



**INSTITUTO DE
TECNOLOGIA**

PROF. JORGE A. SABATO

UNIVERSIDAD NACIONAL
DE GENERAL SAN MARTIN
COMISION NACIONAL
DE ENERGIA ATOMICA

**MAESTRIA EN
CIENCIA Y
TECNOLOGIA
DE MATERIALES**

**ESTUDIO DE LA DEGRADABILIDAD
DE MATERIALES POLIMÉRICOS
BIODEGRADABLES IRRADIADOS**

Noelia Salguero

UNIVERSIDAD NACIONAL DE GENERAL SAN MARTIN
COMISIÓN NACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA
INSTITUTO DE TECNOLOGÍA
"Prof. Jorge A. Sabato"

Estudio de la degradabilidad de materiales poliméricos biodegradables irradiados^(*)

Por Bioq. Noelia Salguero

Directora:
Dra. Mariela F. del Grosso

Codirectora:
Dra. Hebe Durán

^(*)Tesis para optar al título de *Magister en Ciencia y Tecnología de Materiales*

República Argentina

2011

*Dedico esta tesis
a mis abuelos a quienes
llevo y llevaré siempre
conmigo.*

Agradecimientos

Hoy se cierra una etapa para darle paso a un nuevo ciclo, y como ocurre en estos casos, uno se detiene a hacer un balance. Es entonces cuando surge la necesidad de los agradecimientos.

Esta tesis, producto de un trabajo interdisciplinario, fué posible gracias a la colaboración de muchas Instituciones y personas a quienes hoy quiero agradecer:

En primer lugar, al Dr. Manuel Iribarren quien tuvo el buen gesto de responder mis inquietudes y brindarme su disponibilidad al momento del ingreso.

Al Instituto Profesor Jorge A. Sábato por otorgarme el beneficio de la beca de estudio y a sus docentes por transmitirme sus conocimientos con seguridad y entusiasmo.

A mis profes particulares Euge y Laura ante todo, por su paciencia, y por su capacidad de resumir en "algunas palabras" el inmenso mundo de las matemáticas.

Al Dr. Javier Amalvy, del Grupo de Materiales y Nanomateriales Poliméricos del INIFTA, por proveerme las muestras de polihidroxibutirato, sin las cuales este estudio no hubiera sido posible, por las mediciones de peso molecular viscosimétrico, y por su buena predisposición para responder a mis consultas.

A los técnicos y operadores del TANDAR quienes, con su esfuerzo, hicieron posible culminar la etapa de irradiación.

Al Dr. Gerardo García Bermúdez y a la Lic. Claudia Arbeitman por su colaboración y su tiempo durante la irradiación de las muestras.

A la gerencia de Materiales de la CNEA, especialmente a la Sra. Adriana Domínguez, por los turnos y mediciones de Microscopía Electrónica de Barrido.

A Ricardo Montero por las fotografías de las muestras utilizadas para la determinación de ángulo de contacto.

Al departamento de Mecánica de la Universidad Tecnológica Nacional de Gral. Pacheco, por permitirme hacer uso de su laboratorio y especialmente al Dr. Adrián Canzian por su colaboración en las mediciones de ángulo de contacto.

A la División Física Experimental de la Materia Condensada de la CNEA por permitirme utilizar el espectrofotómetro UV-Visible, el espectrofotómetro IR y el microscopio infrarrojo automático para realizar el estudio de mis muestras.

Al Dr. Guillermo Benitez del Laboratorio de Nanoscopías y Fisicoquímica de Superficies del INIFTA por su colaboración en el análisis de las muestras por la técnica XPS.

Al Lic. Facundo Gilles de la División Física Experimental de la Materia Condensada, por su colaboración en el análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido.

A la Dra. Paola Babay y a la Lic. Mariela Espinosa por su ayuda y su esfuerzo en las mediciones por HPLC.

A la Dra. A. Gabriela Leyva por su colaboración en el Análisis Termogravimétrico de las muestras, por su tiempo y sobre todo por sus criteriosas sugerencias.

A las chicas del Laboratorio de Radiobiología de la CNEA por hacerme un lugar en su espacio de trabajo y por su buena predisposición.

A la Dra. Hebe Durán por su codirección en esta tesis, por su ayuda en el desarrollo de la misma, pero por sobre todas las cosas por "hablar en mi mismo idioma".

Al Dr. Hugo Mosca, en primer lugar por haberme sugerido a la mejor directora de tesis, en segundo lugar, por haberme ayudado en las interminables mediciones de "la gotita", y por último, a él y sus hijos Fiorella y Franco por prestarme en varias oportunidades, fuera de todo horario reglamentario, a su esposa y madre.

A mis compañeros: Juan, Rodri, Jorge, Berna, Nelson, Rudy y Sil por hacer de esta maestría una experiencia inolvidable.

A mi directora, la Dra. Mariela F. Del Grosso, por todo, por haber estado en el momento justo con un tema de tesis "casi a medida", por haber trabajado a mi par en forma constante e incansable, por encargarse de estar en cada detalle y no librar nada al azar, por enseñarme y formarme en cada uno de los temas que me eran desconocidos, por apoyarme absolutamente en todo, por mover cielo y tierra para poder "medir de alguna manera", por terminar las correcciones casi en el tiempo cero y por sobre todas las cosas por su excelente predisposición y entusiasmo.

A Rubén Senestro, por su empujoncito al momento de la decisión de embarcarme en un nuevo camino y por reducir, durante el primer año de la maestría, el interminable viaje Quilmes- San Martín a tan solo cincuenta minutos.

Por último quiero agradecer muy especialmente a mi familia:

A Guille, Maru, Vir y Tincho, por apoyarme en absolutamente todas mis locuras, por escuchar mis "novedades" aunque no entiendan ni una sola palabra de lo que les hablo, por haber aguantado libros y apuntes por todos lados en cada reunión familiar por consentirme en todo y por estar siempre.

A Fer por su amor, su comprensión y su paciencia, por estar siempre a mi lado y por apoyarme en cada paso sin cuestionarme nada.

A mis padres por enseñarme a ser quien soy, por dejarme volar, pero siempre con los pies sobre la tierra, por darme siempre la libertad de elegir confiando en cada una de mis decisiones, por escucharme y apoyarme en todo, por sus consejos, su cariño y por vivir casi en primera persona todas mis experiencias.

Resumen

Los polímeros biodegradables poli-L-láctico (PLLA) y polihidroxitirato (PHB) se han utilizado recientemente para ingeniería de tejidos, debido a su biodegradabilidad, sus muy buenas propiedades mecánicas y velocidad de degradación apropiada, comparable con el tiempo de recuperación de tejidos humanos dañados. Sin embargo, tienen una gran limitación en la compatibilidad con las células. Sus superficies altamente hidrofóbicas hacen que sea muy difícil cultivar células sobre ellas pues no presentan buena adhesión.

En los últimos años, la irradiación con haces de iones se ha aplicado para modificar la superficie de polímeros con el fin de mejorar la compatibilidad con sangre y tejidos debido a que permite la creación de grupos polares sobre su superficie aumentando su carácter hidrofílico y favoreciendo, de esta manera, la adhesión de componentes biológicos.

Está demostrado que la irradiación con iones produce un notable incremento de la adhesión y proliferación de células sobre la superficie del polímero, con lo que se mejora la biocompatibilidad.

La aplicación de iones pesados rápidos permite controlar, variando la energía y el tipo de ión, los parámetros de la región dañada: profundidad en el material, intensidad de daño y las dimensiones del diámetro de la traza latente. Si bien esta mejora en la biocompatibilidad de los polímeros es necesaria para su aplicación como sustratos en ingeniería de tejidos, es deseable que las modificaciones producidas con el tratamiento no disminuyan su degradabilidad.

En este trabajo se irradiaron los polímeros poli-L-láctico (PLLA) y polihidroxitirato (PHB) con haces de iones pesados (C y S) de distintas energías y fluencias para modificar sus propiedades hidrofóbicas. Luego de la irradiación, se estudiaron las modificaciones de la superficie irradiada y se evaluó si se produjo algún cambio significativo en la degradabilidad de los polímeros, para lo cual las muestras irradiadas y las no irradiadas fueron sometidas a dos tipos de ensayos de degradación *in vitro*, uno en condiciones fisiológicas y el otro en presencia de una enzima.

La superficie de los polímeros irradiados y degradados fue estudiada por: microscopía electrónica de barrido en modo ambiental (ESEM), Espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier con sistema de Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR), Microespectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier (Micro-FTIR), por medio del ángulo de contacto y por espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS). Por otro lado se evaluaron también las propiedades térmicas de los polímeros modificados mediante análisis termogravimétrico (TGA-DTA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Para estudiar la degradabilidad de las muestras incubadas *in vitro*, además de las técnicas ya mencionadas se estudió el porcentaje de pérdida de peso y se realizó el análisis de peso molecular viscosimétrico.

Los resultados demostraron que el efecto predominante de la irradiación en los polímeros fue el corte de cadenas y la consecuente amorfización con un aumento del carácter hidrofílico de las superficies, lo cual, de acuerdo a la literatura, mejora la adhesión y proliferación celular.

Por otro lado, se determinó que la irradiación aumenta la degradabilidad de los polímeros *in vitro*.

Palabras claves: Polímeros, Biodegradabilidad, Irradiación, Iones pesados.

Abstract

The biodegradable polymers Poly (L-lactic acid) and Poly (hydroxybutyrate) have been recently used for tissue engineering due to their biodegradability, very good mechanical properties and appropriate degradation rate comparable with the regenerative rate of damaged human tissues. However, they have an important limitation regarding the compatibility with the cells. Their surfaces are highly hydrophobic and this makes the surfaces not good for cell attachment so it is very difficult to grow cells on them.

In recent years, ion beam irradiation has been applied to modify the polymers surfaces in order to improve the compatibility with blood and tissues. The creation of polar groups on their surfaces increases their hydrophilic character favouring, thereby, the adhesion of biological components. Several studies have demonstrated that cellular adhesion and proliferation can be improved by this treatment.

The application of swift heavy ion beam irradiation allows control the parameters of the modified areas such as depth in the material, intensity of the hurt and latent track dimension, changing the ion type and its energy. Though this improvement in the biocompatibility of polymers is necessary to its application in tissue engineering, it should not affect the degradation of biomaterials.

In this work the polymers Poly (L-lactic acid) and Poly(hydroxybutyrate) were irradiated with swift heavy ion (S and C) with various fluencies and energies in order to modify their hydrophobic properties. After irradiation, the modified surfaces and the degradability of the polymers were studied to evaluate if some change had taken place. For this purpose, the pristine and irradiated polymers were degraded *in vitro* by two different assays, one in physiological conditions and another by incubation with enzymes.

The surfaces of the irradiated and degraded polymers were studied with Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Contact angle measurements and X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS).

On the other hand, the thermal properties of the modified polymers were evaluated with Thermogravimetric Analysis (TGA), Differential Thermal Analysis (DTA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC).

In order to study the degradability of the incubated *in vitro* samples, besides the techniques previously mentioned, the weight loss analysis and the determination of the viscosimetric molecular weight were done.

Results demonstrated that the predominant irradiation effect in the polymers was the chain scission with the consistent amorphization and an increase of the hydrophilic character of the surfaces.

On the other hand, it was determined that the irradiation enhanced the *in vitro* degradability of the polymers.

Key Words: Polymers, Biodegradability, Irradiation, Heavy ions.

Índice

INTRODUCCION	1
Referencias	1
1. Conceptos generales	2
1.1 Ingeniería de tejidos	2
1.1.1 Obtención de tejidos por cultivo de células sobre un sustrato	2
1.1.1.1 Propiedades de los sustratos	2
1.1.1.2 Aplicación de los polihidroxicanoatos en ingeniería de tejidos	4
1.1.1.2.1 Poliláctico (PLA)	4
1.1.1.2.2 Polihidroxibutirato (PHB)	6
1.2 Modificaciones superficiales de polímeros para aumentar la biocompatibilidad	7
1.3 Degradabilidad de polímeros empleados en implantes biomédicos	8
1.3.1 Biodegradabilidad de los polímeros PHB y PLLA	10
Referencias	12
2. Irradiación: Conceptos y su aplicación en polímeros	14
2.1 Introducción	14
2.2 Interacciones de la radiación con la materia	14
2.2.1 Interacción de los iones con la materia	14
2.3 Irradiación de polímeros	18
2.3.1 Terminología de la radiación	18
2.3.2 Irradiación iónica	19
2.3.2.1 Radiación de baja densidad de ionización	19
2.3.2.2 Radiación de alta densidad de ionización	20
Referencias	22
3. Fundamentos teóricos de las técnicas utilizadas	24
3.1 Irradiación. Descripción del acelerador de iones pesados	24
3.2 Microscopía electrónica de barrido	26
3.3 Ángulo de contacto	27
3.4 Técnicas espectroscópicas	27
3.4.1 Espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR)	27
3.4.1.1 Espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier con sistema de Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)	28
3.4.1.2 Microespectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier (Micro-FTIR)	29
3.4.2 Espectroscopía UV-Visible	29
3.4.2.1 Conceptos generales	29
3.4.2.2 Limitaciones	30
3.4.3 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)	31
3.4.5 Cromatografía	32
3.4.5.1 Conceptos generales	32
3.4.5.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	32
3.4.6 Análisis térmico	34

3.4.6.1 Conceptos generales	34
3.4.6.2 Análisis termogravimétrico (TGA; Thermogravimetric Analysis)	34
3.4.6.3 Análisis térmico diferencial	34
3.4.6.4 Calorimetría diferencial de barrido	35
3.4.7 Viscosimetría	36
4. Materiales y métodos	39
4.1 Materiales	39
4.2 Métodos	39
4.2.1 Irradiación	39
4.2.2 Determinación del ángulo de contacto de las superficies irradiadas	40
4.2.3 Estudio de las superficies irradiadas por microscopía electrónica de barrido	41
4.2.4 Ensayos de degradación <i>in Vitro</i>	41
4.2.4.1 Hidrólisis no enzimática <i>in vitro</i>	41
4.2.4.2 Hidrólisis enzimática <i>in vitro</i>	41
4.2.5 Determinación de la pérdida de peso de los polímeros durante la degradación	42
4.2.6 Determinación del ángulo de contacto de las superficies degradadas	42
4.2.7 Determinación de productos de degradación solubles por espectroscopía UV-Visible	43
4.2.8 Determinación de los productos de degradación por HPLC	43
4.2.9 Estudio de las superficies degradadas por microscopía electrónica de barrido	44
4.2.10 Espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR)	44
4.2.10.1 Estudio de la superficie del PLLA por Espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier con sistema de Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)	44
4.2.10.2 Estudio de la superficie de PHB por Microespectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier (Micro-FTIR)	45
4.2.11 Análisis químico de las superficies de los polímeros por Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)	45
4.2.12 Análisis térmico de los polímeros	45
4.2.12.1 Análisis termogravimétrico (TGA) y análisis térmico diferencial (DTA)	45
4.2.12.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC; Differential Scanning Calorimetry)	46
4.2.13 Determinación de pesos moleculares viscosimétricos	47
Referencias	47
5: Resultados	48
5.1 Caracterización de las superficies irradiadas	48
5.1.1 Determinación del ángulo de contacto	48
5.1.2 Estudio de las superficies por microscopía electrónica de barrido	49
5.2 Estudio de las modificaciones de los polímeros degradados	50
5.2.1 Determinación del porcentaje de pérdida de peso	50
5.2.2 Determinación del ángulo de contacto	50
5.2.3 Determinación de productos de degradación solubles por espectroscopía UV-	51
5.2.4 Determinación de los productos de degradación por HPLC	51
5.2.5 Estudio de las superficies de los polímeros por microscopía electrónica de barrido	52
5.2.5.1 Polihidroxibutirato (PHB)	53

5.2.5.2 Poliláctico (PLLA)	53
5.2.6 Espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR)	55
5.2.6.1 Estudio de la superficie del PLLA por Espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier con sistema de Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)	55
5.2.6.2 Estudio de la superficie de PHB por Microespectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier (Micro-FTIR)	56
5.2.7 Análisis químico de las superficies de los polímeros por Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)	57
5.2.8 Análisis térmico de los polímeros	58
5.2.8.1 Análisis termogravimétrico (TGA) y análisis térmico diferencial (DTA)	58
5.2.8.1.1 Poliláctico	58
5.2.8.1.2 Polihidroxibutirato	61
5.2.8.2 Calorimetría Diferencial de Barrido DSC	65
5.2.8.2.1 Poliláctico	65
5.2.8.2.2 Polihidroxibutirato	67
5.2.9 Peso molecular viscosimétrico del PHB	69
Referencias	70
6. Discusión	72
Referencias	77
7. Conclusiones	79

Introducción

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son una clase de poliésteres naturales sintetizados intracelularmente como fuente de carbono y energía por numerosos organismos. Los polímeros **polihidroxitirato (PHB)** y **poli-L-láctico (PLLA)** pertenecen a este tipo de poliésteres. Ambos han sido utilizados recientemente en ingeniería de tejidos, debido a su biodegradabilidad, sus muy buenas propiedades mecánicas y velocidad de degradación apropiada, comparable con el tiempo de recuperación de tejidos humanos dañados. Sin embargo, tienen una gran limitación en la compatibilidad con las células. Sus superficies altamente hidrofóbicas hacen que sea muy difícil cultivar células sobre ellas pues no presentan buena adhesión.

En los últimos años, la irradiación con haces de iones de baja energía se ha aplicado para modificar la superficie de polímeros con el fin de mejorar la compatibilidad con los tejidos [1]. La irradiación de polímeros permite la creación de grupos polares sobre su superficie, lo que mejora el mojado y la adhesión de componentes biológicos.

Está demostrado que la irradiación con iones produce un notable incremento de la adhesión y proliferación de células sobre la superficie del polímero, con lo que se mejora la biocompatibilidad haciéndolo más adecuado para su aplicación como sustrato en ingeniería de tejidos [2, 3]. La aplicación de iones pesados rápidos permite controlar, variando la energía y el tipo de ión, los parámetros de la región dañada: profundidad en el material, intensidad de daño y las dimensiones del diámetro de la traza latente. Si bien esta mejora en la biocompatibilidad de los polímeros es necesaria para su aplicación como sustratos en ingeniería de tejidos, es deseable que las modificaciones producidas con el tratamiento no disminuyan su **degradabilidad**.

El objetivo del trabajo es irradiar los polímeros **poli-L-láctico** y **polihidroxitirato** con haces de iones pesados de distintas energías y fluencias para modificar sus propiedades hidrofóbicas.

Luego de la irradiación, estudiar las modificaciones de la superficie irradiada y evaluar si se produce algún cambio significativo en la **degradabilidad de los polímeros**.

Referencias

- [1] B. Pignataro, E. Conte, A. Scandurra, G. Marletta, *Biomaterials* 18 (1997) 1461-1470.
- [2] C. R. Arbeitman, M. F. del Grosso, I. Ibáñez, G. Garcia Bermúdez, H. Durán, V. C. Chappa, R. Mazzei, M. Behar, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 268 (2010) 3059-3062.
- [3] C. R. Arbeitman, M. F. del Grosso, I. Ibáñez, G. Garcia Bermúdez, H. Durán, V. , R. Mazzei, *Irradiación de Polímeros Biocompatibles para su utilización como sustratos de cultivos celulares*, Congreso SAM/CONAMET 2009.

Capítulo 1

Conceptos generales

1.1 Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos ha surgido como un campo multidisciplinario combinando conocimientos en biología, ciencia de materiales y reconstrucción quirúrgica, con el fin de proporcionar tejidos que restauren, mantengan o mejoren la función tisular.

La necesidad de este enfoque ha surgido primariamente de la escasez de donación de órganos y tejidos, aunque hoy promete poder expandir dramáticamente la habilidad para reparar tejidos, perfeccionar los procedimientos quirúrgicos y mejorar significativamente la calidad de vida.

En general hay tres formas distintas de obtener nuevos tejidos:

Una se refiere al trabajo con células o sustitutos celulares, otra hace uso de materiales inductores de tejido y por último, una tercera alternativa es el cultivo de células previamente sembradas sobre un sustrato.

1.1.1 Obtención de tejidos por cultivo de células sobre un sustrato

1.1.1.1 Propiedades de los sustratos

El sustrato es una base diseñada para proveer una estructura de soporte al tejido que sobre él se genera y puede ser configurado de forma que encierre a las células implantadas, protegiéndolas del sistema inmune del organismo huésped o, de lo contrario, con una estructura abierta que permita a las nuevas células estar en contacto directo con el medio fisiológico.

Estos soportes, además de proporcionar una base sobre la cual las células permanezcan hasta alcanzar una localización anatómica designada, pueden también desempeñar un rol crítico como plantilla para la reorganización de las células transplantadas que deben constituir el nuevo tejido.

El material elegido para diseñar el sustrato debe cumplir con ciertos requisitos:

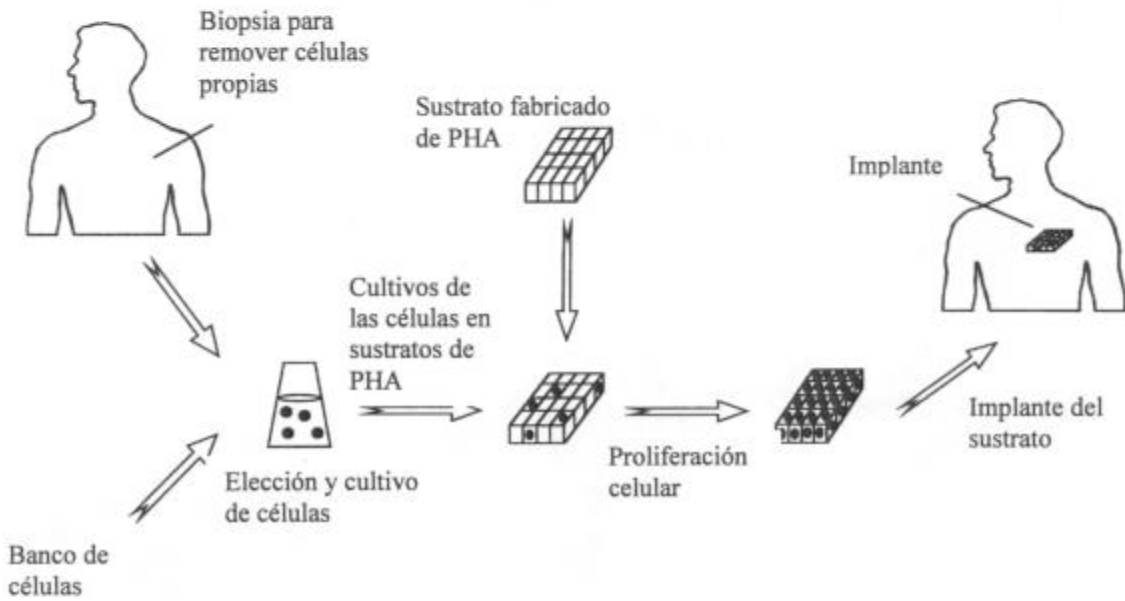
- Debe ser biocompatible
- Debe soportar el crecimiento celular: muchas células de mamíferos solo proliferan adheridas a una superficie, por lo tanto es necesario que la superficie del soporte promueva o sea propicia para la adhesión celular. Una vez adheridas, el soporte debe permitir que las células continúen con su crecimiento y función en un modo normal.
- Debe ser capaz de organizar y guiar a las células en la manera deseada.
- Debe conseguir un número significativo de células manteniéndolas en un estado viable con adecuada difusión de nutrientes y pasaje de desechos.

Finalmente, una vez que el sustrato haya cumplido su propósito de proveer un reemplazo de tejido natural, no se necesitará del mismo a largo plazo, por lo que es deseable su completa degradación hacia productos que no presenten toxicidad y sean bien tolerados por el huésped [1].

Durante la selección del material para dicho fin, deberá considerarse que el sustrato no solo provea sitios adecuados de adhesión y proliferación celular, sino también, permita la difusión de gases y nutrientes.

Después de algunos estudios se vio que algunos polímeros podrían cumplir con la mayoría de estas propiedades [2, 3].

El potencial uso de estos polímeros en ingeniería de tejidos puede esquematizarse de la siguiente manera:



Debe resaltarse que será la **superficie del polímero** la parte del mismo que merezca mayor atención al momento del diseño del sustrato, ya que en ella se darán las interacciones célula-soporte y medio interno-implante.

En un caso ideal, entonces, es deseable poder ajustar sus propiedades para adaptarla según la aplicación destinada, a menudo, sin alterar otras propiedades del soporte.

Algunas técnicas físicas y químicas de **modificación superficial** han sido aplicadas para lograr cambios más o menos importantes en la mojabilidad, la carga y la morfología del polímero, lo cual se correlaciona con el fenómeno de adhesión y proliferación celular.

Otras técnicas como el tratamiento con plasma e irradiación con iones de alta y baja energía inducen una modificación bien controlada en un dado espesor del polímero, sin afectar la estructura ni las propiedades en volumen.

1.1.1.2 Aplicación de los polihidroxicanoatos en ingeniería de tejidos

Hemos mencionado que los polihidroxicanoatos (PHAs) son una clase de poliésteres naturales y que el **polihidroxibutirato (PHB)** y el **poliláctico (PLA)** pertenecen a este tipo de polímeros.

Sus propiedades cubren un amplio espectro, incluyendo materiales que se asemejan al polipropileno y otros que son elastoméricos. Esta variabilidad de características surge de su estructura química, ya sea de la longitud de las cadenas laterales o de la distancia entre las uniones ésteres de la cadena principal. Generalmente, los PHAs con cadenas laterales cortas son muy cristalinos mientras que aquellos con grupos laterales de mayor longitud son elastoméricos.

Además de ofrecer un amplio rango de propiedades mecánicas, estos polímeros son biodegradables.

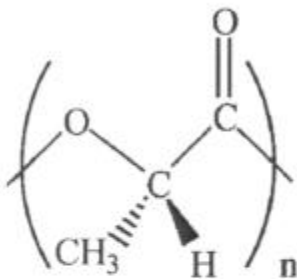
Se han logrado desarrollar nuevas rutas de producción de PHAs, aplicando novedosas técnicas de fermentación y conocimientos en ingeniería genética. Esto, sumado a los avances en las estrategias de recuperación y purificación de los productos biosintéticos, los hace competitivos en cuanto a costos frente a los tradicionales plásticos derivados del petróleo.

Las mejoras en el proceso de producción de los PHAs aumentan su disponibilidad en el campo científico ofreciendo la oportunidad de evaluar y desarrollar diferentes aplicaciones de estos polímeros naturales, siendo de especial interés su aplicación en medicina.

Las posibles aplicaciones de estos polímeros son: suturas quirúrgicas, polvos lubricantes, parches para heridas, implantes ortopédicos, sustitutos pericárdicas y sustratos (scaffolds) en ingeniería de tejidos [1].

1.1.1.2.1 Poliláctico (PLA)

La estructura química del poliláctico (PLA) es:



El PLA es un poliéster termoplástico biodegradable muy estudiado por su potencial para reemplazar a los polímeros convencionales de origen petroquímico. Su precursor, el ácido láctico, es eficientemente producido por fermentación de fuentes renovables como el azúcar y el almidón.

Puede ser sintetizado vía condensación del ácido láctico o por el ciclo del dímero del ácido láctico.

Este polímero se presenta en tres estereoformas: L-PLA, D-PLA y DL-PLA. El L-PLA y el D-PLA son semicristalinos y exhiben alta resistencia a la tracción y baja elongación. Por otro lado, el DL-PLA es más amorfo exhibiendo una distribución aleatoria de las formas isoméricas del ácido láctico dependiendo de la cantidad de D ó L-polímero.

La composición estereoquímica del PLA tiene un efecto significativo sobre su alto punto de fusión (120-175°C), sus propiedades mecánicas y su cristalinidad. Su temperatura de transición vítrea es de 55 °C.

En los últimos tiempos, se ha puesto especial énfasis en desarrollar tecnologías con el fin de lograr propiedades biológicas, mecánicas y químicas equivalentes ó superiores a los polímeros convencionales. La frecuente necesidad de modificar a este poliéster para alcanzar propiedades adecuadas para su aplicación ha demandado mucha atención.

El PLA es un polímero eco-amigable por ser derivado de fuentes renovables, por su biodegradabilidad y por ser reciclable y compostable. Además, su producción consume CO₂ lo que lo hace más interesante.

Otra característica importante de este polímero es su biocompatibilidad. Esta propiedad constituye su aspecto más atractivo, en especial para sus aplicaciones en el área biomédica. Un material biocompatible no debe tener efectos tóxicos ni carcinogénicos sobre los tejidos locales. El PLA, al ser implantado en organismos vivos, incluyendo el cuerpo humano, se hidroliza en sus α -hidroxi-ácidos constitutivos, los que son luego incorporados en el ciclo del ácido tricarbóxico y excretados. Por lo tanto, los productos de degradación de este poliéster no tienen efecto tóxico, haciendo de él una opción natural para aplicaciones biomédicas.

Respecto a su producción y manufactura, tiene muy buena procesabilidad térmica y requiere de 25-50% menos energía para su producción que los derivados del petróleo, lo cual disminuye su costo.

El PLA tiene ciertas limitaciones que deben ser consideradas:

Es un polímero químicamente inerte presentando grupos no reactivos en su cadena. Esto hace que su modificación, tanto superficial como en volumen, sea una tarea desafiante. Además es relativamente hidrofóbico, lo cual resulta en una baja afinidad por las células, condición no deseable durante su uso como sustrato de tejidos biológicos.

