



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN QUÍMICA

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES DE
ALGINATO Y N-ISOPROPILACRILAMIDA PARA
APLICACIONES BIOMÉDICAS**

MARÍA MALVINA SOLEDAD LENCINA

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2013

PREFACIO

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Química y la Planta Piloto de Ingeniería Química durante el período entre abril de 2008 y Marzo de 2013, bajo la dirección de los Doctores Noemí A. Andreucetti y Marcelo A. Villar.

María Malvina Soledad Lencina



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/..../.... mereciendo la calificación de
.....(.....).

RESUMEN

En esta Tesis Doctoral se propuso la síntesis de hidrogeles termo-sensibles para aplicaciones biomédicas a partir de copolímeros de alginato y N-isopropilacrilamida (NIPAAm). Los copolímeros de injerto se obtuvieron empleando tres métodos de síntesis: uno basado en la generación de los sitios reactivos por medio de un iniciador redox convencional (nitrato de amonio y cerio(IV), CAN), el otro mediante radiaciones ionizantes de alta energía, mientras que el tercer método se realizó en dos etapas consecutivas, obteniendo primero polímeros telequéricos amino-terminados los cuales se unieron luego a la cadena del alginato por medio de una reacción de condensación.

Los copolímeros obtenidos fueron caracterizados química y térmicamente empleando distintas técnicas analíticas tales como Resonancia Magnética Nuclear de protón ($^1\text{H-NMR}$), Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), análisis termogravimétrico (TGA), reología y mediciones de punto de nube (CP).

Los copolímeros de injerto obtenidos mediante irradiación con rayos gamma de soluciones acuosas de alginato y NIPAAm presentaron buenas propiedades físicas, tal como solubilidad y termosensibilidad. La composición de los copolímeros resultó ser función de la dosis de radiación y la composición de alginato y NIPAAm en la mezcla inicial de reacción.

De las otras dos vías de síntesis química utilizadas, resultó mejor aquella basada en la obtención de PNIPAAm amino terminado (PNIPAAm-NH₂), y su posterior injerto en la cadena de alginato mediante la reacción de condensación entre los grupos amino del PNIPAAm y los grupos carboxílicos del alginato, ya que se obtuvieron copolímeros con estructura química controlada, con cadenas laterales de masas molares conocidas y una composición definida por la mezcla de reacción.

Los hidrogeles empleados en los ensayos de hinchamiento se prepararon en forma de perlas, por medio del goteo de soluciones de copolímeros sobre una solución de cloruro de calcio. El grado de hinchamiento de los hidrogeles obtenidos a partir de los copolímeros sintetizados por irradiación presentó una dependencia con la temperatura y el contenido de PNIPAAm.

Por otra parte, si bien los copolímeros obtenidos a partir del injerto de PNIPAAm-NH₂ sobre el alginato presentaron termosensibilidad en solución, tal como se pudo observar en los ensayos de reología, los hidrogeles obtenidos a partir de estos copolímeros no mostraron luego este comportamiento, debido probablemente al menor contenido de PNIPAAm una vez obtenido el hidrogel hinchado.

Para llevar a cabo ensayos de liberación se seleccionaron como matrices portadoras del fármaco modelo a aquellos hidrogeles más promisorios de acuerdo a los resultados de hinchamiento obtenidos previamente. Estudios preliminares de liberación de atenolol empleando hidrogeles termosensibles, preparados a partir de los copolímeros de injerto obtenidos por irradiación, mostraron una liberación de aproximadamente un 70 % del contenido inicial del fármaco en el hidrogel en la primer hora de ensayo a 37 °C.

ABSTRACT

In this Doctoral Thesis the synthesis of thermo-responsive hydrogels for biomedical application obtained from alginate and N-isopropylacrylamide (NIPAAm) graft copolymers has been proposed. In order to obtain the copolymers three methods of graft copolymerization have been studied: gamma-ray irradiation and two different methods of conventional grafting reactions using chemical initiator agents.

Obtained graft copolymers were chemically and thermally characterized by H-Nuclear Magnetic Resonance ($^1\text{H-NMR}$), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Thermal Gravimetric Analysis (TGA), rheology, and cloud point measurements (CP).

Graft copolymers obtained by gamma-ray irradiation of aqueous solutions of alginate and NIPAAm presented good physical properties such as solubility and thermosensitivity. Copolymers composition is a function of radiation dose and alginate and NIPAAm composition in the initial aqueous solution.

Only graft copolymers obtained from amino-terminated PNIPAAm, PNIPAAm-NH₂ prepared by a redox initiator, and grafted to alginate by a condensation reaction between amino groups of PNIPAAm-NH₂ and carboxylic groups of alginate, gave copolymers with a known chemical structure with side chains of defined molar mass defined and a composition given by the reaction mixture.

Swelling degree studies were performed on hydrogels obtained by dropping an aqueous solution of the copolymer onto a solution of calcium chloride. Swelling degree of the hydrogels, prepared by using the copolymers synthesized by gamma irradiation, was a function of both temperature and NIPAAm content.

On the other hand, even when copolymers obtained by grafting PNIPAAm-NH₂ onto alginate showed an observable thermosensitivity in solution, hydrogels prepared with those graft copolymers did not behave in the same way, probably due to the low PNIPAAm content in the swollen hydrogel.

Controlled release studies were carried out on those hydrogels that presented thermosensitivity in the swelling study. Preliminary results on atenolol release, using the thermosensitivity hydrogels obtained from the graft copolymers synthesized by gamma radiation, gave a 70 % recovery of initial drug load after one hour at 37 °C.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN	xxxv
OBJETIVOS	xxxviii
REFERENCIAS	xxxix

CAPÍTULO 1: FUNDAMENTOS Y GENERALIDADES

1.1 Generalidades de los materiales poliméricos	2
1.1.1 Materiales poliméricos de origen natural	4
1.1.2 Poliméricos sintéticos termosensibles	8
1.2 Sistemas poliméricos para aplicaciones biomédicas	10
1.2.1 Hidrogeles	11
1.2.2 Aplicaciones de hidrogeles de alginato e hidrogeles de PNIPAAm en la industria.	12
1.3 Referencias	14

CAPÍTULO 2: COPOLIMEROS DE INJERTO

2.1	Introducción	17
2.2	Método de “Grafting From”	18
2.2.1	Síntesis de copolímeros de alginato y N-isopropilacrilamida utilizando nitrato de amonio cérico (CAN).	18
2.2.2	Síntesis de copolímeros de alginato y N-isopropilacrilamida utilizando radiación gamma de ^{60}Co .	20
2.3	Método de “Grafting Onto”	23
2.3.1	Síntesis de NIPAAm amino-terminado y síntesis de copolímeros de injerto de alginato y PNIPAAm	24
2.4	Método de “Grafting Through”	26
2.5	Referencias	27

CAPÍTULO 3: COPOLÍMEROS DE INJERTO ALGINATO Y N-ISOPROPILACRILAMIDA SINTETIZADOS CON EL INICIADOR NITRATO DE AMONIO CÉRICO (CAN)

3.1	Introducción	30
3.2	Síntesis de copolímeros de alginato y N-isopropilacrilamida	30
3.2.1	Materiales	30

3.2.2	Síntesis de copolímeros empleando CAN	31
3.2.3	Nomenclatura y composición de la mezcla de reacción	35
3.3	Caracterización de los copolímeros	36
3.3.1	Caracterización por Espectroscopía Infrarroja (FTIR)	36
3.3.2	Caracterización térmica empleando análisis termogravimétrico (TGA).	43
3.4	Conclusiones	51
3.5	Referencias	52

**CAPÍTULO 4: COPOLÍMEROS DE INJERTO ALGINATO/
N-ISOPROPILACRILAMIDA OBTENIDOS POR RADIACIÓN
GAMMA DE ⁶⁰CO**

4.1	Introducción	54
4.2	Síntesis de copolímeros alginato-g-NIPAAm	54
4.2.1	Materiales	54
4.2.2	Procedimiento general para las síntesis de alginato-g-PNIPAAm	54
4.2.3	Irradiación de las muestras en el Centro Atómico Ezeiza	57
4.2.4	Composición de las mezclas de reacción	58

4.3 Caracterización de los copolímeros de alginato-g-PNIPAAm	59
4.3.1 Caracterización química empleando espectroscopía de $^1\text{H-NMR}$	59
4.3.2 Caracterización química mediante análisis elemental	61
4.3.3 Caracterización química empleando FTIR	63
4.3.4 Caracterización térmica por TGA	69
4.3.5 Caracterización térmica: determinación visual de la temperatura de transición	75
4.4 Conclusiones	78
4.5 Referencias	79

CAPÍTULO 5: POLÍMEROS TERMOSENSIBLES AMINOTERMINADOS Y SUS COPOLÍMEROS CON ALGINATO DE SODIO

5.1 Introducción	82
5.2 Polímeros amino-terminados, PNIPAAm-NH₂	82
5.2.1 Materiales	83
5.2.2 Síntesis de Polímeros amino-terminados: PNIPAAm-NH ₂	83
5.3 Copolímeros P(NIPAAm-co-NTBAAm)-NH₂	84

5.3.1	Materiales	84
5.3.2	Síntesis de copolímeros P(NIPAAm-co-NTBAAm)-NH ₂	84
5.4	Caracterización de los polímeros termosensibles	85
5.4.1	Titulación potenciométrica de los grupos -NH ₂ terminales	85
5.4.2	Caracterización química empleando espectroscopía de ¹ H-NMR	89
5.4.3	Caracterización térmica empleando TGA	91
5.5	Copolímeros de injerto (alginato-g-PNIPAAm) y (alginato-g-P(NIPAAm-co-NTBAAm))	91
5.5.1	Materiales	92
5.5.2	Síntesis de los copolímeros (alginato-g-PNIPAAm)	92
5.5.3	Síntesis del copolímero alginato-g-P(NIPAAm-co-NTBAAm)	93
5.6	Caracterización de los copolímeros de injerto	94
5.6.1	Caracterización química empleando espectroscopía de ¹ H-NMR	94
5.6.2	Caracterización química empleando FTIR	94
5.6.3	Caracterización térmica empleando TGA	97
5.6.4	Determinación de la temperatura crítica en solución: determinación	99

del punto de nube	
5.6.5 Caracterización reológica	103
5.6.5.1 Preparación de las soluciones	103
5.6.5.2 Ensayos reológicos	104
5.6.5.3 Efectos de la temperatura	105
5.6.5.4 Efecto de la concentración	108
5.6.5.5 Efecto de la fuerza iónica del medio	109
5.6.5.6 Efecto de la composición del polímero termosensible	112
5.7 Conclusiones	114
5.8 Referencias	115
 CAPÍTULO 6: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES Y LIBERACIÓN CONTROLADA DE PRINCIPIOS ACTIVOS. 	
6.1 Introducción	118
6.2 Obtención de hidrogeles a partir de copolímeros alginato-g-PNIPAAm	118
6.2.1 Formación de perlas por goteo o dropping	119

6.3	Ensayos de Hinchamiento de los Hidrogeles	120
6.3.1	Hidrogeles de alginato de calcio	121
6.3.1.1	Efecto de la fuerza iónica del medio	121
6.3.1.2	Efecto del pH del medio	123
6.3.2	Hidrogeles obtenidos por entrecruzamiento de copolímeros con iones calcio	127
6.3.2.1	Efecto del grado de entrecruzamiento con iones calcio	127
6.3.2.2	Efecto del diámetro de las perlas	128
6.3.2.3	Efecto de la concentración de la solución formadora de perlas.	130
6.3.3	Efecto de la temperatura	132
6.3.3.1	Experimental	132
6.3.3.2	Resultados	134
6.4	Estudios de liberación controlada de principios activos	146
6.4.1	Equipamiento utilizado	146
6.4.2	Determinación de los materiales a utilizar como sistemas de liberación.	148

6.4.3	Determinación del fármaco a utilizar para los ensayos de liberación.	148
6.4.4	Carga de los materiales con atenolol y cuantificación de su carga	152
6.5	Ensayos de liberación	154
6.5.1	Determinación de atenolol mediante espectrofotometría UV	154
6.6	Conclusiones	161
6.7	Referencias	165
CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES Y TRABAJOS FUTUROS		
7.1	Conclusiones generales	168
7.2	Copolímeros de injerto alginato/N-isopropilacrilamida obtenidos por reacción química utilizando nitrato de amonio cérico.	169
7.3	Copolímeros de injerto alginato/N-isopropilacrilamida obtenidos por radiación gamma de ⁶⁰Co	170
7.4	Polímeros termosensibles aminoterminados y sus copolímeros con alginato de sodio	170
7.5	Obtención y caracterización de hidrogeles y liberación controlada de principios activos	171
7.6	Propuestas de Trabajo Futuro	173

ANEXO 1: TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

AI.1. Propiedades químicas	176
AI.1.1 Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis)	177
AI.1.2 Espectroscopía Infrarroja (IR)	178
AI.1.3 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (NMR)	178
AI.2. Propiedades térmicas	179
AI.2.1 DSC	180
AI.2.2 TGA	181
AI.3. Propiedades reológicas	182
AI.4. Referencias	190

ANEXO 2: CÁLCULOS DE COMPOSICIÓN DE LOS COPOLÍMEROS DE INJERTO A PARTIR DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR ¹H-NMR Y TGA

AII.1. Cálculos a partir de espectros ¹H-NMR	191
AII.1.1. Composición monomérica del alginato.	191
AII.1.2. Composición de los copolímeros de injerto sintetizados a partir del uso de radiación gamma de ⁶⁰ Co descritos en el Capítulo 4	195

AII.1.3 Composición de los copolímeros de injerto sintetizados a partir de la reacción de condensación entre polímeros sensibles amino terminados y alginato	208
AII.2. Cálculos a partir de la derivada de primer orden de los termogramas obtenidos por TGA	212
AII.2.1.- Composición de los copolímeros de injerto sintetizados con Nitrato de Amonio Cérico como iniciador, Capítulo 3.	212
AII.2.2.- Composición de los copolímeros de injerto sintetizados usando radiación gamma de ⁶⁰ CO, Capítulo 4	218
AII.3 Cálculos de composición a partir de los resultados obtenidos por análisis elemental	225
AII.4 Referencias	226
ANEXO 3: QUÍMICA DE LAS RADIACIONES	
AIII.1. Introducción	227
AIII.2. Unidades de radiación	227
AIII.3. Desintegraciones nucleares	228
AIII.3.1. Radiación gamma	228
AIII.3.1.1 Cobalto 60	229

AIII.4. Tratamiento de radiación gamma de ^{60}Co de materiales poliméricos	230
AIII.5. Cambios inducidos en polímeros irradiados en solución acuosa	231
AIII.6. Referencias	233

ANEXO 4: CURVAS DE CALIBRADO

AIV.1. Metodología	235
---------------------------	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1- Representación de las unidades repetitivas en un copolímero: 1) alternado, 2) al azar, 3) en bloque y 4) ramificado.	3
Figura 1.2- Estructura del bloque M (a), del bloque G y del bloque MG (c)	5
Figura 1.3- Interacciones electrostáticas entre el bloque G y los iones calcio bivalentes (a) y representación de la estructura “caja de huevo” (b).	6
Figura 1.4- Representación esquemática del monómero NIPAAm y del polímero lineal (PNIPAAm).	8
Figura 1.5- Comportamiento frente a la temperatura de las cadenas de PNIPAAm, transición ovillo-glóbulo.	10
Figura 2.1- Representación esquemática de las estrategias de síntesis para la formación de copolímeros de injerto: a) <i>grafting onto</i> , b) <i>grafting from</i> y c) <i>grafting through</i> .	17
Figura 3.1- Reactor de vidrio de dos bocas donde se llevaron a cabo las reacciones de síntesis de copolímeros alginato-g-PNIPAAm empleando CAN/HNO ₃ .	33
Figura 3.2- Espectros FTIR correspondientes a alginato (superior), PNIPAAm (inferior) y los copolímeros (en el centro de arriba a abajo): COPQ-12C-46N* (gris claro, superior); COPQ-12C-64N*(gris, medio superior), COPQ-12C-76N*(gris oscuro, medio inferior) y COPQ-12C-84N* (negro, inferior).	37
Figura 3.3- Espectros FTIR del alginato original (S000, superior) y el alginato sometido a las condiciones de reacción (ALGQ-12C-00N, inferior).	39

- Figura 3.4-** Espectros FTIR correspondiente a alginato (superior), PNIPAAm (inferior) y los copolímeros (en el centro de arriba a abajo): COPQ-12C-47N (gris claro, superior); COPQ-12C-78N (gris oscuro, medio) y COPQ-12C-64N (negro, inferior). 39
- Figura 3.5-** Espectros FTIR de los copolímeros COPQ-06C-64N (gris claro, superior); COPQ-12C-64N (gris oscuro, medio) y COPQ-24C-64N (negro, inferior). 41
- Figura 3.6-** Espectros FTIR correspondientes a alginato (superior), PNIPAAm (inferior) y los copolímeros (espectros centrales de arriba a abajo): COPQ-50N-01C (gris claro, superior); COPQ-50N-02C (gris oscuro, medio) y COPQ-50N-20C (negro, inferior). 43
- Figura 3.7-** Cambios en la masa en función de la temperatura para los homopolímeros. Símbolos: (○) alginato original y (■) PNIPAAm. 44
- Figura 3.8** Cambios en la masa en función de la temperatura para el alginato. Símbolos: (■) alginato orinal, S000 y (○) alginato ALGQ-12C-00N. 45
- Figura 3.9-** Cambios en la masa en función de la temperatura para copolímeros sintetizados previamente en PLAPIQUI con CAN en HNO₃. Símbolos: (○) COPQ-12C-46N*, (◇) COPQ-12C-64N*, (▲) COPQ-12C-76N* y (■) COPQ-12C-84N*. 46
- Figura 3.10-** Cambios en la masa en función de la temperatura para copolímeros sintetizados con CAN en HNO₃. Símbolos: (■) COPQ-12C-47N, (▲) COPQ-12C-64N y (○) COPQ-12C-78N. 47
- Figura 3.11-** Cambios en la masa en función de la temperatura para copolímeros sintetizados con igual composición de alginato/NIPAAm y diferentes contenidos de CAN en HNO₃. Símbolos: (●) COPQ-06C-64N, (■) 49

COPQ-12C-64N y (Δ) COPQ-24C-64N.

Figura 3.12- Cambios en la masa en función de la temperatura para copolímeros sintetizados con igual composición de alginato/NIPAAm y diferentes contenidos de CAN en H₂O. Símbolos: (\blacktriangle) alginato inicial, S000, (\diamond) COPQ-50N-01C, (\circ) COPQ-50N-02C y (\blacksquare)COPQ-50N-20C. 50

Figura 4.1- Línea de vacío a la cual se encuentra conectado el equipo de fraccionamiento de la solución de NIPAAm. 56

Figura 4.2- Equipo de fraccionamiento de la solución de NIPAAm, sellado en vacío 56

Figura 4.3- Balón con solución de alginato conectado a una ampolla de solución de NIPAAm. 57

Figura 4.4- Espectro de ¹H-NMR del copolímero de injerto COPi1-80N. 59

Figura 4.5- Espectros FTIR obtenidos para el alginato (superior,-), el PNIPAAm (medio, -) y el copolímero de injerto COPi1-50N (inferior, -). 64

Figura 4.6- Espectros FTIR de los copolímeros COPi03-50N (superior,-); COPi03-67N (medio, -) y COPi03-80N (inferior, -), injertados con una dosis de 0,3 kGy. 66

Figura 4.7- Espectros FTIR de los copolímeros COPi05-50N (superior,-); COPi05-67N (medio, -) y COPi05-80N (inferior, -) injertados con una dosis de 0,5 kGy 66

Figura 4.8- Espectros FTIR de los copolímeros COPI-1-50N (superior,-); COPi1-67N (medio, -) y COPi1-80N (inferior, -), injertados con una dosis de 1 68

kGy

Figura 4.9- Espectros FTIR para los copolímeros COPi5-50N (superior,-); COPi5-67N (medio, -) y COPi5-80N (inferior, -) injertados con una dosis de 5 kGy. 69

Figura 4.10- Cambios en la masa en función de la temperatura para los homopolímeros. Símbolos: (○) alginato original y (■) PNIPAAm. 70

Figura 4.11- Cambios en la masa en función de la temperatura para los copolímeros sintetizados con 0,3 kGy. Símbolos: (○) COPI-03-50N, (▲) COPI-03-67N y (■) COPI-03-80N. 71

Figura 4.12- Cambios en la masa en función de la temperatura para los copolímeros sintetizados con 0,5 kGy. Símbolos: (○) COPI-05-50N, (▲) COPI-05-67N y (■) COPI-05-80N. 72

Figura 4.13- Cambios en la masa en función de la temperatura para los copolímeros sintetizados con 1 kGy. Símbolos: (○) COPI-1-50N, (▲) COPI-1-67N y (■) COPI-1-80N. 72

Figura 4.14- Cambios en la masa en función de la temperatura para los copolímeros sintetizados con 5 kGy. Símbolos: (○) COPI-5-50N, (▲) COPI-5-67N y (■) COPI-5-80N. 73

Figura 4.15- Estudio térmico de las temperaturas de transición para cada uno de los copolímeros obtenidos al irradiar con dosis de 0,3; 0,5; 1; 5 KGy mezclas de reacción con 80%, 67% y 50% de moles de NIPAAm. 77

Figura 5.1- Estructura del copolímero P(NIPAAm-co-NTBAAm). 85

Figura 5.2- Deslocalización de la carga en los grupos aminos. 86

Figura 5.3- Curva de titulación de los grupos amino terminales del PNIPAAm-L.	87
Figura 5.4- Curva de titulación de los grupos amino terminales PNIPAAm-H.	87
Figura 5.5- Curva de titulación de los grupos amino terminales del P(NIPAAm-co-PNTBAAm).	88
Figura 5.6- Espectro ¹ H-NMR para el copolímero P(NIPAAm-co-NTBAAm)-NH ₂ .	89
Figura 5.7- Termograma obtenido para el copolímero P(NIPAAm-co-NTBAAm).	91
Figura 5.8- Espectros FTIR obtenidos para el alginato (inferior), el homopolímero PNIPAAm-L (medio) y el copolímero de injerto COP-L (superior).	95
Figura 5.9- Comparación de espectros FTIR obtenidos para los copolímero de injerto COP-L (inferior) y COP-H (superior).	96
Figura 5.10- Comparación de espectros FTIR obtenidos para los copolímero de injerto COP-L (inferior y COP-C(superior).	96
Figura 5.11- Termogramas obtenidos para los copolímeros de injerto: Símbolos: (●) COP-L, (○) COP-H y (■) COP-C.	98
Figura 5.12- a) Transmitancia a $\lambda = 490$ nm (a) y b) Intensidad de luz dispersada (SLS) en función de la temperatura. Símbolos: (■) PNIPAAm-L, (●) COP-L y (▲) mezcla física de alginato y PNIPAAm-L 4:1.	102
Figura 5.13- P Reómetro AR2000 TA Instrument con plato Peltier	104

termoregulado y tapa cobertora. Colocación de la muestra.

Figura 5.14- Propiedades viscoelásticas de una solución acuosa del copolímero COP-H al 10 %m/m a 0,1 Hz y 0,38 Pa, Símbolos: (●) G' y (○) G'' . 105

Figura 5.15. Propiedades viscoelásticas de soluciones acuosas del copolímero COP-L a 0,1 Hz y 0,38 Pa, Símbolos: (▲,△) G' y G'' a 10 %m/m, (●,○) G' y G'' a 12 %m/m y (■,□) G' y G'' a 14 %m/m. 107

Figura 5.16- Propiedades viscoelásticas de soluciones acuosas del copolímero COP-H a 0,1 Hz y 0,38 Pa, Símbolos: (▲,△) G' y G'' a 10 %m/m, (●,○) G' y G'' a 12 %m/m y (■,□) G' y G'' a 14 %m/m. 107

Figura 5.17- Viscosidad compleja relativa ($\eta^*_{rel.}$) en función de la temperatura adimensional (T/T_{as}) para soluciones acuosas de COP-L. Símbolos: (●) 10 %m/m, (○) 12 %m/m y (■) 14 %m/m. 109

Figura 5.18- Propiedades viscoelásticas de soluciones acuosas al 10 %m/m del copolímero COP-L a 0,1 Hz y 0,38 Pa, Símbolos: (▲,△) G' y G'' 0 M Na_2SO_4 , (■,□) G' y G'' 0,1 M Na_2SO_4 y (●,○) G' y G'' 0,3 M Na_2SO_4 . 110

Figura 5.19- Viscosidad compleja relativa ($\eta^*_{rel.}$) en función de la temperatura adimensional (T/T_{as}) para soluciones acuosas al 10 %m/m de COP-L. Símbolos: (●) 0 M Na_2SO_4 , (○) 0,1 M Na_2SO_4 y (■) 0,3 M Na_2SO_4 . 111

Figura 5.20. Propiedades viscoelásticas de una solución acuosa del copolímero COP-C al 10 %m/m a 0,1 Hz y 0,38 Pa. Símbolos: (■) G' y (□) G'' 112

Figura 5.21. Propiedades viscoelásticas de soluciones al 12 %m/m del copolímero COP-C a 0,1 Hz y 0,38 Pa. Símbolos: (■,□) G' y G'' , 0 M Na_2SO_4 , (●,○) G' y G'' , 0,1 M Na_2SO_4 113

Figura 6.1- Bomba perfusora Cole Parmer 74900 Series empleada en la 119

preparación de perlas de alginato.

Figura 6.2- Grado de hinchamiento de geles de alginato de calcio en función de la fuerza iónica del medio. Símbolos: (◆) 1 h, (◇) 2 h, (■) 3 h, (□) 4 h, (▲) 5 h, (△) 6 h, (●) 7 h y (○) 24 h. 122

Figura 6.3- Grado de hinchamiento de geles de alginato de calcio en función del tiempo a pH 4. 124

Figura 6.4- Grado de hinchamiento de geles de alginato de calcio en función del tiempo a pH 7. 124

Figura 6.5- Grado de hinchamiento de geles de alginato de calcio en función del tiempo a pH 10. 126

Figura 6.6- Grado de hinchamiento de geles de alginato de calcio en función del tiempo. Símbolos: (●) buffer pH 10, (○) buffer pH 10 con 0,9 %m/v NaCl, (▲) solución salina 0,9 %m/v NaCl. 126

Figura 6.7- Grado de hinchamiento de geles HCOPI-1-80N en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl. Símbolos: (●) 1 h en 2 %m/v CaCl₂, (□) 4 h en 2 %m/v CaCl₂ y (▲) 24 h en 2 %m/v CaCl₂. 128

Figura 6.8. Imágenes obtenidas mediante microscopía óptica de perlas de HCOPI-1-80N a) D = 0,85 mm, aguja 31G y b) D = 1 mm, aguja 25G 129

Figura 6.9- Grado de hinchamiento de HCOPI-1-80N curados durante 1 h en una solución 2 %m/v CaCl₂ e hinchados en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl. Símbolos: (●) D = 0,85 mm, aguja 31G y (○) D = 1 mm, aguja 25G. 129

Figura 6.10- Relación de hinchamiento a 24°C para los hidrogeles formados a 131

partir de soluciones al 4% (●) y al 8% (○) del copolímero COPI-1-80N.

Figura 6.11- Relación de hinchamiento a 24°C para los hidrogeles formados a partir de soluciones al 4 % (●) y al 8 % (○) del copolímero COP-L. 132

Figura 6.12- Mediciones del grado de hinchamiento de geles de copolímeros a 37 °C. Baño termostatzado, filtro y cápsulas empleadas para el pesado de las perlas. 133

Figura 6.13- Grado de hinchamiento de geles de copolímeros de alginato y PNIPAAm obtenidos por irradiación con 5 kGy e hinchados en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl. Símbolos: (●) H-COPI-5-80N a 24 °C (○) H-COPI-5-80N a 37 °C, (■) H-COPI-5-67N a 24 °C, (□) H-COPI-5-67N a 37 °C, (▲) H-COPI-5-50N a 24 °C (△) H-COPI-5-50N a 37 °C. 135

Figura 6.14- Grado de hinchamiento de geles de copolímeros de alginato y PNIPAAm obtenidos por irradiación con 1 kGy e hinchados en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl. Símbolos: (●) H-COPI-1-80N a 24 °C (○) H-COPI-1-80N a 37 °C, (■) H-COPI-1-67N a 24 °C, (□) H-COPI-1-67N a 37 °C, (▲) H-COPI-1-50N a 24 °C (△) H-COPI-1-50N a 37 °C. 136

Figura 6.15- Grado de hinchamiento de geles de copolímeros de alginato y PNIPAAm obtenidos por irradiación con 0,5 kGy e hinchados en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl. Símbolos: (●) H-COPI-05-80N a 24 °C (○) H-COPI-05-80N a 37 °C, (■) H-COPI-05-67N a 24 °C, (□) H-COPI-05-67N a 37 °C, (▲) H-COPI-05-50N a 24 °C (△) H-COPI-05-50N a 37 °C. 138

Figura 6.16- Grado de hinchamiento de geles de copolímeros de alginato y PNIPAAm obtenidos por irradiación con 0,3 kGy e hinchados en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl. Símbolos: (●) H-COPI-03-80N a 24 °C (○) H-COPI-03-80N a 37 °C, (■) H-COPI-03-67N a 24 °C, (□) H-COPI-03-67N a 37 °C, (▲) H-COPI-03-50N a 24 °C (△) H-COPI-03-50N a 37 °C. 139

Figura 6.17- Grado de hinchamiento a 24 °C de geles de copolímeros de alginato y PNIPAAm obtenidos por irradiación e hinchados en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl. Símbolos: a) (●) H-COPI-5-80N, (○) H-COPI-1-80N, (▲) H-COP05-80N, (△) H-COPI-03-80N b) (■) H-COPI-5-67N, (□) H-COPI-1-67N, (▼) H-COP05-67N, (▽) H-COPI-03-67N y c) (◆) H-COPI-5-50N, (◇) H-COPI-1-50N, (▶) H-COP05-50N. 140

Figura 6.18- Grado de hinchamiento a 37 °C de geles de copolímeros de alginato y PNIPAAm obtenidos por irradiación e hinchados en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl. Símbolos: a) (●) H-COPI-5-80N, (○) H-COPI-1-80N, (▲) H-COP05-80N, (△) H-COPI-03-80N b) (■) H-COPI-5-67N, (□) H-COPI-1-67N, (▼) H-COP05-67N, (▽) H-COPI-03-67N y c) (◆) H-COPI-5-50N, (◇) H-COPI-1-50N, (▶) H-COP05-50N. 141

Figura 6.19- Grado de hinchamiento en función del tiempo de geles obtenidos empleando COP-L (H-COP-L) hinchados en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl. Símbolos: (●) T = 24 °C, (■) T = 45 °C y (▲) T = 60 °C. 143

Figura 6.20- Grado de hinchamiento en función del tiempo de geles obtenidos empleando COP-H (H-COP-H) hinchados en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl. Símbolos: (●) T = 24 °C, (■) T = 45 °C y (▲) T = 60 °C. 143

Figura 6.21- Grado de hinchamiento en función del tiempo de geles obtenidos empleando COP-C (H-COP-C) hinchados en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl. Símbolos: (●) T = 24 °C, (■) T = 45 °C y (▲) T = 60 °C. 144

Figura 6.22- Grado de hinchamiento en función del tiempo de geles obtenidos empleando una solución al 8 % COPQ-L (H-COPQ-L) hinchados en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl. Símbolos; (●) T = y 24°C y (■) T = 37°C. 145

Figura 6.23- Fotografía del sistema empleado para la determinación de la cinética de liberación de principios activos a 37°C. Se observan las tres celdas 147

empleadas conectadas en línea a un baño termostatzado.

- Figura 6.24-** Fotografía de una de las celdas utilizadas para los estudios de liberación. En la misma se puede observar la bolsa porosa conteniendo en su interior perlas de uno de los hidrogeles cargados con el principio activo 148
- Figura 6.25-** Estructura molecular de la indometacina. 149
- Figura 6.26-** Estructura molecular de la ofloxacina. 149
- Figura 6.27-** Estructura molecular del atenolol. 149
- Figura 6.28-** Perfil de liberación de atenolol a 37 °C a partir del hidrogel H-COPI-5-80N cargado con 6,78 % de fármaco empleando una solución acuosa 0,9 % m/v NaCl como solución receptora. 156
- Figura 6.29-** Perfil de liberación de atenolol a 37 °C a partir del hidrogel H-COPI-1-80N cargado con 8,13 % de fármaco empleando una solución acuosa 0,9 % m/v NaCl como solución receptora. 156
- Figura 6.30-** Perfil de liberación de atenolol a 37 °C a partir del hidrogel H-COPI-05-80N cargado con 8,34 % de fármaco empleando una solución acuosa 0,9 % m/v como solución receptora. 157
- Figura 6.31-** Perfil de liberación de atenolol a 37 °C a partir del hidrogel H-COPI-05-67N cargado con 6,95 % de fármaco empleando una solución acuosa 0,9 % m/v como solución receptora. 157
- Figura 6.32-** Perfil de liberación de atenolol a 37 °C a partir del hidrogel H-COPI-05-50N cargado con 8,06 % de fármaco empleando una solución acuosa 0,9 % m/v como solución receptora. 158

Figura 6.33- Perfil de liberación de atenolol a 37 °C a partir del hidrogel H-COPI-03-80N cargado con 7,23 % de fármaco empleando una solución acuosa 0,9 % m/v como solución receptora.	158
Figura 6.34- Perfil de liberación de atenolol a 37 °C a partir de hidrogeles cargados empleando una solución acuosa 0,9 % m/v como solución receptora. Símbolos: (■) H-COPI-5-80N, (▲) H-COPI-1-80N, (●) H-COPI-05-80N y (▼) H-COPI-03-80N.	159
Figura 6.35- Perfil de liberación de atenolol a 37 °C a partir de hidrogeles cargados empleando una solución acuosa 0,9 % m/v como solución receptora. Símbolos: (●) H-COPI-05-80N, (▲) H-COPI-05-67N y (■) H-COPI-05-50N.	160
Figura 6.36- Perfiles de liberación de atenolol a 37°C a partir de hidrogeles cargados empleando una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl como solución receptora. Símbolos: (○)alginato de calcio y (■) H-COPI-05-80N	161
Figura AI.1- Esquema simplificado de los componentes del calorímetro diferencial.	180
Figura AI.2- Termograma obtenido para una muestra de PNIPAAm	181
Figura AI.3- Comportamientos típicos de la viscosidad de fluidos complejos con la velocidad de deformación: (a) Pseudo-plástico, (b) dilatante, (c) Bingham y (d) visco-plástico.	183
Figura AI.4- Esquema de los dos tipos de flujos: flujo de corte (a), flujo extensional (b).	184
Figura AI.5- Esquema de un flujo de corte simple y expresión de las funciones materiales de corte más utilizadas.	185

Figura AI.6- Comportamiento de la viscosidad frente a la velocidad de deformación en estado estacionario.	186
Figura AI.7- Comportamiento de los distintos tipos de materiales, frente a una deformación oscilatoria de pequeña amplitud.	187
Figura AI.8- Dependencia del comportamiento de los módulos elástico (G' , símbolos vacíos) y viscoso (G'' , símbolos llenos) frente a la frecuencia ω .	189
Figura. AII.1- Espectro de $^1\text{H-NMR}$ para el alginato S000, a 80°C .	192
Figura. AII.2- Espectro de $^1\text{H-NMR}$ para el alginato UPS00, a 80°C .	194
Figura. AII.3- Espectro de $^1\text{H-NMR}$ para el COPI-03-80N	195
Figura. AII.4- Espectro de $^1\text{H-NMR}$ para el COPI-03-67N	197
Figura. AII.5- Espectro de $^1\text{H-NMR}$ para el COPI-03-50N	198
Figura. AII.6- Espectro de $^1\text{H-NMR}$ para el COPI-05-80N	199
Figura. AII.7- Espectro de $^1\text{H-NMR}$ para el COPI-05-67N	200
Figura. AII.8- Espectro de $^1\text{H-NMR}$ para el COPI-05-50N	201
Figura. AII.9- Espectro de $^1\text{H-NMR}$ para el COPI-1-80N	202
Figura. AII.10- Espectro de $^1\text{H-NMR}$ para el COPI-1-67N	203
Figura. AII.11- Espectro de $^1\text{H-NMR}$ para el COPI-1-50N	204

Figura. AII.12- Espectro de $^1\text{H-NMR}$ para el COPI-5-80N	205
Figura. AII.13- Espectro de $^1\text{H-NMR}$ para el COPI-5-67N	206
Figura. AII.14- Espectro de $^1\text{H-NMR}$ para el COPI-5-50N	207
Figura. AII.15- Espectro $^1\text{H-NMR}$ del copolímero de injerto COP-L	208
Figura. AII.16- Espectro $^1\text{H-NMR}$ del copolímero de injerto COP-H	210
Figura. AII.17- Espectro $^1\text{H-NMR}$ del copolímero de injerto COP-C	211
Figura. AII.18- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPQ-12CAN-46N*	212
Figura. AII.19- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPQ-13CAN-64N*	214
Figura. AII.20- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPQ-13CAN-76N*	214
Figura. AII.21- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPQ-12CAN-84N*	215
Figura. AII.22- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPQ-12CAN-47N	215
Figura. AII.23- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPQ-12CAN-64N	216

Figura. AII.24- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPQ-12CAN-74N	216
Figura. AII.25- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPQ-06CAN-64N	217
Figura. AII.26- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPQ-24CAN-64N	217
Figura. AII.27- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPQ-50N-20CAN	218
Figura. AII.28- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPI-03-80N	218
Figura. AII.29- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPI-03-67N	219
Figura. AII.30- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPI-03-50N	219
Figura. AII.31- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPI-05-80N	220
Figura. AII.32- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPI-05-67N	220
Figura. AII.33- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPI-05-50N	221

Figura. AII.34- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPI-1-80N	221
Figura. AII.35- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPI-1-67N	222
Figura. AII.36- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPI-1-50N	222
Figura. AII.37- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPI-5-80N	223
Figura. AII.38- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPI-5-67N	223
Figura. AII.39- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPI-5-50N	224
Figura AIII.1- Espectro electromagnético	228
Figura AIII.2- Esquema de la penetración de las radiaciones ionizantes	229
Figura AIII.3- Esquema del decaimiento radioactivo del ⁶⁰ Co	230
Figura AIV.1. Curva de calibración para ofloxacina a $\lambda = 293$ nm empleando diluciones a partir de una solución inicial de 1 mg/mL. Curva de ajuste: $A = 32544 C$.	236
Figura AIV.2. Curva de calibración para atenolol a $\lambda = 274$ nm empleando diluciones a partir de una solución inicial de 5 mg/mL. Curva de ajuste: $A = 1272,8 C$.	236

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1- Nomenclatura y composición de la mezclas de reacción empleada en la síntesis de copolímeros alginato/NIPAAm utilizando CAN en HNO ₃ como iniciador.	34
Tabla 3.2- Nomenclatura y composición de la mezclas de reacción empleada en la síntesis de copolímeros alginato/NIPAAm utilizando CAN en H ₂ O como iniciador.	35
Tabla 3.3- Relación de alturas de señales características NIPAAm/alginato para los copolímeros sintetizados con 12 % de CAN en HNO ₃ ..	40
Tabla 3.4- Relación de alturas de señales características NIPAAm/alginato para los copolímeros sintetizados con igual composición de NIPAAm en la mezcla de reacción y cantidades crecientes de CAN en HNO ₃ .	42
Tabla 3.5- Composición de los copolímeros COPQ-CAN-NIPAAm* calculada a partir de TGA.	46
Tabla 3.6- Composición de los copolímeros COPQ-CAN-NIPAAm sintetizados empleando cantidades variables de NIPAAm en HNO ₃ calculada a partir de TGA.	47
Tabla 3.7- Composición calculada de los copolímeros COP-CAN-NIPAAm sintetizados empleando cantidades variables de CAN en HNO ₃ a partir de TGA.	49
Tabla 3.8- Composición calculada de los copolímeros COPQ-NIPAAm-CAN sintetizados empleando cantidades variables de CAN en medio acuoso a partir	50

de TGA.

Tabla 4.1- Composición de las mezclas de reacción en la síntesis de copolímeros empleando ^{60}Co .	58
Tabla 4.2- Composición de los copolímeros sintetizados por irradiación obtenida a partir de los espectros ^1H - NMR.	60
Tabla 4.3- Composición obtenida a partir de análisis elemental correspondiente a los copolímeros sintetizados con 0,5 y 1 kGy.	62
Tabla 4.4- Composición obtenida a partir de análisis elemental correspondiente a los copolímeros sintetizados con 0,3 y 5 kGy.	62
Tabla 4.5- Composición de los copolímeros sintetizados por irradiación obtenida a partir de ^1H -NMR y análisis elemental.	63
Tabla 4.6- Relación de alturas de señales características de NIPAAm y alginato para copolímeros sintetizados con 0,3 kGy.	67
Tabla 4.7- Relación de alturas de señales características de NIPAAm y alginato para copolímeros sintetizados con 0,5 kGy.	67
Tabla 4.8- Relación de alturas de señales características de NIPAAm y alginato para copolímeros sintetizados con 1 kGy.	68
Tabla 4.9- Relación de alturas de señales característicos NIPAAm/alg para la dosis de 5 kGy.	69
Tabla 4.10- Composición de los copolímeros sintetizados por irradiación obtenida a partir de TGA	74

Tabla 4.11- Composición de los copolímeros sintetizados por irradiación obtenida a partir de las diferentes técnicas empleadas: $^1\text{H-NMR}$, análisis elemental y TGA	75
Tabla 4.12- Temperaturas críticas de transición en solución de los copolímeros obtenidos por radiación gamma estimadas mediante turbidez	78
Tabla 5.1- Síntesis de PNIPAAm-NH ₂ .	84
Tabla 5.2- Síntesis del copolímero P(NIPAAm-co-NTBAAm)-NH ₂ .	85
Tabla 5.3- Masa molar promedio en número de los polímeros amino-terminados sintetizados.	88
Tabla 5.4- Síntesis de copolímeros de injerto.	93
Tabla 5.5- Composición de copolímeros de injerto calculada a partir $^1\text{H-NMR}$.	94
Tabla 5.6- Relación de alturas de picos característicos dentro del espectro FTIR.	97
Tabla 5.7- Composición calculada a partir de TGA.	98
Tabla 5.8- Temperatura punto de nube obtenida mediante transmitancia de luz a 490 nm	99
Tabla 6.1- Porcentaje de carga de ofloxacina en perlas de alginato de calcio.	151
Tabla 6.2- Porcentaje de carga de atenolol en perlas de alginato de calcio.	151

Tabla 6.3- Carga de atenolol en los hidrogeles seleccionados como sistemas de liberación	153
Tabla AII.1- .- Datos de las señales observadas en el espectro ^1H -RMN del alginato S000, a 80°C.	192
Tabla AII.2- .- Datos de las señales observadas en el espectro ^1H -RMN del alginato UPS00, a 80°C.	194
Tabla AII.3- Información obtenida del Espectro ^1H -RMN del copolímero COPI-03-80N.	195
Tabla AII.4- Información obtenida del Espectro ^1H -RMN del copolímero COPI-03-67N.	197
Tabla AII.5- Información obtenida del Espectro ^1H -RMN del copolímero COPI-03-50N.	198
Tabla AII.6- Información obtenida del Espectro ^1H -RMN del copolímero COPI-05-80N.	199
Tabla AII.7- Información obtenida del Espectro ^1H -RMN del copolímero COPI-05-67N.	200
Tabla AII.8- Información obtenida del Espectro ^1H -RMN del copolímero COPI-05-50N.	201
Tabla AII.9- Información obtenida del Espectro ^1H -RMN del copolímero COPI-1-80N.	202

Tabla AII.10.- Información obtenida del Espectro ¹ H-RMN del copolímero COPI-1-67N.	203
Tabla AII.11.- Información obtenida del Espectro ¹ H-RMN del copolímero COPI-1-50N.	204
Tabla AII.12.- Información obtenida del Espectro ¹ H-RMN del copolímero COPI-5-80N.	205
Tabla AII.13.- Información obtenida del Espectro ¹ H-RMN del copolímero COPI-5-67N.	206
Tabla AII.14.- Información obtenida del Espectro ¹ H-RMN del copolímero COPI-5-50N.	207
Tabla AII.15.- Información obtenida del Espectro ¹ H-RMN del copolímero COP-L.	208
Tabla AII.16.- Información obtenida del Espectro ¹ H-RMN del copolímero COP-H.	210
Tabla AII.17.- Información obtenida del Espectro ¹ H-RMN del copolímero COP-C.	211
Tabla AII.18.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.18.	213
Tabla AII.19.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.19.	214

Tabla AII.20.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.20.	214
Tabla AII.21.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.20.	215
Tabla AII.22.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.20.	215
Tabla AII.23.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.20.	216
Tabla AII.24 Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.20.	216
Tabla AII.25.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.20.	217
Tabla AII.26.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.20.	217
Tabla AII.27.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.20.	218
Tabla AII.28.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.20.	218
Tabla AII.29.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.20.	219

Tabla AII.30.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.20.	219
Tabla AII.31.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.20.	220
Tabla AII.32.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.20.	220
Tabla AII.33.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.20.	221
Tabla AII.34.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.20.	221
Tabla AII.35.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.20.	222
Tabla AII.36.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.20.	222
Tabla AII.37.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.20.	223
Tabla AII.38.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.20.	223
Tabla AII.39.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.20.	224

ÍNDICE DE ESQUEMAS DE REACCIÓN

Esquema 2.1- Mecanismo de reacción para el proceso de copolimerización de un monómero vinílico (metilacrilato, M) sobre el polisacárido polulano (Pu) empleando CAN como iniciador.	19
Esquema 2.2- Mecanismo de reacción para el proceso de copolimerización de un monómero vinílico (acrilamida, M) sobre alginato (Alg-OH) a partir de radiación electromagnética.	22
Esquema 2.3- Mecanismo de homopolimerización a partir de radiación ionizante.	22
Esquema 2.4- Mecanismo de degradación del alginato por efecto de radiación ionizante (Nagasawa y col., 2000).	23
Esquema 2.5- Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de PNIPAAm aminoterminados.	25
Esquema 2.6- Mecanismo de la reacción de condensación entre un grupo carboxílico y una amina terminal a partir de un intermediario reactivo obtenido por la adición de EDC.	26

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN

Los hidrogeles poliméricos son estructuras tridimensionales, capaces de absorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos. Se los denomina inteligentes por la posibilidad de liberar compuestos absorbidos en los mismos, de manera controlada, al ser sometidos a un estímulo externo como puede ser un cambio en la temperatura o en el pH del medio, entre otros (Ju y col., 2001).

En los últimos años los hidrogeles han encontrado un amplio rango de aplicaciones biomédicas incluyendo sistemas de liberación controlada de principios activos, sustitución de tejidos blandos, reemplazo de conductos sanguíneos, recubrimiento de heridas, lentes de contacto, etc. El éxito de los hidrogeles como biomateriales recae en su parecido a los tejidos vivos debido a su alto contenido de agua. Ventajas adicionales de los hidrogeles son su no toxicidad, no irritabilidad y su estabilidad química (Güven y col., 1999; Hamidi y col., 2008).

Los hidrogeles pueden ser naturales o sintéticos y pueden estar compuestos por uno o varios monómeros mono o polifuncionales. Las características de estos monómeros (tipo de grupos que lo forman) y el grado de entrecruzamiento, determina las propiedades de hinchamiento del hidrogel seco y por tanto su aplicabilidad. En la mayoría de los casos, un solo monómero no proporciona al mismo tiempo buenas propiedades mecánicas y gran retención de agua, por ello la copolimerización aparece como una opción de gran interés para poder obtener un mejor compromiso de estas dos propiedades.

Dentro de los polímeros inteligentes los hidrogeles “termosensibles” son quizás los más estudiados en el área de polímeros sensibles a estímulos, por sus interesantes aplicaciones en liberación controlada de fármacos. Estos materiales pueden expandirse o contraerse como resultado de los cambios de temperatura del fluido en el cual están inmersos. Un polímero sensible a la temperatura es la poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) que se caracteriza por tener una baja temperatura crítica de transición (LCST) en medios acuosos, alrededor de los 30-35 °C. Por debajo de esta temperatura el polímero lineal se disuelve en agua y sus cadenas se encuentran extendidas. Por encima de los 35 °C, el polímero adquiere un estado enrollado deshidratado expulsando el agua absorbida y el polímero precipita desde la solución (Panda y col., 2000; Schild, 1992).

También es importante la posibilidad de formar redes poliméricas estables mediante entrecruzamientos covalentes de cadenas. Al entrecruzar la PNIPAAm se obtienen hidrogeles con una transición hidrófila-hidrófoba dependiente de la temperatura. Estas características han permitido su uso para fines tecnológicos relacionados con procesos de separación, liberación controlada de drogas y/o cultivo de células. Además, la posibilidad de ajustar dicha temperatura crítica de transición a valores cercanos a la temperatura del cuerpo humano (37 °C) implica una ventaja adicional y por este motivo es posible encontrar numerosos estudios relacionados con la caracterización del PNIPAAm (De Moura y col., 2006; Deng y col., 2008; Oddo y col., 2010; Zhao y col., 2010)

Sin embargo, los hidrogeles de PNIPAAm tienen pobres propiedades mecánicas, tales como baja resistencia tensil en estado altamente hinchado o expandido (De Moura y col., 2006). Con el objeto de mejorar las propiedades de estos hidrogeles se llevan a cabo diferentes técnicas de copolimerización de PNIPAAm con polímeros sintéticos o naturales mediante injerto o “grafting”. Entre los polímeros naturales o biopolímeros se destacan los alginatos, polisacáridos que pueden ser extraídos de ciertas especies de algas pardas marinas. Los alginatos son copolímeros lineales constituidos por distintas proporciones de bloques conteniendo unidades 1,4 β -D-manuronato (M) y unidades 1,4 α -L-guluronato (G), sensibles a los cambios de pH y con interesantes propiedades para ser usados en formulaciones farmacéuticas. La fuerte interacción electrostática del alginato con iones divalentes, como por ejemplo el calcio, conduce a la formación de hidrogeles de alginato con muy buenas propiedades finales (Draget y Taylor, 2011).

Las técnicas de injerto de PNIPAAm con alginato de sodio, se basan en métodos químicos empleando diferentes catalizadores o métodos físicos empleando radiación electromagnética, tal como microondas, haz de electrones o rayos gamma de ^{60}Co en vacío. La principal ventaja del uso de la química de las radiaciones para producir hidrogeles respecto a métodos químicos convencionales se basa en su habilidad para modificar macromoléculas bajo condiciones comparativamente menos agresivas, sin el agregado de aditivos, a temperatura ambiente y con la posibilidad de limitar el tratamiento sobre áreas del objeto (superficies) bien definidas. Otro aspecto importante es que la irradiación con rayos permite preparar hidrogeles esterilizados evitando contaminaciones de estos biomateriales en aplicaciones médicas y veterinarias, donde

frecuentemente es usada como método de esterilización (Rosiak, 1995; Sabharwal y col., 2004).

La síntesis de los hidrogeles de PNIPAAm con alginato de sodio y la caracterización de sus principales propiedades mediante diferentes técnicas analíticas, permitirá comparar las ventajas y desventajas de las radiaciones ionizantes frente a otros métodos de síntesis de hidrogeles. Luego se analizarán las características formadoras de perlas mediante el método de dropping de los copolímeros estudiados y sus propiedades de liberación de un fármaco modelo estudiado.

Con esto se pretende hacer un aporte original en un tema de interés tecnológico, pero que incorpora elementos formativos novedosos en temas relacionados con la producción, la caracterización y la modificación física y química de polímeros.

OBJETIVOS

El presente trabajo se basa en la obtención de hidrogeles estímulo-sensibles a partir de copolímeros de alginato y poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm). Las reacciones de copolimerización se llevarán a cabo, por síntesis química y empleando radiación gamma de ^{60}Co . El principal objetivo que se plantea es, por lo tanto, optimizar las condiciones de síntesis de los copolímeros, así como seleccionar el método más adecuado para la transformación de los mismos en hidrogeles. Los copolímeros obtenidos serán caracterizados mediante técnicas analíticas para determinar su estructura y demás propiedades fisicoquímicas. Finalmente se analizará el comportamiento de los hidrogeles formados al hincharlos en un medio salino a distintas temperaturas y se estudiará la aplicabilidad de los mismo en procesos de liberación controlada de principios activos.

REFERENCIAS

- Deng, L., Shi, K., Zhang, Y., Wang, H., Zeng, J., Guo, X., Du, Z., and Zhang, B. (2008). *Journal of Colloid and Interface Science*. **323**, 169–175.
- Draget, K. I. and Taylor, C. (2011). *Food Hydrocolloids*. **25**, 251–256.
- Güven, O., Sen, M., Karadag, E., and Sarayd, D. (1999). *Radiation Physics and Chemistry*. **56**, 381–386.
- Hamidi, M., Azadi, A., and Rafiei, P. (2008). *Advanced Drug Delivery Reviews*. **60**, 1638–1649.
- Ju, H. K., Kim, S. Y., and Lee, Y. M. (2001). *Polymer*. **42**, 6851–6857.
- De Moura, M. R., Aouada, F. A., Guilherme, M. R., Radovanovic, E., Rubira, A. F., and Muniz, E. C. (2006). *Polymer Testing*. **25**, 961–969.
- Oddo, L., Masci, G., Di Meo, C., Capitani, D., Mannina, L., Lamanna, R., De Santis, S., Alhaique, F., Coviello, T., and Matricardi, P. (2010). *Acta Biomaterialia*. **6**, 3657–3664.
- Panda, A., Manohar, S. ., Sabharwal, S., Bhardwaj, Y. ., and Majali, a. . (2000). *Radiation Physics and Chemistry*. **58**, 101–110.
- Rosiak, J. M. (1995). *Radiation Physics and Chemistry*. **46**, 161–168.
- Sabharwal, S., Varshney, L., Chaudhari, A. D., and Rammani, S. P. (2004). Radiation processing of polysaccharides Austria.
- Schild, H. G. (1992). *Progress in Polymer Science*. **17**, 163–249.
- Zhao, S., Cao, M., Li, H., Li, L., and Xu, W. (2010). *Carbohydrate Research*. **345**, 425–431.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTOS Y GENERALIDADES

1.1 Generalidades de los materiales poliméricos

Los polímeros son moléculas de gran tamaño, llamadas macromoléculas, constituidas por moléculas más pequeñas, unidades repetitivas, que se enlazan entre sí a partir de uniones covalentes. Las unidades repetitivas pueden disponerse de manera lineal, de forma semejante a los eslabones de una cadena, ramificada donde encontramos una cadena central con cadenas laterales, o interconectadas formando retículos tridimensionales; la unidad repetitiva del polímero es el monómero y la longitud de la cadena viene determinada por el número de unidades que se repiten en la cadena denominado grado de polimerización (DP). La masa molar de un polímero es el producto de la masa molar de la unidad repetitiva por el grado de polimerización.

La alta masa molar de los polímeros imparte a los materiales excelentes propiedades finales como resistencia, estabilidad dimensional y otras propiedades mecánicas (Billmeyer, 1975).

A los materiales poliméricos se los puede clasificar en dos grandes grupos, según la composición monomérica que presentan:

- Homopolímeros: todas las unidades repetitivas son iguales.
- Copolímeros: cuando en la cadena polimérica es posible encontrar dos o más unidades repetitivas diferentes.

La polimerización simultánea de dos o más monómeros diferentes, o bien, el injerto de una cadena de polímero a otra diferente en un determinado sitio reactivo, permite la modificación de las propiedades finales de estos materiales. Estas síntesis dan lugar a copolímeros cuya principal ventaja consiste en materiales con mejores propiedades finales a partir del aporte de cada uno de los componentes.

A su vez, los copolímeros pueden ser clasificados en función del orden y distribución de los monómeros a lo largo de la cadena. Según este criterio es posible encontramos los distintos tipos de copolímeros que se describen a continuación (Figura 1.1).

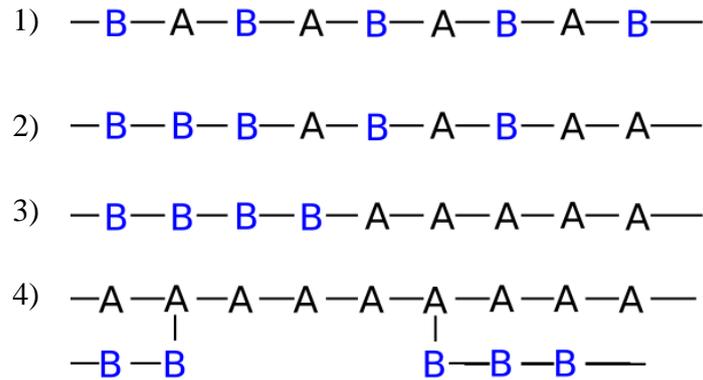


Figura 1.1. Representación de las unidades repetitivas en un copolímero: 1) alternado, 2) al azar, 3) en bloque y 4) ramificado.

- Copolímeros alternados: los monómeros están organizados de manera secuencial respetando un orden.
- Copolímeros al azar: los monómeros no presentan ningún orden.
- Copolímeros en bloque: los monómeros de igual naturaleza química se encuentran agrupados en bloques, formando entonces dominios constituidos sólo por uno de los monómeros que forman el copolímero.
- Copolímeros ramificados: presentan una cadena principal de uno de los monómeros a la cual se enlazan covalentemente cadenas laterales de monómeros de distinta naturaleza a la de la cadena principal.

A su vez considerando el origen de los materiales poliméricos, es posible realizar una tercera clasificación:

- Polímeros naturales: son aquellos provenientes del reino vegetal o animal, como la seda, lana, algodón, celulosa, almidón, proteínas, caucho natural (látex o hule), ácidos nucleicos, como el ADN, entre otros.
- Polímeros semi-sintéticos: se obtienen por transformación de polímeros naturales. Por ejemplo, la nitrocelulosa o el caucho vulcanizado.
- Polímeros sintéticos: son los obtenidos a partir de procesos químicos desarrollados por el hombre. Esta categoría incluye todos los plásticos, entre los cuales es posible mencionar el nylon, el poli(estireno), PS, el poli(cloruro de vinilo), PVC y el poli(etileno), PE, entre otros. La gran variedad de propiedades físicas y químicas de estos compuestos permite aplicarlos en construcción, embalaje,

industria automotriz, aeronáutica, electrónica, alimenticia, en la agricultura o la medicina.

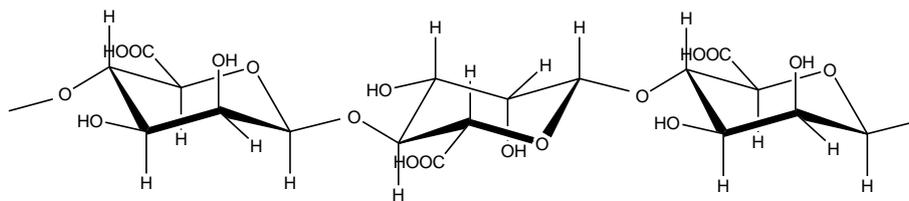
1.1.1 Materiales poliméricos de origen natural

Alginatos

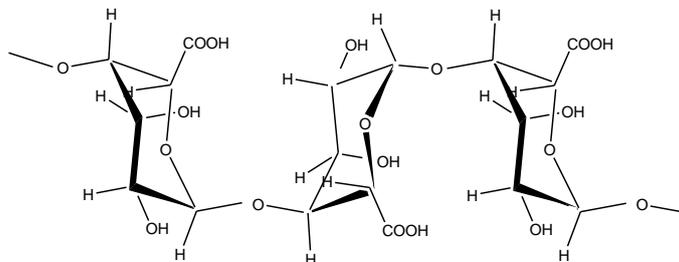
Alginato es el nombre genérico dado a las sales del ácido algínico. El alginato es un polisacárido constituido por residuos de ácidos urónicos, moléculas con grupos carboxílicos en el carbono que no es parte del anillo (Klöck y col., 1997).

El ácido algínico está constituido por una mezcla compleja de secuencias de bloques de poli(ácido manurónico) (bloque M), poli(ácido gulurónico) (bloque G) y bloques MG aleatorios, como se muestra en la Figura 1.2 (Rowley y col., 1999). El ácido manurónico forma enlaces del tipo β (1–4), debido a eso los segmentos de bloques M muestran una conformación lineal flexible, mientras que el ácido gulurónico, epímero del C5 del manurónico, da lugar a enlaces α (1–4), introduciendo de esta manera un impedimento estérico alrededor de los grupos carboxílicos; por esta razón los segmentos de bloques G presentan una estructura conformacional plegada y rígida, responsable de la marcada rigidez de las cadenas de moléculas (Avella y col., 2007; Yang y col., 2011; Lencina y col., 2013). La Figura 1.2 muestra la estructura básica de los bloques M, G y MG, así como su distribución espacial.

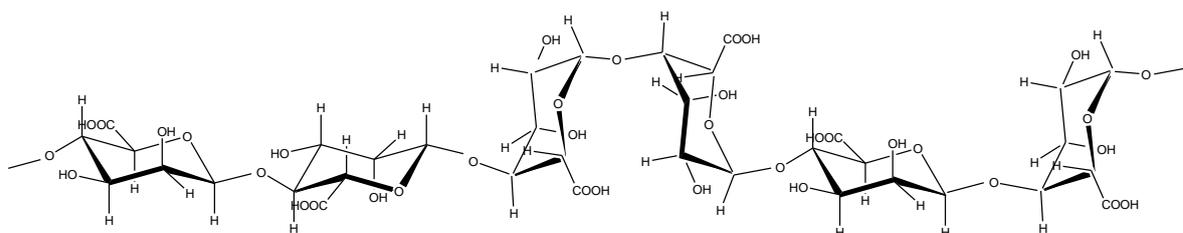
En medio acuoso, esta particular conformación de los bloques G, crea condiciones espaciales que permiten interaccionar con cationes bivalentes, más aun, la coordinación de dichos cationes favorece la asociación entre moléculas distintas del polímero, que resulta eventualmente en la formación de geles ionotrópicos. De esta manera, el contenido total de ácido α -L-gulurónico (en una primera aproximación), o más precisamente, la longitud relativa de los bloques G, es un criterio importante y la propiedad más valiosa de los alginatos por su posibilidad de formar geles. La estructura en bloques es también responsable de muchas otras características de los alginatos, incluyendo su actividad biológica (Usov, 1999).



a) bloque M



b) bloque G



c) bloque MG

Figura 1.2. Estructura del bloque M (a), del bloque G y del bloque MG (c)

Las sales de cationes monovalentes (Na^+ o K^+) del ácido alginico son solubles en agua, pero las sales de cationes polivalentes (Ca^{2+} , Sr^{2+} o Ba^{2+}) resultan insolubles en agua. El pH del medio tiene, también, un rol importante en la solubilidad de estos compuestos. Los alginatos precipitan por acidificación del medio, puesto que son transformados en ácido alginico, insoluble en agua. Entre una amplia variedad de cationes polivalentes, el Ca^{2+} ha recibido una particular atención, dada la estructura característica formada, conocida como “caja de huevo” o “*egg-box structure*” entre los bloques G del alginato y los iones Ca^{2+} (Figura 1.3).

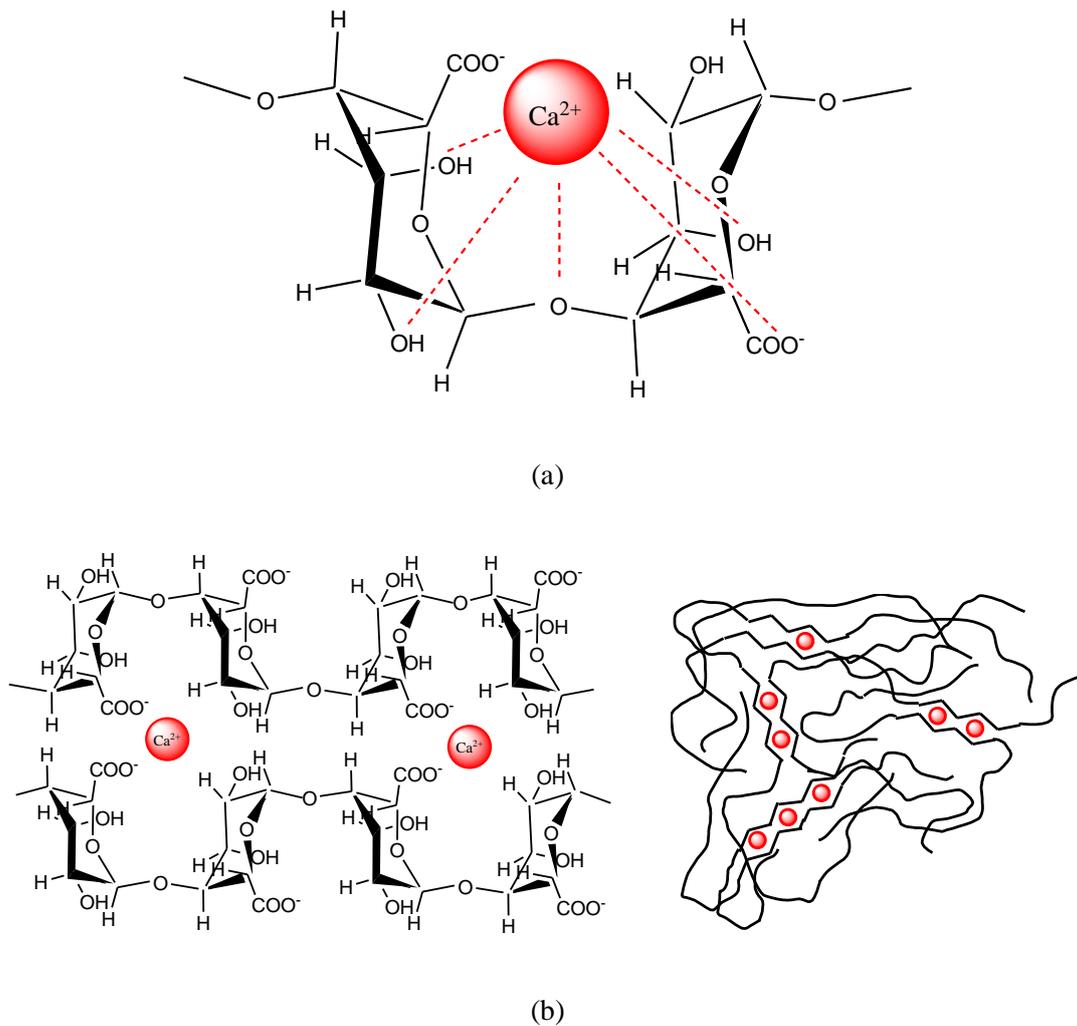


Figura 1.3. Interacciones electrostáticas entre el bloque G y los iones calcio bivalentes (a) y representación de la estructura “caja de huevo” (b).

La gelación se alcanza cuando la polimerización alcanza una estructura tridimensional, donde las cadenas poliméricas alcanzan un tamaño infinito, esto es, todas las cadenas están conectadas entre sí. El comienzo de la gelación señala la aparición de dos tipos de estructuras: el gel, que es insoluble en todos los disolventes no degradables, y el sol, que sigue siendo soluble y puede extraerse del gel. Al continuar la polimerización, luego del punto de gel, la cantidad de gel aumenta a expensas del sol y el material se transforma rápidamente de un líquido viscoso en un material elástico de viscosidad infinita (Billmeyer, 1975).

El alginato puede ser entrecruzado alcanzando una estructura tridimensional por gelación interna o por gelación externa utilizando cationes polivalentes como el Ca^{2+} . Por otra parte puede observarse también una gelación ácida como se mencionó previamente.

La gelación interna utiliza como agente entrecruzante iones calcio de forma inactiva, los cuales se presentan formando una sal de calcio poco soluble (CaCO_3 o citrato de tricalcio) o un complejo (Ca-EDTA). Una solución de una lactona hidrolizable, generalmente glucono- δ -lactona (GDL), es luego agregada a la mezcla de alginato y el agente entrecruzante inactivo (Funami y col., 2009). La GDL se hidroliza en solución para formar ácido glucónico disminuyendo el pH de la solución. Como la solubilidad de la sal de calcio es dependiente del pH, los iones calcio son liberados, dando lugar a la gelación del alginato en la solución. Con este método, se obtiene una distribución uniforme de los iones Ca^{2+} generando simultáneamente la gelación a través de la solución. Los geles así obtenidos presentan una alta homogeneidad (Walsh y col., 1996).

La gelación externa, también llamada gelación por diálisis, implica una rápida migración de los iones Ca^{2+} a través de la matriz polimérica. Debido a la difusión del entrecruzante desde la interface, la concentración de iones calcio disminuye desde la interface hasta el centro del gel. Estos geles pueden ser preparados como perlas o pellets, como tubos o como films a partir de alginato de sodio. En la producción de perlas por gelación externa, se hace gotear una solución de alginato de sodio sobre una solución de una sal de calcio, CaCl_2 . Las perlas se forman instantáneamente cuando la gota de la solución de alginato entra en contacto con la solución de iones calcio. Las perlas así formadas, se mantienen en la solución de iones calcio durante un periodo de tiempo establecido que finalmente determina el grado de entrecruzamiento. En forma análoga, la formación de geles en tubos se logra utilizando una membrana de diálisis de forma cilíndrica. En ella se coloca la solución de alginato de sodio, y posteriormente se sumerge en una solución de iones sodio. El sistema se deja reposar un periodo de tiempo determinado para permitir la difusión de los iones calcio a través de la membrana y del gel formado. Finalmente el hidrogel se retira de la membrana habiendo tomado su forma. Como resultado se tiene un tubo de hidrogel con un gradiente radial de concentración de entrecruzamientos debido a que la difusión se ve afectada a medida que el gel se ha ido formando en la vecindad de la membrana (Walsh y col., 1996; Chan y col., 2006). Otra manera de obtener geles de alginato de calcio, es sumergiendo films de alginato de sodio previamente preparados por casting en una solución de iones calcio de concentración elegida en función de la velocidad y el grado de entrecruzamiento deseado.

Finalmente la gelación ácida tiene lugar a valores de pH inferiores a los valores de pKa de las unidades gulurónicas y manurónicas que componen al alginato ($\text{pH} < 4$). Los geles ácidos son el resultado de asociaciones por puente hidrogeno entre los ácidos carboxílicos presentes en la estructura molecular. En éste caso no sólo involucran a los bloques gulurónicos sino también a los bloques manurónicos obteniéndose materiales homogéneos. Aún así, se ha demostrado que alginatos con mayor contenido en bloques G dan lugar a geles con mejores propiedades. Los bloques M también forman uniones bajo condiciones ácidas aunque su contribución a la red es menor que la de los bloques G. Los bloques alternantes con longitudes mayor a quince unidades repetitivas no contribuyen a la formación de asociaciones por puente hidrogeno perturbando la formación del gel (Funami y col., 2009).

La formación de enlaces de origen electrostático de manera selectiva con iones polivalentes constituye una de las propiedades físicas más importante que presentan estos materiales. Por otra parte, la transición sol-gel no se ve influenciada por la temperatura (Draget y Taylor, 2011).

1.1.2 Polímeros sintéticos termosensibles

Poli(N-isopropilacrilamida), PNIPAAm

El monómero N-isopropilacrilamida, NIPAAm, ha sido de particular interés en las últimas décadas, ya que debido a su carácter vinílico es posible obtener por distintos métodos el polímero de cadena principal saturada, denominado poli(N-isopropilacrilamida), PNIPAAm, con singulares propiedades adecuadas para su uso biomédico, Figura 1.4 (Schild, 1992; de Moura y col., 2006; Deng y col., 2008; Klouda y Mikos, 2008).

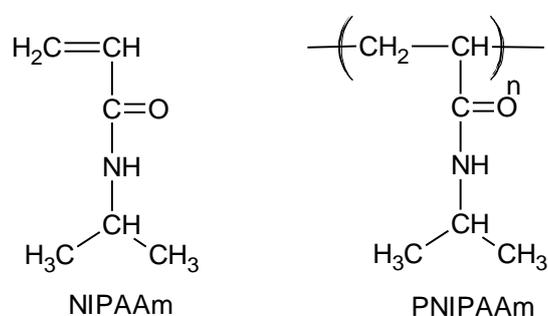


Figura 1.4. Representación esquemática del monómero NIPAAm y del polímero lineal (PNIPAAm).

La importancia de este polímero reside en su comportamiento térmico característico en disolución acuosa. Este polímero se ha convertido, probablemente, en el más popular dentro de los polímeros que poseen una “solubilidad inversa” frente al calentamiento, es decir, una propiedad contraria al comportamiento de la mayoría de los polímeros en solución a presión atmosférica y temperatura ambiente. En solución acuosa y a una determinada temperatura, el PNIPAAm experimenta una transición macromolecular abrupta donde pasa de tener un comportamiento hidrófilo a uno hidrófobo. Este fenómeno ocurre a la llamada temperatura crítica inferior de disolución, LCST por sus siglas en inglés. Experimentalmente, la LCST para el PNIPAAm en medio acuoso se presenta alrededor de los 30-35 °C, siendo el valor de la temperatura de transición función de la microestructura de la macromolécula (Billmeyer, 1975; Schild, 1992).

En soluciones acuosas a bajas temperaturas, los enlaces intermoleculares del tipo puente hidrógeno entre el agua y los grupos polares del PNIPAAm hacen que el polímero se encuentre disuelto, formando una estructura tipo “ovillo”. Por encima de la LCST, los enlaces puente hidrógeno se debilitan mientras que las interacciones hidrofóbicas entre los grupos laterales se incrementan; razón por la cual el polímero se contrae o “colapsa”, produciéndose una transición denominada “ovillo-glóbulo”. De esta manera, la transición de fase puede ser descrita como un fenómeno de dos etapas: una primera etapa que involucra una transición de conformación ovillo a una conformación globular de la cadena molecular, donde los grupos hidrofóbicos se localizan en la superficie de los glóbulos y una segunda etapa, correspondiente a la agregación de los glóbulos individuales, debido a asociaciones hidrofóbicas intermoleculares (Figura 1.5). A bajas temperaturas se produce una hidratación hidrofóbica, en donde las moléculas de agua se ubican alrededor de los solutos hidrofóbicos formando estructuras "icelike" (por su semejanza al ordenamiento de las moléculas de agua en el estado sólido). Como resultado de esta hidratación, las moléculas no polares se vuelven solubles en agua. Sin embargo, a temperaturas superiores tienen lugar interacciones hidrofóbicas, o la asociación de los solutos hidrofóbicos. Así, el incremento de la temperatura resulta en una reducción del número total de moléculas de agua estructuradas alrededor de los grupos hidrofóbicos, lo que promueve las interacciones entre ellos. Es interesante resaltar que este comportamiento es contrario a la mayoría de las interacciones tales como las fuerzas dipolo-dipolo, las de Van der Waals y las fuerzas electrostáticas, donde un aumento de la temperatura se

traduce en un debilitamiento de las interacciones (Fujishige S.; Kubota K.; Ando I., 1989; Otake y col., 1990).

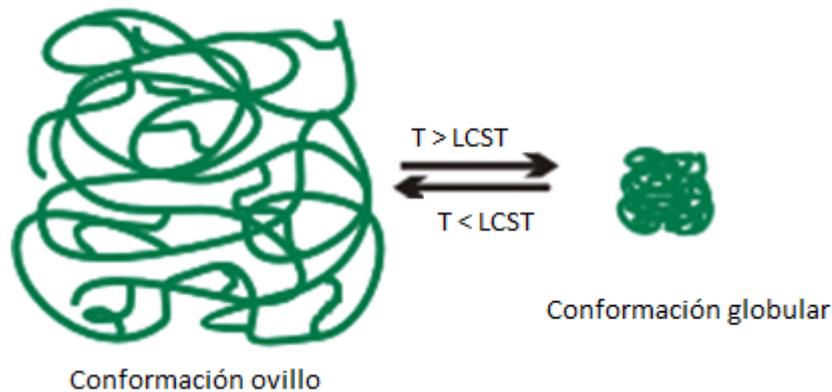


Figura 1.5. Comportamiento frente a la temperatura de las cadenas de PNIPAAm, transición ovillo-glóbulo.

1.2 Sistemas poliméricos para aplicaciones biomédicas

Un biomaterial puede definirse como un material pensado para interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, mejorar o reemplazar tejidos u órganos. El requisito fundamental de estos materiales es presentar una buena biocompatibilidad, esto es la habilidad del material en provocar una buena respuesta o aceptación por parte del receptor en una dada aplicación. A fines del siglo XX la ciencia de los materiales empleados para aplicaciones biomédicas dejó de estar enfocada en materiales bioestables para comenzar a estudiarse la obtención de materiales biodegradables. Los sistemas biodegradables pueden ser utilizados como biomateriales si presentan ciertas propiedades como no generar una respuesta inflamatoria o tóxica al implantarlo en el cuerpo; tener un tiempo de vida útil aceptable (el tiempo que implique la degradación debe ser compatible con el tiempo del proceso de curado o regeneración para el cual está destinado), poseer productos de degradación no tóxicos y poder metabolizarse y eliminarse del cuerpo (Nair y Laurencin, 2007).

A fin de satisfacer la fuerte demanda de nuevas tecnologías biomédicas tales como, ingeniería de tejidos, medicina regenerativa, terapia génica, liberación controlada de fármacos y bionanotecnología, se ha observado un marcado aumento en el estudio y producción de nuevos materiales de origen natural o sintético (Orive y col., 2002; Klouda y Mikos, 2008; Davidovich-pinhas y Bianco-peled, 2011; Ward y Georgiou, 2011; Lee y Mooney, 2012; Shi y col., 2013). En tal sentido tanto los

polímeros sintéticos como los biopolímeros han sido ampliamente investigados como biomateriales poliméricos biodegradables y debido a su versatilidad han ido reemplazando otros materiales empleados tales como metales, aleaciones, cerámicos.

1.2.1 Hidrogeles

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales caracterizadas por su extraordinaria capacidad de absorber grandes cantidades de agua o fluidos fisiológicos (Güven y col., 1999; Guilherme y col., 2003; Gil y Hudson, 2004). Aún presentando una alta afinidad por los medios acuosos, los hidrogeles presentan sólo hinchamiento y no se disuelven en estos medios como consecuencia de los entrecruzamientos presentes en la estructura del hidrogel. Estos materiales están constituidos por homopolímeros o copolímeros hidrofílicos que pueden presentar entrecruzamientos físicos y/o químicos. Los llamados geles físicos presentan una red tridimensional formada por entrelazamientos entre las moléculas o uniones del tipo van der Waals, más débiles que las uniones covalentes. Los geles químicos son aquellos en los que la red está formada por enlaces covalentes. Muchos hidrogeles presentan ambos tipos de entrecruzamiento donde la red polimérica se forma por enlaces covalentes, enlaces por puente hidrogeno, interacciones de van del Waals y entrelazamientos (Ju y col., 2001; Hamidi y col., 2008).

Las características particulares de los hidrogeles, tales como su similitud con los tejidos humanos por su alto contenido de agua, su comportamiento reversible frente al hinchamiento-deshinchamiento con la posibilidad de tener control sobre los procesos cinéticos e interesantes propiedades mecánicas, hacen a estos materiales muy atractivos para aplicaciones biomédicas, entre ellas la ingeniería de tejidos y la liberación controlada de fármacos principalmente (Qiu y Park, 2001; Drury y Mooney, 2003; Yang y col., 2007; Fang y col., 2008; Klouda y Mikos, 2008).

Inicialmente los sistemas de liberación controlada se enfocaron en materiales donde la liberación era una simple función del tiempo, pero ha sido demostrado que para muchos principios activos tales cinéticas de liberación no son deseables y se puede mejorar los efectos terapéuticos mediante la modulación de la liberación de una manera controlada. El interés en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos estímulo-sensibles ha dado lugar a un importante crecimiento del uso de polímeros que puedan responder a un estímulo externo (D'Emanuele y Dinarvand, 1995; Qiu y Park, 2001).

Los geles que presentan tal comportamiento son denominados hidrogeles inteligentes ya que la liberación del fármaco puede ser controlada en un sitio específico o a un tiempo determinado debido a su capacidad de hincharse o colapsar en respuesta a un factor externo, tal como pH, temperatura, fuerza iónica, campo eléctrico o compuestos químicos (Kim y col., 2000; Ju y col., 2001; Sousa y col., 2005). Los hidrogeles termosensibles, es decir, aquellos que responden a variaciones en la temperatura con un cambio en sus propiedades físicas o químicas, han sido desarrollados y ampliamente explorados teniendo en cuenta que el cuerpo humano está termo-regulado (Tsitsilianis, 2010).

1.2.2 Aplicaciones de hidrogeles de alginato e hidrogeles de PNIPAAm en la industria.

Los alginatos han sido utilizados como dispositivos en diversas aplicaciones en el área biomédica, fundamentalmente por su biodegradabilidad, biocompatibilidad, no toxicidad y por sus propiedades como espesante, emulsificante en base a una de sus características distintivas como es la formación de geles con iones polivalentes, tales como el Ca^{+2} . Dentro de las muchas aplicaciones es posible destacar su uso como excipientes en fármacos, como vendas y revestimiento de heridas, como material para impresiones dentales y en formulaciones para la prevención del reflujo gástrico (Draget y Taylor, 2011).

Por otra parte, los hidrogeles basados en PNIPAAm son quizás los materiales más conocidos dentro de los polímeros estímulo-sensibles. Estos hidrogeles presentan pobres propiedades mecánicas en el estado altamente hinchado y pueden ser degradados *in vivo* por la acción de enzimas hepáticas como glutatión S-transferasa, aunque los monómeros de acrilamida son carcinogénicos, desventaja que limita su aplicación como sistemas portadores para liberación controlada de fármacos (De Moura y col., 2006; Fang y col., 2008). La copolimerización permite una reducción de la toxicidad y una mejora de las propiedades mecánicas mejorando la biocompatibilidad de los materiales, de hecho copolímeros de PNIPAAm han sido utilizados como sistemas de liberación por vía oral de calcitonina e insulina (Schmaljohann, 2006), como sistemas de encapsulamiento y liberación de células así como también como superficie de cultivo de células (Klouda y Mikos, 2008).

El NIPAAm puro, no polimerizado, así como otros monómeros basados en acrilamidas, han mostrado ser carcinogénicos y tóxicos para el sistema nervioso. Sin embargo un importante número de estudios han concluido que el PNIPAAm no es tóxico (Kang Derwent y Mieler, 2008).

De tal manera que la copolimerización de alginato y PNIPAAm, combinando las características particulares de ambos polímeros, permitiría obtener materiales con potencial aplicación en el área biomédica, debido a su esperable biocompatibilidad, su termosensibilidad (exhibiendo una LCST cercana a la temperatura corporal) y sus buenas propiedades mecánicas. Sin embargo, estos copolímeros están todavía en estudio y existen pocos trabajos en la literatura respecto a sus propiedades (De Moura y col., 2006).

1.3 Referencias

- Avella, M., Di Pace, E., Immirzi, B., Impallomeni, G., Malinconico, M., and Santagata, G. (2007). *Carbohydrate Polymers*. **69**, 503–511.
- Billmeyer, F. W. (1975). "Ciencia de los Polímeros", Segunda Edición, Ed. Reverté.
- Chan, L. W., Lee, H. Y., and Heng, P. W. S. (2006). *Carbohydrate Polymers*. **63**, 176–187.
- Davidovich-pinhas, M. and Bianco-peled, H. (2011). *Acta Biomaterialia*. **7**, 625–633.
- Deng, L., Shi, K., Zhang, Y., Wang, H., Zeng, J., Guo, X., Du, Z., and Zhang, B. (2008). *Journal of Colloid and Interface Science*. **323**, 169–175.
- Draget, K. I. and Taylor, C. (2011). *Food Hydrocolloids*. **25**, 251–256.
- D'Emanuele, A. and Dinarvand, R. (1995). *International Journal of Pharmaceutics*. **118**, 237–242.
- Fang, J.-Y., Chen, J.-P., Leu, Y.-L., and Hu, J.-W. (2008). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **68**, 626–636.
- Fujishige S.; Kubota K.; Ando I. (1989). *Journal of Physical Chemistry*. **93**, 3311–3313.
- Funami, T., Fang, Y., Noda, S., Ishihara, S., Nakauma, M., Draget, K. I., Nishinari, K., and Phillips, G. O. (2009). *Food Hydrocolloids*. **23**, 1746–1755.
- Gil, E. and Hudson, S. (2004). *Progress in Polymer Science*. **29**, 1173–1222.
- Guilherme, M. ., Silva, R., Giroto, E. ., Rubira, a. ., and Muniz, E. . (2003). *Polymer*. **44**, 4213–4219.
- Güven, O., Sen, M., Karadag, E., and Sarayd, D. (1999). *Radiation Physics and Chemistry*. **56**, 381–386.
- Hamidi, M., Azadi, A., and Rafiei, P. (2008). *Advanced Drug Delivery Reviews*. **60**, 1638–1649.
- Ju, H. K., Kim, S. Y., and Lee, Y. M. (2001). *Polymer*. **42**, 6851–6857.
- Kang Derwent, J. J. and Mieler, W. F. (2008). *Trans Am Ophthalmol Soc*. **106**, 206–214.
- Kim, S. Y., Cho, S. M., Lee, Y. M., and Kim, S. J. (2000). *Journal of Applied Polymer Science*. **78**, 1381–1391.
- Klouda, L. and Mikos, A. G. (2008). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **68**, 34–45.

