RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes

Universidad
Nacional
de Quilmes

Carbajal, María Laura

Bioreconocimiento sobre superficies poliméricas: aplicaciones en biotecnología

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:
Carbajal, M. L. (2016). Bioreconocimiento sobre superficies poliméricas: aplicaciones en biotecnología (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/201

Puede encontrar éste y otros documentos en: https://ridaa.unq.edu.ar

Universidad Nacional de Quilmes
Roque Sáenz Peña 352 // Bernal
Buenos Aires // Argentina
t.: (+41 11) 4365 7100
f.: (+54 11) 4365 7101
info@unq.edu.ar

Carbajal, María Laura, Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto,
Diciembre de 2008, 236 pp.,
http://ridaa.unq.edu.ar,
Universidad Nacional de Quilmes, Secretaría de Posgrado,
Doctorado en Ciencias Básicas y Aplicadas

Bioreconocimiento sobre Superficies Poliméricas: Aplicaciones en Biotecnología

María Laura Carbajal

mlcarbajal@unq.edu.ar

Resumen

Los materiales funcionales avanzados son altamente demandados por diferentes campos para una amplia variedad de aplicaciones. Campos que abarcan desde la biocatálisis hasta la cromatografía, y del diagnóstico hasta los sensores. La propuesta es obtener nuevos materiales con propiedades superficiales modificadas que establezcan una interacción específica con proteínas naturales y recombinantes. Estos materiales poliméricos tienen una aplicación directa en los sistemas de purificación de proteínas y en sistemas de diagnostico.

Las radiaciones ionizantes son capaces de modificar la estructura de los materiales y en particular de los polímeros, ya que generan deficiencias electrónicas (excitaciones e ionizaciones). En este trabajo se utilizan distintas fuentes de radiación ionizante, ya sea de naturaleza corpuscular (electrones acelerados e iones pesados acelerados) como de naturaleza electromagnética (rayos γ), para modificar los diferentes polímeros en estudio.

El objetivo específico de este trabajo es obtener nuevos materiales poliméricos macro porosos injertados con un copolímero de glicidilmetacrilato (GMA) y derivados de la acrilamida para mejorar la hidrofilicidad y accesibilidad de los ligandos a las proteínas.

Para ello, se recurre a la modificación por injerto radio inducido mediante diferentes métodos de síntesis que permiten realizar sobre los materiales distintos grados de modificaciones. Entre ellos se encuentran: la pre-rradiación en vacío, la pre-irradiación en aire, y la técnica en simultáneo. Esta última técnica en particular también ser aplicada sobre nanoporos originados por trazas de iones pesados acelerados.

En primera instancia, se modifican membranas de fibra hueca macroporosas de polieti- leno (PE) por el método de pre irradiación en vacío. En esta síntesis el injerto es iniciado por radicales libres que fueron previamente generados sobre el material por el bombardeo con haces de electrones acelerados (radiación β). Se evaluó la polimerización de monómeros de GMA y de GMA coinjertado con dimetilacrilamida (DMAA), incorporando fenil- alanina como ligando pseudoespecífico. Se obtuvieron grados de injerto del orden de 200 % y rendimientos en la conversión de grupos reactivos de hasta 64 %. También se observaron cambios significativos en las propiedades hidrofílicas de los materiales modificados. Luego, se estudia la modificación de PE poroso y no poroso (HDPE), incorporando AAm

por medio del injerto radio inducido utilizando el método indirecto de peroxidación (en dos etapas). Los grupos peróxidos reactivos son generados sobre el material durante la primera etapa mediante la acción de rayos γ. Se obtienen % GI de hasta 80 % con AAm sobre PE poroso. Se observa del que el injerto de la poliAAm invade al PE produciendo la destrucción material.

Posteriormente, se analiza la técnica de injerto en simultáneo sobre materiales de PE y de polisulfona (PSf). Se incorpora GMA y GMA/DMAA y se derivatiza con IDA-Ni(II) y moléculas organoarseniacales (APA) como ligandos pseudoespecíficos. Se obtienen grados de injerto de hasta el 60 %, siendo el 20 %GI suficiente para el desarrollo del trabajo.

Mediante las diferentes técnicas por injerto estudiadas se obtuvieron nuevos materia- les con propiedades superficiales diferentes debido a la incorporación de GMA, GMA-co- DMAA y AAm. Fue posible obtener materiales macro porosos con elevada concentración de grupos químicamente reactivos y con gran superficie interna de adsorción (red polimérica- ca tridimensional) aumentando el rendimiento en la inmovilización y en la capacidad de adsorción de este tipo de materiales. A través de la aplicación del coinjerto, aumentó 1,5 veces la concentración de ligando en todos las materiales GMA-co-DMAA con respecto a las membranas GMA, además fue obtenido un avance substancial en el mejoramiento de la hidrofilicidad y reactividad de los polímeros injertados. Cabe aclarar que no se ha logrado injertar DMAA como único monómero en las condiciones evaluadas, pero sí fue exitosa su incorporación junto con GMA.

El injerto con GMA mediante la técnica en simultáneo también se utiliza para modificar superficialmente nanoporos perfectos de laminas de polietilentereftalato (PET). Estos nanoporos son obtenidos a partir de trazas latentes generadas por bombardeo con iones pesados acelerados. Se incorpora IDA-Ni(II) como ligando pseudoespecífico. Se obtienen capas homogéneas de poliGMA de aproximadamente 5 nm de espesor con un 1 % GI %. Estas diferentes técnicas estudiadas demostraron ser, en cuanto al grado de modificación, ampliamente superiores a la química de derivatización convencional.

Una vez estudiadas las diferentes técnicas de injerto, obtenido y caracterizado los nuevos materiales funcionales avanzados, se prosigue entonces con la segunda parte de los objetivos propuestos: lograr obtener un sistema para inmovilizar proteínas recombinantes en forma orientada, a través de la unión a ligandos químicos unidos covalentemente a estos materiales poliméricos modificados con injertos de GMA y GMA/DMAA.

En particular, investigaciones sobre la síntesis y la caracterización de este tipo de materiales fueron llevadas a cabo mediante el estudio de la modificación de PSf por la técnica en simultaneo incorporando químicamente ligandos de naturaleza arseniacal. Estos compuestos poseen afinidad por tioles cercanos como los que se encuentran en motivos estructurales del tipo Cys-X-X-Cys en proteínas como la Tioredoxina (Trx). El punto dominante de esta interacción es que presenta especificidad y requisitos estructurales. Los compuestos órgano-arseniacales fueron sintetizados, caracterizados fisicoquímicamente, y posteriormente se estudio, por diferentes metodologías, la interacción que presentan frente a ditioles de moléculas de bajo peso molecular como el DTT, BAL y con monotioles como el β-ME, entre otros.

Se presenta el estudio de la interacción en el estado sólido de los diferentes ligandos arseniacales con Trx. Se evaluó y comparó la especificidad de unión así como las cinéticas de reacción mediante diferentes técnicas analíticas en función de la naturaleza del ligando y del pH.

Finalmente, se evalúa la capacidad de unir específicamente proteínas de fusión a Trx y su potencialidad como soporte alternativo para su uso en kits de diagnóstico.

Director: Dr. Mariano Grasselli

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Biorreconocimiento sobre Superficies Poliméricas: Aplicaciones en Biotecnología



Lic. María Laura Carbajal

Tesis presentada para obtener el título de
Doctora de la Universidad Nacional de Quilmes
Mención Ciencias Básicas y Aplicadas

Director: Dr. Mariano Grasselli

Bernal, Diciembre de 2008

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
LABORATORIO DE MATERIALES BIOTECNOLÓGICOS

Bioreconocimiento Sobre Superficies Poliméricas: Aplicaciones en Biotecnología

Lic. María Laura Carbajal

Tesis presentada para obtener el título de
Doctora de la Universidad Nacional de Quilmes
Mención Ciencias Básicas y Aplicadas

Director: Dr. Mariano Grasselli

Bernal, Diciembre de 2008

El trabajo que dio cuerpo a esta tesis fue financiado en parte por el Consejo Nacional de Investigaciones Científico Tecnológicas de la República Argentina, la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, la Universidad Nacional de Quilmes, y la Fundación Carbajal para la Ciencia.



Bioreconocimiento Sobre Superficies Poliméricas: Aplicaciones en Biotecnología
Copyleft ⓒ Lic. María Laura Carbajal, 2008.
E-mail: lcarbaj@unq.edu.ar

Este trabajo esta dedicado a...

...mi familia entera, en especial a Mónica y a José Martín.
...mis amigos del alma, Mariana, Mariel, Rosa, Leo y Chelo que con alegría y música fueron mi cable a tierra en todo momento.
...todos los que de alguna manera estuvieron y me acompañaron en este camino de vida.
Gracias.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Comisión de Investigaciones Científicas del Gobierno de la Provincia de Buenos Aires (CIC-BA), a la Comisión Nacional de Energía Atómica - Centro Atómico Ezeiza (CNEA-Ezeiza), por aportar los recursos para la realización de este trabajo.

A la Bioquímica Silvina Valdez y al Dr. Edgardo Poskus del Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU), Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA), por las colaboraciones en los experimentos con la GAD-Trx.

A la Dra. Nora Vizioli del Departamento de Química Analítica y Fisicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA).

A la Dra. Ana Cauerhff del Laboratorio de Inmunología Estructural y Molecular del Instituto Leloir (CONICET) por la estrecha vinculación y colaboración en los experimentos mediante la tecnología del Biosensor.

Al *Laboratoire Leon Brillouin* (LLB, Francia) y al *Takasaki Radiation Chemistry Research Establishment, Japan Atomic Energy Research Institute* (Takasaki, Japón) por las colaboraciones científico-técnicas.

Al Dr. Eduardo Smolko de la Unidad de Aplicaciones Tecnológicas y Agropecuarias, Laboratorio de Polímeros del Centro Atómico Ezeiza (CNEA) por el apoyo brindado, la excelente predisposición y los oídos abiertos para cualquier consulta y/o nueva idea.

En especial, al Dr. Mariano Grasselli por las oportunidades brindadas y por aceptar guiarme y acompañarme en este camino.

A todos los compañeros y amigos, profesores, colegas y alumnos que hicieron de este espacio parte de mi vida cotidiana. En especial al Dr. Gustavo Curutchet por sus consejos y por ser como es. A todos los que aportaron para que el Radio Pasillo sea divertido...

A Pablo "Fidel" Martínez López, por introducirme al mundo del LaTeX y ayudarme siempre que pudo con la infinidad de errores, warnings y badboxes con los que tuvimos que lidiar.

Al grupo de trabajo que, si bien algunos fueron y vinieron, de a poco fue creciendo y con el cual compartí el día a día (y de vez en cuando una rica y fría cerveza o un buen helado): Ana Ventura, Lucia Speroni, Martín García, Claudia Britos, Romina Hidalgo, Pablo Giuliano, Eugenio Cálcena, Gustavo Gotelli, Jorge Trelles, Cintia Fernández, Federico Juiz, Sonia Salvatore, Silvia Soto, Flavia Quiroga y Fernando do'Carmo.

A los que me "sufrieron" como docente. Ya que con ellos aprendí mucho más que sólo ser docente-investigadora.

Publicación en revistas internacionales

Publicaciones relacionadas con este trabajo de Tesis:

"*Radiation-induced GMA/DMAA graft copolymerization onto porous PE hollow-fiber membrane*".
M. Grasselli, M.L. Carbajal, F. Yoshii & T. Sugo. Journal of Applied Polymer Science 87, Issue 10 (2003) 1646-1653. ISSN 0021-8995.

"*Oriented immobilization of proteins on grafted porous polymers*".
Carbajal, M.L.; Smolko, E.E; & Grasselli, M. NIMBS (Nuclear Instrument and Methods in Physics Research B) 208 (2003) 416-423. ISNN 0168-583X.

"*On-line affinity selection of histidine-containing peptides using a polymeric monolithic support for capillary electrophoresis*".
Nora M. Vizioli, María L. Rusell, M. Laura Carbajal, Clyde N. Carducci & Mariano Grasselli. Electrophoresis 26, Issue 15 (2005) 2942 - 2948. ISSN 1522-2683.

Abreviaturas

ϵ: Coeficiente de extinción molar (en $M^{-1}cm^{-1}$)

λ: Longitud de onda (cm^{-1})

μ: Velocidad específica de crecimiento microbiano (hs^{-1})

β-ME: β-mercaptoetanol

δ_x: Desplazamiento químico de un núcleo x

AAm: Acrilamida

Ab: Anticuerpos

Ae: Actividad específica

APA(V): Ácido (4-aminofenil) arsónico o ácido arsanílico o ácido *p*-aminobenceno-arsónico

APACl(III): *p*-aminofenildicloroarsina-HCl o diclorarsenanilina

APAO(III): Aminofenilarsin-óxido

Arg: Arginina

ATR: Espectroscopía de reflectancia total atenuada

BAL: 2,3-dimercapto-1-propanol

CCD: Cromatografía en capa delgada (en inglés *Thin layer chromatography* - TLC)

Cys: Cisteína

DMID: Diabetes *mellitus* insulino dependiente

DMAA: Dimetilacrilamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DTNB: Ácido 5,5´-ditiobis-(2-nitrobenzoico)

DTT: Ditiotreitol

EDA: Etilendiamina

EDAX: Fluorescencia por dispersión de rayos X (*Energy Dispersive X-Ray Fluorescence*)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

G.I.%: Grado de injerto porcentual

GAD: Glutamato decarboxilasa

Gly: Glicina o ácido aminoacético

GMA: Glicidilmetacrilato

HDPE: Polietileno de alta densidad (*high density polyethylene*)

HPLC: Cromatografía líquida de alta performance

IDA: Ácido Iminodiacético

IMAC: Cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados

IPTG: Isopropil-tio-β-galactósido ó isopropil-β-D-tiogalactopiranósido

IR: Espectroscopía de infrarrojo

kDa: kilodalton

kGy: Dosis absorbida de energía ionizada

LDPE: Polietileno de baja densidad (*low density polyethylene*)

MBP: *maltose binding protein* o proteína de unión a maltosa

MEA: etanolamina, 2-aminoetanol o monoetanolamina

NTB: nitrobenzoato

PAGE-SDS: electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

PBMA: *p*-[bis-(β-hidroxietilmercapto)-arsino]-anilina

PE: Polietileno

PET: Polietileno Tereftalato

Pf: Punto de fusión

Phe: Fenilalanina

P_i: Peso de la fibra luego de la reacción por injerto

PM: Peso molecular

P*o*: peso de la fibra antes de la reacción por injerto

ppm: partes por millón

PSf: Polisulfona

Px: Peroxidasa

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

SANS: Dispersión de neutrones a pequeños ángulos (del inglés *Small-Angle Neutron Scattering*)

SEM: Microscopía electrónica de barrido

SW %: Parámetro relacionado con la capacidad de hidratación (*swelling water*)

TEA: Trietilamina

Trx: Tioredoxina

UV: Ultravioleta

Wt: *wild type* o tipo salvaje

Definición de Unidades, Equivalencias y Factores de Conversión

- Dosis absorbida (D): Representa la energía absorbida por cantidad de materia.
  Luego de 1986, la unidad del SI es el Gray (Gy). La unidad anterior es el rad, que aún se encuentra vigente.
  1 Gy = 1 J de energía absorbida /kg = 100 rad
- 1 eV es la energía necesaria para mover un electrón en un campo eléctrico de 1 volt en el vacío. 1 eV= $1{,}6.10^{-19}$ CV = $1{,}6.10^{-19}$ J
- MeV: mega electrón volts es el poder de penetración o alcance E
- Carga elemental e: $1{,}6.10^{-19}$ C
- 1 Joule = 0,239 cal = 107 ergios = $6{,}2.10^{18}$ eV
- 1 eV/fotón = 96,5 kJ/mol = 8065 cm^{-1} = 1240 nm
- Valor G: número de átomos, moléculas, iones destruídas o producidas / 100 eV de energía absorbida.
- En promedio, un kwh de energía absorbida es aproximadamente igual a 360 Mrad.kg (ó 3600 kGy.kg).

Nuestro temor más grande no es el de sentirnos débiles.
Tenemos miedo de ser inconmensurablemente poderosos.
Es nuestra luz, no nuestra oscuridad, lo que nos atemoriza.
Nos preguntamos: "¿Quién soy yo, para ser tan brillante, talentoso, extraordinario?"
En realidad: "¿Quién soy yo, para no serlo?..."
Que finjas pequeñez no le sirve al mundo. No le sirve que te encojas para que otra gente no se sienta insegura a tu lado. Y si dejamos hacer brillar nuestra luz, inconscientemente permitimos que los demás hagan lo mismo. Y si nos liberamos de nuestros temores, automáticamente nuestra presencia liberará a los demás.

Nelson Mandela, 1994.
Extracto: Discurso Inaugural

Resumen

Los materiales funcionales avanzados son altamente demandados por diferentes campos para una amplia variedad de aplicaciones. Campos que abarcan desde la biocatálisis hasta la cromatografía, y del diagnóstico hasta los sensores. La propuesta es obtener nuevos materiales con propiedades superficiales modificadas que establezcan una interacción específica con proteínas naturales y recombinantes. Estos materiales poliméricos tienen una aplicación directa en los sistemas de purificación de proteínas y en sistemas de diagnóstico.

Las radiaciones ionizantes son capaces de modificar la estructura de los materiales y en particular de los polímeros, ya que generan deficiencias electrónicas (excitaciones e ionizaciones). En este trabajo se utilizan distintas fuentes de radiación ionizante, ya sea de naturaleza corpuscular (electrones acelerados e iones pesados acelerados) como de naturaleza electromagnética (rayos γ), para modificar los diferentes polímeros en estudio.

El objetivo específico de este trabajo es obtener nuevos materiales poliméricos macroporosos injertados con un copolímero de glicidilmetacrilato (GMA) y derivados de la acrilamida para mejorar la hidrofilicidad y accesibilidad de los ligandos a las proteínas.

Para ello, se recurre a la modificación por injerto radioinducido mediante diferentes métodos de síntesis que permiten realizar sobre los materiales distintos grados de modificaciones. Entre ellos se encuentran: la pre-rradiación en vacío, la pre-irradiación en aire, y la técnica en simultáneo. Esta última técnica en particular también será aplicada sobre nanoporos originados por trazas de iones pesados acelerados.

En primera instancia, se modifican membranas de fibra hueca macroporosas de polietileno (PE) por el método de preirradiación en vacío. En esta síntesis el injerto es iniciado por radicales libres que fueron previamente generados sobre el material por el bombardeo con haces de electrones acelerados (radiación β). Se evalúo la polimerización de monómeros de GMA y de GMA coinjertado con dimetilacrilamida (DMAA), incorporando fenilalanina como ligando pseudoespecífico. Se obtuvieron grados de injerto del orden de 200 % y rendimientos en la conversión de grupos reactivos de hasta 64 %. También se observaron cambios significativos en las propiedades hidrofílicas de los materiales modificados. Luego, se estudia la modificación de PE poroso y no poroso (HDPE), incorporando AAm por medio del injerto radioinducido utilizando el método indirecto de peroxidación (en dos etapas). Los grupos peróxidos reactivos son generados sobre el material durante la primera etapa mediante la acción de rayos γ. Se obtienen % GI de hasta 80 % con AAm sobre PE poroso. Se observó que el injerto de la poliAAm invade al PE produciendo la destrucción del material.

Posteriormente, se analiza la técnica de injerto en simultáneo sobre materiales de PE y de polisulfona (PSf). Se incorpora GMA y GMA/DMAA y se derivatiza con IDA-Ni(II) y

moléculas organoarseniacales (APA) como ligandos pseudoespecíficos. Se obtienen grados de injerto de hasta el 60 %, siendo el 20 %GI suficiente para el desarrollo del trabajo.