La biodegradación es considerada un importante criterio de selección para aplicaciones biomédicas. Una velocidad de degradación demasiado lenta, lleva a una larga vida *in vivo* que, en ciertas condiciones, puede significar un período de años.

No obstante el PLA es un polímero biodegradable, su tasa de degradación es lenta y depende de una serie de factores como ser: estructura química, peso molecular, distribución de peso molecular, temperatura de transición vítrea, temperatura de fusión, cristalinidad, área superficial e hidrofiliidad [4, 5, 6].

Si bien se cree que su degradación ocurre estrictamente a través de una reacción de hidrólisis, sin involucrar enzimas, se encontró que las lipasas podrían catalizar esta reacción en el L-PLA [6].

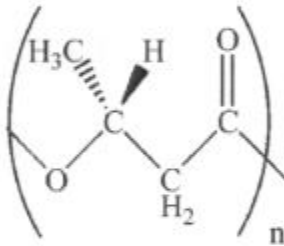
La biodegradabilidad del PLA depende del medio al que esté expuesto. En el cuerpo humano se cree que es inicialmente degradado por hidrólisis y que los oligómeros solubles formados son metabolizados por la célula [6].

El principal inconveniente del PLA en cuanto a sus propiedades en volumen, además de su baja tasa de degradación es su pobre ductilidad. Han sido empleados varios métodos para mejorar dichas propiedades modificando al polímero en volumen [7].

La interacción entre la superficie del PLA y otros materiales juega un rol importante en muchas aplicaciones biomédicas. Su funcionalidad química, hidrofiliidad, rugosidad y topografía condicionan su aplicación. Se han ensayado diferentes técnicas para modificar la superficie del PLA [7].

1.1.1.2.2 Polihidroxibutirato (PHB)

La estructura química del polihidroxibutirato (PHB) es:



El polihidroxibutirato (PHB) es un poliéster biocompatible, completamente biodegradable, con actividad óptica, piezoelectricidad y muy buenas propiedades de barrera.

Es un material parcialmente cristalino, cuya temperatura de fusión es de 174 °C y su temperatura de transición vítrea de 4 °C.

Como hemos visto, este termoplástico pertenece a la familia de los polihidroxicanoatos (PHAs). Sus propiedades físicas y mecánicas son comparables a las del polipropileno (PP) isotáctico. Es un polímero frágil y rígido. El grado de fragilidad depende de su cristalinidad, microestructura y temperatura de transición vítrea [8].

El PHB no contiene ningún residuo de catálisis como otros polímeros sintéticos.

Es un polímero perfectamente isotáctico sin ramificaciones de cadena.

No es soluble en agua, pero es 100% biodegradable. Es poco permeable al O₂, al H₂O y al CO₂ [8].

Todos los PHAs son poliésteres producidos por microorganismos en condiciones de crecimiento desbalanceadas. Hasta ahora solo algunos PHAs están disponibles en cantidades suficientes para su aplicación en investigación, entre ellos se encuentra el PHB.

Este poliéster no es solo un polímero de almacenamiento de energía confinado a ciertas bacterias, sino que está involucrado en importantes funciones fisiológicas.

Se encuentra ampliamente distribuido en el medio intracelular formando complejos con ciertas macromoléculas. El PHB, cuando forma parte de estos complejos, tiene una singular habilidad para disolver sales y facilitar su transferencia a través de barreras hidrofóbicas. Esto define un potencial sitio fisiológico para el PHB en el metabolismo celular. De acuerdo a dichas características, se sabe que el polímero, sus oligómeros y monómeros lejos de ser citotóxicos, pueden ofrecer beneficios terapéuticos y nutricionales [3].

En investigaciones anteriores se observó que el PHB en contacto con la sangre no activa la respuesta celular del sistema de hemostasia, pero si, los sistemas de la coagulación y el complemento [2].

Se han realizado ensayos de cultivos *in vitro* con células de diferentes orígenes sobre este poliéster demostrando que el PHB puede ser usado como matriz para proliferación celular *in vitro* [2, 3].

Dado que el PHB es compatible con la sangre y los tejidos de mamíferos y que su monómero precursor es el ácido 3-hidroxibutírico (metabolito normal del cuerpo humano), el poliéster en cuestión podría ser usado para aplicaciones médicas.

1.2 Modificaciones superficiales de polímeros para aumentar la biocompatibilidad

Las propiedades superficiales de los materiales influyen en los eventos iniciales de la interfase célula-matriz determinando el éxito del cultivo y la hidrofiliidad juega el rol principal en dicha interacción, aunque ciertas propiedades como cargas electrostáticas, impedimento estérico, fuerzas entrópicas, energía de superficie, composición química y microestructura deben también ser consideradas ya que contribuyen a los fenómenos de adhesión, proliferación y propagación celular.

Una de las técnicas empleadas para modificar la superficie de polihidroxialcanoatos (PHAs) con el fin de mejorar la adhesión célula-polímero es la **hidrólisis alcalina con NaOH**. Se han evaluado sus efectos sobre PHB y PLA obteniendo una mejora en la biocompatibilidad de las superficies como resultado del tratamiento [9, 10, 11].

Por otro lado, hay trabajos que demuestran que el PHB induce una respuesta inflamatoria aguda prolongada cuando es implantado *in vivo* [11]. Este fenómeno podría ser causado por falta de compatibilidad de la superficie del polímero con los componentes biológicos presentes en el medio fisiológico, entre ellos, las células.

Se ha intentado minimizar este efecto por modificación superficial vía **hidrólisis enzimática**, obteniendo, en todos los casos, un aumento de carácter hidrofílico de la superficie con la consecuente mejora de su citocompatibilidad [10, 11].

Cabe destacar que, si bien en tanto la hidrólisis alcalina como el tratamiento con enzimas mejoran la hidrofiliidad de las superficies del polímero, el crecimiento celular evaluado luego sobre ellas tiene mejores resultados sobre las superficies tratadas con lipasa. Esto se debe al efecto de cada tratamiento sobre la estructura fina del polímero. El NaOH al ser fuertemente alcalino, no solo cliva las uniones ésteres de la cadena principal como lo hace la enzima, sino que también destruye la microestructura reduciendo la afinidad de las células por la superficie tratada [11].

Debe considerarse entonces, que en aquellos polímeros cuya superficie es expuesta a un tratamiento con el fin de mejorar su biocompatibilidad, no solo se producirán cambios en sus propiedades hidrofílicas y su funcionalidad, sino también se verá afectada su microestructura.

Habiendo demostrado que el tratamiento de los PHAs con lipasas promueve el crecimiento de una determinada línea celular sobre su superficie, se ha evaluado si el incremento de la mojabilidad vía **“recubrimiento” con un polisacárido lineal altamente hidrofílico** podría mejorar su biocompatibilidad. Las superficies resultantes de este tratamiento son heterogéneas y solo en aquellas zonas donde la proporción entre las áreas hidrofílicas e hidrofóbicas es óptima se favorece la adhesión y el crecimiento

celular. Esto debe ser considerado durante la selección y el diseño de biomateriales [10].

El tratamiento de superficies poliméricas con **plasma** ha brindado también excelentes resultados al aplicarse a membranas de PHB. Esta técnica ajusta las propiedades fisicoquímicas superficiales para su aplicación en ingeniería de tejidos [9, 12].

La **implantación de iones** ha sido muy reconocida como un método útil para mejorar la superficie de metales y semiconductores sin alterar significativamente sus propiedades en volumen. Se ha aplicado también para modificar la superficie de polímeros utilizados en ingeniería de tejidos y medicina con el fin de mejorar su compatibilidad con la sangre y los tejidos.

Se ha reportado un importante incremento en la mojabilidad del poliestireno con la consecuente mejora de su citocompatibilidad producidos como resultado de este tratamiento [13].

Por otro lado, la implantación de los iones ^{+}C y ^{-}Ag demostró que la morfología, composición química, y citocompatibilidad de las superficies tratadas están íntimamente relacionadas con la dosis de implantación [2, 14, 15].

En los últimos años se ha utilizado la **irradiación iónica** para modificar la superficie de polímeros pues permite la creación de grupos polares. De esta forma se logra una mejora en su interacción con los componentes biológicos lo que los hace más aptos para ser empleados en ingeniería de tejidos como sustrato de cultivos celulares.

La irradiación iónica de películas de polisiloxano, induce cambios químicos, responsables de una importante disminución del carácter hidrofóbico, como consecuencia de la formación de especies químicas polares [16].

Recientemente se han estudiado los cambios producidos por este tratamiento en las propiedades físico químicas superficiales y la topografía a nanoescala de polipropileno y poliestireno examinando su correlación con el fenómeno de adhesión celular [17].

Se ha estudiado también en años anteriores, el efecto de la irradiación sobre la superficie de otros dos polímeros, poliuretano y polietersulfona, observándose una significativa mejora de su biocompatibilidad dependiente de la fluencia de irradiación [18].

Hasta el momento, las investigaciones realizadas confirman la teoría de que la irradiación de iones promueve la formación de superficies biocompatibles a través de la activación de grupos químicos específicos, siendo, la propiedad de mojabilidad solo una consecuencia de las modificaciones químicas superficiales.

1.3 Degradabilidad de polímeros empleados en implantes biomédicos

Hemos visto que algunos componentes de implantes médicos están hechos de materiales poliméricos que deben cumplir con ciertas funciones y requisitos. En todos los casos la integridad y estabilidad del biomaterial son muy importantes.

Para algunas funciones se desea que sean estables en el tiempo, mientras que para otras, como es el caso de los "sustratos" en ingeniería de tejidos, se requiere la degradación y desaparición del polímero, una vez que haya cumplido su función en la regeneración

del tejido. En todos los casos es muy importante conocer la química que involucra el proceso de degradación al igual que la cinética del mismo.

Hay cuatro mecanismos de degradación de polímeros involucrados en los implantes [19]:

- Degradación oxidativa
- Degradación enzimática
- Degradación física
- Hidrólisis

Degradación oxidativa: Ocurre como consecuencia de la acción de las defensas biológicas en las que las células inflamatorias liberan agentes oxidantes que difunden en los implantes poliméricos y los degradan. La susceptibilidad a dicho mecanismo de degradación depende de la facilidad con que puedan generarse radicales libres en el polímero, condición necesaria para la iniciación de la reacción.

Degradación enzimática: Se debe también a la acción defensiva contra el material extraño implantado. Las enzimas pertenecen al sistema biológico del huésped, por lo tanto, las diferencias individuales en los valores enzimáticos determinan una variabilidad en la degradación de los implantes en la población.

Degradación física: Se debe principalmente a la fricción mecánica asociada al movimiento bajo presión, otra causa es el hinchamiento por el agua, lo cual puede afectar la función del polímero, si este cambia significativamente su temperatura de transición vítrea, su geometría o sus propiedades mecánicas.

Hidrólisis: Es producida por acción del medio acuoso. En los polímeros sólidos, la movilidad molecular, ya sea en estado vítreo o gomoso, es mucho menor que para los polímeros en solución y esto limita la degradación hidrolítica. Por otro lado la accesibilidad de las moléculas de agua a las uniones éster depende del carácter hidrofílico del polímero el cual, a su vez, aumenta durante la hidrólisis como resultado de la generación de cadenas cortas hidrofílicas.

El coeficiente de difusión del agua en los polímeros sólidos no es muy sensible al estado del mismo (vítreo, gomoso, cristalino).

Las sales y los iones, usualmente, difunden poco en los polímeros por lo tanto, iones tales como H^+ y OH^- del medio no tiene efecto significativo en la degradación en volumen, pudiendo si influir sobre la superficie. En presencia de ácidos orgánicos en el medio, estos pueden difundir en el polímero acelerando de esta manera la degradación. Entonces, en la degradación hidrolítica de los poliésteres sólidos, tales como PHB y PLA, es necesario el acceso de las moléculas de agua a las uniones éster, lo cual dependerá de la hidrofiliidad del material.

Durante la degradación hay un fenómeno de autoaceleración de la reacción hidrolítica donde los carboxilos finales de las cadenas catalizan la reacción. Dicho fenómeno depende de la concentración de cadenas terminales, lo que está determinado por el peso molecular del polímero. En polímeros de alto peso molecular este fenómeno es insignificante.

En los polímeros aplicados en ingeniería de tejidos es necesaria su degradación en un período de tiempo comparable con el proceso de curación. En estos casos el tiempo en el que el polímero queda completamente degradado y pierde su masa es muy

importante. Durante dicho período, el polímero libera productos de degradación, los cuales, dependiendo de sus propiedades físicas y químicas y de la velocidad de liberación pueden comprometer la biocompatibilidad del implante.

Conociendo el mecanismo de degradación, los productos de degradación y el medio donde se aplicará el implante, podrá predecirse el éxito del mismo.

Un incremento de la porosidad, un mayor carácter hidrofílico, un aumento del área superficial expuesta al medio y/o un aumento del contenido amorfo del polímero incrementarán la tasa de degradación [20].

La caracterización detallada de las propiedades superficiales de los polímeros estudiados es crucial en el diseño de nuevos biomateriales, no solo por su biocompatibilidad, sino también por ser la superficie del material la parte de éste que estará en contacto con el medio fisiológico una vez implantado permitiendo o no el inicio de su degradación.

Como hemos mencionado, los polímeros biodegradables son ampliamente estudiados para ser usados en medicina y cirugía de implantes. El diseño de tales materiales debe considerar su degradación *in vivo* en forma controlada en un período de tiempo predeterminado luego de la implantación en el organismo, de manera tal que haya logrado una función particular en ese lapso de tiempo. Una vez cumplido su objetivo el polímero biodegradable, debería, idealmente, ser reabsorbido por el cuerpo de manera predecible sin que sea necesaria una remoción subsecuente.

La degradación provoca un cambio en la estructura del material y, por lo tanto, en las propiedades. Dicho cambio es producido por el medio y, como hemos mencionado, involucra varios mecanismos.

La biodegradación verdadera de un polímero implantado debería referirse estrictamente a la producida por la acción de los componentes del medio fisiológico. Para estudiarla, podría llevarse a cabo una hidrólisis *in vitro* reproduciendo con la mayor fidelidad posible las condiciones de dicho medio para luego extrapolar los resultados al comportamiento del material *in vivo*.

1.3.1 Biodegradabilidad de los polímeros PHB y PLLA

Hemos visto que el PHB es considerado un plástico natural biodegradable potencialmente útil para diferentes aplicaciones en el campo de la medicina por lo que su biocompatibilidad ha sido y es muy estudiada. En contraste a esto, y a la gran cantidad de estudios realizados sobre su degradación bacteriana *in vitro*, la distribución tisular y degradación luego de su administración en animales no está bien documentada. No obstante, hace algunos años se han realizado estudios de degradación *in vivo* examinando la actividad inflamatoria y la biodegradación del PHB en ratas demostrando que este material no desencadena respuesta inflamatoria, por lo que podría ser usado en diferentes aplicaciones como biomaterial [20].

Se ha investigado sobre la degradación y las propiedades del PHB con el fin de diseñar implantes temporarios para la regeneración de tejido óseo. El polímero, de algún modo, altera sus propiedades y se biodegrada en respuesta al medio extracelular, reduciendo su rigidez, resistencia y volumen físico permitiendo así que el nuevo tejido adquiera su posición y función fisiológica sin presentar problemas crónicos asociados con la presencia de los implantes a largo plazo [22].

Respecto al PLA, su mecanismo de degradación en medio acuoso es aún materia de estudio y discusión en la literatura. Muchos autores indican que su degradación *in vitro* ocurre por hidrólisis no enzimática al azar de las uniones ésteres, la cual es acelerada *in vivo* por la presencia de enzimas celulares. Se cree que el producto final de degradación de los polilácticos es el ácido láctico que eventualmente es procesado a través de caminos metabólicos normales, y eliminado del organismo como CO_2 y H_2O . Su tiempo de reabsorción completa dependerá de su estructura química, su peso molecular y polidispersidad, su cristalinidad y morfología [5].

Se ha analizado, por la técnica de Espectroscopía de Infrarrojo con Transformadas de Fourier con sistema de Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR), el proceso de hidrodegradación *in vitro* del PLA. Este polímero es un material estable y su tiempo de reabsorción total *in vivo* es de alrededor de 2 – 3 años. Dicha característica puede explicarse por su estructura química, su alto peso molecular y su alta cristalinidad [5].

La microestructura del PLA influye en su susceptibilidad a la degradación, la parte cristalina es más resistente respecto a la parte amorfa y la tasa de degradación disminuye conforme aumenta la cristalinidad. La degradabilidad también depende del peso molecular, siendo los poliésteres de mayor peso molecular más lentamente degradados. Por su parte la temperatura de fusión (T_f) tiene un fuerte efecto en la degradabilidad enzimática, siendo aquellos polímeros de mayor T_f menos degradables [6].

Se ha reportado que la biodegradabilidad del PHB, en ensayos *in vitro* y en implantes practicados en ratones, es mayor que la del PLA [4, 23].

En ambos polímeros, se produce un aumento de la cristalinidad como consecuencia del proceso de degradación [23, 24].

En el caso particular del PHB la degradación es acompañada con una caída de peso molecular continua con cromatogramas de carácter unimodal. Esto sugiere que su hidrólisis comienza al azar por corte de cadenas tanto de la región amorfa como cristalina [23].

En trabajos donde la superficie de películas de PHB fue modificada por “polimerización por injerto” inducido por radiación, se observó que la biodegradabilidad del material resultante depende de la hidrofiliidad del injerto empleado, lo que sugiere que las propiedades hidrofóbicas/hidrofílicas de la superficie del polímero condicionan su degradación [25].

Recientemente, se ha estudiado la estabilidad radiolítica del PHB exponiéndolo a radiación γ . Este tipo de irradiación, a diferencia de la irradiación con iones, modifica al polímero en volumen, por lo que es importante estabilizarlo a través del agregado de aditivos previo a la irradiación para que el material pueda cumplir con su función específica.

El daño producido por la irradiación γ en las películas de PHB acelera su degradación, siendo más notorio este efecto en estudios *in vivo*. Esto sugiere la posibilidad de la acción de ciertos componentes presentes sólo en el medio fisiológico, los que actuarían en los polímeros suficientemente pre-degradados por el daño producido por la radiación.

La radiación γ produce cortes de la cadena principal, lo que promueve la degradación molecular y facilita el ataque enzimático.

Se sabe entonces que la radiación γ , por influir sobre la estructura molecular del polímero puede aumentar su susceptibilidad a la degradación [26, 27].

Referencias

- [1] Simon F. Williams, David P. Martin, Daniel M. Horowitz, Oliver P. Peoples, *International Journal of Biological Macromolecules* 25 (1999) 111-121.
- [2] Guo-Qiang Chen, Qiong Wu, *Biomaterials* 26 (2005) 6565-6578.
- [3] Chuan Ye, Ping Hu, Min-Xian Ma, Yang Xiang, Ri-Guang Liu, Xian-Wen Shang, *Biomaterials* 30 (2009) 4401-4406.
- [4] Thomas Freier, Carmen Kunze, Claudia Nischan, Sven Kramer, Katrin Sternberg, Marko Sab, Ullrich T. Hopt, Klaus-Peter Schmitz, *Biomaterials* 23 (2002) 2649-1657.
- [5] Elzbieta Pamula, Marta Blazewicz, Czeslawa Paluszkiewicz, Piotr Dobrzynski, *Journal of Molecular Structure* 569 (2001) 69-75.
- [6] Yutaka Tokiwa, Buenaventurada P. Calabia, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72 (2006) 244-251.
- [7] Rahul M. Rasal, Amol V. Janorkar, Douglas E. Hirt, *Progress in Polymer Science* 35 (2010) 338-356.
- [8] Elektronisches document, Development of a Biodegradable Material Based on Poly (3-hydroxybutyrate) PHB, 2002.
- [9] Tilo Pompe, Kristin Keller, Gisela Mothes, Mirko Nitschke, Mark Teese, Ralf Zimmermann, Carsten Werner, *Biomaterials* 28 (2007) 28-37.
- [10] Ya-Wu Wang, Qiong Wu, Guo-qiang Chen, *Biomaterials* 24 (2003) 4621-4629.
- [11] Xianshuang Yang, Kai Zhao, Guo-Qiang Chen, *Biomaterials* 23 (2002) 1391-1397.
- [12] G. Clarotti, F. Schue, J. Sledz, A. Ait Ben Aoumar, K. E. Geckeler, A. Orsetti, G. Paleirc, *Biomaterials* 13 (1992) 832-840.
- [13] Hiroshi Tsuji, Hiroko Sato, Takahiro Baba, Shin'ichi Ikemura, Yasuhito Gotoh, Junzo Ishikawa, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 166-167 (2000) 815-819.
- [14] Hiroshi Tsuji, Hiroko Satoh, Shigeki Ikeda, Noburo Ikemoto, Yasuhito Gotoh, Junzo Ishikawa, *Surface and Coatings Technology* 103-104 (1998) 124-128.
- [15] Xiaoyun Chen, Xiongfei Zhang, Ya Zhu, Jizhong Zhang, Ping Hu, *Polymer Journal* 35 (2003) 148-154.
- [16] C. Satriano, E. Conte, G. Marletta, *Langmuir* 17 (2001) 2243-2250.

- [17] C, R. Arbeitman, M.F. del Grosso, I. Ibáñez, G. García Bermúdez, H. Duran, R. Mazzei, Irradiación de Polímeros Biocompatibles para su utilización como sustratos de cultivos celulares, Congreso SAM/CONAMET 2009.
- [18] B. Pignataro, E. Conte, A. Scandurra, G. Marletta, *Biomaterials* 18 (1997) 1461-1470.
- [19] Su Ping Lyu, Darrel Untereker, *Int. J. Mol. Sci.*, 10 (2009) 4033-4065.
- [20] United States Patents US 6,828,357 B1 (2004).
- [21] Terumi Saito, Kenkichi Tomita, Kazuhiko Juni, Kenkichi Ooba, *Biomaterials* 12 (1991) 309-312.
- [22] C. Doyle, E. T. Tanner, W. Bonfield, *Biomaterials* 12 (1991) 841-847.
- [23] Xiang-Hua Qu, Qiong Wu, Kun-Yang Zhang, G. Q. Chen, *Biomaterials* 27 (2006) 3540-3548.
- [24] Nadarajah Vasanthan, Onah Ly, *Polymer Degradation and Stability* 94 (2009) 1364-1372.
- [25] Yuki Wada, Noriaki Seko, Naotsugu Nagasawa, Masao Tamada, Ken-ichi Kasuya, Hiroshi Mitomo, *Radiation Physics and Chemistry* 76 (2007) 1075-1083.
- [26] N. D. Millar, D. F. Williams, *Biomaterials* 8 (1987) 129-137.
- [27] Renata F. S. Santos, Elmo S. Araújo, Carlos R. C. Ferreira, Abene S. Ribeiro, *Radiation Physics and Chemistry* 78 (2009) 85-91.

Capítulo 2

Irradiación: Conceptos y su aplicación en polímeros

2.1 Introducción

El estudio de los efectos producidos por la radiación, ya sea iones, electrones o rayos X y su interacción con los materiales es un campo en continua evolución, de gran interés y con importantes aplicaciones tecnológicas.

Entre las primeras aplicaciones de la radiación se encuentran los rayos X de baja energía para determinar la estructura de los materiales y con propósitos médicos. Con el desarrollo de fuentes de mayor energía y/o alto voltaje fue posible encarar la modificación de las propiedades de los materiales irradiados y su comercialización [1]. Durante la última década, los estudios se han concentrado en los efectos de la radiación en los materiales poliméricos por su potencial aplicación a los desarrollos en microelectrónica.

2.2 Interacciones de la radiación con la materia

Las radiaciones ya sean partículas cargadas o radiaciones electromagnéticas de alta energía se diferencian por su interacción con la materia. Las partículas cargadas al penetrar en un material pierden parte de su energía cuando interactúan con los electrones libres o ligados y otra parte en colisiones con los átomos, mientras que la radiación electromagnética (rayos gama) interactúa en procesos únicos con átomos, electrones o núcleos de acuerdo con la energía del fotón incidente.

2.2.1 Interacción de los iones con la materia

Una partícula cargada moviéndose a través de la materia pierde energía interactuando con electrones ligados o libres y con núcleos atómicos. En ambos casos existe una interacción elástica o inelástica, lo cual da lugar a distintos tipos de colisiones. En las colisiones electrónicas el ión cede una parte de su energía a los electrones libres o ligados del sólido, disipando esta energía recibida en choques secundarios o ionización secundaria. En las colisiones nucleares la interacción se realiza con los núcleos de la matriz, entregándole energía de translación a los átomos del medio.

El fenómeno observado depende de la masa del ión, su número atómico y su energía cinética como así también de la masa y número atómico de las partículas del blanco. El paso del ión a través de un sólido causa tres clases de fenómenos como puede verse en la figura 2.1 [4]:

1. **Efecto en el ión.** Un efecto importante es el de pérdida de energía del ión. El mismo presenta cambios en su estado de carga (ya sea por perder o ganar electrones al

interactuar con el medio) y cambios en su dirección original por la colisión con un átomo del material que atraviesa.

2. **Emisión de radiaciones.** Al pasar el ión por el sólido se producen radiaciones secundarias de muy baja energía que son difíciles de detectar.

3. **Efectos internos.** Son los procesos internos que ocurren en la muestra. No son directamente medibles y están asociados a la radiación secundaria.

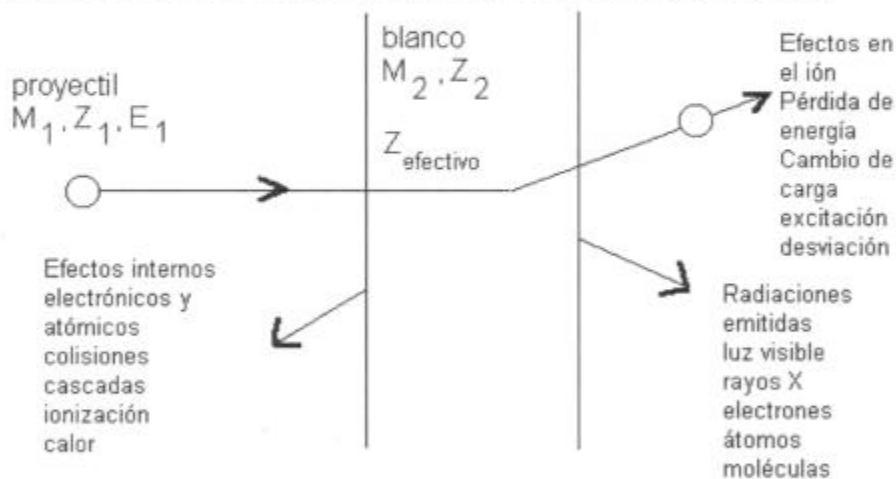


Figura 2.1: Efectos observados en la interacción de un ión con un sólido

Interacción de la radiación con la materia

Pérdida de energía de un ión al atravesar un material

La energía perdida por una partícula cargada por unidad de camino recorrido se define como el poder frenador (stopping power) y se representa con la función $S(E)$:

$$S(E) = - \frac{dE}{dx}$$

En su camino a través del sólido el ión pierde paulatinamente su energía y el poder frenador varía en diversos órdenes de magnitud, por eso su valor se representa generalmente en escala doble logarítmica. Como se puede observar (Fig. 2.2) presenta un máximo alrededor de 1 MeV/amu, denominado pico de Bragg. A mayores energías la función decrece como $1/E$, es el rango descrito por la teoría de Bethe Bloch (BB) [5] y para energías menores al pico de Bragg decrece aproximadamente como \sqrt{E} , en el rango descrito por la teoría de Lindhard- Scharff-Schiott (LSS) [6].

La teoría BB se aplica para altas energías y velocidades no relativistas, en forma más precisa cuando la velocidad del proyectil es $V_0 \gg v_0 Z_1^{2/3}$ donde $v_0 = 2.2 \times 10^8 \text{ cm s}^{-1}$ es la velocidad de Bohr y Z_1 es el número atómico del ión incidente. Esta teoría es válida hasta que la velocidad se aproxima a $v_0 Z_1^{2/3}$ a menores velocidades se reduce paulatinamente la carga efectiva neutralizándose el ión y el poder frenador electrónico comienza a ser proporcional a la velocidad del ión incidente (LSS). Ambas teorías describen adecuadamente la conducta general del poder frenador teniendo en cuenta la dependencia con la energía y su magnitud.

La región de transición, alrededor del máximo del poder frenador solo se describe empíricamente.

A muy bajas energías del ión, algunos keV, justo antes del final del camino del ión prevalece el poder frenador nuclear.