- Klöck, G., Pfeffernann, A., Ryser, C., Gröhn, P., Kuttler, B., Hahn, H.-J., and Zimmermann, U. (1997). *Biomaterials*. **18**, 707–713.
- Lee, K. Y. and Mooney, D. J. (2012). *Progress in Polymer Science*. **37**, 106–126.
- Lencina, M. M. S., Andreucetti, N. A., Gómez, C. G., and Villar, M. A. (2013). *Advances in Natural Polymers: Composites and Nanocomposites*, T. Sabu, P.M. Visakh, & P.M. Aji, edited by., pp. 193–254. Springer.
- De Moura, M. R., Aouada, F. A., Guilherme, M. R., Radovanovic, E., Rubira, A. F., and Muniz, E. C. (2006). *Polymer Testing*. **25**, 961–969.
- Nair, L. S. and Laurencin, C. T. (2007). *Progress in Polymer Science*. **32**, 762–798.
- Orive, G., Hernández, R. M., Gascón, A. R., Igartua, M., and Pedraz, J. L. (2002). **20**, 382–387.
- Otake, K., Inomata, H., Konno, M., and Saito, S. (1990). *Macromolecules*. **23**, 283–289.
- Qiu, Y. and Park, K. (2001). *Advanced Drug Delivery Reviews*. **53**, 321–339.
- Rowley, J. A., Madlambayan, G., and Mooney, D. J. (1999). *Biomaterials*. **20**, 45–53.
- Schild, H. G. (1992). *Progress in Polymer Science*. **17**, 163–249.
- Schmaljohann, D. (2006). *Advanced Drug Delivery Reviews*. **58**, 1655–1670.
- Shi, X., Wang, W., and Wang, A. (2013). *Carbohydrate Polymers*. Trabajo aceptado.
- Sousa, R. G., Prior-Cabanillas, A., Quijada-Garrido, I., and Barrales-Rienda, J. M. (2005). *Journal of Controlled Release*. **102**, 595–606.
- Tsitsilianis, C. (2010). *Soft Matter*. **6**, 2372–2388.
- Usov, A. I. (1999). *Russian Chemical Reviews*. **68**, 957–966.
- Walsh, P. K., Isdell, F. V., Noone, S. M., O'Donovan, M. G., and Malone, D. M. (1996). *Enzyme and Microbial Technology*. **18**, 366–372.
- Ward, M. a. and Georgiou, T. K. (2011). *Polymers*. **3**, 1215–1242.
- Yang, J.-S., Xie, Y.-J., and He, W. (2011). *Carbohydrate Polymers*. **84**, 33–39.

CAPÍTULO 2

COPOLÍMEROS DE INJERTO

2.1 Introducción

El principio de la copolimerización por injerto consiste en polimerizar un monómero, (monómero B), en presencia de un polímero, (polímero A), de manera tal que los centros iniciadores de las reacciones de la polimerización estén situados todos en el polímero original. Debido a estas características, los copolímeros de injerto están constituidos por una cadena principal de la cual se desprenden un cierto número de cadenas laterales. La copolimerización por injerto constituye un método valioso para lograr la modificación de las propiedades físicas y químicas de polímeros naturales y sintéticos. Entre los polímeros naturales, la copolimerización de polisacáridos (alginato, almidón, quitosano o dextrano) con polímeros sintéticos, se ha convertido en una importante fuente de desarrollo de materiales avanzados, con mejores propiedades funcionales (Sen y col., 2010).

El injerto de cadenas de polímeros sintéticos sobre la cadena principal de alginato, es un método que permite introducir hidrofobicidad e impedimentos estéricos, protegiendo al alginato de una rápida disolución y degradación. Estas características hace que los nuevos materiales obtenidos posean potenciales aplicaciones como sistemas de liberación de principios activos, ya que presentan una liberación sostenida de los mismos (Pawar y Edgar, 2012).

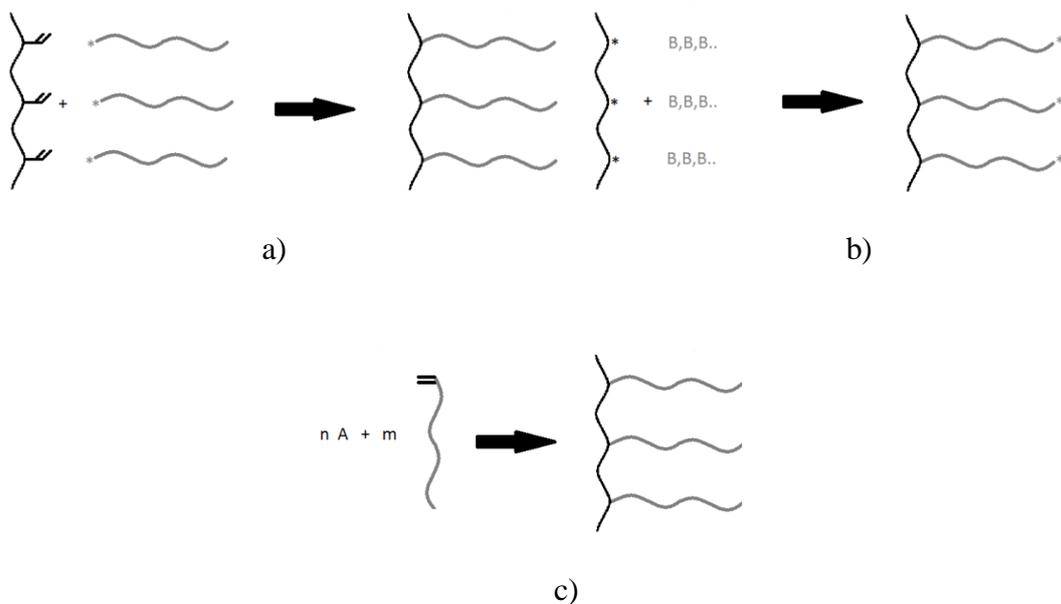


Figura 2.1. Representación esquemática de las estrategias de síntesis para la formación de copolímeros de injerto: a) *grafting onto*, b) *grafting from* y c) *grafting through*.

Los copolímeros de injerto se pueden obtener por medio de tres rutas de síntesis, denominadas como *grafting onto* (injerto en), *grafting from* (injerto desde) y *grafting through* (injerto a través) (Tsitsilianis, 2007). Las tres rutas mencionadas se representan esquemáticamente en la Figura. 2.1.

2.2 Método de “*grafting from*”

En la síntesis de copolímeros empleando la ruta “*grafting from*” se genera un número de sitios activos en la cadena principal los cuales son utilizados para iniciar la polimerización de uno o varios monómeros de distinta naturaleza química, creando así las cadenas laterales. La principal desventaja de este método es la imposibilidad de caracterizar directamente las cadenas laterales, siendo difícil de estimar el grado de injerto. Asumiendo que todos los sitios han sido involucrados en la polimerización del monómero a injertar, es posible calcular la masa molar promedio de las cadenas injertadas en base a la masa molecular del copolímero y el número de sitios de injerto en la cadena principal (Figura 2.1.b).

En el desarrollo de esta tesis se utilizaron dos técnicas de *grafting from*, que se describen a continuación; la primera a partir del uso de un iniciador redox para generar los sitios activos y la segunda a partir del uso de radiación gamma.

2.2.1 Síntesis de copolímeros de alginato y N-isopropilacrilamida utilizando nitrato de amonio cérico (CAN).

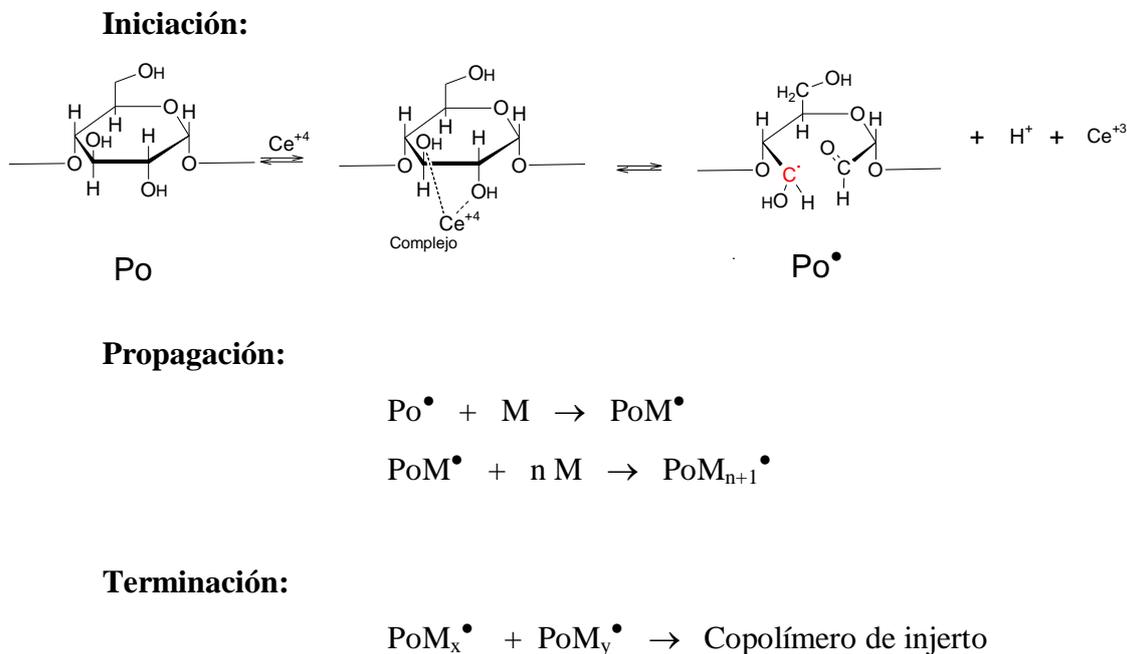
La síntesis de copolímeros de alginato y N-isopropilacrilamida, utilizando nitrato de amonio cérico, implica la utilización de dicho iniciador redox para la generación de radicales libres a lo largo de la cadena del alginato y a partir de estos sitios reactivos la posterior polimerización de la NIPAAm presente en la solución. Dado que en este proceso, los radicales se inician exclusivamente sobre la cadena principal, se esperaría que el injerto se produzca sin formación de homopolímero PNIPAAm (Misra y col., 1981). Sin embargo algunos autores han reportado la homopolimerización como una reacción competitiva con el injerto (Shah y col., 1995).

El ión Ce^{+4} ha sido extensamente utilizado como iniciador redox de copolimerizaciones de injerto de una variedad de monómeros vinílicos sobre diversos polisacáridos, tales como almidón, dextrano y polulano, entre otros (Misra y col., 1981;

Shah y col., 1995; Patel y col., 1999; Yilmaz y col., 2007; Paira y col., 2008; Wu y col., 2009).

En presencia de polialcoholes, el ión cerio forma un complejo que se desproporciona por un proceso de transferencia de un electrón para generar un macroradical en la cadena polimérica principal. El macroradical es el sitio activo que promueve la copolimerización permitiendo la reacción de injerto. Otros grupos funcionales tales como -NH₂, -SH, -CHO, -COOH y -SS- permiten también la formación de un complejo con el ión cerio (Misra y col., 1981). Se han reportado en la literatura diversas reacciones de copolimerización usando el ión cerio dando lugar a más un mecanismo propuesto (Shah et al., 1995; Trivedi et al., 2005; Yilmaz et al., 2007; Paira et al., 2008; Wu et al., 2009).

En el Esquema 2.1, a modo de ejemplo, el mecanismo de reacción planteado para la síntesis del copolímero de injerto de polulano y metilacrilato (Wu y col., 2009). El mecanismo implica las tres etapas típicas de una reacción radicalaria: iniciación, propagación y terminación. En la primera etapa se plantea la formación de un intermediario complejo que determina la apertura del anillo al formarse el radical y la formación de un aldehído como resultado de este proceso.



Esquema 2.1. Mecanismo de reacción para el proceso de copolimerización de un monómero vinílico (metilacrilato, M) sobre el polisacárido polulano (Po) empleando CAN como iniciador.

Para el injerto de NIPAAm sobre dextrano se encontró que los radicales se inician sobre la cadena del polisacárido pero no se indica el tipo de enlace formado que genera el injerto ni en qué grupo funcional se genera el macroradical (Wang y col., 2002). En cambio, para la copolimerización del NIPAAm sobre quitosano el mecanismo propuesto establece como sitio de iniciación de radicales a la amina presente en el quitosano (Recillas y col., 2009). En otros casos, se plantea que el proceso redox involucra la abstracción de un átomo de hidrógeno por la ruptura del enlace Alg-OH para formar un radical Alg-O[•]. Sin embargo, de igual manera puede plantearse la abstracción de un átomo de hidrógeno por la ruptura de un enlace C-H de los carbonos del anillo dando lugar a un radical centrado en un átomo de carbono. Debe notarse que tanto para el alginato, como para otro tipo de polisacáridos, las reacciones de injerto utilizando un iniciador de radicales libres como el CAN o el reactivo de Fenton son poco selectivos, dado que todos los enlaces C-H del monosacárido son lábiles debido a la presencia de grupos funcionales del oxígeno en los átomos de carbono. Puede esperarse entonces que ocurran puntos de iniciación de injerto en todos los carbonos del monosacárido (Pawar y Edgar, 2012).

En esta tesis, la síntesis de copolímeros de alginato/NIPAAm utilizando el iniciador CAN se presenta en el Capítulo 3.

2.2.2 Síntesis de copolímeros de alginato y N-isopropilacrilamida utilizando radiación gamma de ⁶⁰Co.

La radiación gamma es un método físico valioso para inducir cambios químicos que modifican la estructura y propiedades finales de los polímeros. El uso de rayos gamma de ⁶⁰Co presenta ventajas frente a los métodos químicos tradicionales, fundamentalmente porque produce radicales libres sin necesidad de usar compuestos químicos, en forma sencilla y a temperatura ambiente, y en forma proporcional a la dosis de radiación aplicada. Estos radicales promueven la síntesis radicalaria obteniéndose homo- y copolímeros. Por otro lado, los radicales libres generados por radiación producen en los polímeros reacciones de entrecruzamiento y/o escisión de cadena modificando su estructura (Satti y col., 2008).

La aplicación de radiación gamma para producir polimerización y entrecruzamiento de cadenas se emplea actualmente en la preparación de hidrogeles dado que es posible controlar el grado de entrecruzamientos obtenidos en función de la dosis (Lee y col., 2004; Nizam El-Din y col., 2008). Los entrecruzamientos condicionan

el grado de hinchamiento de los hidrogeles en solución acuosa y esto a su vez está directamente relacionado con la cinética de liberación de principios activos. En varias aplicaciones biomédicas, es preferible el empleo de radiación gamma ya que no se generan residuos que pueden ser potenciales agentes tóxicos. Además, la posibilidad de producir simultáneamente la síntesis y la esterilización de los hidrogeles, constituye una ventaja única de los procesos de irradiación (Lee y col., 2006; Makuuchi, 2010).

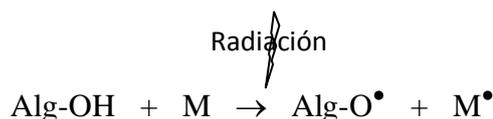
En el caso de la síntesis de copolímeros por injerto de monómeros a las cadenas de alginato, hay que tener en cuenta que los polisacáridos sufren reacciones de escisión debido a la radiación debido a la ruptura de los enlaces glucosídicos de la cadena principal. Debido a la ruptura de los enlaces glucosídicos, se produce la degradación o depolimerización del alginato, con la consecuente disminución de su masa molar.

Por otra parte, la ruptura de enlaces (escisión) y el entrecruzamiento de las cadenas de polímero están fuertemente condicionados por la atmósfera de irradiación y por el estado de agregación del material a irradiar. La presencia de oxígeno durante la irradiación, permite la formación de radicales oxidados que generan efectos indirectos como la degradación oxidativa (ruptura de cadenas) del polímero. En tanto que, la irradiación del material en estado sólido o en solución, presenta importantes diferencias que pueden atribuirse a la diferente movilidad de los radicales libres en cada medio. Para lograr la misma disminución de la masa molar en alginato, la irradiación en estado sólido requiere una dosis veinte veces mayor que la irradiación de una solución acuosa al 1 % m/v. Esto se basa principalmente en la alta movilidad que presentan las moléculas de alginato en solución, lo que disminuye la posible recombinación de las cadenas escindidas. Además, los radicales H^\bullet y OH^\bullet formados por la radiólisis del agua durante la irradiación (Anexo III), aceleran la escisión de las cadenas del alginato. La reacción entre los radicales libres y las moléculas de alginato en solución da lugar a una rápida depolimerización del alginato (Nagasawa y col., 2000; Lee y col., 2003).

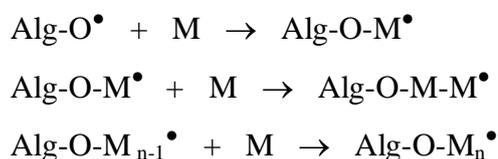
A pesar de la escisión de las cadenas de polisacáridos, la copolimerización por injerto inducida por radiación en solución, es una técnica adecuada para obtener copolímeros donde se combinan las mejores propiedades químicas y físicas de ambos monómeros, el polímero base (polisacárido) y el monómero injertado (Cai y col., 2005). Las características finales de los polímeros obtenidos (masa molar y composición) dependerá fundamentalmente de la dosis elegida y de las condiciones de irradiación, además de la masa molar inicial del polisacárido empleado.

A modo de ejemplo de este tipo de copolimerización, el Esquema 2.2 presenta el mecanismo de reacción propuesto para el injerto de una acrilamida sobre alginato de sodio, empleando radiación electromagnética de microondas (Sen y col., 2010). Podría esperarse un mecanismo similar utilizando radiaciones electromagnéticas de mayor energía, tal como la radiación gamma.

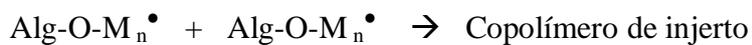
Iniciación:



Propagación:



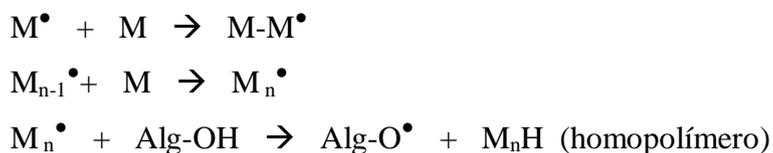
Terminación:



Esquema 2.2. Mecanismo de reacción para el proceso de copolimerización de un monómero vinílico (acrilamida, M) sobre alginato (Alg-OH) a partir de radiación electromagnética.

Sin embargo, y como principal desventaja de este método de copolimerización, la radiación electromagnética puede producir también la homopolimerización como reacción competitiva con el injerto (Esquema 2.3).

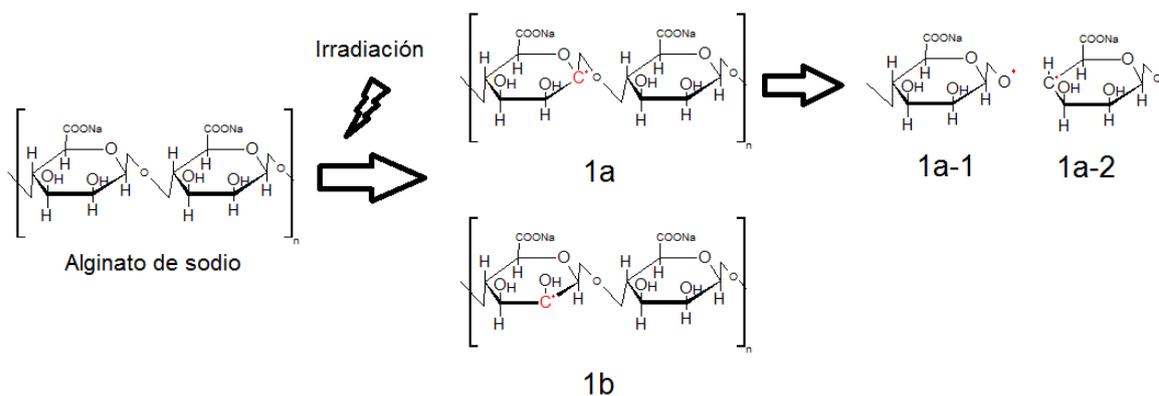
Homopolimerización:



Esquema 2.3. Mecanismo de homopolimerización a partir de radiación ionizante.

En el mecanismo propuesto en el Esquema 2.2 el macroradical se genera en los grupos OH, sin embargo en la bibliografía es posible encontrar para el alginato irradiado con rayos gamma de ^{60}Co macroradicales en átomos de carbono los cuales pueden propiciar el injerto de monómeros vinílicos en dichos sitios activos lo que representa un

mecanismo alternativo para la reacción de copolimerización. Estos radicales en átomos de carbono provienen del mecanismo de depolimerización radioinducida del alginato irradiado con rayos gamma de ^{60}Co (Nagasawa y col., 2000), como puede observarse en el Esquema 2.4.



Esquema 2.4. Mecanismo de degradación del alginato por efecto de radiación ionizante (Nagasawa y col., 2000).

2.3 Método de “grafting onto”

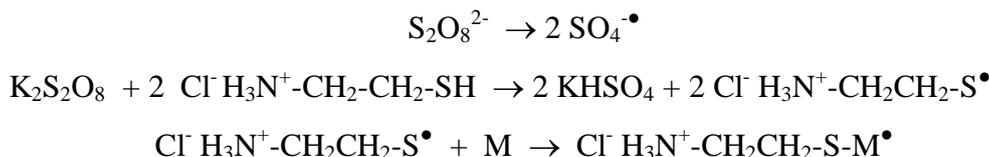
Este método implica la reacción entre cadenas macromoleculares vivas o con grupos funcionales específicos distribuidos a lo largo de la cadena principal. Así, pueden encontrarse dos situaciones, en la primera las cadenas activas son desactivadas al reaccionar con la cadena principal (como es el caso de los sitios aniónicos que reaccionan con grupos electrófilos o las reacciones de condensación entre dos grupos funcionales) y en la segunda las cadenas vivientes reaccionan con insaturaciones y de esta manera los sitios activos se mantienen en las ramificaciones. Esta última situación permite una posterior polimerización por el agregado de un tercer monómero. La posibilidad de enlaces entre cadenas principales es la principal desventaja de este método. En general, la síntesis utilizando una vía de “grafting onto” conduce a copolímeros de injerto bien definidos con un buen control de la estructura principal y de sus cadenas laterales dada la posibilidad de llevar a cabo una precisa caracterización de las cadenas en un paso previo al injerto.

2.3.1 Síntesis de NIPAAm amino-terminado y síntesis de copolímeros de injerto de alginato y PNIPAAm.

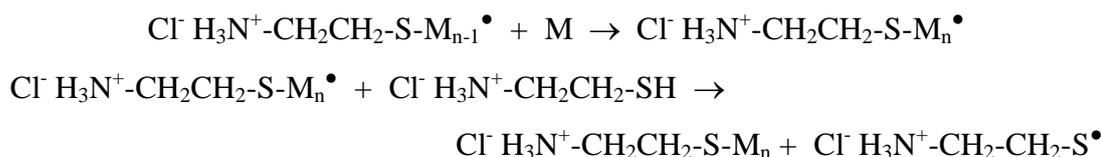
La primera etapa en la obtención de copolímeros de alginato y PNIPAAm por el método de "*grafting onto*" es la obtención de las cadenas a ser injertadas con un grupo funcional en un extremo. El anión persulfato ($S_2O_8^{2-}$) es comúnmente utilizado para generar la iniciación de procesos radicalarios ya que con relativa facilidad se produce la homólisis del enlace O-O dando lugar a dos aniones radicales sulfatos ($SO_4^{\bullet-}$), Esquema 2.5. La ruptura de este enlace por efecto de la luz (fotólisis) o por un aumento de temperatura (termólisis) presenta una dependencia con el pH, la fuerza iónica del medio y la concentración (Moad y Solomon, 2006). El hidrocloreto de aminoetanotiol (AET, HCl) es un conocido agente de transferencia de cadena (ATC), que ha sido ampliamente utilizado para la síntesis de PNIPAAm funcionalizado, en particular el PNIPAAm amino-terminado, PNIPAAm-NH₂ (Kaneko y col., 1998; Durand y Hourdet, 1999; Ju y col., 2001; Kim y col., 2002; Kim y col., 2005; Vasile y Nita, 2011). Esta polimerización radicalaria, donde el agente de transferencia de cadena (ATC) controla el tamaño del polímero obtenido es llamada telomerización. El iniciador químico activa al ATC, el cual comienza la polimerización por una propagación de radicales y aporta el grupo funcional a la cadena del producto final. En el Esquema 2.5 se presenta el mecanismo de reacción empleando persulfato de potasio como iniciador y AET para la obtención de polímero funcionalizado con un buen control de los grupos terminales y de la masa molar alcanzada (De Boos, 1973).

En este caso la masa molar de las cadenas de PNIPAAm-NH₂ obtenidas puede ser medida empleando diversas técnicas analíticas como cromatografía por exclusión de tamaños (SEC), osmometría de membrana o de presión de vapor o a través de una titulación ácido-base de los grupos amino terminales, como se detallará en el Capítulo 5.

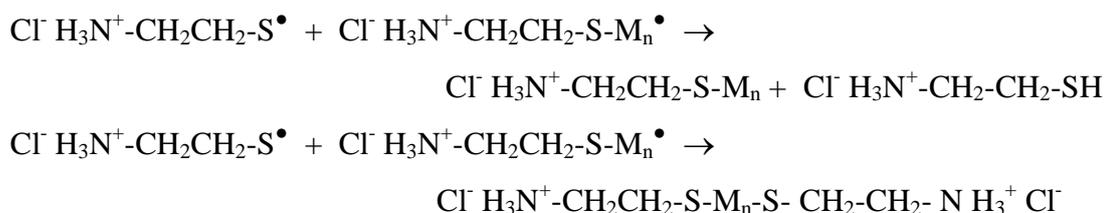
Iniciación:



Propagación:

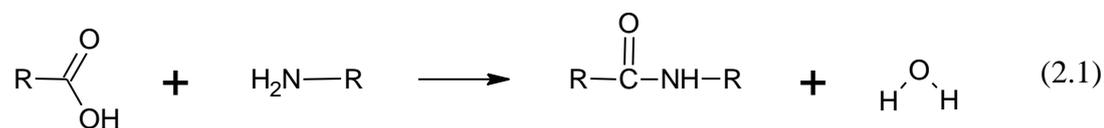


Terminación:



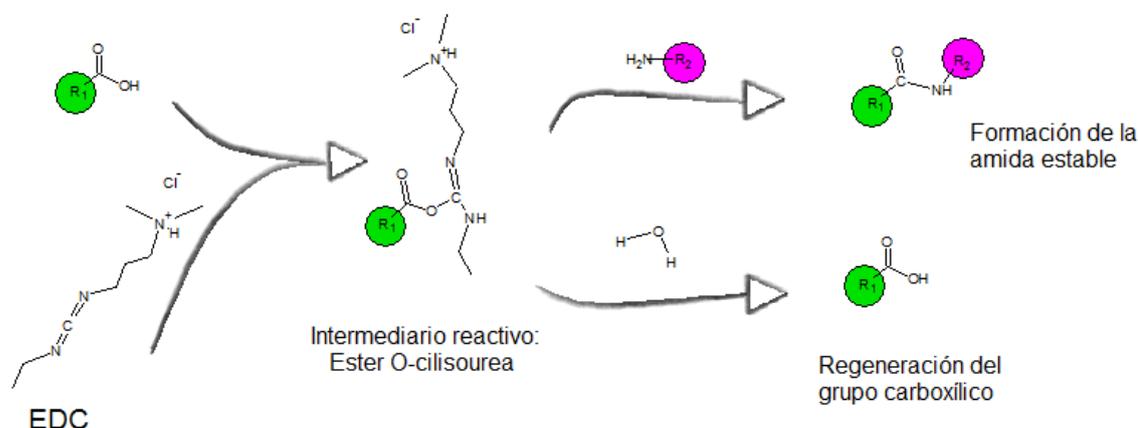
Esquema 2.5. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de PNIPAAm aminoterminados.

En una segunda etapa, se genera el injerto del PNIPAAm-NH₂ sobre el alginato. La reacción de injerto, es una reacción de condensación entre los grupos carboxílicos del alginato y los grupos amino del PNIPAAm; el resultado de dicha condensación es la formación de una amida con la eliminación de una molécula de agua:



En este tipo de reacciones es habitual la incorporación de un agente condensante. El EDC, hidrocloreuro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida, aumenta la eficiencia de la reacción de condensación propuesta ya que es un agente activante de los grupos carboxílicos. El EDC reacciona con los grupos carboxílicos para formar un

intermediario ester O-acilisourea muy reactivo; si este intermediario no encuentra una amina para dar lugar a la correspondiente amida el resultado es la regeneración del grupo carboxílico (Esquema 2.6).



Esquema 2.6. Mecanismo de la reacción de condensación entre un grupo carboxílico y una amina terminal a partir de un intermediario reactivo obtenido por la adición de EDC.

De esta manera es posible obtener copolímeros de injerto mediante una síntesis de mecanismo conocido donde la composición del copolímero será la composición inicial de la mezcla de reacción. Por otra parte el hecho de poder caracterizar las cadenas a ser injertadas antes de la reacción de copolimerización aporta una ventaja adicional ya que es posible conocer la masa molar de las cadenas laterales.

2.4 Método de “grafting through”

Esta ruta de síntesis involucra una mezcla de un monómero A y un macromonómero B que reaccionan para dar un copolímero de injerto. Este método se presenta como una alternativa más eficaz para controlar la estructura de los polímeros obtenidos teniendo en cuenta que puede controlarse, a partir de la mezcla de reacción inicial, tanto el largo de la cadena principal como la densidad de injertos. Sin embargo, a pesar de las bondades antes mencionadas no fue posible aplicarla en esta tesis ya que el sistema planteado posee una cadena principal de biopolímero (alginato).

2.5 Referencias

- De Boos, A. G. (1973). *Polymer*. **14**, 587–588.
- Cai, H., Zhang, Z. P., Chuan Sun, P., Lin He, B., and Xia Zhu, X. (2005). *Radiation Physics and Chemistry*. **74**, 26–30.
- Durand, A. and Hourdet, D. (1999). *Polymer*. **40**, 4941–4951.
- Ju, H. K., Kim, S. Y., and Lee, Y. M. (2001). *Polymer*. **42**, 6851–6857.
- Kaneko, Y., Nakamura, S., Sakai, K., Kikuchi, A., Aoyagi, T., Sakurai, Y., and Okano, T. (1998). *Polymer Gels and Networks*. **6**, 333–345.
- Kim, J. H., Lee, S. B., Kim, S. J., and Lee, Y. M. (2002). *Polymer*. **43**, 7549–7558.
- Kim, M. H., Kim, J.-C., Lee, H. Y., Kim, J. D., and Yang, J. H. (2005). *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*. **46**, 57–61.
- Lee, D. W., Choi, W. S., Byun, M. W., Park, H. J., Yu, Y.-M., and Lee, C. M. (2003). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**, 4819–4823.
- Lee, S. B., Park, E. K., Lim, Y. M., Cho, S. K., Kim, S. Y., Lee, Y. M., and Nho, Y. C. (2006). *Journal of Applied Polymer Science*. **100**, 4439–4446.
- Lee, S. B., Seo, S. M., Lim, Y. M., Cho, S. K., and Lee, Y. M. (2004). *Macromolecular Research*. **12**, 269–275.
- Makuuchi, K. (2010). *Radiation Physics and Chemistry*. **79**, 267–271.
- Misra, B. N., Kaur, I., and Sharma, R. K. (1981). *Polymer Bulletin*. **4**, 365–340.
- Moad, G. and Solomon, D. H. (2006). "The Chemistry of Radical Polymerization", Ed. Elsevier Ltd.
- Nagasawa, N., Mitomo, H., Yoshii, F., and Kume, T. (2000). *Polymer Degradation and Stability*. **69**, 279–285.
- Nizam El-Din, H. M., Abou Taleb, M. F., and El-Naggar, A. W. M. (2008). *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. **266**, 2607–2613.
- Paira, M., Mandal, S. K., and Roy, S. C. (2008). *Tetrahedron Letters*. **49**, 2432–2434.
- Patel, G. M., Patel, C. P., and Trivedi, H. C. (1999). *European Polymer Journal*. **35**, 201–208.
- Pawar, S. N. and Edgar, K. J. (2012). *Biomaterials*. **33**, 3279–3305.

- Recillas, M., Silva, L. L., Peniche, C., Goycoolea, F. M., Rinaudo, M., and Argüelles-Monal, W. M. (2009). *Biomacromolecules*. **10**, 1633–1641.
- Satti, A., Andreucetti, N., Ressia, J., Vallat, M. F., Sarmoria, C., and Vallés, E. M. (2008). *European Polymer Journal*. **44**, 1548–1555.
- Sen, G., Singh, R. P., and Pal, S. (2010). *Journal of Applied Polymer Science*. **115**, 63–71.
- Shah, S. B., Patel, C. P., and Trivedi, H. C. (1995). *Carbohydrate Polymers*. **26**, 61–67.
- Trivedi, J. H., Kalia, K., Patel, N. K., and Trivedi, H. C. (2005). *Carbohydrate Polymers*. **60**, 117–125.
- Tsitsilianis, C. (2007). *Macromolecular Engineering. Precise Synthesis, Materials Properties, Applications.*, K. Matyjaszewski, Y. Gnanou, & L. Leibler, edited by., pp. 839–873. WILEY-VCH Verlag GmbH.
- Vasile, C. and Nita, L. E. (2011). *Carbohydrate Polymers*. **86**, 77–84.
- Wang, L., Tu, K., Li, Y., Zhang, J., and Jiang, L. (2002). *Reactive & Functional Polymers*. **53**, 19–27.
- Wu, S., Jin, Z., Kim, J. M., Tong, Q., and Chen, H. (2009). *Carbohydrate Polymers*. **76**, 129–132.
- Yilmaz, E., Adali, T., Yilmaz, O., and Bengisu, M. (2007). *Reactive & Functional Polymers*. **67**, 10–18.

CAPÍTULO 3

**COPOLÍMEROS DE INJERTO
ALGINATO/N-ISOPROPILACRILAMIDA
OBTENIDOS POR REACCIÓN
QUÍMICA UTILIZANDO NITRATO DE
AMONIO CÉRICO**

3.1 Introducción

El nitrato de amonio cérico (CAN) fue descubierto como iniciador redox por Mino y Kaiserman en 1958, desde entonces ha sido ampliamente utilizado para la copolimerización de monómeros vinílicos sobre varios polímeros sintéticos y naturales (Shah y col., 1995; Patel y col., 1999; Trivedi y col., 2005; Yilmaz y col., 2007; Paira y col., 2008). El CAN se presenta como un iniciador que minimiza la reacción competitiva de homopolimerización durante la copolimerización, produciendo copolímeros sin entrecruzamiento de las cadenas laterales (Athawale y Lele, 1998).

En este capítulo se presenta la síntesis y caracterización de copolímeros de injerto de alginato y N-isopropilacrilamida utilizando CAN como iniciador de la reacción tanto en medio ácido como en medio acuoso.

3.2 Síntesis de copolímeros de alginato y N-isopropilacrilamida

3.2.1 Materiales

Para la síntesis se utilizó N-isopropilacrilamida (NIPAAm) provista por Aldrich y alginato de sodio marca Fluka. Como iniciador redox de la polimerización se empleó nitrato de amonio cérico ($\text{Ce}(\text{NO}_3)_6(\text{NH}_4)_2$, $\text{PM} = 548,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) provisto por Sigma-Aldrich y ácido nítrico (Cicarelli). El alginato de sodio, identificado como S000, se utilizó sin previa purificación. La caracterización por $^1\text{H-NMR}$ arrojó una relación M/G = 0,79; (44 % manuronato, 56 % guluronato), los cálculos realizados se presentan en el Anexo II.

La N-isopropilacrilamida fue purificada mediante recristalización en hexano. En un vaso de precipitado se colocaron 10 gramos de NIPAAm los cuales se disolvieron en 250 mL de hexano a 40 °C. Una vez disuelto y alcanzada la temperatura se lo retiró de la placa calefactora, dejando que la solución alcance los 30 °C, para colocarlo a 0 °C por 2 horas. El NIPAAm así recristalizado, se filtró con ayuda de vacío, empleando un kitasato conectado a una bomba de vacío. El filtrado se enjuagó con hexano frío y se dejó secar en vacío a temperatura ambiente. El NIPAAm recristalizado se almacenó a 4 °C y al abrigo de la luz.

3.2.2 Síntesis de copolímeros empleando CAN

Se realizaron reacciones químicas en solución acuosa de alginato de sodio y N-isopropilacrilamida a temperatura ambiente, utilizando nitrato de amonio cérico (CAN) como iniciador redox de la polimerización. Las reacciones de injerto se llevaron a cabo en condiciones similares a las reportadas por otros autores para sistemas similares. Entre ellos, Kim y col. (2000) y Recillas y col.(2009) publicaron el injerto de NIPAAm sobre quitosano mientras que Wang y col.(2002) reportó la copolimerización de dextrano con NIPAAm. Por otra parte, existe en la literatura un número importante de publicaciones en las cuales se describe la síntesis y caracterización de copolímeros de alginato y otros polisacáridos con monómeros acrílicos (Shah y col., 1995; Patel y col., 1999; Trivedi y col., 2005; Wu y col., 2009) utilizando CAN como iniciador de la reacción redox.

En las síntesis llevadas a cabo en esta tesis se siguieron dos rutas alternativas con el fin de optimizar las condiciones de reacción. La diferencia principal entre ellas es la utilización del iniciador CAN disuelto en ácido nítrico o disuelto en agua, tal como se describen a continuación.

Síntesis de copolímeros utilizando el sistema CAN/HNO₃: se preparó la solución de alginato de sodio colocando 1,5 g ($7,6 \cdot 10^{-3}$ moles de unidades repetitivas) en 150 mL de agua destilada y se homogeneizó con agitación mecánica durante 72 horas antes de llevar a cabo la reacción de copolimerización. Para llevar a cabo las reacciones se utilizó un reactor de dos bocas (Figura 3.1). Por una de las bocas se introdujo un burbujeador de nitrógeno en forma de pipeta de vidrio dentro del seno de la solución; en la otra boca, se colocó un acople de vidrio para regular el flujo de nitrógeno hacia el exterior, mediante un robinete, o un globo de látex que se mantuvo inflado todo el tiempo de reacción asegurando la atmósfera inerte dentro del sistema. Para esto fue importante emplear grasa para vacío en las bocas esmeriladas a fin de evitar pérdidas. La solución de alginato (~ 1 %m/v) fue colocada dentro del reactor y el aire del sistema se purgó manteniendo el burbujeo de una corriente de nitrógeno por al menos 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, se agregó la masa requerida de CAN (5 %m/m) disuelto en ácido nítrico 0,1 M. El agregado se realizó en alícuotas, agitando enérgicamente y de manera manual el balón con cada adición de iniciador. Se observó la formación de dos fases de diferente viscosidad y coloración, una fase con la solución de alginato y la otra correspondiente al iniciador agregado, en contacto con la solución

de alginato, de color amarillo intenso. Luego de 30 minutos de enérgico burbujeo con nitrógeno se adicionó un volumen preciso de una solución al 5 %m/v de NIPAAm, se agitó enérgicamente una vez más y se dejó reaccionar con agitación durante 4 horas. La primera media hora se mantuvo el burbujeo de nitrógeno y el tiempo restante se mantuvo el sistema en atmósfera inerte cerrando el robinete. Una vez transcurrido el tiempo de reacción estipulado se transvasó el contenido del balón a un vaso de precipitado de 1 litro, el copolímero se precipitó mediante el agregado de acetona y luego se filtró en vacío utilizando un kitasato y una bomba de agua. Posteriormente se realizaron varios lavados del copolímero obtenido con mezclas etanol/agua al 70, 80 y 90 % y un último lavado con etanol puro. El copolímero así obtenido se recuperó del papel de filtro y se dejó secar en un cristizador a temperatura ambiente bajo campana.

Una vez secos los copolímeros fueron sometidos a extracción Soxhlet utilizando metanol como solvente. El metanol solubiliza la NIPAAm no reaccionada así como el posible PNIPAAm que pueda haberse generado como reacción secundaria. El lavado de los copolímeros se realizó exhaustivamente durante varios días superándose las 48 horas de extracción mencionadas en la bibliografía (Patel y col., 1999; Trivedi y col., 2005). Transcurrido el tiempo de extracción, el copolímero se dejó secar nuevamente en un cristizador a temperatura ambiente bajo campana. Finalmente, para extraer el iniciador no reaccionado los copolímeros fueron disueltos en una solución de NaOH 0,1 M, lo cual requirió de 24 horas de agitación y el posterior agregado de NaCl en cantidad suficiente para obtener una concentración 1 M. El agregado de sal favoreció el intercambio iónico entre los iones Ce^{+4} y los iones Na^{+} . La solución obtenida se filtró en vacío para eliminar la parte insoluble, que presentaba una fuerte coloración anaranjada debido al iniciador. Luego el copolímero se precipitó con una solución acuosa de etanol al 70 % y el precipitado se filtró en vacío realizando reiterados lavados con etanol al 80, 90 y 100 %. Se obtuvo así un copolímero de color blanco el cual se secó en estufa de vacío a temperatura ambiente. Una vez secos, los copolímeros obtenidos presentaron diferentes coloraciones similares a la del alginato (amarillento pálido).



Figura 3.1. Reactor de vidrio de dos bocas donde se llevaron a cabo las reacciones de síntesis de copolímeros alginato-g-PNIPAAm empleando CAN/HNO₃.

En estas síntesis se varió las cantidades de iniciador y de alginato/NIPAAm para analizar el efecto de estas variables sobre la composición de los copolímeros obtenidos. En la Tabla 3.1 se resumen las condiciones de reacción para cada una de las síntesis realizadas y la nomenclatura empleada para estos copolímeros.

El medio ácido aportado por el ácido nítrico favorece la estabilidad de las especies Ce^{+4} y $[Ce(OH)_3]^{+3}$ a expensas de la especie $(Ce-O-Ce)^+$. Las especies Ce^{+4} y $[Ce(OH)_3]^{+3}$ al ser de menor tamaño son más efectivas para la formación de complejos con el alginato que la especie $(Ce-O-Ce)^+$, lo que conduce a mayores porcentajes de injerto. Sin embargo, aún en ausencia de ácido se alcanzan buenos valores de injerto en medio acuoso (Shah y col., 1995).

Dado que el alginato puede gelificar aún en ausencia de cationes, por gelación ácida como se mencionó en el Capítulo 1, esto fue el factor determinante de la heterogeneidad presente en el medio de reacción de la síntesis descrita. Por esta razón se decidió realizar la copolimerización sin utilizar ácido nítrico para disolver el CAN.

Tabla 3.1. Nomenclatura y composición de la mezclas de reacción empleada en la síntesis de copolímeros alginato/NIPAAm utilizando CAN en HNO₃ como iniciador

Copolímero	m (g)			n (moles)			% molar NIPAAm ^a	% molar CAN ^b
	Alginato	NIPAAm	CAN	Alginato	NIPAAm	CAN		
COPQ-12C-46N*	1,5593	0,7528	0,5314	7,88 10 ⁻³	6,66 10 ⁻³	9,7 10 ⁻⁴	46	12
COPQ-12C-64N*	1,5047	1,495	0,5424	7,60 10 ⁻³	1,32 10 ⁻²	9,9 10 ⁻⁴	64	12
COPQ-12C-76N*	1,5858	2,9292	0,5443	8,01 10 ⁻³	2,59 10 ⁻²	9,9 10 ⁻⁴	76	12
COPQ-12C-84N*	1,5233	4,5098	0,5251	7,69 10 ⁻³	3,99 10 ⁻²	9,6 10 ⁻⁴	84	12
ALGQ-12C-00N	1,501	----	0,50	7,58 10 ⁻³	----	9,1 10 ⁻⁴	----	12
COPQ-12C-47N	1,5035	0,76	0,51	7,59 10 ⁻³	6,73 10 ⁻³	9,3 10 ⁻⁴	47	12
COPQ-12C-78N	1,5023	3,01	0,50	7,59 10 ⁻³	2,66 10 ⁻²	9,1 10 ⁻⁴	78	12
COPQ-12C-64N	1,5024	1,50	0,50	7,59 10 ⁻³	1,33 10 ⁻²	9,1 10 ⁻⁴	64	12
COPQ-06C-64N	1,5056	1,50	0,25	7,60 10 ⁻³	1,33 10 ⁻²	4,6 10 ⁻⁴	64	6
COPQ-24C-64N	1,5029	1,50	1,00	7,59 10 ⁻³	1,33 10 ⁻²	1,8 10 ⁻³	64	24

^a % moles de unidades NIPAAm/moles de unidades monoméricas totales.

^b % moles de CAN/moles de unidades monoméricas de alginato.

Síntesis de copolímeros utilizando CAN/H₂O: Las reacciones se llevaron a cabo en el mismo reactor utilizado en las experiencias anteriores. Una solución conteniendo 1 g de alginato ($5,08 \cdot 10^{-3}$ moles de unidades repetitivas) preparada con 48 horas de anterioridad fue colocada dentro del reactor y luego de 10 minutos de purga con burbujeo de nitrógeno se agregaron 0,57 g de NIPAAm ($5,05 \cdot 10^{-3}$ moles) disueltos en un pequeño volumen de agua destilada. La solución acuosa de alginato/NIPAAm se burbujeó con nitrógeno por 10 minutos adicionales. La masa de CAN a utilizar se disolvió en agua destilada y se agregó a la mezcla de reacción en alícuotas, acompañada de una enérgica agitación manual del balón con cada porción de iniciador adicionado. El volumen total de reacción fue de 200 mL, lo que implicó una concentración de alginato de 0,5 %m/v. En este caso, la menor viscosidad de la mezcla de reacción debida a la menor concentración de alginato utilizada y la no formación del gel ácido, dio lugar a un medio de reacción menos heterogéneo que en el caso anterior pero igual se observó la presencia de dos fases al agregar el iniciador.

El tiempo de reacción empleado en este caso fue de 2 horas manteniendo el burbujeo de nitrógeno durante los primeros 30 minutos y asegurando una atmósfera inerte durante toda la reacción. El pH del medio fue medido antes del agregado del iniciador presentando un valor promedio de pH 5,5. Luego de 2 horas, si bien hubo una leve disminución del pH de la mezcla, no se produjo la gelación ácida del alginato. Dado que el cerio (IV) es un oxidante fuerte bajo condiciones ácidas pero es estable en

condiciones alcalinas (Muljadi, 2011), para finalizar la reacción se elevó el pH del medio hasta 8 con pequeños agregados de NaOH 0,1 M. Posteriormente se agregó NaCl en cantidad suficiente para alcanzar una concentración 1 M que permita generar el intercambio entre iones Ce^{+4} y Na^{+} a fin de remover los iones cerio que pudieran quedar minimizando su contenido en el copolímero. Se centrifugó la mezcla para precipitar la fase insoluble en suspensión y el sobrenadante se mantuvo a $\sim 5^{\circ}C$ para luego realizarse la filtración, precipitación y lavado del copolímero obtenido mediante agitación y agregado de pequeñas cantidades de mezclas etanol-agua (50, 60, 70, 80, 90 y 100 %), intercalando los agregados de solvente con períodos en frío y eliminación del sobrenadante. El copolímero lavado fue secado a temperatura ambiente bajo campana.

Las cantidades de iniciador se variaron hasta encontrar las mejores condiciones para la copolimerización. El contenido de iniciador en los materiales finales representa una desventaja importante dado que el cerio, como otros elementos pertenecientes a las tierras raras, tiene una moderada toxicidad. Debería realizarse una eliminación exhaustiva del metal si se pretende emplear estos copolímeros como biomateriales.

En la Tabla 3.2 se resume las condiciones de reacción para cada una de las síntesis realizadas y la nomenclatura utilizada para estos copolímeros.

Tabla 3.2. Nomenclatura y composición de la mezclas de reacción empleada en la síntesis de copolímeros alginato/NIPAAm utilizando CAN en H_2O como iniciador

Copolímero	m (g)			n (moles)			% molar NIPAAm ^a	% molar CAN ^b
	Alginato	NIPAAm	CAN	Alginato	NIPAAm	CAN		
COPQ-50N-01C	1,0005	0,5700	0,0275	$5,05 \cdot 10^{-3}$	$5,04 \cdot 10^{-3}$	$5,0 \cdot 10^{-5}$	50	1
COPQ-50N-02C	1,0067	0,5702	0,0550	$5,08 \cdot 10^{-3}$	$5,05 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-4}$	50	2
COPQ-50N-20C	1,0043	0,5704	0,5517	$5,07 \cdot 10^{-3}$	$5,05 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$	50	20

^a % moles de unidades NIPAAm/moles de unidades monoméricas totales.

^b % moles de CAN/moles de unidades monoméricas de alginato.

3.2.3 Nomenclatura y composición de la mezcla de reacción

La nomenclatura elegida pretende resumir las condiciones de reacción para cada uno de los copolímeros obtenidos. En las síntesis llevadas a cabo empleando CAN en HNO_3 , las cuatro letras iniciales COPQ indica que son copolímeros obtenidos a partir de una síntesis química, a continuación y separado mediante un guión, se nombra el contenido de iniciador utilizado expresado en moles de CAN por 100 moles de unidades repetitivas de alginato y finalmente separado por un segundo guión el porcentaje en

moles de NIPAAm en la solución con respecto al número de moles totales de unidades repetitivas. La excepción se presenta en el material ALGQ-12C-00N, que corresponde al alginato de sodio, el cual fue sometido a las condiciones de reacción sin el agregado de NIPAAm. Por lo tanto su nomenclatura hace referencia a un alginato que fue tratado químicamente con el agregado de un 12 % de CAN disuelto en ácido nítrico.

Las cuatro primeras muestras de la Tabla 3.1 tienen además un asterisco para diferenciarlas del resto ya que fueron sintetizadas previamente en PLAPIQUI por la Química Luisa L.F. Silva Gutierrez en una estadía de investigación en el marco de convenio de cooperación bilateral con CONACyT (México).

La nomenclatura empleada para los copolímeros sintetizados empleando CAN en H₂O (Tabla 3.2), indica copolímeros obtenidos por síntesis química, seguida de su composición porcentual de NIPAAm y luego en CAN.

3.3 Caracterización de los copolímeros

3.3.1 Caracterización por Espectroscopía Infrarroja (FTIR)

Los espectros infrarrojos (FTIR) se registraron en un espectrofotómetro Nicolet 520 por la acumulación de 30 barridos, con una resolución de 4 cm⁻¹. Las muestras fueron preparadas en pastillas de KBr con una concentración de polímero al 1 % m/m a excepción del alginato y los copolímeros COPQ-50N-XXC que permitieron la formación de films por el método de evaporación del solvente (casting).

En la Figura 3.2 se presentan los espectros FTIR de los copolímeros obtenidos previamente en nuestro laboratorio, empleando un 12 % CAB y con cantidades crecientes de NIPAAm en la mezcla de reacción (46, 64, 76 y 84 %, copolímeros COPQ-12C-46N*, COPQ-12C-64N*, COPQ-12C-76N* y COPQ-12C-84N*). A modo de comparación se presentan en la misma figura un espectro del alginato (S000) y de un PNIPAAm (obtenido a partir de la irradiación con 10 kGy de una solución acuosa al 5 % de NIPAAm). Los espectros se encuentran desplazados en el eje de las abscisas para poder visualizar más fácilmente entre las señales de cada polímero.

El alginato empleado para la síntesis de copolímeros presenta una banda ancha a 3400 cm⁻¹ característica de los grupos oxhidrilos (ν_{O-H}); a 2928 cm⁻¹ aparece la vibración de los enlaces C-H presentes en el anillo (ν_{C-H}) y en 1613 y 1413 cm⁻¹ se observan dos fuertes señales atribuidas al estiramiento asimétrico y simétrico de los

grupos carboxílicos ($\nu^{\text{as}}_{\text{COO}}$; $\nu^{\text{s}}_{\text{COO}}$), respectivamente. En el rango de longitudes de ondas comprendido entre 1030 y $\sim 1170 \text{ cm}^{-1}$ se observan las señales correspondientes a las vibraciones simétricas y asimétricas de los enlaces C-O-C ($\nu_{\text{C-O-C}}$; $\nu^{\text{as}}_{\text{C-O-C}}$) propias de los anillos de polisacáridos. A 1320 cm^{-1} aparece una banda débil de la vibración del enlace C-O ($\nu_{\text{C-O}}$) (Lawrie y col., 2007; Yang y col., 2009; Sen y col., 2010). Para el PNIPAAm obtenido por irradiación las bandas a 2973 cm^{-1} y 2876 cm^{-1} corresponden a las vibraciones simétricas y asimétricas de los grupos metilos (ν_{CH_3} ; $\nu^{\text{as}}_{\text{CH}_3}$), respectivamente. La banda a 2925 cm^{-1} aparece debido a la vibración de los enlaces C-H ($\nu_{\text{C-H}}$). La banda típica amida I ($\nu_{\text{C=O}}$) se presenta a 1650 cm^{-1} y la amida II ($\delta_{\text{N-H}}$) a 1547 cm^{-1} . Las bandas de deformación asimétrica y simétrica de los grupos geminales se observan como una señal media a 1457 cm^{-1} ($\delta^{\text{as}}_{\text{CH}_3}$) y un doble pico a 1388 y 1368 cm^{-1} ($\delta^{\text{s}}_{\text{CH}_3}$) (Lee y col., 2006; Zhao y col., 2008). Las amidas presentan la vibración de carbonilo ($\nu_{\text{C=O}}$) a frecuencias notablemente más bajas que el resto de los grupos con este tipo de enlaces (1630 cm^{-1} ; comparado con $1740\text{-}1660 \text{ cm}^{-1}$) debido al efecto mesomérico (+M) del nitrógeno (capaz de ceder sus electrones) lo cual produce una disminución notable de la frecuencia de las bandas carbonílicas. La fuerte asociación por enlaces de hidrogeno presentes en estado sólido puede hacer disminuir aún más la frecuencia de estas vibraciones.

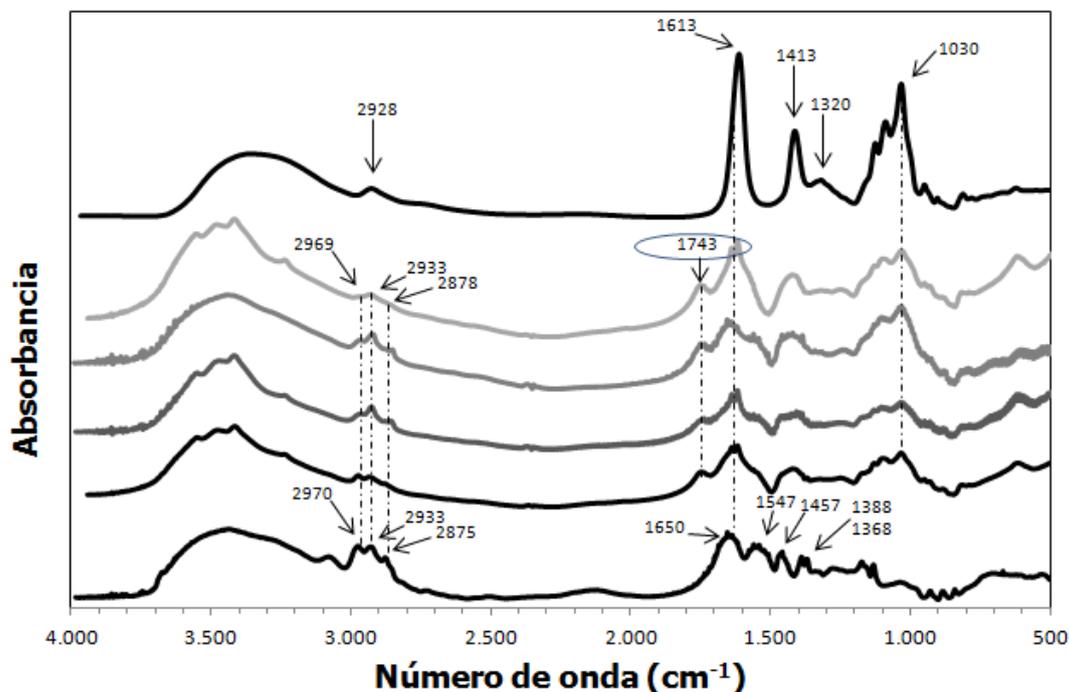


Figura 3.2. Espectros FTIR correspondientes a alginato (superior), PNIPAAm (inferior) y los copolímeros (en el centro de arriba a abajo): COPQ-12C-46N* (gris claro, superior); COPQ-12C-64N*(gris, medio superior), COPQ-12C-76N*(gris oscuro, medio inferior) y COPQ-12C-84N* (negro, inferior).

Los espectros de los copolímeros presentan bandas características de los dos homopolímeros con intensidades propias de su composición (Figura 3.2). Las bandas a 2970 cm^{-1} y 2875 cm^{-1} corresponden a las vibraciones simétricas y asimétricas de los grupos metilos ($\nu^s_{\text{CH}_3}$; $\nu^{\text{as}}_{\text{CH}_3}$) del PNIPAAm así como la banda a 2933 cm^{-1} debido a la vibración de los enlaces C-H ($\nu_{\text{C-H}}$) presente en el espectro del PNIPAAm y en el alginato. La señal a 1651 cm^{-1} abarca las vibraciones de los enlaces C=O ($\nu_{\text{C=O}}$) de los grupos carbonilos tanto pertenecientes al alginato como al PNIPAAm. El pico amida II ($\delta_{\text{N-H}}$) en los copolímeros no se observa como un pico definido, como en el PNIPAAm a 1547 cm^{-1} , sino que se presenta como un hombro del pico a 1650 cm^{-1} correspondiente a los carbonilos. En el rango de longitudes de ondas comprendido entre ~ 1030 y $\sim 1170\text{ cm}^{-1}$ se observan las señales correspondientes a las vibraciones simétricas y asimétricas de los enlaces C-O-C ($\nu_{\text{C-O-C}}$; $\nu^{\text{as}}_{\text{C-O-C}}$) propias de los anillos del alginato, tal como se había mencionado previamente. La señal a 1413 cm^{-1} asociada al estiramiento simétrico de los grupos carboxílicos ($\nu^s_{\text{COO-}}$) del alginato sufre una deformación importante, quedando como una señal poco definida en el COPQ-12C-67N*.

Es importante remarcar la aparición de un nuevo pico a 1740 cm^{-1} , aparentemente ausente en los polímeros de partida; correspondiente a vibraciones de carbonilos, probablemente de aldehídos obtenidos por apertura de los anillos del alginato según el mecanismo propuesto en 2.2.1, o bien, al desdoblamiento de la señal de los carbonilos de los grupos carboxílicos en el alginato y el carbonilo de la amida en el PNIPAAm. Los aldehídos tienen otras bandas características del enlace C-H aldehídico las cuales no fueron observadas en los espectros de la Figura 3.2 por lo que no puede confirmarse su presencia.

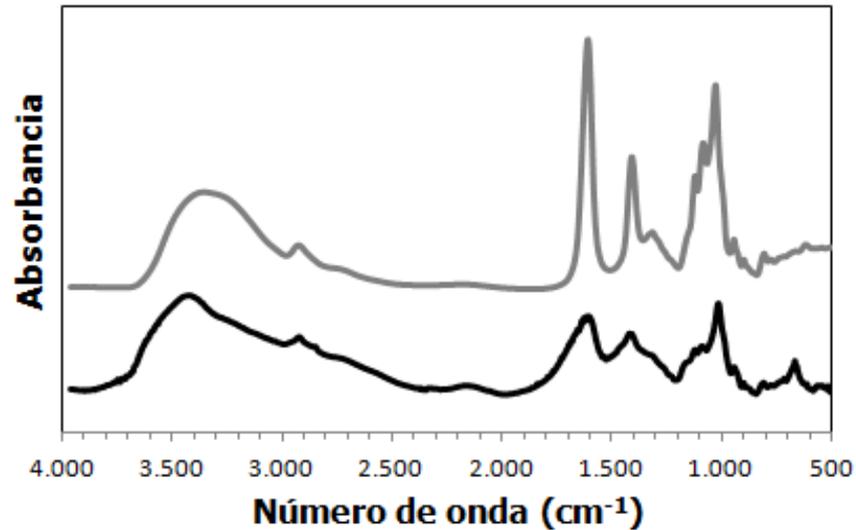


Figura 3.3. Espectros FTIR del alginato original (S000, superior) y el alginato sometido a las condiciones de reacción (ALGQ-12C-00N, inferior).

En la Figura 3.3 se presentan los espectros del alginato original (S000) y del alginato sometido a las condiciones de reacción en ausencia de NIPAAm (ALGQ-12C-00N) con el objeto de analizar el efecto del CAN sobre el alginato. Los espectros de ambos alginatos son muy similares entre sí y la ausencia de una señal a 1740 cm⁻¹ descarta la posibilidad de la apertura del anillo y la formación de grupos aldehído.

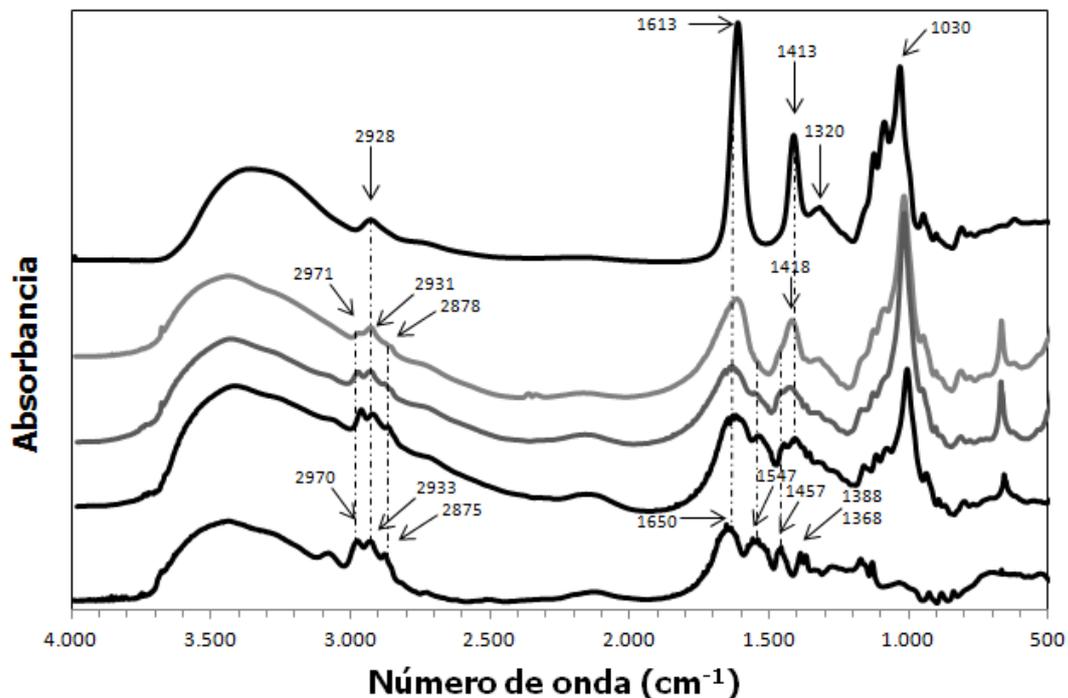


Figura 3.4. Espectros FTIR correspondiente a alginato (superior), PNIPAAm (inferior) y los copolímeros (en el centro de arriba a abajo): COPQ-12C-47N (gris claro, superior); COPQ-12C-78N (gris oscuro, medio) y COPQ-12C-64N (negro, inferior).

En la figura 3.4 se presentan los espectros de los copolímeros sintetizados en esta tesis con las mismas condiciones de reacción que los copolímeros sintetizados previamente en PLAPIQUI. La presentación de los espectros de manera desplazada permite la identificación de las señales dentro del copolímero aportadas por ambos homopolímeros. En estos copolímeros es posible observar las vibraciones simétricas y asimétricas de los enlaces C-O-C (ν_{C-O-C} ; ν^{as}_{C-O-C}) propias de los anillos algínicos en el rango de números de onda entre 1030 y 1170 cm^{-1} , así como la señal a 1413 cm^{-1} asociada al estiramiento simétrico de los grupos carboxílicos (ν^s_{COO-}) confirmando el contenido de alginato. Por otra parte, el contenido de PNIPAAm se observa en las señales que surgen a 2969 y 2878 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones de los grupos metilos. Al observar los espectros de los copolímeros en sentido descendente se hace evidente el marcado crecimiento de la señal alrededor de 1547 cm^{-1} correspondiente al pico de amida II (δ_{N-H}). El orden de los espectros presentados en la Figura 3.4 se eligió en función de la intensidad de esta señal, aún cuando no corresponde al orden respecto al contenido de NIPAAm en la mezcla de reacción inicial.

En la Tabla 3.3 se presenta la relación de alturas entre las señales de los copolímeros a 2969 cm^{-1} , correspondiente a la vibración simétrica de los grupos metilos presentes sólo en el PNIPAAm ($\nu^s_{CH_3}$), y a 1418 cm^{-1} correspondiente a la vibración simétrica de los grupos carboxílicos del alginato. Las relaciones obtenidas permiten estimar la composición de cada copolímero.

Tabla 3.3- Relación de alturas de señales características NIPAAm/alginato para los copolímeros sintetizados con 12 % de CAN en HNO_3

Copolímero	$A_{(\nu_{CH_3})} (2969 \text{ cm}^{-1})$	$A_{(\nu_{COO-})} (1413 \text{ cm}^{-1})$	$A_{(2970 \text{ cm}^{-1})} / A_{(1414 \text{ cm}^{-1})}$
COPQ-12C-47N	0,352	0,375	0,94
COPQ-12C-64N	0,083	0,061	1,36
COPQ-12C-78N	0,051	0,040	1,28

Los resultados obtenidos indican un mayor contenido de PNIPAAm respecto al contenido de alginato en el copolímero COPQ-12C-64N respecto al COPQ-12C-78N lo cual se condice con los resultados obtenidos por TGA de la próxima sección.

De acuerdo con los valores obtenidos, para una concentración de 12 % de CAN existiría un límite en la incorporación de NIPAAm tal que el agregado de un 78 % de NIPAAm no representa un aumento respecto a la concentración del 64 %.

Comparando los espectros FTIR de los copolímeros sintetizados en esta tesis respecto a los obtenidos previamente en PLAPIQUI, es posible destacar la ausencia del pico a 1740 cm^{-1} observado previamente. La diferencia puede atribuirse a C=O de carbonilos provenientes probablemente a una oxidación parcial de los primeros copolímeros ensayados.

Los espectros FTIR correspondientes a los copolímeros sintetizados empleando distintas cantidades de CAN en medio ácido, manteniendo fija la concentración de alginato y NIPAAm en la mezcla de reacción se presentan en la Figura 3.5. Los tres copolímeros sintetizados presentan las bandas características del alginato, a 1413 cm^{-1} y en el rango $1170\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$ ($\nu^s_{\text{C-O-C}}$; $\nu^{\text{as}}_{\text{C-O-C}}$) así como las del PNIPAAm a 2969 cm^{-1} ($\nu^s_{\text{CH}_3}$) y menos notorias a 2878 cm^{-1} ($\nu^{\text{as}}_{\text{CH}_3}$) y 1550 cm^{-1} ($\delta_{\text{N-H}}$). En el espectro del COPQ-12C-64N, la señal de amida II ($\delta_{\text{N-H}}$) a 1550 cm^{-1} se presenta como un pico identificable aunque superpuesto a la banda del carbonilo en $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$, mientras que para el COPQ-24C-64N dicha señal aparece como un hombro de la señal del carbonilo, siendo casi imperceptible en el COPQ-06C-64N (copolímero obtenido con la menor concentración de iniciador).

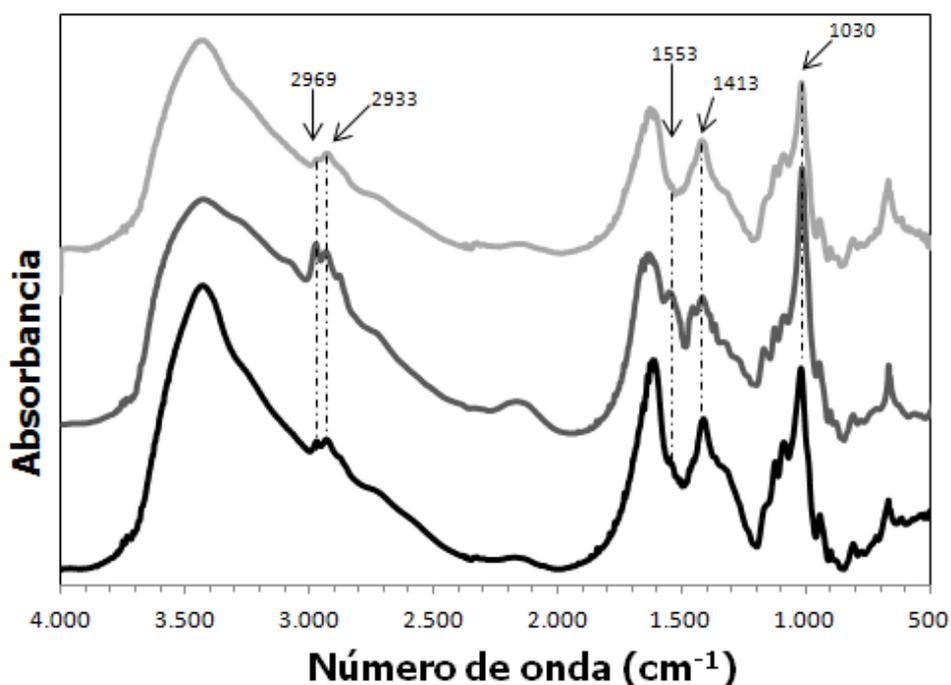


Figura 3.5. Espectros FTIR de los copolímeros COPQ-06C-64N (gris claro, superior); COPQ-12C-64N (gris oscuro, medio) y COPQ-24C-64N (negro, inferior).

Un incremento de 6 % a 12 % de iniciador CAN produce un aumento del injerto de NIPAAm., debido a una mayor cantidad de sitios activos producidos por el iniciador.

Sin embargo, un posterior aumento a 24 % de CAN produce una disminución del injerto obtenido respecto al 12 %. Este comportamiento podría ser debido a la mayor heterogeneidad en el medio de reacción. Dado que el CAN se incorpora en medio ácido, mayores cantidades de CAN producen una mayor gelificación del alginato cuando se transforma en ácido algínico. La gelificación limita la movilidad del NIPAAm en la solución disminuyendo su disponibilidad en el entorno de los sitios activos y por consiguiente el grado de injerto logrado. Además es posible que la generación de un mayor número de radicales formados por el mayor contenido de CAN favorezca la homopolimerización del NIPAAm en lugar del injerto (Shah y col., 1995).

Tabla 3.4. Relación de alturas de señales características NIPAAm/alginato para los copolímeros sintetizados con igual composición de NIPAAm en la mezcla de reacción y cantidades crecientes de CAN en HNO₃.

Copolímero	A _(ν CH₃) (2969 cm ⁻¹)	A _(ν COO⁻) (1413 cm ⁻¹)	A _(2970 cm⁻¹) / A _(1414 cm⁻¹)
COPQ-06C-64N	0,0315	0,0375	0,84
COPQ-12C-64N	0,083	0,061	1,36
COPQ-24C-64N	0,061	0,072	0,85

Finalmente, en la Figura 3.6 se presentan los espectros FTIR de los copolímeros obtenidos en solución acuosa sin el agregado de ácido nítrico con distintos contenidos de iniciador utilizando una misma composición alginato/NIPAAm. Las cantidades de iniciador empleadas se eligieron con el objetivo de maximizar el grado de injerto minimizando la cantidad de CAN adicionado. Para una mejor comparación entre espectros se presentan, además, los espectros del alginato y PNIPAAm. Los espectros correspondientes a los copolímeros sintetizados empleando las menores cantidades de CAN en medio acuoso, COPQ-50N-01C y COPQ-50N-02C son semejantes al obtenido para el alginato de sodio puro y no presentan las señales características del PNIPAAm en la estructura lo cual hace suponer que el grado de injerto fue muy bajo. El espectro del copolímero obtenido a partir de un 20 % CAN es el único que confirma la presencia de PNIPAAm en el material, a partir de las señales a 2969 cm⁻¹ (ν^s_{CH₃}) y el hombro de la señal a 1547 cm⁻¹ (δ_{N-H}). La relación de alturas de picos A_(2969cm⁻¹)/ A_(1413cm⁻¹) = 0,207/0,422 para este copolímero es igual a 0,49 lo cual representa un menor grado de injerto que los obtenidos en los copolímeros sintetizados en medio ácido.

En los copolímeros sintetizados en medio acuoso, el ión cerio presentaría una menor efectividad para la formación de complejos por la falta del medio ácido, dando como resultado una menor eficiencia como iniciador y por consiguiente un menor grado de injerto.

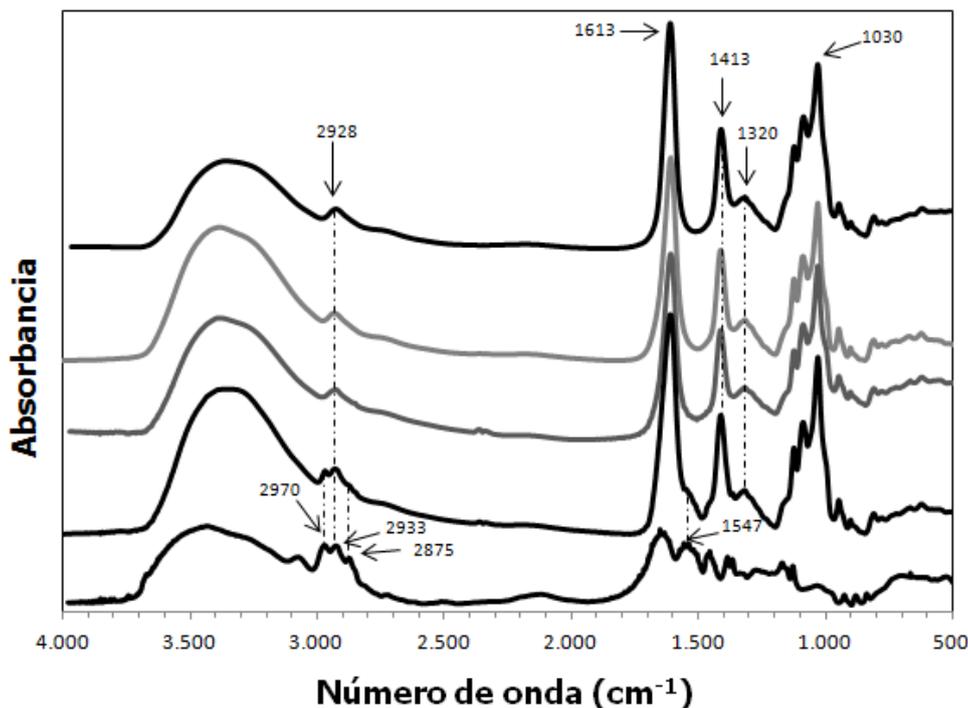


Figura 3.6. Espectros FTIR correspondientes a alginato (superior), PNIPAAm (inferior) y los copolímeros (espectros centrales de arriba a abajo): COPQ-50N-01C (gris claro, superior); COPQ-50N-02C (gris oscuro, medio) y COPQ-50N-20C (negro, inferior).

3.3.2 Caracterización térmica empleando análisis termogravimétrico (TGA).

La caracterización térmica es una herramienta importante para conocer la estabilidad de las muestras frente al aumento de la temperatura; además es posible estimar la composición de los materiales cuando los componentes presentan temperaturas de degradación marcadamente distintas entre sí.

Los ensayos de los materiales COPQ-CAN-NIPAAm fueron realizados en un analizador termogravimétrico TGS-2 Perkin Elmer disponible en las instalaciones de PLAPIQUI, mientras que los copolímeros COPQ-NIPAAm-CAN se ensayaron en una balanza termogravimétrica Rigaku Thermoflex TG 8110 del Laboratorio Instrumental de Uso Compartido (LIUC) del Departamento de Química de la UNS. Para cada

material se registró la variación de masa en el rango de 30 a 700 °C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min bajo atmósfera de nitrógeno (40 mL/min).

En la Figura 3.7 se presentan los termogramas registrados para el alginato (S000) y el PNIPAAm sintetizado por irradiación (10 kGy); ambos polímeros presentan una caída inicial hasta alcanzar aproximadamente 150°C correspondiente a su deshidratación. Para el alginato en el rango de temperatura entre 200 y 300 °C (aproximadamente a 249 °C) se produce una importante caída (45 % de su masa), a causa del inicio de su degradación térmica presentando una segunda pérdida de masa alrededor de los 550 °C (15 %), obteniéndose un residuo mayor a un 20 % de la masa inicial. Por su parte el PNIPAAm presenta una única pérdida de masa al alcanzar los 408 °C que representa prácticamente la pérdida de la totalidad de la masa, observándose un residuo inferior a un 2,5 % de la masa inicial.

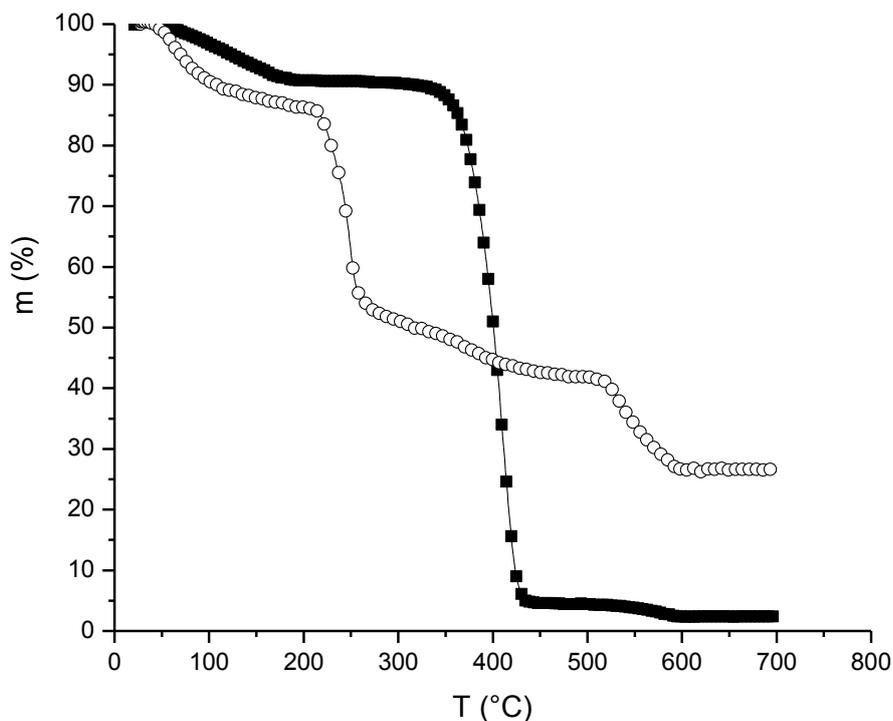


Figura 3.7. Cambios en la masa en función de la temperatura para los homopolímeros. Símbolos: (○) alginato original y (■) PNIPAAm.

Al comparar los termogramas del alginato y el alginato ALGQ-12C-00N (Figura 3.8) se observa que no hay un cambio significativo en el comportamiento térmico del alginato tratado en las condiciones de reacción, ALGQ-12C-00N, el cual presenta las dos degradaciones típicas, la primera en el rango de temperaturas entre 200 y 300 °C y

la segunda a una temperatura algo inferior que en el alginato de sodio puro, alrededor de los 430 °C.

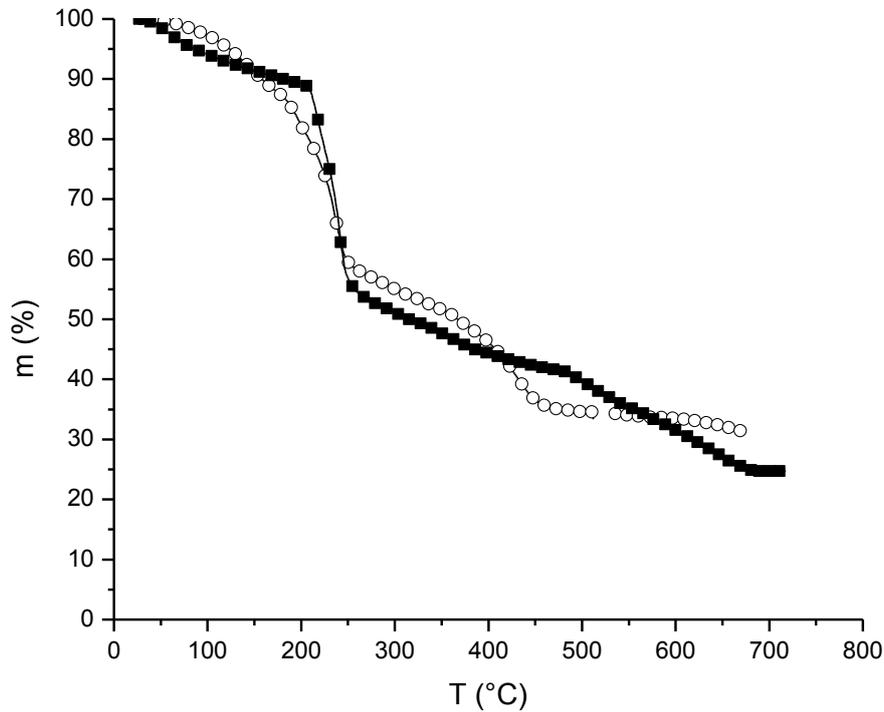


Figura 3.8. Cambios en la masa en función de la temperatura para el alginato. Símbolos: (■) alginato oral, S000 y (○) alginato ALGQ-12C-00N.

En la Figura 3.9 se presentan los termogramas de los copolímeros sintetizados con CAN en HNO₃ obtenidos previamente en PLAPIQUI (COPQ-12C-46N*, COPQ-12C-64N*, COPQ-12C-76N* y COPQ-12C-84N*). En las cuatro curvas de esta figura se observa una degradación escalonada, que puede explicarse como la sucesión de tres etapas. La primera, corresponde a la deshidratación de las muestras y se extiende hasta los 150 °C; la segunda pérdida de masa corresponde a la degradación del alginato en el rango entre 200 y 300 °C y la tercera etapa corresponde a una pérdida de masa alrededor de los 350 °C asociada a la degradación del PNIPAAm. La pérdida de masa en cada una de las dos etapas posteriores a la deshidratación de las muestras está asociada a la composición relativa del alginato y PNIPAAm en el copolímero.

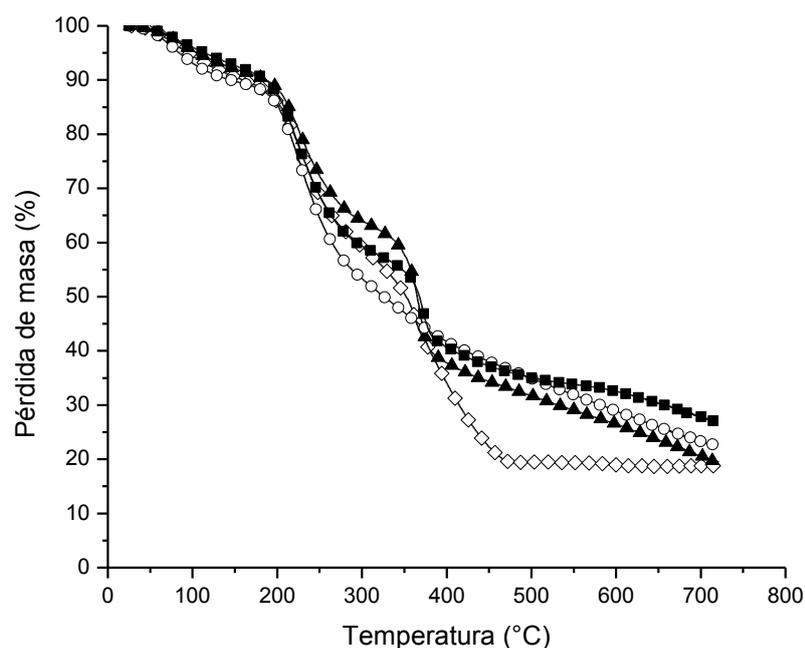


Figura 3.9. Cambios en la masa en función de la temperatura para copolímeros sintetizados previamente en PLAPIQUI con CAN en HNO₃.
 Símbolos: (○) COPQ-12C-46N*, (◇) COPQ-12C-64N*, (▲) COPQ-12C-76N* y (■) COPQ-12C-84N*

A partir de los termogramas e integrando la derivada primera de los mismos es posible obtener la masa asociada a cada degradación y a partir de ésta la composición estimada de los copolímeros (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Composición de los copolímeros COPQ-CAN-NIPAAm* calculada a partir de TGA

Muestra	Área alginato	Área PNIPAAm	Residuo a 650°C	Masa total	Moles alginato	Moles PNIPAAm	% molar NIPAAm
COPQ-12C-46N*	28,28	5,7	26,03	60,01	0,274	0,050	15,4
COPQ-12C-64N*	17,11	21,69	18,71	57,51	0,181	0,192	51,5
COPQ-12C-76N*	19,43	20,62	23,55	63,6	0,217	0,183	45,7
COPQ-12C-84N*	25,55	14,52	30,29	70,36	0,2820	0,129	31,3

En general, era de esperar que con una mayor concentración inicial de monómeros NIPAAm en la mezcla de reacción, se produjera una mayor incorporación de PNIPAAm en el copolímero. Sin embargo, de acuerdo a los cálculos se observa que el mayor injerto se obtuvo con un 64 % de NIPAAm en la mezcla de reacción. Por este motivo, en esta tesis se realizaron duplicados de las síntesis originales obteniéndose resultados similares a los resultados previos. En la Figura 3.10 se presentan las curvas

de masa en función de la temperatura para los copolímeros sintetizados en esta tesis empleando 12 % CAN en HNO₃ (COPQ-12C-47N, COPQ-12C-64N y COPQ-12C-78N). Los resultados obtenidos permitirían inferir que existe un máximo en el grado de injerto en función de la concentración de NIPAAm en la mezcla de reacción para el contenido de CAN estudiado (12 %) lo cual está en acuerdo con lo reportado por otros autores para sistemas similares (Shah y col. (1995)). En la Tabla 3.6 se presentan los valores obtenidos de composición a partir de la integración de la derivada primera de los termogramas de la Figura 3.10.