Mediante las diferentes técnicas por injerto estudiadas se obtuvieron nuevos materiales con propiedades superficiales diferentes debido a la incorporación de GMA, GMA-co-DMAA y AAm. Fue posible obtener materiales macroporosos con elevada concentración de grupos químicamente reactivos y con gran superficie interna de adsorción (red polimérica tridimensional) aumentando el rendimiento en la inmovilización y en la capacidad de adsorción de este tipo de materiales. A través de la aplicación del coinjerto, aumentó 1,5 veces la concentración de ligando en todos las materiales GMA-co-DMAA con respecto a las membranas GMA, además fue obtenido un avance substancial en el mejoramiento de la hidrofilicidad y reactividad de los polímeros injertados. Cabe aclarar que no se ha logrado injertar DMAA como único monómero en las condiciones evaluadas, pero sí fue exitosa su incorporación junto con GMA.

El injerto con GMA mediante la técnica en simultáneo también se utilizó para modificar superficialmente nanoporos perfectos de láminas de polietilentereftalato (PET). Estos nanoporos son obtenidos a partir de trazas latentes generadas por bombardeo con iones pesados acelerados. Se incorpora IDA-Ni(II) como ligando pseudoespecífico. Se obtienen capas homogéneas de poliGMA de aproximadamente 5 nm de espesor con un 1 % GI %. Estas diferentes técnicas estudiadas demostraron ser, en cuanto al grado de modificación, ampliamente superiores a la química de derivatización convencional.

Una vez estudiadas las diferentes técnicas de injerto, obtenido y caracterizado los nuevos materiales funcionales avanzados, se prosigue entonces con la segunda parte de los objetivos propuestos: lograr obtener un sistema para inmovilizar proteínas recombinantes en forma orientada, a través de la unión a ligandos químicos unidos covalentemente a estos materiales poliméricos modificados con injertos de GMA y GMA/DMAA.

En particular, investigaciones sobre la síntesis y la caracterización de este tipo de materiales fueron llevadas a cabo mediante el estudio de la modificación de PSf por la técnica en simultáneo incorporando químicamente ligandos de naturaleza arseniacal. Estos compuestos poseen afinidad por tioles cercanos como los que se encuentran en motivos estructurales del tipo Cys-X-X-Cys en proteínas como la Tioredoxina (Trx). El punto dominante de esta interacción es que presenta especificidad y requisitos estructurales. Los compuestos órgano-arseniacales fueron sintetizados, caracterizados fisicoquímicamente, y posteriormente se estudió, por diferentes metodologías, la interacción que presentan frente a ditioles de moléculas de bajo peso molecular como el DTT, BAL y con monotioles como el β-ME, entre otros.

Se presenta el estudio de la interacción en el estado sólido de los diferentes ligandos arseniacales con Trx. Se evaluó y comparó la especificidad de unión así como las cinéticas de reacción mediante diferentes técnicas analíticas en función de la naturaleza del ligando y del pH.

Finalmente, se evalúa la capacidad de unir específicamente proteínas de fusión a Trx y su potencialidad como soporte alternativo para su uso en kits de diagnóstico.

Objetivos

Este plan de tesis tiene como objetivo fundamental la modificación de materiales poliméricos para generar sobre su superficie un reconocimiento específico a una o varias biomoléculas. Se espera encontrar nuevas aplicaciones de estos materiales en el área biotecnológica.

Dicho objetivo se llevará a cabo a través de la modificación superficial de polímeros utilizando diferentes técnicas que involucran a las radiaciones ionizantes y la derivatización química para la inmovilización de compuestos con afinidad por macromoléculas.

Índice general

I Introducción a la Modificación de Materiales Poliméricos Macroporosos **1**

1. Introducción **3**
1.1. Polímeros como biomateriales . . . 3
1.1.1. Definición . . . 4
1.1.2. Estructura y Nomenclatura . . . 5
1.1.3. Descripción de los materiales poliméricos base . . . 5
1.1.4. Descripción de los monómeros utilizados . . . 7
1.2. Métodos de síntesis de copolímeros . . . 8
1.2.1. Reacciones de transferencia de cadena . . . 9
1.2.2. Ataque de radicales sobre polímeros insaturados . . . 10
1.2.3. Iniciadores de radicales libres . . . 10
1.2.4. Síntesis fotoquímica . . . 12
1.2.5. Degradación mecánica . . . 13
1.2.6. Síntesis Iónica . . . 13
1.2.7. Reacciones de condensación y de apertura de anillo . . . 14
1.2.8. Síntesis radio-inducida . . . 14
1.3. Cinéticas del proceso de injerto por radiación . . . 19
1.3.1. Injerto con dos monómeros . . . 21
1.4. Técnicas de análisis . . . 22
1.4.1. Gravimetría: determinación del Grado de Injerto porcentual (G.I.%) 23
1.4.2. FT-IR . . . 23
1.4.3. IR-ATR . . . 24
1.4.4. Microscopía electrónica de barrido . . . 25
Referencias . . . 27

II Materiales Poliméricos: Modificación por Radiaciones Ionizantes **29**

2. Polimerización por Injerto con Preirradiación al Vacío **31**
2.1. Introducción . . . 31
2.1.1. Importancia del acelerador de electrones para uso industrial . . . 31

2.1.2. Haz de electrones y Aceleradores . . . 32
2.1.3. Sobre dosis y velocidades de dosis . . . 33
2.1.4. Polimerización por injerto por activación con haces de electrones acelerados . . . 34
2.2. Materiales y Métodos . . . 36
2.2.1. Polímero base y monómeros a injertar . . . 36
2.2.2. Procedimiento para la reacción de polimerización por Injerto en membranas macroporosas de PE . . . 36
2.2.3. Análisis de las muestras irradiadas por determinación del Grado de Injerto porcentual (GI%) y Grados de Conversión . . . 38
2.2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM) . . . 38
2.2.5. FT-IR . . . 38
2.2.6. Determinación de la proporción de monómeros de GMA y DMAA en el copolímero . . . 39
2.2.7. Acoplamiento de Phe . . . 40
2.2.8. Determinación del flujo de filtración de agua pura . . . 40
2.2.9. Determinación del parámetro de hidratación . . . 40
2.3. Resultados y Discusión . . . 41
2.3.1. Determinación de la proporción de monómeros de GMA y DMAA en el copolímero . . . 41
2.3.2. Comparación de las velocidades de injerto . . . 41
2.3.3. Acomplamiento de Phe . . . 43
2.3.4. Determinación del flujo de permeación de agua pura y del parámetro de hidratación . . . 45
2.3.5. Microscopía electrónica de barrido (SEM) . . . 48
2.4. Conclusión . . . 49
Referencias . . . 51

3. Polimerización por Injerto por Preirradiación en Aire 53
3.1. Introducción . . . 53
3.2. Materiales y Métodos . . . 54
3.2.1. Materiales . . . 54
3.2.2. Procedimiento . . . 54
3.3. Resultados y Discusión . . . 54
3.3.1. Búsqueda de las condiciones de injerto de los monómeros de trabajo sobre PE pre-irradiados . . . 54
3.3.2. Injerto de AAm sobre PE pre-irradiado . . . 58
3.4. Conclusión . . . 64
Referencias . . . 67

4. Modificación por Injerto en simultáneo 69
4.1. Introducción . . . 69
4.1.1. Co-injerto en simultáneo con más de un monómero . . . 70

4.1.2. Modificación química de las membranas modificadas mediante ácido iminodiacético . . . 72
4.2. Materiales y Métodos . . . 73
4.2.1. Polímero base y monómeros . . . 73
4.2.2. Reacción de polimerización por Injerto en Simultáneo en membranas macroporosas de PSf . . . 74
4.2.3. Acoplamiento del ácido iminodiacético (IDA) . . . 74
4.2.4. Determinación de las modificaciones químicas . . . 74
4.2.5. Microscopía electrónica de barrido (SEM) . . . 75
4.2.6. FT-IR e IR-ATR . . . 75
4.3. Resultados y Discusión . . . 75
4.3.1. Caracterización del copolímero . . . 75
4.4. Conclusión . . . 82
Referencias . . . 83

5. Bombardeo con iones pesados e Injerto en simultáneo 85
5.1. Introducción . . . 85
5.1.1. Implantación y traza latente por bombardeo con iones pesados . . . 87
5.1.2. Interacción de los iones pesados acelerados con la materia . . . 88
5.1.3. Grabado químico . . . 90
5.1.4. Modificación de membranas de poros perfectos . . . 91
5.2. Materiales y Métodos . . . 92
5.2.1. Procedimiento . . . 92
5.2.2. Determinación del % GI por peso . . . 93
5.2.3. Caracterización física de la muestra: microscopía electrónica y SANS 93
5.2.4. ATR-IR . . . 94
5.3. Resultados y Discusión . . . 94
5.3.1. Determinación del GI % por peso en HDPE . . . 94
5.3.2. Cálculo de la superficie cubierta por el injerto . . . 96
5.3.3. Injerto de GMA en membranas de poros perfectos de PET . . . 96
5.3.4. Estudio por dispersión de neutrones a pequeños ángulos (SANS) . . . 99
5.4. Conclusión . . . 109
Referencias . . . 111

III Derivatización y Aplicaciones 113

6. Ligandos Arseniacales 115
6.1. Ligandos Arseniacales . . . 115
6.1.1. Introducción . . . 115
6.2. Materiales y Métodos . . . 118
6.2.1. Reacción de síntesis del APAO . . . 118
6.2.2. Reacción de síntesis del PBMA . . . 118

6.2.3. Determinación de Punto de Fusión . . . 118
6.2.4. Análisis por cromatografía en capa fina (TLC) . . . 118
6.2.5. Análisis por HPLC . . . 118
6.2.6. Caracterización espectroscópica . . . 119
6.3. Resultados y Discusión . . . 121
6.3.1. Síntesis del APAO . . . 121
6.3.2. Síntesis de PBMA . . . 122
6.3.3. Caracterización fisicoquímica . . . 123
6.3.4. Cuantificación del ligando en solución . . . 133
6.3.5. Estudio de la reactividad de los compuestos obtenidos . . . 134
6.3.6. Reactividad por reacciones acopladas . . . 139
6.3.7. Otros aportes a la reactividad . . . 144
6.4. Conclusión . . . 145
Referencias . . . 147

7. Derivatización con Ligando Arseniacal y Aplicaciones 151
7.1. Introducción . . . 151
7.2. Materiales y Métodos . . . 153
7.2.1. Muestras proteicas . . . 153
7.2.2. Determinaciones analíticas . . . 153
7.2.3. Protocolo de inmovilización del PBMA . . . 153
7.2.4. Control por hidrólisis ácida del grupo epóxido (membranas H) . . . 154
7.2.5. Control por inactivación del grupo epóxido por β-ME (membranas E) . . . 154
7.2.6. Cuantificación de As total . . . 154
7.2.7. Cuantificación de As por la técnica de Ellman modificada . . . 154
7.2.8. Determinación de la Capacidad máxima de Adsorción específica a Trx 155
7.2.9. Determinación de la Especificidad . . . 155
7.2.10. Tratamiento de Deshidratación y Rehidratación . . . 156
7.2.11. Análisis cinético y de unión en el equilibrio en el estado sólido. Estudio de la interacción As-Proteína . . . 156
7.3. Resultados y Discusión . . . 157
7.3.1. Inmovilización y síntesis del ligando *in situ* . . . 157
7.3.2. Cuantificación de As total . . . 160
7.3.3. Cuantificación de As(III) inmovilizado por la técnica de Ellman modificada . . . 161
7.3.4. Especificidad y capacidad de adsorción de proteínas . . . 163
7.3.5. Inmovilización orientada de HP-rTrx . . . 164
7.3.6. Análisis cinético y de unión en el equilibrio en el estado sólido. Estudio de la interacción As-Proteína . . . 166
7.3.7. Inmovilización de proteínas de fusión a Trx . . . 170
7.4. Conclusión . . . 174
Referencias . . . 177

IV Conclusiones **179**

8. Discusión General y Conclusión **181**

V Anexos **185**

A. Estructura y Nomenclatura de polímeros **187**

B. Obtención de las Proteínas de Interés **189**
B.1. Introducción . . . 189
B.2. Materiales y Métodos . . . 189
B.3. Resultados y Discusión . . . 189
B.3.1. Obtención de Trx de *Escherichia coli* recombinante . . . 189
B.3.2. Obtención de TrxGAD65 . . . 192
Referencias . . . 195

C. Materiales y Métodos Generales **197**
C.1. Métodos de determinación de proteínas totales . . . 197
C.1.1. Absorbancia en UV . . . 197
C.1.2. Colorimétricos . . . 197
C.2. Métodos de determinación de actividad enzimática . . . 198
C.2.1. Trx: Turbidimétrico. Adaptación a microensayo. . . . 198
C.2.2. Trx: Fluorométrico. . . . 199
C.2.3. TrxGAD65: radioisótopos. Adaptación a estado sólido . . . 200
C.3. Métodos para el seguimiento del crecimiento celular e inducción . . . 201
C.3.1. Determinación de la velocidad de crecimiento de las células . . . 201
C.3.2. Determinación enzimática de consumo de glucosa . . . 202
C.3.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida . . . 202
C.4. Métodos de clonado y obtención de las cepas productoras . . . 203
C.4.1. Crecimiento y Expresión . . . 203
C.5. Métodos físicos de ruptura celular . . . 204
C.5.1. Por ultrasonido (sonicación) . . . 204
C.5.2. Shock Osmótico . . . 204
C.5.3. Homogenizador de Alta Presión . . . 204
C.6. Separación y acondicionamiento de las muestras proteicas . . . 205
C.6.1. Ultrafiltración (UF) y Diafiltración . . . 205
C.6.2. Cromatografía de Exclusión (SEC): separación de grupos (desalado y cambio de buffer) . . . 205
C.7. Purificación por cromatografía . . . 206
C.7.1. Cromatografía de Intercambio Iónico (IEC) . . . 206
C.7.2. Cromatografía de afinidad por iones metálicos IMAC . . . 207
C.8. HPLC . . . 208

C.9. Electroforesis Capilar (EC) 208
Referencias 209

Parte I

Introducción a la Modificación de Materiales Poliméricos Macroporosos

Capítulo 1

Modificación de Materiales Poliméricos Macroporosos

1.1. Polímeros como biomateriales

En la actualidad, los polímeros son considerados productos de alta tecnología y son ampliamente utilizados en la vida cotidiana, con aplicaciones inigualadas en casi todos los campos (como por ejemplo, en el de la salud, en la construcción, en la industria automotriz, en la industria aeroespacial, en la de plásticos y embalajes, y en la deportiva). La principal ventaja que ofrecen es que existe una gran cantidad de materiales diferentes con propiedades mecánicas, físicas y/o químicas específicas. Sin embargo, no siempre se pueden obtener propiedades estructurales y superficiales adaptadas a su uso final y es necesario introducirles modificaciones.

Surge entonces una mayor demanda de técnicas de modificación de superficie donde son de importancia algunas características como: (i) que la modificación se encuentre restringida a las capas más externas de material, de manera de mantener intactas las propiedades mecánicas del polímero, (ii) que además pueda ser aplicada a polímeros con diferentes formas geométricas, y (iii) que las modificaciones sean estables durante la aplicación específica y el almacenamiento.

Algunas de estas técnicas de modificación de superficie que se esquematizan en la Figura 1.1, involucran tratamientos con ácidos, electroquímicos, contacto de superficies con gases reactivos (plasma) y con radiaciones (gamma, haz de electrones).

A partir de mediados de siglo XX, el uso de las radiaciones ionizantes impulsó el desarrollo de la radioquímica de polímeros, incidiendo particularmente en distintos campos con numerosas y variadas aplicaciones. Entre estos campos se encuentran el de los materiales (reticulación, polimerización), de tecnología espacial y nuclear, de electrónica (microlitografía), de embalajes, médico (biomateriales, esterilización de productos descartables) y alimenticio (conservación de alimentos).

Las radiaciones ionizantes son capaces de modificar la estructura de los materiales y en particular de los polímeros, generando deficiencias electrónicas (excitaciones e ionizaciones). Las fuentes de radiación ionizante pueden ser de naturaleza corpuscular (α, β, protones, electrones acelerados, neutrones o iones) o de naturaleza electromagnética (rayos γ o X). Las radiaciones ionizantes más utilizadas en radioquímica de polímeros son los rayos γ y los electrones acelerados [1]. Principalmente se utilizan dos grandes tipos de fuentes: (i) las que se basan en la desintegración radiactiva de cobalto 60, de 1,3 MeV; y (ii) los aceleradores de electrones, que pueden generar corrientes de (a) típicamente entre 150 y

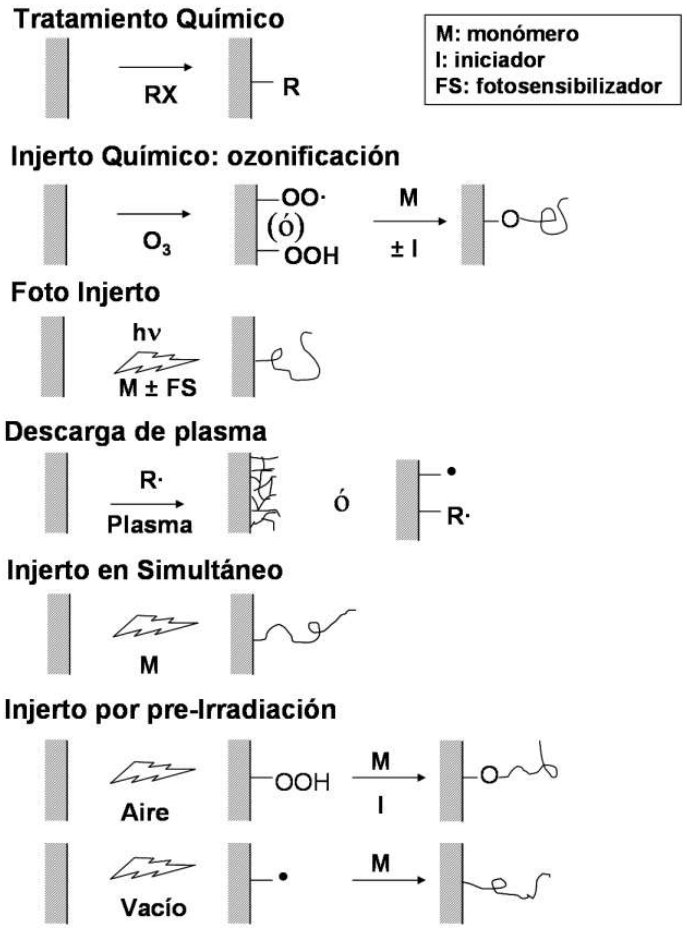


Figura 1.1 – Esquema de las técnicas más comunes utilizadas en la modificación superficial de polímeros

400 keV (de bajo voltaje) y (b) de 1,5 o 2 MeV hasta 10-14 MeV (de alto voltaje). Una característica útil de las fuentes de ^{60}Co es que poseen rangos de velocidades de dosis de 0,1 a 30 kGy/hora [2]. En los últimos años también se han comenzado a utilizar los iones pesados acelerados [3, 4, 5].

1.1.1. Definición

Los polímeros son materiales compuestos de macromoléculas lineales, formadas por motivos elementales (monómeros) unidos covalentemente entre ellos. Estas cadenas están principalmente constituídas por átomos de carbono sobre los cuales se unen otros elementos como el hidrógeno o el oxígeno. Otros elementos, particularmente el cloro, el nitrógeno y el flúor, también pueden intervenir en la composición de la cadena.

Según la IUPAC, se define copolímero injertado a un polímero que consiste de dos o mas partes poliméricas, de diferente composición, unidas químicamente entre sí. Esta

unión puede producirse de diferentes formas, ya sea por una primera polimerización de un monómero dado y subsiguiente polimerización de otra clase de monómero sobre el producto de la primera polimerización, o por la unión de dos polímeros mediante reacción química entre sus grupos terminales, o por reacciones de entrecruzamiento entre los diferentes materiales.

