J.* **95**, 27 (2017).
11. G.G. Flores-Rojas, I.V. Lijanova, O.G. Morales-Saavedra, K. Sanchez-Montes and M. Martinez-Garcia: Synthesis and NLO behavior of Oligo(phenylenevinylene)-Porphyrin Dendrimers. *Dyes Pigments* **96**, 125 (2013).

- 12.G.G. Flores-Rojas and E. Bucio: Radiation-grafting of ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and glycidyl methacrylate (GMA) onto silicone rubber. *Radiat. Phys. Chem.* **127**, 21 (2016).
- 13.K. Fujiki, N. Tsubokawa and Y. Sone: Radical grafting carbon black. Graft polymerization of vinyl monomers initiated by azo groups introduced onto carbon black surface. *Polym. J.* **22**, 661 (1990).
- 14.R. Aliev, P. Garcia and G. Burillo: Graft polymerization of acrylic acid onto polycarbonate by the preirradiation method. *Radiat. Phys. Chem.* **58**, 299 (2000).
- 15.L. Islas, J.C. Ruiz, F. Muñoz-Muñoz, T. Isoshima and G. Burillo: Surface characterization of poly(vinyl chloride) urinary catheters functionalized with acrylic acid and poly(ethylene glycol)methacrylate using gamma-radiation. *Appl. Surf. Sci.* **384**, 135 (2016).
- 16.G. Burillo, E. Bucio, E. Arenas and G.P. Lopez: Temperature and pH-sensitive swelling behavior of binary DMAEMA/4VP graft on poly(propylene) films. *Macromol. Mater. Eng.* **292**, 214 (2007).
- 17.E. Bucio, G. Burillo, E. Adem and X. Coqueret: Temperature sensitive behavior of poly(N-isopropylacrylamide) grafted onto electron beam-irradiated poly(propylene). *Macromol. Mater. Eng.* **290**, 745 (2005).
- 18.C.A.B. Nava-Ortiz, G. Burillo, E. Bucio and C. Alvarez-Lorenzo: Modification of polyethylene films by radiation grafting of glycidyl methacrylate and immobilization of b-cyclodextrin. *Radiat. Phys. Chem.* **78**, 19 (2009).
- 19.T. Adali and E. Yilmazm: Synthesis, characterization and biocompatibility studies on chitosan-graft-poly(EGDMA), *Carbohydr. Polym.* **77**, 136 (2009).
- 20.W. Geurtsen: Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* **11**, 333 (2000).
- 21.N.S. Pujari, B.K. Vaidya, S. Bagalkote, S. Ponrathnam and S. Nene: Poly(urethane methacrylate-co-glycidyl methacrylate)-supported-polypropylene biphasic membrane for lipase immobilization. *J. Membrane Sci.* **285**, 395 (2006).
- 22.K.E.J. Barrett: Determination of rates of thermal decomposition of polymerization initiators with a differential scanning calorimeter. *J. Appl. Polym. Sci.* **11**, 1617 (1967).
- 23.G.G. Flores-Rojas, F. López-Saucedo, E. Bucio and T. Isochima: Covalent immobilization of lysozyme in silicone rubber modified by easy chemical grafting. *MRS Commun.* **7**, 904 (2017).
- 24.R.L. Remmele and Jr.C. Stushnoff: Low-temperature IR spectroscopy reveals four stages of water loss during lyophilization of hen egg white Lysozyme. *Biopolymers.* **34**, 365 (1994).
- 25.P.W. Yang, H.H. Mantsch, J.L.R. Arrondo, I. Saint-Girons, Y. Guillou, G.N. Cohen and O. Barzu: Fourier transform infrared investigation of the Escherichia coli methionine aporepressor. *Biochemistry-US.* **26**, 2706 (1987).
- 26.G. Careri and A. Giansanti: Lysozyme film hydration events: An IR and gravimetric study. *Biopolymers.* **18**, 1187 (1979).
- 27.L.G.P. Moraes, R.S.F. Rocha, L.M. Menegazzo, E. Borges de Araújo, K. Yukimitu and J.C.S. Moraes: Infrared spectroscopy: a tool for determination of the degree of conversion in dental composites. *J Appl Oral Sci.* **16**, 145 (2008).