Como los fenómenos de colisiones nucleares y electrónicas se pueden considerar independientes entre sí, el poder frenador puede expresarse como la suma de los dos términos. Uno proveniente de las colisiones electrónicas y el otro de las nucleares:

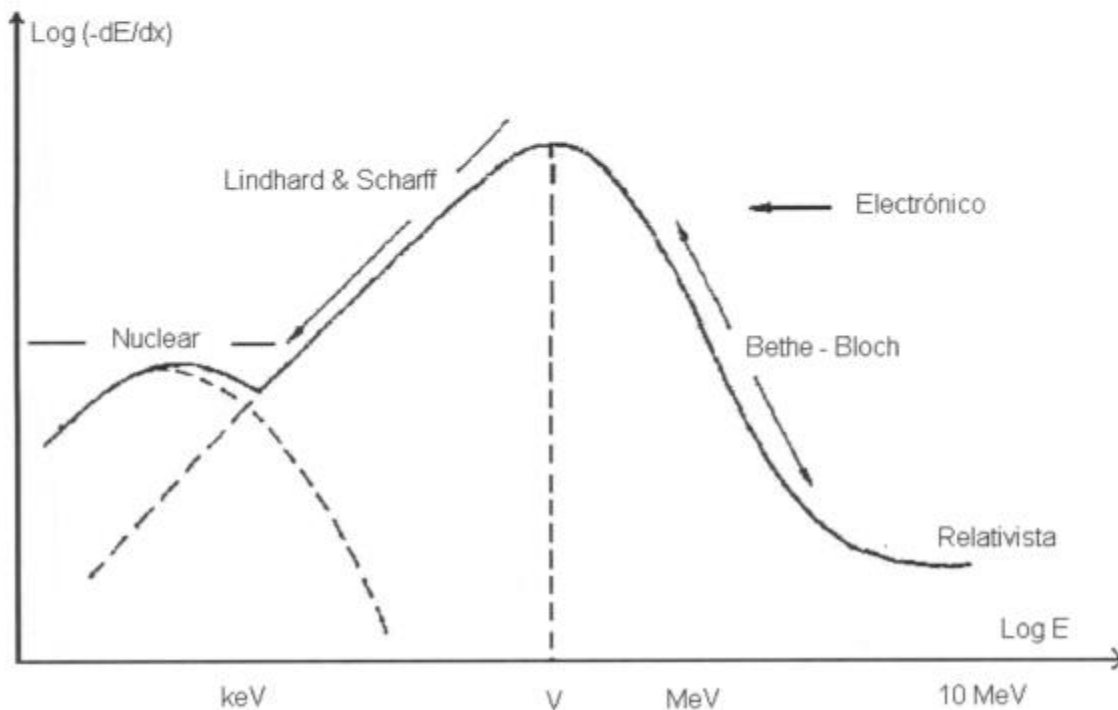


Figura 2.2: Gráfico doble logarítmico del poder frenador en función de la energía donde se muestran las distintas zonas correspondientes a distintos mecanismos.

$$\frac{dE}{dx} = \left. \frac{dE}{dx} \right|_{\text{nuclear}} + \left. \frac{dE}{dx} \right|_{\text{electrónico}}$$

Poder frenador electrónico

Desde el punto de vista de la interacción con los electrones la pérdida de energía del ión en la materia se puede dividir en tres fases:

Energía transferida: Durante la primera fase la energía es transferida del ión a los electrones individuales del material. La energía perdida por el ión y el desvío producido pueden ser determinados a partir de las mediciones del ángulo y la energía antes y después de atravesar la muestra.

Cascadas de colisiones electrónicas: La segunda fase es la emisión de electrones (electrones delta) que transportan la energía perpendicularmente a la dirección del ión hasta una distancia de aproximadamente $1 \mu\text{m}$ [7].

Cascadas de colisiones atómicas: Al final del recorrido se forman cascadas de colisiones atómicas producto de la repulsión coulombiana de los átomos entre sí que se encuentran en el camino del proyectil. Este tipo de cascada tiene una dimensión mucho menor que la electrónica, y es de aproximadamente $0.01 \mu\text{m}$ [8].

Poder frenador nuclear

A medida que disminuye la energía del proyectil las nubes electrónicas que rodean los núcleos del blanco se hacen más difíciles de penetrar por el ión incidente. En un caso límite el proceso de impacto se puede representar por la colisión de dos esferas rígidas de masa comparable. Si se incrementa la energía, más de 0.1 MeV/amu , las nubes electrónicas de ambos átomos se interpenetran y se puede observar un fenómeno de tipo dispersión de Rutherford puro. Las colisiones nucleares permiten una transferencia directa de momento y energía del proyectil al átomo de la muestra.

Energía perdida por unidad de camino

Al penetrar el ión en la materia, interactúa con los electrones del sólido. Como la masa del ión es mucho más grande que la de los electrones, su dirección no se verá mayormente afectada pero sí sufrirá una pérdida de energía. Los electrones de la muestra emitidos (rayos delta) se desplazan perpendicularmente a la dirección del ión pudiendo recorrer varios micrones hasta perder totalmente su energía por ionización de otros átomos y calentamiento de la muestra [9]. Considerando una partícula de masa m_1 , número atómico z_1 y carga q_1 que se propaga en un medio absorbente con velocidad uniforme v_1 en forma rectilínea e interactúa en forma Coulombiana con un átomo del medio de masa m_2 , z_2 , inicialmente en reposo y asumiendo que la muestra tiene una superficie S , un espesor Δx y que contiene N partículas por elemento de volumen, la probabilidad de que ocurra una colisión está dada por:

$$P_A = N S \Delta x \sigma_A$$

donde $\sigma_A = 2\pi p \Delta p$ es la sección diferencial de corte, y p (parámetro de impacto) la distancia normal de la trayectoria del proyectil al centro del núcleo atómico.

Por otro lado la energía cinética transferida (T) como función del parámetro de impacto se puede expresar como:

$$T = 2 \frac{q_1^2 q_2^2}{m_2 v^2} \frac{1}{p^2 + (b/2)^2}$$

donde $b = \frac{q_1 q_2}{1/2 m_0 v^2}$ y $m_0 = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$

La energía transferida entre p y $p + dp$ se puede expresar como:

$$dT = T(p) \sigma_A = T(p) 2\pi p dp$$

Integrando sobre todas las partículas de la muestra contenidas en un blanco de espesor dx y un área unidad se obtiene la energía perdida por el proyectil en una distancia dx .

Considerando que la masa del ión es mucho mayor que la de las partículas del blanco, la energía perdida a causa de las colisiones electrónicas $(dE)_e$ sería:

$$(dE)_e = -N_e dx \int_0^{p_{max}} dT = -N_e dx \int_0^{p_{max}} T(p) 2\pi p dp$$

donde N_e es el número de electrones del blanco por unidad de volumen.

Para calcular la energía perdida a causa de colisiones electrónicas se divide la ecuación anterior por dx reemplazando T luego de un cambio de variable resulta:

$$\left(-\frac{dE}{dx}\right)_e = N_e dx \int_0^{p_{max}} T(p^2) 2\pi p dp = \pi N_e \int_0^{p_{max}} T(p^2) d(p^2)$$

sustituyendo en la ecuación de la energía cinética transferida, $[p^2 + (b=2)^2]$ por x y considerando que P_{max} es muy grande entonces obtenemos:

$$\left(-\frac{dE}{dx}\right)_e = \pi N z_2 \frac{2(z_1 e)^2 e^2}{m_e v^2} \int_{(b/2)^2}^{P_{max}^2} \frac{dx}{x}$$

$$\left(-\frac{dE}{dx}\right)_e = 4\pi \frac{(z_1)^2 e^4}{m_e v^2} N z_2 \ln\left(\frac{2P_{max}}{b}\right)$$

donde $b \approx \frac{2z_1 e^2}{m_e v^2}$. Finalmente se obtiene la expresión del poder frenador electrónico según la teoría de Bohr [10].

2.3 Irradiación de polímeros

En esta sección se definirán los parámetros más importantes referentes a la radiación. Como ser rango, dosis, fluencia, y tasa de radiación o rendimiento.

2.3.1 Terminología de la radiación

Rango de los iones

En su trayectoria dentro de un absorbente, la partícula cargada disminuye progresivamente su energía hasta llegar al reposo luego de atravesar cierto espesor. Se define como alcance, al espesor mínimo de absorbente que resulte suficiente para que la partícula pierda totalmente su energía en él. Este alcance está sujeto a una fluctuación estadística que hace que partículas con igual energía inicial tengan distinto alcance [11].

$$R = \int_0^{E_0} \left(\frac{dE}{dx}\right)^{-1} dE$$

Flujo y Fluencia

El flujo (Φ_p) es el número de partículas que inciden por unidad de superficie y por unidad de tiempo. Se expresa en $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La fluencia es la integración del flujo en el tiempo, es decir la cantidad de partículas incidentes por unidad de superficie. Sus unidades son cm^{-2} .

Dosis

Dosis es la cantidad de energía absorbida por unidad de masa, que en el sistema internacional se mide en Gray ($1\text{Gy} = 1\text{J/kg}$). La dosis depende evidentemente de la fluencia como también de la manera en que el proyectil deposita su energía a lo largo de la trayectoria, es decir de su poder frenador. La dosis y la fluencia se pueden relacionar mediante la siguiente ecuación:

$$D = 1.602 \times 10^{-13} \Phi_p t \left(\frac{dE}{dx} \right)_e$$

La velocidad de deposición se expresa como la dosis por unidad de tiempo (Grays/s).

Tasa de radiación química

La tasa de radiación química (G) se expresa como el número de procesos iniciados por efecto de la radiación a nivel molecular que ocurren por cada 100 eV de energía absorbidos por el medio. En el sistema internacional las unidades son en $\text{mol} \cdot \text{J}^{-1}$ y no es constante con la dosis. En un material polimérico, G representa el número de un cierto tipo de efectos que se producen en el polímero al irradiarse, (trans-vinileno, dieno, alquino, corte de cadenas o entrecruzamiento) cada 100 eV de energía depositada. Por ejemplo $G(\bullet)$ es el número de radicales libres que se producen por cada 100 eV. En el caso de entrecruzamiento se la llama $G(X)$ y para corte de cadena se indica como $G(S)$.

2.3.2 Irradiación iónica

La radiación se puede dividir en dos grandes grupos [12].

1. Radiación de baja densidad de ionización (bajo LET, energía lineal transferida) tal como rayos X, gama y electrones rápidos.
2. Radiación de alta densidad de ionización (alto LET) producida por iones pesados de alta energía.

Estos dos grupos se diferencian por la producción de distintos fenómenos físico químicos.

2.3.2.1 Radiación de baja densidad de ionización

Este tipo de radiación es la más utilizada en el campo de irradiación de polímeros. Las muestras irradiadas son de un gran espesor ya que el rango de las radiaciones utilizadas es de algunos centímetros para los rayos X y gama y de varios milímetros para electrones rápidos.

La deposición de energía se produce en forma homogénea sobre todo el volumen de la muestra, esto hace posible definir exactamente la dosis absorbida por la misma.

Las reacciones químicas que se producen con este tipo de radiación han sido muy bien estudiadas sobre todo en cuanto a cambios físicos y químicos ya que algunas de estas transformaciones se utilizan en aplicaciones industriales.

Cambios químicos producidos

Los cambios químicos por efecto de la radiación dependen fuertemente del peso molecular del polímero. Se observó que la energía depositada necesaria para producir ionización primaria y excitación (20 - 30 eV) es mucho mayor que las energías de unión de muchas de las sustancias orgánicas simples (3 - 5 eV). Existen ciertas reglas que no están del todo bien establecidas pero sirven de guía. Por ejemplo en hidrocarburos lineales las uniones C-H se rompen más frecuentemente que las uniones C-C a pesar de la baja energía de unión de ambas. Además los cambios físico químicos dependen también del lugar en la molécula donde ocurre la interacción.

Los cambios químicos más comunes en moléculas orgánicas irradiadas son:

- Evolución de gases, donde el hidrógeno es el más importante ya que es el más liviano.
- Creación de doble uniones.
- Corte de uniones C-C, formando compuestos de menor peso molecular
- Reacciones radical-radical formando moléculas de mayor tamaño.

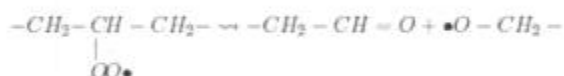
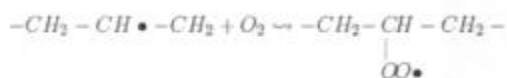
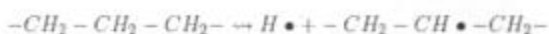
Estos mismos procesos se observan en los polímeros. La evolución de gases y la presencia de doble uniones ocurren en casi todos los polímeros. El corte de cadenas destruye el material ya que al cortar las macromoléculas reduce su peso molecular y por ende su resistencia mecánica.

Por otro lado, la combinación de radicales que unen una cadena con otra, genera el fenómeno de entrecruzamiento que aumenta el peso molecular del material. Este entrecruzamiento eleva el punto de fusión del polímero [13] y lo hace insoluble en los solventes que normalmente suelen atacarlo.

Hay polímeros en los cuales la irradiación produce más cortes de cadena que entrecruzamiento y otros en los que ocurre lo contrario. Los polímeros en los cuales el mecanismo predominante es el corte de cadenas, son denominados como de revelado "positivo". Las zonas irradiadas se disuelven más rápidamente que las zonas no afectadas por la radiación. Mientras que los polímeros donde predomina el entrecruzamiento se denominan de revelado "negativo".

En estos últimos las zonas irradiadas son menos solubles y son más resistentes al ataque químico del disolvente.

Al irradiar en una atmósfera inerte pueden ocurrir las siguientes reacciones:



donde el símbolo \bullet representa a un radical libre.

Los polímeros que tienden a realizar entrecruzamiento, si son irradiados en presencia de aire pueden producir cortes de cadena sin que se entrecrucen.

2.3.2.2 Radiación de alta densidad de ionización

Este tipo de radiación es de interés en diversas áreas de estudios específicos como ser la detección de partículas de alta energía (ya sea en el espacio o las producidas por un acelerador de partículas), la formación de agujeros micrométricos de tamaño controlado (membranas), microlitografía y otros.

El rango de esta radiación es muy pequeño. Los cambios químicos que ocurren en la trayectoria de la partícula por el material, tienen cierta dificultad para ser caracterizados a causa de la pequeña porción de material afectado. La energía depositada en cada trayectoria es característica del tipo de ión y su energía. El radio efectivo de la traza afectada no está claramente definido, por lo tanto no se puede hablar de una dosis absoluta depositada en términos de Grays sino de una dosis promedio. La dosis local real responsable de los cambios químicos es varios órdenes de magnitud más alta que la utilizada en las radiaciones convencionales.

Cambios químicos producidos

Como resultado de las colisiones atómicas y electrónicas cercanas al camino del ión se forma una nube de vacancias e intersticiales. En regiones más alejadas, la cascada formada por las colisiones electrónicas produce la excitación de átomos y moléculas produciendo reacciones químicas. La distribución local de energía se puede obtener aproximadamente realizando simulaciones computacionales [14]. Finalmente los defectos atómicos se reorganizan formando el núcleo de la traza, una zona altamente perturbada que según el ión utilizado puede tener un diámetro aproximado de $0.01 \mu\text{m}$. Esto involucra la difusión de muchas partículas generando una zona muy perturbada del sólido. Los defectos producidos por los electrones dan origen a sitios activos (radicales, etc.) hasta una distancia de aproximadamente $1 \mu\text{m}$ denominada penumbra o halo, cuyo tamaño depende fuertemente del ión.

Entre los modelos semiempíricos que describen la zona del Núcleo de la traza podemos citar:

Explosión coulombiana: Como resultado de la ionización primaria a lo largo de la trayectoria del ión se forma una nube de átomos despojados de la totalidad de sus electrones. Los electrones son emitidos a gran distancia. En los metales las nubes iónicas así formadas son neutralizadas inmediatamente después del paso del ión, sin embargo en los aisladores, los electrones no pueden neutralizar la nube debido a las trampas electrónicas. Esta nube iónica contiene una gran cantidad de energía electrostática almacenada que produce su expansión en forma explosiva y se transforma en la fuerza impulsora para generar la cascada de colisiones atómicas que disipa la energía contenida en la red.

Modelo de pico térmico El modelo del pico térmico (thermal spike) propuesto por Vineyard en 1976 [15] reemplaza el complicado proceso de la cascada de colisión atómica suponiendo un crecimiento abrupto de la temperatura, miles de grados, en un cilindro infinitesimal alrededor de la trayectoria del ión en el tiempo $t=0$ (figura 2.3). Después del paso del ión para un tiempo $t > 0$, la energía térmica induce la difusión fuera de la trayectoria del ión. El pico térmico crea defectos por activación térmica que permanecen como defectos congelados a lo largo de la trayectoria del ión debido a que la temperatura desciende bruscamente.

Iones pesados de alta energía

Los iones interactúan principalmente con los átomos por procesos de colisiones inelásticas, que producen una ionización de los átomos y la excitación e ionización de los electrones ligados.

Una de las características de la irradiación es la heterogeneidad de la distribución espacial en energía depositada. Esta energía se deposita en un pequeño volumen, con simetría de revolución a lo largo del camino del ión. Considerando, como en el caso anterior, ausencia de oxígeno se producen las siguientes reacciones:

Destrucción global del polímero por la densidad de energía depositada y la amorfización de regiones cristalinas que se produce directamente en la traza del ión. La concentración de saturación de estos grupos es mayor para los iones que para los electrones. La energía depositada por el ión tiene probabilidad de re-excitar una unión doble ya formada, esto podría llevar al entrecruzamiento, o a la formación de radicales libres.

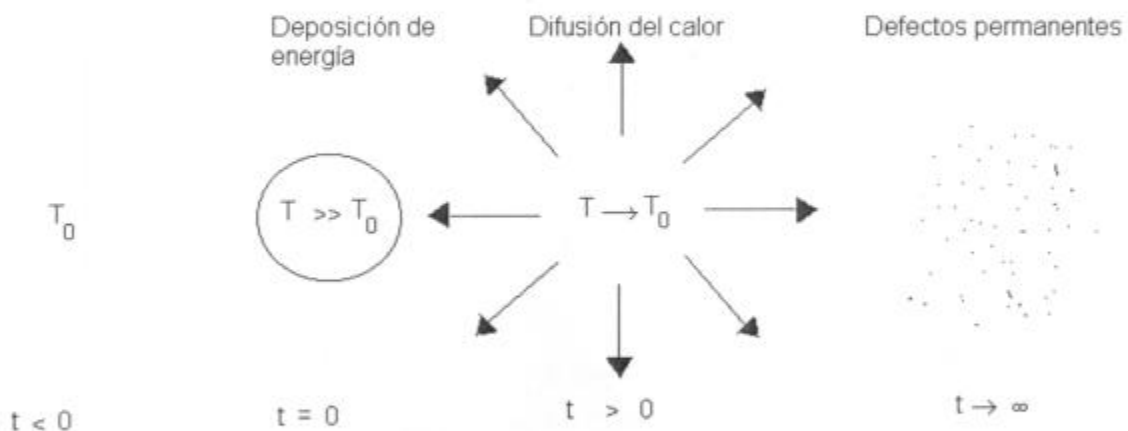


Figura 2.3: Pasos básicos del modelo de thermal spike

Referencias

- [1] A.Charlesby. Present and future developments in polymer radiation.Nucl.Inst.and Meth. B, 105 (1995) 217-24.
- [4] P. Armbruster and J.C. Jousset, Radiation Effects and Defects in Solids 110 (1989) 1.
- [5] S. P. Ahlen. Theoretical and experimental aspects of the energy loss of relativistic heavily ionizing particles.Rev.Mod. Phys., 52 (1980) 121-73.
- [6] J. Lindhard, M. Scharff and H.E. Schiott. Range concepts and heavy ion ranges. Mat. Fys. Medd. Dan., 33 (1963) 1.
- [7] J. Schou. Transport theory for kinetic emission of secondary electrons from solids. Phys. Rev. B, 22 (1980) 2141-74.
- [8] J.P. Biersack and L.G. Haggmark. A Monte Carlo computer program for the transport of energetic ions in amorphous targets. Nucl. Inst. Meth. B, 174 (1980) 257.
- [9] G. García Bermúdez and M. Alurralde. Análisis de superficie utilizando iones pesados. En: A.Somoza, A. López García Caracterización y estudio de materiales por técnicas nucleares. Tandil: Universidad Nacional del Centro de la Pcia. de Buenos Aires, (1998) 9-48.
- [10] N. Bohr, K. Dan. Vidnesk. Selsk.Mat. Fys. Medd. 18 (1948).
- [11] H.E. Bosch, Elementos de física nuclear. Buenos Aires: CAESE, (1970).
- [12] A. Chapiro. General consideration of the radiation chemistry of polymers. Nucl.Inst.and Meth. B, 105 (1995) 5-7.
- [13] S.P. Tripathya, R. Mishraa, K.K. Dwivedib, D.T. Khathinga, S. Ghoshb, D. Fink . Radiation Measurements 35 (2002) 95 – 98.
- [14] H.G. Paretzke. Radiation track structure theory. New York:John Wiley; (1986).
- [15] G.H. Vineyard. Thermal spikes and activated processes. Radiation Effects, 29 (1976) 245-248.

Capítulo 3

Fundamentos teóricos de las técnicas utilizadas

3.1 Irradiación. Descripción del acelerador de iones pesados

El acelerador TANDAR instalado en la Gerencia de Investigación y Aplicaciones de la Comisión Nacional de Energía Atómica, es del tipo Pelletron de 20 MV de voltaje máximo. La figura 3.1 muestra un croquis esquemático del mismo. Las principales partes que lo componen son:

Sistema de generación de iones El sistema de generación de iones o inyector es un conjunto de fuentes de iones, imanes selectores, lentes magnéticas, etc., instaladas dentro de una estructura cilíndrica, destinada a producir y conformar un haz de iones negativos, para ser luego inyectados en el acelerador de 20 MV.

Para obtener una gran variedad de iones, el sistema cuenta con tres fuentes de iones negativas modulares e intercambiables. Una de ellas es del tipo dúo-plasmatrón convencional para protones y deuterones, otra del tipo alphasat para acelerar helio y la tercera de tipo "sputtering" para el resto de los elementos. Con esta configuración se pueden generar e inyectar todos los elementos de la tabla periódica excluyendo los gases nobles, a excepción del helio que, como se ha mencionado, cuenta con una fuente de iones especial.

Acelerador El principio de funcionamiento, que permite la aceleración de iones a grandes energías, se basa en el uso de un intenso campo eléctrico. La columna del acelerador está constituida por 40 módulos de aluminio, en los que se encuentran los denominados tubos de aceleración (pequeñas secciones de aislador con electrodos de titanio dispuestos periódicamente con el objeto de producir un gradiente de voltaje al haz de iones que viaja en su interior con vacíos del orden de 10^{-8} Torr), separados entre sí por postes aislantes de 60 cm de alto y ubicados a ambos lados de la Terminal de alto voltaje que se encuentra en el centro de la columna. El diámetro de la columna es de 2,15 m y su altura de 34,84 m, incluyendo la Terminal de alto voltaje. Cada módulo de aceleración recibe una tensión máxima de 1 MV, resultando un voltaje total de 20 MV. Hay cuatro secciones muertas (de no aceleración) en las cuales se ubican equipos de control, focalización y vacío. La estabilización de alto voltaje se realiza utilizando un triodo corona controlado por un par de ranuras ubicadas a la salida del imán analizador. A los efectos de lograr un alto voltaje en la terminal del acelerador, es necesario emplazar a este en una atmósfera dieléctrica, ya que en caso contrario, se producirán descargas eléctricas que impedirían alcanzar voltajes superiores al millón de voltios. Por ello el acelerador está contenido en un tanque de presión de forma cilíndrica, de 7,6 m de diámetro y 36,3 m de altura, el cual es llenado con una mezcla de hexafluoruro de azufre (SF_6 con nitrógeno, a una presión de hasta aproximadamente 10 atm. Cuatro cadenas del tipo pelletron de aluminio y nylon son utilizadas para transportar 400 A de carga a la Terminal de alta tensión, cuya dimensión es de 2,44 m de diámetro y 4,88 m de alto. Estas cadenas asociadas de a pares por dos motores de 15 HP, se encuentran en la zona de baja energía (primera mitad de la columna). El sistema que permite

transmitir potencia a los elementos que se encuentran en la columna de aceleración incluyendo las secciones muertas y la Terminal de alta tensión) está compuesto de dos ejes rotativos de lucite accionados por sendos motores de 25 HP situados en los extremos (potencial cero) de la columna. Estos ejes mueven seis generadores de 400 ciclos y 5 kVA ubicados en las secciones muertas y el Terminal. Además, cada módulo de aceleración posee un pequeño generador propio para el calentamiento de los tubos. Los tubos de aceleración operan a una presión interna medida en el rango de 10^{-8} Torr, debiendo soportar una presión externa de hasta 10 atm debido al gas aislador. El Terminal de alto voltaje alberga, además de los elementos de vacío, monitoraje y focalización, tres intercambiadores de carga en la Terminal (dos sólidos con capacidad para 200 folias cada uno y otro gaseoso con Nitrógeno como gas de intercambio) que actúa sobre los iones negativos incidentes removiendo los electrones periféricos, transformándolos así, a los iones, de simplemente negativos en varias veces positivos, con la consecuente ganancia de energía en la segunda etapa. Inmediatamente después de este proceso, una lente focalizadora, tipo triplete excéntrica, selecciona los estados de carga emergentes focalizando solamente el deseado. Un nuevo intercambiador de carga (sólido con capacidad para 200 folias) se encuentra en la tercer sección muerta con el propósito de aumentar aún mas la energía de los iones emergentes.

Imán analizador El imán analizador doblemente focalizante con una relación masa-energía $ME/Z^2 = 500$, posee un radio de curvatura de 2 m, una distancia focal objeto-imagen de 6,1 m y la intensidad máxima del campo magnético es de 16 kGauss entre polos. El imán está montado sobre una base giratoria de tal manera de poder dirigirlo y alinearlo con cada una de las diferentes líneas experimentales. Además de la salida a 90° existen salidas a 0° y a 15° , esta última diseñada para poder analizar y desviar haces moleculares pesados que no puedan ser desviados a 90° .

Línea de medición Cada línea de medición consta de un cuadrupolo para focalizar el haz. Dos pares de imanes desviadores (steerer) permiten desplazar el haz sobre el blanco. El sistema de vacío, que permite obtener un vacío del orden de 10^{-7} Torr, está compuesto de un sistema de bombeo junto con dos válvulas: una enfrentada al imán analizador y otra a la cámara del usuario. El sistema de bombeo varía en las diferentes líneas instaladas, constando generalmente de una bomba iónica y una sublimadora de titanio en el tubo de transporte del haz hasta la cámara, y bombas varias (criogénica, turbo, etc.) en la zona accesible al experimentador.

Sistema de control La consola de control está compuesta por siete bastidores de tamaño estándar. La distribución de equipos en ella es tal que recorriéndola de izquierda a derecha equivale recorrer el acelerador desde el inyector (Nivel 56 m) hasta las líneas experimentales (Nivel 0 m). El sistema de control está comandado por una computadora con sus periféricos habituales.

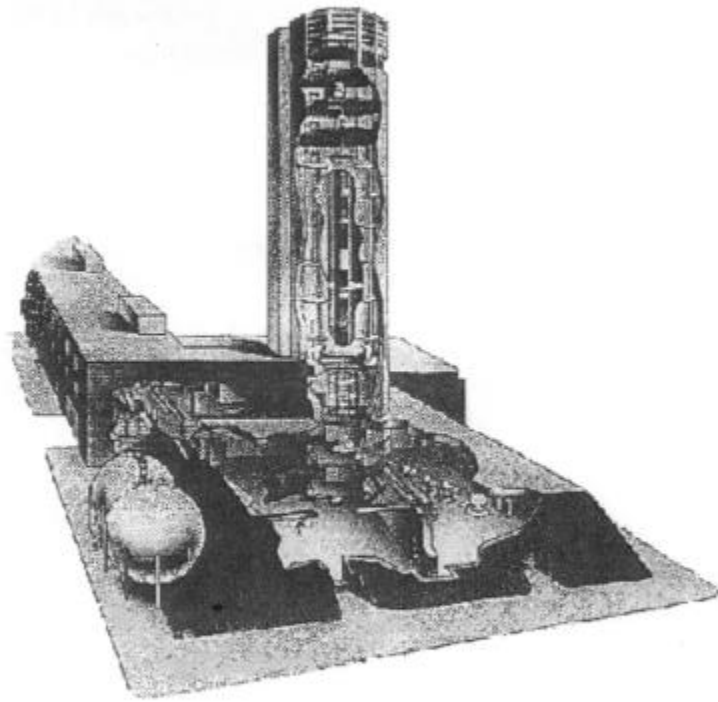


Figura 3.1: Vista del acelerador TANDAR, en dónde se observa el tubo acelerador, el terminal de alta tensión y dos salas experimentales.

3.2 Microscopía electrónica de barrido

El microscopio electrónico de barrido (SEM) permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica de la muestra analizada.

Las principales características de esta técnica son la alta resolución ($\sim 100 \text{ \AA}$), la gran profundidad de campo que le da apariencia tridimensional a las imágenes y la sencilla preparación de las muestras.

En el microscopio electrónico de barrido, el haz electrónico incide sobre la muestra. Un generador de barrido es el responsable de producir el movimiento de dicho haz, de manera que barra la muestra punto a punto. De la interacción entre los electrones incidentes con los átomos que componen la muestra se generan señales, las cuales pueden ser captadas con detectores adecuados para cada una de ellas.

El detector capta una señal y las convierte en una señal electrónica que es proyectada en un tubo de rayos catódicos (CRT). El barrido del haz está sincronizado con el barrido del CRT y produce una relación uno a uno entre puntos de la muestra y puntos en el CRT.

Uno de los detectores más comunes es el detector de electrones secundarios SEI (Secondary Electron Image). Los mismos son emitidos desde la muestra como consecuencia de las ionizaciones surgidas de las interacciones inelásticas. Por esta razón, poseen baja energía (50 eV). Ellos brindan una imagen de la morfología superficial de la muestra.

Además del SEI puede utilizarse un detector de electrones retrodispersados que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie BEI (Backscattered Electron Image), y un detector de energía dispersiva EDS (Energy Dispersive Spectrometer) que permite coleccionar los Rayos X generados por la muestra y

realizar diversos análisis e imágenes de distribución de elementos en superficies pulidas. Sus análisis proporcionan datos como textura, tamaño y forma de la muestra.