1.1.2. Estructura y Nomenclatura

Según la composición en monómeros de su estructura, los polímeros pueden definirse como homopolímeros (químicamente homogéneos y derivan de una sola especie de monómero) o copolímeros simples (derivan de dos monómeros diferentes).

Siendo A y B monómeros, se define:

(Homo)polímero: -A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-
Copolímero: -A-B-A-A-A-B-B-A-A-

Según los métodos de preparación (o los posibles mecanismos involucrados), se pueden producir diferentes combinaciones de los monómeros que generan distintos copolímeros, por lo que es necesario organizarlas en subclasificaciones.

El homopolímero se describe como poli(A), poli(B). Los polímeros *ramdom* se indican con el prefijo -*co*-, por ejemplo (poli(A-*co*-B) o poli(B-*co*-A); los copolímeros alternados con -*alt*-. Para diferenciar entre copolímeros por injerto o en bloque es necesario introducir dos prefijos adicionales, -*b*- para segmentos lineales en bloque y -*g*- para los segmentos injertados en bloque, como por ejemplo poli(A-*b*-B) y poli(A-*g*-B).

En este tipo de nomenclatura, para el copolímero por injerto, el primer segmento de polímero nombrado corresponde al homopolímero o copolímero que se prepara en el primer paso de síntesis. En un copolímero, el primer monómero mencionado es el que está presente en mayor proporción. Los fenómenos de entrecruzamiento y ramificación son acomodados de la misma manera con prefijos [*cl*] y [*br*], respectivamente, como por ejemplo poli(A-*g*[*br*]-B) o poli([*cl*]A-*g*-B).

En particular, a los copolímeros desarrollados en este trabajo les corresponde la denominación del tipo *Injerto*. También se los puede denominar con la nomenclatura de tipo general o *Inespecífico*, poli(A-*co*-B) (ver Apéndice A).

En este trabajo de tesis se utilizará una nomenclatura simplificada, en caso de realizar diferentes injertos sobre un mismo polímero base, se especificará en un principio al polímero base y luego sólo se hará referencia al copolímero injertado, como por ejemplo, poliGMA o poliGMA/DMAA en el caso del injerto de un copolímero con los monómeros GMA y DMAA.

1.1.3. Descripción de los materiales poliméricos base

En el desarrollo de este trabajo de tesis se utilizaron diferentes tipos de polímeros base (Figura 1.2). A continuación se describen brevemente sus principales características fisicoquímicas y sus aplicaciones más comunes.

Los plásticos que se denominan *termoplásticos* son aquellos que sufren cambios reversibles con la temperatura sin cambios en la estructura química del material, pudiendo ser entonces reutilizados.

Polietileno (PE): Probablemente es el polímero más utilizado en la vida cotidiana. Este termoplástico económico, se utiliza por ejemplo para hacer bolsas, juguetes para niños, envases, películas (*films*) para empaques, y tuberías. Ofrece una amplia gama de propiedades debido a las diferencias en su estructura y peso molecular. **Polietileno de Baja Densidad (LDPE)**: PE muy ramificado, de pesos moleculares promedio en el rango de 10^4 uma. Comúnmente usado para formar películas y láminas. Es muy buen aislante (dieléctrico) con bajo factor de pérdida, por lo cual tiene gran demanda como recubrimiento de cables, en especial cables submarinos y aplicaciones de radar. Posee buena resistencia química, baja resistencia al UV, es inflamable, con alta permeabilidad a gases (especialmente a CO_2), baja temperatura de reblandecimiento y baja resistencia a la deformación plástica, también presenta estrés por resquebrajamiento. **Polietileno de Alta Densidad (HDPE)**: PE de cadena lineal no ramificada, de pesos moleculares promedio en el rango de 10^6 uma. Con buena resistencia de impacto a baja temperatura y muy buena resistencia química. Susceptible a agrietamiento por estrés ambiental, posee baja resistencia al UV. En comparación con el LDPE, presenta una mayor rigidez y soporta temperaturas más severas. En comparación con el polipropileno (PP) tiene menor rigidez. Comúnmente utilizado para fabricar botellas, tambores, tanques, contenedores y tubos.

Polietilentereftalato (PET): es el más común de los poliésteres termoplásticos. Usado para cuerdas de cubiertas de automóviles, cintas magnéticas, botellas para refrescos, componentes eléctricos, fibras de una amplia gama de textiles y otros usos industriales (Dacron®, Trevira®, Terylene®. Además, las fibras de PET son uno de los biomateriales con mayor uso clínico (Dacron®, DuPont®) ya que poseen propiedades físicas adecuadas (elasticidad, permeabilidad, resistencia), son de fácil purificación, fabricación y esterilización; además, no incluye reacciones secundarias y puede ser usado en contacto con fluidos corporales [6]. Tiene buena resistencia química excepto a la hidrólisis por álcali. Es un material hidrofóbico y su cristalinidad varía de amorfo a cristalino. En cuanto a las láminas de PET, se suele hacer referencia a sus principales marcas (Mylar®, Melinex® o Hostaphan®) que son estabilizadas térmicamente. Se utilizan en capacitores, gráficas, bases de películas y cintas de grabación entre otras aplicaciones.

Polisulfona (PSf): Las polisulfonas, como familia química, presentan elevada estabilidad química y mecánica, poseen muy buenas propiedades térmicas, eléctricas y resistencia a la deformación plástica bajo un amplio rango de temperaturas. Material biocompatible, utilizado como material biotecnológico, termoplástico resistente. Posee meteorización química pobre. Las ventajas de estos polímeros se han visto reflejadas en el sector aeroespacial, automotriz, de electricidad y sistemas de iluminación, entre otras (sobre todo en aplicaciones donde se requieren condiciones exigentes de durabilidad sostenida). Estos

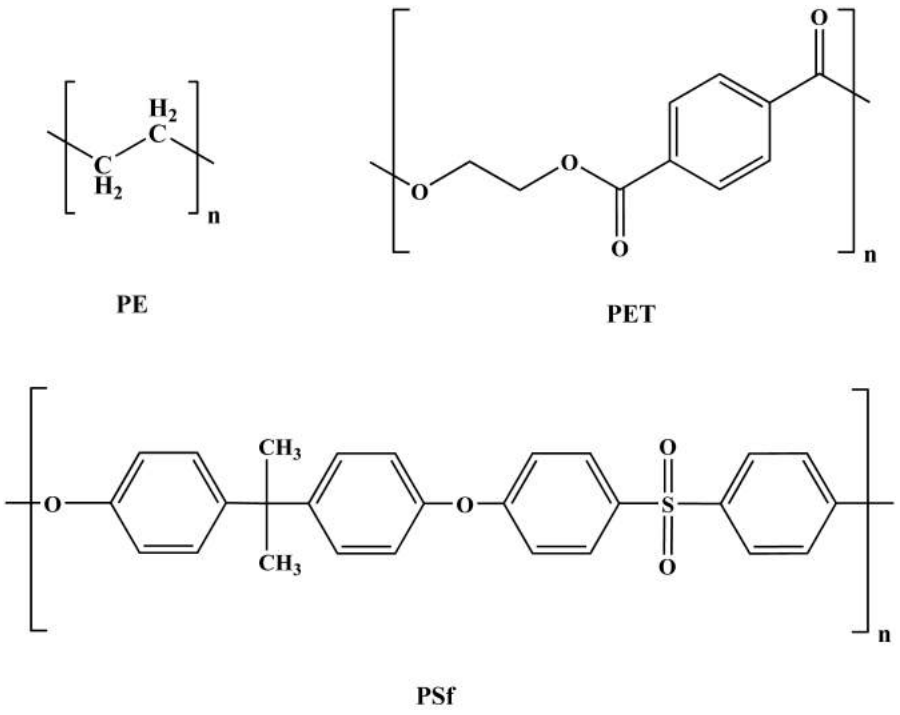


Figura 1.2 – Polímeros base utilizados

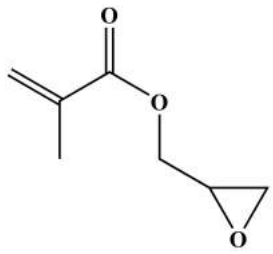
polímeros son particularmente sensibles a las radiaciones ionizantes y pueden verse sometidos a reacciones de escisión de cadena con G(S) ≈ 10 (este alto valor se debe a la escisión selectiva de los enlaces C-S). Oleofinas y dióxido de azufre son los productos mayoritarios de radiólisis, mediado por carbaniones [2].

1.1.4. Descripción de los monómeros utilizados

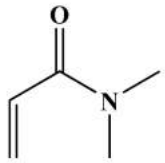
Glicidilmetacrilato (GMA). Características: Monómero bifuncional ya que contiene un grupo vinilo y un grupo epóxido reactivos en una misma molécula. El grupo vinilo puede polimerizar por radicales libres. Por otro lado, el grupo epóxido resulta de carácter iónico. La bifuncionalidad puede ser utilizada para generar polímeros de tipo vinílicos o polímeros de tipo de policondensación. El grupo epoxi puede reaccionar con varios compuestos con hidrógenos reactivos, como ácidos, bases, aminas secundarias o primarias, alcoholes, agentes oxidantes y reductores (por ejemplo, sulfito), a temperatura ambiente o en caliente. Propiedades fisicoquímicas: Fórmula química $C_7H_{10}O_3$; PM 142,15. Aspecto: Líquido incoloro con olor frutado. Muy poco soluble en agua (5-10 mg/ml en agua a 20 °C), soluble en la mayoría de los solventes orgánicos. Densidad específica (20 °C): 1,073. Índice de refracción: 1,448. Punto de ebullición (a 760 mm Hg): 189 °C. Punto de fusión, menor a -50 °C (Blemmer G®, Nipón oil & Fats Co., LTD). Campos de aplicación: Industria de resinas sintéticas, fibras sintéticas, pinturas y adhesivos.

N, N-dimetilacrilamida (DMAA). Características: Monómero hidrofílico. Es rápidamente polimerizado por iniciadores de cadena por radicales libres. Se pueden realizar polimerizaciones en solución, emulsión, suspensión y en bloque. En soluciones acuosas de DMAA/acrilamida, en presencia de sales de peroxibisulfato, se producen reacciones de entrecruzamiento debido a la dehidrogenación del radical metil N-sustituído. Propiedades fisicoquímicas: Fórmula química C_5H_9NO; PM 99,133. Aspecto: líquido límpido incoloro o levemente amarillento. Soluble en agua y solventes orgánicos comunes. Insoluble en n-hexano. Hidroscópico. Densidad específica (20 °C): 0,9653. Índice de refracción: 1,4723. Viscosidad: 1,35 c.p. (25 °C). Punto de ebullición (a 760 mm Hg): 171-172 °C; punto de fusión: -20 °C (Marca Kohjin, Japón). Campos de aplicación: adhesivos, recubrimiento de materiales, tratamiento textil y del papel, lentes de contacto, materiales para fotografía e impresión, materia prima en materiales para cosmética y medicina, recuperación de polímeros de petróleo, diluyente para resinas curables por UV, entre otros [7].

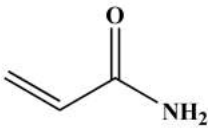
Acrilamida (AAm). Características: vinil amida derivada del ácido propenoico. Monómero hidrofílico. Propiedades fisicoquímicas: Fórmula química C_3H_5NO; PM: 71,08. Aspecto: Cristales blancos, inodoros. Soluble en agua (2150 mg/ml, a 30 °C), etanol y éter. Punto de ebullición (se descompone): 175-300 °C. Punto de fusión: 84,5 °C. Campos de aplicación: se emplea en la fabricación de papel, extracción de metales, industria textil y obtención de colorantes. También se emplea en la síntesis de poliacrilamidas.



GMA



DMAA



AAm

1.2. Métodos de síntesis de copolímeros

La polimerización es una reacción que combina, por una reacción covalente, moléculas de bajo peso molecular (monómeros, A, B, M) para formar una macromolécula de alto peso molecular (polímero P, A_n, B_n, M_n).

Existen dos grandes tipos de polimerización: reacciones de polimerización en cadena y reacciones de policondensación. En el primer caso, la formación de la macromolécula resulta de la adición de monómeros a través de los extremos y necesita la existencia de un sitio activo. En el segundo caso, la formación de la macromolécula resulta de la eliminación de pequeñas moléculas como H_2O, HCl, por reacción entre dos monómeros polifuncionales. Estos dos tipos de polimerizaciones poseen distintos mecanismos.

Dentro de la polimerización por adición es de particular interés la polimerización radicalaria, ya que es una de las formas más importantes de polimerización a nivel industrial. Gran variedad de monómeros pueden ser polimerizados y la reacción puede ser controlada por aditivos, temperatura y/o estados de la materia (estado gaseoso, en masa, en suspensión, emulsión, solución, precipitado de una solución o gas).

El sitio activo es un radical libre. Este es una especie neutra (átomo o molécula) que posee un electrón desapareado y tiempos de vida media generalmente muy cortos (en general en el orden de 10^{-4} segundos). Pueden ser creados por radiaciones ionizantes, UV (iniciación fotoquímica), calentamiento (iniciación térmica) o química (por ejemplo, peróxidos)

El proceso de polimerización involucra las siguientes etapas generales:

1. **Iniciación**: es la etapa de formación del sitio activo; el polímero se inicia por la formación de un radical mediada por un iniciador (activación). El sitio activo define el tipo de polimerización.

2. **Propagación**: el macro radical formado incorpora monómeros. Etapa de crecimiento de la cadena macromolecular.

3. **Terminación**: eliminación de radicales por acoplamiento o desproporción o por exceso de radicales iniciadores.

Cada etapa posee una velocidad de reacción (v_i) caracterizada por una constante de velocidad (k_i).

Existen varias formas de obtener copolímeros. A continuación se describen las más importantes.

1.2.1. Reacciones de transferencia de cadena

Este mecanismo de polimerización ha sido aplicado desde 1937 en polimerizaciones en masa, en emulsión, en suspensión y en solución.

Cuando una reacción de polimerización está en fase de propagación puede ocurrir una sustracción de átomos de H o halógenos sobre otro polímero P presente en el medio, de esta manera, la cadena M_n se incorpora a P generando un polímero injertado. Interrumpe el crecimiento de la cadena pero sin la destrucción del centro activo que es transferido a otra molécula (monómero, solvente). Esta reacción disminuye las masas moleculares de las cadenas y su extensión.

Una reacción de transferencia de cadena es caracterizada por una constante de transferencia de cadena que representa la relación entre constantes de velocidad de transferencia y de velocidad de homopolimerización. En otras palabras, siendo $\sim M_n\cdot$ la cadena creciente de monómero, P el polímero base, y M_1 a la unidad de monómero, se define la constante de transferencia de cadena como: $\nu_{P-M_n}/\nu_{\sim M\cdot_{n+1}}$.

La reacción de transferencia de cadena (1.1) posee una energía de activación mayor que la reacción de homopolimerización (1.2), resultando entonces ésta última más favorecida.

La temperatura de reacción es una variable a considerar para modificar este fenómeno.

$$\sim M_n \cdot + P \rightarrow P - M_n \qquad ;\nu_{P-M_n} \tag{1.1}$$

$$\sim M_n \cdot + M_1 \rightarrow \sim M\cdot_{n+1} \qquad ;\nu_{\sim M\cdot_{n+1}} \tag{1.2}$$

La velocidad de transferencia de cadena depende de otros factores importantes que influencian la reacción de injerto. Entre estos factores se encuentran: la relación molar, la reactividad del radical libre y labilidad del átomo a sustraer de P; el tipo y concentración del iniciador de polimerización química; la naturaleza química de P y M.

Por ejemplo, el PE, y en menor proporción el PP, son polímeros muy estables por poseer en su estructura uniones C-C y C-H. Obtener un radical libre H· para activar y generar otros radicales libres, y así poder obtener el injerto, requiere de energías superiores a las proporcionadas por la radiación UV.

1.2.2. Ataque de radicales sobre polímeros insaturados

Cuando los monómeros vinílicos son polimerizados en presencia de macromoléculas que contienen dobles enlaces en la cadena principal, pueden formarse copolímeros injertados. Los polímeros conteniendo vinilos son más lábiles y reactivos. Se requiere la presencia de un iniciador de radicales libres como el peróxido de benzoilo que, al poseer efectos estabilizantes del radical libre por resonancia, favorece entonces la reacción de adición. Esta reacción de polimerización es también conocida como copolimerización por adición.

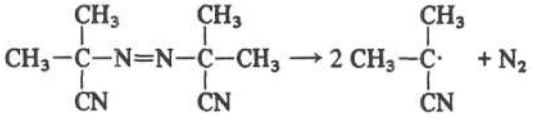
Esta copolimerización resulta útil en la síntesis de copolímeros injertados en sistemas poliméricos con dobles enlaces "residuales" (remanentes del proceso de síntesis del mismo).

Aunque las reacciones de copolimerización por adición tienen lugar a baja temperatura, y a concentraciones del polímero menores que las requeridas para la transferencia de cadena, éstas últimas también pueden producirse.

1.2.3. Iniciadores de radicales libres

Térmicos

Los iniciadores térmicos (o aceleradores) son moléculas que generan radicales libres al descomponerse con la temperatura. Por ejemplo el N, N-azobisisobutironitrilo (AIBN) que se descompone en N_2 estable y dos radicales.



Hidroxiperoxidación

Otro de los métodos importantes en la preparación de copolímeros por injerto es la introducción de grupos hidroperóxido en posiciones al azar en toda la longitud de la cadena polimérica para formar un iniciador funcional. Existen varios métodos para introducir los grupos hidroperóxidos a lo largo de la estructura de cadena, uno de ellos es la oxidación directa y otro la ozonificación.

1. *Oxidación directa*: La oxidación química de grupos vinilo presentes en P puede ser utilizada para iniciar la polimerización de M vinílicos bajo condiciones redox. Si se logra controlar el grado de ramificación (por variación del grado de oxidación del esqueleto del polímero), este método es capaz, al menos en un principio, de formar un injerto libre de homopolímero.

2. *Ozonización*: El uso de ozono como método para introducir grupos hidroperóxidos es generalmente usado en gomas naturales. En principio, puede ser aplicado a cualquier polímero conteniendo hidrógenos lábiles o insaturaciones. Sin embargo, un tratamiento intensivo puede conducir a la degradación más que a la generación de los hidroperóxidos.

La capacidad de formar peróxidos estables en el polímero depende de la estructura de las macromoléculas. Para una hidroxiperoxidación más homogénea se requiere realizar la reacción en solución.

Diazotación

Los polímeros por injerto también pueden ser obtenidos de polímeros conteniendo grupos amino-aromáticos. Cuando tales compuestos de alto peso molecular son diazotizados, se forma una sal de polímero de diazonio que reacciona con Fe^{2+} para formar un poli radical polimérico capaz de iniciar la polimerización de M vinílicos.

$$\text{R-C}_6\text{H}_4\text{-N}_2^+ + \text{Fe}^{2+} \longrightarrow \text{R-C}_6\text{H}_4\text{-N}_2\cdot + \text{Fe}^{3+}$$
$$\text{R-C}_6\text{H}_4\text{-N}_2\cdot \rightarrow \text{R-C}_6\text{H}_4\cdot + \text{N}_2$$

La degradación térmica de los derivados de diazonio puede llevar a insolubilización, probablemente debido al entrecruzamiento de cadenas por recombinación de radicales libres.

Tiosulfatos, hidrosulfitos, sulfitos, incremento de temperatura, sales de Fe(II) o Cu(I), son los mejores agentes reductores para los grupos azo. Sin embargo, el uso de sulfitos y metasulfitos conduce a la formación de homopolímero.

Sistemas redox

Ciertas sales de Cerio, como el nitrato y el sulfato, forman sistemas redox muy efectivos en presencia de agentes reductores orgánicos como alcoholes, tioles, glicoles, aldehídos y aminas. La oxidación y reducción produce iones cerio y especies transientes de radicales libres capaces de iniciar polimerizaciones.