**Figure captions and Tables**

**FIG. 1.** Scheme of grafting reaction by *grafting-from* method, a) PP-film, b) PP-film functionalized by peroxides and hydroperoxides, and c) PP-*g*-(EGDMA/GMA).

**FIG. 2.** Scheme of activation of PP-*g*-(EGDMA/GMA) and the covalent immobilization of lysozyme. a) PP-*g*-(EGDMA/GMA) the polymeric chains of PEGDMA were omitted for clarity of scheme, b) PP-*g*-NH, c) PP-*g*-Al, and d) PP-*g*-Lys.

**FIG. 3.** Grafting degree as a function of a) absorbed dose, using a monomer concentration of 50 vol.% in toluene at 70 °C and a reaction time of 22 h, b) monomer concentration in toluene with PP-film *pre*-irradiated at 20 kGy at 70 °C and a reaction time of 22 h, c) reaction temperature using a monomer concentration of 50 vol.% in toluene with PP-film *pre*-irradiated at 20 kGy, and d) reaction time using a monomer concentration of 50 vol.% in toluene with PP-film *pre*-irradiated at 20 kGy and 70 °C.

**FIG. 4.** FTIR-ATR spectra in dry conditions of a) PP-film, b) PP-*g*-(EGDMA/GMA), c) PP-*g*-NH, d) PP-*g*-Al, and e) PP-*g*-Lys. FTIR-ATR spectra on right side were recorded using the dry and swollen samples, f) dry PP-*g*-Lys, and g) swollen PP-*g*-Lys.

**FIG. 5.** DSC thermograms of a) PP-film, b) PP-*g*-(EGDMA/GMA), c) PP-*g*-NH, d) PP-*g*-Al, e) PP-*g*-Lys. TGA thermograms, f) PP-film, g) PP-*g*-(EGDMA/GMA), h) PP-*g*-NH, i) PP-*g*-Al, and j) PP-*g*-Lys.

**FIG. 6.** Contact angle of the PP-films in each step of lysozyme immobilization: a) PP-film, b) PP-*g*-(EGDMA/GMA), c) PP-*g*-NH, d) PP-*g*-Al, and e) PP-*g*-Lys.

**FIG. 7.** AFM images in dry conditions, a) PP-film, b) PP-*g*-(EGDMA/GMA), c) PP-*g*-NH, d) PP-*g*-Al, and e) PP-*g*-Lys.

**FIG. 8.** a) Enzymatic activity at 30 °C of lysozyme immobilized on PP-films grafted at different monomer concentration  $\rightarrow$  enzymatic activity,  $\square$  grafting degree, b) absorbance of *M. Lysodeikticus* suspension at interval time of 30 min., c) enzymatic activity at 30 °C of lysozyme immobilized on PP-films grafted at different absorbed doses  $\rightarrow$  enzymatic activity,  $\square$  grafting degree, and d) absorbance of *M. Lysodeikticus* suspension at interval time of 30 min.

**FIG. 9.** a) Enzymatic activity of PP-*g*-Lys at different temperature and pH = 6.2, b) absorbance decrease of *M. Lysodeikticus* suspension at different temperature, c) enzymatic activity of PP-*g*-Lys at different pH values, and d) absorbance of *M. Lysodeikticus* suspension at different pH values. The PP-*g*-Lys was synthesized using the PP-*g*-(EGDMA/GMA) obtained with an absorbed dose of 60 kGy.

**FIG. 10.** a) Enzymatic activity of the PP-*g*-Lys in different cycles at pH = 6.2 and 30 °C and b) photographs of samples of *M. Lysodeikticus* suspension at 0 and 100 min. after to add the PP-*g*-Lys sample.