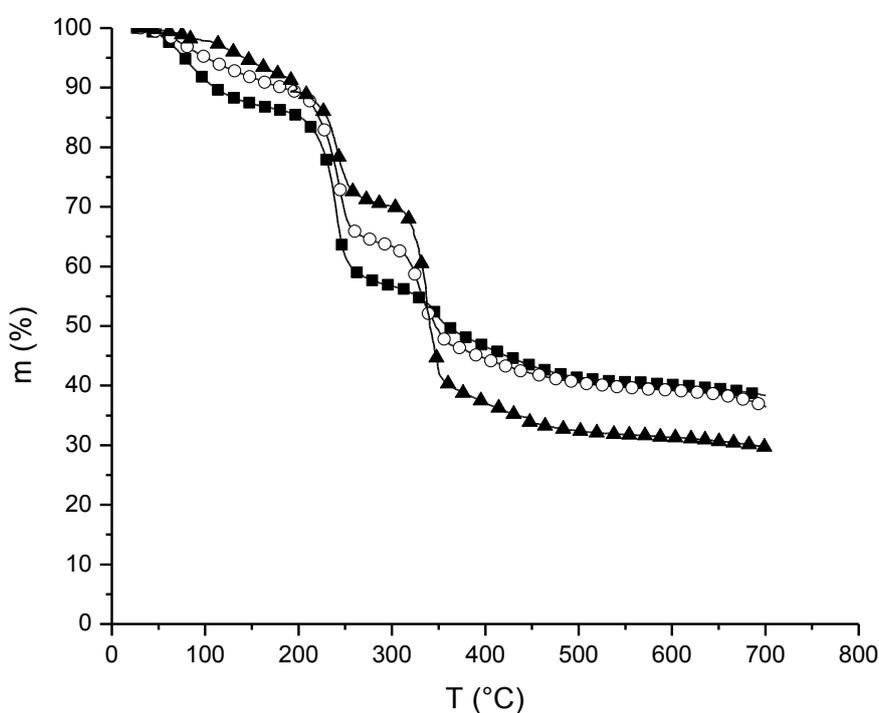


Figura 3.10. Cambios en la masa en función de la temperatura para copolímeros sintetizados con CAN en HNO₃.

Símbolos: (■) COPQ-12C-47N, (▲) COPQ-12C-64N y (○) COPQ-12C-78N

Tabla 3.6- Composición de los copolímeros COPQ-CAN-NIPAAm sintetizados empleando cantidades variables de NIPAAm en HNO₃ calculada a partir de TGA.

Copolímero	Área alginato	Área PNIPAAm	Residuo a 650°C	Masa total	Moles alginato	Moles PNIPAAm	% molar NIPAAm
COPQ-12C-47N	26,02	9,25	39,46	74,73	0,331	0,082	19,8
COPQ-12C-64N	17,04	27,05	30,67	74,76	0,241	0,239	49,8
COPQ-12C-78N	23,12	16,22	38,5	77,84	0,311	0,144	31,6

La composición de los copolímeros obtenida por TGA está de acuerdo con la relación de picos característicos obtenida por FTIR. Ambas técnicas indican un comportamiento similar para los copolímeros sintetizados obteniéndose el mayor grado de injerto con un 64 % molar de NIPAAm en la composición de la mezcla inicial de reacción. Un aumento en el contenido de NIPAAm en la mezcla inicial de reacción por encima del 64 % favorecería la reacción de homopolimerización (PNIPAAm), compitiendo por los monómeros NIPAAm disponible para el injerto. Resultados similares fueron reportados por Shah y col. (1995) en la copolimerización de metilmetacrilato sobre alginato. En este trabajo los autores observaron un crecimiento inicial del grado de injerto al aumentar la concentración de metilmetacrilato. Sin embargo, por encima de un valor óptimo, el agregado de mayores concentraciones de metilmetacrilato no produjo un incremento en el grado de injerto. Estos resultados fueron explicados en base a que una mayor formación de macroradicales de metilmetacrilato, los cuales presentan una mayor velocidad de combinación y desproporción que su velocidad de combinación con los sitios reactivos de las cadenas del alginato, conducirían a la formación de homopolímero.

En la Figura 3.11 se presentan los termogramas de los copolímeros obtenidos a partir de una misma composición alginato/NIPAAm y distintas cantidades de CAN en medio ácido. El comportamiento observado en los termogramas tanto como las composiciones obtenidas (Tabla 3.7) corroboran los resultados de FTIR: al duplicar el porcentaje de CAN de 6 % a 12 % se incrementa notablemente el injerto del PNIPAAm pero luego disminuye cuando el CAN se incrementa a 24 %.

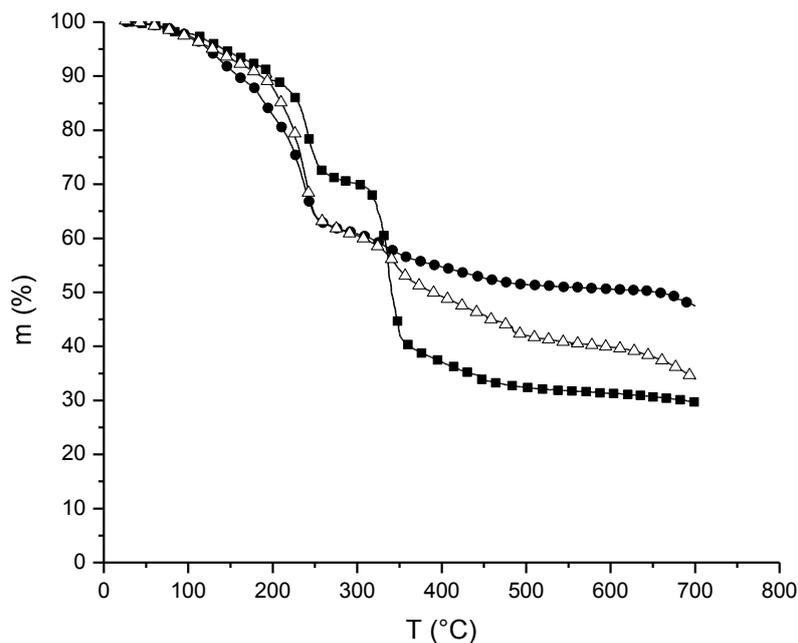


Figura 3.11. Cambios en la masa en función de la temperatura para copolímeros sintetizados con igual composición de alginato/NIPAAm y diferentes contenidos de CAN en HNO₃.
 Símbolos: (●) COPQ-06C-64N, (■) COPQ-12C-64N y (△) COPQ-24C-64N

Tabla 3.7. Composición calculada de los copolímeros COP-CAN-NIPAAm sintetizados empleando cantidades variables de CAN en HNO₃ a partir de TGA.

Copolímero	Área alginato	Área PNIPAAm	Residuo a 650°C	Masa total	Moles alginato	Moles PNIPAAm	% molar NIPAAm
COPQ-06C-64N	17,78	3,47	50,1	71,35	0,343	0,031	8,2
COPQ-12C-64N	17,04	27,05	30,67	74,76	0,241	0,239	49,8
COPQ-24C-64N	24,90	6,66	38,05	69,61	0,318	0,059	15,6

Finalmente, la Figura 3.12 presenta los termogramas de los copolímeros sintetizados en medio acuoso sin la utilización de ácido nítrico (COPQ-50N-01C y COPQ-50N-02C y COPQ-50N-20C), comparados con el alginato original S000. El comportamiento frente a la temperatura de los copolímeros COPQ-50N-01C y COPQ-50N-02C es semejante al del alginato, indicando que el contenido de NIPAAm en el copolímero sería prácticamente nulo corroborando los resultados obtenidos por FTIR. El termograma del COPQ-50N-20C presenta las degradaciones correspondientes a un copolímero de alginato y PNIPAAm, presentando la degradación correspondiente al PNIPAAm a una temperatura de 349,9 °C. El contenido de NIPAAm en COPQ-50N-20C obtenido por TGA fue de un 18,9 %, valor similar a los obtenidos para los

copolímeros COPQ-12C-46N* y COPQ-12C-47N, de 15,4 y 19,8 % NIPAAm respectivamente. Dada la similitud en la composición de NIPAAm en la mezcla de reacción inicial para los tres copolímeros, resulta evidente que un medio ácido proporciona una mayor efectividad del ión cerio en la reacción de injerto.

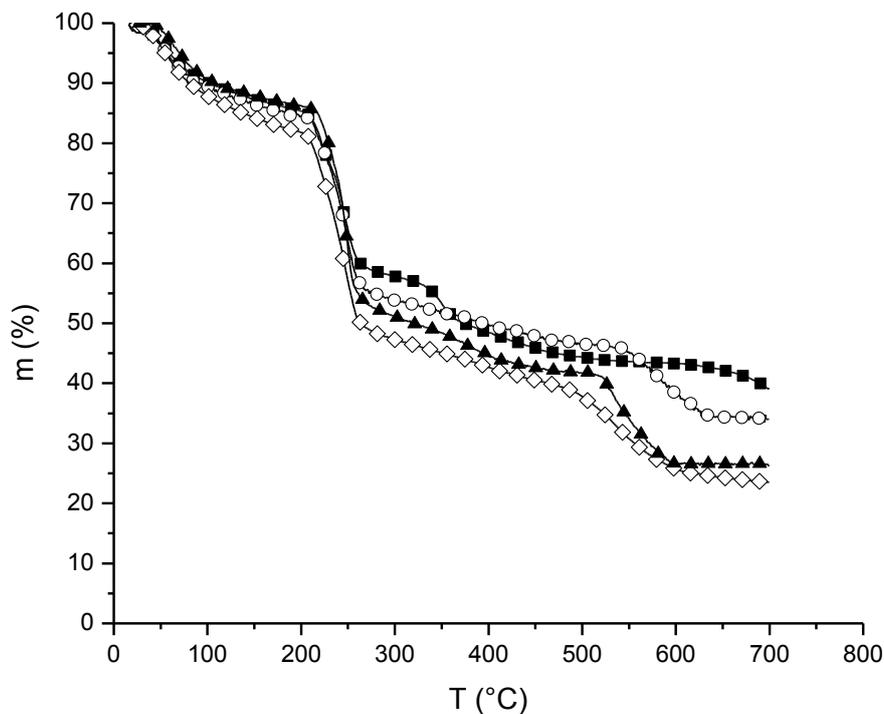


Figura 3.12. Cambios en la masa en función de la temperatura para copolímeros sintetizados con igual composición de alginato/NIPAAm y diferentes contenidos de CAN en H₂O. Símbolos: (▲) alginato inicial, S000, (◇) COPQ-50N-01C, (○) COPQ-50N-02C y (■)COPQ-50N-20C

Tabla 3.8- Composición calculada de los copolímeros COPQ-NIPAAm-CAN sintetizados empleando cantidades variables de CAN en medio acuoso a partir de TGA.

Muestra	Área alginato	Área PNIPAA	Residuo a 650°C	Masa total	Moles alginato	Moles PNIPAA	% molar NIPAA
Alginato S000	30,71	0	26,60	57,31	0,289	0	0
COPQ-50N-01C	30,41	0	24,25	54,66	0,276	0	n/d
COPQ-50N-02C	26,33	0	34,42	60,75	0,307	0	n/d
COPQ-50N-20C	27,18	9,2	42,19	78,57	0,350	0,081	18,9

3.4 Conclusiones

Se obtuvieron copolímeros de injerto de NIPAAm y alginato de sodio empleando nitrato de amonio cérico (CAN), en medio ácido y en medio acuoso.

En el caso de injerto de NIPAAm sobre alginato empleando un medio ácido, método ampliamente reportado en la literatura para el injerto de diversos monómeros sobre distintos polímeros, el CAN es más efectivo, pero el sistema es heterogéneo a pesar de la agitación y la síntesis transcurre en un medio altamente viscoso lo cual afecta el grado de injerto obtenido. En estas condiciones, el injerto de PNIPAAm aumenta hasta un cierto valor máximo y luego disminuye aún agregando mayores concentraciones de NIPAAm en el medio de reacción.

En medio acuoso, el sistema resultó menos viscoso y por consiguiente más homogéneo, pero se requieren mayores concentraciones de iniciador CAN para lograr el mismo grado de injerto obtenido en medio ácido.

Por otra parte, en ambos casos se requiere, luego de la reacción, un lavado exhaustivo del copolímero para remover la NIPAAm no reaccionada, el PNIPAAm homopolímero formado y los restos de iniciador empleado.

La baja solubilidad de todos los copolímeros sintetizados por este método, impidió la obtención de espectros de resonancia magnética nuclear de protón en agua deuterada. Esto es coincidente con los resultados reportados por Wu y col. (2009) en síntesis de copolímeros de pululano con metilacrilato, empleando CAN en medio ácido.

Los copolímeros sintetizados en esta tesis, empleando CAN como iniciador de las reacciones de injerto, no fueron adecuados para la formación de hidrogeles con la capacidad de hincharse en un medio acuoso, tal como la solución fisiológica (NaCl 0,9 % m/v), por tal motivo estos copolímeros no fueron empleados en los ensayos de hinchamiento o liberación de principios activos (Capítulo 6).

3.5 Referencias

- Kim, S. Y., Cho, S. M., Lee, Y. M., and Kim, S. J. (2000). *Journal of Applied Polymer Science*. **78**, 1381–1391.
- Lawrie, G., Keen, I., Drew, B., Chandler-temple, A., Rintoul, L., Fredericks, P., and Grøndahl, L. (2007). *Biomacromolecules*. **8**, 2533–2541.
- Lee, S. B., Park, E. K., Lim, Y. M., Cho, S. K., Kim, S. Y., Lee, Y. M., and Nho, Y. C. (2006). *Journal of Applied Polymer Science*. **100**, 4439–4446.
- Muljadi, P. (2011). Cerium an Overview. <http://books.google.com.ar/books?id=dtraWNYkKW6oCyprintsec=frontcoveryh1=es#v=onepageyqyf=false>
- Patel, G. M., Patel, C. P., and Trivedi, H. C. (1999). *European Polymer Journal*. **35**, 201–208.
- Recillas, M., Silva, L. L., Peniche, C., Goycoolea, F. M., Rinaudo, M., and Argüelles-Monal, W. M. (2009). *Biomacromolecules*. **10**, 1633–1641.
- Sen, G., Singh, R. P., and Pal, S. (2010). *Journal of Applied Polymer Science*. **115**, 63–71.
- Shah, S. B., Patel, C. P., and Trivedi, H. C. (1995). *Carbohydrate Polymers*. **26**, 61–67.
- Trivedi, J. H., Kalia, K., Patel, N. K., and Trivedi, H. C. (2005). *Carbohydrate Polymers*. **60**, 117–125.
- Wang, L., Tu, K., Li, Y., Zhang, J., and Jiang, L. (2002). *Reactive y Functional Polymers*. **53**, 19–27.
- Wu, S., Jin, Z., Kim, J. M., Tong, Q., and Chen, H. (2009). *Carbohydrate Polymers*. **76**, 129–132.
- Yang, W., Zhang, L., Wu, L., Li, J., Wang, J., Jiang, H., and Li, Y. (2009). *Carbohydrate Polymers*. **77**, 331–337.
- Zhao, Z., Li, Z., Xia, Q., Xi, H., and Lin, Y. (2008). *European Polymer Journal*. **44**, 1217–1224.

CAPÍTULO 4

COPOLÍMEROS DE INJERTO ALGINATO/N-ISOPROPILACRILAMIDA OBTENIDOS POR RADIACIÓN GAMMA DE ⁶⁰Co

4.1 Introducción

Los procesos que involucran radiación electromagnética son una herramienta muy útil para transformar los materiales poliméricos y se han convertido en un área de enorme interés en las últimas décadas por su importante aplicación en la industria.

Los polisacáridos naturales y sus derivados al ser irradiados sufren la escisión de sus macromoléculas. Sin embargo, se ha demostrado que bajo ciertas condiciones algunos polisacáridos pueden ser entrecruzados por efecto de la radiación absorbida o copolimerizados con otros monómeros para formar hidrogeles o copolímeros, respectivamente. La posibilidad de modificar polímeros de origen natural empleando radiación ofrece la oportunidad de obtener materiales biodegradables y biocompatibles, no tóxicos y libres de aditivos, que pueden ser utilizados en una amplia variedad de aplicaciones (Sabharwal y col., 2004; Huq y col., 2012).

En este capítulo se presenta la síntesis de copolímeros de injerto de alginato y N-isopropilacrilamida a partir del uso de radiación gamma de ^{60}Co . El objetivo de la presente sección incluye la optimización de las condiciones de síntesis variando la composición de las mezclas de reacción y la dosis de radiación empleada y su posterior caracterización utilizando $^1\text{H-NMR}$, FTIR, análisis elemental y TGA.

4.2 Síntesis de copolímeros alginato-g-NIPAAm

4.2.1 Materiales

Para la síntesis de los copolímeros se utilizó N-isopropilacrilamida (NIPAAm) provista por Aldrich y alginato de sodio obtenido de Fluka. Se utilizó el alginato de sodio sin previa purificación, mientras que la NIPAAm se purificó mediante recristalización en hexano, según lo descrito en la sección 3.2.1. El alginato empleado en esta síntesis es el mismo empleado en el capítulo anterior, identificado como S000, el cual posee una relación monomérica M/G = 0,79 (44% manuronato, 56% guluronato).

4.2.2 Preparación de las muestras para irradiar

La preparación de las muestras implicó la obtención de una solución de NIPAAm al 5 %m/v. La misma fue posteriormente fraccionada y adicionada a 1 gramo de alginato; tal que para todas las muestras el volumen final de solución fue de 50 ml. El volumen de solución de NIPAAm utilizado se eligió de manera tal de lograr concentraciones alginato/NIPAAm: 20/80, 33/67, y 50/50, expresadas en moles de unidades repetitivas para

ambos materiales. El volumen final constante permitió obtener soluciones de alginato al 0,5 %m/v de baja viscosidad.

Con el objeto de evitar la presencia de oxígeno y por consiguiente la degradación oxidativa de los polímeros durante la irradiación, se prepararon portamuestras de vidrio Pyrex, apropiados para luego sellarlos en la línea de vacío disponible en PLAPIQUI (Figura 4.1). En este proceso es fundamental controlar que el material de vidrio no presente poros o fisuras. Para esto, antes de utilizarlos se los somete a vacío mediante una conexión a la línea de alto vacío, y pasado un tiempo de purga, se le aplica corriente de un generador de alto voltaje (Tesla), pudiendo detectar irregularidades en el vidrio. Los equipos de vidrio Pyrex utilizados fueron construidos en etapas. La primera etapa consistió en armar un equipo de fraccionamiento de la solución de NIPAAm para obtener ampollas de vidrio selladas en vacío. La figura 4.1 presenta la línea de alto vacío utilizada, la cual cuenta con varias secciones separadas por robinetes de teflón de tipo JJYoung[®], que permiten la apertura y el cierre de los diferentes tramos de la línea. Las diferentes secciones de la línea cuenta con terminales de bocas cónicas esmeriladas a las que se le puede conectar balones o equipos especialmente preparados para realizar vacío. Una vez conectado el equipo de fraccionamiento a la línea de vacío el mismo cargado con la solución de NIPAAm y evacuado empleando una bomba de vacío. A continuación se procede al corte del equipo mediante el sellado del vidrio por la acción del calor utilizando un soplete. En la Figura 4.2. se muestra el sistema de fraccionamiento para obtener las ampollas de solución de NIPAAm. Con la solución contenida en el balón se llenaron las respectivas ampollas previamente calibradas. Las ampollas se separaron del equipo mediante el sellado por calor de las constricciones de vidrio que las unían al sistema de fraccionamiento. En una etapa posterior, las ampollas se soldaron, mediante una conexión de vidrio provista de un sello de vidrio y un imán en su interior que permitiría luego la ruptura del sello, a balones de 100 mL de capacidad. En los balones se introdujo el alginato de sodio y el agua destilada necesaria para alcanzar el volumen final de reacción, teniendo en cuenta el volumen a agregar de la correspondiente ampolla con la solución de NIPAAm (Figura 4.3). De esta forma, se tuvo un sistema conectado a la línea de vacío, que consistió en una ampolla cerrada con la solución de NIPAAm obtenida anteriormente la cual fue soldada con calor a un tubo de vidrio del cual pendía el balón con la solución de alginato. Este último balón se congeló por inmersión en nitrógeno líquido, evitando que el agua de la solución sea extraída al conectar la línea de vacío. A continuación se hizo vacío y finalmente se separaron del sistema mediante sellado con calor. Una vez separado, se rompió la constricción que conectaba la ampolla de

NIPAAm con el balón de alginato permitiendo el mezclado de las dos soluciones dentro del balón en ausencia de oxígeno. Luego se cortó, nuevamente con calor, la conexión con la ampolla vacía y de esta manera la muestra quedó confinada en un balón pequeño que facilitó su manipulación, transporte y posterior irradiación.



Figura 4.1. Línea de vacío a la cual se encuentra conectado el equipo de fraccionamiento de la solución de NIPAAm.

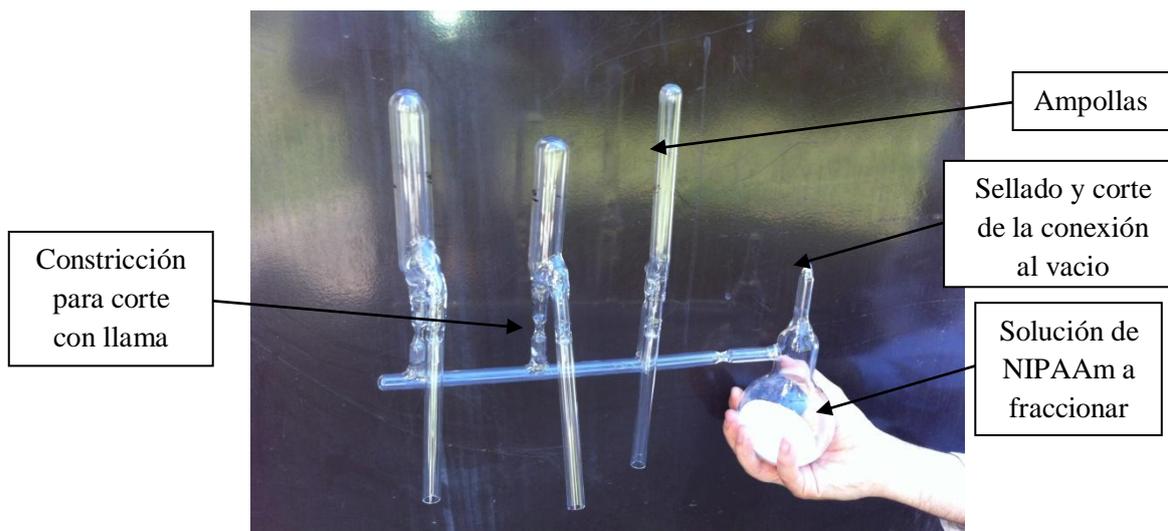


Figura 4.2. Equipo de fraccionamiento de la solución de NIPAAm, sellado en vacío.

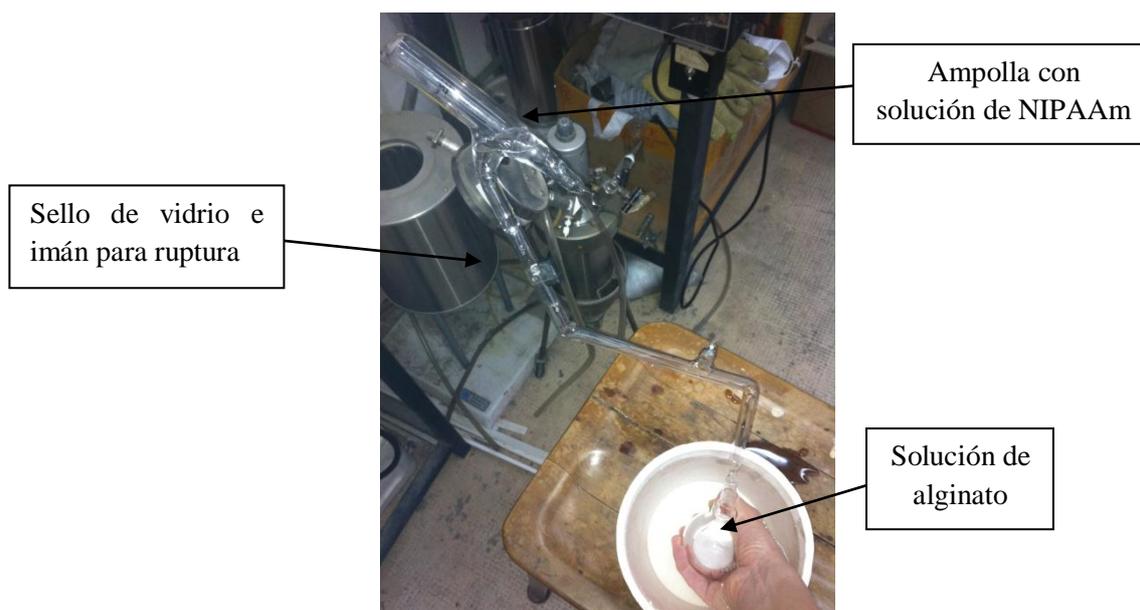


Figura 4.3. Balón con solución de alginato conectado a una ampolla de solución de NIPAAm.

4.2.3 Irradiación de las muestras en el Centro Atómico Ezeiza

La irradiación de las soluciones acuosas de alginato y NIPAAm contenidas en los balones de vidrio Pyrex cerrados al vacío, se llevó a cabo en el Centro Atómico Ezeiza (CAE) utilizando dosis y velocidad de dosis controladas. La velocidad de dosis seleccionada fue de 1 kGy/h, mientras que las dosis aplicadas variaron entre 0,3 y 10 kGy. La calibración de dosis se realizó empleando dosímetros Perspex en el CAE .

A pesar de la gran difusión del uso de radiación gamma en la producción de dispositivos médicos o productos biopoliméricos funcionales, se requiere un adecuado control del proceso, teniendo en cuenta especialmente el efecto de la velocidad de dosis y la dosis aplicada.

Diferentes autores han propuesto que la velocidad de dosis controla la velocidad de reacción y con ello la homogeneidad del proceso, mientras que la dosis total absorbida determina el número de entrecruzamientos en el producto polimérico obtenido (Panda y col., 2000; Liu y col., 2007; Jha y col., 2010). Por ejemplo, Jha y col. (2010), reportaron la copolimerización de estireno y anhídrido maleico para obtener el copolímero RISUG[®] empleando diferentes dosis (1,8; 2; 2,2 y 2,4 kGy) y diferentes velocidades de dosis de radiación (0,5 a 1,5 kGy/h). Para una misma dosis aplicada, al aumentar la velocidad de dosis se observó una reducción de la masa molar del polímero obtenido, lo que indicaría que la efectividad de los radicales libres disminuye o bien se produce la escisión radioinducida en la cadena polimérica formada. Por otra parte, fijando la velocidad de dosis, los resultados

fueron concluyentes respecto del efecto de la dosis, ya que un pequeño incremento en las dosis aplicadas (incrementos en etapas de 0,2 kGy) resultó en aumentos en la masa molar de los polímeros obtenidos.

En función de los resultados reportados por otros autores para sistemas similares (Grasselli y col., 2009) en esta tesis se eligió 1 kGy/h como velocidad de dosis. Por otra parte, las dosis utilizadas en los copolímeros sintetizados por radiación, fueron menores que las reportadas por otros autores (Lee y col., 2004; Cai y col., 2005), ya que el objetivo fue la obtención de copolímeros de alginato y NIPAAm, minimizando el efecto de escisión radioinducida en las cadenas de biopolímero (Nagasawa y col., 2000; Lee y col., 2003).

Finalmente los materiales irradiados se trataron mediante extracción Soxhlet utilizando metanol como solvente por al menos 48 h para extraer los restos de NIPAAm sin reaccionar y el posible homopolímeros PNIPAAm formado.

4.2.4 Composición de las mezclas de reacción

La nomenclatura y composición de los copolímeros sintetizados por irradiación con rayos gamma de ^{60}Co se presenta en la Tabla 4.1. En dicha tabla se resumen los datos de cada copolímero obtenido como dosis aplicada, concentración de cada uno de los reactivos en la mezcla de reacción y porcentaje molar de NIPAAm.

Tabla 4.1. Composición de las mezclas de reacción en la síntesis de copolímeros empleando ^{60}Co .

Dosis	Copolímero	m (g)		n (moles)		% molar NIPAAm
		ALG	NIPAAm	ALG	NIPAAm	
0,3 kGy	COPI-03-80N	1,0012	2,25	$5,06 \cdot 10^{-3}$	$1,99 \cdot 10^{-2}$	80
	COPI-03-67N	1,0002	1,14	$5,05 \cdot 10^{-3}$	$1,01 \cdot 10^{-2}$	67
	COPI-03-50N	1,0000	0,57	$5,05 \cdot 10^{-3}$	$5,04 \cdot 10^{-3}$	50
0,5 kGy	COPI-05-80N	1,0005	2,25	$5,05 \cdot 10^{-3}$	$1,99 \cdot 10^{-2}$	80
	COPI-05-67N	1,0005	1,14	$5,05 \cdot 10^{-3}$	$1,01 \cdot 10^{-2}$	67
	COPI-05-50N	1,0008	0,57	$5,05 \cdot 10^{-3}$	$5,04 \cdot 10^{-3}$	50
1 kGy	COPI-1-80N	1,0003	2,25	$5,05 \cdot 10^{-3}$	$1,99 \cdot 10^{-2}$	80
	COPI-1-67N	1,0003	1,14	$5,05 \cdot 10^{-3}$	$1,01 \cdot 10^{-2}$	67
	COPI-1-50N	1,0005	0,57	$5,05 \cdot 10^{-3}$	$5,04 \cdot 10^{-3}$	50
5 kGy	COPI-5-80N	1,0012	2,25	$5,06 \cdot 10^{-3}$	$1,99 \cdot 10^{-2}$	80
	COPI-5-67N	1,0002	1,14	$5,05 \cdot 10^{-3}$	$1,01 \cdot 10^{-2}$	67
	COPI-5-50N	1,0000	0,57	$5,05 \cdot 10^{-3}$	$5,04 \cdot 10^{-3}$	50

La nomenclatura empleada para cada muestra consiste en cuatro letras que representan el copolímero obtenido por irradiación, COPI-, seguidas de un número que representa la dosis aplicada 0,3 kGy (COPI-03), 0,50 kGy (COPI-05), 1 kGy (COPI-1) y 5 kGy (COPI-5) y por último otro número que indica el contenido en porcentaje molar de NIPAAm en la mezcla de reacción inicial, -80N, -67N o -50N. El contenido de NIPAAm se expresa en moles de NIPAAm por cien moles de unidades repetitivas totales (NIPAAm y alginato).

4.3 Caracterización de los copolímeros alginato-g-PNIPAAm

4.3.1 Caracterización química empleando espectroscopia de ^1H -NMR

La caracterización por ^1H -NMR de los copolímeros de injerto obtenidos se llevó a cabo en agua deuterada a temperatura ambiente empleando un espectrómetro Bruker Avance DPX 400MHz, equipamiento disponible en la Universidad de Patras, Patras, Grecia.

En la Figura 4.4 se presenta, a modo de ejemplo, el espectro ^1H -NMR para el copolímero COPI-1-80N.

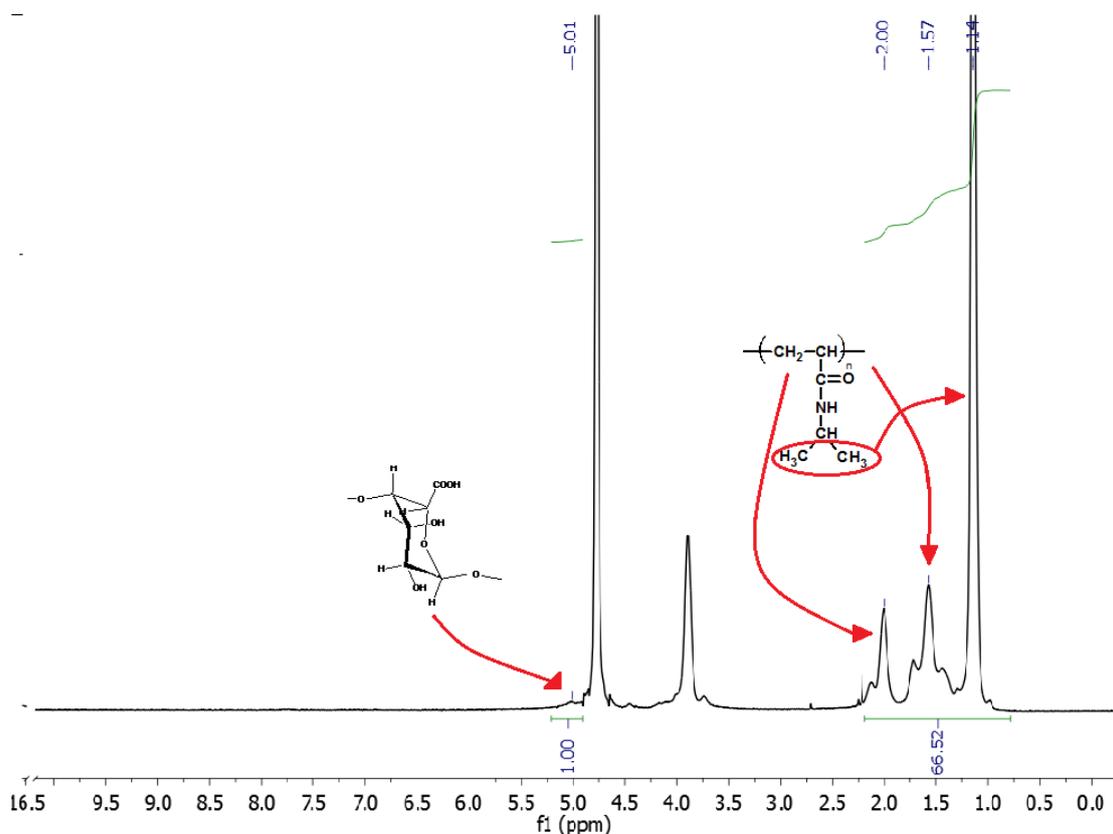


Figura 4.4. Espectro ^1H -NMR del copolímero de injerto COPI-1-80N.

En la Figura 4.4 se ha agregado la estructura química de los monómeros que constituyen el copolímero y la asignación de algunas señales de los hidrógenos de las mismas en el espectro. El hidrógeno anomérico de las unidades de guluronato del alginato da lugar a una señal que se observa a un desplazamiento $\delta = 5,01$ ppm, mientras que los hidrógenos del PNIPAAm $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}-$, y los dos $-\text{CH}_3$ se presentan en $\delta = 2,2$; 1,57 y 1,14 ppm, respectivamente (Dincer y col., 2002; Salomonsen y col., 2009). A partir de la relación de las áreas de las señales del espectro se estimó la composición de los copolímeros obtenidos. Los espectros del resto de los copolímeros sintetizados, con la respectiva asignación de señales y los cálculos realizados para la determinación de la composición de los copolímeros se presentan en el Anexo II.

Tabla 4.2. Composición de los copolímeros sintetizados por irradiación obtenida a partir de los espectros ^1H - NMR.

Copolímero	Área _{NIPAAm} (9H)	Área _{Alg} (1H)	n_{NIPAAm}	n_{G_G}	n_{G} (S000)	n_{total}	% molar NIPAAm
COPI-03-80N	9,87	1	0,5231	0,4769	0,8517	1,3747	38,0
COPI-03-67N	8,54	1	0,4869	0,5131	0,9163	1,4032	34,7
COPI-03-50N	4,62	1	0,3392	0,6608	1,1800	1,5192	22,3
COPI-05-80N	23,09	1	0,7195	0,2805	0,5008	1,2204	59,0
COPI-05-67N	22,33	1	0,7127	0,2873	0,5130	1,2257	58,1
COPI-05-50N	19,21	1	0,6810	0,3190	0,5697	1,2507	54,4
COPI-1-80N	66,52	1	0,8808	0,1192	0,2128	1,0936	80,5
COPI-1-67N	13,71	1	0,6037	0,3963	0,7077	1,3114	46,0
COPI-1-50N	10,84	1	0,5464	0,4536	0,8101	1,3564	40,3
COPI-5-80N	52,91	1	0,8546	0,1454	0,2596	1,1142	76,7
COPI-5-67N	82,38	1	0,9015	0,0985	0,1759	1,0774	83,7
COPI-5-50N	44,65	1	0,8322	0,1678	0,2996	1,1318	73,5

En la Tabla 4.2, se resume la información obtenida a partir de los espectros ^1H - NMR, siendo $\text{Área}_{\text{NIPAAm}}$, el área de las señales de los 9 hidrógenos ($-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}-$, y los dos $-\text{CH}_3$) del PNIPAAm; Área_{Alg} , el área de la señal del hidrógeno anomérico de las unidades gulurónicas del alginato; n_{NIPAAm} el número de moles estimados para las unidades repetitivas de NIPAAm; n_{G_G} el número de moles para las unidades repetitivas de guluronato, n_{G} (S000) el número de moles de unidades repetitivas de alginato teniendo en cuenta la relación

M/G para el alginato utilizado, n_{total} el número de moles totales de unidades repetitivas y % molar NIPAAm el porcentaje molar de unidades repetitivas de NIPAAm en el copolímero.

Para una dosis constante, el contenido de NIPAAm en el copolímero aumenta al aumentar la cantidad de NIPAAm en la mezcla de reacción inicial, excepto para la dosis de 5 kGy que presentó valores de injerto similares para las tres composiciones de la mezcla de reacción estudiadas. Los copolímeros obtenidos con 5 kGy presentaron baja solubilidad en agua deuterada debido, posiblemente, a la formación de entrecruzamientos radioinducidos entre las cadenas laterales de PNIPAAm injertadas. Por este motivo los valores de composición de los copolímeros obtenido por $^1\text{H-NMR}$ para la serie de copolímeros sintetizada con 5 kGy no fue comparable con los valores de composición obtenidos por otras técnicas analíticas como análisis elemental y TGA.

Por otra parte, al analizar los resultados para una misma composición de alginato y NIPAAm en la mezcla de reacción inicial es posible observar que las mezclas con mayor contenido en NIPAAm (80 %) dieron como resultado copolímeros con mayor cantidad de NIPAAm injertado a medida que se incrementó la dosis, salvo para la dosis de 5 kGy con la cual se obtuvieron grados de injerto similares a los obtenidos con 1 kGy.

Para el resto de las composiciones valores de % NIPAAm en los copolímeros obtenidos son más bajos para la menor dosis empleada (0,3 kGy) y más altos para la mayor dosis empleada (5 kGy). Sin embargo, para la dosis de 1 kGy, los valores de % NIPAAm de la muestras -67N y -50 N resultaron menores que los esperado al compararlos con los porcentajes obtenidos para las mismas composiciones y dosis 0,5 kGy.

4.3.2 Caracterización química mediante análisis elemental

Los ensayos de análisis elemental se realizaron en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad de Patras, Grecia, usando un analizador Carlo Erba EA1108 C-H-N-S. A partir de la composición del alginato y el PNIPAAm homopolímeros se calculo la composición de cada uno de los copolímeros sintetizados. Teniendo en cuenta que el alginato no posee átomos de nitrógeno en sus unidades monoméricas, todo el porcentaje de nitrógeno obtenido por análisis elemental, se asocia al PNIPAAm injertado. En función del contenido de nitrógeno, puede calcularse el contenido de carbono asociado al PNIPAAm y el resto de masa de carbono, corresponderá al contenido en alginato. Las Tablas 4.3 y 4.4 presentan los resultados obtenidos mediante esta técnica. Un ejemplo de los cálculos realizados se presenta en el Anexo II.

Tabla 4.3. Composición obtenida a partir de análisis elemental correspondiente a los copolímeros sintetizados con 0,5 y 1 kGy.

Dosis			1kGy			0,5kGy		
A.E.	ALG	PNIPAAm	COPI-1-80N	COPI-1-67N	COPI-1-50N	COPI-05-80N	COPI-05-67N	COPI-05-50N
N%	0,000	11,870	8,130	3,844	3,366	4,727	4,264	4,183
C%	30,004	58,918	49,833	38,524	39,330	38,622	40,333	39,972
H%	4,717	9,931	7,909	4,285	6,053	5,991	5,926	6,371
C corresp al NIPAAm			40,354	19,080	16,707	23,463	21,165	20,763
C corresp al Alg			9,479	19,444	22,623	15,159	19,168	19,209
g ALG			31,592	64,804	75,398	50,523	63,885	64,022
g NIPAAm			68,492	32,384	28,357	39,823	35,922	35,240
mol ALG ^a			0,160	0,327	0,381	0,255	0,323	0,323
mol NIPAAm ^a			0,606	0,287	0,251	0,352	0,318	0,312
% ALG ^b			20,8	53,3	60,3	42,0	50,4	50,9
%NIPAAm ^b			79,2	46,7	39,7	58,0	49,6	49,1

^a Moles de alginato y NIPAAm basados en la masa molar de las unidades repetitivas.

^b Porcentajes molares de NIPAAm respecto al número de moles totales de unidades repetitivas.

Tabla 4.4. Composición obtenida a partir de análisis elemental correspondiente a los copolímeros sintetizados con 0,3 y 5 kGy.

Dosis			0,3 kGy			5 kGy		
A.E.	ALG	PNIPAAm	COPI-03-80N	COPI-03-67N	COPI-03-50N	COPI-5-80N	COPI-5-67N	COPI-5-50N
N%	0,000	11,870	3,083	2,203	0,947	11,092	7,029	2,875
C%	30,004	58,918	36,511	30,695	32,554	56,720	46,389	36,442
H%	4,717	9,931	5,668	2,934	4,956	8,456	5,913	5,780
C corresp al NIPAAm			15,303	10,935	4,701	55,056	34,889	14,270
C corresp al Alg			21,208	19,760	27,853	1,664	11,500	22,172
g ALG			70,685	65,858	92,833	5,545	38,328	73,896
g NIPAAm			25,973	18,559	7,978	93,446	59,217	24,221
mol ALG ^a			0,357	0,333	0,469	0,028	0,194	0,373
mol NIPAAm ^a			0,230	0,164	0,071	0,827	0,524	0,214
% ALG ^b			60,8	66,9	86,9	3,3	27,0	63,5
%NIPAAm ^b			39,2	33,1	13,1	96,7	73,0	36,5

En la Tabla 4.5 se presentan, en forma comparativa, los valores de composición obtenidos por $^1\text{H-NMR}$ y por análisis elemental para todos los copolímeros sintetizados.

Tabla 4.5. Composición de los copolímeros sintetizados por irradiación obtenida a partir de $^1\text{H-NMR}$ y análisis elemental

Copolímero	0,3 kGy		0,5 kGy		1 kGy		5 kGy	
	$^1\text{H-}$	A.E.	$^1\text{H-}$	A.E.	$^1\text{H-}$	A.E.	$^1\text{H-}$	A.E.
COPI-80N	38,0	39,2	59,0	58,0	80,5	79,2	76,7	96,7
COPI-67N	34,7	33,1	58,1	49,6	46,0	46,7	83,7	73,0
COPI-50N	22,3	13,1	54,4	49,1	40,3	39,7	73,5	36,5

Los valores de % NIPAAm en los copolímeros presentan un buen acuerdo entre ambas técnicas, excepto los copolímeros obtenidos con 5 kGy. En todos los casos se observa un aumento en el contenido de NIPAAm a medida que aumenta la dosis. El valor de 96,7 % NIPAAm obtenido para la dosis de 5 kGy resulta mayor al esperado en base a la composición inicial de la solución irradiada. Si bien ésta dosis no es suficiente para la escisión del alginato en una magnitud tal que pudiera perderse durante el lavado con metanol (oligómeros), un análisis de los residuos extraídos por FTIR no mostró la presencia de alginato. Descartada esta posibilidad, la única explicación posible es un error en el cálculo de la composición de la solución inicial. Dado que la irradiación con 5 kGy se realizó en una etapa posterior a las otras muestras presentadas en la Tabla 4.1; es posible que un error en el fraccionamiento de las ampollas de NIPAAm resultara en una mayor concentración en la mezcla inicial de reacción.

4.3.3 Caracterización química empleando FTIR

Los espectros infrarrojos con Transformada de Fourier (FTIR) se registraron en un espectrofotómetro Nicolet 520 por la acumulación de 30 barridos, con una resolución de 4 cm^{-1} . Las muestras fueron preparadas por casting (evaporación del solvente) a partir de soluciones al 1 %m/m o bien en pastillas de KBr en el caso de los copolímeros menos solubles.

En la Figura 4.5 se presentan los espectros FTIR del alginato original (S000), el PNIPAAm polimerizado por irradiación con una dosis de 10 kGy a partir de una solución acuosa al 5 % de NIPAAm y como el copolímero COPI-1-50N (1 kGy, 50 % NIPAAm solución inicial). Los espectros se encuentran desplazados en el eje de las abscisas para comparar entre las señales de cada polímero.

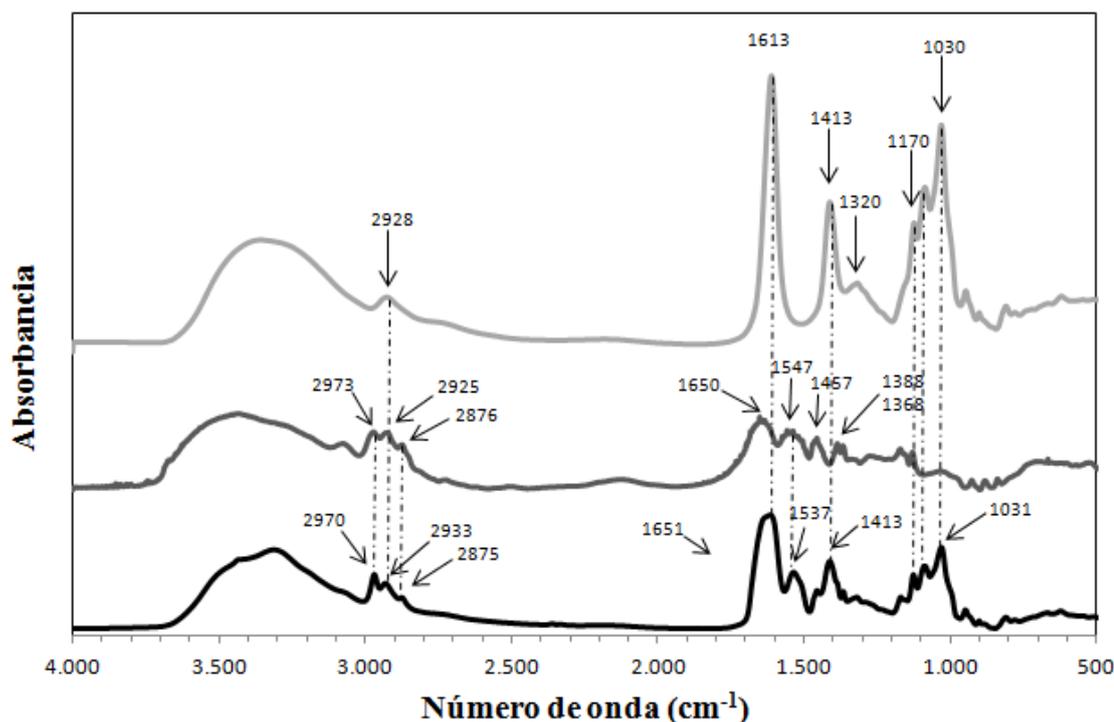


Figura 4.5. Espectros FTIR obtenidos para el alginato (gris claro, superior), el PNIPAAm (gris, medio) y el copolímero de injerto COPI-1-50N (negro, inferior).

El alginato presenta una banda ancha característica de los grupos oxhidrilos ($\nu_{\text{O-H}}$) a 3400 cm^{-1} ; la vibración de los enlaces C-H presentes en el anillo ($\nu_{\text{C-H}}$) a 2928 cm^{-1} y dos señales fuertes atribuidas al estiramiento asimétrico y simétrico de los grupos carboxílicos ($\nu^{\text{as}}_{\text{COO-}}$; $\nu^{\text{s}}_{\text{COO-}}$) en 1613 y 1413 cm^{-1} , respectivamente. En el rango de longitudes de ondas comprendido entre 1030 y 1170 cm^{-1} se observan las señales correspondientes a las vibraciones simétricas y asimétricas de los enlaces C-O-C ($\nu_{\text{C-O-C}}$; $\nu^{\text{as}}_{\text{C-O-C}}$) propias de los anillos de polisacáridos, mientras que a 1320 cm^{-1} aparece una banda débil de la vibración del enlace C-O ($\nu_{\text{C-O}}$) (Lawrie y col., 2007; Yang y col., 2009; Sen y col., 2010). Para el PNIPAAm, se observan las bandas correspondientes a las vibraciones simétricas y asimétricas de los grupos metilos (ν_{CH_3} ; $\nu^{\text{as}}_{\text{CH}_3}$) a 2973 cm^{-1} y 2876 cm^{-1} , respectivamente. La banda correspondiente a la vibración de los enlaces C-H ($\nu_{\text{C-H}}$) a 2925 cm^{-1} , tal como se presenta en el alginato y las bandas típicas amida I ($\nu_{\text{C=O}}$) a 1650 cm^{-1} y amida II ($\delta_{\text{N-H}}$) a 1547 cm^{-1} . Las bandas de deformación asimétrica y simétrica de los grupos geminales se observan como una señal media a 1457 cm^{-1} ($\delta^{\text{as}}_{\text{CH}_3}$) y un doble pico a 1388 y 1368 cm^{-1} ($\delta^{\text{s}}_{\text{CH}_3}$) (Lee y col., 2006; Zhao y col., 2008).

El espectro del copolímero COPI-1-50N presenta bandas características de los dos homopolímeros, tales como las vibraciones simétricas y asimétricas de los grupos metilos ($\nu^{\text{s}}_{\text{CH}_3}$; $\nu^{\text{as}}_{\text{CH}_3}$) del PNIPAAm a 2970 cm^{-1} y 2875 cm^{-1} así como la banda a 2933 cm^{-1} debido

a la vibración de los enlaces C-H ($\nu_{\text{C-H}}$) presentes tanto en el PNIPAAm como en el alginato. La señal a 1651 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de los enlaces C=O ($\nu_{\text{C=O}}$) de los grupos carbonilos tanto perteneciente al alginato como al PNIPAAm, mientras que la señal de amida II ($\delta_{\text{N-H}}$) a 1537 cm^{-1} es una señal características de la presencia de PNIPAAm en el copolímero. De manera similar, en el rango de longitudes de ondas comprendido entre ~ 1030 y $\sim 1170\text{ cm}^{-1}$ se observan las señales correspondientes a las vibraciones simétricas y asimétricas de los enlaces C-O-C ($\nu_{\text{C-O-C}}^{\text{s}}$; $\nu_{\text{C-O-C}}^{\text{as}}$) propias de los anillos del alginato mientras que la señal a 1414 cm^{-1} está asociada al estiramiento simétrico de los grupos carboxílicos ($\nu_{\text{COO}}^{\text{s}}$) del alginato.

En las Figuras 4.6 a 4.9 se presentan los espectros FTIR de los copolímeros obtenidos a partir de distintas composiciones de la mezcla inicial de reacción, agrupados según la dosis de radiación gamma ^{60}Co empleada en la síntesis (0,3; 0,5; 1 y 5 kGy) respectivamente. A partir de los espectros obtenidos se presenta en las Tablas 4.6 a 4.9 la relación de alturas de los picos a 2970 cm^{-1} , correspondiente a la vibración simétrica de los grupos metilos presentes sólo en el PNIPAAm ($\nu_{\text{CH}_3}^{\text{s}}$), y a 1414 cm^{-1} propio de la vibración simétrica de los grupos carboxílicos del alginato; ésta relación permite estimar el grado de injerto de NIPAAm sobre alginato.

Al observar la Figura 4.6 pueden apreciarse las señales características del PNIPAAm en los copolímeros a 2970 cm^{-1} ($\nu_{\text{CH}_3}^{\text{s}}$) y 1546 cm^{-1} ($\delta_{\text{N-H}}$). Estas bandas se hacen a su vez más notorias al incrementarse el contenido de NIPAAm en el copolímero (COPI-03-50N < COPI-03-67N < COPI-03-80N), dado que las señales del alginato no presentan variaciones importantes en su aspecto. La señal en 1546 cm^{-1} ($\delta_{\text{N-H}}$) que se distingue mejor en el espectro de COPI-03-80N, es apenas perceptible en las otras dos muestras. Esta observación puede ser confirmada en función del cociente de la absorbancia a dos longitudes de onda características (Tabla 4.6), cuyos valores aumentan con el incremento de NIPAAm en la mezcla de reacción inicial.

A partir de los espectros FTIR obtenidos para los copolímeros sintetizados con 0,5 kGy (COPI-05) es posible concluir la misma dependencia con la composición en cuanto a la incorporación de NIPAAm. Los valores de la relación de absorbancia a las longitudes de onda características (Tabla 4.7) indican que aumenta el injerto de NIPAAm sobre alginato a medida que aumenta la concentración de PNIPAAm en la mezcla de reacción inicial.

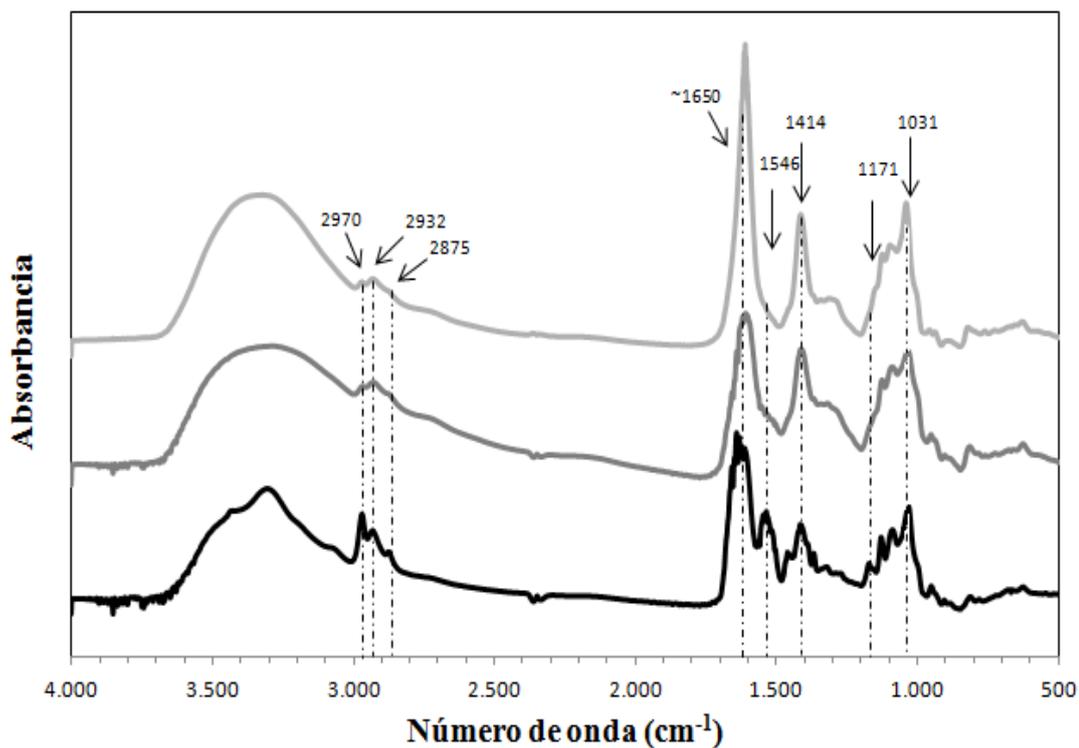


Figura 4.6. Espectros FTIR de los copolímeros sintetizados con una dosis de 0,3 kGy: COPI-03-50N (gris claro, superior); COPI-03-67N (gris, medio) y COPI-03-80N (negro, inferior).

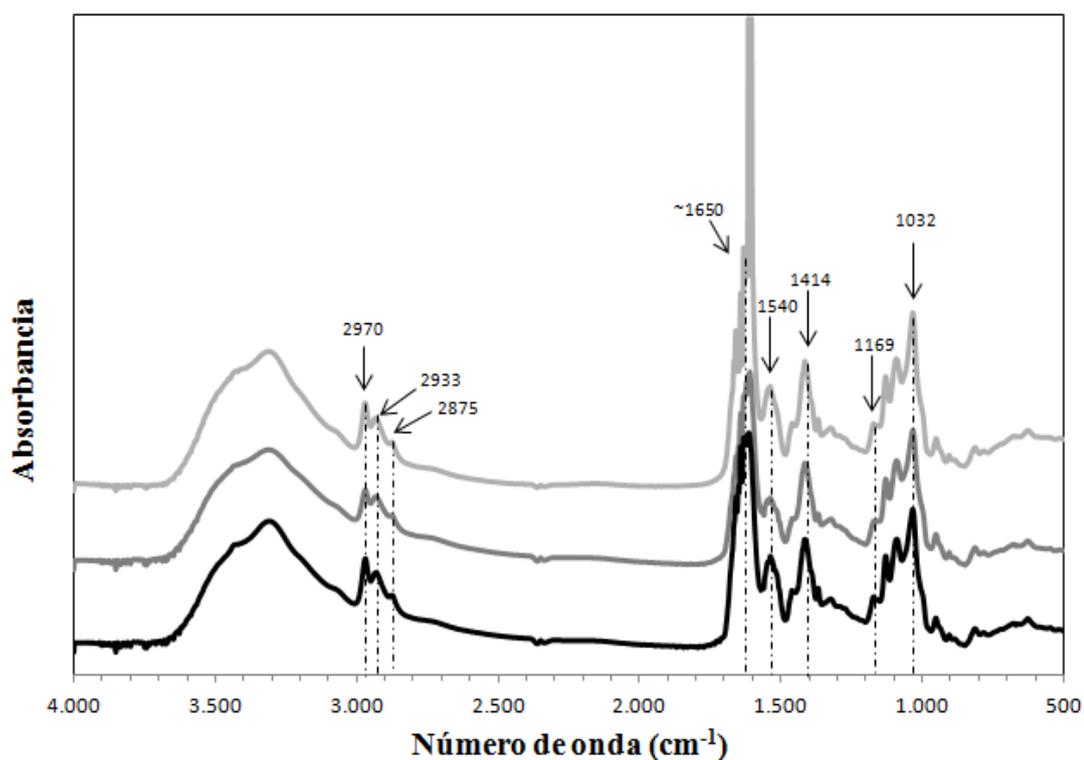


Figura 4.7. Espectros FTIR de los copolímeros sintetizados con 0,5 kGy: COPI-05-50N (gris claro, superior); COPI-05-67N (gris, medio) y COPI-05-80N (negro, inferior).

Tabla 4.6. Relación de alturas de señales características de NIPAAm y alginato para copolímeros sintetizados con 0,3 kGy.

Copolímero	$A_{(\nu \text{ CH}_3)} (2970 \text{ cm}^{-1})$	$A_{(\nu \text{ COO}^-)} (1414 \text{ cm}^{-1})$	$A_{(2970 \text{ cm}^{-1})}/A_{(1414 \text{ cm}^{-1})}$
COPI-03-50N	0,865	1,652	0,52
COPI-03-67N	0,768	1,055	0,73
COPI-03-80N	0,465	0,417	1,12

Tabla 4.7. Relación de alturas de señales características de NIPAAm y alginato para copolímeros sintetizados con 0,5 kGy.

Copolímero	$A_{(\nu \text{ CH}_3)} (2970 \text{ cm}^{-1})$	$A_{(\nu \text{ COO}^-)} (1414 \text{ cm}^{-1})$	$A_{(2970 \text{ cm}^{-1})}/A_{(1414 \text{ cm}^{-1})}$
COPI-05-50N	1,109	1,636	0,68
COPI-05-67N	0,607	0,811	0,75
COPI-05-80N	0,707	0,852	0,83

Los espectros obtenidos para los copolímeros sintetizados con 1 KGy (COPI-1) son similares a los obtenidos con una dosis menor (COPI-03 y COPI-05). Sin embargo a esta dosis, en el copolímero COPI-1-80N con mayor contenido en PNIPAAm, la señal a 1458 cm^{-1} aparece como un pico importante así como también puede detectarse fácilmente el doble pico a 1387 y 1367 cm^{-1} , siendo éstas las bandas de deformación asimétrica y simétrica de los grupos geminales del PNIPAAm respectivamente. Por otra parte de la relación de altura de los picos característicos es posible inferir el mayor contenido de NIPAAm en el copolímero COPI-1-80N en relación a los otros dos copolímeros sintetizados con esta dosis.

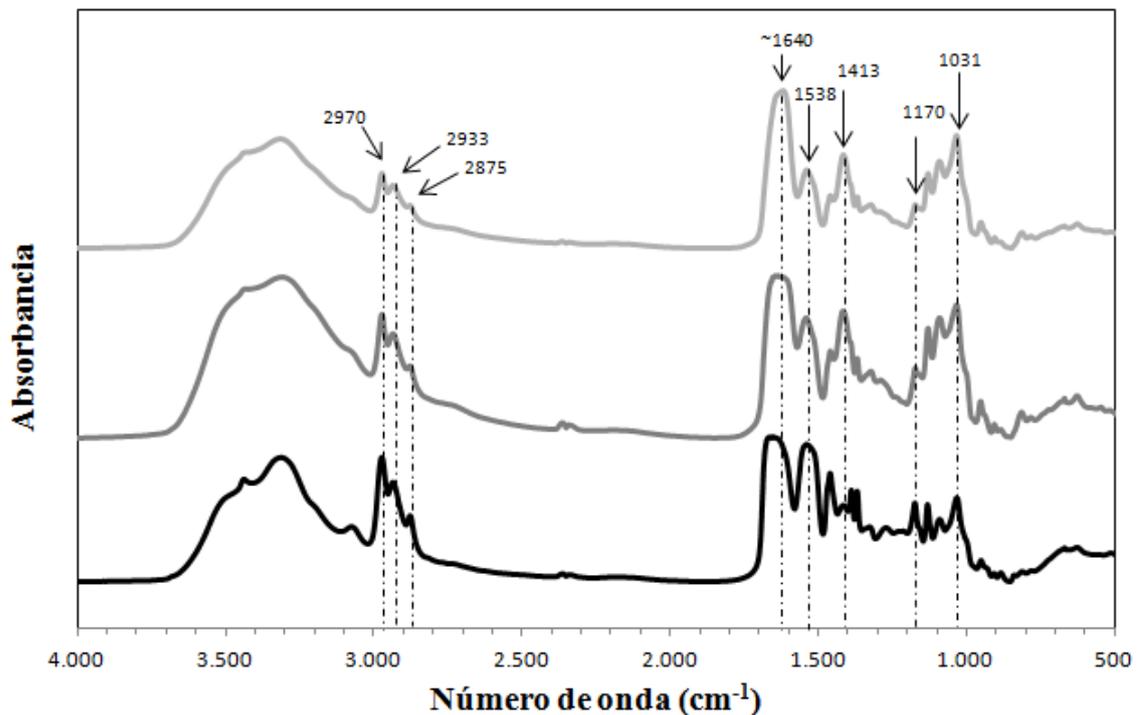


Figura 4.8. Espectros FTIR de los copolímeros sintetizados con una dosis de 1 kGy: COPI-1-50N (gris claro, superior); COPI-1-67N (gris, medio) y COPI-1-80N (negro, inferior).

Tabla 4.8. Relación de alturas de señales características de NIPAAm y alginato para copolímeros sintetizados con 1 kGy.

Copolímero	$A_{(\nu \text{ CH}_3)} (2970 \text{ cm}^{-1})$	$A_{(\nu \text{ COO}^-)} (1414 \text{ cm}^{-1})$	$A_{(2970 \text{ cm}^{-1})}/A_{(1414 \text{ cm}^{-1})}$
COPI-1-50N	0,525	0,653	0,80
COPI-1-67N	1,300	1,335	0,97
COPI-1-80N	1,297	0,799	1,62

Observando los espectros correspondientes a los copolímeros COPI-5 (Figura 4.9) y las relaciones de absorbancia de los picos característicos (Tabla 4.9) es posible destacar una menor incorporación de NIPAAm en el copolímero COPI-5-80N respecto del copolímero COPI-5-67N teniendo en cuenta la concentración de PNIPAAm en la mezcla de reacción inicial. A esta dosis de radiación el mayor número de radicales libres generado favorecería la reacción de homopolimerización disminuyendo la cantidad de NIPAAm injertada al alginato.

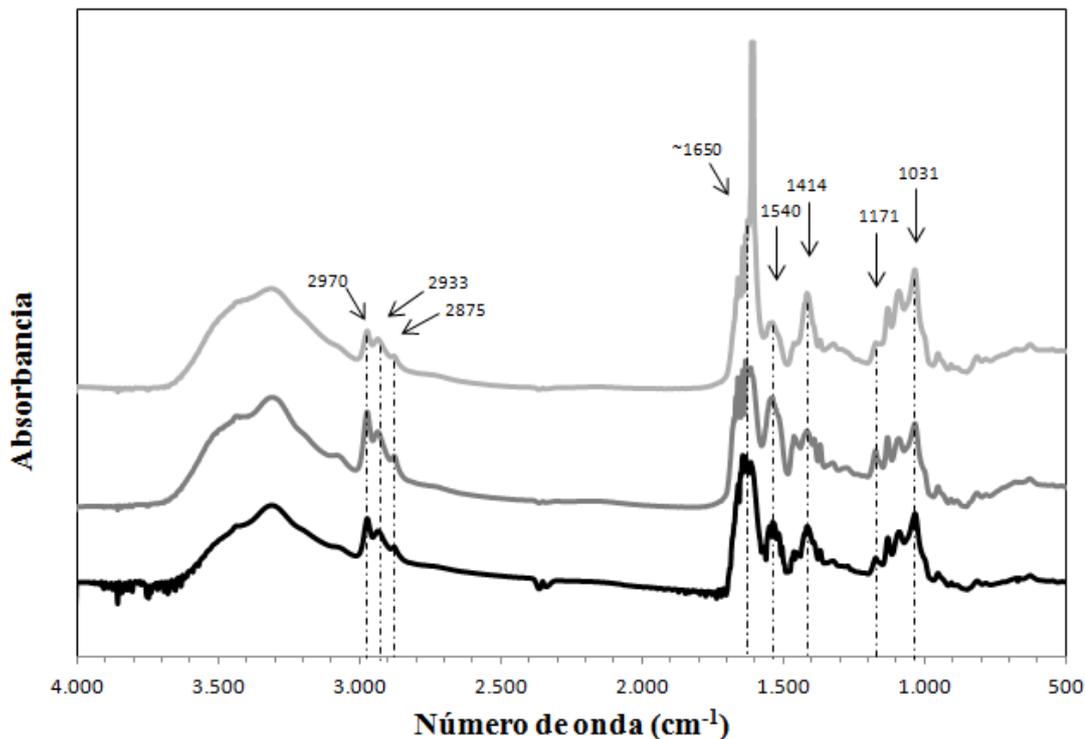


Figura 4.9- Espectros FTIR para los copolímeros sintetizados con una dosis de 5 kGy: COPI-5-50N (gris claro, superior); COPI-5-67N (gris, medio) y COPI-5-80N (negro, inferior).

Tabla 4.9. Relación de alturas de señales características de NIPAAm y alginato para copolímeros sintetizados con 5 kGy.

Copolímero	$A_{(\nu \text{ CH}_3)} (2970 \text{ cm}^{-1})$	$A_{(\nu \text{ COO}^-)} (1414 \text{ cm}^{-1})$	$A_{(2970 \text{ cm}^{-1})} / A_{(1414 \text{ cm}^{-1})}$
COPI-5-50N	1,041	1,685	0,62
COPI-5-67N	1,646	1,343	1,23
COPI-5-80N	0,289	0,262	1,10

4.3.4 Caracterización térmica por TGA

Además de estimar la estabilidad térmica de los copolímeros sintetizados por radiación se empleó termogravimetría para estimar la composición. Los ensayos fueron realizados en una balanza termogravimétrica Discovery TGATM disponible en PLAPIQUI. Para cada uno de los materiales se registró la variación de masa en el rango de 25 a 700 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min bajo atmósfera de nitrógeno (40 mL/min).

En la Figura 4.10 se presentan los termogramas registrados para el alginato (S000) y el PNIPAAm sintetizado por irradiación (10 kGy). Ambos polímeros presentan una pérdida de masa inicial hasta alcanzar aproximadamente 150 °C correspondiente a su deshidratación. Para el alginato se produce una importante disminución de su masa (45 %), en el rango de

temperatura entre 200 y 300 °C (aproximadamente a 249 °C) a causa del inicio de su degradación térmica, presentando luego una segunda pérdida de masa alrededor de los 550 °C (15 %), obteniéndose un residuo mayor a un 20 % de la masa inicial. Por su parte el PNIPAAm presenta una única pérdida de masa al alcanzar los 408 °C que representa prácticamente la totalidad de la masa, obteniéndose un residuo inferior a un 2,5% de la masa inicial.

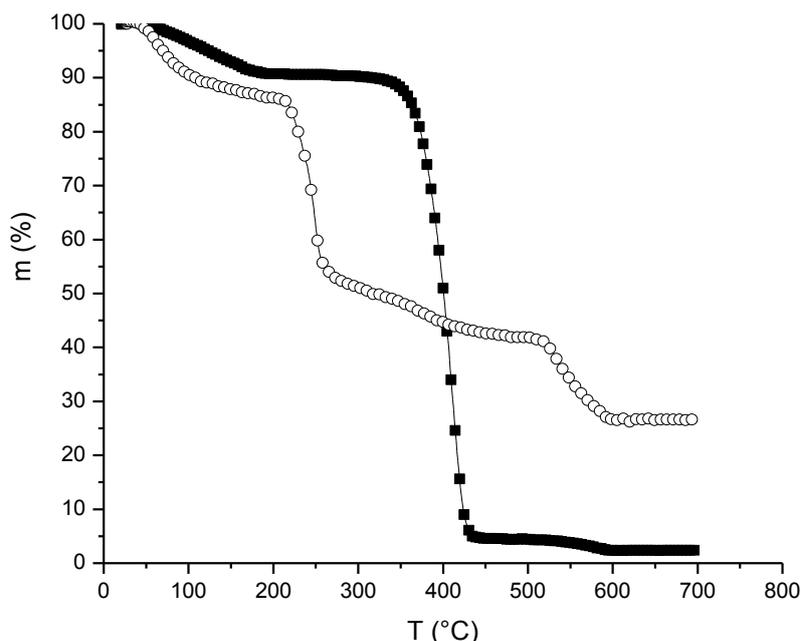


Figura 4.10. Cambios en la masa en función de la temperatura para los homopolímeros. Símbolos: (○) alginato original y (■) PNIPAAm.

Los termogramas de los copolímeros se presentan agrupados por dosis de radiación empleada (0,3, 0,5, 1 y 5 kGy), para diferentes composiciones de la mezcla de reacción de injerto, en las Figuras 4.11 a 4.14.

Se observan en todos los casos dos degradaciones características correspondientes a cada uno de los homopolímeros que forman los copolímeros. Luego de la deshidratación, la primera etapa de degradación, entre 200 y 300 °C, corresponde al alginato y la segunda etapa, en el rango de 300 a 400 °C corresponde al PNIPAAm el cual se presenta en el copolímero a temperaturas algo inferiores que las obtenidas para el homopolímero puro.

A partir de la pérdida de masa que implica cada una de las dos degradaciones es posible obtener una estimación aproximada de la composición de alginato y PNIPAAm en cada copolímero. A menores contenidos de PNIPAAm la primera etapa involucra una mayor

pérdida de masa (correspondiente al alginato) indicando su mayor proporción en el copolímero. Por otra parte, en estos casos aumenta el contenido de residuo a los 700 °C correspondiente a una mayor proporción de polisacárido.

Para los copolímeros COPI-03 los termogramas presentados en la Figura 4.11 muestran claramente una mayor pérdida de masa en el rango de 300 a 400 °C a medida que aumenta el contenido de PNIPAAm en el copolímero y por consiguiente una disminución en la pérdida de masa en el rango de 200 a 300 °C correspondiente al alginato. El residuo remanente aumenta con el contenido de alginato en el copolímero.

A partir de la Figura 4.12, se observa una semejanza en la composición de los copolímeros COPI-05-50N y COPI-05-67N ya que los termogramas son prácticamente superponibles, lo cual está en acuerdo con la composición obtenida por $^1\text{H-NMR}$ y análisis elemental. El copolímero COPI-05-80N se diferencia de estos últimos, presentando una pérdida de masa más importante correspondiente al PNIPAAm y el menor residuo de los tres copolímeros.

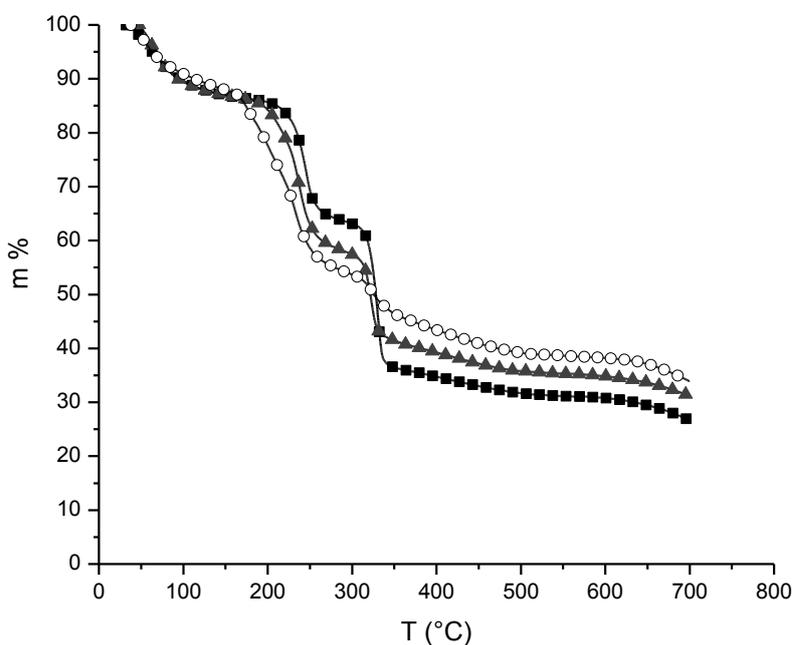


Figura 4.11. Cambios en la masa en función de la temperatura para los copolímeros sintetizados con 0,3 kGy. Símbolos: (○) COPI-03-50N, (▲) COPI-03-67N y (■) COPI-03-80N.

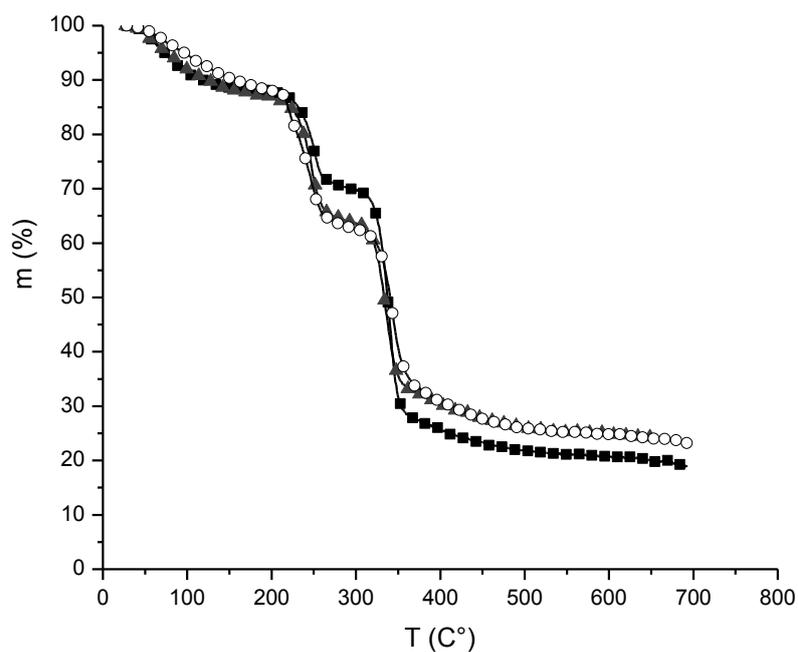


Figura 4.12. Cambios en la masa en función de la temperatura para los copolímeros sintetizados con 0,5 kGy. Símbolos: (○) COPI-05-50N, (▲) COPI-05-67N y (■) COPI-05-80N.

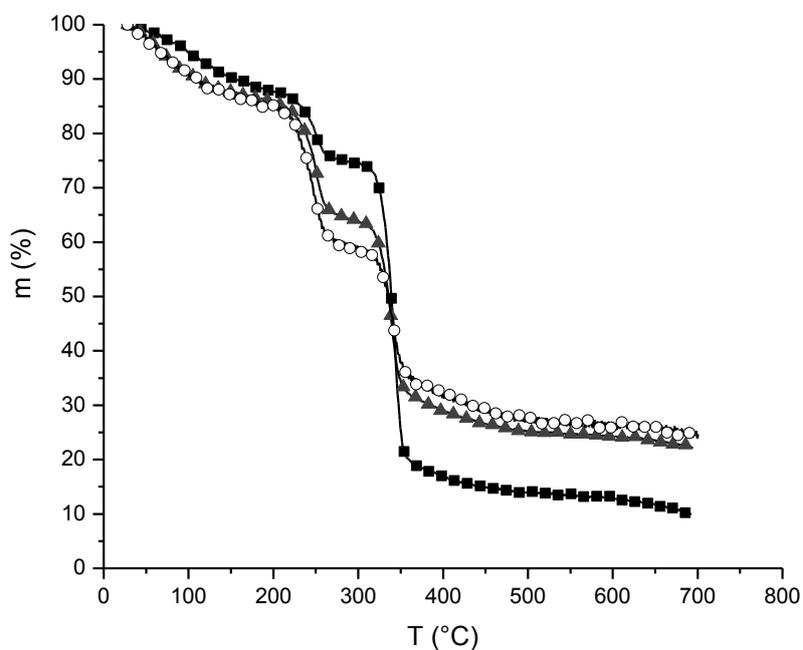


Figura 4.13. Cambios en la masa en función de la temperatura para los copolímeros sintetizados con 1 kGy. Símbolos: (○) COPI-1-50N, (▲) COPI-1-67N y (■) COPI-1-80N.

La Figura 4.13, presenta los termogramas de los copolímeros sintetizados con 1 kGy (COPI-1), análogos a los descritos en la Figura 4.11, donde los tres copolímeros presentan una diferencia en los porcentajes de pérdida de masa. La pérdida de masa correspondiente a la primera degradación, asociada al contenido de alginato en el material, disminuye a medida que la segunda pérdida de masa, asociada a la degradación del PNIPAAm, aumenta. Por otra parte, un aumento de NIPAAm en la mezcla inicial de reacción se traduce en un incremento en el contenido de PNIPAAm en el copolímero obtenido observándose que el COPI-1-80N presenta la pérdida de masa más importante entre 300 y 400 °C y el menor contenido de residuo.

Los copolímeros sintetizados empleando la dosis más alta de radiación gamma estudiada (5 kGy) presentan pérdidas de masa más definidas entre las distintas composiciones, respecto a los termogramas obtenidos con menores dosis. El COPI-5-80N, con el mayor contenido en PNIPAAm, muestra una caída de masa correspondiente al alginato muy pequeña, alrededor del 4 % de la masa inicial, mientras que la pérdida correspondiente al PNIPAAm supera el 80 % de la masa inicial. Por el contrario para el COPI-5-50N la pérdida de masa debida al alginato representa aproximadamente un 26 % mientras que la pérdida de masa debido al PNIPAAm es de aproximadamente un 20 %, siendo el comportamiento del COPI-5-67N intermedio entre los dos extremos.

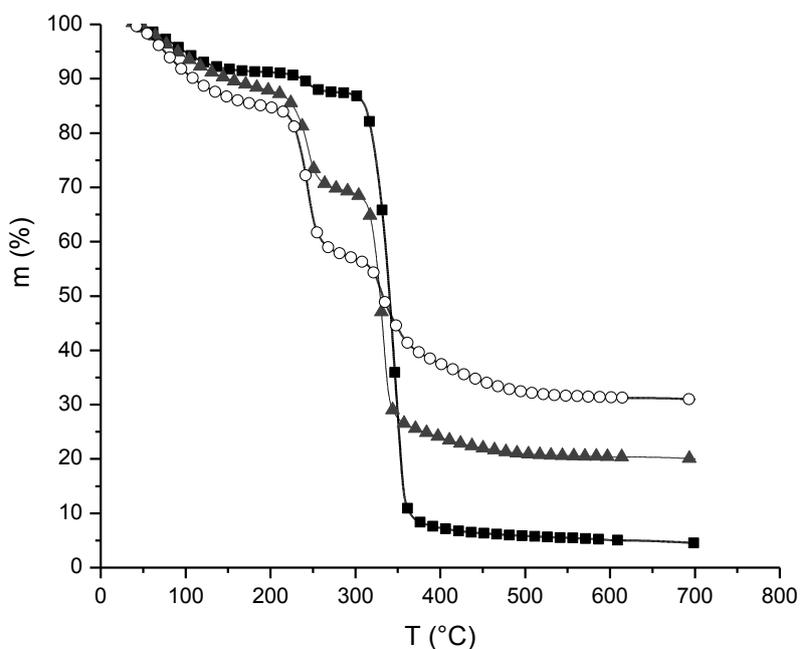


Figura 4.14. Cambios en la masa en función de la temperatura para los copolímeros sintetizados con 5 kGy. Símbolos: (○) COPI-5-50N, (▲) COPI-5-67N y (■) COPI-5-80N.

Los termogramas de los copolímeros sintetizados por irradiación permiten una buena estimación de la composición aproximada de cada material a partir del análisis de la primera derivada de las curvas de masa en función de la temperatura. De ésta manera, en la Tabla 4.10 se presentan los valores de masa porcentual de alginato y PNIPAAm estimados para cada uno de los copolímeros. El residuo remanente a 700 °C se asocia al contenido de alginato ya que para el PNIPAAm el residuo obtenido a esa temperatura es inferior al 3 %. Las curvas de la primera derivada de la masa y la integración de las señales se presentan en el Anexo II.

Los valores de composición expresados en % molar de NIPAAm obtenidos para los materiales sintetizados con distintas dosis de radiación gamma presentan un incremento al aumentar el contenido de NIPAAm en la mezcla de reacción inicial. Nuevamente, el COPI-5-80N presenta una composición superior al 80 % molar de NIPAAm esperado a partir de su composición en la mezcla de reacción, corroborando el valor obtenido por análisis elemental.

