

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Orgánica



**SISTEMAS POLIMÉRICOS HIDROFÍLICOS CON
GRUPOS IONIZABLES Y SU APLICACIÓN COMO
BIOMATERIALES**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

María Rosa Aguilar de Armas

Bajo la dirección de los Doctores:

Alberto Gallardo Ruiz
Julio San Román del Barrio

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-1812-4

MARÍA ROSA AGUILAR DE ARMAS

TESIS DOCTORAL

**SISTEMAS POLIMÉRICOS HIDROFÍLICOS CON
GRUPOS IONIZABLES Y SU APLICACIÓN COMO
BIOMATERIALES**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Orgánica



INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

Departamento de Química Macromolecular



Madrid, 2002

MARÍA ROSA AGUILAR DE ARMAS

TESIS DOCTORAL

**SISTEMAS POLIMÉRICOS HIDROFÍLICOS CON
GRUPOS IONIZABLES Y SU APLICACIÓN COMO
BIOMATERIALES**

Directores:

Alberto Gallardo Ruiz

Julio San Román del Barrio

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Orgánica



INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

Departamento de Química Macromolecular



Madrid, 2002

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
 CAPITULO 1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS COPOLIMÉRICOS BASADOS EN AMPS	
1 INTRODUCCIÓN	21
1.1 Introducción a la copolimerización radical.....	21
1.2 Copolimerización con AMPS	23
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
2.1 Reactivos y muestras.....	26
2.1.1 Reactivos.....	26
2.1.1.a Síntesis de THEMA	26
2.1.1.b Síntesis de los polímeros.....	27
2.2 Caracterización general de los sistemas copoliméricos:.....	28
2.2.1 Técnicas espectroscópicas	28
2.2.2 Técnicas cromatográficas.....	28
2.2.3 Métodos térmicos.....	29
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
3.1 Caracterización general de los sistemas copoliméricos	30
3.1.1 Técnicas espectroscópicas	30
3.1.1.a RMN- ¹ H.....	30
3.1.1.b FTIR.....	33
3.1.2 Métodos cromatográficos.....	36
3.1.3 Métodos térmicos.....	38
3.1.3.a Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	38
3.1.3.b Termogravimetría (TGA).....	41
4 BIBLIOGRAFÍA	45

CAPITULO 2. ESTIMACIÓN DE LAS RELACIONES DE REACTIVIDAD DE LOS SISTEMAS COPOLIMÉRICOS CON AMPS POR RMH-¹H “in situ”

1	INTRODUCCIÓN	49
1.1	Modelo terminal de copolimerización	49
1.2	Ecuación diferencial de composición	51
1.3	Ecuación integrada.....	52
1.4	Análisis por RMN- ¹ H <i>in situ</i>	53
2	MATERIALES Y MÉTODOS:	56
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
3.1	Método 1.	63
3.1.1	Cálculo de las elipses de confianza.....	67
3.2	Método 2.	70
4	EVOLUCIÓN DE LA COPOLIMERIZACIÓN CON LA CONVERSIÓN	74
6	BIBLIOGRAFÍA	79

**CAPITULO 3. ESTUDIO DE REACCIONES DE COPOLIMERIZACIÓN
RADICAL POR ELECTROCROMATOGRFÍA CINÉTICA MICELAR (MECK)**

1	Introducción	83
2	Fundamentos de la electroforesis capilar	85
2.1	Equipo de electroforesis capilar	87
2.2	Electroforesis capilar en zona libre (CZE).....	88
2.3	Electrocromatografía cinética micelar (MEKC).....	91
3	Materiales y métodos:	93
3.1	Reactivos y muestras.....	93
3.2	Análisis por MEKC.....	94
3.3	Análisis conductimétrico	95
4	Resultados y discusión:.....	96
4.1	Cinéticas de copolimerización analizadas por MEKC.....	96
4.2	Análisis conductimétrico	102
4.3	Influencia del peso molecular y la composición.....	103
5	BIBLIOGRAFÍA	112

CAPITULO 4. EVALUACIÓN DE LOS COPOLÍMEROS THEMA-AMPS PARA SU APLICACIÓN COMO RECUBRIMIENTOS DE PRÓTESIS VASCULARES DE PEQUEÑO DIÁMETRO

1	INTRODUCCIÓN	115
1.1	Propiedades y mecanismo de acción del Triflusal.....	117
2	MATERIALES Y MÉTODOS:	119
2.1	Medidas de hinchamiento	119
2.2	Estudio de la liberación del fármaco.....	119
2.3	Medidas de ángulo de contacto.....	120
2.4	Recubrimiento de las prótesis	120
2.5	Adhesión plaquetaria	120
2.6	Ensayos de biocompatibilidad <i>in vivo</i>	121
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	122
3.1	Medidas de ángulo de contacto.....	122
3.2	Estudio del hinchamiento y la liberación.....	125
3.3	Adhesión de plaquetas	128
3.4	Compatibilidad <i>in vivo</i> de los implantes copoliméricos	131
3.4.1	Observación macroscópica	132
3.4.2	Observación microscópica.....	133
4	BIBLIOGRAFÍA	136

**CAPITULO 5. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS
POLIELECTROLÍTICOS (PEC) OBTENIDOS CON PLANTILLA (“TEMPLATE
POLYMERIZATION”)**

1	INTRODUCCIÓN	141
1.1	Complejos polielectrolíticos (PEC)	141
2	MATERIALES Y MÉTODOS	144
2.1	Reactivos.....	144
2.2	Interacciones quitosano-monómero AMPS	144
2.3	Síntesis de los complejos polielectrolíticos	144
2.4	Caracterización	145
2.5	Medidas de hinchamiento	145
2.6	Liberación de teofilina del sistema HA-Q	146
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	147
3.1	Interacciones quitosano-monómero AMPS	147
3.2	Caracterización de los PEC.....	148
3.3	Hinchamiento y análisis gravimétrico de los complejos obtenidos con plantilla 151	
3.4	Liberación de teofilina	155
4	BIBLIOGRAFÍA	158

**CAPÍTULO 6. BIOCOMPATIBILIDAD “in vitro” DE LOS COMPLEJOS
POLIELECTROLÍTICOS OBTENIDOS CON PLANTILLA**

1	INTRODUCCIÓN	161
2	MATERIALES Y MÉTODOS	164
2.1	Cultivo celular in vitro	164
2.2	Tests de citotoxicidad	166
2.2.1	Medio de elución.....	166
2.2.2	Ensayo MTT	167
2.2.3	Ensayo Alamar Blue	167
2.2.4	Ensayo Neutral Red	168
2.3	Microscopía.....	168
2.3.1	Microscopía óptica.....	168
2.3.2	Microscopía confocal: Ensayo Vida/Muerte	168
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	170
3.1	Sistema HA-Q.....	170
3.2	Sistema DA-Q.....	171
3.3	Microscopía confocal: Ensayo Vida/Muerte	174
4	BIBLIOGRAFÍA	176

**CAPÍTULO 7. APLICACIÓN DE LA RESONANCIA DE PLASMÓN
SUPERFICIAL (SPR) AL ANÁLISIS DE COMPLEJOS POLIELECTROLÍTICOS
(PEC) Y SU INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS**

1	INTRODUCCIÓN	179
1.1	Teoría de la SPR	182
1.2	Aplicaciones de la SPR.....	184
2	MATERIALES Y MÉTODOS	185
2.1	Reactivos.....	185
2.2	Resonancia de Plasmón.....	185
2.3	Preparación de la muestra	186
2.4	Interacciones polielectrolíticas quitosano-copolímeros.....	186
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	187
3.1	Sistema quitosano-HEMA:AMPS	189
3.2	Sistema quitosano-DMAA:AMPS.....	191
4	BIBLIOGRAFÍA	194
	CONCLUSIONES	199
	APÉNDICE. DESARROLLO DEL PROGRAMA “CONVERSION” PARA LA PREDICCIÓN DE LA EVOLUCIÓN DE LA REACCIÓN DE COPOLIMERIZACIÓN (MODELO TERMINAL) CON LA CONVERSIÓN	203

INTRODUCCIÓN

El término biomaterial puede definirse como “*un material no vivo usado en un dispositivo médico, destinado a interactuar con el sistema biológico*”¹. Esta definición incluye diversos tipos de materiales: metales, cerámicos o polímeros, tanto naturales como sintéticos y se emplean para mejorar o reemplazar las funciones de los tejidos vivos. La condición indispensable para que un material pueda utilizarse con fines biomédicos es que sea biocompatible, es decir, que sea capaz de coexistir con el organismo sin desencadenar un efecto inapropiado o no deseable.

Los biomateriales desempeñan en la actualidad un papel muy importante en la calidad de vida de la población. Los numerosos dispositivos médicos que existen en el mercado, son el resultado de un largo trabajo de investigación y desarrollo de carácter multidisciplinario, involucrando áreas tales como ingeniería de materiales, biología celular, ciencia de biomateriales (interacción material-medio biológico), química macromolecular, biología molecular, ingeniería genética, electrónica, microingeniería, informática o tecnología de adquisición y análisis de datos.

La **Química Macromolecular** es una de las disciplinas que brindan un aporte fundamental para el desarrollo de instrumentos e implantes de alta prestación, ya que permite la obtención de formulaciones que satisfagan los requerimientos necesarios para cada problema concreto, mediante el diseño de propiedades de masa y superficie. Entre los temas de estudio de este campo podemos destacar: la síntesis de polímeros y copolímeros especiales de aplicación en diferentes áreas (Ingeniería de Tejidos, Elementos de Diagnóstico, Farmacia, etc), el desarrollo de modificadores de superficie, la obtención de hidrogeles, la formulación de materiales bioabsorbibles y de sistemas destinados a la liberación controlada de fármacos. La **copolimerización radical** nos ofrece la oportunidad de obtener materiales con propiedades preestablecidas ya que la combinación de monómeros y la disposición de éstos en las cadenas macromoleculares, nos conduce a un número ilimitado de materiales. Las propiedades fisicoquímicas y el comportamiento biológico de los sistemas poliméricos dependen de los monómeros de los que estén hechos² y de las características microestructurales de las cadenas sintetizadas durante el proceso de polimerización³. Por ello, en esta tesis se ha

desarrollado una nueva metodología para determinar dos de los parámetros cinéticos más característicos que definen a un sistema copolimérico que se ajusta al modelo terminal, sus **relaciones de reactividad**⁴. Estos parámetros proporcionan información acerca de la composición media y la distribución estadística de secuencias de monómeros en el sistema copolimérico^{5,6}. Se determinaron mediante la monitorización *in situ* por RMN-¹H de la reacción de copolimerización y el ajuste no lineal por mínimos cuadrados de los datos de composición a la ecuación integrada de copolimerización⁷. Se obtuvieron datos de relaciones de reactividad sin manipulación de la muestra, ni aislamiento del copolímero y en uno o dos experimentos.

Para hacer más sencilla la interpretación de los valores de las relaciones de reactividad, se ha desarrollado un programa en BASIC para la construcción de diagramas tridimensionales que relacionen la composición en alimentación, la conversión y otras variables, como la composición instantánea o promedio en el copolímero, la distribución estadística de secuencias, su longitud media...etc⁸.

Dependiendo de la reactividad de los monómeros, la composición en alimentación y la conversión, se obtienen macromoléculas que difieren significativamente en composición y en ocasiones en compatibilidad, llegando a formar en caso extremo mezclas poliméricas. Por ello es interesante estimar la distribución de composiciones químicas y estudiar en profundidad el proceso de copolimerización de los nuevos sistemas objeto de estudio. Utilizando la electrocromatografía cinética micelar (MEKC) se han estudiado dos de los sistemas copoliméricos sintetizados en esta tesis⁹. La MEKC aprovecha dos factores opuestos en el análisis de las macromoléculas: su carga y su hidrofobicidad, haciéndola muy útil a la hora de estudiar reacciones en las que intervienen especies iónicas. El análisis por MEKC proporcionó una valiosa información acerca de la distribución de composiciones químicas, la evolución con la conversión, así como la formación de especies de bajo peso molecular.

Tradicionalmente se consideraba a un material adecuado para ser usado en contacto con el cuerpo cuando no producía ningún daño ni reacción adversa en el organismo, y en estos casos el material era definido como inerte. Sin embargo, con el tiempo se ha demostrado que todo cuerpo extraño causa alguna reacción en el

organismo. La respuesta biológica desencadenada en presencia de los materiales “inertes” es usualmente inespecífica, se desarrolla a una velocidad lenta y activa un amplio rango de procesos de forma simultánea de consecuencias impredecibles¹⁰. El avance en el conocimiento alcanzado en las diferentes disciplinas involucradas en el campo de los biomateriales, ha llevado a la comunidad científica a la formulación de un nuevo objetivo: *“lograr una segunda generación de biomateriales y dispositivos avanzados en estructura y funcionalidad, que posean la cualidad de interactuar con el medio biológico siendo activos en el sentido fisiológico y correctores de patologías durante periodos extendidos”*.

La mayoría de los materiales poliméricos utilizados actualmente en dispositivos médicos son materiales estándar aplicados no sólo en medicina, sino en otras áreas muy diversas. Los principales polímeros empleados son polietileno de baja densidad (LDPE), policloruro de vinilo (PVC), poliestireno (PS), polietileno de alta densidad (HDPE), polipropileno, poliésteres termorrígidos, poliuretanos (PU), acrílicos, nylon, epoxis y otros (poliacetales, celulósicos, poliésteres termoplásticos, policarbonatos, polisulfonas, siliconas, resinas urea-formaldehído). Todos estos materiales tienen la característica de no haber sido originalmente diseñados para aplicaciones médicas, aunque han demostrado ser clínicamente aceptables. Aunque tienden a desaparecer puesto que se busca desarrollar materiales que interactúen activa y adecuadamente con el medio biológico.

El término biocompatibilidad en ocasiones se confunde con el de citotoxicidad. La prueba de toxicidad implica un primer paso de evaluación para alentar o descartar la utilización de una dada formulación. Una vez se ha comprobado que el material no libera al medio ningún compuesto tóxico, ya sea este último un contaminante constitutivo del material o se genere a través de procesos de biodegradación, su biocompatibilidad recae en otra serie de eventos que pueden ocurrir en la interfase, los cuales se deben conocer y controlar (formación de la cápsula fibrosa, vascularización, inflamación, etc). Resulta claro entonces, que las fronteras del desarrollo de la ciencia e ingeniería de biomateriales están dadas por el entendimiento y el control de las reacciones biológicas generadas en respuesta a la estimulación ejercida por un determinado sustrato. En este sentido, los avances en la química macromolecular permitirán nuevas rutas de síntesis y mayor control de los procesos de polimerización,

que llevan al diseño de biomateriales poliméricos con mayores prestaciones, y un conocimiento más profundo de las relaciones entre la estructura y las propiedades de los mismos. Para lograr una buena prestación del componente o dispositivo final implantable se deben tener en cuenta los requerimientos de la aplicación y llevar a cabo la selección o diseño y desarrollo de los materiales adecuados en cuanto a propiedades, procesabilidad del material para adquirir la forma final, reproducibilidad (tanto del biomaterial como de la pieza), biocompatibilidad y bioestabilidad.

En el campo de la **liberación controlada de principios activos** vemos que la síntesis de macromoléculas ha posibilitado el desarrollo de sofisticados sistemas de liberación controlada, que consiguen mantener la dosis de fármaco dentro del índice terapéutico (es decir, entre los límites de concentración mínima efectiva y concentración mínima tóxica) durante largos periodos de tiempo. Esto conlleva la mayor comodidad del paciente que reduce considerablemente la toma de dosis, la protección del fármaco frente a la metabolización rápida y la disminución de la toxicidad derivada de la sobredosificación. El diseño de nuevos sistemas degradables o no degradables que permitan la liberación de diferentes agentes activos mediante diversos mecanismos, es un tema de investigación de gran interés a nivel mundial en la actualidad.

La aplicación convencional de formulaciones farmacológicas en el organismo humano está supeditada a la solubilidad de las sustancias activas, de tal forma que resulta muy difícil poder alcanzar el nivel óptimo de dosificación para obtener la respuesta farmacológica más adecuada, teniendo que llegar en la mayoría de los casos a soluciones de compromiso. Los **sistemas conjugados** de dosificación controlada **polímero-fármaco** ofrecen una vía apropiada para evitar los problemas inherentes a las sobredosis de las formas de administración convencionales, sobretodo para aquellas sustancias cuyo índice terapéutico es pequeño. Así, es posible diseñar sistemas en los que la dosificación de fármaco activo se ajusta a las curvas que mantienen dosis terapéuticas efectivas durante largos periodos de tiempo, evitando oscilaciones bruscas de concentración y efectos secundarios asociados a la sobredosis. Por otra parte, el tratamiento clínico de una determinada afección se realiza a través de una dosificación generalizada, cuando en muchas ocasiones está localizada en un determinado órgano; en este sentido, podríamos considerar que normalmente se recurre a una invasión desproporcionada del fármaco, cuando sólo es necesaria su acción a nivel local. Por

ello, se trabaja en el diseño de sistemas conjugados polímero-fármaco, capaces de dosificar y dirigir el principio activo a su lugar de acción. La actividad de tales compuestos estará ligada tanto a la naturaleza química de los grupos funcionales, como al carácter macromolecular de las propias sustancias.

Desde el punto de vista estructural, los sistemas poliméricos con actividad farmacológica pueden presentar una estructura química muy variada, aunque pueden clasificarse genéricamente en dos tipos¹¹. El primero, está basado en la unión física de compuestos farmacológicamente activos a matrices poliméricas. La liberación del fármaco en este caso se produce por simple difusión a través de una matriz hinchada, o una membrana semipermeable. Las formulaciones biodegradables hicieron posible el suministro controlado de nuevos antígenos, proteínas y drogas de alto peso molecular, los cuales no podían difundir a través de matrices poliméricas convencionales. En esta memoria, se presentan sistemas de dosificación controlada de teofilina de los complejos polielectrolíticos a base de quitosano y poli(2-hidroxietilmetacrilato -co- ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico) (poli(HEMA-co-AMPS), que ofrecen una gran variedad de cinéticas de liberación. Por otra parte, la degradabilidad enzimática del quitosano, y la solubilidad de las macromoléculas copoliméricas permitirán la eliminación total del sistema del organismo.

El segundo tipo de sistemas con actividad farmacológica, consiste en sistemas que incorporan el principio activo en la propia macromolécula, o unido covalentemente a ella. En estos casos, los enlaces que unen el fármaco al esqueleto macromolecular deben ser hidrolíticamente inestables a pH fisiológico. Pueden ser sintetizados por dos vías diferentes: bien mediante reacciones de polimerización, o bien mediante reacciones de modificación de grupos laterales capaces de reaccionar con algún grupo funcional del propio fármaco. Cuando los compuestos farmacológicamente activos no presentan grupos polimerizables, pueden ser transformados mediante la adición de restos vinílicos o acrílicos, que posteriormente polimerizarán para dar macromoléculas en las que la cadena principal actúa como matriz o soporte.

En general todo fármaco polimérico debe ser soluble y fácil de sintetizar, de peso molecular moderado y estrecha distribución de tamaños moleculares. Debe presentar una estabilidad moderada en los puntos de anclaje del compuesto activo. Y

debe ser compatible con el medio fisiológico e idealmente biodegradable después de cumplir su función.

Desde el punto de vista químico, este tipo de sistemas brindan la posibilidad de combinar en una misma macromolécula diferentes grupos funcionales, que puedan controlar los procesos fisiológicos y bioquímicos a los que estará expuesto el sistema una vez dentro del organismo.

El diseño de este tipo de sistemas de control químico, han constituido una de las principales líneas de investigación desarrolladas en nuestro grupo de trabajo¹²⁻¹⁸ y también ha sido objeto de estudio en esta tesis. Se ha llevado a cabo la síntesis, caracterización y evaluación de un nuevo sistema copolimérico a base de [(2-acetiloxi)-4-trifluorometil]benzoato de metacrililoetilo (THEMA, derivado metacrílico del Triflusal sintetizado en nuestro laboratorio¹⁹), y el ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico (AMPS). El sistema poli(THEMA-*co*-AMPS), incorpora por una parte un fármaco antiagregante plaquetario (Triflusal) unido covalentemente a la cadena macromolecular, y por otra, un monómero que presenta grupos sulfónicos en su cadena lateral, los cuales han sido a su vez descritos como antitrombogénicos²⁰⁻²². Se sintetizaron cuatro formulaciones ricas en THEMA con el fin de obtener materiales insolubles que presentaron actividad en su forma macromolecular (al igual que otros polímeros análogos^{12,14}). Todas ellas desarrollaron una cinética de liberación del principio activo de orden cero, claramente dependiente del pH. Y tras la pérdida del fármaco su esqueleto polimérico se transforma progresivamente en poli(HEMA-*co*-AMPS), soluble y eliminable en medio fisiológico. La buena adhesión y la capacidad para formar películas hacen que las formulaciones sintetizadas pudiesen ser utilizadas con dos funciones simultáneamente: como recubrimientos de prótesis vasculares de pequeño diámetro que mejoren la trombogeneidad de las prótesis y como dispositivos de liberación controlada de fármaco, alternativos a las formas de dosificación tradicionales.

Las **características superficiales de los dispositivos biomédicos** juegan un papel importante en la comprensión de fenómenos y de los mecanismos involucrados en la interacción del biomaterial con el medio biológico. La región superficial de un

material posee una reactividad particular, inevitablemente diferente a la del interior del mismo. Aquellos materiales que no liberan sustancias tóxicas al medio, es decir, aquellos que superan los tests rutinarios de toxicidad, se comunican con el entorno biológico a través de su superficie, el cuerpo “lee” la estructura superficial y responde a ella. Por ello, el control de la superficie de un biomaterial es importante a la hora de diseñar dispositivos en contacto con medios biológicos. Se han estudiado multitud de propiedades, tales como la relación hidrofobicidad/hidrofobicidad, la carga eléctrica de la superficie, la humectabilidad del material, los grupos funcionales específicos, los receptores superficiales, la rugosidad...etc. A pesar de haberse realizado numerosos esfuerzos para correlacionar estas propiedades con el comportamiento del material en el medio biológico, existen muy pocas reglas que lo consigan²³, ya que las reacciones biológicas pueden deberse a la combinación de varias de estas propiedades. Además, se debería prestar atención a otros parámetros superficiales más sutiles como son la distribución de grupos funcionales, la orientación de estos grupos, la distribución superficial de dominios, la movilidad molecular, la contaminación superficial, las trazas de compuestos químicos tóxicos...etc. La superficie de un material exhibe a menudo cierto grado de movilidad, los átomos y moléculas cercanos a la superficie pueden reordenarse en respuesta al medio externo. Así en respuesta a un medio hidrofóbico como el aire, los componentes de menor energía superficial pueden migrar hacia la superficie, mientras que en medio acuoso, la superficie puede reordenar su estructura y los grupos polares interactúan con el medio. Por estos motivos los métodos tradicionales para caracterizar la estructura de los materiales no son adecuados para determinaciones superficiales. La mayoría de los materiales poliméricos empleados en la industria en los últimos 50 años han sido sometidos a diversos tipos de modificación superficial. Existen numerosos métodos físicos, químicos, mecánicos y biológicos para ello. El desarrollo de estos métodos ha permitido nuevas formas de controlar la química superficial. Entre las diversas técnicas empleadas actualmente para modificar las propiedades superficiales de biomateriales se encuentran:

- La modificación de la superficie original mediante el bombardeo de iones, descarga corona en aire, plasma (nitrógeno, argón, oxígeno), radiación gamma o beta, tratamiento de surfactantes pre-adsorbidos con descarga de gas argón, silinización...²⁴ Se trata de uno de los métodos más utilizados para la

modificación superficial de biomateriales poliméricos sin alterar significativamente las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de los mismos²⁵.

- Recubrimientos unidos covalentemente a la superficie utilizando irradiación UVA de biomoléculas pre-adsorbidas conjugadas con fotosensibilizador, ozonización, irradiación con radiación ionizante, injertos empleando plasma frío²⁶... Esta técnica permite sintetizar estructuras macromoleculares superficiales a través de mecanismos de depósito, injerto o funcionalización de superficies.
- Recubrimientos no covalentes sobre la superficie por evaporación de disolventes²⁷, deposición de filmes de monocapas autoensambladas o Langmuir-Blodgett²⁸, aditivos con actividad superficial, deposición de vapores de carbono y metales, etc.

Por lo tanto, la modificación superficial de biomateriales constituye un área de investigación y desarrollo de notable importancia dado que puede mejorar la biocompatibilidad de un material sin alterar sus propiedades en masa. En primer lugar, las propiedades superficiales resultan determinantes en el proceso de adhesión celular ya que influirán directamente sobre la adsorción de proteínas plasmáticas. Este evento ocurre inmediatamente después de que un dispositivo toma contacto con el medio biológico (después de unos segundos)²⁹ y antes de que las células se acerquen al sustrato (después de un minuto aproximadamente)³⁰. Las proteínas por lo general prefieren el ambiente acuoso. Sin embargo, cuando una solución de proteínas se pone en contacto con otra fase tienden a acumularse en la interfase. En una interfase sólida, las proteínas interactúan con la superficie a través de fuerzas electrostáticas, polares e hidrofóbicas. La extensión de este tipo de interacciones depende un elevado número de factores (estructura de la superficie, estructura y concentración de la proteína, tiempo de contacto, temperatura, condiciones de flujo...etc). Las proteínas se adhieren en la superficie del material y sufren cambios conformacionales o incluso se desnaturalizan. Dado que las células responden específicamente a la naturaleza de la película proteica inicial, esta ejerce una función reguladora sobre la posterior reacción del organismo al implante. Por lo tanto, uno de los mayores retos que se le plantean al científico para mejorar la funcionalidad de los biomateriales es controlar la adhesión proteica, bien favoreciendo cierto tipo de conformaciones, bien reduciendo la cantidad de proteínas

sobre la superficie³¹. Se ha demostrado que la adsorción de proteínas transportadoras, como la albúmina, en la superficie de un biomaterial influye notablemente y positivamente en su trombogenicidad, reduciendo el número de plaquetas que se adhieren a su superficie^{32,33}. Sin embargo el fibrinógeno se ha identificado como un mediador de la agregación y adhesión plaquetaria mediante su interacción directa con los receptores GPIIb/IIIa de las plaquetas³⁴. Estas observaciones han provocado el desarrollo de materiales que adsorban preferentemente albúmina sobre su superficie^{35,36}, e incluso la albúmina ha sido inmovilizada sobre superficies poliméricas con el fin de mejorar la trombogenicidad. Sin embargo, estos materiales han demostrado no poseer buena estabilidad a largo plazo³⁷⁻³⁹.

Por otro lado, se han injertado con este fin **hidrogeles poliméricos** en las superficies. Se trata de materiales hidrofílicos entrecruzados, insolubles en agua a temperatura, pH y fuerza iónica fisiológica. Su uso como modificadores de superficies de biomateriales da lugar a una disminución del coeficiente de fricción⁴⁰ y a un control de la adsorción de proteínas específicas o de la adhesión de microorganismos^{41,42}. En este sentido, se han estudiado varios complejos polielectrolíticos obtenidos por interacción directa de macromoléculas con grupos iónicos complementarios, es decir, interacción del quitosano (con grupos amino libres) y copolímeros aniónicos con grupos sulfónicos en su estructura. Así, se trata de combinar las excelentes propiedades del quitosano, con la estructura química hemocompatible de los copolímeros. Estos materiales se sintetizaron con el fin de disminuir, evitar o hacer más selectiva la adsorción de proteínas plasmáticas de superficies que vayan a estar en contacto con medios biológicos.

Los avances tecnológicos de la última década han sido relevantes para interpretar los fenómenos de interacción biomaterial-medio biológico. La morfología y la química superficial de los materiales así como la calidad de las estructuras biológicas adsorbidas o adheridas a las mismas puede investigarse de manera más precisa gracias a la aparición de nuevos métodos de caracterización tales como la resonancia de plasmón superficial (SPR), la microscopía de fuerza atómica (AFM), la microscopía de efecto túnel (STM), espectroscopia electrónica para análisis químico (ESCA)...etc. Por otra parte el desarrollo de la microscopía ambiental de barrido (ESEM) permite la

observación de materiales en el medio en el que desempeñarán su actividad utilizando bajo vacío. De esta manera se buscan los datos necesarios para correlacionar la química y la topografía de cada biomaterial, con los procesos biológicos estimulados. Sobre la base de la observación del orden estructural de sustratos y del reconocimiento de macromoléculas y sitios específicos de reacción que definen una respuesta, será posible en un futuro cercano el diseño de dispositivos de alta prestación con superficies capaces de definir y controlar las reacciones fisiológicas. Nosotros hemos utilizado la Resonancia de Plasmón Superficial con el fin de monitorizar diversos fenómenos que tienen lugar en nuestros sistemas. La técnica registra los cambios que se producen en el índice de refracción en las proximidades de los materiales y los relaciona con la adhesión molecular. En primer lugar, se estudió la formación de algunos complejos polielectrolíticos *in situ*. Y en segundo lugar, se observó la interacción de estos materiales con albúmina y fibrinógeno. De los materiales ensayados observamos que aquellos que poseen N,N-dimetilacrilamida (DMAA) en su estructura son capaces de adherir selectivamente albúmina en su superficie. Mientras que los PEC que incorporan 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA), no adhieren ninguna de las dos proteínas plasmáticas ensayadas.

Finalmente, la Química Macromolecular ha brindado también un gran aporte al desarrollo de sistemas poliméricos biodegradables dirigidos al reemplazo de tejidos dañados (piel, hueso, nervios y vasos sanguíneos). El área de **ingeniería de tejidos** muestra hoy un crecimiento exponencial y existe la perspectiva de que se mantenga este ritmo debido a la utilización de conocimientos y recursos provenientes de otras disciplinas, que también experimentan en la actualidad una evolución acelerada, tales como la ingeniería genética, biología, ciencia de materiales, medicina y electrónica⁴³. Aprovecha los principios de ingeniería de transportes, fenómenos de reacciones superficiales, así como los métodos de análisis aplicados a los complejos procesos biológicos. Para ello, es necesario el conocimiento de la estructura molecular de sustratos y su relación con las reacciones bioquímicas que se producen. Las especies normalmente implicadas en la ingeniería de tejidos son células vivas, así como sus componentes extracelulares que participan en el desarrollo de dispositivos que permitan, estimulen o favorezcan, la reparación o restauración, de un órgano o tejido dañado^{44,45}. La regeneración y sustitución de tejidos no funcionales se desarrollan en

base a estrategias que emplean como medio algún sistema polimérico, ya sea de origen natural o artificial. Las de mayor importancia:

- La sustitución con materiales tanto bioestables como degradables
- La utilización de xenoinjertos obtenidos de tejidos animales, tratados químicamente para estabilizarlos y evitar en lo posible las reacciones inmunológicas propias de cuerpo extraño.
- La encapsulación de células en cámaras de difusión, microcápsulas o sustratos reabsorbibles.
- La aplicación *in situ* de sustancias específicas conocidas como factores de crecimiento, que en combinación con un soporte adecuado pueden utilizarse como sistemas de vectorización y de dosificación controlada en zonas del organismo humano donde son necesarios.

Los materiales polímeros más utilizados en la actualidad con este propósito son: los polímeros de origen natural y sus modificaciones y sistemas poliméricos sintéticos. Nuestro grupo ha desarrollado nuevos sistemas de quitosano modificado por polimerización con ácido acrílico. El sistema polimérico formado es una red interpenetrada de poliácido acrílico en las macromoléculas de quitosano, en las que además se produce la formación de copolímeros de injerto, mediante reacciones de transferencia de las cadenas de poliácido acrílico en las unidades de glucopiranosas repetitivas del propio quitosano⁴⁶. Este tipo de sistemas puede ser utilizado para la formación de soportes biodegradables *in situ* que proporcionen un medio adecuado para la regeneración de tejido blando. Siguiendo esta línea de investigación, hemos diseñado nuevos sistemas en base a quitosano copolímeros del ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico (AMPS) con HEMA sintetizados en presencia del quitosano, que están siendo empleados como canales de guía en estudios preliminares de regeneración de nervio ciático en rata.

En resumen, la síntesis de nuevas estructuras poliméricas constituye el paso inicial necesario para el desarrollo de dispositivos biomédicos de alta prestación. El diseño racional de un biomaterial que formará parte de un sistema implantable o de un dispositivo destinado a una práctica terapéutica o quirúrgica, comienza con la selección de reactivos químicos y método de síntesis adecuado. Finalmente es necesario remarcar

que tanto la calidad fisico-química de las macromoléculas sintetizadas, como el método de fabricación elegido y los parámetros de procesado seleccionados, condicionarán el logro de las propiedades deseadas (en masa y superficie) de los dispositivos producidos.

Esta tesis se centra en el desarrollo y caracterización de nuevos sistemas poliméricos multifuncionales de interés biomédico así como en la aplicación de nuevas metodologías y técnicas instrumentales para su caracterización. Ha sido estructurada en dos partes, la primera (dividida en cuatro capítulos), estudia la síntesis y caracterización de los sistemas copoliméricos por las técnicas convencionales de caracterización de monómeros y polímeros. Aborda el estudio de las relaciones de reactividad de los sistemas copoliméricos mediante RMN- ^1H *in situ*, utilizando una nueva metodología diseñada en nuestro laboratorio⁴. Estudia mediante electrocromatografía cinética micelar (MEKC) la cinética de reacción así como de la distribución de composiciones químicas de los dos sistemas copoliméricos sintetizados con comportamiento más extremo⁹. Y el último evalúa el sistema copolimérico THEMA-AMPS como recubrimiento de prótesis vasculares de pequeño diámetro²⁷.

La segunda parte de la memoria estudia la formación de complejos polielectrolíticos tanto sintetizados con una macromolécula plantilla (“template polymerization”), como por mezcla de macromoléculas con grupos iónicos complementarios. Evalúa la citotoxicidad *in vitro* de algunos de los materiales con posible aplicación como dispositivos de liberación controlada de fármacos, para lo que se utilizaron cultivos primarios de células osteoblásticas. Y la aplicación de una de las formulaciones como estructura de andamiaje para la regeneración de nervio periférico, empleando el nervio ciático de rata como modelo experimental. Por último, estudia la adsorción de proteínas plasmáticas sobre la superficie de los complejos con posible aplicación como recubrimientos vasculares mediante Resonancia de Plasmón Superficial (SPR).

- 1) Williams D.F. *Definitions in Biomaterials-Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials*; Elsevier: New York, 1987.
- 2) Alencar de Queiroz, A. A., Gallardo A., San Román J. *Biomaterials* **2000**, *21*, 1631-1643.
- 3) Van Krevelen D.V. *Properties of Polymers. Their estimation and correlation with chemical structure.*; Ed. Elsevier: Amsterdam, 1990.
- 4) Aguilar M.R., Gallardo A., Fernández M.M., San Román J. *Macromolecules* **2002**.
- 5) Fukuda T., Kubo K., Ma Y.D. *Progress in Polym Sci* **1992**, *17*, 875.
- 6) Szymanski R. *Progress in Polym Sci* **1992**, *17*, 917.
- 7) Mayo F.R., Lewis F. M. *J Am Chem Soc* **1944**, *66*, 1594-1601.
- 8) Gallardo A., Aguilar M. R., Abraham G., San Román J. *Journal of Chemical Education* **2002**, *submitted*.
- 9) Aguilar M.R., Gallardo A., San Román J., Cifuentes A. *Macromolecules* **2002**, *36*.
- 10) Williams D.F. *Concise encyclopedia of medical and dental devices*; 1st Ed ed.; Pergamon Press: Oxford, UK, 1990.
- 11) Baker R. *Controlled Release of Biologically Active Agents*; Wiley Intersci: New York, 1987.
- 12) San Román J., Buján J., Bellón J.M., Gallardo A., Escudero M.C., Jorge E., Álvarez L., Castillo-Olivares J.L. *Journal of Biomedical Materials Research* **1996**, *32*, 19-27.
- 13) Liso P.A., Revuelta M., San Román J., Gallardo A., Villar A.M. *Controlled Release* **1995**, *33* (3), 429-436.
- 14) San Román J., Escudero M. C., Gallardo A., Santa Cruz R., Jorge E., Haro J., Alvarez L., Millán I., Buján J., Bellón J.M., Castillo-Olivares J.L. *Biomaterials* **1994**, *15* (10), 759-765.
- 15) Liso P.A., Revuelta M., San Román J., Gallardo A., Villar A.M. *Polymethacrylic delivery system with NSAID properties*, 1995, pp 469-470.
- 16) Alencar de Queiroz A.A., Gallardo A., San Román, Higa O.Z. *J Biomater Sci Polym Ed* **1995**, *7*(6), 523-530.
- 17) San Román J., Gallardo A., Levenfeld B. *Macromol Symp* **1994**, *84*, 145-158.
- 18) Gallardo A., Fernández F., Cifuentes A., Díez-Masa J.C., Bermejo P., Revuelta M., López-Bravo A., San Román J. *J Controlled Release* **2001**, *72* (1-3), 1-11.

- 19)Rodriguez G., Gallardo A., San Román J., Rebuelta M., Bermejo P., Buján J., Bellón M., Hoduvilla N.G., Escuerdo C. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1999**, *10*, 1-6.
- 20)Keogh J.R., Wolf M. F., Overend M.E., Tang L., Eaton J.W. *Biomaterials* **1996**, *17*, 1987-1994.
- 21)Tamada Y., Murata M., Makino K., Yoshida Y., Yoshida Y., Hayashi Y. *Biomaterials* **1998**, *19*, 745-750.
- 22)Tamada Y., Murata M., Hayashi T., Goto K. *Biomaterials* **2002**, *23*, 1375-1382.
- 23)Ratner B.D., J. A. B., Lenk T.J. *J Biomed Mater Res: Appl Biomat* **1987**, *21*, 59-90.
- 24)Lee J.H., Park J. W., Lee H.B. *Biomaterials* **1991**, *12*, 443-448.
- 25)Abraham G.A., Elvira C., San Román J. *Revista de Plásticos Modernos* **2001**, *81(535)*, 70-80.
- 26)Zhang F., Kang E. T., Neoh K.G., Wang P., Tan K.L. *J Biomed Mater Res* **2001**, *56* (3), 324-332.
- 27)Aguilar M.R., Rodríguez G., Fernández M.M., Gallardo A., San Román J. *J Biomed Mater Sci: Mater Med* **2002**, *13* (12).
- 28)Chen W., McCarthy T. J. *Macromolecules* **1997**, *30*, 78-86.
- 29)Vroman L., Adams A. L., Klings M., Fischer G.C., Muñoz P.C., Solensky R.P. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1977**, *283*, 65-76.
- 30)Baier R.E. *Artificial Organs* **1978**, *2* (4), 422-426.
- 31)Brash J.L. *Role of plasma protein adsorption in the response of blood to foreign surfaces*; Sharma C.P., S. M., Ed.; Technomic: Lancaster , PA, 1991, pp 3-24.
- 32)Mustard J.F., Glynn M. F., Nishizawa E.E., Packham M.A. *Platelet-surface interactions, relationship to thrombosis and haemostasis*, 1967; Vol. 26, pp 106-114.
- 33)Young B.R., Lambrecht L. K., Cooper S.L., Mosher D.F. *Plasma proteins: their role in initiating platelet and fibrin deposition on biomaterials*; Cooper S.L., P. N. A., Ed.; Adv Chem Ser, 1982; Vol. 199, pp 317.
- 34)Horbett T.A. *Cardiovasc Pathol* **1993**, *2*, 137s-148s.
- 35)Alencar de Queiroz A.A., Castro S. C., Higa O.Z. *Journal of Biomaterial Science, Polymer Edition* **1997**, *8* (5), 335-347.
- 36)Tanaka M., Motomura T., Kawada M., Anzai T., Kasori Y., Shiroya T., Shimura K., Onishi M., Mochizuchi A. *Biomaterials* **2000**, *21*, 1471-1481.
- 37)Alencar de Queiroz A.A., Barrak E. R., Gil H.A.C., Higa O.Z. *Journal of Biomaterial Science: Polymer Edition* **1997**, *8* (9), 667-681.

- 38) Joseph G., Sharma C. P. *J Biomed Mater Res* **1987**, 21, 937-945.
- 39) Ryu G.H., Han D. K., Kim Y.H., Min B. *Am Soc Artif Int Org J* **1992**, 38 (3), M644-M648.
- 40) Ratner B.D. *Biomedical applications of hydrogels: review and critical appraisal*; Williams D.F., Ed.; CRC Press: Boca Ratón, Florida, 1981; Vol. 2.
- 41) Ikada Y. *Adv Polym Sci* **1984**, 57, 103-140.
- 42) Amiji M.M., Park K. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **1993**, 4 (3), 217-234.
- 43) Patrick C.W., Mikos A. G., McIntire L.V. *Frontiers in tissue engineering*; 1st ed.; Pergamon, Elsevier Science Ltd: Oxford, Uk, 1998.
- 44) Heineken F.G., Skalak R. *J Biomechanical engineering* **1991**, 113, 111-120.
- 45) Langer J.P., V. *Science* **1993**, 260, 920-926.
- 46) Peniche C., Argüelles-Covas W., Davidenko N., Sastre R., Gallardo A., San Román J. *Biomaterials* **1999**, 20, 1869-1878.

CAPÍTULO 1

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS COPOLIMÉRICOS BASADOS EN AMPS

CAPÍTULO 1: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS COPOLIMÉRICOS BASADOS EN AMPS

1	INTRODUCCIÓN.....	21
1.1	Introducción a la copolimerización radical	21
1.2	Copolimerización con AMPS	23
2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
2.1	Reactivos y muestras	26
2.1.1	Reactivos	26
2.1.1.a	Síntesis de THEMA.....	26
2.1.1.b	Síntesis de los polímeros	27
2.2	Caracterización general de los sistemas copoliméricos:.....	28
2.2.1	Técnicas espectroscópicas	28
2.2.2	Técnicas cromatográficas	28
2.2.3	Métodos térmicos	29
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
3.1	Caracterización general de los sistemas copoliméricos.....	30
3.1.1	Técnicas espectroscópicas	30
3.1.1.a	RMN- ¹ H	30
3.1.1.b	FTIR	33
3.1.2	Métodos cromatográficos	36
3.1.3	Métodos térmicos	38
3.1.3.a	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	38
3.1.3.b	Termogravimetría (TGA)	41
4	BIBLIOGRAFÍA	45

1 INTRODUCCIÓN

La polimerización de monómeros que contienen grupos funcionales activos es sumamente atractiva, por la amplia gama de propiedades que pueden lograrse mediante homopolimerización o copolimerización con otros monómeros adecuados.

Este capítulo describe la copolimerización radical de tres sistemas que incorporan ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico (AMPS) en su estructura, además de 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA), [(2-acetiloxi)-4-trifluorometil]benzoato de metacrililoiloxietilo (THEMA) o N,N-dimetilacrilamida (DMAA). La diferente estructura química de los monómeros y por tanto el diferente comportamiento físico de las moléculas nos permite obtener sistemas con propiedades muy diferentes (desde polímeros solubles hasta insolubles) con la simple variación de los monómeros en la mezcla de reacción.

1.1 Introducción a la copolimerización radical

La polimerización en cadena que se lleva a cabo entre dos monómeros se denomina copolimerización y el producto que se obtiene copolímero. Los dos monómeros se incorporan a la cadena en cantidades que dependen de su reactividad y de la concentración relativa en que se encuentran en la mezcla de reacción. Los métodos de copolimerización nos brindan la oportunidad de obtener materiales con propiedades preestablecidas debido a la amplias posibilidades que han abierto los conocimientos logrados sobre polimerización y sobre la relación estructura-propiedades. La combinación de monómeros existentes y de nueva síntesis, la variación de la cantidad relativa de éstos en el medio de reacción, la disposición de las diferentes unidades bien al azar, alternadas, en bloque o en forma de injerto y los diferentes métodos de procesado, nos conducen a un número ilimitado de materiales que difieren tanto en composición química como en propiedades físicas.

La copolimerización, como medio de obtención de numerosísimas estructuras, es actualmente un proceso estudiado en profundidad en diversos laboratorios del mundo. Por consiguiente, existe un cuerpo de doctrina amplio, si bien, dadas las ilimitadas

posibilidades de reacción, sigue siendo un tema objeto de estudio. Por otra parte, la copolimerización constituye también un camino interesante para el estudio de la reactividad de los monómeros y su relación con la estructura.

Tipos de copolímeros

Un copolímero estadístico posee una distribución de monómeros a lo largo de la cadena copolimérica que sigue una ley estadística, de tal modo que tendremos copolímeros Bernoullianos (o Markov de orden-cero), Markov de primer orden o Markov de segundo orden.

Los copolímeros pueden presentar sus componentes distribuidos al azar formando *copolímeros al azar*:

AAABBABBAABABBBA

Si las estructuras monoméricas se *alternan* dentro de la cadena, se trata de *copolímeros alternantes*:

ABABABABABAB

Si los monómeros se disponen en *largas secuencias* en la misma unidad, los copolímeros se denominan *copolímeros de bloque*:

AAAAAABBBBBB

Por último, existe otro tipo de copolímeros que son productos poliméricos *ramificados* en los que la cadena principal está formada por un único monómero y la cadena lateral por otro monómero de estructura diferente. Son denominados *copolímeros de injerto*.

AAAAAAAAAAAA

B B B
 B B B
 B B B
 B B
 B

Estos dos últimos tipos de copolímeros no pueden sintetizarse mediante copolimerización simultánea de dos monómeros y se obtienen mediante otro tipo de reacciones.

Existe un gran interés tanto académico como industrial en el desarrollo de polímeros funcionalizados entre los que cabe destacar aquellos que poseen grupos iónicos en su estructura. La incorporación de grupos ionizables altera la morfología polimérica y consecuentemente altera sus propiedades físicas y químicas.

1.2 Copolimerización con AMPS

En este trabajo se describe la preparación de copolímeros biocompatibles de AMPS con HEMA, THEMA o DMAA para posibles aplicaciones biomédicas. AMPS es un monómero aniónico, portador de un grupo sulfónico (ácido fuerte) ionizado en prácticamente todo el rango de pHs¹ (Figura 1.1). Fuera del campo biomédico y debido a su carácter altamente hidrofílico (asociado a su carácter iónico) y a su estabilidad hidrolítica, térmica y mecánica, tiene gran interés como componente activo de fibras acrílicas, adhesivos, látex, en el tratamiento de aguas y también en ciertos productos para el cuidado personal como cremas, aceites, etc.

En el área médica presenta una serie de características que le hacen enormemente atractivo: por una parte presenta una excelente capacidad de absorción de agua (sus derivados pueden considerarse en algún caso como superabsorbentes) lo que le hace útil en formulaciones de hidrogeles. Además, puede formar complejos con polielectrolitos catiónicos y tiene propiedades lubricantes², adhesivas³ y es un componente biocompatible⁴. Pero si se debe resaltar una propiedad en este terreno, es la asociada a la naturaleza sulfónica de sus grupos iónicos, la cual es responsable de sus características anticoagulantes por su mimetismo con la heparina⁵ (molécula natural con gran actividad antitrombogénica y portadora de grupos sulfónicos⁶⁻¹⁰).

Por otra parte, tanto los polímeros como los copolímeros de **HEMA** tienen amplias aplicaciones en cirugía y medicina, entre las que cabe destacar: lentes de contacto, cicatrizantes, recubrimientos hemocompatibles, sistemas de liberación de

fármaco, prótesis quirúrgicas, membranas de diálisis, córneas artificiales...etc^{11,12}. Esto se debe a su capacidad para formar hidrogeles biocompatibles con una excelente tolerancia y buena estabilidad^{11,13}. Los materiales en base a **DMAA** han sido sintetizados del mismo modo para aplicaciones biomédicas consiguiendo una extraordinaria biocompatibilidad de los sistemas¹⁴. La copolimerización de estos dos monómeros con AMPS se realizó con la intención de combinar la buena biocompatibilidad de HEMA y DMAA con las propiedades características de los grupos sulfónicos. Estos copolímeros además, fueron diseñados con el fin de formar complejos polielectrolíticos combinándolos con otras macromoléculas que posean grupos iónicos complementarios, como el quitosano, que incorpora grupos amina en su estructura. De este modo pueden obtenerse estructuras entrecruzadas físicamente capaces de responder a cambios de pH y/o a la temperatura, obteniendo sistemas “inteligentes” con gran potencial para ser utilizados como agentes de liberación de fármacos o incluso como sistemas de andamiaje para ingeniería de tejidos.

El [(2-acetiloxi)-4-trifluorometil]benzoato de metacrililoiloxietilo) (**THEMA**), un derivado metacrílico del ácido [(2-acetiloxi)-4-trifluorometil]benzóico (**Triflusal**, comercializado con el nombre de Disgren®), ha sido funcionalizado y polimerizado en nuestro laboratorio con éxito¹⁵⁻¹⁷, formando matrices poliméricas no sólo con actividad farmacológica sino también con propiedades de dosificación controlada de fármaco, capaces de mantener un nivel elevado de medicamento en plasma de forma controlada durante largos periodos de tiempo. En este trabajo, THEMA ha sido copolimerizado con el AMPS con el fin de obtener materiales apropiados para su uso como recubrimientos de prótesis vasculares de pequeño diámetro, conjugando la acción antiagregante de ambas moléculas.

La copolimerización radical de AMPS con HEMA, DMAA o THEMA ha dado lugar a tres series de materiales con propiedades muy diferentes. Existe una diferencia estructural clara asociada a la naturaleza del componente no iónico, HEMA DMAA o THEMA respectivamente. HEMA es más hidrofóbico que DMAA (como lo demuestra el hecho de que su correspondiente homopolímero, poli-HEMA, no es soluble en agua mientras que el poli-DMAA sí lo es). Además, e íntimamente relacionado con lo anterior, la reactividad de las dos parejas de comonómeros es muy diferente, debido a la

naturaleza acrilamida de AMPS y DMAA frente al HEMA que es un metacrilato con mayor reactividad inherente en polimerización radical. Este hecho tiene una gran importancia, tal y como se describe en este trabajo, ya que la distribución de unidades tiende a la formación de bloques en un caso (HEMA-AMPS) mientras que en el otro (DMAA-AMPS) es más aleatoria.

El THEMA es un monómero metacrílico muy hidrofóbico que conduce a materiales insolubles en medios acuosos tras su copolimerización con el AMPS, a fracciones molares altas en THEMA. Su hidrólisis da lugar a la liberación directa del Triflusal y a la transformación progresiva de la matriz polimérica de THEMA-AMPS en HEMA-AMPS, soluble y eliminable por el organismo. El Triflusal es un fármaco antiagregante con acción farmacológica dual: inhibe la producción de Tromboxano A₂ por inhibición de la ciclooxigenasa plaquetaria e incrementa la tasa plaquetaria de AMP_c por inhibición del enzima AMP_c fosfodiesterasa (acción que también presenta su principal metabolito, HTB). Estas características le hacen un candidato excepcional para emplearlo en la síntesis de fármacos poliméricos para el recubrimientos de prótesis vasculares de pequeño diámetro. Además de la caracterización química del sistema THEMA-AMPS se llevó a cabo una exhaustiva evaluación del sistema tanto *in vitro* (medidas de la hidrofilia y energía superficial de los copolímeros, liberación del fármaco a diferentes pH's, estimación de la capacidad antiagregante del sistema...), como *in vivo* (estudio de la biocompatibilidad) para su posible aplicación como recubrimiento de prótesis vasculares y se recoge en el Capítulo 4 de esta memoria.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos y muestras

2.1.1 Reactivos

El ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico, AMPS, fue suministrado por Avocado y utilizado sin purificación previa. La N,N-dimetilacrilamida, DMAA, (Aldrich) se destiló cuidadosamente a presión reducida. El 2-Hidroxietilmetacrilato, HEMA, (Fluka) fue purificado según la literatura¹⁸. El Triflusal fue amablemente cedido por Uriach & Cia. y fue utilizado sin purificación previa. El dioxano (Panreac) se purificó sobre hidróxido potásico (KOH) manteniendo a reflujo durante 24 horas. Después se destiló a presión atmosférica. El éter de dietilo (SDS) se utilizó en su forma comercial sin previa purificación. El 2,2'-Azo-bis-isobutironitrilo (AIBN) se utilizó previa recristalización de metanol; punto de fusión $104 \pm 1^\circ\text{C}$. Los demás reactivos fueron utilizados en su forma comercial por ser extra-puros.

2.1.1.a Síntesis de THEMA

Los copolímeros poli(THEMA-co-AMPS), se obtuvieron mediante polimerización radical en solución del derivado metacrílico del Triflusal (THEMA) con AMPS. La síntesis del derivado de Triflusal se llevó a cabo siguiendo un protocolo de trabajo desarrollado en nuestro laboratorio¹⁷. En primer lugar se prepara el cloruro de ácido y posteriormente se esterifica con el 2-hidroxietilometacrilato (HEMA); el proceso de síntesis se detalla a continuación.

Síntesis del cloruro de ácido

Se llevó a cabo por la reacción de cloruro de tionilo, SOCl_2 , (70 ml), con Triflusal (0,1 moles) en presencia de trietilamina como catalizador a reflujo, durante 4 horas. Posteriormente se procedió a la destilación del cloruro de ácido en exceso que no había reaccionado y a continuación, se destiló el cloruro de ácido a presión reducida (64 % de rendimiento).

Síntesis del derivado metacrílico portador del Triflusal (THEMA)

La esterificación del HEMA con el cloruro de ácido se realizó del siguiente modo: 0,025 moles de HEMA y la trietilamina se disolvieron en éter. A esta solución se le añadió, gota a gota, el cloruro de ácido (0,025 moles) disuelto también en éter. El producto de reacción se mantuvo bajo corriente de nitrógeno y agitación magnética durante 24 horas. El clorhidrato de trietilamina precipitado durante la reacción se eliminó por filtración y el filtrado se lavó con una solución acuosa de hidróxido sódico (5 %) varias veces eliminando la fase acuosa. La fase orgánica se secó con sulfato magnésico anhidro (MgSO_4) y el disolvente se eliminó a vacío hasta pesada constante. (Rendimiento 52 %).

2.1.1.b Síntesis de los polímeros

Se sintetizaron homopolímeros y copolímeros de los sistemas HEMA-AMPS y DMAA-AMPS, a conversión total y en todo el rango de composiciones molares (de 0 a 1). Serán nombrados como HA10, HA30... etc, dependiendo de la composición molar en alimentación en HEMA (Tabla 1.1) o DA10, DA30... etc, dependiendo de su composición molar en DMAA (Tabla 1.2). Los homopolímeros poli(2-hidroxi-etilmetacrilato), poli(N,N-dimetilacrilamida) y poli(ácido 2-acrilamido-2-metilpropano-sulfónico) serán nombrados como PHEMA, PDMAA y PAMPS respectivamente. Estos materiales se obtuvieron por polimerización radical en solución, usando H_2O :isopropanol (50:50) como disolvente, a 50 °C y AIBN como iniciador en concentración $1,5 \times 10^{-2}$ M. Se utilizó isopropanol como disolvente con el fin de obtener copolímeros de peso molecular controlado debido a su baja toxicidad (clasificado por la *Food and Drugs Administration* (FDA) como clase 3)¹⁹ y alta constante de transferencia²⁰. La disolución fue desoxigenada burbujeando nitrógeno durante 30 minutos. La concentración total de monómero fue 0,30 M para el sistema poli(HEMA-co-AMPS) y 0,50 para el sistema poli(DMAA-co-AMPS). Transcurridas 24 horas de reacción, se eliminó el disolvente de las muestras y posteriormente se liofilizaron.

Con el fin de obtener materiales insolubles, apropiados para su aplicación como recubrimientos de prótesis vasculares de pequeño diámetro, se sintetizaron copolímeros portadores de Triflusal que incorporaban grandes cantidades de THEMA en su estructura. Su nomenclatura será a partir de ahora THA60, THA70...etc, dependiendo de la composición molar en alimentación en THEMA (Tabla 1.3). El homopolímero del derivado metacrílico del Triflusal se denominará PTHEMA en este trabajo. Estos materiales se sintetizaron por polimerización radical en solución, utilizando dioxano/agua (90:10) como disolvente, una concentración monomérica de 0,25 M, a 50 °C, durante 48 horas. Se empleó AIBN como iniciador en una concentración de $1,5 \times 10^{-2}$ M. Las mezclas de reacción se desoxigenaron burbujeando nitrógeno (N_2) durante 30 minutos. Los copolímeros sintetizados a conversión total se precipitaron en éter, redisolvieron en la mínima cantidad de agua y liofilizaron. Posteriormente, los sólidos obtenidos se disolvieron en cloroformo y precipitaron en éter. Por último se filtraron y secaron a vacío hasta peso constante.

2.2 Caracterización general de los sistemas copoliméricos:

2.2.1 Técnicas espectroscópicas

Los copolímeros obtenidos de las diferentes mezclas de HEMA-AMPS o DMAA-AMPS se disolvieron en D_2O ó $DMSO-d_6$, dependiendo de su solubilidad, en una concentración de 10 mg ml^{-1} y se realizaron espectros de **RMN-¹H** en un equipo Varian 300-XL trabajando a una frecuencia de 300 MHz. Los espectros de **RMN-¹³C** se registraron en el mismo equipo (Varian 300-XL) trabajando a una frecuencia de 75,5 MHz a partir de soluciones al 100 mg ml^{-1} en D_2O , $DMSO-d_6$ ó metanol deuterado, según el caso y a 40 °C. Los espectros de **IR** de todos los materiales se obtuvieron en pastillas de KBr utilizando un equipo FTIR Perkin-Elmer 1720.

2.2.2 Técnicas cromatográficas

Las medidas de **cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)** se realizaron en dimetilformamida (DMF) con 0,1% (m/v) de LiBr. El sistema estaba formado por una bomba Perkin-Elmer Isocratic LC pump 250, trabajando a un flujo de 1 mL min^{-1} . El sistema se termostató a 70°C con un horno Perkin-Elmer modelo LC OVEN 101. La distribución de pesos moleculares se obtuvo mediante un refractómetro diferencial

Waters 410. Se usaron tres columnas poliestireno-divinilbenceno pl-gel con tamaño de poro nominal de 500, 10^4 y 10^5 Å.