**Table 1.** Temperatures and enthalpies of the DSC and TGA study.

Sample	Onset point (°C)	Maximum (°C)	$\Delta H$ (J/g)	TGA (10 wt% loss, °C)	% Char yield (700 °C, N <sub>2</sub> )
PP-film	150.3	165.3	133.9	411.7	7.6
PP-g-(EGDMA/GMA)	138.1, 235.7	158.0, 251.8	54.3, 24.4*	276.6	14.5
PP-g-NH	135.7	157.5	72.5	331.4	7.8
PP-g-Al	131.2	157.0	111.4	306.2	15.6
PP-g-Lys	140.2	153.7	87.4	322.4	3.6

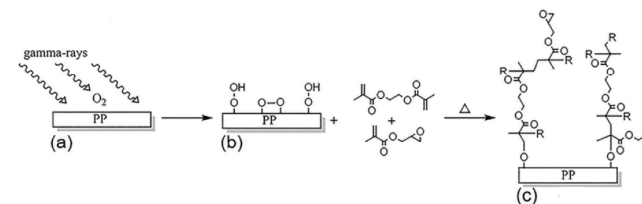
\* $\Delta H$  of (EGDMA/GMA) grafting decomposition

Figure 1

31x9mm (600 x 600 DPI)

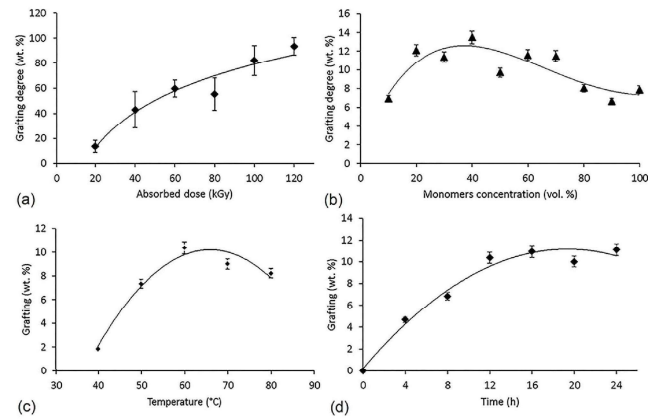


Figure 2

66x43mm (600 x 600 DPI)

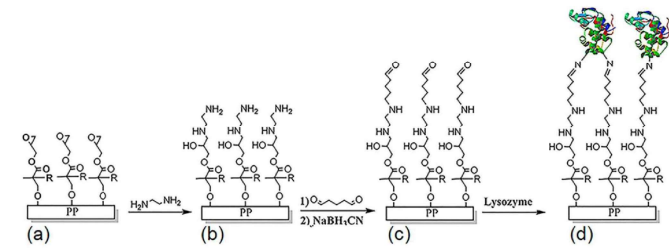


Figure 3

38x14mm (600 x 600 DPI)

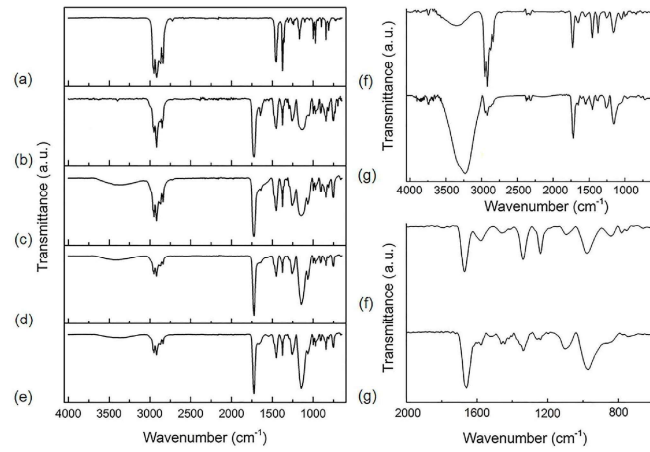


Figure 4

73x50mm (600 x 600 DPI)

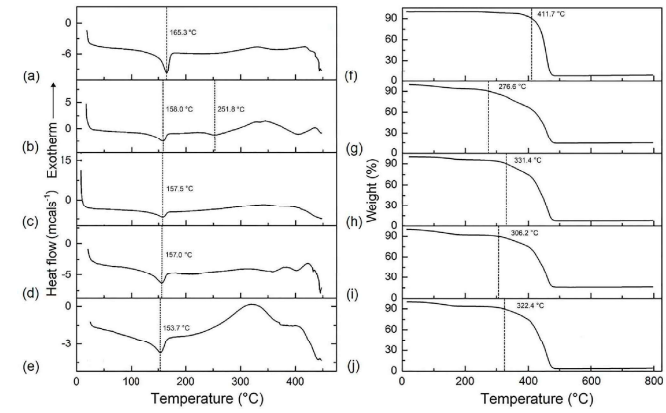


Figure 5 R1 (corrected)