3.3 Ángulo de contacto

El ángulo de contacto es una propiedad superficial de los sólidos que cuantifica su tendencia a la hidrofobicidad como parámetro importante para analizar los mecanismos de interacción entre las fases sólida y líquida.

El ángulo de contacto θ es el ángulo que forma la tangente de la superficie del líquido (gota yacente) respecto a la superficie de contacto con el sólido (figura 3.2). Está determinado por la resultante de las fuerzas adhesivas y cohesivas.

Como la tendencia de una gota a expandirse en una superficie plana aumenta con la disminución del ángulo de contacto, este ángulo proporciona una medida de la inversa de la mojabilidad.

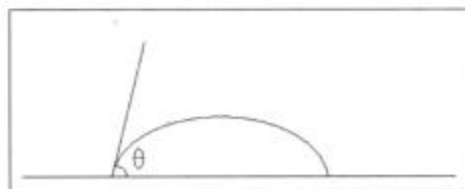


Figura 3.2. Representación esquemática del ángulo de contacto θ

Una manera de poderlo determinar es depositando una gota de líquido sobre la superficie de un sólido, esta gota se ilumina para poder mantener una imagen con sus bordes muy bien definidos y así poder calcular las coordenadas del perfil de la gota.

3.4 Técnicas espectroscópicas

3.4.1 Espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR)

La espectroscopía de infrarrojos (espectroscopia IR) es un tipo de espectroscopía de absorción que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético. Su principal aplicación técnica es la detección de grupos funcionales, y el análisis cualitativo y cuantitativo de compuestos orgánicos.

Esta técnica se basa en el hecho de que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas, que corresponden a los niveles de energía de la molécula. Estas frecuencias dependen de la forma de la superficie, de la energía potencial de la molécula, la geometría molecular, las masas atómicas y, posiblemente, el acoplamiento vibracional.

Si la molécula recibe luz con la misma energía de esa vibración, entonces la luz será absorbida si se dan ciertas condiciones. Para que una vibración aparezca en el espectro infrarrojo, la molécula debe someterse a un cambio en su momento dipolar durante la

vibración. Los enlaces pueden vibrar de seis maneras: estiramiento simétrico, estiramiento asimétrico, tijeras, rotación y giro.

Con el fin de hacer medidas en una muestra, se transmite un rayo monocromo de luz infrarroja a través de la muestra, y se registra la cantidad de energía absorbida. Repitiendo esta operación en un rango de frecuencias de interés (por lo general, 4000-400 cm^{-1}) se puede construir un gráfico. Al examinar el gráfico de una sustancia, un operador experimentado puede obtener información sobre la misma.

Esta técnica funciona casi exclusivamente en enlaces covalentes, y se usa mucho en química, en especial en química orgánica. Permite determinar la estructura básica de los compuestos por la ubicación espectral de las absorciones infrarrojas que presenta.

El espectro de absorción de la radiación infrarroja versus la frecuencia es una huella digital del compuesto que al compararse con un espectro de referencia permite su identificación.

Se pueden generar gráficos bien resueltos con muestras de una sola sustancia de gran pureza. Sin embargo, la técnica se utiliza habitualmente para la identificación de mezclas complejas.

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica de análisis para obtener el espectro infrarrojo con mayor rapidez. En lugar de registrar los datos variando la frecuencia de luz infrarroja monocromática, se guía la luz IR (con todas las longitudes de onda de pista utilizada) a través de un interferómetro. Después de pasar por la muestra, la señal medida da el interferograma. La realización de una transformada de Fourier de la señal produce un espectro idéntico al de la espectrometría infrarroja convencional (dispersiva).

La medida de un solo espectro es mucho más rápida en esta técnica, debido a que la información de todas las frecuencias se toman al mismo tiempo. Esto permite hacer múltiples lecturas de una sola muestra y obtener un promedio, lo que aumenta la sensibilidad del análisis.

3.4.1.1 Espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier con sistema de Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

La reflexión interna se produce cuando una radiación infrarroja entra en un cristal ATR transmisor y de alto índice de refracción. El cristal está diseñado para permitir una reflexión interna total que crea una onda evanescente sobre la superficie del cristal. Esta onda se extiende a la muestra que se mantiene en contacto íntimo con el cristal, registrándose el espectro de infrarrojo del analito. La profundidad de penetración de la onda evanescente dentro de la muestra es función del material del cristal y del ángulo de incidencia del haz. A menor índice de refracción y menor ángulo de incidencia, mayor penetración se consigue. La profundidad de penetración también se incrementa con la longitud de onda.

En el campo de los materiales poliméricos, la espectroscopía FTIR con sistema ATR permite el análisis no destructivo de muestras en forma sólida y líquida, así como su comportamiento térmico hasta 200 °C, con requerimientos mínimos de cantidad de muestra.

3.4.1.2 Microespectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier (Micro-FTIR)

Microespectroscopía infrarroja se refiere al análisis y caracterización de pequeñas cantidades de material o zonas del mismo mediante el acoplamiento de un microscopio óptico y un espectrómetro para análisis vibracionales.

En la Figura 3.3 se muestra un esquema del dispositivo experimental para la realización de la microscopía infrarroja. Aquí, el microscopio infrarrojo está focalizado en la parte de la muestra que deseamos analizar. El movimiento de la muestra en la zona de análisis, se realiza mediante el desplazamiento micrométrico controlado por un ordenador, a lo largo de la platina que soporta la muestra.

Existen celdas especiales que permiten estudiar los compuestos en función de la temperatura, presión, etc.

Una lente "Cassegrain" produce una imagen de alta calidad sin aberraciones cromáticas, y un diafragma variable situado en el plano imagen, permite seleccionar el área de análisis. La radiación es enviada finalmente al detector.

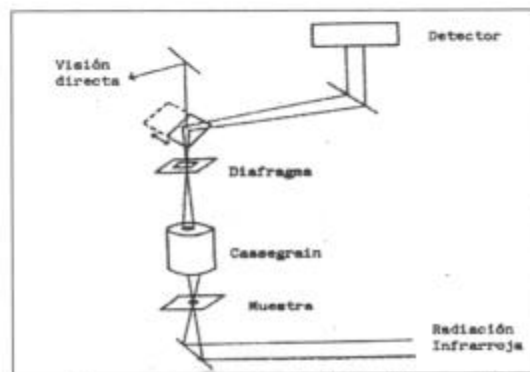


Figura 3.3. Esquema del espectrómetro Infrarrojo por Transformada de Fourier con sistema microscópico.

3.4.2 Espectroscopía UV-Visible

3.4.2.1 Conceptos generales

El principio de la espectroscopía ultravioleta-visible involucra la absorción de radiación ultravioleta-visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado. La longitud de onda comprende entre 160 y 780 nm.

La excitación corresponde a los electrones de enlace, por ello los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlaces. Por este motivo la espectroscopia UV-visible es válida para identificar grupos funcionales en una molécula.

La espectroscopía UV-Visible puede aplicarse tanto para análisis cualitativos como cuantitativos.

Las mediciones de absorción son útiles para descubrir la presencia de ciertos grupos funcionales que actúan como cromóforos.

Por la ley de Lambert – Beer podemos medir la concentración de la sustancia que absorbe al medir la cantidad de radiación absorbida, independiente de la radiación incidente:

$$A = \epsilon b c = -\log T = \log(I_0/I)$$

Donde:

ϵ = Coeficiente de extinción molar, es una constante relacionada con el área de incidencia del cromóforo y la probabilidad de que produzca la absorción.

b = recorrido en cm. de la radiación a través de la muestra.

c = concentración de la muestra en moles/litro.

T= Transmitancia

I_0 = Intensidad de radiación incidente en la muestra

I= Intensidad de radiación transmitida

3.4.2.2 Limitaciones

Con frecuencia se encuentran desviaciones de la proporcionalidad entre la medida de la absorbancia y la concentración cuando el camino óptico es constante. En algunas ocasiones estas desviaciones están relacionadas con el fundamento de la ley de Beer y representan limitaciones propias de la misma. Otras veces surgen como consecuencia de la forma en que se realizan cambios químicos asociados con cambios de concentración; estas son conocidas a veces como desviaciones instrumentales y desviaciones químicas, respectivamente.

La ley de Beer describe de forma correcta el comportamiento de absorción de un medio que contiene concentraciones de analito relativamente bajas; en este sentido es una ley límite. A concentraciones altas (generalmente $>0.01M$), la distancia media entre las moléculas responsables de la absorción disminuye hasta el punto en que cada molécula altera la distribución de carga de las moléculas vecinas. Esta interacción, a su vez, puede alterar la capacidad de las moléculas para absorber la radiación de una determinada longitud de onda. Como la magnitud de la interacción depende de la concentración, la aparición de este fenómeno da lugar a desviaciones de la linealidad entre la absorbancia y la concentración. Un efecto similar se encuentra, a veces, en medios que contienen concentraciones de absorbente bajas pero concentraciones altas de otras especies, especialmente electrólitos. La estrecha proximidad de los iones al absorbente altera la absorptividad molar de éste por interacciones electrostáticas; el efecto se reduce mediante dilución. Aunque, normalmente, el efecto de las interacciones moleculares no es significativo para concentraciones inferiores a $0.01M$, entre ciertos iones o moléculas orgánicas grandes aparecen algunas excepciones.

La espectroscopía ultravioleta-visible es la más limitada para la información de compuestos, ya que solo puede ser de utilidad para aquellos que tengan un cromóforo (cualquier grupo de átomos que absorben luz independientemente de que presente color o no) o insaturaciones visibles en la región comprendida entre los 100 y los 800 nm. (Energía comprendida entre las 286 y 36 Kcal/mol).

Debemos tener en cuenta que la obtención de un espectro UV supone en primer lugar disolver la sustancia en un disolvente adecuado, que también absorbería en el UV, por lo que en la práctica la espectroscopía UV se ve limitada a longitudes de onda superiores a 200–220 nm. Debido a ello, como podemos imaginar, no son muchos los

grupos funcionales que podremos determinar con la espectroscopia UV, siendo de destacar que todos ellos deben poseer al menos un enlace doble, como compuestos aromáticos carboxílicos.

Un espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible, de doble haz, contiene una fuente emisora de radiación ultravioleta que pasa a través de un monocromador que selecciona una longitud de onda determinada que, a continuación, es dividida en dos haces (figura 3.4). Una pasa a través de una disolución que contiene el compuesto orgánico (haz de la muestra) y la otra pasa a través de la celda de referencia que contiene únicamente el disolvente (haz de referencia). El detector mide de forma continua la relación de intensidad entre el haz de luz que atraviesa la celda de referencia y el haz de luz que atraviesa la celda que contiene el compuesto orgánico. Un registrador traza una gráfica (espectro) de la absorbancia de la muestra frente a la longitud de onda y, por tanto, de un espectro UV se extrae directamente el valor de la longitud de onda máxima (λ_{max}) y de la absorbancia.

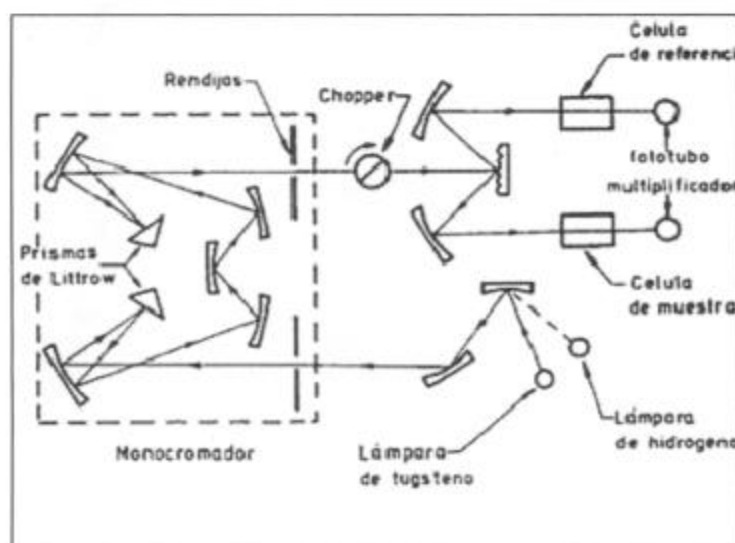


Figura 3.4: Trayectoria de la radiación en un espectrofotómetro de doble haz

3.4.3 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

Los rayos-X son muy útiles para caracterizar los sólidos y sus estructura, estos son absorbidos por la materia (interacción inelástica) produciendo como consecuencias transiciones electrónicas de los niveles internos de los átomos.

El material puede responder de diversas formas a la absorción de rayos-X lo que origina un conjunto de técnicas relacionadas pero que pueden dar información complementaria. Se pueden analizar las energías de los electrones emitidos que constituye la técnica XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy), también conocida por el acrónimo ESCA "electron spectroscopy for chemical analysis" que indica claramente el uso de esta herramienta para análisis químico. Como fuentes de excitación se usa las líneas $K\alpha_{1,2}$ de Mg o Al que tienen energías de 1253.6 y 1486 eV, respectivamente. Se utiliza un tubo de rayos-X y se mide la energía cinética de los fotoelectrones una vez

que salen de la superficie de la muestra, la cual dependerá de la estructura química de esta.

Hay varias técnicas para este análisis aunque el más común es el cambio de dirección de los electrones mediante analizadores electrostáticos o magnéticos. Los electrostáticos son los más utilizados para el análisis de energías cinéticas de electrones del orden de 1 keV que es lo común.

Las aplicaciones más importantes de la técnica XPS se basan en el hecho de que la interacción de los electrones con la materia es muy fuerte y las energías de los electrones emitidos son relativamente bajas (≤ 1.5 keV) por lo que son detenidos muy fácilmente. Solo electrones emitidos o que han interactuado en la superficie de la muestra pueden alcanzar el detector para ser analizados. Por esto, la técnica XPS es superficial (informa sobre tres o cuatro capas de átomos en la superficie de la muestra).

3.4.5 Cromatografía

3.4.5.1 Conceptos generales

La cromatografía puede emplearse para la separación de mezclas de especies químicas estrechamente relacionadas entre sí. Se puede emplear para identificación cualitativa y determinación cuantitativa de las especies separadas.

El parámetro que puede usarse con fines cualitativos en cromatografía es el tiempo de retención. Este es el tiempo transcurrido entre el instante en que se introduce la muestra y el instante en que se detecta la señal propia del componente en su máxima intensidad. Es característico de cada componente en cada sistema cromatográfico. Se trata, sin embargo, de una información pobre si se compara con otras técnicas de identificación (ej: espectroscópicas). Únicamente con el tiempo de retención resulta difícil asegurar la presencia de un componente en una mezcla, aunque sí se puede afirmar la ausencia. La identificación requiere siempre el uso de patrones en las mismas condiciones cromatográficas.

El análisis cuantitativo se basa en la comparación del área o altura de pico del componente de interés con la de estándares de esta sustancia de concentración conocida, admitiendo que existe una relación lineal entre el área o altura de pico y la concentración en un determinado intervalo de concentraciones. En los análisis basados en altura de pico se requiere que la anchura de los picos no sufra modificación durante el tiempo necesario para obtener los cromatogramas de la muestra y los estándares para obtener resultados exactos. Por ello suele usarse mucho más el análisis basado en área de pico, parámetro independiente de los efectos de ensanchamiento.

3.4.5.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Entre las técnicas cromatográficas cuya fase móvil es un líquido la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la más utilizada. Esta técnica deriva de una evolución de la cromatografía preparativa en columna, en la que la cromatografía se realizaba en columnas de vidrio con diámetros de 1 a 5 cm y longitudes de 50 a 500 cm. Para que el flujo de fase móvil fuese razonablemente rápido las partículas de fase estacionaria debían ser de gran diámetro (150-200 μm), lo que se traducía en una separación poco eficaz y, a pesar de todo, lenta. Para aumentar la eficacia de la separación y así incrementar la resolución era necesario emplear fases estacionarias con

tamaño de partícula mucho menor (entre 2 y 5 μm), y que la difusión de los solutos entre las fases móvil y estacionaria se hace más rápida. Pero ello implica la necesidad de impulsar la fase móvil con un sistema de alta presión, nace así la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Un cromatógrafo de líquidos consta de una serie de elementos indispensables (Figura 3.5), normalmente constituyendo módulos con funciones bien definidas. La circulación de fase móvil entre los distintos módulos se hace a través de conductos tubulares. Deben emplearse siempre diámetros de tubo muy pequeños a fin de reducir el efecto de ensanchamiento de banda extracolumnar.

Los elementos indispensables en cualquier cromatógrafo de HPLC son: sistema de suministro de fase móvil (con depósito de disolventes y bomba de alta presión), sistema de inyección y de detección continuo. Existen además otros elementos adicionales que pueden mejorar aspectos de la separación o la detección.

La cromatografía de partición se trata probablemente del tipo más usado de cromatografía líquida de alta eficacia. En ella la separación de los solutos se basa en la diferente solubilidad entre las fases móvil y estacionaria. En general la fase estacionaria debe tener polaridad semejante a la de los analitos y la fase móvil, una polaridad diferente, evitando que dicha diferencia sea tan grande que lleve a tiempos de retención excesivamente largos.

La aplicación típica de esta cromatografía es la separación y determinación de compuestos orgánicos, como por ejemplo **hidrocarburos**.

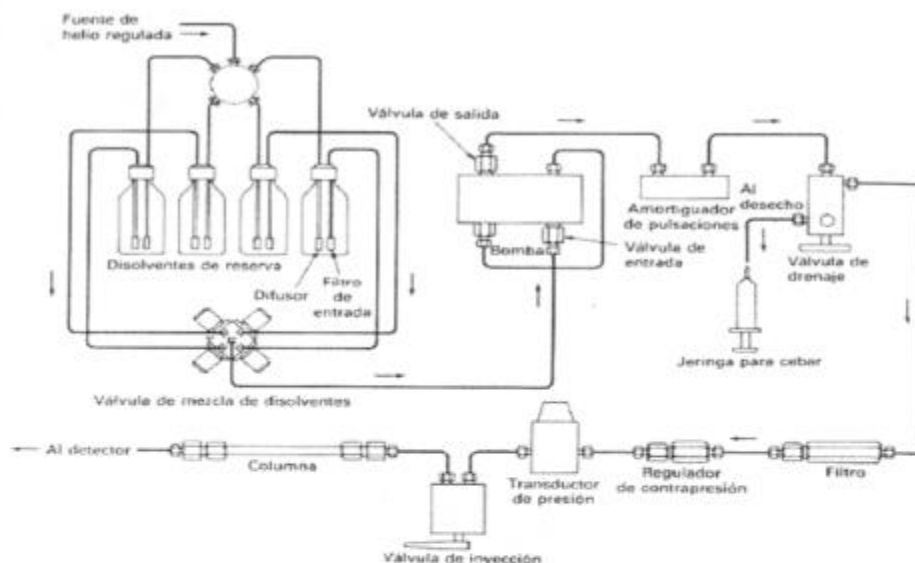


Figura 3.5: Esquema de un cromatógrafo HPLC.

3.4.6 Análisis térmico

3.4.6.1 Conceptos generales

La definición generalmente aceptada de análisis térmico abarca al grupo de técnicas en las que se mide una propiedad física de un sistema (sustancia o un material) en función de la temperatura mientras se lo somete a un programa de temperatura controlado.

Se pueden distinguir más de una docena de métodos térmicos que difieren en las propiedades medidas y en los programas de temperatura. Estos métodos encuentran una amplia aplicación tanto en el control de calidad como en investigación de productos farmacéuticos, arcillas y minerales, metales y aleaciones y **polímeros**.

Los efectos del calor sobre los materiales pueden ser varios y producir cambios en muchas de sus propiedades.

En el análisis térmico, los cambios de peso configuran la base de la termogravimetría (**TGA**, Thermogravimetric Analysis), mientras que la medida de los cambios de energía constituye la base del análisis térmico diferencial (**DTA**, Differential Thermal Analysis) y la calorimetría diferencial de barrido (**DSC**, Differential Scanning Calorimetry). Así, por ejemplo, la termogravimetría nos dice cuándo una muestra pierde o gana peso y cuánto, mientras que el DTA y el DSC nos dice si una reacción o cambio físico es endotérmico o exotérmico, y a menudo es capaz de medir la variación de calor.

3.4.6.2 Análisis termogravimétrico (TGA; Thermogravimetric Analysis)

En un análisis termogravimétrico se registra, de manera continua, la masa de una muestra colocada en una atmósfera controlada, o bien en función de la temperatura, o bien en función del tiempo. En el primer caso (experimento dinámico) la temperatura de la muestra va aumentando de manera controlada (normalmente de forma lineal con el tiempo), y en el segundo (experimento isoterma), la temperatura se mantiene constante durante todo el experimento. La representación de la masa o del porcentaje de masa en función del tiempo o de la temperatura se denomina termograma o curva de descomposición térmica. Existen otros tipos de análisis denominados de termogravimetría diferencial donde se registra o representa la variación de masa o derivada con respecto a la temperatura o respecto al tiempo dependiendo de que el experimento sea dinámico o isoterma respectivamente.

Los métodos termogravimétricos están limitados por las reacciones de descomposición y de oxidación y por procesos tales como la vaporización, la sublimación y la desorción.

Quizás, entre las aplicaciones más importantes de los métodos termogravimétricos se encuentre el estudio de **polímeros**. Los termogramas proporcionan información sobre los mecanismos de descomposición de diversas preparaciones poliméricas. Además, los modelos de descomposición son característicos de cada tipo de polímero y, en algunos casos, pueden ser utilizados con finalidades de identificación.

3.4.6.3 Análisis térmico diferencial (DTA; Differential Thermal Analysis)

Este método mide la diferencia de temperatura entre la muestra y un material inerte de referencia mientras son sometidos al mismo programa de temperaturas.

El material de referencia debe ser un material que no presente ninguna transformación en el intervalo de temperaturas que se vaya a estudiar.

Sobre el pocillo de referencia se coloca un termopar que nos indicará en todo momento la temperatura programada. Por otro lado, tanto sobre el pocillo de referencia como sobre el de la muestra, se coloca un termopar diferencial que permita medir en todo momento la diferencia de temperaturas existente entre la muestra y el material de referencia.

Las aplicaciones más comunes del análisis térmico diferencial son: determinación de cambios de fase (fusión, cristalización, sublimación), estudios de reacciones químicas, estudios de procesos de deserción.

Los equipos empleados para realizar dicho análisis suelen ser muy sensibles a la hora de obtener temperaturas a las cuales se producen las transformaciones, sin embargo, a no ser que estén convenientemente calibrados, no permiten obtener los valores de energía (entalpías) asociadas a dichas transformaciones. Los equipos que permiten obtener estas energías son los denominados calorímetros.

3.4.6.4 Calorimetría diferencial de barrido (DSC; Differential Scanning Calorimetry)

La calorimetría diferencial de barrido permite el estudio de aquellos procesos en los que se produce una variación entálpica como puede ser la determinación de calores específicos, puntos de ebullición y cristalización, pureza de compuestos cristalinos, entalpías de reacción y determinación de otras transiciones de primer y segundo orden. En general, el DSC puede trabajar en un intervalo de temperaturas que va desde la temperatura del nitrógeno líquido hasta unos 600 °C. Por esta razón esta técnica de análisis se emplea para caracterizar aquellos materiales que sufren transiciones térmicas en dicho intervalo de temperaturas. La familia de materiales que precisamente presenta todas sus transiciones térmicas en ese intervalo es la de los polímeros. Por esta razón, el DSC se emplea fundamentalmente para la caracterización de estos materiales.

En el campo de polímeros pueden determinarse transiciones térmicas como la temperatura de transición vítrea (T_g ; glass transition temperature), temperatura de fusión (T_m ; melting temperature), se pueden hacer estudios de compatibilidad de polímeros, reacciones de polimerización y procesos de curado. Cualquier reacción polimérica acompañada por un cambio entálpico puede ser seguida por DSC.

La finalidad de la calorimetría diferencial de barrido es registrar la diferencia en el cambio de entalpía que tiene lugar entre la muestra y un material inerte de referencia en función de la temperatura o del tiempo, cuando ambos están sometidos a un programa controlado de temperaturas. La muestra y la referencia se alojan en dos pocillos idénticos que se calientan mediante resistencias independientes. Esto hace posible emplear el principio de "balance nulo" de temperatura. Cuando en la muestra se produce una transición térmica (un cambio físico o químico que da lugar a una liberación o absorción de calor), se adiciona energía térmica bien sea a la muestra o a la referencia, con objeto de mantener ambas a la misma temperatura. Debido a que la energía térmica es exactamente equivalente en magnitud a la energía absorbida o liberada en la transición, el balance de energía proporciona una medición calorimétrica directa de la energía de la transición.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC; Differential Scanning Calorimetry) mide la energía que es necesaria suministrar a la muestra para mantenerla a idéntica temperatura que la referencia.

3.4.7 Viscosimetría

La viscosidad es una de las propiedades más importantes de las soluciones poliméricas. La viscosidad depende de la estructura química del polímero, de las interacciones con el disolvente y del peso molecular.

La viscosimetría de soluciones diluidas está relacionada con la medida de la habilidad intrínseca de un polímero para incrementar la viscosidad de un disolvente a una temperatura determinada y es útil para obtener información relacionada con el tamaño y la forma de las moléculas de polímero en solución y las interacciones polímero-disolvente.

En el régimen diluido la viscosidad de una solución polimérica (para concentraciones de polímero muy bajas) es determinada relativa a la viscosidad del disolvente. Los siguientes términos son definidos en estos casos:

Viscosidad relativa

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0}$$

donde η es la viscosidad de la solución de polímero y η_0 es la viscosidad del disolvente puro.

Viscosidad específica

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1 = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}$$

Viscosidad reducida

$$\eta_{rel} = \frac{\eta_p}{c}$$

donde c es la concentración del polímero. Esta es una medida de la habilidad de un polímero para aumentar la viscosidad de un disolvente.

Viscosidad inherente

$$\eta_{inh} = \frac{\ln \eta_r}{c}$$

Aun en soluciones muy diluidas las moléculas de polímero son capaces de presentar interacciones intermoleculares. Las dos contribuciones a la viscosidad reducida son el movimiento de las moléculas aisladas en el disolvente y la interacción entre las moléculas del polímero y la solución.

Para eliminar las interacciones es necesario extrapolar a concentración cero para obtener las viscosidades inherente y reducida comúnmente conocidas como viscosidad intrínseca.

$$[\eta] = (\eta_{red})_{c \rightarrow 0} = (\eta_{inh})_{c \rightarrow 0}$$

La viscosidad intrínseca tiene las unidades de masa/volumen y depende del tamaño de una molécula en solución. Es una medida de la habilidad de una molécula de polímero para aumentar la viscosidad de un disolvente en ausencia de interacciones intermoleculares y está relacionada con el peso molecular promedio denominado viscosimétrico que, para un buen solvente, es próximo al promedio en peso.

Para cuantificar la relación viscosidad/peso molecular se requiere un calibrado con muestras de peso molecular conocido, normalmente el promedio en peso determinado por dispersión de luz. En ausencia de patrones se utiliza la correlación existente para un polímero de naturaleza similar en el mismo solvente y temperatura. De este modo se ignoran interacciones específicas del polímero en estudio y el valor que se obtiene es solo orientativo pero adecuado a efectos comparativos.

El principio de medición de los **viscosímetros capilares** esta basado en la ecuación de Hagen-Poiseuille :

$$v = \frac{\pi R^2 \cdot g \cdot h_m}{8 \cdot V \cdot L} \cdot t$$

Mediante la misma se puede relacionar el tiempo que tarda en pasar un volumen de fluido (V) por un capilar de longitud L y radio R con la viscosidad del mismo, por lo tanto, la viscosidad de una solución (v) puede definirse como el tiempo (t) que tarda la disolución en pasar por un capilar fino por efecto de la gravedad (g).

La altura promedio de la columna del líquido en el viscosímetro durante la medición se denota como h_m . Ver figura 3.6.

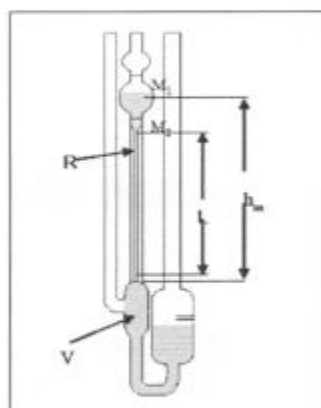


Figura 3.6. Viscosímetro capilar tipo Ubbelohde

Como hemos mencionado, la viscosidad intrínseca $[\eta]$ es la extrapolación a concentración cero de la viscosidad reducida (η_{red}) según la expresión:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{t}{t_0} - 1 \right) / c$$

Donde t y t_0 son los tiempos de caída de la disolución y el disolvente, c es la concentración de la disolución en g dl^{-1} . Los tiempos son proporcionales a la viscosidad si son suficientemente grandes para lo cual debe elegirse adecuadamente el diámetro del capilar.

Una vez calculada la viscosidad intrínseca, se puede determinar el peso molecular viscosimétrico (M_v) de un polímero a partir de la ecuación de Mark-Houwink:

$$[\eta] = K.M_v^a$$

Donde K (dl g^{-1}) y a son constantes tabuladas que dependen de la naturaleza del polímero, del disolvente y de la temperatura.

Experimentalmente la medición de la viscosidad intrínseca se realiza midiendo el tiempo de flujo (t) requerido para que un volumen determinado de disolución polimérica atraviese el tubo capilar por efecto de la gravedad y el tiempo que tarda en hacerlo un volumen equivalente de disolvente puro (t_0).