Tabla 4.10. Composición de los copolímeros sintetizados por irradiación obtenida a partir de TGA

Polímero	Área alginato	Área PNIPAAm	Residuo a 650°C	Masa total	n_{alginato}	n_{PNIPAAm}	% molar NIPAAm
ALG	30,71		26,6	57,31	0,155	0,000	0,0
PNIPAAm		79,75	2,4	82,15	0,000	0,706	100,0
COPI-03-80N	19,86	26,23	29,45	75,54	0,249	0,232	48,2
COPI-03-67N	26,52	15,91	33,63	76,06	0,304	0,141	31,7
COPI-03-50N	30,51	9,89	37,09	77,49	0,341	0,088	20,4
COPI-05-80N	15,85	47,02	19,91	82,78	0,181	0,416	69,7
COPI-05-67N	21,96	32,67	24,44	79,07	0,234	0,289	55,3
COPI-05-50N	24,87	33,88	24,07	82,82	0,247	0,300	54,8
COPI-1-80N	12,86	58,4	11,76	83,02	0,124	0,517	80,6
COPI-1-67N	22,13	35,15	23,63	80,91	0,231	0,311	57,4
COPI-1-50N	25,06	26,34	25,58	76,98	0,256	0,233	47,7
COPI-5-80N	3,66	81,06	4,89	89,61	0,043	0,717	94,3
COPI-5-67N	18,28	47,5	20,33	86,11	0,195	0,420	68,3
COPI-5-50N	25,76	20,1	31,21	77,07	0,288	0,178	38,2

En la Tabla 4.11 se comparan los resultados de composición de los copolímeros sintetizados obtenidos por 1H-NMR, análisis elemental y TGA. Se observa una muy buena concordancia entre los valores de composición obtenidos para los materiales sintetizados con dosis entre 0,3 y 1 kGy. A través de las diferentes técnicas se observa que para una

misma dosis de radiación, el material presenta un mayor contenido de PNIPAAm a medida que aumenta el contenido de NIPAAm en la mezcla inicial de reacción. A su vez, para las mezclas de reacción con una composición en NIPAAm de un 80 %, un incremento en la dosis aplicada representa un aumento del contenido de NIPAAm en el copolímero obtenido. No así para las composiciones de 50 y 67 % molar NIPAAm en la mezcla inicial de reacción, donde 0,5 kGy parecería ser más efectivo para la copolimerización que 1 kGy.

Tabla 4.11. Composición de los copolímeros sintetizados por irradiación obtenida a partir de las diferentes técnicas empleadas: $^1\text{H-NMR}$, análisis elemental yTGA

	% molar de NIPAAm		
	$^1\text{H-NMR}$	Análisis elemental	TGA
COPI-03-80N	38,0	39,2	48,2
COPI-03-67N	34,7	33,1	31,7
COPI-03-50N	22,3	13,1	20,4
COPI-05-80N	59,0	58,0	69,7
COPI-05-67N	58,1	49,6	55,3
COPI-05-50N	54,4	49,1	54,8
COPI-1-80N	80,5	79,2	80,6
COPI-1-67N	46,0	46,7	57,7
COPI-1-50N	40,3	39,7	47,7
COPI-5-80N	76,7	96,7	94,3
COPI-5-67N	83,7	73,0	68,3
COPI-5-50N	73,5	36,5	38,2

4.3.5. Caracterización térmica: determinación visual de la temperatura de transición

Para el estudio de la temperatura de transición crítica en solución de los materiales injertados por radiación, se prepararon soluciones al 2 % m/m, las cuales fueron colocadas en viales de vidrio incoloro que se sumergieron en un baño de agua termostatzada. La temperatura del agua se fijó inicialmente en $26 \pm 0,4$ °C y fue incrementándose a razón de 1°C hasta alcanzar los 37 °C. En el rango de 30 a 33 °C, donde se esperaba estuviera la transición, se incremento de a 0,5 °C observándose las soluciones a 30,5, 31,5 y 32,5 °C. Se optó por incrementar manualmente la temperatura, manteniendo la misma constante por un tiempo superior a los 20 minutos para asegurar la homogeneidad térmica en todos los tubos.

La temperatura del agua del baño se midió con una termocupla empleando un medidor Digi-Sense[®] Cole Parmer.

En la Figura 4.15 se muestran las fotografías de cada una de las soluciones de copolímero, para cada una de las temperaturas ensayadas. Las soluciones presentaron distintas tonalidades, dependiendo de la composición del copolímero, observándose una coloración más amarillenta en las soluciones cuyo copolímero poseía un mayor contenido de alginato (-50N), para las cuatro dosis estudiadas. El alginato original tiene una coloración ambar-amarillenta la cual puede acentuarse por la formación de dobles enlaces luego de la escisión de cadenas a causa de la irradiación (Nagasawa y col., 2000).

El único de los copolímeros que no formó una solución homogénea fue el COPI-5-80N, correspondiente al mayor contenido de NIPAAm y la mayor dosis; probablemente por los motivos explicados previamente respecto a la formación de entrecruzamientos que disminuyen la solubilidad del mismo. En este caso se observó una fase líquida y una fase gel hinchada insoluble.

En las imágenes de la Figura 4.15 puede observarse que los COPI-03-80N y 67N comienzan a presentar una tenue turbidez blanquecina a los 31,5 °C atravesando la temperatura de transición con un aspecto lechoso alrededor de 32 °C. Para el caso del COPI-03-50N la turbidez comienza a 32 °C, con un incremento paulatino de la opalescencia de la solución, pero no alcanza una apariencia completamente blanca como en los dos casos anteriores. Para los COPI-05; las soluciones no presentan turbidez alguna a los 31,5 °C, pero a los 32 °C la transición se hace evidente con un aumento importante en la opalescencia de cada una de las soluciones. El aspecto lechoso de las soluciones, completamente blancas, impiden el paso de la luz indicando el colapso del PNIPAAm el cual se vuelve hidrófobo.

En el caso de los COPI-1-67N y COPI-1-50N, las soluciones se mantienen sin cambios aparentes en los 31,5 °C, pero a los 32 °C, tienen un cambio apreciable. No ocurre lo mismo con el COPI-1-80N que presenta la transición a los 32,5 °C. Luego de la temperatura de transición las soluciones se vuelven blancas y no translucidas.



Figura 4.15. Estudio térmico de las temperaturas de transición para cada uno de los copolímeros obtenidos al irradiar con dosis de 0,3; 0,5; 1; 5 KGy mezclas de reacción con 80%, 67% y 50% de moles de NIPAAm.

Los copolímeros COPI-5-80N y COPI-5-67N presentan una tenue turbidez alrededor de 32 °C no así el COPI-5-50N. A los 32,5 °C los tres materiales muestran una suave opalescencia que se incrementa conforme aumenta la temperatura. Para el COPI-5-80N la separación de fases ocurre principalmente en el gel hinchado el cual precipita como un material blanco y contraído.

Los valores de temperatura de transición estimados a partir de esta caracterización se presentan en la Tabla 4.12. La temperatura considerada como la de transición es aquella donde se observa el comienzo de la turbidez blanquecina, correspondiente a la redistribución espacial del PNIPAAm para dejar expuestos al medio los grupos metilos hidrófobos.

Tabla 4.12. Temperaturas críticas de transición en solución de los copolímeros obtenidos por radiación gamma estimadas mediante turbidez

Copolímero	0,3 kGy	0,5 kGy	1 kGy	5 kGy
COPI-X-80N	31,5	32,0	32,5	32,0
COPI-X-67N	31,5	32,0	32,0	32,0
COPI-X-50N	32,0	32,0	32,0	33,0

Todos los copolímeros presentan una temperatura crítica en solución en el rango de 31,5 y 33 °C no exhibiendo una marcada dependencia con la composición. El PNIPAAm en solución, presenta un valor de LCST en el rango de 30 a 35 °C, siendo ésta una función de la masa molar (Schild, 1992; De Moura y col., 2006).

4.4 Conclusiones

En este capítulo se estudió la síntesis de copolímeros alginato-g-NIPAAm empleando radiación gamma de ^{60}Co , en vacío y a temperatura ambiente. Se eligieron cuatro dosis de radiación: 0,3, 0,5, 1 y 5 kGy y se estudiaron tres composiciones diferentes de alginato/NIPAAm. La composición de las mezclas de reacción, expresadas en % moles de NIPAAm fueron de 50, 67 y 80 %.

A partir de los resultados obtenidos por las distintas técnicas de caracterización, se pueden enunciar las siguientes conclusiones:

- Para cada dosis de radiación, un aumento en el contenido de NIPAAm en la mezcla inicial de reacción, produjo un mayor porcentaje de injerto a la cadena de alginato.
- Para la mayor concentración de NIPAAm en la mezcla inicial a irradiar (80 %), el aumento de la dosis produce un mayor injerto de PNIPAAm en los copolímeros. Por el

contrario, para la menor concentración (50 %) el grado de injerto disminuyó para las mayores dosis estudiadas (1 y 5 kGy).

Esto implica entonces que, aumentando la dosis de radiación, aumenta el grado de injerto con el aumento en el contenido de NIPAAm en la mezcla de reacción inicial.

- La copolimerización por irradiación presenta una buena eficiencia de injertos, aumentando la cantidad disponible de monómero a injertar y/o la dosis de radiación, dentro del rango de concentraciones y dosis estudiada.
- Las temperaturas de transición de soluciones acuosas al 2 % de los copolímeros presentaron temperaturas críticas de transición en el rango de 31,5 a 33 °C. Por debajo de 31 °C las soluciones fueron transparentes y por encima de la temperatura de transición, las soluciones mostraron la opalescencia característica del colapso hidrofóbico de las cadenas de PNIPAAm. Para la mayor dosis aplicada (5kGy) y la mayor concentración de NIPAAm (80 %) en la mezcla de reacción inicial, el precipitado de aspecto blanco lechoso uniforme, fue indicativo visual del mayor contenido de NIPAAm en este copolímero, confirmando las conclusiones obtenidas por otros métodos de caracterización.
- La optimización de las variables de proceso como dosis, velocidad de dosis, composición de la mezcla inicial de reacción, pueden conducir con relativa facilidad a la obtención de copolímeros con buenas propiedades de acuerdo a la aplicación requerida.

Prácticamente todos los copolímeros obtenidos presentaron importantes grados e hinchamiento en solución fisiológica y respuesta a los cambios de temperatura por lo que fueron empleados en los ensayos preliminares de liberación de principios activos (Capítulo 6).

4.5 Referencias

Cai, H., Zhang, Z. P., Chuan Sun, P., Lin He, B., y Xia Zhu, X. (2005). *Radiation Physics and Chemistry*. **74**, 26–30.

Dincer, S., Kesim, H., Rzaev, Z. M. O., y Pis, E. (2002). *European Polymer Journal*. **38**, 2143–2152.

Grasselli, M., Britos, C. N., Carbajal, M. L., Hidalgo, R., Soto Espinoza, S., Quiroga, F., Trelles, J. A., y Smolko, E. E. (2009). *V Argentine-Chilean Polymer Symposium - ARCHIPOL 09*,.

- Huq, T., Khan, A., Dussault, D., Salmieri, S., Khan, R. a., y Lacroix, M. (2012). *Radiation Physics and Chemistry*. **81**, 945–948.
- Jha, P. K., Jha, R., Gupta, B. L., y Guha, S. K. (2010). *Radiation Physics and Chemistry*. **79**, 663–671.
- Lawrie, G., Keen, I., Drew, B., Chandler-temple, A., Rintoul, L., Fredericks, P., y Grøndahl, L. (2007). *Biomacromolecules*. **8**, 2533–2541.
- Lee, D. W., Choi, W. S., Byun, M. W., Park, H. J., Yu, Y.-M., y Lee, C. M. (2003). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**, 4819–4823.
- Lee, S. B., Park, E. K., Lim, Y. M., Cho, S. K., Kim, S. Y., Lee, Y. M., y Nho, Y. C. (2006). *Journal of Applied Polymer Science*. **100**, 4439–4446.
- Lee, S. B., Seo, S. M., Lim, Y. M., Cho, S. K., y Lee, Y. M. (2004). *Macromolecular Research*. **12**, 269–275.
- Liu, Q., Zhu, Z., Yang, X., Chen, X., y Song, Y. (2007). *Radiation Physics and Chemistry*. **76**, 707–713.
- De Moura, M. R., Aouada, F. A., Guilherme, M. R., Radovanovic, E., Rubira, A. F., y Muniz, E. C. (2006). *Polymer Testing*. **25**, 961–969.
- Nagasawa, N., Mitomo, H., Yoshii, F., y Kume, T. (2000). *Polymer Degradation and Stability*. **69**, 279–285.
- Panda, A., Manohar, S., Sabharwal, S., Bhardwaj, Y., y Majali, A. (2000). *Radiation Physics and Chemistry*. **58**, 101–110.
- Sabharwal, S., Varshney, L., Chaudhari, A. D., y Rammani, S. P. (2004). Radiation processing of polysaccharides Austria.
- Salomonsen, T., Jensen, H. M., Larsen, F. H., Steuernagel, S., y Engelsen, S. B. (2009). *Food Hydrocolloids*. **23**, 1579–1586.
- Sen, G., Singh, R. P., y Pal, S. (2010). *Journal of Applied Polymer Science*. **115**, 63–71.
- Yang, W., Zhang, L., Wu, L., Li, J., Wang, J., Jiang, H., y Li, Y. (2009). *Carbohydrate Polymers*. **77**, 331–337.
- Zhao, Z., Li, Z., Xia, Q., Xi, H., y Lin, Y. (2008). *European Polymer Journal*. **44**, 1217–1224.

CAPÍTULO 5

POLÍMEROS TERMOSENSIBLES AMINOTERMINADOS Y SUS COPOLÍMEROS CON ALGINATO DE SODIO

5.1 Introducción

Las reacciones de polimerización que se llevan a cabo utilizando el método de "Grafting Onto" implican la modificación de la cadena principal para introducir grupos funcionales capaces de reaccionar con polímeros que presentan un final de cadena activo. Los copolímeros obtenidos de ésta manera presentan una estructura definida ya que pueden caracterizarse de manera individual los polímeros de partida, conociéndose entonces la longitud de las cadenas laterales así como el número de cadenas injertadas. Puede lograrse una baja polidispersión aunque la posición de las cadenas injertas será aleatoria a lo largo de la cadena principal (Pitsikalis y col., 1998).

La estructura química del alginato de sodio contiene grupos carboxílicos en cada unidad monomérica del mismo, esto representa una ventaja ya que pueden dar lugar a reacciones de condensación con grupos tales como amidas o alcoholes, generando amidas o ésteres, respectivamente. Por otra parte la telomerización del monómero NIPAAm a partir del uso de hidrocloreuro de aminoetanotiol (AET, HCl) ha sido un método de amplio uso para dar lugar a PNIPAAm amino-terminado (Kaneko y col., 1998; Durand y Hourdet, 1999; Bokias y col., 2001; Ju y col., 2001; Kim y col., 2002; Deng y col., 2008; Vasile y Nita, 2011). A su vez la copolimerización del NIPAAm con otros monómeros de mayor o menor hidrofiliidad, producen un desplazamiento hacia mayor o menores valores de su temperatura crítica de transición (Feil y col., 1993; Ozturk y Okay, 2002; Debord y Lyon, 2003; Gibbons y col., 2006).

En este capítulo se presenta la síntesis y caracterización de polímeros termosensibles, PNIPAAm-NH₂ y P(NIPAAm-co-NTBAAm)-NH₂, y sus respectivos copolímeros de injerto con alginato; la síntesis utilizada implica la reacción de condensación entre los grupos amino y los grupos carboxílicos presentes en el polisacárido.

5.2 Polímeros amino-terminados, PNIPAAm-NH₂

En el capítulo 2 se describió el mecanismo de reacción que presenta la reacción de telomerización para la obtención de PNIPAAm aminoterminado. Dicha reacción presenta una iniciación radicalaria a partir de persulfato de amonio que activa el agente de transferencia de cadena (ATC); el hidrocloreuro de aminoetanotiol. Así, la polimerización comienza y se propaga consumiendo los monómeros NIPAAm. Finalmente se da la recombinación de los radicales.

5.2.1 Materiales

El monómero, N-isopropilacrilamida (NIPAAm), fue provisto por ALDRICH y empleado sin tratamiento previo. El persulfato de amonio (APS) también de ALDRICH, fue utilizado como iniciador y el hidrocioruro de aminoetanotiol (AET, HCl) obtenido de Alfa Aesar, como agente de transferencia de cadena.

Se utilizó alginato de baja viscosidad provisto por Alfa Aesar, con una relación monomérica M/G = 2,2, estimada a partir del espectro de resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-NMR}$) en base a lo expuesto en la literatura (Gomez y col., 2007; Salomonsen y col., 2009), ver Anexo II.

5.2.2 Síntesis de polímeros amino-terminados: PNIPAAm-NH₂

Para la obtención del PNIPAAm-NH₂ se empleó el esquema de reacción propuesto por Durand y Hourdet (1999), descrito en el capítulo 2. Inicialmente, una solución acuosa conteniendo 10 g de NIPAAm (0,088 mol) se purgó durante 30 min con burbujeo de argón. Posteriormente se agregó el iniciador, persulfato de amonio (APS), y el agente de transferencia de cadena, AET, disueltos en agua. Las cantidades de APS y AET fueron calculadas en función de la masa molar de polímero deseada. Se trabajó con una concentración 1,0 M de NIPAAm en el volumen final de reacción. La mezcla de reacción se burbujeó con argón durante 30 minutos luego de la adición del iniciador y del agente de transferencia y se mantuvo bajo atmósfera inerte durante todo el tiempo de reacción. La polimerización se llevó a cabo a durante 24 horas, a temperatura ambiente y con agitación continua. Una vez finalizada la reacción de polimerización se colocó la solución en una membrana de diálisis (corte: 12 kDa) para extraer el NIPAAm no reaccionado. Finalmente, la solución se liofilizó para obtener el PNIPAAm sólido.

Mediante esta técnica se sintetizaron dos PNIPAAm-NH₂ con distintos pesos moleculares variando la cantidad de AET agregado a la mezcla de reacción (Tabla 5.1). Las cantidades utilizadas se basaron en los resultados obtenidos por Durand y Hourdet (1999) en la síntesis de PNIPAAm-NH₂ de distintos pesos moleculares.

Tabla 5.1- Síntesis de PNIPAAm-NH₂.

Muestra	NIPAAm (g)	AET* (mol%)	APS* (mol%)
PNIPAAm-L	10,009	2,5	2
PNIPAAm-H	10,001	1	2

* Respecto al número de moles de NIPAAm.

5.3 Copolímeros P(NIPAAm-co-NTBAAm)-NH₂

La copolimerización de los monómeros NIPAAm con los monómeros NTBAAm de mayor hidrofobicidad permite desplazar a menores valores la temperatura de transición crítica del material obtenido respecto al del homopolímero PNIPAAm. (Feil y col., 1993; Ozturk y Okay, 2002; Debord y Lyon, 2003; Gibbons y col., 2006). De esta manera la copolimerización se vuelve una herramienta útil para la modificación de la LCST del polímero termosensible y su posterior aplicación

5.3.1 Materiales

En la síntesis de copolímeros P(NIPAAm-co-NTBAAm)-NH₂ se emplearon los mismos reactivos utilizados para la síntesis de P(NIPAAm)-NH₂ (ver inciso 5.2.1) agregando el monómero *N-tert*-butilacrilamida (NTBAAm) provisto por Alfa Aesar.

5.3.2 Síntesis de copolímeros P(NIPAAm-co-NTBAAm)-NH₂

Para la síntesis de estos copolímeros se siguió el procedimiento descrito para la síntesis de PNIPAAm-NH₂ (ver inciso 5.2.2). Debido a la hidrofobicidad del monómero NTBAAm, se utilizó una mezcla de agua/dioxano (50/50) como solvente de reacción. Se preparó una solución disolviendo NIPAAm y NTBAAm, en una relación molar 85/15, con una concentración del 10% m/v la cual se purgó durante 30 min con burbujeo de argón (Tabla 5.2). Dado que las constantes de reactividad de ambos monómeros son similares se obtiene un copolímero al azar donde se observan bloques PNIPAAm-PNIPAAm, PNIPAAm-NTBAAm y NTBAAm-NTBAAm, siendo la composición del copolímero la dada por los monómeros en la mezcla de reacción inicial. Un esquema del copolímero obtenido se presenta en la Figura 5.1.

permiten la protonación de los grupos amino terminales, observándose una disminución más pronunciada del pH. Finalmente, la tercera etapa se alcanza cuando el agregado de ácido genera una caída brusca del pH por la presencia de iones hidrógeno libres en solución, una vez que todos los grupos aminos han sido protonados.

En la segunda etapa queda descartada la protonación del nitrógeno que forma la amida ya que, las amidas son débilmente básicas, debido a la interacción mesómera entre el doble enlace carbonílico y el par de electrones del átomo de nitrógeno, según se observa en la Figura 5.2. La carga positiva parcial que resulta sobre el átomo de nitrógeno disminuye su basicidad y la protonación de las amidas, que sólo tiene lugar de manera significativa en condiciones fuertemente ácidas, ocurre sobre el átomo de oxígeno, ya que así la carga del catión resultante queda deslocalizada.

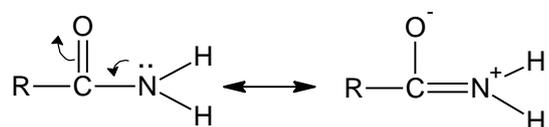


Figura 5.2. Deslocalización de la carga en los grupos aminos.

Las Figuras 5.3, 5.4 y 5.5 presentan las gráficas obtenidas en las titulaciones de los tres polímeros termosensibles sintetizados. En éstas, se presenta la variación del pH de la solución de polímero a medida que se adiciona HCl (V_{HCl}). Por otra parte, se presentan como inserto en cada figura, la derivada del pH en función del volumen de HCl agregado, observándose los dos puntos de equivalencia tomados como referencia para calcular los mL consumidos para la protonación de los grupos amino terminales. El primer punto de equivalencia corresponde a la neutralización del exceso de NaOH, mientras que el segundo punto de equivalencia, claramente observado en el pico agudo de la derivada, corresponde al total de grupos básicos presentes en la solución (NaOH y NH_2 terminales del polímero).

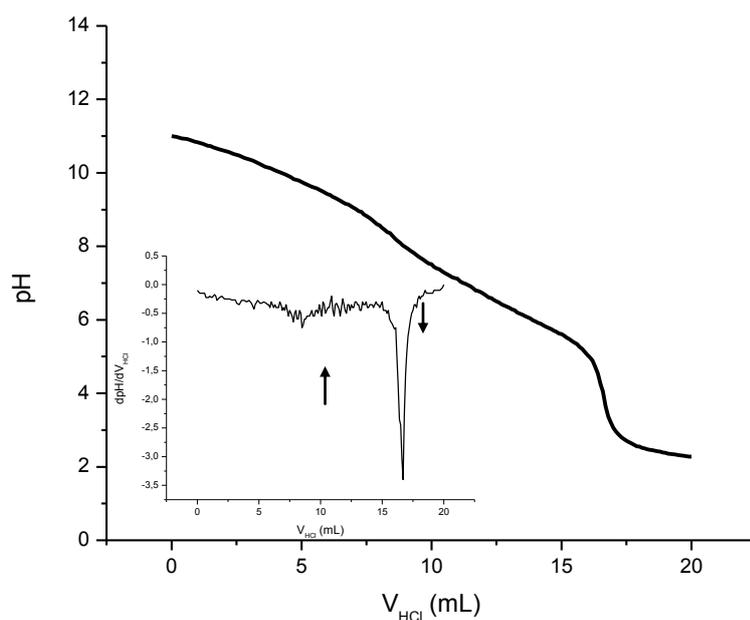


Figura 5.3. Curva de titulación de los grupos amino terminales del PNIPAAm-L.

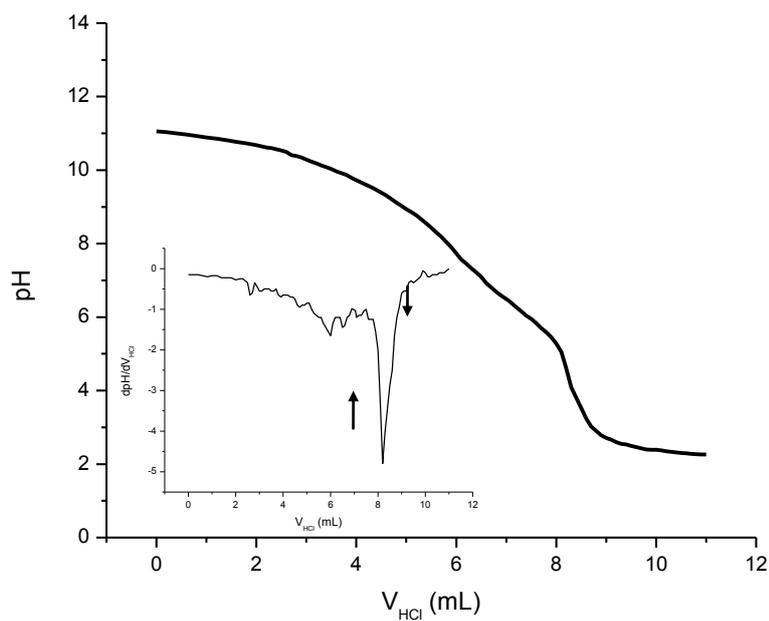


Figura 5.4. Curva de titulación de los grupos amino terminales PNIPAAm-H.

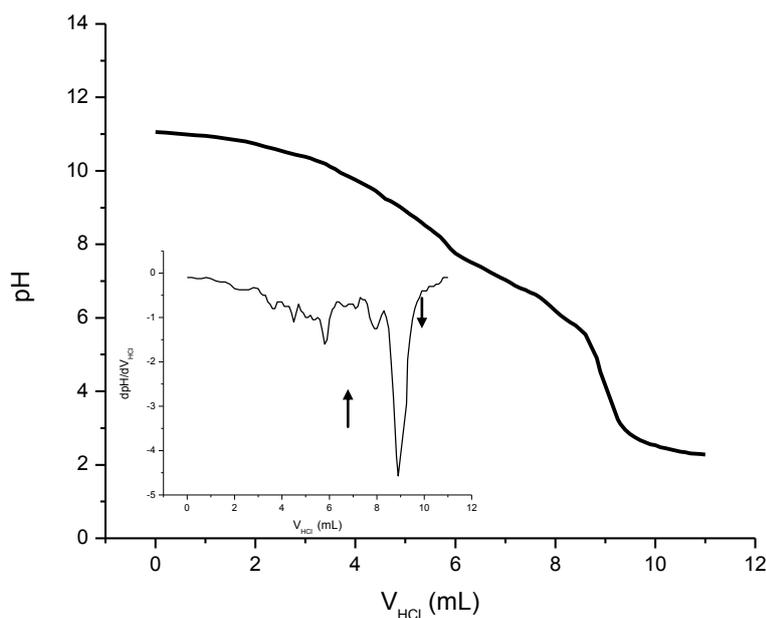


Figura 5.5. Curva de titulación de los grupos amino terminales del P(NIPAAm-*co*-PNTBAAm).

En la Tabla 5.3, se presentan los datos utilizados para el cálculo de la masa molar promedio en número obtenida para cada uno de los polímeros sintetizados utilizando la ecuación 5.1.

$$M_n = \frac{m_{polimero}}{n_{NH_2}} \quad (5.1)$$

Tabla 5.3- Masa molar promedio en número de los polímeros amino-terminados sintetizados.

Polímero	$m_{polim.}$ (g)	$V_{HCl, 0,007M}$ (mL)	n_{NH_2} (moles)	M_n (g/mol)
PNIPAAm-L	0,2499	8,2	$5,74 \cdot 10^{-5}$	4.400
PNIPAAm-H	0,2508	2,2	$1,54 \cdot 10^{-5}$	16.300
P(NIPAAm- <i>co</i> -NTBAAm)	0,2504	3,1	$2,17 \cdot 10^{-5}$	11.500

5.4.2 Caracterización química empleando espectroscopía de $^1\text{H-NMR}$

La caracterización por $^1\text{H-NMR}$ de los polímeros aminoterminados se llevó a cabo en agua deuterada, usando un espectrómetro Bruker Avance DPX 400 MHz (Universidad de Patras, Patras, Grecia). Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente. La composición monomérica del copolímero P(NIPAAm-co-NTBAAm) se calculó a partir del área de integración de las señales observadas en los espectros de $^1\text{H-NMR}$, tal como se reporta en la literatura (Gibbons y col., 2006). El contenido del monómero NTBAAm se determinó a partir de la relación de áreas de las señales de los hidrógenos metílicos del NIPAAm (9 H) y del TBAAm (12 H), resonancias a $\delta_{\text{H}} \sim 0,78-2,18$ ppm en relación al área de la señal propia del monómero NIPAAm del hidrógeno N-CH observado a un desplazamiento $\delta_{\text{H}} \sim 3,78-4$ ppm, Figura 5.6.

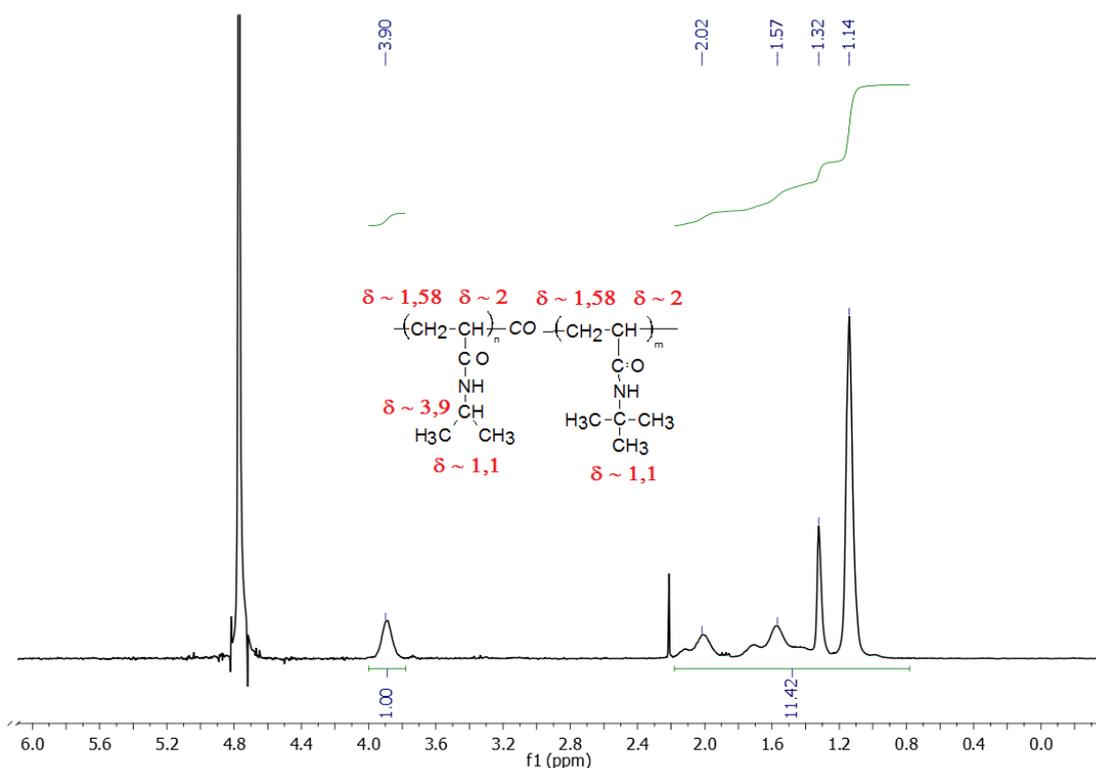


Figura 5.6. Espectro $^1\text{H-NMR}$ para el copolímero P(NIPAAm-co-NTBAAm)-NH₂.

Los cálculos realizados para la determinación de la composición del copolímero se detallan a continuación:

En primer lugar se establece la relación entre el área integrada de las señales que corresponden al hidrogeno del C-H en el NIPAAm, $\delta = 3,9$ ppm, respecto al área de las señales entre $\delta \sim 0,78-2,18$ ppm correspondiente a todos los hidrógenos metílicos

presentes en ambos monómeros, a partir de los valores de integración en la Figura 5.4, se plantea

$$\frac{1 H NIPAAm}{9 H NIPAAm + 12 H NTBAAm} = \frac{1 H NIPAAm}{21 H Totales} = \frac{1}{11,14} = 0,0898$$

Despejando la ecuación anterior se establece una relación entre el número de monómeros de NIPAAm y el número de monómeros de NTBAAm dentro del copolímero.

$$NIPAAm = 0,0898 \times 9 NIPAAm + 0,0898 \times 12 NTBAAm$$

$$(1 - 0,0808)NIPAAm = 1,078 NTBAAm$$

$$0,192 NIPAAm = 1,078 NTBAAm$$

$$NIPAAm = 5,615 NTBAAm$$

Además, la sumatoria total de monómeros tiene que ser igual al entero,

$$NIPAAm + NTBAAm = 1$$

$$6,615 NTBAAm = 1$$

Obteniéndose una composición, que puede ser tomada como composición molar de cada uno de los reactivos. Siendo,

$$NTBAAm = 0,151$$

$$NIPAAm = 0,849$$

El resultado será expresado en porcentajes molares, tal que la composición represente los moles de monómeros de NTBAAm (o NIPAAm) por 100 moles de monómeros totales. La composición obtenida entonces es,

$$NTBAAm = 15,1 \%$$

$$NIPAAm = 84,9 \%$$

Para los cálculos que seguirán en este capítulo fue necesario estimar un valor de masa molar promedio de la unidad repetitiva, la cual fue estimada a partir de su composición:

$$MNIPAAm = 113,16 \text{ g/mol}$$

$$MNTBAAm = 127,18 \text{ g/mol}$$

$$M_{(NIPAAm-co-NTBAAm)} = 113,16 * 0,849 + 127,18 * 0,151 = 115,28 \text{ g/mol}$$

5.4.3 Caracterización térmica empleando TGA.

El análisis termogravimétrico de las muestras se realizó utilizando un equipo Discovery TGATM. Se registró la variación de masa en el rango de 30 a 800 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min y con una caudal de nitrógeno gaseoso de 40 mL/min.

En los capítulos anteriores se presentó el termograma correspondiente al homopolímero P(NIPAAm), observándose una pérdida de masa inicial debido a la humedad de la muestra hasta los 160 °C y luego una caída abrupta en la masa en el rango de temperatura de 350-400 °C, correspondiente a la degradación del PNIPAAm, quedando a 650°C un residuo inferior al 5 % de la masa inicial.

El termograma para el copolímero P(NIPAAm-co-NTBAAm), arrojó los mismos resultados, situación esperable debido a la semejanza química de los monómeros que lo componen (Figura 5.7).

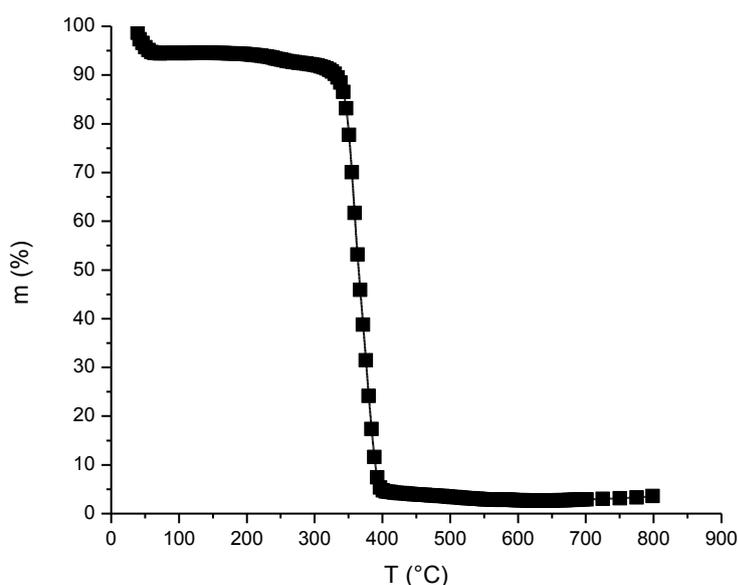


Figura 5.7. Termograma obtenido para el copolímero P(NIPAAm-co-NTBAAm).

5.5 Copolímeros de injerto, alginato-g-PNIPAAm y alginato-g-P(NIPAAm-co-NTBAAm)

Los copolímeros de injerto se obtuvieron mediante la reacción de condensación entre los grupos carboxilo del alginato y los amino terminal de los polímeros termosensibles previamente sintetizados. La copolimerización se llevó a cabo utilizando EDC como agente de acoplamiento. El mecanismo de reacción fue descrito en el capítulo 2. Estos

copolímeros permiten incorporar al alginato, el cual es un material biodegradable y no tóxico, cadenas laterales de polímeros termosensibles. De esta manera se logra, por combinación de sus propiedades individuales, obtener un material de estructura biodegradable que presente un comportamiento de estímulo-respuesta frente a cambios en la temperatura del entorno (Zhang y col., 2009).

5.5.1 Materiales

En la síntesis de los copolímeros de injerto se emplearon los polímeros amino-terminados PNIPAAm-NH₂ y P(NIPAAm-co-NTBAAm)-NH₂ previamente descritos, alginato de sodio de baja viscosidad provisto por Alfa Aesar, con una relación M/G = 2,2 (estimada a partir del espectro de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-NMR) en base a lo reportado en la literatura (Gomez y col., 2007; Salomonsen y col., 2009) según se indica en el Anexo II) e hidrocloruro de 1-(3-dimetilamino)propil-3-etil carbodiimida (EDC) obtenido de Alfa Aesar.

5.5.2 Síntesis de los copolímeros (alginato-g-PNIPAAm)

Para llevar a cabo la reacción de acoplamiento se preparó una solución acuosa de alginato 1,5 %m/m. A esta solución se le añadió el PNIPAAm previamente disuelto y la mezcla se dejó bajo agitación al menos 30 minutos con el fin de homogeneizarla. La cantidad de alginato y PNIPAAm utilizados fue 4 g y 1 g respectivamente, dichos valores corresponden a una relación en porcentaje molar de unidades repetitivas de 69,5/30,5. Los detalles de las síntesis llevadas a cabo se resumen en la Tabla 5.4. El EDC disuelto en una pequeña cantidad de agua se añadió, en tres oportunidades al inicio de la reacción, a las 8 horas y a las 20 horas del primer agregado y la reacción se dejó proceder bajo agitación durante 4 días, a temperatura ambiente. La cantidad añadida cada vez varió entre 0,1 y 0,15 g, siendo la cantidad total agregada la necesaria para asegurar un exceso de agente de acoplamiento respecto a la cantidad de cadenas de PNIPAAm-NH₂ presentes en la mezcla de reacción. Una vez finalizada la reacción la mezcla se liofilizó y el producto sólido obtenido se lavó con metanol en soxhlet durante al menos 30 horas, para eliminar el PNIPAAm-NH₂ no reaccionado. Finalmente se dejó secar bajo campana.

5.5.3 Síntesis del copolímero alginato-*g*-P(NIPAAm-*co*-NTBAAm)

Para llevar a cabo la reacción de acoplamiento entre el alginato y el copolímero P(NIPAAm-*co*-NTBAAm)-NH₂ fue necesario una modificación al proceso descrito en 5.5.2. Debido a la hidrofobicidad del copolímero, se utilizó como solvente de reacción una mezcla de agua/dioxano. En este caso, se eligió una composición 65 % de agua, 35 % de dioxano, siendo la mezcla con mayor contenido de dioxano que permitió a la vez una buena solubilización del alginato. Además, el balón que contenía la mezcla de reacción se sumergió en un baño de agua a 20 °C para asegurarse estar por debajo de la LCST del polímero termosensible.

La mezcla de reacción consistió en una relación 4:1 en gramos de alginato y P(NIPAAm-*co*-NTBAAm)-NH₂ (Tabla 5.4), dichos valores corresponden a una relación en porcentaje molar de unidades repetitivas de 70/30. La extracción del polímero no reaccionado se realizó de igual manera con metanol en un equipo soxhlet, ya que el metanol es también un buen solvente para el copolímero P(NIPAAm-*co*-NTBAAm)-NH₂.

La Tabla 5.4 presenta las condiciones de síntesis de los tres copolímeros obtenidos en éste capítulo. Su nomenclatura se basa en las tres letras COP seguidas de otra letra que representa su estructura molecular del polímero termosensible injertado, siendo COP-L el copolímero de injerto con el PNIPAAm de bajo peso molecular (PNIPAAm-L), COP-H el copolímero alginato-*g*-PNIPAAm-H y COP-C el copolímero obtenido por el injerto del copolímero P(NIPAAm-*co*-NTBAAm) sobre el alginato.

Tabla 5.4. Síntesis de copolímeros de injerto

Polímero	Materiales de partida		Solvente	m_{EDC}
	m_{Alginato} (g)	m_{PNIPAAm-L} (g)		(g)
COP-L			Agua	1° 0,137
	4,007	1,001	tridestilada	2° 0,138
				3° 0,137
COP-H			Agua	1° 0,102
	4,001	1,002	tridestilada	2° 0,101
				3° 0,100
COP-C		m_{P(NIPAAm-<i>co</i>-NTBAAm)} (g)	Agua/Dioxano	1° 0,100
			65/35	2° 0,111
	2,4021	0,6027		3° 0,101

5.6 Caracterización de los copolímeros de injerto

5.6.1 Caracterización química empleando espectroscopía de $^1\text{H-NMR}$

La composición de los copolímeros de injerto: COP-L, COP-H y COP-C se obtuvo a partir de la integración de las señales características en los espectros de NMR; los espectros respectivos junto con los cálculos realizados se presentan en el Anexo II.

Los valores estimados para dichas composiciones se presentan en la Tabla 5.5. Los mismos muestran una buena correspondencia entre la composición obtenida y la de la mezcla de reacción.

Tabla 5.5. Composición de copolímeros de injerto calculada a partir $^1\text{H-NMR}$

Copolímero	% molar NIPAAm	% molar alginato
COP-L	28,0	72,0
COP-H	34,7	65,3
COP-C	27,0	73,0

5.6.2 Caracterización química empleando FTIR

Los espectros infrarrojos con Transformada de Fourier (FTIR) se registraron en un espectrofotómetro Nicolet 520 por la acumulación de 30 barridos, con una resolución de 4 cm^{-1} . Las muestras fueron preparadas en películas y en pastillas de KBr. Las películas o films a partir del método de casting (evaporación del solvente) y las pastillas de bromuro de potasio, utilizando concentraciones de 1 %m/m de copolímero.

En la Figura 5.8 se presentan los espectros FTIR para alginato, PNIPAAm-L y el copolímero de injerto obtenido, COP-L. Los espectros se encuentran desplazados en el eje de las abscisas para poder observar la correspondencia entre las señales de cada polímero.

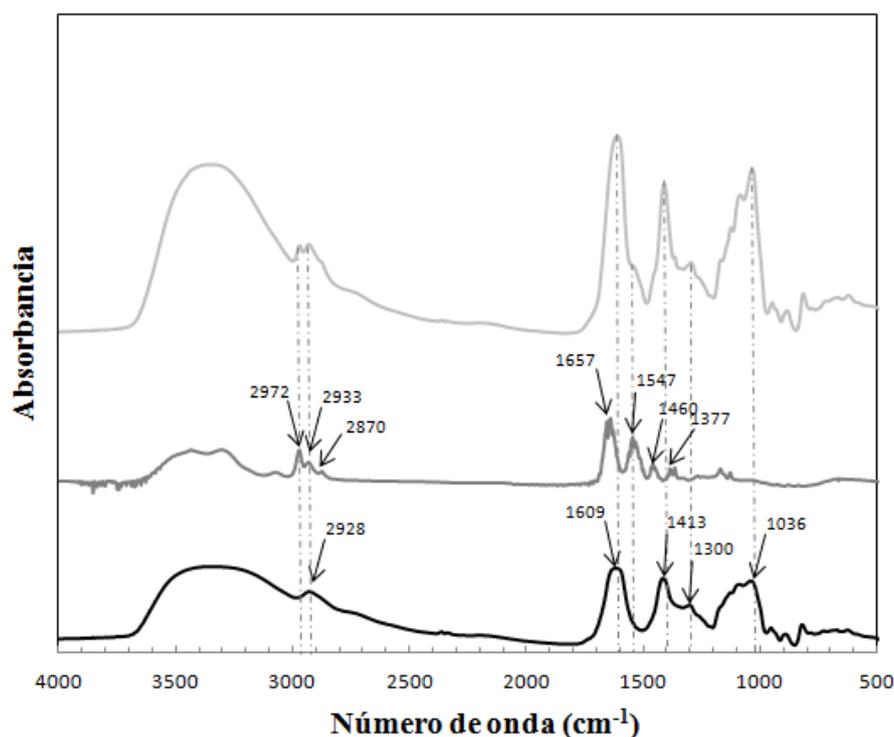


Figura 5.8. Espectros FTIR obtenidos para el alginato (inferior), el homopolímero PNIPAAm-L (medio) y el copolímero de injerto COP-L (superior).

El alginato presenta señales características a 3400 cm^{-1} debido a los grupos oxhidrilos ($\nu_{\text{O-H}}$), a 2928 cm^{-1} aparece la vibración de los enlaces C-H ($\nu_{\text{C-H}}$) y en 1609 y 1413 cm^{-1} se observan dos fuertes picos atribuidos al estiramiento asimétrico y simétrico de los grupos carboxílicos ($\nu^{\text{as}}_{\text{COO}^-}$; $\nu^{\text{s}}_{\text{COO}^-}$). En el rango de longitudes de ondas comprendido entre 1050 y $\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ se observan las señales correspondientes a las vibraciones simétricas y asimétricas de los enlaces C-O-C ($\nu_{\text{C-O-C}}$; $\nu^{\text{as}}_{\text{C-O-C}}$) propias de los anillos de azúcares. A 1300 cm^{-1} aparece una banda débil de la vibración del enlace C-O ($\nu_{\text{C-O}}$). Para el PNIPAAm-L las bandas a 2972 cm^{-1} y 2870 cm^{-1} corresponden a las vibraciones simétricas y asimétricas de los grupos metilos (ν_{CH_3} ; $\nu^{\text{as}}_{\text{CH}_3}$), respectivamente. La banda a 2933 cm^{-1} también corresponde al enlace metilo (ν_{CH_3}). La banda típica amida I ($\nu_{\text{C=O}}$) se presenta a 1657 cm^{-1} y la amida II ($\delta_{\text{N-H}}$) a 1547 cm^{-1} . Las bandas de deformación asimétrica y simétrica de los grupos geminales se observan como una señal débil a 1460 cm^{-1} ($\delta^{\text{as}}_{\text{CH}_3}$) y un doble pico a 1377 cm^{-1} ($\delta^{\text{s}}_{\text{CH}_3}$).

En el espectro FTIR obtenido para el COP-L las bandas de absorción características del alginato son fácilmente observadas, mientras que las bandas típicas para el PNIPAAm son menos pronunciadas. Por ejemplo, la señal amida II ($\delta_{\text{N-H}}$) a 1535

cm^{-1} aparece como un hombro de la banda de amida I ($\nu_{\text{C=O}}$) se presenta a 1657 cm^{-1} . A su vez esta última se superpone con la señal de los grupos carboxílicos del alginato. El pico a 2969 cm^{-1} debido a la vibración del grupo metilo (ν_{CH_3}) se observa como un pico individual adyacente a la banda correspondiente a los C-H ($\nu_{\text{C-H}}$) del alginato.

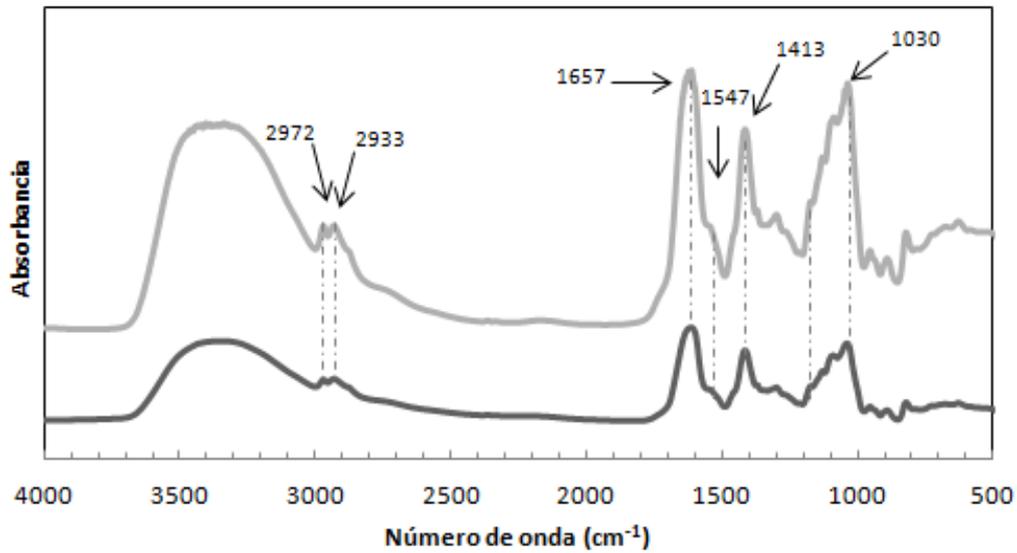


Figura 5.9. Comparación de espectros FTIR obtenidos para los copolímero de injerto COP-L (inferior) y COP-H (superior).

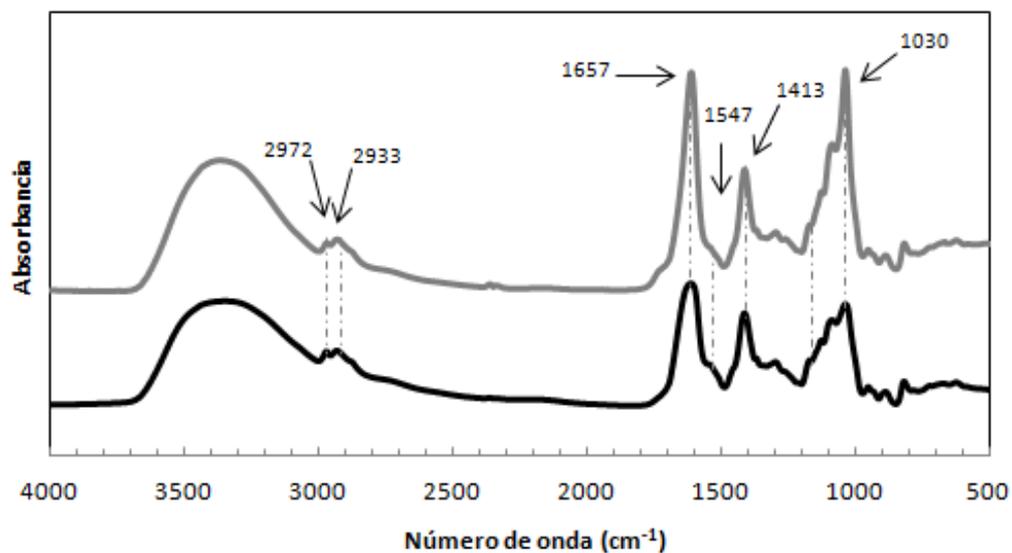


Figura 5.10. Comparación de espectros FTIR obtenidos para los copolímero de injerto COP-L (inferior) y COP-C (superior).

En las Figuras 5.9 y 5.10, se comparan los espectros obtenidos para el COP-H y COP-C frente al espectro del COP-L, respectivamente. La similitud en los espectros es la esperada debido a que la estructura de los tres copolímeros es equivalente en grupos

funcionales y en composición. Se realizó una comparación entre la altura de dos picos en cada uno de los espectros, los picos elegidos aparecen a 2972 cm^{-1} propio de los grupos metílicos (ν_{CH_3}) de los monómeros NIPAAm y NTBAAm y a 1413 cm^{-1} correspondiente a la vibración $\nu^{\text{s}}_{\text{COO}^-}$ en el alginato. De las relaciones obtenidas (Tabla 5.6) puede concluirse que mediante FTIR prácticamente no se observan diferencias en cuanto a la composición de los tres copolímeros de injerto sintetizados.

Tabla 5.6. Relación de alturas de picos característicos dentro del espectro FTIR.

Polímero	$A_{2972\text{ cm}^{-1}}$	$A_{1413\text{ cm}^{-1}}$	$A_{2972\text{ cm}^{-1}}/A_{1413\text{ cm}^{-1}}$
COP-L	0,558	0,945	0,59
COP-H	1,599	2,882	0,55
COP-C	0,659	1,409	0,47

5.6.3 Caracterización térmica empleando TGA

La caracterización térmica de los copolímeros de injerto se realizó en las mismas condiciones que los polímeros amino-terminados sintetizados, atmósfera de nitrógeno (40 mL/min) con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min en un equipo Discovery TGATM. Los termogramas obtenidos se presentan en la Figura 5.11. En ellos se observan claramente tres etapas que implican pérdida de masa y que permiten analizar características propias de estos copolímeros de injerto.

La primera etapa, correspondiente a la deshidratación de la muestra se extiende hasta aproximadamente los 150 °C , la segunda pérdida de masa observada corresponde a la degradación del alginato en el rango de temperaturas entre 200 y 300 °C . Finalmente, la pérdida de masa que aparece a $\sim 350\text{ °C}$ se asocia a la degradación del polímero termosensible (PNIPAAm o P(NIPAAm-co-NTBAAm). La segunda etapa de degradación de los copolímeros está en acuerdo con la composición de los mismos (aproximadamente un 70 mol% de alginato).

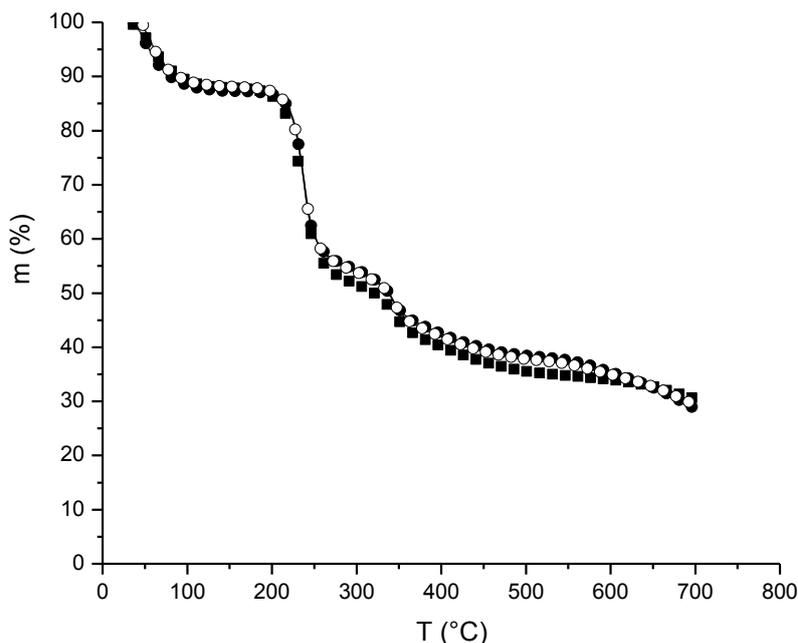


Figura 5.11. Termogramas obtenidos para los copolímeros de injerto: Símbolos: (●) COP-L, (○) COP-H y (■) COP-C.

Para el cálculo de la composición de cada copolímero se empleó la derivada de la masa en función de la temperatura. A partir de la integración del área de los picos correspondientes a las degradaciones propias de cada componente se logró hacer una relación de masas entre el alginato y el polímero injertado. Los cálculos se resumen en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7. Composición calculada a partir de TGA.

Polímero	Área alginato	Área P. Termos.	Residuo a 650°C	Masa total	Moles alginato	Moles P. Termos.	% molar alginato	% molar P. Termosensible
COP-L	32,0	14,9	32,5	79,4	0,326	0,132	71,2	28,8
COP-H	33,2	14,5	32,7	80,4	0,333	0,128	72,2	27,8
COP-C	35,8	14,6	32,7	83,1	0,346	0,129	72,9	27,1

Los valores obtenidos por TGA para la composición molar de los copolímeros sintetizados corroboran los valores obtenidos a partir de la espectroscopía de ¹H-NMR. Se obtuvieron valores altamente comparables entre sí los cuales están a su vez en concordancia con la composición inicial de los polímeros empleados en la síntesis de los mismos.

5.6.4 Determinación de la temperatura crítica en solución: determinación del punto de nube

Las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas del PNIPAAm se vuelven más importantes con el aumento en la temperatura, resultando en la formación de extensos agregados los cuales provocan la disminución de la transmitancia de luz dando lugar a una temperatura crítica (T_{cp}) denominada punto de nube (cloud point). Estos agregados moleculares se producen en mayor proporción si las cadenas del polímero son más largas por lo que la temperatura crítica o punto de nube se observa a menores temperaturas. La T_{cp} disminuye con el incremento de la masa molecular del polímero. Con el aumento del grado de polimerización aumentan tanto la frecuencia de colisión como la probabilidad de adhesión de los segmentos hidrofóbicos. Así, los agregados ocurren a menores temperaturas, es decir, se observa una disminución en los puntos de nube (Pamies y col., 2009).

La transición de fase que experimentan los polímeros sintetizados, en soluciones acuosas, se estudió a partir de mediciones de transmitancia óptica a una longitud de onda de 490 nm en una celda de cuarzo de 1 cm de espesor utilizando un espectrofotómetro Hitachi U-200. Se emplearon soluciones 0,1 %m/m de los polímeros y como referencia se empleó agua deionizada. Se midió la transmitancia de las soluciones en función de la temperatura a una velocidad de calentamiento de 1 °C/min y se calculó el punto de nube como la temperatura a la cual se presenta el punto de inflexión en la curva de transmitancia en función de la temperatura. Los valores iniciales de transmitancia medidos se encontraron por encima del 90 % y el punto de nube implicó una marcada reducción en dicho valor (Yoo y col., 1997; Yin y col., 2006). Para algunas muestras el punto de nube obtenido por espectrofotometría fue confirmado por dispersión de luz estática (SLS) en un equipo Brookhaven empleando un láser He-Ne (632,8 nm) y un goniómetro BI-200SM con control de temperatura.

En la Tabla 5.8 se presentan los valores de temperatura crítica (puntos de nube) obtenidos a partir de medidas de transmitancia.

Tabla 5.8. Temperatura de punto de nube obtenida mediante transmitancia de luz a 490 nm

Polímero	T_{cp} (°C)	Copolímeros de injerto	T_{cp} (°C)
PNIPAAm-L	36	COP-L	37
PNIPAAm-H	35	COP-H	35
P(NIPAAm-co-NTBAAm)	26	COP-C	27

Los polímeros basados en PNIPAAm son termosensibles y se espera que presenten una menor T_{cp} a medida que aumenta la masa molar o se incorporan en la cadena monómeros hidrofóbicos (Debord y Lyon, 2003; Pamies y col., 2009). La temperatura de transición o punto de nube es independiente de la concentración de la solución y de la longitud de cadena para polímeros de PNIPAAm con altas masas molares (Otake y col., 1990; Schild y Tirrell, 1990). Por el contrario, polímeros con baja masa molar presentan una temperatura de punto de nube que es función de la concentración y del largo de cadena (Boutris y col., 1997; Pamies y col., 2009).

Para masas molares de PNIPAAm mayores a 50.000 g/mol y concentraciones en el rango de 0,01 a 1 % m/m, fue observado que la LCST presentada por las soluciones acuosas y consecuentemente su T_{cp} , son independientes de la masa molar del polímero estudiado así como de la concentración de éste en la solución (Fujishige y col., 1989)

Los homopolímeros PNIPAAm-H y PNIPAAm-L presentaron temperaturas de punto de nube de 35 y 36 °C las cuales están en muy buen acuerdo con las reportadas en la literatura para este polímero (Schild, 1992; de Moura y col., 2006). Por otra parte el copolímero P(NIPAAm-co-NTBAAm), conteniendo un 15 mol% de NTBAAm, presentó una temperatura de punto de nube de 26 °C lo cual es 10 °C menor que el PNIPAAm-H de similar masa molar. Esta disminución en la temperatura de transición se debe al mayor número de segmentos hidrofóbicos presentes en la molécula debido a la introducción del monómero NTBAAm. La LCST depende de un balance hidrofóbico/hidrofílico dentro del polímero y en consecuencia se ve modificado por la incorporación de monómeros hidrofóbicos como es el caso del NTBAAm (Debord y Lyon, 2003).

Los valores observados de T_{cp} para los copolímeros de injerto basados en alginato son coherentes con las T_{cp} de los polímeros termosensibles injertados en cada caso. El aumento en un grado en alguno de los casos pudiera justificarse desde dos puntos de vista. Por un lado, la solución del copolímero de injerto posee una concentración de PNIPAAm o P(NIPAAm-co-NTBAAm) menor a 0,1 %, con lo cual es razonable que la T_{cp} aumente al disminuir la concentración. Por otro lado, el alginato debido a su carácter hidrofílico hace que la transición ocurra a una mayor temperatura. De todos modos la diferencia observada está dentro del error experimental asociado a la medición.

La Figura 5.12 muestra las curvas obtenidas por turbidimetría y SLS para el polímero PNIPAAm-L, el copolímero de injerto COP-L y una mezcla física de alginato y PNIPAAm-L de composición equivalente a la del copolímero (4:1 en masa).

Inicialmente, a baja temperatura, las soluciones se presentan transparentes y traslucidas, las moléculas en solución tienen dimensiones tales que permiten el paso de la luz con una baja dispersión. Cuando se alcanza la temperatura de transición y se produce el punto de nube la transmitancia decrece abruptamente y la intensidad de luz dispersada es diez veces mayor que su valor inicial. A la T_{cp} , tiene lugar la transición de fase y la agregación de las moléculas es la responsable del incremento en la dispersión y de la disminución en la transmitancia. Los copolímeros de injerto presentan, debido a la presencia del alginato, un cambio menos abrupto al alcanzar la T_{cp} , dado que la copolimerización atenúa la respuesta frente a la temperatura debido a una modificación en el balance hidrófobo/hidrófilo.

En la Figura 5.12, puede observarse que el comportamiento de la mezcla física es similar al del PNIPAAm-L, presentando no sólo una marcada caída de la transmitancia en la temperatura de transición, sino también un incremento de la luz dispersada. El COP-L, por el contrario, muestra un cambio menos pronunciado en los parámetros medidos lo cual puede atribuirse a que el colapso de las cadenas de PNIPAAm injertadas es obstaculizado por las cadenas de alginato. Por esta razón, la agregación no se produce tan fácilmente y el cambio en la luz transmitida así como en la luz dispersada es más gradual con la temperatura.

Posteriormente, se analizó también como afectaba el cambio de la concentración en la temperatura de punto de nube para el PNIPAAm-L. Las soluciones acuosas de concentración 0,1 % (m/m) y 0,02 % (m/m) presentaron valores de T_{cp} de 36 °C y 39 °C respectivamente, además la solución más concentrada presentó una respuesta a la temperatura más abrupta alcanzado el punto de nube.

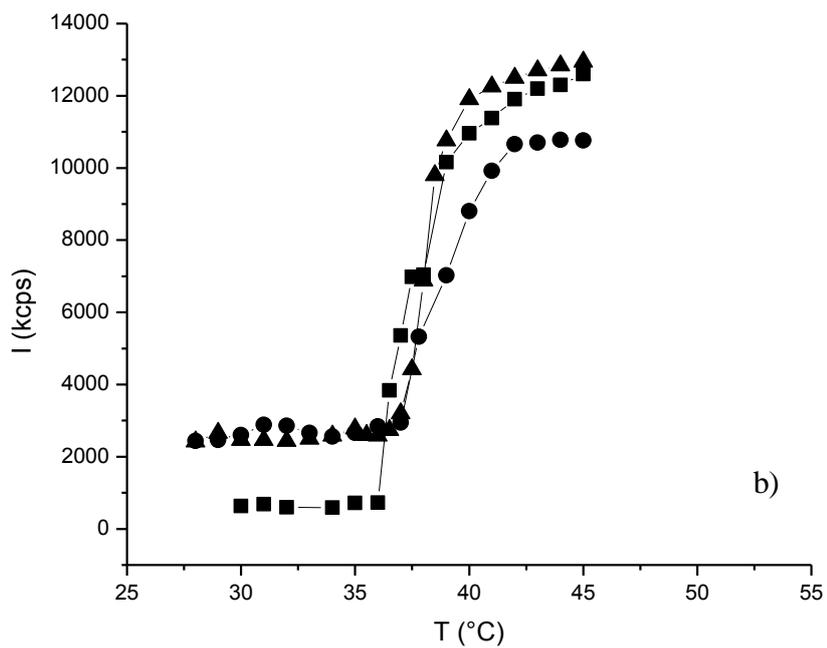
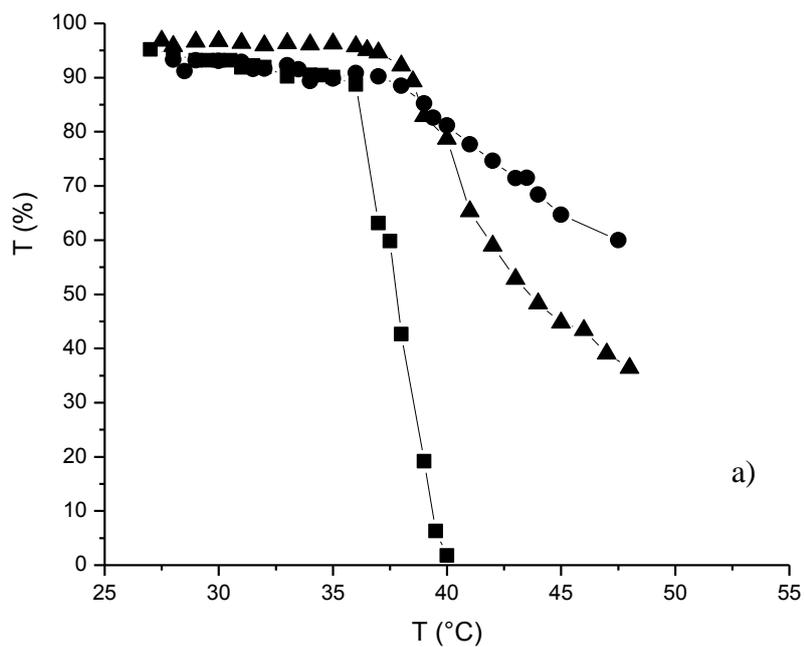


Figura 5.12. a) Transmisancia a $\lambda = 490$ nm y b) Intensidad de luz dispersada (SLS) en función de la temperatura. Símbolos: (■) PNIPAAm-L, (●) COP-L y (▲) mezcla física de alginato y PNIPAAm-L 4:1.

5.6.5 Caracterización reológica

En esta sección se estudiaron las propiedades reológicas de soluciones acuosas de los copolímeros descritos, teniendo en cuenta la influencia de la temperatura, la concentración, la fuerza iónica y el contenido de PNIPAAm y se analizaron los resultados obtenidos en función de la estructura de los mismos.

En los polímeros termosensibles, se observa un cambio de estructura con el aumento de la temperatura que se refleja en las propiedades reológicas. Sin embargo, es importante analizar si este reordenamiento de la estructura conduce a una separación de fases o a un comportamiento termoasociativo.

La mayoría de las moléculas orgánicas siguen la ley de Arrhenius presentando una disminución de sus propiedades reológicas al aumentar la temperatura, pero hay ciertas macromoléculas denominadas termoasociativas o polímeros thermo-thickening, que presentan un comportamiento opuesto (Karakasyan y col., 2008).

Es importante destacar que aún cuando estos polímeros presentan estructuras químicas diferentes, sus propiedades de asociación siguen reglas similares. Tal que, a baja temperatura, las moléculas de agua disminuyen su entropía formando estructuras "ice-like" alrededor de los grupos no polares de las cadenas poliméricas. Cuando la temperatura aumenta, las vibraciones térmicas desestabilizan dichas estructuras y su ruptura conduce a la agregación de los grupos no polares, induciendo la autoasociación de las macromoléculas. Si hay un balance apropiado entre el número de grupos no polares y la contraparte soluble en agua, puede formarse una red física siempre y cuando la concentración sea suficientemente alta como para que la asociación se propague en todo el volumen (Otake y col., 1990; Karakasyan y col., 2008).

En este contexto, los estudios reológicos desarrollados en éste capítulo se enfocaron en determinar el posible comportamiento thermo-thickening de los copolímeros de alginato y PNIPAAm sintetizados.

5.6.5.1 Preparación de las soluciones

Para los ensayos reológicos se prepararon soluciones acuosas de los copolímeros de injerto sintetizados en este capítulo. Para la preparación de las mismas se utilizó agua tridestilada como solvente y sulfato de sodio para cambiar la fuerza iónica de la solución. Para cada solución, el copolímero y el solvente (agua o solución salina) fueron pesados, mezclados y homogeneizados con la ayuda del uso de una centrífuga. Los

tubos que contenían las muestras se centrifugaron cambiando el sentido de rotación de los mismos, en forma alternada. Se trabajó con concentraciones expresadas en por ciento en masa (% m/m) mientras que la concentración de sal se expresó en moles/L (M).

5.6.5.2 Ensayos reológicos

Las propiedades viscoelásticas de los copolímeros de injerto fueron estudiadas en un reómetro AR2000 (TA Instrument) equipado con una geometría de cono y plato Peltier (diámetro 20 mm, ángulo de $3^{\circ} 59' 49''$). Los experimentos se llevaron a cabo en la zona de viscoelasticidad lineal para lo cual se realizó inicialmente un barrido de tensiones entre 0,05 y 100 Pa utilizando una frecuencia de 0,1 Hz. La temperatura se controló con un sistema Julabo AWC 100 que permite una recirculación del agua termostatzada a través del sistema de plato Peltier. Se tuvo particular cuidado en evitar la deshidratación de la muestra, para lo cual se contó con una tapa especialmente diseñada para impedir la pérdida de agua por evaporación durante el tiempo del ensayo. En la Figura 5.13 se presentan dos fotografías tomadas del reómetro utilizado. En las mismas se observa el sistema de plato Peltier, la tapa utilizada para evitar la deshidratación de las muestras y el modo de colocación de las muestras estudiadas.



Figura 5.13. Reómetro AR2000 TA Instrument con plato Peltier termoregulado y tapa cobertora. Colocación de la muestra.

Se realizaron barridos de temperatura entre 10 °C y 60 °C a 1 °C/min y a frecuencia constante (0,1 y 0,5 Hz) o esfuerzo de corte constante (entre 0,38 y 1 Pa). En estas condiciones se midió el módulo elástico (G') y viscoso (G'') en función de la temperatura y a partir de ellos se calculó la viscosidad compleja (η^*).

5.6.5.3 Efecto de la temperatura

En la Figura 5.14 se presenta una curva típica de la variación de los módulos, G' y G'' en función de la temperatura.

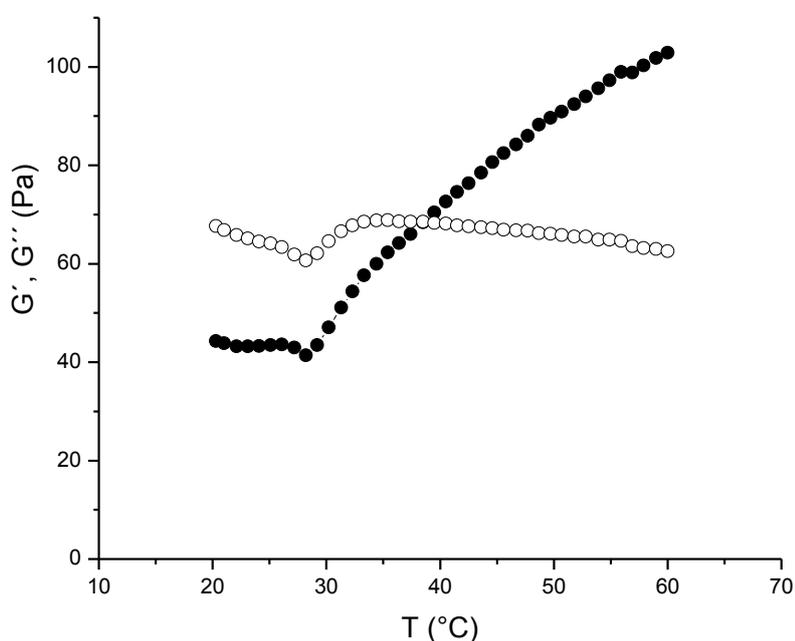


Figura 5.14. Propiedades viscoelásticas de una solución acuosa del copolímero COP-H al 10 %m/m a 0,1 Hz y 0,38 Pa, Símbolos: (●) G' y (○) G'' .

Este comportamiento es similar para los tres copolímeros de injerto estudiados (COP-L, COP-H y COP-C) observándose que la variación de los módulos G' y G'' frente al aumento de temperatura presenta dos zonas. Una primera zona que va desde el comienzo del experimento hasta la temperatura de transición (T_{as}), donde las cadenas laterales de PNIPAAm o P(NIPAAm-co-NTBAAm) son completamente solubles en agua y las propiedades de las soluciones de copolímeros son muy similares a las observadas para el alginato. Como las soluciones son esencialmente viscosas, G'' prevalece sobre G' . Se observa la disminución de los módulos con el incremento de temperatura, tal como sucede para el alginato. En la segunda zona, por encima de la T_{as} ,

se produce la transición hidrofílica/hidrofóbica de las cadenas laterales las cuales comienzan a auto-ensamblarse en microdominios formando poco a poco uniones físicas (similares a puntos de entrecruzamientos reversibles). Para el COP-H, se observa una $T_{as} = 28,2$ °C y una temperatura de crítica o de transición sol-gel (cruce entre G'' y G'), $T_c = 38$ °C (Winter y Mours, 1997; Karakasyan y col., 2008).

En las Figuras 5.15 y 5.16 se presentan las propiedades viscoelásticas de soluciones acuosas de los copolímeros COP-L (a) y COP-H (b), para distintas concentraciones (10, 12 y 14 %m/m). Para ambos materiales, se observa una clara dependencia de los módulos elástico y viscoso con la concentración del polímero en solución. Como es de esperar, ambos módulos aumentan con un incremento en la concentración del copolímero en la solución.

A la menor concentración estudiada, 10 %m/m, para el COP-L se observa una leve dependencia de los módulos con la temperatura, siendo G'' mayor que G' en todo el rango de temperatura analizado (Figura 5.15). Cuando se aumenta la concentración, a 12 y 14 %m/m, aparece un incremento de la densidad muy marcado por encima de T_{as} (efecto *thermo-thickening*). Los módulos aumentan con el incremento en la temperatura y se observa el cruce entre los mismos a la temperatura T_c . Por encima de esta temperatura G' se mantiene por encima de G'' en el resto del intervalo de temperatura estudiado. A medida que la concentración aumenta, el valor observado de T_{as} disminuye en forma análoga a lo que sucede con el punto de nube. Al aumentar la concentración de copolímero el valor de temperatura donde ocurre la transición sol-gel (T_c) se observa a menores temperaturas. A medida que la concentración aumenta, las moléculas en solución se encuentran más entrelazadas y la transición sol-gel aparece a menor temperatura.

A la concentración de 10 %m/m, el COP-L no presenta la T_c , mientras que para el COP-H se observa a 38,5 °C, Figura 5.16. Esto puede justificarse en base a la longitud de las cadenas de PNIPAAm laterales involucradas en cada copolímero. En el COP-L, las cadenas son demasiado cortas y la concentración no es lo suficientemente alta para conseguir el grado de entrelazamiento necesario para que la transición sol-gel tenga lugar.

Los valores de T_{as} y T_c para soluciones acuosas del COP-H tienen el mismo comportamiento respecto a la concentración que lo descrito precedentemente para el COP-L. Es importante resaltar que para la solución de mayor concentración del COP-H

(14 % en masa), el entrelazamiento entre las moléculas es tal, que G' es mayor que G'' en todo el intervalo de temperaturas estudiadas.

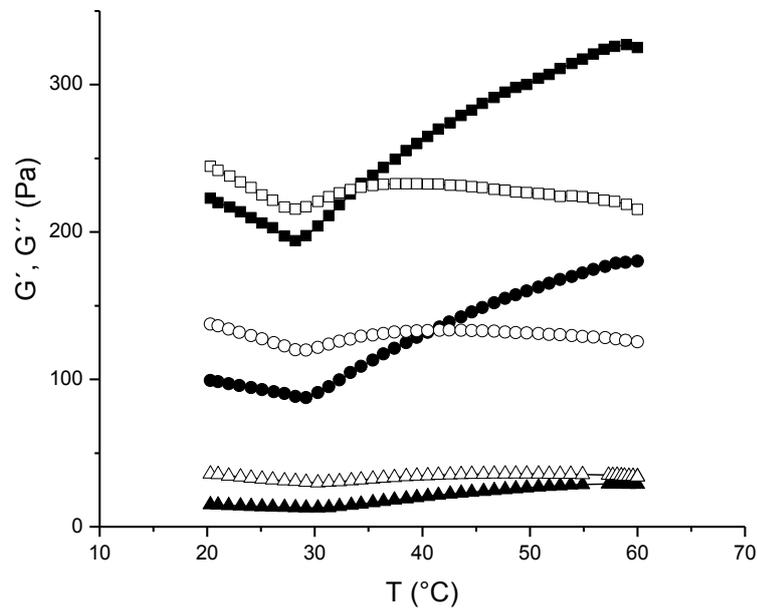


Figura 5.15. Propiedades viscoelásticas de soluciones acuosas del copolímero COP-L a 0,1 Hz y 0,38 Pa, Símbolos: ($\blacktriangle, \triangle$) G' y G'' a 10 %m/m, (\bullet, \circ) G' y G'' a 12 %m/m y (\blacksquare, \square) G' y G'' a 14 %m/m.

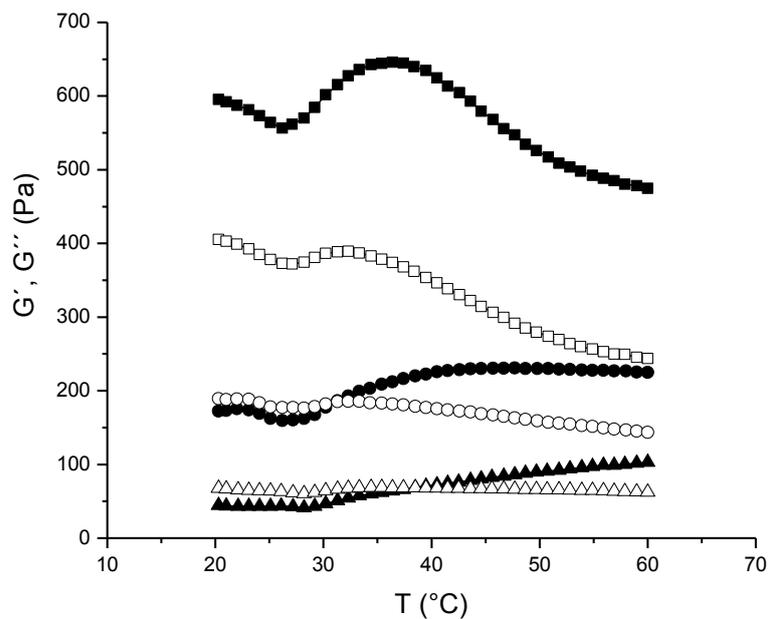


Figura 5.16. Propiedades viscoelásticas de soluciones acuosas del copolímero COP-H a 0,1 Hz y 0,38 Pa, Símbolos: ($\blacktriangle, \triangle$) G' y G'' a 10 %m/m, (\bullet, \circ) G' y G'' a 12 %m/m y (\blacksquare, \square) G' y G'' a 14 %m/m.

5.6.5.4 Efecto de la concentración

Para entender mejor la dependencia de la temperatura de transición con la concentración de polímero se presenta la viscosidad compleja relativa ($\eta_{rel.}^*$) como función de la temperatura reducida (T/T_{as}) de acuerdo a lo propuesto por Karaskasyan y col. (2008).

La viscosidad compleja relativa se define como:

$$\eta_{rel.}^* = \frac{\eta^*}{\eta_{dis.}^*} \quad (5.1)$$

Donde η^* es la viscosidad compleja medida y $\eta_{dis.}^*$ es la viscosidad compleja asumiendo que no existen interacciones hidrofóbicas en el polímero. Para obtener el valor de $\eta_{dis.}^*$ se empleó una dependencia tipo Arrhenius con la temperatura, ecuación de Andrade (Costa, 2005):

$$\eta^* = A \exp\left(\frac{E_a}{RT}\right) \quad (5.2)$$

Donde los valores del factor pre-exponencial (A) y la energía de activación al flujo (E_a) fueron ajustados con los datos medidos a $T < T_{as}$, siendo R la constante de los gases y T la temperatura absoluta.

En el régimen semiconcentrado, la viscosidad compleja relativa aumenta debido al efecto thermo-thickening, que parece prácticamente independiente de la concentración, tal como se observa en la Figura 5.17 para las soluciones del COP-L a 10 y 12 %m/m. Esto puede ser explicado teniendo en cuenta que en el régimen semiconcentrado el tiempo de relajación de soluciones de polielectrolitos es independiente de la concentración (Colby y col., 1994). A concentraciones superiores, como en el caso de 14 %m/m, donde el módulo elástico se encuentra siempre por encima del módulo viscoso en todo el rango de temperaturas estudiado, prevalece el comportamiento no-Newtoniano y se produce un efecto de ablandamiento (*softening*) el cual da lugar a una disminución de la viscosidad con el aumento de temperatura. Estos resultados están en concordancia con la encontrado por Karaskasyan y col. (2008) para soluciones en el rango de concentraciones 1 a 5 % de copolímeros de carboximetilcelulosa-g-P(óxido de propileno-co-óxido de etileno) (CMC-g-PEPO).

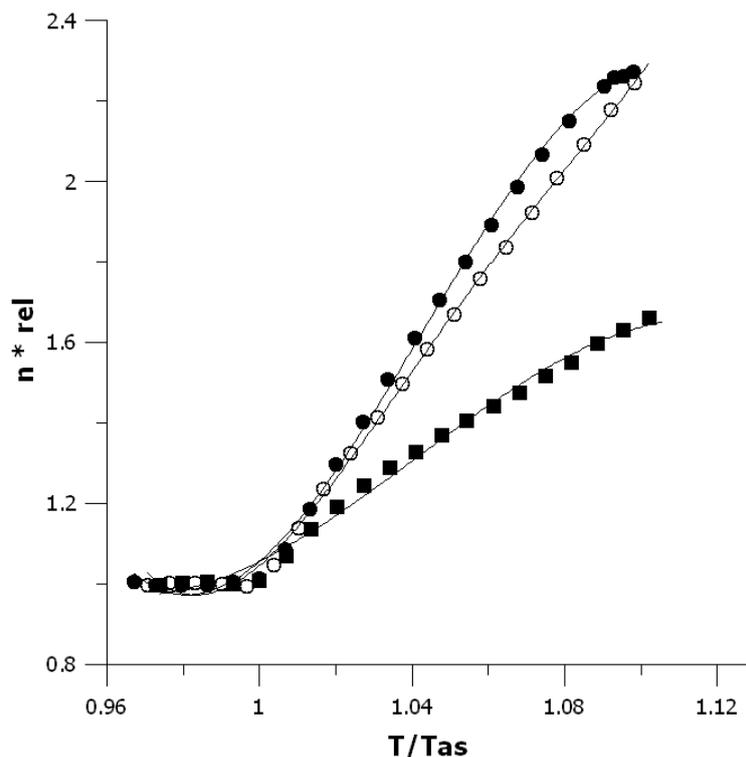


Figura 5.17. Viscosidad compleja relativa (η^*_{rel}) en función de la temperatura adimensional (T/T_{as}) para soluciones acuosas de COP-L. Símbolos: (●) 10 % m/m, (○) 12 % m/m y (■) 14 % m/m.

5.6.5.5 Efecto de la fuerza iónica del medio

En las dispersiones coloidales acuosas, la adición de electrolitos provoca su floculación. Este fenómeno es conocido como efecto "salting out". Un fenómeno similar es observado en los polímeros termosensibles, para los cuales se obtiene una disminución de la temperatura de transición en presencia de pequeñas cantidades de sales (Eeckman y col., 2001). La presencia de sales, así como el aumento de la temperatura, reduce las interacciones polímero-solvente y por lo tanto se incrementan las interacciones entre las moléculas del polímero. Como resultado, las cadenas poliméricas se agregan dando lugar a una menor temperatura crítica de transición (Durand y Hourdet, 2000).

En los estudios realizados por Schild y Tirrell, (1990) la temperatura de transición hidrofílica/hidrofóbica del PNIPAAm establecida como 33 °C en medio acuoso fue desplazada a menores temperaturas por el agregado de sales en la solución. Tal que, se alcanzó un valor de 25 °C para una concentración en sulfato de sodio igual a 200 mM (2,8 %) y también para una concentración 900 mM de bromuro de sodio (9,3 %).

Por tal motivo, los ensayos realizados en soluciones salinas de los copolímeros de éste capítulo presentaron un desplazamiento de las temperaturas T_{as} y T_c , a menores

valores a medida que se aumentó la concentración iónica del medio. En la Figura 5.18 se presentan las propiedades viscoelásticas del COP-L en solución en función de la temperatura para distintas concentraciones de sulfato de sodio en el medio.