En el caso de los alcoholes, por ejemplo:

$$Ce^{4+} + \text{R-OH} \leftrightarrow [\text{complejo alcohol-Ce}] \rightarrow Ce^{3+} + H^{+} + \text{RCH·OH (ó } RCH_2O\cdot)$$

Entre las desventajas se encuentran la contaminación del producto final por Cerio y los bajos rendimientos de reacción, por lo que se requieren varios ciclos para obtener un buen porcentaje de injerto. Esta técnica se aplica a la modificación de polímeros naturales (celulosa, almidón) dado que presentan gran cantidad de hidroxilos vecinales.

Radicales atrapados

Si durante una polimerización por radicales libres, el sistema se torna altamente viscoso o entrecruzado, con pérdida de la movilidad de las cadenas crecientes, puede ocurrir un enlentecimiento en el paso de terminación de reacción. A este fenómeno se lo conoce como *Efecto Trommsdorff* o efecto de gel. A parte de los factores cinéticos asociados con este efecto, aparecen en el sistema, debido a las condiciones de estado no estacionario, macro radicales de vida media larga. Estos macro radicales atrapados u ocluidos pueden ser utilizados para generar copolímeros de bloque o de injerto actuando como iniciadores de la polimerización de un segundo monómero. Los radicales atrapados pueden ser originados por radiación (ver sección 1.2.8).

1.2.4. Síntesis fotoquímica

Cuando una molécula absorbe radiación electromagnética en la región UV-Visible, y su energía es incrementada, se dice entonces que la molécula se encuentra en un estado excitado. Esta molécula rica en energía puede disociarse en radicales libres reactivos o disipar su energía por fluorescencia, fosforescencia, o colisión. En el caso de un polímero, este proceso puede derivar en la formación de sitios de radicales libres sobre la estructura del mismo que pueden ser utilizados para iniciar la copolimerización por injerto o en bloque. El proceso puede ser promovido por la adición de fotosensibilizadores. Al absorber energía, un fotosensibilizador puede descomponerse en radicales libres activos o transferir la energía absorbida a otras moléculas del sistema, y así promover la reacción de copolimerización. Las cetonas alifáticas son comúnmente utilizadas como sensibilizadores. En la fotólisis, tanto en fase sólida como en fase líquida, ocurren dos reacciones simultáneas, que se describen a continuación:

$$\text{R-CO-R'} \xrightarrow{h\nu} \text{R}\cdot + \text{R'CO}\cdot \rightarrow \text{R}\cdot + \text{R'}\cdot + \text{CO}\cdot \qquad \text{(Tipo 1)}$$

$$\text{R-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-CO-R'} \xrightarrow{h\nu} \text{RCH=}CH_2 + CH_3\text{COR'} \qquad \text{(Tipo 2)}$$

Sólo en la reacción de Tipo 1 se generan radicales. Los polímeros vinílicos conteniendo grupos carboxilos, pueden experimentar reacciones similares frente a la radiación. Generalmente, en estos casos se obtienen mezclas de injerto y homopolímero, así como de aldehídos menores y metano.

Además de los grupos carbonilo, los enlaces carbono-halógeno son sitios lábiles a la radiación. Estos pueden ser incorporados en sitios al azar a lo largo de la cadena polimérica

mediante métodos químicos (por ejemplo con tetrabromuro de carbono y bromotriclorometano).

La fotoiniciación directa puede ser aplicada directamente a unos pocos polímeros. Sin embargo, con el uso de fotosensibilizadores esta técnica tiene un mayor espectro de aplicación. Clorobenzofenona, deoxibenzoina, 4,4´-dimetilbenzofenona son algunos de los fotosensibilizadores que han sido utilizados y que actúan eficientemente en la iniciación de radicales libres.

1.2.5. Degradación mecánica

Cuando una molécula de polímero es sometida a fuerzas de cizalla o a estrés mecánico, puede ocurrir una escisión de enlaces produciendo radicales libres en los extremos de las cadenas. Si un monómero está presente durante este proceso puede iniciarse entonces una copolimerización en bloque.

A continuación se exponen algunos ejemplos de los numerosos métodos de degradación mecánica de macromoléculas y la subsecuente formación de copolímeros en bloque que han sido desarrollados:

1. La masticación en frío, la molienda, y extrusión de los polímeros en el estado viscoelástico. Se producen mezclas de copolímero por injerto y en bloque (interpolímero) sobre sistemas naturales y gomas. Requiere condiciones anoxigénicas.

2. Desintegración intensiva por pulverización y molienda por vibración de polímeros. Se forman centros activos específicos de naturaleza de radical libre o iónica sobre las superficies nuevas que pueden reaccionar con monómeros para polimerizar o con polímeros para crear injertos o bloques.

3. La alta velocidad de agitación y el movimiento a través de orificios estrechos de la solución de polímeros. Se producen además otros productos de degradación secundarios.

En la mayoría de estos métodos, es predominante la formación de copolímeros en bloque, y en algunos casos también presentan injerto.

1.2.6. Síntesis Iónica

La copolimerización por injerto puede también ocurrir por mecanismos iónicos. En los mecanismos aniónicos, el injerto es iniciado por carbaniones mientras que en los mecanismos catiónicos se debe a iones carbono.

Los iniciadores de iones carbono mayormente utilizados son BF_3, $SnCl_4$ y $AlBr_3$. En la mayoría de los casos se requieren temperaturas de reacción por debajo del cero y solventes orgánicos (el agua es un potente inhibidor).

Los carbaniones, tanto de naturaleza monomérica como polimérica, capaces de iniciar copolimerizaciones por injerto son resultado de la formación de complejos organometálicos

con metales alcalinos en solventes anhidros como el tetrahidrofurano (THF). La polimerización catiónica no es espontánea y es fuertemente influenciada por los contraiones.

1.2.7. Reacciones de condensación y de apertura de anillo

Moléculas de polímero conteniendo un átomo de H reactivo (grupos hidroxilo, carboxilo, amino, tiol, y ciertos ésteres) pueden ser unidos químicamente por medio de una reacción de condensación con α-epóxidos para formar copolímeros en bloque o injertados. Si estos grupos funcionales están localizados en los extremos, el resultado será una copolimerización en bloque. Si en uno de los polímeros se encuentran al azar a lo largo de la cadena el resultado será un injerto. Si ambas especies contienen los grupos en posiciones al azar resultará en una estructura entrecruzada compleja.

Entre algunos ejemplos, obtenidos a partir del tratamiento con óxido de etileno, se encuentran ciertos surfactantes no iónicos como Pluronics® y Tetronics®, y algunos nuevos derivados del nylon®. Sobre superficies de lana conteniendo -OH y -NH_2 se han incorporado poliamidas, poliuretanos, poliureas, poliésteres y policarbonatos por condensación interfacial [8].

1.2.8. Síntesis radio-inducida

La radiación electromagnética de alta energía puede inducir procesos físicos y químicos sobre un sistema químico determinado; el flujo de partículas energéticas produce ionización y excitación en el material (con la consecuente formación de iones, electrones, radicales y/o estados excitados) que conllevan a la modificación del sistema hacia nuevos productos.

La radiación γ está constituída por fotones de alta energía, con mayor poder de penetración pero menor poder de ionización que las partículas α y β. Cuando la radiación electromagnética interacciona con la materia, pueden ocurrir tres fenómenos de atenuación diferentes denominados **efecto fotoeléctrico**, **dispersión de Compton**, y **producción de pares** (Figura 1.3).

El **efecto fotoeléctrico** o **fotoionización** ocurre cuando rayos γ de baja energía chocan con el átomo entero, resultando en la desaparición del fotón y la expulsión de un electrón, dando lugar a un ión positivo; toda la energía del fotón incidente es absorbida y transferida a un electrón atómico simple (fotoelectrón) con una E cinética, que es la diferencia entre la energía del fotón y la energía de enlace electrón-átomo. Este efecto es importante en elementos pesados.

Los rayos γ de energía intermedia pueden dispersar electrones. Al chocar elásticamente con un electrón, parte de la energía del fotón le es transferida resultando en la expulsión del electrón del átomo. La otra parte es liberada como un nuevo fotón, de menor energía y con dirección distinta de la incidente. Este mecanismo es conocido como **efecto Compton**. Este efecto es importante en elementos de bajo Z (con rango de energía de 30 KeV a 20 MeV) o con energías menores (entre 1 a 5 MeV) si es el caso de elementos con Z elevados.

La **producción de pares** involucra la completa absorción del fotón en la vecindad del núcleo (campo de Coulomb) con la formación de un positrón y un electrón. Este efecto

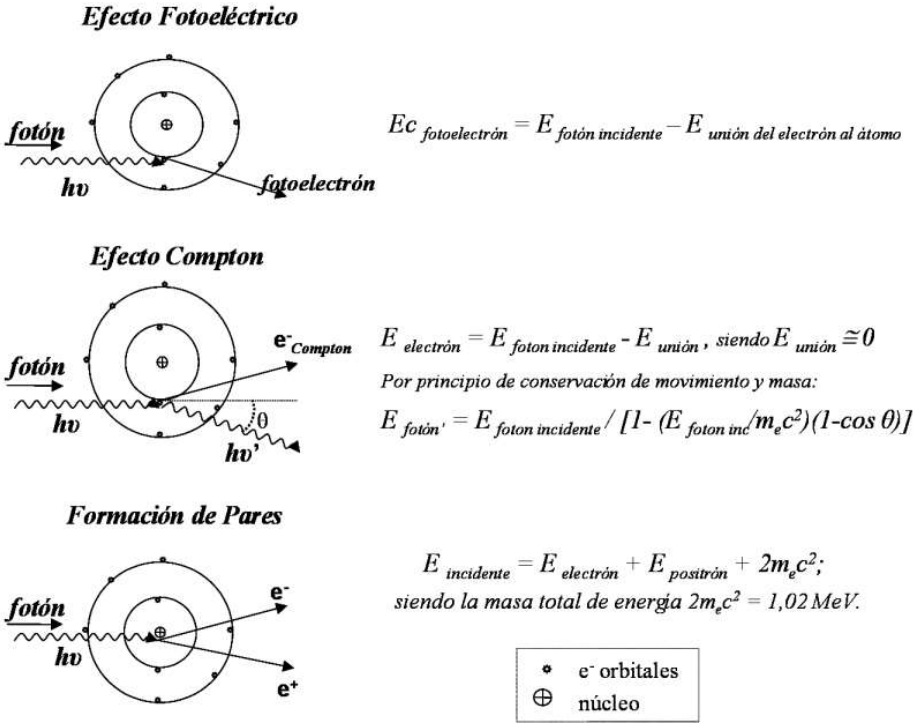


Figura 1.3 – Representación esquemática de los tres fenómenos de atenuación que pueden ocurrir al interactuar la radiación electromagnética con la materia.

no ocurre a menos que el fotón pase un umbral de energía (energías fotónicas mayores a 1,02 MeV). Se favorece a mayores masas atómicas (elementos pesados) y al incrementar la energía. Cuando el electrón y el positrón chocan entre sí, originan dos rayos γ con energías de 0,51 MeV cada uno.

Las **reacciones fotonucleares** pueden expulsar un protón o neutrón del núcleo, dando lugar a compuestos radioactivos. Esto sólo puede ocurrir si el fotón incidente tiene una energía mayor a 8 MeV para elementos de alto Z o mayor a 10 MeV para elementos de Z bajos.

La ocurrencia y contribución de estos mecanismos está dada tanto en función de la masa del elemento blanco como de la energía del fotón aplicada. Por ejemplo, frente al carbono como material de detención, la probabilidad de que se produzca el efecto de fotoionización es mayor entre 0,01 y 0,1 MeV, para el efecto Compton la probabilidad aumenta entre 0,1 y 10 MeV, y requiere ser mayor a 10 MeV para la formación de pares iónicos (Figura 1.4).

El átomo de ^{60}Co se descompone radioactivamente a un átomo estable de Ni liberando en el proceso de decaimiento dos rayos γ, uno de 1,33 MeV y otro de 1,17 MeV de energía, aunque se considera que la energía del rayo es el promedio de ambos (1,25 MeV), con un tiempo medio de decaimiento de 5,3 años. La máxima velocidad de dosis que se puede alcanzar con rayos γ, en cualquier distribución de fuentes no superará los 30 kGy/hora.

El efecto predominante en la irradiación γ proveniente de una fuente de ^{60}Co sobre ma-

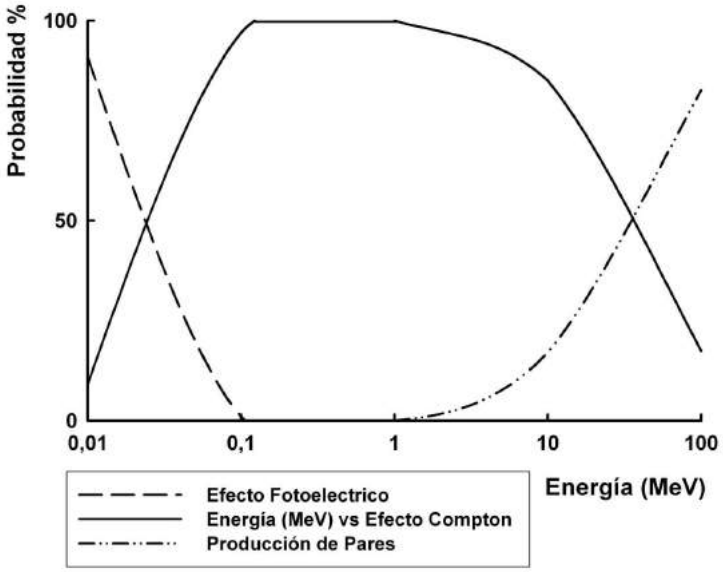


Figura 1.4 – Contribución de los efectos de atenuación en función de la energía del fotón aplicada, frente al carbono como material de frenado [9].

teriales orgánicos es la dispersión de Compton. Tanto el electrón como el fotón producidos, posteriormente interactúan con el material dando lugar a dos procesos, uno de ionización y otro de excitación. En el caso de la ionización, el electrón Compton transfiere energía suficiente a un electrón orbital de otro átomo como para ser expulsado, dejando entonces un ión positivo. Si la energía transferida es insuficiente para provocar la expulsión de un electrón, el átomo queda en un estado excitado de energía. Los iones y moléculas excitadas son muy reactivos, y pueden reaccionar con otros materiales presentes en el sistema o descomponerse en radicales libres, átomos o moléculas.

La formación de radicales libres produce tres fenómenos sobre los polímeros: entrecruzamiento, degradación y modificaciones químicas (reacciones de injerto radioinducidas). Los aceleradores de electrones son muy utilizados industrialmente para reacciones de entrecruzamiento y degradación, siendo la primera muy utilizada en industria del caucho mientras que la segunda tiene gran importancia en la fabricación de teflón en polvo. Las modificaciones químicas pueden ser producidas por pre-irradiación o por reacción en simultáneo con fuentes de ^{60}Co, aceleradores de electrones [10] y con bombardeo con iones acelerados [3, 5, 11]. Otros métodos de iniciación, de menor energía, son la radiación con UV y el tratamiento con descarga de plasma, que en este trabajo de tesis no serán desarrollados. En cuanto a la técnica de polimerización por injerto radioinducida posee ciertas ventajas por sobre las otras, como por ejemplo permite controlar el sitio y longitud del injerto así como la densidad del grupo funcional posteriormente incorporado [12].

La síntesis radio inducida es una técnica interesante para obtener copolímeros por

injerto sobre polímeros de baja reactividad química, dado la gran variedad de monómeros disponibles y de técnicas posibles.

Diferentes métodos de Injerto por radiaciones

Se han desarrollado varios métodos de modificación química por injerto utilizando radiaciones ionizantes. Se pueden agrupar en método directo, preirradiación en aire o preirradiación en vacío. Otras técnicas que han sido desarrolladas son la irradiación de mezclas de polímeros y la radiación por injerto en sistemas de emulsiones. La descripción de cada método en cuanto a eficiencia, aplicabilidad, características cinéticas y mecanismo de injerto, será expuesta a continuación.

Pre irradiación en vacío

En ausencia de aire, los radicales formados por irradiación en vacío o gas inerte quedan atrapados en el sistema pudiendo permanecer "activos" por un tiempo considerable (manteniendo el polímero a bajas temperaturas), para luego actuar como iniciadores de la copolimerización. Posteriormente, la solución de monómero difunde en el polímero y entonces puede interactuar con los radicales atrapados.

Esta técnica se aplica principalmente a polímeros con alto grado de cristalinidad (donde los radicales libres tienen una vida media más larga), con requerimiento de alta dosis de energía (200 KGy) y un proceso en dos etapas. A favor cuenta con la ausencia de homopolímero y permite trabajar a menores temperaturas de copolimerización con respecto a las técnicas de peroxidación.

Pre irradiación en aire

Al preirradiar el polímero en presencia de oxígeno o aire, se generan grupos peróxidos e hidroperóxidos en el mismo que posteriormente pueden ser utilizados como iniciadores de polimerización de monómeros. Los peróxidos son descompuestos térmicamente liberando radicales libres en presencia del monómero y ausencia de aire. Es necesario entonces que el polímero base sea térmicamente estable a elevadas temperaturas (150 °C). Por lo tanto, este método transcurre en dos etapas. En la primer etapa es necesario considerar que el polímero base puede verse afectado por reacciones de entrecruzamiento y degradativas, debido a una insuficiente velocidad de difusión del oxígeno en el material dejando lugar a la formación de radicales libres. Es por esta razón que la velocidad de dosis de irradiación debe ser controlada y las dosis de energía elevadas. En la segunda etapa, además requiere de inhibidores de homopolimerización debido a la presencia de peróxidos de bajo peso molecular.

Método Directo o Simultáneo

Se lleva a cabo por medio de la irradiación de P en presencia de un M polimerizable y en ausencia de aire. El copolímero por injerto es iniciado por radicales libres generados sobre el polímero. Como la radiación ionizante es no selectiva, existen algunos factores a

considerar, uno de ellos es el efecto de ésta sobre el P, M, solvente o cualquier otra sustancia presente en el sistema. La sensibilidad del sustrato a la radiación es medida en términos de su valor G o rendimiento en radicales libres (número de radicales libres formados por cada 100 eV de energía absorbida por gramo de materia). Los rendimientos de injerto son mayores cuando el G_P es mayor que el G_M y cuando se trabaja con bajas concentraciones de M. Sin embargo, el valor G de un sistema puede resultar alterado por la presencia de otras especies, llamado efecto protector, ya que pueden existir efectos de transferencia de energía entre las diferentes especies presentes.

Es importante considerar también los efectos de degradación y entrecruzamiento sobre P debido a la radiación. Si el polímero se degrada, en presencia del monómero, predominará entonces la copolimerización de tipo en bloque. Si hay entrecruzamiento, puede resultar en estructuras de tipo de injerto.

La dosis y velocidad de dosis de radiación son también importantes para cualquier sistema de injerto. En el método directo, la dosis total determina la cantidad de sitios de injerto mientras que la velocidad de dosis determina la longitud de la cadena injertada (a mayor velocidad de dosis, menor longitud de cadena). Además, esta longitud es controlada por otros factores, como la presencia de agentes de transferencia de cadena, la concentración de monómero, la temperatura de reacción, la viscosidad del medio de reacción y fenómenos de difusión.

En algunos sistemas de injerto por radiación directa, se producen efectos autocatalíticos. La reacción continúa aún después de finalizada la irradiación debido a la presencia de cadenas ocluidas sin finalizar, resultantes del efecto *Trommsdorff* que enlentece la velocidad de terminación.

La polaridad del solvente puede favorecer el contacto entre P y M según la naturaleza de estos. También puede incrementar la velocidad de iniciación debido a la transferencia de energía ó a reacciones de radicales libres del solvente con P o M.

La temperatura posee un efecto complejo, ya que así como afecta a la velocidad de difusión de M también puede incrementar las cinéticas de transferencia y terminación de las cadenas en propagación, reduciendo la importancia del efecto de gel. La solubilidad y movilidad de los radicales también pueden modificarse con la temperatura.