Capítulo 4

Materiales y métodos

4.1 Materiales

En este trabajo se utilizaron dos tipos de polímeros, poliláctico (PLA) y polihidroxibutirato (PHB), cada uno de ellos obtenido de una fuente diferente.

El Poliláctico (PLA) utilizado es un biopolímero comercial fabricado por Goodfellow. Se usó el isómero L (PLLA) bajo la presentación de films de 50 μm de espesor.

Las películas de polihidroxibutirato (PHB), en cambio, fueron preparadas para nuestro estudio por el Grupo de Materiales y Nanomateriales Poliméricos del Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), el espesor de las mismas fue de 100 μm . Para la preparación, el polímero fue disuelto en cloroformo a 60°C usando un extractor Soxhlet y la solución resultante fue distribuida en placas de teflón de donde se obtuvieron las películas por evaporación del solvente.

Ambas muestras fueron cortadas en forma rectangular con una dimensión de (3x1.5) cm. Las muestras se conservaron en contenedores limpios y secos a temperatura ambiente y se manipularon con guantes y pinzas entre los ensayos para evitar su contaminación.

4.2 Métodos

4.2.1 Irradiación

Las muestras se irradiaron con C y S, a diferentes fluencias y energías, utilizando el acelerador de iones pesados tipo Tandem de 20 MV (TANDAR, CAC-CNEA).

La irradiación se realizó con un dispositivo especial diseñado para obtener una superficie uniforme y homogéneamente afectada por los iones. (Figura 4.1)

El tiempo de irradiación fue optimizado para evitar el calentamiento de la muestra y así evitar provocar cambios en su estructura. La fluencia fue medida "in situ" con una copa de faraday.



Figura 4.1 Dispositivo diseñado para irradiar las muestras homogénea y uniformemente

En la tabla 4.1 se describen las condiciones de irradiación para cada polímero y se da una estimación del alcance del recorrido del ión dentro del material (rango) calculado con un programa Monte Carlo de uso libre, SRIM (The Stopping and Range of Ions in Matter) [1].

Se irradiaron ocho muestras en cada condición.

Tabla 4.1: Iones, energías y fluencias usados en las diferentes condiciones de irradiación para cada polímero.

Ión	Energía [MeV]	Fluencia [10^{10} ión cm^{-2}]	Rango* [μm]
C ³⁺	18	7, 30, 70	21
C ⁵⁺	45	1, 10, 50	73
S ⁵⁺	27	1, 6, 10	12
S ⁹⁺	75	1, 5, 10	28

* El rango para cada condición fue calculado con el código SRIM

4.2.2 Determinación del ángulo de contacto de las superficies irradiadas

Esta medición se llevó a cabo con el fin de estudiar las modificaciones en el carácter hidrofílico de la superficie de los polímeros irradiados.

Se tomó una muestra de cada condición de irradiación y se midió el ángulo de contacto de su superficie antes y después de ser expuestas al haz de iones.

Se colocó sobre la superficie limpia y seca de las muestras, con una micropipeta, una gota de 5 μl de agua desionizada y se determinó, empleando un medidor de perfiles Prazis Po400hd, la tangente entre el sustrato polimérico y la superficie de contacto con la gota.

Todas las medidas se obtuvieron a una temperatura de 20°C.

Se realizaron veinte mediciones para cada muestra, obteniendo luego como resultado el promedio de las mismas con una desviación estándar de $\pm 1^\circ$.

4.2.3 Estudio de las superficies irradiadas por microscopía electrónica de barrido

Las imágenes para el estudio de la superficie del material fueron tomadas con un microscopio electrónico de barrido (SEM) Philips modelo ESEM QUANTA 200, que permite la captura de imágenes digitales y fotografías con aumentos de 12X a 80000X. Todas las muestras fueron metalizadas para su posterior análisis.

Con el fin de caracterizar el efecto producido por la **irradiación** sobre la topografía de los polímeros, se analizó cada una de las muestras irradiadas antes y después de ser expuestas al haz de iones.

Mediante esta técnica se estudió la topografía de la superficie de los polímeros irradiados con aumentos de 2000X, 4000X y 8000X.

4.2.4 Ensayos de degradación *in vitro*

Debido a la complejidad de los fluidos corporales, los resultados de los estudios de degradación *in vitro* deben intentar reproducir con la mayor fidelidad posible las condiciones presentes *in vivo*. De esta manera representarán el comportamiento del implante en el organismo huésped.

En este trabajo se intentaron reproducir dos mecanismos de degradación que podrían coexistir *in vivo*:

- **Hidrólisis no enzimática *in vitro***
- **Hidrólisis enzimática *in vitro***

4.2.4.1 Hidrólisis no enzimática *in vitro*

Las muestras irradiadas y muestras control (sin irradiar) fueron inmersas en tubos cónicos de polipropileno conteniendo 10 ml de buffer fosfato salino (PBS) 0.1 M, pH 7.0. Con el fin de evitar la contaminación bacteriana se agregó, semanalmente, antibiótico al medio (estreptomycin 70µg/ml, penicilina 70UI/ml). Se mantuvieron en baño térmico a 37°C con agitación constante y fueron periódicamente removidas, lavadas con agua destilada y secadas en estufa (PLLA: 38°C, PHB: 50°C) hasta peso constante antes de ser sometidas a cada análisis.

4.2.4.2 Hidrólisis enzimática *in vitro*

Las muestras irradiadas y muestras control fueron sumergidas en tubos cónicos de polipropileno conteniendo 10 ml de PBS 0.1 M, pH 7.0. Para evitar la contaminación bacteriana se agregó antibiótico al medio (estreptomycin 70µg/ml, penicilina 70UI/ml) el cual fue renovado semanalmente.

Una vez sumergidas las piezas de polímero, se agregó a cada tubo la enzima (Lipasa pancreática porcina, L0382-100KU, Sigma-Aldrich) en una concentración 0.1g/L.

Se mantuvieron en baño térmico a 37°C con agitación constante y fueron periódicamente removidas, lavadas con agua destilada y secadas en estufa (PLLA: 38°C, PHB: 50°C) hasta peso constante antes de ser sometidas a cada análisis.

Con el fin de evitar cambios en la concentración de lipasa (debido a la posible evaporación de agua) y pérdida de la actividad enzimática durante la incubación, la solución de enzima fué renovada cada cinco días.

4.2.5 Determinación de la pérdida de peso de los polímeros durante la degradación

Las muestras fueron lavadas con agua destilada y secadas en estufa hasta peso constante, luego de lo cual se registró el peso de los polímeros con una balanza analítica digital Mettler AE 163, sensibilidad 0.01mg/30g. El error de las mediciones es de 10⁻⁵g. Una vez obtenido el peso de cada muestra, se sometió a las mismas al ensayo **de hidrólisis no enzimática in vitro** según se explica en la sección 4.2.4.1 durante un período de incubación de 40 días. Por último, se pesaron nuevamente las muestras y se calculó el porcentaje de pérdida de peso (%PP) según la ecuación:

$$\%PP = [(P_1 - P_2)/P_1] \times 100$$

Donde:

P₁ peso de la muestra antes del ensayo de degradación

P₂ peso de la muestra luego de la degradación

De la misma manera se llevó a cabo el ensayo de pérdida de peso sometiendo a las muestras a una **hidrólisis enzimática in vitro** según se describe en la sección 4.2.4.2

Estos dos ensayos de pérdida de peso se realizaron por triplicado para cada una de las condiciones de irradiación y para los polímeros control (sin irradiar).

En paralelo a estos dos ensayos se realizó un control de cada una de las muestras, donde se las lavó con agua destilada, se las secó en estufa hasta peso constante, y luego de registrar el peso a tiempo cero, se las mantuvo fuera del baño de incubación en un tubo cónico de polipropileno limpio y seco a temperatura ambiente. Al cabo de 40 días, se las analizó de la misma manera que a las muestras degradadas.

4.2.6 Determinación del ángulo de contacto de las superficies degradadas

Esta medición se llevó a cabo con el fin de estudiar las modificaciones en el carácter hidrofílico de la superficie de los polímeros degradados.

Las mediciones se realizaron sobre las superficies antes y después de la incubación en el medio de degradación.

Se colocó sobre la superficie limpia y seca de las muestras, con una micropipeta, una gota de 5 µl de agua desionizada y se determinó, empleando un medidor de perfiles

Prazis Po400hd, el ángulo formado por la tangente de la superficie del líquido respecto a la superficie de contacto con el sustrato polimérico (ángulo de contacto).

Todas las medidas se obtuvieron a una temperatura de 20°C.

Se realizaron veinte mediciones para cada muestra, obteniendo luego como resultado el promedio de las mismas con una desviación estándar de $\pm 1^\circ$.

4.2.7 Determinación de productos de degradación solubles por espectroscopía UV-Visible

Los productos de degradación de los polímeros PLLA y PHB son sus monómeros constituyentes los cuales se solubilizan en medio acuoso. Debido a la presencia de un grupo carboxilo en su estructura, absorben en el espectro UV a 210 nm.

Con el fin de determinar los productos de degradación solubles, los polímeros fueron sometidos al ensayo de degradación enzimática *in vitro*. Durante el mismo, periódicamente, se determinó en forma cualitativa la absorbancia de la solución de incubación a 210 nm con un espectrofotómetro UV-Visible Perkin-Elmer Lambda 2.

La tabla 4.2 describe las muestras utilizadas. Cada una de ellas fué estudiada por triplicado.

Tabla 4.2 Muestras estudiadas por espectroscopía UV-Visible

Muestra	Polímero	Irradiación
1	PLLA	no
2	PLLA	si
3	PHB	no
4	PHB	si

4.2.8 Determinación de los productos de degradación por HPLC

Con el fin de determinar los productos de degradación de los polímeros estudiados mediante cromatografía, las películas de PHB y los películas de PLLA fueron sometidos al ensayo de degradación enzimática *in vitro*.

En la tabla 4.3 se describen las muestras utilizadas.

El buffer de incubación fue analizado periódicamente con una columna Spherisorb S10 ODS2 (C18), (250 x 4,6) mm, tamaño de partícula 10µm.

Se utilizó un detector UV para registrar la absorbancia a 210 nm.

Los monómeros ácido láctico y 3-hidroxibutirato se usaron como patrones para la puesta a punto de la técnica empleando ácido fosfórico 10mM como fase móvil con un flujo de 1 ml/min.

Tabla 4.3 Muestras estudiadas por HPLC

Muestra	Polímero	Irradiación
1	PLLA	no
2	PLLA	si (ión: S)
3	PLLA	si (ión: C)
4	PHB	no
5	PHB	si (ión: S)
6	PHB	si (ión: C)

4.2.9 Estudio de las superficies degradadas por microscopía electrónica de barrido

Las imágenes para el estudio de la superficie del material fueron tomadas con un microscopio electrónico de barrido (SEM) Philips modelo ESEM QUANTA 200, que permite la captura de imágenes digitales y fotografías con aumentos de 12X a 80000X. Todas las muestras fueron metalizadas para su posterior análisis.

Con el objeto de caracterizar el daño producido por la **degradación**, se obtuvieron imágenes de las muestras sometidas a los ensayos de hidrólisis (no enzimática y enzimática) antes y después de la incubación.

Se estudiaron en paralelo los cambios producidos en la topografía de los polímeros irradiados y no irradiados durante los procesos de degradación.

Se obtuvieron imágenes con aumentos de 2000X, 4000X y 8000X.

4.2.10 Espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR)

Como hemos visto en la sección 3.4.1.1, la técnica de FTIR con sistema de Reflectancia Total Atenuada (ATR), requiere que la superficie a analizar se mantenga en contacto íntimo con la placa de material óptico, para lo cual la muestra es presionada contra el cristal ATR con una prensa. De los polímeros estudiados en este trabajo (PHB y PLLA), solo el poliláctico puede ser sometido a este sistema. El polihidroxibutirato, en cambio, al ser un polímero muy frágil se daña con el prensado y no se logra el contacto íntimo requerido.

Para el PHB se utilizó entonces, la técnica de Microespectroscopía infrarroja (sección 3.4.1.2). Con ella se analizan pequeñas zonas de la muestra mediante el acoplamiento de un microscopio óptico y un espectrómetro para análisis vibracionales.

4.2.10.1 Estudio de la superficie del PLLA por Espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier con sistema de Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

Con el fin de determinar los cambios en los grupos funcionales y las modificaciones en el estado de orden (estado cristalino/amorfo) en las películas de **poliláctico** luego de la degradación se realizó el análisis **FTIR-ATR** en un espectrofotómetro Shimadzu IR Prestige-21 con una resolución de 4 cm^{-1} .

Para llevar a cabo este análisis los polímeros irradiados y no irradiados fueron sometidos a los ensayos de degradación enzimática y no enzimática *in vitro*, realizando luego los espectros de los mismos antes y después de la degradación.

Se obtuvieron tres espectros de cada muestra en el rango (800-3000) cm^{-1} .

4.2.10.2 Estudio de la superficie de PHB por Microespectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier (Micro-FTIR)

Para el estudio de los cambios en los grupos funcionales y las modificaciones en el estado de orden producidas por la irradiación y la degradación sobre las películas de **polihidroxibutirato** se realizó el análisis por **Micro-FTIR** en un microscopio infrarrojo automático Shimadzu AIM-8800.

Para realizar este análisis las películas de PHB irradiadas y no irradiadas fueron sometidas a los ensayos de degradación enzimática y no enzimática *in vitro*, realizando luego los espectros de estos polímeros sin irradiar e irradiados antes y después de la degradación.

Se obtuvieron tres espectros de cada muestra en el rango (800-2000) cm^{-1} .

4.2.11 Análisis químico de las superficies de los polímeros por Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

Los cambios químicos producidos en las superficies de los polímeros debido a la irradiación y a la degradación se analizaron por medio de la técnica XPS.

Se empleó una fuente de Rayos X: XR 50, SPECS GMBH usando la línea Mg K α (1253.6 eV) como fuente de excitación, con una potencia de 300W.

Se utilizó un Analizador de energías Hemiesférico con detector multicanal (5 canales), PHOIBOS 100 MCD5, SPECS GMBH.

La energía de paso fue de 40 eV para los espectros amplios y 10 eV para la región del C 1s.

La calibración de la escala de energía se hizo utilizando muestras de Au (Au 4f_{7/2} a 84.00 eV) y Cu (Cu_{2p_{3/2}} a 932.67 eV) ambas fueron limpiadas por bombardeo con iones Ar⁺.

Los espectros se analizaron utilizando el siguiente software:

CasaXPS v2.3.14 , XPS Peak 4.0 [2].

4.2.12 Análisis térmico de los polímeros

4.2.12.1 Análisis termogravimétrico (TGA) y análisis térmico diferencial (DTA)

Con el fin de estudiar el comportamiento térmico de los polímeros luego de la irradiación y de la degradación, estos se sometieron a un programa de temperatura controlado en un DTG-50 Shimadzu bajo atmósfera de Nitrógeno. La velocidad de calentamiento fué de 10°C/min en un rango de temperaturas de (25-500) °C.

Las muestras de PHB y PLLA estudiadas se describen en la tabla 4.4 y 4.5 respectivamente.

Tabla 4.4 Muestras de PHB estudiadas por TGA y DTA

Muestra	Polímero	Irradiación	Degradación
5	PHB	no	no
1	PHB	si	no
7	PHB	no	si
2	PHB	si	si

Tabla 4.5 Muestras de PLLA estudiadas por TGA y DTA

Muestra	Polímero	Irradiación	Degradación
6	PLLA	no	no
3	PLLA	si	no
8	PLLA	no	si
4	PLLA	si	si

4.2.12.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC; Differential Scanning Calorimetry)

El comportamiento térmico de los polímeros fué estudiado usando un Shimadzu DSC, modelo DSC-60.

Se procedió a sellar cada una de las muestras en un vial de aluminio antes de comenzar con el análisis.

Todos los barridos fueron hechos en atmósfera de nitrógeno.

Las muestras, a temperatura ambiente, fueron calentadas hasta alcanzar una temperatura de 200°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min (primer calentamiento) y mantenidas a esa temperatura por 5 min.

Luego se realizó un enfriamiento rápido desde 220 hasta -20°C a una velocidad de -60°C/min. y se mantuvo a las muestras durante 10 min a -20°C.

El segundo calentamiento se realizó desde -20°C hasta 200°C a una velocidad de 10°C/min manteniendo, durante 5 minutos a los polímeros a 200°C antes de que sean lentamente enfriados hasta -20°C (-10 °C/min).

Finalmente, luego de ser mantenidas durante 10 minutos a -20°C, las muestras fueron calentadas hasta 200°C a la misma velocidad que la segunda rampa de calentamiento.

En las tablas 4.6 y 4.7 se describen las muestras estudiadas.

Tabla 4.6 Muestras de PHB estudiadas por DSC

Muestra	Polímero	Irradiación	Degradación
5	PHB	no	no
1	PHB	si	no
7	PHB	no	si
2	PHB	si	si

Tabla 4.7 Muestras de PLLA estudiadas por DSC

Muestra	Polímero	Irradiación	Degradación
6	PLLA	no	no
4	PLLA	si	no
8	PLLA	no	si
3	PLLA	si	si

4.2.13 Determinación de pesos moleculares viscosimétricos

Sólo el polímero polihidroxibutirato fue estudiado por este método.

En primer lugar las películas de PHB fueron disueltas completamente en cloroformo. Luego, se prepararon diferentes diluciones de la solución del polímero y se midió la viscosidad de cada una de ellas con un viscosímetro tipo Ubbelohde de capilar curvo. Todas las medidas fueron hechas a temperatura ambiente.

Se representaron los datos obtenidos para cada dilución utilizando las ecuaciones de Huggins (a) y Kraemer (b) y, ajustando a una función lineal, se determinó la viscosidad intrínseca de la solución calculando el valor a concentración cero.

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta]_H + k_H [\eta]_H^2 c \quad (a)$$

$$\frac{\ln \eta_r}{c} = [\eta]_K - k_K [\eta]_K^2 c \quad (b)$$

Finalmente, con el valor de viscosidad intrínseca se determinó el peso molecular viscosimétrico usando la fórmula de Kuhn-Mark-Houwink de acuerdo a las referencias [3] y [4].

Referencias

[1] J.E.Ziegler, J.P.Biersack, U. Littmark, The Stopping and range of ions in Solids, Pergamon, New York, (1985).

[2] <http://www.uksaf.org/software.html>

[3] Zdeno Spitalský, Igor Lacíc, Elena Lathová, Ivika Janigová, Ivan Chodák, Polymer Degradation and Stability 91 (2006) 856-861.

[4] Kerry J. Townsend, Karsten Busse, Joerg Kressler, Carmen Scholz, Biotechnol. Prog. 21 (2005) 959-964.

Capítulo 5

Resultados

5.1 Caracterización de las superficies irradiadas

5.1.1 Determinación del ángulo de contacto

Al realizar las mediciones con el fin de estudiar las modificaciones en el carácter hidrofílico de la superficie de los polímeros irradiados, se encontró que tanto en el PLLA como en el PHB, el haz de iones produjo una disminución del ángulo de contacto.

Todas las superficies, luego de ser irradiadas, presentaron un ángulo menor al que presentaron antes del tratamiento, indicando un aumento de la hidrofiliidad como consecuencia de la irradiación. Sin embargo, debido a la poca sensibilidad del método, no fue posible establecer una relación entre las condiciones de irradiación y el grado de disminución del ángulo.

En la tabla 5.1 se muestran algunos de los polímeros medidos cuyos resultados representan los obtenidos para todas las muestras. Cada resultado, promedio de 20 mediciones, presenta una desviación estándar de $\pm 1^\circ$.

En el caso del PHB, cada una de las muestras antes de la irradiación presentaba un ángulo de contacto diferente, esto se debe a que las películas de dicho polímero no eran homogéneas entre ellas. Por ello se tuvo especial cuidado en medir el ángulo de contacto en la misma muestra antes y después de la irradiación para determinar la variación producida únicamente por el tratamiento.

Tabla 5.1 Ángulos de contacto medidos en la superficie del PLLA y el PHB antes (θ_a) y después (θ_d) de la irradiación.

Condiciones de irradiación		PLLA		PHB	
Ión	Energía [MeV]	θ_a [°]	θ_d [°]	θ_a [°]	θ_d [°]
C ³⁺	18	70	65	69	65
C ⁵⁺	45	70	65	73	70
S ⁵⁺	27	70	63	72	70
S ⁹⁺	75	70	63	69	67

En el caso del polímero PLLA la disminución del ángulo de contacto con la irradiación representa aproximadamente un 8% del ángulo inicial. En el PHB el cambio es de alrededor del 4%.

5.1.2 Estudio de las superficies por microscopía electrónica de barrido

Las micrografías obtenidas con el fin de caracterizar el efecto producido por el haz de iones sobre la topografía de los polímeros muestran que:

- Las películas de PHB, para todas las condiciones de irradiación, no presentan cambios en su topografía luego del tratamiento. En las imágenes de su superficie antes y después de ser sometido al haz de iones no se encuentran diferencias sustanciales (figura 5.1).
- Los films de PLLA presentan un importante aumento en la rugosidad luego de la irradiación (figura 5.2). Este efecto se observa en todas las condiciones de tratamiento y podría deberse a un aumento de la temperatura durante la irradiación que modifica la estructura de la muestra.

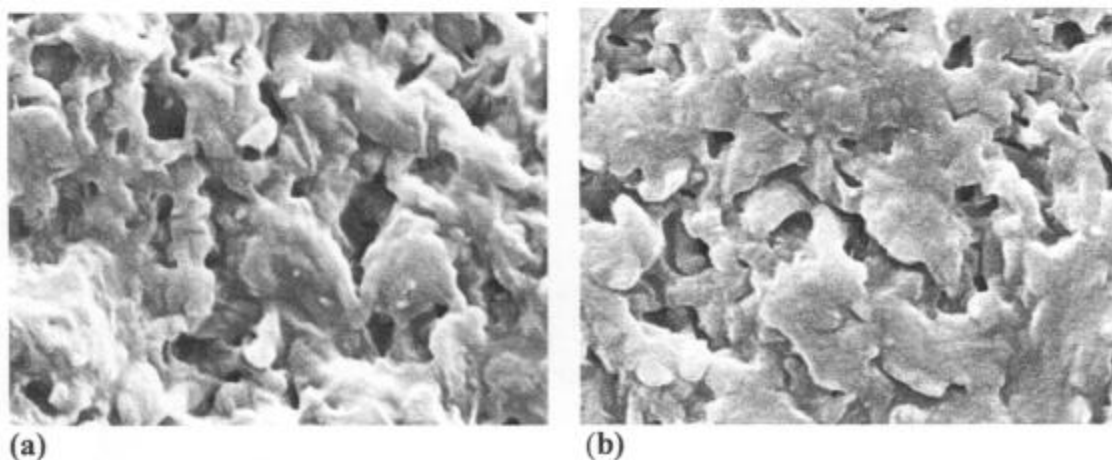


Figura 5.1 Micrografías con aumento de 8000X del polímero **PHB** antes (a) y después (b) de la irradiación (S^{9+} , 75 MeV, 1×10^{11} ión cm^{-2})

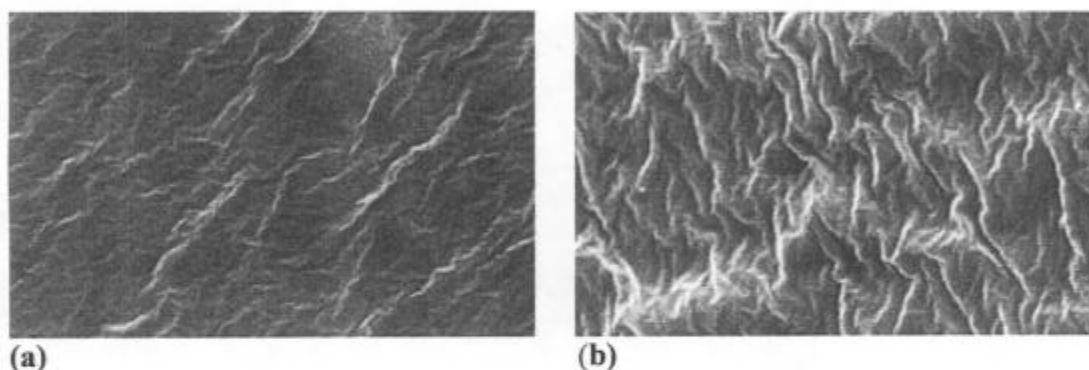


Figura 5.2 Micrografías con aumento de 8000X del polímero **PLLA** antes (a) y después (b) de la irradiación (S^{9+} , 75 MeV, 1×10^{11} ión cm^{-2})

5.2 Estudio de las modificaciones de los polímeros degradados

5.2.1 Determinación del porcentaje de pérdida de peso

Luego de 40 días de degradación las películas de PLLA sin irradiar e irradiadas presentaron valores de pérdida de peso menores al 0.1 %. Teniendo en cuenta que la estimación del error de las mediciones fue de 0.1% se determinó que la pérdida de peso de dicho polímero durante la degradación fue despreciable.

Las películas de PHB sin irradiar e irradiadas, en cambio, tuvieron un bajo porcentaje de pérdida de peso (tabla 5.2).

Ambos polímeros mostraron los mismos resultados tanto para el proceso de degradación enzimática *in vitro* como para la hidrólisis no enzimática.

Las muestras empleadas como control (cada uno de los polímeros sin ser sometidos al ensayo de degradación) no sufrieron pérdida de peso.

Tabla 5.2 Pérdida de peso de las películas de PHB luego de 40 días de degradación enzimática *in Vitro*.

Condiciones de irradiación		%Pérdida de peso
Ión	Energía (MeV)	
—	—	1,1
C ³⁺	18	1,5
C ⁵⁺	45	1
S ⁵⁺	27	1
S ⁹⁺	75	1,1

5.2.2 Determinación del ángulo de contacto

Los polímeros estudiados, PLLA y PHB, sometidos a los ensayos de degradación *in vitro* con y sin enzimas por un período de 40 días, presentaron, luego del mismo, una importante disminución del ángulo de contacto indicando un aumento del carácter hidrofílico de sus superficies.

En la tabla 5.3 se muestran los resultados de algunas de las muestras medidas. Estos representan los cambios observados en todas las películas de PHB y todos los films de PLLA sometidos a los ensayos de degradación. Cada resultado, promedio de 20 mediciones, presenta una desviación estándar de ± 1 %.

En la figura 5.3 se puede observar el perfil de una gota de agua desionizada sobre la superficie del polímero antes y después de la degradación, donde se distingue a simple vista la disminución del ángulo de contacto sobre la superficie degradada.



Figura (a)



Figura (b)

Figura 5.3 Fotografía de una gota de agua desionizada sobre un film de PLLA antes (a) y después (b) de 40 días de degradación enzimática *in vitro*.

Tabla 5.3 Porcentaje de disminución del ángulo de contacto de los polímeros ($\% \Delta \theta$) luego de 40 días de degradación enzimática *in vitro*.

Condiciones de irradiación		$\% \Delta \theta$	
Ión	Energía [MeV]	PHB	PLLA
—	—	8	10
C ³⁺	18	9	12
C ⁵⁺	45	14	10
S ⁵⁺	27	13	12
S ⁹⁺	75	10	8

5.2.3 Determinación de productos de degradación solubles por espectroscopía UV-Visible

Con el fin de determinar los productos de degradación solubles, los polímeros fueron sometidos al ensayo de degradación enzimática *in vitro*.

Se empleó como blanco de medición la solución de incubación correspondiente a dicho ensayo de degradación, la cual se componía de buffer PBS, con concentraciones de estreptomina de 70 μ g/ml, penicilina de 70UI/ml y Lipasa pancreática porcina (L0382-100KU, Sigma-Aldrich) de 0.1g/L.

Debido a que los antibióticos y la enzima presentes en la solución absorbían radiación electromagnética en la longitud de onda de trabajo, al intentar llevar a cero el valor de absorbancia con la solución blanco se produjo una saturación de la señal por lo que no fue posible medir la A_{210nm} correspondiente a los productos de degradación de los polímeros.

Por lo expuesto se decidió que la degradación de los polímeros no sería estudiada por éste método.

5.2.4 Determinación de los productos de degradación por HPLC

Con el fin de estudiar los productos de degradación de los polímeros mediante cromatografía, se procedió de acuerdo a lo indicado en trabajos previos [1, 2].

Las películas de PHB y los films de PLLA fueron sometidos al ensayo de degradación enzimática *in vitro*.

Dado que los monómeros ácido láctico y 3-hidroxibutirato son productos esperados de la hidrólisis del PLLA y el PHB respectivamente [3, 1], se usaron estos compuestos como patrones para la puesta a punto de la técnica y se determinaron los tiempos de elución de cada uno.

Se realizó la cromatografía del buffer de degradación luego de 2, 3, 6, 12 y 24 horas de incubación. En ninguna de las corridas logró determinarse la presencia de los monómeros ácido láctico y 3-hidroxibutirato. Se propuso que los tiempos empleados para la degradación podrían no haber sido suficientes para que una cantidad detectable de producto estuviera presente en la solución, por lo que se incubaron nuevamente ambos polímeros durante un período de tiempo prolongado de 40 días. En dicha oportunidad tampoco fue posible identificar los picos correspondientes a dichos monómeros en el cromatograma.

Durante la degradación de 40 días las muestras de PHB sufrieron una pérdida de peso que, de acuerdo a las condiciones del ensayo, correspondería a una concentración de producto en solución de aproximadamente $40\mu\text{g ml}^{-1}$. Para verificar que el método cromatográfico usado fuera sensible a esa cantidad, se realizaron las corridas de los patrones en concentraciones de $40\mu\text{g ml}^{-1}$. En los cromatogramas resultantes se identificaron claramente ambos picos por lo que la sensibilidad de la cromatografía no representaba un problema.