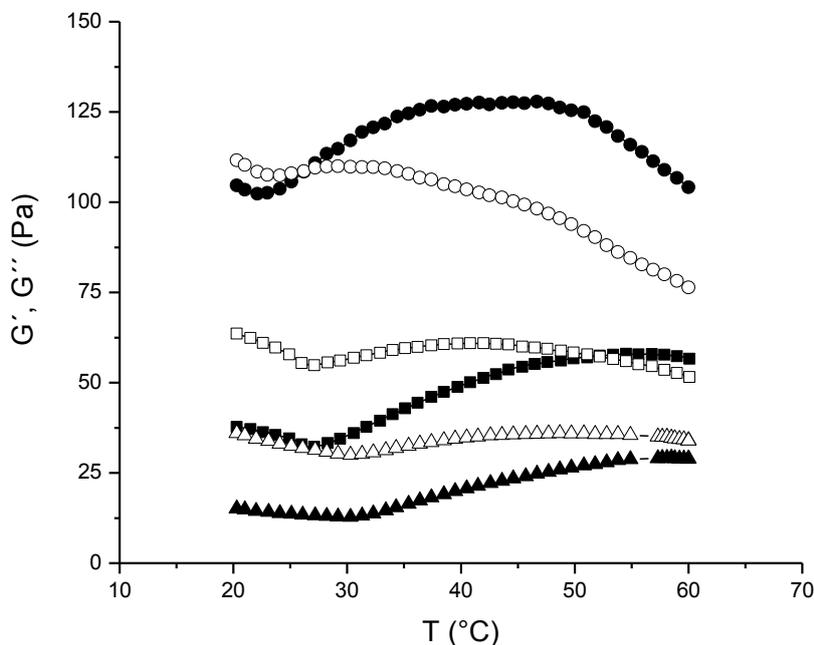


Figura 5.18. Propiedades viscoelásticas de soluciones acuosas al 10 %m/m del copolímero COP-L a 0,1 Hz y 0,38 Pa, Símbolos: (▲,△) G' y G'' 0 M Na_2SO_4 , (■,□) G' y G'' 0,1 M Na_2SO_4 y (●,○) G' y G'' 0,3 M Na_2SO_4 .

Un aumento en la concentración de sal disminuye la temperatura de transición de fase de las cadenas de polímero debido a la competencia por las moléculas de agua que se presenta entre el polímero y la sal (Siqueira y col., 2010).

Cuando la concentración de sal se incrementa, parte de las moléculas de agua son atraídas por los iones de sal, de modo tal que disminuye el número de moléculas de agua que interactúan en el entorno de la NIPAAm (orientadas en estructuras tipo caja o *cagelike*). Debido a una disminución en las interacciones polímero-solvente aumentan las interacciones polímero-polímero, produciendo la transición del PNIPAAm a menores temperaturas. Al aumentar la fuerza iónica del medio, en soluciones de polielectrolitos, se produce una disminución en las repulsiones entre cadenas debido al efecto de apantallamiento de las interacciones electrostáticas. Las cadenas pueden acercarse más fácilmente generando un mayor solapamiento y haciendo la asociación entre ellas más fácil y fuerte (Rotta y col., 2010; Durand y Hourdet, 2000).

Al aumentar la fuerza iónica del medio se produce un incremento en los módulos G' y G'' (Figura 5.18). El aumento en la fuerza iónica del medio produce el mismo efecto sobre las propiedades viscoelásticas de la solución que un incremento en la concentración de polímero.

La influencia de la fuerza iónica del medio fue analizada también en términos de la dependencia de la viscosidad compleja relativa en función de la temperatura adimensional (Figura 5.19). Para una concentración de 10 % m/m de COP-L en agua y en una solución 0,1 M Na_2SO_4 , la viscosidad compleja relativa alcanza valores superiores a 2,2, mientras que en la solución 0,3 M Na_2SO_4 dicho valor no supera 1,5. La mayor fuerza iónica del medio produce un menor efecto de densificación o *thermo-thickening*, comportamiento similar a lo observado para la mayor concentración de COP-L estudiada (Figura 5.17).

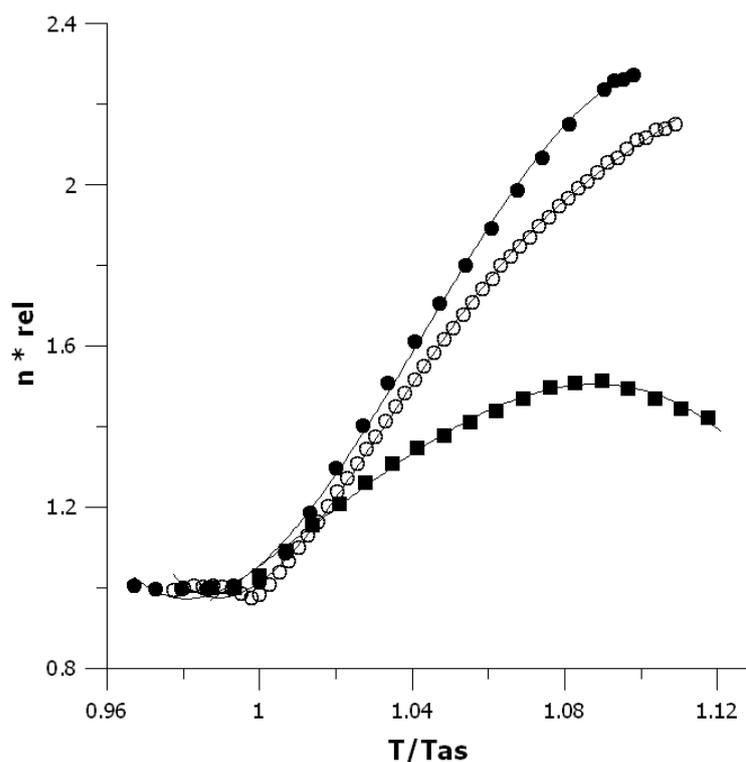


Figura 5.19. Viscosidad compleja relativa ($\eta^*_{rel.}$) en función de la temperatura adimensional (T/T_{as}) para soluciones acuosas al 10 % m/m de COP-L.
 Símbolos: (●) 0 M Na_2SO_4 , (○) 0,1 M Na_2SO_4 y (■) 0,3 M Na_2SO_4 .

5.6.5.6 Efecto de la composición del polímero termosensible

La incorporación de un monómero hidrofóbico a la cadena lateral del polímero termosensible injertado al alginato tiene un efecto directo en las temperaturas de transición del copolímero final. La respuesta viscoelástica de las soluciones del COP-C (alginato-*g*-P(NIPAAm-*co*-NTBAAm)) frente a la temperatura presentan una marcada diferencia respecto a la respuesta de los copolímeros que poseen PNIPAAm (COP-L y COP-H). En la Figura 5.20 se presenta las propiedades viscoelásticas (G' y G'') de una solución al 10 % m/m de COP-C en función de la temperatura.

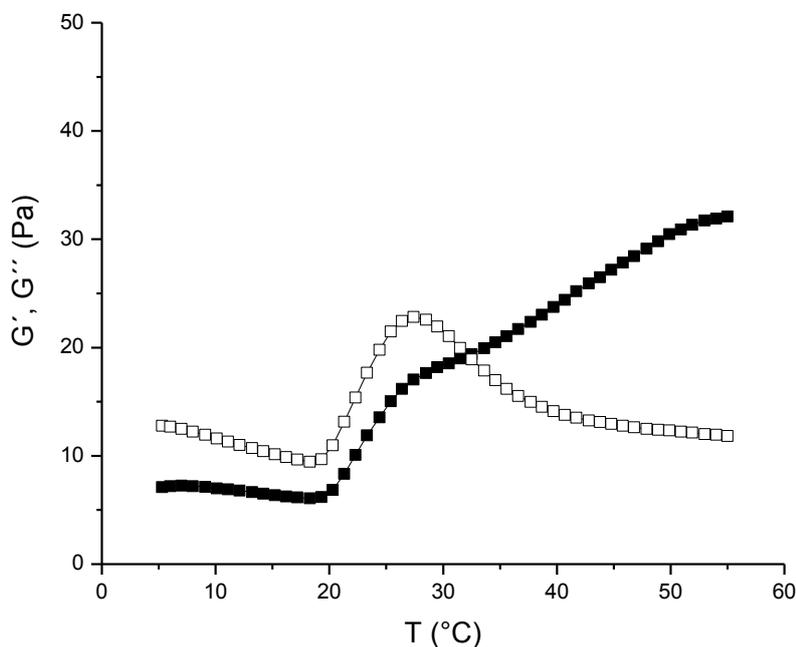


Figura 5.20. Propiedades viscoelásticas de una solución acuosa del copolímero COP-C al 10 %m/m a 0,1 Hz y 0,38 Pa. Símbolos: (■) G' y (□) G'' .

Para una misma concentración y considerando que el COP-C y el COP-H tienen masas molares similares, las propiedades viscoelásticas de la solución de COP-C presentó valores de módulos G' y G'' tres veces menores que los observados para la solución del COP-H. Por otra parte, la asociación de las cadenas en la solución del COP-C ocurre a menores temperaturas, T_{as} es casi 10 °C menor que la T_{as} del COP-H. Esto se debe a que las interacciones entre grupos hidrofóbicos se ven favorecidas por la incorporación del monómero hidrófobo NTBAAm en la cadena. Teniendo en cuenta que la composición de los copolímeros es similar, es evidente que las diferencias observadas se deben a la composición de las cadenas laterales.

En la Figura 5.21 se presentan las propiedades viscoelásticas de soluciones al 12 %m/m del COP-C, con y sin agregado de sal, en función de la temperatura. Esta solución con una mayor concentración de copolímero (12 %m/m) presenta un módulo elástico que está por encima del módulo viscoso en todo el intervalo de temperatura. Esto indica que la solución de COP-C presenta un mayor número de entrecruzamientos físicos de que la solución de COP-H, ya que en esta última se observa la transición sol-gel. Por otra parte, un aumento en la fuerza iónica de la solución produce un aumento del módulo elástico y una disminución del módulo viscoso. Esto indica que la red posee una mayor concentración de puntos de entrecruzamientos físicos debido al efecto de “apantallamiento” que produce la sal favoreciendo la formación de los agregados por interacción de los grupos hidrófobos.

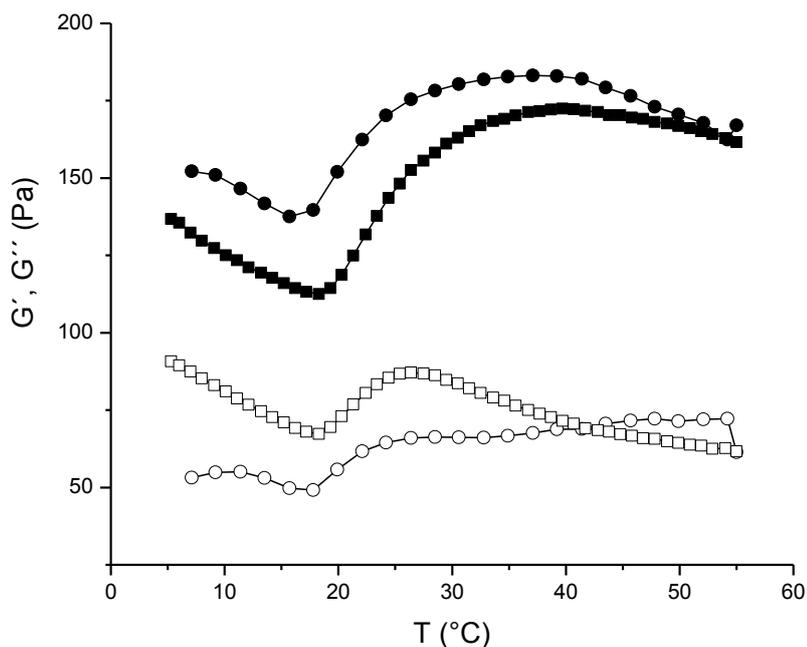


Figura 5.21. Propiedades viscoelásticas de soluciones al 12 %m/m del copolímero COP-C a 0,1 Hz y 0,38 Pa. Símbolos: (■, □) G' y G'' , 0 M Na_2SO_4 , (●, ○) G' y G'' , 0,1 M Na_2SO_4 .

5.7 Conclusiones

Se sintetizaron de tres polímeros termosensibles, dos PNIPAAm con distintas masas molares, 4.400 y 16.300 g/mol, y un copolímero P(NIPAAm-co-NTBAAm) de masa molar 11.500 g/mol. Los tres polímeros se obtuvieron por una reacción de telomerización, mediante la cual se obtuvieron macromoléculas con un grupo amino en el extremo de cadena. Este grupo amino terminal permitió el posterior injerto de los mismos al alginato, mediante una sencilla reacción de condensación con los grupos carboxílicos del polisacárido.

La caracterización molecular permitió corroborar el éxito de las reacciones llevadas a cabo, así como también estimar la longitud de las cadenas de los polímeros termosensibles que serían posteriormente injertadas al alginato, verificar la termosensibilidad de los materiales obtenidos, estudiando su dependencia con la masa molar, la concentración y la composición estructural.

Las conclusiones de éste capítulo se detallan a continuación:

- En las telomerizaciones, la cantidad de AET agregada produce un efecto directo sobre la longitud de cadena obtenida en los materiales finales.
- Las reacciones de injerto por condensación dan lugar a productos cuya composición es muy similar a la composición inicial de la mezcla de reacción. Como pudo comprobarse a partir de los resultados obtenidos a partir de $^1\text{H-RMN}$ y TGA.
- Del comportamiento de estos materiales frente a cambios en la temperatura se concluye que:
 - Por medio de reología se corroboraron los resultados obtenidos por las mediciones de punto de nube, referidos al efecto del largo y la composición de las cadenas laterales y de la concentración de las soluciones sobre la LCST de cada copolímero.
 - La concentración de las soluciones tiene un efecto marcado en la T_{as} para polímeros de masa molar inferior a $5 \cdot 10^4$. Tal que, para mayores concentraciones la T_{as} se presenta a valores inferiores.
 - El aumento de la longitud de cadena implicó una disminución de la T_{as} .
 - La composición monomérica del polímero termosensible es un factor clave en el valor de T_{as} . La incorporación del monómero de mayor hidrofobicidad, NTBAAm, se reflejó en una caída de aproximadamente 10°C en la T_{as} .

- A temperaturas superiores a la LCST y para ciertas concentraciones, se observó el cruce de los módulos G' y G'' correspondiente a la transición sol-gel, reflejando de esta manera, el fenómeno termoasociativo de los copolímeros.

5.8 Referencias

Bokias, G., Mylonas, Y., Staikos, G., Bumbu, G. G., y Vasile, C. (2001). *Macromolecules*. **34**, 4958–4964.

Boutris, C., Chatzi, E. G., y Kiparissides, C. (1997). *Polymer*. **38**, 2567–2570.

Colby, R. H., Rubinstein, M., y Dobrynin, A. V. (1994). *Physical Review Letters*. **73**, 2776–2779.

Costa, J. M. (2005). Diccionario de Química Física.

Debord, J. D. y Lyon, L. A. (2003). *Langmuir*. **19**, 7662–7664.

Deng, L., Shi, K., Zhang, Y., Wang, H., Zeng, J., Guo, X., Du, Z., y Zhang, B. (2008). *Journal of Colloid and Interface Science*. **323**, 169–175.

Durand, A. y Hourdet, D. (1999). *Polymer*. **40**, 4941–4951.

Durand, A. y Hourdet, D. (2000). *Journal of Physical Chemistry*. **104**, 9371–9377.

Eeckman, F., Amighi, K., y Moës, a J. (2001). *International Journal of Pharmaceutics*. **222**, 259–270.

Feil, H., Bae, Y. H., Feijen, J., y Kim, S. W. (1993). *Macromolecules*. **26**, 2496–2500.

Fujishige S.; Kubota K.; Ando I. (1989). *Journal of Physical Chemistry*. **93**, 3311–3313.

Gibbons, O., Carroll, W. M., Aldabbagh, F., y Yamada, B. (2006). *Journal of Polymer Science*. 6410–6418.

Gomez, C. G., Rinaudo, M., y Villar, M. A. (2007). *Carbohydrate Polymers*. **67**, 296–304.

Gupta, N. R., Ghute, P. P., y Badiger, M. V. (2011). *Carbohydrate Polymers*. **83**, 74–80.

Ju, H. K., Kim, S. Y., y Lee, Y. M. (2001). *Polymer*. **42**, 6851–6857.

Kaneko, Y., Nakamura, S., Sakai, K., Kikuchi, A., Aoyagi, T., Sakurai, Y., y Okano, T. (1998). *Polymer Gels and Networks*. **6**, 333–345.

- Karakasyan, C., Lack, S., Brunel, F., Maingault, P., y Hourdet, D. (2008). *Biomacromolecules*. **9**, 2419–2429.
- Kim, J. H., Lee, S. B., Kim, S. J., y Lee, Y. M. (2002). *Polymer*. **43**, 7549–7558.
- De Moura, M. R., Aouada, F. A., Guilherme, M. R., Radovanovic, E., Rubira, A. F., y Muniz, E. C. (2006). *Polymer Testing*. **25**, 961–969.
- Otake, K., Inomata, H., Konno, M., y Saito, S. (1990). *Macromolecules*. **23**, 283–289.
- Ozturk, V. y Okay, O. (2002). *Polymer*. **43**, 5017–5026.
- Pamies, R., Zhu, K., Kjøniksen, A.-L., y Nyström, B. (2009). *Polymer Bulletin*. **62**, 487–502.
- Pitsikalis, M., Pispas, S., Mays, J. W., y Hadjichristidis, N. (1998). *Advances in Polymer Science*, p. 20. Germany: Springer.
- Rotta, J., Minatti, E., Nandi, L. G., Guerra, J. P. V. T. A., Barreto, P. L. M., y Vinha, M. V. (2010). *XII International Macromolecular Colloquium*, pp. 1021–1024.
- Salomonsen, T., Jensen, H. M., Larsen, F. H., Steuernagel, S., y Engelsen, S. B. (2009). *Food Hydrocolloids*. **23**, 1579–1586.
- Schild, H. G. (1992). *Progress in Polymer Science*. **17**, 163–249.
- Schild, H. G. y Tirrell, D. A. (1990). *Journal of Physical Chemistry*. **94**, 4352–4356.
- Siqueira, G., Habibi, Y., Bras, J., Goffin, A., Schiltz, N., Duquesne, E., Dubois, P., Laborie, M., Fraschini, C., Prud, R. E., y col. (2010). *XII International Macromolecular Colloquium*, pp. 91–95.
- Vasile, C. y Nita, L. E. (2011). *Carbohydrate Polymers*. **86**, 77–84.
- Winter, H. H. y Mours, M. (1997). *Advances in Polymer Science*. **134**, 165–234.
- Yin, X., Hoffman, A. S., y Stayton, P. S. (2006). *Biomacromolecules*. **7**, 1381–1385.
- Yoo, M. K., Sung, Y. K., Cho, C. S., y Lee, Y. M. (1997). *Polymer*. **38**, 2759–2765.
- Zhang, H., Zhong, H., Zhang, L., Chen, S., Zhao, Y., y Zhu, Y. (2009). *Carbohydrate Polymers*. **77**, 785–790.

CAPÍTULO 6

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES Y LIBERACIÓN CONTROLADA DE PRINCIPIOS ACTIVOS

6.1 Introducción

Los hidrogeles son redes poliméricas hidrofílicas tridimensionales capaces de absorber un importante volumen de agua u otro fluido biológico. Los denominados hidrogeles inteligentes, estímulo-sensibles, poseen la capacidad de presentar cambios en su comportamiento de hinchamiento, permeabilidad o en sus propiedades mecánicas en respuesta a un estímulo externo, tal como pequeños cambios en el pH, fuerza iónica o temperatura, entre otros. Estas propiedades, además de su similitud con los tejidos vivos debido a su alto contenido de agua, hacen de los hidrogeles materiales con numerosas aplicaciones, particularmente en el área de la medicina y la industria farmacéutica (Güven y col. 1999; Kim y col. 2002).

La posibilidad de obtener hidrogeles a partir de la síntesis de copolímeros de alginato y N-isopropilacrilamida, se presenta como una propuesta promisoría para generar biomateriales termosensibles. Esta copolimerización involucra la modificación fisicoquímica de un polisacárido de origen natural como es el alginato, el cual proviene de una fuente renovable.

En esta tesis se prepararon hidrogeles por entrecruzamiento con iones calcio de los copolímeros obtenidos por radiación gamma (Capítulo 4) y por síntesis química en base a la reacción de condensación entre PNIPAAm amino terminados y alginato (Capítulo 5). El objetivo principal es evaluar la termosensibilidad de los hidrogeles obtenidos mediante ensayos de hinchamiento a distintas temperaturas y su aplicación como sistemas de liberación controlada de un fármaco modelo.

6.2 Obtención de hidrogeles a partir de copolímeros alginato-g-PNIPAAm

Los copolímeros de alginato y N-isopropilacrilamida sintetizados previamente, tanto por métodos químicos como por radiación gamma, fueron empleados en la formación de hidrogeles. Estos se obtuvieron a partir de la unión electrostática entre iones bivalentes (calcio) y los grupos carboxílicos del alginato, formando una estructura estable, denominada "*caja de huevo*", según lo detallado en el Capítulo 1. Para la obtención de los hidrogeles se eligió el método de gelación externa el cual implica el intercambio de iones monovalentes del alginato por iones Ca^{2+} a través de la matriz polimérica. Dado que los iones difunden desde la superficie, la concentración de los mismos disminuye desde la superficie hasta el centro del material. Estos hidrogeles pueden ser preparados en forma de perlas o pellets, como tubos o como films a partir de

alginato de sodio. En la producción de perlas por gelación externa, se hace gotear una solución de alginato de sodio sobre una solución de una sal de calcio, comúnmente CaCl_2 . Las perlas se forman instantáneamente cuando ambas soluciones entran en contacto y se producen las uniones con el calcio formando una red. Las perlas así formadas, se mantienen dentro de la solución de iones calcio durante un cierto periodo de tiempo el cual determina el grado de entrecruzamiento final obtenido en el hidrogel.

6.2.1 Formación de perlas por goteo o *dropping*

Se prepararon soluciones con los copolímeros obtenidos previamente. Las concentraciones elegidas variaron entre 4 y 8 %m/m. Las concentraciones empleadas se eligieron de modo tal de partir de soluciones de viscosidad apropiada y con el contenido de alginato necesario para la formación de perlas cuando se gotea sobre una solución de cloruro de calcio. Las soluciones se prepararon por pesada y las mismas fueron colocadas en tubos aptos para centrifuga, siendo esta última una herramienta muy útil para acelerar el proceso de homogenización de las soluciones preparadas.



Figura 6.1. Bomba perfusora Cole Parmer 74900 Series empleada en la preparación de perlas de alginato de calcio.

La obtención de las perlas se basó en el goteo de las soluciones empleando una jeringa, la cual puede ser accionada manualmente o mediante una bomba perfusora Cole Parmer 74900, provista de agujas 25G (0,5 mm de diámetro) y 31G (0,3 mm de diámetro), como se muestra en la Figura 6.1. Mediante el empleo de una bomba es posible generar una presión constante sobre la jeringa, pudiéndose graduar el caudal de

solución a ser bombeado. La velocidad de goteo se eligió teniendo en cuenta la viscosidad de cada solución evitando sobre-presiones en la jeringa. En todos los casos se empleó una solución de cloruro de calcio al 2 % m/v como solución de gelificación.

6.3 Ensayos de Hinchamiento de los Hidrogeles

Se denomina hinchamiento a la propiedad que posee un material de aumentar de tamaño cuando es sumergido en un medio líquido, que ingresa y es retenido en el material. Usualmente se cuantifica en función de la masa o del volumen, a partir de la relación de hinchamiento, ecuación 6.1 (Lee y col. 2004):

$$RH = \frac{W_h - W_s}{W_s} \quad (6.1)$$

Donde W_h es el peso del material en el estado hinchado y W_s el peso del material seco.

El hinchamiento de un gel es función de la estructura de la red formada. Un aumento en la densidad de entrecruzamientos se traduce en una red más compacta la cual presentará un menor grado de hinchamiento (Isiklan y col. 2011).

En una primera etapa se estudió el hinchamiento de perlas de alginato de calcio, lo cual se tomó como base para los estudios posteriores de los hidrogeles obtenidos a partir de los copolímeros alginato-g-PNIPAAm. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente, en un laboratorio con temperatura controlada a $24 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. El grado de hinchamiento se midió por pesada de las perlas en función del tiempo. Para pesar las perlas a cada tiempo de medición, se extrajeron del solvente y se secaron con papel absorbente para eliminar la humedad superficial. En estos estudios preliminares se estudió el efecto de la fuerza iónica y del pH del medio sobre el grado de hinchamiento de perlas de alginato de calcio.

Posteriormente, se empleó el hidrogel del COPI-1-80N, denominado HCOPI-1-80N para poner a punto la metodología para determinar la cinética de hinchamiento de los hidrogeles obtenidos por entrecruzamiento con iones calcio. Se eligió este hidrogel, HCOPI-1-80N, por tener mayor contenido de NIPAAm y provenir de un copolímero sintetizado a partir de una dosis intermedia (1 kGy). El mayor contenido de PNIPAAm implica un menor contenido de alginato disponible para entrecruzar con los iones calcio, y por otro lado, con 1 kGy se obtienen copolímeros con buenas propiedades finales y termosensibles (Capítulo 4).

6.3.1 Hidrogeles de alginato de calcio

6.3.1.1 Efecto de la fuerza iónica del medio

En estos ensayos se utilizaron perlas de alginato de calcio preparadas previamente por goteo de una solución de alginato de sodio al 1 %m/v sobre una solución de cloruro de calcio de concentración 2 %m/v utilizando un gotero plástico. El tiempo de inmersión o curado fue de 60 ± 10 minutos. Las perlas de alginato de calcio así obtenidas se dejaron secar a temperatura ambiente hasta peso constante.

Para analizar el efecto de la fuerza iónica del medio sobre el hinchamiento de perlas de alginato de calcio se prepararon soluciones acuosas con diferentes concentraciones de cloruro de sodio: 0,1; 0,3; 0,6; 0,9 y 1,2 %m/v. Luego se colocó la masa equivalente a 10 perlas de alginato de calcio, en 20 mL de cada solución salina. El número de perlas se eligió de tal manera de obtener cambios medibles en la masa durante el hinchamiento. Las perlas se pesaron antes de sumergirlas en la solución salina en estudio y luego fueron pesadas cada hora durante al menos 7 horas, obteniéndose el valor final del grado de hinchamiento a las 24 horas del comienzo del ensayo. Las mediciones se realizaron por duplicado.

Debido al proceso de intercambio iónico entre Ca^{2+} y Na^+ se produce además de hinchamiento una disminución en la concentración de puntos de entrecruzamientos lo cual conduce a un cambio en la estructura del hidrogel. El proceso de hinchamiento estará acompañado entonces de un proceso de modificación de la estructura del gel, por lo que la relación de hinchamiento, medida en cada caso, será un balance entre estos dos procesos. La pérdida de iones calcio conduce a la solubilización de las cadenas del alginato, por lo que algunas moléculas del alginato pasarán a la solución. Es por esto que, este balance debe ser tenido en cuenta para la interpretación de los resultados.

En la Figura 6.2 se presenta la relación de hinchamiento de las perlas de alginato de calcio para cada concentración de NaCl en función del tiempo. Los resultados obtenidos para agua destilada no se presentan ya que el grado de hinchamiento es prácticamente nulo, las perlas de alginato de calcio secas no se hincharon en agua aún luego de 24 horas. Probablemente se necesiten tiempos más largos para observar el hinchamiento de estos materiales. Los iones calcio no sólo se encuentran involucrados en las uniones del tipo caja de huevo en la estructura del alginato, sino que están presentes además como iones libres dentro del hidrogel. Cuando el material es secado, el alginato se deshincha y colapsa, las uniones caja de huevo se ubican lo

suficientemente cerca para formar agregados a través de los iones calcio libres. Como consecuencia del secado aumenta la densidad de entrecruzamientos, siendo ésta la posible razón por la cual las perlas de alginato no presentan un hinchamiento apreciable en agua pura a tiempos cortos (Fang y col. 2011).

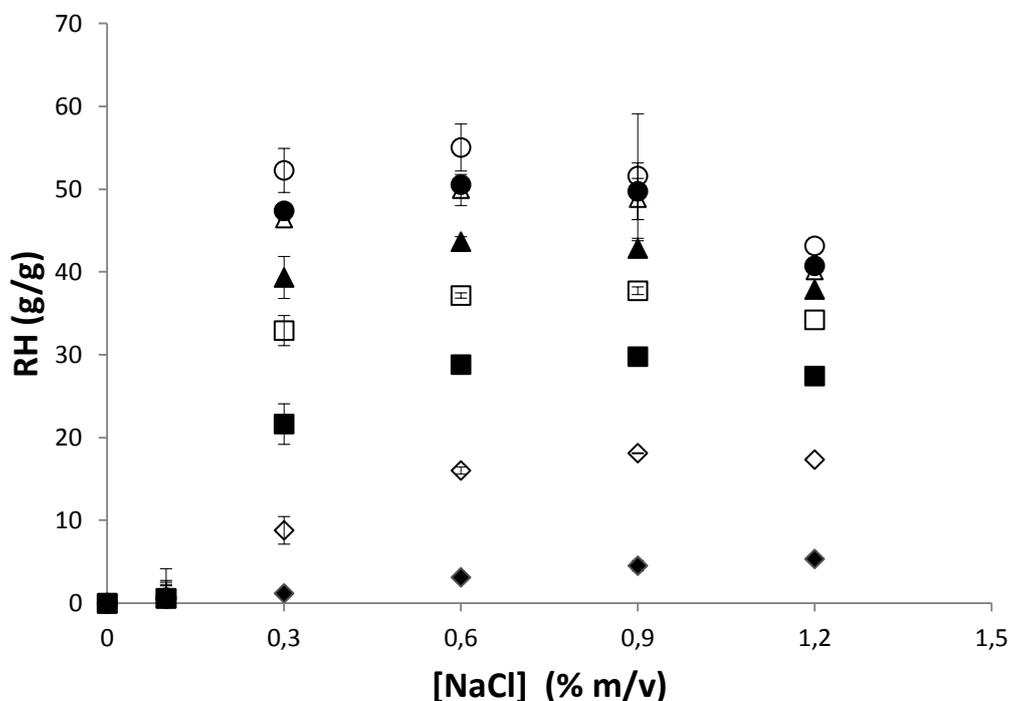


Figura 6.2- Grado de hinchamiento de geles de alginato de calcio en función de la fuerza iónica del medio. Símbolos: (◆) 1 h, (◇) 2 h, (■) 3 h, (□) 4 h, (▲) 5 h, (△) 6 h, (●) 7 h y (○) 24 h.

El grado de hinchamiento de las perlas de alginato aumenta con el aumento de la fuerza iónica del medio. Para concentraciones bajas de iones Na^+ en la solución se observa un bajo grado de hinchamiento, aún luego de 24 horas (Figura 6.2). En este caso, la concentración de iones sodio en solución no es suficiente para modificar substancialmente la estructura del gel debido al intercambio iónico. Para concentraciones de NaCl mayores a 0,3 %m/v e inferiores a 0,9 %m/v, se observa un grado de hinchamiento similar en función del tiempo. Para la mayor concentración de NaCl estudiada (1,2 %m/v) es posible observar una disminución en el grado de hinchamiento debido, probablemente, a una modificación substancial en la estructura del gel debido al intercambio iónico con el medio. Los hidrogeles entrecruzados con iones calcio presentan un incremento en el número de grupos cargados cuando aumenta la fuerza iónica del medio, resultado del intercambio entre iones Ca^{2+} y Na^+ . El gran número de grupos cargados disminuye la densidad de entrecruzamientos y aumenta la

hidrofilicidad de la red lo cual incrementa el grado de hinchamiento. Sin embargo, a altas concentraciones de Na^+ en la solución se produce una disminución importante en la concentración de puntos de entrecruzamiento en el gel de alginato de calcio (Ju y col. 2001).

No existen diferencias significativas entre 7 y 24 h de ensayo lo cual indica que el proceso de hinchamiento/degradación ha alcanzado el equilibrio luego de 7 horas en el rango de concentraciones estudiadas.

6.3.1.2 Efecto del pH del medio

En estos ensayos se emplearon perlas de alginato de calcio preparadas según fue descrito en la sección anterior. Para estudiar la influencia del pH del medio sobre el grado de hinchamiento se utilizaron soluciones buffer de pH 4, 7 y 10. La solución buffer de pH = 4, es una solución de biftalato de potasio y la solución buffer de pH = 7 es una solución de fosfato monobásico de potasio e hidróxido de sodio (Anhedra), La solución buffer de pH = 10 contiene ácido bórico e hidróxido de sodio (Biopack). Los resultados obtenidos para las perlas de alginato de calcio sumergidas en soluciones de pH 4, 7 y 10 se presentan en las Figuras 6.3; 6.4 y 6.5 respectivamente.

A pH 4, se observa un importante grado de hinchamiento (RH) llegando a superar 120 veces la masa inicial. A las 6 horas de ensayo las perlas mantenían la forma inicial y probablemente no se haya alcanzado aún el grado de hinchamiento de equilibrio. El valor de pH del medio se encuentra por encima del pK_a de la unidad guluronato del alginato ($\text{pK}_a \sim 3,2$) y es igual al pK_a de la unidad manuronato ($\text{pK}_a \sim 4$), por lo que los grupos carboxílicos del guluronato, unidad en mayor proporción en el alginato utilizado, se encuentran desprotonados generando repulsiones electrostáticas entre sí lo cual favorecen la absorción del medio acuoso (Kim y col., 2002).

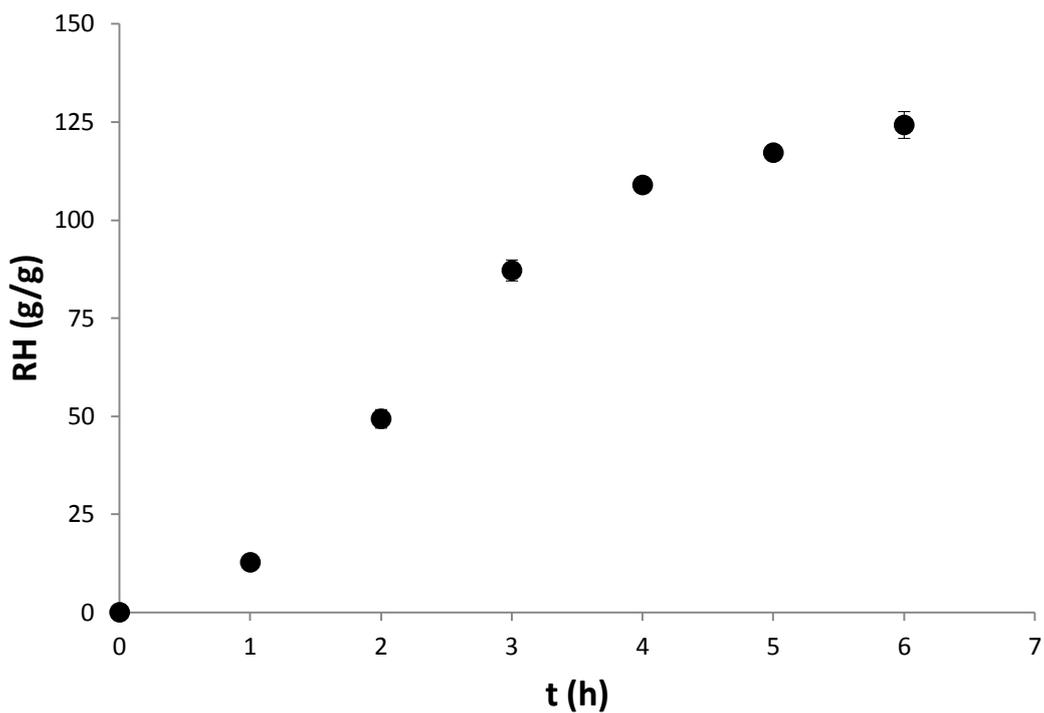


Figura 6.3- Grado de hinchamiento de geles de alginato de calcio en función del tiempo a pH 4.

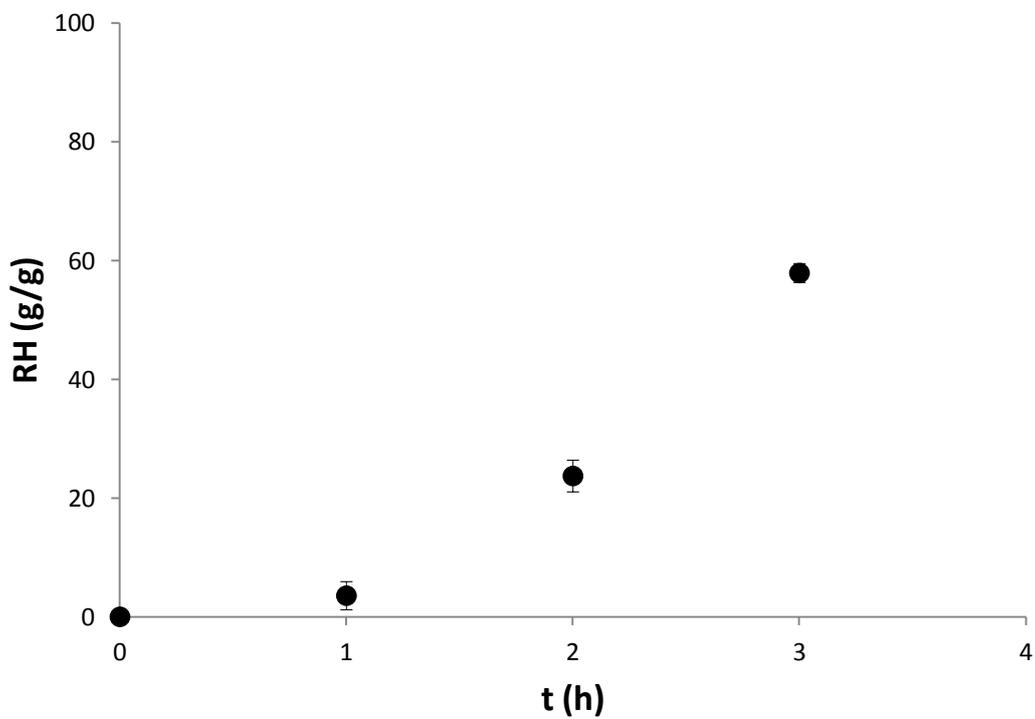


Figura 6.4. Grado de hinchamiento de geles de alginato de calcio en función del tiempo a pH 7.

A tiempos equivalentes el grado de hinchamiento de las perlas de alginato a pH 7 fue menor que a pH 4. Sin embargo, se observó un importante deterioro de los geles luego de 4 horas de ensayo. A partir de este tiempo no pudieron realizarse las mediciones debido a que las perlas se desintegraban al intentar removerlas de la solución. Este comportamiento podría explicarse teniendo en cuenta la composición de la solución buffer empleada. La presencia de iones Na^+ y K^+ en el medio serían responsables del intercambio con los iones calcio del gel con el agravante de un efecto secuestrante de los iones fosfato sobre los iones calcio desplazados dando lugar a sales de calcio, como hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Kim y col., 2008; Gonza, 2002; Ferreira y col., 2004, Pasparakis y Bouropoulos 2006, Kim y col. 2008). De esta manera, se produce una rápida disminución en la concentración de puntos de entrecruzamiento lo cual se traduce en una rápida degradación de las perlas.

A pH 10, las perlas prácticamente no se hincharon; el pequeño aumento de masa observado pudo deberse a la humedad superficial de las mismas sin un hinchamiento apreciable. Debido a esto se adicionó a la solución buffer, la cantidad necesaria de NaCl para alcanzar una concentración de 0,9 %. La concentración de cloruro de sodio, se eligió en función de los buenos resultados obtenidos en la sección 6.3.1.1 y por ser la composición de la solución fisiológica comúnmente usada en farmacología. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 6.6.

El agregado de 0,9 %m/v NaCl a la solución buffer de pH 10 no provocó un aumento significativo en el grado de hinchamiento. El hinchamiento inicial de un hidrogel esta usualmente relacionado con el tiempo de relajación de segmentos de cadenas en la red. La ionización de los grupos carboxílicos ocurre por encima del pKa del alginato (pH ~ 4). El aumento de los grupos ionizados provoca repulsiones electrostáticas cada vez más importantes, lo que beneficia la relajación de la red y una mayor velocidad de relajación de la red favorece la penetración de las moléculas del medio dentro de la estructura del gel. Sin embargo, a pH elevados la movilidad de la red se ve reducida por un efecto de apantallamiento de los cationes sobre los grupos hidrofílicos cargados negativamente ($-\text{COO}^-$), de modo tal que la difusión de las moléculas de agua se ve limitada (Shi y col. 2013).

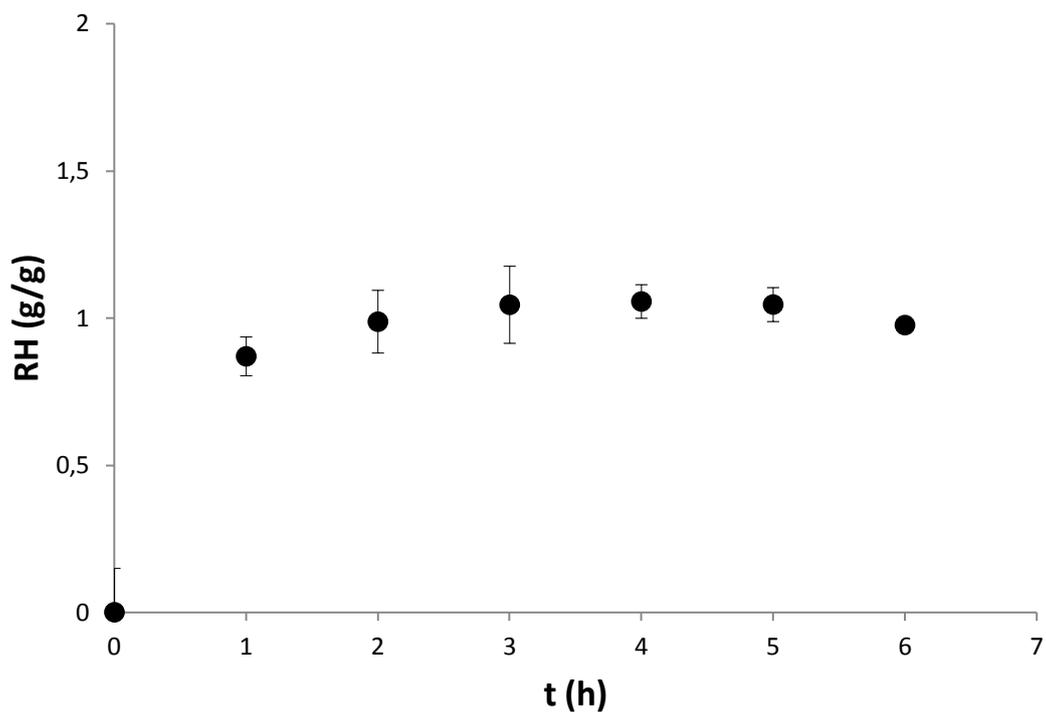


Figura 6.5. Grado de hinchamiento de geles de alginato de calcio en función del tiempo a pH 10.

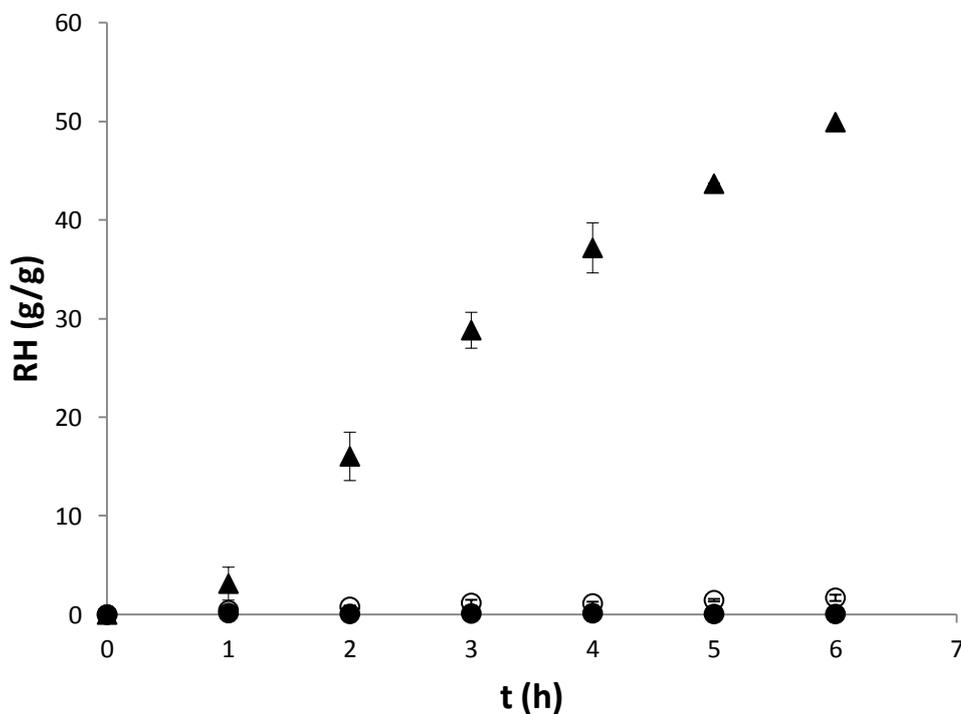


Figura 6.6. Grado de hinchamiento de geles de alginato de calcio en función del tiempo.
 Símbolos: (●) buffer pH 10, (○) buffer pH 10 con 0,9 %m/v NaCl,
 (▲) solución salina 0,9 %m/v NaCl.

6.3.2 Hidrogeles obtenidos por entrecruzamiento de copolímeros con iones calcio

En ésta sección las experiencias se realizaron empleando el hidrogel HCOPI-1-80N como material modelo para analizar el efecto del grado de entrecruzamiento, el tamaño de las perlas y la concentración de la solución del copolímero utilizada para la formación de perlas sobre el grado de hinchamiento.

6.3.2.1 Efecto del grado de entrecruzamiento con iones calcio

Con la experiencia adquirida previamente empleando geles de alginato de calcio, se prepararon perlas mediante goteo de una solución acuosa al 4 % m/m del copolímero COP-I-1-80N en una solución al 2 % m/v de CaCl_2 . Las perlas del hidrogel HCOP-I-1-80N se dejaron en la solución de iones calcio por el término de 1, 4 y 24 horas con el objetivo de estimar el tiempo adecuado de inmersión en la solución de calcio, denominado comúnmente tiempo de curado.

La Figura 6.7 presenta el grado de hinchamiento en función del tiempo para perlas de alginato de calcio curadas durante 1, 4 y 24 horas en una solución de CaCl_2 . Las perlas con una hora de curado presentaron un grado de hinchamiento levemente superior que las curadas durante 4 horas pero comenzaron a desintegrarse luego de permanecer 6 horas en la solución de hinchamiento lo cual imposibilitó la medición de su peso a tiempos superiores. Si bien las perlas entrecruzadas durante 4 horas en CaCl_2 presentan una mayor estabilidad puede inferirse un cierto deterioro en la estructura a lo largo del tiempo evidenciado por el incremento en las barras de error correspondientes. Las perlas comienzan a degradarse y la pérdida de masa no es la misma en las réplicas estudiadas.

Las perlas curadas durante 24 horas en CaCl_2 presentaron un leve incremento en el grado de hinchamiento según se observa en la Figura 6.7. Aunque estos geles deberían ser los más rígidos porque permanecieron más tiempo en contacto con la solución de iones calcio, es evidente que la incorporación de los mismos fue apenas un poco mayor a la de las perlas con 4 horas de curado. Sin embargo, ésta pequeña diferencia en la incorporación de Ca^{+2} permitió que las perlas del material curado durante 24 horas permaneciera más tiempo sin deteriorarse.

En función de los resultados expuestos precedentemente, se eligió un tiempo de curado de 24 horas para la formación de perlas de los copolímeros presentados en las siguientes experiencias de este capítulo

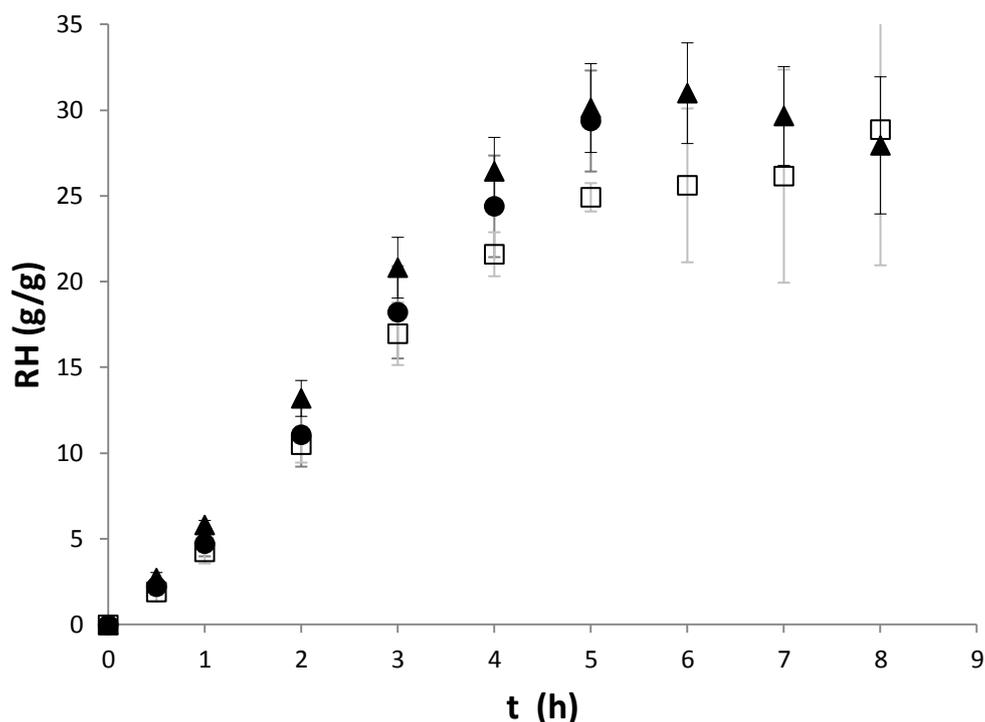


Figura 6.7. Grado de hinchamiento de geles HCOPI-1-80N en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl. Símbolos: (●) 1 h en 2 %m/v CaCl₂, (□) 4 h en 2 %m/v CaCl₂ y (▲) 24 h en 2 %m/v CaCl₂.

6.3.2.2 Efecto del diámetro de las perlas

Para el estudio del efecto del tamaño de las perlas sobre el grado de hinchamiento se prepararon perlas por goteo con agujas de 15 mm de longitud y diferentes diámetros: 25G (0,5 mm de diámetro) y 31G (0,3 mm de diámetro). Los tamaños de perlas obtenidos fueron de 1 mm y 0,85 mm de diámetro promedio respectivamente, estos valores se calcularon en base al tamaño de 10 perlas. En la Figura 6.8, se presentan las imágenes obtenidas a partir del uso de un Microscopio óptico Zeiss Phomi III POL en modo transmisión.

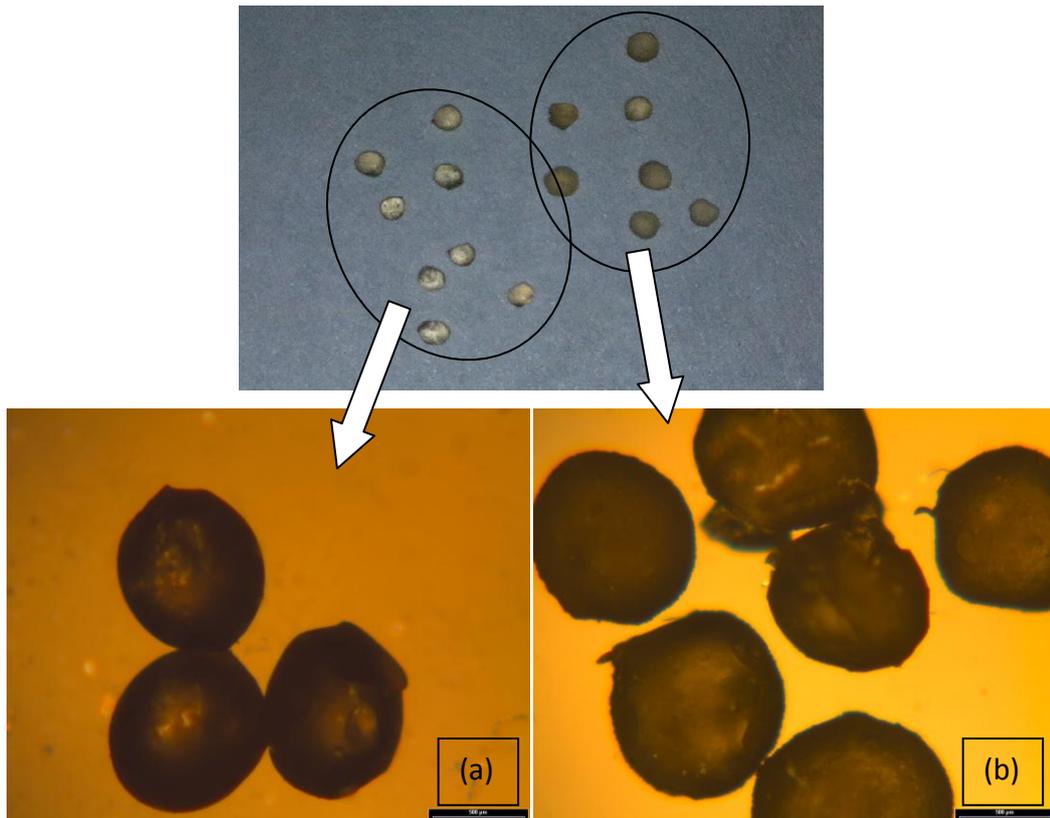


Figura 6.8. Imágenes obtenidas mediante microscopía óptica de perlas de HCOPI-1-80N
a) $D = 0,85$ mm, aguja 31G y b) $D = 1$ mm, aguja 25G.

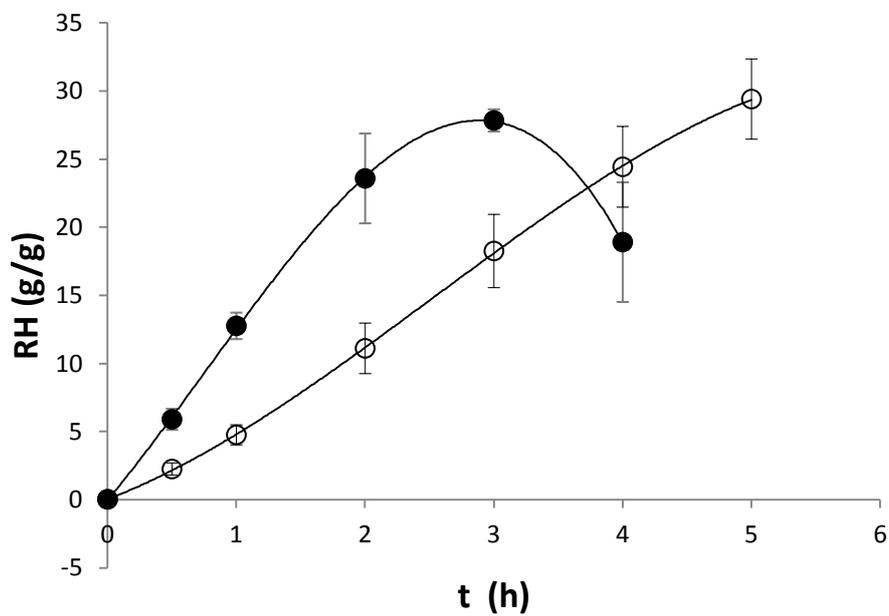


Figura 6.9. Grado de hinchamiento de HCOPI-1-80N curados durante 1 h en una solución 2 %m/v CaCl_2 e hinchados en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl.
Símbolos: (●) $D = 0,85$ mm, aguja 31G y (○) $D = 1$ mm, aguja 25G.

Las perlas de mayor tamaño ($D = 1 \text{ mm}$) presentan un hinchamiento más controlado en función del tiempo. Las perlas de menor tamaño ($D = 0,85 \text{ mm}$) poseen una mayor área superficial y por consiguiente una mayor velocidad de hinchamiento, alcanzando su mayor grado de hinchamiento a las 3 horas de sumergidas en la solución (Figura 6.9). Posteriormente comienzan a degradarse observándose una caída en el grado de hinchamiento y su posterior desintegración. Las perlas de mayor tamaño se hincharon con mayor lentitud y mostraron una mayor estabilidad estructural luego de 5 horas de inmersas en la solución. El intercambio iónico se produce más lentamente manteniéndose la estabilidad estructural y aumentando el grado de hinchamiento.

6.3.2.3 Efecto de la concentración de la solución formadora de perlas

La formación de perlas está directamente ligada a la concentración del polímero en la solución a ser goteada. La concentración de polímero establece la densidad de entrelazamientos entre las moléculas así como la cantidad de sitios disponibles para el entrecruzamiento con iones calcio en función de la composición en alginato del mismo.

Utilizando soluciones de concentración 4 % y 8 % del copolímero COPI-1-80N se prepararon hidrogeles por goteo en una solución de CaCl_2 al 2 % m/v. La relación de hinchamiento en función del tiempo de cada hidrogel se presenta en la Figura 6.10. El HCOPI-1-80N obtenido a partir de la solución al 4 % presentó un mayor hinchamiento y una mayor velocidad al compararlo con el hidrogel preparado a partir de la solución al 8 %. En este caso, tal como se presentó en la sección anterior, la mayor velocidad de hinchamiento permite que se alcance el máximo grado de hinchamiento en un periodo más corto de tiempo (6 horas), para luego decaer debido al deterioro del gel. Por otra parte, para los hidrogeles preparados a partir de una solución más concentrada del copolímero, el hinchamiento es más gradual y se logra que crezca regularmente en todo el periodo de tiempo ensayado.

La gelación del alginato con los iones calcio se basa en la asociación de los residuos gulurónicos. El número de puntos de entrecruzamiento formados se incrementa con el aumento de la concentración de alginato en la solución, dando lugar a la formación de una estructura más rígida y compacta (Mandal y col. 2010). Estas características regulan el hinchamiento, presentándose como un obstáculo para el intercambio iónico $\text{Na}^+ \leftrightarrow \text{Ca}^{2+}$ ya mencionado.

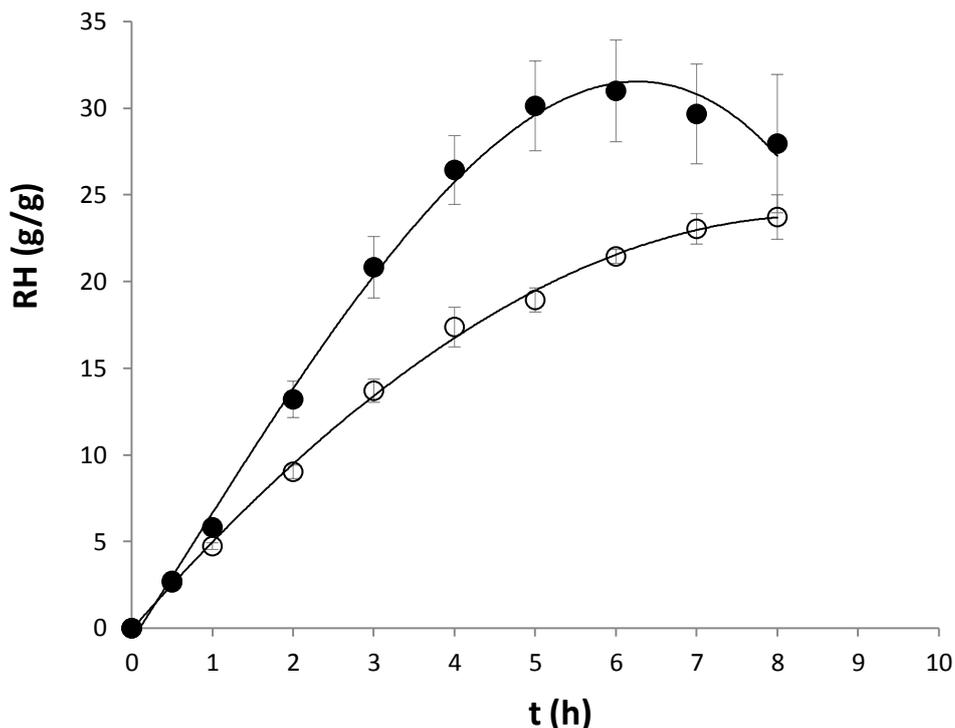


Figura 6.10- Relación de hinchamiento a 24°C para los hidrogeles formados a partir de soluciones al 4% (●) y al 8% (○) del copolímero COPI-1-80N.

Por otra parte se estudió también el efecto de la concentración de copolímero en la solución empleando el COP-L. Dicho material, cuya síntesis se detalló en el Capítulo 5 tiene una composición alginato/NIPAAm 70/30 expresada en moles de unidades repetitivas. Además, corresponde al copolímero con PNIPAAm de bajo peso molecular (PNIPAAm-L). Su elección se basó en que éste material permitiría obtener una solución con menor viscosidad para la formación de perlas.

En la Figura 6.11 se observa que para el hidrogel HCOP-L obtenido a partir de una solución al 4 % con 24 hs de curado, se alcanza el máximo grado de hinchamiento luego de tres horas de ensayo para posteriormente deteriorarse rápidamente. En cambio, para una solución al 8 % el máximo grado de hinchamiento se alcanza entre la cuarta y quinta hora de ensayo y el material se mantiene estable e hinchado durante el resto del ensayo.

Este efecto de la concentración de la solución formadora de perlas es similar a lo observado en la Figura 6.10 para el HCOPI-1-80N.

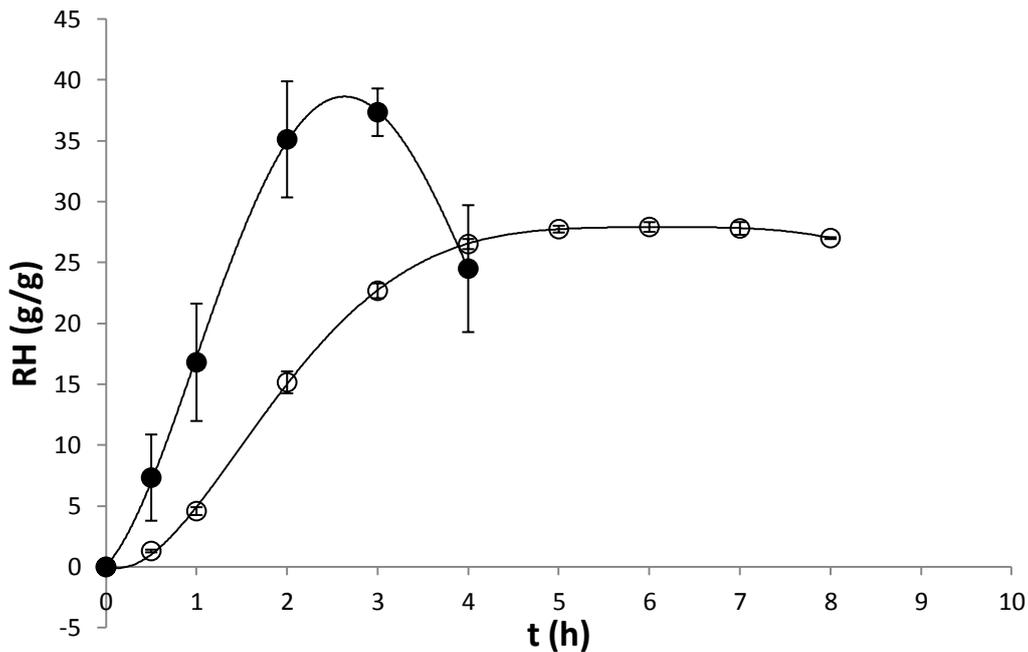


Figura 6.11- Relación de hinchamiento a 24°C para los hidrogeles formados a partir de soluciones al 4 % (●) y al 8 % (○) del copolímero COP-L.

En conclusión, un aumento de la concentración del copolímero en la solución formadora de perlas mejora la estabilidad en el tiempo de las mismas respecto a su grado de hinchamiento.

6.3.3 Efecto de la temperatura

El estudio de la relación de hinchamiento de los hidrogeles obtenidos en ésta tesis en función de la temperatura, es fundamental para verificar y cuantificar la termosensibilidad de estos materiales; siendo esta termosensibilidad función de la composición PNIPAAm/alginato de los copolímeros utilizados en la formación de hidrogeles.

6.3.3.1 Experimental

Se eligieron dos temperaturas de trabajo para llevar a cabo estas experiencias: una de ellas 24 °C, la cual está por debajo de la temperatura crítica de transición del PNIPAAm, y la otra 37 °C, por estar por encima de la transición y ser la temperatura corporal, lo que permite utilizar los resultados como un estudio preliminar para estimar su comportamiento como sistemas de liberación de principios activos.

Para llevar a cabo los experimentos a 37 °C se utilizaron viales de vidrio de 10 mL en los cuales se colocó la solución de hinchamiento (0,9 %m/v NaCl). Mediante el empleo de una gradilla se sumergió los viales en un baño de agua Cole Parmer (Modelo 12700-55) seteado a la temperatura de trabajo. Luego de alcanzarse la temperatura deseada, aproximadamente 30 minutos, se introdujo en cada vial de vidrio entre 8 y 10 mg de perlas de alginato. Para el pesado de las perlas a distintos tiempos las mismas se filtraron con una malla metálica recuperándose en un vaso de precipitados la solución de hinchamiento. Una vez removida la humedad superficial de las perlas con papel absorbente las mismas fueron pesadas en pequeñas cápsulas de papel de aluminio, colocadas nuevamente en el vial y sumergidas en la solución de hinchamiento para continuar con el proceso (Figura 6.12). El tiempo de medición fue menor a los dos minutos de modo tal de minimizar la variación de temperatura por estar fuera del baño termostatzado.



Figura 6.12. Mediciones del grado de hinchamiento de geles de copolímeros a 37 °C.
Baño termostatzado, filtro y cápsulas empleadas para el pesado de las perlas.

6.3.3.2 Resultados

Se estudió la influencia de la temperatura sobre el grado de hinchamiento de los hidrogeles de los copolímeros sintetizados en el Capítulo 4, por irradiación, y en el Capítulo 5, por reacción química de condensación.

Para los hidrogeles que provienen de los copolímeros obtenidos por irradiación (COPI-X-X) es importante recordar algunos aspectos característicos que condicionarán su comportamiento. El hinchamiento de los hidrogeles en estudio va a estar condicionado por la estructura formada por los copolímeros al entrecruzarse con los iones calcio. Es por esto que la dosis absorbida, la composición final de los materiales y la temperatura de ensayo son factores fundamentales a la hora de explicar las curvas de hinchamiento observadas.

En la Figura 6.13 se muestran las curvas de hinchamiento obtenidas para los HCOPI-5 con distinto contenido de PNIPAAm a 24 y 37 °C.

Para la dosis de 5 kGy, los radicales libres radioinducidos pueden generar el injerto de la NIPAAm al alginato, la escisión de los enlaces glucosídicos del polisacárido, la homopolimerización de los monómeros NIPAAm y también entrecruzamientos de las cadenas laterales del PNIPAAm formando una red aún antes del entrecruzamiento con calcio para la formación del hidrogel. Por lo cual, el efecto total de la dosis sobre la estructura del hidrogel obtenido será un balance entre las posibles reacciones mencionadas.

Los hidrogeles con mayor contenido de NIPAAm, para la dosis de 5 kGy, HCOPI-5-80N, presentan un grado de hinchamiento a temperatura ambiente (24 °C) muy diferente al obtenido a 37 °C. A 24 °C, se alcanza el máximo grado de hinchamiento entre todos los hidrogeles. Este material tiene poco contenido de alginato y más de un 90% de NIPAAm, (Capítulo 4). Evidentemente, este hidrogel presentaría el entrecruzamiento de las cadenas laterales de PNIPAAm formando una red que se mantuvo estable durante todo el tiempo de ensayo. Esto se corrobora con la alta viscosidad observada al preparar la solución de éste copolímero con una concentración del 8 % m/m para la formación de las perlas.

En los ensayos a 37 °C era de esperar que estos hidrogeles, con mayor contenido de PNIPAAm, presentaran un hinchamiento menor. La contracción del PNIPAAm en el gel provoca una limitación en la absorción del medio acuoso al exponer los grupos hidrofóbicos del mismo. Este comportamiento, como se observará más adelante, fue

similar para todos los hidrogeles ensayados a ésta temperatura y coincide con lo reportado en la bibliografía para otros hidrogeles basados en copolímeros de PNIPAAm (Ju y col., 2001; Guilherme y col., 2005).

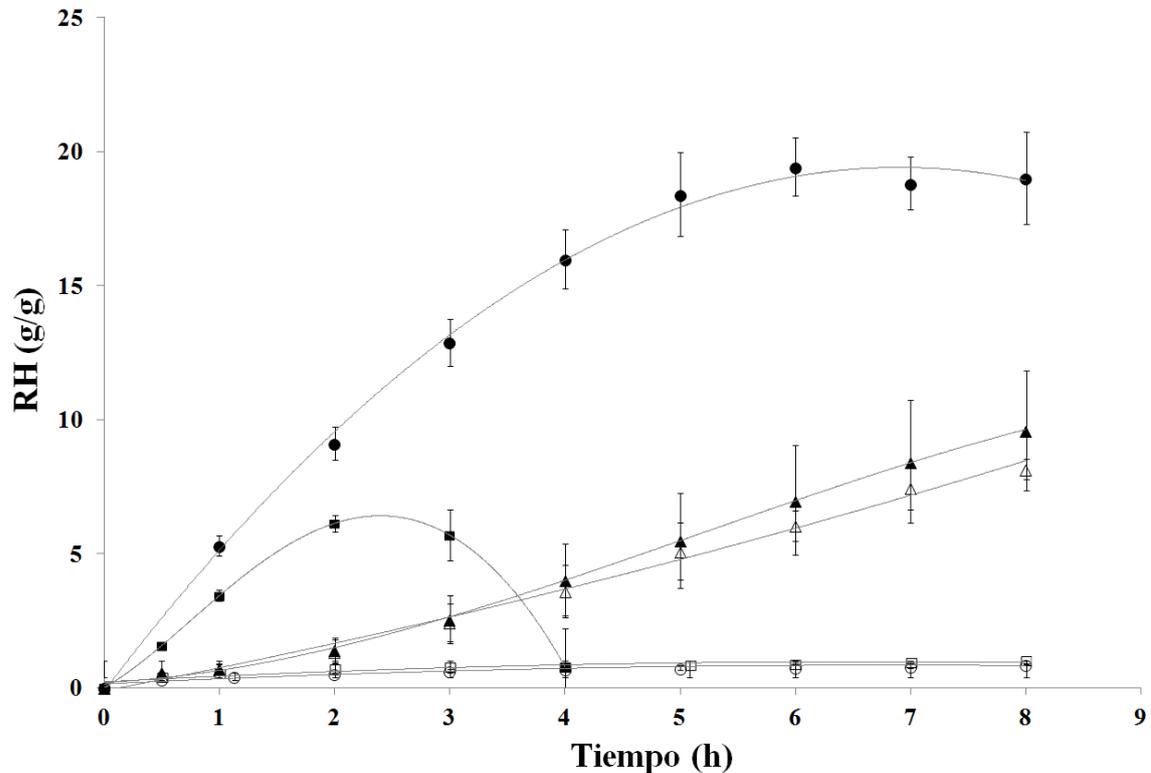


Figura 6.13. Grado de hinchamiento de geles de copolímeros de alginato y PNIPAAm obtenidos por irradiación con 5 kGy e hinchados en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl. Símbolos: (●) H-COPI-5-80N a 24 °C (○) H-COPI-5-80N a 37 °C, (■) H-COPI-5-67N a 24 °C, (□) H-COPI-5-67N a 37 °C, (▲) H-COPI-5-50N a 24 °C (△) H-COPI-5-50N a 37 °C.

El hidrogel H-COPI-5-67N presenta a temperatura ambiente (24 °C) una alta velocidad de hinchamiento, alcanzando su el máximo grado de hinchamiento a las dos horas de ensayo, pero inmediatamente después se produce la degradación de la estructura de gel. Su mayor contenido de alginato respecto al H-COPI-5-80N implicaría que, la escisión radioinducida en el mismo junto con un menor grado del entrecruzamiento de las cadenas laterales de PNIPAAm, conduciría a una estructura de gel menos estable. De manera el intercambio iónico $Ca^{+2} \leftrightarrow Na^{+}$ conduce a una disminución de los puntos de entrecruzamiento del alginato resultando en el deterioro del hidrogel. Por otra parte, tal como era previsible, el hinchamiento a 37 °C es mayor que el observado para el hidrogel HCOPI-1-80N por su menor contenido de NIPAAm.

Los hidrogeles H-COPI-5-50N presentaron relativamente bajos grados de hinchamiento, similares a ambas temperaturas. En este caso no se apreció un efecto de

la temperatura lo cual podría deberse al poco contenido de NIPAAm en su estructura. Para estos hidrogeles la escisión del alginato, evidente en la baja viscosidad de la solución de estos copolímeros al 8 %m/m, dio lugar a una estructura de gel con muy poca capacidad de hinchamiento. La escisión del alginato no disminuye los sitios disponibles para el entrecruzamiento con calcio, sino que disminuye el tamaño molecular y con ello los entrelazamientos moleculares.

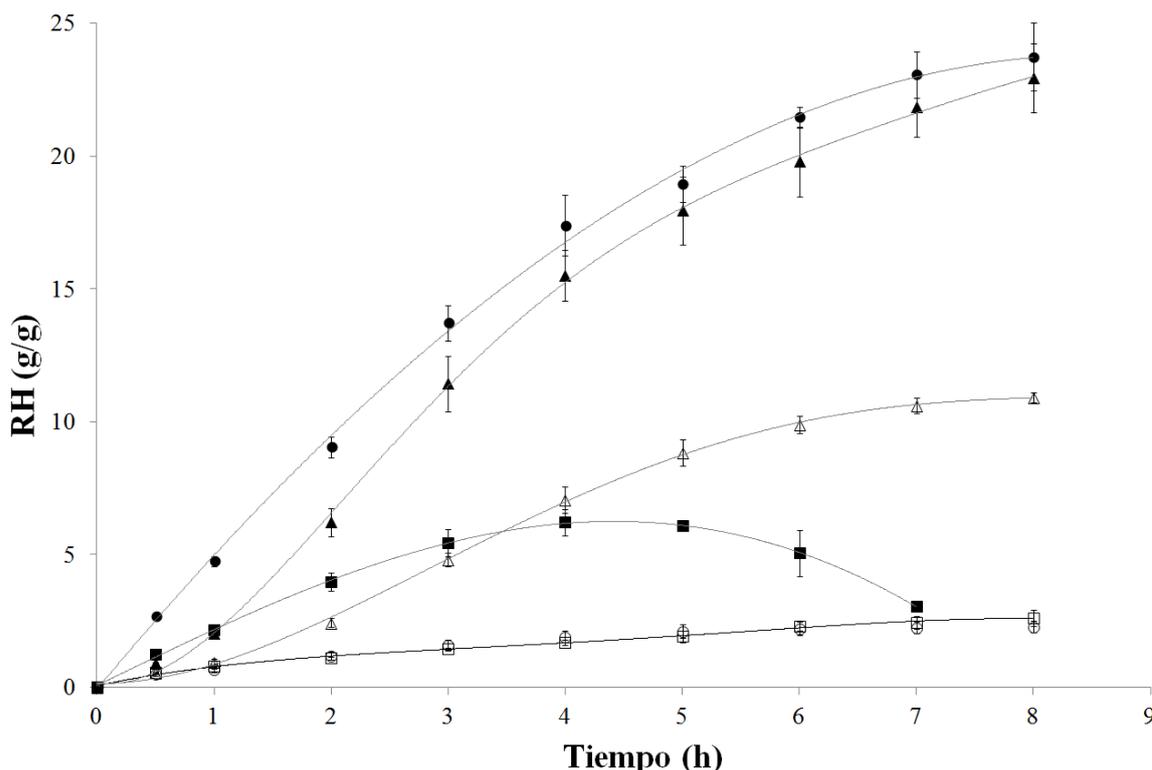


Figura 6.14. Grado de hinchamiento de geles de copolímeros de alginato y PNIPAAm obtenidos por irradiación con 1 kGy e hinchados en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl. Símbolos: (●) H-COPI-1-80N a 24 °C (○) H-COPI-1-80N a 37 °C, (■) H-COPI-1-67N a 24 °C, (□) H-COPI-1-67N a 37 °C, (▲) H-COPI-1-50N a 24 °C (△) H-COPI-1-50N a 37 °C.

A temperatura ambiente (24 °C), los hidrogeles H-COPI-1-80N y H-COPI-1-50N, presentan un comportamiento similar, alcanzando el máximo grado de hinchamiento a las 8 horas de ensayo, mientras que el H-COPI-1-67N, alcanza un máximo grado de hinchamiento a las 4 horas pero luego se observa un deterioro del gel (Figura 6.14). El comportamiento del hidrogel H-COPI-1-80N puede explicarse en términos de su mayor contenido de NIPAAm y de los entrelazamientos y posibles entrecruzamientos radioinducidos de las cadenas laterales de PNIPAAm. La solución del COPI-1-80N al 8 %m/v presentó una alta viscosidad, al igual que la del COPI-5-80N, previo a su entrecruzamiento con los iones calcio.

En los hidrogeles H-COPI-1-67N el hinchamiento estuvo condicionado por su mayor contenido de alginato. Nuevamente, tal como se describió para la dosis de 5 kGy la escisión radioinducida del alginato junto con los menores entrelazamientos aportados por el NIPAAm generan una red menos compacta que se deteriora debido al intercambio iónico. Sin embargo, los efectos radioinducidos son menores a los observados a 5 kGy por utilizarse una dosis menor; lo cual explicaría porque el hidrogel H-COPI-1-67N mantuvo su estructura hasta la cuarta hora de ensayo.

Para los hidrogeles H-COPI-50N, con mayor contenido de alginato, el hinchamiento se basó fundamentalmente en la menor escisión del mismo respecto al H-COPI-5-50N permitiendo formar una red mas entrelazada capaz de hincharse progresivamente.

Por otra parte, a 37 °C, el grado de hinchamiento de todos los hidrogeles es nuevamente función del contenido de NIPAAm en el copolímero empleado para la obtención del hidrogel.

En la Figura 6.15, se presentan las curvas de hinchamiento de los hidrogeles obtenidos a partir de los copolímeros sintetizados con 0,5 kGy (H-COPI-05-80N, H-COPI-05-67N y H-COPI-05-50N). Los hidrogeles fueron estables para las tres composiciones, prácticamente no hubo deterioro de las perlas en todo el periodo de ensayo.

Para los copolímeros obtenidos con una dosis de 0,5 kGy no se obtendría entrecruzamiento de las cadenas laterales del PNIPAAm injertado. Por lo tanto, el alginato, que a su vez está menos escindido, proveería la estructura del gel al entrecruzarse con los iones Ca^{+2} . En este caso, el PNIPAAm no contribuye a la estructura tridimensional con entrecruzamientos, pero si con entrelazamientos aportando mayor rigidez a la red formada a medida que el contenido de NIPAAm es mayor. Un mayor contenido de NIPAAm en e copolímero se traduce en un menor grado de hinchamiento alcanzado. Para el hidrogel H-COPI-05-50N, con menor contenido de NIPAAm se alcanza el mayor valor de grado de hinchamiento a 24 °C.

A 37 °C, una vez más el comportamiento de los hidrogeles está condicionado por el contenido de PNIPAAm y a su colapso hidrofóbico, limitando el hinchamiento.

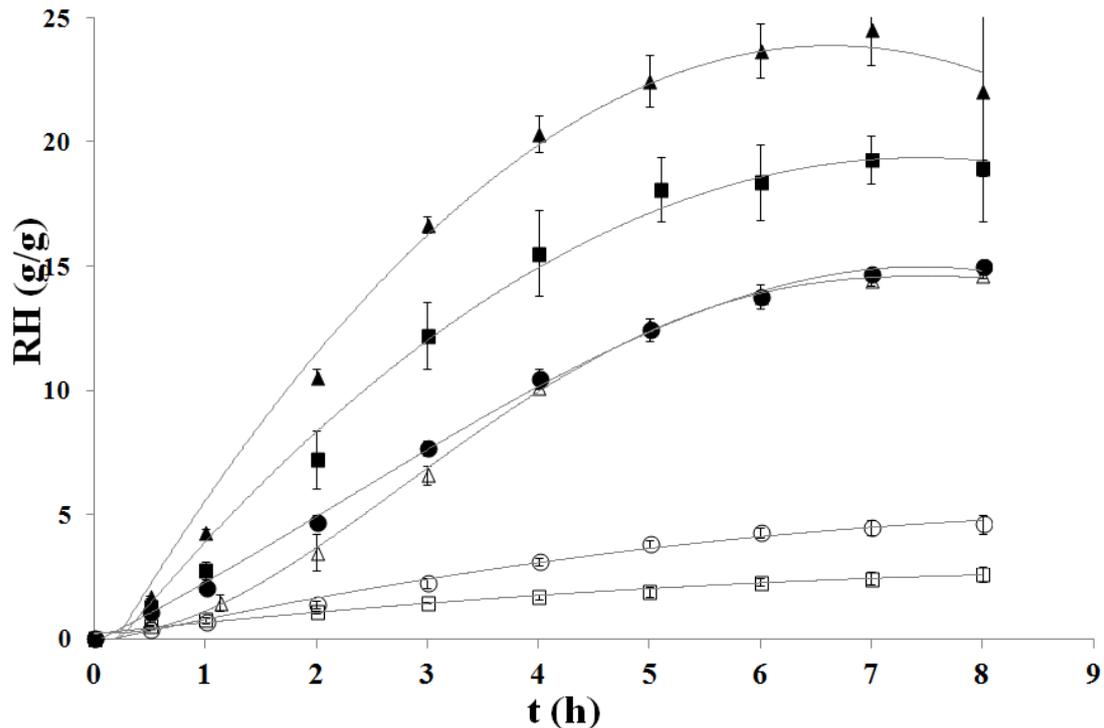


Figura 6.15. Grado de hinchamiento de geles de copolímeros de alginato y PNIPAAm obtenidos por irradiación con 0,5 kGy e hinchados en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl.

Símbolos: (●) H-COPI-05-80N a 24 °C (○) H-COPI-05-80N a 37 °C, (■) H-COPI-05-67N a 24 °C, (□) H-COPI-05-67N a 37 °C, (▲) H-COPI-05-50N a 24 °C (△) H-COPI-05-50N a 37 °C.

En la Figura 6.16 se presentan las curvas de hinchamiento para los hidrogeles obtenidos a partir copolímeros sintetizados con 0,3 kGy. Las perlas del hidrogel H-COPI-03-50N no pudieron formarse dado que la solución al 8 % m/m del copolímero COPI-03-50N no presentó una viscosidad suficiente para mantener la forma de gota al entrar en contacto con la solución de iones calcio.

Los hidrogeles H-COPI-03-80N presentaron un buen grado de hinchamiento a 24 °C mientras que la estructura más compacta a 37 °C mostró un menor grado de hinchamiento haciendo evidente su termosensibilidad. Sin embargo, para el H-COPI-03-67N los valores de grado de hinchamiento observados a 24 y 37 °C no presentaron diferencias significativas, lo que podría atribuirse a su menor contenido en NIPAAm (~ 30 % molar). Un comportamiento similar se observó para el hidrogel H-COPI-5-50N cuya composición estimada en el Capítulo 4 resultó ser menor a un 40 % molar de NIPAAm.

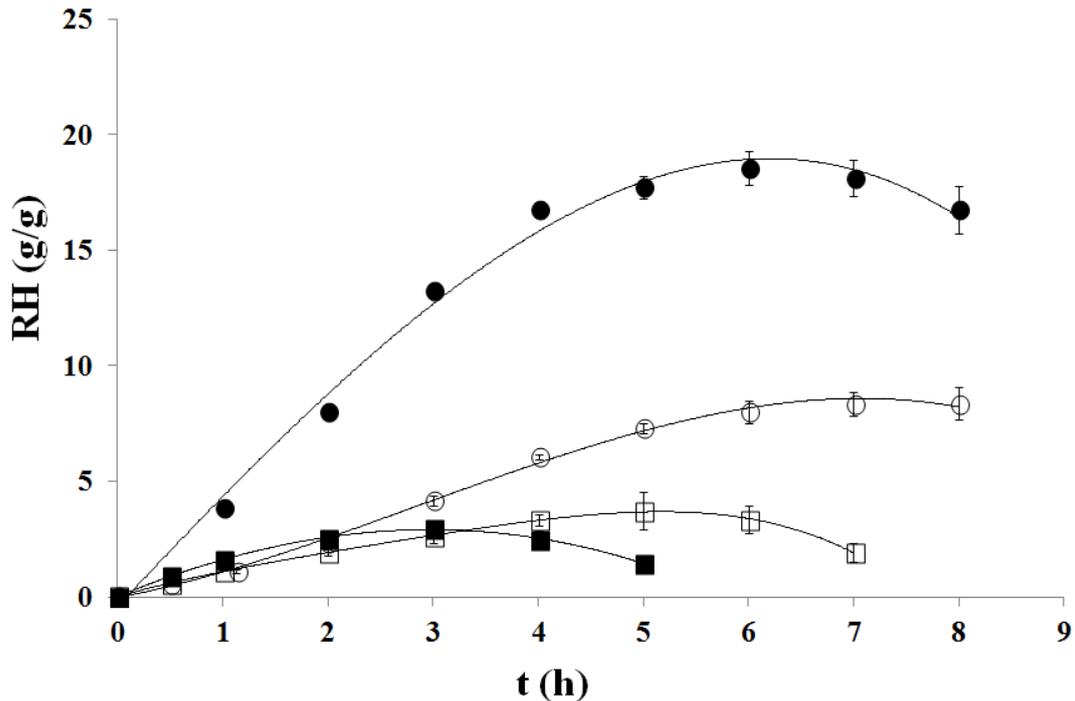


Figura 6.16. Grado de hinchamiento de geles de copolímeros de alginato y PNIPAAm obtenidos por irradiación con 0,3 kGy e hinchados en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl.