2.2.3 Métodos térmicos

Las medidas de **calorimetría diferencial de barrido (DSC)** se llevaron a cabo en un aparato Perkin-Elmer DSC-7. Se utilizó nitrógeno para purgar la celda de análisis. Las muestras (aproximadamente 12 mg) se cerraron herméticamente en cápsulas de aluminio y se calentaron a una velocidad de $10^\circ\text{C min}^{-1}$. La T_g se definió como el punto de inflexión de la región de transición vítrea. El calibrado de temperaturas se realizó utilizando indio como patrón.

Las medidas de **termogravimetría (TGA)** se realizaron en una termobalanza Perkin-Elmer TGA7. Los experimentos se realizaron bajo flujo de nitrógeno de 50 ml min^{-1} , a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, desde 50 hasta 550°C .

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización general de los sistemas copoliméricos

3.1.1 Técnicas espectroscópicas

3.1.1.a RMN-¹H

Se llevó a cabo el análisis por RMN-¹H de los tres sistemas copoliméricos sintetizados a alta conversión. Sus estructuras químicas se encuentran representadas en la Figura 1.1. Las fracciones molares de los monómeros se encuentran detalladas en las Tablas 1.1, 1.2 y 1.3.

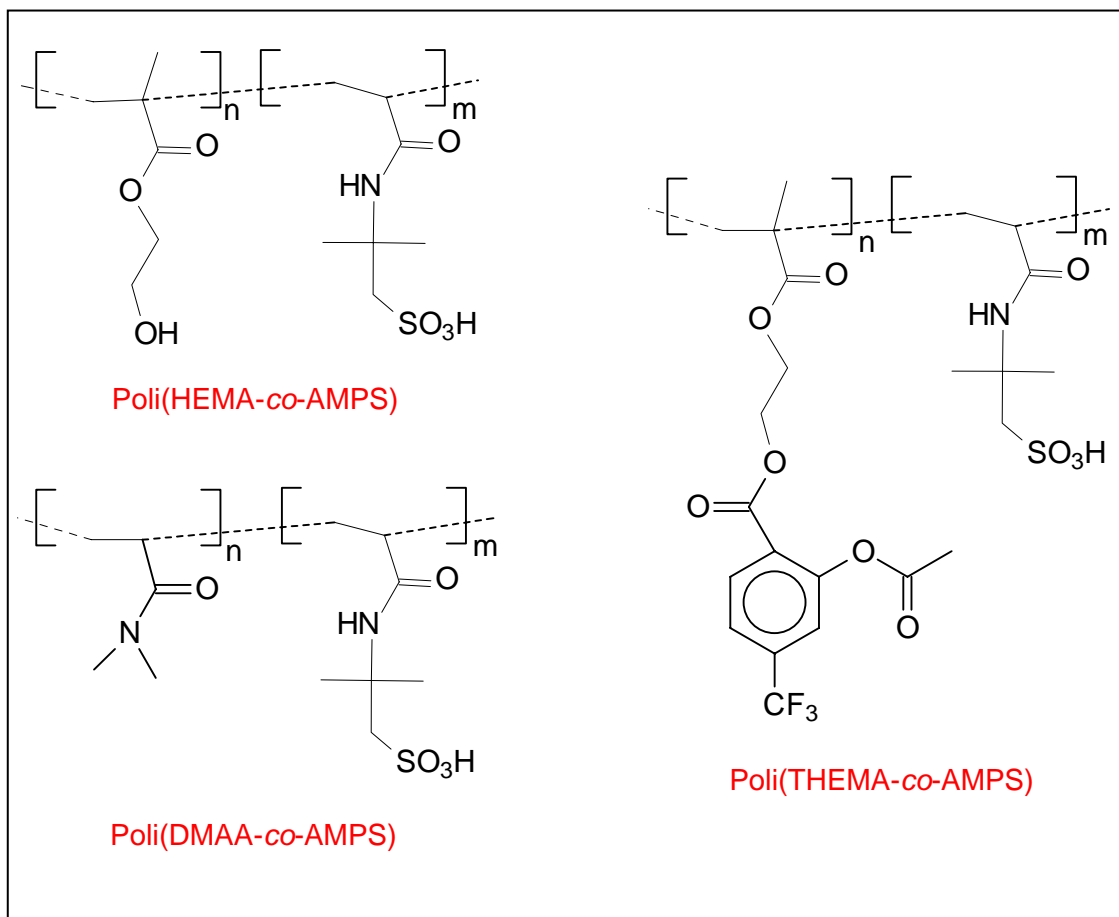


Fig. 1.1: Estructura química de los sistemas copoliméricos estudiados.

En las Figuras 1.2, 1.3 y 1.4 se muestran espectros de RMN-¹H (300 MHz) de un copolímero representativo de cada sistema y la asignación de cada una de las señales a su correspondiente protón o grupo de protones. La composición de cada uno de los copolímeros sintetizados se recoge en las Tablas 1.1, 1.2 y 1.3 y fueron calculadas utilizando la señal A₅ (AMPS) y las H₃ y H₄ (HEMA), para el sistema **HEMA-AMPS**. El cálculo de las composiciones del sistema **DMAA-AMPS** se realizó empleando, por un lado las señales A₅, D₂, D₃ y D₄ y por otro, las del conjunto A₁, A₂, A₃, A₄ y D₁ y con los datos obtenidos se resolvió un sistema de ecuaciones que nos proporcionó la composición molar de los correspondientes copolímeros. Por último, para el sistema **THEMA-AMPS**, se emplearon las señales asignadas para los 3 protones aromáticos del THEMA (T₅, T₆, T₇) y el grupo de señales asignado a los 9 protones del AMPS (A₁, A₂, A₃ y A₄) y 5 correspondientes al monómero portador de Triflusal (T₂ y T₈) (1,6-3 ppm). Se comprobó la ausencia de monómero residual en todas las muestras.

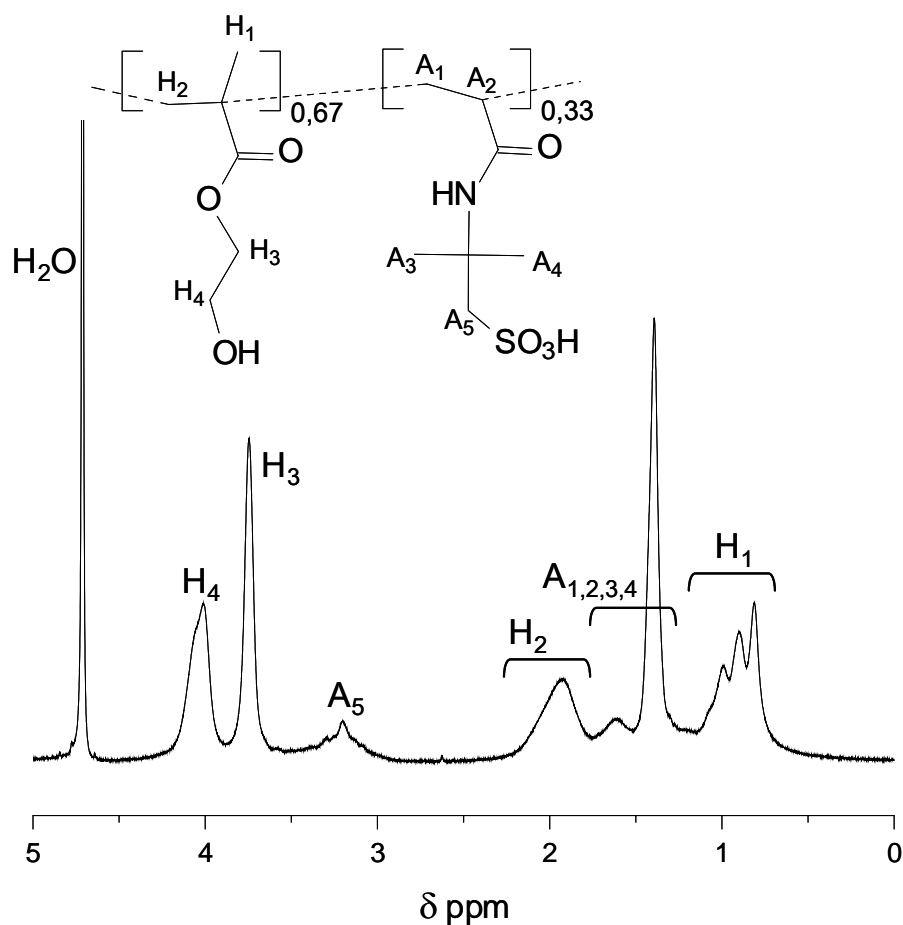


Fig. 1.2: Espectro de RMN-¹H de HA70 registrados en D₂O, a 300 MHz.

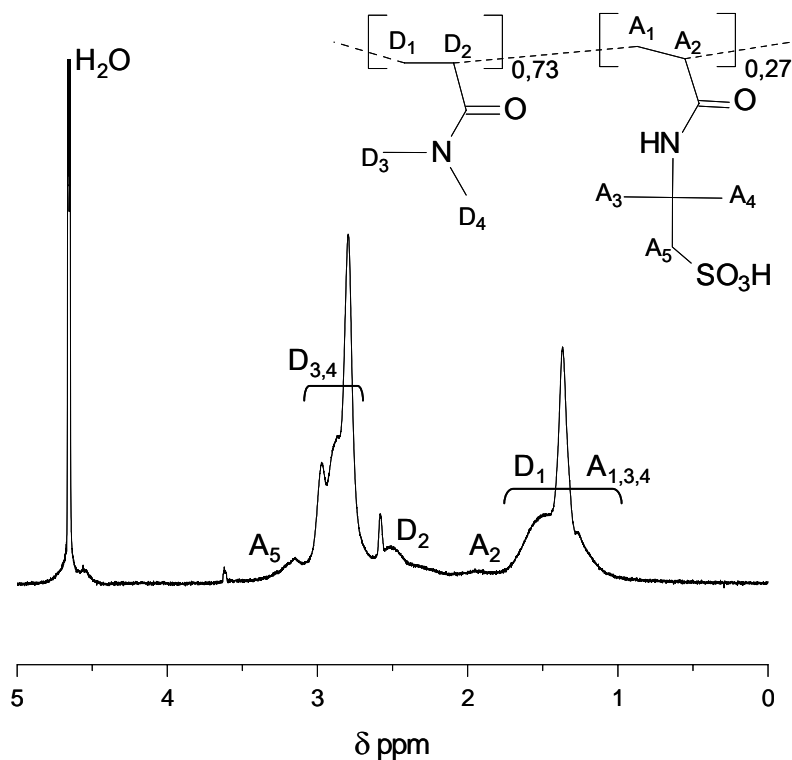


Fig. 1.3: Espectro de RMN- ^1H de DA70 registrados en D_2O , a 300 MHz.

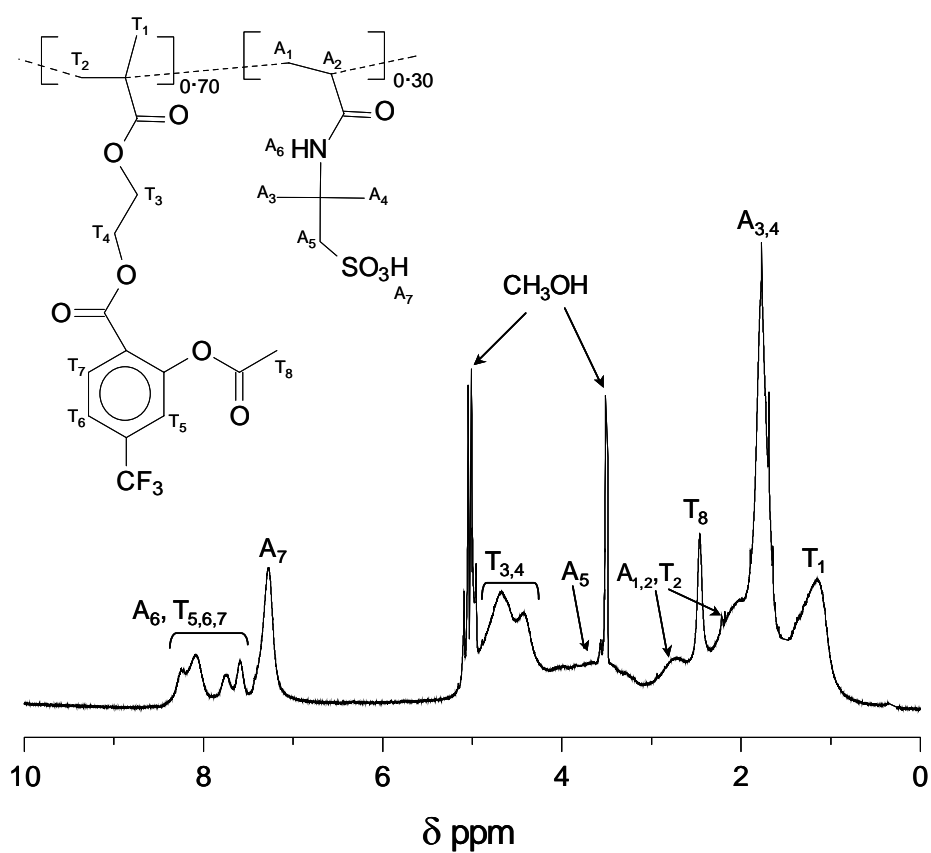


Fig. 1.4: Espectro de RMN- ^1H de THA70 registrados en metanol deuterado, a 300 MHz.

	PHEMA	HA90	HA70	HA50	HA30	HA10	PAMPS
$f_{\text{HEMA alimentación}}$	1	0,90	0,70	0,50	0,30	0,10	0
$F_{\text{HEMA copolímero}}$	1	0,89	0,67	0,47	0,27	0,10	0

Tabla 1.1: Composiciones molares de HEMA en el sistema HEMA-AMPS tanto en alimentación ($f_{\text{HEMA alimentación}}$) como en el copolímero ($F_{\text{HEMA copolímero}}$) sintetizados a conversión total, halladas mediante RMN- ^1H a 300 MHz.

	PDMAA	DA90	DA70	DA50	DA30	DA10	PAMPS
$f_{\text{DMAA alimentación}}$	1	0,90	0,70	0,50	0,30	0,10	0
$F_{\text{DMAA copolímero}}$	1	0,89	0,73	0,52	0,31	0,09	0

Tabla 1.2: Composiciones molares de DMAA en el sistema DMAA-AMPS tanto en alimentación ($f_{\text{DMAA alimentación}}$) como en el copolímero ($F_{\text{DMAA copolímero}}$), sintetizados a conversión total, halladas mediante RMN- ^1H a 300 MHz.

	PHEMA	THA90	THA80	THA70	THA60	PAMPS
$f_{\text{HEMA alimentación}}$	1	0,90	0,80	0,70	0,60	0
$F_{\text{HEMA copolímero}}$	1	0,90	0,81	0,69	0,63	0

Tabla 1.3: Composiciones molares de THEMA en el sistema THEMA-AMPS tanto en alimentación ($f_{\text{HEMA alimentación}}$) como en el copolímero ($F_{\text{HEMA copolímero}}$), sintetizados a conversión total, halladas mediante RMN- ^1H a 300 MHz.

3.1.1.b FTIR

- Sistema HEMA-AMPS

Los espectros de IR correspondientes a los homopolímeros y dos copolímeros representativos sintetizados para este sistema se encuentran detallados en la Figura 1.5 Como puede observarse no se distinguen picos olefínicos $\nu_{\text{C=C}}$ a 1635-1620 indicando la ausencia de monómero residual en las muestras caracterizadas. Las cadenas poliméricas

están formadas por unidades AMPS (ν_{NH} a 3311, $\nu_{\text{C=O}}$ (amida I) a 1650, ν_{CN} y δ_{CNH} (amida II) 1551, $\delta_{\text{C(CH}_3)_2}$ a 1391, ν_{SO_2} a 1224, $\nu_{\text{SO}_3\text{H}}$ a 1021 y $\nu_{\text{S-O}}$ a 617 cm^{-1}) y unidades HEMA (ν_{OH} a 3437, ν_{CH_3} 2943, $\nu_{\text{C=O}}$ a 1721, δ_{CH_3} (metacrilato) a 1452, δ_{COHip} de 1400 a 1000, $\nu_{\text{C-O}}$ 1156 y δ_{COHoop} de 700 a 550 cm^{-1})

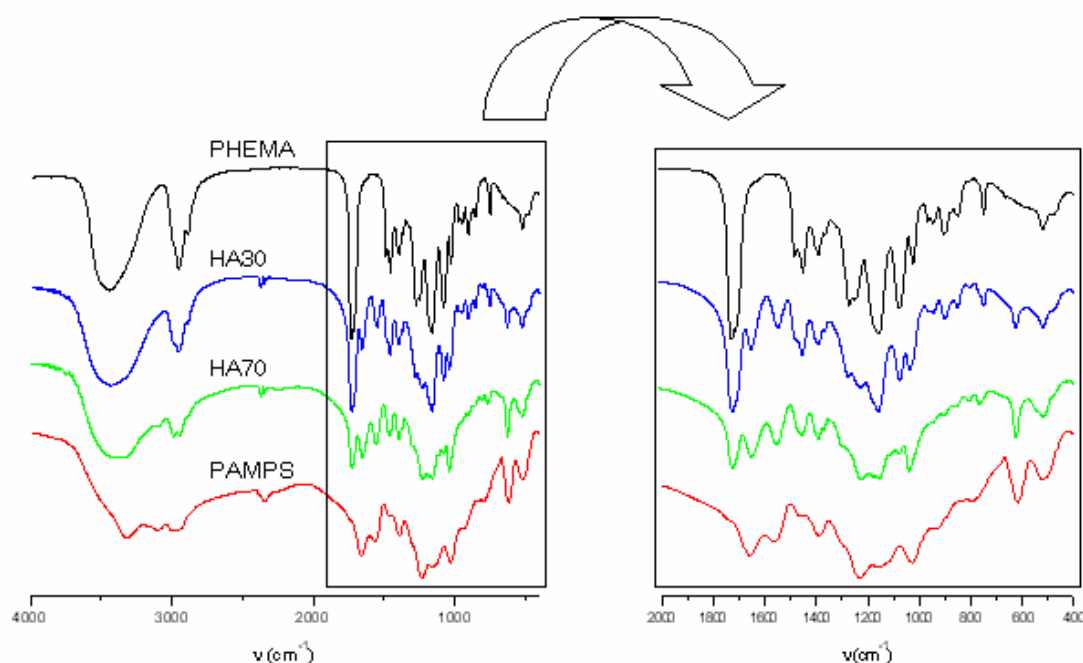


Fig. 1.5: Espectros de FTIR de dos copolímeros representativos del sistema HEMA-AMPS (HA30 y HA70) y de sus correspondientes homopolímeros (PHEMA y PAMPS).

- *Sistema DMAA-AMPS*

Los espectros de IR correspondientes a los homopolímeros y alguno de los copolímeros sintetizados para este sistema se encuentran detallados en la Figura 1.6. En los espectros FTIR no se distinguen picos olefínicos $\nu_{\text{C=C}}$ a 1635-1620 y las cadenas poliméricas están formadas por unidades AMPS (ν_{NH} a 3311, $\nu_{\text{C=O}}$ (amida I) a 1650, ν_{CN} y δ_{CNH} (amida II) 1551, $\delta_{\text{C(CH}_3)_2}$ a 1391, ν_{SO_2} a 1224, $\nu_{\text{SO}_3\text{H}}$ a 1021 y $\nu_{\text{S-O}}$ a 617 cm^{-1})

y unidades DMAA ($\nu_{\text{CH}_{\text{sp}^3}}$ a 2934, $\nu_{\text{C=O}}$ a 1638, $\delta_{\text{CH}_2\text{NC}}$ a 1490, ν_{CN} a 1422, ν_{CNC} a 1267 y δ_{NCO} a 616 cm^{-1})

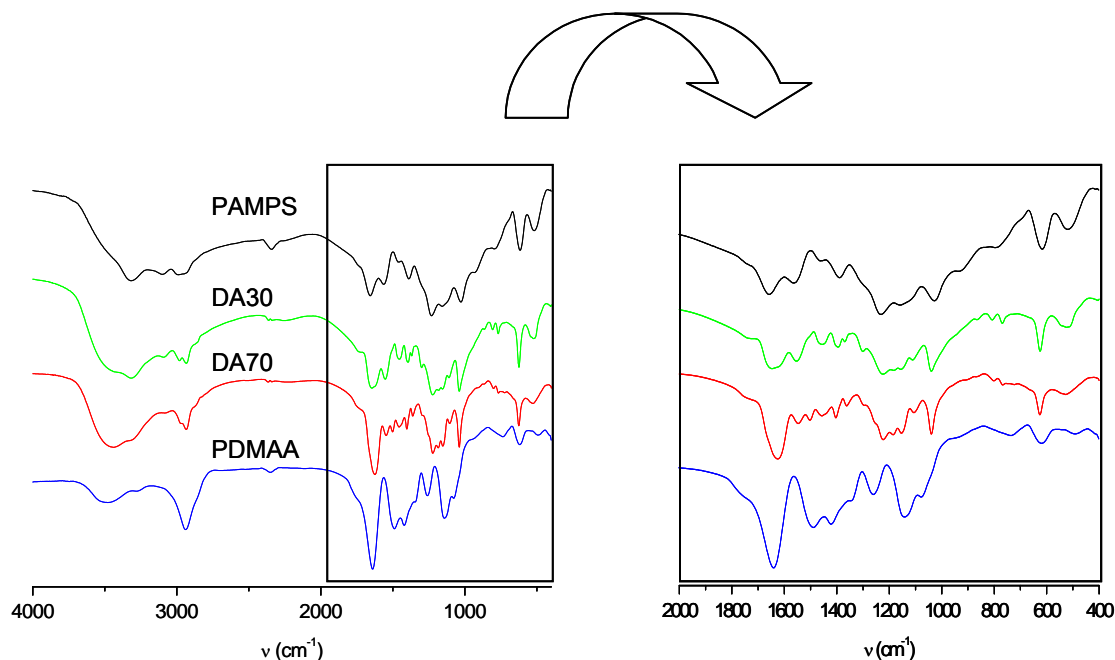


Fig. 1.6: Espectros de FTIR de dos copolímeros representativos del sistema DMAA-AMPS (DA30 y DA70) y de sus correspondientes homopolímeros (PDMAA y PAMPS).

- *Sistema THEMA-AMPS*

Los espectros de IR correspondientes a los homopolímeros y dos copolímeros representativos sintetizados para este sistema se encuentran detallados en la Figura 1.7. Como puede observarse las cadenas poliméricas están formadas por unidades AMPS (ν_{NH} a 3318, $\nu_{\text{C=O}}$ (amida I) a 1687, ν_{CN} y δ_{CNH} (amida II) 1633, δ_{NH} a 1544, δ_{CH_3} a 1455 cm^{-1} , ν_{SO_2} a 1214, $\nu_{\text{SO}_3\text{H}}$ a 1041, $\nu_{\text{S-O}}$ a 624) y unidades TH ($\nu_{\text{C=O}}$ a 1777 y 1731, $\nu_{\text{C-O}}$ a 1700-1550 (1630 y 1584), δ_{CH_3} (metilcetonas) a 1418, $\nu_{\text{C-O}}$ (acetato) 1257, ν_{CF_3} y $\delta_{\text{oop arC-H}}$ 785, 750 y 704 cm^{-1}).

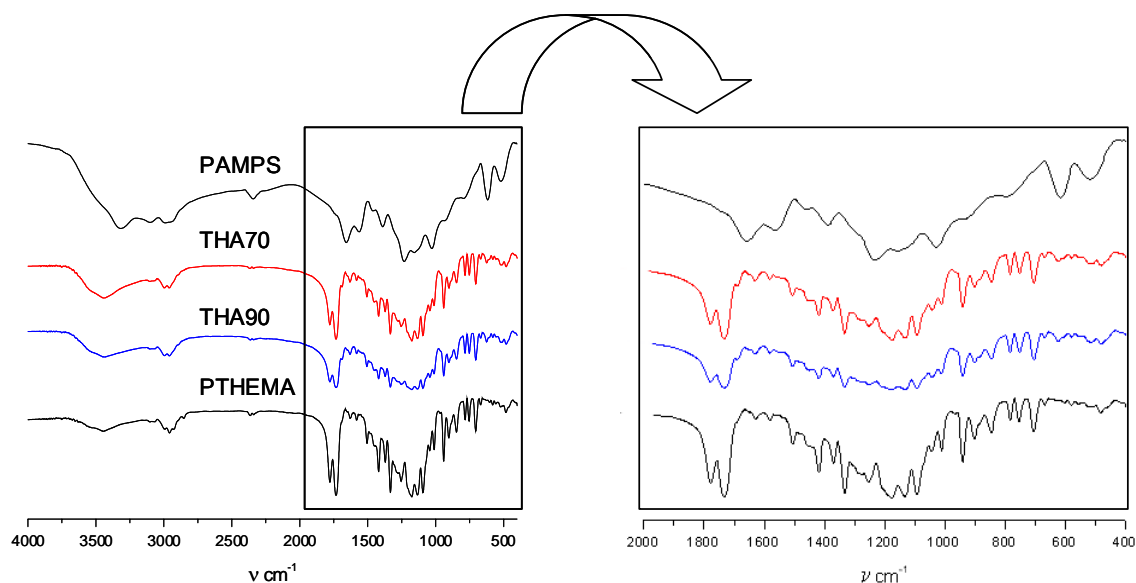


Fig. 1.7: Espectros de FTIR de dos copolímeros representativos del sistema THEMA-AMPS (THA90 y THA70) y de sus correspondientes homopolímeros (PHEMA y PAMPS).

3.1.2 Métodos cromatográficos

Durante el análisis de polielectrolitos por SEC pueden aparecer algunas desviaciones en las medidas debido a interacciones entre el polímero, el disolvente y el material de relleno de la columna. Estas interacciones tienden a aumentar la dispersión y disminuir la resolución.

- *Sistema HEMA-AMPS*

Los cromatogramas de exclusión por tamaño obtenidos para los copolímeros HEMA-AMPS ponen de manifiesto que la polimerización del sistema copolimérico no es homogénea sino que da lugar a una distribución bimodal de especies de diferente tamaño molecular. Se obtiene una población de alto peso molecular, probablemente rica en HEMA y una segunda especie de bajo peso molecular probablemente rica en AMPS (como se discutirá en el capítulo 3 de esta memoria). El índice de polidispersidad de las

dos poblaciones es muy diferente siendo la fracción que eluye a tiempos más cortos (mayor tamaño) más polidispersa que aquella que eluye a mayores tiempos (menor tamaño), cuya curva de distribución de tamaños moleculares es bastante estrecha. En los distintos cromatogramas puede observarse la aparición de picos “no genuinos” a partir de los 18 minutos de análisis. Este perfil de picos, reproducible en todos y cada uno de los cromatogramas, es consecuencia de turbulencias debidas a la inyección de la muestra en el sistema, que quedan registradas en el detector por índice de refracción. Los cromatogramas de exclusión por tamaño registrados en la Figura 1.8, no son una medida exacta de los pesos moleculares de los copolímeros, sino una aproximación de la distribución de pesos moleculares que se forman durante la reacción de copolimerización. Esto se debe a que para el calibrado de los pesos moleculares se emplearon patrones de poliestireno, cuya estructura química es muy diferente a la de los copolímeros sintetizados en este trabajo. Además, la incorporación de grupos iónicos en las cadenas macromoleculares puede provocar fenómenos de adsorción o exclusión en la fase estacionaria y por lo general, obliga a una conformación extendida de las cadenas formando estructuras tipo varilla, de distinto comportamiento hidrodinámico que las estructuras adoptadas por sistemas no polielectrolíticos. Por todo ello hay que considerar estos pesos moleculares como aparentes.

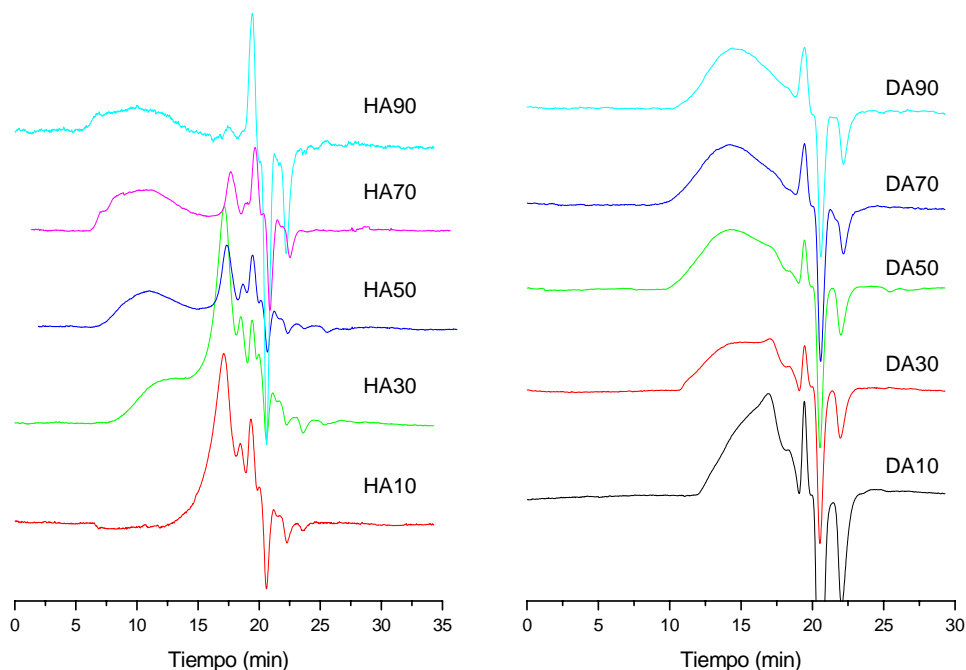


Fig. 1.8: Cromatogramas de exclusión por tamaño de los copolímeros HA y DA

- *Sistema DMAA-AMPS*

Los cromatogramas obtenidos para el sistema DMAA-AMPS (Fig. 1.8) muestran una distribución de pesos moleculares más homogénea. La formación de una distribución bimodal de pesos moleculares se intuye en los gráficos, pero la diferencia entre poblaciones es menos acusada que en el sistema anterior.

3.1.3 Métodos térmicos

3.1.3.a Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

- *Sistema HEMA-AMPS*

Resulta muy difícil determinar la T_g de los copolímeros ricos en AMPS ya que se observa la superposición de esta pseudotransición de primer orden, con una endoterma que aparece inmediatamente después de la T_g . Este pico aumenta a medida que lo hace la concentración de AMPS y puede ser indicativo de una reacción de degradación, i.e. ciclación de las unidades monoméricas. Los termogramas que se representan en la Figura 1.9 confirman que el PAMPS comienza a degradar a 181°C , una temperatura muy próxima a la de su T_g (175°C).

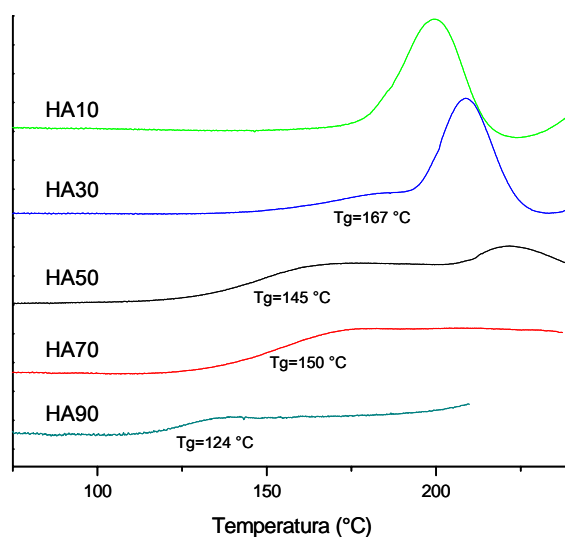


Fig. 1.9: Gráficos de DSC para el sistema HEMA-AMPS.

Por lo tanto, se podría interpretar que para que se produzca la reacción de ciclación es necesario que las cadenas tengan suficiente movilidad, lo que no sucede hasta la transición vítrea. El razonamiento anteriormente expuesto está en buena concordancia con los datos obtenidos por termogravimetría y desarrollados en el siguiente apartado.

- *Sistema DMAA-AMPS*

En los termogramas obtenidos para los copolímeros DMAA:AMPS no se puede distinguir la T_g . Las diferencias en el calor específico que se producen como consecuencia de la T_g en la muestra son muy pequeñas y la sensibilidad del aparato no es suficiente como para distinguir dicha transición.

- *Sistema THEMA-AMPS*

La T_g del homopolímero PHEMA es de 42 °C, próxima a la fisiológica, resultando un valor muy conveniente para su aplicación como recubrimiento de prótesis vasculares. Los copolímeros sintetizados experimentan un progresivo aumento de su T_g a medida que aumenta en sus cadenas macromoleculares el contenido de AMPS, siendo en todos los casos inferior a 100 °C. Sin embargo, el valor de esta T_g sólo puede relacionarse con la rigidez de los polímeros en estado seco y no en las condiciones de aplicación del mismo, es decir, en estado húmedo. Los materiales estudiados presentan un incremento de la hidrofilia y el hinchamiento a medida que se incrementa el contenido de monómero iónico. Esto supone un mayor contenido de agua en la red polimérica y la consiguiente disminución de la T_g en estado hidratado, debido al bien conocido efecto de plastificación que ejercen las moléculas de agua en las cadenas macromoleculares.

La rigidez de los copolímeros poli(THEMA-co-AMPS) depende de su composición media y las T_g s obtenidas se ajustan a la ecuación de Fox (Figura 1.10):

$$\frac{1}{T_g} = W_1 \left[\frac{1}{T_{g1}} - \frac{1}{T_{g2}} \right] + \frac{1}{T_{g2}}$$

siendo T_{g1} y T_{g2} las temperaturas de transición vítreas de los homopolímeros del sistema y T_g la temperatura de transición vítrea del copolímero correspondiente.

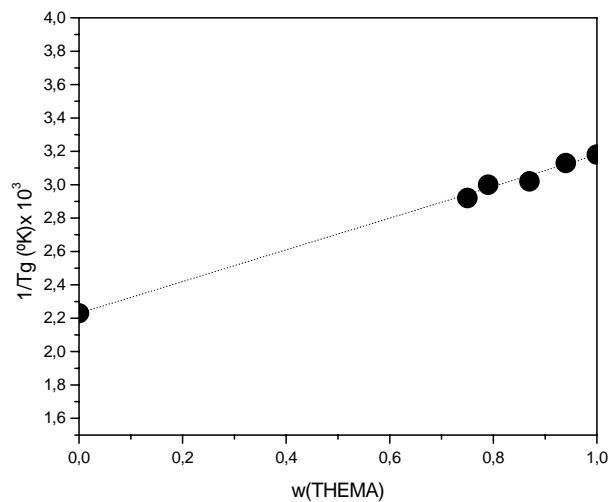


Figura 1.10: Variación del inverso de la T_g en función de la fracción en peso de THEMA del sistema poli(THEMA-co-AMPS).

Según esta ecuación, la contribución de las unidades monoméricas a la flexibilidad de las cadenas es aditiva. Ambos monómeros no interactúan específicamente y contribuyen a los segmentos macromoleculares como componentes aislados. Este hecho está de acuerdo con la tendencia a formar bloques (que se comentará en el Capítulo 2), donde las interacciones entre unidades adyacentes (responsables de las desviaciones de la ecuación de Fox) se minimizan debido a que las diadas AMPS-AMPS y TH-TH son las mayoritarias (Ver Capítulo 2_relaciones de

reactividad); el sistema se comporta desde el punto de vista térmico como una mezcla de homopolímeros.

3.1.3.b Termogravimetría (TGA)

La degradación térmica de las macromoléculas sigue por lo general dos tipos de mecanismos que a menudo coexisten haciendo su interpretación muy complicada:

1. Despolimerización por vía radical u otros mecanismos
2. Reacciones de modificación de polímeros portadores de grupos funcionales laterales mediante la eliminación de compuestos y formando en la cadena nuevos grupos de estructura cíclica y en ocasiones, entrecruzamientos.

Los termogramas obtenidos en este trabajo se realizaron en condiciones no isotermas, a una velocidad de calentamiento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$). En las Figuras 1.11, 1.12 y 1.13 representadas a continuación, se muestran las derivadas de la pérdida de peso en función de la temperatura. De esta forma se observan las variaciones de pendiente en las curvas, y por tanto, se pueden distinguir más fácilmente los cambios en los mecanismos de degradación. Puesto que el mecanismo de degradación de los sistemas HEMA-AMPS y THEMA-AMPS son muy parecidos, se discutirán conjuntamente para después comentar el sistema DMAA-AMPS.

- *Sistema HEMA-AMPS y THEMA-AMPS*

El mecanismo de degradación térmica de compuestos acrílicos y metacrílicos (como el HEMA) es por lo general de tipo 1. A partir de una determinada temperatura el polímero comienza a degradar mediante escisiones de la cadena principal. Sin embargo, el PAMPS degrada según el mecanismo 2 y fue estudiado por Aggour en profundidad²¹⁻²³. El proceso degradativo no implica la rotura aleatoria de la cadena macromolecular, sino la formación de nuevos grupos químicos en la misma. En algunas ocasiones, las causas de degradación de los polímeros que contienen en su estructura

grupos como -NH, -OH ó -Cl hay que buscarlas en la reactividad de estos grupos, que son eliminados de la cadena en forma de H₂O, HCl, NH₃, alcohol, etc. El mecanismo de degradación del PAMPS se describe mediante tres etapas consecutivas. Una primera pérdida de peso (181°C) correspondiente al desprendimiento de amoniaco tras la reacción de imidación entre dos grupos amida adyacentes. Una segunda pérdida de peso (218°C) debida a la degradación los grupos sulfónicos y una tercera etapa de degradación (278°C) debida a la descomposición del esqueleto polimérico y de las imidas formadas durante la primera etapa de degradación.

Los poli(HEMA-*co*-AMPS) son materiales sólidos blancos que durante su degradación térmica se vuelven en primera instancia amarillos y después funden y se expanden mientras que velocidad de degradación disminuye. La formación de espumas y expansión del material durante la degradación térmica es típico de sistemas que liberan moléculas volátiles durante su descomposición. Las moléculas de HEMA y AMPS pueden sufrir ciclaciones formando estructuras imida o anhídridos dependiendo de si se produce entre dos moléculas AMPS o entre una HEMA y otra AMPS.

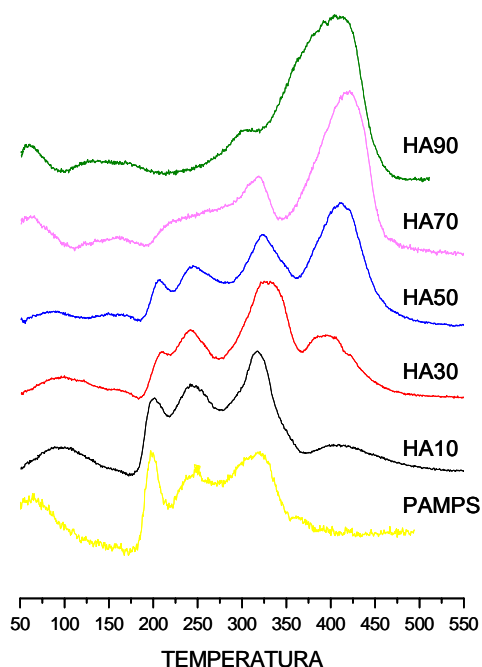


Fig. 1.11: Primera derivada de los termogramas obtenidos por TGA para el sistema HEMA-AMPS.

La degradación térmica del sistema THEMA-AMPS (Figura 1.12) es similar a la del sistema HEMA-AMPS (Figura 1.11). En todos los copolímeros estudiados aparece la etapa de ciclación (140-210°C) correspondiente a la formación de estructuras imida o anhídrido entre dos monómeros adyacentes. Al igual que en sistema HEMA-AMPS, el perfil de degradación corresponde aproximadamente, a la adición de ambas degradaciones lo que está de acuerdo con la tendencia de estos copolímeros a la homopolimerización consecutiva por la gran diferencia que existe en sus relaciones de reactividad (ver Capítulo 2_relaciones de reactividad).

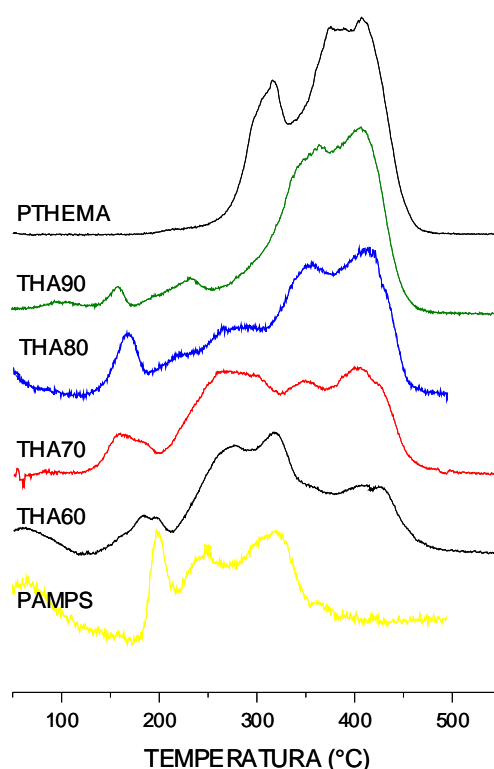


Fig. 1.12: Primera derivada de los termogramas obtenidos por TGA para el sistema THA.

- *Sistema DA*

La degradación térmica del PDMAA sigue un proceso de degradación en bloque por escisión de la cadena principal a partir de los 330°C. La ausencia de hidrógenos reactivos en el grupo amida que puedan reaccionar con unidades de AMPS adyacentes hace imposible la degradación de los poli(DMAA-co-AMPS) mediante un mecanismo de tipo 2, cuando encontramos diadas del tipo AMPS-DMAA. Sólo se producirá ciclación de unidades monoméricas cuando existan dos unidades AMPS juntas, y por

tanto a mayor concentración de AMPS, mayor será la población de diadas AMPS-AMPS contribuyendo a este mecanismo. Por esta razón las composiciones ricas en DMAA no presentan la etapa de ciclación en su termograma (no se observa la aparición del correspondiente pico a 180 °C), como ocurre en el DA90.

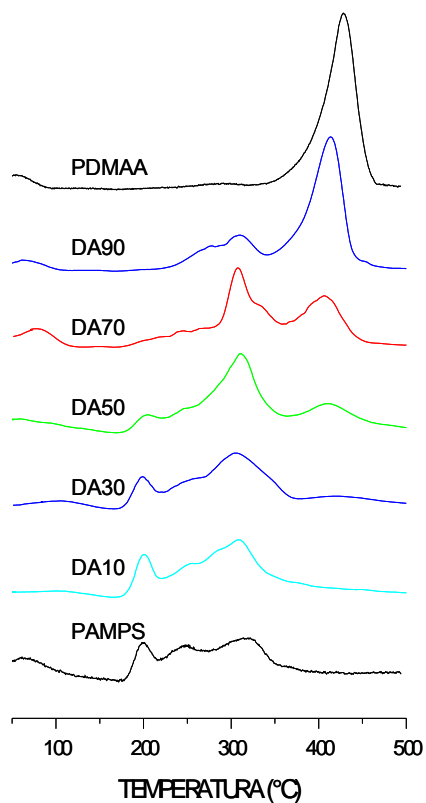


Fig. 1.13: Primera derivada de los termogramas obtenidos por TGA para el sistema DA.

4 BIBLIOGRAFÍA

- 1) Mackles L., Gary H. H. *Lubricant for cosmetics and toiletries*; Bristol-Myers: Canada, 1980.
- 2) Cahalan P.T., Jevne A. H., Coury A.J., Kallcock M.J. *Hydrogel adhesive*; Lifecore Biomedical, Inc.: United States, 1998.
- 3) Quarfoot A.J., Hyla P. H., Patience D. *Hydrogel wound dressing*; The Kendall Company: United States, 1990.
- 4) Coury A.J., Keogh J. R., Hobot C.M., Howland W.W. *Thromboresistant material and articles*; Medtronic Inc: United States, 1994.
- 5) Keogh J.R., Wolf M. F., Overend M.E., Tang L., Eaton J.W. *Biomaterials* **1996**, *17*, 1987-1994.
- 6) Tamada Y., Murata M., Makino K., Yoshida Y., Yoshida Y., Hayashi Y. *Biomaterials* **1998**, *19*, 745-750.
- 7) Tamada Y., Murata M., Hayashi T., Goto K. *Biomaterials* **2002**, *23*, 1375-1382.
- 8) Yui N., Suzuki K., Okano T., Sakurai Y., Ishikawa C., Fujimoto K., Kawaguchi H. *Adsorption behavior of fibrinogen to sulfonated polyethyleneoxide-grafted polyurethane surfaces*; 1st Ed. ed.; Cooper S.L., B. C. H., Tsuruta T., Ed.; VSP: Utrecht, The Netherlands, 1995, pp 237-253.
- 9) Amiji M.M. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* **1998**, *10*, 263-271.
- 10) López G.P., Ratner B. D., Rapoza R.J., Horbett T.A. *Macromolecules* **1993**, *26(13)*, 3252.
- 11) Wichterle O., Lim D. *Nature* **1960**, *165*, 117.
- 12) Montheard J.P., Chatzopoulos M., Chappard D. *Rev Macromol Chem Phys* **1992**, *C32(1)*, 1.
- 13) Alencar de Queiroz A.A., Gallardo A., San Román, Higa O.Z. *J Biomater Sci Polym Ed* **1995**, *7(6)*, 523-530.
- 14) San Román J., Escudero M. C., Gallardo A., Santa Cruz R., Jorge E., Haro J., Alvarez L., Millán I., Buján J., Bellón J.M., Castillo-Olivares J.L. *Biomaterials* **1994**, *15 (10)*, 759-765.
- 15) San Román J., Buján J., Bellón J.M., Gallardo A., Escudero M.C., Jorge E., Álvarez L., Castillo-Olivares J.L. *Journal of Biomedical Materials Research* **1996**, *32*, 19-27.

- 16)Rodriguez G., Gallardo A., San Román J., Rebuelta M., Bermejo P., Buján J., Bellón M., Hoduvilla N.G., Escuerdo C. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1999**, *10*, 1-6.
- 17)Fort R.J., Polyzoidis. T. M. *Eur Polym J* **1976**, *12*, 685-689.
- 18)*Guidance for the Industry Q3C Impurities: Residual Solvents*; US Federal Register, 1997; Vol. 62 FR67377.
- 19)Brandrup J., Immergut E. H., Grulke E.A. *Polymer Handbook*; 4th ed.; Wiley, 1999.
- 20)Aggour Y.A. *Polymer Degradation and Stability* **1994**, *44*, 71-73.
- 21)Aggour Y.A. *Polymer Degradation and Stability* **1994**, *45*, 273-276.
- 22)Aggour Y.A. *Polymer Degradation and Stability* **1998**, *60*, 317-320.

CAPÍTULO 2

***ESTIMACIÓN DE LAS RELACIONES DE
REACTIVIDAD DE LOS SISTEMAS
COPOLIMÉRICOS CON AMPS POR RMH-¹H
“in situ”***

CAPÍTULO 2: ESTIMACIÓN DE LAS RELACIONES DE REACTIVIDAD DE LOS SISTEMAS COPOLIMÉRICOS CON AMPS POR RMN-¹H “*in situ*”

1	INTRODUCCIÓN.....	49
1.1	Modelo terminal de copolimerización.....	49
1.2	Ecuación diferencial de composición.....	51
1.3	Ecuación integrada.....	52
1.4	Análisis por RMN- ¹ H <i>in situ</i>	53
2	MATERIALES Y MÉTODOS:.....	56
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
3.1	Método 1.....	63
3.1.1	Cálculo de las elipses de confianza.....	67
3.2	Método 2.....	70
4	EVOLUCIÓN DE LA COPOLIMERIZACIÓN CON LA CONVERSIÓN.....	74
5	CONCLUSIONES.....	¡Error! Marcador no definido.
6	BIBLIOGRAFÍA.....	79

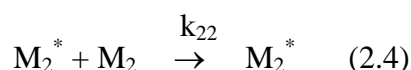
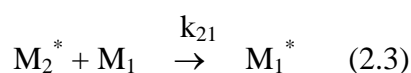
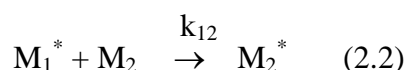
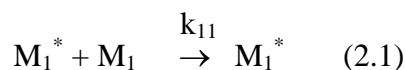
1 INTRODUCCIÓN

Las propiedades fisicoquímicas y el comportamiento biológico de los sistemas poliméricos dependen de las características microestructurales de las cadenas sintetizadas durante el proceso de polimerización¹⁻⁶. La mayoría de las reacciones de copolimerización siguen un perfil cinético que se ajusta al modelo terminal. Se trata del modelo de polimerización más sencillo y fue descrito por Mayo y Lewis en 1944⁷. En este capítulo se muestra la utilidad de la monitorización de reacciones de polimerización por RMN-¹H *in situ* para la determinación de los dos parámetros cinéticos más característicos descritos por este modelo, denominados relaciones de reactividad. Éstas, proporcionan información clara acerca de la composición media y de la distribución estadística de secuencias de monómeros en el sistema copolimérico^{8,9}.

1.1 Modelo terminal de copolimerización

La copolimerización de dos monómeros M₁ y M₂, produce dos tipos de especies en propagación, una con M₁ al final de la cadena en propagación y otra con M₂. El modelo terminal de copolimerización asume que la reactividad de la especie en propagación depende únicamente de la unidad final que porta el centro activo y no de la composición de la cadena que le precede.

Considerando el caso de dos monómeros M₁ y M₂, los dos tipos de especies en propagación serán M₁^{*} y M₂^{*}. Las reacciones de propagación posibles serán:



Siendo k_{11} , k_{12} , k_{21} y k_{22} las constantes cinéticas de cada una de las reacciones de propagación. Se asume que el **estado estacionario** se alcanza rápidamente y la concentración de radicales permanece constante durante toda la reacción. Esto supone, que la velocidad a la que los radicales M_1^* se convierten en M_2^* es igual que la velocidad a la que M_2^* se convierte en M_1^* , de tal forma, que el número de radicales que se forman es igual al número de radicales que se consumen. Por lo tanto, las velocidades de reacción (2.2) y (2.3) son iguales:

$$k_{21} [M_2^*][M_1] = k_{12} [M_1^*][M_2] \quad (2.5)$$

Las velocidades de desaparición de los monómeros serán:

$$-d[M_1]/dt = k_{11}[M_1^*][M_1] + k_{21} [M_2^*][M_1] \quad (2.6)$$

$$-d[M_2]/dt = k_{12}[M_1^*][M_2] + k_{22} [M_2^*][M_2] \quad (2.7)$$

donde se desprecia en buena aproximación el monómero consumido en iniciación. Y dividiendo (2.5) entre (2.6), obtenemos:

$$\frac{d[M_1]}{d[M_2]} = \frac{k_{11}[M_1^*][M_1] + k_{21}[M_2^*][M_1]}{k_{12}[M_1^*][M_2] + k_{22}[M_2^*][M_2]} \quad (2.8)$$

La ecuación anterior se puede reescribir introduciendo las **relaciones de reactividad de los monómeros**, $r_1 = k_{11}/k_{12}$ y $r_2 = k_{22}/k_{21}$, que expresan las reactividades relativas de cada tipo de radical con su propio monómero respecto del otro monómero:

$$\frac{d[M_1]}{d[M_2]} = \frac{[M_1]}{[M_2]} \cdot \frac{r_1[M_1] + [M_2]}{[M_1] + r_2[M_2]} \quad (2.9)$$

Ésta es la **ecuación de composición del copolímero o ecuación de copolimerización**, que expresa la composición instantánea del copolímero en función de las relaciones de reactividad y de la concentración de los monómeros en la alimentación. La ecuación de copolimerización puede expresarse también en función de las fracciones molares, ya que la relación dM_1/dM_2 es la relación F_1/F_2 o fracción molar

instantánea en el copolímero. Considerando que f_1 y f_2 son las fracciones molares de las unidades monoméricas, podemos llegar a la siguiente ecuación:

$$\frac{F_1}{F_2} = \frac{F_1(r_1F_1 + F_2)}{F_2(F_1 + r_2F_2)} \quad (2.10)$$

La estimación de las relaciones de reactividad en reacciones de copolimerización radical es un área de gran interés tanto a nivel académico como industrial. Esto queda reflejado en el gran número de artículos y publicaciones que describen y determinan dichos parámetros para diferentes sistemas copoliméricos.

1.2 Ecuación diferencial de composición

El punto de partida habitual para la estimación de las relaciones de reactividad es la **ecuación diferencial de composición**, (Ecuaciones 2.9 y 2.10). El protocolo más utilizado en este caso consiste en la preparación de copolímeros a baja conversión cubriendo todo el rango de composiciones molares del sistema, de 0 a 1 (se acepta como aproximación que las cadenas formadas a cortos tiempos de reacción cumplen la ecuación de copolimerización). Después de la determinación de las fracciones molares tanto en alimentación como en el copolímero, se pueden aplicar distintos tratamientos que ajusten estos datos a la ecuación diferencial de copolimerización. A partir de parejas f_1/F_1 , los métodos clásicos de determinación de las relaciones de reactividad^{7,10,11} utilizan diferentes linealizaciones de la ecuación instantánea de composición, donde los parámetros r_1 y r_2 (relaciones de reactividad del sistema) son las dos únicas incógnitas y son estimadas mediante la representación gráfica y el ajuste lineal por mínimos cuadrados a dicha ecuación. Sin embargo, estas aproximaciones no son válidas estadísticamente hablando, ya que la variable independiente contiene errores, y la dependiente no posee una varianza constante. Estas dos condiciones son necesarias para llevar a cabo un ajuste lineal por mínimos cuadrados. Como resultado O'Driscoll y Reilly¹² entre otros, han demostrado que la linealización de la ecuación de composición propuesta por Mayo-Lewis no es una aproximación rigurosa y conduce, en ocasiones, a graves errores con intervalos de confianza erróneos.

Por lo tanto, la aplicación de métodos no lineales es la aproximación más correcta a la hora de estimar dichos parámetros y fue propuesto por primera vez por Behnken¹³. A pesar de tratarse de un proceso laborioso, se ha convertido en rutinario con los avances informáticos de los últimos tiempos. Una extensión del tratamiento no lineal es el uso del modelo de “error-in-variables” (EVM), que evalúa correctamente el error en todas las variables. Fue propuesto por Van der Meer et al.¹⁴ y Patino-Leal et al.¹⁵. Este método estadístico tiene en cuenta el error cometido tanto en la variable independiente como en la dependiente, es decir, tanto en la composición en alimentación como la composición en el copolímero respectivamente. Otra forma de estimar valores de relaciones de reactividad mediante ajustes no lineales por mínimos cuadrados o por EVM, ha sido recientemente diseñado por Jenkins^{16,17} y está basado en una modificación del esquema Q-e clásico.

1.3 Ecuación integrada

El protocolo de trabajo expuesto anteriormente y empleado por los métodos clásicos, mediante el aislamiento de muestras a baja conversión, es tedioso y posee errores y problemas intrínsecos ineludibles. En ocasiones se arrastran restos de monómero residual y disolventes durante el aislamiento del polímero o se fraccionan las muestras del copolímero. Además, el copolímero obtenido no corresponde al formado instantáneamente con la composición inicial en alimentación, sino que se trata del promedio de copolímeros formados hasta que la copolimerización se para a baja conversión. A pesar de que esta aproximación está ampliamente aceptada, conlleva un inevitable error y es especialmente acusado en el caso de parejas con muy diferentes relaciones de reactividad, donde la composición del copolímero es muy diferente de la composición en la alimentación. La utilización de la ecuación integrada no conlleva esta limitación y puede ser utilizada para conversiones mayores del 15-20%, ya que tiene en cuenta la variación de composición^{12,18}.

$$\frac{[M_2]}{[M_{20}]} = \left[\frac{[M_{20}][M_1]}{[M_{10}][M_2]} \right]^{\frac{r_2}{1-r_2}} \left[\frac{(r_1-1)([M_1]/[M_2]) - r_2 + 1}{(r_1-1)([M_{10}]/[M_{20}]) - r_2 - 1} \right]^{\frac{r_1 r_2 - 1}{(1-r_1)(1-r_2)}} \quad (2.11)$$

Su forma más utilizada es la aproximación de Skeist, desarrollada en 1946, que relaciona la composición del copolímero con la conversión.

$$1 - \frac{M}{M_0} = 1 - \left[\frac{f_1}{(f_1)_0} \right]^\alpha \left[\frac{f_2}{(f_2)_0} \right]^\beta \left[\frac{(f_1)_0 - \delta}{f_1 - \delta} \right]^\gamma \quad (2.12)$$

siendo:

$$\alpha = \frac{r_2}{(1-r_2)} \quad \beta = \frac{r_1}{(1-r_1)} \quad \gamma = \frac{(1-r_1r_2)}{(1-r_1)(1-r_2)} \quad \delta = \frac{(1-r_2)}{(2-r_1-r_2)}$$

Mao y Huglin¹⁹ entre otros, han propuesto nuevos métodos lineales y no lineales para la estimación de las relaciones de reactividad mediante la ecuación integrada. Los métodos lineales proporcionan buenas aproximaciones para algunos casos, aunque fueron más fiables a la hora de estimar estos parámetros los métodos no lineales.

En este capítulo se ha utilizado un ajuste no lineal por mínimos cuadrados a la solución exacta de la ecuación integrada de copolimerización (Ec.2.11) de datos de composición instantánea obtenidos por RMN-¹H *in situ*.

1.4 Análisis por RMN-¹H *in situ*

La determinación de las relaciones de reactividad con pequeños intervalos de confianza requiere técnicas analíticas sensibles, la cuidadosa planificación de los experimentos y el uso de métodos estadísticos de validación.