Siendo que la sensibilidad era suficiente, pero aún así no se habían detectado los productos en las soluciones luego de los 40 días de incubación, se evaluó la posibilidad de que hubiera ocurrido una degradación total de los monómeros en la solución antes de que ésta fuera analizada por cromatografía. Para ello se procedió a la incubación de los patrones por 40 días a una temperatura de 37°C para luego volver a realizar las corridas. Después de dicho tiempo de incubación los picos de los patrones permanecieron inalterados en cuanto a tiempo de elución y área, demostrando así, que de estar presentes en la solución, los monómeros no se hubieran degradado, por lo que deberían haber sido identificados en los cromatogramas.

Habiendo evaluado todas las posibles causas por las cuales podrían no haberse identificado los monómeros en el buffer durante la degradación del PLLA y el PHB, se concluyó que, en esta oportunidad, en las condiciones de ensayo empleadas, los productos de degradación de los polímeros no fueron los monómeros correspondientes sino otros oligómeros resultantes de la hidrólisis. Considerando esto, para poder estudiar la degradación sería necesario contar con patrones de los posibles productos (oligómeros de diferente longitud), lo cual, en el tiempo disponible para realizar el trabajo, no fue viable.

Por lo expuesto se resolvió seguir el estudio de la degradación de los polímeros por los otros métodos descritos en el capítulo 3.

5.2.5 Estudio de las superficies de los polímeros por microscopía electrónica de barrido

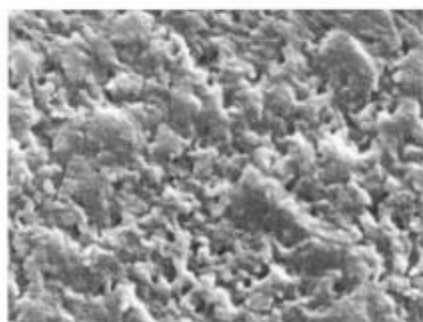
Con el objeto de caracterizar el efecto producido por la **degradación**, se obtuvieron imágenes de las muestras sometidas a los ensayos de hidrólisis (no enzimática y enzimática) antes y después de la incubación.

Se estudiaron en paralelo los cambios producidos en la topografía de los polímeros irradiados y no irradiados durante los procesos de degradación.

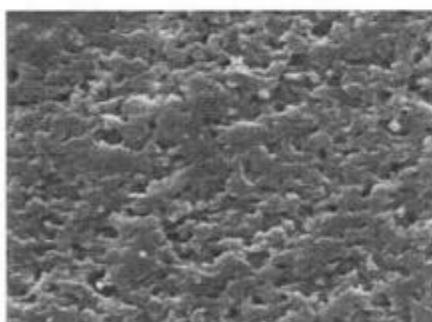
5.2.5.1 Polihidroxibutirato (PHB)

En las micrografías obtenidas se puede observar que el efecto de la degradación sobre la topografía de la superficie del polímero sin irradiar fue el mismo que el producido sobre el polímero irradiado.

Las imágenes de las superficies de las películas de PHB **sin irradiar** luego de 7 y 30 días de degradación *in vitro* muestran un desgaste dando un aspecto mas liso de la superficie (figura 5.4). Lo mismo se observa en las imágenes de los **polímeros irradiados** sometidos a iguales períodos de degradación (figura 5.5).

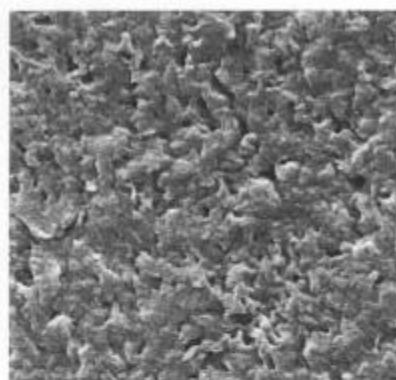


(a)

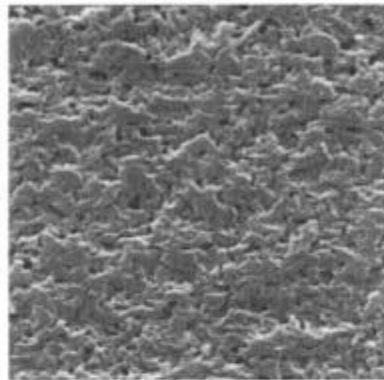


(b)

Figura 5.4 Micrografías con aumento de 2000X del polímero **PHB sin irradiar** antes (a) y después (b) de ser sometido durante 30 días al ensayo de degradación enzimática



(a)



(b)

Figura 5.5 Micrografías con aumento de 2000X del polímero PHB irradiado (S^{9+} , 75 MeV, 1×10^{11} ión cm^{-2}) antes (a) y después (b) de ser sometido durante 30 días al ensayo de degradación enzimática

5.2.5.2 Poliláctico (PLLA)

En todas las muestras de PLLA se observa primero un cambio en la rugosidad de la superficie y luego, al aumentar el tiempo de degradación, la formación de poros. No obstante, existen diferencias marcadas en las micrografías de los films irradiados respecto a las de los no irradiados.

En las **películas no irradiadas**, luego de 7 días de degradación, aumenta la rugosidad de la superficie y a los 30 días ésta se vuelve heterogénea presentando zonas con grandes orificios intercaladas con áreas sin perforar (figura 5.6).

En los **polímeros irradiados**, luego de 7 días de degradación, aumenta la rugosidad con un patrón de líneas paralelas de una única orientación y a los 30 días orificios muy pequeños cubren casi la totalidad de la superficie (figura 5.7).

Estos efectos en ambos polímeros se observan tanto durante el proceso de degradación enzimática como durante la hidrólisis no enzimática.

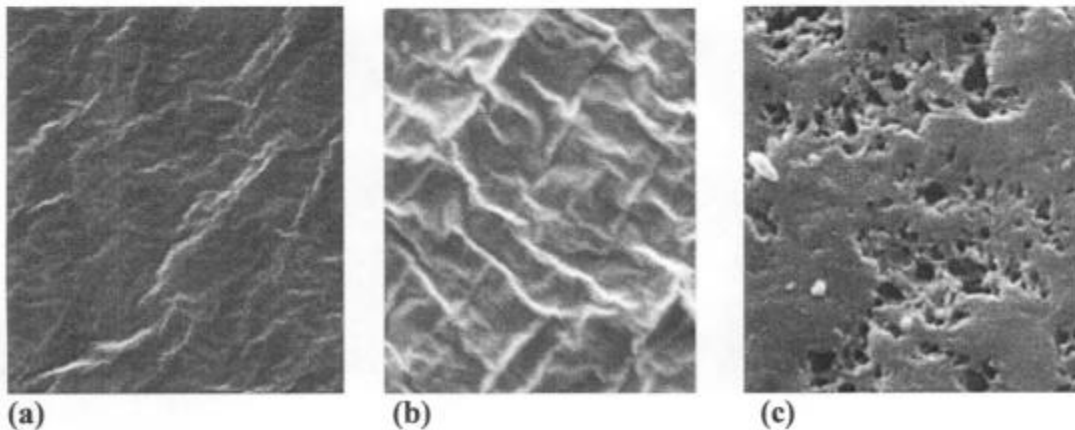


Figura 5.6 Micrografías con aumento de 8000X del polímero **PLLA sin irradiar** antes de ser sometido al ensayo de degradación enzimática *in vitro* (a) y luego de 7 días (b) y 30 días (c) de incubación.

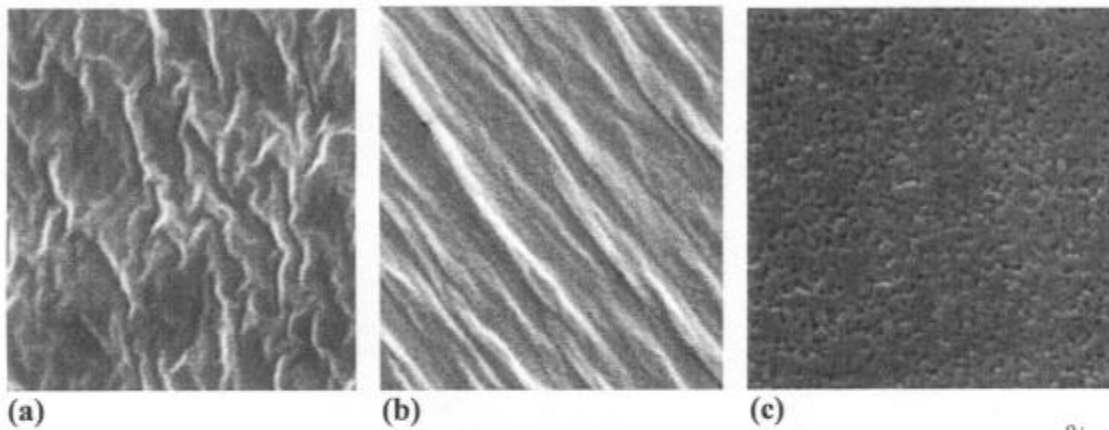


Figura 5.7 Micrografías con aumento de 8000X del polímero PLLA irradiado (S^{9+} , 75 MeV, 1×10^{11} ión cm^{-2}) antes de ser sometido al ensayo de degradación enzimática *in vitro* (a) y luego de 7 días (b) y 30 días (c) de incubación.

5.2.6 Espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR)

Del análisis espectroscópico infrarrojo del PLLA y el PHB, se obtuvieron los espectros característicos de dichos polímeros [4]. En ellos no se observaron nuevos picos luego de la irradiación y de la degradación, sin embargo la absorbancia de ciertas bandas disminuyó ó aumentó como resultado de los tratamientos.

A continuación se describirán los resultados de cada uno de los polímeros en forma individual ya que, como se explicó en la sección 4.2.10 se utilizó un método distinto para obtener el espectro infrarrojo de cada una de ellos.

5.2.6.1 Estudio de la superficie del PLLA por Espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier con sistema de Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

En la figura 5.8 se muestra el espectro completo comprendido en el rango (800-3000) cm^{-1} de cada una de las muestras de PLLA. En el mismo no se observan diferencias significativas entre los espectros del polímero antes y después de la irradiación. La degradación, sin embargo, provocó una disminución del área de todos los picos del espectro tanto en el polímero irradiado como en el no irradiado. Además con la degradación aparecen dos picos ubicados en las posiciones 2916 cm^{-1} y 2846 cm^{-1} cuya intensidad es mayor en el polímero irradiado. Estos picos podrían ser atribuidos al estiramiento de los grupos $-\text{CH}_3$ que forman parte de las cadenas hidrolizadas [5]. En la región comprendida entre 1500 cm^{-1} y 1600 cm^{-1} aparece también un pico luego de la degradación en ambos polímeros (1595 cm^{-1}) y otro pico solo en el polímero irradiado (1535 cm^{-1}), ambos podrían atribuirse a las vibraciones de las moléculas de agua adsorbidas al polímero [6].

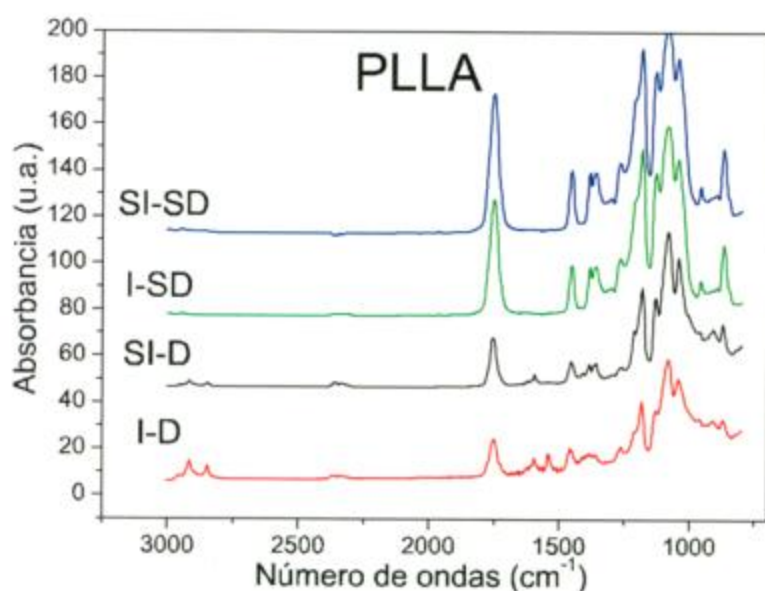


Figura 5.8 Espectros completos obtenidos por FTIR-ATR del polímero PLLA sin irradiar antes (SI-SD) y después de la degradación (SI-D) y el polímero PLLA irradiado antes (I-SD) y después de la degradación (I-D)

En la figura 5.9 se muestra en detalle la región del espectro acotada entre 800 y 1000 cm^{-1} .

En los polímeros irradiados, respecto de los no irradiados, se observa una menor intensidad en la absorbancia a 921 cm^{-1} . Por otro lado, el índice de cristalinidad, determinado como se indica en la literatura [7] por la relación entre las absorbancias a 921 y 956 cm^{-1} , disminuyó en un 30 % luego de la irradiación. Ambos resultados indican, de acuerdo a la bibliografía [7], que el polímero irradiado tiene una fracción cristalina menor debido al tratamiento.

La degradación, tanto en el polímero sin irradiar como en el irradiado, provocó una disminución de las absorbancias de las bandas a 871, 895 y 956 cm^{-1} , y un incremento de la banda a 921 cm^{-1} . Además, la relación entre las absorbancias a 921 cm^{-1} y 956 cm^{-1} aumentó luego de la degradación, siendo el incremento, en el polímero irradiado, del 10% y en el no irradiado, del 40%. Todos los cambios descritos en el espectro pueden atribuirse a un aumento de la fracción cristalina [7] en ambos polímeros (irradiado y no irradiado) durante la degradación. Esto está de acuerdo con la mayor resistencia a la hidrólisis de la parte cristalina respecto a la amorfa descrita en la literatura [3].

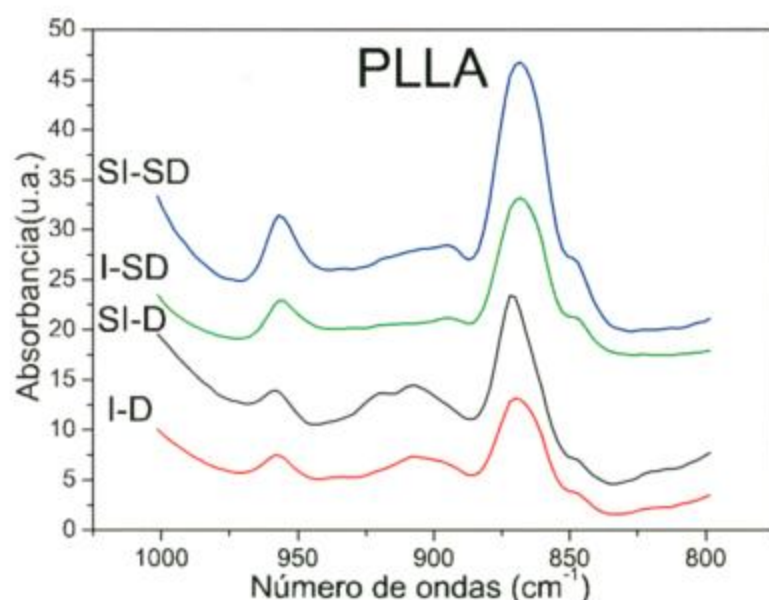


Figura 5.9 Espectros acotados en el rango (800-1000) cm^{-1} obtenidos por FTIR-ATR del polímero PLLA sin irradiar antes (SI-SD) y después de la degradación (SI-D) y el polímero PLLA irradiado antes (I-SD) y después de la degradación (I-D)

5.2.6.2 Estudio de la superficie de PHB por Microespectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier (Micro-FTIR)

En la figura 5.10 se muestra el espectro completo de todas las muestras de PHB comprendido en el rango 800-2000 cm^{-1} , medido por Micro-FTIR. En él puede observarse una disminución en la absorbancia a 1278 cm^{-1} en la muestra sin degradar

(SD) luego de la irradiación. Dicha banda es atribuida a vibraciones propias de la fase cristalina [8], lo cual pone en evidencia el efecto producido por la irradiación.

Por otro lado, al determinar el índice de cristalinidad mediante la relación de absorbancias a 1380 cm^{-1} y 1186 cm^{-1} como se indica en la bibliografía [8], puede apreciarse un aumento del 20% de la misma con la degradación en el polímero irradiado, no así en el no irradiado, lo que significa que durante la hidrólisis se incrementa la fracción cristalina del PHB irradiado.

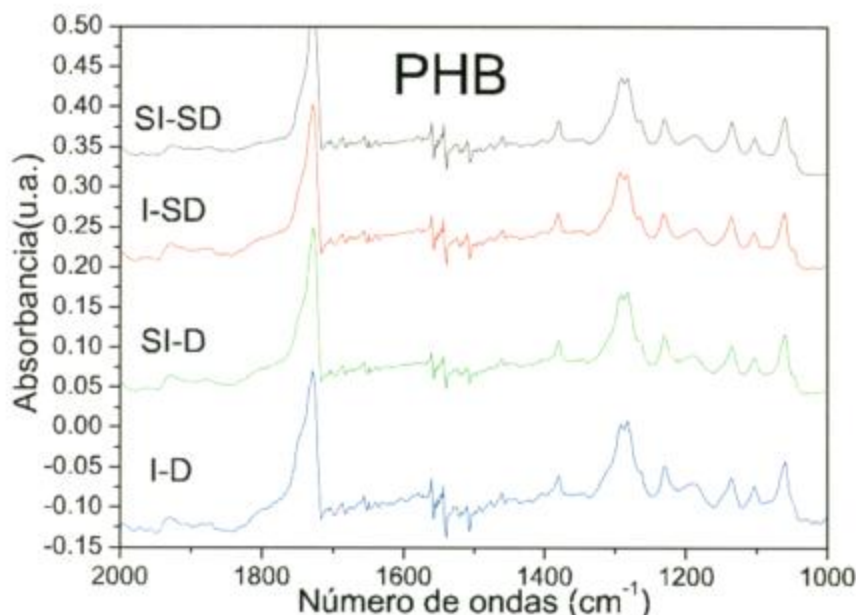


Figura 5.10 Espectros completos obtenidos por Micro-FTIR del polímero PHB sin irradiar antes (SI-SD) y después de la degradación (SI-D) y el polímero PHB irradiado antes (I-SD) y después de la degradación (I-D)

5.2.7 Análisis químico de las superficies de los polímeros por Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

Para estudiar en detalle los cambios estructurales de los polímeros se realizó el análisis de la superficie de los mismos por Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS). Para ello, los polímeros PLLA y PHB irradiados y no irradiados fueron sometidos a los ensayos de degradación enzimática y no enzimática *in vitro*.

En las figuras 5.12 y 5.13 se muestran los espectros C_{1s} de los polímeros PLLA y PHB respectivamente. Los mismos fueron ajustados usando una combinación de gaussianas y lorentzianas para caracterizar los cambios en las uniones químicas del átomo de C.

En cada espectro se resuelven tres componentes asignados a diferentes estados químicos del C. El primero, en un valor de energía de 285 eV, corresponde a las uniones C-C y C-H. El segundo, a 286.6 eV, se asigna a la unión C-O y el tercero, determinado por el grupo O-C=O a 289.1 eV. En las figuras 5.12 y 5.13 se muestran las áreas relativas de cada uno de dichos componentes.

En los espectros de los films de PLLA (figura 5.12), luego de la irradiación y la degradación, se observa una disminución de la banda asignada a los enlaces C-O y al grupo O-C=O, debido a la degradación del polímero. El mismo efecto se observa en los espectros de las películas de PHB (figura 5.13), indicando también la degradación del polímero.

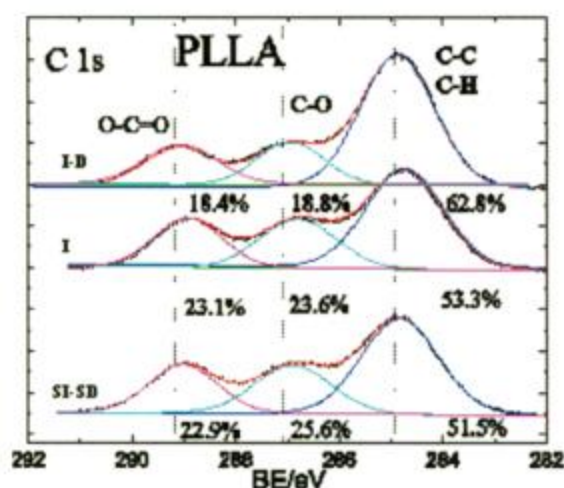


Figura 5.12 Espectros XPS de los polímeros PLLA sin irradiar sin degradar (SI-SD), PLLA irradiado (I) y PLLA irradiado y degradado (I-D).

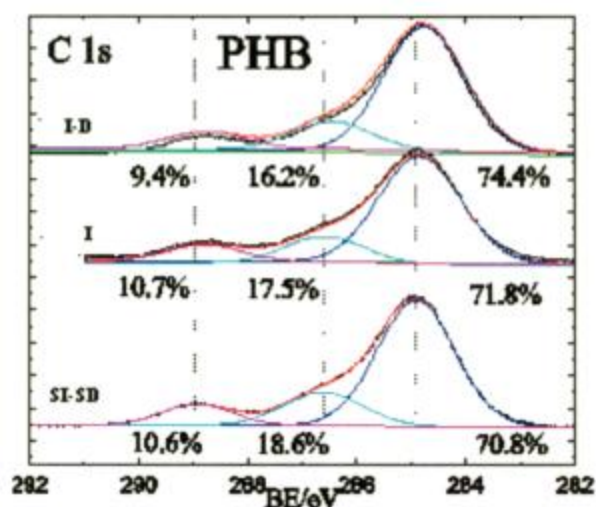


Figura 5.13 Espectros XPS de los polímeros PHB sin irradiar sin degradar (SI-SD), PHB irradiado (I) y PHB irradiado y degradado (I-D).

5.2.8 Análisis térmico de los polímeros

5.2.8.1 Análisis termogravimétrico (TGA) y análisis térmico diferencial (DTA)

Para llevar a cabo estos análisis los polímeros PLLA y PHB fueron sometidos previamente a los ensayos de degradación enzimática y no enzimática *in vitro*.

5.2.8.1.1 Poliláctico

En la tabla 5.4 se describen nuevamente las muestras de PLLA empleadas en este análisis para una mayor comprensión del texto a continuación.

Tabla 5.4 Muestras de PLLA analizadas por TGA y DTA

Muestra	Polímero	Irradiación	Degradación
6	PLLA	no	no
3	PLLA	si	no
8	PLLA	no	si
4	PLLA	si	si

En la figura 5.14 se muestran los termogramas obtenidos por DTA a baja temperatura en los que se observa un pico endotérmico presente en todas las muestras. La posición del mismo para las muestras 3 y 4 (irradiadas) es de 168.57 °C y 168.76 °C respectivamente. En las muestras 6 y 8 (sin irradiar), en cambio, se ubican a 169.30 °C y 169.33 °C respectivamente. En paralelo, puede verse que durante dicho proceso endotérmico las muestras no sufren cambios en su masa (TGA) por lo que, dadas las condiciones y de acuerdo a los datos de la literatura [9], la transición de fase observada puede atribuirse a la fusión del polímero que estaría ocurriendo a menor temperatura en las muestras irradiadas.

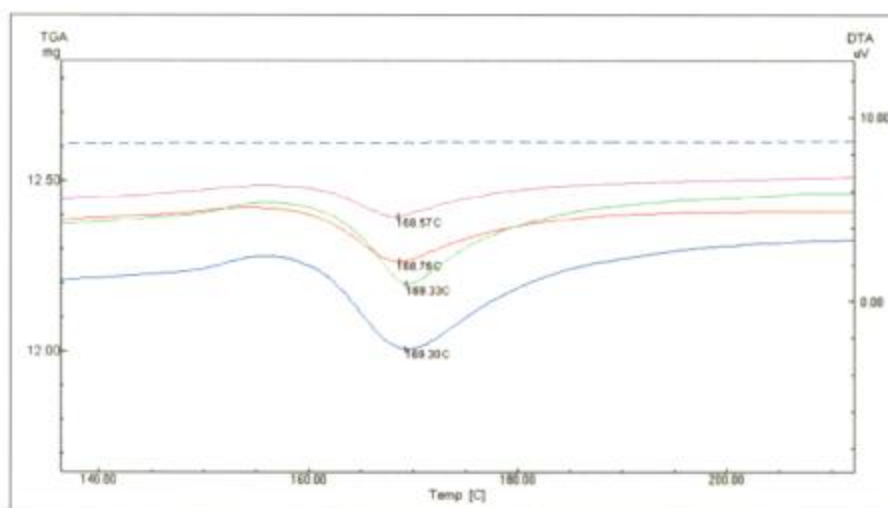


Figura 5.14 Curvas TGA y DTA, a baja temperatura, del poliláctico

- Muestra 6: DTA PLLA sin irradiar/ sin degradar
- Muestra 3: DTA PLLA irradiado / sin degradar
- Muestra 8: DTA PLLA sin irradiar/ degradado
- Muestra 4: DTA PLLA irradiado/ degradado
- TGA PLLA

Todas las muestras pierden la totalidad de su masa dentro del rango de temperaturas (250-400) °C.

La naturaleza irregular de los sistemas poliméricos determina que cada muestra presente un modelo de descomposición propio. Sin embargo en la figura 5.15 puede observarse que las polímeros irradiados (3 y 4) presentan un mismo patrón en la forma de sus picos de descomposición térmica y los no irradiados (6 y 8), en cambio, exhiben picos de descomposición múltiples sin un patrón en común entre ellos. Esto indica que el tratamiento (irradiación) modificó la estructura molecular de los polímeros, de manera tal de hacerlos más homogéneos frente a la descomposición térmica.

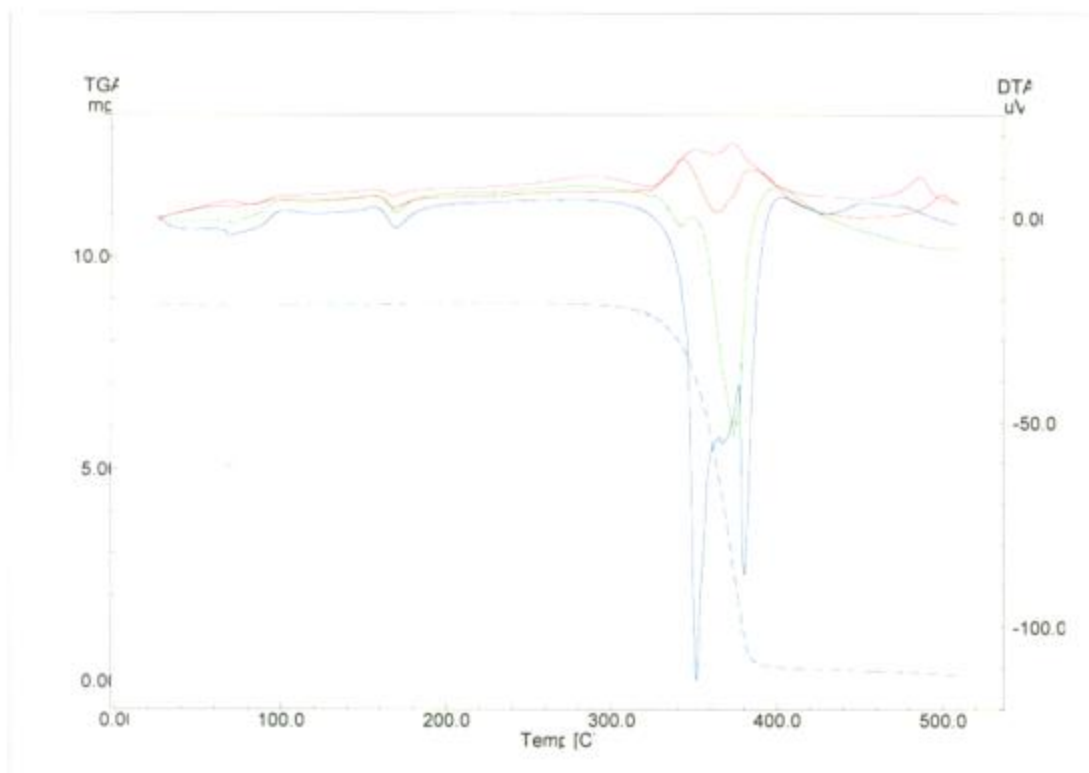


Figura 5.15 Curvas TGA y DTA completas del poliláctico

- Muestra 6: DTA PLLA sin irradiar/ sin degradar
- Muestra 3: DTA PLLA irradiado / sin degradar
- Muestra 8: DTA PLLA sin irradiar/ degradado
- Muestra 4: DTA PLLA irradiado/ degradado
- - TGA PLLA

En la figura 5.16 puede verse que las muestras irradiadas (3 y 4) comienzan a perder masa a temperaturas cercanas a los 250 °C. Luego, a una temperatura levemente superior, lo hace la muestra 8 y finalmente, el polímero que no fue sometido ni a la degradación *in vitro* ni a la irradiación (muestra 6) comienza a hacerlo a temperaturas mayores. Dichos resultados sugieren que ambos tratamientos (irradiación y degradación) facilitan el comienzo de la descomposición térmica.