Símbolos: (●) H-COPI-03-80N a 24 °C (○) H-COPI-03-80N a 37 °C, (■) H-COPI-03-67N a 24 °C, (□) H-COPI-03-67N a 37 °C.

La influencia de la temperatura y de las condiciones de síntesis de los copolímeros (composición y dosis de radiación) empleados en la obtención de los hidrogeles sobre el grado de hinchamiento puede ser explicada más fácilmente si se grafican en forma adecuada los datos anteriores.

En las Figuras 6.17 se presenta el grado de hinchamiento a 24 °C para todos los hidrogeles anteriormente descritos. Por debajo de la temperatura crítica de transición del PNIPAAm, el comportamiento del hidrogel frente al hinchamiento no está determinado por uno de los componentes sino que su respuesta se debe a una sumatoria de factores tales como, escisión de las cadenas de alginato, grado de injerto de NIPAAm, grado de entrecruzamiento y entrelazamientos de las cadenas de PNIPAAm injertadas. A partir de los valores obtenidos puede concluirse que a ésta temperatura los hidrogeles que presentan un mejor comportamiento frente al hinchamiento son los que poseen mayor contenido de NIPAAm (-80N), en particular 1 kGy, mientras que para los hidrogeles con menor contenido de NIPAAm (-67N y -50N), la dosis de 0,5 kGy conduce a hidrogeles más estables (no se deterioran durante el ensayo).

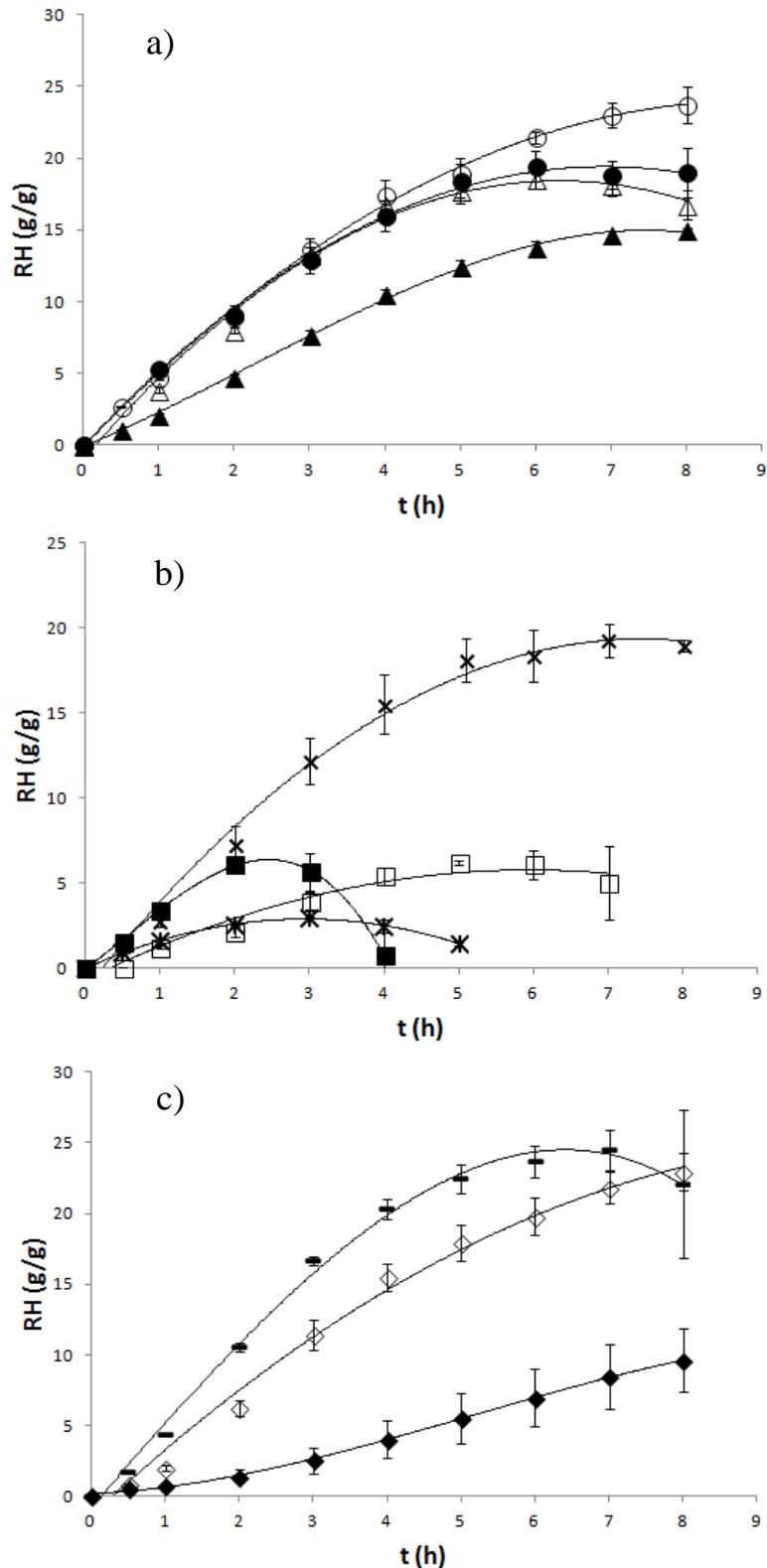


Figura 6.17. Grado de hinchamiento a 24 °C de geles de copolímeros de alginato y PNIPAAm obtenidos por irradiación e hinchados en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl. Símbolos: a) (●) H-COPI-5-80N, (○) H-COPI-1-80N, (▲) H-COPI-05-80N, (△) H-COPI-03-80N b) (■) H-COPI-5-67N, (□) H-COPI-1-67N, (X) H-COPI-05-67N, (*) H-COPI-03-67N y c) (◆) H-COPI-5-50N, (◇) H-COPI-1-50N, (-) H-COPI-05-50N.

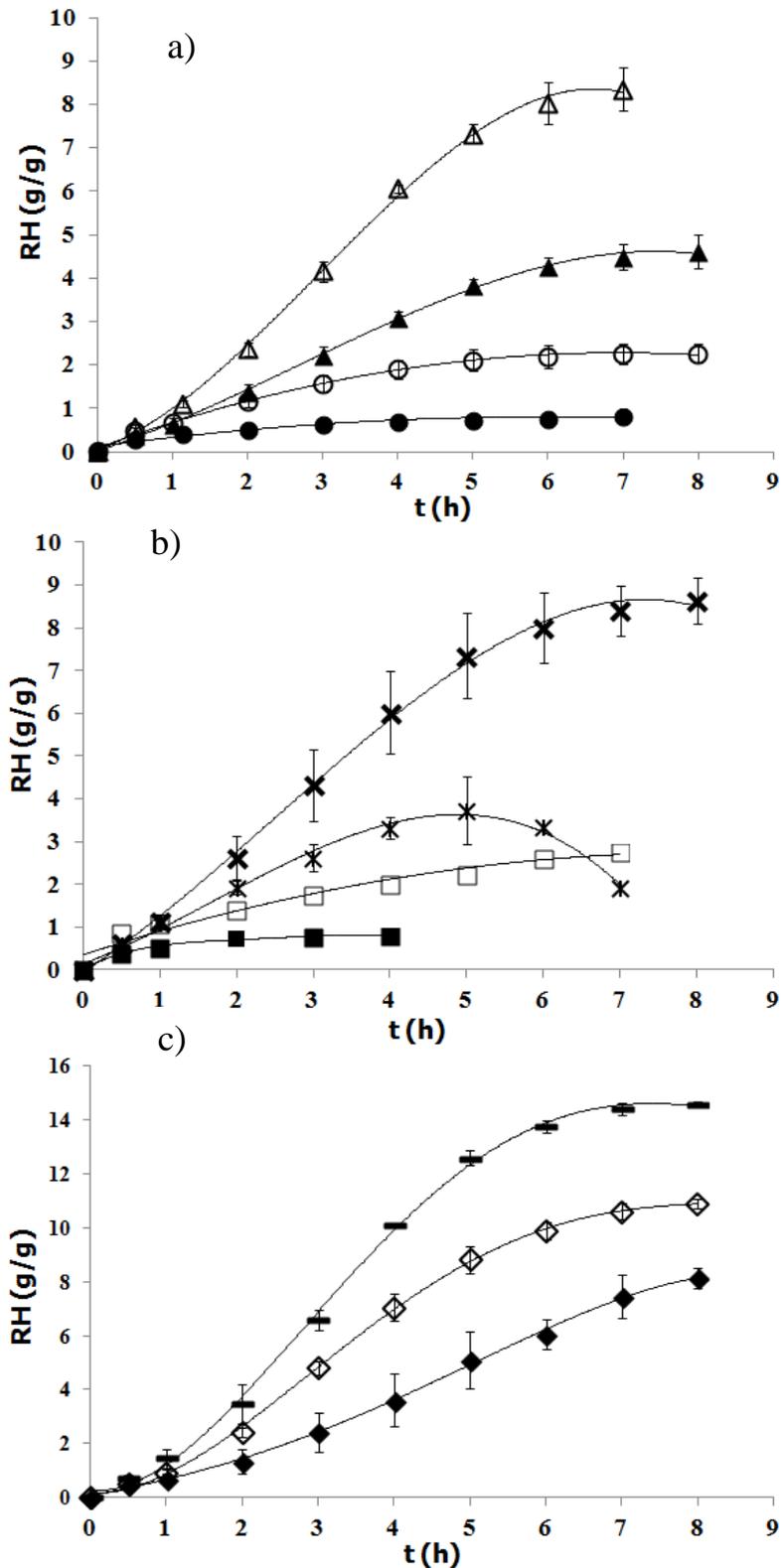


Figura 6.18. Grado de hinchamiento a 37 °C de geles de copolímeros de alginato y PNIPAAm obtenidos por irradiación e hinchados en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl. Símbolos: a) (●) H-COPI-5-80N, (○) H-COPI-1-80N, (▲) H-COPI-05-80N, (△) H-COPI-03-80N b) (■) H-COPI-5-67N, (□) H-COPI-1-67N, (X) H-COPI-05-67N, (*) H-COPI-03-67N y c) (◆) H-COPI-5-50N, (◇) H-COPI-1-50N, (-) H-COPI-05-50N.

Los ensayos de hinchamiento realizados a 37 °C arrojan resultados determinantes en cuanto al efecto de la dosis en el injerto del NIPAAm sobre el alginato (Figuras 6.18). A esta temperatura el hinchamiento del hidrogel está determinado por el contenido de PNIPAAm en el copolímero obtenido por irradiación. En todos los casos se observa que para una misma composición de la mezcla de reacción, una mayor dosis aplicada da como resultado un mayor contenido de NIPAAm en el copolímero. Esto da como resultado un hidrogel que presenta una mayor contracción de la red cuando se trabaja a temperaturas por encima de la LCST del PNIPAAm y se alcance, por consiguiente, un menor grado de hinchamiento. El grado de hinchamiento de los hidrogeles, a 37 °C, aumenta con la disminución de la dosis empleada en la síntesis de los copolímeros (con excepción del hidrogel H-COPI-03-67N). A esta temperatura no se observa un deterioro del hidrogel en el tiempo lo cual puede deberse a que las cadenas de PNIPAAm expone los grupos metilos hidrofobos limitando el ingreso de agua y por consiguiente el intercambio entre Na^+ y Ca^{2+} .

Por otra parte, se obtuvieron también hidrogeles empleando los copolímeros obtenidos por síntesis química (Capítulo 5). La composición de estos copolímeros se estimó en aproximadamente un 30 % molar de unidades repetitivas del polímero termosensible (PNIPAAm de mayor y menor masa molar, COPQ-H y COPQ-L, y P(NIPAAm-co-NTBAAm), COP-C).

Para obtener éstos hidrogeles se prepararon soluciones al 4 % m/v, puesto que éstas presentaban la mejor formación de perlas al gotearlas sobre las soluciones al 2 % m/v CaCl_2 . Los ensayos de hinchamiento para los hidrogeles H-COPQ-L, H-COPQ-H y H-COPQ-C se llevaron a cabo a temperatura ambiente (24 °C), a 45 °C para estar por encima de la temperatura de transición y, en una etapa posterior, a raíz de que a 45 °C no se observaron cambios significativos en el grado de hinchamiento se realizaron medidas a una temperatura superior (60 °C). Los resultados se presentan en las Figuras 6.19, 6.20 y 6.21.

Por otra parte, en estos copolímeros se empleó un alginato diferente al utilizado en la síntesis de los copolímeros por irradiación razón por la cual será prácticamente imposible comparar los resultados de grado de hinchamiento obtenidos en ambos casos.

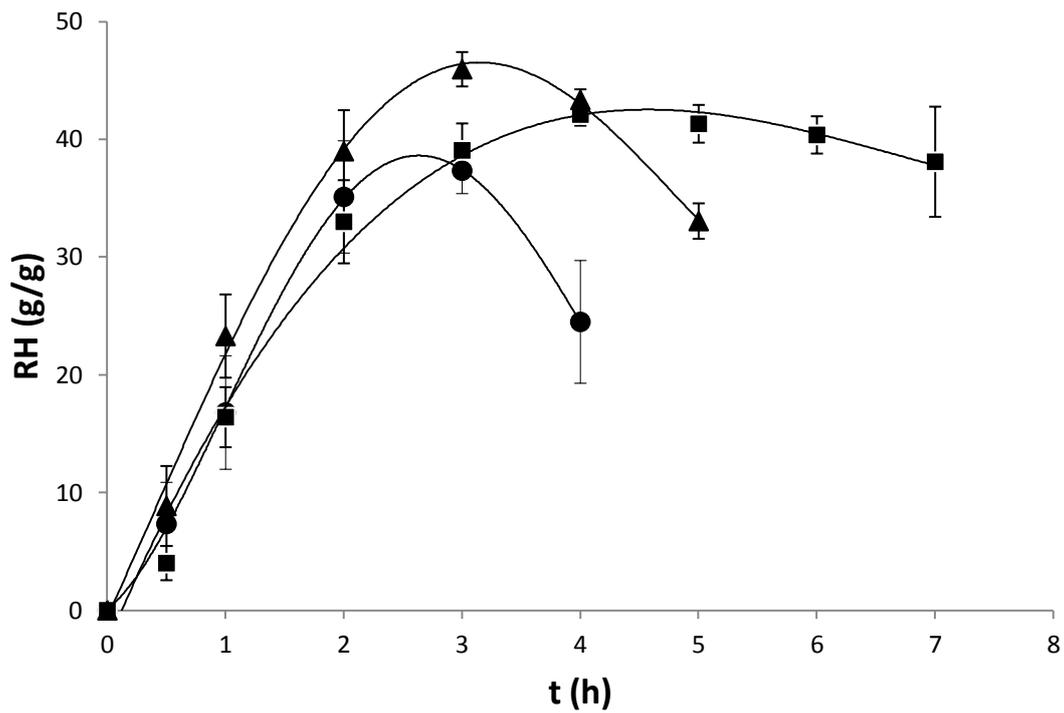


Figura 6.19. Grado de hinchamiento en función del tiempo de geles obtenidos empleando COPQ-L (H-COPQ-L) hinchados en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl. Símbolos: (●) T = 24 °C, (■) T = 45 °C y (▲) T = 60 °C.

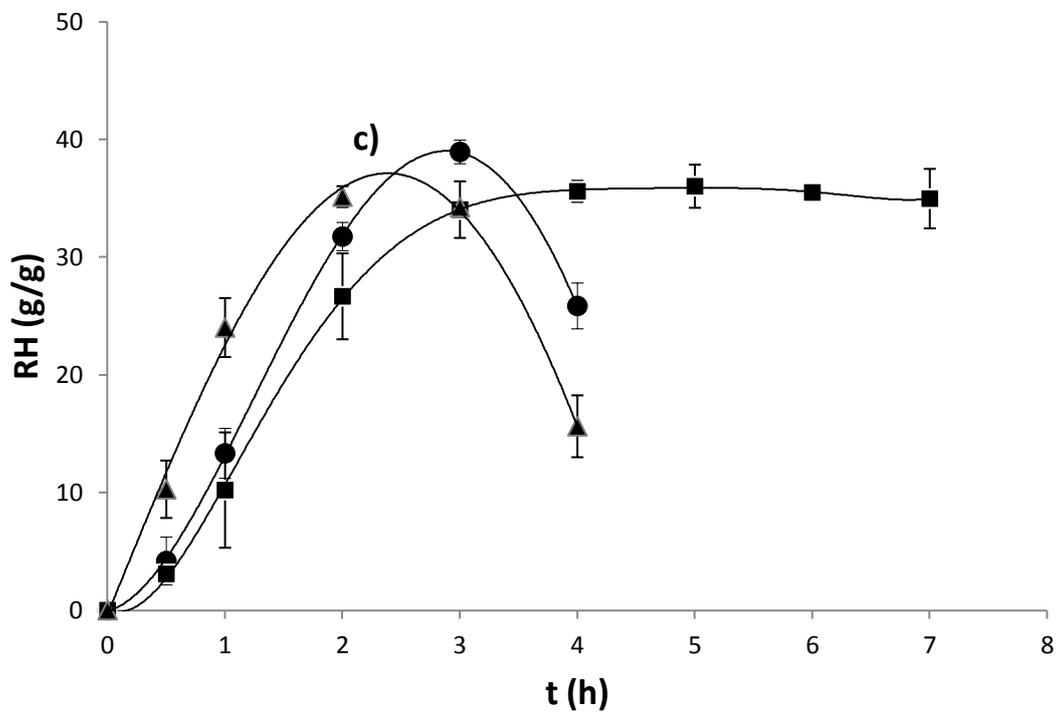


Figura 6.20. Grado de hinchamiento en función del tiempo de geles obtenidos empleando COPQ-H (H-COPQ-H) hinchados en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl. Símbolos: (●) T = 24 °C, (■) T = 45 °C y (▲) T = 60 °C.

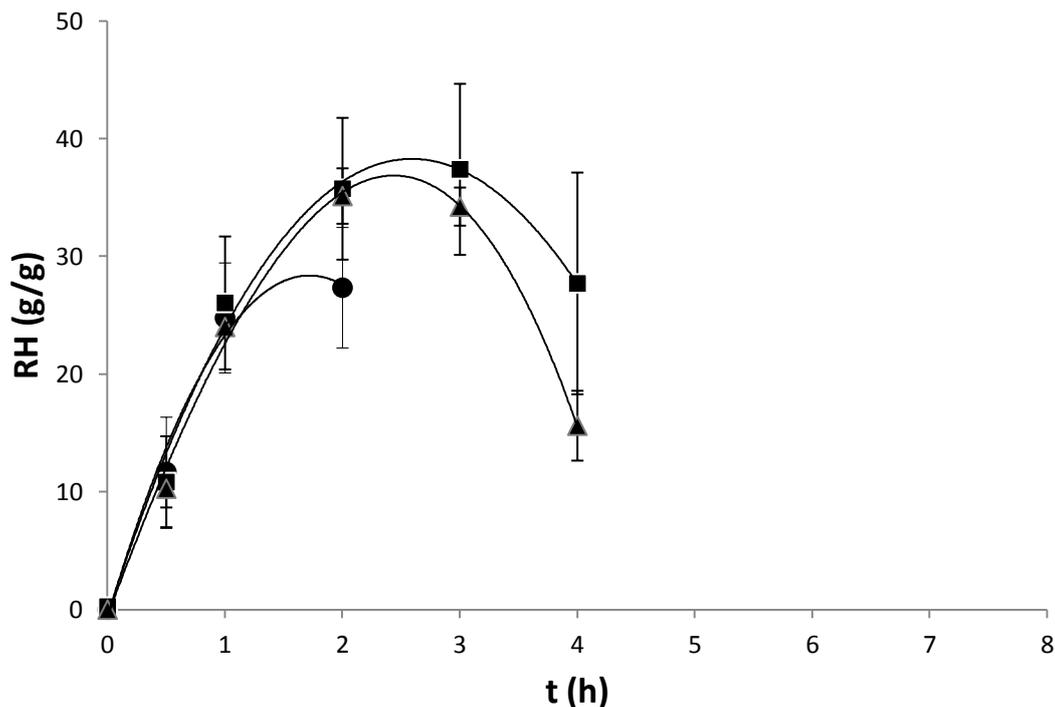


Figura 6.21. Grado de hinchamiento en función del tiempo de geles obtenidos empleando COPQ-C (H-COPQ-C) hinchados en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl. Símbolos: (●) T = 24 °C, (■) T = 45 °C y (▲) T = 60 °C.

En los hidrogeles obtenidos a partir de copolímeros alginato-g-PNIPAAm (H-COPQ-L y H-COPQ-H) se obtuvieron valores importantes de grado de hinchamiento a 45 °C los cuales se mantuvieron constantes por más de 6 horas de inmersión en la solución acuosa. Sin embargo, no hubo una transición notable en la estructura de estos hidrogeles por el cambio de temperatura entre 24 y 45 °C. Tampoco se observaron diferencias en el grado de hinchamiento variando la longitud de las cadenas de PNIPAAm (L y H) injertadas en el alginato.

El hidrogel H-COPQ-C presentó, a 24 °C, la menor estabilidad deteriorándose después de la segunda hora de ensayo, mientras por un aumento de la temperatura sólo extendió en una hora la estabilidad de las perlas.

Si bien los hidrogeles formados presentaron la transición hidrofílica/hidrofóbica al ser ensayados a 37 °C, siendo evidente en la apariencia de las mismas (presentando el color blanco característico), el grado de hinchamiento de los hidrogeles no cambió substancialmente a las temperaturas estudiadas. Dicho comportamiento condujo a la hipótesis, que quizás la utilización de una solución de los copolímeros menos concentrada, que la utilizada para la formación de hidrogeles con los copolímeros por irradiación H-COPI, diera lugar a materiales menos rígidos (los cuales alcanzarán un

mayor grado de hinchamiento). A su vez, la menor rigidez, haría que el PNIPAAm al contraerse no pueda formar una estructura compacta por el menor número de entrelazamientos y por consiguiente no se observe la termosensibilidad en el hidrogel. Por ésta razón, se decidió preparar hidrogeles con una solución del COPQ-L al 8 %m/m. y se eligieron como temperaturas de ensayo 24 y 37°C. En la Figura 6.22 se presenta el grado de hinchamiento para el hidrogel H-COPQ-L preparado a partir de una solución al 8% m/m. Estos resultados corroboran que un aumento en la concentración de la solución de polímero, se traduce en un menor grado de hinchamiento (mayor densidad de entrecruzamientos). Sin embargo, el aumento en la concentración, no dió lugar a una respuesta distinta del hidrogel frente a la temperatura. Los hidrogeles obtenidos no presentan una termosensibilidad significativa, presentando valores similares de grado de hinchamiento a temperatura ambiente (24 °C) y a 37 °C.

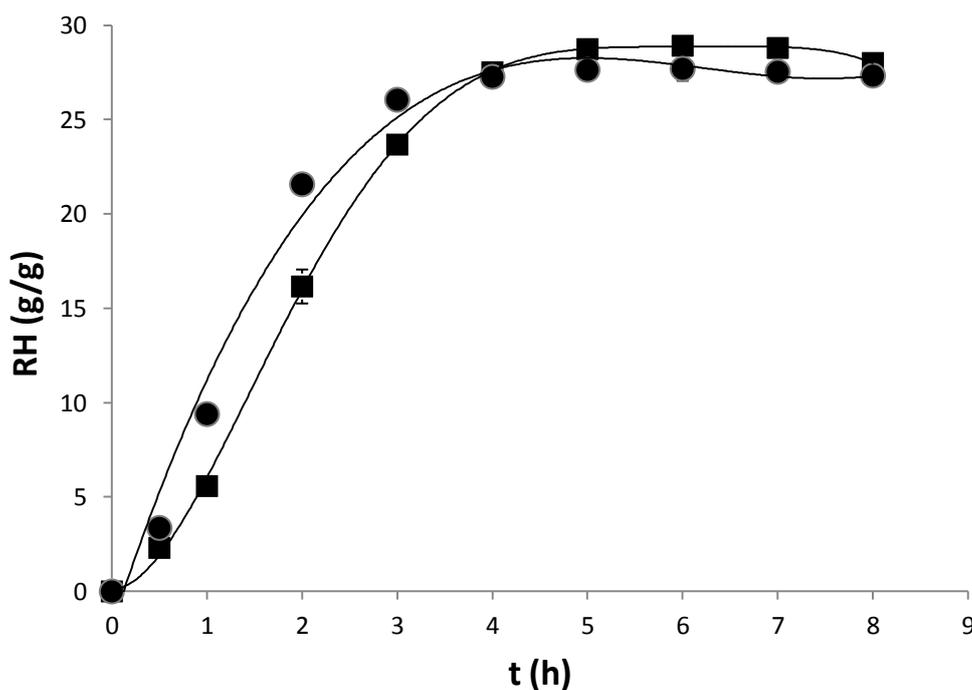


Figura 6.22. Grado de hinchamiento en función del tiempo de geles obtenidos empleando una solución al 8 % COPQ-L (H-COPQ-L) hinchados en una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl. Símbolos; (●) T = y 24°C y (■) T = 37°C.

La ausencia de termosensibilidad observada en los hidrogeles formados por los copolímeros COPQ-L, COPQ-H y COPQ-C puede ser atribuída a la composición del copolímero. Al igual que lo observado para los hidrogeles H-COPI-5-50N y H-COPI-

03-67N, en los cuales el contenido de NIPAAm en los copolímeros es de alrededor de 35 %, los hidrogeles de los copolímeros COPQ-L, COPQ-H e HCOPQ-C no presentan un grado de hinchamiento que cambie substancialmente con la temperatura. Sabiendo que el contenido de NIPAAm de los copolímeros COP-L, COP-H y COP-C es de alrededor de un 30 %, es razonable que no se refleje en el hidrogel el comportamiento termosensible del copolímero de partida. De todos modos, un aumento en la concentración de la solución a partir de la cual se obtiene el hidrogel, le aporta una mayor densidad de entrecruzamientos lo cual se traduce en una mayor estabilidad de los hidrogeles (se alcanzan 8 horas de ensayo con las perlas en buenas condiciones).

Al comparar los perfiles de hinchamiento de los hidrogeles obtenidos a partir de los copolímeros sintetizados por irradiación y los copolímeros preparados por condensación, es posible observar que, en estos últimos, se alcanza un máximo en el grado de hinchamiento en el término de las primeras 3 horas, resultado observado también por otros autores (Kim y col., 2005). Por otra parte, el hinchamiento de los hidrogeles de los copolímeros sintetizados por irradiación fue más progresivo, aumentando paulatinamente, en la mayoría de los casos, en todo el intervalo de tiempo estudiado.

6.4 Estudios de liberación controlada de principios activos

6.4.1 Equipamiento utilizado

Para llevar a cabo las experiencias se utilizó una adaptación de las celdas de Franz disponibles en PLAPIQUI. En la Figura 6.23 se presenta una fotografía del sistema empleado en los ensayos de liberación de principios activos a partir de algunos de los hidrogeles caracterizados previamente. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Se utilizaron los compartimentos inferiores, denominados receptores, de las celdas de Franz, utilizadas comúnmente para el estudio de la difusión a través de membranas porosas. Los mismos consisten en vasos de vidrio termostatizados mediante la circulación de agua a través de una camisa externa. Cada celda está colocada sobre un agitador magnético que homogeniza la concentración y temperatura del medio receptor. El sistema de celdas fue termostatizado a 37 °C. La agitación de las soluciones se eligió de manera tal que fuera lo suficientemente enérgica para asegurar la rápida homogenización del medio, minimizando así posibles gradientes de concentración en las mismas. A su vez, se controló la agitación de modo tal que sea la misma en las tres

celdas y que no generara turbulencias dentro de la celda que pudieran introducir burbujas dentro del sistema.

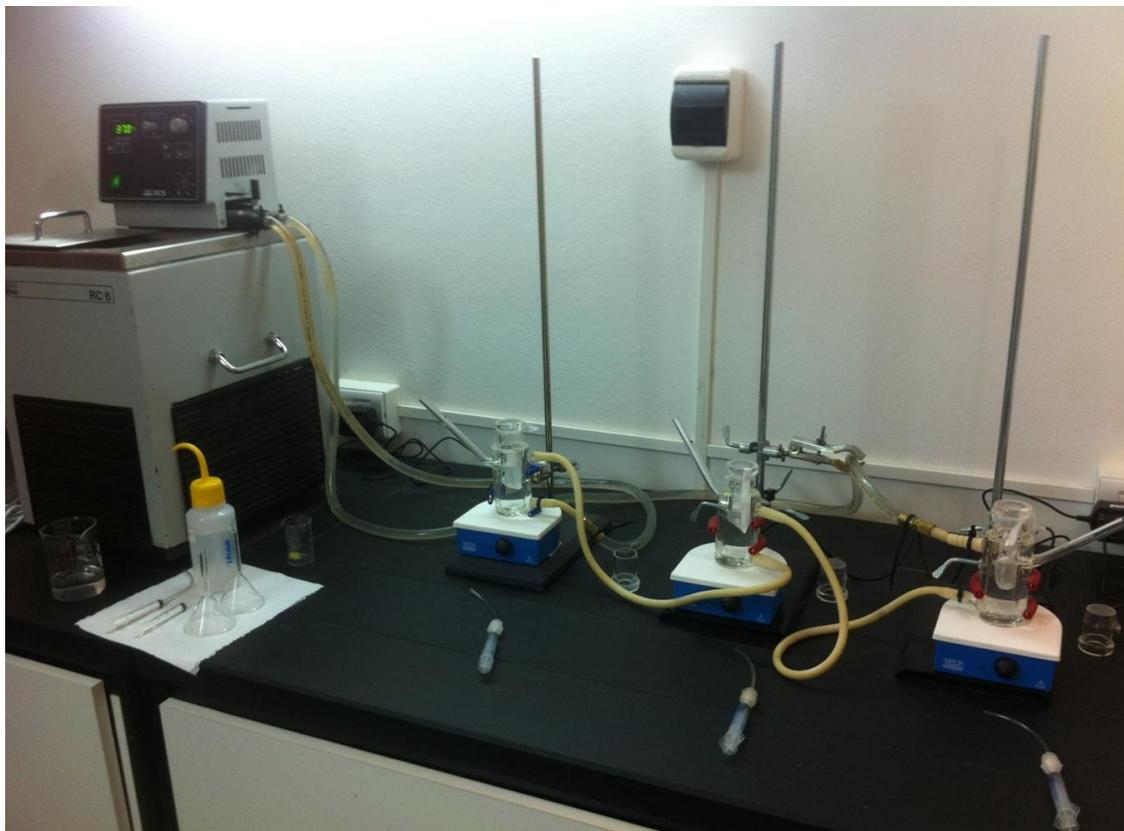


Figura 6.23. Fotografía del sistema empleado para la determinación de la cinética de liberación de principios activos a 37 °C. Se observan las tres celdas empleadas conectadas en línea a un baño termostalizado.

Cada celda posee una boca principal superior por donde se colocaron las bolsas permeables con el material a ensayar y por donde se realizó la toma de muestra empleando una jeringa de 5 mL provista de una sonda plástica con filtro. La sonda, de aproximadamente 10 cm de longitud, permitió realizar una cómoda toma de muestra desde el seno de la solución receptora. Las celdas poseen además un brazo lateral por donde se repone el volumen equivalente a la solución salina extraída en la toma de muestra (Figura 6.24).

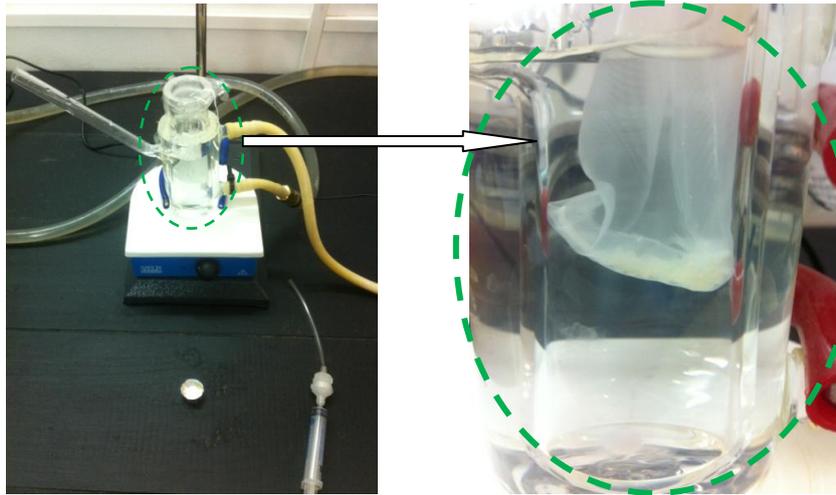


Figura 6.24. Fotografía de una de las celdas utilizadas para los estudios de liberación. En la misma se puede observar la bolsa porosa conteniendo en su interior perlas de uno de los hidrogeles cargados con el principio activo.

6.4.2 Determinación de los materiales a utilizar como sistemas de liberación

En función de los resultados obtenidos para el hinchamiento de los hidrogeles se seleccionaron para los ensayos de liberación los hidrogeles preparados a partir de copolímeros de injerto con alto contenido en PNIPAAm sintetizados por radiación. Estos hidrogeles presentaron un mayor carácter termosensible y por consiguiente un menor grado de hinchamiento a 37 °C por lo que la liberación del principio activo estaría termo-regulada. Para estudiar el efecto de las variables de la síntesis de los copolímeros precursores de los hidrogeles sobre los perfiles de liberación se eligió la serie con mayor contenido de NIPAAm (H-COPI-5-80N, H-COPI-1-80N, H-COPI-05-80N y H-COPI-03-80N) en donde se varió la dosis de radiación y la serie obtenida con 0,5 kGy de radiación, variando el contenido de NIPAAm (H-COPI-05-80N, H-COPI-05-67N y H-COPI-05-50N).

6.4.3 Determinación del fármaco a utilizar para los ensayos de liberación

En cuanto a los principios activos a utilizar, se eligieron tres fármacos ampliamente utilizados: indometacina, ofloxacina y atenolol, ya que los tres permiten su cuantificación a partir de una medición de absorbancia en el espectro ultravioleta, las estructuras moleculares se presentan en las figuras 6.25 para la indometacina, 6.26 para la ofloxacina y 6.27 para el atenolol.

La indometacina es un principio activo del tipo antiinflamatorio no esteroide que se indica para el alivio del dolor, fiebre e inflamación en pacientes con osteoartritis, artritis reumatoide, dolor muscular, entre las afecciones más comunes. Se suministra por vía oral o rectal, con una dosificación de 25, 50 y 100 mg diarios (Clinical Pharmacology, 2009a). La ofloxacina es un antibiótico sintético utilizado para el tratamiento de las infecciones urinarias moderadas o leves, prostatitis, infección del tracto respiratorio inferior e infecciones de la piel, entre otras. La ofloxacina se puede administrar por vía oral, intravenosa y oftálmica. Su posología es de alrededor de 400 mg diarios (Clinical Pharmacology, 2009b). Finalmente el atenolol, es un fármaco del grupo de los beta bloqueantes, una droga usada primariamente en enfermedades cardiovasculares, como hipertensión, enfermedades coronarias, arritmia, e infarto de miocardio después del evento agudo. Las vías de administración son oral e intravenosa y su posología varía entre 25 y 100 mg diarios (Thompson, 1977; Gurni y Felt, 2003; Clinical Pharmacology, 2009a y 2009b; Wander y col. 2009).

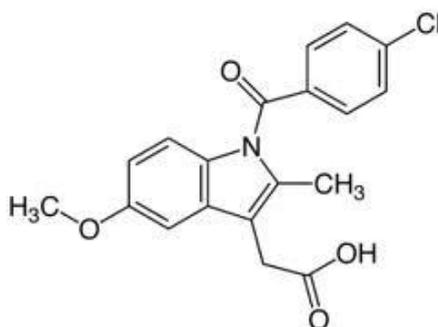


Figura 6.25. Estructura molecular de la Indometacina

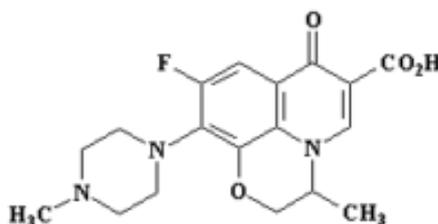


Figura 6.26. Estructura molecular de la Ofloxacina

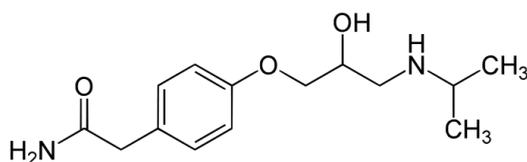


Figura 6.27. Estructura molecular del Atenolol

De los tres principios activos descriptos, el primero en ser descartado para su uso como fármaco modelo en los ensayos de liberación fue la indometacina, dado que presenta una muy baja solubilidad en solución acuosa: 0,937 mg/L. La ofloxacina presenta una mayor solubilidad que la indometacina a pH 7 pero igualmente relativamente baja: 3,23 mg/mL (Gurni y Felt, 2003). El atenolol posee una solubilidad en agua de 26,5 mg/mL a 37 °C (Wander y col. 2009).

Teniendo en cuenta los valores de solubilidad, se realizaron pruebas para cargar los principios activos seleccionados (ofloxacina y atenolol) en los hidrogeles. Para esto, se estudió en una primera etapa la carga de los principios activos en perlas de alginato de calcio. Se cargaron así perlas de alginato de calcio hinchadas (sin experimentar el proceso de deshidratación) por inmersión en una solución de fármaco de concentración conocida, cuantificando la disminución de la concentración del fármaco en la solución en función del tiempo de inmersión.

A fin de no utilizar soluciones concentradas de los principios activos (cercanas a la saturación), se eligió preparar una solución conteniendo 1,5 mg de ofloxacina en 25 mL de agua y una solución conteniendo 25 mg de atenolol en 25 mL de agua, utilizando agua destilada de pH~5,5. Para favorecer la solubilidad de las drogas utilizadas los matraces con la solución se colocaron en un sonicador por un período de 15 minutos.

Utilizando pipetas de doble aforo se colocaron 5 mL de cada solución en tres conjuntos de viales de vidrio, a los cuales se les colocó una masa de aproximadamente 0,2 g de perlas de alginato de calcio preparadas a partir de una solución al 1 % m/v de alginato de sodio, con un tiempo de inmersión de 24 horas en una solución al 2 % m/v CaCl₂. Luego de una hora de inmersión se retiraron las perlas del primer conjunto de viales (uno con solución de atenolol y otro con solución de ofloxacina) y se dejaron secar a temperatura ambiente. El mismo procedimiento se realizó luego de 4 y 20 h de inmersión. Se obtuvieron así, para cada fármaco, tres soluciones residuales que contuvieron las perlas por 1, 4 y 20 horas, y las perlas resultantes de estos periodos de inmersión.

Las soluciones de los viales se diluyeron en una proporción 1:10 y se cuantificó la concentración del fármaco mediante espectrofotometría UV. Para determinar la longitud de onda donde cuantificar cada fármaco se realizó previamente un espectro de la solución seleccionando la longitud de onda donde se produce un máximo de absorción: $\lambda = 293$ nm para la ofloxacina y $\lambda = 274$ nm para el atenolol.

Las curvas de calibración realizadas para la cuantificación de cada fármaco se presentan en el Anexo IV. A partir de los valores de absorbancia se determinó la concentración de fármaco en la solución inicial y final (luego de la inmersión de las perlas por distintos tiempos). Por otro lado, se calculó el contenido de perlas secas en la masa de perlas hinchadas y con este dato se estimó el porcentaje de carga, expresándolo como mg de fármaco contenido en 100 mg de perlas de alginato de calcio secas. Para corroborar estos valores se colocó las perlas cargadas en 1 mL de solución buffer de pH = 7 con base en fosfatos lo cual permitió el intercambio entre iones Na^+ y Ca^{+2} liberándose en la solución la carga del fármaco. Posteriormente se cuantificó la concentración de fármaco en la solución previa centrifugación para separar las partículas en suspensión Tablas 6.1 y 6.2.

Tablas 6.1. Porcentaje de carga de ofloxacina en perlas de alginato de calcio.

Tiempo (h)	A	$[\text{M}]_d$	$[\text{M}]_c$	mg Oflox en 5 ml	Carga (mg)	m_{perlas} (mg)	% Carga SC	% Carga P
0	0,448	$1,45 \cdot 10^{-5}$	$7,25 \cdot 10^{-5}$	0,131				
1	0,426	$1,38 \cdot 10^{-5}$	$6,89 \cdot 10^{-5}$	0,125	0,006	1,267	0,51	0,55
4	0,422	$1,37 \cdot 10^{-5}$	$6,83 \cdot 10^{-5}$	0,123	0,008	1,388	0,55	0,51
20	0,417	$1,35 \cdot 10^{-5}$	$6,75 \cdot 10^{-5}$	0,122	0,009	1,316	0,69	0,56

Las Tablas 6.1 y 6.2 presentan las absorbancias medidas para cada una de las soluciones (A), la concentración molar del fármaco en la solución diluída (1:10) $[\text{M}]_d$ calculada siguiendo la Ley de Lambert-Beer a partir de los valores de absorbancia y la concentración molar correspondiente a la solución concentrada de partida $[\text{M}]_c$. A su vez, se establecen los valores de mg de fármaco presentes en los 5 ml utilizados y haciendo la diferencia con el contenido inicial se calcularon los mg de fármaco cargado (Carga). En base a los mg de perlas secas se estimaron los valores de % de carga expresada como mg de fármaco por 100 mg de perlas secas. La última columna muestra los porcentajes de carga calculados en base a los resultados de absorbancia promediadas para las soluciones de las perlas disueltas.

Tabla 6.2. Porcentaje de carga de atenolol en perlas de alginato de calcio.

Tiempo (h)	A	$[\text{M}]_d$	$[\text{M}]_c$	mg Aten en 5 ml	Carga (mg)	m_{perlas} (mg)	% Carga SC	% Carga P
0	0,482	$3,85 \cdot 10^{-4}$	$1,93 \cdot 10^{-3}$	2,566				
1	0,471	$3,77 \cdot 10^{-4}$	$1,88 \cdot 10^{-3}$	2,508	0,059	1,27	4,63	8,37
4	0,475	$3,80 \cdot 10^{-4}$	$1,90 \cdot 10^{-3}$	2,529	0,037	1,35	2,77	8,22
20	0,470	$3,76 \cdot 10^{-4}$	$1,88 \cdot 10^{-3}$	2,502	0,064	1,31	4,89	8,14

Los resultados obtenidos para la carga de ofloxacina a partir de la solución del fármaco y a partir de la destrucción de las perlas cargadas son similares obteniéndose valores de aproximadamente 0,5 a 0,6 mg de ofloxacina por cada 100 mg de perlas secas. La carga de ofloxacina es similar para los tres tiempos de inmersión estudiados indicando que la concentración del fármaco dentro de las perlas alcanza rápidamente el equilibrio y un mayor tiempo de inmersión no aumenta significativamente el valor de carga obtenido. Por otra parte, los niveles de carga alcanzados indican que no podría usarse para una administración por vía oral ya que para una dosis de 400 mg diarios el paciente debería ingerir no menos de 70 gramos de polímero, lo que representaría una importante cantidad de hidrogel en su sistema digestivo.

Los resultados para el atenolol fueron más promisorios, obteniéndose mayores porcentajes de carga que en el caso de la ofloxacina. Evidentemente se ha cometido un error en la cuantificación de la concentración de atenolol en la solución final luego de 4 h de inmersión de las perlas el cual pudo haberse debido a una pobre homogenización de la solución antes de la toma de muestra para la dilución. Por otra parte, se obtuvo prácticamente el doble de porcentaje de carga mediante la cuantificación de las perlas cargadas. De todas maneras es claro que la carga del atenolol es mayor que la ofloxacina debido fundamentalmente a la mayor concentración y mayor solubilidad en agua del fármaco.

A partir de estos resultados, se eligió utilizar atenolol como fármaco para los estudios de liberación a partir de los hidrogeles termosensibles preparados.

6.4.4 Carga de los materiales con atenolol y cuantificación de su carga

Habiendo seleccionado al atenolol como fármaco modelo, se eligió cargar los hidrogeles termosensible de tal manera de obtener una mayor relación fármaco/hidrogel. Se preparó una solución del fármaco conteniendo 5 mg de atenolol por mL de solución; para facilitar la disolución se colocó el recipiente en un sonicador por un período de 30 minutos. Esta solución acuosa de atenolol se utilizó como solvente para la preparación de las soluciones de copolímeros (8 %m/m) y también como solvente de la solución de CaCl_2 al 2 %m/v. De esta manera, se disminuyó la pérdida de fármaco por difusión ya que en todas las soluciones su concentración era equivalente. Las perlas de hidrogel formadas se mantuvieron en la solución de calcio por el término de 24 horas, siguiendo

el mismo procedimiento que en la formación de hidrogeles descrito en la sección anterior y luego se dejaron secar a temperatura ambiente.

La medición de la carga de atenolol en las perlas obtenidas se realizó por triplicado, colocando alrededor de 11/12 mg de hidrogel seco en 5 mL de solución buffer pH = 7 de fosfatos. Luego de 24 horas de inmersión en la solución buffer, la solución se centrifugó, se filtró el sobrenadante y nuevamente se centrifugó a fin evitar una cuantificación errónea mediante la lectura de absorbancia de las soluciones. Los resultados se presentan en la Tabla 6.3, obteniéndose valores de entre 6,8 y 8,3 mg de atenolol cada 100 mg de hidrogel seco.

A partir de los datos de la Tabla 6.3 y para que una liberación del 25 % del fármaco absorbido presente una absorbancia mayor o igual a 0,200 se trabajará con aproximadamente 70 mg de perlas de hidrogel en cada celda siendo el volumen total del medio receptor de 25 ml.

Tablas 6.3. Carga de atenolol en los hidrogeles seleccionados como sistemas de liberación

Muestra	A	Solución atenolol			Perlas		
		C (mol/L)	n (moles) en 5 mL	m (g) en 5 mL	m (g)	Carga (%m/m)	Carga promedio (%m/m)
H-COPI-5-80N	0,772	$6,07 \cdot 10^{-4}$	$3,03 \cdot 10^{-6}$	$8,08 \cdot 10^{-4}$	0,0115	7,02	6,78
	0,719	$5,65 \cdot 10^{-4}$	$2,82 \cdot 10^{-6}$	$7,52 \cdot 10^{-4}$	0,0122	6,17	
	0,847	$6,65 \cdot 10^{-4}$	$3,33 \cdot 10^{-6}$	$8,86 \cdot 10^{-4}$	0,0124	7,15	
H-COPI-1-80N	0,842	$6,62 \cdot 10^{-4}$	$3,31 \cdot 10^{-6}$	$8,81 \cdot 10^{-4}$	0,0120	7,34	8,13
	0,960	$7,54 \cdot 10^{-4}$	$3,77 \cdot 10^{-6}$	$1,00 \cdot 10^{-4}$	0,0127	7,91	
	1,031	$8,10 \cdot 10^{-4}$	$4,05 \cdot 10^{-6}$	$1,08 \cdot 10^{-4}$	0,0118	9,14	
H-COPI-05-80N	0,989	$7,77 \cdot 10^{-4}$	$3,89 \cdot 10^{-6}$	$1,03 \cdot 10^{-4}$	0,0114	9,08	8,34
	0,886	$6,96 \cdot 10^{-4}$	$3,48 \cdot 10^{-6}$	$9,27 \cdot 10^{-4}$	0,0112	8,28	
	0,790	$6,21 \cdot 10^{-4}$	$3,10 \cdot 10^{-6}$	$8,27 \cdot 10^{-4}$	0,0117	7,06	
	0,942	$7,40 \cdot 10^{-4}$	$3,70 \cdot 10^{-6}$	$9,86 \cdot 10^{-4}$	0,0110	8,96	
H-COPI-05-67N	0,729	$5,73 \cdot 10^{-4}$	$2,86 \cdot 10^{-6}$	$7,63 \cdot 10^{-4}$	0,0113	6,75	6,95
	0,742	$5,83 \cdot 10^{-4}$	$2,91 \cdot 10^{-6}$	$7,76 \cdot 10^{-4}$	0,0117	6,64	
	0,877	$6,89 \cdot 10^{-4}$	$3,45 \cdot 10^{-6}$	$9,18 \cdot 10^{-4}$	0,0123	7,46	
H-COPI-05-50N	0,852	$6,69 \cdot 10^{-4}$	$3,35 \cdot 10^{-6}$	$8,91 \cdot 10^{-4}$	0,0117	7,62	8,06
	0,889	$6,98 \cdot 10^{-4}$	$3,49 \cdot 10^{-6}$	$9,30 \cdot 10^{-4}$	0,0115	8,09	
	0,899	$7,06 \cdot 10^{-4}$	$3,53 \cdot 10^{-6}$	$9,41 \cdot 10^{-4}$	0,0111	8,47	
H-COPI-03-80N	0,850	$6,68 \cdot 10^{-4}$	$3,34 \cdot 10^{-6}$	$8,89 \cdot 10^{-4}$	0,0120	7,41	7,23
	0,802	$6,30 \cdot 10^{-4}$	$3,15 \cdot 10^{-6}$	$8,39 \cdot 10^{-4}$	0,0124	6,77	
	0,911	$7,16 \cdot 10^{-4}$	$3,58 \cdot 10^{-6}$	$9,53 \cdot 10^{-4}$	0,0127	7,51	

6.5 Ensayos de liberación

Para los ensayos de liberación se utilizó como medio receptor una solución acuosa de NaCl al 0,9 % m/v (solución fisiológica). Previo a cada ensayo se colocó el volumen total de medio receptor a utilizar en una probeta y la misma se llevó a temperatura sumergiéndola en el baño termostatzado. Una vez alcanzada la temperatura deseada la probeta se colocó en un sonicador para eliminar pequeñas burbujas de aire contenidas en el líquido, evitándose la adherencia de burbujas de aire en la superficie de las perlas.

Se colocaron 25 mL de solución en cada una de las celdas receptoras y el resto de la solución se colocó nuevamente dentro del baño termostatzado para ser utilizada como medio de reposición. Esto permite minimizar el gradiente de temperatura al reponer el volumen extraído. Antes de comenzar la experiencia se controló que en las tres celdas el volumen de medio añadido haya alcanzado la temperatura de trabajo (37 °C). Las perlas de los hidrogeles cargados con atenolol se colocaron en pequeñas bolsas permeables, de modo tal que permitan el pasaje del medio acuoso asegurando la retención de las perlas.

La toma de muestra para realizar la cuantificación del atenolol se realizó a los 5, 15, 30, 45 y 60 minutos de comenzado el ensayo de liberación y luego a intervalos de una hora hasta alcanzar las 4 horas de ensayo. El volumen de la alícuota tomada en cada muestreo fue de 1,5 mL, considerando que es el volumen mínimo necesario para ser medido en el espectrofotómetro UV utilizando microceldas de cuarzo. De esta manera el volumen extraído en cada toma de muestra fue inferior al 10 % del volumen total de solución receptora de modo tal de minimizar los errores sistemáticos.

6.5.1 Determinación de atenolol mediante espectrofotometría UV

Se determinó la concentración de atenolol a $\lambda = 274$ nm empleando las alícuotas tomadas a cada tiempo de la solución receptora. Para realizar la cuantificación del fármaco liberado se hicieron los cálculos correspondientes teniendo en cuenta el efecto de dilución en cada una de las tomas por la reposición del volumen correspondiente de solución salina.

En las Figuras 6.28 a 6.33 se presentan los perfiles de atenolol liberado en función del tiempo para los hidrogeles seleccionados (Tabla 6.3).

Los perfiles de liberación obtenidos para todos los hidrogeles estudiados presentan un comportamiento similar. A los 5 minutos de ensayo se alcanza un 50 % de

liberación y el atenolol liberado aumenta progresivamente durante la primera hora de ensayo obteniéndose luego una meseta en la cantidad de fármaco liberada, excepto para el hidrogel H-COPI-5-80N. Los hidrogeles ensayados presentan luego una liberación muy baja, no más de un 2 % en el término de las 3 horas posteriores y no más de un 4 % luego de las 20 horas.

Los hidrogeles obtenidos a partir de los copolímeros sintetizados con distintas dosis de radiación, partiendo de la mezcla inicial con mayor contenido de NIPAAm (80 % NIPAAm), presentaron grados de hinchamiento marcadamente diferentes a 37 °C, lo cual podría dar lugar a diferentes perfiles de liberación. Sin embargo, tanto los perfiles como el porcentaje de atenolol liberado luego de 4 horas de ensayo fue similar para todos los hidrogeles excepto el obtenido con el copolímero sintetizado con la mayor dosis de radiación (H-COPI-5-80N) el cual presentó el menor grado de hinchamiento (Figura 6.34). Los porcentajes de liberación alcanzados para los hidrogeles obtenidos con los copolímeros sintetizados con dosis de 1, 0,5 y 0,3 kGy son similares, pero el hidrogel H-COPI-1-80N (1 kGy de dosis) presenta una liberación más lenta en la primera hora. Algo similar ocurre con el hidrogel H-COPI-5-80N (5 kGy de dosis) indicando que el bajo grado de hinchamiento de estos hidrogeles produce una liberación inicial más lenta.

Los resultados obtenidos en las experiencias de liberación analizadas en esta tesis son preliminares, pero permiten obtener algunas conclusiones interesantes. De los copolímeros sintetizados, aquel con el mayor contenido de PNIPAAm (~ 90 %), COPI-5-80N presentó el máximo porcentaje de liberación de atenolol a partir de un proceso más gradual. En contraposición, el copolímero con menor contenido de PNIPAAm (~ 20 %), COPI-03-50N, presentó el menor porcentaje de liberación alcanzado a las cuatro horas de ensayo, con el comportamiento menos gradual en el intervalo inicial de 60 minutos. Para el resto de los copolímeros ensayados, con composiciones entre un 50 y 80 % en PNIPAAm no se obtuvieron valores de % L marcadamente distintos aunque el material con un contenido ~ 80 %, COPI-1-80N se diferenció de éstos por presentar una liberación más gradual, comportamiento que puede estar asociado a su alto contenido en PNIPAAm.

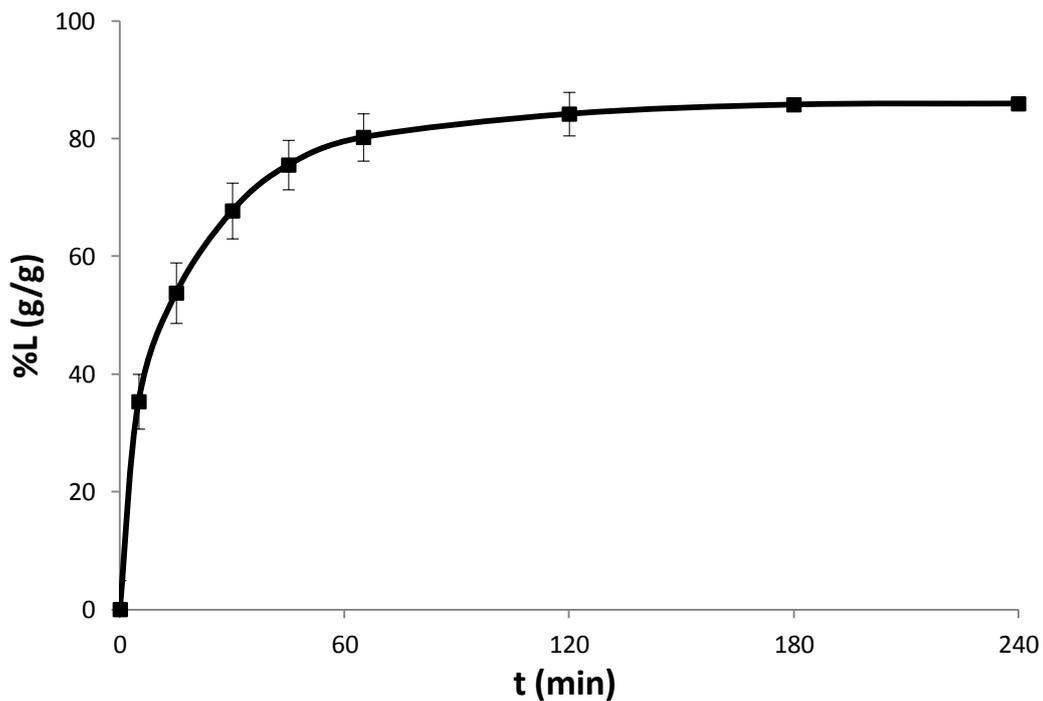


Figura 6.28. Perfil de liberación de atenolol a 37 °C a partir del hidrogel H-COPI-5-80N cargado con 6,78 % de fármaco empleando una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl como solución receptora.

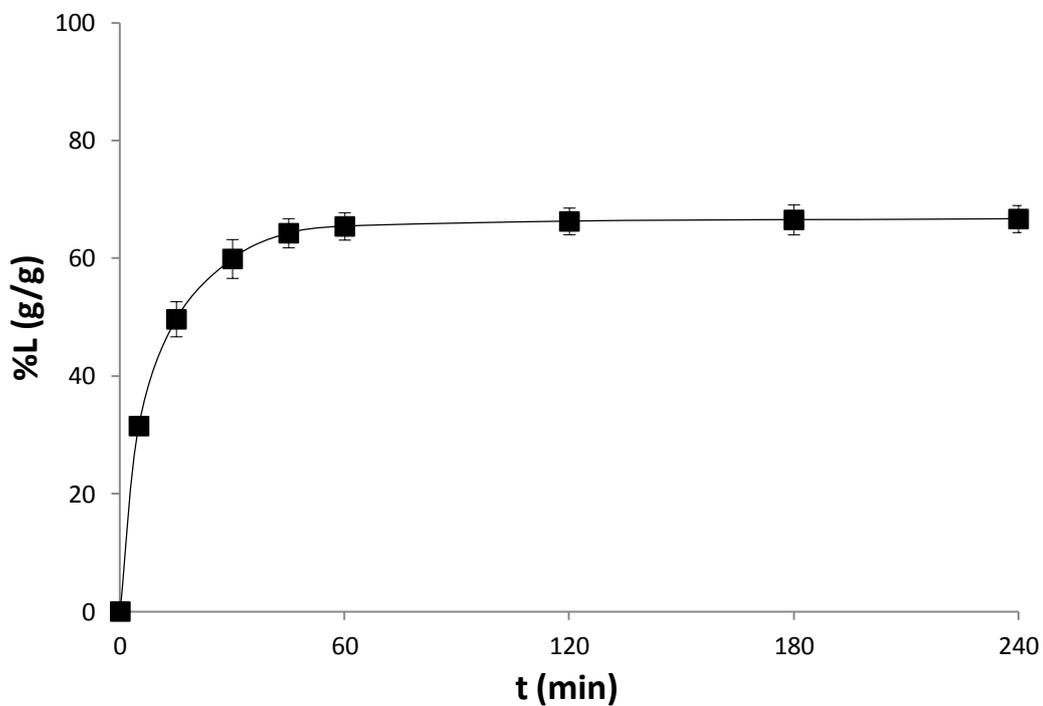


Figura 6.29. Perfil de liberación de atenolol a 37 °C a partir del hidrogel H-COPI-1-80N cargado con 8,13 % de fármaco empleando una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl como solución receptora.

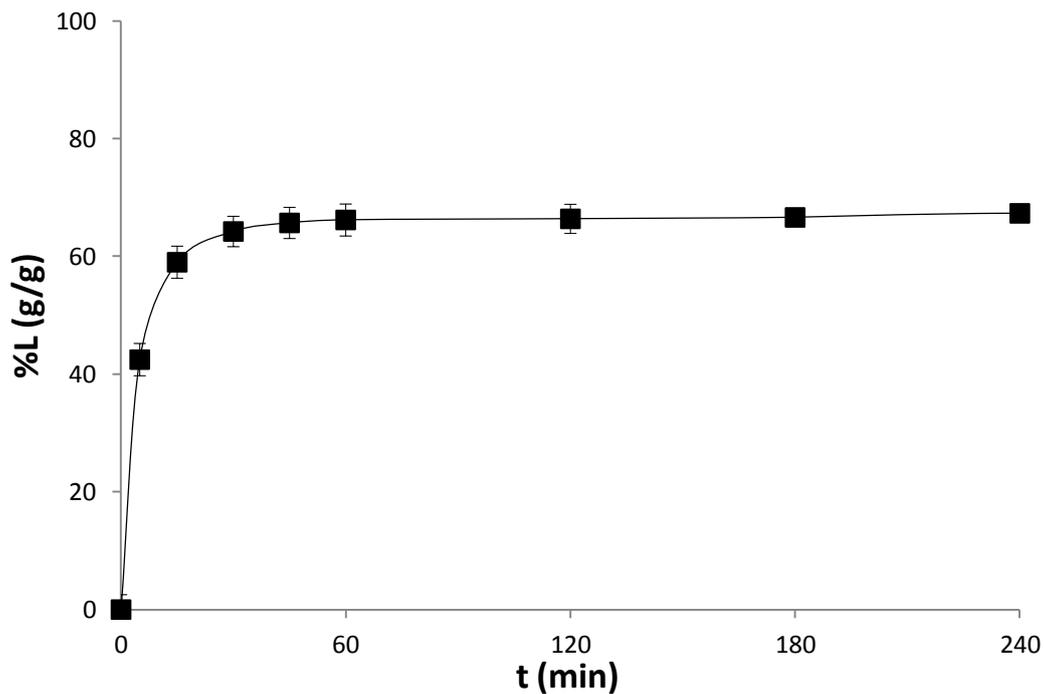


Figura 6.30. Perfil de liberación de atenolol a 37 °C a partir del hidrogel H-COPI-05-80N cargado con 8,34 % de fármaco empleando una solución acuosa 0,9 % m/v NaCl como solución receptora.

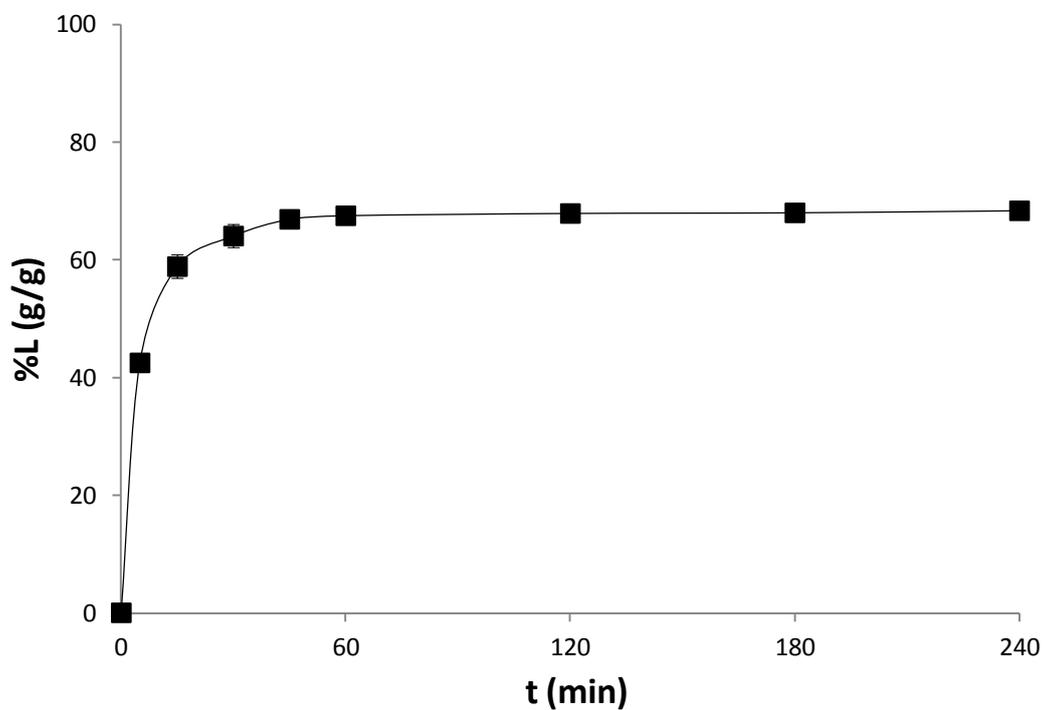


Figura 6.31. Perfil de liberación de atenolol a 37 °C a partir del hidrogel H-COPI-05-67N cargado con 6,95 % de fármaco empleando una solución acuosa 0,9 % m/v NaCl como solución receptora.

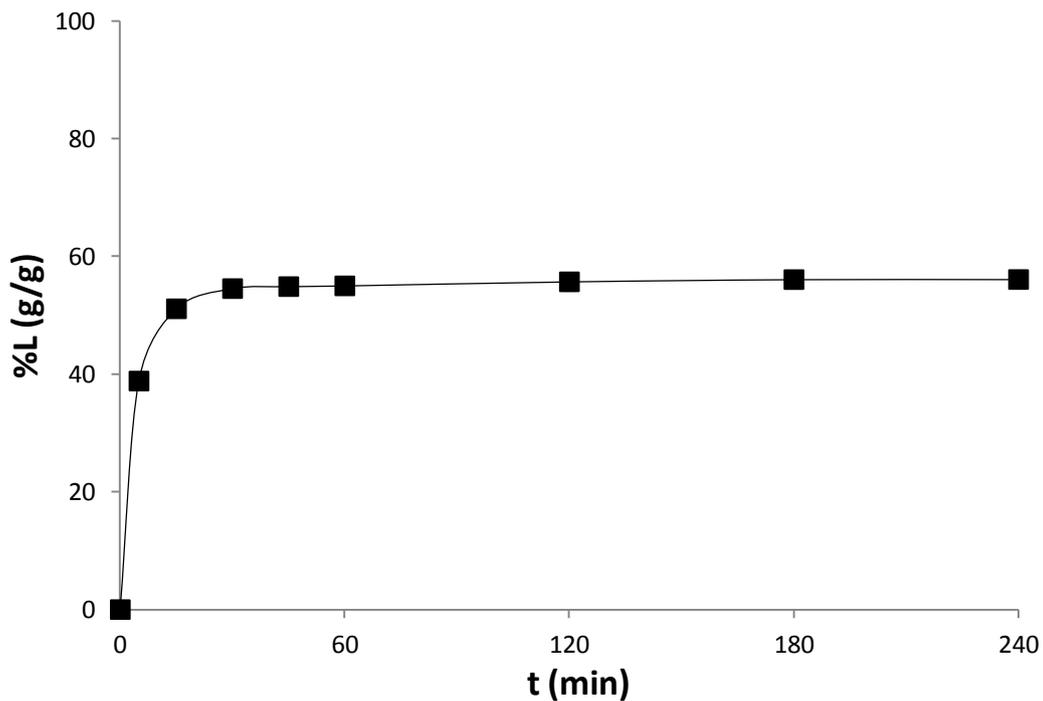


Figura 6.32. Perfil de liberación de atenolol a 37 °C a partir del hidrogel H-COPI-05-50N cargado con 8,06 % de fármaco empleando una solución acuosa 0,9 % m/v NaCl como solución receptora.

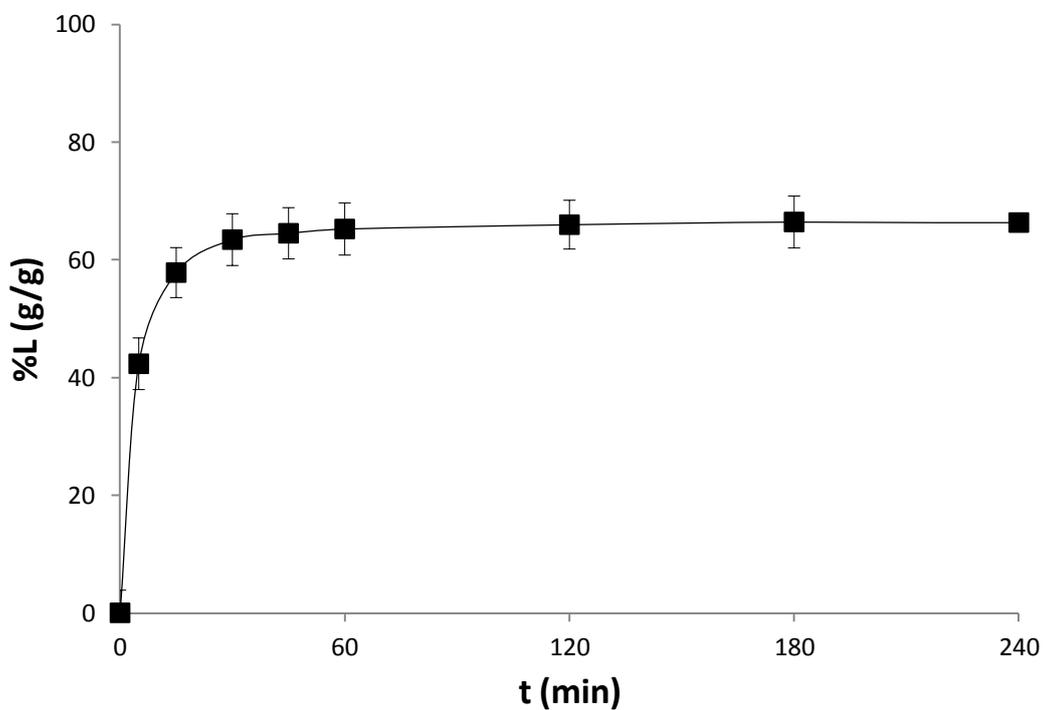


Figura 6.33. Perfil de liberación de atenolol a 37 °C a partir del hidrogel H-COPI-03-80N cargado con 7,23 % de fármaco empleando una solución acuosa 0,9 % m/v NaCl como solución receptora.

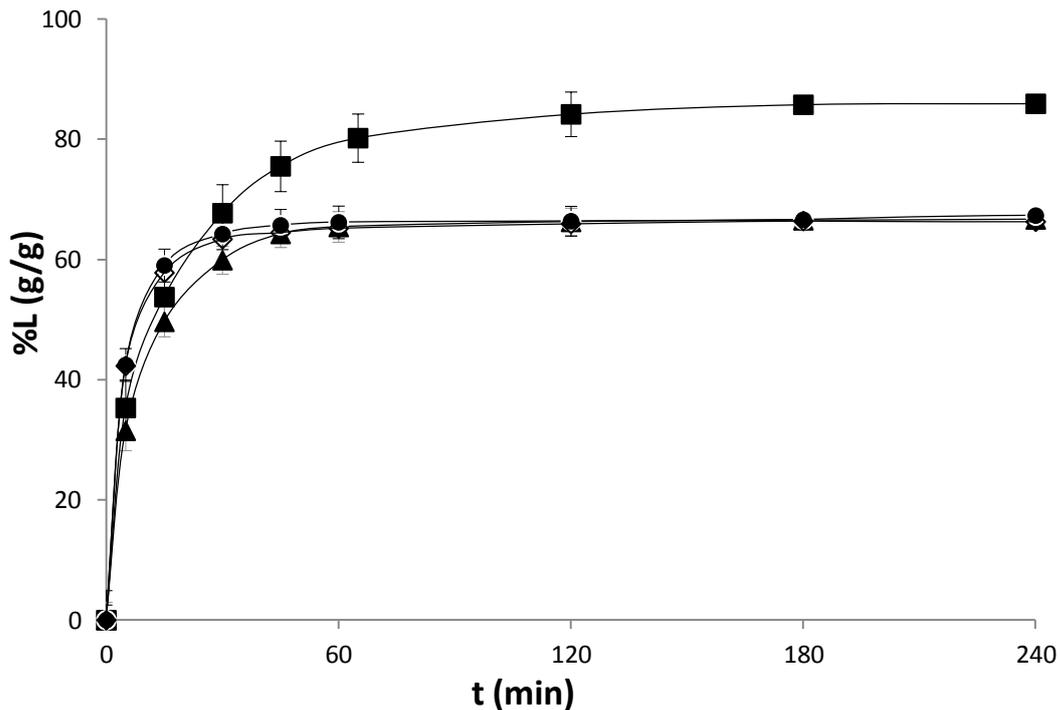


Figura 6.34. Perfil de liberación de atenolol a 37 °C a partir de hidrogeles cargados empleando una solución acuosa 0,9 %m/v como solución receptora. Símbolos: (■) H-COPI-5-80N, (▲) H-COPI-1-80N, (●) H-COPI-05-80N y (◇) H-COPI-03-80N.

Al estudiar el perfil de liberación de los hidrogeles obtenidos a partir de los copolímeros sintetizados con 0,5 kGy (Figura 6.35), no se observan diferencias significativas para los hidrogeles con mayor contenido de NIPAAm (H-COPI-05-80N y H-COPI-05-67N). Sin embargo, pese a que posee un mayor grado de hinchamiento, el hidrogel obtenido a partir del copolímero con menor contenido de NIPAAm presenta una liberación más lenta y un menor porcentaje de liberación luego de 4 horas de ensayo.

Al relacionar los resultados de los ensayos de hinchamiento con los de liberación, es posible observar que el aumento en el hinchamiento de los hidrogeles en el término de 4 horas no implica un incremento de la liberación de atenolol en igual proporción. El grado de hinchamiento alcanzado en el término de 60 minutos es suficiente para alcanzar un equilibrio con el medio receptor y liberar así el contenido de atenolol libre presente en el hidrogel. Podría suponerse entonces que el atenolol no liberado permanezca en el hidrogel debido a una asociación entre las moléculas del fármaco y el copolímero que forma el hidrogel. *A priori*, podría pensarse que esa mayor afinidad se produciría cuanto mayor es el contenido de alginato en el copolímero. Por lo tanto se

plantea como hipótesis para trabajos futuros que a 37 °C la contracción del PNIPAAm generaría un medio hidrofóbico en el interior del hidrogel, que expulsaría al atenolol por su carácter hidrófilo y ayudando a una mayor liberación, como es el caso del hidrogel H-COPI-5-80N.

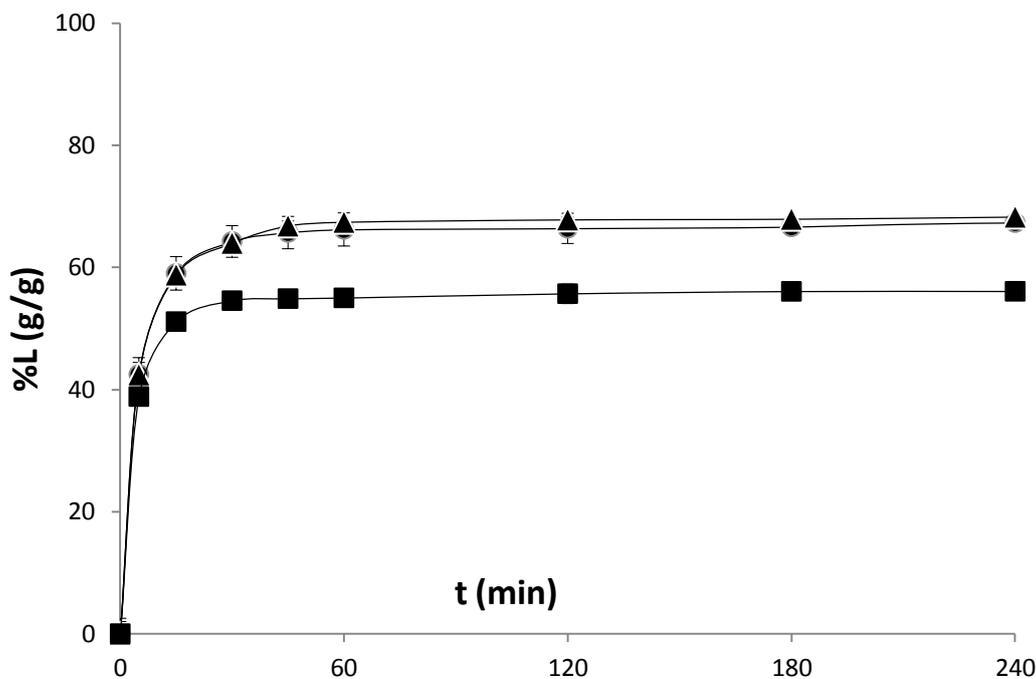


Figura 6.35. Perfil de liberación de atenolol a 37 °C a partir de hidrogeles cargados empleando una solución acuosa 0,9 %m/v como solución receptora. Símbolos: (●) H-COPI-05-80N, (▲) H-COPI-05-67N y (■) H-COPI-05-50N.

En la Figura 6.36, se presenta el perfil de liberación obtenido para un hidrogel de alginato de calcio, obtenido a partir de una solución al 1% de alginato de sodio, comparado con el perfil de liberación del hidrogel H-COPI-5-80N. Debido a que la densidad del material en uno y otro hidrogel son distintos, esta comparación se plantea sólo para mostrar que para el alginato de calcio, la liberación es inmediata y no presenta una liberación gradual. La incorporación del PNIPAAm a la red aporta un control en la liberación al limitar el hinchamiento del material. La exposición de los grupos hidrofóbicos por parte del PNIPAAm a temperaturas por encima de su LCST le transfiere al hidrogel obtenido una regulación en la difusión del medio a través del material lo que limita la liberación del atenolol. El porcentaje de liberación para el alginato de calcio es superior al resto de los hidrogeles ensayados, lo que podría

contradecir la conclusión obtenida en cuanto a que un mayor contenido de alginato retiene en mayor medida al atenolol, pero dado que el material logrado está menos entrecruzado, es esperable que el hinchamiento sea mayor y esto conduzca a una liberación más efectiva.

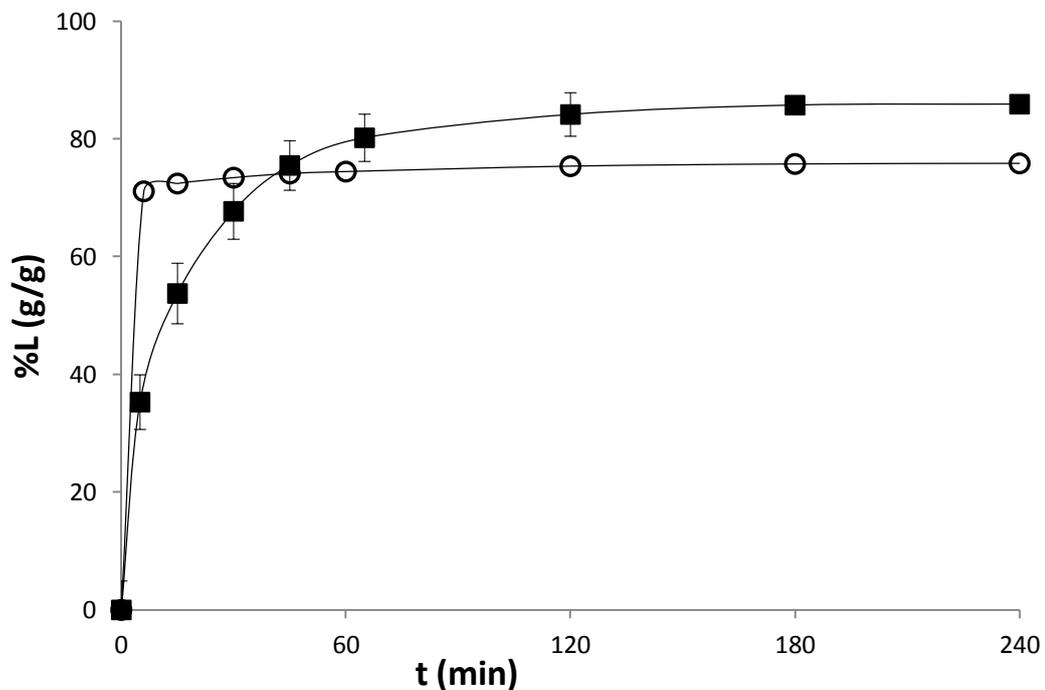


Figura 6.36- Perfiles de liberación de atenolol a 37°C a partir de hidrogeles cargados empleando una solución acuosa 0,9 %m/v NaCl como solución receptora. Símbolos: (○)alginato de calcio y (■) H-COPI-05-80N.

6.6 Conclusiones

La formación de hidrogeles presenta una serie de variables determinantes a la hora de estudiar el grado de hinchamiento de los hidrogeles obtenidos. A partir de los ensayos realizados se definieron algunos de los parámetros que permitieron optimizar las condiciones de estudio de los hidrogeles obtenidos. A continuación se describen algunas de las conclusiones más relevantes:

- La formación de hidrogeles por goteo resultó un método eficaz para la formación de perlas. Aunque la distribución de tamaños en las perlas es un factor que influye en el grado de hinchamiento máximo del hidrogel y, por su variabilidad se convierte en una desventaja del método, fue elegido por su simplicidad y por ser un camino rápido en la obtención de los hidrogeles. La preparación de films hubiera requerido un

estudio más detallado de las características del material, como espesor, masa, efectos de borde, etc.

- La fuerza iónica del medio influye en el grado de hinchamiento de los hidrogeles, presentando una buena respuesta de los mismos para una concentración de 0,9 %m/v NaCl, concentración equivalente a la de la solución fisiológica. La solución fisiológica es ampliamente utilizada en medicina ya que presenta compatibilidad con los organismos vivos debido a sus características de fuerza osmótica, pH y fuerza iónica.
- Los ensayos de hinchamiento realizados a distintos pH deberían profundizarse eliminando el efecto de ciertos iones presentes, como es el caso de los fosfatos en la solución buffer de pH = 7. Hasta el momento puede concluirse que un pH ácido, que se encuentre por encima del pKa del alginato, aumenta la absorción del medio porque los grupos carboxílicos del alginato se encuentran desprotonados. Esto es importante porque se generan repulsiones electrostáticas entre los grupos ionizados que favorecerían la incorporación del medio acuoso (Kim y col. 2002). Un pH superior a 10 limita fuertemente la absorción del medio por el efecto de apantallamiento de los iones positivos, ya que estos presentan una alta movilidad respecto a los grupos hidrofílicos cargados negativamente y limitan de esta manera la flexibilidad de la red (Shi y col., 2013).
- El mayor tiempo de curado de las perlas en la solución de CaCl₂ 2% (m/v) no produjo una diferencia importante en el grado de hinchamiento. Posiblemente el pequeño tamaño de las perlas permita alcanzar un equilibrio con la solución de iones calcio más rápido que el que podría ocurrir en un material más entrecruzado.
- El tamaño de las perlas tiene un efecto importante en el grado de hinchamiento de los hidrogeles preparados. Un mayor tamaño de perla permite un hinchamiento más controlado y prolongado en el tiempo. Perlas pequeñas alcanzan rápidamente su máxima absorción para luego deteriorarse; el hidrogel se desintegra al perder los puntos de entrecruzamiento generados por los iones calcio.
- La concentración de la solución de polímero empleada para formar las perlas es un factor determinante del grado de hinchamiento alcanzado. El hidrogel obtenido a partir de una solución más diluida estará menos entrecruzado y la red será más flexible. El hidrogel más entrecruzado será más rígido y tendrá un menor grado de hinchamiento. Los resultados obtenidos fueron similares tanto para los hidrogeles

obtenidos a partir de los copolímeros sintetizados por irradiación (Capítulo 5) como para aquellos obtenidos a partir de la reacción de condensación (Capítulo 6).