La formación de homopolímero es reducida contemplando la baja concentración de monómero y disminuyendo la temperatura.

Dos ventajas que presenta este método son el requerimiento de bajas dosis de energía (2-20 kGy) y que es un proceso de una etapa.

Sobre trazas

A partir de los últimos quince años, comenzaron a desarrollarse estudios sobre la polimerización por injerto utilizando haces de iones pesados acelerados como fuente de irradiación [3, 13]. Cuando un haz de iones pesados acelerados incide sobre una lámina de polímero, se produce una zona de daño por irradiación a lo largo y alrededor del eje incidente, que se denomina traza latente. Este proceso crea sitios activos adecuados para iniciar el injerto de un monómero. Se ha estudiado el proceso de injerto de diferentes monómeros, co-

mo estireno, ácido acrílico (AA), N-isopropilacrilamida (NIPPAm), hidroxietilmetaacrilato (HEMA), metilmetacrilato (MMA) sobre láminas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) y otros polímeros como el PP [4, 14].

En particular, cuando se irradia un polímero con un haz de iones pesados acelerados se producen excitaciones electrónicas de alta densidad que provocan procesos físicos y químicos muy complejos. Esta gran cantidad de energía se disipa por emisión de un gran número de electrones (rayos delta), que amplían la zona de daño a un radio de unas pocas decenas de nanómetros respecto del eje de incidencia del ion. Los reordenamientos y reacciones de estos efectos primarios y secundarios conducen a la formación de trazas latentes que, en general, son estables en el tiempo. Estas trazas latentes pueden ser "reveladas" por diferentes procesos físicos. Otra alternativa es iniciar la polimerización de otros monómeros por injerto radioinducido a partir de peróxidos producidos por oxidación de radicales dentro de las trazas latentes [3, 5] y utilizando sitios activos residuales luego de la etapa de marcado químico [4, 5].

Irradiación de mezclas de polímeros

Una mezcla de polímeros en estrecho contacto puede conducir a un copolímero por injerto al ser irradiada en ausencia de oxígeno. Esto ocurre por entrecruzamiento o combinación de macro radicales libres poliméricos de ambos polímeros. La eficiencia del proceso depende de cuan cercanos físicamente se encuentren los polímeros, fenómeno no muy común, por lo que su uso es limitado.

Radiación por injerto en sistemas de emulsiones

Los sistemas en emulsión facilitan la preparación de injerto homogéneo para sistemas heterogéneos. La copolimerización puede ser iniciada por radicales libres formados como resultado de varias reacciones como la acción directa de la radiación y la remoción de un átomo de hidrógeno del polímero por acción de radicales OH producidos por la irradiación en fase acuosa, y en menor grado, por transferencia de cadena y formación de radicales ocultos.

Resulta en altas eficiencias de injerto con poca formación de homopolímeros. Ampliamente utilizado en gomas naturales cristalinas con monómeros vinílicos.

1.3. Cinéticas del proceso de injerto por radiación

Para el diseño de un proceso de polimerización por injerto es necesario conocer datos cinéticos precisos. En principio, se puede aplicar el esquema convencional de polimerización por radicales libres, ya que en general la reacción involucra la polimerización de un monómero vinílico iniciada por un radical polimérico. Sin embargo, el efecto de gel, de transferencia de cadena, de separación de fases y de difusión son algunos de los factores que pueden causar serios efectos sobre las cinéticas de reacción.

Considerando la técnica del Método en Simultáneo, con una mezcla de monómero y polímero, siendo el polímero insoluble en el monómero y suponiendo que la copolimeriza-

ción ocurre por el proceso de cadenas radicalarias, entonces el esquema de reacción puede dividirse en los pasos principales de iniciación, propagación y terminación. Estos pasos pueden representarse con las siguientes ecuaciones y consideraciones:

Iniciación

$$P \xrightarrow{k} P\cdot \tag{1.3}$$

$$v = kI \tag{1.4}$$

Propagación del radical inicial

$$P\cdot + M \xrightarrow{k_i} PM\cdot \tag{1.5}$$

$$v_i = k_i[P\cdot][M] \tag{1.6}$$

Propagación

$$PM_n\cdot + M \xrightarrow{k_p} PM_{n+1}\cdot \tag{1.7}$$

$$v_p = k_p[PM_n\cdot][M] \tag{1.8}$$

Terminación

$$PM_m\cdot + PM_n\cdot \xrightarrow{k_t} PM_{m+n} \qquad \acute{o} \quad PM_m + PM_n \tag{1.9}$$

$$v_t = 2k_t[PM\cdot]^2 \tag{1.10}$$

Asumiendo que la longitud de las cadenas de polímero es larga, la reacción 1.5 puede despreciarse con respecto a la reacción 1.7, obteniendo la siguiente relación para la velocidad de polimerización por injerto:

$$v_p = k_p[PM_n\cdot][M] \tag{1.11}$$

Suponiendo la condición de estado estacionario, la velocidad de cambio en la concentración del radical es pequeña comparada con su velocidad de formación y desaparición, entonces

$$v_i = k_i[P\cdot][M] = 2k_t[PM_n\cdot]^2 \tag{1.12}$$

$$\text{reordenando,} [PM_n\cdot] = (v_i/2k_t)^{\frac{1}{2}} \tag{1.13}$$

y combinando las Ec. 1.11 y Ec. 1.13, se obtiene la **velocidad de polimerización por injerto**:

$$\mathbf{v_p = k_p(v_i/2k_t)^{\frac{1}{2}}[M]} \tag{1.14}$$

Siendo K= $k_p(v_i/2k_t)^{\frac{1}{2}}$ se puede escribir en la forma:

$$\mathbf{v_p = K[M]} \tag{1.15}$$

donde:
I = intensidad de radiación
P = Polímero base

P· = radical polimérico
PM_m, PM_n ó PM_{m+n} = copolímero injertado
M = monómero a injertar
v = velocidad de iniciación de radicales poliméricos
v_i, v_p, v_t = velocidades de iniciación, propagación y terminación de la reacción de copolimerización, respectivamente
k = constante de velocidad de iniciación de radicales poliméricos
k_i, k_p, k_t = constantes de velocidad de iniciación, propagación y terminación de la reacción de copolimerización, respectivamente.

Sin embargo, existen fenómenos físicos y/o químicos asociados que pueden modificar el resultado de la copolimerización. Por ejemplo, el estado estacionario es sólo aplicable para radicales de vida media corta. En cuanto al fenómeno de transferencia de cadena, puede conducir a la formación de homopolímero o injerto si la transferencia ocurre al monómero o al polímero, respectivamente.

Experimentalmente se ha visto que el rendimiento de la reacción de injerto no concuerda con estas deducciones teóricas. Esto es asignado a que la concentración de monómero no es homogénea sobre la superficie del polímero debido tanto a (i) efectos de solubilidad sobre P y PM_n así como a (ii) efectos de difusión por aumento de la viscosidad (efecto *Trommsdorff*), fenómeno que también incide sobre la velocidad de terminación.

1.3.1. Injerto con dos monómeros

Cuando un monómero vinílico es copolimerizado con un segundo monómero, la relación entre la composición del copolímero inicialmente formado y la mezcla inicial de monómeros está dado por $dM_1/dM_2 = M_1\ (v_1M_1 + M_2)/[M_2\ (v_2M_2 + M_1)]$. Donde dM_1/dM_2 es la relación entre monómero 1 y monómero 2 en el copolímero formado; M_1 y M_2 es la concentración de monómero 1 y 2 en la mezcla de reacción, respectivamente; v_1 y v_2 son las reactividades relativas de cada monómero. Para cualquier par de monómeros las relaciones de las constantes de velocidad de reacción de propagación vienen dadas por:

$$\sim M_1 \cdot + M_1 \rightarrow \sim M_1 M_1 \cdot \qquad k_{11} \qquad (1.16)$$

$$\sim M_1 \cdot + M_2 \rightarrow \sim M_1 M_2 \cdot \qquad k_{12} \qquad (1.17)$$

$$\sim M_2 \cdot + M_1 \rightarrow \sim M_2 M_1 \cdot \qquad k_{21} \qquad (1.18)$$

$$\sim M_2 \cdot + M_2 \rightarrow \sim M_2 M_2 \cdot \qquad k_{22} \qquad (1.19)$$

Con $v_1 = k_{11}/k_{12}$ y $v_2 = k_{22}/k_{21}$, siendo que ~M· representa el radical último de la cadena derivado de M.

Para copolímeros sintetizados en un paso de reacción, las disposiciones arbitrarias de los tipos de unidades monoméricas constituyentes de sus cadenas, son gobernadas tanto por la relación entre las reactividades de los monómeros como por las concentraciones molares de cada especie en juego [15].

En bibliografía específica, se han encontrado las reactividades relativas de copolimerización por radicales libres de pares M_1 y M_2 de monómeros vinílicos, pero no para el par de

interés DMAA/GMA [7, 15, 16]. Como el metilmetacrilato (MMA) es similar en estructura al GMA, se podría entonces asumir un comportamiento similar en las reactividades del par DMAA/GMA en función del par DMAA/MMA. Además, el par GMA/MMA posee reactividades muy parecidas entre sí (v_1: 0,82 y v_2: 0,75, a 60 °C) [16].

Las reactividades del par DMMA/MMA (M_1/M_2) son v_1: **0,57** y v_2: **2,15**. Esto significa que se verá favorecida la polimerización de MMA sobre DMAA, ya que con $k_{22} > k_{21}$ y $k_{12} > k_{11}$ (casi dos veces mayor para ambos casos) se favorece la polimerización de tipo $\sim M_2M_2\cdot$ y $\sim M_1M_2\cdot$, respectivamente. Se espera un comportamiento similar para el par DMAA/GMA.

1.4. Técnicas de análisis

En la caracterización física y química de los nuevos materiales obtenidos, se utilizan diversas técnicas para el análisis de superficie. En la figura se muestran diferentes técnicas para el estudio de superficies y su rango de análisis (Figura 1.5). En este trabajo de tesis en particular, fueron utilizadas la gravimetría, la espectroscopía de IR de superficies, microscopías ópticas (SEM) y el análisis por emisión de rayos x superficiales (EDAX).

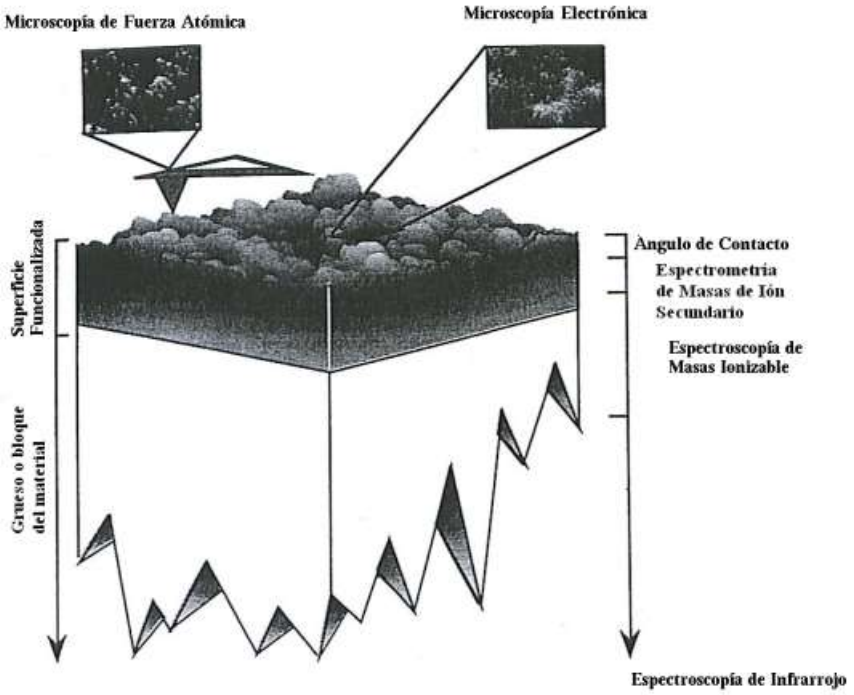


Figura 1.5 – Diferentes técnicas para el estudio de superficies y su rango de análisis (adaptado del libro *Polymer Surfaces* [17]).

1.4.1. Gravimetría: determinación del Grado de Injerto porcentual (G.I.%)

La forma más simple de evaluar una polimerización por injerto es a través de la determinación del incremento en peso del polímero base.

El grado de injerto porcentual es la cantidad porcentual de masa adicionada al polímero original, después de haber eliminado el homopolímero. La remoción del homopolímero se realiza generalmente por extracción *Soxhlet*. En este trabajo en particular, debido a la termosensibilidad de los grupos reactivos incorporados, y teniendo en cuenta que la producción de homopolímero es controlada y éste es soluble en determinados solventes inocuos para el injerto, es que se realizan lavados exhaustivos a temperatura ambiente para eliminar el homopolímero producido. Como antecedente, se presenta el caso del trabajo de Lim y col., quienes para remover el homopolímero del lumen de las fibras huecas de celulosa modificadas, también realizan lavados exhaustivos con agua destilada [18].

Esta cantidad de polímero nuevo que se adiciona se mide al décimo de miligramo por peso seco y se calcula como:

$$G.I.(\%) = [(P_i - P_o)/P_o]^*100 \tag{1.20}$$

Donde P_i representa al peso del polímero injertado y P_o al peso del polímero original.

1.4.2. FT-IR

El espectro infrarrojo de un compuesto proporciona gran información sobre la composición química, interacción entre sustituyentes y análisis de grupos funcionales específicos, lo cual convierte a la espectroscopía de IR en una herramienta de gran utilidad para el reconocimiento de estructuras químicas moleculares. Una molécula que absorbe energía electromagnética puede sufrir diferentes grados de excitación (electrónica, vibracional, rotacional) según la longitud de onda de la irradiación. El IR se divide en tres dominios: el cercano (13000 a 4000 cm^{-1}), el medio (4000 a 200 cm^{-1}) y el lejano (200 a 10 cm^{-1}). El dominio de estudio de polímeros orgánicos está usualmente localizado entre 4000 y 400 cm^{-1} [9].

El espectro de infrarrojo de un compuesto es esencialmente la superposición de bandas de absorción, correspondientes a los estados vibracionales y rotacionales, de las uniones químicas de sus grupos funcionales específicos, aunque la configuración global de la molécula le confiere un sello de individualidad (huella digital) al espectro del compuesto (en la región 900-650 nm). Las energías de las vibraciones moleculares en el análisis de IR corresponden a la longitud de onda en el rango de $2{,}5.10^{-6}$ a 25.10^{-6} m [19].

Al interpretar un espectro, por comparación empírica de espectros y extrapolación a estudios de moléculas simples, es posible establecer la presencia/ausencia de ciertos grupos funcionales en el material. Generalmente, la ausencia de absorción en los rangos asignados para los grupos funcionales (región de "frecuencias de grupo", 4000-1300 cm^{-1}) se usa como evidencia de la ausencia de dichos grupos en la molécula. La presencia de ciertas bandas características del IR en la región de "huella digital" permite la identificación de

Frecuencia ν **(cm**$^{-1}$**)**	**Grupos**	**Intensidad**
3600	O-H alcoholes libres	m, fina
3400-3200	O-H uniones intermoleculares entre polímeros	F, larga
3300-2500	O-H uniones hidrógeno entre dímeros de ácidos carboxílicos	d, muy larga
3300	C-H de alquinos	F
2960 y 2870	C-H de RCH_3 (alcanos)	F
2926 y 2850	C-H de $RR´CH_2$ (alcanos)	F
2890	C-H de RR´R´´CH (alcanos)	F
1740-1720	C=O de aldehídos alifáticos	F
1680-1620	C=C de alquenos no conjugados	v
1660-1580	C=C de alquenos conjugados con C=C o C=O	F
1660-1640	C=C de $RR´C{=}CH_2$ (vinilideno)	d a m
1645-1640	C=C de $RCH{=}CH_2$ (vinilo)	d a m
1715-1740	-C(C=O) (éster)	F
1695-1630	C=O (amido)	F
906	Grupo epóxido	d

Tabla 1.1 – Ejemplos de algunas frecuencias características de IR [9, 20]. *Donde F es fuerte, m es medio, d es débil y v es variable.*

determinadas estructuras dentro del compuesto. Algunos ejemplos de interés se citan en la Tabla 1.1.

El análisis de la intensidad de las bandas de absorción, si se conoce el coeficiente de extinción molar, permite una descripción cuantitativa.

La espectroscopía de IR por transformada de Fourier (FT-IR) en comparación con el de tipo dispersivo, posee alta resolución y exactitud en la longitud de onda, aunque menor sensibilidad. Un espectrómetro FT-IR consiste en una fuente de radiación, un interferómetro de Michelson y un detector con procesamiento computarizado de datos. Las determinaciones pueden ser realizadas en una amplia región espectral que recorre desde el IR lejano al cercano. Posee gran versatilidad ya que pueden ser estudiadas muestras sólidas, líquidas o gaseosas.

1.4.3. IR-ATR

Permite realizar estudios de superficies, no sólo mediante espectros de transmisión sino también mediante la utilización de técnicas de reflexión total atenuada (en inglés *Attenuated Total Reflection spectroscopy*, ATR). Se obtienen espectros de IR con un haz infrarrojo láser que se refleja una o múltiples veces sobre la superficie de una muestra que se encuentra en estrecho contacto con un cristal de alto índice de refracción. Estos espectros muestran la composición química a nivel superficial entre 0,5 y 3 micrones de profundidad (la profundidad de penetración de la onda infrarroja depende de la longitud de onda y es

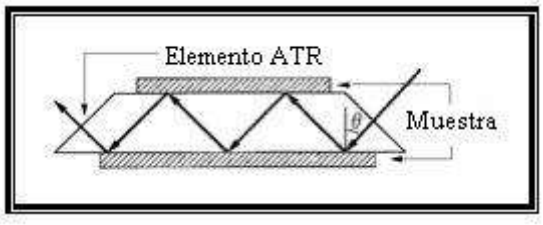


Figura 1.6 – Esquema de la reflexión del haz de luz en la placa en ATR.

independiente del espesor de la muestra).

Cuando un haz de radiación entra en una placa (o prisma) rodeada o sumergida en una muestra, se refleja internamente sólo si el ángulo de incidencia en la interfaz entre la muestra y la placa es mayor que el ángulo crítico (que es una función del índice de refracción). En la reflexión interna toda la energía es reflejada; sin embargo, existe una onda evanescente que penetra ligeramente más allá de la superficie reflectora y luego regresa. La profundidad de la penetración es de aproximadamente una longitud de onda y está dada por $dp = \lambda/[2\pi (sen^2\theta\text{-}\eta_s/\eta_c)^{1/2}]$. Donde dp representa a la profundidad de penetración, λ es la longitud de onda, θ es el ángulo efectivo de incidencia, η_c es el índice refracción del cristal y η_s es el índice de refracción de la muestra (Figura 1.6).

El modelo de ángulo variable consiste en un accesorio que se inserta en un espectrómetro convencional de IR, donde un sistema de espejos envía la irradiación de la fuente hacia el accesorio y un segundo sistema de espejos dirige la radiación hacia el monocromador. Los portamuestras se montan en cualquiera de las tres posiciones estándar (30°, 45° o 60°). La relación longitud-espesor de la placa determina el número de reflexiones después que el ángulo de incidencia ha sido seleccionado (Figura 1.7).

Los cristales generalmente usados son Seleniuro de Zinc (ZnSe) o Irtran IV, diamante, Germanio, Yoduro de Bromo Talio (I) o KRS-5, y se escogen en función de su reactividad química [21].