98x61mm (600 x 600 DPI)

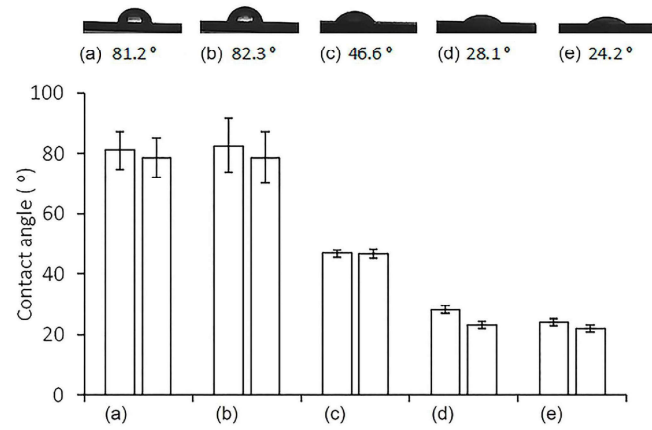


Figure 6

68x46mm (600 x 600 DPI)

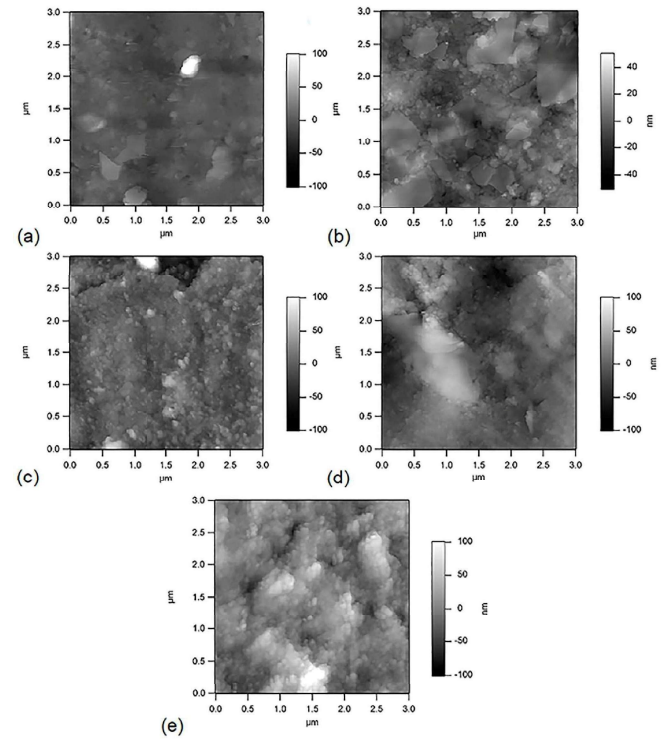


Figure 7

114x131mm (600 x 600 DPI)

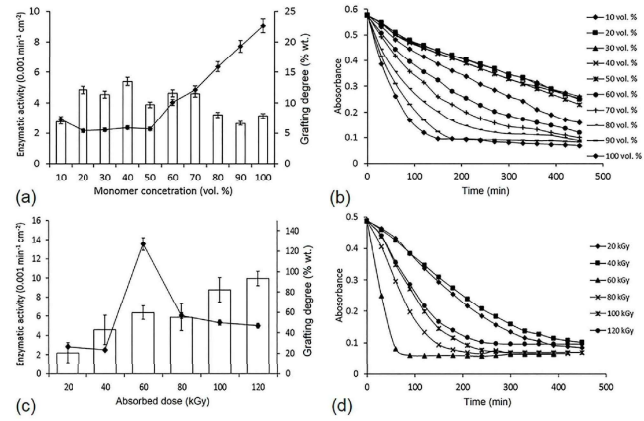


Figure 8

65x43mm (600 x 600 DPI)