La composición del copolímero puede determinarse de dos formas: **indirectamente**, midiendo la concentración de los monómeros que no han reaccionado y haciendo balances de materia para calcular la fracción molar de monómeros en el copolímero acumulado, o bien **directamente**, midiendo la composición del copolímero formado. En cualquiera de los dos casos es necesaria la separación de monómeros y copolímero, ya que ambos poseen prácticamente los mismos grupos funcionales. La concentración de monómeros se mide por lo general mediante cromatografía de gases (CG) o cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Por otro lado, la determinación de composición en el copolímero (mediante espectroscopia de infrarrojo (IR), ultravioleta (UV) o resonancia magnética nuclear (RMN) entre otras) es menos

precisa por la complejidad de los espectros, pero es necesaria cuando existen reacciones secundarias que consumen significativas cantidades de monómero.

Recientemente, varias escuelas han propuesto el uso de la espectroscopía de la resonancia magnética nuclear, RMN, para el análisis directo del medio de reacción de diferentes sistemas de copolimerización. Ito y colaboradores han descrito el análisis *in situ* de reacciones de copolimerización radical por RMN^{20,21} y llevaron a cabo un riguroso estudio de la cinética de reacción, incluyendo la determinación de las relaciones de reactividad y la simulación de la reacción utilizando estos valores. Koole y Kruff²² estudiaron la reacción de copolimerización radical de nuevos ésteres metacrílicos que contenían grupos yodobenzoilo con metacrilato de metilo y 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA). Más recientemente, Mc Brierty y colaboradores^{23,24} han propuesto un interesante y elegante método basado en RMN-¹H y FTIR para la monitorización de la dinámica de curado de formulaciones acrílicas y vinílicas activadas por radiación UV. Los resultados obtenidos del análisis de los espectros de protón de mezclas de HEMA, *N*-vinilpirrolidona y 4 ó 5-*t*-butil-2-hidroxiciclohexilmetacrilato al cabo de distintos tiempos de irradiación permiten determinar la fracción estos componentes en función del grado de conversión. La comparación de los datos experimentales obtenidos por los espectros de RMN con la simulación estadística asistida por ordenador a partir de los parámetros Q-e fue excelente en todo el intervalo de conversión, demostrando la validez del método para el estudio de sistemas de polimerización complejos aunque existan reacciones de entrecruzamiento.

En este capítulo proponemos una simple y novedosa metodología para la estimación de las relaciones de reactividad de los sistemas poli(HEMA-*co*-AMPS), poli(DMAA-*co*-AMPS) y poli(HEMA-*co*-AMPS). El método utiliza la solución integrada exacta de la ecuación diferencial de copolimerización definida para el modelo terminal, para ajustar directamente la evolución de las concentraciones de monómeros obtenidas por análisis cuantitativo de RMN-¹H. Si la reacción se ajusta al modelo terminal, un ajuste no lineal por mínimos cuadrados nos da los valores óptimos de las relaciones de reactividad. Se describen dos aproximaciones diferentes para obtener estos parámetros por este método. El proceso posee varias ventajas sobre el método estándar, ya que al tratarse de una monitorización *in situ*, no es necesaria la manipulación de la

muestra, ni el aislamiento del copolímero y obtiene datos instantáneos de composición en el copolímero a partir del consumo del monómero. Uno de los puntos más polémicos de este trabajo es la influencia del campo magnético sobre las propiedades Q-e del sistema y por lo tanto sobre la reacción de copolimerización²⁵. Sin embargo, el trabajo de Mc Brierty^{23,24} demuestra que esta influencia es muy pequeña. Además, la concordancia entre las relaciones de reactividad obtenidas por este método y las descritas en la literatura demuestran la validez del método. Esta metodología podría aplicarse con otras técnicas no invasivas, tales como FTIR.

2 MATERIALES Y MÉTODOS:

Reactivos

Los reactivos empleados en este capítulo han sido previamente detallados en el Capítulo 1 (Materiales y Métodos_Reactivos).

Copolimerización

La copolimerización **HEMA-AMPS** se llevó a cabo dentro de un equipo de RMN utilizando D₂O como disolvente, a $50 \pm 0,1^\circ\text{C}$ y con persulfato amónico como iniciador en concentración 0,02 M. La disolución fue desoxigenada burbujeando nitrógeno durante 15 minutos. La concentración total de monómero fue 0,30 M y la fracción molar de HEMA en la alimentación 0,50.

Las reacciones de copolimerización **DMAA-AMPS** se realizaron en D₂O a $40 \pm 0,1^\circ\text{C}$, utilizando persulfato amónico como iniciador (0,02 M) y una concentración de monómero total de 0,30 M. Las fracciones molares de DMAA en alimentación fueron 0,75, 0,54 y 0,33.

La determinación de las relaciones de reactividad del sistema **THEMA-AMPS** se llevó a cabo monitorizando la síntesis de los copolímeros en DMSO-d₆, a $50 \pm 0,1^\circ\text{C}$ y AIBN ($1,5 \times 10^{-2}$ M) como iniciador. La concentración de monómeros fue 0,25 M y las fracciones molares de THEMA 0,8 y 0,6.

Con la intención de comprobar la exactitud del método, se sintetizaron muestras a baja conversión (< 5%) para los sistemas HEMA-AMPS y DMAA-AMPS, en las mismas condiciones que las mencionadas anteriormente pero en H₂O y en una estufa termostaticada a la temperatura adecuada. Las fracciones molares en alimentación fueron F_{HEMA} 0,5 y 0,2 y F_{DMAA} 0,75 y 0,2 respectivamente. Transcurrido un corto tiempo de reacción, los frascos se retiraron de la estufa y se precipitaron en un gran

exceso de acetona, se redisolviaron en agua y liofilizaron durante 24h. Posteriormente se caracterizaron por RMN-¹H.

Medidas de los tiempos de relajación T_1

Con el fin de establecer un tiempo de espera entre adquisiciones adecuado para las reacciones más rápidas (DMAA-AMPS y HEMA-AMPS), se calculó el tiempo de relajación spín-red (T_1) de los protones vinílicos, empleados en el cálculo de las concentraciones de los monómeros.

T_1 se determinó empleando una técnica de pulsos inversión-recuperación, en un equipo Bruker 300. El momento macroscópico M se hizo girar a lo largo del eje z , para luego aplicar un segundo pulso de 90°. Si el tiempo entre pulsos (d_1) es menor que T_1 , la componente z de magnetización no habrá tenido tiempo para aumentar hasta el valor del equilibrio M_0 . Por lo tanto, midiendo M_z a diferentes d_1 (en nuestro caso tomamos valores entre 10 y 0,01 segundos), se puede llegar a determinar T_1 .

Análisis por RMN-¹H

Todos los experimentos se llevaron a cabo en un equipo Varian 400. Con el fin de obtener datos cuantitativos, se utilizó una secuencia de pulsos de 7 μ s, equivalentes a un pulso de 90°. Se adquirió un espectro (un punto experimental) cada 60s para los sistemas **HEMA-AMPS** y **DMAA-AMPS**. El tiempo de espera entre espectro y espectro resultó suficiente para permitir la total relajación de los protones vinílicos, cuyos tiempos de relajación, T_1 , nunca superaron los 1,5 s (el tiempo de espera entre pulsos aconsejado, debe ser superior a cinco veces el tiempo de relajación T_1). Para el sistema **THEMA-AMPS** se pudo aplicar un tiempo de espera entre espectro y espectro de 600s (15 min), ya que la velocidad de copolimerización de este sistema copolimérico es significativamente menor. En todas las reacciones la velocidad de giro del tubo fue de 7 Hz y cada espectro se obtuvo mediante una sola adquisición, asegurando de esta forma que los datos obtenidos correspondían a medidas instantáneas de composición/conversión y no a un promedio. La temperatura de las muestras se mantuvo a 40 ó 50 \pm 0,1°C con el controlador de temperatura automático del equipo. Dentro del tubo de RMN se introdujo un capilar de vidrio con una solución de N,N-

dimetilaminopiridina (DMAP, 10 % w/v) en D₂O ó DMSO-d₆ (dependiendo del disolvente empleado en la reacción), que se utilizó como referencia. Las señales se integraron utilizando el programa NUTS (2D Versión 5.097). Las concentraciones instantáneas en alimentación se determinaron del siguiente modo:

Sistema HEMA-AMPS:

$$[HEMA] = \frac{H_1 + H_2}{2R} \quad (2.13)$$

$$[AMPS] = \frac{A_1 + A_2 + A_3}{3R} \quad (2.14)$$

donde H₁ y H₂ corresponden a la contribución de protones metilénicos asignados a HEMA, A₁, A₂ y A₃ son atribuidos a los protones acrílicos del AMPS y R a los picos de referencia (DMAP). Las contribuciones los protones fueron normalizadas para composiciones iniciales en alimentación de [HEMA]=[AMPS]=0,15 mol/L. En la Fig. 2.1 se muestra la estructura química de los monómeros y en la Figura 2.2 los espectros registrados a distintos tiempos de reacción.

Sistema DMAA-AMPS:

$$[DMAA] = \frac{D_1 + D_2}{2R} \quad (2.15)$$

$$[AMPS] = \frac{A_2}{R} \quad (2.16)$$

donde D₁ y D₂ corresponden a las contribuciones de los protones metilénicos de la DMAA (Figuras 2.1 y 2.3). Los valores fueron normalizados utilizando la composición inicial en alimentación.

Sistema THEMA-AMPS:

$$[AMPS] = \frac{[(A_1 + A_2 + T_2) - T_1] + A_3}{3} \quad (2.17)$$

$$[THEMA] = T_1 \quad (2.18)$$

donde T_1 y T_2 corresponden a la contribución de los protones metilénicos del THEMA en la (Figuras 2.1 y 2.4). Como en los dos casos anteriores estos valores se normalizaron respecto de la composición inicial en alimentación.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las reacciones de copolimerización fueron monitorizadas por RMN-¹H. En las Figuras 2.2, 2.3 y 2.4 se muestran varios espectros de los sistemas HEMA-AMPS, DMAA-AMPS y THEMA-AMPS a distintos tiempos de reacción. En la Figura 2.1 se muestra la asignación de los protones empleados para la determinación de las concentraciones de los monómeros tal y como se especificó en la sección de materiales y métodos. La dimetilaminopiridina (DMAP) se utilizó como referencia para el análisis cuantitativo.

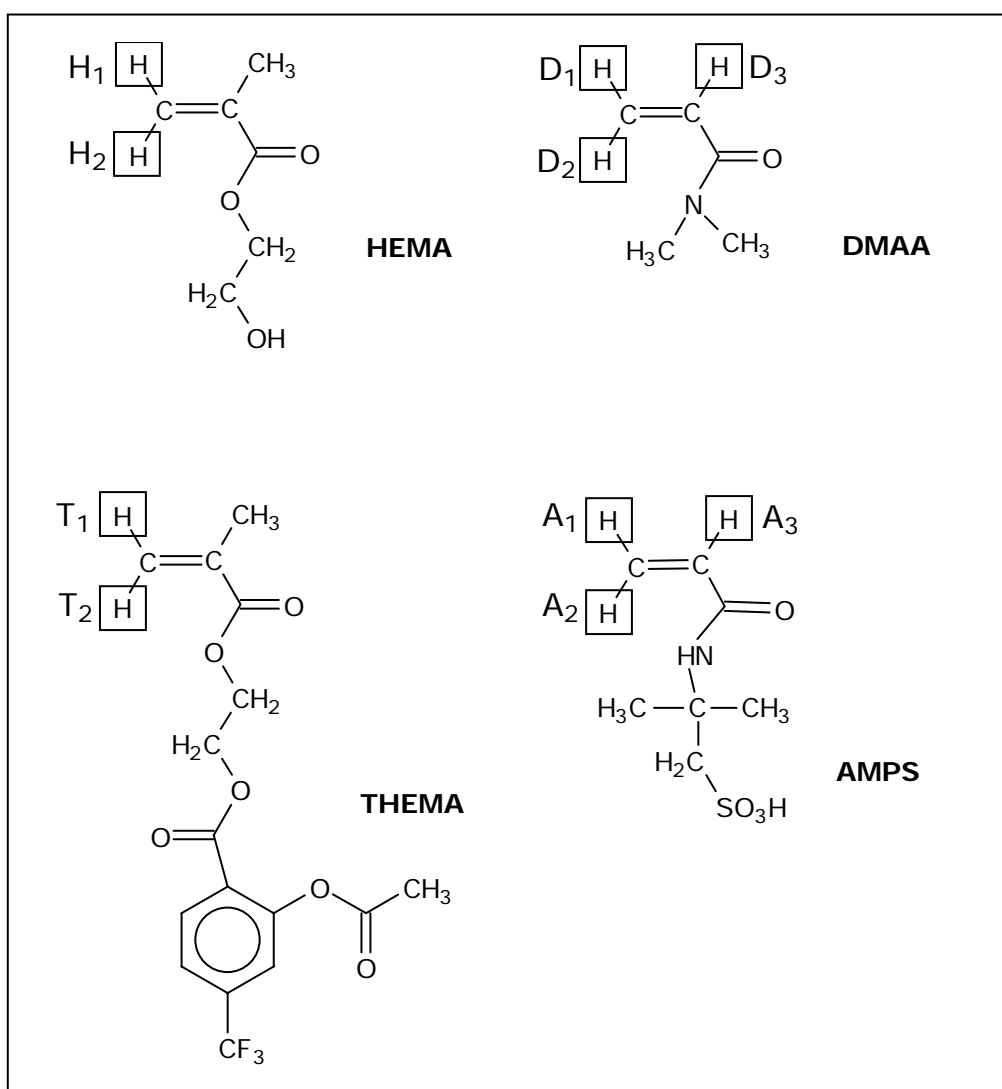


Fig. 2.1: Estructura química de los monómeros utilizados para la síntesis de los correspondientes copolímeros junto con la nomenclatura de los protones acrílicos y metacrílicos objeto de estudio.

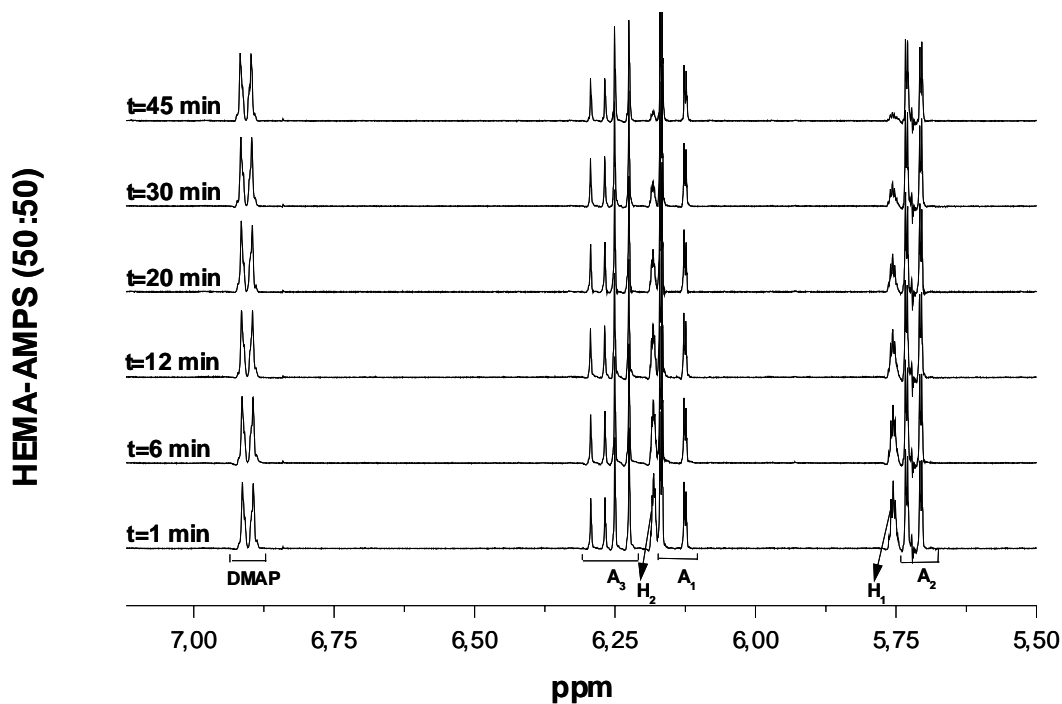


Fig.2.2: Detalle de la región acrílica de espectros representativos de la reacción de copolimerización HEMA-AMPS con una fracción molar inicial en alimentación de $F(\text{HEMA}) = 0,50$.

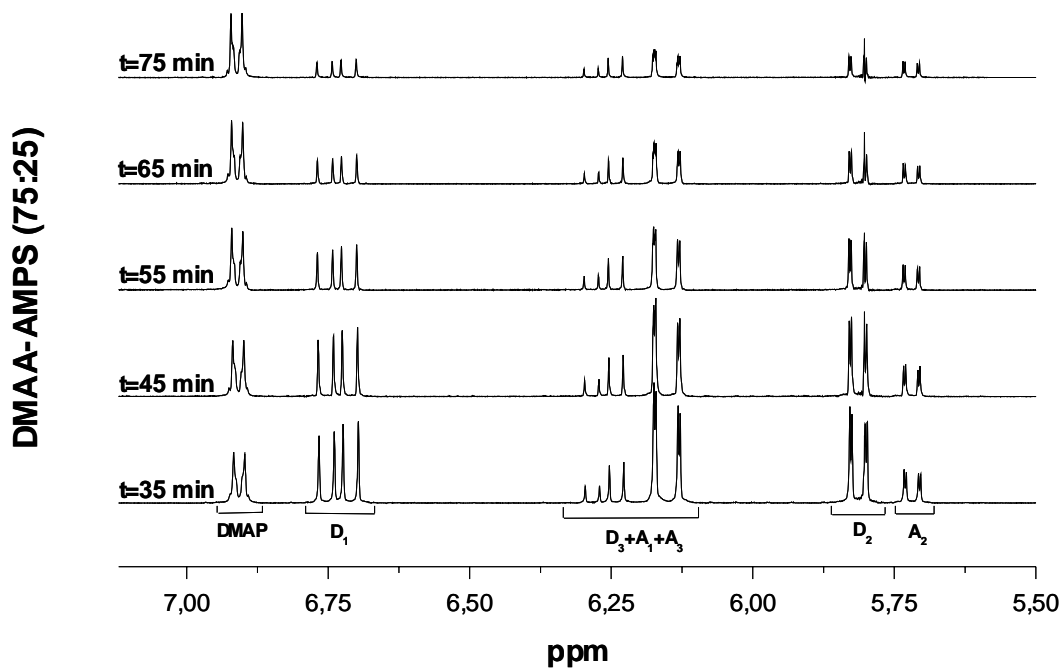


Fig.2.3: Detalle de la región acrílica de espectros representativos de la reacción de copolimerización DMAA-AMPS con una fracción molar inicial en alimentación de $F(\text{DMAA}) = 0,75$.

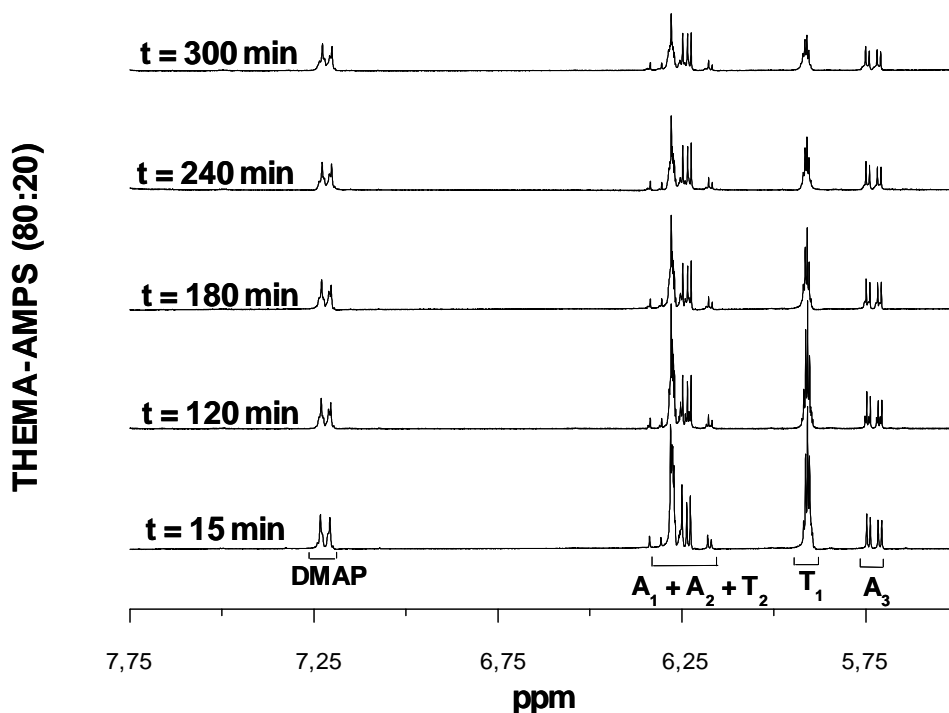


Fig.2.4: Detalle de la región acrílica de espectros representativos de la reacción de copolimerización THEMA-AMPS con una fracción molar inicial en alimentación de $F(\text{THEMA}) = 0,80$.

La variación de la concentración de monómeros se relacionó con las relaciones de reactividad utilizando la ecuación integrada de copolimerización que describe el modelo terminal^{12,18} (Ecuación 2.11).

Si $[M_1]/[M_2] = x$, $[M_2] = y$, $r_1 = a$ y $r_2 = b$

$$y = y_0 \left(\frac{x}{x_0} \right)^{\frac{b}{1-b}} \left(\frac{1-b+(a-1)x}{1-b+(a-1)x_0} \right)^{\frac{ab-1}{(1-a)(1-b)}} \quad (2.19)$$

$$y = k x^{\frac{b}{1-b}} \left[1-b+(a-1)x \right]^{\frac{ab-1}{(1-a)(1-b)}} \quad (2.20)$$

donde k es una constante que incluye las condiciones iniciales de copolimerización. A pesar de que esta ecuación es bien conocida en la literatura, el método más utilizado para analizar las composiciones en alimentación y copolímero en función de la conversión es el desarrollado por Skeist²⁶, el cuál utiliza composiciones promedio. En nuestro caso, en cambio, hemos utilizado la solución integrada exacta y los datos experimentales x e y ($[M_2]$, $[M_1]/[M_2]$) los obtuvimos del análisis *in situ* por RMN-¹H de la reacción de copolimerización. Hemos desarrollado dos aproximaciones para estimar las relaciones de reactividad de sistemas que se ajustan al modelo terminal, basados un ajuste no lineal por mínimos cuadrados a las Ecuaciones 2.19 y 2.20.

Las Figuras 2.5 y 2.7 representan los datos experimentales obtenidos de varias reacciones de copolimerización para los sistemas HEMA-AMPS y DMAA-AMPS como ejemplo. La dispersión de los datos se atribuyó al error experimental de la RMN. Existen fuentes de error que pueden alterar las medidas, como la preparación de la muestra, la integración de las señales...etc. Por ello, la utilización de un único punto como condición inicial (x_0 , y_0) puede conducir a grandes errores en la estimación de r_1 y r_2 utilizando la Ecuación 2.19. Para solventar este inconveniente se desarrollaron dos metodologías.

3.1 Método 1.

El error experimental se promedió utilizando k como tercer parámetro en el ajuste no lineal a la Ecuación 2.20 en vez de x_0, y_0 . La optimización por mínimos cuadrados proporcionó los valores óptimos de r_1 , r_2 y k . Se aplicó este tratamiento a los sistemas HEMA-AMPS y DMAA-AMPS, los cuales presentaron un comportamiento muy diferente: mientras en el sistema DMAA-AMPS ambos monómeros se consumen a velocidades similares (relaciones de reactividad próximas a la unidad), en el sistema HEMA-AMPS, HEMA se consume a mucha mayor velocidad, lo que se traduce en relaciones de reactividad muy diferentes (r_{HEMA} debe ser mayor que 1 y r_{AMPS} menor que 1).

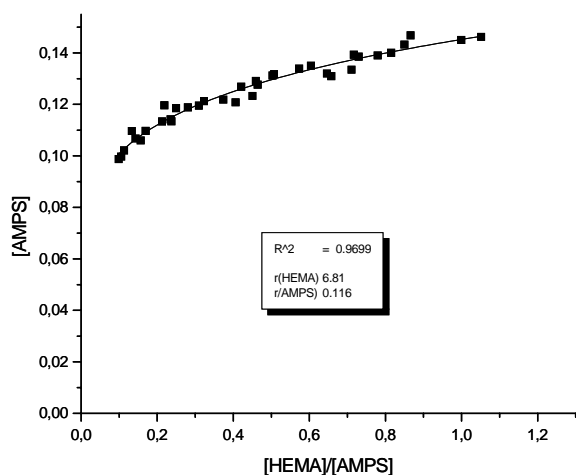


Figura 2.5: Concentración molar de AMPS [AMPS] frente a la relación [HEMA]/[AMPS], obtenido de la monitorización *in situ* por RMN-¹H de la reacción de copolimerización HEMA-AMPS. $F(\text{HEMA}) = 0,50$.

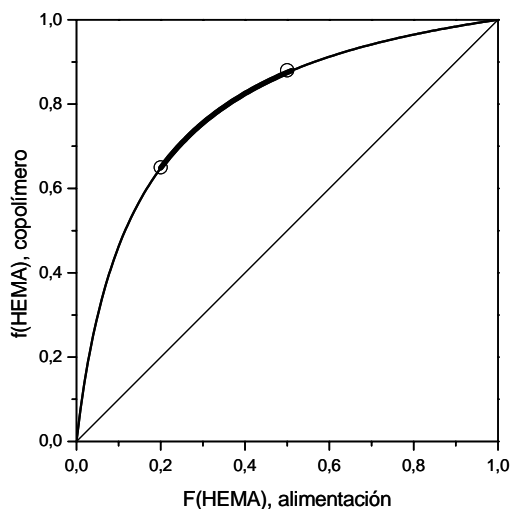
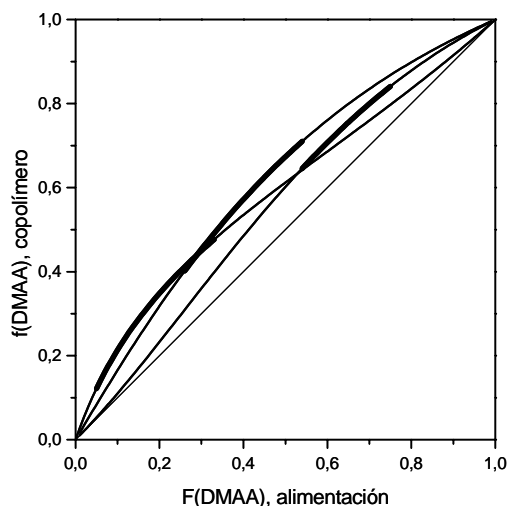
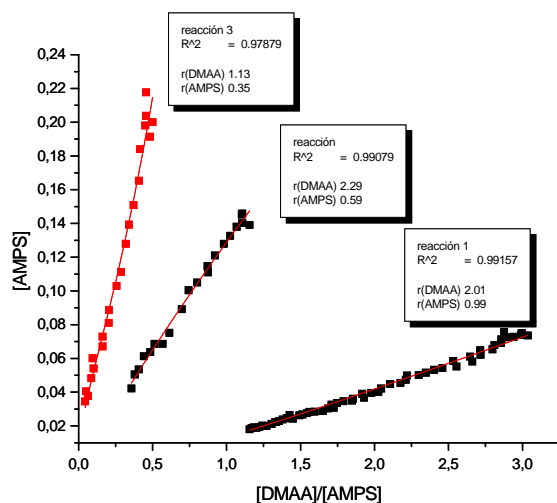


Figura 2.6: Diagrama de composición obtenido con las relaciones de reactividad determinadas por el tratamiento propuesto para el sistema HEMA-AMPS. La línea gruesa corresponde a la región recorrida por los datos experimentales. Los círculos representan los datos obtenidos con los experimentos a baja conversión.

Como consecuencia de esto, una buena elección de las condiciones iniciales de reacción para el sistema HEMA-AMPS permitió utilizar una única reacción para obtener relaciones de reactividad fiables. [AMPS] frente [HEMA]/[AMPS] es representado en la Figura 2.5 para una fracción molar en alimentación inicial de 0,50. La alta velocidad de reacción del HEMA hace que [HEMA]/[AMPS] varíe de 1 a 0,1, mientras que [AMPS] disminuye ligeramente. El ajuste a la Ecuación 2.20 dio unos valores óptimos $r_{\text{HEMA}} = 6,81$ y $r_{\text{AMPS}} = 0,116$. Para estas relaciones de reactividad se calculó el diagrama teórico de composición (Figura 2.6), donde se representó en tramo grueso el rango de composiciones en alimentación recorridas por la reacción, el cuál fue considerado suficiente para estimar de forma fiable estos parámetros cinéticos. Los

puntos experimentales obtenidos mediante las reacciones estándar a baja conversión también están representadas en la Figura 2.6 y están en concordancia con el diagrama



obtenido.

Figura 2.7: Concentración molar de AMPS [AMPS] frente a la relación [DMAA]/[AMPS] a partir de la monitorización *in situ* por RMN-¹H de las reacciones de copolimerización DMAA-AMPS con una composición molar en alimentación de F(DMAA)=0,74; 0,54 y 0,33 (experimentos 1, 2 y 3 respectivamente).

Figura 2.8: Diagramas de composición obtenidos con las relaciones de reactividad determinadas por el tratamiento propuesto para el sistema DMAA-AMPS. Las líneas gruesas corresponden a las regiones recorridas por los datos experimentales.

En el caso del sistema de copolimerización DMAA-AMPS, a altas conversiones, es decir, cuando se alcanza el límite de detección de la técnica de RMN, la relación M_1/M_2 ha sufrido una variación relativamente pequeña, lo que se traduce en un pequeño rango de puntos en el diagrama f/F. La reacción de copolimerización continúa en cualquier caso recorriendo el resto de composiciones del diagrama pero por debajo del límite de detección. Para solucionar este inconveniente se decidió emplear sucesivos experimentos que solapasen cortos rangos de $[M_1]/[M_2]$, es decir, empezar una reacción donde terminó la anterior. La Figura 2.7 representa la concentración molar de AMPS ([AMPS]) frente [DMAA]/[AMPS] para tres reacciones. El ajuste de cada una de las

reacciones por separado conduce a las relaciones de reactividad $r_{\text{DMAA}}=2,01$, $r_{\text{AMPS}}=0,99$, $r_{\text{DMAA}}=2,29$, $r_{\text{AMPS}}=0,59$ y $r_{\text{DMAA}}=1,13$, $r_{\text{AMPS}}=0,35$ respectivamente. En la Figura 2.8 se representan los correspondientes diagramas de composición, donde los tramos gruesos resaltan, de nuevo, el rango de composiciones recorrido por las reacciones. Existe una notable discordancia entre las tres curvas atribuido al error asociado al uso de datos en cortas regiones de composición.

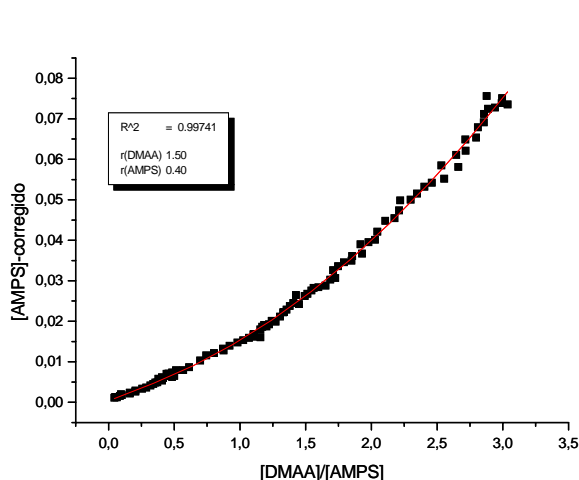


Figura 2.9: Concentración molar corregida de AMPS [AMPS] frente a la relación [DMAA]/[AMPS] obtenido mediante el tratamiento propuesto en el texto.

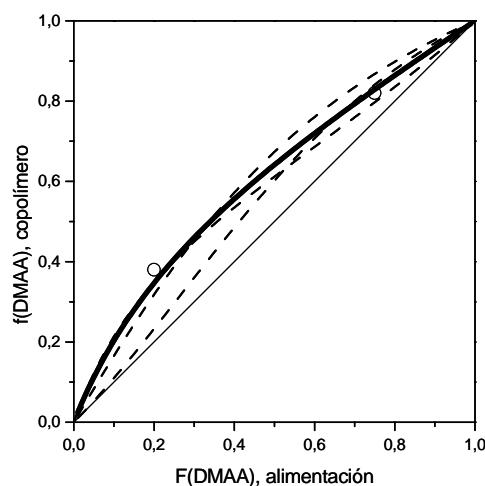


Figura 2.10: Diagrama de composición obtenido con las relaciones de reactividad determinadas por el tratamiento propuesto para el sistema DMAA-AMPS. Las líneas punteadas corresponden a los diagramas de la Figura 2.8 y los círculos representan los datos obtenidos con los experimentos a baja conversión.

Para solucionar este problema se aplicaron unos factores de desplazamiento de las curvas $p_1 = [\text{AMPS}]_{\text{ajuste2}}/[\text{AMPS}]_{\text{ajuste1}} = 8,649$ para $[\text{DMAA}]/[\text{AMPS}] = 1,156$ (la relación $[M_1]/[M_2]$ final e inicial para el primer y segundo experimento respectivamente) y $p_2 = 30,763 = p_1 \times [\text{AMPS}]_{\text{ajuste3}}/[\text{AMPS}]_{\text{ajuste2}}$ para $[\text{DMAA}]/[\text{AMPS}]$ de 0,45 y siendo $[\text{AMPS}]_{\text{fiti}}$ el valor teórico obtenido por la Ecuación 2.20 en cada caso. Debido a que x_0 e y_0 han sido parametrizados y x depende de la relación $[M_1]/[M_2]$ y no de valores absolutos de concentración M_1 y M_2 , podemos crear estos parámetros de desplazamiento

que compatibilizan matemáticamente los datos de las tres reacciones. Multiplicando los datos de los experimentos 2 y 3 por $1/p_1$ y $1/p_2$ respectivamente, obtenemos una representación del siguiente tipo (Figura 2.9) la cual se ajusta a la ecuación 2.20 y obteniendo datos de relaciones de reactividad $r_{\text{DMAA}}=1,50$ $r_{\text{AMPS}}=0,40$.

Además de la considerable disminución del error de la regresión no lineal, el diagrama teórico de composición obtenido con estos valores (Figura 2.10) presenta una considerable concordancia con los diagramas anteriores (Figura 2.8) ya que se ajusta a la reacción 1 a altas concentraciones de DMAA (altas composiciones iniciales de DMAA en alimentación), mientras que a intermedias y bajas concentraciones de DMAA se ajusta a las reacciones 2 y 3 respectivamente. Estos resultados resaltan la gran importancia de utilizar datos que cubran todo el rango de composiciones. En la literatura se describen valores de relaciones de reactividad para este sistema de $r_{\text{DMAA}}=1,03$ y $r_{\text{AMPS}}=0,53$ ²⁷, aunque estos autores utilizaron muestras a relativamente alta conversión, por lo que posiblemente el error asociado a este hecho es el responsable de que obtengan valores de r más próximos a la unidad, que los valores obtenidos en nuestro laboratorio. Existe, de nuevo, una buena concordancia con los puntos experimentales obtenidos a baja conversión.

3.1.1 Cálculo de las elipses de confianza

De cara a valorar el error experimental de los datos, se hallaron las dimensiones de la elipse de confianza generada a partir del método descrito por Box y colaboradores (95% de confianza)²⁸ y el cual se resume a continuación. Se representaron en la Figura 2.11, para los sistemas estudiados por el Método 1.

Si tenemos un modelo biparamétrico (por ejemplo, nuestra ecuación integrada exacta que incluye dos parámetros r_1 y r_2) y n puntos experimentales, la suma de las diferencias cuadráticas entre los valores experimentales y_{exp} y aquellos dados por el modelo y_i , para cualquier pareja de r_1 y r_2 , se define como S :

$$S = \sum_{i=1}^n [y_i - y_{\text{exp}}]^2 \quad (\text{ec. 2.21})$$

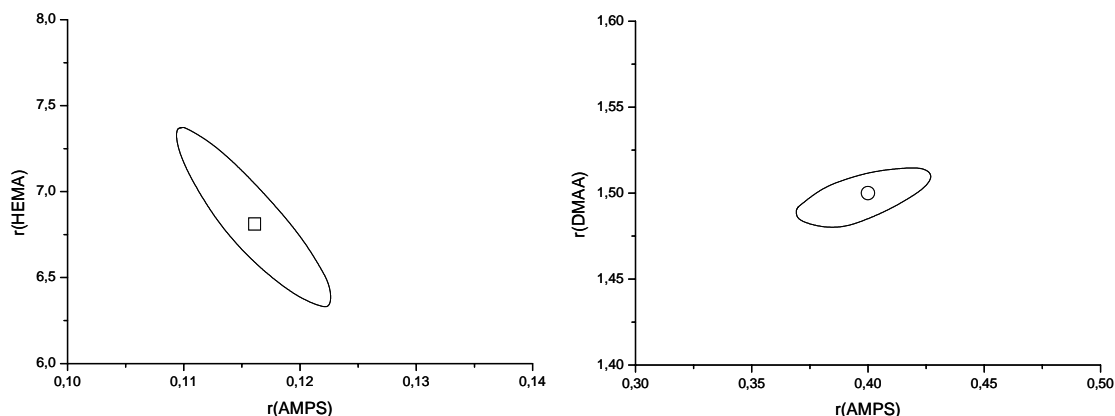


Fig.2.11: Elipses de confianza ($\alpha = 95\%$) de las relaciones de reactividad estimadas mediante el Método 1.

Cada pareja r_1/r_2 dará lugar a un valor de S (más grande o más pequeño). La estimación de r_1 y r_2 por el método de ajuste por mínimos cuadrados se lleva a cabo mediante la minimización de S (es decir, se estiman aquellos r_1 y r_2 que dan lugar a la S_{min}). Éste método se puede utilizar con sistemas con parámetros lineales y en buena aproximación con sistemas de parámetros no lineales (como es nuestro caso).

Una característica de S (suma de las diferencias cuadráticas) es que aquellos valores de r_1 y r_2 (en nuestro caso) que dan lugar a un mismo valor de S (más o menos alejado de S_{min}), se representan en el espacio paramétrico (r_1 frente a r_2 en nuestro caso, o viceversa) como una elipse o elipsoide. Así, una región de confianza $1-\alpha$ para r_1 y r_2 , viene definido por un valor de S que se aleja de S_{min} según la expresión probabilística:

$$S = S_R \left[1 + \frac{p}{n-p} F_{\alpha}(p, n-p) \right] = A \quad (\text{ec. 2.22})$$

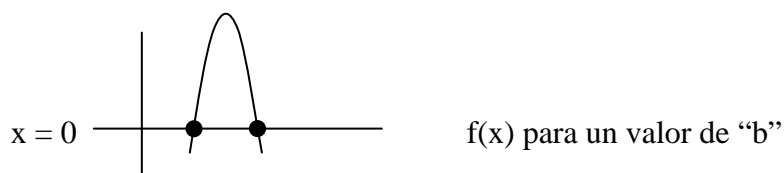
valor de S que se corresponde con una elipse en el espacio r_1 - r_2 (la elipse de confianza), siendo " S_R " la suma de los cuadrados de los residuales para los r_1 y r_2 estimados por el

método de mínimos cuadrados (es decir, S_R es S_{min}), " F_α " el valor de distribución F con " α " % de confianza, " p " el número de parámetros y " $n-p$ " los grados de libertad (para n puntos experimentales). Una elipse del 90% de confianza, por ejemplo, tiene el mismo significado que el del intervalo de confianza del 90%: si repetimos la experimentación muchas veces, el 90% de la región de confianza incluirá el valor verdadero r_1/r_2 y un 10% no. Por otra parte, la estimación de errores (para un modelo de dos parámetros) de un ajuste por mínimos cuadrados (lineal o no lineal), cuyos parámetros dependen unos de otros, debe realizarse mediante elipses de confianza (o regiones) y no con los intervalos de confianza comúnmente utilizados. Esto se debe a que podrían existir valores que entran dentro de los intervalos de confianza de cada uno de los parámetros por separado, pero no en la elipse de confianza que relaciona ambos errores. De esta forma se podrían dar por buenos valores que no lo son.

En nuestro ejemplo concreto, una vez estimados r_1 y r_2 (por medio de un ajuste no lineal de mínimos cuadrados) y conocidos S_R , n , p y F_α para un intervalo de confianza dado $(1-\alpha)$, calculamos A en la ecuación anterior y la elipse vendrá dada por la expresión:

$$\sum_{i=1}^n [y_i(r_1, r_2) - y_{exp}]^2 = A \quad (\text{ec. 2.23})$$

Debido a la complejidad de nuestro modelo, para determinar los puntos de la elipse hemos definido una función $f(x) = A - \sum$ donde r_2 es x .



Con la ayuda del software Mathsoft hemos calculado las parejas de puntos r_1/r_2 (r_1/x) que hacen $f(x)=0$ mediante la representación gráfica de $f(x)$ para diferentes valores de r_1 . Para los valores de r_1 que definen la elipse, encontramos dos x (r_2) que hacen $f(x)=0$ (corte del eje x). De esta manera se obtuvieron los puntos que generarán la elipse de confianza.

3.2 Método 2.

Mayo y Lewis en 1944 desarrollaron un método para determinar gráficamente las relaciones de reactividad en el caso de sistemas obtenidos a alta conversión utilizando la ecuación integrada de copolimerización. El método puede resumirse del siguiente modo: partiendo de la ecuación 2.11 y tras una reorganización de términos se llega a la expresión 2.24.

$$r_2 = \frac{\log \frac{[M_{20}]}{[M_2]} - \frac{1}{p} \log \frac{1-p \frac{[M_1]}{[M_2]}}{1-p \frac{[M_{10}]}{[M_{20}]}}}{\log \frac{[M_{10}]}{[M_1]} + \frac{1}{p} \log \frac{1-p \frac{[M_1]}{[M_2]}}{1-p \frac{[M_{10}]}{[M_{20}]}}} \quad (2.24) \quad \text{siendo } p = \frac{1-r_1}{1-r_2} \quad (2.25)$$

Se lleva a cabo una reacción a alta conversión y se determinan las concentraciones de los monómeros tanto al principio ($[M_{i0}]$) como al final de la reacción ($[M_i]$). Se eligen arbitrariamente valores positivos o negativos de p mediante ensayo y error, con el fin de obtener puntos en la región significativa, y se sustituyen en la ecuación 2.24, conduciéndonos a diferentes valores de r_2 . El valor de r_1 se calcula sustituyendo en la ecuación 2.25. Se representa r_2 vs. r_1 obteniendo para cada experimento una línea recta de pendiente positiva que aumenta a medida que aumenta $[M_1]/[M_2]$. Por ello se necesitan dos o más experimentos para estimar las relaciones de reactividad del sistema ya que el punto de intersección de las rectas indicarían el valor óptimo para este sistema.

Nuestro Método 2 es, en definitiva, una variación del método de Mayo y Lewis. Aplicando la ecuación 2.19 y tomando distintos valores de x_0, y_0 , es decir considerando distintos puntos experimentales x_t, y_t como puntos iniciales de la reacción del sistema

objeto de estudio, ajustamos por mínimos cuadrados el conjunto de puntos experimentales a la ecuación 2.19. De esta manera, obtenemos valores de r_1 y r_2 (Figura 2.13) para cada uno de los ajustes. Los datos presentan una particular tendencia lineal, que al igual que en el modelo de Mayo-Lewis, posee pendiente positiva que aumenta al aumentar $[M_1]/[M_2]$. El error experimental asociado a cada x_0, y_0 , hace que los valores de r_1, r_2 se desplacen a lo largo de una línea recta para cada serie de datos obtenida con cada una de las reacciones. Esto se debe a que las relaciones de reactividad que se ajustan a cada grupo de puntos experimentales están altamente relacionadas. En la Figura 2.12 se representan el conjunto de diagramas de composición obtenidos para las reacciones llevadas a cabo con el sistema DMAA-AMPS, considerando distintos puntos experimentales x_b, y_t como x_0, y_0 . Por otro lado, la familia de diagramas de composición que cruzan un punto de F/f común (lo que es una simplificación de nuestro caso) queda descrito por una línea recta en función de r_1 y r_2 .

El punto de corte de las líneas representadas en la Figura 2.13 debería estar muy cerca del valor de las relaciones de reactividad verdadero, independientemente del error introducido por x_0, y_0 . Si la técnica experimental y el desarrollo teórico fueran completamente perfectos, las rectas de los tres experimentos poseerían un único punto de intersección común y no delimitarían una región de puntos. Es decir, a mejor diseño del experimento, menor es la región r_1 - r_2 óptima.

La gran diferencia entre el Método 2 y aquel descrito por Mayo-Lewis para polímeros sintetizados a alta conversión es que ellos determinaban r_1 y r_2 mediante iteraciones, con un sólo dato de composición inicial y final. Sin embargo, mediante el Método 2, r_1 y r_2 se obtienen de la monitorización de las reacciones de copolimerización y multitud de datos de composición (no menos de 10). El método de Mayo-Lewis utiliza datos de composición puntuales y el Método 2 obtiene datos de composición instantánea en todo el rango de conversiones monitorizadas.

La ventaja del Método 2 sobre el Método 1 es que no necesita la existencia de puntos comunes de composición en las distintas reacciones, lo que se traduce en una mayor versatilidad a la hora de planear los experimentos. Por ello, este tratamiento se aplicó al sistema DMAA-AMPS con el fin de comparar los resultados obtenidos por

métodos diferentes y al sistema THEMA-AMPS ya que presentaba pocos puntos comunes de composición en los experimentos complicando el desarrollo del Método 1.

SISTEMA DMAA-AMPS

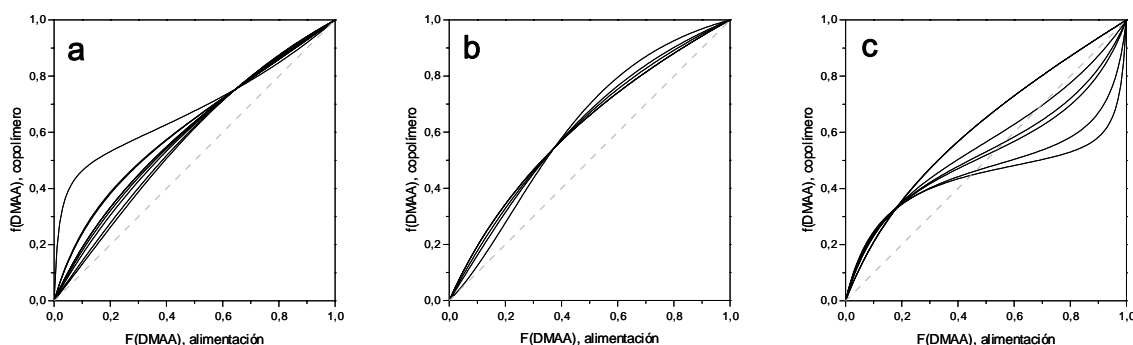


Figura 2.12: Diagramas de composición correspondientes a los diferentes ajustes llevados a cabo con los puntos experimentales de las reacciones 1 (a), 2 (b) y 3 (c), siguiendo el protocolo de trabajo del Método 2.

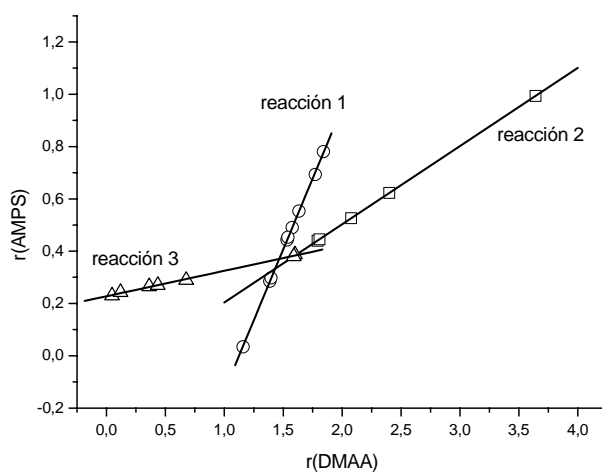


Fig.2.13: r_{AMPS} vs r_{DMAA} obtenido por el Método 2.

En la Figura 2.13 se muestra el diagrama r_1 , r_2 correspondiente al sistema DMAA-AMPS obtenido según el Método 2. Cada punto que constituye las rectas corresponde a los valores de las relaciones de reactividad calculados para cada una de las reacciones. La región que definen la intersección de las tres rectas corresponde a los

valores de r_1 , r_2 óptimos (entre los que se encuentra el valor calculado por el Método 1: $r_{DMAA} = 1,50$; $r_{AMPS} = 0,40$).

SISTEMA THEMA-AMPS

Las relaciones de reactividad de este sistema se calcularon por el Método 2 partiendo de fracciones molares de THEMA de 0,6 y 0,8 obteniéndose $r_{THEMA} = 4,54$ y $r_{AMPS} = 0,32$, tal y como puede observarse en la Figura 2.14 (el punto de intersección corresponde al valor de r_1 y r_2 óptimo).

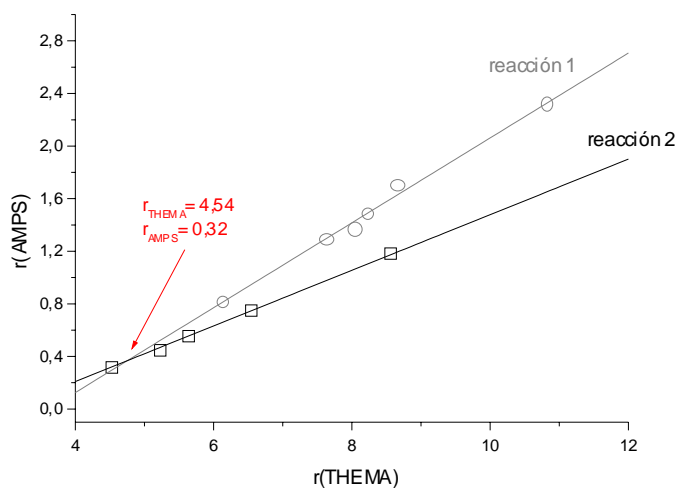


Figura 2.14: Relaciones de reactividad óptimas para el sistema THEMA-AMPS calculadas mediante el Método 2.

4 EVOLUCIÓN DE LA COPOLIMERIZACIÓN CON LA CONVERSIÓN

A través de los valores obtenidos de relaciones de reactividad podemos estimar teóricamente la evolución, con la fracción inicial en alimentación y con la conversión, de diferentes parámetros como las fracciones molares promedio e instantánea en el copolímero, la distribución de secuencias monoméricas en las cadenas macromoleculares, la longitud media de dichas secuencias, etc. Para ello, ha de emplearse alguna de las formas integradas de la ecuación de copolimerización, siendo la más comúnmente utilizada la aproximación de Skeist²⁶. Sin embargo, nosotros hemos desarrollado un algoritmo²⁹ que nos permite usar la solución exacta de la ecuación diferencial de copolimerización⁷ para predecir la evolución de los parámetros anteriormente mencionados con la conversión. De esta forma evitamos el uso de aproximaciones. El desarrollo detallado de este algoritmo se encuentra al final de esta memoria (Apéndice), en el que se describe el funcionamiento del programa y la construcción de diagramas tridimensionales.

La finalidad de este apartado es el estudio de la evolución de diferentes parámetros característicos de las reacciones de copolimerización con la conversión, en base a las relaciones de reactividad calculadas anteriormente (Tabla 2.1), empleando para ello distintas representaciones gráficas.

SISTEMA	r ₁	r ₂
Poli(HEMA-co-AMPS)	6,81	0,12
Poli(HEMA-co-AMPS)	4,54	0,32
Poli(DMAA-co-AMPS)	1,50	0,40

Tabla 2.1: Relaciones de reactividad estimadas por RMN-¹H *in situ* de los sistemas copoliméricos objeto de estudio.

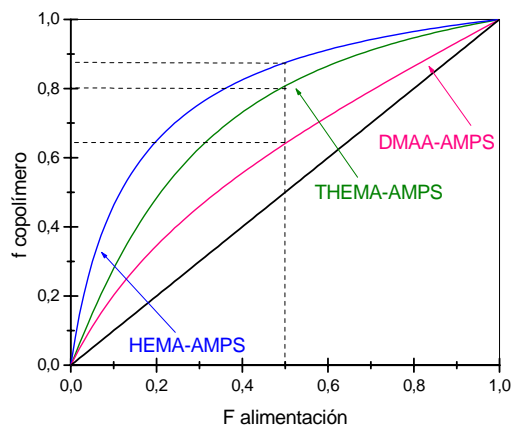


Figura 2.15: Diagrama de composición de los tres sistemas copoliméricos estudiados: (--) poli(HEMA-*co*-AMPS), (--) poli(THEMA-*co*-AMPS) y (--) poli(DMAA-*co*-AMPS)

El comportamiento de la mayoría de los sistemas copoliméricos se encuentra entre una copolimerización ideal ($r_1 \times r_2 = 1$) y una copolimerización alternante ($r_1 = r_2 = 0$). A medida que $r_1 \times r_2$ disminuye desde la unidad hasta cero, aumenta la tendencia a la copolimerización alternante. Se alcanza una situación especial cuando uno de los monómeros posee una relación de reactividad mucho mayor que el otro. En el caso que $r_1 \gg 1$ y $r_2 \ll 1$, ambos tipos de especies en propagación adicionan preferentemente el monómero M_1 , existiendo una tendencia a la homopolimerización consecutiva de los dos monómeros. Es decir, M_1 tiende a homopolimerizar hasta que es consumido en gran parte y entonces M_2 tiende a homopolimerizar a continuación.

Los tres sistemas estudiados presentan un comportamiento de copolimerización muy diferente, como reflejan las relaciones de reactividad calculadas. Éstas varían desde valores próximos a la unidad para ambos monómeros, como en el sistema DMAA-AMPS ($r_{\text{DMAA}} = 1,50$, $r_{\text{AMPS}} = 0,40$), hasta valores muy diferentes, como en el HEMA-AMPS ($r_{\text{HEMA}} = 6,81$, $r_{\text{AMPS}} = 0,12$), mientras que el sistema THEMA-AMPS toma valores intermedios entre uno y otro ($r_{\text{THEMA}} = 4,54$, $r_{\text{AMPS}} = 0,32$). La notable diferencia en las reacciones de copolimerización queda reflejada en los diagramas de composición (Figura 2.15) que representan, de acuerdo a las relaciones de reactividad, las fracciones molares instantáneas en el copolímero para una composición dada en

alimentación. Por ejemplo, la polimerización de una mezcla equimolecular de monómeros ($F_{\text{alimentación}} = 0,5$), conduce inicialmente a la formación de cadenas macromoleculares con un contenido molar en AMPS de 0,12, 0,20 y 0,36 para los sistemas HEMA-AMPS, THEMA-AMPS y DMAA-AMPS respectivamente. Como puede verse en la Figura 2.15, se producirá una progresiva disminución en la composición en alimentación del monómero más reactivo (HEMA, THEMA o DMAA). Los gráficos tridimensionales representados en las Figuras 2.16 1a, 1b y 1c proporcionan información más clara acerca de la variación instantánea de las fracciones molares de HEMA, THEMA o DMAA en las cadenas de copolímero en función de la conversión y la fracción molar en alimentación. Estas figuras ilustran el distinto comportamiento de los sistemas durante la copolimerización y en ella se ha representado la fracción instantánea en el copolímero del monómero más reactivo (HEMA, THEMA o DMAA) en función de la fracción inicial en alimentación y de la conversión. Las líneas rojas, en todos los gráficos, representan las reacciones de copolimerización utilizadas para la preparación de los copolímeros a conversión total (Capítulo 1-Tablas 1.1, 1.2 y 1.3).

Debido a que el sistema THEMA-AMPS presenta unas relaciones de reactividad intermedias y por ello un comportamiento de copolimerización intermedio entre los otros dos sistemas, se compararán los sistemas de comportamiento extremo para después comentar las reacciones de copolimerización del sistema THEMA-AMPS.

A pesar de ser AMPS el monómero menos reactivo en los tres sistemas copoliméricos, su incorporación en las cadenas macromoleculares es bastante diferente. Mientras HEMA se incorpora con gran preferencia frente a AMPS (Figuras 2.16-1a) en el sistema HEMA-AMPS, DMAA lo hace a una velocidad ligeramente superior en el sistema DMAA-AMPS (Figuras 2.16-1c). Esto se debe a que la diferencia en las relaciones de reactividad de los monómeros es mucho mayor en el primer sistema. HEMA se consume inicialmente a mucha mayor velocidad que AMPS y por tanto, en los diagramas tridimensionales podemos diferenciar dos regiones bien definidas, con una transición aguda entre ellas. La primera región corresponde a la formación de macromoléculas ricas en HEMA (a bajas conversiones), mientras que la segunda región corresponde a la formación de macromoléculas ricas en unidades de AMPS (a altas conversiones). Entre una y otra etapa se forman pocas macromoléculas de composición

intermedia. Es decir, una vez que se consume la mayor parte de HEMA, AMPS empieza a reaccionar formándose cadenas poliméricas con largas secuencias de AMPS, que correspondería al *plateau* inferior de la Figura 2.16-1a. En cambio, el sistema DMAA-AMPS copolimeriza de forma más homogénea hasta muy altas conversiones donde se forman cadenas ricas en AMPS, tal y como se observa en la parte izquierda de la Figura 2.16-1c. Entre uno y otro comportamiento encontramos el sistema THEMA-AMPS el cual presenta unos diagramas tridimensionales similares a los del HEMA-AMPS (Figuras 2.16-1b), aunque su transición entre la región rica en el monómero más reactivo y el menos reactivo es menos aguda. Por lo tanto, se forman más cadenas de composición intermedia, aunque se sigue apreciando cierta tendencia a la homopolimerización consecutiva. Y se diferencian dos etapas durante la copolimerización, consumiéndose preferentemente en primer lugar el monómero más reactivo, para después consumirse preferentemente el menos reactivo, formándose algunas cadenas de composición intermedia entre una y otra etapa.