1.4.4. Microscopía electrónica de barrido

En la caracterización de muestras por microscopía óptica y para la obtención de micrografías, los microscopios polarizantes de transmisión y microscopios estereoscópicos (de reflexión y transmisión), son utilizados como técnica de rutina en la preparación de muestras, la observación morfológica de cristales, la observación de dominios en muestras transparentes e identificación de defectos en superficie. El microscopio electrónico de barrido (en inglés *scanning electron microscopy*, SEM) produce imágenes similares a las ópticas, pero con una gran profundidad de foco que le confiere una apariencia tridimensional característica. Resoluciones de hasta 3 nm y poder de magnificación de 30 a 300.000 veces, hacen de esta técnica una herramienta útil en la determinación de distribución de tamaño de partícula, topografía superficial y textura de materiales. Aunque la SEM posee menores resoluciones que las microscopías electrónicas de transmisión, la relativa simplicidad en la

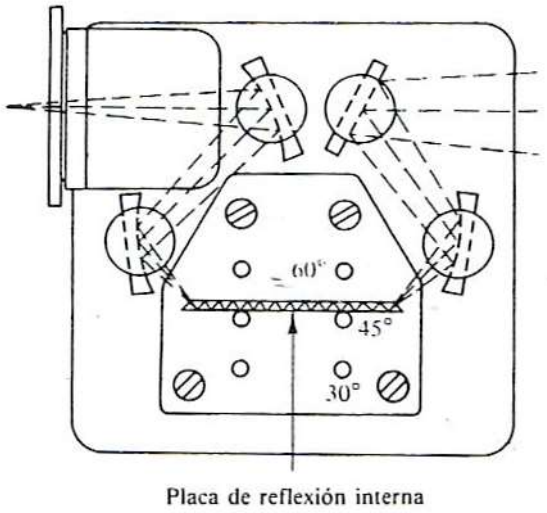


Figura 1.7 – ATR - Esquema del dispositivo de espejos del accesorio de ángulo variable.

preparación de la muestra la convierten en una microscopía de fácil operatividad.

El área superficial y la porosidad del material modificado pueden ser analizadas mediante SEM combinada con el sistema de microanálisis dispersivo de energía de rayos X (EDAX). Las técnicas de microanálisis dispersivo en energía permiten la identificación de los elementos de la Tabla Periódica de número atómico Z mayor a 11 (Na), cuya concentración en peso en la muestra sea mayor que 0,5 %.

Referencias

[1] Chmielewski A. G. and Haji-Saeid M. Radiation technologies: past, present and future. *Radiation Physics and Chemistry*, 71:16–20, 2004.

[2] International Atomic Energy Agency (IAEA). *Advanced radiation chemistry research: current status*, TECDOC–834, Vienna, 1995.

[3] Betz N. Ion track grafting. *NIMB*, 105:55–62, 1995.

[4] Mazzei R., Garcia Bermúdez G., Betz N., and Cabanillas E. Swift heavy ion induced graft polymerization in track etched membranes' submicroscopic pores. *NIMB*, 226:575–584, 2004.

[5] Mazzei R., Garcia Bermúdez G., Chappa V. C., del Grosso M. F., and Fernández A. Grafting on nuclear tracks using the actives sites than remain after the etching process. *NIMB*, 251:99–103, 2006.

[6] Hoffman A. S. Use of radiation technology in preparing material for bioengineering and medical science. In *Industrial Application of radioisotopes and Radiation Technology*, Vienna, 1982. IAEA, Conference Proceedings IAEA, 1981.

[7] Kojhin C. L. Catálogo del producto dmaa.

[8] Battaerd H. A. J. and Tregear G. W. *Graft copolymers*. New York, Interscience Publisher - A division of John Wiley & Sons, NY-London-Sydney, 1968.

[9] Betz N. *Etude des Effets d'Irradiations et du Radiogreffage, Induits dans le Polyfluorure de Vinylidène, par des Ions Lourds Rapides*. PhD thesis, These de Doctorat de l' Universite Pierre et Marie Curie (Paris VI) Spécialité: Chimie-Physique, 1992.

[10] Kim M. and Saito K. Radiation-induced graft polymerization and sulfonation of glycidyl methacrylate on to porous hollow-fiber membranes with different pore sizes. *Radiation Physics and Chemistry*, 57:167–172, 2000.

[11] Porté-Durrieu M. C., Aymes-Chodur C., Vergne C., Betz N., and Baquey Ch. Surface treatment of biomaterials by gamma and swift heavy ions grafting. *NIMB*, 151:404–415, 1999.

[12] Okamoto J. Radiation synthesis of functional polymer. *Radiat. Phys. Chem.*, 29:469–475, 1987.

[13] Mazzei R., Smolko E., Torres A., Tadey D., Rocco C., Gizzi L., and Strangis S. Radiation grafting studies of acrylic acid onto cellulose triacetate membranes. *Radiation Physics and Chemistry*, 64:149–160, 2002.

[14] Mazzei R. O., García Bermúdez G., Tadey D., and Rocco C. Grafting of poly(vinylidene fluoride) foils induced by swift heavy ions. *NIMB*, 218:313–317, 2004.

[15] Greenley R. Z. Free radical copolymerization reactivity ratios. St Louis, Missouri, Monsanto, Co., no especifica año.

[16] Nippon Oil & Fats Co. LTD. Reactive monomers. blemmer g. versatile polymer modifier., 1998. Catálogo del producto. Oleo & Specialty Chemical Division.

[17] Garbassi F., Morra M., and Occhiello E. *Polymer Surfaces. From Physics to Technology.* John Wiley & Sons, Great Britain, 1998.

[18] Lim S. L., Fane A. G., and Fell C. J. D. Radiation induced grafting of regenerated cellulose hollow-fiber membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, 41:1609–1616, 1990.

[19] Mahato R. I. *Biomaterials for delivery and targeting of proteins and nucleic acids.* CRC Press, Taylor & Francis Group, 2005.

[20] Lin-Vien D., Colthup N., Fataley W., and Grasselli J. *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules.* Academic Press, 1991.

[21] Willard, Merritt, Dean, and Settle. *Métodos instrumentales de análisis.* Grupo Editorial Iberoamericana, 1991.

Parte II

Materiales Poliméricos: Modificación por Radiaciones Ionizantes

Capítulo 2

Copolimerización por injerto radioinducida por pre-irradiación en vacío

2.1. Introducción

2.1.1. Importancia del acelerador de electrones para uso industrial

Una de las áreas más importantes de la ciencia y tecnología de polímeros es el desarrollo de métodos para modificarlos con el fin de ajustar sus propiedades fisicoquímicas, mecánicas, ópticas, entre otras, sin ningún tipo de transformación química. Uno de los enfoques más prometedores para la modificación controlada de la estructura química y de las capas superficiales de este tipo de materiales es el tratamiento con radiación ionizante.

Una de las grandes ventajas de la radiación es su capacidad para penetrar y llevar a cabo reacciones en el interior de sólidos. La baja dependencia térmica, la ausencia de iniciadores de reacción u otros aditivos, pueden ser de considerable ventaja frente a otros procesos competidores, como lo son la fotoquímica con luz ultravioleta o las reacciones de descarga de plasma, que poseen costos de capital e instalación más bajos.

En particular, la irradiación mediante electrones acelerados se ha convertido en uno de los principales procesos comúnmente usado en este campo de acción. En los últimos años, esta tecnología se transformó en una herramienta eficaz para la modificación de superficies y ha encontrado aplicaciones en procesos litográficos y de revestimiento. En la industria de los plásticos, algunas de las aplicaciones son la degradación inducida por la radiación (disminución en el peso molecular), el entrecruzamiento, los injertos, el curado y la polimerización [1]. Una de las características más interesantes es que permite introducir modificaciones y funcionalizaciones por radiación sobre diversos materiales químicamente inertes, como PE y PET, e impartirles la reactividad requerida para la formación de mezclas de polímeros y monocapas de injerto, logrando de esta forma cambiar las propiedades químicas superficiales de los mismos [2]. En cuanto al injerto, resulta en un muy buen método para la modificación superficial de materiales poliméricos, tales como láminas de polímero, membranas, fibras naturales y sintéticas, y textiles. Se modifican propiedades tales como la resistencia a la permeación, biocompatibilidad, adhesión, fricción, hidrofilicidad o hidrofobicidad, entre otras.

La aplicación controlada de la intensidad del haz de electrones ofrece obtener efectos diferenciales y formación de compuestos con estructuras tridimensionales que son difíciles de lograr de otras maneras. Por ejemplo, la producción de materiales de espuma con tamaño

de poro controlada o la producción de láminas coinjertadas para el control químico de catalizadores, la obtención de polímeros con mayor resistencia, como cables antignífugos.

En la aplicación de la irradiación con electrones acelerados se pueden encontrar las siguientes ventajas: comparado con los procesos térmicos presenta un considerable ahorro de energía, altas velocidades de proceso, permite reacciones químicas sin catalizadores y sin sensibilizadores (de particular importancia en aislantes de alto voltaje y biomateriales que deben ser libres de impurezas), permite realizar modificaciones a temperatura ambiente y a bajas temperaturas, control de proceso de radiación simple y de acción rápida, modificación y esterilización simultánea de materiales médicos, entre otros. Un acelerador industrial de haz de electrones funciona en un rango medio de energía de 0,6 a 1,5 MeV. En función de las condiciones de irradiación, pueden ocurrir diversas reacciones radio-inducidas que conducen a diferentes grupos funcionales y estructuras químicas [1].

Los aceleradores de electrones de barrido de haz de electrones han sido la principal fuente de radiación en los procesos y aplicaciones industriales.

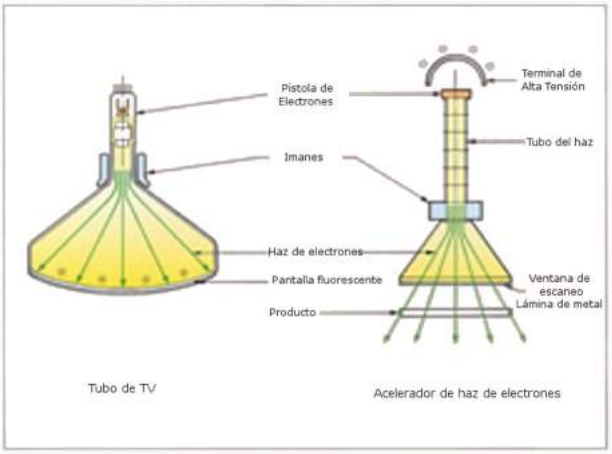
Desde fines de la década del '80, el grupo de investigación del Dr. Saito trabaja en la modificación de membranas poliméricas con metacrilatos utilizando el método de preirradiación con electrones acelerados.

2.1.2. Haz de electrones y Aceleradores

A partir de los años '30, el desarrollo de los aceleradores de corriente continua (DC) ha desempeñado un papel fundamental en la física nuclear, en el análisis de haces de iones y en la implantación de alta y baja energía. Las principales ventajas de estas máquinas son: (i) cualquier partícula cargada puede acelerarse; (ii) la dispersión de energía es bastante baja; (iii) la terminal de tensión y, por tanto, la energía de las partículas pueden ser variadas fácilmente; (iv) la intensidad del haz es continua.

En la descripción esquemática de un acelerador a nivel básico, los aspectos importantes son la fuente de iones o de partículas (que determina la intensidad del haz), el acelerador en sí (que determina la energía final alcanzada y la estructura temporal del haz) y el sistema de transporte del haz que lo lleva hasta la sala experimental en la que se realizan las medidas.

El principio básico de algunos aceleradores de electrones (como el *Dynamitron* usado en este trabajo), es similar al principio de un televisor de tubo. Los electrones son generados por un filamento caliente que constituye la fuente de éstos. Un gradiente de voltaje dispara los electrones fuera del cañón y son acelerados en vacío a través de un tubo. A medida que el haz de alta tensión de electrones pasa a través del tubo por medio de imanes se genera un campo magnético oscilante que se extiende por el haz hacia adelante y hacia atrás a través de la ventana de análisis. Una televisión opera aproximadamente a 25 keV, que es suficiente para generar imágenes de los electrones que colisionaron en la pantalla fluorescente del tubo imagen. El voltaje de los aceleradores varía de 500 keV a 5 MeV, que es lo suficientemente grande como para acelerar los electrones a través de la lámina de metal de la ventana de análisis e irradiar al producto que está por debajo.



Los electrones acelerados bajo una tensión de 5 MeV se encuentran viajando a aproximadamente 99,6 % de la velocidad de la luz cuando entran en la ventana de análisis. En un televisor, el haz es del orden de varios microamperes. En un acelerador tipo, es mil veces mayor. Es interesante observar que 1 mA representa alrededor de 6.10^{15} partículas de electrones por segundo. Donde el objetivo de una TV es crear una imagen, para un acelerador típico es enviar haces o "paquetes" de electrones de 3 a 5 cm de diámetro para irradiar los productos industriales. La gran cantidad de electrones y la aceleración de alta tensión producen reacciones rápidas por colisión directa sobre las moléculas dentro del producto. Esto significa obtener rendimientos mayores con respecto a otros métodos tales como calor, luz y reactivos químicos.

Existen varios tipos de aceleradores de electrones con diferentes características, que se pueden agrupar en cuatro grandes grupos: el primer grupo (i) de bajo voltaje, con baja penetración en el material (1 mm por unidad de densidad), generalmente usado en el estudio o tratamiento de láminas delgadas y películas o en reacciones de superficie; (ii) los de voltaje mas elevado que los anteriores, que producen entre 2 y 4 MeV, que fueron los primeros tipos de aceleradores usados en investigaciones como radiólisis por pulso, con poder en el orden de los kW y con penetración de alrededor de 1 cm por unidad de densidad; (iii) los de alto voltaje y de alta penetración, pero con bajo poder, se utilizan cuando es esencial una mayor penetración y también cuando las reacciones nucleares están involucradas; el cuarto grupo (iv) se encuentra en la región intermedia, entre 0,6 a 1 MeV, y es necesario una fuente de alto poder ya que hasta 400 keV carece de penetración.

Para el tipo de aplicaciones donde se requieren procesos rápidos o una prolongada exposición, que podría derivar en efectos secundarios indeseables (tales como las reacciones de oxidación), se prefieren los haces de electrones de alta intensidad [3].

La máxima cantidad de energía (E) transmitida permitida para no producir radioactividad es 10 MeV. Los haces de electrones tienen energías entre 0,2 MeV y 10 MeV y los rayos gamma de ^{60}Co una $E_{promedio}$ de 1,25 MeV. El haz de electrones de un acelerador de tipo en cascada como el utilizado en este trabajo no produce isótopos radiactivos ya que es operado con una energía de 1 MeV y con corriente de 1 mA.

2.1.3. Sobre dosis y velocidades de dosis

El uso de las radiaciones ionizantes en cualquier proceso depende de la transferencia de energía desde el haz de radiación hacia al material que se está siendo procesado. Dosis se define entonces como la energía absorbida por el material o producto, es la cantidad

medida y no lo que es emitido por la fuente de radiación o por el acelerador de haces de electrones. La medición de la dosis es una parte fundamental en el proceso de irradiación. La unidad de medida de dosis es el Gray (Gy), que es definido como la absorción de 1 Joule de energía por kilogramo de material.

Para diversos procesos las dosis típicas necesarias son, por ejemplo: 5 - 10 kGy para el tratamiento de gases de chimenea; 10 - 50 kGy para injerto de polímeros; 10 - 60 kGy para esterilización; 25 - 50 kGy para polimerización; 50 - 250 kGy para entrecruzamiento de polímeros; 100 - 400 kGy para la vulcanización del caucho; 500 - 1500 kGy para la degradación de fluoropolímeros; mayores a 1500 kGy para la coloración de piedras preciosas.

Otro concepto importante es la penetración, que es la distancia total que pueden penetrar los electrones en un determinado material. Esta distancia se encuentra en función tanto de la energía de los electrones (a mayor energía, mayor penetración) como de la densidad del material (mayor densidad, menor penetración).

2.1.4. Polimerización por injerto por activación con haces de electrones acelerados

El PE y el PP son utilizados para obtener membranas de micro (MF) y ultra filtración (UF). Para aplicaciones biológicas, la hidrofilización de membranas de microfiltración hidrofóbicas es necesaria para disminuir la adsorción inespecífica de proteínas cuando se tratan fluidos biológicos como sueros, medios de cultivo y soluciones de enzimas, ya que la adsorción no selectiva sobre la membrana de MF causa tanto pérdidas en el producto como taponamientos de membrana. Para evitar este inconveniente, es común la modificación química de la superficie porosa para hacerla más hidrofílica.

En general, cuando la técnica de injerto se aplica para incorporar funcionalidad en una membrana porosa, el polímero injertado se forma en la superficie del poro, lo cual introduce una disminución en la permeabilidad al agua [4].

Los grupos hidroxilo alcohólicos y sus análogos son una buena opción para hidrofilizar materiales poliméricos. Estos grupos, provenientes de diversos tipos de monómeros vinílicos injertados sobre la MF necesitan ser seleccionados en función de algunos criterios, como mantener el flujo filtración y disminuir la adsorción inespecífica de proteínas a la membrana modificada. Con este fin, el grupo de Kim y col. por medio de la polimerización por injerto radioinducido, incorporaron distintos monómeros vinílicos conteniendo hidroxilos (mono- y dioles) sobre membranas de MF de PE [5]. Los monómeros evaluados fueron el 2-hidroxietil metacrilato (HEMA), el acetato de vinilo (VAc), y el glicidilmetacrilato (GMA). Como resultado, el único de los monómeros injertados que no disminuye significativamente el flujo de permeación y además mantiene la densidad de grupo hidroxilo relativamente constante es el GMA (ente 5 y 7 moles de grupos hidroxilos por kilogramo de membrana de MF). Las capacidades de adsorción inespecíficas a proteínas como seroalbúmina bovina (BSA) y gamma globulina bovina disminuyeron significativamente en las membranas modificadas con GMA (a 1 mg/m^2). Además, la adsorción cambia de irreversible a reversible [5].

Diferentes grupos intercambiadores de iones, grupos quelantes y pequeñas moléculas

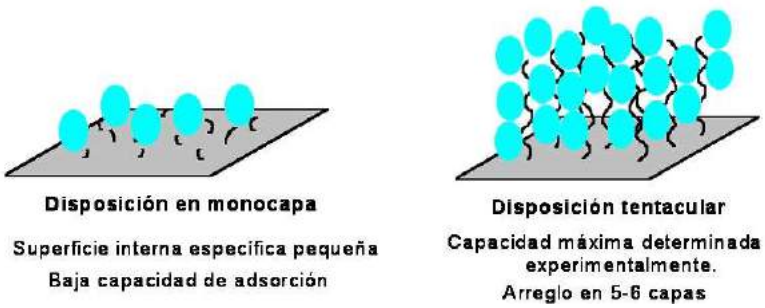


Figura 2.1 – Disposición en monocapa *vs* Disposición tentacular

han sido inmovilizados en los poros de membranas de fibra hueca modificadas con injertos radioinducidos [4, 6, 7, 8, 9]. En particular, con la inmovilización de pequeños grupos de intercambiadores iónicos, como el ácido sulfónico o la dietilamina (DEA), se obtuvieron fibras huecas porosas de PE con injerto de GMA del tipo "tentacular" (Figura 2.1). Este tipo de disposición tridimensional de las cadenas injertadas permite la adsorción en multicapas (con factores de adsorción de hasta 50 veces con respecto a la monocapa) con lo cual aumenta la capacidad de adsorción de proteínas [6, 10]. En uno de los trabajos realizados sobre PE con injerto de GMA por bombardeo de haz de electrones acelerados, se observó por SEM que la estructura del poro se mantiene, siendo que el injerto invade la estructura de la matriz, resultando entonces en una densidad de grupos DEA elevada, con disposición del tipo "tentacular". Los grados de injerto comúnmente utilizados por este grupo de trabajo para enmascarar al PE se encuentran en el orden del 100 GI% al 200 GI% [11].

Los L-aminoácidos han sido usados como ligandos de afinidad pseudobioespecíficos para proteínas de interés clínico. De este modo, tanto fenilalanina (Phe) como triptófano (Trp) pueden ser usados como ligandos de afinidad a IgG en el tratamiento de enfermedades inmunes como el reumatismo y *miastenia gravis* [12]. Los aminoácidos, así como ligandos hidrófobicos, no han mostrado un comportamiento similar al descrito anteriormente cuando son inmovilizados a la misma matriz de polímero modificada [13, 14, 15]. De la misma manera, péptidos y proteínas tampoco han sido satisfactoriamente inmovilizados con una organización tentacular sobre injertos de GMA, resultando en membranas de afinidad de baja capacidad de adsorción [16].