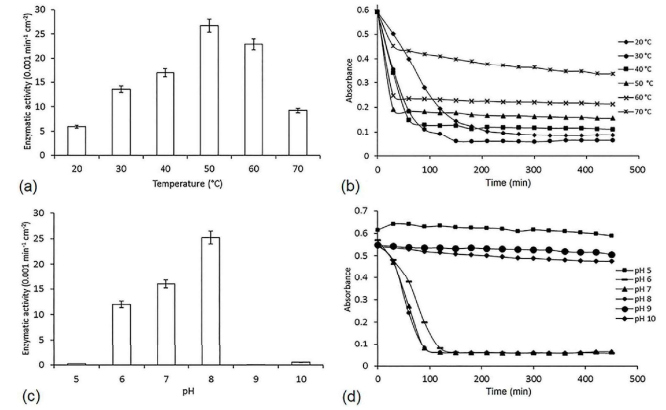


Figure 9

64x41mm (600 x 600 DPI)

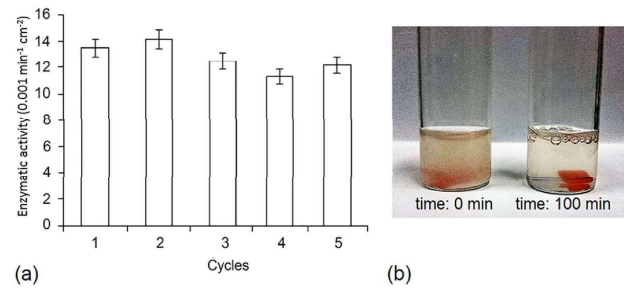
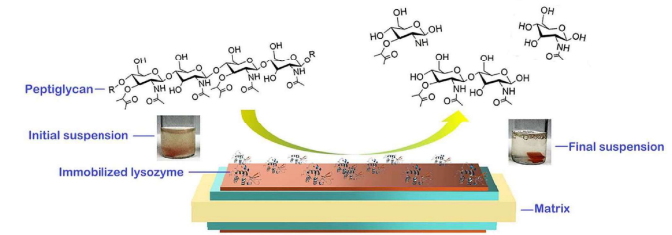


Figure 10

44x19mm (600 x 600 DPI)



Graphical Abstract (corrected)

51x19mm (600 x 600 DPI)

## Supplementary material

### Polypropylene-films modified by *grafting-from* of EGDMA/GMA using gamma-rays and antimicrobial biofunctionalization by Schiff bases

G.G. Flores-Rojas<sup>1,2,\*</sup>, F. López-Saucedo<sup>1</sup>, J.E. López-Barriguete<sup>1,2</sup>, T. Isoshima<sup>2</sup>, M. Luna-Straffon<sup>1</sup>, E. Bucio<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química de Radiaciones y Radioquímica, Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México CDMX 04510, México.

<sup>2</sup>Nano Medical Engineering Laboratory, RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan.

#### S.1. Methodology

##### S.1.1. Materials

Polypropylene (PP) films with 1 mm in thickness were purchased from Goodfellow (Huntingdon, UK). Ethylenediamine, tetrahydrofuran (THF), glutaraldehyde (50 vol.%), *Micrococcus lysodeikticus*, sodium cyanoborohydride, ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), and glycidyl methacrylate (GMA) were acquired from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). All the monomers were distilled at reduced pressure before use. Lysozyme was obtained from MP Biomedicals (Germany), and ethanol from J.T. Baker (Mexico).

\* Corresponding author: Tel.: +52 (55) 5622-4674  
E-mail address: ggabofo@hotmail.com (G.G. Flores-Rojas), ebucio@nucleares.unam.mx (E. Bucio)

#### S.1.2. Grafting of EGDMA/GMA on PP-films

Four series of grafted PP-films were made by the *grafting-from* method to examine the dependence of the grafting degree on absorbed gamma-ray dose, monomer concentration, reaction temperature, and reaction time. In the first series, the grafting degree was studied at different absorbed doses using PP-films (1x5 cm) irradiated in presence of air with a <sup>60</sup>Co gamma-rays source (Gammabeam 651 PT, Nordion Co., Canada) from 20 to 120 kGy with an average dose rate of 10.9 kGy h<sup>-1</sup>. The irradiated samples were placed into glass ampoules containing 8 mL of monomer solution (EGDMA/GMA, 1:1 mol) at 50 vol.% in toluene as solvent. The second series was carried out with PP-films irradiated at 20 kGy and placed in ampoules varying the monomer concentration (EGDMA/GMA, 1:1 mol) from 10 to 100 vol.%. All ampoules were degassed by repeated freeze-thaw cycles (3 times for 10 min.), sealed under vacuum, and heated at 70 °C for a reaction time of 22 h. The third and fourth series were prepared at different reaction temperatures and times, using PP-films irradiated at 20 kGy and introduced in 8 mL of monomer solution (EGDMA/GMA, 1:1 mol) at 50 vol.%. All the ampoules were degassed and sealed as mentioned above. For the study at different temperatures, the samples were heated from 40 to 80 °C for 24 h. The study at different reaction times was performed from 0 to 24 h at 70 °C.