En definitiva, tal y como se explicó anteriormente la tendencia a la homopolimerización consecutiva aumenta al aumentar la diferencia entre los valores de las relaciones de reactividad. De esta forma, se obtendrán poblaciones de cadenas macromoleculares más heterogéneas cuanto más difieran estos parámetros entre sí. Esto queda claramente reflejado en las Figuras 2.16-2, donde la longitud media de las secuencias centradas en el monómero más reactivo se representa en función de la fracción inicial en alimentación y la conversión. Las mesetas o *plateaus* superiores son artefactos del programa que representan las secuencias superiores a 20 unidades. HEMA forma largas secuencias en los primeros estadios de la reacción, mientras que las reacciones con DMAA no llegan a formar estas largas secuencias salvo a fracciones en alimentación de DMAA muy elevadas. Por otra parte, se forman largas secuencias de unidades AMPS en los últimos estadios de la reacción, una vez consumido el monómero más reactivo. El área de los *plateaus* superiores (HEMA-AMPS > THEMA-AMPS > DMAA-AMPS) está relacionado con la existencia de largas secuencias y es de nuevo indicativo de la diferente heterogeneidad microestructural de las cadenas macromoleculares.

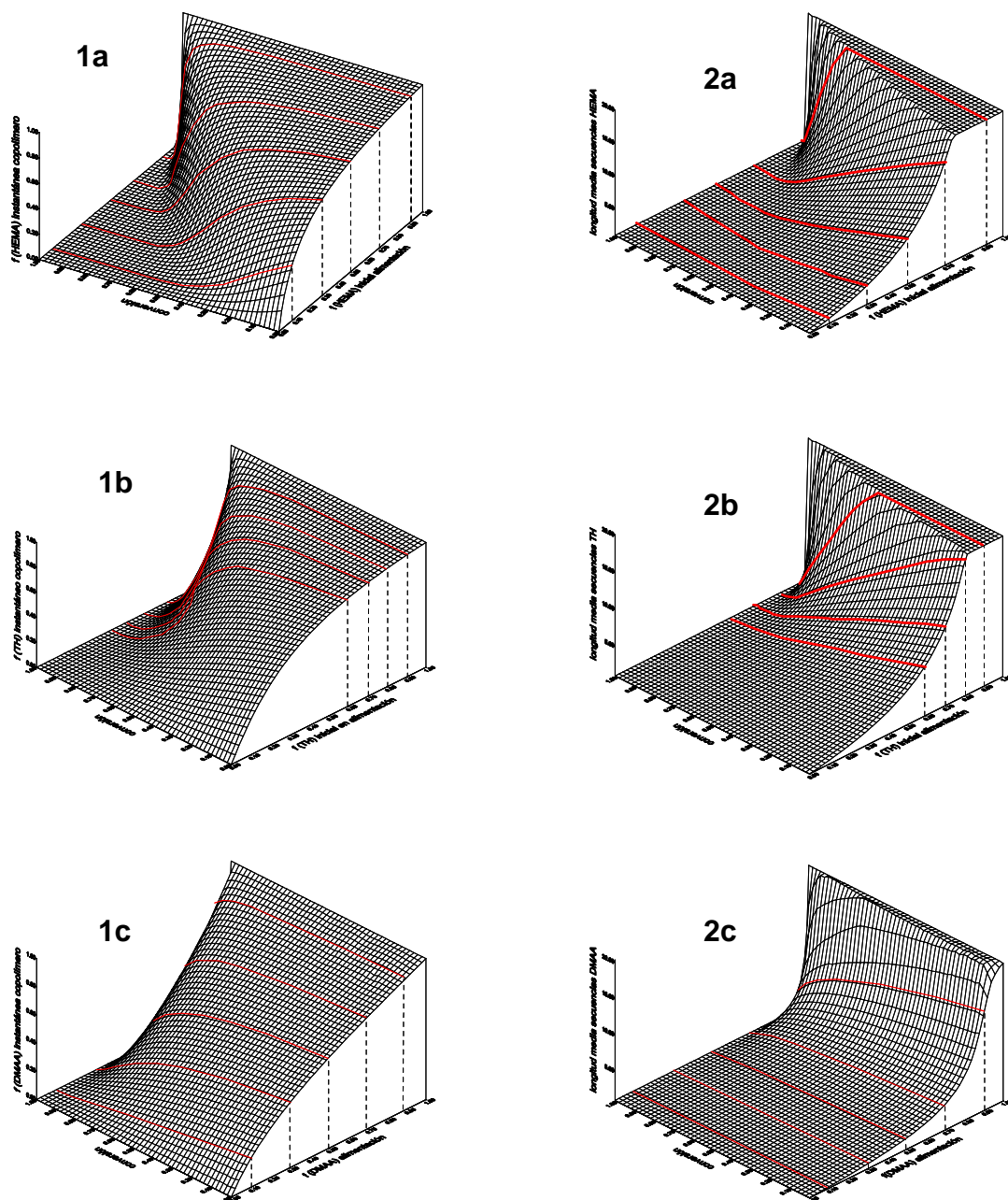


Figura 2.16: Evolución de la fracción molar instantánea en el copolímero (1) y longitud media de secuencias (2) de HEMA (a), THEMA (b) o DMAA (c) con la fracción molar en alimentación y con la conversión.

En conclusión, se han descrito dos nuevas y sencillas metodologías para analizar reacciones de copolimerización radical siguiendo la disminución de las concentraciones de los monómeros. Este protocolo utiliza el análisis cuantitativo por espectroscopía de RMN-¹H *in situ* de la desaparición de los picos de los monómeros durante la copolimerización para determinar las relaciones de reactividad y asociarlo a la forma integrada de la ecuación de copolimerización. Los métodos se aplicaron para los sistemas HEMA-AMPS, THEMA-AMPS y DMAA-AMPS. Sus relaciones de reactividad indican que HEMA-AMPS y THEMA-AMPS en menor medida, presentan una tendencia a la homopolimerización consecutiva y con ello a la formación de dos o más poblaciones de macromoléculas claramente diferenciadas. Sin embargo, el sistema DMAA-AMPS, cuyas relaciones de reactividad se acercan más a la unidad, da lugar a una copolimerización mucho más homogénea. .

5 BIBLIOGRAFÍA

- 1) Van Krevelen D.V. *Properties of Polymers. Their estimation and correlation with chemical structure.*; Ed. Elsevier: Amsterdam, 1990.
- 2) Bamford C.H., Middleton I. P., Al-Lamee K.G. *Polymer* **1986**, 27, 1981.
- 3) Maruyama Y., Sung-Jo Y., Inoue Y., Chûjô R., Tasaka S., Miyata S. *Polymer* **1987**, 28, 1087.
- 4) Ross J.F. *Macromol Sci Chem* **1984**, A21, 453.
- 5) Baumert M., Frey H., Hölderle M., Kressler J., Sernetz F.G., Mülhaupt R. *Macromol Symp* **1997**, 121, 53.
- 6) Nagai K. *TRIP* **1996**, 4, 122.
- 7) Mayo F.R., Lewis F. M. *J Am Chem Soc* **1944**, 66, 1594-1601.
- 8) Fukuda T., Kubo K., Ma Y.D. *Progress in Polym Sci* **1992**, 17, 875.
- 9) Szymanski R. *Progress in Polym Sci* **1992**, 17, 917.
- 10) Fineman M., Ross S. D. *Journal of Polymer Science* **1950**, 5 (2), 259-265.
- 11) Kelen T., Tudos F. *J Macromol Chem* **1975**, A9, 1-27.

- 12) O'Driscoll K.F., Reilly P. M. *Makromol Chem Macromol Symp* **1987**, 10/11, 355-374.
- 13) Behnken D.W. *Journal of Polymer Science: Part A* **1964**, 2, 645.
- 14) Van der Meer R., Linssen H. N., German A.L. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* **1978**, 16, 2915.
- 15) Patino-Leal H., Reilly P. M., O'Driscoll K.F. *Journal of Polymer Science, Polymer Letters* **1980**, 18, 219.
- 16) Jenkins A.D. *Macromol Rapid Commun* **1996**, 17, 275.
- 17) Jenkins A.D. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* **1996**, 34, 3495.
- 18) Kruse R.L. *Polymer Letters* **1967**, 5, 437-440.
- 19) Mao R., Huglin M. B. *Polymer* **1993**, 34, 1709-1715.
- 20) Ito H., Dalby C., Pomerantz A., Sherwood M.J., Sata R., Sooriyakumaran R., Guy K., Breyta G. *Macromolecules* **2000**, 33, 5080-5089.
- 21) Ito H., Miller D., Sveum N., Sherwood M.J. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* **2000**, 38, 3521-3542.
- 22) Kruff M-A.B., Koole L. H. *Macromolecules* **1996**, 29, 5513.
- 23) Martin S.J., Mc Brierty V. J., Dowling J., Douglas D.C., *Macromol Rapid Commun* **1999**, 20, 95-97.
- 24) Martin S.J., Mc Brierty V. J., Douglass D.C. *Macromolecules* **2001**, 34, 8934-8943.
- 25) Bag D.S., Maiti S. *Indian Journal of Chemistry* **1998**, 37A, 212-221.
- 26) Fort R.J., Polyzoidis T. M. *Eur Polym J* **1976**, 12, 685-689.
- 27) Skeist I. *J Am Chem Soc* **1946**, 68, 1781.
- 28) Tong Z., Lin X. *Macromolecules* **1994**, 27, 844-848.
- 29) Box G.E.P., H. J. S. *Statistics for Experiments: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building*; John Wiley & Sons: New York, 1978.
- 30) Gallardo A., Aguilar M. R., Abraham G., San Román J. *Journal of Chemical Education* **2002**, submitted.

CAPÍTULO 3

ESTUDIO DE REACCIONES DE COPOLIMERIZACIÓN RADICAL POR ELECTROCROMATOGRFÍA CINÉTICA MICELAR (MECK)

***CAPÍTULO 3: ESTUDIO DE LAS REACCIONES DE
COPOLIMERIZACIÓN RADICAL POR
ELECTROCROMATOGRAFÍA CINÉTICA MICELAR (MEKC)***

1	Introducción.....	83
2	Fundamentos de la electroforesis capilar.....	86
2.1	Equipo de electroforesis capilar	87
2.2	Electroforesis capilar en zona libre (CZE)	88
2.3	Electrocromatografía cinética micelar (MEKC).....	91
3	Materiales y métodos:.....	93
3.1	Reactivos y muestras	93
3.2	Análisis por MEKC	94
3.3	Análisis conductimétrico	95
4	Resultados y discusión:	96
4.1	Cinéticas de copolimerización analizadas por MEKC	96
4.2	Análisis conductimétrico	101
4.3	Influencia del peso molecular y la composición	103
5	bibliografía	112

1 INTRODUCCIÓN

Cuando dos o más monómeros de diferente estructura química polimerizan se forman, por lo general, copolímeros químicamente heterogéneos en vez de homopolímeros homogéneos, considerando no sólo el peso molecular y la distribución de pesos moleculares, sino también la composición química y estructural y la distribución de las unidades comonoméricas a lo largo de la cadena macromolecular. Dependiendo de la reactividad de los monómeros, la composición en alimentación y la conversión, se obtienen macromoléculas que difieren significativamente en composición y en ocasiones, en compatibilidad, llegando a formar en caso extremo mezclas poliméricas. Como ya se comentó en el capítulo anterior, la reactividad relativa de radicales y monómeros viene descrita por las relaciones de reactividad del sistema. Únicamente se obtienen copolímeros homogéneos (composiciones idénticas tanto en alimentación como en el copolímero) en el punto azeotrópico de copolimerizaciones azeotrópicas o en el caso de copolímeros que sigan estrictamente un comportamiento de copolimerización al azar donde $r_1 = r_2 = 1$. Por lo general, la composición instantánea del copolímero difiere de la de la mezcla, causando una disminución en la concentración del monómero más reactivo. De esta forma se obtienen copolímeros heterogéneos, ya que la mezcla de reacción varía progresivamente con la conversión. La descripción de estos copolímeros ha de hacerse en base a su distribución de pesos moleculares y composición química.

La distribución de composiciones químicas de copolímeros al azar proporciona gran información acerca de las cadenas poliméricas: distribución de secuencias, heterogeneidad instantánea y heterogeneidad en función de la conversión entre otras. Esta función de distribución puede obtenerse bien a través de cálculos teóricos basados en algún modelo de copolimerización, bien vía técnicas de separación. Aparte de las predicciones teóricas se ha mostrado muy poco interés en el desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas de separación respecto a la composición química. La distribución de secuencias en los copolímeros pueden realizarse por estudios de RMN¹, pero obtener espectros de alta resolución y la asignación inequívoca de bandas puede resultar muy complicado. Por lo tanto, parece evidente la necesidad de utilizar alguna

técnica de separación para el estudio de la distribución de composición química a lo largo del copolímero y con ello, el estudio de la heterogeneidad en la distribución de carga en el caso de cadenas polielectrolíticas. Por ejemplo, el análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) ha sido descrita en la literatura ² con este propósito.

La técnica cromatográfica más empleada en la caracterización de polímeros es la cromatografía de exclusión por tamaños (SEC), la cual nos proporciona información acerca de la masa molecular promedio y su distribución (Ver Figura 1.8). Sin embargo, la caracterización de polielectrolitos por SEC es muy problemática ya que este tipo de polímeros son principalmente solubles en medios acuosos y suelen producir efectos de exclusión y adsorción en la fase estacionaria, además, los efectos de agregación de los analitos pueden interferir en la determinación de la masa molecular. Por otro lado, no proporciona información acerca de la *distribución* de composición química, ya que esta técnica separa las macromoléculas en base a su volumen hidrodinámico, que es función de la composición química y de la longitud de cadena, por lo que es capaz de dar información acerca del peso molecular medio y de la polidispersidad del sistema, pero no es capaz de separar muestras de similar peso molecular y diferente composición.

La electroforesis capilar (EC) constituye una nueva herramienta para el análisis y caracterización de sistemas copoliméricos cargados ya que aprovecha la diferencia de velocidad desarrollada por los distintos analitos polielectrolíticos sometidos a la acción de un campo eléctrico en el proceso de separación. Por lo tanto, la mayor ventaja que posee esta técnica es la posibilidad obtener cierto análisis químico de los polímeros como parte del proceso de separación. Además, proporciona elevadas eficacias (10^5 - 10^6 platos teóricos por metro de columna) con mínima difusión (perfil del flujo del tampón plano) en pequeños intervalos de tiempo (normalmente inferior a 30 minutos). Requiere muy poca cantidad de muestra (1-10 microlitros) y es capaz de detectar en continuo. En el caso del análisis de polímeros, las medidas de movilidad electroforética pueden proporcionar información del peso molecular, densidad de carga, hidrofobicidad e interacciones no covalentes.

A pesar de existir un pequeño número de publicaciones sobre el análisis de copolímeros sintéticos por electroforesis capilar, se han utilizado distintas modalidades para el análisis de la distribución de la composición química, entre los que cabe destacar la isotacoforesis (CITP) con la que Whitlock y colaboradores analizaron también el sistema HEMA-AMPS³, el análisis por electroforesis capilar frontal (FACCE) utilizado por Staggemeier y colaboradores⁴ en el estudio del sistema acrilamida-AMPS ó la electroforesis capilar con redes poliméricas (CGE) que permiten la separación de los polímeros en función de su peso molecular⁵. Nuestro grupo de trabajo ha empleado con anterioridad la electrocromatografía cinética micelar (MEKC) para el estudio del sistema copolimérico neutro poli(HEMA-*co*-vinilpirrolidona) obteniendo la elucidación de diferentes especies copoliméricas con distinta composición en función de su hidrofobicidad⁶. El grado de interacción con el SDS del tampón y por tanto, la movilidad electroforética de las macromoléculas, dependieron del contenido en el monómero más hidrófobo, es decir, del contenido en HEMA.

Aunque la MEKC fue diseñada para separar compuestos no cargados⁷, puede utilizarse también para la separación de sustancias con carga incorporando interacciones de tipo hidrófobo e interacciones iónicas entre el analito y las micelas. De esta forma se consigue mejorar sensiblemente la selectividad, haciéndola ideal para la caracterización de copolímeros iónicos/no-iónicos.

El objetivo de este capítulo es el empleo de esta modalidad de EC para el estudio de las reacciones de copolimerización radical de los sistemas polielectrolíticos poli(HEMA-*co*-AMPS) y poli(DMAA-*co*-AMPS). Fueron elegidos por tratarse de los sistemas de comportamiento más diferente (el sistema poli(HEMA-*co*-AMPS) posee un comportamiento intermedio entre uno y otro sistema). Para ello, se llevó a cabo un estudio exhaustivo del proceso de polimerización y la estimación de distribución de composición química de los copolímeros. También se determinó la influencia del medio de reacción en la formación de especies de bajo peso molecular durante la reacción de copolimerización.

2 FUNDAMENTOS DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR

La electroforesis capilar es una técnica de separación basada en la diferente movilidad de las sustancias bajo la acción de un campo eléctrico. Combina el poder de separación de la electroforesis convencional con el apoyo instrumental propio de la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC). La separación de las sustancias se lleva a cabo en el interior de un tubo capilar, normalmente de sílice fundida, cuyas dimensiones oscilan entre 10-100 cm de longitud y 25-100 μm de diámetro interno, lleno de una solución tampón. Una fuente de alimentación de corriente continua suministra una elevada diferencia de potencial (5-30 kV) y gracias a la conductividad eléctrica del tampón se origina una corriente eléctrica entre los extremos del tubo. Cada sustancia introducida en el capilar se desplaza por su interior a una velocidad que depende de su carga eléctrica global, su estructura, la viscosidad del medio y la diferencia de potencial aplicado, que son los principales responsables de la separación.

Existen distintas modalidades de electroforesis capilar, las cuales se diferencian fundamentalmente en la naturaleza del contenido del tubo capilar. De las siguientes modalidades se detallarán en profundidad los fundamentos de separación de la **electroforesis en zona libre**, por ser la más utilizada, y de la **electrocromatografía cinética micelar**, por ser la modalidad empleada en este trabajo.

- *Electroforesis en zona libre*: en este caso el capilar contiene únicamente un medio tamponado. La movilidad del analito depende fundamentalmente de la relación carga/masa.
- *Electrocromatografía cinética micelar (MEKC)*: se añade al medio tamponado un tensioactivo en concentración superior a la concentración micelar crítica, se forman micelas y al efecto carga/masa hay que añadir las interacciones soluto-micela. En este caso existe una semejanza notable con la cromatografía puesto que la micela podría considerarse como una fase pseudoestacionaria que se mueve, de tal manera que esta modalidad tiene capacidad para separar también sustancias no cargadas eléctricamente.

- *Electroforesis capilar en gel:* El capilar está relleno de un gel o solución de polímero hidrofílico. En este caso, la propiedad del soluto que determina su movilidad es el tamaño molecular. De este manera pueden separarse polímeros de similar relación carga/masa en función de su tamaño molecular.
- *Isoelectroenfoque:* La separación se produce en función de los puntos isoeléctricos (pI) de los solutos. Al medio se le añade una mezcla de anfólitos en una gama de pHs que comprendan los pI de la mezcla a separar y se aplica un campo eléctrico. Cada soluto se mueve hasta encontrar la zona de pH igual a su pI, donde su carga global se anula y deja de moverse.
- *Electrocromatografía:* El capilar tiene un relleno parecido al empleado en HPLC, pero el desplazamiento del tampón, que actúa de fase móvil, se efectúa mediante la aplicación de una diferencia de potencial entre los extremos del capilar.
- *Isotacoforesis:* La muestra se inyecta entre un tampón (denominado frontal) cuya movilidad es superior a la del componente más rápido de dicha muestra y otro tampón (denominado terminal) cuya movilidad es inferior a la del componente más lento de la muestra. Al aplicar la diferencia de potencial las sustancias que componen la muestra se separan en zonas entre ambos tampones.

2.1 Equipo de electroforesis capilar

Las partes fundamentales que componen un equipo de electroforesis capilar son las siguientes (Figura 3.1):

1. Una fuente de alta tensión, que permite establecer diferencias de potencial de varias decenas de kilovoltios (normalmente de hasta 30 kV con una corriente eléctrica máxima del orden de 200 μ A) entre los extremos del capilar.
2. Una columna capilar, normalmente de sílice fundida. Como en cromatografía, ésta es la parte fundamental del equipo puesto que en su interior se produce la separación.
3. Dos recipientes que contienen generalmente el mismo tampón que el capilar, que permiten establecer la diferencia de potencial entre los extremos del tubo. Para la inyección se sustituye uno de estos recipientes por otro que

contenga la muestra a analizar y se aplica presión, vacío o una pequeña diferencia de potencial, con lo que se introduce en el capilar una banda de muestra (casi siempre de anchura inferior a 10 mm)

4. Dos electrodos con los que se establece el contacto eléctrico entre el capilar y los recipientes llenos de tampón de separación, y la fuente de tensión.
5. Un detector, de función idéntica a los utilizados para cromatografía. La detección suele hacerse en columna, es decir, en un punto del mismo capilar de separación.

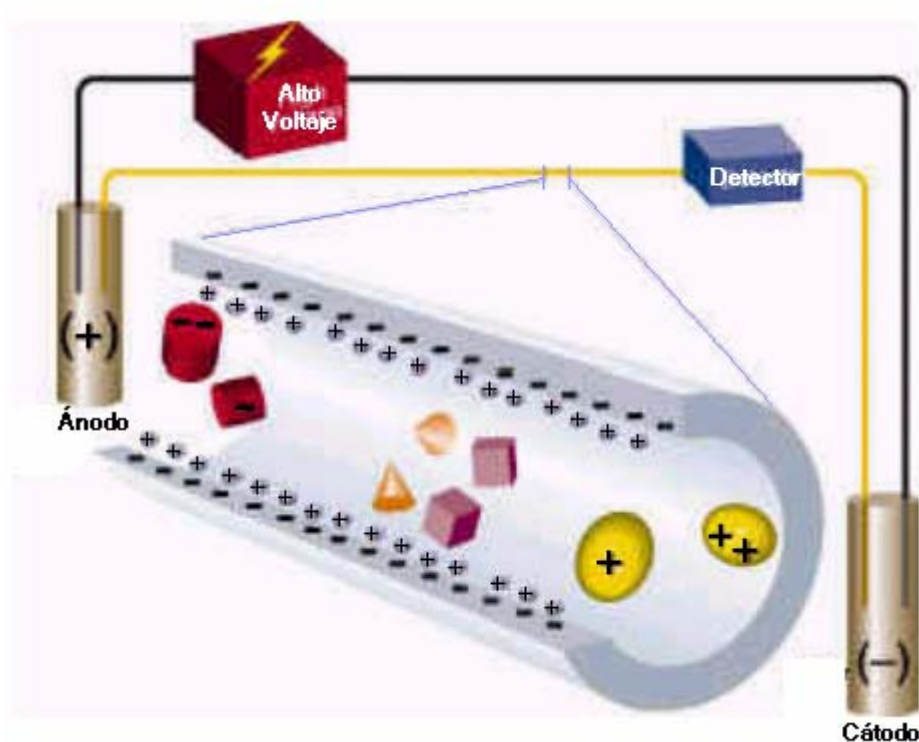


Fig. 3.1: Esquema básico del equipo empleado en electroforesis capilar en zona libre.

2.2 Electroforesis capilar en zona libre (CZE)

La primera modalidad de electroforesis capilar fue desarrollada por Jorgenson y Lukacs y sigue siendo la más utilizada. En el interior del capilar sólo se encuentra el tampón donde se llevará a cabo el análisis. Los componentes de la muestra, una vez inyectada serán separados en función de su relación carga/masa. Entre sus ventajas cabe destacar la posibilidad de separar simultáneamente sustancias con carga positiva y

negativa, siempre que el flujo electroosmótico sea lo bastante elevado como para arrastrar ambos tipos de iones.

Las sustancias, una vez inyectadas en el capilar, se ven sometidas a la fuerza originada por el campo eléctrico aplicado, F_e

$$F_e = q \frac{V}{L}$$

siendo q la carga de la sustancia, V la diferencia de potencial aplicada y L la longitud del capilar. F_e es proporcional al campo eléctrico aplicado ($E = V/L$) y la carga propia de la sustancia, que depende principalmente del pH del tampón de separación. A esta fuerza se opone otra de origen viscoso debida al rozamiento, F_r , cuyo valor, suponiendo que las sustancias se comporten como partículas esféricas, viene dado por la ecuación de Stokes

$$F_r = 6\pi\eta r_p v_e$$

donde r_p es el radio de la partícula, η es la viscosidad del medio y v_e es la velocidad con que dicha partícula se desplaza. El movimiento rectilíneo uniforme de las partículas se debe a que, tras un primer momento, las fuerzas F_e y F_r se igualan. La velocidad de migración vendrá dada por

$$v_e = \frac{q}{6\pi\eta r_p} E$$

La expresión $q/6\pi\eta r_p$ es lo que se denomina movilidad electroforética, μ_e , que depende de parámetros específicos de cada partícula y del tampón de separación (directamente a través de la viscosidad o mediante su influencia sobre q y r_p). La importancia de este parámetro se debe a que es el que gobierna la selectividad del sistema de separación a través de la relación q/r_p , que debe ser diferente para las sustancias que se desean separar.

El otro desplazamiento al que están sometidas las moléculas de soluto, la movilidad electroosmótica, μ_{eo} , está asociado al movimiento global del tampón de separación en el interior del capilar, que es el resultado de la interacción entre los grupos con carga negativa del capilar y los contraiones del tampón que, bajo la acción del campo eléctrico, se desplazan hacia el polo negativo, arrastrando el agua de solvatación asociada. La observación macroscópica es un movimiento global del

tampón en el interior del capilar. El valor de μ_{eo} puede calcularse mediante la siguiente expresión

$$\mu_{eo} = \frac{\chi}{\eta} \psi(x)$$

donde χ es la constante dieléctrica del medio y $\psi(x)$ es la diferencia de potencial eléctrico generada entre la pared del capilar y el tampón a la distancia x de la pared. Este parámetro es el que controla el valor del flujo electroosmótico.

El tiempo de migración, t_m , que una sustancia requiere para recorrer una distancia l desde la entrada del capilar al punto de detección puede determinarse mediante:

$$t_m = \frac{l}{(\mu_{eo} \pm \mu_e)E}$$

Por lo tanto, cuanto mayor sea el campo eléctrico aplicado menor será el tiempo de migración de las sustancias, es decir, más rápido será el análisis. Las sustancias que se separan en la misma dirección que el flujo electroosmótico (cationes) tendrán tiempos de migración menores, mientras que los que lo hacen en contra (aniones) permanecerán más tiempo dentro del capilar si el valor de la movilidad electroosmótica es mayor que el de la electroforética. Las sustancias cuya movilidad electroforética sea mayor y de sentido contrario a la movilidad electroosmótica permanecerán en el capilar un tiempo infinito. Las sustancias sin carga se desplazan solidariamente con el flujo electroosmótico.

Las principales limitaciones de la técnica son:

1. Baja reproducibilidad y baja sensibilidad a la concentración.
2. Tendencia a la adsorción de los analitos sobre la pared del capilar.
3. Falta de selectividad para sustancias con distinto peso molecular pero igual relación carga/masa.
4. No permite la separación entre sustancias neutras.

2.3 Electrocromatografía cinética micelar (MEKC)

La electrocromatografía cinética micelar es una modalidad de electroforesis capilar que fue diseñada en un principio para la separación de sustancias neutras⁸, aunque también puede ser utilizada para analizar sustancias cargadas. En este apartado se explicará el comportamiento de las sustancias neutras en contacto con las micelas por ser el más sencillo. A todas las interacciones descritas a continuación habrá que añadirles las interacciones de tipo iónico entre el analito y las micelas, las cuales mejoran sensiblemente la selectividad.

La MEKC (Figura 3.2) incorpora un detergente en el tampón de separación en una concentración superior a su concentración micelar crítica. Las micelas formadas actúan como una pseudofase estacionaria que se desplaza a lo largo del capilar. Los analitos sin carga interactúan con la micela por hidrofobicidad y sus movilidades electroforéticas se modifican de acuerdo con sus solubilidades en la micela. Cada sustancia interactúa con la micela en función de su coeficiente de reparto específico, obteniéndose de esta manera una movilidad específica que permite su separación.

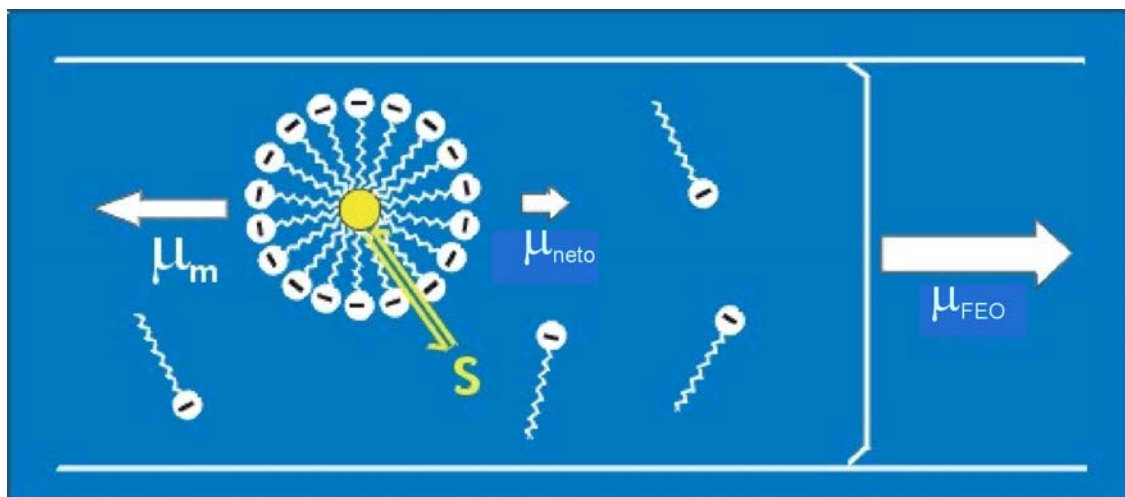


Fig. 3.2: Esquema básico de los fenómenos que tienen lugar en el interior de un capilar de electrocromatografía micelar. (S) soluto, (μ_m) movilidad de la micela, (μ_{neto}) movilidad global, (μ_{FEO}) movilidad del flujo electroosmótico.

El comportamiento de tres sustancias neutras que interaccionan de forma diferente con las micelas sería:

1. Un compuesto N que no interacciona con las micelas y cuyo tiempo de migración correspondería al del flujo electroosmótico ($t_N = t_0$).
2. Un compuesto T que interacciona irreversiblemente con la micela y que tendrá el mismo tiempo de migración que ella, ($t_T = t_{mc}$)
3. Un compuesto S (Figura 3.2) que interacciona parcialmente con la micela, cuyo tiempo de migración dependerá del coeficiente de reparto del compuesto entre el tampón y la micela, en cuyo caso $t_0 < t_S < t_{mc}$. A la diferencia de los tiempos $t_{mc} - t_0$ se le denomina ventana de separación y es el intervalo de tiempo en el que todas las sustancias neutras pueden aparecer en el electroforegrama.

Esta técnica puede realizarse con micelas de distinto tipo, bien sean aniónicas, catiónicas, zwitteriónicas o neutras. También puede actuarse sobre la selectividad a través de la influencia de otros parámetros tales como aditivos orgánicos, temperatura de separación, etc.

Las sustancias a separar se reparten entre la micela y el tampón de la misma manera que en cromatografía entre la fase estacionaria y la fase móvil. El factor de retención (coeficiente de reparto) de una sustancia en MEKC queda definido como:

$$k_{MECK} = \frac{n_{mc}}{n_t}$$

donde n_{mc} es el número de moléculas de soluto en la fase micelar y n_t es el número de moléculas de soluto en el tampón.

Por último, señalar que los mayores inconvenientes de esta técnica son la mayor complejidad del tampón de separación y la existencia de una ventana de separación, en cuyo intervalo ($t_m - t_0$) deben ser separadas todas las sustancias neutras.

3 MATERIALES Y MÉTODOS:

3.1 Reactivos y muestras

Reactivos y polímeros

Todos los reactivos y polímeros utilizados para la realización de este capítulo fueron detallados en el Capítulo 1. Las tablas 3.1 y 3.2 detallan la nomenclatura de los materiales y la fracción molar de uno de sus componentes, antes y después de ser sometidos a diálisis en agua destilada durante 48 horas, para eliminar la presencia de especies de bajo peso molecular y monómero residual que no haya sido eliminado por precipitación. Para ello se utilizaron membranas de celulosa regenerada de corte por peso molecular de 3500 Daltons (Slide-A-Lyzer® Diálisis Cassette, PIERCE). Las composiciones de los copolímeros de determinaron por RMN-¹H.

	PHEMA	HA90	HA70	HA50	HA30	HA10	PAMPS
$f_{\text{HEMA alimentación}}$	1	0,90	0,70	0,50	0,30	0,10	0
$F_{\text{HEMA copolímero}}$	1	0,89	0,67	0,47	0,27	0,10	0
$F_{\text{HEMA cop_dial}}$	1	0,92	0,80	0,67	0,51	0,23	0

Tabla 3.1: Composiciones molares de HEMA en los copolímeros poli(HEMA-co-AMPS) tanto en alimentación ($f_{\text{HEMA alimentación}}$), como en el copolímero antes y después de ser dializados ($F_{\text{HEMA copolímero}}$ y $F_{\text{HEMA cop-dial}}$ respectivamente). Halladas mediante RMN-¹H a 300 MHz.

	PDMAA	DA90	DA70	DA50	DA30	DA10	PAMPS
$f_{\text{DMAA alimentación}}$	1	0,90	0,70	0,50	0,30	0,10	0
$F_{\text{DMAA copolímero}}$	1	0,89	0,73	0,52	0,31	0,09	0
$F_{\text{DMAA cop_dial}}$	1	0,89	0,75	0,57	0,39	0,16	0

Tabla 3.2: Composiciones molares de DMAA tanto en alimentación ($f_{\text{DMAA alimentación}}$) como en el copolímero en los copolímeros del sistema DMAA-AMPS sintetizados, antes y después de ser dializados ($F_{\text{DMAA copolímero}}$ y $F_{\text{DMAA cop-dial}}$ respectivamente), halladas mediante RMN-¹H a 300 MHz.

Cinéticas de polimerización

Se llevaron a cabo distintas cinéticas de polimerización en las mismas condiciones que las descritas en el Capítulo 1. De cada uno de los reactores se extrajeron muestras del medio de reacción (0,5 mL) con una jeringuilla, para evitar la oxigenación del medio, a diferentes tiempos. La reacción se paró instantáneamente con una solución de hidroquinona (20 μ L; 0,375 M) e introduciendo los viales en un baño de hielo. Las muestras se almacenaron en un congelador a -20°C hasta su análisis por electroforesis capilar. Las muestras se diluyeron 1:10 antes de ser inyectadas en la columna capilar.

3.2 Análisis por MEKC

Todas las muestras fueron analizadas por electrocromatografía cinética micelar (**MEKC**) en un equipo Beckman System 5500 (P/ACE) con detector UV ($\lambda = 200 \text{ nm}$), con inyector automático, una columna capilar de sílice fundida (Composite Metal Services) de 37 cm de longitud y un diámetro interno de 50 μm . La ventana de detección se fijó a 30 cm del punto de inyección. La temperatura externa del capilar se mantuvo a 25°C , la inyección se llevó a cabo en el ánodo por presión de nitrógeno durante 5 segundos (0,5 psi) y la separación mediante un voltaje (V) de 10 kV. Los datos se recogieron y analizaron con la ayuda de un software "System Gold" proporcionado por Beckman. Las medidas de composición se realizaron en un aparato Beckman System 5000 (P/ACE) equipado con un detector UV de fila de diodos. Se empleó la relación de absorbancias 200/220 nm para cuantificar la composición del copolímero. El capilar se lavó después de cada inyección con agua (1 minuto) y el tampón correspondiente (1 minuto).

Tampones

Todas las soluciones tampón se prepararon con agua ultrapura, purificada con un sistema Milli-Q (Millipore Corporation). Se utilizaron además tetraborato sódico, ácido bórico, dodecilsulfato sódico (SDS) y acetonitrilo, todos ellos de Sigma, en la preparación de los tampones.

La separación de especies en el sistema poli(HEMA-*co*-AMPS) se consiguió en tampón 100mM ácido bórico / tetraborato sódico a pH 9, con 80 mM SDS. El sistema poli(DMAA-*co*-AMPS) se analizó en tampón 100mM ácido bórico / tetraborato sódico a pH 9, con 100 mM SDS, al que se le añadió 5 % (v/v) acetonitrilo como modificador orgánico.

Microcones

Una solución dializada de HA50 fue centrifugada a través de un microcone de celulosa regenerada de corte por peso molecular de 10000 Da (Microcone YM10, Millipore Corporation). Tanto la fracción filtrada como la retenida por la membrana se recogieron y procesaron en las mismas condiciones que las mencionadas anteriormente.

3.3 Análisis conductimétrico

Se realizaron medidas de **intensidad de corriente eléctrica** de las muestras extraídas durante la cinética de reacción HEMA-AMPS (50:50). El capilar se acondicionó con un lavado exhaustivo con agua antes de cada medida. Seguidamente se rellenó con la muestra a analizar y se aplicó una diferencia de potencial de 10 kV entre dos viales que contenían la misma muestra. Pasado un tiempo de espera de 3 minutos para asegurar la estabilidad de la medida, se registró el valor de intensidad de corriente eléctrica.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Se llevó a cabo el análisis de los sistemas copoliméricos, poli(DMAA-co-AMPS) y poli(HEMA-co-AMPS), por MEKC. Sus estructuras químicas se encuentran detalladas en la Figura 3.3.

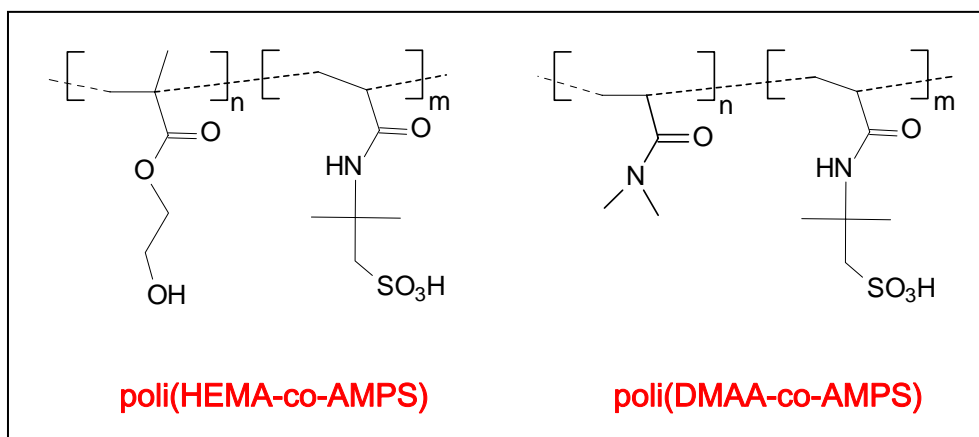


Fig. 3.3: Estructura química de los sistemas copoliméricos.

Como ya ha sido comentado, existen notables diferencias en la hidrofiliía de los tres monómeros que constituyen los sistemas: DMAA es más polar que HEMA (a pesar de que los dos monómeros son hidrosolubles, los correspondientes homopolímeros presentan un comportamiento diferente: el poli-DMAA es soluble en agua mientras que el poli-HEMA no lo es). Por otro lado, el AMPS es un ácido fuerte que se encuentra ionizado en todo el rango de pH del estudio. Además de estas diferencias de polaridad, los dos sistemas presentan un comportamiento en copolimerización muy diferente, como ya se comentó en el Capítulo 2 en base a las relaciones de reactividad calculadas.

4.1 Cinéticas de copolimerización analizadas por MEKC

Se llevaron a cabo varios experimentos para estudiar la evolución de dos reacciones de copolimerización utilizadas como referencia, con una fracción molar en alimentación inicial de 0,5. Se extrajeron alícuotas a tiempos de reacción adecuados y se analizaron por MEKC. Los dos métodos de separación por MEKC utilizados en este trabajo se desarrollaron en nuestro laboratorio probando distintos voltajes de separación y medios tamponados hasta la correcta optimización de las condiciones experimentales.

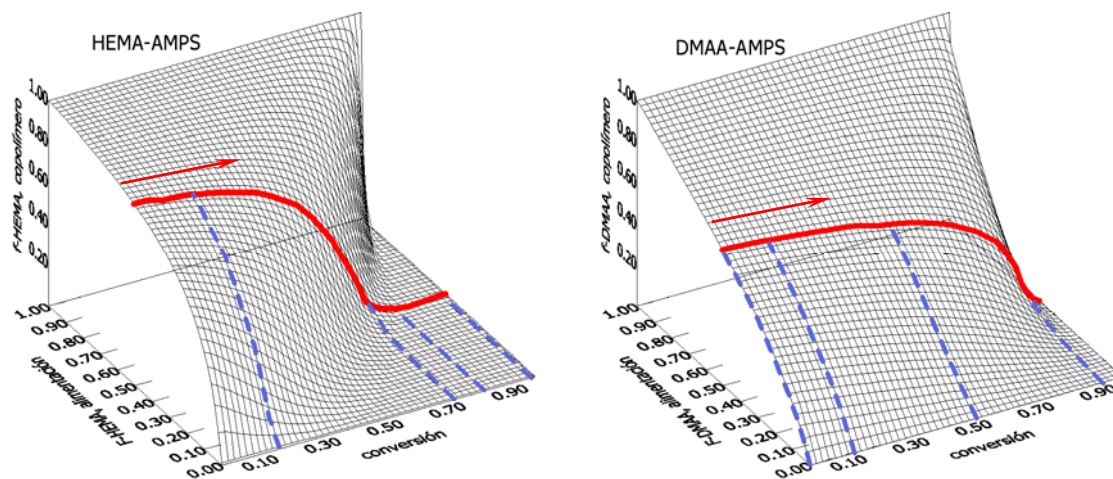


Fig. 3.4: Diagramas tridimensionales de la variación relativa de la fracción molar instantánea de HEMA o DMAA en el copolímero en función de la fracción molar inicial en alimentación y el grado de conversión. La línea continua representa el curso de una reacción equimolecular de monómeros para cada uno de los sistemas. Las líneas a trazos corresponden a los tiempos de reacción de los electroforegramas representados en las Figuras 3.6 y 3.7 (conversión 0,18_170 minutos; conversión 0,74_10 horas; conversión 0,84_13 horas y conversión 0,98_24 horas para el sistema HEMA-AMPS; conversión 0_10 minutos; conversión 0,10_30 minutos; conversión 0,50_50 minutos y conversión 0,94_240 minutos para el sistema DMAA-AMPS).

Con el fin de hacer más sencilla la interpretación de los datos obtenidos, la Figura 3.4 se muestra la variación de las fracciones molares instantáneas en el copolímero en función de la fracción molar en alimentación y la conversión para los dos sistemas objeto de estudio. En estos gráfico tridimensionales, se destaca en rojo la evolución de una reacción equimolecular de monómeros para cada uno de los sistemas. Las líneas de trazos azules muestran las conversiones de algunas de las muestras analizadas durante el estudio, que coinciden con los electroforegramas representados en las figuras 3.5 y 3.6.

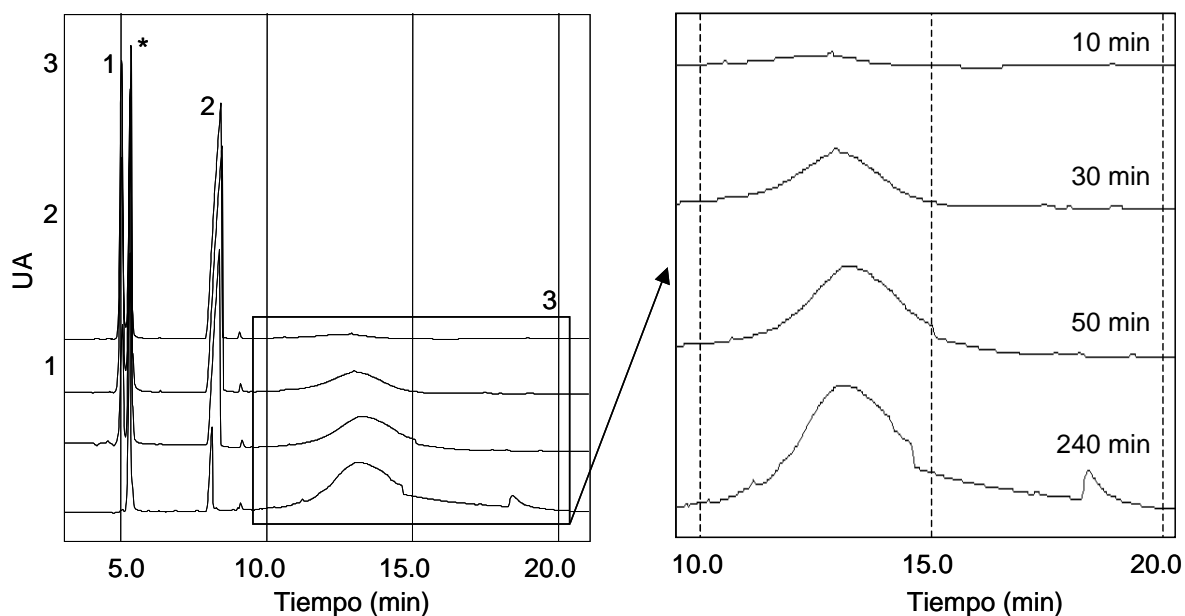


Fig. 3.5: Electroforegramas de muestras de la reacción de copolimerización DA50 a distintos tiempos de reacción. (1) monómero DMAA, (2) monómero AMPS, (*) hidroquinona, (3) región del copolímero, ampliada en la parte derecha de la Figura.

El análisis por MEKC nos permite monitorizar el consumo de monómeros en la copolimerización y por tanto, la conversión. El pico 1 corresponde al monómero DMAA en la Figura 3.5 y al monómero HEMA en la Figura 3.6, y el pico 2 corresponde al AMPS en ambas. El pico designado con un asterisco corresponde a la hidroquinona, la cual se empleó simultáneamente como inhibidor de radicales y como patrón interno.

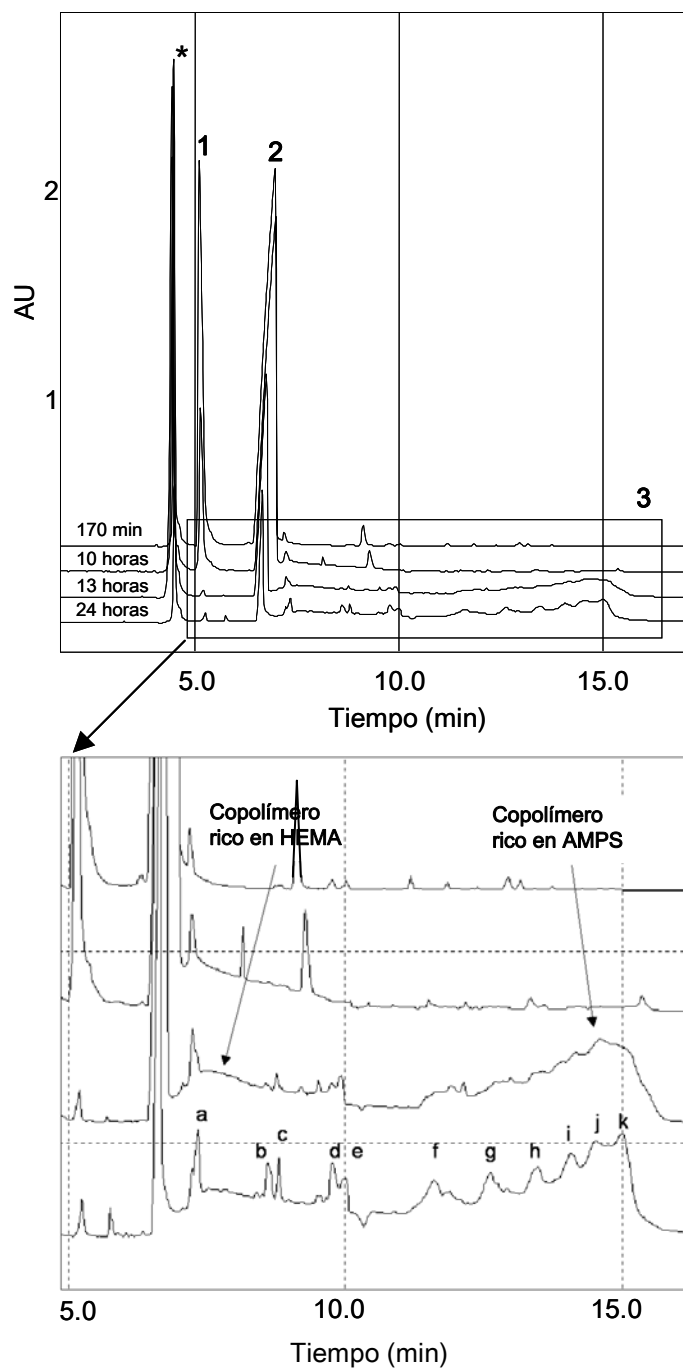


Fig. 3.6: Electroforegramas MEKC de muestras de la reacción de copolimerización HA50 a distintos tiempos de reacción. (1) monómero HEMA, (2) monómero AMPS, (*) hidroquinona, (3) región del copolímero ampliada en la zona inferior de la Figura.

La variación del área de los picos 1 y 2 frente al tiempo queda resumida en las Figuras 3.7 y 3.8, de las que pueden extraerse estimaciones cinéticas básicas: el sistema HEMA-AMPS alcanza altas conversiones después de transcurridas aproximadamente 29 horas mientras que el sistema copolimérico DMAA-AMPS lo hace después 6 horas de reacción (Figura 3.8). En cualquier caso, la información obtenida en las Figuras 3.7 y 3.8 será de gran utilidad a la hora de discutir el mecanismo de polimerización.

En el caso de la copolimerización del sistema HEMA-AMPS (Figura 3.6), las cadenas macromoleculares formadas en los primeros estadios de la reacción, de menor tiempo de análisis, es decir, de menor carga aniónica, están formadas principalmente por HEMA y corresponden en la Figura 3.4-izquierda al *plateau* superior del gráfico. Los picos que se forman después del consumo de casi todo el HEMA (*plateau* inferior del gráfico), de mayor tiempo de migración (mayor carga aniónica) están principalmente constituidos por unidades AMPS. Estos datos están de acuerdo con el consumo de monómeros presentado en la Figura 3.7, donde el monómero HEMA se consume casi en su totalidad aproximadamente a las 10 horas y media de reacción (75 % de conversión), coincidiendo con la tapa de inflexión entre el *plateau* superior e inferior de la Figura 3.4-izquierda. La formación de varios picos a altas conversiones se discutirá posteriormente.

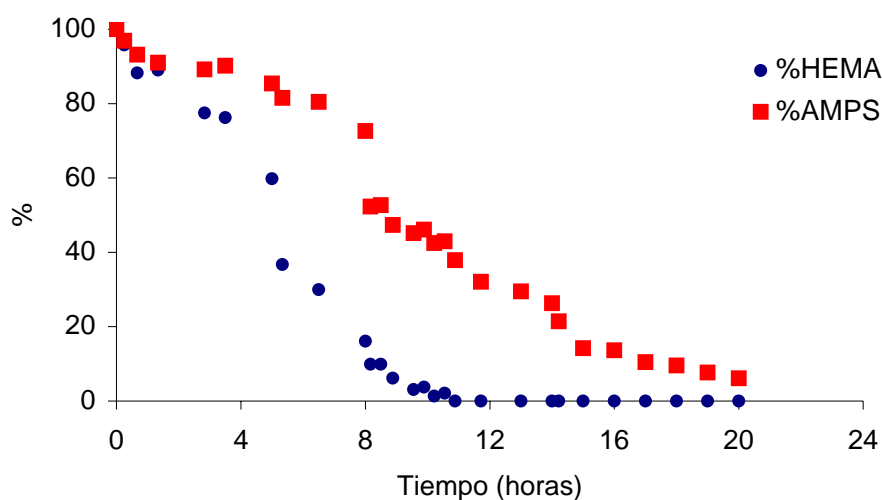


Fig. 3.7: Consumo de monómeros en función del tiempo de reacción para el sistema HEMA-AMPS

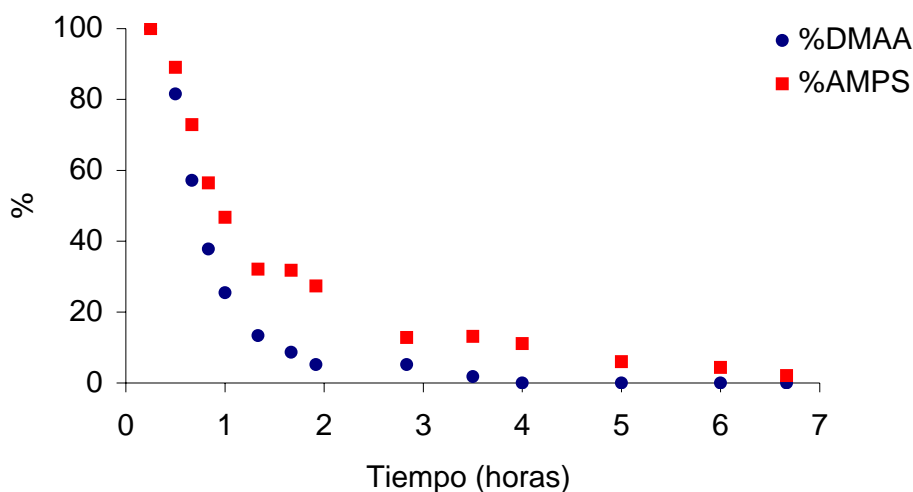


Fig. 3.8: Consumo de monómeros en función del tiempo de reacción para el sistema DMAA-AMPS

Por otra parte, las superficies tridimensionales de la Figura 3.4 predicen una copolimerización relativamente homogénea para la reacción DMAA-AMPS y la formación de dos especies en el caso de HEMA-AMPS (especies ricas en HEMA y en AMPS respectivamente). Los electroforegramas de la reacción DMAA-AMPS presentan un único pico ancho durante casi todo el transcurso de la reacción (Figura 3.5) y la aparición, en un caso, de un pico pequeño a mayores tiempos de análisis (probablemente debida a especies con una alta carga negativa) en los últimos estadios de la reacción que correspondería a la formación de especies copoliméricas ricas en AMPS, coincidiendo con los datos de consumo de monómeros de la Figura 3.8.

4.2 Análisis conductimétrico

En un trabajo anterior, Cifuentes y col. demostraron la utilidad de la electroforesis capilar para determinar la concentración micelar crítica de detergentes iónicos mediante el estudio de la variación de la conductividad con la concentración del detergente⁹.

Este tipo de experimento permite la obtención de información utilizando un volumen de muestra mínimo y de una forma limpia y rápida. Continuando con esta idea, medimos la conductividad del medio de reacción durante el proceso de polimerización

para el sistema más heterogéneo (HEMA-AMPS), lo que debería proporcionar información acerca del mecanismo de polimerización de este sistema polielectrolítico. Los resultados experimentales se representan en la Figura 3.9.

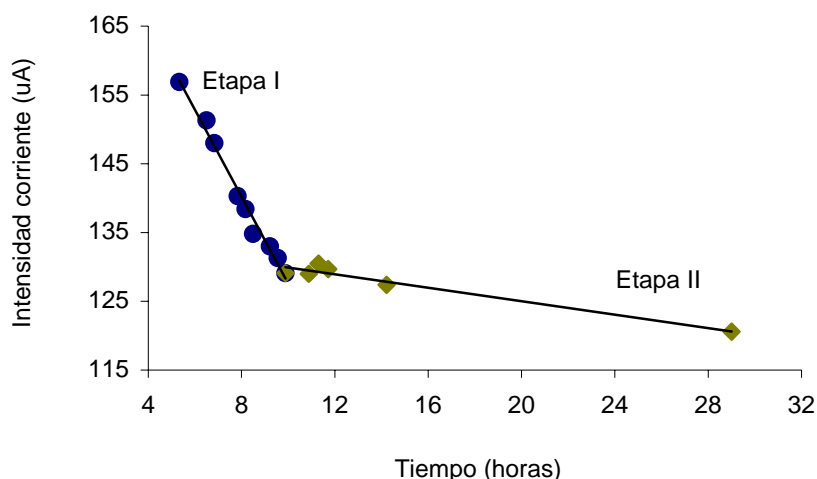


Fig. 3.9: Corriente eléctrica en función del tiempo de reacción para el sistema copolimérico HEMA-AMPS.

La disminución inicial de la intensidad de corriente está relacionada con la formación de copolímeros ricos en HEMA que incorporan pocas unidades de AMPS (Etapa I). Esta variación en la conductividad se debe a que el AMPS presenta un valor de la conductividad eléctrica, (σ), diferente en su forma monomérica que cuando está unido a un copolímero rico en HEMA. En la Etapa II, la intensidad de corriente se mantiene prácticamente constante debido a que básicamente se forman especies muy ricas en AMPS. El punto de inflexión (paso de Etapa I a Etapa II) coincide con el consumo de la mayor parte de HEMA en la Figura 3.7. Por lo tanto, estos experimentos nos proporcionan una valiosa corroboración acerca del mecanismo de polimerización heterogénea que se predijo teóricamente en la Figura 3.4-izquierda.