La DMAA ha sido injertada sobre membranas de PP por medio de copolimerización por injerto iniciada por descarga de plasma [17]. Esta membrana de ultrafiltración presentó una capacidad de separación del plasma y hemocompatibilidad excelentes. Sin embargo, fue necesario mantener un bajo grado de injerto para mantener el flujo a través de la membrana [17]. Además, la DMAA no posee los grupos reactivos necesarios para inmovilizar ligandos sobre el polímero modificado.

En las matrices cromatográficas convencionales, las partículas altamente porosas tradicionalmente utilizadas son diseñadas para maximizar el área superficial y por lo tanto para

maximizar la capacidad de unión, aún cuando su morfología interna límite el transporte de masas en el soporte cromatográfico.

Se presenta como desafío encontrar una manera de exponer la fase móvil y las moléculas objetivo a toda la superficie del material cromatográfico de forma rápida y eficiente, incluyendo el área dentro de los poros. En membranas, la relación entre el área superficial y el volumen es superior en la conformación de fibra hueca con respecto a la configuración plana.

De este modo, la síntesis de membranas macroporosas funcionales capaces de capturar iones y moléculas por un mecanismo adsortivo, donde el analito será transportado por convección, permite una adsorción y procesos de elución más rápidos [18].

En el presente trabajo se utiliza la técnica de copolimerización por injerto mediante la activación por haces de electrones acelerados (EB) para modificar las membranas de microfiltración de PE. Se seleccionan los monómeros GMA y DMAA en función de sus características funcionales para ser coinjertados sobre las membranas macroporosas de fibra hueca de PE. Se espera que el copolímero injertado sobre el material base pueda compartir las propiedades deseadas de los monómeros de GMA y DMAA: reactividad química y permeación (propiedades de flujo de filtración elevadas) de las membranas injertadas con GMA y la hidrofilicidad y solvatación de aquellas injertadas con DMAA.

Como se muestra en la Figura 2.2 (Esquema I), el GMA es injertado en el PE poroso por polimerización por injerto radioinducida y posteriormente se adiciona la Phe por reacción química sobre el grupo epóxido reactivo. En un segundo esquema, el GMA y la DMAA son copolimerizados sobre las fibras huecas de PE (Figura 2.2, Esquema II).

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Polímero base y monómeros a injertar

Membrana de PE poroso, configuración de fibra hueca, como polímero base. Con diámetro interno y externo de 0,7 y 1,2 mm, respectivamente; con diámetro promedio de poro de 0,1 μm y porosidad del 71 %.

Monómeros GMA y DMAA, obtenidos comercialmente de la Tokio Kasei Co. (Tokio, Japón). L-Phe y otros reactivos fueron de grado analítico o superior.

2.2.2. Procedimiento para la reacción de polimerización por Injerto en membranas macroporosas de PE

Las condiciones de pre-irradiación con electrones acelerados y de reacción de injerto de GMA sobre PE son similares a las utilizadas en los trabajos de Yamagishi [4] y Kim [5]. Fibras huecas de 10 cm de largo son irradiadas en un acelerador de electrones de tipo en cascada (*Dynamitron, Modelo IEA 3000-25-2, Radiation Dynamics, Inc.*), a temperatura ambiente y en atmósfera de nitrógeno. El acelerador es operado con una energía de 1 MeV y con corriente de 1 mA. Inmediatamente después de la irradiación, con una dosis total de

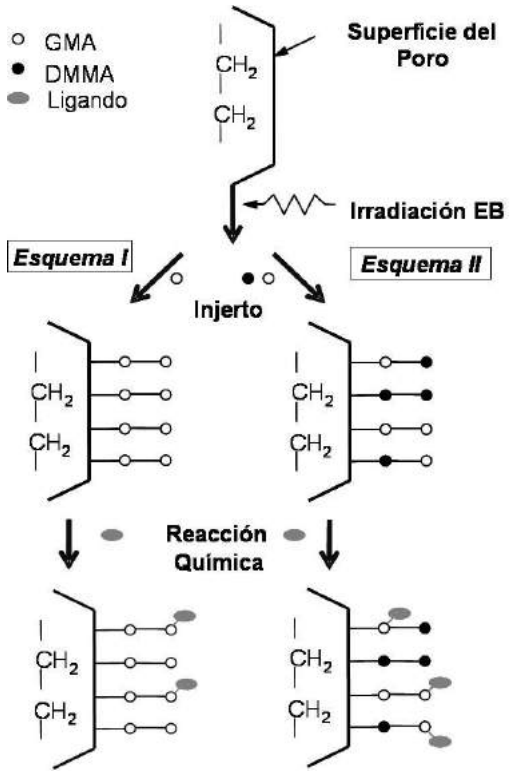


Figura 2.2 – Esquemas de trabajo para la adición de Phe sobre las fibras huecas de PE macroporosas modificadas con: injerto de GMA (Esquema I) y copolímero de GMA/DMAA (Esquema II).

200 kGy, las fibras huecas se sumergen en una solución al 10 % de GMA (v/v) en etanol a 40 °C. Después de un tiempo preestablecido, las fibras se retiran del medio de reacción y son lavadas varias veces con dimetilformamida (DMF) y metanol, posteriormente se secan en estufa al vacío. La fibra hueca resultante se denomina como membrana-GMA (M-G).

La copolimerización por injerto de GMA y DMAA en la fibra porosa de PE se realiza con la misma técnica de pre-irradiación utilizada para incorporar GMA. Membranas de fibra hueca de 10 cm, son irradiadas como se describe anteriormente. Inmediatamente después de la irradiación se sumergen a las fibras en una solución de GMA al 10 % (v/v) y volúmenes variables de DMAA en etanol desde 3 a 30 % (v/v), a 40 °C. Concentraciones finales de 3,5; 7; 15 y 30 % (v/v) de DMAA se utilizan para preparar las diferentes soluciones de monómero. Una vez finalizada la polimerización, se lavan y secan, de manera similar a lo anteriormente descrito en esta sección. La fibra resultante se denomina como membrana-X D/G (M-X D/G), donde X representa la proporción molar de ambos monómeros en la composición del copolímero.

2.2.3. Análisis de las muestras irradiadas por determinación del Grado de Injerto porcentual (GI%) y Grados de Conversión

El GI% se determina como se describe en la sección 1.4.1 del Capítulo I. La adición química posterior se monitorea por la relación de incremento en peso, como

$$RP(\%) = [(P_2 - P_1)/(P_1 - P_0)]^*100 \tag{2.1}$$

donde P_2 es el peso de la fibra después añadir Phe a la membrana GMA.

El Grado de conversión (X) del grupo epoxi en la reacción de Phe sobre la membrana-GMA se define como

$$X(\%) = [(P_2 - P_1)/165]/[(P_1 - P_0)/142]^*100 \tag{2.2}$$

donde 165 y 142 son los pesos moleculares de Phe y GMA, respectivamente.

Para calcular el X% en la adición de Phe a M-X D/G, se tienen en cuenta los siguientes dos supuestos: (a) todos los grupos epoxi son convertidos y (b) son posibles dos reacciones químicas de conversión en este grupo: la adición de Phe o la hidrólisis del grupo epoxi. Por lo tanto, la fórmula anterior (2.2) puede reformularse a (2.3):

$$X(\%) = [(P_2 - P_1) - 18^*mG/(165 - 18)]/mG\ ^*100 \tag{2.3}$$

donde mG corresponde a la cantidad molar de GMA en el copolímero que se define como

$$mG(mol) = (P_1 - P_0)/(142 + 99^*D/G) \tag{2.4}$$

donde 99 es el peso molecular del DMAA y D/G es la proporción molar de DMAA a GMA en la membrana injertada de acuerdo a las determinaciones de IR.

2.2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Micrografías de las membranas de GMA y D/G son tomadas por microscopía electrónica de barrido (SEM). Las membranas de fibra hueca son secadas a presión reducida y son fracturadas en nitrógeno líquido para observar la estructura interna del poro.

2.2.5. FT-IR

Espectros IR de transmisión (en modo absorbancia) son registrados para GMA, DMAA, y siete diferentes mezclas de ambos monómeros (rango 0,2 - 7 de relación molar D/G) por medio de un espectrómetro FTIR Shimadzu 8100A.

2.2.6. Determinación de la proporción de monómeros de GMA y DMAA en el copolímero

La composición de copolímero en el injerto se estima a partir del área de la señal IR del carbonilo, a través de la relación de áreas de los picos de carbonilo correspondientes a GMA y DMAA. Previamente, se construye una curva de calibración de la relación de áreas de las señales IR de carbonilo utilizando mezclas conocidas de monómeros.

La relación de áreas se calcula a partir la señal de vibración de estiramiento del grupo carbonilo, de intensidad fuerte a 1720 cm^{-1} y 1649 cm^{-1} para GMA y DMAA, respectivamente. La relación de ambos se hace una calibración en base a una mezcla de monómeros en solución.

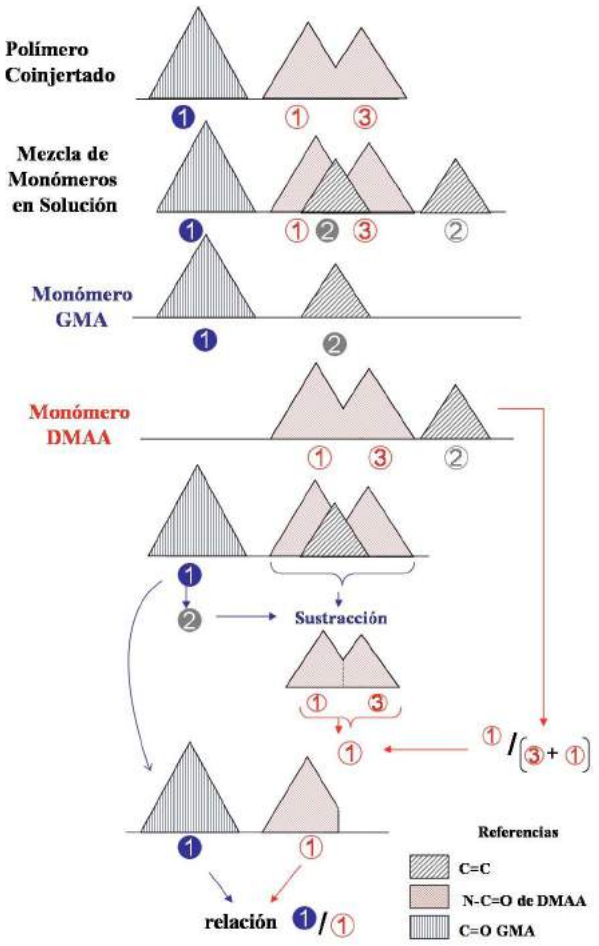


Figura 2.3 – Esquema para realizar las correcciones correspondientes y obtener la curva de calibración para la mezcla de monómeros.

Para estimar la composición relativa de monómero en el material injertado, se asume que la relación de la señal IR del carbonilo de la mezcla líquida de monómeros y la relación de la señal IR de carbonilo en las muestras en estado sólido son similares. Los espectros IR correspondientes a los monómeros contienen además las señales correspondientes a los grupos vinilo. En el caso del GMA, esta señal se encuentra a 1637 cm^{-1} e interfiere con la señal del carbonilo de la DMAA. Entonces se plantea un procedimiento de sustracción para corregir esta desviación en la construcción de la curva de calibración (Figura 2.3).

Para ello, por pesada se determina la relación de áreas para la DMAA (asignada con color rojo, Figura 2.3). Siendo el área total la suma de ambas áreas, el área del pico más comprometido (número 3, en rojo) será igual a la relación de áreas del pico 1 y la total (1+3). Lo mismo para GMA. A partir del espectro de GMA y correlacionando con el pico 1 en azul, se obtiene el aporte del pico 2 gris en la mezcla de ambos monómeros. Este valor se sustrae del área total de la señal de la zona de 1600 cm^{-1} correspondiente a la muestra. Una vez realizadas estas correcciones, se procede a relacionar ambos monómeros (área del

pico 1 rojo en función del área del pico 1 azul). Este procedimiento se esquematiza en la Figura 2.3.

Una vez realizadas estas correcciones se procede a correlacionar la señal de la relación de áreas con la relación DMAA/GMA y así obtener la curva de calibración, para luego entonces poder establecer la relación molar en la composición del copolímero.

2.2.7. Acoplamiento de Phe

A continuación de la reacción de injerto, se acopla Phe químicamente al grupo epoxi. Las membranas de fibra hueca injertadas son sumergidas en una solución 0,08 M Phe (pH 13 ajustado utilizando NaOH 1M) a 80 °C. La reacción se desarrolla por 24 hs, las fibras son removidas del medio de reacción, se lavan con agua repetidas veces a tiempos preestablecidos, se secan y se pesan. La incorporación de ligando sobre las fibras huecas injertadas es determinado por incremento de peso. Las membranas resultantes son denominadas membranas-GMA-Phe (M-G-Phe) o membranas-X D/G-Phe (M-X D/G-Phe), según el monómero o mezcla de monómeros injertados.

2.2.8. Determinación del flujo de filtración de agua pura

La permeabilidad al flujo de agua pura a través de la membrana de fibra se mide bajo el método de presión constante (a 0,1 MPa) utilizando un aparato de fabricación casera similar al descrito por Yamagishi y col. [4] (Figura 2.4).

En este esquema se representa: (1) Recipiente de alimentación; (2) Controlador de flujo; (3) Manómetro; (4) Fibra hueca; (5) Probeta.

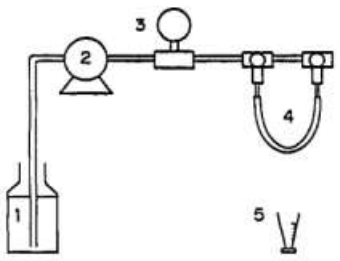


Figura 2.4 – Esquema del dispositivo para la determinación de flujos de agua (adaptado de Yamagishi [4]).

Después de que las membranas se sumergen en metanol, el agua deionizada es forzada a permear radialmente hacia el exterior a través de la fibra hueca. El flujo de permeación se obtiene dividiendo el flujo de permeación (flujo de filtración) por la superficie interna de la membrana (área de filtración).

2.2.9. Determinación del parámetro de hidratación

Otra característica es el grado de hidratación del polímero, representado por el parámetro SW % que se define como

$$SW\,\% = (D_H - D_S)/D_S \; {}^*100 \tag{2.5}$$

donde D_H y D_S son los diámetros externos de la membrana en los estados húmedo y seco, respectivamente. El diámetro externo de las membranas injertadas se mide con una escala utilizando un microscopio óptico, antes y después de 20 minutos de hidratación a temperatura ambiente. Es necesario un tratamiento con metanol por 10 minutos sobre las membranas secas para llenar los poros antes del tratamiento con agua.

2.3. Resultados y Discusión

2.3.1. Determinación de la proporción de monómeros de GMA y DMAA en el copolímero

Debido a que las velocidades de incorporación de los diferentes monómeros en la reacción de injerto son diferentes, y dependientes además de las cantidades de monómero presentes, es que se propuso encontrar la relación de monómeros óptima tal que en el injerto final se encuentren en una proporción molar de uno a uno. Para ello se copolimeriza sobre el soporte base diferentes proporciones iniciales de los monómeros GMA y DMAA. Cabe aclarar que no se han logrado obtener polímeros injertados sólo con poliDMAA, ya que se encuentra favorecida la formación de homopolímero sobre el injerto.

Se estudió correlacionar directamente la altura de los picos a 1720 cm^{-1} y a 1652 cm^{-1} correspondientes a GMA y DMAA, respectivamente para realizar la curva de calibración de la mezcla de monómeros. Sin embargo, como puede observarse en la Figura 2.5 B, no se obtuvo una buena correlación (siendo que además no pasa por el cero). Se adopta entonces la correlación con las áreas (Figura 2.5 A) que resultó ser de $Y_{(\text{relación de señal de áreas})} = 0{,}67624\ X_{(\text{DMAA/GMA})} - 0{,}0831$ (R^2: 0,99241) y fue $Y_{(\text{relación de señal de áreas})} = 0{,}67627\ X_{(\text{DMAA/GMA})} - 0{,}06$ (R^2: 0,993), si se considera el cero.

2.3.2. Comparación de las velocidades de injerto

Los radicales formados en el PE base por efecto de la irradiación son los iniciadores de la reacción de polimerización por injerto a partir de una solución de monómeros vinílicos. Las velocidades de injerto del GMA, la DMAA, y de una combinación de ambos en proporción equimolar sobre la fibra hueca porosa de PE se muestran en la Figura 2.6.

Las membranas de PE que estuvieron en contacto con una solución de monómeros de GMA exhibieron una elevada velocidad de injerto como consecuencia de la gran superficie interna expuesta; por el contrario, las membranas que fueron sumergidas en una solución de monómeros de DMAA a igual concentración, mostraron un grado de injerto insignificante para las mismas condiciones de reacción (polímero base, temperatura y solvente). La mezcla D/G (1:1) presentó polimerización, con un comportamiento intermedio (más lento) en cuanto a la velocidad de injerto.

La presencia de copolímero DMAA/GMA injertado en la membrana de PE fue detectado por la presencia de las señales en 1720 cm^{-1} y 1652 cm^{-1} por medio de IR.

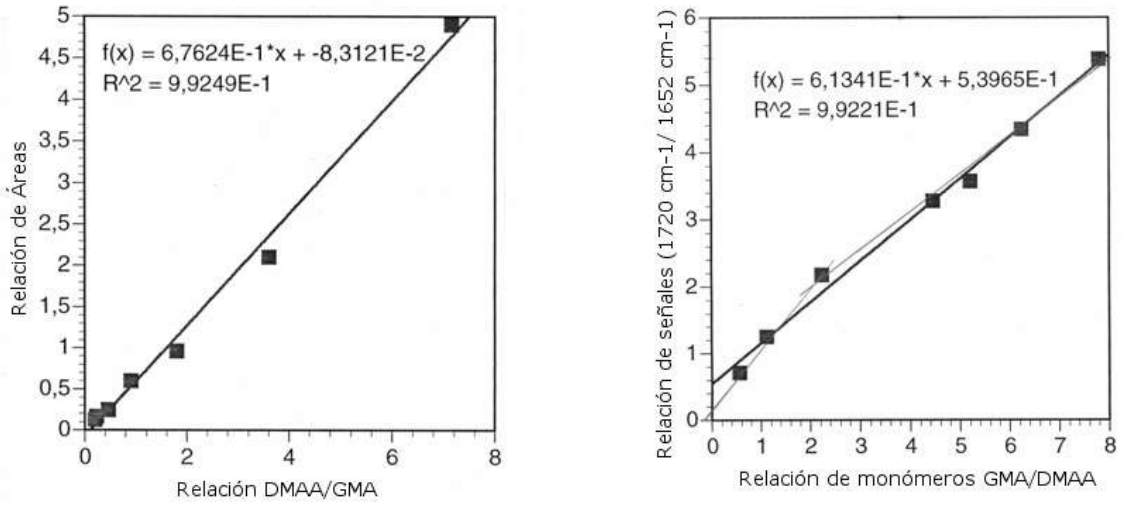


Figura 2.5 – Curvas de calibración: (A) considerando relación de áreas; (B) considerando relación de alturas.