To extract the residual monomer and copolymer formed in the grafting polymerization, the samples were soaked in ethanol for 48 h (changing the solvent), followed by drying under vacuum at room temperature (25 °C) until constant weight.

The grafting yield ( $G_{\%}$ ) was calculated by the following equation (Eq. A.1)

$$G_{\%} = 100((W_f - W_i)/W_i) \quad (\text{Eq. A.1})$$

where  $W_i$  and  $W_f$  are the initial (PP-film) and final (PP-g-(EGDMA/GMA)) weights, respectively.

### S.1.3. Activation of PP-g-(EGDMA/GMA) and immobilization of lysozyme

The chemical activation was divided into two steps: the first step was the reaction with ethylenediamine and the second one was the reaction with glutaraldehyde and the reduction of imine groups.

PP-g-(EGDMA/GMA) (1x0.5 cm) was placed in 3 mL of THF with 57  $\mu\text{L}$  (0.85 mmol) of ethylenediamine. The reaction was carried out at 60 °C under fixed stirring for 4 h. When the reaction was completed, the films [(PP-g-(EGDMA/GMA))-g-NH, hereafter abbreviated as PP-g-NH] were washed firstly with water and then with ethanol. The number of amine groups was calculated by the difference of the weight using the samples dried in vacuum.

Subsequently, the PP-g-NH samples were placed in 4 mL of THF and added 114 mg (0.57 mmol) of glutaraldehyde solution (50 vol.%). The reactions were performed at 40 °C for 24 h. Then, the samples were washed with THF, followed by the reduction of imine groups using 114 mg (1.8 mmol) of  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  in 4 mL THF with a reaction time of 2 h at 40 °C. After the reaction time, the films [(PP-g-

(EGDMA/GMA))-g-NH)-g-Al, hereafter abbreviated as PP-g-Al] were washed with distilled water.

Finally, the lysozyme immobilization was accomplished placing the PP-g-Al films in 2 mL of lysozyme solution at 33 vol.% methanol-phosphate buffer pH = 7 [0.01M] with 2.6 mg of lysozyme per mL, for 72 h at 5 °C. After the incubation time, the films (((PP-g-(EGDMA/GMA))-g-NH)-g-Al)-g-Lys, hereafter abbreviated as PP-g-Lys) were washed for 1h with a solution of NaCl [0.1M].

### S.1.4. Enzymatic activity assay

The enzymatic assay was carried out utilizing a sample of PP-g-Lys (0.5  $\text{cm}^2$ ), and 4 mL of *M. Lysodeikticus* suspension with a concentration of 0.6  $\text{mg mL}^{-1}$  ( $Ab_i \approx 0.55$ ). The loss of absorbance at 450 nm was monitored at different temperatures and pH values.

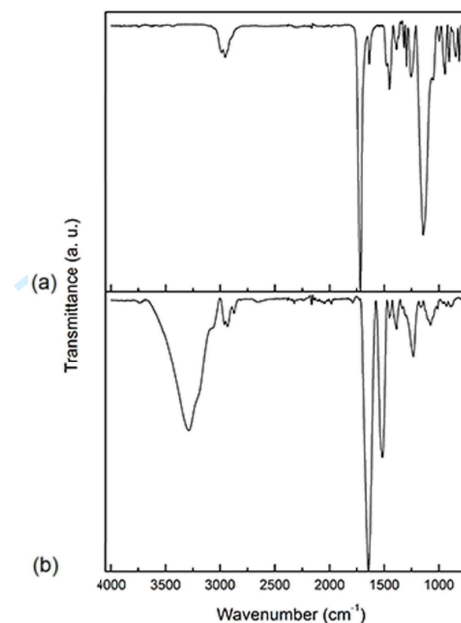
The enzymatic activity was calculated using the Eq. A.2 where  $Ab_i$  and  $Ab_f$  are the initial and final absorbance, respectively, measured in the system where  $A$  is the area in  $\text{cm}^2$ ,  $t$  is the time in minutes, and 0.001 is the definition of activity unit.