4.3 Influencia del peso molecular y la composición

El peso molecular juega un papel importante en la separación de especies iónicas por MEKC, ya que las moléculas son separadas según su relación carga/masa y su hidrofobicidad. En el caso de polímeros que poseen alta densidad de carga, uniformemente repartida, como en el caso de moléculas de ADN o del poliestirensulfonato, la separación electroforética de las cadenas de bajo peso molecular puede llevarse a cabo por CZE, únicamente cuando el tamaño molecular no excede de unos cuantos miles de Daltons [Stellwagen, 1997 #312]¹⁰. Para tamaños moleculares superiores, la relación carga/masa se hace constante siendo imposible la separación. En el caso de especies no cargadas y MEKC, la longitud de cadena también juega un papel importante en la separación ya que la hidrofobicidad (y como consecuencia la movilidad electroforética de los analitos) cambia con el peso molecular.

Para determinar la influencia de la región de bajo peso molecular de estos compuestos, las muestras fueron dializadas utilizando una membrana de corte por peso molecular de 3500 Daltons. Los experimentos de RMN-¹H, antes y después de la diálisis (Tablas 3.1 y 3.2), demuestran la presencia de fracciones de bajo peso molecular en ambos casos. Las Tablas 3.1 y 3.2 muestran el enriquecimiento de los copolímeros en HEMA o DMAA después de la diálisis, lo cual está de acuerdo con la pérdida de cadenas ricas en AMPS durante el proceso. Este fenómeno es más acusado para el sistema HEMA-AMPS, el cual presenta una pérdida de AMPS en todo el rango de composiciones mientras que el DMAA-AMPS presenta una pérdida significativa de AMPS para composiciones altas en este monómero.

Con el fin de ayudar a la elucidación de la región rica en AMPS en el caso del copolímeros HEMA-AMPS, una muestra de HA50 se dializó y centrífugo a través de un *microcone* de corte por peso molecular de 10000 Da.

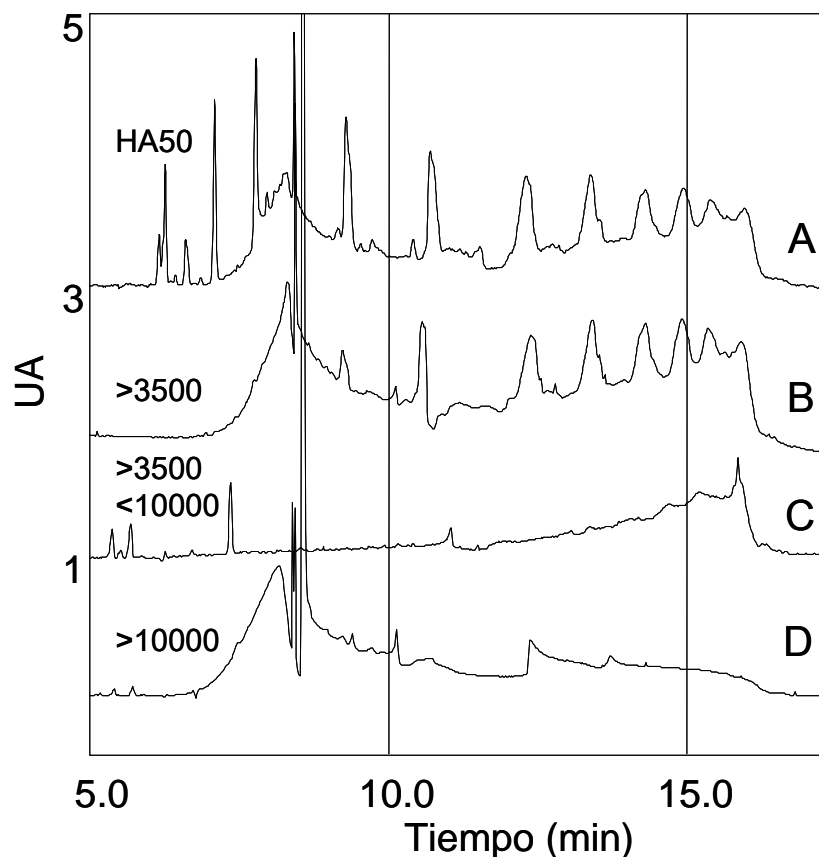


Fig. 3.10: Electroforegramas MEKC del copolímero HA50 no purificado (A), dializado a través de una membrana de corte por peso molecular de 3500 Da (B) y de esta última muestra centrifugada con centricones de corte por peso molecular de 10000 Da (filtrado (C) y retenido (D))

La Figura 3.10, muestra los electroforegramas del copolímero HA50 a alta conversión no tratado y las tres fracciones obtenidas por el tratamiento anterior (<3500, >3500<10000 y >10000). Como puede observarse, el HA50 original (Figura 3.10A) da lugar al electroforegrama Figura 3.10B después de ser dializado, donde los picos correspondientes a los monómeros y oligómeros cortos ($t_m < 8$ minutos) son eliminados. Esta muestra dializada se centrifuga a través de un *microcone* de 10000 Da de corte por peso molecular. El filtrado, de peso molecular entre 10000 y 3500, da lugar al electroforegrama Figura 3.10C, donde aparece la fracción rica en AMPS (mayores tiempos de migración). En la fracción retenida, con peso molecular mayor a 10000 Da (Figura 3.10D), aparecen los copolímeros ricos en HEMA. Por lo tanto, aunque la diálisis (3500 *cut-off*) del copolímero no varía demasiado el aspecto del electroforegrama, la centrifugación a través del *microcone* (10000 *cut-off*) da lugar a dos fracciones muy diferentes. Además, la aparición de especies de bajo peso molecular

parece estar relacionado con altos contenidos en AMPS, mientras que los mayores tamaños moleculares lo están con el contenido en HEMA.

La formación de macromoléculas de cadena corta en composiciones ricas en AMPS se debe a la utilización de isopropanol como co-solvente en la reacción de copolimerización radical. Este co-solvente fue elegido por un lado por su baja toxicidad, ya que ha sido clasificado por la FDA como clase 3 (menor toxicidad)¹¹ y es comúnmente utilizado en preparaciones farmacéuticas y en formulaciones de algunos productos del hogar^{12,13}. Por otro lado, se ha escogido este disolvente por el interés biomédico de los copolímeros, los cuales se pretenden eliminar a través del riñón una vez ejercida su función, Para ello, sería necesario conseguir un peso molecular inferior al límite glomerular, el cual se encuentra alrededor de 30000-40000 Da¹⁴. Una de las formas más comunes de obtener polímeros sintéticos con pesos moleculares relativamente bajos, es la utilización de disolventes con una alta constante de transferencia, como el isopropanol¹⁵. El AMPS, además, presenta baja reactividad en copolimerización radical no sólo por su naturaleza acrilamida, sino también por poseer un grupo lateral ionizado que le hace poco reactivo en medios de reacción polares debido a la repulsión electrostática. Por otro lado, la transferencia al isopropanol debe aumentar al aumentar el número de radicales terminados en AMPS, (así como con la conversión, ya que se incrementarían las restricciones de difusión de dichas especies cargadas en medios polares). El aumento de la relación de transferencia debido a altas concentraciones de radicales terminados en AMPS, se produce en los últimos estadios de la reacción o cuando la fracción molar inicial de AMPS es alta para el sistema DMAA-AMPS.

Para determinar la influencia del medio de reacción, se llevó a cabo una copolimerización radical adicional del sistema HEMA-AMPS utilizando metanol, en vez de isopropanol, como co-solvente. La transferencia al metanol es mucho menor¹⁵ debido a que se trata de un alcohol de cadena corta incapaz de estabilizar radicales libres como lo hace el isopropanol. En la Figura 3.11 se encuentran representados los respectivos electroforegramas. La reacción que se llevó a cabo en agua:metanol (50:50) no presenta la distribución de picos agudos a altos tiempos de análisis, y todo el copolímero rico en AMPS se desplaza a altos tiempos de migración lo que está de acuerdo con un mayor peso molecular. La membrana de diálisis y el tratamiento con

microcones no extrajeron fracciones de bajo peso molecular. Este experimento corrobora que la distribución de picos que surgen a lo largo del electroforegrama son fracciones de bajo peso molecular.

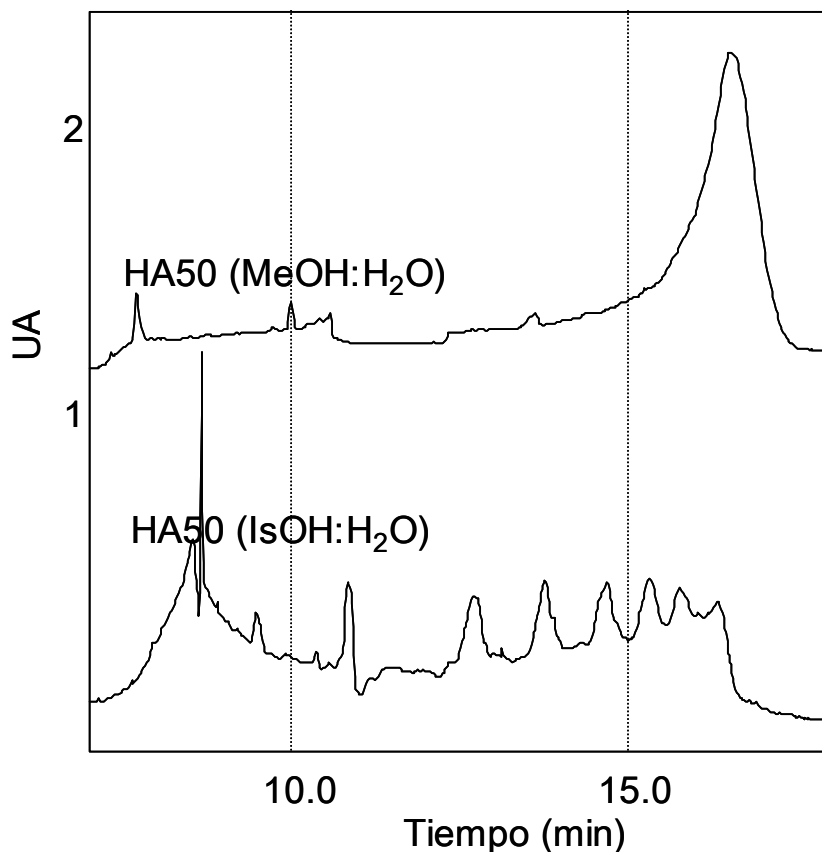


Fig. 3.11: Electroforegramas MEKC del copolímero HA50 sintetizado en metanol/agua (1:1) e isopropanol/agua (1:1).

Se realizaron una serie de análisis por MEKC de muestras a alta conversión con el fin de estudiar el efecto de la composición. Las muestras sintetizadas en todo el rango de composiciones en alimentación se dializaron (corte por peso molecular de 3500) con el fin de eliminar todo el monómero residual así como los oligómeros formados. Las Figuras 3.12 y 3.13 representan los electroforegramas correspondientes a los sistemas DMAA-AMPS y HEMA-AMPS respectivamente.

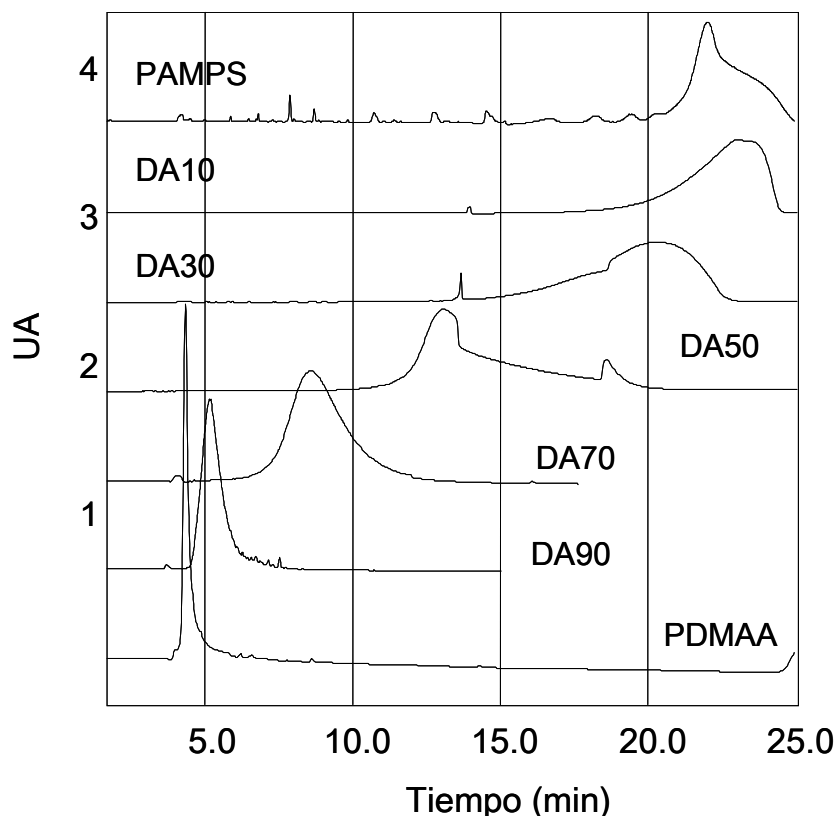


Fig. 3.12: Electroforegramas MEKC de muestras copoliméricas DMAA-AMPS sintetizadas a alta conversión.

Las diferencias en los procesos de polimerización comentadas anteriormente quedan ratificadas en las Figuras 3.12 y 3.13. La copolimerización DMAA-AMPS (Figura 3.12) conduce a una distribución de secuencias homogénea (tal y como se describió en la Figura 3.4-derecha), presentando un solo pico que se desplaza a tiempos de análisis que dependen de la composición media (los homopolímeros PAMPS y PDMAA fueron utilizados como referencia). Al aumentar el contenido en AMPS, aumenta la carga negativa de las especies macromoleculares y aumenta el tiempo de análisis (y con un solo pico electroforéticamente diferente, excepto para DA50, que presenta un pequeño pico a mayores tiempos y que ha sido comentado anteriormente). Este gráfico demuestra la utilidad de MEKC para diferenciar entre copolímeros relativamente homogéneos de composición diferente.

El sistema HEMA-AMPS, en cambio, presenta electroforegramas con un perfil de picos más complejos (Figura 3.13) y que también varía con la composición. Un primer análisis nos dice que al incrementarse el contenido en AMPS, aumenta el área de las fracciones ricas en AMPS (a mayores tiempos de análisis). Por otra parte, parece que se produce un aumento en la concentración de ciertas especies y la disminución de otras (y no únicamente el desplazamiento de un pico como sucede en el caso del DMAA-AMPS). Esto puede interpretarse como un cambio en el balance de concentración de las distintas especies y no sólo en su composición media. En definitiva, en este caso, MEKC es capaz de separar especies electroforéticamente diferentes formadas durante la reacción y monitorizar su dependencia con la composición inicial en alimentación.

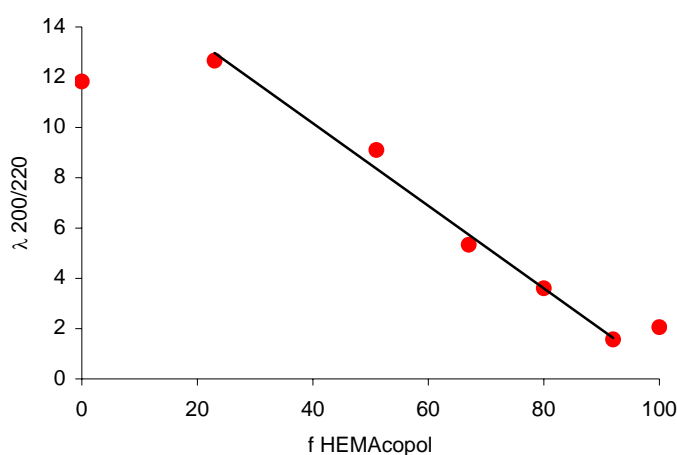


Fig. 3.14: Curva de calibrado utilizando el cociente 200 nm/220 nm tal y como se describe en Materiales y Métodos.

Llegado este punto ha de hacerse hincapié en los coeficientes de extinción molar (ϵ) de los distintos componentes: AMPS posee un ϵ aproximadamente dos veces superior al del HEMA o al de la DMAA a la longitud de onda seleccionada. Esta es la razón de la mayor señal detectada para AMPS a la longitud de onda empleada, obteniéndose áreas mucho mayores para copolímeros ricos en AMPS que para copolímeros ricos en cualquiera de los otros dos monómeros. Aprovechando la diferencia existente entre los espectros UV del poli-AMPS y del poli-HEMA, ha sido posible estimar la composición de cada pico de la Figura 3.13 (los números insertados en la Figura corresponden a datos estimados de composición de HEMA). Para ello, se utilizaron medidas de absorbancia a 200 y 220 nm para construir la curva de calibrado representada en la Figura 3.14. Se emplearon para ello homopolímeros y copolímeros

sintetizados a alta conversión. De este modo se han obtenido datos de composición química aproximada utilizando un detector UV de filas de diodos con el que se registraron valores de absorbancia a 200 y 220 nm simultáneamente. Debe tenerse en cuenta que los datos de composición estimados son aproximados ya que la curva de calibrado se aleja de la linealidad en composiciones cercanas a los homopolímeros, por lo que sólo puede utilizarse para composiciones intermedias (los picos designados como H o A en la Figura 3.13, corresponden a copolímeros ricos en HEMA o AMPS respectivamente, cuyas composiciones no pudieron ser determinadas por la falta de linealidad en la curva). Cabe destacar que la composición molar en AMPS por encima de la cual la movilidad electroforética se hace constante es 50-60. Esto está en concordancia con los fenómenos predichos por la Ley de Manning¹⁶ y con los resultados obtenidos por Whitlock y Wheeler³ para el sistema HEMA-AMPS por isotacoforesis, lo que parece confirmar la utilidad de este método.

De los datos de composición aproximada puede concluirse como regla general que a medida que aumenta el contenido en AMPS, aumenta el tiempo de análisis. Los picos correspondientes a fracciones muy ricas en AMPS son principalmente cadenas de bajo peso molecular (Fig. 3.11).

Las fracciones ricas en HEMA (H en la Fig. 3.13) no presentan una marcada dependencia trivial con la composición. HA90 a pesar de poseer un bajo contenido en AMPS, se desplaza a tiempos de migración mayores que el HA70 y el HA50. Esto se debe a la capacidad de MEKC de separar cadenas poliméricas según su hidrofobicidad (el poli-HEMA no es hidrosoluble) y en el caso de copolímeros más hidrofóbicos la interacción con las micelas empieza a cobrar gran importancia. Por lo tanto, para polímeros más hidrofóbicos, a medida que aumenta la hidrofobicidad de la macromolécula, aumenta la interacción con el SDS, disminuye la movilidad electroforética y por tanto aumenta el tiempo de migración.

En este capítulo se demuestra la capacidad de MEKC para caracterizar reacciones de copolimerización en las que intervienen especies iónicas. Se han estudiado los sistemas HEMA-AMPS, DMAA-AMPS, su evolución con la conversión, así como la formación de especies de bajo peso molecular. La técnica aprovecha dos factores opuestos que influyen en el tiempo de análisis (la carga de la molécula y su hidrofobicidad) para obtener una valiosa información acerca de la distribución de composiciones químicas del sistema.

5 BIBLIOGRAFÍA

- 1)Tonelli A.E. *NMR spectroscopy and polymer microstructure: the conformational connection* New York, 1989.
- 2)Braun D., Krämer I., Pasch H. *Macromol Chem Phys* **2000**, 201(10), 1048-1057.
- 3)Whitlock L.R., Wheeler L. M. *Journal of Chromatography* **1986**, 368, 125-134.
- 4)Staggemeier B., Huang Q. R., Dubin P.L., Morishima Y., Sato T. *Anal Chem* **2000**, 72, 255-258.
- 5)Grosche O., Bohrisch J., Wendler U., Jaeger W., Engelhardt H. *Journal of chromatography A* **2000**, 894, 105-116.
- 6)Gallardo A., Lemus R., San Román J., Cifuentes A., Díez-Masa J.C. *Macromolecules* **1999**, 32, 610-617.
- 7)Terabe S., Otsuka K., Ichikawa K., Tsichiya A., Ando T. *Anal Chem* **1984**, 56, 113.
- 8)Terabe S., Chen N., Otsuka K. *Adv Electrophoresis* **1994**, 7, 87.
- 9)Cifuentes A., Buján J. L., Díez-Masa J.C. *Analytical Chemistry* **1997**, 69, 4271-4274.
- 10)Stellwagen N. C., Gelfi, C.; Righetti, P.G. *Biopolymers* **1997**, 42, 687-703.
- 11)Viovy, J. L. *Rev Mod Phys* **2000**, 72, 813-872.
- 12)*Guidance for the Industry Q3C Impurities: Residual Solvents*; US Federal Register, 1997; Vol. 62 FR67377.
- 13)Kirk R.E., Othmer D. F. *Encyclopedia of chemical technology*; 3rd Ed. ed.; Wiley Interscience: New York, 1978-1984.
- 14)Santodonato J. "Monograph on human exposure to chemicals in the workplace: isopropyl alcohol," Center for Chemical Hazard Assessment, Syracuse; Research Corporation, 1985.
- 15)Seymour L.W. *Systemic cancer therapy using polymer-based prodrugs and progenies*; Dumitriu S., D. M., Ed.: New York, 2002, pp 843-850.
- 16)Brandrup J., Immergut E. H., Grulke E.A. *Polymer Handbook*; 4th ed.; Wiley, 1999.
- 17)Manning G. S. *Acc. Chem. Res.* **1979**, 12, 443.
- 18)Kok W.T., Stol R. *Analytical Chemistry* **2000**, 72(13), 468A-476A.

CAPÍTULO 4

EVALUACIÓN DE LOS COPOLÍMEROS THEMA-AMPS PARA SU APLICACIÓN COMO RECUBRIMIENTOS DE PRÓTESIS VASCULARES DE PEQUEÑO DIÁMETRO

CAPÍTULO 4: EVALUACIÓN DE LOS COPOLÍMEROS THEMA-AMPS PARA SU APLICACIÓN COMO RECUBRIMIENTOS DE PRÓTESIS VASCULARES DE PEQUEÑO DIÁMETRO

1	INTRODUCCIÓN.....	115
1.1	Propiedades y mecanismo de acción del Triflusal	117
2	MATERIALES Y MÉTODOS:	119
2.1	Medidas de hinchamiento.....	119
2.2	Estudio de la liberación del fármaco	119
2.3	Medidas de ángulo de contacto	120
2.4	Recubrimiento de las prótesis.....	120
2.5	Adhesión plaquetaria	120
2.6	Ensayos de biocompatibilidad <i>in vivo</i>	121
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	122
3.1	Medidas de ángulo de contacto	122
3.2	Estudio del hinchamiento y la liberación	125
3.3	Adhesión de plaquetas	128
3.4	Compatibilidad <i>in vivo</i> de los implantes copoliméricos.....	131
3.4.1	Observación macroscópica.....	132
3.4.2	Observación microscópica.....	133
4	BIBLIOGRAFÍA	136

1 INTRODUCCIÓN

La trombosis es uno de los mayores problemas asociados al uso de biomateriales como prótesis vasculares¹. Para prevenir la formación de coágulos sanguíneos suele administrarse un anticoagulante como la heparina. Sin embargo, no se recomienda la administración de altas concentraciones de heparina debido a que provoca efectos secundarios graves como trombocitopenia o hemorragia². Por este motivo, la investigación se ha dirigido hacia la síntesis de superficies antitrombogénicas que no necesiten la administración de agentes anticoagulantes, mediante el desarrollo de sistemas de liberación controlada de este tipo de fármacos³⁻⁵.

El desarrollo de nuevos materiales con buenas propiedades en contacto con la sangre requiere el diseño de materiales no trombogénicos con una alta fiabilidad⁶. Se han llevado a cabo numerosas estrategias para mejorar la antitrombogéneidad de dichos materiales, especialmente la de los utilizados en fabricación de prótesis de pequeño diámetro (4 mm o menos).

En el diseño de prótesis vasculares se suele utilizar politetrafluoroetileno expandido (PTFEe) ya que su estabilidad y propiedades mecánicas son excelentes y presenta una baja incidencia de oclusión por trombosis o hiperplasia de la capa íntima vascular. Sin embargo, estos fenómenos sí ocurren con prótesis de PTFEe de pequeño diámetro, no siendo recomendable su utilización como *bypass* o en la reconstrucción del árbol vascular por debajo de la rodilla. El fracaso asociado a este tipo de prótesis podría deberse a que un aumento de la relación superficie/volumen produce un aumento en la velocidad de activación de los factores de coagulación, complemento, plaquetas... ya que chocan contra una superficie menos tromborresistente que una vena normal, o que la disminución del flujo en las vasos de pequeño diámetro produce un aumento en el tiempo de contacto de los componentes de la sangre con la superficie, que puede activar los procesos de agregación o coagulación. En la actualidad las investigaciones se dirigen hacia la modificación superficial del PTFEe, de manera que se mantengan las propiedades fisicoquímicas del mismo, disminuyendo la adhesión proteica y plaquetaria fundamentalmente, disminuyendo de esta forma, la trombogéneidad del material.

La modificación superficial puede realizarse mediante modificación química, injerto, recubrimiento con polímeros con grupos funcionales adecuados o adsorbiendo selectivamente moléculas biológicamente activas o biomiméticas⁷. Uno de los métodos más ensayados consiste en la **inmovilización de grupos sulfónicos** en la superficie que se encontrará en contacto con la sangre. Estos grupos se incorporan con la intención de conseguir cierta similitud con la heparina, cuyos grupos sulfónicos han sido asociados a su actividad anticoagulante⁸⁻¹³. Estos grupos, repelen la adsorción de proteínas, la adhesión de células e inhiben factores de coagulación por repulsión electrostática.

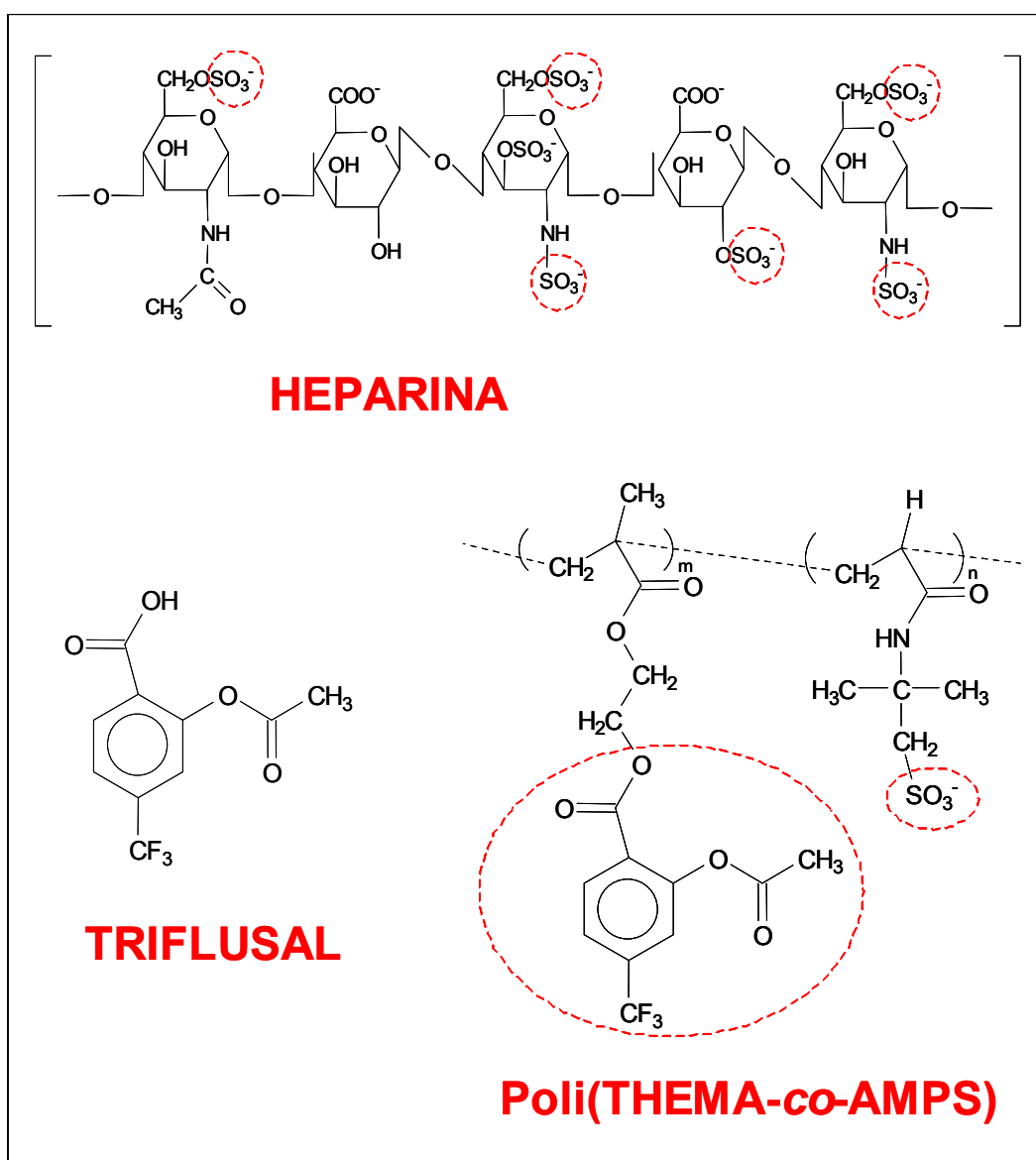


Figura 4.1: Estructura química de la heparina, el Triflusal y del sistema copolimérico poli(THEMA-co-AMPS), objeto de estudio en este capítulo.

Por otro lado, se han **inmovilizado** en el lumen de los vasos sintéticos diversos **agentes que, bien inhiben la adhesión o agregación plaquetaria** como la aspirina o la prostaciclina, **bien estimulan la anticoagulación** como la heparina, **o la fibrinólisis** como la urokinasa, **o bien inhiben la hiperplasia del íntima vascular** como la fracción no anticoagulante de la heparina¹⁴. Nuestro grupo ha demostrado recientemente que la aplicación de recubrimientos poliméricos derivados del ácido acetilsalicílico y del Triflusal (Disgren®) en la superficie interior de prótesis vasculares de pequeño diámetro, disminuye la adhesión y agregación de plaquetas en su superficie¹⁵⁻¹⁷. En estos sistemas, el agente activo se une covalentemente al esqueleto de un polímero bioabsorbible por polimerización directa de la droga funcionalizada con otro monómero biocompatible. Así, se obtienen materiales no sólo con actividad farmacológica sino también con propiedades de dosificación controlada de fármaco, capaces de mantener un nivel elevado de droga en plasma durante largos periodos de tiempo de forma controlada, es decir, sin alcanzar niveles tóxicos ni caer en por debajo de los niveles efectivos.

El sistema copolimérico poli([(2-acetiloxi)-4-trifluorometil]benzoato de metacrililoiloxietilo)-*co*-ácido 2-acrilamido-2-metilpropano sulfónico (poli(THEMA-*co*-AMPS)) fue sintetizado con el fin de combinar ambas estrategias. Es decir, se han incorporado simultáneamente y de manera covalente grupos sulfónicos y un fármaco antiagregante (Triflusal). Este sistema es atractivo como recubrimiento farmacológicamente activo de prótesis vasculares y/o como sistema de liberación de controlada de Triflusal. En este capítulo se realiza un estudio preliminar que evalúa cuatro copolímeros estadísticos del sistema THEMA-AMPS. Para ello se estudió la cinética de liberación *in vitro* del fármaco anclado al esqueleto polimérico, se evaluaron las propiedades antiagregantes en condiciones estáticas y la biocompatibilidad *in vivo* empleando rata Wistar como modelo experimental.

1.1 Propiedades y mecanismo de acción del Triflusal

Con el fin de inhibir los procesos cardiovasculares trombogénicos se han desarrollado numerosos fármacos antiagregantes plaquetarios, entre ellos el Triflusal. Este fármaco está relacionado estructuralmente con el ácido acetilsalicílico y por tanto,

forma parte de la familia de los salicilatos. Su espectro de acción es diferente al del ácido acetil salicílico ya que presenta acción antiagregante plaquetaria pero carece de actividad antiinflamatoria. Su síntesis surge a mediados de los años 70 con el fin de encontrar un fármaco antiagregante plaquetario con menos efectos secundarios que la aspirina. Resultó ser una excelente alternativa ya que posee una acción más selectiva sobre la ciclooxigenasa plaquetar frente a la endotelial.

Las plaquetas se activan principalmente por estimulación del ciclo del fosfatidilinositol, que origina la formación del inositol-trifosfato (IP_3) y activa la síntesis del tromboxano A_2 (T_xA_2) que es una de las moléculas endógenas con actividad vasoconstrictora y procoagulante más potente. El T_xA_2 facilita la salida del calcio al citoplasma plaquetario y provoca la agregación de las plaquetas, proceso mediado por el complejo receptor glucoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa). Por otro lado, existe un mecanismo defensivo que es el sistema AMP_c/GMP_c que tiende a preservar el calcio dentro de sus depósitos evitando así la agregación plaquetaria. Los principales responsables de esta activación son por un lado la prostaciclina y la adenosina, que elevan los niveles de AMP_c , y por otro el óxido nítrico endotelial que incrementa el GMP_c .

El Triflusal inhibe la agregación de las plaquetas mediante un mecanismo de acción dual: inhibición de la producción de T_xA_2 e incremento de la tasa intraplaquetaria de AMP_c . Es decir, consigue en primer lugar disminuir la producción de T_xA_2 ya que se trata de un inhibidor irreversible de la ciclooxigenasa plaquetaria por acetilación de su centro activo. Este efecto también lo presenta su principal metabolito en el organismo, el ácido 2-hidroxi-4-trifluorometilbenzónico (HTB), lo cual potencia la acción del Triflusal. Sin embargo, este fármaco apenas presenta efecto sobre la ciclooxigenasa del endotelio vascular por lo que respeta la síntesis de prostaciclina. Por lo tanto, se trata de un **inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa plaquetaria** ya que la concentración de fármaco necesaria para inhibir la función plaquetaria en un 50% es 900 veces menor que la necesaria para inhibir la síntesis vascular de prostaciclina humana. En segundo término, el Triflusal incrementa la tasa de AMP_c por inhibición de la AMP_c fosfodiesterasa plaquetaria, efecto que presenta principalmente el HTB.

2 MATERIALES Y MÉTODOS:

2.1 Medidas de hinchamiento

Se realizaron medidas de hinchamiento de los copolímeros objeto de estudio en soluciones tampón de concentración 100 mM, a pH 2, 7,4 y 10,0 y 150 mM de fuerza iónica, a 37 °C. El grado de hinchamiento se determinó gravimétricamente a distintos tiempos de análisis en términos de agua absorbida, es decir, a partir del peso de la muestra hinchada respecto de la muestra seca según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ agua absorbida} = \frac{P_i - P_0}{P_0} \times 100$$

siendo P_i el peso de la muestra hinchada a un tiempo “ t ” y P_0 el peso de la muestra seca. La superficie de las muestras se secó cuidadosamente con papel de filtro antes de cada pesada.

2.2 Estudio de la liberación del fármaco

Se estudió el proceso de liberación de fármaco en medio acuoso a pH's 2,0, 7,4 y 10,0 de los copolímeros THA80 y THA60 tomados como modelo. Se monitorizó la liberación del principal metabolito del Triflusal, el ácido 2-hidroxi-4-trifluorometilbenzónico (HTB), debido a la poca estabilidad del fármaco en medio acuoso¹⁸. Se utilizaron películas de copolímero (25 mg) dentro de un soporte de poliéster perforado, y se sumergieron en 10 ml de solución tampón. A determinados tiempos de análisis se tomaron muestras de 0,2 ml que se repusieron por medio fresco.

La cuantificación del HTB se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en fase inversa con detección ultravioleta. El equipo empleado en este trabajo constó de una bomba Perkin-Elmer LC-250, un detector UV Perkin-Elmer LC-95 y una columna Waters μ Boundapak C-18 de 3,0 \times 300 mm. Como fase móvil se utilizó una disolución metanol/solución acuosa de PIC® A (Waters) (60:40) microfiltrado y desgasificado, a una velocidad de flujo de 1 ml min⁻¹. La detección se produjo a una longitud de onda de 305 nm. Las medidas se realizaron a intervalos de

tiempo similares a los correspondientes a las medidas de hinchamiento con el fin de relacionar la influencia del grado de hidrofilia y la solubilización de los sistemas en los procesos de liberación.

2.3 Medidas de ángulo de contacto

Las medidas de contacto se realizaron utilizando el método “sessile drop” empleando disolventes de tensión superficial conocida: agua ($\gamma_L = 72,8 \text{ mJ m}^{-2}$), glicerol ($\gamma_L = 63,4 \text{ mJ m}^{-2}$) y diyodometano ($\gamma_L = 51,8 \text{ mJ m}^{-2}$). Siendo γ_L la energía libre superficial del líquido. La energía libre superficial tanto de homopolímeros como copolímeros se calcularon por el método de Owens¹⁹.

2.4 Recubrimiento de las prótesis

Las prótesis vasculares de politetrafluoroetilino expandido (PTFEe), Gore-Tex®, fueron homogéneamente recubiertas añadiendo 100 μl de disolución de polímero al 20 % (p/v) en THF o THF/etanol según la solubilidad de cada polímero. El disolvente se dejó evaporar a temperatura ambiente durante 24 horas. Este proceso se repitió dos veces. De esta forma se obtuvieron recubrimientos homogéneos con una ganancia de peso del $11,4 \pm 0,5 \%$.

2.5 Adhesión plaquetaria

Los ensayos de adhesión plaquetaria se realizaron en condiciones estáticas sobre las prótesis de Gore-Tex® previamente recubiertas con los materiales polímeros. Las prótesis se fijaron en contenedores cilíndricos de 8 mm de diámetro y 10 mm de profundidad. Se utilizó plasma rico en plaquetas (PRP) de voluntarios humanos sanos. Para ello se centrifugaron 40 ml de sangre total a 1500 r.p.m durante 4 minutos y se aisló el sobrenadante (PRP). Sobre cada una de los contenedores se añadieron 100 μl de PRP permitiendo el contacto del plasma con la prótesis vasculares durante 1 hora, 1 día y 3 días. Las muestras se mantuvieron a 37 °C en una estufa de cultivos con atmósfera de CO₂ al 5 % durante el tiempo que duró el experimento.

2.6 Ensayos de biocompatibilidad *in vivo*

Para este estudio se utilizaron 4 ratas hembra Wistar de entre 200 a 250 g de peso. En todas las ratas se implantó una pieza de material en forma de pastilla de 5 mm de diámetro previamente esterilizada sumergiéndola en etanol al 70 %. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40 mg kg^{-1} , i.p) y se les afeitó el área dorsal. Se les realizó una incisión de 1 cm de longitud en el músculo dorsal en condiciones asépticas. Las muestras se colocaron en esta cavidad y la piel se cerró con hilo de sutura. A los 15 y 60 días, se sacrificaron por sobredosis de éter de dietilo y se extrajeron los implantes junto con el tejido circundante para el posterior análisis histológico.



Figura 4.2: Fotografía del proceso de implantación del material polímero esterilizado sobre el músculo dorsal de una rata Wistar anestesiada.

El estudio histológico se realizó utilizando tinciones de hematoxilina-eosina. En primer lugar se fijaron las muestras en formol al 10% en tampón fosfato, pH 7,4, durante al menos 5 días. Las muestras se embebieron en parafina y se seccionaron en láminas de $5 \mu\text{m}$. Por último se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las muestras se observaron en un microscopio óptico (Leitz Dialux 22) y fueron fotografiadas con una película 100 ASA Kodachrome.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se sintetizaron cuatro copolímeros de contenido molar en alimentación de AMPS de 0,10, 0,20, 0,30 y 0,40, con la intención de obtener materiales polímeros con posible aplicación como recubrimiento de prótesis vasculares de pequeño diámetro. Las composiciones anteriormente mencionada se encuentran dentro del rango de insolubilidad en agua y por tanto, dentro del límite de aplicación de los materiales. La introducción de unidades AMPS en la estructura contribuye no sólo a la incorporación en las macromoléculas de grupos sulfónicos ionizados (biológicamente activos, como se mencionó anteriormente), sino también a mejorar la adhesión y aumentar la hidrofilia (humectabilidad), siendo ambas propiedades críticas en el comportamiento biológico de los materiales. El balance hidrofílico/hidrofóbico y consecuentemente la energía libre interfacial en solución acuosa, dependerá en gran medida de la composición, ya que el monómero THEMA es relativamente hidrofóbico y el AMPS es más hidrofílico debido especialmente a su naturaleza iónica .

3.1 Medidas de ángulo de contacto

La energía superficial del sólido (SES) es un parámetro clave en la interacción de un material con proteínas y células, y por tanto, en su hemocompatibilidad. Se han determinado las componentes de la energía libre interfacial de los cuatro copolímeros a partir de las medidas de los ángulos de contacto de tres líquidos de tensión superficial conocida, empleando la metodología de Owens¹⁹ que se resume mediante las siguientes ecuaciones:

$$\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p$$

$$(1 + \cos\theta)\gamma_l / 2 = (\gamma_s^d \gamma_l^d)^{1/2} + (\gamma_s^p \gamma_l^p)^{1/2}$$

donde θ es el valor del ángulo de contacto, γ_s y γ_l son la energía superficial del sólido y del líquido y γ_s^d , γ_s^p , γ_l^d y γ_l^p son las componentes dispersiva y polar de la energía superficial del sólido y del líquido respectivamente. La Figura 4.3 representa la variación de γ_s^d , γ_s^p , así como de la tensión superficial total de los materiales sintetizados en función del contenido molar en THEMA.

Los valores de los ángulos de contacto se recogen en la Tabla 4.1. La componente polar disminuye al disminuir el contenido en AMPS, de acuerdo con la disminución de la hidrofilia atribuida al componente iónico. La componente dispersiva se mantiene prácticamente constante. La SES de los copolímeros no se ajusta a la regla de aditividad molar. La desviación de los datos obtenidos experimentalmente hacia menores valores respecto de las regla teórica de aditividad molar, podría estar relacionado con reagrupamientos moleculares dentro de las cadenas, que conducirían a dominios superficiales ricos en el monómero THEMA. La tendencia que presenta el sistema a la “homopolimerización” consecutiva durante la síntesis (ya comentada en el Capítulo 2), que conduce a la formación de largas secuencias de uno y otro monómero en las cadenas macromoleculares, podría dar lugar a estos reagrupamientos moleculares.

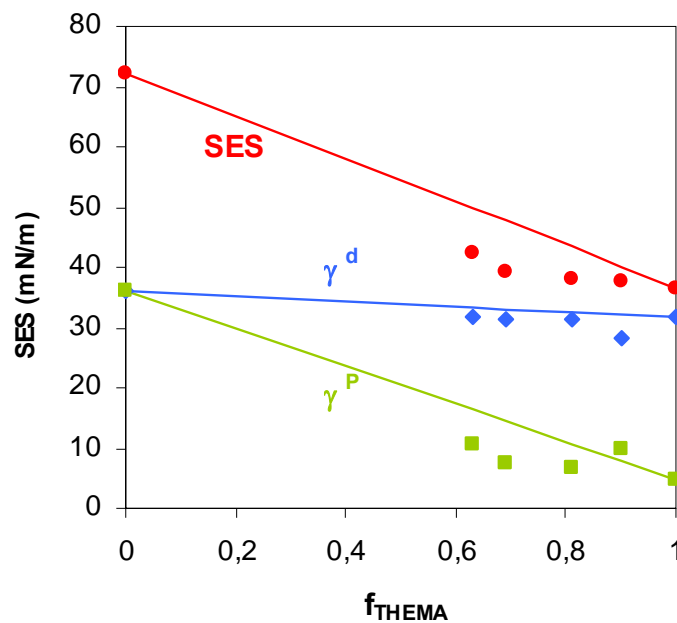


Figura 4.3: Variación de la energía superficial del sólido (●) y de las componentes dispersiva (◆) y polar (■) en función de la composición del copolímero. Las rectas corresponden a los valores teóricos calculados según la regla de adición molar.

La **tensión crítica superficial** (σ_c) es un parámetro muy valioso usado frecuentemente en la literatura en la estimación y predicción de la hemocompatibilidad de un material. A principios de los años 70, Robert Baier y sus colaboradores²⁰

desarrollaron una hipótesis que relacionaba las características superficiales y la biorreactividad. Según este autor, la compatibilidad de un material con la sangre se consigue minimizando la adhesión de los componentes sanguíneos y la superficie artificial, siendo σ_c uno de los parámetros más importantes a determinar. La hipótesis se basa en medidas de ángulos de contacto, θ , para la determinación de energías superficiales y sugiere que tensiones críticas superficiales cercanas a 22 mN/m presentan una mínima adhesión. Por ello, σ_c ha sido calculado mediante el método de Zisman²¹ y se encuentra representado en la Tabla 4.1, que expresa la media \pm el error estándar de al menos diez medidas. Este método calcula σ_c como una aproximación a la tensión superficial del sólido. Para ello se colocan gotas de líquidos con tensión superficial conocida y que difieran considerablemente entre sí, sobre el material que se desea estudiar y se mide el ángulo de contacto. Se hace una representación gráfica de la tensión superficial del líquido frente al coseno del ángulo de contacto ($\cos \theta$) obteniéndose una línea recta. Se extrapola la recta a $\cos \theta = 1$ obteniéndose así σ_c . Los valores de σ_c obtenidos para los copolímeros ensayados varían entre 26 y 33 mN/m, los cuales se encuentran dentro o cercanos del rango mínima bioadhesión y máxima hemocompatibilidad descrito por Baier (entre 20 y 30 mN/m)^{20,22}

Composición	Ángulo de contacto				σ_c (mN/m)	SES (mN/m)		
	f_{THEMA}	θ_{agua}	$\theta_{\text{glicerina}}$	$\theta_{\text{diiodometano}}$		γ_s^p	γ_s^d	γ_s
Poli(AMPS)	0	0.00 \pm 1.74	44.39 \pm 3.31	46.67 \pm 1.83	194.05	36.2	28.4	64.6
THA60	0.63	68.85 \pm 4.25	73.78 \pm 3.91	54.48 \pm 2.26	33.17	11.7	26.6	38.3
THA70	0.69	74.77 \pm 5.31	73.20 \pm 8.13	54.82 \pm 2.17	32.11	7.4	29.6	36.9
THA80	0.81	77.29 \pm 2.86	70.34 \pm 4.50	54.96 \pm 3.72	28.23	6.9	28.0	34.9
THA90	0.90	73.08 \pm 5.24	70.48 \pm 1.97	55.63 \pm 5.30	26.60	9.4	25.1	34.5
Poli(THEMA)	1	81.18 \pm 2.36	72.06 \pm 4.95	54.39 \pm 2.76	31.54	4.8	30.6	35.4

Tabla 4.1: Ángulos de contacto en agua (θ_{agua}), glicerina ($\theta_{\text{glicerina}}$) y diiodometano ($\theta_{\text{diiodometano}}$) así como energía superficial del sólido (γ_s), componente polar (γ_s^p) y dispersiva (γ_s^d) de los copolímeros poli(THEMA-co-AMPS) y homopolímeros

3.2 Estudio del hinchamiento y la liberación

Los copolímeros hinchan y alcanzan el equilibrio en medio acuoso en pocas horas, alcanzando valores de contenido en agua máximos de entre 25 y 150 %, tal y como se registra en la Figura 4.4. El grado de hinchamiento aumenta considerablemente con el contenido en AMPS, debido al mayor carácter hidrófilo del componente iónico comparado con la unidad de TH. Las cinéticas de hinchamiento siguen un perfil muy particular, alcanzando un máximo de absorción a los pocos minutos para después perder hasta un 50% del medio absorbido. Esto podría deberse al efecto del contraión o a que puedan existir fracciones de bajo peso molecular ricas en AMPS (Figura 4.5).

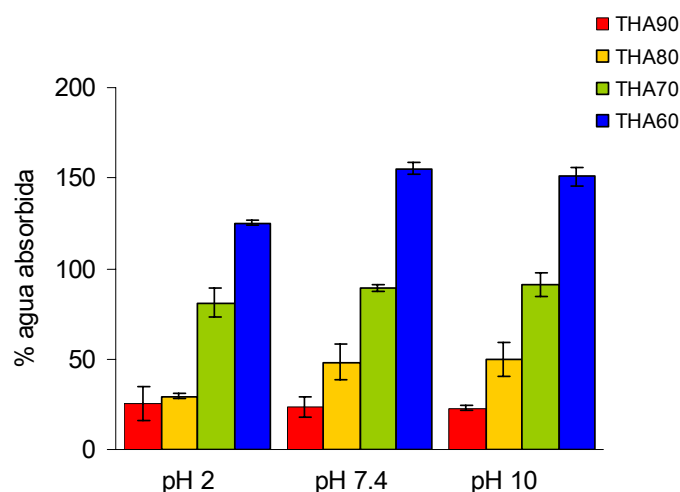


Figura 4.4: Dependencia del Hinchamiento máximo de los copolímeros THEMA-AMPS en función del pH

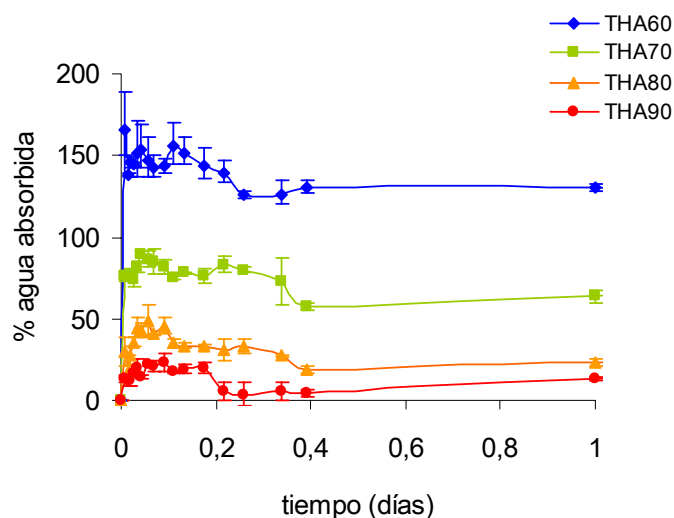


Figura 4.5: Cinéticas de hinchamiento de los copolímeros THEMA-AMPS a pH 7,4

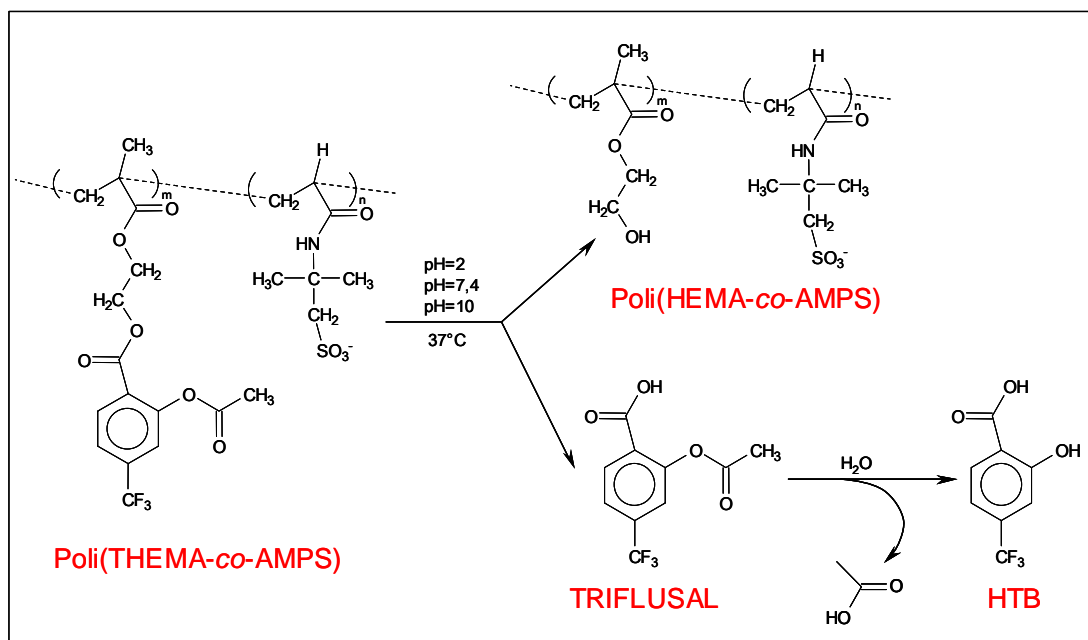


Figura 4.6: Representación esquemática de la hidrólisis de las macromoléculas en medio acuoso para dar lugar a Triflusal y a HTB, su principal metabolito.

Estos sistemas van a sufrir en medio acuoso la hidrólisis del enlace débil que une el fármaco con el esqueleto polimérico (Figura 4.6). Por ello se ha llevado a cabo el estudio de liberación *in vitro* a pH básico, fisiológico y ácido de los copolímeros THA80 y THA60. Las cinéticas de liberación se encuentran representadas en la Figura 4.7, expresadas en porcentajes (derecha) o $\mu\text{moles/g}$ de polímero (izquierda). Los materiales estudiados presentan una interesante cinética de liberación de orden cero, que a pH 7,4 se mantiene durante 6 meses. Este comportamiento resulta muy interesante a la hora de utilizar este material como recubrimiento de prótesis vasculares con actividad a largo plazo, sin embargo, siempre es arriesgado extrapolar los resultados *in vitro* al verdadero comportamiento *in vivo*.

	PH=2	PH=7.4	PH=10
THA 60	3.6	13.1	65.9
THA80	2.6	11.6	62.4

Tabla 4.2: Constantes cinéticas de liberación ($\mu\text{mol fármaco} / \text{g polímeros} \times \text{día}$)

Esta cinética de liberación de orden cero ha sido descrita con anterioridad para sistemas acrílicos similares portadores de fármacos²³ y puede atribuirse al incremento de la hidrofilia del sistema a medida que se libera el fármaco, ya que al desprenderse Triflusal al medio, la matriz polimérica cambia progresivamente de THEMA a HEMA, más polar que el monómero de partida. De la pendiente de la recta representada en la parte izquierda de la Figura, se pueden determinar las constantes cinéticas recogidas en la Tabla 4.2.

La velocidad de hidrólisis aumenta considerablemente a pH alcalino (como cabría esperar) debido a la naturaleza del enlace éster cuya susceptibilidad a ser hidrolizado aumenta a este pH. Además, la composición también ejerce gran influencia en la liberación. A mayor contenido en AMPS, mayor es el hinchamiento y mayor la velocidad de liberación. Esto se debe a que el aumento de la hidrofilia de los materiales incrementa la accesibilidad de las moléculas de agua al enlace éster susceptible de ser hidrolizado.

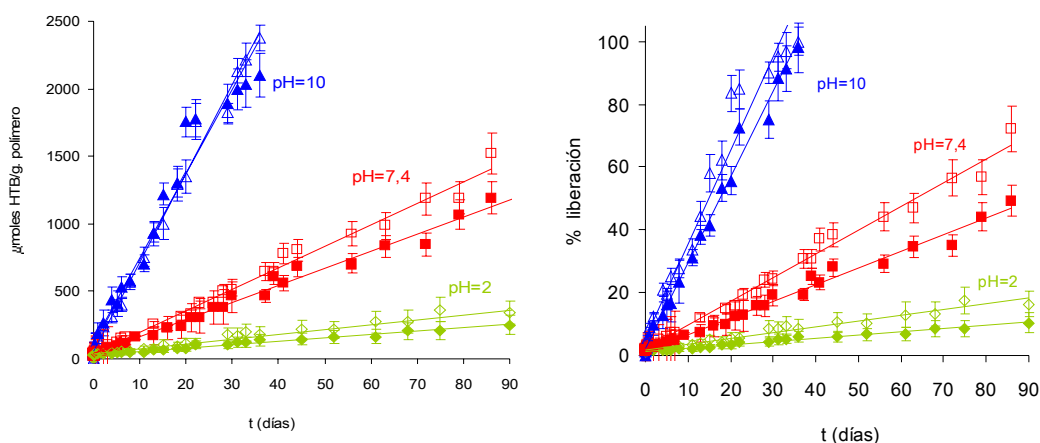


Figura 4.7: Monitorización de la liberación de TH en medios acuosos tamponados a pH 2 (\blacklozenge), pH 7,4 (\blacksquare) y pH 10 (\blacktriangle) a partir de THA60 (símbolos huecos) y THA80 (símbolos coloreados) en valores absolutos (izquierda) y en % de liberación (derecha).

Sin embargo, como el número absoluto de moléculas de fármaco aumenta al disminuir la cantidad de AMPS, los perfiles de liberación de ambos copolímeros (expresado como μg de droga/g de recubrimiento; parte izquierda de la Figura 4.7) son muy similares, debido a la relación existente entre el incremento de la hidrofilia y la disminución de moléculas de fármaco por gramo de material.

3.3 Adhesión de plaquetas

Los resultados que se obtienen de tests *in vitro* que evalúan las interacciones sangre-biomaterial, proporcionan gran información a nivel celular acerca de las interacciones plaqueta-superficie y plaqueta-plaqueta.

La adhesión plaquetar y el grado de activación de las mismas se considera un indicador de la trombogenicidad potencial del biomaterial ensayado¹⁰. Estos parámetros no son suficientes a la hora de clasificar un material como trombogénico, y no predicen la extensión de los efectos trombogénicos locales o sistémicos, pero numerosos estudios han demostrado que la acumulación y activación de plaquetas en la superficie del material a cortos intervalos de tiempos, pueden provocar el fracaso del material, especialmente en el caso de prótesis vasculares de pequeño diámetro²⁴. Por lo tanto, estos experimentos cortos deberían ser apropiados para detectar materiales altamente trombogénicos por la rápida acumulación de plaquetas activadas en su superficie.

La adhesión y grado de extensión de las plaquetas están fuertemente relacionados con su grado de activación en las superficies poliméricas. Inicialmente mantienen su forma de disco propia del estado no activado (área $10\text{-}15\mu\text{m}^2$). Cuando se activan emiten pseudópodos y adquieren forma circular (área $45\text{-}50\mu\text{m}^2$). Lin y colaboradores²⁵ describieron, entre uno y otro estado, cinco etapas de activación basándose en el grado de extensión de las plaquetas. Tanto la adhesión de las plaquetas como el grado de activación de las mismas fueron evaluados empleando ESEM.