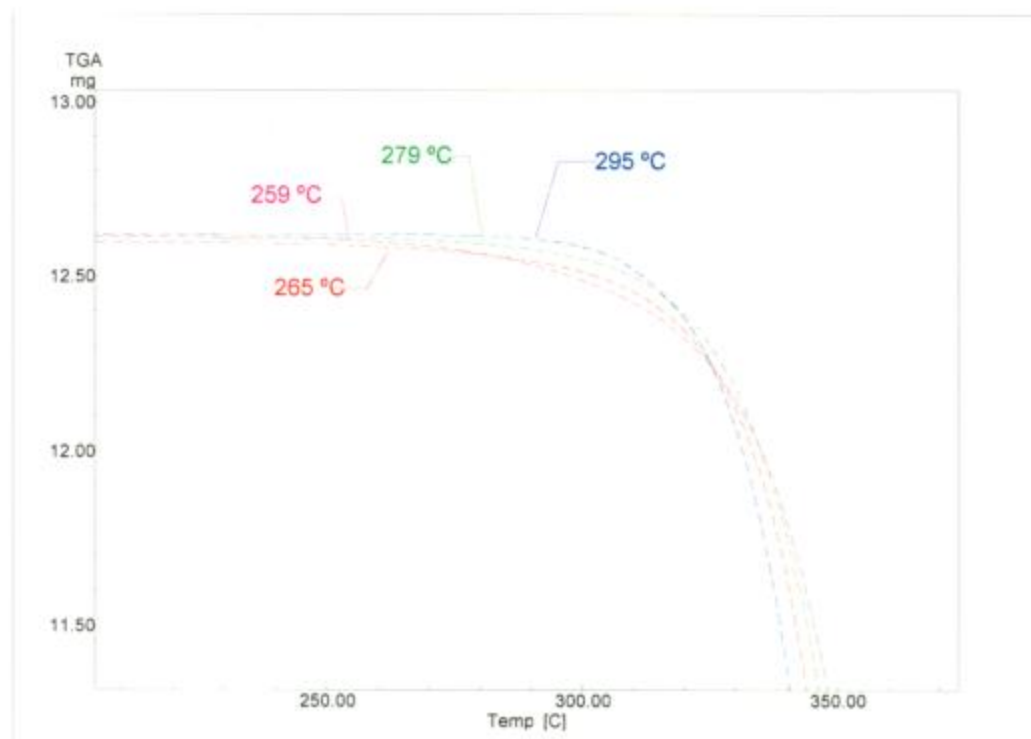


Figura 5.16 Curvas TGA del poliláctico

- Muestra 6: PLLA sin irradiar/ sin degradar
- Muestra 3: PLLA irradiado / sin degradar
- - Muestra 8: PLLA sin irradiar/ degradado
- - Muestra 4: PLLA irradiado/ degradado

5.2.8.1.2 Polihidroxibutirato

En la tabla 5.5 se describen nuevamente las muestras de PHB empleadas para este análisis para facilitar la comprensión del texto a continuación.

Tabla 5.5 Muestras de PHB analizadas por TGA y DTA

Muestra	Polímero	Irradiación	Degradación
5	PHB	no	no
1	PHB	si	no
7	PHB	no	si
2	PHB	si	si

Se realizaron los análisis termogravimétricos convencional (TGA) y diferencial (DrTGA) cuyos termogramas se muestran en la figura 5.17. En ellos se observa que el polímero irradiado y degradado se descompone por completo a menor temperatura que el resto de las muestras. Dicho resultado sugiere que las películas de PHB irradiadas, durante el ensayo de hidrólisis *in vitro* podrían haberse degradado más que las no irradiadas aumentando así su susceptibilidad a la descomposición térmica.

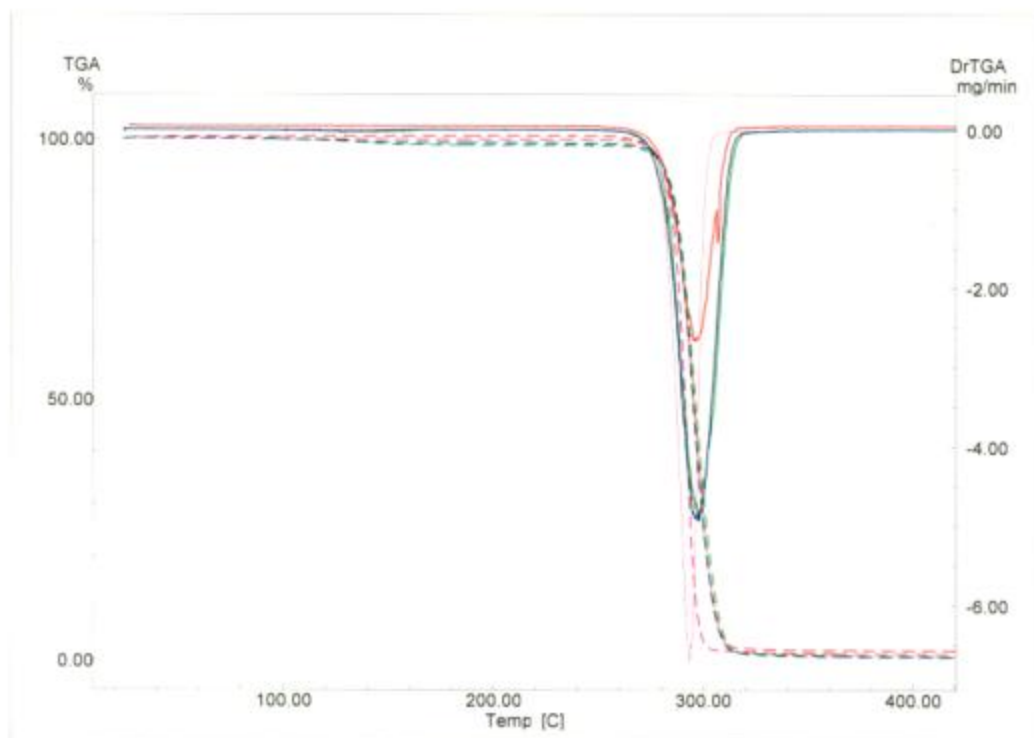


Figura 5.17 Curvas TGA (trazo punteado) y DrTGA (trazo lleno) del polihidroxitirato

- Muestra 5: PHB sin irradiar/ sin degradar
- Muestra 1: PHB irradiado / sin degradar
- Muestra 7: PHB sin irradiar/ degradado
- Muestra 2: PHB irradiado/ degradado

En la figura 5.18 puede verse como los polímeros que no fueron sometidos al ensayo de hidrólisis *in vitro* (muestras 5 y 1) sufren una pequeña pérdida de masa a baja temperatura durante el análisis térmico, la cual no se observa en los termogramas de las muestras degradadas (2 y 7). Esto sugiere que los polímeros efectivamente sufrieron degradación durante los ensayos de hidrólisis *in vitro*.

Es importante destacar que las muestras sometidas a la degradación *in vitro* presentan el mismo comportamiento térmico a baja temperatura independientemente de que hayan o no sido irradiadas antes de la degradación (muestra 2 y 7 respectivamente).

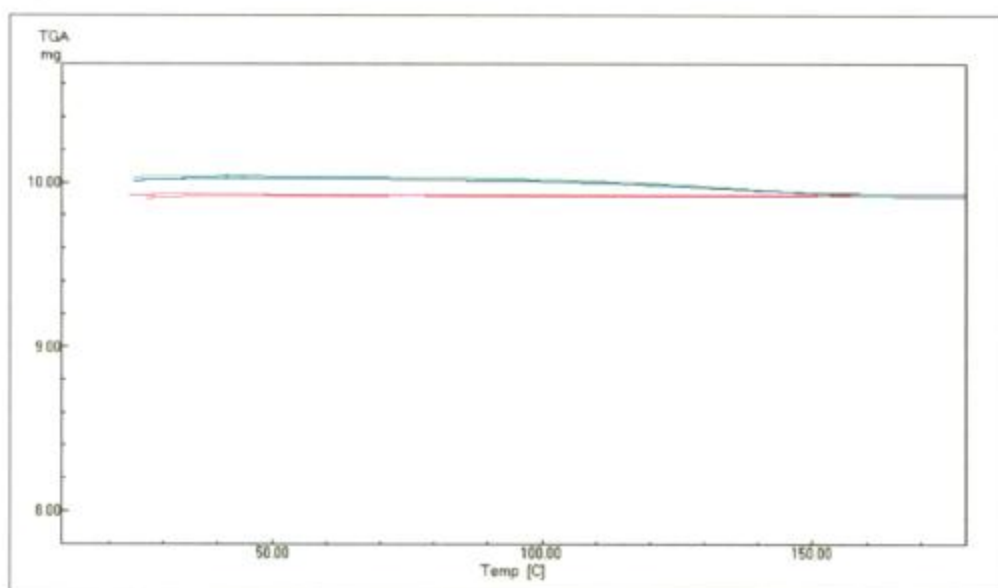


Figura 5.18 Curvas TGA a baja temperatura del polihidroxibutirato

- Muestra 5: PHB sin irradiar/ sin degradar
- Muestra 1: PHB irradiado / sin degradar
- Muestra 7: PHB sin irradiar/ degradado
- Muestra 2: PHB irradiado/ degradado

Si bien en el análisis termogravimétrico no es posible resolver la diferencia entre las temperaturas a las cuales cada muestra comienza a perder masa debido a la descomposición térmica (figura 5.19), en el análisis térmico diferencial se observa que los polímeros irradiados (muestras 1 y 2) comienzan su descomposición a menor temperatura que los no irradiados (muestras 5 y 7) y que el polímero que solo fue sometido a la degradación (muestra 7) se descompone térmicamente antes que aquel al cual no se le realizó ningún tratamiento previo al análisis (muestra 5) (figura 5.20). Dichos resultados sugieren que tanto la irradiación como la degradación facilitan el proceso de descomposición de los polímeros.

En la Figura 5.21 se muestran los termogramas DTA de cada polímero donde se observa un proceso endotérmico correspondiente, de acuerdo a los datos de la literatura [10], a la fusión del PHB. Dada la heterogeneidad entre las muestras estudiadas las pequeñas diferencias encontradas entre los picos no pueden ser atribuidas a una causa en particular, por lo que no podría definirse un cambio significativo en la fusión debido a la irradiación y/o la degradación.

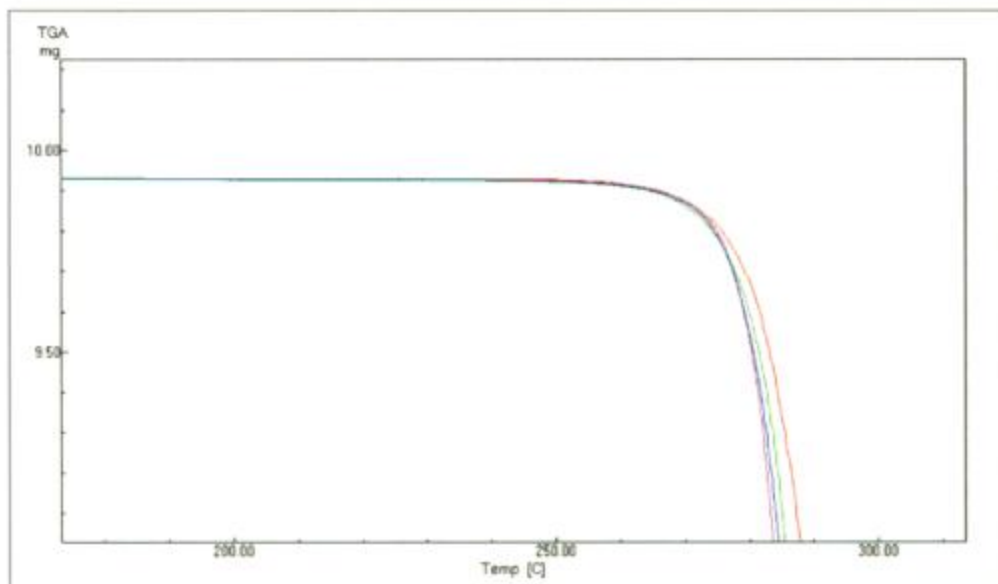


Figura 5.19 Curvas TGA a alta temperatura del polihidroxitirato

- Muestra 5: PHB sin irradiar/ sin degradar
- Muestra 1: PHB irradiado / sin degradar
- Muestra 7: PHB sin irradiar/ degradado
- Muestra 2: PHB irradiado/ degradado

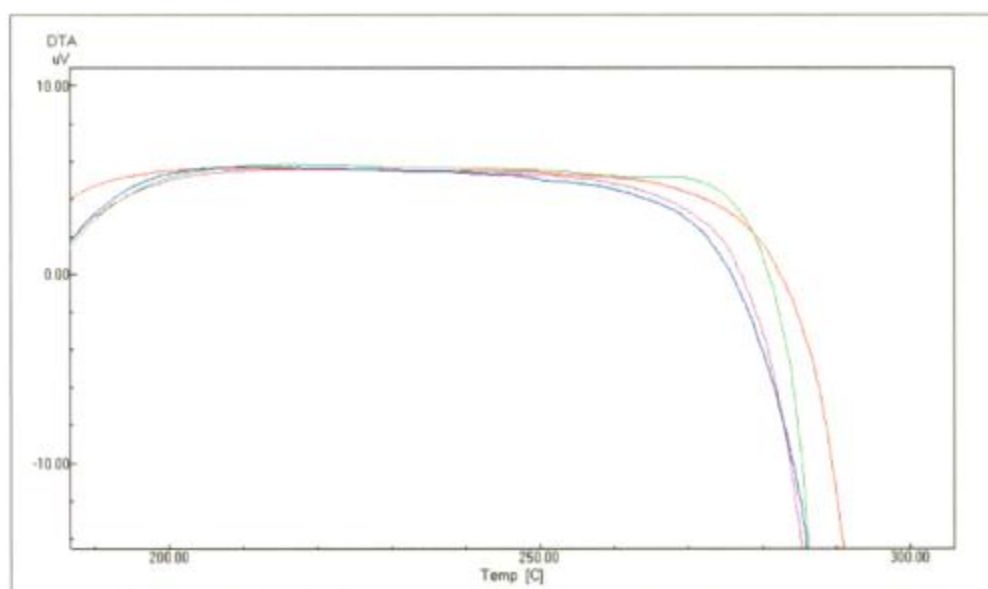


Figura 5.20 Curvas DTA a alta temperatura del polihidroxitirato

- Muestra 5: PHB sin irradiar/ sin degradar
- Muestra 1: PHB irradiado / sin degradar
- Muestra 7: PHB sin irradiar/ degradado
- Muestra 2: PHB irradiado/ degradado

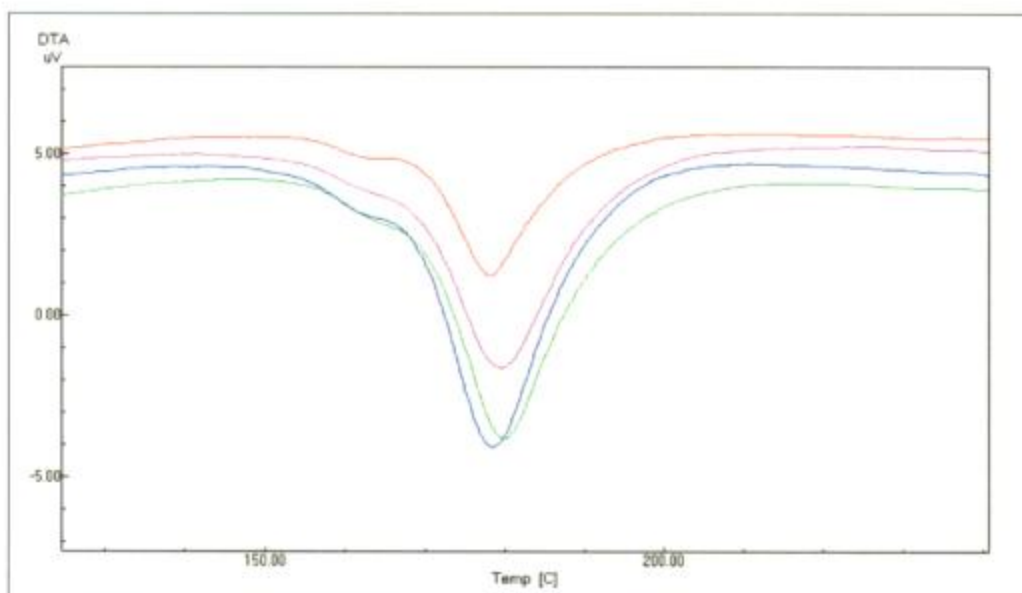


Figura 5.21 Curvas DTA a baja temperatura del polihidroxibutirato

- Muestra 5: PHB sin irradiar/ sin degradar
- Muestra 1: PHB irradiado / sin degradar
- Muestra 7: PHB sin irradiar/ degradado
- Muestra 2: PHB irradiado/ degradado

5.2.8.2 Calorimetría Diferencial de Barrido DSC

Para llevar a cabo este ensayo los polímeros PHB y PLLA fueron sometidos previamente a los ensayos de degradación enzimática *in vitro* según se describe en la sección 4.2.4.2.

5.2.8.2.1 Poliláctico

La figura 5.21 muestra los termogramas del segundo calentamiento de las cuatro muestras de PLLA estudiadas.

En todas las curvas puede observarse un escalón a temperaturas cercanas a los 60°C correspondiente a la transición vítrea del polímero [9]. Luego, un primer pico exotérmico pequeño y un segundo pico exotérmico más importante, los cuales indican dos procesos de cristalización. Finalmente, a mayor temperatura, se observa un pico endotérmico atribuido a la fusión de los films [9].

El grado de cristalinidad (X_c) de los polímeros fue determinado mediante la relación entre las entalpías de fusión de la muestra (obtenida del segundo calentamiento durante el análisis DSC) y de un polímero 100 % cristalino cuyo valor es 81 J g^{-1} [11].

En la tabla 5.6 se describen en detalle las temperaturas y entalpías correspondientes a las transiciones observadas en los termogramas.

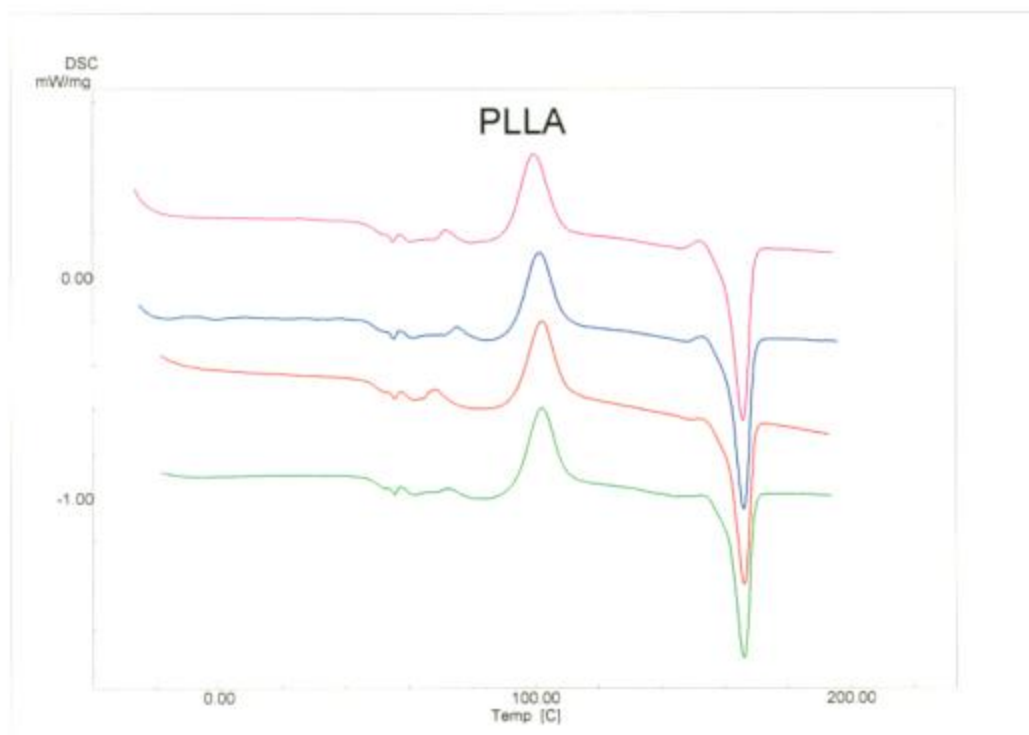


Figura 5.21: Termogramas DSC del PLLA

- Muestra 6: PLLA sin irradiar/ sin degradar
- Muestra 4: PLLA irradiado / sin degradar
- Muestra 8: PLLA sin irradiar/ degradado
- Muestra 3: PLLA irradiado/ degradado

Tabla 5.6: Propiedades térmicas del PLLA: temperatura de fusión (T_f), entalpía de fusión (ΔH_f) temperatura de cristalización (T_c), entalpía de cristalización (ΔH_c), grado de cristalización (X_c) y temperatura de transición vítrea (T_g)

Termograma	Polímero	Irradiación	Degradación	T_f (°C)	ΔH_f (J g ⁻¹)	T_c (°C)	ΔH_c (J g ⁻¹)	X_c (%)*	T_g (°C)
verde	PLLA	no	no	166,09	28,96	72,84	-1,4	36	55,26
						102,26	-23,89		
rojo	PLLA	si	no	166,22	28,91	68,48	-2,28	36	55,25
						102,5	-21,18		
azul	PLLA	no	si	166,09	28,9	75,34	-1,39	36	52,34
						101,44	-22,57		
magenta	PLLA	si	si	165,86	33,12	71,99	-1,63	41	50,86
						100,03	-24,99		

La irradiación produjo un desplazamiento del primer pico de cristalización del polímero hacia temperaturas inferiores, indicando una mayor facilidad de las moléculas para acomodarse, al ser expuestas a un calentamiento, luego del tratamiento.

La degradación, en cambio, modificó el grado de cristalinidad y la temperatura de transición vítrea del polímero. Cabe destacar que las modificaciones producidas por la degradación sobre el film irradiado no son las mismas que sobre el polímero no irradiado. En este último, luego de la degradación el grado de cristalinidad no varió. En

la muestra irradiada, en cambio, se produjo un aumento del mismo. Esta diferencia sugiere que la hidrólisis, que como ya mencionamos ocurre con mayor facilidad en la fase amorfa [3], habría ocurrido preferentemente en el polímero irradiado aumentando de esa manera la fracción cristalina en detrimento de la amorfa.

En ambos polímeros, irradiado y no irradiado, se observa una disminución de la temperatura de transición vítrea luego de la degradación debido al aumento en la movilidad de las cadenas del polímero como resultado de la hidrólisis. Dicho variación es mayor en la muestra irradiada lo que indica que ésta habría sufrido más degradación.

5.2.8.2.2 Polihidroxibutirato

La figura 5.22 muestra los termogramas del segundo calentamiento de las cuatro muestras de PHB estudiadas.

En todas las muestras se observa, a temperaturas cercanas a 0°C, el escalón correspondiente a la transición vítrea del polímero. Luego, un pico exotérmico que indica un proceso de cristalización.

En todas las muestras, excepto en la de PHB irradiado y degradado, se observa un segundo pico exotérmico pequeño correspondiente también a un proceso de cristalización a mayor temperatura.

A temperaturas superiores a 170°C puede verse, en las cuatro curvas, un pico endotérmico debido a la fusión del polímero.

El grado de cristalinidad (X_c) de los polímeros fue determinado mediante la relación entre las entalpías de fusión de la muestra (obtenida del segundo calentamiento durante el análisis DSC) y de un polímero 100 % cristalino cuyo valor es 146 J g^{-1} de acuerdo a lo indicado en la literatura [12].

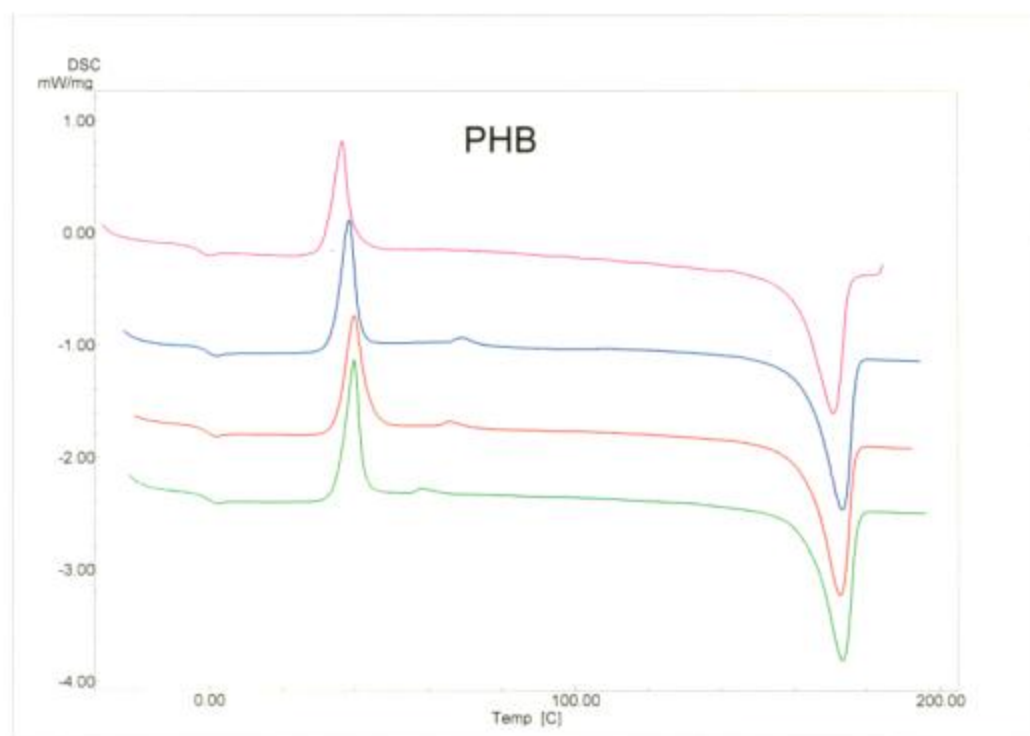


Figura 5.22: Termogramas DSC del PHB

- Muestra 5: PHB sin irradiar/ sin degradar
- Muestra 1: PHB irradiado / sin degradar
- Muestra 7: PHB sin irradiar/ degradado
- Muestra 2: PHB irradiado/ degradado

En la tabla 5.7 se detallan las temperaturas y entalpías asociadas a las transformaciones observadas en los termogramas.

Tabla 5.7: Propiedades térmicas del PHB: temperatura de fusión (T_f), entalpía de fusión (ΔH_f), temperatura de cristalización (T_c), entalpía de cristalización (ΔH_c), grado de cristalinidad (X_c) y temperatura de transición vítrea (T_g)

Termograma	Polimero	Irradiación	Degradación	T_f (°C)	ΔH_f (J g ⁻¹)	T_c (°C)	ΔH_c (J g ⁻¹)	X_c (%) [*]	T_g (°C)
verde	PHB	no	no	173,16	77,86	39,57 58,37	-39,36 -1,03	53	-0,97
rojo	PHB	si	no	172,68	76,28	39,66 65,84	-40,27 -1,55	52	-1,38
azul	PHB	no	si	173,07	80,21	38,21 68,63	-35,29 -1,74	55	-0,89
magenta	PHB	si	si	170,77	79,05	36,44	-38,47	54	-3,23

La irradiación no produjo por sí sola cambios en las propiedades térmicas de las películas de PHB.

La degradación, en cambio, modificó el comportamiento de los polímeros frente a la temperatura, pero, al igual que en los films de PLLA, dichas modificaciones difieren en las muestras irradiadas respecto a las mismas en las muestras no irradiadas.

Solo en el polímero irradiado se produjo una disminución en la temperatura de fusión luego de la degradación indicando, de esta manera, un comportamiento diferente frente a la degradación de las muestras irradiadas respecto a las no irradiadas.

El grado de cristalinidad aumentó como resultado de la hidrólisis tanto en las muestras irradiadas como no irradiadas, lo que podría deberse no solo a la mayor susceptibilidad de la parte amorfa frente a la degradación, sino también a la posible cristalización durante la incubación en el baño a 37 ° C por acomodamiento de las cadenas cortas generadas por la hidrólisis.

Un resultado a destacar es la desaparición del segundo pico de cristalización en la muestra irradiada luego de la degradación.

Por último, solo en los polímeros irradiados se observa una disminución de la temperatura de transición vítrea como resultado de la hidrólisis.

5.2.9 Peso molecular viscosimétrico del PHB

Se intentó estudiar el efecto producido por la irradiación y la degradación sobre el peso molecular viscosimétrico del PHB.

Para ello, se realizó un ensayo de degradación *in vitro* del polímero [13], durante un periodo de seis días a 65 °C de temperatura.

En la tabla 5.8 se describen las muestras analizadas para dicho fin.

Tabla 5.8: Muestras estudiadas por viscosimetría

Muestra	Polímero	Irradiación	Degradación
PHB	PHB	no	no
PHB-I	PHB	si	no
PHB-D	PHB	no	si
PHB-ID	PHB	si	si

La irradiación produjo un descenso del peso molecular como resultado de los cortes de cadena por efecto del haz de iones durante el tratamiento (figura 5.23).

Tanto el polímero irradiado como el no irradiado, luego de la degradación presentaron una disminución de su peso molecular debido al corte de las cadenas poliméricas producido por la hidrólisis (figura 5.24). Puede observarse que dicho cambio en el peso molecular es menor en la muestra irradiada indicando probablemente una menor degradación.