$$\text{Enzymatic activity } (0.001\text{min}^{-1}\text{cm}^{-2}) = (Ab_i - Ab_f)/(0.001At) \quad (\text{Eq. A.2})$$

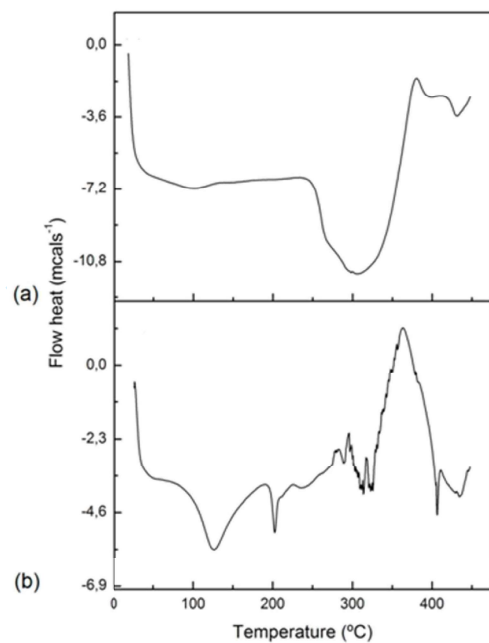
### S.1.5. Characterization



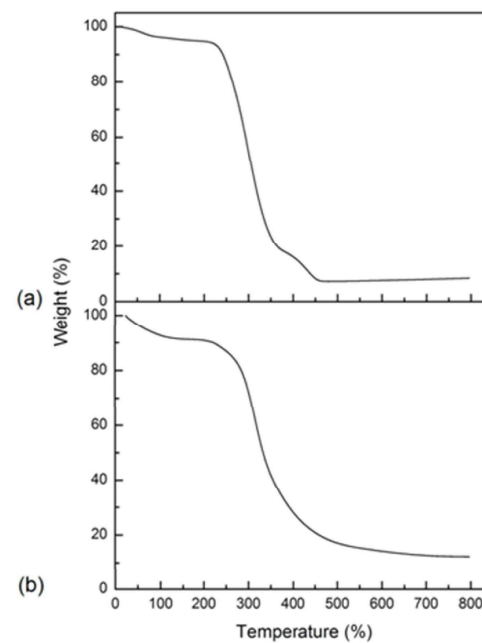
Infrared spectra were recorded on dry and swollen conditions using an FT-IR equipment (Perkin-Elmer Spectrum 100, Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk CT, USA) fitted with a universal attenuated total reflection (ATR) sampling accessory. Thermogravimetric analyses (TGA) were performed using a TGA Q50 (TA Instruments, New Castle, DE) at a heating rate of  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  in the temperature interval from 25 to  $800\text{ }^{\circ}\text{C}$  under a nitrogen atmosphere. Differential scanning calorimetry analyses (DSC) were carried out in a DSC 2010 (TA Instruments, New Castle, DE) from 25 to  $450\text{ }^{\circ}\text{C}$ , under a nitrogen atmosphere at a flow rate of  $60\text{ mL min}^{-1}$  and a heating rate of  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Kruss DSA 100 drop shape analyser (Matthews NC, USA) was used to measure the water contact angle, which was recorded at 1 and 5 min. after a bi-distilled water droplet was deposited on the dry films. The surface morphology was determined by atomic force microscopy (AFM) using an MFP-3D equipment (Asylum Research/Oxford Instruments PCI, CA, USA). The surface height images were obtained in AC (tapping) mode, using a NCH-W chip (Nanoworld Technologies AG, Switzerland).



**Fig. S1.** Infrared spectra of a) P(EGDMA/GMA), C=O  $1720\text{ cm}^{-1}$ , C=C  $1638\text{ cm}^{-1}$ , epoxide group  $994$  and  $1091\text{ cm}^{-1}$  and b) Lysozyme, amide I  $1646\text{ cm}^{-1}$ , C=O of carboxyl groups and amide II  $1517\text{ cm}^{-1}$ .