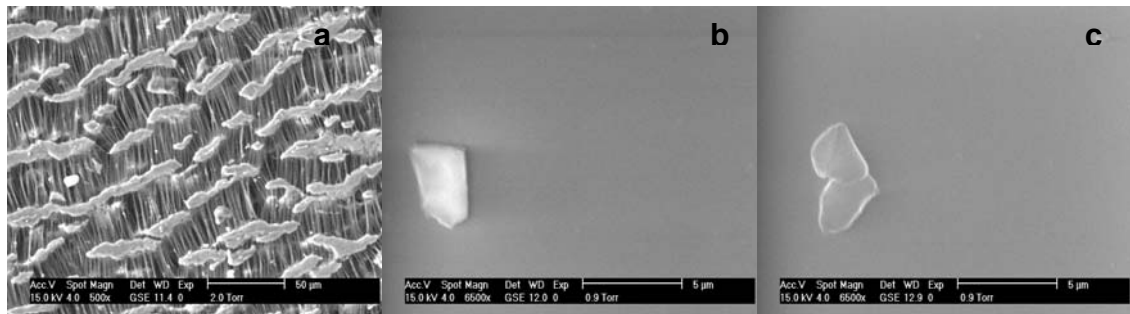


Figura 4.8: Micrografías de ESEM de las superficies de Gore-Tex®: (a) no recubierto; (b) recubierto con THA80 y (c) recubierto con THA90.

Se recubrieron prótesis de Gore-Tex® con los copolímeros obteniéndose recubrimientos homogéneos (Figura 4.8) con una ganancia de peso del $11,4\pm 0,5\%$. La serie A corresponde al control (Gore-Tex® sin recubrir) y las series B y C a las prótesis recubiertas con THA80 y THA90 respectivamente. La presencia de los grupos sulfónicos en las cadenas copoliméricas confiere una mayor adhesión de las cadenas a la superficie del Gore-Tex® comparado con el homopolímero y además, los recubrimientos son estables durante mayores periodos de tiempo. Esto fue confirmado mediante microscopía ESEM. Del mismo modo, la agregación plaquetaria en las superficies de la prótesis puede ser controlada por las características del recubrimiento. La Figura 4.9 muestra la retención de las plaquetas en la superficie de prótesis recubiertas y sin recubrir en función del tiempo. Como puede apreciarse las plaquetas están menos agregadas en el caso de las superficies recubiertas con THA80 y THA90. Además, como se observa en las micrografías, las plaquetas no han emitido pseudópodos, lo que indica la no activación de las mismas. Por lo tanto, y como ha sido descrito previamente en la literatura^{10,15}, la presencia de grupos sulfónicos y/o la liberación de Triflusal durante largos periodos de tiempo previene la adhesión y activación de las plaquetas.

3.4 Compatibilidad *in vivo* de los implantes copoliméricos

El estudio de la biocompatibilidad *in vivo* de los biomateriales y dispositivos médicos es un paso imprescindible a la hora de ensayar un material que vaya a estar implantado en humanos. A pesar de que los ensayos *in vitro* proporcionan información fundamental acerca de algunas interacciones celulares y moleculares con los biomateriales, no pueden reemplazar a los ensayos *in vivo*. Por ello, los modelos animales son necesarios ya que:

1. Deben existir interacciones de distinto tipo de células con el material implantado y entre si
2. Deben actuar factores paracrinos y endocrinos alrededor del implante
3. La implantación del material en el ser vivo altera las interacciones de las células con los componentes insolubles de la matriz extracelular y con moléculas solubles reguladoras
4. Deben existir interacciones con las células sanguíneas, proteínas y moléculas presentes en todo ser vivo

Además, el ser vivo ha de responder a:

1. El “espacio muerto” creado por el implante
2. Agentes solubles que son liberados por el material
3. Partículas insolubles liberadas del material
4. Las interacciones químicas entre la superficie del material y las moléculas biológicas que lo rodean
5. Las alteraciones en las propiedades mecánicas en el tejido circundante al implante provocado por la diferencia del módulo de elasticidad entre el implante y el tejido circundante.

Los múltiples procesos que tienen lugar en respuesta a la implantación de un biomaterial en un ser vivo, pueden resumirse en tres: (1) reacción cicatrizante al trauma post-operatorio, (2) aparición de una reacción inflamatoria crónica y (3) adaptación del tejido circundante a los cambios producidos por el implante. Se deben elegir aquellos modelos animales que mejor simulen la respuesta del cuerpo humano, seleccionando además, el lugar de implantación según la vascularidad, la naturaleza de las células

parenquimales (capacidad de mitosis y migración) ya que determinan la capacidad de regeneración, la presencia de células reguladoras y el efecto de la deformación en el comportamiento de las células parenquimales.

La simple presencia de un implante crea un espacio muerto en el tejido que atrae macrófagos hacia la interfase tejido-biomaterial. Estos macrófagos, junto con los fibroblastos que forman la cicatriz, crearán por lo general, una capa de células bien definidas que envolverá el implante. A esta reacción típica se le denomina *encapsulación fibrótica*. La presencia de macrófagos (células reguladoras) en la interfase puede influir en la respuesta a cuerpo extraño, ya que estas células tienen la capacidad de liberar agentes proinflamatorios si son estimuladas por los movimientos del material o si este libera al medio sustancias tóxicas.

Se ha elegido el músculo paravertebral de las ratas, conejos y perros como un sitio de implantación estándar para detectar el efecto de las sustancias liberadas por un implante. Debido al relativo movimiento entre el implante y el músculo, además de la limitada capacidad de regeneración del músculo esquelético, se crea tejido fibroso alrededor de la superficie del biomaterial. El grosor de la cápsula fibrosa en este lugar de implantación se ha relacionado con el movimiento relativo del implante en este emplazamiento.

Nosotros hemos elegido la rata Wistar como modelo experimental para ensayar la biocompatibilidad *in vivo* de estos materiales copoliméricos y se ha realizado un profundo estudio histológico con el fin de evaluar la respuesta tisular al biomaterial. Se han observado las características morfológicas del material implantado y del tejido a diferentes tiempos de implantación. La morfología y los patrones de tinción, tanto de las células como de la matriz extracelular, han proporcionado gran información acerca de la respuesta del tejido circundante al implante.

3.4.1 Observación macroscópica

Todas las ratas sobrevivieron al periodo de tiempo desde la intervención hasta el sacrificio. La herida, cicatrización y trauma quirúrgico fueron normales ya que no se observaron cambios visuales en el aspecto ni en el comportamiento de los animales. La

observación macroscópica de los animales a los 15 y 30 días después de la operación mostró una completa cicatrización de la herida para todos los materiales.

3.4.2 Observación microscópica

Después de 15 días *post-implantación*, el tejido circundante mostró una aguda reacción inflamatoria (Figura 4.10 y 4.11). Esta reacción es normal cuando un cuerpo extraño se implanta en un animal y tiene lugar una interacción dinámica entre el animal y el implante. Las células inflamatorias, los fibroblastos y la producción de colágeno se dispara, conduciendo a la encapsulación del material y a la correcta cicatrización del implante. Además, después de 30 días *post-implantación* (Figura 4.12 y 4.13) el grado de la reacción inflamatoria ha disminuido considerablemente y ha sido reemplazada por tejido fibrótico en los dos copolímeros. Estos resultados indican que THA60 y THA80 presentan una buena biocompatibilidad.

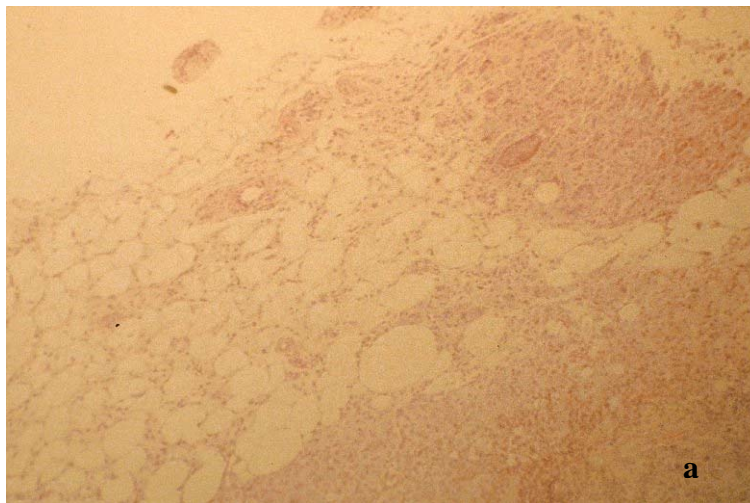


Figura 4.10: Micrografía del tejido donde THA60 fue implantado: (a) formación de una cápsula fibrosa (tinción Hematoxilina y Eosina, $\times 10$) extraído a los 15 días post-operación.

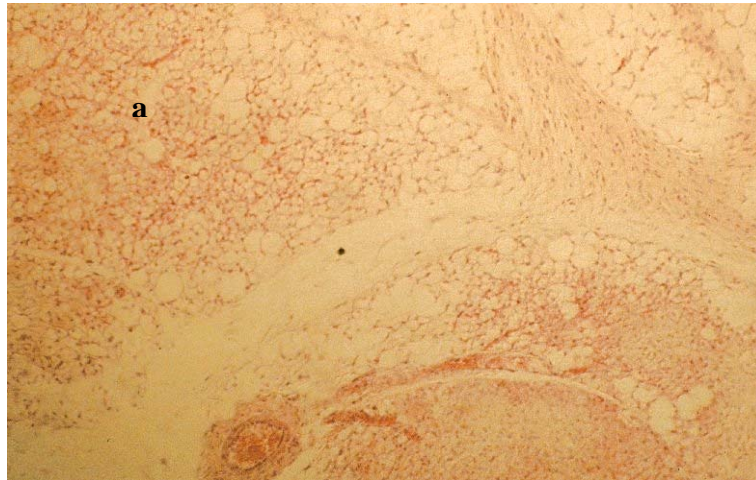


Figura 4.11: Micrografía del tejido donde THA80 fue implantado: (a) inflamación aguda (tinción Hematoxilina y Eosina, $\times 10$) extraído a los 15 días post-operación.

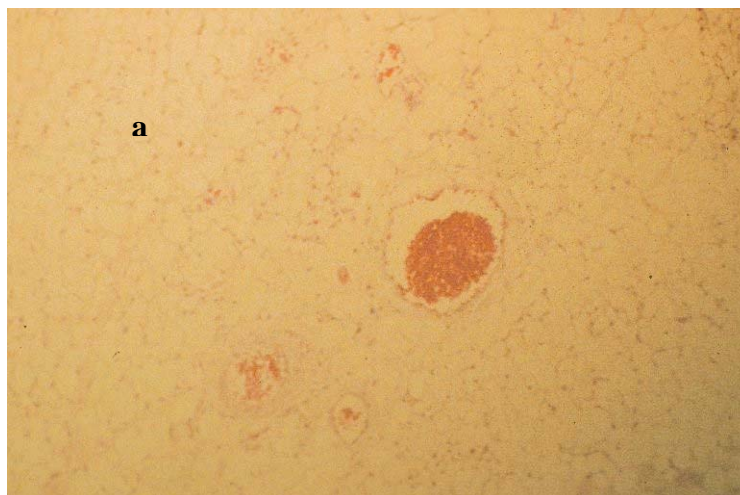


Figura 4.12: Micrografía del tejido donde THA60 fue implantado: (a) tejido normal (tinción Hematoxilina y Eosina, $\times 10$) extraído a los 30 días post-operación.

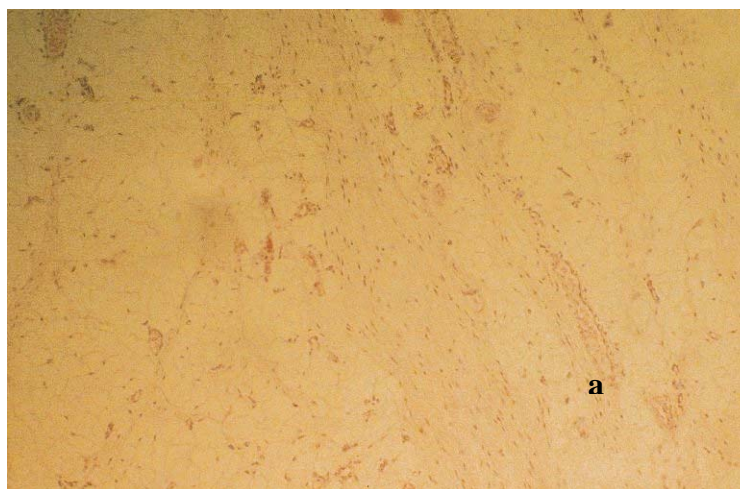


Figura 4.13: Micrografía del tejido donde THA80 fue implantado: (a) tejido normal (tinción Hematoxilina y Eosina, $\times 10$) extraído a los 30 días post-operación.

En este capítulo se han evaluado cuatro composiciones distintas del sistema poli(THEMA-co-AMPS) con posible aplicación como recubrimientos de prótesis vasculares sintéticas (Gore-Tex®) de pequeño diámetro. Estos materiales presentan estabilidad en medio acuoso y una cinética de liberación de orden cero del fármaco antiagregante (Triflusal) durante largos periodos de tiempo. Su grado de humectabilidad y tensión crítica superficial se encuentran dentro de la zona descrita por Baier como de mínima adhesión. Los datos obtenidos de agregación plaquetaria en condiciones estáticas indican que la presencia de grupos sulfónicos y la liberación del fármaco antiagregante y tal vez, la actividad en su forma macromolecular (como ha sido descrito para otros fármacos poliméricos), favorecen la no agregación de las plaquetas en la superficie de los materiales. Los ensayos de biocompatibilidad *in vivo* utilizando en rata Wistar como modelo experimental han dado lugar a resultados muy positivos.

4 BIBLIOGRAFÍA

- 1) Reynolds L.O., Newren W. H., Scolio J.F., Miller I.F. *A model for thromboembolization on biomaterials.*; 1st Ed. ed.; Cooper S.L., B. C. H., Tsuruta T., Ed.; VSP: Utrecht, The Netherlands, 1995, pp 301-317.
- 2) Chong B.H. *Br J Hoematol* **1995**, *89*, 431-439.
- 3) Makris M. *Semin Thromb Hemost* **1999**, *25 (1)*, 33-36.
- 4) Orloff L.A., Glenn M. G., Domb A.J., Esclamado R.A. *Surgery* **1995**, *117 (5)*, 554-559.
- 5) Vasudev S.C., Chandy T., Sharma C.P., Mohanty M., Umasankar P.R. *Artif Organs* **2000**, *24 (2)*, 129-136.
- 6) Yui N., Suzuki K., Okano T., Sakurai Y., Ishikawa C., Fujimoto K., Kawaguchi H. *Adsorption behavior of fibrinogen to sulfonated polyethyleneoxide-grafted polyurethane surfaces*; 1st Ed. ed.; Cooper S.L., B. C. H., Tsuruta T., Ed.; VSP: Utrecht, The Netherlands, 1995, pp 237-253.
- 7) Xue L., Greisler H. P. *Blood Vessels*; 2nd Ed. ed.; Lanza R.P., L. R., Vacanti J., Ed.; Academic Press: California, 2000, pp 427-446.
- 8) Han D.K., Ryu G. H., Park K.D., Jeong S.Y., Min B.G. *Adsorption behavior of fibrinogen to sulfonated polyethyleneoxide-grafted polyurethane surfaces*; 1st Ed. ed.; Cooper S.L., B. C. H., Tsuruta T., Ed.; VSP: Utrecht, The Netherlands, 1995, pp 181-193.
- 9) Keogh J.R., Wolf M. F., Overend M.E., Tang L., Eaton J.W. *Biomaterials* **1996**, *17*, 1987-1994.
- 10) Tamada Y., Murata M., Makino K., Yoshida Y., Yoshida Y., Hayashi Y. *Biomaterials* **1998**, *19*, 745-750.
- 11) Amiji M.M. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* **1998**, *10*, 263-271.
- 12) Tamada Y., Murata M., Hayashi T., Goto K. *Biomaterials* **2002**, *23*, 1375-1382.
- 13) Ratner B.D., Hoffman A. S., Schoen F.J., Lemons J.E. *Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine*; Academic Press: California, USA, 1996, pp 484.
- 14) Rodríguez G., Gallardo A., San Román J., Rebuelta M., Bermejo P., Buján J., Bellón M., Hoduvilla N.G., Escuerdo C. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1999**, *10*, 1-6.

- 15) San Román J., Escudero M. C., Gallardo A., Santa Cruz R., Jorge E., Haro J., Alvarez L., Millán I., Buján J., Bellón J.M., Castillo-Olivares J.L. *Biomaterials* **1994**, *15* (10), 759-765.
- 16) San Román J., Buján J., Bellón J.M., Gallardo A., Escudero M.C., Jorge E., Álvarez L., Castillo-Olivares J.L. *Journal of Biomedical Materials Research* **1996**, *32*, 19-27.
- 17) Ramis J., Torrent J., Mis R., Conte L., Barbanj M.J., Jané J., Forn J. *Int J Clin Pharm Ther Tox* **1990**, *28*, 344-349.
- 18) Owens D.K., Wendt R. C. *Journal of Applied Polymer Science* **1969**, *13*, 1741-1747.
- 19) Baier R.E. *Bull N Y Acad Med* **1972**, *48*(2), 257-272.
- 20) Zisman W. A. *Relation of equilibrium contact angle to liquid and solid constitution*; M., F. F., Ed.; American Chemical Society: Washington D. C, 1964; Vol. 43, pp 1-51.
- 21) Baier R.E., Meyer A. E. *Surface energetics and biological adhesion*; K.L., M., Ed.; Plenum Press: New York, 1981; Vol. 2, pp 895-909.
- 22) Gallardo A., Peniche C., San Román J. *J Control Rel* **2001**, *71*, 127.
- 23) Harker L.A., Kelly A. B., Hanson S.R. *Circulation* **1991**, *83*(6 Suppl.), IV41-55.
- 24) Lin J.C., Ko T. M., Cooper S.L. *J Colloid Interface Sci* **1994**, *164*, 99-106.

CAPÍTULO 5

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS POLIMÉRICOS (PEC) OBTENIDOS CON PLANTILLA (“TEMPLATE POLYMERIZATION”)

CAPÍTULO 5: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS POLIELECTROLÍTICOS (PEC)

1	INTRODUCCIÓN.....	141
1.1	Complejos polielectrolíticos (PEC).....	141
2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	144
2.1	Reactivos	144
2.2	Interacción del quitosano con el monómero AMPS.....	144
2.3	Síntesis de los complejos polielectrolíticos.....	144
2.4	Caracterización	145
2.5	Medidas de hinchamiento.....	145
2.6	Liberación de teofilina del sistema HA-Q.....	146
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	147
3.1	Interacciones quitosano-monómero AMPS.....	147
3.2	Caracterización de los PEC	149
3.3	Estudio del hinchamiento de los complejos obtenidos con plantilla.....	151
3.4	Liberación de teofilina.....	155
4	BIBLIOGRAFÍA	158

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Complejos polielectrolíticos (PEC)

Los complejos polielectrolíticos (PEC) resultan de la interacción de macromoléculas que poseen grupos iónicos complementarios. Por lo general, se forman bien mezclando soluciones de policationes y polianiones, bien polimerizando monómeros con grupos iónicos adecuados en presencia de un polímero plantilla (“*template polymerization*”). Las fuertes interacciones coulómbicas entre polielectrolitos que poseen grupos iónicos complementarios conducen a la agregación espontánea de los componentes de la solución. Estas interacciones específicas entre las moléculas confieren al complejo unas propiedades físicas y químicas especiales, ya que es capaz de controlar la velocidad de flujo de solutos y la especificidad de este flujo, mediante cambios en las condiciones ambientales en las que se encuentra el complejo. Por ello, este tipo de materiales ha sido utilizado como sistemas de liberación controlada de fármacos, para separación de proteínas, como recubrimientos anticoagulantes, en la síntesis de membranas de diálisis, como biosensores, etc .

La formación de complejos entre polianiones y policationes con grupos iónicos fuertes y pesos moleculares comparables forman sistemas agregados (tipo huevo revuelto “*scramble egg*”) que por lo general, conducen a la floculación macroscópica del complejo. El grado de agregación se controla fundamentalmente mediante la concentración de la solución. En sistemas concentrados, los complejos polielectrolíticos se forman casi estequiométricamente como coacervados que son solubles únicamente en disolventes específicos, como por ejemplo, mezclas ternarias agua-acetona-bromuro potásico. La caracterización de este tipo de sistemas es extremadamente compleja. En diluciones altamente diluidas ($<10^{-4}$ g/ml) conducen a dispersiones de partículas coloidales que pueden estudiarse por los métodos estándar. La formación de los PEC está condicionada por las características de sus componentes (densidad de carga, rigidez de las cadenas y posición de los restos iónicos) y del entorno químico en el que se encuentran (pH, fuerza iónica, temperatura, concentración...) ¹.

Dentro de los polímeros más utilizados en la obtención de este tipo de complejos se encuentra el quitosano (1,4)-[2-amino-2-desoxi- β -glucano] (CHI), un polisacárido natural que se obtiene de la N-desacetilación catalítica de la quitina, dando lugar a una macromolécula que contiene unidades glucosamina y unidades de N-acetilglucosamina (Figura 5.1). Es por tanto, un polisacárido básico que a pH neutro o básico, posee grupos amino libres, mientras que a pH ácido estos grupos se encuentran protonados haciéndole soluble en agua. Su solubilidad depende de la distribución de los grupos amino libres en la molécula. Se trata de un polielectrolito lineal a pH ácido, con una alta densidad de carga, que puede interactuar en solución acuosa con polianiones de distinto tipo (heparina, alginato sódico, carboximetilquitina, poli(ácido acrílico)...etc) para formar complejos polielectrolíticos²

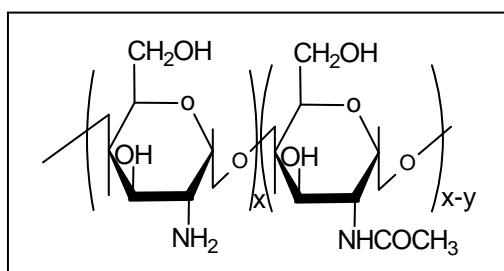


Figura 5.1: Estructura química del quitosano (CHI)

El quitosano ha sido empleado en numerosas aplicaciones biomédicas como soporte para ingeniería tisular, suturas reabsorbibles, agente hipocolestirémico, sistemas de liberación controlada de fármacos, inmovilización de enzimas, agente cicatrizante, etc³⁻⁵. Entre sus características más importantes se encuentran su biodegradabilidad y su alta biocompatibilidad dentro del organismo humano.

En este capítulo se describe la síntesis y caracterización de PEC formados a base de quitosano y copolímeros que incorporan AMPS en su estructura (poli(HEMA-*co*-AMPS) y poli(DMAA-*co*-AMPS)), sintetizados en presencia del quitosano como plantilla (“template polymerization”), o por mezcla de disoluciones acuosas de ambas macromoléculas. El primer método de síntesis permite la formación de hidrogeles con

gran capacidad de absorción de agua (hinchamiento), que resultan muy apropiados para su utilización como sistemas de liberación controlada de fármacos macromoleculares, fármacos que presenten interacciones específicas con la matriz polimérica o fármacos poco solubles en agua. Esto se debe, además de a su alto grado de hinchamiento, a su gran cantidad de grupos funcionales, apropiados para interactuar activamente con un fármaco incorporado en su estructura. Las cinéticas de liberación de fármacos dependen de numerosos parámetros además de la geometría del dispositivo de liberación. Es decir, están condicionadas por las propiedades de la matriz polimérica que forma el sistema (geometría, peso molecular, cristalinidad y temperatura de transición vítrea) y por las propiedades del propio fármaco (concentración inicial, interacciones fármaco-polímero, presión osmótica y solubilidad del fármaco). La combinación y control de todos estos parámetros, permitirá la obtención de sistemas de liberación controlada apropiados para cada requerimiento. En este sentido, se han estudiado algunos de los PEC sintetizados en presencia de quitosano como dispositivos de liberación controlada de teofilina. La teofilina es un broncodilatador potente que se utiliza en la fase inmediata del ataque asmático, con un índice terapéutico muy estrecho. Su posología es complicada y requiere una administración muy particular. Una primera etapa de liberación rápida como tratamiento de choque, seguida de una segunda etapa lenta de mantenimiento de los niveles de teofilina dentro del límite terapéutico. Los PEC ensayados presentaron unos perfiles de liberación de este fármaco muy prometedores.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos

El quitosano de bajo peso molecular ($M_r \approx 150000$) de grado de acetilación 19 % fue suministrado por Fluka. Antes de ser utilizado se purificó hinchándolo en agua destilada (1 % p/v) al que se le añadió unas gotas de ácido acético glacial (Normasol, 99,5 % pureza) hasta llegar a un pH aproximado de 4. La solución viscosa se filtra con el fin de eliminar todo el residuo sólido insoluble y el filtrado se precipita con una solución de hidróxido sódico al 40 %. El sólido se aísla por filtrado y posteriormente se liofiliza durante 48 horas. Los monómeros y copolímeros empleados en la síntesis de estos PEC han sido descritos en el Capítulo 1 (Materiales y Métodos).

2.2 Interacción del quitosano con el monómero AMPS

En primer lugar, se estudiaron las interacciones entre el CHI y el monómero AMPS (AMPS_m). Para ello, se disolvieron diferentes proporciones de quitosano en soluciones acuosas del monómero AMPS. Las mezclas de partida se nombrarán como CHI-AMPS_m (20:80), CHI-AMPS_m (30:70), CHI-AMPS_m (40:60) o CHI-AMPS_m (50:50), dependiendo de la composición molar de las mezclas. Éstas se dejaron bajo agitación magnética durante el tiempo necesario para la completa disolución del polisacárido. Posteriormente se precipitaron en etanol, con el fin de eliminar el monómero residual que no haya interactuado con el quitosano, y el precipitado se secó a vacío hasta peso constante. Por último, se analizaron por FTIR (Perkin-Elmer 1720) y los espectros obtenidos se compararon unos con otros con el software del equipo (OMNIC-4.1).

2.3 Síntesis de los complejos polielectrolíticos

Las reacciones de polimerización en presencia de quitosano se llevaron a cabo en agua destilada como disolvente, empleando persulfato amónico como iniciador, a 50 °C. La concentración global de monómeros fue 0,3 M y las fracciones molares en alimentación se encuentran especificadas en la Tabla 5.1. Los complejos se denominaron DA50-Q, DA70-Q, DA90-Q y HA50-Q, HA70-Q, HA90-Q HA95-Q

dependiendo del tipo de sistema al que pertenezcan (DA: Sistema DMAA-AMPS; HA: Sistema HEMA-AMPS) y de la composición molar de DMAA o HEMA que incluyan. La letra “Q” indica que los materiales contienen un 20% en peso de quitosano en alimentación (excepto el HA95-Q, que incluye un 25% en peso de quitosano).

El AMPS fue disuelto en el agua con el fin de obtener el pH ácido necesario para disolver el quitosano. Después de la completa solubilización del quitosano, se añadió a la mezcla de reacción el segundo monómero y se burbujeó nitrógeno durante 30 minutos. Posteriormente se añadió el iniciador y la disolución se introdujo en una estufa a 50 °C, durante 24 horas. La disolución homogénea y viscosa, mezcla de los reactivos, da lugar a un precipitado blanco y un sobrenadante mucho menos viscoso que la mezcla de reacción de partida. Ambas fases fueron aisladas, para su posterior análisis. El precipitado se lavó con agua para eliminar el copolímero no injertado o no unido por medio de enlaces iónicos al quitosano.

2.4 Caracterización

Todas las muestras (tanto su fase precipitada como el sobrenadante) fueron analizadas por **RMN-¹H** (Varian 300) y **FTIR** (Perkin-Elmer 1720). Además, los precipitados se visualizaron mediante microscopía electrónica de barrido (**SEM-Philips**).

2.5 Medidas de hinchamiento

Debido a la poca consistencia de los PEC sintetizados por este método, las medidas de hinchamiento se realizaron en el interior de una cesta de malla metálica para proteger el material. La capacidad de absorción de agua con el tiempo de los compuestos sintetizados se estudió en soluciones tampón a pH 2, 7,4 y 10, con una fuerza iónica 0,1 M a 37 °C. Los resultados fueron expresados como:

$$\% = \frac{P_i - P_0}{P_0} \times 100$$

siendo P_i el peso de la muestra hidratada a tiempo “i” y P_0 el peso de la muestra seca.

Además se registraron los máximos de hinchamiento de los materiales en todo el rango de pH's.

2.6 Liberación de teofilina del sistema HA-Q

La prepararon pastillas de 100 mg PEC con 25 mg de teofilina, por mezcla mecánica de ambos compuestos y compresión de la mezcla final (3 toneladas), para obtener pastillas de 1 cm de diámetro y $110 \pm 0,07$ μm de espesor. La liberación se llevó a cabo en tampón fosfato a pH 7,4. Las pastillas se introdujeron en botes cerrados con 20 ml del tampón, y todo ello, en el interior de una estufa a 37 °C. A diferentes tiempos se tomaron alícuotas de la solución tampón (0,5ml) que se reemplazaron por tampón fresco. Las muestras se almacenaron en un congelador a -20 °C hasta su análisis por UV ($\lambda = 350$ nm)(espectrofotómetro UV-Visible, Perkin-Elmer).

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuando el proceso de polimerización de los PEC tiene lugar en presencia del quitosano (CHI), en primer lugar se producirán las interacciones CHI-monómero aniónico (apartado 3.1). Una vez iniciada la polimerización se producirán eventuales reacciones de transferencia de los radicales poliméricos en crecimiento a los grupos funcionales de los ciclos que constituyen el CHI, incluyendo tanto a los grupos amino como a los grupos –OH presentes en su estructura⁶. Además, algunos autores defienden que el sistema de iniciación redox (persulfato amónico), también producirá reacciones de transferencia a los ciclos de pirano del CHI⁷. Este tipo de reacción de injerto se produce con gran frecuencia entre polisacáridos y monómeros vinílicos al utilizar iniciación radical vía redox. El sistema iniciador más empleado con este propósito son las sales de cerio, con las que se ha conseguido injertar acrilonitrilo, dimetilaminoetilmetacrilato, 2-hidroxietilmetacrilato, etilenglicol monometilacrilato, acrilamida y vinil pirrolidona en el esqueleto polisacárido del quitosano⁸.

En la obtención de los PEC obtenidos en presencia de quitosano sintetizados en este capítulo, se utilizó persulfato amónico como iniciador y por lo tanto, pueden sufrir estas reacciones de injerto dando lugar a redes entrecruzadas. Si la estructura posee la densidad de puntos de entrecruzamiento adecuada, se pueden llegar a formar estructuras tridimensionales insolubles incluso cuando los grupos iónicos no se encuentran ionizados, tal y como ocurre en el sistema HA-Q. Las propiedades de este tipo de complejos se verán condicionadas por la hidrofilia de los monómeros, la proporción de polímero plantilla, la cantidad de grupos ionizables y su capacidad para formar enlaces iónicos que creen puntos de entrecruzamiento físico en la estructura.

3.1 Interacciones quitosano-monómero AMPS

Se han estudiado las interacciones que tienen lugar entre el quitosano y el monómero AMPS (AMPSm) con el fin de determinar la formación del complejo entre ambas especies y en qué medida se forma. Se mezclaron soluciones acuosas de CHI y AMPSm en diferentes proporciones. El monómero ácido siempre se añadió en exceso, con el propósito de disolver el polisacárido. Las mezclas CHI-AMPSm se precipitaron

en etanol, con el fin de aislar el complejo (el AMPSm es soluble en este disolvente). Así, el AMPSm que no interacciona con el CHI, permanecerá en solución, mientras que el complejo precipita. Éste se aisló por centrifugación y se lavó varias veces con etanol, posteriormente se secó a vacío hasta peso constante. Su análisis por FTIR (Figura 5.2) confirma que se obtiene el mismo producto (99 % de correlación entre unos compuestos y otros), independientemente de la mezcla de reacción, y que este precipitado está formado por ambos compuestos. Ya que se distinguen bandas características del **CHI** (3500-3300 vibración NH-,OH-; 1651 cm^{-1} amida I, 1577 cm^{-1} amida II, 1377 cm^{-1} CH₂ y las bandas características de los polisacáridos a 1153, 1030 y 1077 cm^{-1}) y bandas características del **AMPS** (3420-3490 cm^{-1} vibraciones NH- y OH-, 1647 cm^{-1} amida I, 1522 cm^{-1} amida II y 1393 cm^{-1} CH₂, las bandas debidas a los grupos sulfónicos se observan entre 1224-1153 cm^{-1}). Además, se observa el desplazamiento y cambio de intensidad de algunas de las bandas, especialmente en la región donde aparecen los grupos sulfónicos (que se desplazan a mayores frecuencias y cambian de intensidad). Además, el hombro ancho que aparece a 2500 cm^{-1} se puede atribuir a la formación de grupos NH₃⁺. Todo esto sugiere que tiene lugar la interacción iónica de ambas especies y por tanto, el CHI actuará como plantilla de la polimerización, dando lugar a una polimerización dirigida.

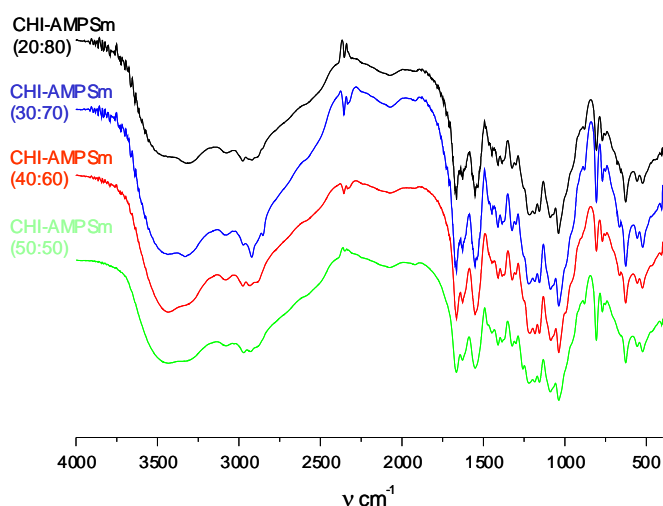


Figura 5.2: Espectros de FTIR del complejo CHI-monómero AMPS obtenidos por mezcla de soluciones acuosas de ambos compuestos.

3.2 Caracterización de los PEC

Las dos fases que se obtuvieron tras la polimerización de los copolímeros en presencia de quitosano se analizaron por separado. Los espectros de RMN-¹H demostraron que tanto el sobrenadante, como el precipitado (PEC) tenían el mismo contenido en monómeros, y que únicamente el precipitado presentaba quitosano en su estructura. Esto indica, que la reactividad relativa de los monómeros no se ve afectada por la presencia del quitosano, aunque sí podría afectar a la velocidad de polimerización.

La Tabla 5.1 muestra la composición de los PEC obtenida mediante RMN-¹H. En ella se muestran las composiciones tanto en alimentación como en el complejo después de la polimerización, aislamiento y purificación del material. Con el fin de comprender el comportamiento de los sistemas, se debe comparar la proporción de grupos sulfónicos (AMPS) y grupos amino libres (CHI, se ha de tener en cuenta el grado de desacetilación de la molécula). De esta forma se puede tener una idea de las interacciones iónicas que puedan tener lugar entre ambas macromoléculas. Del mismo modo, estas interacciones darán gran información acerca del comportamiento de los sistemas en medios acuosos tamponados.

	<i>Fracción molar HEMA</i>		<i>Fracción molar AMPS</i>		<i>Fracción molar DMAA</i>		<i>Fracción molar CHI</i>	
	Aliment	PEC	Aliment	PEC	Aliment	PEC	Aliment	PEC
<i>DA50-Q</i>	-	-	43	35	43	36	14	29
<i>DA70-Q</i>	-	-	26	24	62	56	12	20
<i>DA90-Q</i>	-	-	9	6	80	82	11	12
<i>HA50-Q</i>	42	-	42	-	-	-	16	-
<i>HA70-Q</i>	60	66	26	20	-	-	14	14
<i>HA90-Q</i>	80	76	8	9	-	-	12	15
<i>HA95-Q</i>	80	80	4	3	-	-	16	17

Tabla 5.1: Composición molar de los PEC sintetizados por “template” determinada por RMN-¹H.

La Figura 5.3, muestra el **espectro infrarrojo** del complejo HA70-Q, de los homopolímeros PHEMA y PAMPS, además del espectro del CHI. Se observan bandas características de todos los componentes del sistema y además, se observa el desplazamiento de algunas de estas bandas como resultado de la interacción entre grupos funcionales.

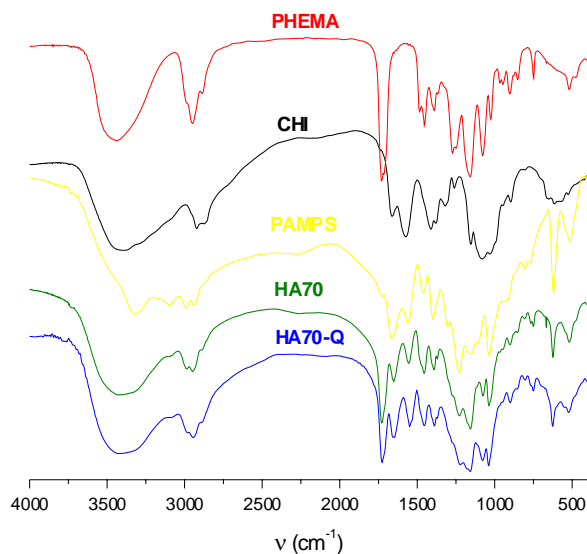


Figura 5.3: Espectros de FTIR del PEC HA70-Q, del copolímero HA70, de sus correspondientes homopolímeros (PHEMA y PAMPS) y del quitosano (CHI).

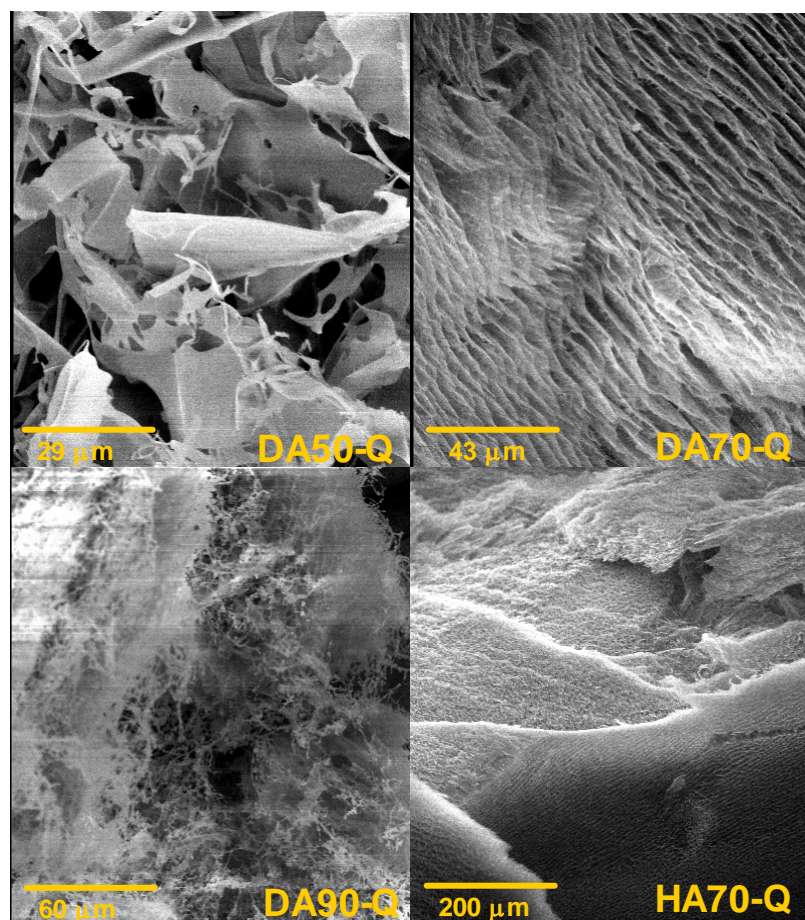


Figura 5.4: Imágenes de SEM de los complejos sintetizados por “template” a diferentes aumentos. Debe tenerse en cuenta que las fotografías han sido tomadas a diferentes aumentos.

Los materiales obtenidos por este método forman redes tridimensionales cuyo tamaño de poro viene gobernado por su capacidad de absorción de agua. Fueron visualizados por **microscopía electrónica de barrido (SEM)**. En la Figura 5.4 se muestra el aspecto de algunos de estos compuestos. Los complejos del sistema DA-Q, son muy diferentes unos de otros: DA50-Q forma láminas desordenadas, DA70-Q forma una estructura más organizada en forma de celdas alargadas y DA90-Q forma una red fina tipo maraña. Sin embargo el sistema HA-Q forma estructuras muy similares, parecidas a la estructura del HA70-Q, similar a su vez a la del DA70-Q (nótese la distinta magnificación de las imágenes).

3.3 Estudio del hinchamiento de los complejos obtenidos con plantilla

La disolución de un polímero soluble se produce mediante una primera etapa de difusión del disolvente en el interior de la masa del polímero hinchándolo, hasta lograr la separación de las cadenas y su incorporación en la disolución. Cuando un polímero no es soluble, únicamente se produce la etapa de hinchamiento. Este proceso está directamente relacionado con el carácter hidrofílico del polímero. En este apartado se han estudiado los procesos de hinchamiento y disolución de los PEC sintetizados con plantilla (“*template polymerization*”), con el fin de comprender los parámetros que gobiernan el comportamiento de estos materiales en soluciones acuosas tamponadas a distinto pH y de esta forma, elegir los complejos apropiados para la liberación controlada de teofilina.

El sistema **HA-Q** da lugar a hidrogeles con gran capacidad de absorción de agua que mantienen su estructura a lo largo de todo el experimento (excepto la formulación HA50-Q). En la Figura 5.5 se muestran la variación del grado de hinchamiento de los materiales con el tiempo. En ella se observa un primer periodo de difusión rápido (entre 1 y 2 horas dependiendo del material) hasta que se alcanza el equilibrio. De las cuatro formulaciones sintetizadas, sólo tres permanecen estables a lo largo de todo el ensayo (2 meses) puesto que HA50-Q comienza a perder peso a las pocas horas de empezar el análisis. HA50-Q es el PEC con mayor AMPS en su estructura y por tanto, el que presenta mayor cantidad de grupos iónicos (más hidrofílico). La entrada masiva de moléculas de agua en su estructura débilmente entrecruzada, provoca que el PEC no soporte su propio peso y termine disolviéndose⁹.

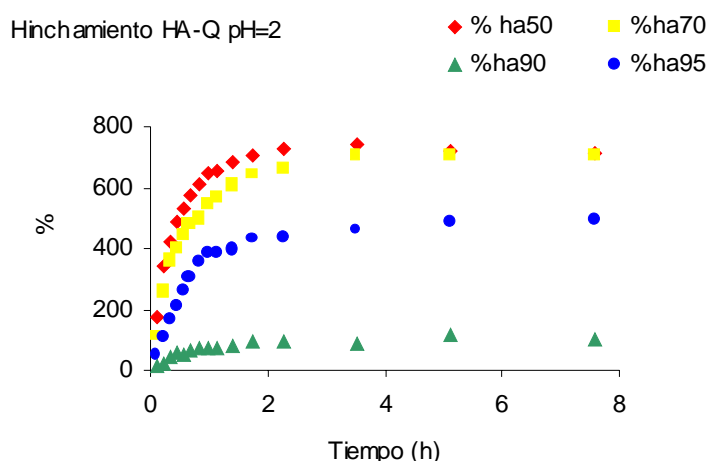


Figura 5.5: Variación del grado de hinchamiento con el tiempo de (◆) HA50-Q, (■) HA70-Q, (●) HA90-Q y (▲) HA95-Q en medio acuoso tamponado a pH 2 y 37 °C, a tiempos cortos de análisis.

El hinchamiento de estos sistemas está directamente relacionado con la cantidad de grupos iónicos presentes en su estructura, así como el grado de ionización de los mismos. Por lo tanto, a la hora de interpretar el comportamiento de los sistemas con el pH, se han de tener muy presentes tanto la composición molar de cada uno de los componentes, como el pK_a de cada una de las especies iónicas. El AMPS presenta grupos sulfónicos en su estructura, cuyo grado de ionización puede considerarse igual a la unidad⁹. El quitosano presenta grupos amino libres en su estructura y un $pK_a_{CHI} = 6,3$. Si observamos la Figura 5.6 en la que se representa la variación del máximo de hinchamiento en el rango de pH entre 2 y 12, para el PEC HA70-Q, observamos que el máximo de hinchamiento está gobernado por el grado de ionización del CHI. Es decir, a pH's en los que el CHI está ionizado o parcialmente ionizado ($pH < pK_a (6,3)$), se forman enlaces iónicos que entrecruzan la red con mayor efectividad y disminuyen la hidrofilia, haciendo más difícil la entrada de agua en la estructura tridimensional (disminuyendo el hinchamiento). Sin embargo, a $pH > pK_a (6,3)$ el máximo de hinchamiento permanece prácticamente constante. A pesar de no existir enlaces iónicos entre las macromoléculas, la estructura tridimensional se mantiene. Esto se debe a los puntos de entrecruzamiento creados en las reacciones de transferencia, comentadas anteriormente en el apartado 3.1.

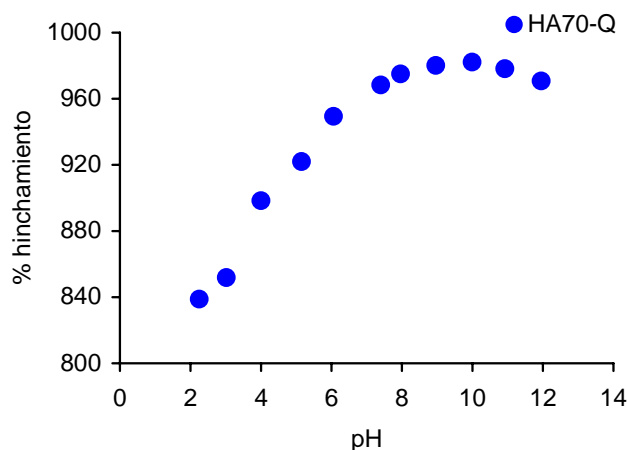


Figura 5.6: Variación del máximo de hinchamiento con el pH, del PEC HA70-Q.

En la Figura 5.7 se muestran los máximos de hinchamiento de los complejos polielectrolíticos registrados a pH 2, 7,4 y 10. El asterisco indica que el PEC se disuelve a lo largo del experimento. Por lo tanto, los datos de hinchamiento de HA50-Q no son significativos y en definitiva no son comparables con las demás formulaciones.

Como puede observarse en el diagrama de barras, el comportamiento de los PEC a $\text{pH} > \text{pK}_{\text{a CHI}} (6,3)$ es muy similar, y el hinchamiento aumenta al aumentar la proporción en AMPS (ya que es la única especie ionizada en este pH).

Sin embargo, a $\text{pH} < \text{pK}_{\text{a CHI}} (6,3)$ el perfil de absorción de agua es muy diferente. La capacidad de hinchamiento está gobernada por la densidad de puntos de entrecruzamiento por enlace iónico, y por tanto, por la proporción de grupos sulfonato y grupos amino libres ionizado que puedan interactuar. **HA70-Q** contiene mayor cantidad de AMPS que CHI en su estructura. A $\text{pH} = 2$, una vez ionizados los grupos amino y formados los enlaces iónicos, quedarán menos grupos sulfónico sin interactuar que a pH's 7,4 y 10 y en consecuencia, la estructura entrecruzada tendrá menor capacidad de absorción de agua.

En la Tabla 5.1, se observa que **HA90-Q** contiene una cantidad similar de grupos iónicos complementarios (9 % AMPS y 12,15 % grupos amino libres o anillos desacetilados de CHI). Esto implica un mayor número de enlaces iónicos en la

estructura y una menor proporción de grupos iónicos libres y en definitiva un menor hinchamiento a este pH.

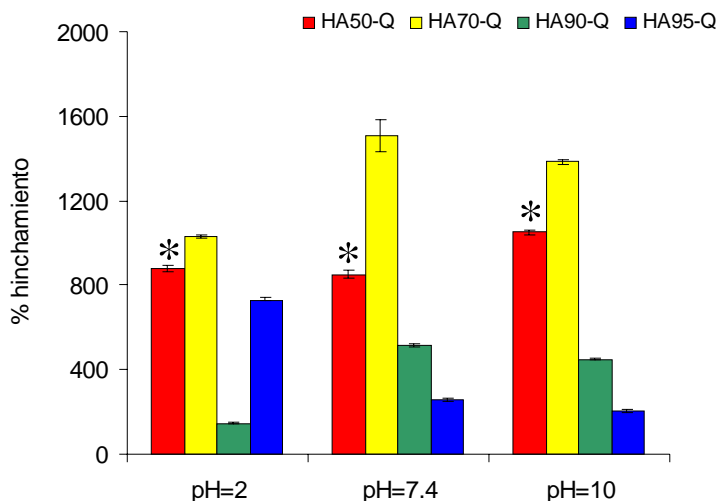


Figura 5.7: Máximos de hinchamiento de los PEC HA-Q.

HA95-Q es el PEC con mayor cantidad de grupos amino libres (13,77 % grupos amino libres, frente a un 3% de AMPS en la estructura). Una vez formados los enlaces iónicos, quedarán grupos amino ionizados sin interactuar que contribuyen a aumentar la hidrofilia del material a este pH. En estas condiciones el PEC presentará una carga global positiva, mientras que HA70-Q la presenta negativa.

Los complejos polielectrolíticos **DA-Q** forman también estructuras tridimensionales débilmente entrecruzadas que absorben grandes cantidades de agua en su estructura, pero tal y como se ha descrito en otras ocasiones⁹, la gran hidrofilia de la DMAA provoca la entrada masiva de agua al sistema que estos materiales débilmente entrecruzados no pueden soportar su propia masa y terminan por disolverse. Su comportamiento en medios acuosos tamponados pueden resumirse como una primera etapa de difusión de agua en la estructura (1-2 horas), un pseudoequilibrio y una última etapa de disolución que en algunos casos, sólo se observa a tiempos de análisis largos (Figura 5.8). La etapa de pseudoequilibrio y la de disolución dependen tanto de la composición e hidrofilia del material como del pH del medio tamponado.

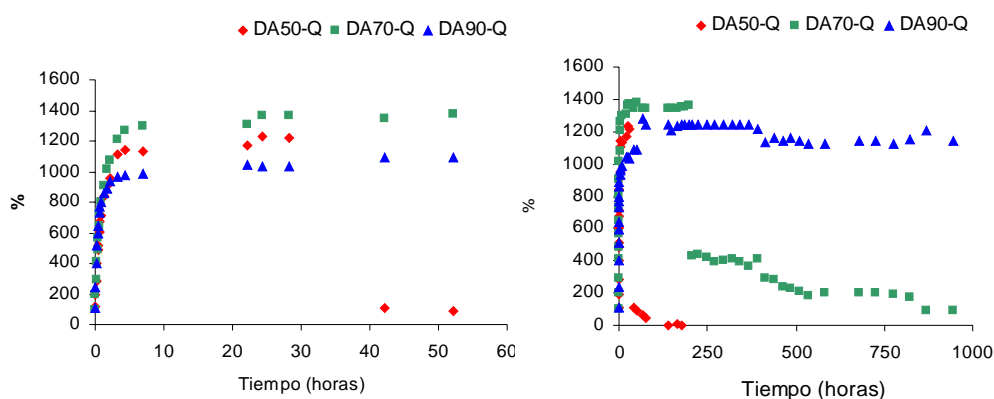


Figura 5.8: Representación gráfica del estudio gravimétrico de absorción de agua de los PEC DA50-Q (◆), DA70-Q (■) y DA90-Q (▲) en medio acuoso tamponado a pH 10 y 37 °C a tiempos cortos (izquierda) y tiempos largos de análisis (derecha).

Las diferencias observadas en el comportamiento de ambos sistemas podría estar relacionadas con la menor hidrofilia del monómero HEMA.

3.4 Liberación de teofilina

La teofilina (Figura 5.9) es una metilxantina empleada en el tratamiento de la fase inmediata del ataque asmático y su efecto principal es la dilatación de los bronquios. La estrechez de los márgenes entre la dosis terapéutica y de seguridad, el problema de interacción con otros fármacos y la posibilidad de efectos a largo plazo sobre el sistema nervioso central han provocado la intranquilidad de muchos autores que han sugerido que este fármaco no debería ser el principal en el tratamiento del asma. No obstante, las preparaciones de liberación sostenida pueden ser provechosas para tratar el asma nocturna¹⁰. Debido a las grandes variaciones interindividuales en la eliminación de la teofilina, el ajuste de la dosis debe ser individualizado y establecido por el médico. En el tratamiento de las crisis asmáticas severas se recomienda el uso de la vía intravenosa. En las crisis leves o moderadas pueden ser útiles las teofilinas orales de liberación rápida. En estos casos, se recomiendan tratar al paciente con una dosis de ataque de 5-6 mg/kg y posteriormente ajustar la posología según la tolerancia que presente el individuo al fármaco¹¹. Por lo tanto, es importante disponer de dispositivos de dosificación controlada que proporcionen este tipo de perfil de liberación, es decir,

una primera etapa de liberación rápida, seguida de una etapa de liberación lenta o mantenimiento durante periodos más largos de tiempo.

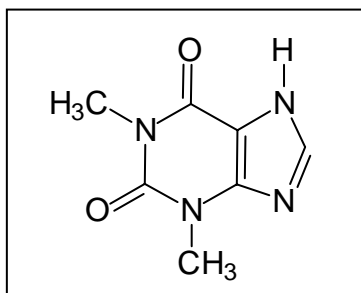


Figura 5.9: Estructura química de la teofilina

Los hidrogeles que absorben grandes cantidades de agua son especialmente indicados en el caso de fármacos poco solubles en agua, fármacos que presenten interacciones específicas o macromoléculas. Nuestros PEC HA-Q pertenecen a este tipo de hidrogeles y se utilizaron con el fin de conseguir matrices de liberación controlada de teofilina. La teofilina, es una molécula básica que presenta un $pK_a = 8,77$ y un $pK_b = 13,5-11,5$. Es soluble en agua caliente, en solución alcalina y solución ácida e insoluble en disolvente orgánicos. La liberación del fármaco se monitorizó por espectroscopia UV y se consiguieron los perfiles de liberación que aparecen representados en la Figura 5.10.

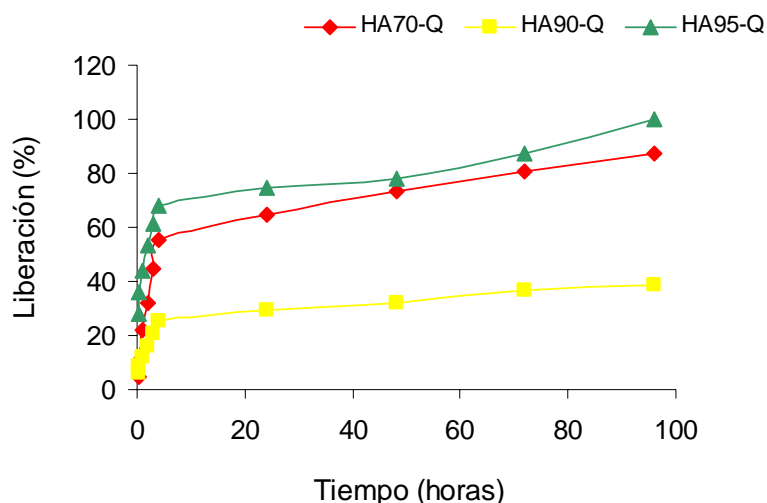


Figura 5.10: Liberación controlada de teofilina de los PEC (♦) HA70-Q, (■) HA90-Q y (▲) HA95-Q, en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 y fuerza iónica 0,1 M, a 37 °C.

Los perfiles de liberación obtenidos para estos tres materiales son muy interesantes para la liberación sostenida de la teofilina. En los tres casos se produce una primera etapa de liberación rápida que coincide con la etapa de difusión de agua en la matriz macromolecular (Figura 5.5) y una segunda etapa de liberación más lenta que se mantiene durante días. La cinética de liberación está estrechamente relacionada con el proceso de absorción de agua de la matriz polimérica y con la naturaleza ácida o básica de la misma. Si únicamente influyese el hinchamiento del sistema, se obtendría una velocidad de liberación que variaría en este sentido $HA70-Q > HA90-Q > HA95-Q$. Sin embargo, las interacciones específicas polímero-fármaco juegan un papel importante en el proceso de liberación. La teofilina (básica) interacciona en mayor medida con aquellos PEC que incorporan mayor proporción de moléculas ácidas (AMPS). Así se obtiene que el perfil de liberación más rápido es el de HA95-Q (con menor proporción de AMPS y mayor de CHI).

En definitiva, en el proceso de liberación sostenida de teofilina de las matrices poliméricas intervienen dos características de las moléculas conjuntamente: su capacidad de absorción de agua (hinchamiento) y la basicidad o acidez de la matriz polimérica. La combinación apropiada de monómeros y CHI podría dar lugar a numerosos perfiles de liberación diferentes, apropiados para el tratamiento de este tipo de enfermedades respiratorias.