- Tanto el grado de entrecruzamiento, determinado por el tiempo de inmersión de las perlas en la solución de iones calcio, como la concentración de la solución de copolímero que dará origen a las mismas, son dos factores importantes en el análisis de los resultados obtenidos. En este trabajo dichos parámetros se fijaron a fin de poder comparar los resultados obtenidos
- Considerando la temperatura como factor clave en los materiales termosensibles por su contenido en PNIPAAm, cabe destacar que:
 - Los hidrogeles estudiados presentaron un grado de hinchamiento a 24 °C marcadamente superior al grado de hinchamiento obtenido a 37 °C para todos los hidrogeles en los cuales el copolímero empleado poseía un contenido de PNIPAAm mayor al 40 %.
 - Los hidrogeles obtenidos a partir de copolímeros con contenidos de PNIPAAm menores al 40 %, tal como en el caso de los hidrogeles formados a partir de los copolímeros COPI-5-50N, COPI-03-67N y COPQ-L, COPQ-H y COPQ-C, no presentaron una termosensibilidad apreciable y los valores del grado de hinchamiento medido a 24 y 37 °C no difirieron substancialmente. Por esta razón las conclusiones que se detallan a continuación no involucran a estos materiales.
 - A 37 °C el hinchamiento en los materiales estuvo determinado por el contenido de PNIPAAm. De esta manera, el hidrogel con mayor contenido en PNIPAAm presentó el menor grado de hinchamiento luego de 8 horas de inmersión en la solución fisiológica simulada. Por el contrario, el hidrogel con menor contenido de PNIPAAm presentó el mayor grado de hinchamiento.
 - A 24 °C, el grado de hinchamiento no se encuentra dominado únicamente por la composición del material sino que debe tenerse en cuenta además las características de los copolímeros. En el caso de los copolímeros irradiados la dosis aplicada y la composición de la mezcla de reacción inicial, representan dos factores importantes en la estructura final del hidrogel obtenido. La rigidez del hidrogel está dada por el grado de entrecruzamiento logrado, el cual estará relacionado con la longitud del alginato (masa molar) así como de la red aportada por el PNIPAAm injertado.

- La mezcla de reacción inicial con mayor contenido de NIPAAm (80 %) fue la más efectiva en el injerto del PNIPAAm al alginato por medio de radiación gamma dando lugar a copolímeros con mayor termosensibilidad.
- Los copolímeros sintetizados a partir de una mezcla de reacción inicial con un 67 % de NIPAAm no dieron como resultado hidrogeles con buena respuesta al hinchamiento, presentando un deterioro de los mismos a las pocas horas de ensayo. Con excepción del copolímero sintetizado con 0,5 kGy. Esta composición de la solución inicial no permite un injerto de PNIPAAm lo suficientemente efectivo, ni posee un contenido en alginato suficiente para dar lugar a un hidrogel estable.
- Las dosis de 1 y 5 kGy produjeron copolímeros con buenas propiedades para la mezcla con mayor contenido de NIPAAm. Para composiciones menores en la mezcla de reacción la dosis de 5 kGy produce escisiones en el alginato que no son compensadas por el PNIPAAm injertado.
- La adaptación de las celdas de Franz permitió la medición de los perfiles de liberación garantizando homogeneidad tanto en temperatura como en composición de la solución receptora.
- Los hidrogeles elegidos para los ensayos de liberación se seleccionaron a partir de los resultados obtenidos en las mediciones de hinchamiento, empleándose los cuatro copolímeros con mayor contenido de NIPAAm y los tres copolímeros sintetizados con una dosis de 5 kGy. Los hidrogeles formados presentaron una buena estabilidad en el tiempo y una buena respuesta a la temperatura en función de su composición.
- Como fármaco modelo para los ensayos de liberación se escogió al atenolol, descartando la indometacina y la ofloxacina por su baja solubilidad, lo que se vería traducido en una baja relación fármaco/polímero.
- La carga de los materiales seleccionados como sistemas de liberación se realizó utilizando como solvente una solución de atenolol de 5 mg/mL para preparar tanto la solución de polímero a ser goteado como la solución de iones calcio. Esto permitió obtener materiales con valores de carga entre 6,78 y 8,34 %. Dichos valores son apropiados si se pretende emplear los materiales para una administración vía oral, ya que el fármaco presenta una posología de entre 25 y 100 mg diarios.

- Los hidrogeles ensayados mostraron una buena capacidad de liberar el atenolol cargado, aunque en un período de tiempo corto; con perfiles de liberación similares, aún cuando el contenido de PNIPAAm en los hidrogeles varía considerablemente.
- El hidrogel con el mayor contenido de PNIPAAm presenta el máximo valor de L%. Mientras que el hidrogel con menor contenido de PNIPAAm presenta el mínimo valor de L% a las 4 horas de ensayo. Esto permite inferir que el aumento en la composición de alginato genera una mayor retención del atenolol en la matriz del hidrogel.
- La incorporación del PNIPAAm en el copolímero aporta al hidrogel un control frente al hinchamiento a 37 °C.

Para finalizar, es importante destacar que las experiencias realizadas a partir de los hidrogeles es sólo un comienzo de la caracterización de estos materiales para determinar su aplicación como sistemas de liberación controlada. Los parámetros fijados, tales como tamaño de perla, tiempo de curado, concentración del polímero, condiciones de carga del fármaco en el material, entre otros, fueron parte de una serie de estudios iniciales para poder comparar los copolímeros obtenidos.

6.7 Referencias

Clinical Pharmacology (2009a). Indomethacin. www.clinicalpharmacology.com

Clinical Pharmacology (2009b). Ofloxacin. www.clinicalpharmacology.com

Fang, Y., Li, L., Vreeker, R., Yao, X., Wang, J., Ma, Q., Jiang, F., y Phillips, G. O. (2011). *Carbohydrate Polymers*. **86**, 1145–1150.

Gonza, M. L. (2002). *International Journal of Pharmaceutics*. **232**, 225–234.

Guilherme, M., De Moura, M., Radovanovic, E., Geuskens, G., Rubira, A., y Muniz, E. (2005). *Polymer*. **46**, 2668–2674.

Gurni, R. y Felt, O. M. (2003). 1–11.

Güven, O., Sen, M., Karadag, E., y Sarayd, D. (1999). *Radiation Physics and Chemistry*. **56**, 381–386.

Isiklan, N., Murat, I., Kursun, F., y Ercan, G. (2011). *Carbohydrate Polymers*. **84**, 933–943.

- Ju, H. K., Kim, S. Y., y Lee, Y. M. (2001). *Polymer*. **42**, 6851–6857.
- Kim, J. H., Lee, S. B., Kim, S. J., y Lee, Y. M. (2002). *Polymer*. **43**, 7549–7558.
- Kim, M. H., Kim, J.-C., Lee, H. Y., Kim, J. D., y Yang, J. H. (2005). *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*. **46**, 57–61.
- Kim, W., Chung, H., Shin, I., Yam, K., y Chung, D. (2008). *Carbohydrate Polymers*. **71**, 566–573.
- Lee, S. B., Seo, S. M., Lim, Y. M., Cho, S. K., y Lee, Y. M. (2004). *Macromolecular Research*. **12**, 269–275.
- Mandal, S., Kumar, S. S., Krishnamoorthy, B., y Basu, S. K. (2010). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*. **46**, 785–793.
- Shi, X., Wang, W., y Wang, A. (2013). *Carbohydrate Polymers*. Trabajo aceptado.
- Wander, G. S., Takkar, S., y Kaur, K. (2009). *Supplement of JAPI*. **57**, 13–16.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES Y TRABAJOS

FUTUROS

7.1 Conclusiones generales

Durante el desarrollo de esta tesis se obtuvieron copolímeros de alginato y N-isopropilacrilamida (NIPAAm) por síntesis química y por medio de radiación gamma de ^{60}Co . Los copolímeros sintetizados fueron caracterizados química y térmicamente empleando distintas técnicas analíticas tales como Resonancia Magnética Nuclear de protón ($^1\text{H-NMR}$), Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), análisis termogravimétrico (TGA), reología y mediciones de punto de nube (CP).

Para llevar a cabo ensayos de liberación se seleccionaron como matrices portadoras del fármaco modelo aquellos hidrogeles más promisorios de acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos de hinchamiento.

En función de los resultados de esta tesis se destacan las siguientes conclusiones generales:

La síntesis de copolímeros por injerto es un método que permite combinar las características de diferentes monómeros, de tal manera de obtener nuevos materiales con mejores propiedades finales e incrementar sus posibles aplicaciones.

La síntesis química empleando CAN no permitió obtener materiales adecuados a los fines de su aplicación en la liberación de compuestos activos, debido a su baja solubilidad, bajo grado de injerto y a la retención del iniciador empleado. En general el injerto de NIPAAm sobre alginato procede en forma heterogénea si se realiza en medio ácido mientras que en medio acuoso disminuye la eficiencia del CAN como iniciador.

Los polímeros de PNIPAAm amino-terminados, injertados luego por una reacción de condensación a la cadena del alginato, permiten obtener mejores materiales en cuanto a estructura controlada y solubilidad. Sin embargo, no presentaron una buena respuesta al cambio de temperatura al realizar los ensayos de hinchamiento, posiblemente por su bajo contenido de PNIPAAm.

La síntesis de copolímeros por irradiación de una mezcla de alginato y NIPAAm en solución acuosa, en vacío y a temperatura ambiente, es simple y limpia y permite obtener hidrogeles con buenas propiedades para su aplicación como medio de liberación de principios activos. Además la radiación, dependiendo de la dosis aplicada, tiene la

propiedad de disminuir y hasta eliminar la contaminación microbiana en los copolímeros sintetizados.

Los hidrogeles formados a partir de copolímeros sintetizados por irradiación, resultaron termosensibles con un buen hinchamiento en medios salinos y con una liberación efectiva del fármaco atenolol superior al 70%, en la mayoría de los hidrogeles estudiados. La incorporación del PNIPAAm al alginato dio lugar a copolímeros cuyos hidrogeles mostraron liberación gradual de atenolol en relación a la liberación obtenida en hidrogeles de alginato de calcio.

7.2 Copolímeros de injerto alginato/N-isopropilacrilamida obtenidos por reacción química utilizando nitrato de amonio cérico.

Se obtuvieron copolímeros de injerto de NIPAAm y alginato de sodio empleando CAN como iniciador, en medio ácido y en medio acuoso, en atmósfera inerte y con agitación.

En medio ácido, método ampliamente empleado en la literatura, el CAN es más efectivo, pero el proceso es heterogéneo a pesar de la agitación y la síntesis transcurre en un sistema altamente viscoso que influye en el grado de injerto final obtenido. En estas condiciones, el porcentaje de injerto aumenta hasta un cierto valor y no aumenta para mayores concentraciones de NIPAAm en el medio de reacción.

En medio acuoso, el sistema es menos viscoso y por consiguiente más homogéneo pero requiere el empleo de mayores concentraciones de iniciador para lograr el mismo grado de injerto que en medio ácido siendo necesaria una etapa posterior que implica un lavado exhaustivo del copolímero para eliminar el cerio.

La baja solubilidad de todos los copolímeros sintetizados por este método, impidió obtener espectros adecuados mediante resonancia magnética nuclear de protón. Esto puede ser debido al entrecruzamiento de las cadenas laterales injertadas y del alginato.

Los copolímeros sintetizados empleando CAN en las reacciones de injerto, no fueron adecuados para la formación de hidrogeles por lo que no pudieron emplearse en los ensayos de hinchamiento.

7.3 Copolímeros de injerto alginato/N-Isopropilacrilamida obtenidos por radiación gamma de ^{60}Co

Se obtuvieron copolímeros de injerto de NIPAAm sobre alginato de sodio empleando rayos gamma de ^{60}Co como generador de radicales libres.

Para cada dosis de radiación, un aumento en la concentración de NIPAAm en la mezcla de reacción, produce un mayor porcentaje de injerto de los mismos a la cadena de alginato.

Para la mayor concentración de NIPAAm en la mezcla a irradiar estudiada (80 %) el aumento de la dosis produce copolímeros con el mayor contenido de PNIPAAm. Por el contrario, para la menor concentración de NIPAAm (50 %) los injertos disminuyen para las mayores dosis estudiadas (1 y 5 kGy).

La eficiencia de injerto se incrementa aumentando la cantidad disponible de monómero a injertar o aumentando la dosis de radiación aplicada, dentro del rango de concentraciones y dosis estudiadas.

La temperatura de transición del PNIPAAm en los copolímeros sintetizados estuvo entre 31,5 y 33 °C. Por debajo de dicha temperatura de transición soluciones acuosas de los copolímeros fueron translúcidas y por encima de la temperatura de transición, las soluciones mostraron opalescencia debido al colapso hidrofóbico de las cadenas de PNIPAAm.

Estos copolímeros dieron lugar a hidrogeles con termosesibilidad, reflejado en la variación del grado de hinchamiento al cambiar la temperatura de ensayo por encima o por debajo de la temperatura de transición. Por éste motivo fueron seleccionados para el estudio de la liberación de atenolol como fue descrito en el Capítulo 6.

7.4 Polímeros termosesibles aminoterminados y sus copolímeros con alginato de sodio

La caracterización de los copolímeros obtenidos mediante el injerto de polímeros amino terminados con alginato de sodio permitió corroborar el éxito de las reacciones llevadas a cabo, así como también estimar la longitud de las cadenas del polímero termosesibles injertado al alginato, verificar la termosesibilidad de los materiales obtenidos, estudiando su dependencia con la masa molar, la concentración y la composición estructural.

En las telomerizaciones, la cantidad de AET agregada produce un efecto directo sobre la longitud de cadena obtenida en los materiales finales. Por otra parte, el agregado de un comonomero hidrofóbico a la cadena de PNIPAAm desplaza la temperatura de transición hacia menores valores.

Las reacciones de injerto por condensación dan lugar a productos cuya composición es muy similar a la composición inicial de la mezcla de reacción.

La concentración de las soluciones tiene un efecto marcado en la T_{as} para polímeros de masa molar inferior a 50.000 g/mol, desplazándose hacia menores valores cuando aumenta la concentración en solución. Por otra parte, un aumento en la longitud de cadena produce una disminución de la T_{as} . La composición monomérica del polímero termosensible es un factor clave en el valor de T_{as} . La incorporación de un monómero mas hidrofóbico como NTBAAm produjo una disminución de aproximadamente 10 °C en T_{as} .

A temperaturas superiores a la temperatura crítica y para ciertas concentraciones, se observó un comportamiento termoasociativo de los copolímeros.

7.5 Obtención y caracterización de hidrogeles y liberación controlada de principios activos

La formación de hidrogeles por goteo resultó un método eficaz para la formación de perlas que permitieron obtener resultados repetitivos.

La fuerza iónica, la concentración de la solución de copolímero formadora de perlas, el tamaño de perlas y el tiempo de curado, fueron parámetros a tener en cuenta para obtener hidrogeles con buen grado de hinchamiento y con buena estabilidad de la estructura del gel durante el tiempo de ensayo.

Los ensayos de hinchamiento se llevaron a cabo a dos temperaturas, por debajo y por encima de la temperatura de transición. De las experiencias realizadas pueden enunciarse las siguientes conclusiones:

- Los hidrogeles estudiados presentaron un grado de hinchamiento a 24 °C marcadamente superior al obtenido a 37°C para todos los hidrogeles obtenidos empleando copolímeros con contenido de PNIPAAm mayor al 40 %.

- A 37 °C el hinchamiento en los hidrogeles estuvo determinado por el contenido de PNIPAAm. De esta manera, el hidrogel obtenido con el copolímero con mayor contenido de PNIPAAm presentó el menor grado de hinchamiento.
- A 24 °C, el grado de hinchamiento no se encuentra dominado únicamente por la composición del copolímero sino que depende de la estructura global del mismo. En el caso de los copolímeros obtenidos por irradiación, la dosis aplicada y la composición de la mezcla de reacción, representan dos factores importantes en la estructura final de los hidrogeles obtenidos. La rigidez del hidrogel está dada por el grado de entrecruzamiento logrado, el cual está relacionado con la masa molar del alginato así como con la red aportada por el PNIPAAm injertado.
- La mezcla de reacción con una composición en NIPAAm de un 80% fue la más efectiva en el injerto del PNIPAAm al alginato por medio de radiación gamma, y esto dio lugar a hidrogeles con mayor termosensibilidad.
- Los copolímeros obtenidos empleando dosis de 1 y 5 kGy produjeron hidrogeles con buenos resultados de hinchamiento para la mezcla de reacción con mayor contenido de NIPAAm. Para composiciones menores de NIPAAm en la mezcla inicial de reacción fue más adecuada la dosis de 0,5 kGy.

La adaptación de las celdas de Franz permitió la medición de los perfiles de liberación garantizando homogeneidad en la temperatura y composición de la solución receptora asegurando resultados reproducibles.

- Como fármaco modelo para los ensayos de liberación se escogió el atenolol, descartando la indometacina y la ofloxacina por su baja solubilidad, lo que resultaba en una baja relación fármaco/polímero.
- La carga porcentual de atenolol en los hidrogeles alcanzó valores entre 6,78 y 8,34 %. Dichos valores son apropiados si se pretende emplear los materiales para una administración por vía oral, ya que el fármaco presenta una posología de entre 25 y 100 mg diarios.
- A partir de los estudios de liberación puede concluirse que los hidrogeles obtenidos a partir de copolímeros sintetizados por irradiación tienen la capacidad de liberar el principio activo cargado, aunque en un corto período de tiempo (1 h). Todos los perfiles de liberación son similares, aún cuando la composición de los copolímeros empleados presentaron diferentes contenidos de PNIPAAm.

- El hidrogel obtenido con el copolímero con mayor contenido de PNIPAAm presentó el máximo valor de liberación, L%.
- El hidrogel de alginato de calcio presentó una liberación muy rápida. La incorporación del PNIPAAm, aportó al hidrogel un efecto moderador en la cinética de liberación a 37 °C.

7.6 Propuestas de Trabajo Futuro

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos durante el trabajo realizado en la presente tesis, en esta sección se presentan las siguientes propuestas de trabajo futuro para profundizar el estudio sobre materiales que puedan ser aplicados como sistemas de liberación controlada de fármacos.

En cuanto a las síntesis, se propone repetir la obtención de copolímeros de injerto empleando radiación gamma, con el objeto de complementar los resultados obtenidos, con otras técnicas de caracterización, tales como microscopía electrónica y el análisis de sus propiedades mecánicas por reología. Éstas técnicas permitirán analizar los efectos radioinducidos en la estructura del material.

Se propone también las síntesis de copolímeros por condensación, pero con mayor contenido de PNIPAAm, para analizar si la falta de termosensibilidad observada en los ensayos de hinchamiento se debió a la baja concentración de PNIPAAm en el copolímero.

También debería explorarse el uso de comonómeros con distinta hidrofiliidad, tales como NTBAAm, acrilamida o metilacrilamida, como el objetivo de obtener polímeros con diferentes valores de temperatura de transición en solución.

Es importante destacar que las experiencias realizadas a partir de los hidrogeles preparados en esta tesis, resultaron promisorias en la búsqueda de nuevos materiales para su aplicación como sistemas de liberación. Los parámetros seleccionados, tales como tamaño de perla, tiempo de curado, concentración del polímero, condiciones de carga del fármaco en el material, entre otros, fueron parte de una serie de estudios preliminares para evaluar los copolímeros sintetizados.

Aunque los resultados obtenidos son preliminares, dieron lugar al comienzo de un interesante campo de estudio, previsto para el período posdoctoral. En ese período se proyecta optimizar los parámetros de hinchamiento para cada material, en función de su composición, y también establecer otros factores que puedan influir en el

comportamiento. Entre estos factores figuran algunos como la reversibilidad del hinchamiento de los materiales, la presentación de los materiales no sólo en formas de perlas sino también como films, el análisis de la distribución de tamaños de perlas, su aplicación en medios no acuosos o acuosos pero con otro contenido de iones, etc. A su vez se propone cargar los hidrogeles con fármacos modelo (indometacina, atenolol y ofloxacina) y estudiar los perfiles de liberación *in vitro* en función de la temperatura, el pH y la fuerza iónica del medio evaluando las ventajas y desventajas de cada uno de los sistemas farmacéuticos estudiados.

ANEXOS

ANEXO I

TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

En el estudio de los materiales poliméricos se requiere el empleo de diversas técnicas y ensayos para conocer las propiedades finales que éstos presentan.

AI.1. PROPIEDADES QUÍMICAS

Las propiedades químicas que presenta una muestra dependen fundamentalmente de su naturaleza química, esto es, de su composición y el tipo de grupos funcionales que están presentes en el material.

Dentro de los métodos espectroscópicos, se incluyen una serie de técnicas analíticas donde se analizan los efectos que resultan de la interacción entre la materia y la radiación electromagnética emitida por una fuente. Es sabido que dependiendo de la estructura de los átomos y/o moléculas de la materia que atraviesa el haz de radiación, éste puede ser absorbido, transmitido o dispersado dependiendo de la frecuencia de la radiación emitida por la fuente.

Si un átomo o molécula absorbe energía de un haz de radiación puede sufrir varios tipos de excitación: electrónica, rotacional, deformación de enlaces, entre otros. Dependiendo de la composición de la materia, cada absorción aparecerá en una región específica del espectro electromagnético, ya que cada modo de excitación requiere una cantidad específica de energía. El espectro de un compuesto es un gráfico que indica cuanta radiación se absorbe o transmite a cada frecuencia o longitud de onda y es característico de la estructura de la sustancia con la cual interacciona la radiación.

A continuación se presenta una breve reseña del fundamento de cada una de las espectroscopias que se han utilizado en la caracterización de los materiales obtenidos en el transcurso de esta tesis.

AI.1.1 Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

Cuando un compuesto o molécula absorbe luz en la zona UV-Vis, esto es en el rango de longitudes de onda entre 200 y 800 nm, los electrones de un nivel de menor energía son excitados hacia uno de mayor energía. Las bandas observadas son anchas debido a que cada nivel energético tiene asociados distintos niveles vibracionales y rotacionales.

El proceso de absorción en este rango del espectro queda limitado a los compuestos que presenten dobles o triples enlaces, esto es, que posean electrones π .

Muy utilizado es el método de turbidimetría, donde se cuantifica el aumento en la absorbancia **A** de la solución en estudio en función de la concentración, temperatura o alguna otra variable. Este aumento de absorbancia se expresa como pérdida de la transmitancia **T**, estando estas dos magnitudes relacionadas a partir de la ecuación AI.1.

$$A = -\log T \quad (\text{AI.1})$$

Aquí la sustancia no requiere de enlaces múltiples, si no poseer la capacidad de variar la dispersión de la luz frente a alguna variable.

Un espectrofotómetro UV-Vis, consta de dos celdas a través de las cuales se hace pasar un haz de luz, que es recibido en un detector. Una de las celdas se toma de referencia y contiene el blanco (solvente con el que se prepara la muestra), la otra celda corresponde a la solución de la muestra. El detector compara la intensidad de luz recibida desde cada una de las celdas para calcular la absorbancia. Este valor de absorbancia medido se rige por la Ley de Lambert-Beer, ecuación AI.2.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C \quad (\text{AI.2})$$

Siendo ϵ , la absorptividad molar (tabuladas para cada sustancia en función de la longitud máxima de absorción); **b**, el camino óptico del haz a través de la muestra (espesor de la celda) y **C**, la concentración molar de la muestra.

Turbidimetría. Los ensayos de turbidimetría, se presentan en esta tesis como curvas de porcentaje de transmitancia en función de la temperatura. A partir de estos ensayos se ha determinado el llamado "punto de nube" o "cloud point".

El punto de nube se define como la temperatura en el punto de inflexión de la curva transmitancia vs. temperatura. El punto de nube implica una importante reducción del valor de la transmitancia. (Yoo, Sung, Cho, & Lee, 1997)

AI.1.2 Espectroscopía Infrarroja (IR)

Las vibraciones y rotaciones moleculares se producen por la absorción de radiación en la región del infrarrojo del espectro electromagnético. Esta región se encuentra a continuación de la zona visible hacia longitudes de onda superiores, la radiación no tiene la energía suficiente para causar la excitación electrónica. La medición de las vibraciones y rotaciones moleculares pueden medirse directamente como absorción en el espectro infrarrojo (IR) o indirectamente como radiación dispersa en el espectro Raman. En esta tesis, se cuantificó la absorbancia IR de las muestras.

Actualmente, los resultados obtenidos por esta técnica se presentan como curvas de absorción frente al número de onda, esto es la inversa de la longitud de onda. La ventaja de presentarlos frente al número de onda, es que este último es proporcional a la frecuencia de la radiación absorbida, y en consecuencia, directamente proporcional a la energía absorbida, ecuaciones AI.3 y AI.4.

$$\Delta E = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda = h \cdot c \cdot \bar{\nu} \quad (\text{AI.3})$$

$$\Delta E \sim \bar{\nu} \quad (\text{AI.4})$$

Muchos grupos funcionales en las moléculas orgánicas muestran vibraciones características, a las que les corresponden bandas de absorción en regiones definidas del espectro infrarrojo. Estas vibraciones se producen en gran parte en el grupo funcional y no abarcan al resto de la molécula. De esta forma se pueden identificar estos grupos por su banda de absorción, haciendo espectroscopia IR. Este es un método sencillo, rápido y fiable para identificar distintas clases de compuestos, ya sea un alcohol, amina, cetona, etc. (Hesse et al., 1995)

AI.1.3 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (NMR)

Esta espectroscopía tiene un fundamento teórico más complejo que las anteriores, basado en las propiedades mecánico-cuánticas de los núcleos atómicos, que se detallan en profundidad en la bibliografía, como ser Hesse *et al.* (1995).

Todos los núcleos que poseen un número impar de protones y neutrones tienen un momento magnético y un momento angular intrínseco, en otras palabras, tienen un número

cuántico de spin mayor que cero pudiendo interactuar con un campo magnético aplicado. Los núcleos más comúnmente empleados en RMN son el protón (^1H , el isótopo más sensible en RMN después del inestable tritio, ^3H), el ^{13}C y el ^{15}N , aunque los isótopos de muchos otros elementos (^2H , ^{10}B , ^{11}B , ^{14}N , ^{17}O , ^{19}F , ^{23}Na , ^{29}Si , ^{31}P , ^{35}Cl , ^{113}Cd , ^{195}Pt) pueden ser utilizados. La aplicación de un campo magnético fuerte al material que contiene tales núcleos, desdobra a los niveles de energía en dos, que representan los estados con spin paralelo y antiparalelo al campo. Las transiciones entre los estados dan lugar a una absorción o emisión de energía.

Los espectros de RMN se presentan en función del desplazamiento químico que está definido en función de la intensidad de campo aplicada. La frecuencia de resonancia exacta de un determinado tipo de núcleo depende en una forma característica de su entorno (naturaleza y ubicación de los grupos atómicos en la vecindad). Para la RMN de protón (^1H -NMR) las señales observadas permiten identificar el tipo y número de núcleos que dieron origen a esa señal, en función del desplazamiento al cual aparecen y el valor de la integral de la señal que presentan, respectivamente.

AI.2. PROPIEDADES TÉRMICAS

El análisis térmico es un término general que cubre una serie de técnicas relacionadas, donde se mide la dependencia de cualquier propiedad física de una sustancia con la temperatura.

En el marco de esta tesis se utilizaron principalmente dos técnicas usuales en la caracterización de polímeros: la calorimetría diferencial de barrido (DSC) y el análisis termogravimétrico (TGA) que son descriptas a continuación.

Entre las principales ventajas del uso de estas técnicas se encuentran: la posibilidad de estudiar a la muestra en un amplio rango de temperaturas por medio de rampas de temperatura; la muestra puede ensayarse en diferentes estados de agregación, ya sea líquido, sólido, geles, etc.; también es posible controlar la atmósfera a la cual es sometida la muestra. Estos ensayos requieren muy poca cantidad de muestra, variando entre 0, 1 μg y 10 mg. Dentro de las desventajas de estas técnicas, encontramos la influencia sobre los resultados de la dimensión y masa de la muestra, de la velocidad de calentamiento/enfriamiento, de la naturaleza de la atmósfera utilizada y la historia termo-

mecánica que pueda presentar la muestra en el momento del ensayo. Y, la principal desventaja, es que son técnicas destructivas, sobre todo la TGA, porque el material luego del ensayo no mantiene las propiedades iniciales.

AI.2.1 DSC

La calorimetría diferencial de barrido, se basa en la medición del flujo de calor producido por la muestra comparado con el de una referencia, en función de la temperatura.

Un esquema simplificado de un calorímetro diferencial se presenta en la figura AI.1, donde se observan los dos hornos correspondientes a la muestra y a la referencia, asociados a un sistema de detección y procesamiento de datos. El equipo permite la realización de ensayos calorimétricos para la medida de capacidades caloríficas, cambios de fase, calores de reacción y transiciones térmicas.

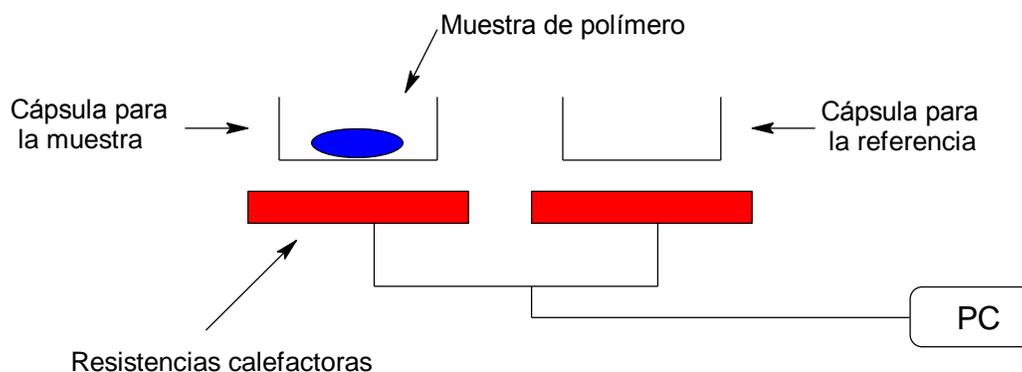


Figura AI.1. Esquema simplificado de los componentes del calorímetro diferencial.

Un circuito de temperatura mide y controla la temperatura en los recipientes de la muestra y la referencia, para ajustarse a un programa predeterminado de tiempo-temperatura. Esta temperatura se representa en el eje X de un gráfico tipo X-Y.

Al mismo tiempo, un circuito compara la diferencia de las temperaturas de los recipientes de la muestra y de la referencia, suministrando energía para calentar la resistencia situada en cada recipiente hasta que las temperaturas se mantengan iguales. Cuando la muestra experimenta una transición térmica, la potencia de las dos resistencias se ajusta para mantener sus temperaturas, y entonces se registra sobre el eje Y del gráfico, una señal proporcional a la diferencia de potencia aplicada. El área bajo la curva resultante, es una medida directa del calor de transición.

AI.2.2 TGA

En el análisis termogravimétrico se utiliza una balanza sensible, que registra el cambio de masa de la muestra en función de la temperatura. No todos los eventos térmicos producen un cambio de masa en la muestra, pero si lo producen algunos como la desorción, absorción, sublimación, evaporación, oxidación, reducción y descomposición. Las aplicaciones características, incluyen la evaluación de la estabilidad térmica, la temperatura de descomposición y la composición de los materiales, entre otras (Billmeyer, 1975).

En la figura 5, se presenta el gráfico de un análisis termogravimétrico de una muestra de poli(N-isopropilacrilamida). En dicha curva se diferencian dos fenómenos, el primero corresponde a la pérdida de humedad de la muestra, y esto ocurre en el rango de temperaturas de 25°C a 200°C, y representa una pérdida de masa de alrededor de un 10%. El segundo proceso, con una pérdida de masa de casi el 90%, ocurre aproximadamente a 350°C y pertenece a la descomposición de la muestra, quedando luego un residuo de masa despreciable a temperaturas superiores.

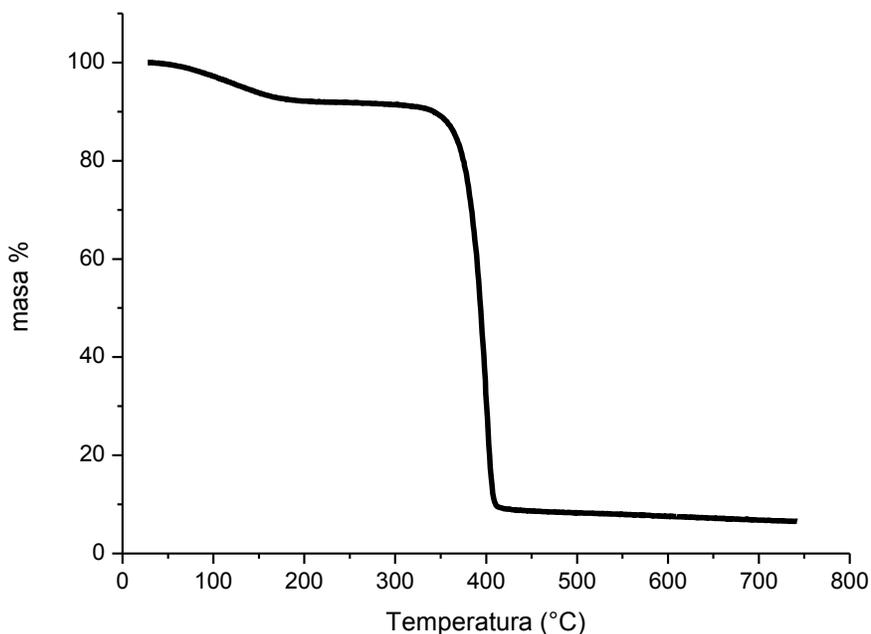


Figura AI.2. Termograma obtenido para una muestra de PNIPAAm.

AI.3. PROPIEDADES REOLÓGICAS

La **reología** es la ciencia que estudia la deformación y flujo de los materiales. La **viscosidad** es una medida de la resistencia a fluir debido a la fricción interna cuando una capa de fluido es forzada a moverse en relación a otra capa. A medida que la fricción aumenta, la cantidad de fuerza requerida para causar el movimiento es mayor, a este movimiento se lo denomina corte.

En esta sección se describen muy brevemente los conceptos básicos necesarios para poder entender las curvas de las propiedades reológicas presentadas en el capítulo 5.

El comportamiento mecánico de un material es caracterizado por la deformación que resulta de la aplicación de una carga externa. Los materiales poliméricos, ya sea en solución, o en geles o en estado fundido, presentan un comportamiento denominado viscoelástico. Esto es, un comportamiento intermedio entre los sólidos elásticos o “Sólidos de Hooke” (ecuación AI.5), y los fluidos puramente viscosos o “Fluidos Newtonianos” (ecuación AI.6).

$$\text{Límite puramente elástico:} \quad F \sim \gamma = \Delta x/H \quad (\text{AI.5})$$

$$\text{Límite puramente viscoso:} \quad F \sim \dot{\gamma} = U/H = \Delta x/(\Delta t.H) \quad (\text{AI.6})$$

En el límite puramente elástico de un sólido simple, la fuerza aplicada (F) sobre el material es directamente proporcional a la deformación (γ) que éste presenta en respuesta a dicha fuerza. Al remover la fuerza, el material recupera la forma original, teniendo memoria perfecta de la posición original. En el límite puramente viscoso de un líquido simple, la fuerza es directamente proporcional a la velocidad de deformación y al remover la fuerza, el material queda con la deformación lograda, no existe memoria de las posiciones anteriores. Los materiales viscoelásticos al ser sometidos a una fuerza, presentan una deformación que es función del tiempo y al retirar la carga, el material puede volver a su posición original si se le da el tiempo suficiente para que las moléculas se reacomoden, este tiempo dependerá del tipo de moléculas que constituyan al material ensayado.

Se puede separar a los materiales en dos grandes grupos, aquellos que se comportan como fluidos Newtonianos y aquellos como no-Newtonianos.

Los fluidos Newtonianos, o fluidos simples, son aquellos que obedecen la Ley de Newton, ecuación AI.7.

$$\tau = -\mu \times \dot{\gamma} \quad (\text{AI.7})$$

Donde τ es la tensión en un punto del material producida a partir de un valor puntual de velocidad de deformación $\dot{\gamma}$ y siendo μ la viscosidad. Ésta ecuación responde a la evidencia experimental que muestra que, para fluidos simples, el estado de tensiones en cada punto de la materia en un dado instante de tiempo es proporcional a la velocidad de deformación que existe en ese momento en ese lugar para cualquier flujo y que las tensiones surgen instantáneamente ante la aplicación de una deformación.

Los fluidos no-Newtonianos, o fluidos complejos no se comportan de acuerdo a la ecuación AI.7. La viscosidad del fluido no-Newtoniano depende del gradiente de velocidad, además de la condición del fluido. Dentro del comportamiento no-Newtoniano encontramos una clasificación de los materiales según el comportamiento de su viscosidad con la velocidad de deformación, figura AI.3.

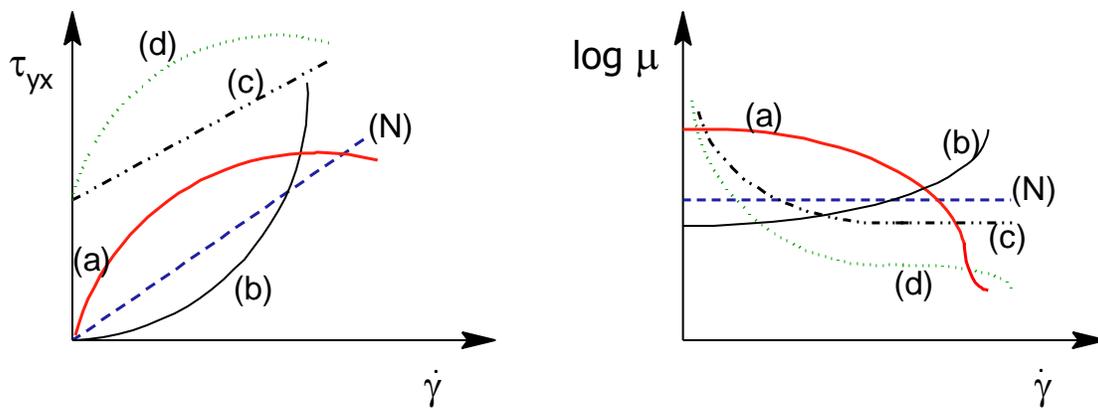


Figura AI.3. Comportamientos típicos de la viscosidad de fluidos complejos con la velocidad de deformación: (a) Pseudo-plástico, (b) dilatante, (c) Bingham y (d) visco-plástico.

Los fluidos **pseudo-plásticos** o **shear-thinning** (Figura AI.3.a) presentan una viscosidad que decrece cuando aumenta la velocidad de deformación. Los fluidos **dilatantes** o **shear-thickening** (Figura AI.3.b) muestran un aumento de la viscosidad con el incremento en la velocidad de deformación. En los fluidos de "**Bingham**" o con tensión de fluencia (Figura AI.3.c), como también se los conoce, la tensión debe exceder un dado

valor para que el fluido comience a fluir. Finalmente, los fluidos **viscoplásticos**, son fluidos del tipo pseudo-plásticos que además presentan tensión de fluencia.

Cabe destacar que la tensión de fluencia es un parámetro que permite modelar un comportamiento que se observa solo debido a la falta de mediciones completas. Muchos materiales experimentan una caída brusca de la viscosidad en un rango muy pequeño de tensión de corte, lo que lleva a pensar que la viscosidad tiende a infinito.

Los fluidos que se acaban de describir no presentan una dependencia de la viscosidad con el tiempo. Aquellos que si presentan una dependencia del valor de viscosidad con el tiempo se denominan **tixotrópicos**, cuando el valor decrece con el tiempo y **reopécticos** cuando el valor de viscosidad aumenta.

Los parámetros de viscosidad y densidad no alcanzan para describir todos los efectos observados en el flujo de polímeros, por lo que se recurre a la utilización de funciones materiales, las mismas como su nombre lo indica no son constantes, dependen de la temperatura, velocidad de deformación, historia de deformaciones, etc. Además, se utiliza un parámetro que mide la reacción "no instantánea" de los polímeros, llamado tiempo de relajación (λ). El tiempo de relajación de un polímero es el tiempo que tarda el material a adaptarse a las nuevas condiciones.

Es importante describir los dos tipos de flujos que se consideran "estándar" en la caracterización de fluidos poliméricos. Ellos son los flujos de corte y los flujos libres de corte, llamados extensionales, una representación de estos flujos se presentan en las figuras AI.4 a) y b) respectivamente. El movimiento relativo de las partículas en estos dos tipos de flujos es muy distinto y permiten obtener información reológica distinta.

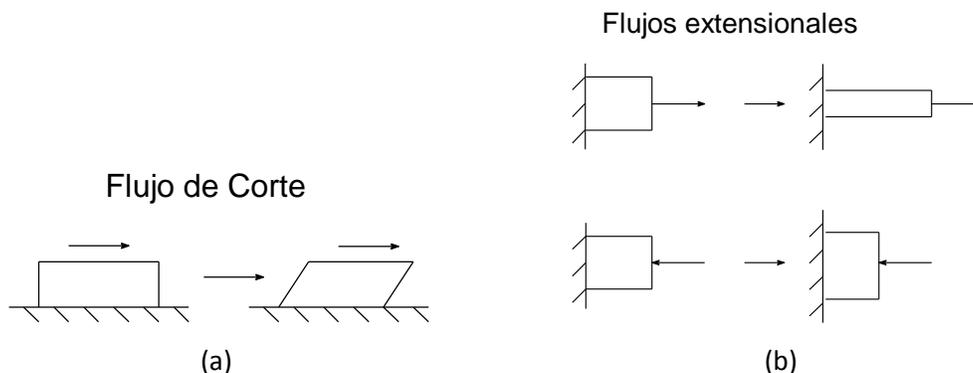
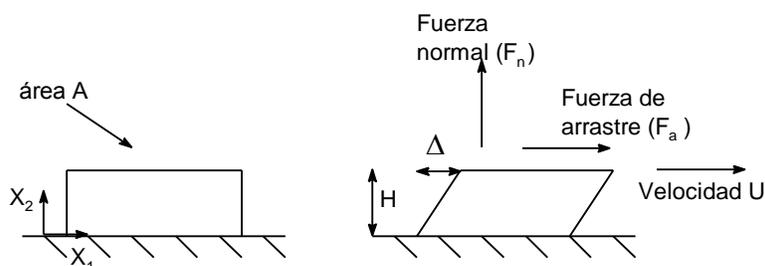


Figura AI.4. Esquema de los dos tipos de flujos: flujo de corte (a) , flujo extensional (b).

A continuación se presentan los parámetros o funciones materiales de corte más utilizadas, y su comportamiento para fluidos macromoleculares simples y homogéneos, Figura AI.5. Este tipo de flujo ocurre por ejemplo entre dos platos paralelos o entre cono y plato.



$$\frac{F_a}{A} \rightarrow \text{tensión de corte } \tau_{12}$$

$$\frac{\Delta}{H} = \frac{\text{desplazamiento}}{\text{espesor}} = \text{deformación de corte } \gamma$$

$$\frac{F_n}{A} \rightarrow \text{tensiones normales}$$

$$\frac{\Delta}{H} = \frac{d\Delta}{dt} = \text{velocidad de deformación, } \dot{\gamma}$$

Figura AI.5. Esquema de un flujo de corte simple y expresión de las funciones materiales de corte más utilizadas.

Flujo de corte en estado estacionario:

Para este tipo de flujo, la viscosidad de un material es descrita en términos de la tensión de corte y la velocidad de deformación, ecuación AI.8 .

$$\eta = -\tau_{21} / \dot{\gamma} \quad (\text{AI.8})$$

La Figura AI.6, representa el comportamiento de la viscosidad en función de la variación de la velocidad de deformación. La curva observada presenta tres zonas que se solapan entre sí.

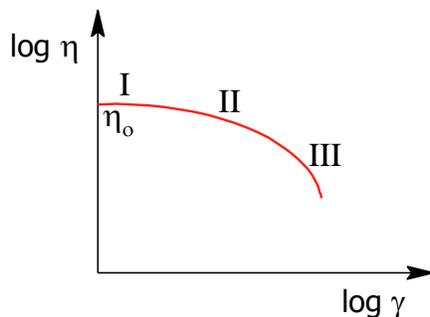


Figura AI.6. Comportamiento de la viscosidad frente a la velocidad de deformación en estado estacionario

Zona I: a bajas velocidades de deformación la viscosidad presenta valores constantes. El movimiento es suficientemente lento para permitir la relajación, el comportamiento se asemeja al Newtoniano.

Zona II: el movimiento es más rápido y las moléculas se ordenan en dirección del flujo porque no pueden reacomodarse y terminan orientándose, la viscosidad comienza a disminuir porque hay menor resistencia.

Zona III: a altas velocidades de deformación, la viscosidad se relaciona con la velocidad de deformación mediante la Ley de la potencia, siendo la viscosidad proporcional a una potencia de la velocidad de deformación.

Flujo de corte oscilatorio de pequeña amplitud:

Este flujo transitorio, no estacionario (el esfuerzo involucrado es función del tiempo), se obtiene haciendo oscilar uno de los platos a una frecuencia ω constante con una amplitud pequeña.

En la figura AI.7 se muestra el comportamiento frente a este tipo de deformaciones por parte de un sólido elástico, donde las tensiones son proporcionales a la deformación, o de un fluido viscoso, donde las tensiones son proporcionales a la velocidad de deformación (o lo que es equivalente, la derivada de la deformación) y finalmente se observa un material viscoelástico, que presenta un desfase en el tiempo respecto de las curvas sinusoidales de deformación y tensión.

Si la amplitud es pequeña, las tensiones resultantes oscilan con la misma frecuencia y están en fase o fuera de fase respecto de la deformación según el tipo de fluido descripto.

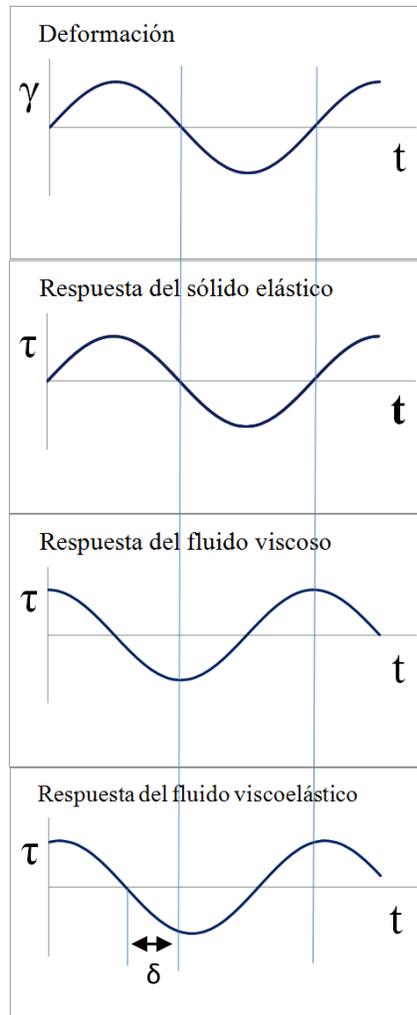


Figura AI.7. Comportamiento de los distintos tipos de materiales, frente a una deformación oscilatoria de pequeña amplitud.

Las ecuaciones que se plantean para este tipo de ensayos son:

Deformación:

$$\gamma_{21}(t) = \gamma^{\circ} \text{sen } \omega t \quad (\text{AI.9})$$

Velocidad de deformación:

$$\dot{\gamma}_{21}(t) = \gamma^{\circ} \omega \text{sen } \omega t = \gamma^{\circ} \text{cos } \omega t \quad (\text{AI.10})$$

Cuando trabajamos en estas condiciones surgen nuevos parámetros de gran utilidad en la descripción de las propiedades reológicas de un material. Ellos son el **Módulo Elástico** G' y el **Módulo Viscoso** G'' . G' es el coeficiente de la componente de la tensión

en fase con la deformación y G'' es el coeficiente de la componente de la tensión 90° fuera de fase con la deformación, ecuación AI.11.

$$\tau_{21} = -G'(\omega) \gamma^\circ \text{sen}(\omega t) - G''(\omega) \gamma^\circ \text{cos}(\omega t) \quad (\text{AI.11})$$

Tanto G' como G'' forman parte de la definición del módulo complejo G^* . En caso de trabajar con un sólido elástico, el módulo complejo se definiría como la relación entre la tensión y la deformación en un punto. Es la resistencia total a la deformación del material, independientemente si esa deformación es recuperable (elástica) o no recuperable (viscosa). Al trabajar con materiales viscoelásticos el módulo complejo presenta una parte real, G' y una parte imaginaria, G'' , como se presenta en la ecuación AI.12. De esta manera, el módulo elástico G' o módulo de almacenamiento, puede usarse como un indicador de la porción elástica del material, alcanzando un máximo cuando la deformación es puramente elástica. El módulo viscoso G'' , o también llamado módulo de pérdida, está relacionado con la disipación de trabajo dentro del material durante un ciclo de esfuerzo. Indica, por ejemplo, la energía convertida en calor y puede ser utilizada como una medida del componente viscoso o de la energía no recuperable disipada por ciclo.

$$G^*(i\omega) = G'(\omega) + i G''(\omega) \quad (\text{AI.12})$$

El ángulo de fase δ indica el desplazamiento de la tensión respecto de la fase de la deformación. La tangente de este ángulo, es conocida como la **tangente de pérdida** y se utiliza para definir la relación entre los módulos de pérdida y almacenamiento, como lo indica la ecuación AI.13. Este valor adimensional permite medir la energía perdida en relación con la energía almacenada, un valor elevado de la tangente significa que el material presenta un comportamiento a la deformación altamente inelástico. Un valor pequeño caracteriza a los materiales que se comportan fundamentalmente como elásticos.

$$\tan \delta = \frac{G''(\omega)}{G'(\omega)} \quad (\text{AI.13})$$

Los módulos descriptos forman parte de las propiedades que llevan el nombre de propiedades viscoelásticas lineales, y resultan independientes de la deformación aplicada dentro de un rango de deformaciones pequeñas, llamado **régimen viscoelástico lineal**. Dentro de estas propiedades encontramos a la viscosidad compleja η^* , que de acuerdo a la ecuación AI.14, es la relación entre el módulo complejo y la frecuencia angular de la deformación aplicada.

$$\eta^* = \frac{G^*}{\omega} \quad (\text{AI.14})$$

El comportamiento típico de los módulos de fluidos macromoleculares homogéneos se observa en la figura AI.8. Donde se reconocen cuatro regímenes.

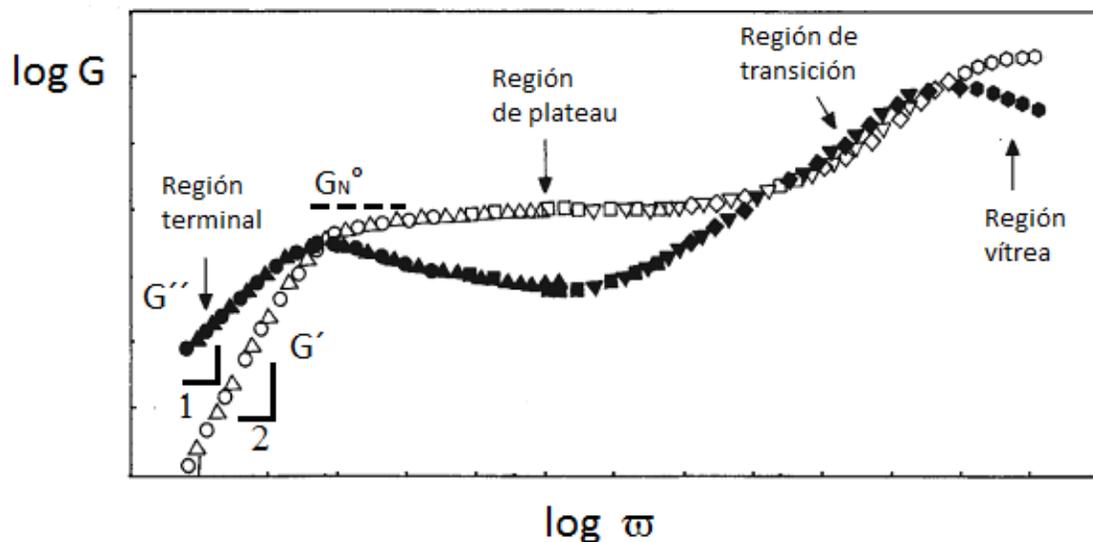


Figura AI.8. Dependencia del comportamiento de los módulos elástico (G' , símbolos vacíos) y viscoso (G'' , símbolos llenos) frente a la frecuencia ω .

- **Región vítrea:** Zona de frecuencias extremadamente altas, donde la velocidad de deformación es tan rápida que el material se comporta como un sólido elástico, el material no se deforma. G'' disminuye, si pudiéramos alcanzar frecuencias infinitas el valor del módulo viscoso tendería a cero. El valor de G' es muy importante.
- **Región de transición:** Las frecuencias son menores, pequeñas partes de las moléculas presentan vibraciones. Solo pequeñas porciones pueden moverse, pueden adaptarse al movimiento. Se observa una disminución de los módulos.
- **Región de plateau:** Porciones más largas de moléculas, aunque de menor longitud que la distancia promedio entre entrelazamientos de cadenas, tienen movilidad, los

entrelazamientos se comportan análogamente a enlaces covalentes. El G' toma un valor constante (plateau), en este rango de frecuencias las moléculas se mueven pero no pueden deslizarse unas sobre otras, comportamiento como de una goma. En esta zona, inicialmente el G'' es menor a medida que las frecuencias disminuyen, pero como a medida que aumenta la movilidad debido a las menores frecuencias pero no se alcanza el deslizamiento entre moléculas el mayor rozamiento produce un aumento del módulo G'' , el cual alcanza un máximo (pérdida de energía por rozamiento).

- **Región terminal:** La deformación es más lenta y el material tiene tiempo de acomodarse, las moléculas se deslizan unas sobre otras. Los módulos decrecen rápidamente cuánto más capacidad de fluir tiene el polímero.

Tung & Dynes (1982) reportaron la relación entre las propiedades viscoelásticas y la gelación en sistemas poliméricos termoestables. El tiempo de gel fue determinado como el tiempo al cual los módulos elástico y viscoso se intersectan, $G' = G''$.

Referencias de la sección 3: (Pérez Lambrecht, 2008)(Ehrenstein, 2001)(Han, 2007)(Naranjo et al., 2008)(Quinzani, 2008)

AI.4. Referencias

Billmeyer, F. W. (1975). "Ciencia de los Polímeros" Ed. Reverté.

Ehrenstein, G. W. (2001). "Polymeric Materials Munich": Ed. Hanser Publishers.

Han, C. D. (2007). "Rheology and Processing of Polymeric Materials". Ed. Oxford University Press, Inc.

Hesse, M., Meier, H., and Zeeh, B. (1995). Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica Nueva York: Editorial Síntesis.

Naranjo, A., Noriega, M. del P., Osswald, T., Roldán-Alzate, A., and Sierra, J. D. (2008). Plastics Testing and Characterization. Industrial Applications Cincinnati, USA: Hanser Gardner Publications.

Pérez Lambrecht, M. V. (2008). Extracción y Caracterización Físicoquímica de Alginatos, Pectinas y sus Mezclas. Universidad Nacional del Sur.

Quinzani, L. M. (2008). Apunte de curso de posgrado "Reología de fluidos complejos". UNS. 2008

Yoo, M. K., Sung, Y. K., Cho, C. S., and Lee, Y. M. (1997). *Polymer*. **38**, 2759–2765.

ANEXO II

CÁLCULOS DE COMPOSICIÓN DE LOS COPOLÍMEROS DE INJERTO A PARTIR DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR ¹H-NMR Y TGA

En el presente anexo se plasman los cálculos y resultados de las composiciones estimadas a partir de los datos obtenidos de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protón (¹H-NMR) y las derivadas de los termogramas obtenidas a partir de Análisis Termogravimétrico (TGA)

II. 1.- CÁLCULOS A PARTIR DE ESPECTROS DE ¹H-NMR

A partir de los espectros obtenidos y por medio de la integración de las señales características se estimó la composición monomérica del alginato y luego la composición de los copolímeros de injerto del capítulo 4 y 5.

II.1.1.- Composición monomérica del alginato.

En las reacciones llevadas a cabo en el transcurso de esta tesis se utilizaron dos alginatos de dos marcas comerciales distintas. El primero provisto por Fluka, se utilizó en las reacciones de síntesis a partir de radiación gamma (capítulo 4) y en las reacciones con iniciador CAN. Este alginato se identificó como S000. El segundo alginato, utilizado en las síntesis llevadas a cabo en la Universidad de Patras, fue provisto por Alfa Aesar, como material de baja viscosidad. Éste material se identificó como UPS00.

En ésta tesis se determinaron, para los alginatos anteriores, la relación monomérica M/G a partir de los espectros ¹H-NMR en base a lo expuesto en la literatura (Gomez et al., 2007; Salomonsen et al., 2009). Los espectros se registraron a 80°C para desplazar la señal que surge de los protones del agua a valores inferiores y así evitar la superposición de señales.

De acuerdo a la señal integrada a $\delta = 5,18-4,96$ ppm fue asignada al hidrogeno del carbono anomérico de la unidad repetitiva guluronato H1-G (pico 1). En $\delta = 4,82-4,57$ ppm y $\delta = 4,55-4,38$ ppm se integran H1-M + H5-GM (pico 2) y H5-GG (pico 3), respectivamente. Siendo el pico 2, la suma de las señales correspondientes al hidrogeno

del carbono anomérico del monómero manuronato y la del hidrogeno en el carbono 5 de las unidades G adyacentes a unidades M, el pico 3 corresponde a la señal del hidrógeno del carbono 5 en las unidades G adyacentes a unidades G. Teniendo en cuenta que el área del protón H1-G es igual al del protón H5-G, es posible calcular H5-GM de la diferencia entre los picos 1 y 3. Entonces, el área de H1-M puede ser obtenida de la diferencia entre el pico 2 y el área de H5-GM. De estos valores, la relación M/G es calculada considerando la relación H1-M/H1-G.

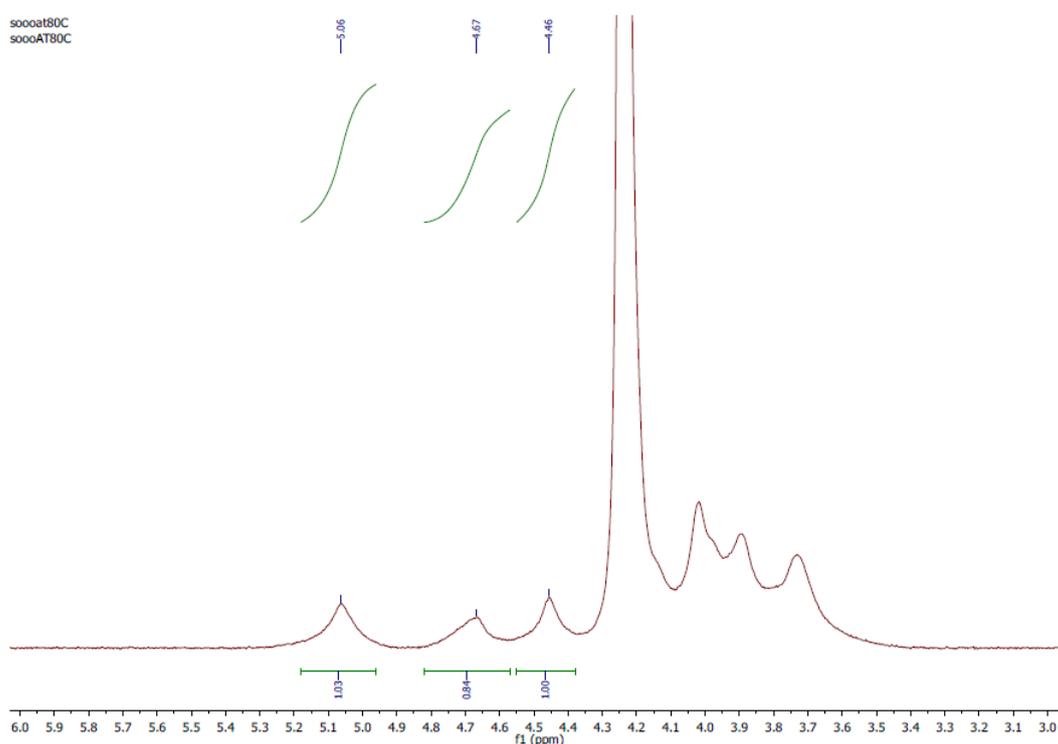


Figura. AII.1.- Espectro ^1H -RMN del alginato S000, a 80°C .

Tabla. AII.1.- Datos de las señales observadas en el espectro ^1H -RMN del alginato S000, a 80°C .

Pico	Señal	Desplazamiento	Integración de áreas
1	G_1	5,18 - 4,96	1,03
2	$M_1 + GM_5$	4,82 - 4,57	0,84
3	GG_5	4,55 - 4,38	1,00

Según la figura AII.2.1, la información obtenida se presenta en la tabla AII.2.1. Así teniendo en cuenta que:

$$G_1 = G_5$$

Dado que por cada hidrogeno anomérico hay un hidrogeno en el carbono 5 de la unidad gulurónica.

$$GM_5 = G_1 - GG_5 \quad \text{esto es,} \quad GM_5 = Pico 1 - Pico 3$$

Entonces,

$$M1 = M1 - GM5 \quad \text{lo que es igual,}$$

$$M1 = Pico 2 - GM5 = Pico 2 - (Pico 1 - Pico 3)$$

La relación M/G es calculada considerando la relación M_1/G_1 .

$$M1 = 0,84 - (1,03 - 1,00) = 0,81$$

$$G1 = 1,03$$

$$M/G = 0,79$$

Siendo $M + G = 1$, se obtiene que

$$M = 0,44 \quad \text{y} \quad G = 0,56$$

La composición de las unidades repetitivas del alginato S000 es de un 44% de Manuronato y de un 56% de Guluronato.

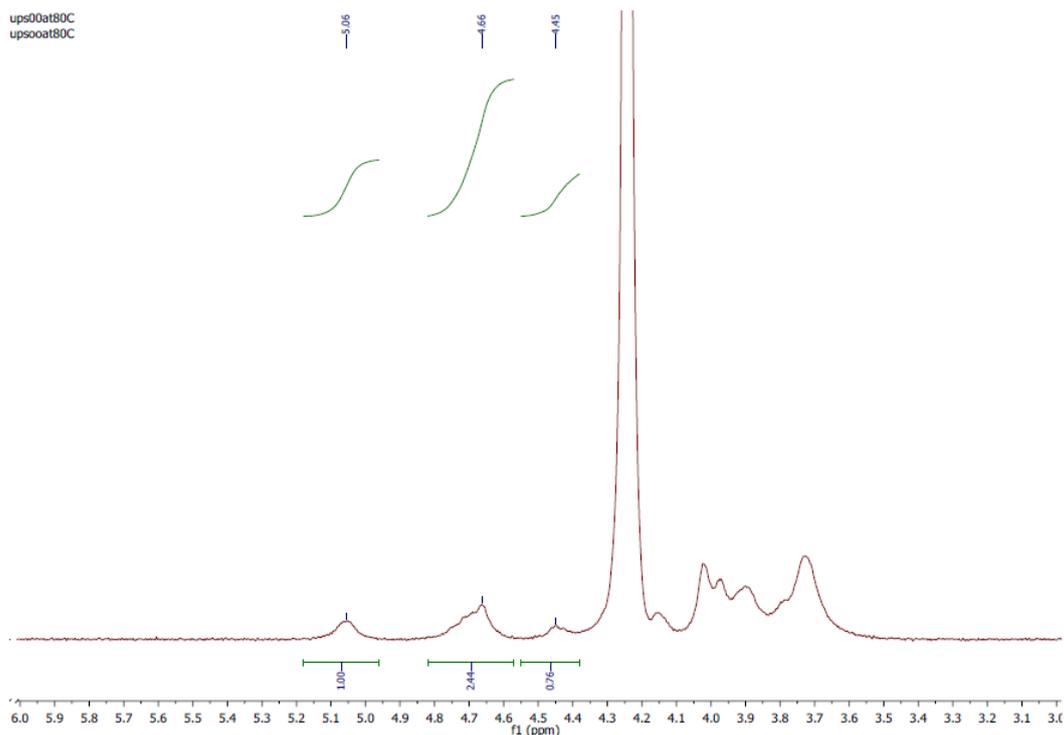


Figura AII.2.- Espectro ^1H -RMN del alginato UPS00, a 80°C .

Tabla AII.2.- Datos de las señales observadas en el espectro ^1H -RMN del alginato UPS00, a 80°C .

Pico	Señal	Desplazamiento	Integración de áreas
1	G_1	5,18 - 4,96	1,00
2	$M_1 + GM_5$	4,82 - 4,57	2,44
3	GG_5	4,55 - 4,38	0,76

Según la figura AII.2.1, la información obtenida se presenta en la tabla AII.2.1. Al igual que para S000,

La relación M/G es calculada considerando la relación M_1/G_1 .

$$M_1 = 2,44 - (1 - 0,76) = 2,2 \quad G_1 = 1$$

$$M/G = 2,2$$

Siendo $M + G = 1$, se obtiene que

$$M = 0,69 \quad \text{y} \quad G = 0,31$$

La composición de las unidades repetitivas del UPS00 es de un 69% de Manuronato y de un 31% de Guluronato.

AII.1.2.- Composición de los copolímeros de injerto sintetizados a partir del uso de radiación gamma de ^{60}Co descritos en el Capítulo 4.

- COPI-03-80N

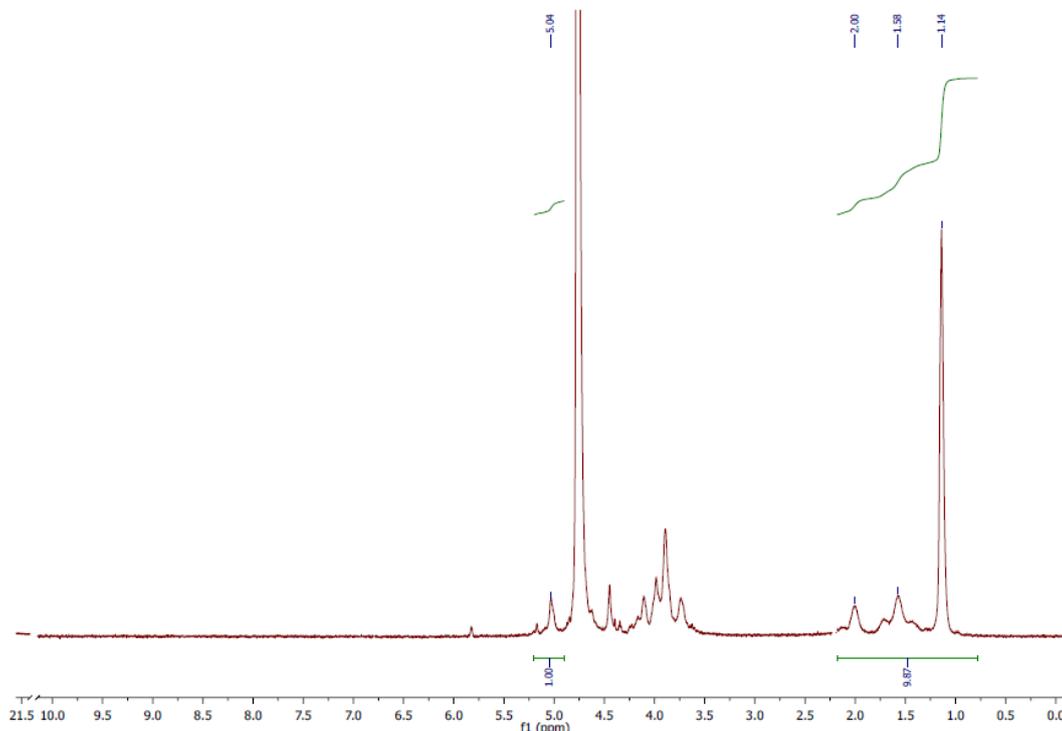


Figura AII.3.- Espectro ^1H -RMN del COPI-03-80N

Tabla AII.3.- Información obtenida del Espectro ^1H -RMN del copolímero COPI-03-80N.

Componente	Señal	n° de H por señal	δ (ppm)	Rango de integración	Sumatoria de Áreas	N° total de Hidrogenos
NIPPAm	CH_3	6	1,14	0,780-2,180 ^a	9,87	9
	CH_2	2	1,58			
	CH	1	2,00			
ALG	H_{G1}	1	5,04	4,960-5,180 ^b	1	1

^a (Dincer et al., 2002)

^b (Salomonsen et al., 2009)

A continuación se presentan los cálculos realizados para estimar la composición de los copolímeros de injerto de alginato y NIPAAm. El resultado final se expresa en porcentajes molares, tal que esa composición representa moles de unidades repetitivas de cada uno de los dos polímeros de partida.

Según la tabla AII.3

$$\frac{9H \text{ NIPAAm}}{1H \text{ ALGG}} = \frac{9,87}{1}$$

Siendo ALG_G y NIPAAm, los moles de unidades gulurónicas en el alginato y los moles de monómeros NIPAAm, respectivamente.

$$\frac{NIPAAm}{ALG_G} = 1,097 \quad ALG_G + NIPAAm = 1$$

$$NIPAAm = 1,097 - 1,097 NIPAAm$$

$$NIPAAm = 0,523$$

$$ALG_G = 0,477$$

El alginato utilizado, S000, tiene una relación de monómeros M/G= 0,79, esto implica que un 56,0 % de los moles de unidades de repetitivas corresponden al monómero guluronato y 44,0% al manuronato. Por tanto,

$$0,477 ALG_G = 0,852 ALG$$

De acuerdo a los cálculos realizados la composición del copolímero de injerto COPI-03-80N es de 38,0 % molar NIPAAm y 62,0 % molar alginato.

A continuación se presentan el resto de los espectros para los copolímeros sintetizados a partir de irradiación con rayos gama de ^{60}Co . Se presentan, a su vez, la correspondiente tabla de asignación de señales a cada uno de los espectros y el resultado obtenido para la composición de alginato y NIPAAm en cada caso.

- COPI-03-67N

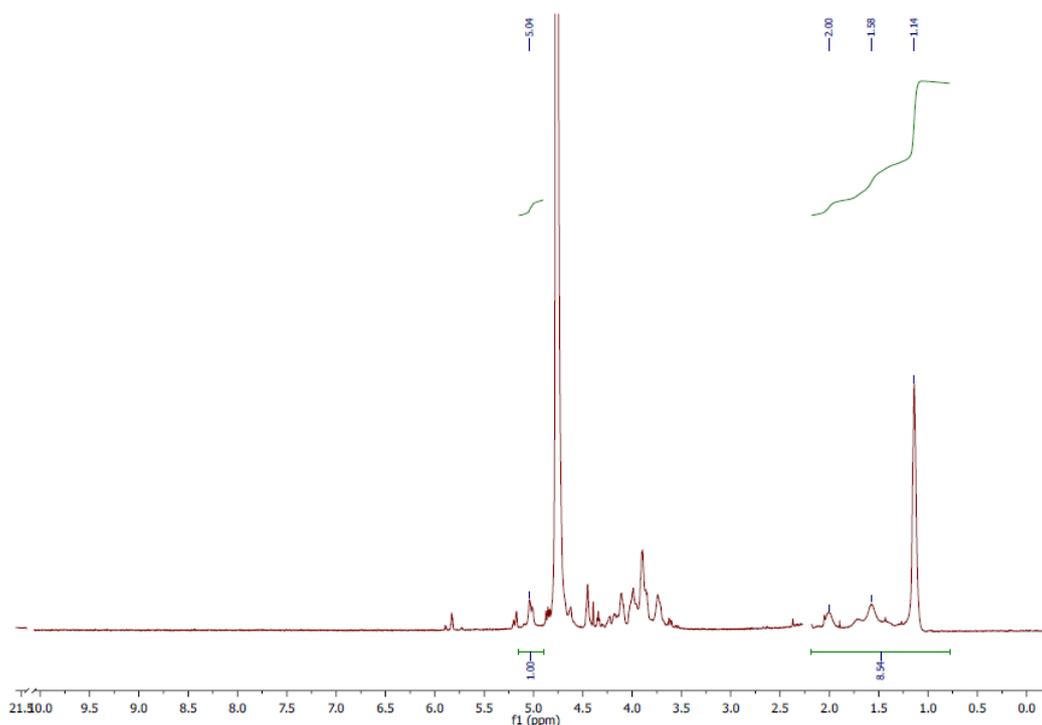


Figura AII.4.- Espectro ¹H-RMN del COPI-03-67N

Tabla AII.4.- Información obtenida del Espectro ¹H-RMN del copolímero COPI-03-67N.

Componente	Señal	n° de H por señal	δ (ppm)	Rango de integración	Sumatoria de Áreas	N° total de Hidrogenos
NIPPA _m	CH ₃	6	1,14	0,780-2,180 ^a	8,54	9
	CH ₂	2	1,58			
	CH	1	2,00			
ALG	H _{G1}	1	5,04	4,960-5,180 ^b	1	1

^a (Dincer et al., 2002)

^b (Salomonsen et al., 2009)

$$NIPAA_m = 0,487$$

$$ALG_g = 0,513$$

$$0,513 ALG_g = 0,916 ALG$$

La composición del copolímero de injerto COPI-03-67N es de 34,7 % molar NIPAA_m y 65,3 % molar alginato.

- COPI-03-50N

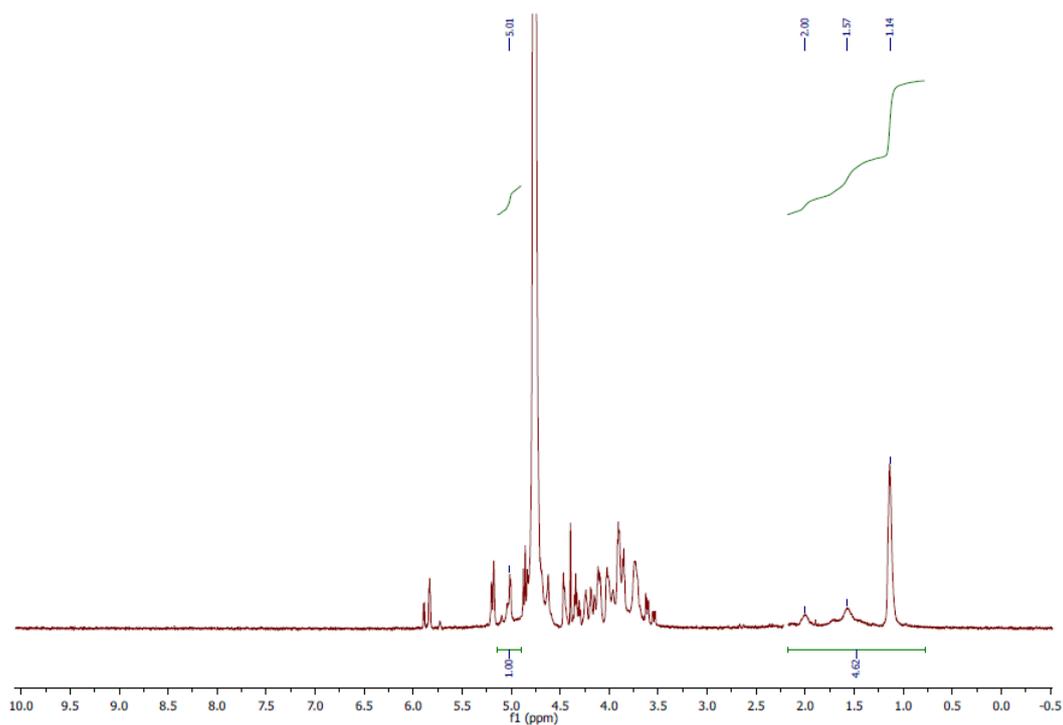


Figura AII.5.- Espectro ¹H-RMN del COPI-03-50N

Tabla AII.5.- Información obtenida del Espectro ¹H-RMN del copolímero COPI-03-50N.

Componente	Señal	n° de H por señal	δ (ppm)	Rango de integración	Sumatoria de Áreas	N° total de Hidrógenos
NIPPA _m	CH ₃	6	1,14	0,780-2,180 ^a	4,62	9
	CH ₂	2	1,57			
	CH	1	2,00			
ALG	H _{G1}	1	5,01	4,960-5,180 ^b	1	1

^a (Dincer et al., 2002)

^b (Salomonsen et al., 2009)

$$NIPAA_m = 0,339$$

$$ALG_g = 0,661$$

$$0,661 ALG_g = 1,180 ALG$$

La composición del copolímero de injerto COPI-03-50N es de 22,3 % molar NIPAA_m y 77,7% molar alginato.

- COPI-05-67N

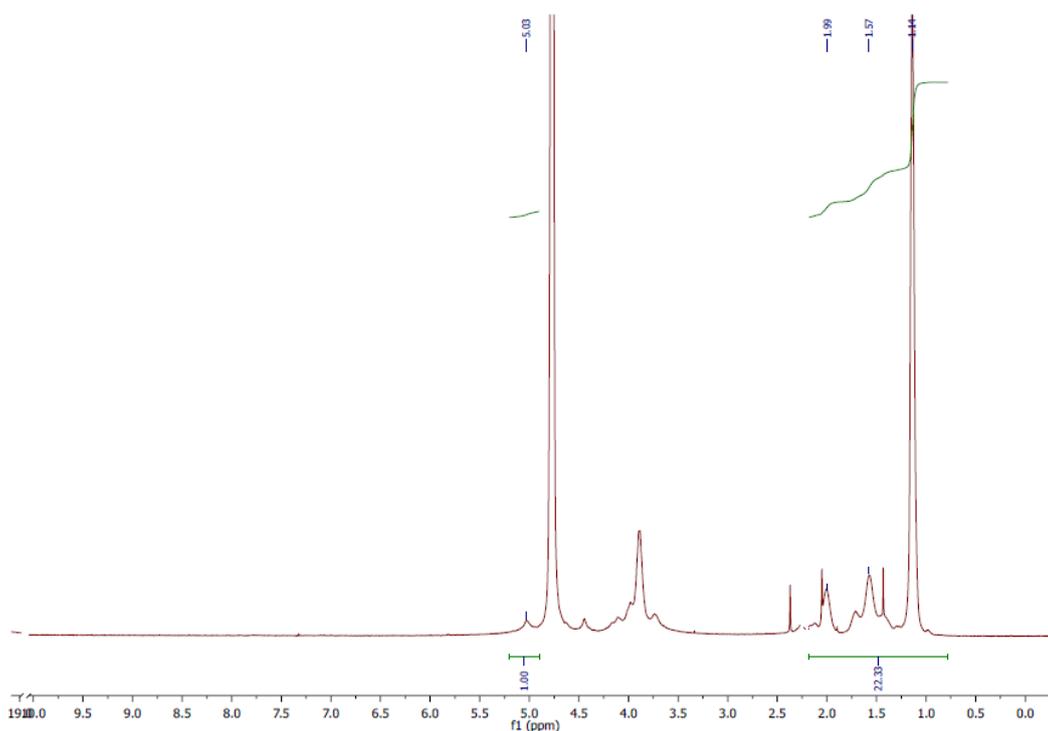


Figura AII.7.- Espectro ¹H-RMN del COPI-05-67N

Tabla AII.7.- Información obtenida del Espectro ¹H-RMN del copolímero COPI-05-67N.

Componente	Señal	n° de H por señal	δ (ppm)	Rango de integración	Sumatoria de Áreas	N° total de Hidrogenos
NIPPA _m	CH ₃	6	1,14	0,780-2,180 ^a	22,33	9
	CH ₂	2	1,57			
	CH	1	1,9			
ALG	H _{G1}	1	5,03	4,960-5,180 ^b	1	1

^a (Dincer et al., 2002)

^b (Salomonsen et al., 2009)

$$NIPAA_m = 0,713$$

$$ALG_g = 0,287$$

$$0,287 ALG_g = 0,513 ALG$$

La composición del copolímero de injerto COPI-05-67N es de 58,1 % molar NIPAA_m y 41,9 % molar alginato.

- COPI-05-50N

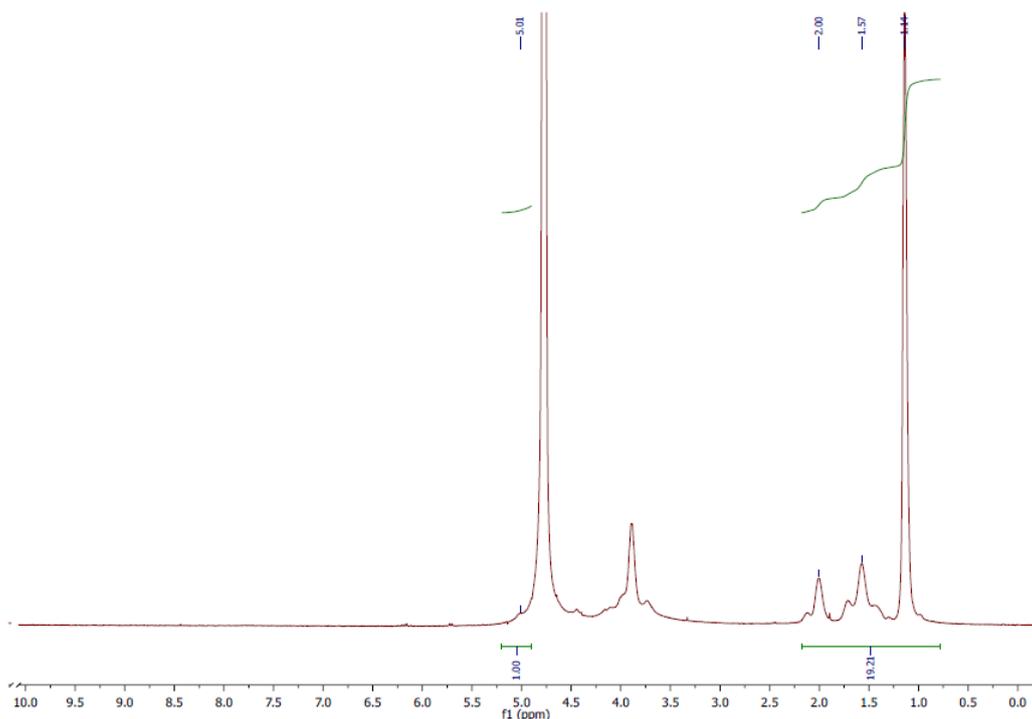


Figura AII.8.- Espectro ¹H-RMN del COPI-05-50N

Tabla AII.8.- Información obtenida del Espectro ¹H-RMN del copolímero COPI-05-50N.

Componente	Señal	n° de H por señal	δ (ppm)	Rango de integración	Sumatoria de Áreas	N° total de Hidrogenos
NIPPA _m	CH ₃	6	1,14	0,780-2,180 ^a	19,21	9
	CH ₂	2	1,57			
	CH	1	2,00			
ALG	H _{G1}	1	5,01	4,960-5,180 ^b	1	1

^a (Dincer et al., 2002)

^b (Salomonsen et al., 2009)

$$NIPAA_m = 0,681$$

$$ALG_g = 0,319$$

$$0,319 ALG_g = 0,570 ALG$$

La composición del copolímero de injerto COPI-05-50N es de 54,4 % molar NIPAA_m y 45,6 % molar alginato.

- COPI-1-80N

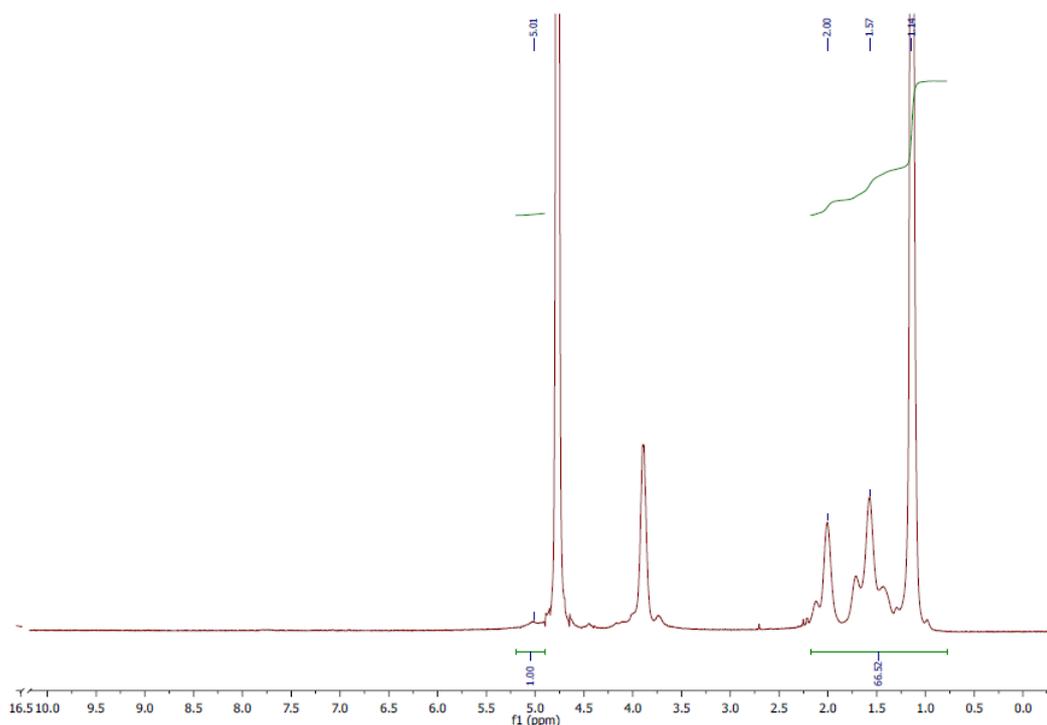


Figura AII.9.- Espectro ¹H-RMN del COPI-1-80N

Tabla AII.9- Información obtenida del Espectro ¹H-RMN del copolímero COPI-1-80N.