**Fig. S2.** DSC thermograms of a) P(EGDMA/GMA), Onset point 257.1°C, Peak max. 290.9 °C, and b) Lysozyme, Onset point 100.3 °C, Peak max. 125.8 °C, Onset point2, 197.3 °C, Peak max2 202.2 °C.



**Fig. S3.** TGA thermograms of a) P(EGDMA/GMA), 242.0 °C at 10 wt. % loss and b) Lysozyme, 220.8 °C at 10 wt. % loss.

#### **S4. Quantification of remained double bonds in the PP-g-(EGDMA/GMA)**

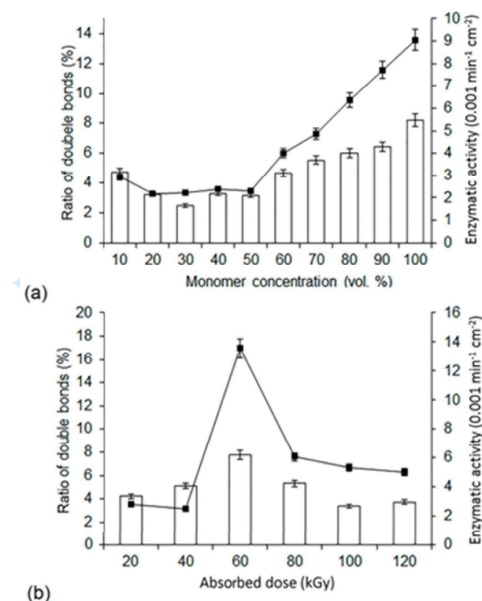
We calculated the rate of double bonds regarding carbonyl groups since we considered these last ones as the total grafting copolymer. Therefore, it was computed the area of each corresponding band to the double bonds and the

carbonyl groups in the infrared spectrum. The results were plotted with the enzymatic activity indicating an improvement of this one. The results are shown in the Fig. S4.

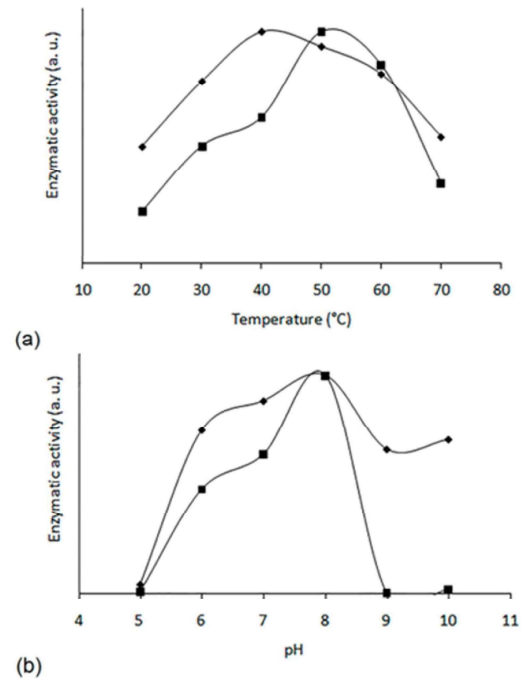
Ratio of remained double bonds in the grafting copolymer was computed for the next equation:

$$\text{Rate of double bonds (\%)} = 100(A_{C=C}/(A_{P(EGDMA/GMA)} + A_{C=C})) \quad (\text{Eq. A.3})$$

where  $A_{C=C}$  is the area for the band of double bonds, and  $A_{P(EGDMA/GMA)}$  is the area for corresponding carbonyl band of P(EGDMA-co-GMA).<sup>[27]</sup>



**Fig S4.** a) Ratio of double bonds at different monomer concentrations, b) Ratio of double bonds at different absorbed doses. □ remained double bonds, —■— enzymatic activity of immobilized lysozyme.



**Fig. S5.** Comparison of enzymatic activity between free and immobilized lysozyme at different a) temperatures and b) pH values.  $\blacklozenge$  free lysozyme,  $\blacksquare$  immobilized lysozyme. The enzymatic activity was normalized to better comparison.