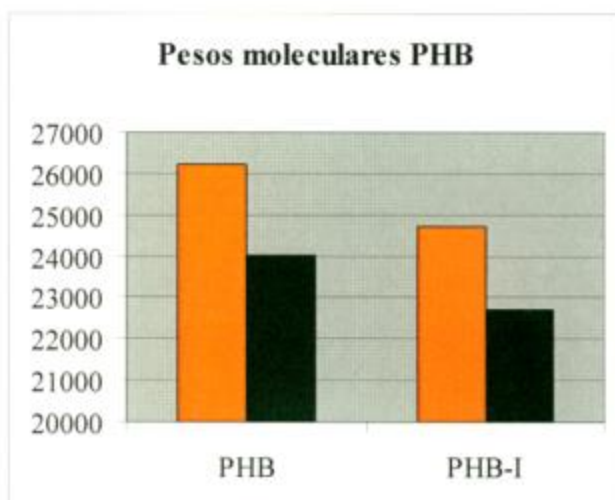


Figura 5.23: Representación gráfica de los pesos moleculares viscosimétricos del polímero PHB no irradiado (PHB) e irradiado (PHB-I). Los resultados en color naranja corresponden a los obtenidos según las referencia [8] y los de color verde, a los obtenidos según la referencia [14].

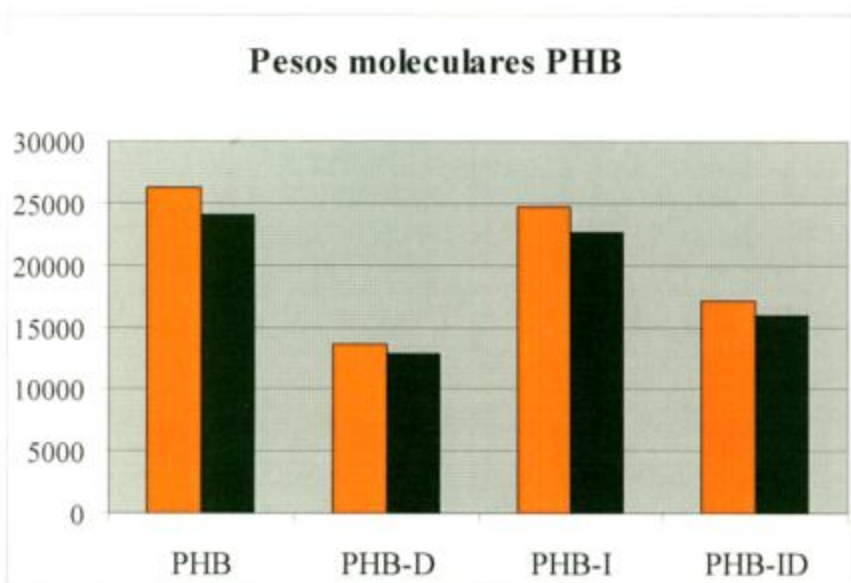


Figura 5.24: Representación gráfica de los pesos moleculares viscosimétricos de los polímeros PHB (PHB), PHB degradado (PHB-D), PHB irradiado (PHB-I) y PHB irradiado y degradado (PHB-ID). Los resultados en color naranja corresponden a los obtenidos según las referencia [8] y los de color verde, a los obtenidos según la referencia [14].

Referencias

[1] Ken-ichi Kasuya, Yoshio Inoue, Kenji Yamada, Yoshiharu, Polymer Degradation and Stability 48 (1995) 167-174.

- [2] Hideki Abe, Isao Matsubara, Yoshiharu Doi, Yoji Hori, Akio Yamaguchi, *Macromolecules* 27 (1994) 6018-6025.
- [3] Yutaka Tokiwa, Buenaventurada P. Calabia, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72 (2006) 244-251.
- [4] Tsuyoshi Furukawa, Harumi Sato, Rumi Murakami, Jianming Zhang, Yong-Xin Duan, Isao Noda, Shukichi Ochiai, Yukihiko Ozaki, *Macromolecules* 38 (2005) 6445-6454.
- [5] Pamula, M. Blazewicz, C. Paluszkiwicz, *Journal of molecular structure* 596 (2001) 69-75 E.
- [6] G. Velázquez de la Cruz, M.O. Martín-Polo A. Herrera-Gómez, *Superficies y Vacío* 11 (2000) 24-31.
- [7] Nadarajah Vasanthan, Onah Ly, *Polymer Degradation and Stability* 94 (2009) 1364-1372.
- [8] Jun Xu, Bao-Hua Guo, Rui Yang, Qiong Wu, Guo-Qiang Chen, Zeng-Min Zhang, *Polymer* 43 (2002) 6893-6899.
- [9] Nadarajah Vasanthan, Onah Ly, *Polymer Degradation and Stability* 94 (2009) 1364-1372.
- [10] Zdeno Spitalský, Igor Lacík, Elena Lathová, Ivica Janigová, Ivan Chodák, *Polymer Degradation and Stability* 91 (2006) 856-861.
- [11] *J. Appl. Polym. Sci.* 54 (1994) 1525-1535
- [12] *J. Mater. Sci.* 19 (1984) 2781-2794.
- [13] Thomas Freier, Carmen Kunze, Claudia Nischan, Sven Kramer, Katrin Sternberg, Marko Sab, Ullrich T. Hopt, Klaus-Peter Schmitz, *Biomaterials* 23 (2002) 2649-1657.
- [14] Kerry J. Townsend, Karsten Busse, Joerg Kressler, Carmen Scholz, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005) 956-964.

Capítulo 6

Discusión

En las primeras secciones se describieron las características y propiedades de los polímeros poliláctico y polihidroxibutirato. Una de las propiedades a modificar en ambos polímeros durante este trabajo, era su carácter relativamente hidrofóbico, lo cual significa una limitación para su uso en ingeniería de tejidos por disminuir su afinidad con los componentes biológicos y por hacerlos menos afines a las moléculas de agua durante el proceso de hidrólisis para su degradación. Para ello se realizó la irradiación de los polímeros PLLA y PHB con iones pesados de alta energía.

Se sabe que mediante la irradiación con iones pesados se generan cambios estructurales y químicos, los cuales hemos descrito en la sección 2, que pueden ser usados para modificar ciertas propiedades de los materiales [1, 2, 3].

Con las diferentes técnicas empleadas hemos podido estudiar algunos de dichos cambios. Debe aclararse que de todos los métodos usados, los resultados del análisis por microscopía electrónica de barrido en modo ambiental (ESEM), por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) en modo ATR y microIR en reflexión especular, por medio del ángulo de contacto y por espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), corresponden a caracterizaciones de la superficie del polímero. El estudio de las propiedades térmicas mediante análisis termogravimétrico (TGA-DTA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) y el estudio del peso molecular por viscosimetría, en cambio, determinan las características del polímero en todo su volumen.

En primer lugar es importante mencionar que el aspecto de las muestras a simple vista no cambió inmediatamente luego del tratamiento.

La técnica de microscopía electrónica de barrido no fue lo suficientemente sensible para determinar las modificaciones producidas por la irradiación en la superficie de los polímeros. La diferencia observada en las imágenes del PLLA antes y después del tratamiento pudo haber sido causada por un calentamiento de la muestra durante la irradiación ya que, si bien se trabajó con baja intensidad de corriente y tiempos prolongados para evitar dicho efecto, no puede asegurarse que este no se haya producido. Es importante destacar, además, que la temperatura de transición vítrea del PLLA es de aproximadamente 50°C, valor que pudo haber sido alcanzado fácilmente durante la irradiación de no disiparse completamente el calor en la muestra, modificando así el aspecto del polímero.

Mediante el estudio de la superficie de los polímeros por XPS se determinó una disminución de la banda asignada a los enlaces C-O luego de la irradiación lo cual indica que el tratamiento provocó la ruptura de dichos enlaces.

Esto es coherente con la disminución del peso molecular viscosimétrico hallada en las muestras de PHB irradiadas. Es bien conocido que entre los efectos producidos por la irradiación de polímeros podemos encontrar cortes de cadena o entrecruzamiento de las

mismas [4]. En nuestro caso los resultados confirman que el efecto predominante en estos polímeros es el corte de cadenas.

El corte de cadenas producido por la irradiación genera grupos funcionales terminales que ofrecen mayor polaridad a las moléculas de los polímeros irradiados. La disminución del ángulo de contacto observada en las superficies tratadas lo demuestra, indicando el aumento de su carácter hidrofílico. De acuerdo a los resultados obtenidos en estudios anteriores, este aumento de hidrofiliicidad en la superficie de los polímeros irradiados mejora la adhesión y proliferación de células cuando se los emplea como sustratos celulares [5, 6].

Mediante el análisis de los espectros infrarrojos se determinó una disminución de la fracción cristalina del PLLA y el PHB producida por el tratamiento. Diferentes estudios muestran que un polímero semicristalino expuesto al haz de iones pierde gradualmente su habilidad para cristalizar y, a partir de una fluencia crítica, se vuelve completamente amorfo [7]. Por ejemplo en trabajos previos [8, 9] se muestra que el grado de cristalinidad de un polímero (en este caso poliuretano) cambia sustancialmente con la irradiación iónica. La formación de entrecruzamientos y el subsiguiente reacomodamiento de las uniones cambian la morfología del polímero lo que genera un estado de desorden con la consecuente amorfización.

Al estudiar el comportamiento térmico de los polímeros se observó que los procesos de cristalización y fusión del PLLA se producen a menor temperatura luego de la irradiación del polímero. En el PHB, en cambio, no se encontraron dichos resultados. Esta diferencia puede deberse a que el rango de los iones ($21\mu\text{m}$) durante la irradiación de los polímeros corresponde a casi la mitad del espesor del PLLA ($50\mu\text{m}$) y menos de la cuarta parte del espesor del PHB ($100\mu\text{m}$), por lo tanto el volumen modificado no es el suficiente para que la técnica sea sensible al cambio.

Habiendo determinado, mediante la interpretación de los resultados de XPS y peso molecular viscosimétrico, que la irradiación produjo cortes en la estructura del polímero, la disminución de las temperaturas de cristalización y fusión puede atribuirse a la mayor movilidad de las cadenas cortas generadas.

Siguiendo con el comportamiento de los polímeros frente a la temperatura se observó una mayor susceptibilidad a la descomposición térmica tanto del PLLA como del PHB luego de la irradiación. En este caso, como lo que varía con el tratamiento es la temperatura a la cual comienza a producirse la descomposición, es de esperar que el cambio se distinga también en el PHB debido a que la descomposición se produce en forma gradual en un rango de temperaturas, por lo que la parte atravesada por el haz estaría contribuyendo al comienzo prematuro del proceso.

Por otro lado, dada la naturaleza irregular de los sistemas poliméricos cada muestra tiene un pico de descomposición propio, sin embargo, todas las muestras de PLLA irradiadas presentaron un mismo patrón de descomposición indicando una homogenización del polímero tratado frente a la descomposición térmica.

Finalmente, en cuanto a las modificaciones generadas por la irradiación se vio que las películas de PHB inmediatamente después de la irradiación no presentaron cambios en su aspecto, sin embargo luego de aproximadamente 60 días de almacenamiento a temperatura ambiente, en un lugar seco y resguardado de la exposición a la luz, presentaron un aspecto mas opaco revelando la zona irradiada.

Teniendo en cuenta, de los resultados obtenidos por DSC, que el PHB presenta un pico de cristalización a temperaturas cercanas a los 30°C y que el peso molecular viscosimétrico del polímero disminuyó como resultado del tratamiento, la opacidad de la región de la muestra irradiada puede deberse a la cristalización del polímero a temperatura ambiente facilitada por la mayor movilidad de las cadenas.

Debido a que la finalidad del tratamiento de los polímeros es modificar las propiedades de la superficie sobre la que se cultivarán las células para generar un tejido, los films de PLLA y las películas de PHB fueron irradiadas solo en una de sus caras, por lo que, en el implante, la superficie irradiada estará cubierta por el tejido y la superficie no irradiada será la que esté en contacto directo con el medio fisiológico. Sin embargo, debe estudiarse el efecto producido por la irradiación sobre la degradabilidad debido a que las moléculas de agua, que como se describió en la introducción son las responsables de la hidrólisis, pueden difundir entre el tejido y el sustrato, entre las células del tejido (dependiendo el tipo de tejido) y a través de la matriz polimérica alcanzando las zonas modificadas por la irradiación.

En la sección 1.3 se desarrollaron los posibles mecanismos de degradación de los polímeros implantados, entre los cuales la hidrólisis es el de mayor importancia debido a la gran disponibilidad de moléculas de agua presentes en el medio fisiológico. Por ello, en este trabajo, se llevaron a cabo los ensayos de hidrólisis enzimática y no enzimática para evaluar si la irradiación afecta la degradabilidad de los polímeros.

Durante la hidrólisis se controló la pérdida peso del polímero. Para el PHB solo se vió una pequeña pérdida de peso sin encontrarse diferencias entre las muestras irradiadas y no irradiadas. El peso molecular de este polímero, determinado por viscosimetría, en cambio, disminuyó como consecuencia del corte de las cadenas poliméricas durante la hidrólisis. Ambos resultados concuerdan con los obtenidos en un estudio previo de degradación *in vitro* del PHB [10].

En el PLLA la variación de peso no fue significativa. Esto, de acuerdo a la bibliografía [11], se justifica considerando que la estructura microporosa del polímero puede representar una barrera para el flujo de los productos de degradación al buffer de incubación.

A través del estudio de las superficies por XPS se determinó una disminución de los enlaces C-O y de los grupos O-C=O, lo que indica que se produjo la hidrólisis de las uniones éster. Debe aclararse que, por falta de tiempo, sólo se estudió la degradación en los polímeros irradiados, no pudiendo comparar, por esta técnica, con la degradación de los polímeros sin irradiar. Por lo expuesto solo se puede asegurar que el polímero irradiado efectivamente se degrada por hidrólisis.

La disminución del ángulo de contacto observada con la degradación, tanto del PHB como del PLLA, indica un aumento del carácter hidrofílico de sus superficies. Esto se debe a que durante la hidrólisis de las uniones éster que conforman la estructura del polímero, se generan grupos hidroxilos terminales que aumentan la polaridad de las moléculas incrementando así su hidrofiliidad. Los polímeros irradiados no presentaron diferencias respecto a los no irradiados en el aumento del carácter hidrofílico de las superficies debido a la degradación.

Considerando que la microestructura del polímero influye en su susceptibilidad a la degradación siendo la parte cristalina la más resistente [12], el aumento en la fracción

cristalina observado luego de la degradación, mediante el análisis de los espectros FTIR, tanto en los polímeros sin irradiar como en los irradiados, indica, por un lado que se produjo hidrólisis, y por otro, que ésta tuvo lugar mayoritariamente en las partes amorfas de los polímeros. Estos resultados confirman los obtenidos en previos estudios de hidrólisis *in vitro* del PLLA y el PHB [13 y 14].

En cuanto al estudio microscópico de las muestras, respecto al PHB, puede decirse que, teniendo en cuenta que las imágenes obtenidas pertenecen a la misma superficie antes y después de la hidrólisis, la degradación provocó un desgaste de la superficie independientemente de que la misma estuviera o no irradiada, indicando así que el polímero irradiado se degrada de la misma forma que el no irradiado.

Habiendo determinado ya que la irradiación produjo una amorfización de los polímeros y que la parte amorfa es la más susceptible a la degradación, las diferencias observadas en el PLLA entre la superficie irradiada degradada y la superficie no irradiada degradada pueden ser explicadas de la siguiente manera. En la superficie del polímero sin irradiar, la degradación produjo grandes agujeros en zonas discretas que corresponderían a la parte amorfa, más susceptible a la hidrólisis. Intercaladas con estas zonas, se ven importantes porciones de la matriz sin degradar, las que podría corresponder a la parte cristalina más resistente, quedando así una superficie degradada en forma heterogénea.

El polímero irradiado, en cambio, presentó toda la superficie cubierta por poros muy pequeños generados por la degradación. El hecho de que los iones hayan producido la amorfización de las zonas cristalinas sería la causa de que la superficie se vea homogéneamente degradada.

Ya vimos, con los estudios del peso molecular por viscosimetría y con el análisis por XPS, que la irradiación provocó cortes en las cadenas del PLLA y el PHB y que esto, provocó un aumento de la susceptibilidad de los polímeros al comienzo de la descomposición térmica, lo cual se determinó con el análisis termogravimétrico. La degradación, debido a la hidrólisis de los enlaces éster también generó cortes de cadena, facilitando de la misma manera la descomposición de los polímeros a alta temperatura. Debido a que el efecto producido por la irradiación (corrimiento del inicio de la descomposición térmica a menor temperatura) es mayor que el generado por la degradación, no pueden distinguirse las diferencias entre el polímero sin irradiar degradado y el polímero irradiado degradado. De esta manera puede sugerirse que la irradiación y la degradación, como consecuencia del corte de las cadenas del polímero harán que éste comience a descomponerse a menor temperatura, pero no puede verse si la degradación del polímero irradiado es diferente a la del polímero sin irradiar.

En el caso del PHB, sin embargo, si bien en el comienzo no se ven diferencias, se observa que el polímero irradiado degradado se descompone por completo a menor temperatura que el resto, indicando que las muestras de PHB expuestas al haz de iones pudieron haberse degradado más durante la hidrólisis *in vitro*.

Otro resultado a discutir del PHB en particular es el hecho de que las muestras que no fueron sometidas al ensayo de hidrólisis *in vitro* tienen, a baja temperatura, un comportamiento térmico diferente al de las muestras que si fueron sometidas a la degradación, y que este resultado se observa independientemente de que el polímero haya o no sido irradiado antes de la hidrólisis. Esto sugiere que tanto los polímeros irradiados como los no irradiados fueron degradados durante los ensayos *in vitro*.

Los cortes en la estructura del polímero producidos por la degradación, aumentan la movilidad de las cadenas lo cual disminuye la temperatura de transición vítrea del polímero degradado [11]. Este efecto, en el caso del PHB, solo se observó, luego del ensayo de hidrólisis *in vitro*, en las muestras previamente irradiadas. En el PLLA, si bien tanto en los films irradiados como en los no irradiados se vio la disminución de la temperatura de transición vítrea debido a la degradación, el cambio fue mayor en las muestras irradiadas. Sabiendo que la degradabilidad de un polímero depende, entre otros factores, de su peso molecular [12] y habiendo comprobado, mediante diferentes técnicas (XPS, viscosimetría), que el haz de iones produjo cortes en las cadenas poliméricas con disminución del peso molecular, podríamos sugerir que los polímeros PHB y PLLA modificados por la irradiación habrían sufrido más degradación durante la incubación *in vitro* que aquellos no irradiados.

Por calorimetría diferencial de barrido, en las películas de PHB irradiadas y no irradiadas sometidas a la degradación se vio un aumento del grado de cristalinidad debido a la degradación de la parte amorfa. Esto es coherente con el aumento en la fracción cristalina determinado por FTIR en las mismas muestras.

Al haber estudiado el comportamiento térmico por DSC del PHB determinamos que éste cristaliza a temperaturas cercanas a los 39°C. Teniendo en cuenta esto y sabiendo que los polímeros durante la hidrólisis sufren una disminución de la longitud de sus cadenas, el aumento de la fracción cristalina luego de la degradación *in vitro* podría deberse también a un fenómeno de cristalización que se produjo durante la incubación a 37°C por reacomodamiento de las cadenas cortas generadas durante la hidrólisis.

En el caso del PLLA, en cambio, solo los films previamente irradiados aumentaron su grado de cristalinidad luego de la hidrólisis. Debido a que la tasa de degradación disminuye conforme aumenta la cristalinidad [12] y que la irradiación produjo la amorfización de los polímeros, las muestras de PLLA irradiadas, al ser menos cristalinas, se estarían degradando más fácilmente por lo que solo en ellas se vería el cambio en el grado de cristalinidad luego del ensayo de hidrólisis. Esto estaría de acuerdo con los resultados ya discutidos del análisis microscópico de este polímero. Además, al estudiar las modificaciones producidas por la irradiación en el PLLA se vio que el tratamiento con el haz de iones disminuyó la temperatura de fusión del polímero y es sabido que esta tiene un fuerte efecto en la degradabilidad, siendo aquellos polímeros de mayor temperatura de fusión menos degradables [12].

Por otro lado, si bien no se observaron diferencias en cuanto al aumento de cristalinidad luego de la degradación entre las películas de PHB irradiadas y no irradiadas, solo en las muestras expuestas al haz de iones se vio, en los resultados del análisis térmico diferencial, una disminución en la temperatura de fusión luego de la degradación. Como se discutió anteriormente, este cambio, que coincide con la disminución de la temperatura de transición vítrea observada en estas mismas muestras, se debe a una mayor movilidad de las cadenas cortas generadas, en este caso, por la hidrólisis. Además, el PHB irradiado, a diferencia del no irradiado, luego de la degradación dejó de cristalizar a temperaturas cercanas a los 65°C. Considerando una vez más el corte de cadenas producido por la hidrólisis, este cambio en el comportamiento térmico podría atribuirse a que toda la cristalización del polímero irradiado degradado se estaría dando a baja temperatura (39°C aproximadamente) debido a que las cadenas serían suficientemente cortas para reacomodarse con poca energía (baja temperatura). Cabe resaltar que esta muestra (PHB irradiado y degradado) es la misma que se diferenció del resto porque, además de disminuir sus temperaturas de fusión y transición vítrea

luego de la degradación, se descompuso térmicamente por completo a menor temperatura. Estas diferencias encontradas entre el polímero PHB irradiado luego de la degradación respecto al no irradiado indicarían que las películas modificadas por el tratamiento con el haz de iones estarían siendo más degradadas durante el ensayo de hidrólisis *in vitro*.

En los resultados obtenidos del estudio de las muestras de PHB por viscosimetría se vio que, si bien tanto los polímeros irradiados como los no irradiados sufrieron una disminución de su peso molecular luego de la degradación indicando que en ambos casos se produjo la hidrólisis de las uniones éster, la disminución de peso molecular como consecuencia de la incubación fue menor en los polímeros irradiados.

Para discutir este resultado, deben tenerse en cuenta las condiciones en las que se realizó el ensayo de degradación *in vitro* (temperatura de incubación de 65°C).

Habiendo determinado por el resto de las técnicas que la degradación *in vitro* de los polímeros irradiados fue igual o mayor que la de los polímeros no irradiados, de haber sometido a las muestras a las mismas condiciones de incubación se esperaría obtener una disminución de peso molecular luego de la degradación de los polímeros irradiados igual o mayor que la de los polímeros no irradiados. Sin embargo, el hecho de haber incubado las muestras a 65°C durante seis días para acelerar el proceso de degradación desencadenó otro resultado.

Ya vimos que la irradiación produjo mayoritariamente cortes en las cadenas del polímero, aumentando la movilidad de las mismas y facilitando el acomodamiento durante la cristalización. Del análisis por DSC, se determinó que el PHB puede cristalizar en un rango de temperatura entre los 30°C y los 69°C aproximadamente. Si se considera que la incubación se llevó a cabo a 65°C, temperatura a la cual el polímero puede cristalizar, y que la irradiación disminuyó la longitud de las cadenas, se puede esperar que el polímero irradiado haya cristalizado durante la incubación. Recordando que la tasa de degradación disminuye conforme aumenta la cristalinidad del polímero [12] se explica que el PHB irradiado, haya sido menos degradado durante el ensayo de hidrólisis acelerado por temperatura.

Debe aclararse que si bien al comienzo de esta discusión se explicó que en este trabajo se llevaron a cabo los ensayos de hidrólisis enzimática y no enzimática para evaluar si la irradiación afecta la degradabilidad de los polímeros, todos los resultados expuestos se refieren a ambos ensayos en forma indistinta. No hubo diferencia en la degradación, evaluada por las técnicas explicadas, en los ensayos con y sin enzima. Esto, considerando que la enzima fue sometida a un control positivo a través del cual se aseguró la actividad de la misma, indica que los polímeros estudiados no son degradados *in vitro* por la enzima elegida en las condiciones de ensayo empleadas y que la degradación estudiada fue producto de una simple hidrólisis sin catálisis enzimática.

Habiendo evaluado todos los resultados se logró determinar el efecto de la irradiación en las propiedades y en la degradabilidad de los polímeros PLLA y PHB. El incremento de carácter hidrófilico, la amortización y el consecuente aumento de la degradación los hace más apropiados para su uso como soporte de células y su posterior implantación.

Referencias

- [1] Hirvonen, J. K., *Mater. Sci. Eng. A* 116 (1989) 167
- [2] Cuomo, J.J., Rossnagel, S. M., Kaufman, H. R. (Eds.), *Handbook of Ion Beam Processing Technology* (1989)
- [3] Smidt, F. A., *Int. Mat. Rev.* 35 (1990) 61
- [4] W. Ensinger, *Radiation Measurements* 40 (2005) 712-721
- [5] C. R. Arbeitman, M.F. del Grosso, I. Ibáñez, G. García Bermúdez, H. Duran, R. Mazzei, *Irradiación de Polímeros Biocompatibles para su utilización como sustratos de cultivos celulares*, Congreso SAM/CONAMET 2009.
- [6] C. R. Arbeitman, M.F. del Grosso, I. Ibáñez, G. García Bermúdez, H. Duran, V. C. Chappa, R. Mazzei, M. Behar, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 268 (2010) 3059-3062.
- [7] Zdeno Spitalský, Igor Lacík, Elena Lathová, Ivica Janigová, Ivan Chodák, *Polymer Degradation and Stability* 91 (2006) 856-861.
- [8] A. Le Bouëdec, N. Betz, S. Esnouf, A. Le Möel, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 151 (1999) 89-96.
- [9] E. Balanzat, N. Betz, S. Bouffard, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 105 (1995) 46-54.
- [10] Thomas Freier, Carmen Kunze, Claudia Nischan, Sven Kramer, Katrin Sternberg, Marko Sab, Ullrich T. Hopt, Klaus-Peter Schmitz, *Biomaterials* 23 (2002) 2649-1657.
- [11] Rosella Dorati, Claudia Colonna, Ida Genta, Tiziana Modena, Bice Conti, *Polymer Degradation and Stability* 95 (2010) 694-701.
- [12] Yutaka Tokiwa, Buenaventurada P. Calabia, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72 (2006) 244-251.
- [13] Nadarajah Vasanthan, Onah Ly, *Polymer Degradation and Stability* 94 (2009) 1364-1372.
- [14] Xiang-Hua Qu, Qiong Wu, Kun-Yang Zhang, G. Q. Chen, *Biomaterials* 27 (2006) 3540-3548.

Capítulo 7

Conclusiones

En este trabajo se irradiaron los polímeros biodegradables PHB y PLLA con haces de iones pesados de alta energía con el fin de modificar sus propiedades superficiales para mejorar la adhesión y proliferación celular.

Se estudió la degradabilidad de los polímeros modificados por la irradiación caracterizando, mediante diferentes técnicas, los cambios producidos por la hidrólisis.

Como se vio a través de los resultados del análisis químico de las superficies por XPS y de la determinación de peso molecular viscosimétrico, el efecto predominante de la irradiación en los polímeros fue el corte de cadenas. Esto provocó la amorfización del material, lo cual fue comprobado mediante los análisis de Espectroscopía Infrarroja (disminución de la cristalinidad) y de TGA (disminución de las temperaturas de cristalización, de fusión y de descomposición térmica). Debido al tratamiento se encontró también un aumento del carácter hidrofílico de la superficie, medido a través del ángulo de contacto.

Durante la degradación *in vitro* se produjo la hidrólisis de las cadenas de los polímeros independientemente de que estos hubieran o no sido irradiados antes de la degradación, lo cual se determinó por la disminución del peso molecular viscosimétrico, la menor cantidad de uniones C-O determinadas por XPS y el aumento del carácter hidrofílico de las superficies evaluado por el ángulo de contacto.

Del estudio de los espectros infrarrojos y del análisis por calorimetría diferencial de barrido se verificó que la hidrólisis se produjo mayoritariamente en la parte amorfa de los polímeros.

En el caso del PLLA en particular la superficie irradiada fue degradada de manera más homogénea que la superficie sin irradiar debido a la amorfización producida por el tratamiento. Esto lo hace más adecuado para su uso como sustrato de células y su posterior implantación.

Si bien se determinó que todos los polímeros, irradiados y no irradiados, se degradaron por hidrólisis, de los resultados obtenidos mediante las técnicas DSC y TGA se concluye que el PHB y el PLLA modificados por la irradiación sufrieron más degradación que los no irradiados debido a que solo en ellos se vio la disminución de las temperaturas de transición vítrea y de fusión debido al corte de las cadenas. Además, por un lado de todas las muestras de PLLA, solo el polímero irradiado aumentó su grado de cristalinidad luego de la degradación y por el otro, de todas las muestras de PHB, solo el polímero irradiado se descompuso térmicamente a menor temperatura luego de la degradación. Ambos hechos confirman que las modificaciones producidas por la irradiación en los polímeros PLLA y PHB aumentan su degradabilidad.

En conclusión, la irradiación además de mejorar las propiedades de las superficies de los polímeros PLLA y PHB lo cual, como se ha visto en trabajos anteriores del grupo, facilita la adhesión y proliferación celular, favorece su degradación hidrolítica *in vitro* haciéndolo más apropiado para su aplicación en implantes médicos.

Es esencial notar que en este trabajo no se tiene en cuenta la degradación asociada a la actividad celular ni a la respuesta del sistema inmunológico. En algunos casos, estos fenómenos biológicos pueden cambiar significativamente los resultados obtenidos. Por ello debería tenerse en cuenta, como perspectiva futura, el estudio de la degradación *in vivo* de los polímeros asociados a las células.