Componente	Señal	n° de H por señal	δ (ppm)	Rango de integración	Sumatoria de Áreas	N° total de Hidrogenos
NIPPA _m	CH ₃	6	1,14	0,780-2,180 ^a	66.52	9
	CH ₂	2	1,57			
	CH	1	2,00			
ALG	H _{G1}	1	5,01	4,960-5,180 ^b	1	1

^a (Dincer et al., 2002)

^b (Salomonsen et al., 2009)

$$NIPAA_m = 0,881$$

$$ALGG = 0,119$$

$$0,119 ALGG = 0,213 ALG$$

La composición del copolímero de injerto COPI-1-80N es de 80,5 % molar NIPAA_m y 19,5 % molar alginato.

- COPI-1-67N

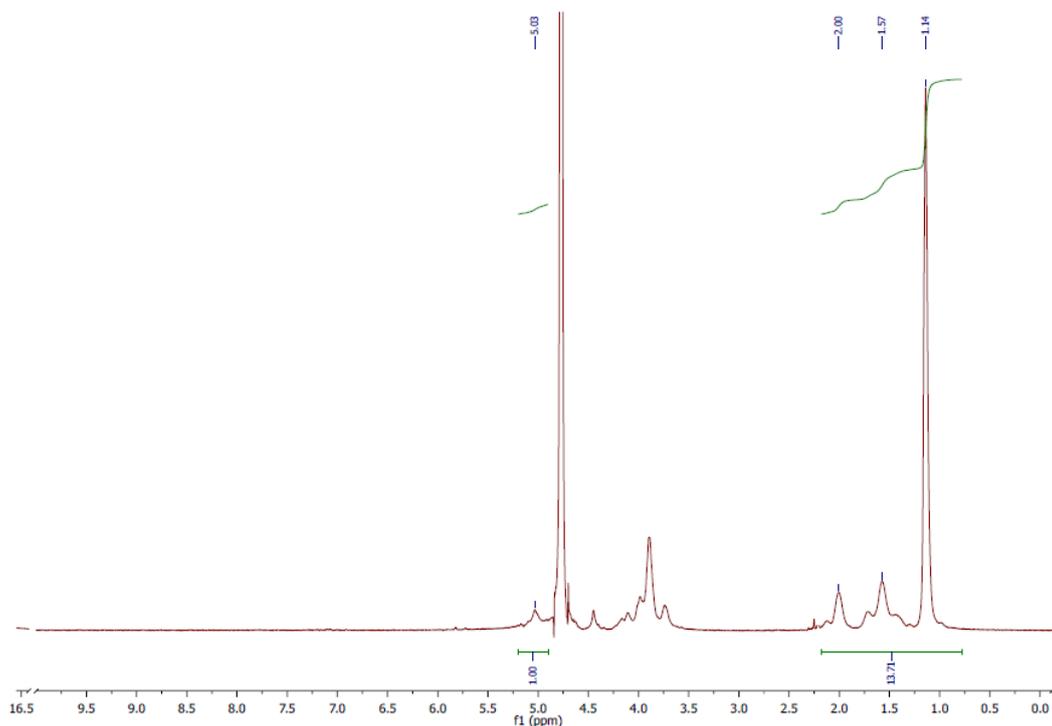


Figura AII.10.- Espectro¹H-RMN del COPI-1-67N

Tabla AII.10.- Información obtenida del Espectro¹H-RMN del copolímero COPI-1-67N.

Componente	Señal	n° de H por señal	δ (ppm)	Rango de integración	Sumatoria de Áreas	N° total de Hidrogenos
NIPAAm	CH ₃	6	1,14	0,780-2,180 ^a	13,71	9
	CH ₂	2	1,57			
	CH	1	2,00			
ALG	H _{G1}	1	5,03	4,960-5,180 ^b	1	1

^a (Dincer et al., 2002)

^b (Salomonsen et al., 2009)

$$NIPAAm = 0,604$$

$$ALGG = 0,396$$

$$0,396 ALGG = 0,708 ALG$$

La composición del copolímero de injerto COPI-1-67N es de 46,0 % molar NIPAAm y 54,0 % molar alginato.

- COPI-1-50N

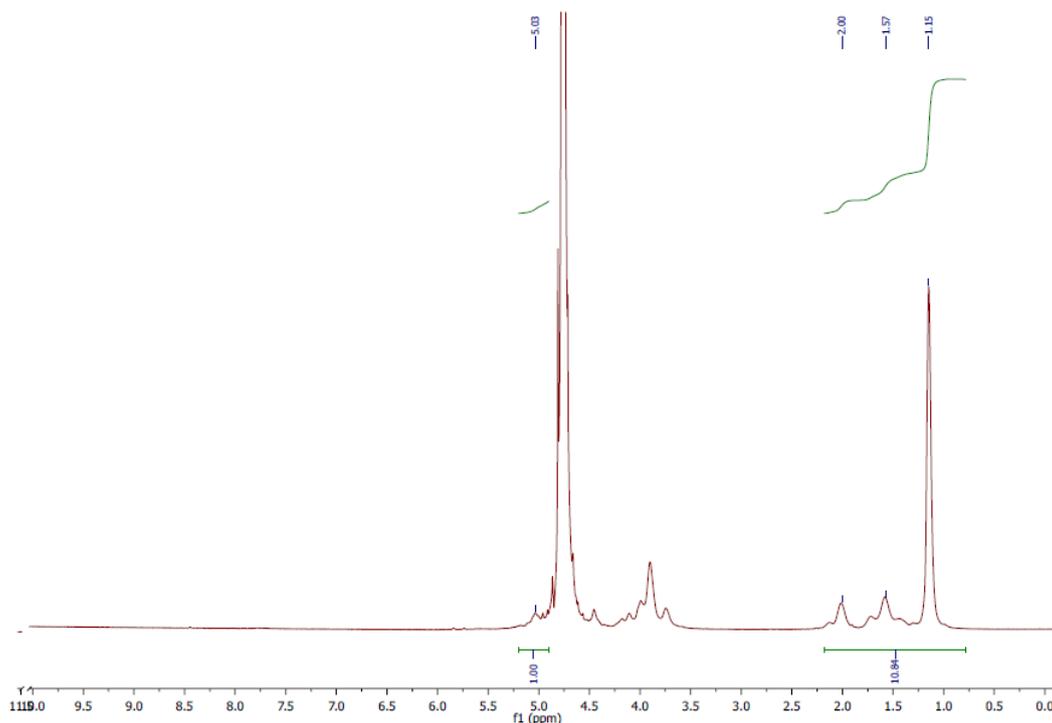


Figura AII.11.- Espectro ^1H -RMN del COPI-1-50N

Tabla AII.11.- Información obtenida del Espectro ^1H -RMN del copolímero COPI-1-50N.

Componente	Señal	n° de H por señal	δ (ppm)	Rango de integración	Sumatoria de Áreas	N° total de Hidrogenos
NIPPA _m	CH ₃	6	1,15	0,780-2,180 ^a	10,84	9
	CH ₂	2	1,57			
	CH	1	2,00			
ALG	H _{G1}	1	5,03	4,960-5,180 ^b	1	1

^a (Dincer et al., 2002)

^b (Salomonsen et al., 2009)

$$NIPAA_m = 0,546$$

$$ALG_g = 0,454$$

$$0,454 ALG_g = 0,811 ALG$$

La composición del copolímero de injerto COPI-1-50N es de 40,3 % molar NIPAA_m y 59,7 % molar alginato.

- COPI-5-80N

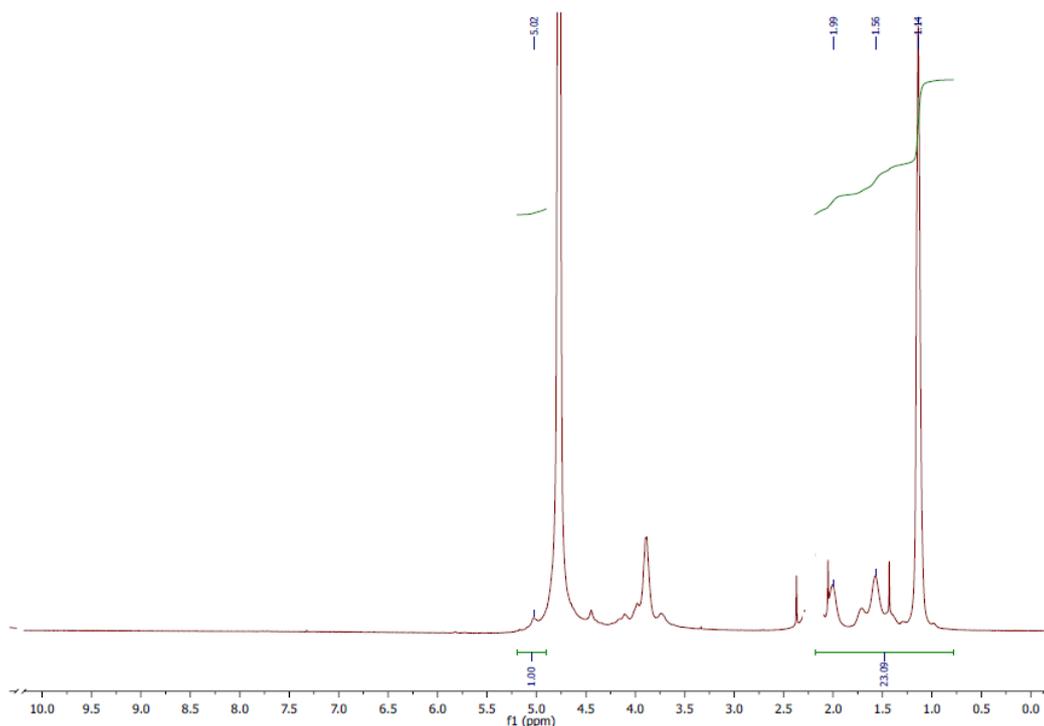


Figura AII.12.- Espectro¹H-RMN del COPI-5-80N

Tabla AII.12- Información obtenida del Espectro¹H-RMN del copolímero COPI-5-80N.

Componente	Señal	n° de H por señal	δ (ppm)	Rango de integración	Sumatoria de Áreas	N° total de Hidrogenos
NIPPA _m	CH ₃	6	1,14	0,780- 2,180 ^a	52,91	9
	CH ₂	2	1,56			
	CH	1	2,00			
ALG	H _{G1}	1	5,01	4,960-5,180 ^b	1	1

^a (Dincer et al., 2002)

^b (Salomonsen et al., 2009)

$$NIPAA_m = 0,855$$

$$ALG_g = 0,145$$

$$0,145 ALG_g = 0,260 ALG$$

La composición del copolímero de injerto COPI-5-80N es de 76,7 % molar NIPAA_m y 23,3 % molar alginato.

- COPI-5-67N

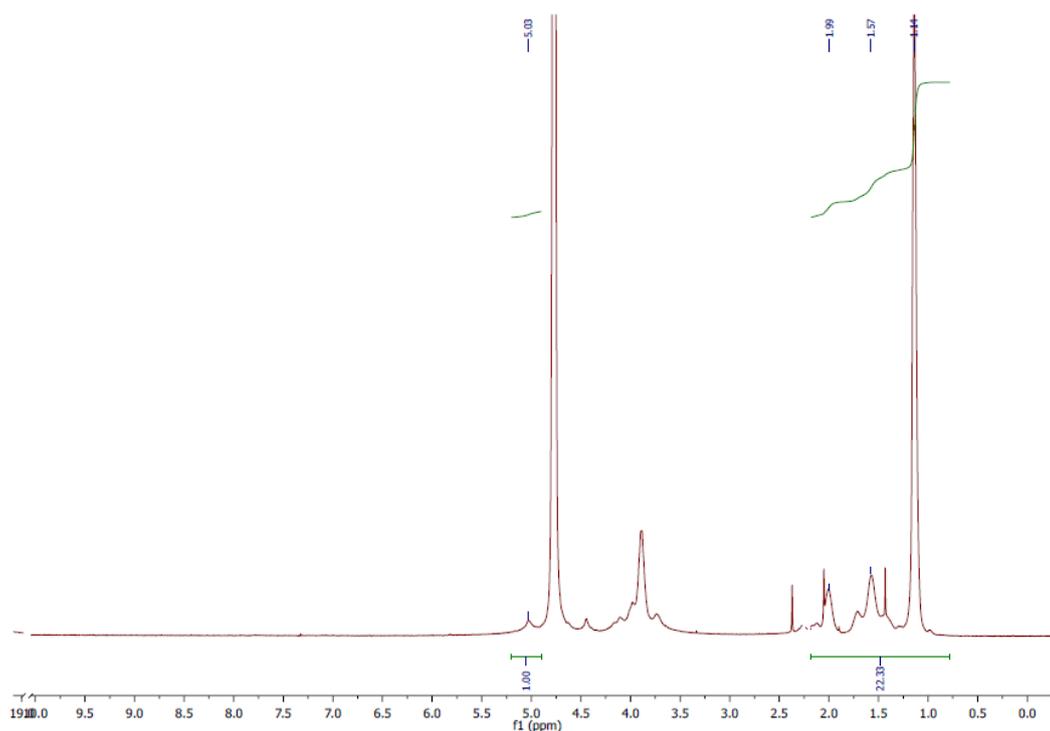


Figura AII.13.- Espectro¹H-RMN del COPI-5-67N

Tabla AII.13.- Información obtenida del Espectro¹H-RMN del copolímero COPI-5-67N.

Componente	Señal	n° de H por señal	δ (ppm)	Rango de integración	Sumatoria de Áreas	N° total de Hidrogenos
NIPAAm	CH ₃	6	1,14	0,780-2,180 ^a	82,38	9
	CH ₂	2	1,57			
	CH	1	2,00			
ALG	H _{G1}	1	5,02	4,960-5,180 ^b	1	1

^a (Dincer et al., 2002)

^b (Salomonsen et al., 2009)

$$NIPAAm = 0,902$$

$$ALGG = 0,098$$

$$0,098 ALGG = 0,176 ALG$$

La composición del copolímero de injerto COPI-5-67N es de 83,7 % molar NIPAAm y 16,3 % molar alginato.

- COPI-5-50N

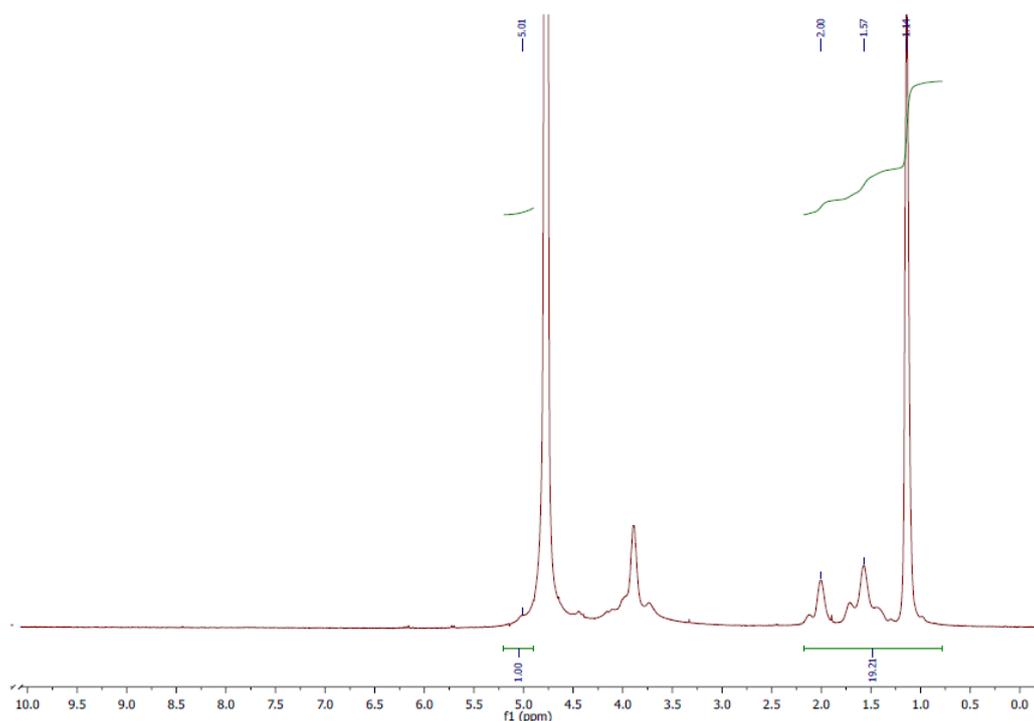


Figura AII.14.- Espectro¹H-RMN del COPI-5-50N

Tabla AII.14- Información obtenida del Espectro¹H-RMN del copolímero COPI-5-50N.

Componente	Señal	n° de H por señal	δ (ppm)	Rango de integración	Sumatoria de Áreas	N° total de Hidrogenos
NIPPA _m	CH ₃	6	1,15	0,780- 2,180 ^a	45,00	9
	CH ₂	2	1,57			
	CH	1	2,00			
ALG	H _{G1}	1	5,04	4,960-5,180 ^b	1	1

^a (Dincer et al., 2002)

^b (Salomonsen et al., 2009)

$$NIPAA_m = 0,832$$

$$ALG_g = 0,168$$

$$0,168 ALG_g = 0,300 ALG$$

La composición del copolímero de injerto COPI-5-50N es de 73,5 % molar NIPAA_m y 26,5 % molar alginato.

AII.1.3.- Composición de los copolímeros de injerto sintetizados a partir de la reacción de condensación entre polímeros sensibles amino terminados y alginato.

Los datos utilizados en los cálculos se detallan en la Tabla 5.4 del copolímero COP-L, Tabla 5.5 del COP-H y Tabla 5.6 del COP-C.

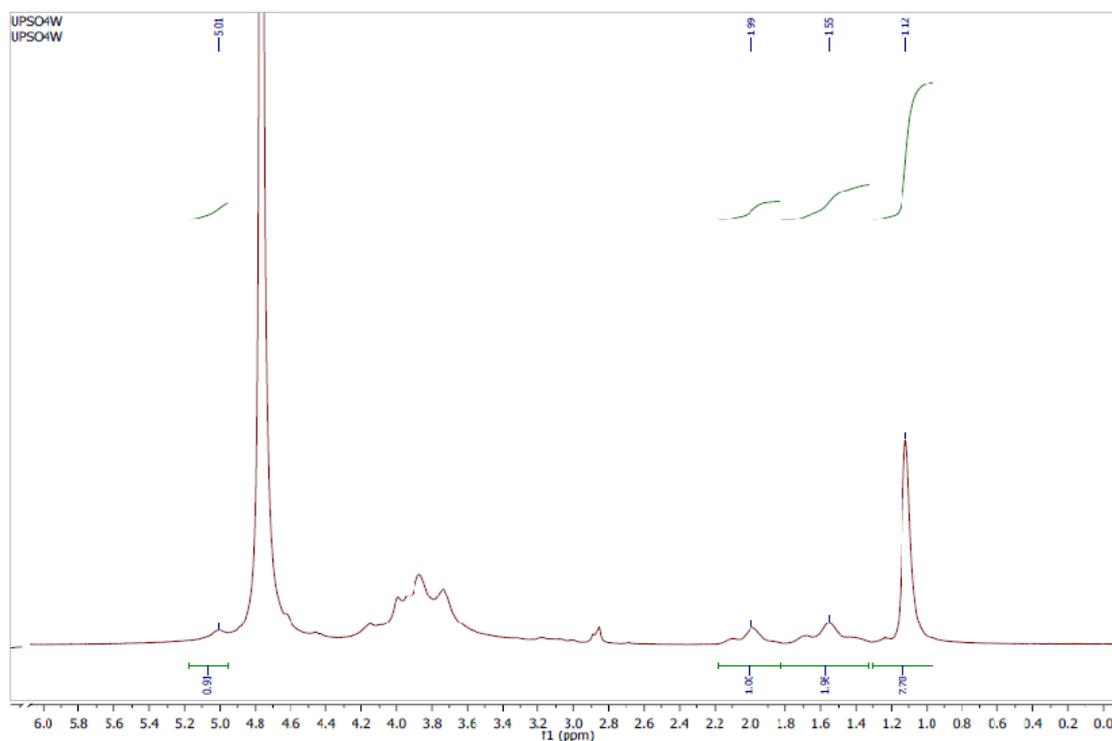


Figura AII.15. Espectro ^1H -NMR del copolímero de injerto COP-L.

Tabla AII.15. Información obtenida del Espectro ^1H -NMR del copolímero COP-L.

Polímero	Señal	H (número)	δ (ppm)	Rango de integración	Área	Área total	H totales (número)
P(NIPPAm)	CH ₃	6	1,12	0,96-1,30 ^a	7,78	10,74	9
	CH ₂	2	1,55	1,33-1,82 ^a	1,96		
	CH	1	1,99	1,83-2,18 ^a	1		
Alginato	H _{G1} *	1	5,01	4,96-5,18 ^b	0,91	0,91	1

^a Dincer y col, 2002

^b Salomonsen y col., 2009

* Señal correspondiente al hidrogeno anomérico de las unidades gulurónicas del alginato.

A continuación se presentan los cálculos para estimar la composición de los copolímeros de injerto. El resultado final se expresa en porcentajes molares, tal que esa

composición representa moles de unidades repetitivas de cada polímeros por cien moles de unidades repetitivas totales.

Por tanto, según los valores de la tabla 5.4 se establece que,

$$\frac{1H \text{ ALG}_G}{9H \text{ NIPAAm}} = \frac{0,91}{10,74} = 0,0847$$

Siendo ALG_G y NIPAAm , los moles de unidades gulurónicas en el alginato y los moles de monómeros NIPAAm , respectivamente.

De la relación $\text{ALG}_G/\text{NIPAAm}$ y teniendo en cuenta que la sumatoria de las unidades repetitivas constituyen el entero (composición total del copolímero) se plantea que,

$$\frac{\text{ALG}_G}{\text{NIPAAm}} = 0,7626 \quad \text{ALG}_G + \text{NIPAAm} = 1$$

$$\text{ALG}_G = 0,7626 - 0,7626 \text{ ALG}_G$$

Obteniendose,

$$\text{ALG}_G = 0,433$$

$$\text{NIPAAm} = 0,567$$

Dado que, el alginato utilizado tiene una relación de monómeros $M/G= 2,2$, esto implica que solo un 31,3% de los moles de unidades de repetitivas corresponden al monómero guluronato y el resto (68,7%) al manuronato; se plantea la igualdad:

$$0,433 \text{ ALG}_G = 1,383 \text{ ALG}$$

De ésta manera, el copolímero COP-L presenta un **28,0 % molar de NIPAAm** y un 72,0 % molar de alginato (en unidades repetitivas).

De igual manera se calculó la composición de los copolímeros denominados COP-H y COP-C. Para ello se utilizó la información de las tablas 5.5 y 5.6.

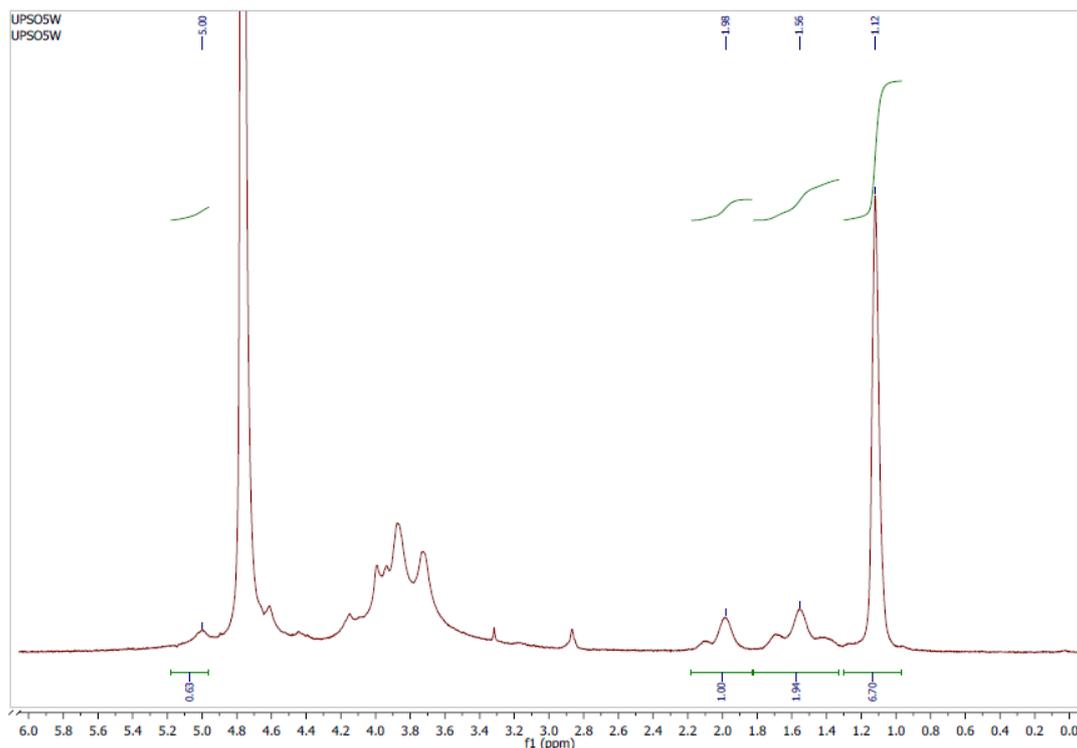


Figura AII.16- Espectros de $^1\text{H-NMR}$ del copolímero de injerto COP-H.

Tabla AII.16. Información obtenida del Espectro $^1\text{H-NMR}$ del copolímero COP-H.

Polímero	Señal	H (número)	δ (ppm)	Rango de integración	Área	Área total	H totales (número)
P(NIPPA _m)	CH ₃	6	1,12	0,96-1,30 ^a	6,70	9,64	9
	CH ₂	2	1,55	1,33-1,82 ^a	1,94		
	CH	1	1,99	1,83-2,18 ^a	1		
Alginato	H _{G1}	1	5,01	4,96-5,18 ^b	0,63	0,63	1

^a (Dincer y col., 2002)

^b (Salomonsen y col., 2009)

La composición del copolímero COP-H es de un **34,7 % molar de NIPAA_m** y un **65,3 % molar de alginato**.

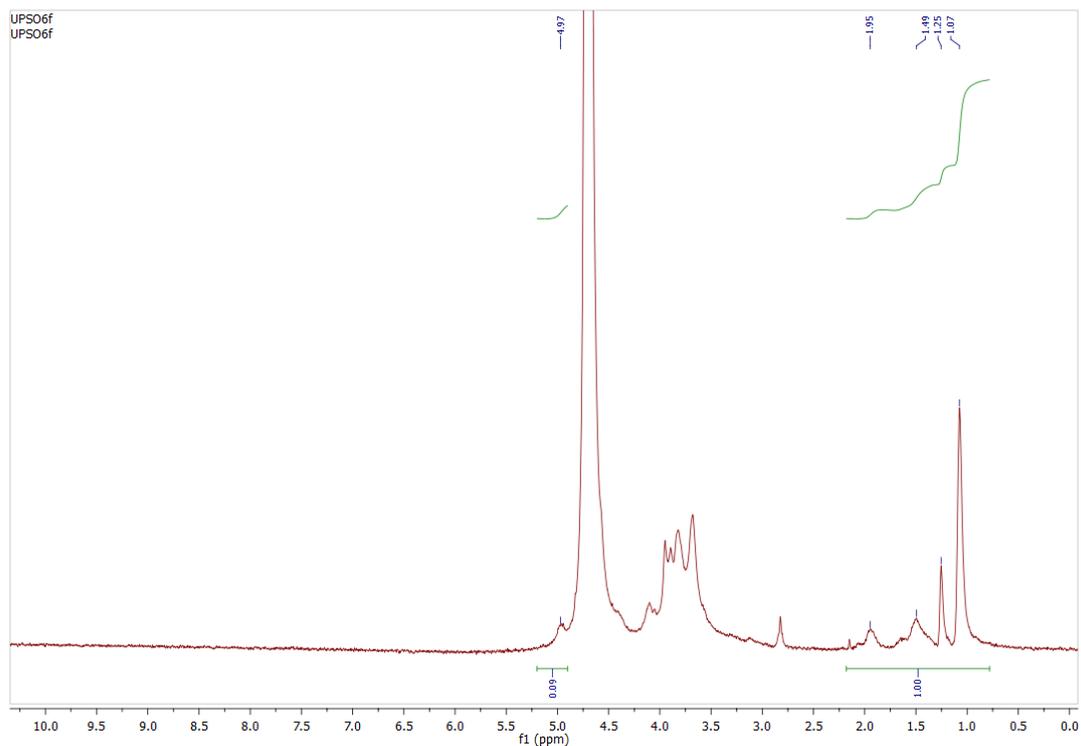


Figura AII.17. Espectro $^1\text{H-NMR}$ del copolímero de injerto COP-C.

Tabla AII.17. Información obtenida del Espectro $^1\text{H-NMR}$ del copolímero COP-C.

Polímero	Señal	H (número)	δ (ppm)	Rango de integración	Área total	H totales (número)
P(NIPAAm	CH_3	6/9	1,07	0,78-2,18 ^a	1	9,45 ^c
co-	CH_2	2	1,25			
NTBAAm)	CH	1	1,95			
Alginato	H_{G1}	1	4,97	4,90-5,02 ^b	0,09	1

^a Dincer y col., 2002

^b Salomonsen y col., 2009

^c Valor promedio teniendo en cuenta la composición monomérica NIPAAm/NTBAAm

La composición del copolímero COP-C es de un **27,0 % molar de NIPAAm** y un **73,0 % molar de alginato**.

AII.2.- CÁLCULOS A PARTIR DE LA DERIVADA DE PRIMER ORDEN DE LOS TERMOGRAMAS OBTENIDOS POR TGA

AII.2.1.- Composición de los copolímeros de injerto sintetizados con Nitrato de Amonio Cérico como iniciador, Capítulo 3.

Se realizó la derivada de primer orden de cada uno de los termogramas obtenidos para los copolímeros de injerto sintetizados con CAN. Las derivadas en función de la temperatura permiten identificar los picos correspondientes a las degradaciones de los componentes del material. En el rango de 200 a 300°C se presenta el pico que corresponde a la degradación del alginato presente en el copolímero. En el rango de temperaturas de 300 a 400/450°C se presenta un segundo pico, propio de la degradación del PNIPAAm.

A partir de la integración de las áreas de los picos se puede estimar la masa asociada a cada degradación. Además, puede estimarse la masa total de alginato contenida en el copolímero sumando la masa correspondiente a la degradación del alginato en el rango de temperaturas entre 200 a 300°C y la masa remanente del residuo a 650°C. La masa del residuo fue considerada proveniente del alginato ya que el PNIPAAm tiene apenas un 2,5% de masa residual a esa temperatura.

A continuación se presentan las curvas obtenidas para cada uno de los materiales del capítulo 3 así como las tablas obtenidas en el proceso de integración de los picos.

- COPQ-12CAN-46N*

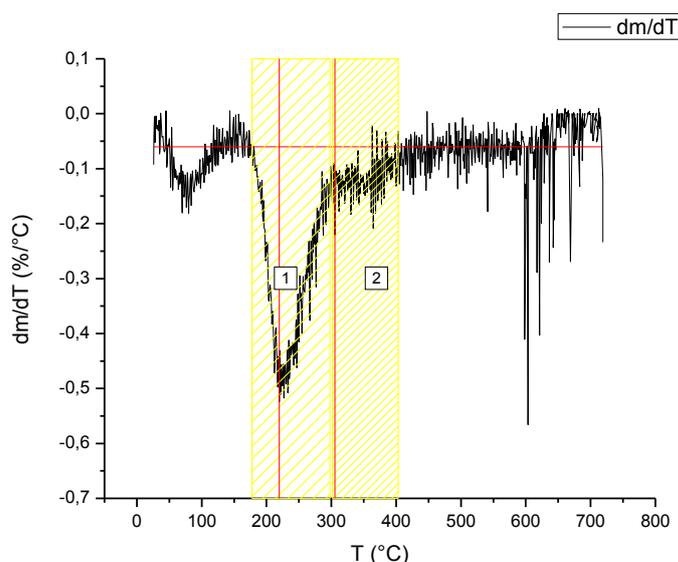


Figura AII.18.- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPQ-12CAN-46N*.

Tabla AII.18.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.18.

Área	Inicio(°C)	Fin (°C)	Ancho	Centro(°C)
28,28	177,1	298,1	58,5	219,5
5,70	301,5	403,1	--	305,5

A modo de ejemplo se describe el procedimiento matemático para el cálculo de la composición de alginato y PNIPAAm dentro del copolímero COPQ-12CAN-46N*:

Teniendo en cuenta que el residuo a 650°C es de 26,03 tal como se expuso en la tabla 3.5,

$$\text{masa de alginato} = 28,28 + 26,03 = 54,31$$

$$\text{moles de alginato} = \frac{54,31}{198} = 0,274$$

$$\text{masa de PNIPAAm} = 5,70$$

$$\text{moles de PNIPAAm} = \frac{5,70}{113} = 0,050$$

$$\text{moles totales} = 0,274 + 0,050 = 0,324$$

$$\% \text{ molar de alginato} = 0,274 \times \frac{100\%}{0,324} = \mathbf{84,6\%}$$

$$\% \text{ molar de NIPAAm} = 0,050 \times \frac{100\%}{0,324} = \mathbf{15,4\%}$$

- COPQ-13CAN-64N*

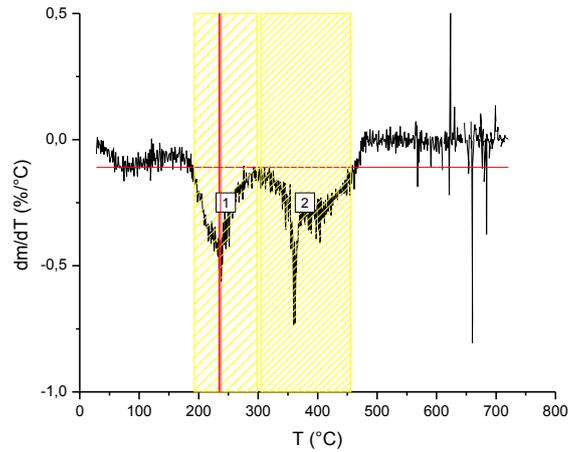


Figura AII.19.- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPQ-13CAN-64N*

Tabla AII.19.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.19.

<u>Área</u>	<u>Inicio(°C)</u>	<u>Fin (°C)</u>	<u>Ancho</u>	<u>Centro(°C)</u>
17,11	192,0	298,7	31,7	237,6
21,69	304,4	455,7	6,0	359,6

- COPQ-12CAN-76N*

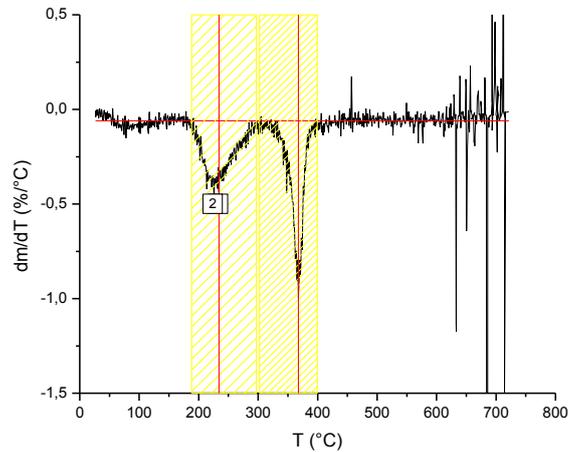


Figura AII.20.- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPQ-12CAN-76N*

Tabla AII.20.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.20.

<u>Área</u>	<u>Inicio(°C)</u>	<u>Fin (°C)</u>	<u>Ancho</u>	<u>Centro(°C)</u>
19,43	188,6	296,7	48,8	234,1
20,62	302,4	399,6	16,2	367,8

- COPQ-12CAN-84N*

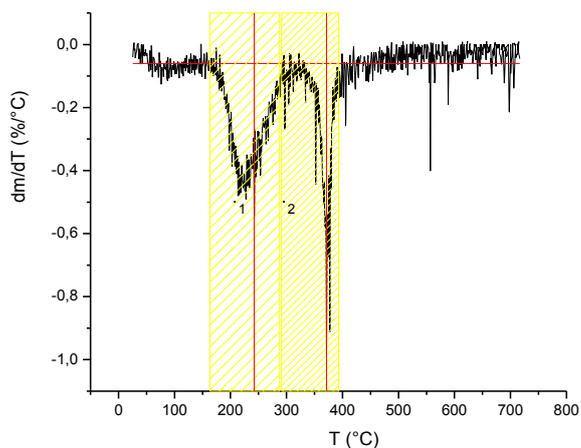


Figura AII.21.- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPQ-12CAN-84N*

Tabla AII.21.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.21.

<u>Área</u>	<u>Inicio(°C)</u>	<u>Fin (°C)</u>	<u>Ancho</u>	<u>Centro(°C)</u>
25,55	175,8	300,3	46,10024	242,3
14,52	303,8	405,9	7,32188	371,5

- COPQ-12CAN-47N

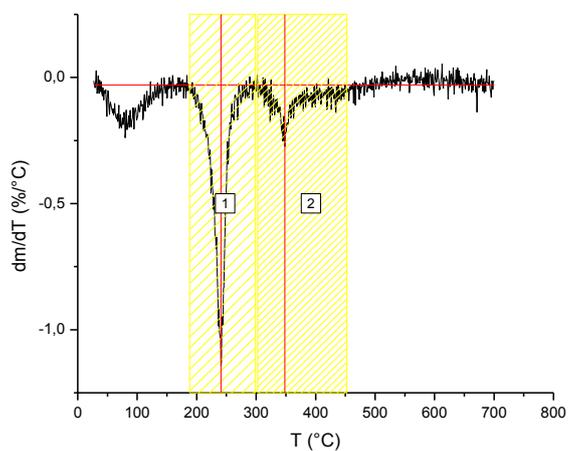


Figura AII.22.- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPQ-12CAN-47N

Tabla AII.22.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.22.-

<u>Área</u>	<u>Inicio(°C)</u>	<u>Fin (°C)</u>	<u>Ancho</u>	<u>Centro(°C)</u>
26,02	188,5	299,0	17,3	240,947
9,25	302,4	452,7	31,3	348,342

- COPQ-12CAN-64N

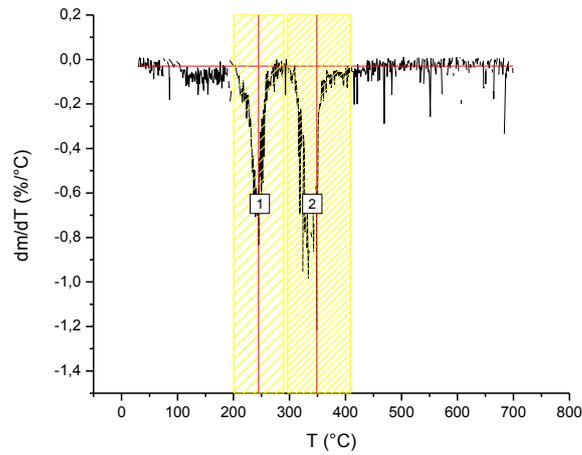


Figura AII.23.- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPQ-12CAN-64N

Tabla AII.23.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.23.-

<u>Área</u>	<u>Inicio(°C)</u>	<u>Fin (°C)</u>	<u>Ancho</u>	<u>Centro(°C)</u>
17,04	202,0	289,3	14,8	244,7
27,05	296,4	409,2	31,7	348,8

- COPQ-12CAN-78N

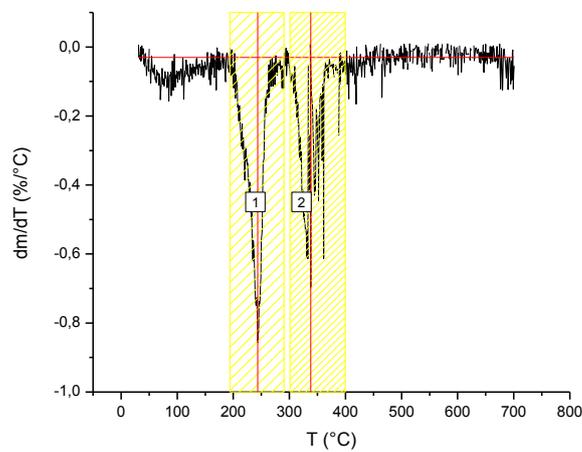


Figura AII.24.- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPQ-12CAN-78N

Tabla AII.24.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.24.-

<u>Área</u>	<u>Inicio(°C)</u>	<u>Fin (°C)</u>	<u>Ancho</u>	<u>Centro(°C)</u>
23,12	194,2	290,7	21,3	243,7
16,22	301,5	399,7	16,7	338,0

- COPQ-06CAN-64N

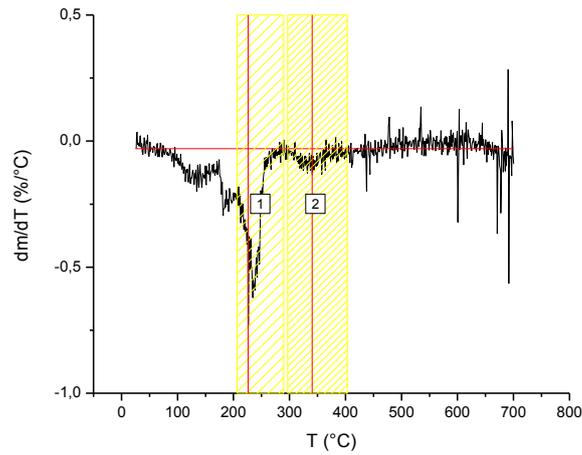


Figura AII.25.- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPQ-06CAN-64N

Tabla AII.25.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.25.-

Área	Inicio(°C)	Fin (°C)	Ancho	Centro(°C)
17,78	206,6	289,8	4,4	226,2
3,47	296,5	403,1	26,4	340,4

- COPQ-24CAN-64N

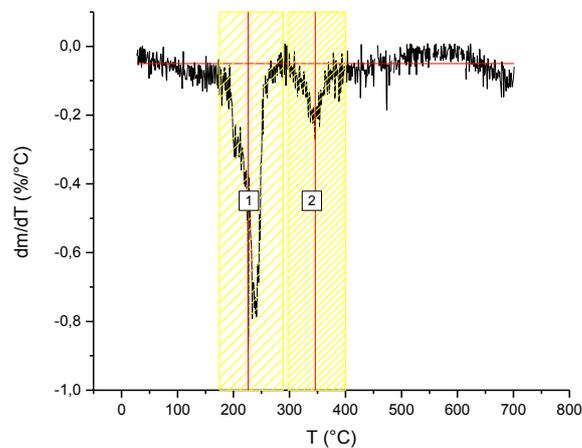


Figura AII.26.- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPQ-24CAN-64N

Tabla AII.26.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.26.-

Área	Inicio(°C)	Fin (°C)	Ancho	Centro(°C)
24,90	174,6	288,7	3,6	226,1
6,66	297	400,1	18,9	346,2

- COPQ-50N-20CAN

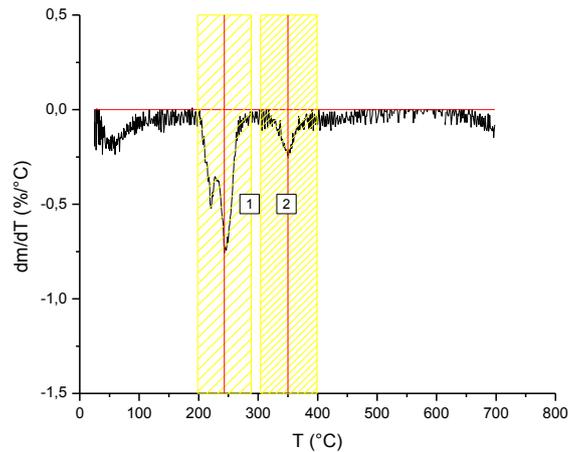


Figura AII.27.- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPQ-50N-20CAN.

Tabla AII.27.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.27.-

Área	Inicio(°C)	Fin (°C)	Ancho	Centro(°C)
27,18	198,7	288,5	41,0	243,2
9,20	303,5	399,4	23,8	349,9

AII.2.2.- Composición de los copolímeros de injerto sintetizados a partir del uso de radiación gamma de ⁶⁰Co, Capítulo 4.

- COPI-03-80N

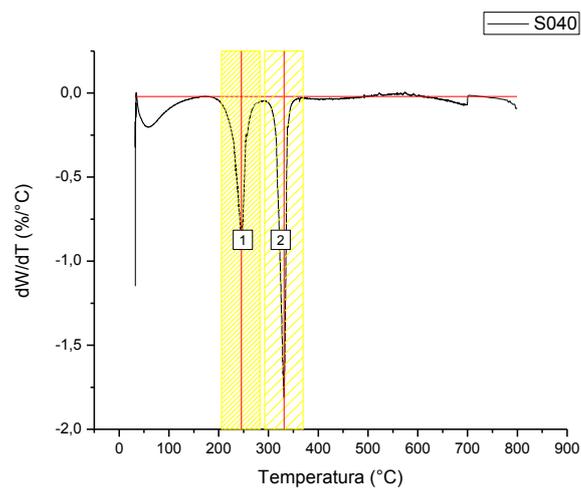


Figura AII.28.- Derivada del termograma obtenido del copolímero COPI-03-80N.

Tabla AII.28.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.28.-

Área	Inicio(°C)	Fin (°C)	Ancho	Centro(°C)
19,86	205,7	282,9	18,7	245,6
26,23	292,3	369,6	12,6	331,4

- COPI-03-67N

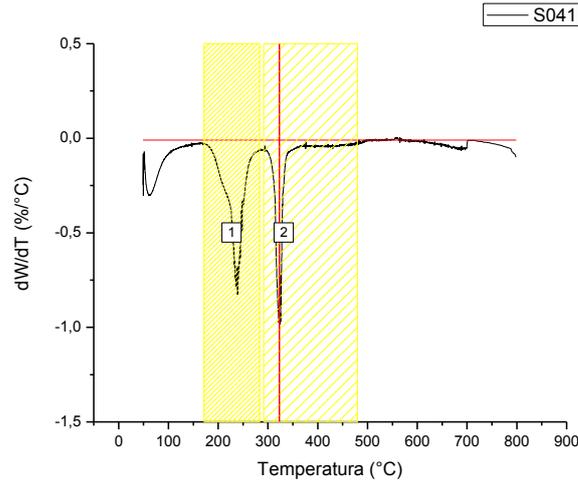


Figura AII.29.- Derivada del termograma obtenido del copolímeros COPI-03-67N.

Tabla AII.29.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.29.-

<u>Área</u>	<u>Inicio(°C)</u>	<u>Fin (°C)</u>	<u>Ancho</u>	<u>Centro(°C)</u>
26,52	167,5	279,5	20,1	239,0
15,91	323,0	798,7	--	324,3

- COPI-03-50N

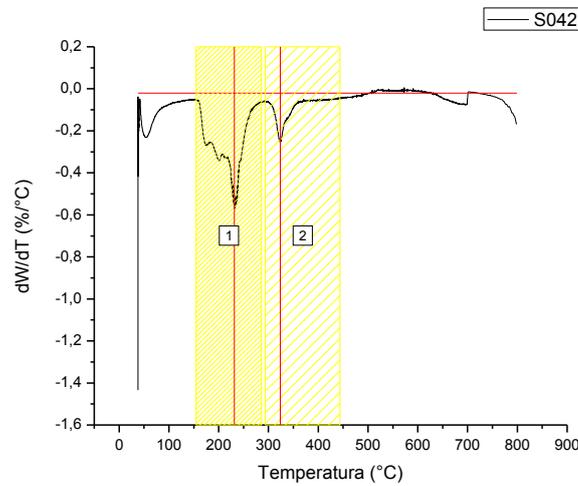


Figura AII.30.- Derivada del termograma obtenido del copolímeros COPI-03-50N.

Tabla AII.30.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.30.-

<u>Área</u>	<u>Inicio(°C)</u>	<u>Fin (°C)</u>	<u>Ancho</u>	<u>Centro(°C)</u>
30,51	154,7	286,1	54,7	231,6
9,89	293,6	443,6	25,3	323,6

- COPI-05-80N

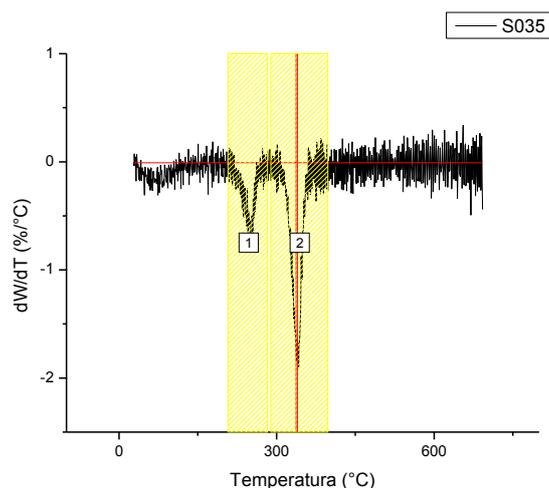


Figura AII.31.- Derivada del termograma obtenido del copolímeros COPI-05-80N.

Tabla AII.31.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.31.-

Área	Inicio(°C)	Fin (°C)	Ancho	Centro(°C)
15,85	215,1	275,6	20,8	252,4
47,02	294,2	646,2	19,0	342,0

- COPI-05-67N

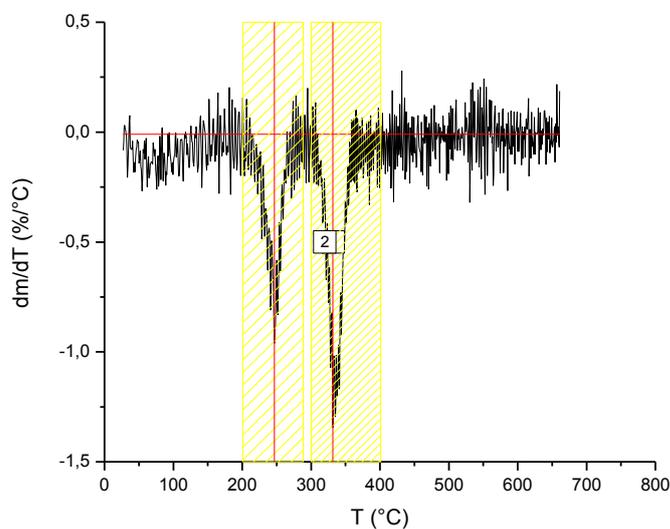


Figura AII.32.- Derivada del termograma obtenido del copolímeros COPI-05-67N.

Tabla AII.32.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.32.-

Área	Inicio(°C)	Fin (°C)	Ancho	Centro(°C)
21,96	200,8	295,0	17,5	246,7
32,67	300,0	401,1	20,9	331,6

- COPI-05-50N

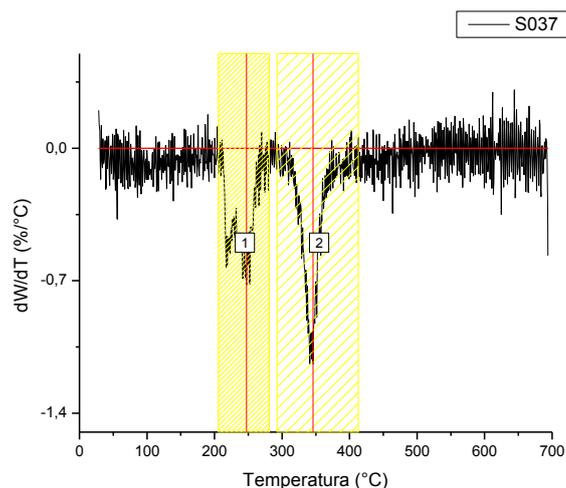


Figura AII.33.- Derivada del termograma obtenido del copolímeros COPI-05-50N.

Tabla AII.33.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.33.-

<u>Área</u>	<u>Inicio(°C)</u>	<u>Fin (°C)</u>	<u>Ancho</u>	<u>Centro(°C)</u>
24,87	205,5	281,0	42,0	247,3
33,88	292,4	412,7	23,3	345,9

- COPI-1-80N

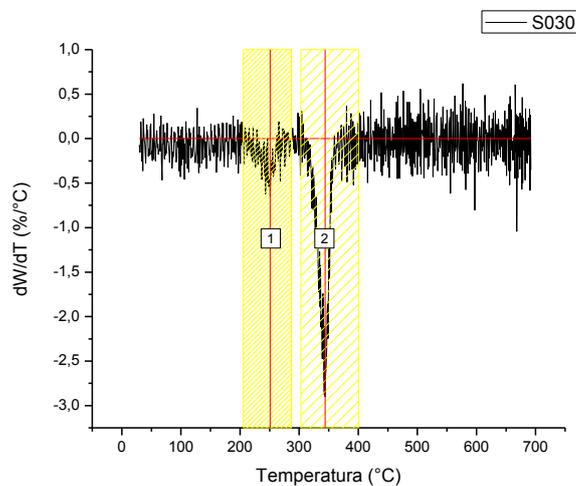


Figura AII.34.- Derivada del termograma obtenido del copolímeros COPI-1-80N.

Tabla AII.34.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.34.-

<u>Área</u>	<u>Inicio(°C)</u>	<u>Fin (°C)</u>	<u>Ancho</u>	<u>Centro(°C)</u>
12,86	206,1	286,5	16,1	251,1
58,40	302,8	400,1	18,0	344,0

- COPI-1-67N

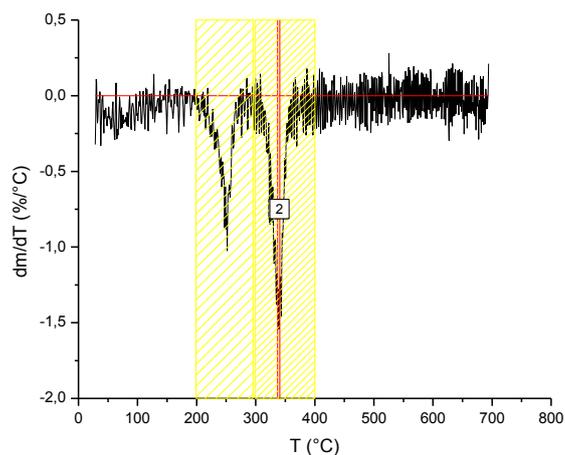


Figura AII.35.- Derivada del termograma obtenido del copolímeros COPI-1-67N.

Tabla AII.35.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.35.-

Área	Inicio(°C)	Fin (°C)	Ancho	Centro(°C)
22,13	198,8	295,4	18,6	251,9
35,15	298,7	399,7	23,7	339,1

- COPI-1-50N

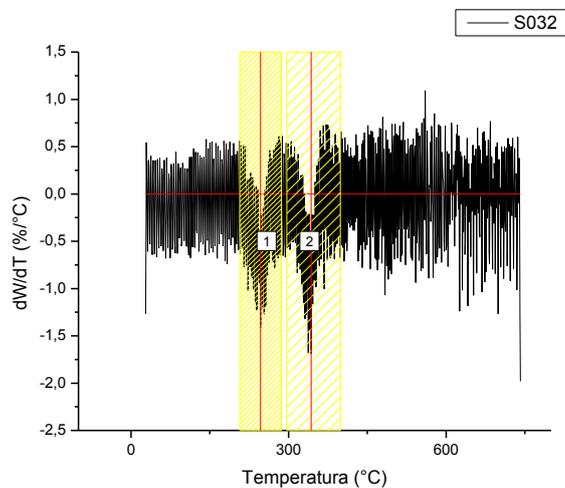


Figura AII.36.- Derivada del termograma obtenido del copolímeros COPI-1-50N.

Tabla AII.36.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.36.-

Área	Inicio(°C)	Fin (°C)	Ancho	Centro(°C)
25,06	207,5	286,4	32,5	246,9
26,34	297,0	398,2	18,9	343,2

- COPI-5-80N

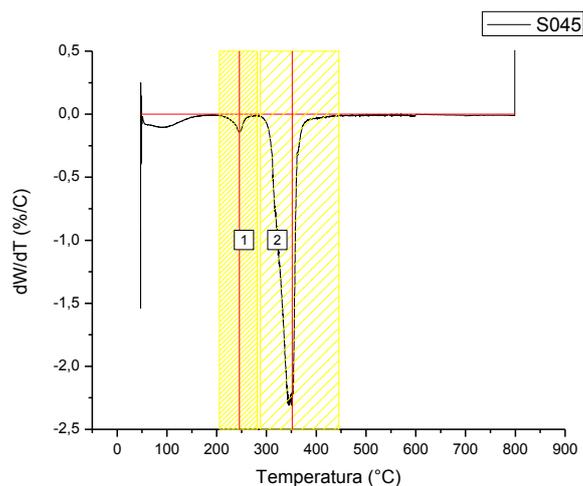


Figura AII.37.- Derivada del termograma obtenido del copolímeros COPI-5-80N.

Tabla AII.37.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.37.-

<u>Área</u>	<u>Inicio(°C)</u>	<u>Fin (°C)</u>	<u>Ancho</u>	<u>Centro(°C)</u>
3,66	205,7	281,7	17,14	245,5
81,06	287,4	445,5	32,52	351,7

- COPI-5-67N

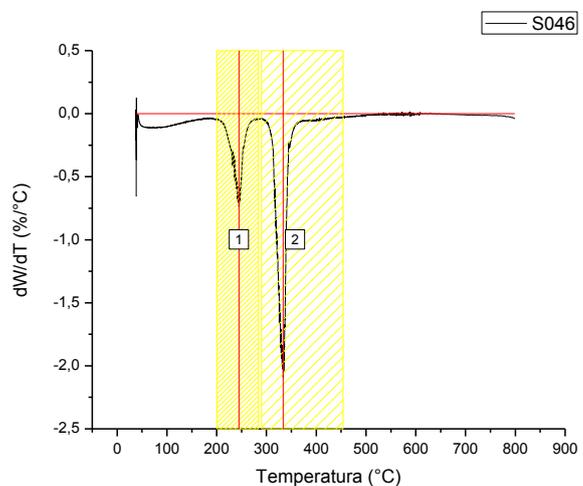


Figura AII.38.- Derivada del termograma obtenido del copolímeros COPI-5-67N.

Tabla AII.38.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.38.-

<u>Área</u>	<u>Inicio(°C)</u>	<u>Fin (°C)</u>	<u>Ancho</u>	<u>Centro(°C)</u>
18,28	200,4	283,9	20,01	244,7
47,50	290,0	453,8	18,27	333,7

- COPI-5-50N

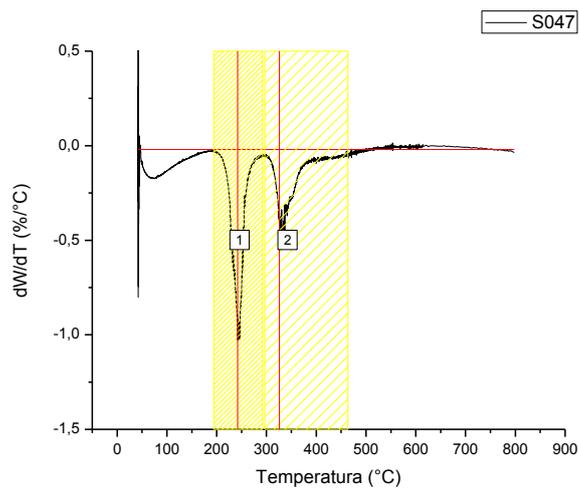


Figura AII.39.- Derivada del termograma obtenido del copolímeros COPI-5-50N.

Tabla AII.39.- Datos obtenidos de la integración de los picos de la figura AII.39.-

Área	Inicio(°C)	Fin (°C)	Ancho	Centro(°C)
25,76	194,2	292,3	23,0	242,2
20,10	296,7	463,6	22,3	326,0

AII.3.- CÁLCULOS DE COMPOSICIÓN A PARTIR DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR ANÁLISIS ELEMENTAL.

A continuación se presentan los cálculos matemáticos para estimar la composición del COPI-1-80N, procedimiento empleado del cálculo de cada uno de los copolímeros sintetizados.

A partir de la relación de N% y C% del NIPAAm, presentados en la tabla 4.3 del capítulo 4, se calculó el contenido de C correspondiente al NIPAAm dentro del copolímero,

$$\frac{58,918 \text{ C corresp. al NIPAAm}}{11,870 \text{ N corresp. al NIPAAm}} = \frac{x \text{ C corresp al NIPAAm en COPI} - 1 - 80\text{N}}{8,130 \text{ N COP1} - 80\text{N}}$$

Siendo: C corresp al NIPAAm en COPI – 1 – 80N = 40,354

Restando el contenido de C correspondiente al NIPAAm al C total presente en el copolímero puede obtenerse el C correspondiente al alginato:

$$\begin{aligned} 49,833 \text{ C total en COPI} - 1 - 80\text{N} - 40,354 \text{ C corresp al NIPAAm en COPI} - 1 - 80\text{N} \\ = \text{C corresp al ALG en COPI} - 1 - 80\text{N} \end{aligned}$$

Obteniendose,

$$\text{C corresp al ALG en COPI} - 1 - 80\text{N} = 9,479$$

Los valores de las masas de carbono (g) para cada componente pueden asociarse a una cantidad de gramos de alginato y NIPAAm teniendo en cuenta los resultados de análisis elemental para cada uno de ellos,

$$\frac{100 \text{ g de PNIPAAm}}{11,870 \text{ g de N}} \times 8,130 \text{ g de N corresp al NIPAAm} = 68,5 \text{ g NIPAAm}$$

$$\frac{100 \text{ g de ALG}}{30,004 \text{ g de C}} \times 9,479 \text{ g de C corresp al ALG} = 31,6 \text{ g ALG}$$

De los valores en gramos, se obtienen los moles de unidades repetitivas de cada componente,

$$\frac{1 \text{ mol NIPAAm}}{113 \text{ g NIPAAm}} \times 68,5 \text{ g NIPAAm} = 0,61 \text{ mol NIPAAm}$$

$$\frac{1 \text{ mol ALG}}{198 \text{ g ALG}} \times 31,6 \text{ g ALG} = 0,16 \text{ mol ALG}$$

Finalmente a partir del valor de los moles totales obtenidos es posible calcular el porcentaje molar de NIPAAm en el copolímero.

$$n \text{ totales} = 0,61 \text{ mol NIPAAm} + 0,16 \text{ mol ALG} = 0,77 \text{ moles}$$

$$\frac{100\%}{0,77 \text{ moles}} \times 0,61 = \mathbf{79,2 \% \text{ NIPAAm}}$$

II.4.- REFERENCIAS

Dincer, S., Kesim, H., Rzaev, Z. M. O., and Pis, E. (2002). *European Polymer Journal*. **38**, 2143–2152.

Gomez, C. G., Rinaudo, M., and Villar, M. A. (2007). *Carbohydrate Polymers*. **67**, 296–304.

Salomonsen, T., Jensen, H. M., Larsen, F. H., Steuernagel, S., and Engelsen, S. B. (2009). *Food Hydrocolloids*. **23**, 1579–1586.

ANEXO III

QUÍMICA DE LAS RADIACIONES

AIII.1.- Introducción

Los cambios radioinducidos se atribuyen inicialmente a una mezcla de intermediarios reactivos que incluyen inicialmente iones y moléculas excitadas y posteriormente a la formación de radicales libres, los cuales son considerados como los principales responsables de diferentes reacciones químicas.

Los tipos de radiación más comúnmente empleados son aquellos producidos por el decaimiento de núcleos radiactivos naturales o artificiales (radiación alfa, beta y gamma), o bien haces de partículas cargadas aceleradas (electrones, protones, deuteronos, núcleos de helio y otros núcleos pesados) y también rayos X.

AIII.2.- Unidades de Radiación

La velocidad con que se desintegra una fuente radiactiva se denomina Actividad y se mide en Curie, Ci (unidad antigua) o Becquerel Bq según el Sistema Internacional.

Su equivalencia es:

$$1 \text{ Ci} = 3,7 \cdot 10^{10} \text{ Bq.}$$

Los efectos de las radiaciones dependen de la energía que se absorbe por unidad de masa de cualquier material. Entonces la cantidad de Dosis Absorbida está definida como la energía por unidad de masa que se deposita en el material. La unidad es el Gray (Gy), que equivale a un joule por kilogramo. Tradicionalmente se ha usado el RAD (Roentgen Absorbed Dose), que equivale a 100 erg/g.

La conversión de unidades es entonces:

$$1 \text{ Gy} = 1\text{J/kg} = 10.000 \text{ erg/g} = 100 \text{ rad}$$

Si los efectos estudiados son biológicos, se emplea la Dosis efectiva. Su unidad es el Sievert, y en su cálculo aparecen factores de ponderación con los cuales se toma en cuenta la sensibilidad de los tejidos irradiados.

AIII.3. Desintegraciones Nucleares

Existen núcleos que son inestables y que alcanzan la estabilidad mediante la emisión de algún tipo de radiación electromagnética o de algún tipo de partícula. Cuando el proceso de emisión ocurre, se dice que se produce una desintegración.

AIII.3.1. Radiación Gamma

Cuando un núcleo está excitado (estado metaestable), al regresar a su estado fundamental, lo puede hacer emitiendo radiación γ . Se trata de radiación electromagnética y sigue la ley de Planck, ecuación AIII.1:

$$E_{\gamma} = h \times \nu = h \times \frac{c}{\lambda} \quad (\text{AIII.1})$$

Los rayos γ son monoenergéticos casi sin masa y siempre acompañan a una desintegración β , α y al proceso de fisión nuclear.

La radiación γ tiene las mismas características de la luz. Son fotones de alta energía (más energéticos que los rayos X) y se ubican energéticamente en la última parte del espectro electromagnético, junto con algunos rayos cósmicos (figura AIII.1.).

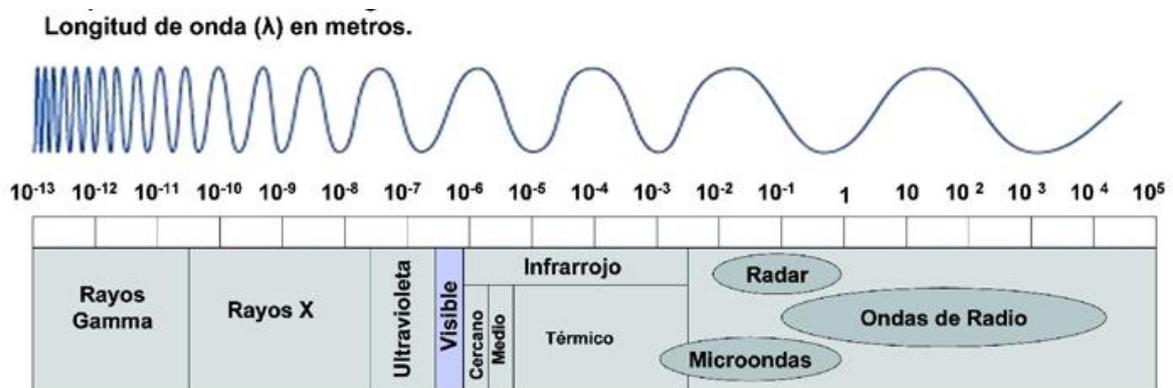


Figura AIII.1.- Espectro electromagnético.

Las ondas electromagnéticas, entonces, aumentan su frecuencia al aumentar la energía. La longitud de la onda es inversamente proporcional a la frecuencia. En consecuencia la longitud de onda disminuye al aumentar la energía como se muestra en el dibujo.

Estas formas de energía pueden ser controladas y usadas para cubrir importantes necesidades de los seres humanos, y son de hecho utilizadas cotidianamente en un amplio espectro de aplicaciones, tales como telecomunicaciones, hornos de microondas,

diagnóstico y tratamiento de enfermedades (Rayos X y Gamma), o para el procesamiento de productos y sustancias que requieren un medioambiente libre de microorganismos (UV; Rayos Gamma).

La aplicación de radiación ionizante para la modificación de materiales ha sido y sigue siendo ampliamente utilizada en el área de los polímeros (Rosiak, 1995; Güven et al., 1999; Kumar et al., 2006; Liu et al., 2007; Abd El-Mohdy & Safrany, 2008; Grasselli et al., 2009). En general en estos procesos, se prefiere el uso de radiación Gamma frente a los electrones acelerados, porque si bien ambas técnicas producen iones en forma homogénea, la radiación gamma tiene una mayor penetración en el material a tratar. La figura AIII.2, presenta un esquema de la penetración de las radiaciones ionizantes. La radiación gamma penetra en la materia más que las partículas α o β . La radiación α se frena en un papel delgado, la β y los electrones se frenan interponiendo una lámina de plástico o aluminio de un milímetro de espesor, pero la radiación gamma requiere gruesos espesores de plomo, para su atenuación.

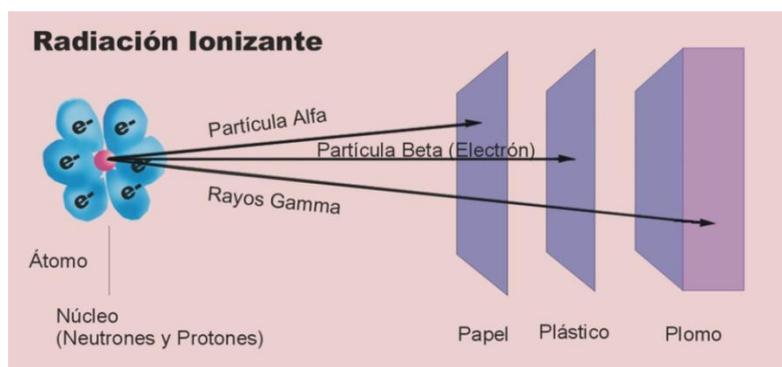
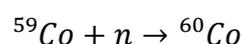


Figura AIII.2.- Esquema de la penetración de las radiaciones ionizantes.

AIII.3.1.1. Cobalto 60

El Cobalto 60 (^{60}Co) es un metal radiactivo que se caracteriza por emitir energía en forma de rayos gamma. Se lo obtiene a partir del isótopo natural del Cobalto, ^{59}Co , exponiéndolo a un flujo de neutrones. Estos neutrones se pueden producir en gran cantidad en los reactores nucleares. Nuestro país es productor de este isótopo radiactivo en el reactor de Embalse de Rio Tercero, Córdoba, para uso interno y el excedente se exporta.



El ^{60}Co es radiactivo y se desintegra emitiendo partículas beta (electrones nucleares) y dos rayos gamma de energías $E_{\gamma}=1,173$ y $1,332$ Mev. (Figura AIII.3).



Figura AIII.3.- Esquema del decaimiento radioactivo del ^{60}Co .

El ^{60}Co se encapsula herméticamente en fuentes de diversas geometrías y dimensiones de acuerdo a su uso. Este radioisótopo, para poder ser utilizado sin riesgos de contaminación para las personas o el medioambiente, se envasa en recipientes herméticos de doble pared de acero inoxidable, a prueba de pérdidas y de corrosión, llamados fuentes selladas. Se fabrican dos tipos de fuentes, para uso en radioterapia y para uso industrial.

En nuestro país hay dos plantas semi-industriales de irradiación con rayos gamma de ^{60}Co , una de ellas en el Centro Atómico de Ezeiza (CAE-CNEA) y otra privada IONIX en la localidad de Talar de Pacheco, Provincia de Buenos Aires. En ambas se irradian diferentes productos comerciales (alimentos, elementos de cosmética, envases para remedios etc.) para su esterilización.

AIII.4. Tratamiento con radiación gamma de ^{60}Co de materiales poliméricos en estado sólido.

Los polímeros están constituidos por moléculas de alto peso molecular, que al ser expuestas a radiaciones de alta energía pueden sufrir los siguientes cambios químicos:

- Entrecruzamiento: la formación de enlaces intermoleculares permite un incremento de la masa molar. (Güven et al., 1999; Raz & Katus̃, 2008)
- Degradación: la escisión de cadenas disminuye la masa molar significativamente. (Nagasawa et al., 2000; Lee et al., 2003; Wasikiewicz et al., 2005)

- Formación de gases: evolución de productos gaseosos como H₂, CH₄, CO que implican una modificación de los grupos funcionales dentro de la macromolécula.
- Cambios en la insaturación de las moléculas.
- Ciclación: formación de enlaces intramoleculares
- Oxidación: Cuando la irradiación se produce en presencia de oxígeno puede generar la formación de especies oxidadas.

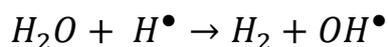
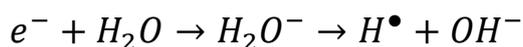
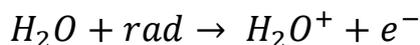
Finalmente el polímero puede ser resistente a la radiación no presentando de manera significativa ninguno de los cambios anteriormente mencionados (Filho et al., 2010).

AIII.5 Cambios inducidos en polímeros irradiados en solución acuosa

En primer lugar, la radiación incidente sobre las moléculas de agua puede ionizarlas de tal manera que se forma un ion H₂O⁺ y un electrón libre. A este electrón se le llama electrón acuoso pues es muy lento dentro del sistema, ya que casi toda la energía se ha invertido en arrancarlo de la molécula.

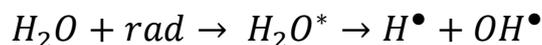
El ion H₂O⁺ es muy inestable y rápidamente se descompone en un H⁺ y en un radical OH[•]. El electrón acuoso, puede reaccionar con otras moléculas orgánicas o con una segunda molécula de agua produciendo radicales H[•] e iones hidroxilo OH⁻.

Los radicales H[•] y OH[•] con gran reactividad química, pues tienen un electrón desapareado, tenderán a crear enlaces y quitar así átomos a otras moléculas del sistema irradiado.



Los iones hidroxilo y los protones libres, por tener cargas opuestas, tenderán a atraerse neutralizándose y formando de nuevo agua.

Existe también la posibilidad más directa de formar los radicales libres por la excitación de las moléculas de agua, inducida a partir de la radiación de alta energía. Teóricamente es posible que por este proceso se produzca la disociación del agua en radicales H^\bullet y OH^\bullet .

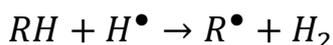
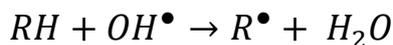


De una manera u otra se forman radicales que poseen electrones desapareados, lo que los hace altamente reactivos, bien como agentes oxidantes o reductores.

Los radicales se distribuyen a lo largo de la trayectoria de la radiación, dependiendo de la transferencia lineal de energía de la misma. Una buena parte de ellos se pierden en reacciones neutralizadoras combinándose de la siguiente forma.



Pero otros se propagan pudiendo interactuar con otras moléculas presentes en el sistema irradiado y generan nuevos radicales en la molécula:



Cuando se irradian soluciones acuosas de polímeros, se produce la radiólisis del agua y también se forman intermediarios reactivos en las macromoléculas. Esto proviene de la acción directa de la radiación en el polímero o de forma indirecta por la reacción con los intermediarios generados en el agua. En soluciones diluidas o moderadamente concentradas, prevalece el efecto indirecto con intermediarios del agua.

Entre las especies reactivas, el OH^\bullet tiene una mayor velocidad de reacción y reacciona abstrayendo un hidrógeno del polímero generando macroradicales. Dado que estos OH^\bullet arrancan hidrógenos en diferentes posiciones, esto genera varios tipos de radicales, algunos centrados en átomos de carbono, y en otros casos oxi-radicales cuando arranca los hidrógenos unidos a átomos de oxígeno. La reacción de estos oxi-radicales puede generar la ruptura de las cadenas poliméricas.

Los radicales poliméricos centrados en átomos de carbono son importantes en la formación de entrecruzamientos de cadenas (crosslinks) y por lo tanto en la formación de hidrogeles. En aquellos casos en que, por el contrario, se producen reacciones de escisión de cadenas, estas se pueden producir en la cadena principal cuando el radical se ubica allí, o bien el corte de las cadenas laterales si se sitúa en esas cadenas.

Desde el punto de vista de la química de las radiaciones la formación de entrecruzamientos radioinducidos en los polímeros, junto con la formación de hidrogeles es una de las aplicaciones de mayor suceso en el mundo.

La producción de entrecruzamientos intermoleculares, es decir la unión de cadenas vecinas, depende de varios factores, entre ellos de la movilidad de los macroradicales, la concentración de polímero en la solución y también de la velocidad de dosis. Para muy altas velocidades de dosis, tal como aquella de los aceleradores de electrones (EB), se genera una enorme cantidad de radicales simultáneos en la solución, tal que la probabilidad de recombinación entre los mismos es muy alta. Por el contrario la formación de enlaces intermoleculares se ve reducida y la formación de hidrogeles también.

La combinación de una mayor concentración de polímero en el sistema a irradiar junto con una menor velocidad de dosis, resulta muy conveniente para la producción de hidrogeles con buena eficiencia (Rosiak y Ulan, 1999).

AIII.6. Referencias

Abd El-Mohdy, H. L. and Safrany, A. (2008). *Radiation Physics and Chemistry*. **77**, 273–279.

Filho, A. A. M. F., Schettini, A. R. A., and Gomes, A. S. (2010). *XII International Macromolecular Colloquium*, pp. 3–5.

Grasselli, M., Britos, C. N., Carbajal, M. L., Hidalgo, R., Soto Espinoza, S., Quiroga, F., Trelles, J. A., and Smolko, E. E. (2009). *V Argentine-Chilean Polymer Symposium - ARCHIPOL '09*.

Güven, O., Sen, M., Karadag, E., and Sarayd, D. (1999). *Radiation Physics and Chemistry*. **56**, 381–386.

Kumar, V., Chaudhari, C. V, Bhardwaj, Y. K., Goel, N. K., and Sabharwal, S. (2006). *European Polymer Journal*. **42**, 235–246.

- Lee, D. W., Choi, W. S., Byun, M. W., Park, H. J., Yu, Y.-M., and Lee, C. M. (2003). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**, 4819–4823.
- Liu, Q., Zhu, Z., Yang, X., Chen, X., and Song, Y. (2007). *Radiation Physics and Chemistry*. **76**, 707–713.
- Nagasawa, N., Mitomo, H., Yoshii, F., and Kume, T. (2000). *Polymer Degradation and Stability*. **69**, 279–285.
- Raz, D. and Katusˇ, B. (2008). *Radiation Physics and Chemistry*. **77**, 288–344.
- Rosiak, J. M. (1995). *Radiation Physics and Chemistry*. **46**, 161–168.
- Rosiak, J. M. and Ulanski, P. (1999). *Radiation Physics and Chemistry*. **55**, 139–151.
- Wasikiewicz, J. M., Yoshii, F., Nagasawa, N., Wach, R. a., and Mitomo, H. (2005). *Radiation Physics and Chemistry*. **73**, 287–295.

ANEXO IV

CURVAS DE CALIBRADO

En el capítulo 6 se presentaron los perfiles de liberación de atenolol para los hidrogeles seleccionados. La cuantificación del fármaco liberado se realizó a partir de mediciones de absorbancia. En éste anexo se presentan las curvas de calibrado de atenolol y ofloxacina.

AIV. Metodología

En primera instancia se determinó la longitud de onda de trabajo para los dos fármacos utilizados, ofloxacina y atenolol. Una solución patrón de cada uno de ellos se midió en el espectrofotómetro realizando un barrido del espectro de longitudes de onda entre 200 y 800 nm. Determinándose los máximos de absorción en $\lambda = 293$ y $\lambda = 274$ nm para la ofloxacina y el atenolol respectivamente.

Para la realización de las curvas de calibrado, en cada caso se prepararon seis soluciones de concentración creciente a partir de la dilución de una solución inicial. De las recta de Absorbancia en función de la concentración se obtuvo el coeficiente de absortividad molar para cada uno de los principios activos.

Las curvas de calibrado se presentan en las Figuras AIV.1 y AIV.2 para la ofloxacina y el atenolol respectivamente.

Teniendo en cuenta la ley de Lambert-Beer,

$$A = \varepsilon \times b \times C$$

Al presentar las gráficas de Absorbancia (A) en función de la concentración (C) se obtuvo un valor de absortividad molar a partir de la pendiente de la recta. Este valor para la ofloxacina fue $\varepsilon = 32544 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ y para el atenolol fue $\varepsilon = 1272,8 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ considerando que el camino óptico (b) fue igual a 1 cm.

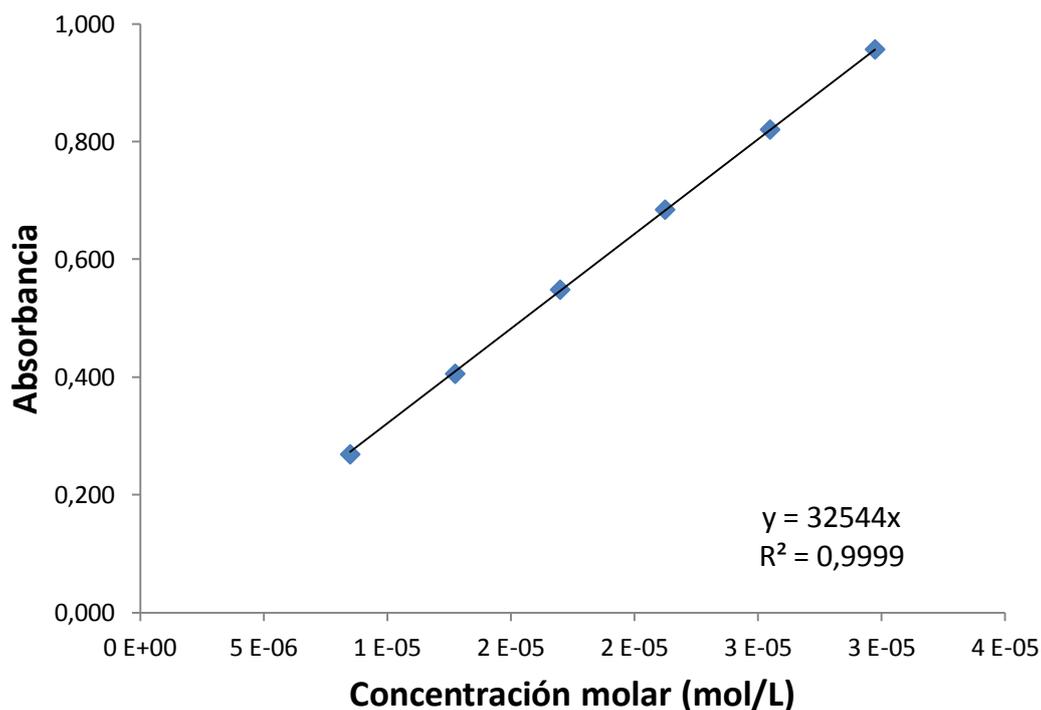


Figura AIV.1. Curva de calibración para ofloxacina a $\lambda = 293$ nm empleando diluciones a partir de una solución inicial de 1 mg/mL. Curva de ajuste: $A = 32544 C$.

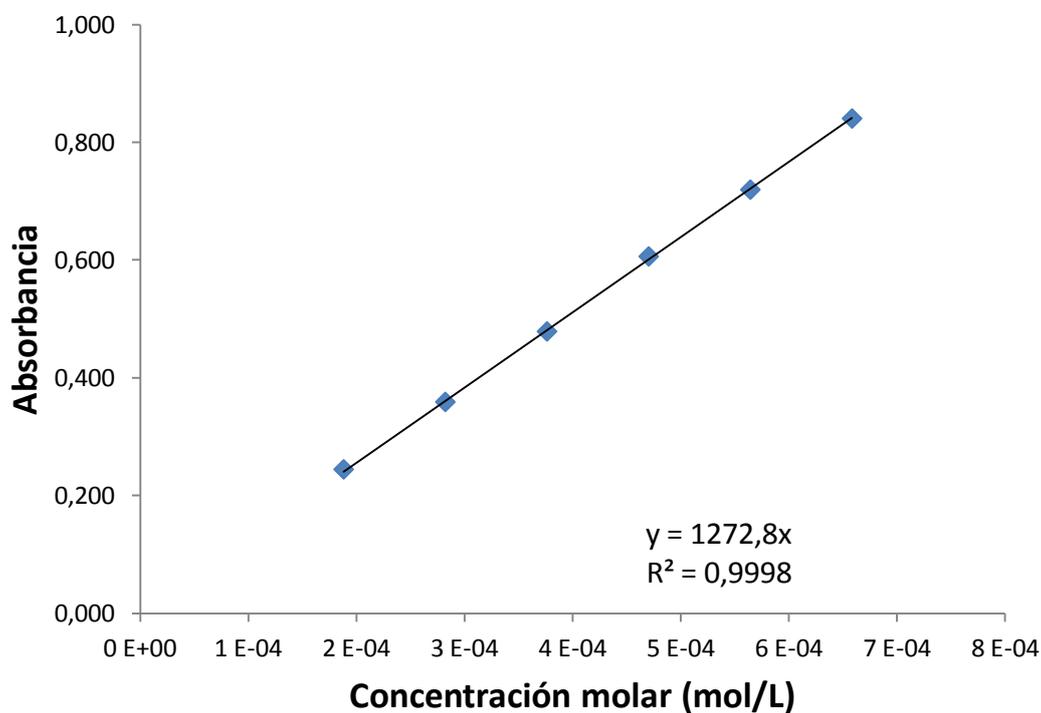


Figura AIV.2. Curva de calibración para atenolol a $\lambda = 274$ nm empleando diluciones a partir de una solución inicial de 5 mg/mL. Curva de ajuste: $A = 1272,8 C$.