4 BIBLIOGRAFÍA

- 1)Tsuchida E., Abe K. *Interactions Between Macromolecules in Solution and Intermolecular Complexes*; Springer-Verlang: Berlin, 1982.
- 2)Dutkiewicz J., Tuora M. ; Brine J., S.-B. G., Anthonsen T., Sandford P., Ed.; Elsevier: New York, 1992, pp 496.
- 3)Singh D., Ray A. R. *J.M.S.- Rev Macromol Chem Phys* **2000**, C40 (1), 69-83.
- 4)Gupta K.C., Ravi Kumar M. N. V. *J.M.S.-Rev Macromol Chem Phys* **2000**, C40 (4), 273-308.
- 5)Ravi Kumar M.N.V. *Chitin and chitosan drug delivery systems homepage*, 2001; Vol. 2001.
- 6)Peniche C., Elvira C., San Román J. *Polymer* **1998**, 39 (25), 6549-6554.
- 7)Abduel Majid K., Wan Md Zin Wuang Y., Mansor B. Ahmad *Journal of Applied Polymer Science* **2000**, 77, 2314-2318.
- 8)Brown C., Hoffman A. S. *Modification of natural polymers: chitosan*, 2001, pp 565-574.
- 9)Tong Z., Liu X. *Macromolecules* **1994**, 27, 844-848.
- 10)Rang H.P., Dale M. M. *Farmacología*; Alhambra Longman: Madrid, 1992.
- 11)*Vademecum Internacional*; 42th ed.; Medicom S.A.: Madrid, 2001.

CAPÍTULO 6

BIOCOMPATIBILIDAD “in vitro” DE LOS COMPLEJOS POLIELECTROLÍTICOS OBTENIDOS CON PLANTILLA

CAPÍTULO 6: BIOCOMPATIBILIDAD IN VITRO DE LOS COMPLEJOS POLIELECTROLÍTICOS OBTENIDOS CON PLANTILLA

1	INTRODUCCIÓN.....	161
2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	164
2.1	Cultivo celular in vitro.....	164
2.2	Tests de citotoxicidad	166
2.2.1	Medio de elución	166
2.2.2	Ensayo MTT	167
2.2.3	Ensayo Alamar Blue	167
2.2.4	Ensayo Neutral Red	168
2.3	Microscopía	168
2.3.1	Microscopía óptica	168
2.3.2	Microscopía confocal: Ensayo Vida/Muerte	169
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	170
3.1	Sistema HA-Q	170
3.2	Sistema DA-Q	171
3.3	Microscopía confocal: Ensayo Vida/Muerte	174
4	BIBLIOGRAFÍA.....	176

1 INTRODUCCIÓN

Tal y como se describió en la introducción, un **biomaterial** se define como “*cualquier material, natural o sintético, utilizado para la fabricación de dispositivos biomédicos destinados a interactuar con un medio biológico, para mejorar o reemplazar las funciones de los tejidos vivos*¹”. El requisito fundamental para que un biomaterial pueda ser utilizado con fines biomédicos es que pueda coexistir con el organismo humano sin que desencadene un efecto inapropiado o no deseado, es decir debe ser **biocompatible**. Se puede decir que un material es biocompatible si resulta inerte o presenta una interacción apropiada y positiva con el medio fisiológico. La evaluación de la biocompatibilidad de un biomaterial, generalmente se refiere a la determinación de las interacciones biológicas que tienen lugar entre un dispositivo biomédico y el entorno vivo. Éstas deben determinarse mediante la magnitud y duración de las alteraciones en los mecanismos homeostáticos. Por lo general, un biomaterial debe ser no-tóxico, no-carcinogénico, no-trombogénico, debe tener unas propiedades mecánicas apropiadas para su aplicación, no debe causar reacción inmunológica y si degrada, los nuevos productos formados deben ser a su vez no-tóxicos. La norma ISO 10993² recoge todas las especificaciones a tener en cuenta y los ensayos que deben realizarse durante el diseño de un nuevo dispositivo biomédico.

La interacción de la superficie de un biomaterial con la sangre es el primer evento que tendrá lugar tras su implantación, siendo la adhesión de las proteínas plasmáticas el paso más rápido después de la adsorción de agua e iones inorgánicos³. La adsorción de proteínas influye en las interacciones celulares con la superficie del material, es decir, determinadas células pueden no adherirse a la superficie de un material, pero pueden llegar a hacerlo si existen ciertas proteínas sobre su superficie. Por lo tanto, las proteínas adsorbidas mediarán la adhesión celular al biomaterial. Debe tenerse en cuenta que no sólo el tipo y la cantidad de proteínas adsorbidas determinan la actividad biológica de un dispositivo, sino también la organización y conformación de las mismas. Por lo tanto, la adsorción de proteínas en la superficie de un biomaterial puede ser la clave para mejorar o diseñar un biomaterial biocompatible⁴.

La actividad celular local en el lugar donde se coloca un implante juega un papel principal en el destino y funcionalidad del biomaterial y en la recuperación y cicatrización del tejido que lo rodea. Los cultivos celulares proporcionan un modelo de investigación de las interacciones entre células y el medio que las rodea, por ejemplo, su respuesta a factores de estimulación y el contacto con un biomaterial. Todos los materiales con posible aplicación clínica deberían someterse a un riguroso “*screening*” *in vitro* de toxicidad y biocompatibilidad. Estos ensayos poseen ciertas ventajas sobre la experimentación *in vivo*, ya que permiten el estudio detallado de un tipo particular de células sin la complejidad asociada a los modelos *in vivo* y deberían utilizarse como estudio preliminar antes de recurrir a un modelo animal. Los cultivos celulares, con un número limitado de variables, permiten la directa observación de las interacciones célula-biomaterial. Además, el microentorno de los sistemas de cultivo puede ser diseñado, modificado y mantenido para estudiar el efecto de distintas variables en condiciones controladas.

La biocompatibilidad de un hidrogel está directamente relacionada con su capacidad de absorción de gran cantidad de agua. Su permeabilidad al agua, iones y pequeñas moléculas permiten el paso de nutrientes, metabolitos y productos de desecho de los tejidos circundantes. Además, su suave consistencia reduce la irritación del tejido receptor por efectos mecánicos o de fricción. El alto grado de hidratación alcanzado por estos materiales proporciona una tensión interfacial polímero-tejido muy baja o nula, reduciendo la adhesión proteica y celular a un mínimo. Además, los microdominios hidrofílicos-hidrofóbicos influirán en las características de las proteínas adsorbidas y por tanto en la adsorción celular, favoreciéndola o impidiéndola. Dependiendo de la aplicación del biomaterial buscaremos uno u otro efecto.

Las buena biocompatibilidad que suelen presentar los hidrogeles ha hecho que estos materiales se hayan utilizado en casi todos los campos de aplicación médica: recubrimientos (suturas, catéteres, sensores...), dispositivos de liberación controlada de fármaco (antibióticos, anticoagulantes, anticuerpos, enzimas, anticonceptivos...) o como materiales homogéneos (lentes de contacto, corneas artificiales, dentaduras...)5,6

El objetivo de este capítulo fue evaluar la citotoxicidad de algunos de los materiales sintetizados en el Capítulo 5: los complejos polielectrolíticos (PEC) HA-Q y DA-Q, sintetizados por copolimerización de los monómeros correspondientes en presencia de quitosano. Su alto grado de hinchamiento y porosidad, les proporcionan buenas características para ser utilizados como dispositivos de liberación controlada de fármaco, ya que las células no se adhieren en su superficie.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

La biocompatibilidad de los materiales HA-Q (HA70-Q, HA-90-Q y HA95-Q) se testó sobre los materiales tal y como se obtuvieron (Capítulo 5: Materiales y Métodos). Para ello se hicieron pastillas por compresión, de 1cm de diámetro y aproximadamente 100 μm de espesor. Sin embargo, la mayor hidrofilia y menor consistencia de los PEC DA-Q (DA50-Q, DA70-Q y DA90-Q) hizo imposible su manipulación para este tipo de ensayos, ya que las pastillas terminaban por disgregarse a lo largo de los experimentos. Por ello, el sistema DA-Q fue entrecruzado con vapor de glutaraldehído durante distintos tiempos de reacción (24 horas, 48 horas y 5 días), la nomenclatura que tomaremos a continuación se detalla en la Tabla 1.

Tiempo reacción	DA50-Q	DA70-Q	DA90-Q
No entrecruzado	DA50-Q	DA70-Q	DA90-Q
24 horas	DA50-Q-24glut	DA70-Q-24glut	DA90-Q-24glut
48 horas	DA50-Q-48glut	DA70-Q-48glut	DA90-Q-48glut
5 días	DA50-Q-5glut	DA70-Q-5glut	DA90-Q-5glut

Tabla 7.1: Nomenclatura de los materiales del sistema DA-Q entrecruzados y no entrecruzados.

El medio de cultivo, los aditivos y los discos de Thermanox™ (TMX) y policloruro de vinilo (PVC) fueron suministrados por Life Technologies, y todo el material de plástico para el cultivo por Becton-Dockinson. La tripsina, el tampón fosfato (PBS), el ascorbato y el MTT los administró Sigma. Los demás reactivos fueron obtenidos de Merck. Todas las muestras fueron esterilizadas mediante irradiación gamma, utilizando una dosis de 2,5 Mrad (Swann Morton, UK) siguiendo estrictamente los métodos estándar para dispositivos médicos.

2.1 Cultivo celular in vitro

En primer lugar se obtuvieron cultivos primarios de células osteoblásticas (HOB) mediante su aislamiento de cabezas de fémur de pacientes sometidos a una artroplastia de cadera siguiendo el protocolo de trabajo descrito por Di Silvio en 1995⁷, las células se cultivaron a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5%.

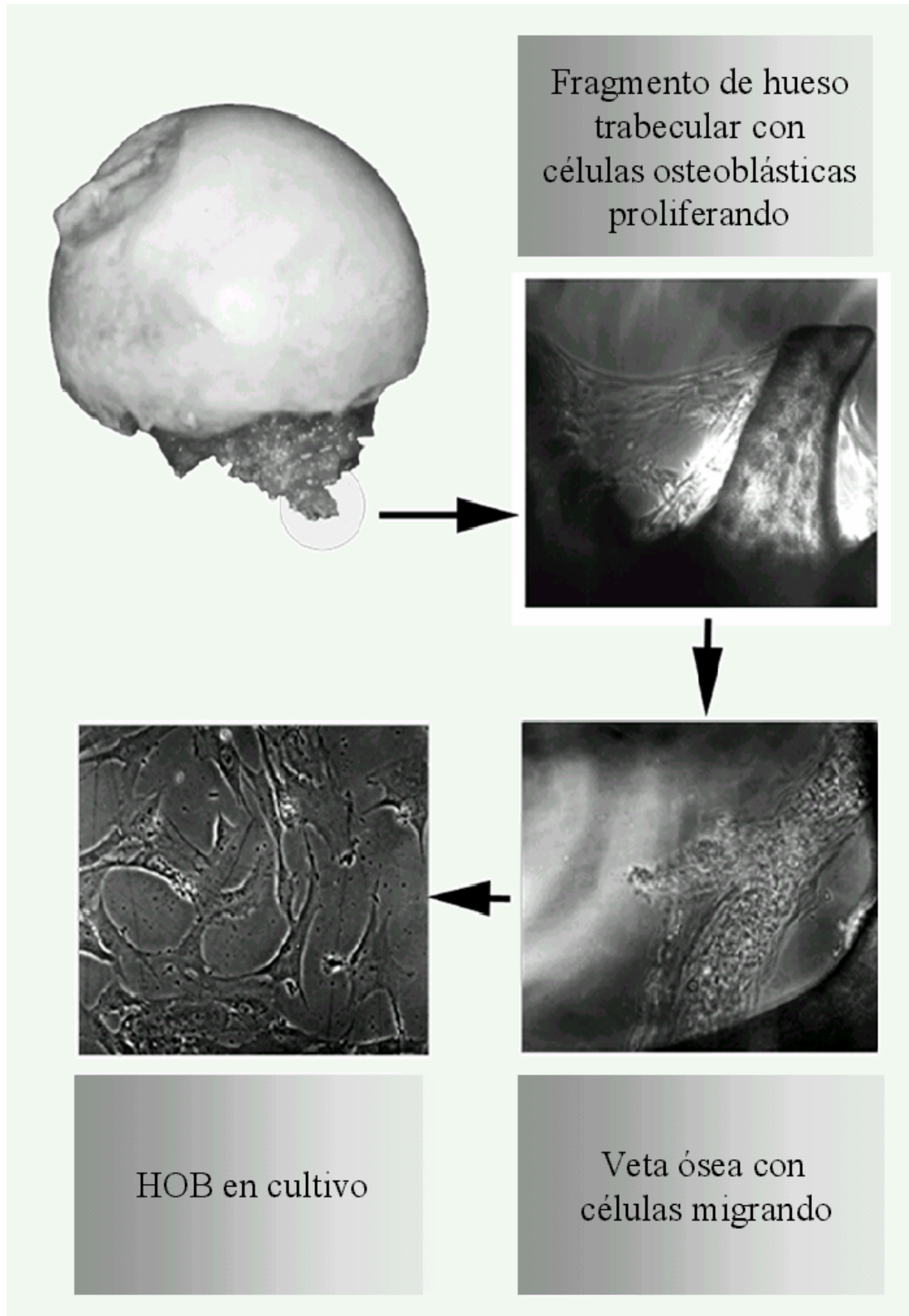


Figura 7.1: Pasos para obtener un cultivo celular primario de células osteoblásticas (HOB) a partir de una cabeza de fémur.

El medio de cultivo fue “*Dubelco’s Modified Eagle’s Medium*” (DMEM), complementado con un 10% de suero fetal bovino (FCS), un 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA), 0,02M de tampón ácido [4-(2-(hidroxietil)-1-piperazinetano-sulfónico] (HEPES), L-Glutamina 2 mM, 100 unidades ml^{-1} de penicilina y 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ estreptomycin y 150 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ascorbato. El medio de cultivo se cambió cada tres días. Cuando los frascos alcanzaron la confluencia, las células se digirieron utilizando tripsina (Sigma) al 0,02% en PBS y HEPES 0,02 M. La suspensión de células se centrífugo a 2000 rpm durante 5 minutos y el precipitado se resuspendió en medio de cultivo utilizando una jeringuilla para romper los agregados. La viabilidad de las células se observó mediante su tinción con “*Tripan Blue*” y la densidad celular se calculó mediante un hematocitómetro. La suspensión original de células se diluyó hasta la densidad deseada y se homogeneizó con la ayuda de una pipeta Pasteur antes de sembrarlas sobre los materiales.

2.2 Tests de citotoxicidad

Se realizaron métodos tanto directos, como indirectos, para determinar la citotoxicidad de los materiales. En los métodos indirectos, la citotoxicidad se mide tras exponer a las células a los extractos acuosos de los materiales obtenidos a distintos tiempos de elución. Los ensayos indirectos se basan en la medida de la acción de enzimas mitocondriales sobre sales de tetrazolio (MTT), la acción redox de células en el medio de cultivo (Alamar Blue) y el uso de tintes de viabilidad (Neutral Red). En los ensayos directos, las células se ponen en contacto directo con los materiales y después de diferentes tiempos se tratan con tintes fluorescentes capaces de diferenciar las células vivas de las muertas.

2.2.1 Medio de elución

Se obtuvieron extractos acuosos tanto de los materiales ensayados, como de los controles (Thermanox™: control negativo; PVC: control positivo). Se introdujeron las muestras (110 mg) en tubos Falcon con 20 ml de medio de cultivo sin ascorbato (este reactivo interfiere con el ensayo MTT). Los tubos colocaron en un rotor a 37°C y el medio se recopiló al cabo de diferentes tiempos (4 horas, 24 horas, 48 horas y 7 días).

Los extractos obtenidos se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Todo el protocolo de trabajo se realizó bajo condiciones estériles.

2.2.2 Ensayo MTT

El ensayo MTT mide la acción de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas sobre la sal de tetrazolio: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)⁸. La sal es transformada por las enzimas en cristales azules insolubles, que absorben a 570 nm. Las enzimas que realizan esta acción sólo se encuentran en células vivas, y el color azul producido es proporcional al número de células vivas presentes⁹. Este ensayo fue elegido por su gran sensibilidad¹⁰.

Se sembraron células HOB en microplacas estériles de 96 pocillos en una densidad de 1×10^4 células/pocillo en medio de cultivo completo hasta que alcanzaron la confluencia. En este momento el medio se reemplazó por el correspondiente extracto (100 μl /pocillo). Las placas se colocaron en una incubadora a 37°C , aire humidificado y atmósfera de CO_2 al 5%. Al cabo de 24 horas, se añadió una solución de MTT en PBS a 37°C a cada pocillo para dar una concentración final de 0,5mg/ml y las placas se volvieron a meter en la incubadora durante 4 horas. Después, se desecha el exceso de medio de cultivo y MTT y se añaden 100 μl de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada pocillo, con el fin de disolver los cristales formados. Las microplacas se agitan durante 10 minutos para asegurarnos que los cristales se disuelven en el DMSO y se midió la absorbancia a 570 nm, con una longitud de onda de referencia de 630 nm, en un lector de microplacas Dynatech MR700. Para evaluar el efecto citotóxico de los extractos de los materiales, los resultados fueron normalizados respecto al control negativo (TMX = 100 %) y se realizaron test estadísticos de ANOVA ($p < 0,05$).

2.2.3 Ensayo Alamar Blue

El Alamar Blue es un indicador redox que responde a la reducción u oxidación del medio^{11,12}. En este ensayo se produce fluorescencia y cambio de color en respuesta a la reducción química del medio de cultivo por la acción del crecimiento y división celular¹³.

Al igual que en el ensayo MTT, se sembraron células HOB en microplacas estériles de 96 pocillos en una densidad de 1×10^4 células/pocillo en medio de cultivo completo hasta que alcanzaron la confluencia. En este momento el medio se reemplazó por el correspondiente extracto (100 μ l/pocillo). Al cabo de 24 horas de incubación, se reemplazó el extracto por 100 μ l de una disolución de Alamar Blue (Alamar Blue (Biosource) al 10% en medio DMEM sin “*phenol red*”). Pasadas tres horas de incubación, la fluorescencia creada se midió en un fluorímetro Fluoroskan, empleando una longitud de onda de excitación de 510 nm y una longitud de onda de emisión de 590nm. Para determinar el efecto de los extractos de los materiales sobre las HOB, los resultados fueron normalizados respecto al control negativo (TMX = 100 %) y se realizaron test estadísticos de ANOVA ($p < 0,05$) respecto al mismo (TMX).

2.2.4 Ensayo *Neutral Red*

El ensayo Neutral Red (NR) mide la actividad lisosomal de las células y está basado en la determinación espectroscópica del hidrocloreuro de 3-amino-*m*-dimetilamino-2-metilfenazina (NR) almacenado por en los lisosomas de células viables^{10,14,15}. Como en los dos casos anteriores, los resultados fueron normalizados respecto al control negativo (TMX = 100 %) y se realizaron test estadísticos de ANOVA ($p < 0,05$) respecto al mismo (TMX), con el fin de evaluar la respuesta celular.

2.3 Microscopía

2.3.1 Microscopía óptica

En los ensayos indirectos, la morfología de las células expuestas a los extractos de los materiales, fue observada cada día para detectar los efectos citotóxicos de los mismos. Durante el ensayo directo (Vida/Muerte), se examinó regularmente la morfología de las células HOB sobre TMX (control negativo) mediante un microscopio óptico, con el fin de monitorizar cualquier cambio o anomalía en los cultivos.

2.3.2 Microscopía confocal: Ensayo Vida/Muerte

Se utilizó una combinación de “*calcein AM*”, un tinte no fluorescente que es transformado por las células vivas en “*calcein*” fluorescente, y “*ethidium homodimer-1*”, tinte que pasa a través de las membranas dañadas para unirse al ADN¹⁶, para determinar la viabilidad de las células HOB sembradas en contacto directo con los materiales.

Las células HOB se sembraron en micromasa sobre los materiales secos o previamente hinchados en una densidad de $1,5 \times 10^5$ células ml^{-1} durante 24 horas. El medio de cultivo se reemplazó por una disolución (100 μl) de $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de los dos tintes anteriormente mencionados. Después de una hora de incubación, las muestras se visualizaron en un microscopio confocal (Nikon).

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Sistema HA-Q

Los resultados obtenidos mediante el **ensayo MTT** sugieren que los extractos liberados al medio por el sistema HA-Q a las 4 horas de poner el material en contacto con el medio, ejercen un efecto perjudicial sobre la actividad mitocondrial de las células. Sin embargo, se recuperan niveles normales o incluso superiores de actividad mitocondrial con las alícuotas de 24 horas, 48 horas y 7 días de los materiales en contacto con el medio de cultivo (Fig 7.2).

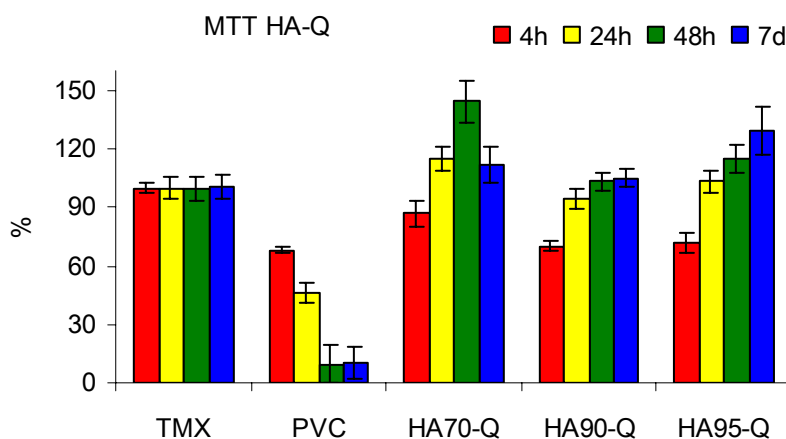


Figura 7.2: Resultados del ensayo MTT del sistema HA-Q y de los controles negativo (TMX) y positivo (PVC). Los resultados son la media \pm desviación estándar (DS), para n=8.

Los ensayos **Alamar Blue** y **Neutral Red** no detectan cambios en el metabolismo celular y actividad lisosomal de una población de HOB expuesta a alícuotas eluidas de los materiales HA-Q, respectivamente.

Por lo tanto, se pueden sacar conclusiones similares de los tres ensayos indirectos que monitorizan diferentes aspectos de la actividad celular. Todos los extractos tóxicos (monómero residual, cadenas de bajo peso molecular...) se liberan durante las primeras 4 horas del ensayo de elución y las células recuperan niveles normales en las siguientes horas. La información obtenida por los tres experimentos confirma los mismos resultados. Sin embargo, la mayor sensibilidad de el ensayo

MTT¹⁰ hace que sea el único en detectar el efecto negativo de los productos liberados por los materiales.

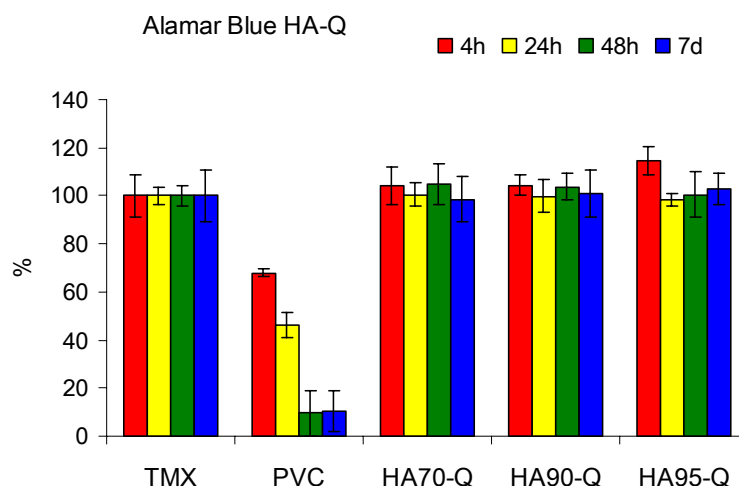


Figura 7.3: Resultados del ensayo AB para el sistema HA-Q y de los controles negativo (TMX) y positivo (PVC). Los resultados son la media \pm desviación estándar (SD), para $n = 8$.

3.2 Sistema DA-Q

El sistema DA-Q fue entrecruzado utilizando para ello vapor de glutaraldehído durante diferentes tiempos de reacción, obteniendo los materiales detallados en la Tabla 7.1.

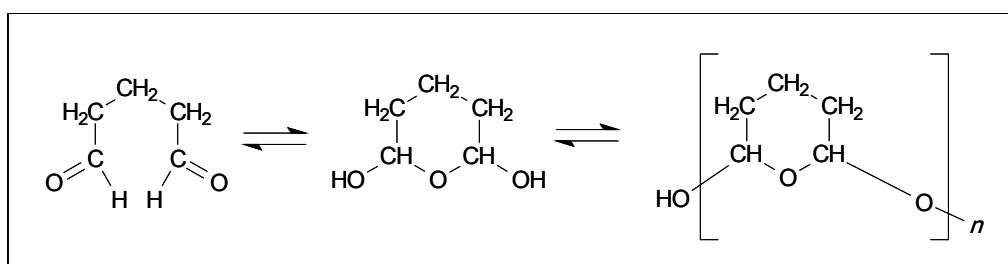


Figura 7.4: Esquema de la estructura en equilibrio del glutaraldehído en solución acuosa.

El glutaraldehído es un reactivo muy utilizado en el campo de la medicina, que ha sido ampliamente utilizado como agente de entrecruzamiento para la preparación de prótesis y para el entrecruzamiento de proteínas y polisacáridos en el diseño de dispositivos de liberación controlada de fármacos.¹⁷

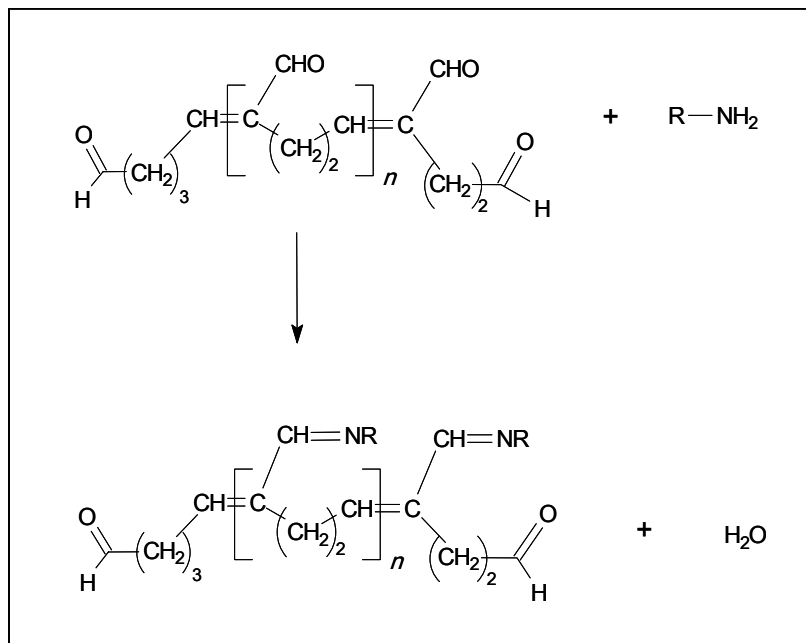


Figura 7.5: Esquema de la reacción del glutaraldeído con aminas primarias.

La ventaja del glutaraldeído frente a otros es que reacciona rápidamente y es capaz de extenderse distintas distancias entre moléculas, ya que una solución acuosa de glutaraldeído está formada por una mezcla de especies en equilibrio (aldehído libre, hemiacetales poliméricos cíclicos y varios polímeros α,β -insaturados) (Figura 7.4). De esta forma es capaz de reaccionar con un mayor número de grupos amino de las moléculas obteniendo redes fuertemente entrecruzadas, en las que se retarda la biodegradación y aumenta la estabilidad estructural^{18,19}.

El glutaraldeído polimerizado reaccionará con las aminas primarias del quitosano para formar un enlace imino estabilizado (base de Schiff) y no reacciona mediante una adición tipo Michael (Figura 7.5).

Los extractos liberados al medio de los materiales DA-Q durante las primeras cuatro horas del experimento, resultaron citotóxicos en todos los casos, según los datos obtenidos mediante el **ensayo MTT** (Figura 7.6). La toxicidad aumenta considerablemente con el tiempo de entrecruzamiento con glutaraldeído. Esto significa, que el efecto citotóxico descrito, probablemente se debe a los restos de glutaraldeído que permanecen sin reaccionar en la superficie de los materiales. Sin

embargo, la respuesta recupera niveles normales con los siguientes extractos, confirmándose los resultados expuesto por Gendler et al.²⁰, quienes defendían que los efectos citotóxicos del glutaraldehído residual desaparecían por eliminación o inactivación del mismo, tras un lavado exhaustivo de los materiales.

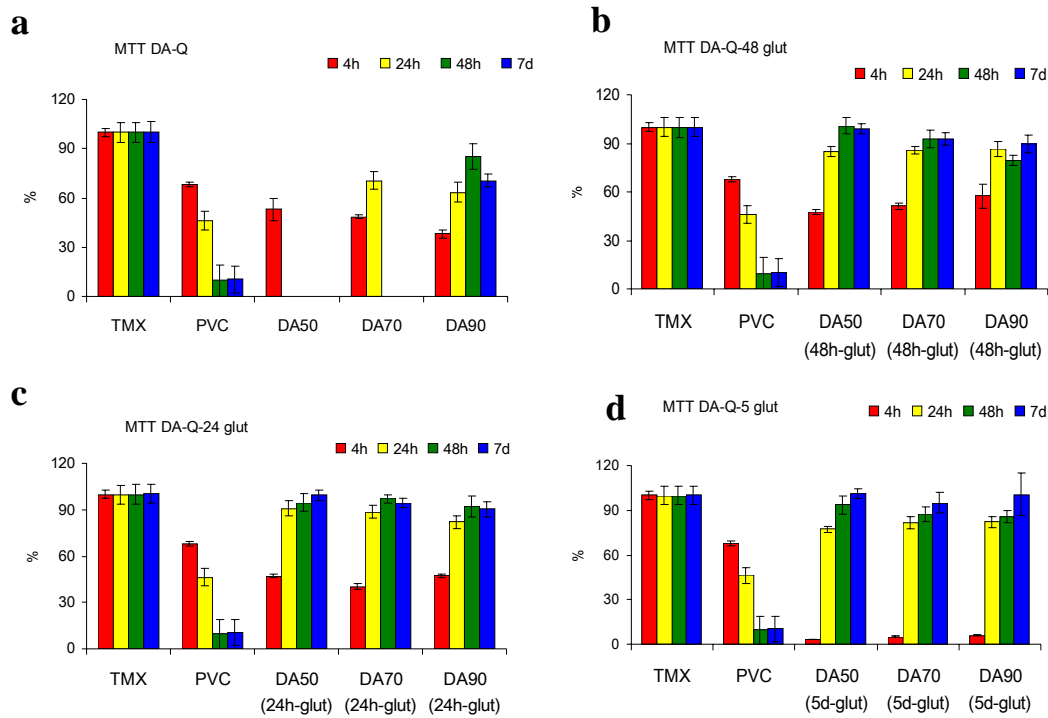


Figura 7.6: Resultados del ensayo MTT del sistema DA-Q entrecruzado a diferentes tiempos de reacción (a: no entrecruzado; b: 1 día de reacción; c: 2 días de reacción; d: 5 días de reacción) y de los controles negativo (TMX) y positivo (PVC).

Los ensayos **Alamar Blue** y **Neutral Red** detectan únicamente la citotoxicidad de los extractos de los materiales entrecruzados con vapor de glutaraldehído durante 5 días. Esto se debe, como ya se indicó anteriormente, a la menor sensibilidad de estos ensayos respecto al MTT.

3.3 Microscopía confocal: Ensayo Vida/Muerte

El ensayo Vida/Muerte llevado a cabo mediante microscopía confocal es un ensayo cualitativo y directo, con el que se pretendía tener una idea de la morfología y supervivencia de las células en contacto con los PEC. No se llevó a cabo el recuento de células vivas y muertas, pero se observó la fluorescencia de las células teñidas y sembradas en toda la superficie del material.

Existen notables diferencias entre los resultados obtenidos para los hidrogeles secos y previamente hinchados. Cuando la siembra de las células se realizó sobre los materiales secos, se observaron pocas células sobre la superficie de los hidrogeles. Su morfología se mantenía redonda, y no se observó en ningún caso indicios de adhesión celular (pseudópodos o aplanamiento de las células). Este comportamiento es muy común en el caso de células en contacto con superficies muy hidrofílicas. Además, la mayoría de ellas estaban muertas. Es decir, el núcleo de las HOB se observó teñido de rojo, lo que indica que el “*ethidium homodimer*” atravesó las membranas dañadas de las células muertas y llegó hasta el núcleo para unirse al ADN nuclear (Figuras 7.7-a y 7.9-a). Esto indica que la viabilidad de las células se ve tremendamente afectada por el proceso de hinchamiento de los materiales, y probablemente sufran un proceso de deshidratación severa durante el mismo. En las Figura 7.7 las células que se observan sobre la superficie del DA70-Q poseen una morfología redondeada y sus núcleos aparecen teñidos de rojo. El sistema HA70-Q (Figura 7.9) muestra el mismo comportamiento, las células que se encuentran sobre la superficie presentan el núcleo teñido de rojo.

Sin embargo, cuando la siembra se realizó sobre los materiales previamente hinchados, se observó que la morfología celular se mantenía redonda (materiales muy hidrofílicos) y las pocas células que permanecían sobre el material tenían un aspecto mucho más sano que en el caso anterior, ya que la estructura celular se mantenía teñida de color verde y existían muchos menos núcleos de color rojo. Como puede observarse en las Figuras 7.8 y 7.10 no aparece nada en la Imagen a (no existe daño en la membrana y el “*ethidium homodimer*” no llega a teñir el núcleo). Además en la Figura 7.10 se muestran dos células en división, signo de que el ambiente en el que se encuentran es mucho menos agresivo que en el caso de las muestras no hidratadas.

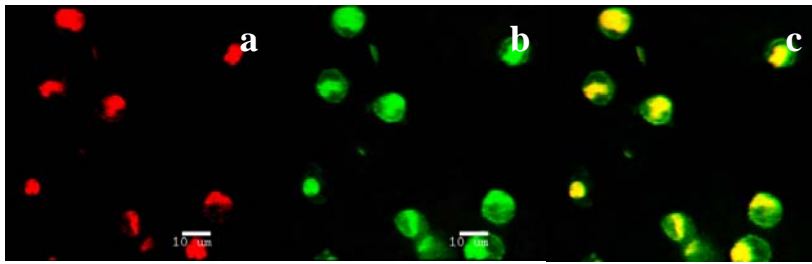


Figura 7.7: Imagen de microscopía confocal de HOB sobre DA70-Q.

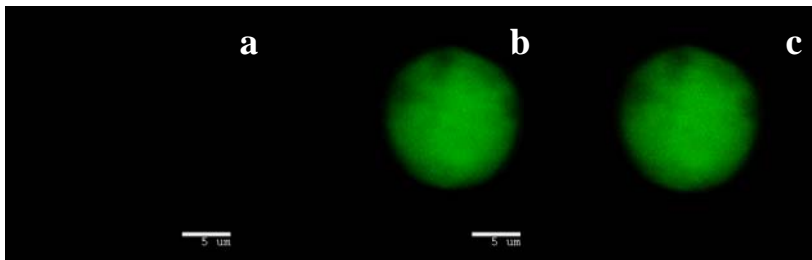


Figura 7.8: Imagen de microscopía confocal de HOB sobre DA70-Q hidratado

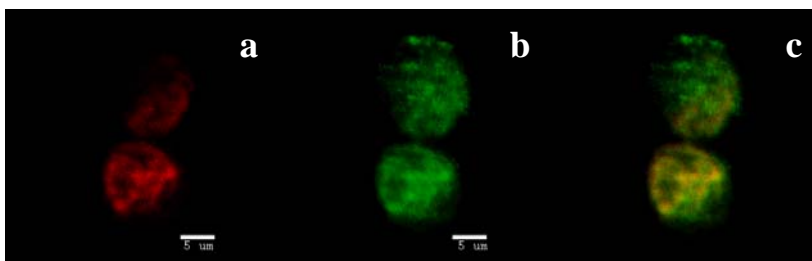


Figura 7.9: Imagen de microscopía confocal de HOB sobre HA70-Q.

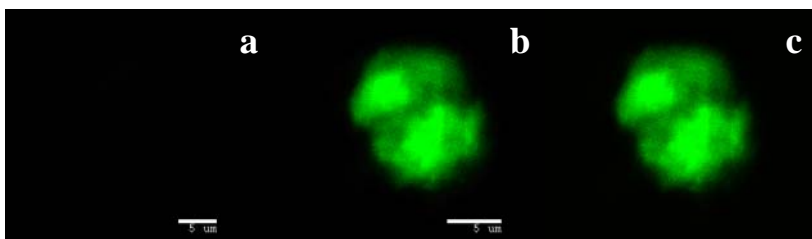


Figura 7.10: Imagen de microscopía confocal de HOB sobre HA70-Q hidratado.

Las distintas imágenes corresponden a: imagen del núcleo dañado de las células en las que el “*ethidium homodimer*” se ha unido al ADN (a), imagen de la membrana celular teñida por acción del “*calcein*” fluorescente (b), imagen conjunta del núcleo y la membrana celular (c).

Por lo tanto, los datos obtenidos mediante los test *in vitro* de citotoxicidad, indican que los materiales no presentan una acción citotóxica sobre las células HOB si son exhaustivamente lavados (durante al menos 4 horas) e hidratados antes de ponerlos en contacto con las células.

4 BIBLIOGRAFÍA

- 1) Williams D.F. *Concise encyclopedia of medical and dental devices*; 1st Ed ed.; Pergamon Press: Oxford, UK, 1990.
- 2) ISO 10993 *Biological evaluation of medical devices*, 1992.
- 3) Vroman L., Adams A. L., Klings M., Fischer G.C., Muñoz P.C., Solensky R.P. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1977**, 283, 65-76.
- 4) Brash J.L. *Role of plasma protein adsorption in the response of blood to foreign surfaces*; Sharma C.P., S. M., Ed.; Technomic: Lancaster, PA, 1991, pp 3-24.
- 5) Peppas N.A. *Hydrogels in medicine and pharmacy*; CRC Press: Boca Raton, Florida, 1987.
- 6) Ratner B.D. *Biomedical applications of hydrogels: review and critical appraisal*; Williams D.F., Ed.; CRC Press: Boca Raton, Florida, 1981; Vol. 2.
- 7) Di Silvio L. *Development of cell culture model and primary human osteoblasts*; University of London: London, 1995.
- 8) Mosmann T. *J Immunol Meth* **1983**, 65, 55-63.
- 9) Wan H. et al. *J Mat Sci: Mat in Med* **1994**, 5, 154-159.
- 10) Clifford C.J., Downes S. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1996**, 7, 637-643.
- 11) Nakayama G.R., Caton M. C., Nova M.P., Parandoosh Z. *J Immunol Methods* **1997**, 204, 205-208.
- 12) Nikolaychik V.V., M. M., Lelkes P.I. *J Biomater Sci Polym Ed* **1996**, 7, 181-191.
- 13) Nociari M.M., Shalev A., Benias P., Russo C. *J Immunol Methods* **1998**, 213, 157-167.
- 14) Borenfreund E., Puerner J. A. *J Tiss Cult Meth* **1984**, 9, 7-9.
- 15) Borenfreund E. et al. *Toxicol in vitro* **1988**, 2, 1-6.
- 16) Moore P.L., McCoubrey I., Hougland R.P. *Journal of Cell Biology* **1990**, 111, 58a [Abstract N° 304].
- 17) Jayakrishnan A., Jameela S. R. *Biomaterials* **1996**, 17, 471-484.
- 18) Jameela S.R., Jayakrishnan A. *Biomaterials* **1995**, 16, 769-775.
- 19) Yao K., Peng T., Goosen M.F.A., Min J.M., He Y.Y. *Journal of Applied Polymer Science* **1993**, 48, 343-354.
- 20) Gendler E., Gendler S., Nimni M.E. *J Biomed Mater Res* **1984**, 18, 727-736.

CAPÍTULO 7

APLICACIÓN DE LA RESONANCIA DE PLASMÓN SUPERFICIAL (SPR) AL ANÁLISIS DE COMPLEJOS POLIELECTROLÍTICOS (PEC) Y SU INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS

CAPÍTULO 7: APLICACIÓN DE LA RESONANCIA DE PLASMÓN SUPERFICIAL (SPR) AL ANÁLISIS DE COMPLEJOS POLIELECTROLÍTICOS (PEC) Y A SU INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS.

1	INTRODUCCIÓN.....	179
1.1	Teoría de la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR).....	182
1.2	Aplicaciones de la SPR	184
2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	185
2.1	Reactivos	185
2.2	Resonancia de Plasmón	185
2.3	Preparación de la muestra.....	186
2.4	Interacciones polielectrolíticas quitosano-copolímeros.....	186
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	187
3.1	Sistema quitosano-HEMA:AMPS	189
3.2	Sistema quitosano-DMAA:AMPS	191
4	BIBLIOGRAFÍA	194

1 INTRODUCCIÓN

Las interacciones superficiales de los biomateriales poliméricos son fundamentales a la hora de determinar ciertos comportamientos, tales como la respuesta de cuerpo extraño o la biocompatibilidad. De hecho, muchos esfuerzos en el diseño de materiales biocompatibles se dirigen hacia el control de las interacciones superficiales, ya que la superficie del material posee una reactividad particular inevitablemente diferente a la del interior del mismo. Los instrumentos médicos modernos están hechos de materiales como metales, cerámicos y polímeros. Debido a la mayor energía libre superficial de los metales y cerámicos, sus superficies se recubren con polímeros biológicamente inertes en aplicaciones en contacto con el medio fisiológico. De hecho, polímeros que forman películas homogéneas proporcionan mejor biocompatibilidad que las superficies originales y se han utilizado ampliamente en circuitos extracorpóreos, catéteres de drenaje, injertos vasculares, membranas de diálisis...etc¹.

A la hora de estudiar la hemocompatibilidad de un biomaterial, determinar la interacción de las plaquetas con éste es primordial. Sin embargo, antes de la adhesión de las plaquetas, se absorben rápidamente proteínas plasmáticas sobre la superficie del material^{2,3}, las cuales influyen notablemente en las interacciones de la sangre con el mismo. La composición y reversibilidad de dicha adsorción depende principalmente de las características superficiales del polímero. Por lo tanto, la actividad anticoagulante o antitrombogénica del material polímero viene determinada por sus características superficiales. No se pueden especificar qué parámetros son los más importantes para entender las respuestas biológicas a las superficies (probablemente interactúan varios de estos parámetros simultáneamente), pero se han publicado numerosos estudios sobre la rugosidad, la distribución de grupos funcionales aniónicos y la densidad de interacciones electrostáticas en el polímero, balance hidrofóbico/hidrofílico en la superficie, separación de microdominios heterogéneos, etc⁴. Por lo tanto, uno de los mayores retos que se le plantean al científico para mejorar la funcionalidad de los biomateriales es controlar la adhesión proteica, bien favoreciendo cierto tipo de conformaciones, o bien reduciendo la cantidad de proteínas sobre la superficie⁵.

El fibrinógeno parece ser un componente muy importante de dicha capa protéica ya que es capaz de inducir la adhesión y agregación plaquetaria por interacción directa

con los receptores plaquetarios GPIIb/IIIa⁶. Además, Chinn et al. demostraron que la adhesión plaquetaria se inhibía casi por completo cuando el plasma era deficiente en fibrinógeno⁷. Por otro lado, se sabe que la adhesión y activación de plaquetas se ve significativamente reducida sobre materiales recubiertos con albúmina. Esto se debe a que la membrana plaquetaria no tiene receptores de albúmina y por tanto, no interacciona específicamente con ella⁸.

Como ya se ha comentado en el capítulo anterior, el quitosano es un polímero básico semisintético que se obtiene de la quitina. Sus propiedades químicas y biológicas le hacen tremendamente atractivo para su aplicación en el campo de los biomateriales⁹⁻¹². Sus propiedades más destacables son su biocompatibilidad, biodegradabilidad, nula toxicidad (sus productos de degradación son metabolitos naturales)¹³, su capacidad de atrapar lípidos ácidos y de formar filmes, recubrimientos, fibras, partículas y disoluciones⁹. Sin embargo, ha sido descrito como un material que activa tanto el complemento¹⁴, como los sistemas de coagulación¹⁵. Esto se debe a que absorbe gran cantidad de fibrinógeno y otras proteínas plasmáticas¹⁶. Y se ha demostrado que el grado de activación de los sistemas de coagulación está íntimamente relacionado con el grado de acetilación del quitosano^{16,17}.

El principal objetivo de este capítulo ha sido el estudiar la formación de PEC por interacción directa de moléculas con cargas complementarias y la adsorción en la superficie de estos materiales de proteínas plasmáticas de interés biomédico. Una de las estrategias más utilizadas a la hora de buscar recubrimientos hemocompatibles es el recubrimiento de los dispositivos biomédicos con un hidrogel¹⁸, ya que la pequeña tensión interfacial que se establece entre el gel hinchado y el flujo sanguíneo, reduce la adsorción de proteínas plasmáticas y por tanto, la adhesión de plaquetas a la superficie. Otra de las estrategias empleadas (y ya comentada en esta memoria) para inhibir la adhesión plaquetaria en materiales polímeros es modificar su carga eléctrica superficial. Ha sido descrito en la literatura que algunos materiales cargados positivamente son trombogénicos, mientras que aquellos cargados negativamente tienden a ser no-trombogénicos¹⁹. Esto sugiere que las interacciones electrostáticas que tienen lugar entre los conductos vasculares y la sangre también controlan los fenómenos que

desencadenan la cascada de coagulación. Por otro lado, los grupos sulfónicos han sido relacionados con cierta capacidad anticoagulante de la heparina²⁰.

Se han empleado muchas técnicas de análisis superficial a la hora de caracterizar biomateriales, aunque muy pocas son capaces de monitorizar las interacciones dinámicas que surgen en un ambiente fluido, más similar al que existiría *in vivo*. Algunas de estas técnicas incluirían la elipsometría, la reflexión interna total, las guías de onda dieléctricas monomodo y la resonancia de plasmón. El conjunto de todas ellas nos ofrece la posibilidad de estudiar fenómenos dinámicos en un amplio rango de superficies.

Con el fin de obtener recubrimientos hidrofílicos y con grupos sulfónicos en su estructura, se han formado complejos polielectrolíticos insolubles “quitosano-copolímero sintético con AMPS en su estructura”. De esta forma aprovechamos las buenas características descritas para el quitosano (entre las que habría que destacar desde el punto de vista práctico, su capacidad para formar películas) y las de los polímeros sintéticos, negativamente cargados por grupos sulfónicos (biológicamente activos) en sus cadenas laterales.

La resonancia de plasmón superficial (SPR) es capaz de monitorizar cualquier proceso dinámico²¹, tales como adsorción^{22,23} o degradación²⁴, en un número amplio de superficies con interés biomédico²⁵, a tiempo real, sin necesidad de marcar el analito ni de complicados procesos preparativos y con una elevada sensibilidad^{3,26}. Es capaz de obtener rápidamente información acerca de la velocidad de adsorción y de su extensión, permitiendo la determinación de propiedades dieléctricas, cinéticas de asociación/disociación y constantes de afinidad de interacciones específicas ligando-ligando²⁷.

En este capítulo estudiaremos mediante SPR, en primer lugar, la formación de complejos polielectrolíticos entrecruzados físicamente mediante enlaces iónicos, por mezcla directa de macromoléculas con grupos iónicos de carga opuesta y la posibilidad de formar materiales multicapas. En segundo lugar, se determinará la interacción de estos materiales preparados *in situ* con dos de las proteínas plasmáticas más abundantes

en el plasma y de mayor significado en los ensayos de hemocompatibilidad, la albúmina (4,0 g/dl) y el fibrinógeno (0,3 g/dl).

1.1 Teoría de la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)

La SPR se basa en un fenómeno óptico asociado a la oscilación de densidad de carga en la interfase entre dos medios que poseen constantes dieléctricas de signos opuestos (por ejemplo un metal y un dieléctrico). La excitación óptica de un plasmón superficial se produce mediante una onda evanescente y se consigue cuando un rayo de luz incide en la interfase entre la capa metálica y el medio dieléctrico a un ángulo determinado, denominado ángulo de resonancia. La excitación del plasmón superficial provoca un descenso muy grande de la reflectancia del metal. Si se mide la intensidad del haz reflejado en función del ángulo de incidencia de la luz, se observa un mínimo muy pronunciado para el ángulo de resonancia. El ángulo de resonancia depende fuertemente del índice de refracción del medio colindante a la lámina metálica.

Para excitar una onda de plasmón superficial con una onda electromagnética incidente en la superficie, se deben cumplir las condiciones de resonancia, es decir, que los vectores de propagación del plasmón superficial y de la onda electromagnética deben ser iguales. Los plasmones superficiales únicamente existirán si la permeabilidad eléctrica del metal y el medio dieléctrico son de signo contrario. Estas condiciones sólo se cumplen para frecuencias del infrarrojo o del visible con algunos metales. La elección del metal es crítica, ya que debe presentar electrones libres. Los metales más apropiados son la plata, el oro, el cobre y el aluminio siendo los dos primeros los más comúnmente utilizados. La plata, porque proporciona picos de resonancia muy agudos y el oro por su estabilidad. En general los plasmones superficiales se producen con frecuencias del rango del visible con grandes pérdidas a medida que nos desplazamos hacia el IR. La determinación del espesor óptico de la capa metálica es fundamental a la hora de obtener el valor de reflectancia mínimo y depende de las constantes ópticas del metal y de la longitud de onda de la luz (el espesor óptico del oro es 45 nm a una longitud de onda de 790 nm). Existen dos formas de excitar ópticamente y alcanzar las condiciones de resonancia: mediante reflexión total con estructuras prismáticas acopladas o empleando redes de difracción. La primera es la más utilizada debido a su simplicidad y se le denomina configuración Kretschmann (Figura 6.1).

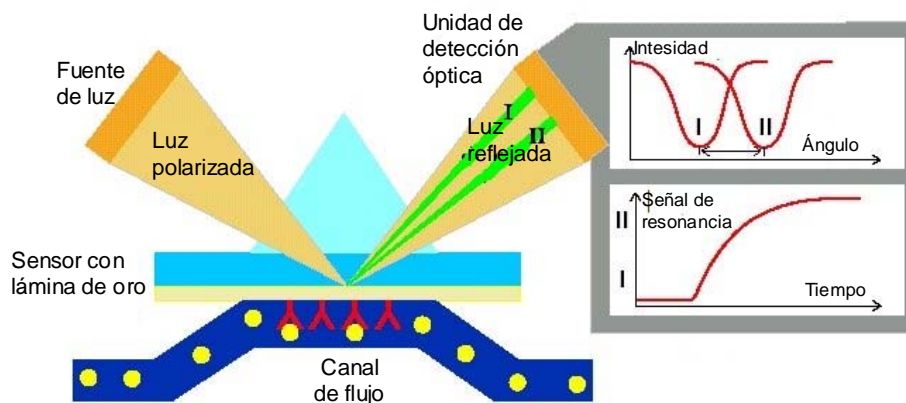


Figura 6.1: Esquema de un aparato de SPR con configuración Kretschmann y de su unidad de detección.

El ángulo de resonancia es muy sensible a los cambios que se producen en el índice de refracción en las proximidades de la superficie metálica y cualquier cambio en el índice de refracción, como por ejemplo una interacción química, se puede detectar a través de cambios en el ángulo de resonancia (Figura 6.1).

El ángulo de resonancia depende de la longitud de onda incidente, del índice de refracción del prisma, del metal y de la capa de muestra que se desea detectar. Si únicamente el último cambia, la SPR puede utilizarse para monitorizar cambios en el índice de refracción de las capas adsorbidas en la superficie metálica. Los cambios en el índice de refracción, pueden relacionarse con variaciones de masa y por tanto se pueden relacionar con interacciones específicas entre las moléculas de analito depositadas previamente en la superficie metálica y sus receptores específicos.

Cuando se utiliza luz monocromática para excitar la respuesta de la SPR, existen dos formas de medirla: seguir la variación del ángulo de resonancia acoplado o seguir la intensidad de la luz reflejada a un ángulo fijo. En este trabajo se utilizará el segundo método. Para ello se elige un ángulo a la mitad de la anchura del valle de resonancia y se mide la intensidad de la luz reflejada para ese ángulo. De esta forma se pueden registrar cambios a tiempo real debido a que las variaciones del índice de refracción pueden medirse con una alta sensibilidad. Esta forma de medida sólo puede utilizarse cuando los cambios en el índice de refracción son pequeños, como sería el caso de interacciones biomoleculares. Además de la monitorización *in situ* de las interacciones,

se puede obtener información acerca de la especificidad, concentración y cinética de dichas interacciones.

1.2 Aplicaciones de la SPR

Las aplicaciones de esta técnica son numerosas y en continuo aumento³. Entre otras cabría destacar el estudio de las propiedades ópticas de una capa metálica, medidas de espesor de filmes y de índices de refracción de capas orgánicas sobre superficies metálicas²², estudio de la adsorción de proteínas a biomateriales² y la adsorción de gases en superficies para su utilización como biosensores²⁶.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos

La albúmina de suero bovino n° A0281, BSA ($pI = 4,9$; 68 kD; > 99 % pureza), y el fibrinógeno de plasma bovino n°. F8630 ($pI = 6,0$; 340 kD, 75 % de proteína, 10 % citrato de sodio y 15 % cloruro de sodio) fueron suministrados por Sigma y se utilizaron sin previa purificación. El quitosano de bajo peso molecular ($M_r \approx 150000$) de grado de acetilación 19 % fue suministrado por Fluka y el método de purificación empleado con este compuesto ha sido descrito anteriormente (Capítulo 5).

2.2 Resonancia de Plasmón

Todas las medidas se llevaron a cabo en un prototipo de Sensor SPR desarrollado en el Departamento de Biosensores del Instituto Nacional de Microelectrónica del CSIC (Figura 6.2).

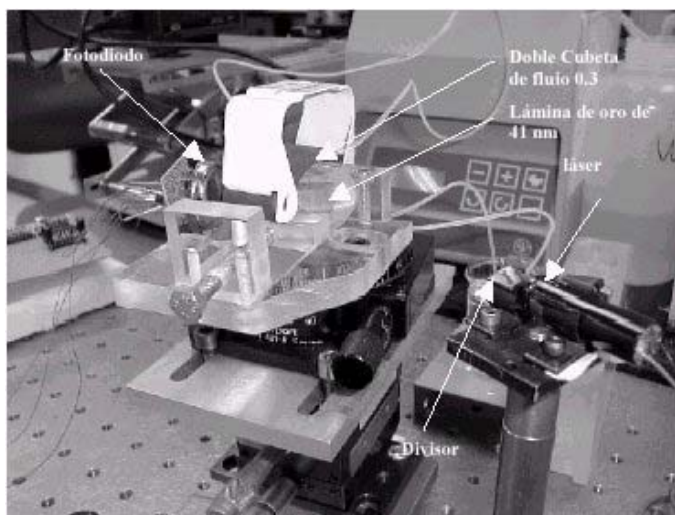


Figura 6.2: Fotografía del aparato de SPR empleado en este trabajo .

La fuente de luz es un diodo de láser de 3 mW (670 nm) que se divide en dos haces iguales mediante un divisor de haz. La luz se hace incidir a través de un prisma semicircular sobre una lámina de oro de 41 nm. La luz reflejada es detectada por un

fordiodo cuadrante, amplificada y digitalizada por una tarjeta de adquisición. Los datos digitales se transmiten a un PC, donde se procesaron a tiempo real. Ésta configuración permite la realización de medidas simultáneas independientes o el uso de una de las cubetas como referencia. Esto es de gran importancia a la hora de discriminar las variaciones de intensidad provocadas por inestabilidad del láser y cambios en la temperatura, así como para diferenciar la señal debida a la reacción de reconocimiento frente a las de los cambios de índice de refracción de la disolución.

2.3 Preparación de la muestra

Sobre la superficie metálica se depositó una capa de quitosano mediante “*spin-coating*”. Se cubrió la placa metalizada con una solución acuosa de quitosano de 5 mg/ml y se hizo girar con una aceleración de 75 y una velocidad de 120 durante 30 segundos. Posteriormente, las muestras se secaron en una estufa a 180 °C durante 30 minutos.

2.4 Interacciones polielectrolíticas quitosano-copolímeros

Sobre la capa de quitosano se hicieron pasar a una velocidad de 10 $\mu\text{l min}^{-1}$ diferentes soluciones acuosas de los homopolímeros PDMAA, PAMPS y de los copolímeros HA30 y HA70 del sistema HEMA-AMPS, y DA30 y DA 70 del sistema DMAA-AMPS en concentración 1×10^{-2} M. Además, se estudiaron las interacciones de los complejos polielectrolíticos con las proteínas BSA y fibrinógeno. Para ello se prepararon disoluciones proteicas de concentración 1 mg ml^{-1} en PBS (Sigma), pH 7,4 que se pasaron a una velocidad de flujo constante de 1 $\mu\text{l min}^{-1}$.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuando una superficie artificial se pone en contacto con la sangre, pasados unos segundos se adsorben sobre su superficie proteínas plasmáticas, para después producirse la adhesión de plaquetas. A nivel molecular la estructura superficial tiene un efecto en la adsorción de proteínas y éstas a su vez sobre la adhesión de las plaquetas. En este capítulo, se ha seguido por SPR la formación de recubrimientos poliméricos *in situ*, mediante la deposición sucesiva de capas (“capa a capa”). La deposición de sustancias sobre la placa original, queda reflejado en las curvas de SPR como cambios en la intensidad de luz reflejada a un ángulo fijo, cercano al ángulo de resonancia. En la Figura 6.3 se muestra la respuesta que registrará un aparato de SPR ante la adhesión y NO adhesión de sustancias en la superficie del sensor (la placa metálica o la placa metálica previamente recubierta).

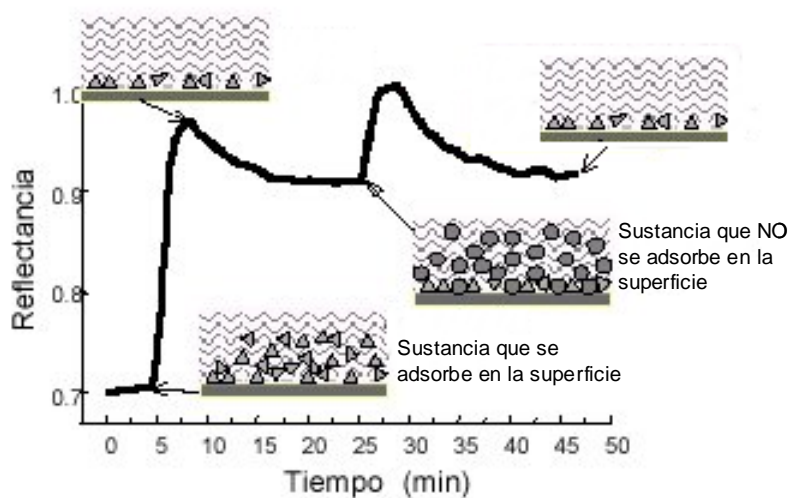


Figura 6.3: Esquema del registro del aparato de SPR ante la adsorción (\blacktriangle) y la NO adsorción (\bullet) de sustancias sobre la superficie del sensor.

El aparato de SPR es sensible a los cambios de índice de refracción en las proximidades del sensor, que registrará curvas similares a la de la Figura XXX. Si en primer lugar hacemos pasar sobre el sensor una solución que contenga moléculas que se adhieren en su superficie (\blacktriangle), el aumento de masa sobre la mismo, que conlleva un aumento del índice de refracción, se traduce en un salto de la señal que registra el

aparato. La magnitud del escalón será proporcional a la cantidad de sustancia adherida sobre la superficie. Si por el contrario pasamos sobre la superficie del sensor una solución de moléculas que no se adhieren a la misma (●), tras un primer aumento de la señal, ésta recupera la línea base, alcanzando los niveles originales. La variación en la señal se debe a la diferencia en el índice de refracción entre la solución tampón y el tampón que incorpora la molécula (●).

El objetivo de este apartado es el estudio de la formación de complejos polielectrolíticos *in situ* por interacción directa de macromoléculas con grupos iónicos complementarios, mediante SPR. Los PEC se formaron a base de quitosano y poli(HEMA-*co*-AMPS) o poli(DMAA-*co*-AMPS). Sobre una fina película de quitosano (con grupos $-\text{NH}_3^+$) colocada previamente sobre el sensor, se pasó una disolución de copolímero portador de AMPS (con grupos $-\text{SO}_3^-$), detectando la interacción entre ambas macromolécula por cambios en la señal de resonancia. Prácticamente todos los complejos polielectrolíticos sintetizados en este apartado, poseen el mismo perfil de adhesión. En todos los sistemas se observó que tras una primera inyección del copolímero en el circuito, se produce una primera etapa de adsorción debida a la adhesión del copolímero por enlace iónico entre el grupo amino ionizado del quitosano y el sulfonato del AMPS (Figura 6.6). Y una segunda etapa en la que se deposita una capa de copolímero que se une al resto mediante uniones débiles inespecíficas. Este segunda etapa se detecta en la curva de plasmón mediante un cambio en la pendiente de la curva (Figura 6.4, “a”).

Si se hace pasar sobre el complejo CHI-copolímero una disolución de quitosano, éste no vuelve a depositarse, ya que la señal recupera los niveles de partida, y por tanto, no se obtienen sistemas multicapa (CHI-copolímero-CHI). Si posteriormente se hacen pasar soluciones de copolímero sobre el PEC, se observa que las capas de copolímero unidas mediante interacciones débiles pueden seguir uniéndose sucesivamente, quedando registradas en la curva como escalones de la misma pendiente e intensidad. Estas interacciones débiles se pierden al cambiar las condiciones del medio (cambio de agua a PBS, y con ello, cambio del pH y la fuerza iónica del medio), permaneciendo unida única y exclusivamente la capa unida mediante enlace iónico.

3.1 Sistema quitosano-HEMA:AMPS

Quitosano-Poli(HEMA-co-AMPS) (70:30)

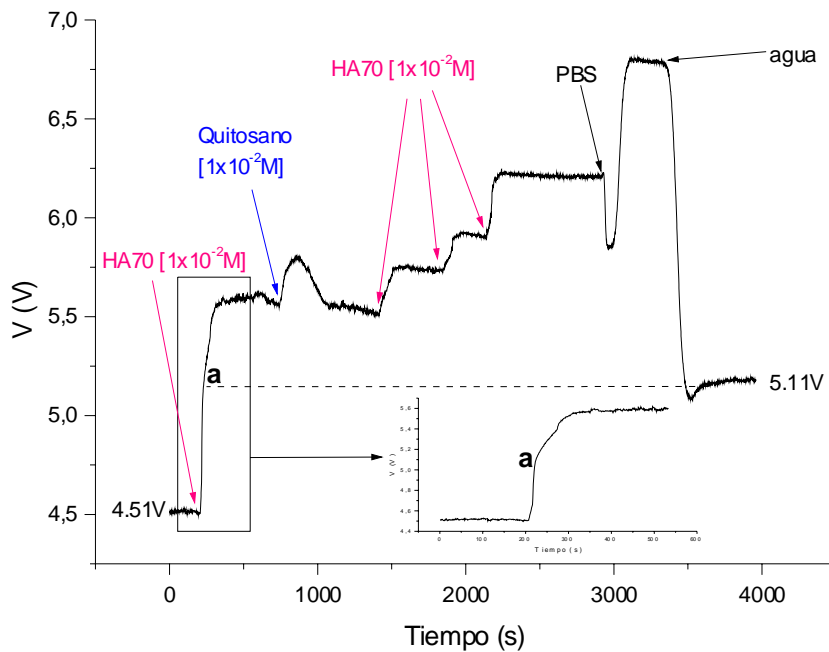


Figura 6.4: Diagrama de la respuesta de SPR a tiempo real de la interacción macromolecular entre quitosano y el copolímero HA30

Quitosano-Poli(HEMA-co-AMPS) (30:70)

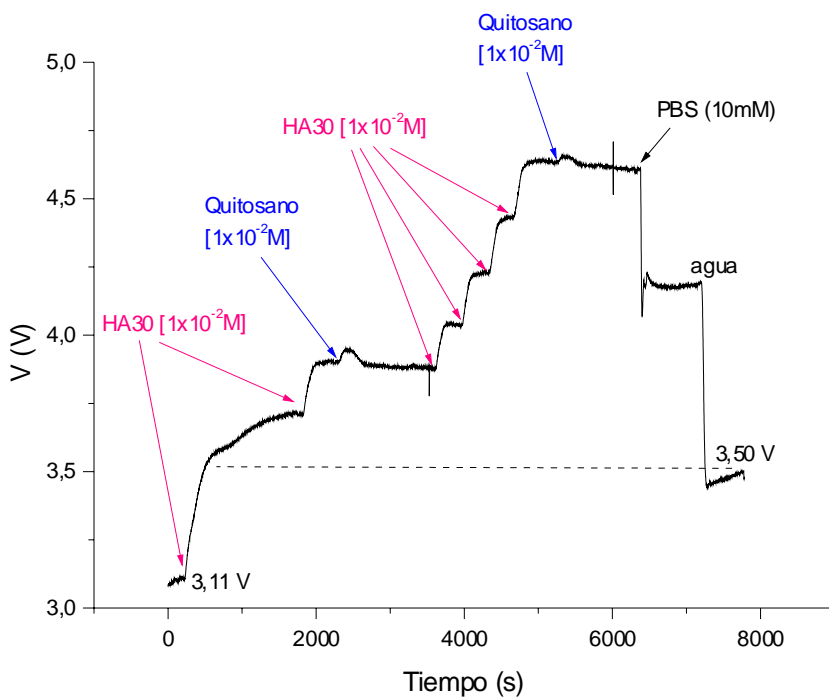


Figura 6.5: Diagrama de la respuesta de SPR a tiempo real de la interacción macromolecular entre quitosano y el copolímero HA30

La interacción de los distintos complejos con la albúmina y el fibrinógeno es significativamente diferente de un sistema a otro. Cuando se hace pasar una disolución de proteínas plasmáticas sobre una capa de quitosano (Figura 6.7), observamos que sobre su superficie se produce la adhesión tanto de la albúmina, como del fibrinógeno, siendo la adhesión de esta última una de las causas de su mala hemocompatibilidad¹⁶, ya que activa tanto el complemento¹⁴, como los sistemas de coagulación¹⁵. Cuando la superficie del quitosano es modificada por la formación de complejos con los copolímeros poli(HEMA-co-AMPS), la adhesión de estas proteínas plasmáticas es inhibida totalmente (Figura 6.8).

Figura 6.6: Esquema de las interacciones iónicas que tienen lugar en los complejos polielectrolíticos quitosano poli(HEMA-co-AMPS).

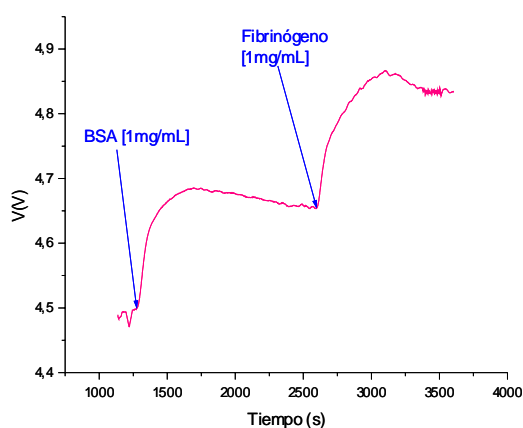
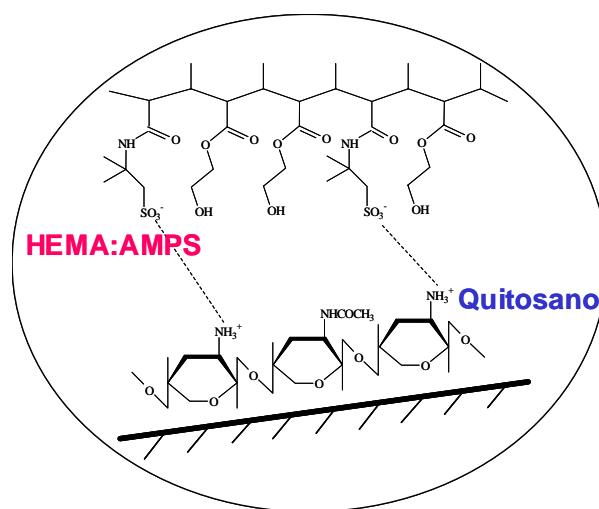


Figura 6.7: Diagrama de SPR a tiempo real y ángulo fijo de las interacciones del quitosano con las proteínas plasmáticas BSA y fibrinógeno.

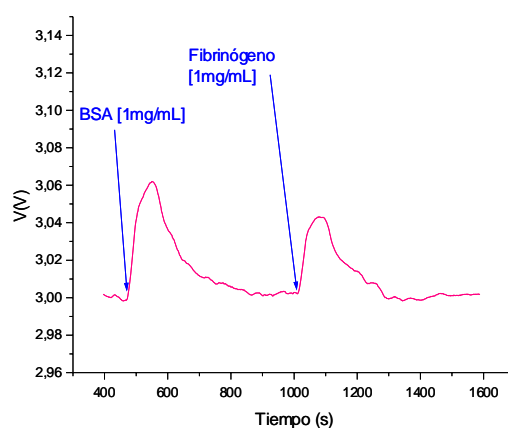


Figura 6.8: Diagrama de SPR a tiempo real y ángulo fijo de las interacciones del complejo quitosano-HA30 con las proteínas plasmáticas BSA y fibrinógeno.

El monómero HEMA ha sido descrito en numerosas ocasiones como hemocompatible, debido a su capacidad para formar hidrogeles de bajo tensión superficial y por el balance hidrofílico/hidrofóbico de su superficie que forma microdominios permitiendo la adecuada organización de las proteínas plasmáticas en su superficie²⁸. Sin embargo, en esta ocasión no se produce la adhesión de proteínas sobre la superficie, indicando que la organización en microdominios se rompe con la presencia del AMPS en las cadenas macromoleculares. Se forma un complejo polielectrolítico hidrofílico que repele la adhesión tanto de la albúmina como del fibrinógeno en todas las formulaciones ensayadas.

3.2 Sistema quitosano-DMAA:AMPS

Los complejos quitosano-poli(DMAA-co-AMPS) presentan un comportamiento diferente frente a la adhesión de albúmina y fibrinógeno. Alencar de Queiroz et al.²⁹ estudiaron la adhesión de proteínas plasmáticas sobre superficies modificadas de PTFE injertadas con cadenas de PDMAA. Observaron la disminución de la adsorción de fibrinógeno y un aumento en la adsorción de albúmina para polímeros y copolímeros injertados que incorporaban DMAA en sus cadenas. Estos resultados concuerdan con las interacciones registradas por SPR de la BSA y fibrinógeno con el quitosano tratado con PDMAA (Figura 6.9).

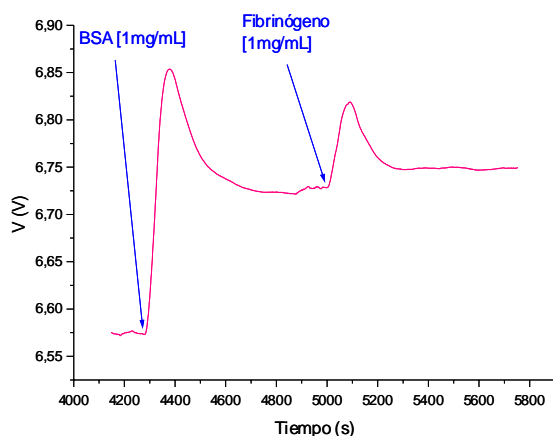


Figura 6.9: Diagrama de SPR a tiempo real y ángulo fijo de las interacciones de las proteínas plasmáticas BSA y fibrinógeno con el complejo quitosano-PDMAA .

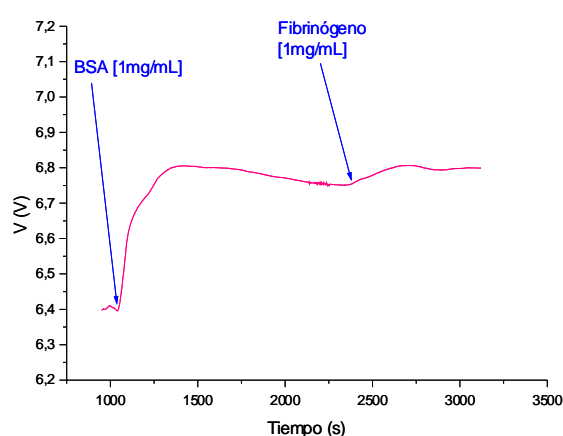


Figura 6.10: Diagrama de SPR a tiempo real y ángulo fijo de las interacciones de las proteínas plasmáticas BSA y fibrinógeno con el complejo quitosano-PAMPS .

Por otro lado, ha sido descrita la formación del complejo BSA-PAMPS³⁰. Mattison et al. demostraron que a pesar de que la carga global de la proteína es negativa ($pI_{BSA} = 4,9$), interacciona fuertemente con el AMPS. Este comportamiento se da en la naturaleza en numerosas ocasiones, y se debe a que las proteínas poseen heterogeneidad de carga, presentando regiones positivas y regiones negativas. Si existen sitios de unión en aquellas zonas de carga opuesta a la carga global la proteína interaccionará con un sustrato del mismo signo que ella, de aquí su interacción con el AMPS. Esta interacción ha sido confirmada haciendo pasar una disolución de BSA sobre el complejo quitosano-PAMPS (Figura 6.10). Como puede apreciarse, la BSA se adhiere sobre la superficie, sin embargo el fibrinógeno no lo hace. Mediante la unión quitosano-PAMPS se consigue una interacción selectiva de la BSA frente al fibrinógeno.

Los complejos quitosano-poli(DMAA-co-AMPS) sintetizados en esta sección presentan un comportamiento parecido al descrito por Alencar de Queiroz et al., ya que estos materiales inhiben la adhesión del fibrinógeno, mientras que la albúmina sigue interaccionando con su superficie (Figura 6.12).

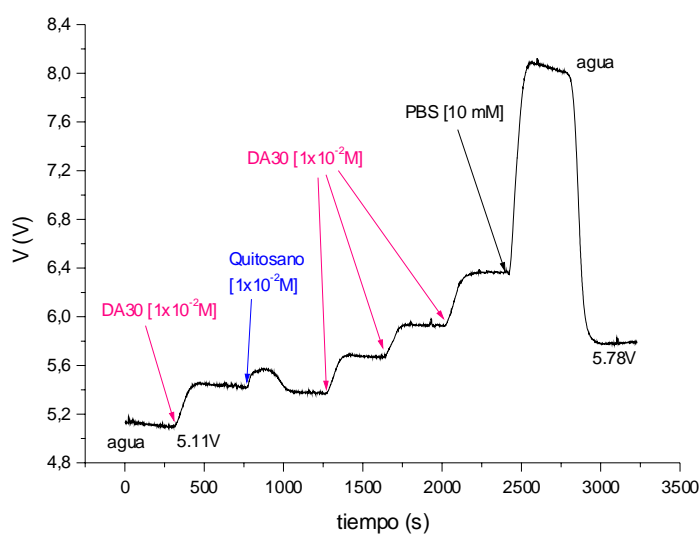


Figura 6.11: Diagrama de la respuesta de SPR a tiempo real de la interacción macromolecular entre quitosano y el copolímero DA30

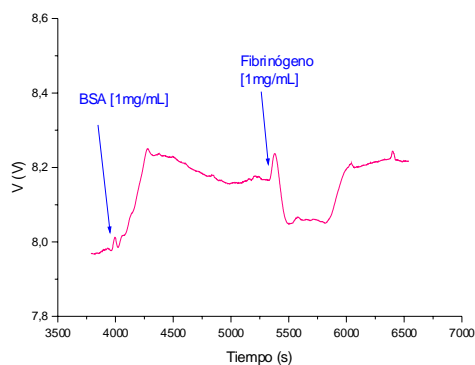


Figura 6.12: Diagrama de SPR a tiempo real y ángulo fijo de las interacciones del quitosano-DA30 con las proteínas plasmáticas BSA y fibrinógeno.

Mediante la SPR se ha monitorizado la formación de complejos polielectrolíticos a tiempo real y se ha diferenciado entre interacciones estables e interacciones débiles e inespecíficas entre dos moléculas por cambio en las condiciones del medio (variación del pH, la fuerza iónica...). Además se han monitorizado la interacción de proteínas plasmáticas con la superficie de biomateriales sin necesidad de marcajes, ni complicados ensayos de derivatización.

Se ha conseguido toda una gama de recubrimientos poliméricos homogéneos que podrían mejorar la hemocompatibilidad del quitosano, conservando por otra parte, todas sus buenas propiedades. Los complejos a base de quitosano y poli(HEMA-*co*-AMPS) inhibe la adhesión de BSA y fibrinógeno. Y lo que es más interesante en cuanto a hemocompatibilidad se refiere, los recubrimientos quitosano-poli(DMAA-*co*-AMPS), adhieren BSA, pero evitan la adhesión de fibrinógeno.

4 BIBLIOGRAFÍA

- 1) Abraham G.A., Queiroz A. A. A., San Román J. *Biomaterials* **2001**, *22*, 1971-1985.
- 2) Green R.J., Davies M. C., Roberts C.J., Tendler S.J.B. *Biomaterials* **1999**, *20*, 385-391.
- 3) Green R.J., Frazier R. A., Shakesheff K.M., Davies M.C., Roberts C.J., Tendler S.J.B. *Biomaterials* **2000**, *21*, 1823-1835.
- 4) Park W.H., Ha W. S., Ito H., Miyamoto T., Inagaki H., Noishiki Y. *Fibers and Polymers* **2001**, *2* (2), 58-63.
- 5) Brash J.L. *Role of plasma protein adsorption in the response of blood to foreign surfaces*; Sharma C.P., S. M., Ed.; Technomic: Lancaster , PA, 1991, pp 3-24.
- 6) Horbett T.A. *Cardiovasc Pathol* **1993**, *2*, 137s-148s.
- 7) Chinn J.A., Horbett T. A., Ratner B.D. *Thromb Haemost* **1991**, *65*, 608-617.
- 8) Amiji M.M., Park K. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **1993**, *4* (3), 217-234.
- 9) Singh D., Ray A. R. *J.M.S.- Rev Macromol Chem Phys* **2000**, *C40* (1), 69-83.
- 10) Gupta K.C., Ravi Kumar M. N. V. *J.M.S.-Rev Macromol Chem Phys* **2000**, *C40* (4), 273-308.
- 11) Brown C., Hoffman A. S. *Modification of natural polymers: chitosan*, 2001, pp 565-574.
- 12) Ravi Kumar M.N.V. *Chitin and chitosan drug delivery systems homepage*, 2001; Vol. 2001.
- 13) Muzzarelli R., Baldesarre V., Conti F., Ferrara P., Biagini G., Gazzanelli G., Vasi V. *Biomaterials* **1988**.
- 14) Minami S., Suzuki H., Okamoto Y., Fujinaga T., Shigemasa Y. *Carbohydrate Polymers* **1998**, *36*, 151-155.
- 15) Brandenburg G., Leibrock L. G., Shuman R., Malette W.G., Quigley H. *Neurosurgery* **1984**, *15*, 9-13.
- 16) Benesh J., Tengvall P. *Biomaterials* **2002**, *23*, 2561-2568.
- 17) Yong Lee K., Shik H. W., Ho Park W. *Biomaterials* **1995**, *16*, 1211-1216.
- 18) Ratner B.D. *Biomedical applications of hydrogels: review and critical appraisal*; Williams D.F., Ed.; CRC Press: Boca Ratón, Florida, 1981; Vol. 2.

- 19) Garbassi F., N. M., Occhiello E. *Biomedical materials*; Wiley & Sons: New York, 1994, pp 395-416.
- 20) Keogh J.R., Wolf M. F., Overend M.E., Tang L., Eaton J.W. *Biomaterials* **1996**, *17*, 1987-1994.
- 21) Clarke S., Davies M. C., Roberts C.J., Tendler S.J.B., Williams P.M., O'Byrne V., Lewis A.L., Russell J. *Langmuir* **2000**, *16*, 5116-5122.
- 22) Corneillie S., Ngok Lan. P., Schacht E., Davies M., Shard A., Green R., Denyer S., Wassall M., Whitfield H., Choong S. *Polymer International* **1998**, *46*, 251-259.
- 23) Jung L.S., Campbell C. T., Chinowsky T.M., Mar M.N., Yee S.S. *Langmuir* **1998**, *14*, 5636-5648.
- 24) Frazier R.A., Davies M. C., Matthij G., et al. *Langmuir* **1997**, *13*, 7115-7120.
- 25) Kooyman R.P.H., Bruijn H. E., Eenink R.G., Greve J. *Journal of Molecular Structure* **1990**, *218*, 345-350.
- 26) Lechuga L.M., Calle A., Prieti F. *Química Analítica* **2000**, *19 [Suppl 1]*, 54-60.
- 27) Sigal G.B., Mrksich M., Whitesides G.M. *Langmuir* **1997**, *13*, 2749-2755.
- 28) Peppas N.A. *Hydrogels in medicine and pharmacy*; CRC Press: Boca Ratón, Florida, 1987.
- 29) Alencar de Queiroz A.A., Castro S. C., Higa O.Z. *Journal of Biomaterial Science, Polymer Edition* **1997**, *8 (5)*, 335-347.
- 30) Mattison K.W., Dubin P. L., Brittain J. *J Phys Chem B* **1998**, *102*, 3820-3836.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se han sintetizado polímeros iónicos que incorporan ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico en su estructura. Este monómero se ha combinado con 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA), N,N-dimetilacrilamida (DMAA) y el derivado metacrílico portador del Triflusal (THEMA), obteniéndose materiales con propiedades muy diferentes. Los sistemas HEMA-AMPS y DMAA-AMPS son solubles en medio acuoso, mientras que las formulaciones ricas en monómero THEMA son insolubles.
2. Se han desarrollado dos nuevas y sencillas metodologías para determinar las relaciones de reactividad de sistemas copoliméricos que se ajusten al modelo terminal. Para ello, se monitoriza por RMN-¹H *in situ* la disminución de la concentración de los monómeros y se relaciona con la solución integrada exacta de la ecuación de copolimerización.
3. Se ha demostrado la capacidad de la electrocromatografía cinética micelar (MEKC) para caracterizar reacciones de copolimerización en las que intervienen especies iónicas. La técnica aprovecha dos factores opuestos que influyen en el tiempo de análisis, la carga de la molécula y su hidrofobicidad, en el estudio de los sistemas HEMA-AMPS y DMAA-AMPS, su evolución con la conversión, así como la formación de especies de bajo peso molecular.
4. Se han sintetizado formulaciones del sistema poli(THEMA-co-AMPS) ricas en el monómero THEMA con el fin de obtener polímeros insolubles con propiedades antiagregantes, para el recubrimiento de prótesis vasculares de pequeño diámetro. Estos materiales poseen actividad en su forma macromolecular y son capaces de mantener cinéticas de liberación de Triflusal de orden cero durante largos periodos de tiempo. Las formulaciones presentaron una buena adhesión a las prótesis y buena biocompatibilidad *in vitro*.

5. Se han sintetizado complejos polielectrolíticos (PEC) en presencia de quitosano como plantilla (“template polymerization”) obteniendo como resultado hidrogeles débilmente entrecruzados sensibles a las condiciones del medio. Los PEC responden la pH del medio dependiendo del grado de ionización de los monómeros ionizables, de la composición molar de sus componentes y de la densidad de puntos de entrecruzamiento tanto físico como químico entre las macromoléculas. Han sido estudiados como dispositivos de liberación controlada de teofilina, obteniendo perfiles de liberación muy prometedores, ya que se ajustan a los requerimientos del organismo para este fármaco.
6. Se ha estudiado la citotoxicidad *in vitro* de los PEC sintetizados por “template” observando que los materiales, después de un exhaustivo lavado, no liberan sustancias tóxicas al medio. Las células osteoblásticas no se adhieren a la superficie de los hidrogeles previamente hidratados. Sus propiedades les hacen muy interesantes en el campo de la liberación controlada de fármacos.
7. Se ha monitorizado mediante Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) la formación *in situ* de PEC por interacción directa de macromoléculas con grupos iónicos complementarios. Además, se ha estudiado la interacción de estos complejos con proteínas plasmáticas de interés biomédico. Los PEC sintetizados presentaron una disminución de la adhesión proteica (sistema quitosano-poli(HEMA-*co*-AMPS) o lo que es más interesante en cuanto a recubrimientos hemocompatibles se refiere, una selectividad en la adhesión proteica (sistema quitosano-poli(DMAA-*co*-AMPS)
8. Por último, se presenta el desarrollo del programa “CONVERSIÓN” para la predicción de la evolución de las reacciones de copolimerización radical (que sigan el modelo terminal) con la conversión, de gran cantidad de parámetros, como son: las fracciones molares instantáneas y acumuladas en el copolímero, fracciones molares de cualquier tipo de secuencia o la longitud media de bloques de uno y otro componente

APÉNDICE

*DESARROLLO DEL PROGRAMA
“CONVERSION” PARA LA PREDICCIÓN DE
LA EVOLUCIÓN DE LA REACCIÓN DE
COPOLIMERIZACIÓN (MODELO TERMINAL)
CON LA CONVERSIÓN*

APÉNDICE 1: Desarrollo del programa "CONVERSIÓN" para la predicción de la evolución de la reacción de copolimerización [modelo terminal] con la conversión.

La ecuación de Mayo-Lewis¹ (Ecuación A.1) gobierna la adición de monómeros en copolimerización radical para el modelo terminal. Sin embargo, si se quiere describir la evolución de la reacción con la conversión bajo este modelo terminal o de primer orden de Markov, se debe recurrir a una de las formas integradas de la ecuación de copolimerización, siendo la aproximación más comúnmente utilizada la de Skeist². En este apartado se desarrolla un algoritmo que permite emplear la *solución integrada exacta* de la ecuación diferencial (Ecuación A.2), para predecir teóricamente y sin llevar a cabo ninguna aproximación, la evolución con la fracción inicial en alimentación y con la conversión de diferentes parámetros, como las fracciones molares promedio e instantánea en el copolímero, la distribución de secuencias, la longitud media de las mismas, etc.

$$\frac{d[M_1]}{d[M_2]} = \frac{r_1[M_1] + [M_1][M_2]}{r_2[M_2] + [M_1][M_2]} \quad \text{o en fracciones molares} \quad \frac{f_1}{f_2} = \frac{r_1F_1^2 + F_1F_2}{r_2F_2^2 + F_1F_2}$$

Ecuación A.1: Ecuación de Mayo Lewis. $[M_i]$ = concentración molar del monómero i . F_i = fracción molar en la alimentación. f_i = fracción molar en el copolímero. r_1 y r_2 = relaciones de reactividad

$$\frac{[M_2]}{[M_{20}]} = \left(\frac{[M_{20}][M_1]}{[M_{10}][M_2]} \right)^{\frac{r_2}{1-r_2}} \left(\frac{(r_1-1)\left(\frac{[M_1]}{[M_2]}\right) - r_2 + 1}{(r_1-1)\left(\frac{[M_{10}]}{[M_{20}]} \right) - r_2 + 1} \right)^{\frac{r_1 r_2 - 1}{(1-r_1)(1-r_2)}}$$

Ecuación A.2: Solución integrada de la Ecuación A.1, $[M_{i0}]$ =concentración inicial del monómero i y $[M_i]$ = concentración del monómero i a un tiempo t .

El algoritmo desarrollado ha sido programado en BASIC (el programa se ha llamado CONVERSION) y tiene carácter general, es decir, predice el desarrollo de una reacción dada para cualquier valor de r_1 y r_2 , es decir, para cualquier pareja copolimérica. En términos de reactividades diferenciales entre los componentes 1 y 2 de

una pareja copolimérica, hay cuatro posibles reacciones, tal y como se ha representado en los diagramas de composición de la Figura A.1.

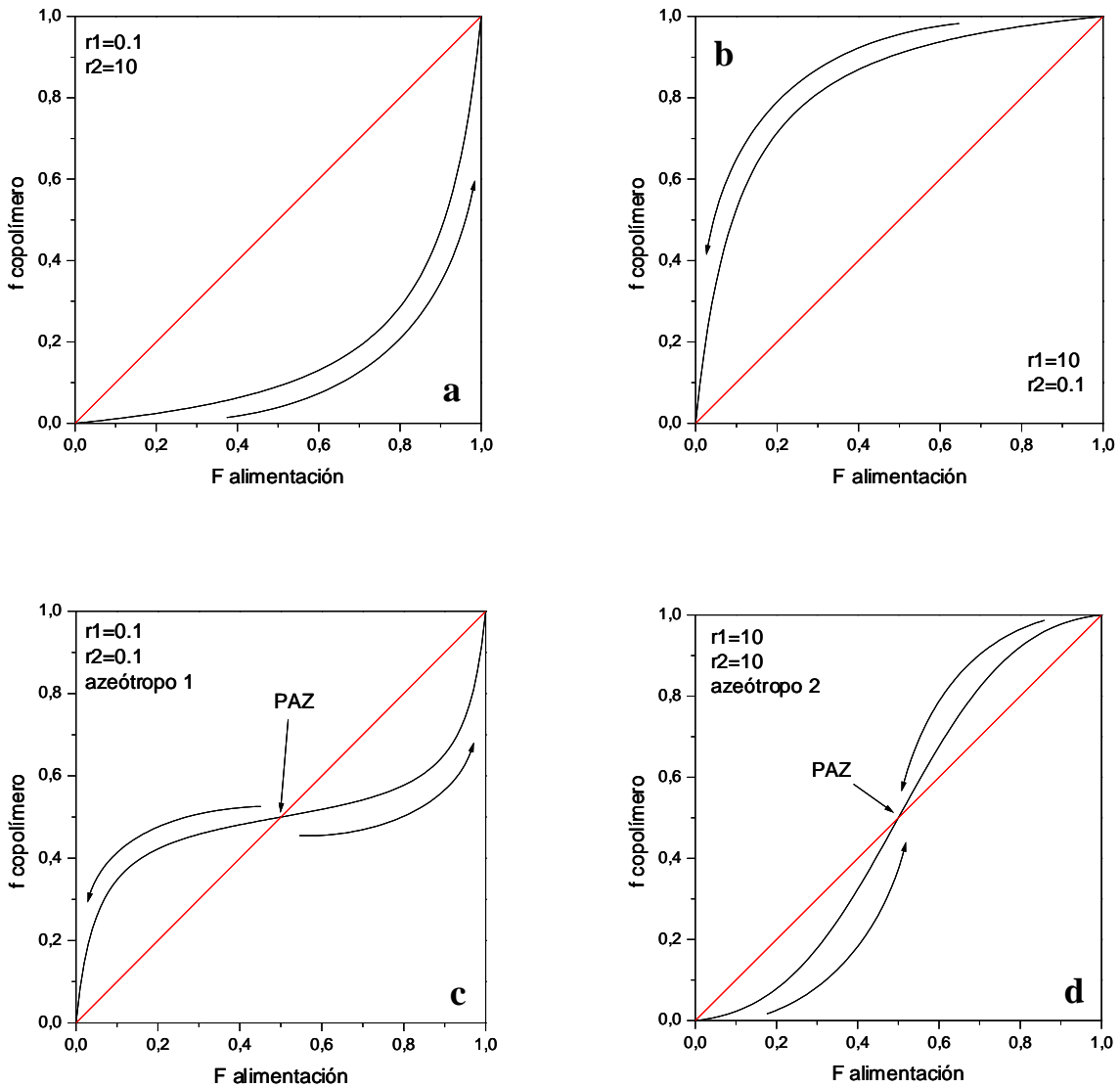


Figura A.1: Diagramas de composición correspondientes a los cuatro tipos posibles de reacciones de copolimerización. **a:** $r_1 < 1$ y $r_2 > 1$; **b:** $r_1 > 1$ y $r_2 < 1$; **c:** $r_1 < 1$ y $r_2 < 1$ y **d:** $r_1 > 1$ y $r_2 > 1$

Si el diagrama queda por debajo de la diagonal en todo el rango de fracciones molares (ocurre cuando $r_1 \leq 1$ y $r_2 \geq 1$), la alimentación se va enriqueciendo en el monómero 1 (menos reactivo), con el resultado de que la reacción evoluciona con la conversión hacia la formación de sistemas progresivamente más ricos en 1. El caso opuesto, cuando $r_2 \leq 1$ y $r_1 \geq 1$, se representa por un diagrama situado por encima de la diagonal. En este caso la reacción evoluciona con la conversión hacia la formación de sistemas progresivamente más ricos en el componente menos reactivo, 2. A estos dos

casos (que en realidad son el mismo, considerando 1 como 2 y viceversa), hay que sumarles los dos posible sistemas azeotrópicos (SAZ). En estos casos hay dos regiones diferenciadas en el diagrama de composición: aquellas separadas por el punto azeotrópico (PAZ). En el PAZ, la fracción en el copolímero no varía con la conversión porque es igual a la fracción molar en alimentación. En el primer tipo de SAZ, cuando r_1 y r_2 son menores de la unidad, las reacciones evolucionan con la conversión hacia los homopolímeros. Es decir, reacciones con fracciones molares en alimentación menores que el PAZ, consumen preferentemente monómero 1, de forma que las cadenas macromoleculares que se van formando a lo largo de la reacción se enriquecen progresivamente en monómero 2; y reacciones con fracciones molares mayores que el PAZ tienen la tendencia opuesta. Finalmente, el segundo tipo de SAZ (cuando r_1 y r_2 son mayores de la unidad) muestra un comportamiento bien diferente. En este caso las reacciones no tienden hacia los homopolímeros sino hacia el PAZ. La región de fracciones molares por debajo del PAZ consume preferentemente monómero 2, de forma que las cadenas macromoleculares que se van formando a lo largo de la reacción se enriquecen progresivamente en monómero 1. La región por encima del PAZ, en cambio, consume preferentemente monómero 1 y la reacción evoluciona hacia sistemas más ricos en el componente 2. Este tipo de comportamiento no es, en cualquier caso, muy relevante, pues no se da en la práctica.

La Figura A.2 muestra un esquema simplificado del algoritmo utilizado y la Figura A.3 las líneas más representativas de CONVERSION. El programa discrimina en primer lugar entre los cuatro tipos mencionados de copolimerización y define un paso positivo o negativo dependiendo de si el medio de reacción consume preferentemente uno u otro monómero. A continuación el programa se direcciona a la rutina común generadora de puntos (líneas 10000 en adelante), donde se inicia un barrido en todo el rango de fracciones molares iniciales en alimentación, con la ayuda de un contador. Cada uno de estos puntos es considerado como inicio de una reacción y la rutina escribe primero los puntos a conversión cero (generando el diagrama de composición). Posteriormente predice la evolución con la conversión (para esta fracción inicial definida por el contador) utilizando las Ecuaciones A.1 y A.2. El programa da por terminada la reacción cuando la conversión es superior a 0.9999, pasando a predecir la siguiente. En el caso de los azeótropos, hay una redefinición del signo del paso en el punto azeotrópico tal y como se explica en la Figura A.3.

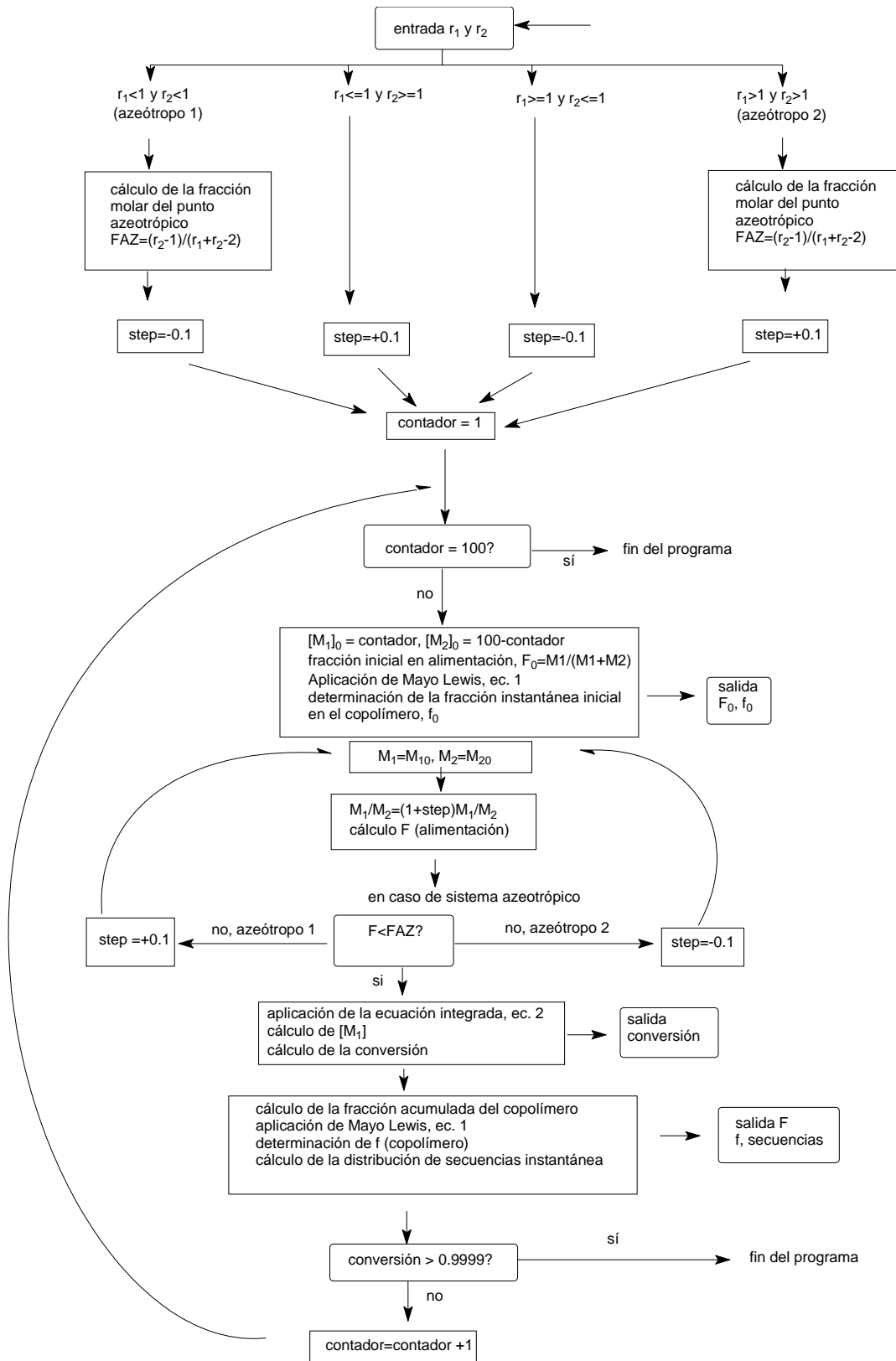


Figura A.2: Representación esquemática del desarrollo del algoritmo CONVERSIÓN.

CONVERSION

```
10 INPUT "sistema ", SIS$
20 INPUT "r1 ", R1
30 INPUT "r2 ", R2
40 OPEN "O", #1, "C:"+SIS$+".dat"
90 IF (R1<1 AND R2<1) THEN GOSUB 1000
100 IF (R1>1 AND R2>1) THEN GOSUB 2000
110 IF (R1<=1 AND R2>=1) THEN GOSUB 3000
120 IF (R1>=1 AND R2<=1) THEN GOSUB 4000
130 CLOSE
140 END
```

Entrada de r1 y r2

Discriminación de los sistemas. Hay cuatro posibilidades, tal y como se muestra en la figura 1

```
1000 FAZEOTROPO=(R2-1)/(R1+R2-2)
1010 XAZEOTROPO=FAZEOTROPO/(1-FAZEOTROPO)
1050 PASO=-0.1
1060 LIMITEINFERIOR=0
1070 LIMITESUPERIOR=XAZEOTROPO
1080 GOSUB 10000
1090 PASO=+0.1
1100 LIMITEINFERIOR=XAZEOTROPO
1110 LIMITESUPERIOR=1
1120 GOSUB 10000
```

Ejemplo de sistema azeotrópico 1, cuando r1 y r2 son menores de 1. En este caso hay que considerar dos regiones a la hora de generar los puntos teóricos: fracciones iniciales en alimentación menores del punto azeotrópico que consumen más rápidamente el monómero 1 y evolucionan hacia su agotamiento, y fracciones iniciales en alimentación mayores del punto azeotrópico que consumen preferentemente el monómero 2 y evolucionan hacia su agotamiento. Por ello se define un paso negativo o positivo. Este paso es el que usa posteriormente la rutina común (a partir de la línea 10000) para generar puntos con la conversión. Una reacción que consuma preferentemente el monómero 1 necesita un paso negativo puesto que a medida que avanza la polimerización, la fracción molar de este monómero 1 disminuye. Por ello la línea 3000 define un paso negativo (r1≤1 y r2≥1, es decir, consumo preferente de 2) mientras que la 4000 lo define positivo antes de redireccionar al programa a la rutina común en 1000

[2000-2120] igual que [1000-1120] pero con pasos de signo contrario.

```
3000 PASO=+0.1
3010 LIMITEINFERIOR=0
3020 LIMITESUPERIOR=1
3030 GOSUB 10000
3040 RETURN
```



[4000-4040] IGUAL QUE [3000-3040] pero con paso de signo contrario.

```
10000 FOR N=1 TO 99
10010 M10=N
10020 M20=100-N
10030 X0=M10/M20
10040 F0=M10/(M10+M20)
10050 CONSTANTE=((F0^2)*R1+F0*(1-F0)+R2*((1-10060 F0)^2))
10070 FC0=CONSTANTE/(1+CONSTANTE)
10080 PRINT #1, F0, 0, FC0
10090 X=X0
10100 X=X+PASO*X
10110 IF X<LIMITEINFERIOR THEN GOTO 10210
10120 IF X>LIMITESUPERIOR THEN GOTO 10210
10130 M2=M20*((X/X0)^(R2/(1-R2)))*(((1-R2)+(R1-1)*X)/(1-R2+(R1-1)*X0))^(R1*(R2-1)/((1-R1)*(1-R2)))
10140 M1=X*M2
10150 F=M1/(M1+M2)
10160 CONSTANTE=((F^2)*R1+F*(1-F)+R2*((1-F)^2))
10170 FC=CONSTANTE/(1+CONSTANTE)
10180 CONVERSION=(M10+M20-M1-M2)/(M10+M20)
10190 PRINT #1, F0, CONVERSION, FC
10200 IF CONVERSION < 0.9999 GOTO 10100
10210 NEXT
10220 RETURN
```

Rutina de aplicación de la ecuación integrada y de la ecuación de Mayo Lewis. Generación de los puntos fracción instantánea en el copolímero (FC) en función de la conversión y de la fracción inicial en la alimentación (F0). Si en necesario se pueden incorporar las líneas necesarias que generen las fracciones molares acumuladas en el copolímero (a partir de M10-M1 y de M20-M2), las fracciones molares de diferentes secuencias (a partir de las ecuaciones que definen las probabilidades condicionales p11, p12, p22 y p21) o la longitud media de bloques.

Figura A.3: Líneas más significativas del programa CONVERSIÓN.

Como ejemplo, se ha aplicado a los cuatro sistemas modelo utilizados en la Figura A.1 para las cuatro parejas de valores de r_1 y r_2 de 0.1 y 10. Los puntos obtenidos, fracción instantánea en el copolímero frente a la conversión y a la fracción inicial en la alimentación, han sido representados con la ayuda del programa SURFER dando lugar a las cuatro superficies de la Figura A.4. Las superficies tridimensionales obtenidas son muy similares a las construidas por el método clásico, es decir, empleando la aproximación de Skeist^{3,4}.

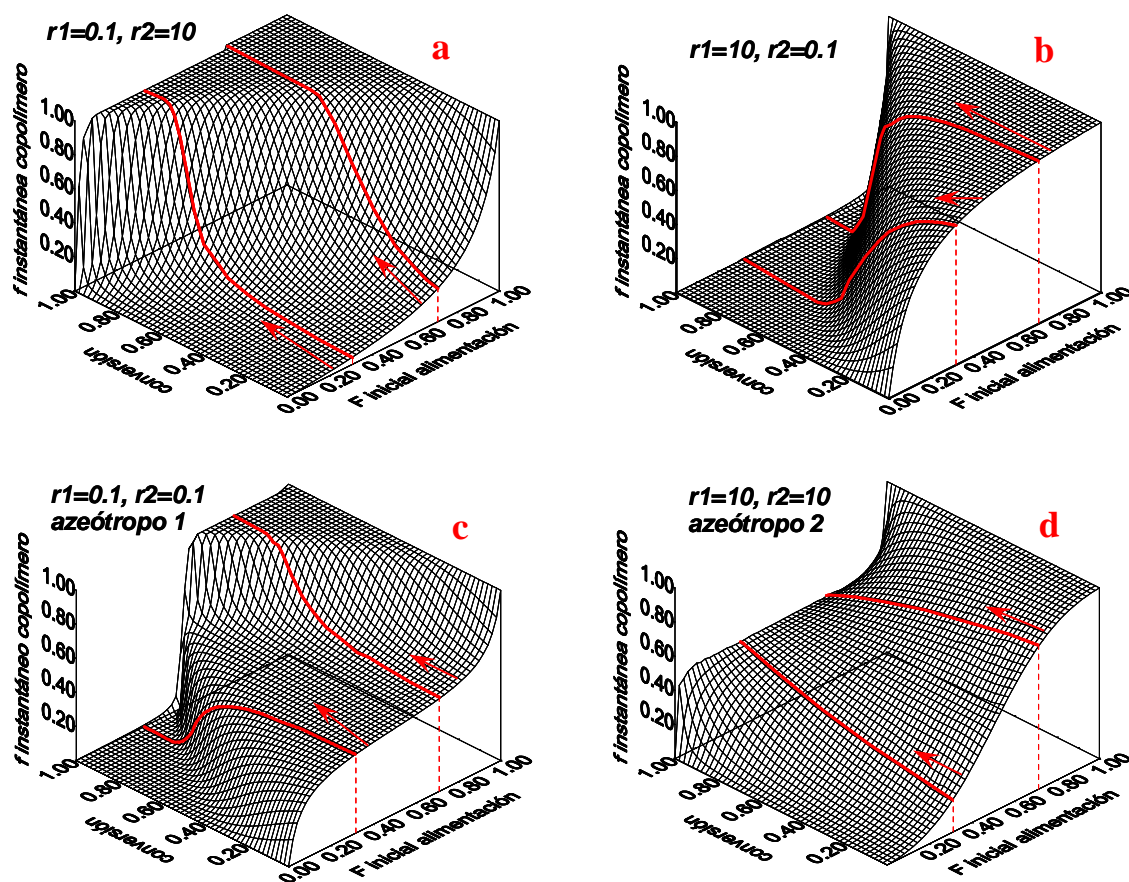


Figura A.4: Dependencia de la composición instantánea del copolímero (f) en función de la composición inicial en alimentación y la conversión, para los cuatro sistemas anteriormente mencionados. **a:** $r_1 < 1$ y $r_2 > 1$; **b:** $r_1 > 1$ y $r_2 < 1$; **c:** $r_1 < 1$ y $r_2 < 1$ y **d:** $r_1 > 1$ y $r_2 > 1$. Las líneas gruesas corresponden al curso de las reacciones comenzadas en fracciones molares en alimentación de 0,7 y 0,3 tomadas como ejemplo.

Una característica de estas superficies tridimensionales es que su corte con conversión cero da lugar al diagrama de composición de la Figura A.1. Para facilitar la discusión, se han dibujado para cada sistema los caminos de reacción correspondientes a copolimerizaciones con fracciones molares iniciales en alimentación de 0.3 y 0.7. Se aprecia claramente el carácter altamente heterogéneo de la mayoría de las reacciones, el cual está relacionado, obviamente, con una elección de relaciones de reactividad alejadas de uno (0.1 y 10). En el caso de parejas copoliméricas con valores de estos parámetros r_1 y r_2 cercanas a 1, las reacciones de copolimerización tienen lugar de una manera mucho más homogénea, tal y como se describió para el sistema DMAA-AMPS en los Capítulos 2 y 3. Sin embargo, para sistemas con una alta reactividad diferencial de los dos componentes (como son los ejemplos de la Figura A.1), esta predicción teórica puede tener gran importancia.

Mientras que las reacciones del ejemplo de azeótropo **d**, que tienden con la conversión hacia el punto azeotrópico, transcurren relativamente homogéneamente, las reacciones del ejemplo de azeótropo **c**, que tienden hacia los homopolímeros, muestran un comportamiento muy interesante. Ambas reacciones forman inicialmente copolímeros con una composición cercana a la azeotrópica, pero a partir de conversiones superiores al 50 %, toman caminos divergentes, de forma que por debajo del PAZ las composiciones finales de las cadenas son muy ricas en 2, mientras que por encima del PAZ, se forman cadenas muy ricas en 1. Los ejemplos **a** y **b** son en realidad la misma copolimerización donde los componentes son 1 y 2 ó 2 y 1 respectivamente. Se aprecia en ambos casos, la formación de dos especies a lo largo de la reacción. Inicialmente se forman cadenas ricas en el componente más reactivo, y una vez consumido una gran parte del mismo, se forman macromoléculas cada vez más ricas en el componente menos reactivo. Un análisis global de la reacción, sin embargo, no nos ofrece esta valiosa información. En este sentido, la Figura A.5 muestra comparativamente las fracciones molares instantánea y acumulada para el ejemplo **a** ($r_1 = 0.1$ y $r_2 = 10$). La composición media se incrementa lentamente hasta alcanzar lógicamente la composición inicial en alimentación. Esta tendencia no refleja, sin embargo, la distribución real, altamente heterogénea, de las composiciones en las cadenas, que tendrá cierta influencia en las propiedades de los materiales.

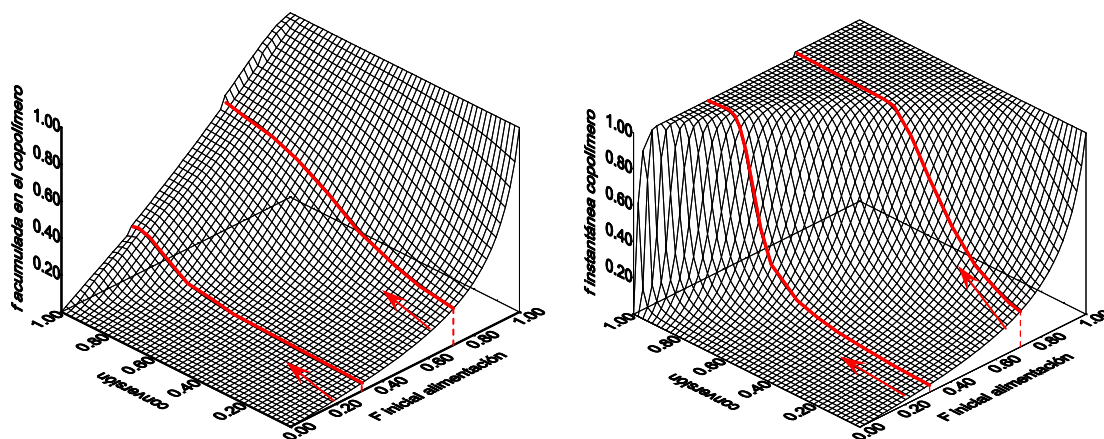


Figura A.5: Fracción molar acumulada (izquierda) e instantánea (derecha) en el copolímero en función de la fracción molar en alimentación y la conversión, para el sistema $r_1 = 0,1$ y $r_2 = 10$. Las líneas gruesas representan el curso de las reacciones empezadas en fracciones molares en alimentación de 0,3 y 0,7 tomadas como ejemplo.

Además de la fracción instantánea (o la acumulada) en el copolímero, el programa puede predecir la evolución con la conversión de otros parámetros o aspectos de la reacción como son las fracciones molares de secuencias o la longitud media de cadenas. Como ejemplo en la Figura A.6 se muestran las fracciones molares centradas en 1 y 2 para uno de los sistemas modelo ($r_1 = 0.1$ y $r_2 = 10$). Las fracciones molares obtenidas están de acuerdo con la discusión previa y con el carácter altamente heterogéneo de la reacción que da lugar a la formación de dos especies predominantes, cada una de ellas rica en uno de los componentes. En este caso, el componente 2 es mucho más reactivo que 1 y a bajas conversiones y altas composiciones iniciales de 2, se forman preferentemente triadas 222, mientras que a altas conversiones y altas composiciones iniciales de 1, se forman triadas 111. Las heterotriadas (112+211, 212,

221+122 o 121) se forman en pequeña proporción a lo largo de la diagonal que separa la formación de las dos especies predominantes.

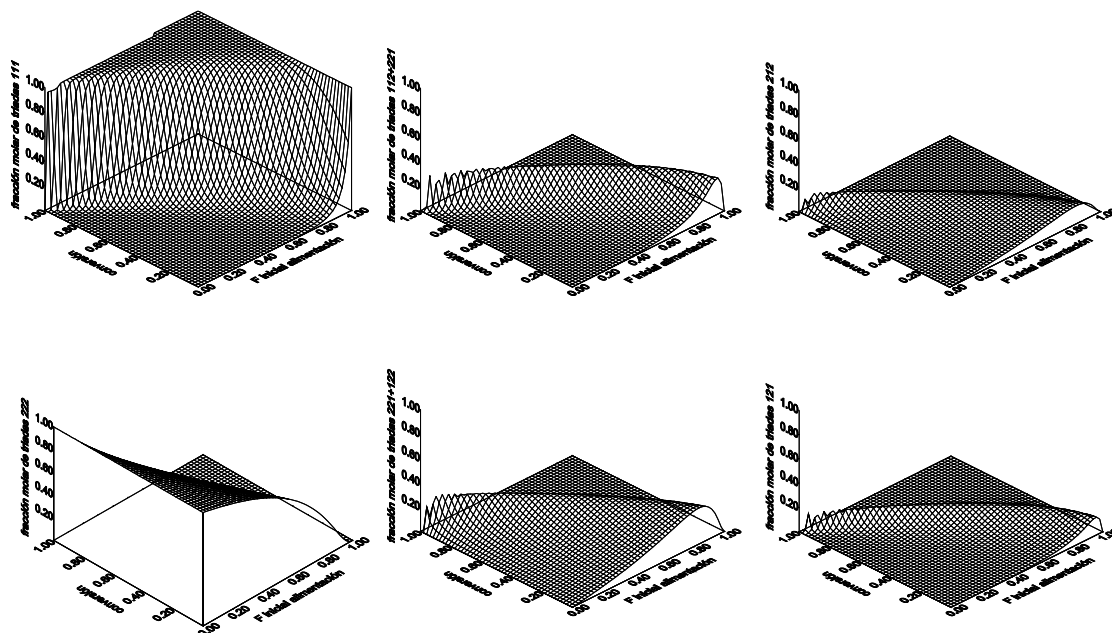


Figura A.6: Fracciones molares de las triadas centradas en uno (arriba) y en dos (abajo) para el sistema $r_1 = 0,1$ y $r_2 = 10$

En conclusión, se ha desarrollado un programa [CONVERSION] capaz de predecir, para una reacción de copolimerización binaria que se ajuste al modelo terminal, la evolución con la conversión de gran cantidad de parámetros, como son: fracciones molares instantáneas y acumuladas en el copolímero, fracciones molares de cualquier tipo de secuencia, o longitud media de bloques de uno u otro componente.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Mayo F.R., Lewis F. M. *J Am Chem Soc* **1944**, *66*, 1594-1601.
- 2) Skeist I. *J Am Chem Soc* **1946**, *68*, 1781.
- 3) Gallardo A., Lemus R., San Román J., Cifuentes A., Díez-Masa J.C. *Macromolecules* **1999**, *32*, 610-617.
- 4) Aguilar M.R., Gallardo A., San Román J., Cifuentes A. *Macromolecules* **2002**, *36*.

INTRODUCCIÓN