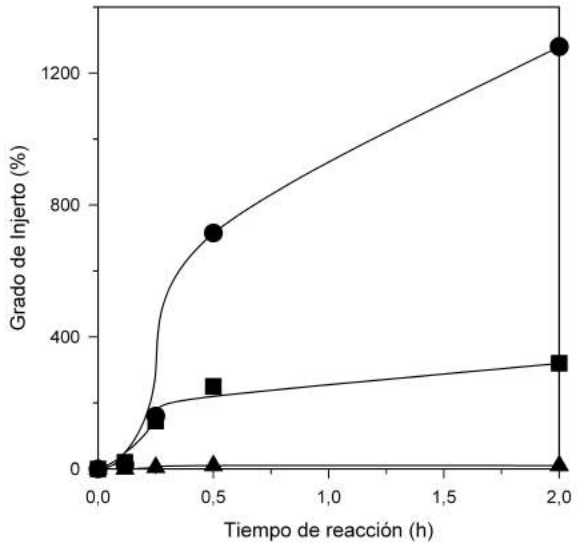


Figura 2.6 – Efecto del tiempo de reacción de injerto en el grado de injerto con soluciones al 10 % v/v de monómeros y mezcla de monómeros sobre membranas de fibra hueca de PE: (•) GMA, (■) D/G (1:1), (▲) DMAA.

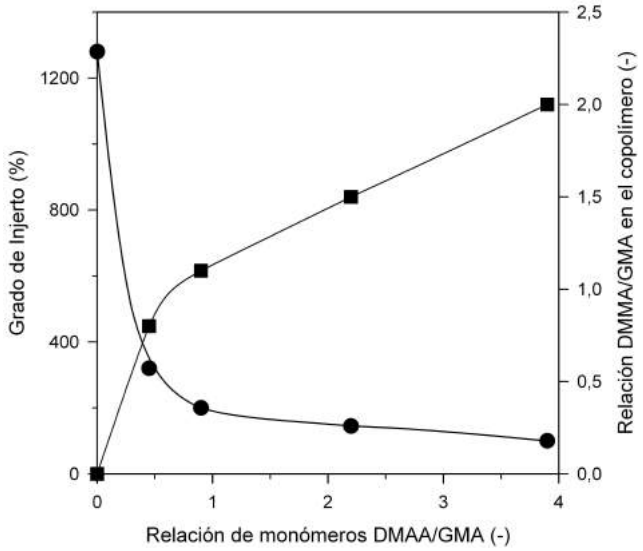


Figura 2.7 – Efecto de la relación de monómeros DMAA/GMA en el tubo de reacción sobre el grado de injerto y sobre la composición relativa en el copolímero (a tiempo de reacción 2 horas): (•) GI %, (■) composición del copolímero injertado.

La ocurrencia de la aparición de polímeros injertados y las velocidades de su crecimiento están en correspondencia con la cantidad relativa de GMA en la mezcla de monómeros. Como se muestra en la Figura 2.7, al añadir cantidades crecientes de DMAA sobre un volumen constante de GMA (10 % v/v) en etanol se observa una reducción sobre el grado de injerto en las membranas de PE después de dos horas de reacción de polimerización.

La relación D/G sobre la estructura del polímero injertado fue estimada por espectroscopía FT-IR. Se utilizó la relación de áreas de la señal IR del carbonilo para calcular la composición de monómeros en los copolímeros injertados. Esta relación fue calculada a partir de la curva de calibración detallada en la sección 2.2.6. y de los resultados de la sección 2.3.1 de este mismo capítulo. La relación de monómeros D/G en la constitución del polímero muestra ser lineal en un rango de 1 a 4 moles (Figura 2.7). Sin embargo, esta composición en el polímero no es proporcional; la relación GMA en el polímero injertado aumenta con respecto a la relación molar inicial en el tubo de reacción.

2.3.3. Acomplamiento de Phe

Para realizar el siguiente estudio comparativo, se sintetizaron membranas con injerto de GMA (M-GMA ó M-G) y membranas mixtas D/G (M-X D/G), con cuatro relaciones D/G diferentes, estableciendo un GI % entre 170 a 220 %. Según estudios previos, tanto la estructura interna de poro como la permeabilidad al agua permanecen constantes en un rango de hasta 320 % de grado de injerto en membranas con GMA hidrolizado [5]. Además, un grado de injerto grado del orden del 200 % fue seleccionado por otros autores

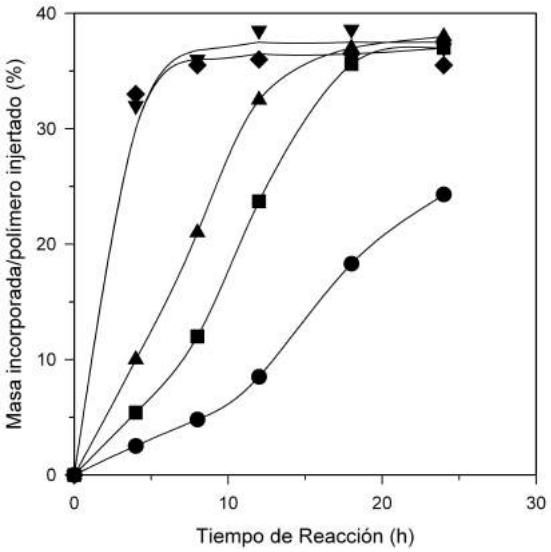


Figura 2.8 – Cinética de la adición de masa en la reacción de inmovilización de Phe (RP %) en membranas -GMA y -D/G: (●) GMA (■) 0,9 D/G (▲) 1,1 D/G (◆) 1,5 D/G (▼) 2 D/G.

para obtener diversas membranas adsortivas [7, 19].

Sobre estas membranas se realizó la reacción de adición de Phe, tal como se indica en la sección 2.2.7. La relación de incremento en peso se define como RP (%) y se describe en la sección 2.2.3 (Ec.2.1). La Figura 2.8 muestra el rendimiento en la adición de masa en relación a los polímeros injertados en función del tiempo de reacción. En estas condiciones de reacción ha sido descrito que la hidrólisis de los grupos epóxidos de membranas injertadas con GMA es despreciable [13]. Por lo tanto es posible calcular la fracción molar de grupos epóxidos que reaccionó como se observa en la Figura 2.8. La conversión cercana al 20 % obtenida a las 24 horas de reacción para las M-G se corresponde con los obtenidos por otros autores [13]. Todas las membranas injertadas con el copolímero mostraron mayor adición de masa (alrededor del 35 %) que las M-GMA.

Además, puede observarse que la cinética de incorporación de Phe fue más rápida cuanto mayor era la proporción de DMAA en el copolímero (representadas por las pendientes de las curvas de la Figura 2.8). Los espectros de IR demostraron la ausencia de grupos epóxidos después de 24 hs de reacción en todas las membranas injertadas con D/G (señal a 907 cm^{-1}, datos no mostrados) en contraste con las M-G que sí presentaban una señal residual. Además, se demostró que las membranas injertadas con el copolímero son más sensibles a la hidrólisis alcalina (Grasselli, resultados no publicados). Por lo tanto, para las M-X D/G es posible estimar la concentración de Phe incorporada asumiendo una conversión total de los grupos epóxidos (reacción de inmovilización más hidrólisis), utilizando las ecuaciones 2.3 y 2.4 que se definen en la sección 2.2.3.

En la Figura 2.9 se muestra la conversión de los grupos epóxidos de la fracción de

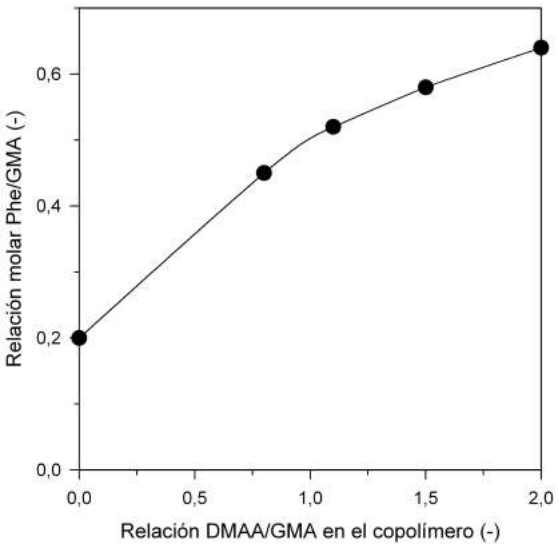


Figura 2.9 – Relación molar de incorporación de Phe para los distintos copolímeros injertados.

GMA en el copolímero en la reacción de adición de Phe. La M-G muestra sólo el 20 % de conversión epoxi como se informó anteriormente. La eficiencia de la adición de Phe *versus* la reacción de hidrólisis fue mayor cuanto mayor es la proporción de DMAA en la composición del copolímero. Existen al menos dos posibles explicaciones para el aumento de la eficiencia en las reacciones de adición: (i) en primer lugar, al ser los copolímeros más solubles en agua, hay una mejor difusión de los reactivos; (ii) en segundo lugar, hay menos impedimento estérico. Se obtuvo una conversión del 64 % para el copolímero 2 D/G. Este elevado nivel de conversión sólo había sido logrado con ligandos ionizables como dietilamina (80 % de conversión) e iminodiacético (60 % de conversión) sobre M-G [20].

2.3.4. Determinación del flujo de permeación de agua pura y del parámetro de hidratación

La medida de los diámetros relativos de las fibras en estado húmedo y seco brinda un parámetro para comparar la hidrofilicidad de los materiales injertados. De este modo, en la Tabla 2.1 se exponen los resultados del efecto de la composición de monómeros en los copolímeros injertados en función de la relación de hidratación (SW %), definida por la Ec. 2.5 en la sección 2.2.9.

En el caso del SW % de las membranas se observa que las membranas con relación 0,9 D/G y 1,1 D/G mantienen el diámetro externo constante previo a la reacción química de adición de Phe, mientras que las que poseen proporciones mayores de DMAA (1,1 a 2 D/G) mostraron un pequeño aumento en el parámetro de hidratación. Se puede apreciar un aumento significativo en el SW para todas las membranas durante y posterior a la reacción

Tipo de Membrana	SW (%) Previo a la reacción química	SW (%) Posterior a la reacción química
M - G	1,4	3
M - 0,9 D/G	1	7,2
M - 1,1 D/G	1,1	7,7
M - 1,5 D/G	2,5	10
M - 2 D/G	5	25

Tabla 2.1 – Parámetros de la relación de hidratación obtenidos para membranas GMA y diferentes membranas coinjertadas D/G previo y posterior a la reacción de adición de Phe.

química de incorporación de Phe (Tabla 2.1 y Figura 2.10). Las fibras huecas M-G-Phe mostraron un ligero aumento en el diámetro externo, principalmente como consecuencia del pH alcalino del medio de reacción que afectan a la matriz de PE [13]. Sin embargo, el progresivo incremento en el SW obtenido en las membranas D/G puede asignarse a la hidrofilicidad de la DMAA.

La tendencia de la relación de hidratación para cada polímero (Figura 2.10) muestra una estrecha similitud con la forma de la tendencia de RP (%) (Figura 2.8). A pesar de esta similitud con las curvas de RP % en todas las membranas D/G, el SW de cada copolímero muestra diferentes valores finales a tiempos de reacción mayores a 10 horas (SW % entre 5 y 25).

Se realizaron determinaciones de flujo de agua a una presión de 0,1 MPa en las diferentes membranas (M-G, M-G-Phe, M-X D/G, M-X D/G-Phe). El flujo se mantuvo prácticamente constante en todos los copolímeros hasta una relación de D/G de 0,9 (Figura 2.11). Relaciones mayores de D/G mostraron una reducción progresiva del flujo hasta hacerse despreciable para el copolímero con una relación de 2 D/G. Resultados similares se obtuvieron para las M-G-Phe y las M-X D/G-Phe, con dos diferencias principales: (i) en primer lugar, con respecto a las membranas epoxi respectivas, un mayor flujo de permeación fue mostrado por las M-G-Phe y las M-D/G-Phe con menor proporción en DMAA Este comportamiento es asignado al efecto de hidratación por pH alcalino sobre la matriz de PE [13]. En segundo lugar, la M-1,5 D/G-Phe mostró un menor flujo de permeación con respecto a M-1,5 D/G-epoxi. Este comportamiento podría ser debido a un estiramiento parcial de la estructura de injerto como consecuencia de estructura más hidrofílica de la membrana con Phe. Por último, los escasos flujos de permeación medidos para las M-2D/G (epoxi y Phe) podrían deberse a estiramientos en la estructura del copolímero debido al elevado contenido de DMAA en el mismo. El comportamiento en la reducción del flujo de permeación está en concordancia con las propiedades de hidratación mostradas por todas las membranas D/G.

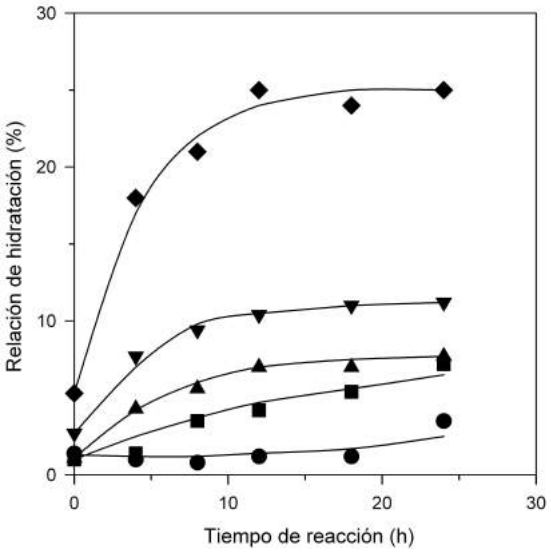


Figura 2.10 – Efecto del tiempo de reacción de adición de Phe sobre el parámetro de hidratación SW para membranas-G y -D/G: (•) GMA; (■) 0,9 D/G; (▲) 1,1 D/G; (▼) 1,5 D/G; (♦) 2 D/G.

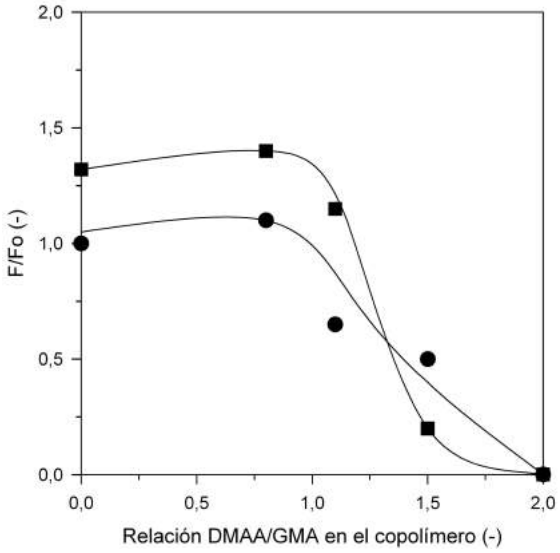


Figura 2.11 – Efecto de la composición DMAA/GMA del polímero sobre las propiedades de permeación, medido como la relación de flujo respecto al flujo de filtración de agua pura a 0,1 MPa de la membrana de GMA: (•) membranas Epoxi; (■) Membranas-Phe.

2.3.5. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La estructura porosa interna de todas las membranas se encuentra preservada, tanto para GMA como para D/G. Esto se visualiza en las siguientes fotos (Figura 2.12) de cortes de sección transversal, perpendiculares al eje principal de membrana, observadas por SEM.

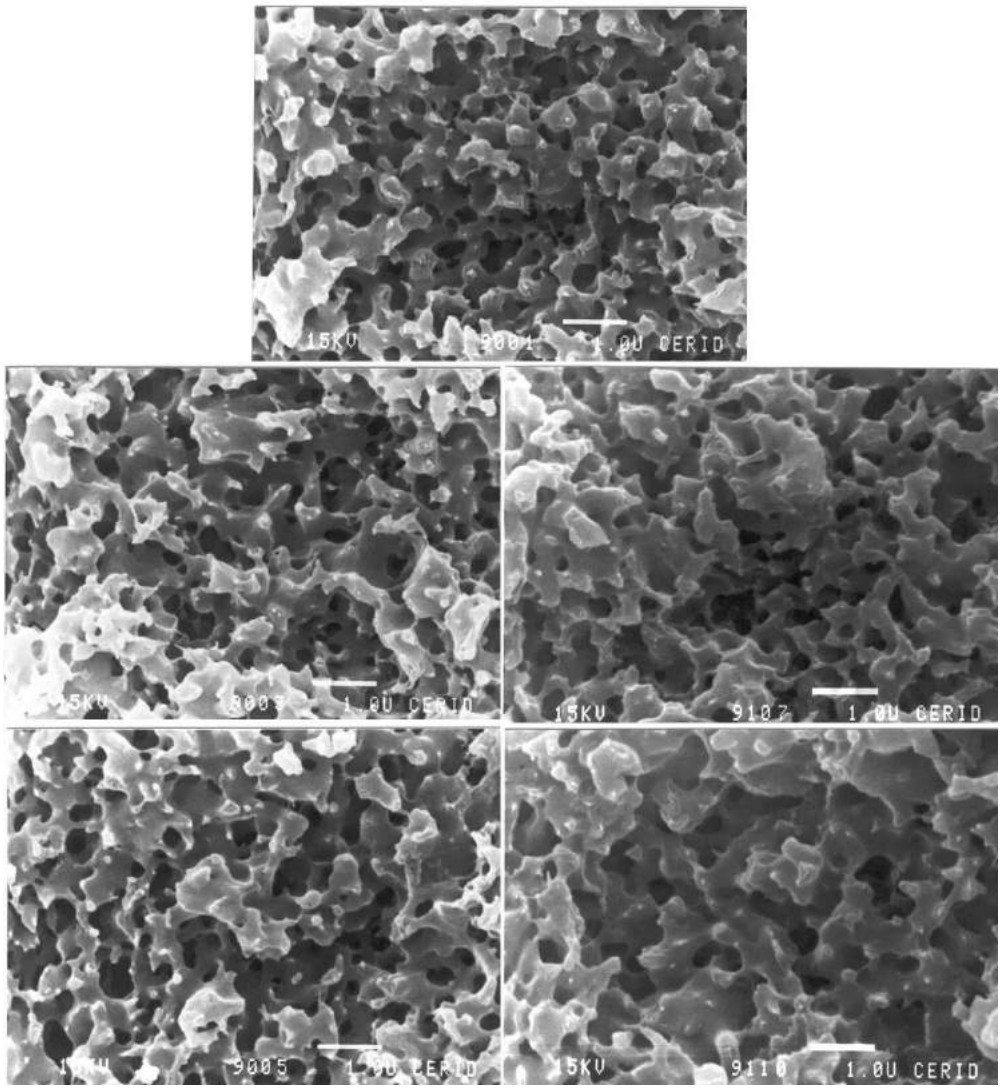


Figura 2.12 – Fotos SEM de membranas GMA (arriba al centro) y membranas coinjertadas D/G con las siguientes relaciones molares: 0,9 D/G (medio izquierda); 1,1 D/G (medio derecha); 1,5 D/G (abajo izquierda); y 2 D/G (abajo derecha).

2.4. Conclusión

Soluciones de GMA, DMAA y mezclas de ambos fueron utilizadas para realizar la polimerización por injerto sobre fibras huecas de PE preirradiadas en vacío. La solución de GMA mostró una muy alta velocidad de injerto, en cambio la misma concentración de DMAA solo mostró una cantidad despreciable de injerto en las mismas condiciones de reacción. Resultados similares fueron obtenidos utilizando este solvente para la polimerización por injerto bajo irradiación sobre fluoropolímeros [21]. Las mezclas de ambos monómeros mostraron un comportamiento intermedio entre las soluciones puras. El grado de injerto obtenido a las 2 horas de reacción fue disminuyendo de 1300 % a 100 % con el incremento del porcentaje de DMAA. Se obtuvieron copolímeros con un máximo de composición DMAA a GMA en relación molar 2:1, con un grado de injerto en el orden del 200 %. La composición relativa de ambos monómeros en el polímero injertado fue estimada en base a la relación de las señales de los carbonilos por espectroscopía de FT-IR. La composición del polímero mostró una relación lineal con respecto a las soluciones de monómeros entre 1 y 4 DMAA/GMA (D/G). Sin embargo, esta relación no fue proporcional siendo siempre mayor el porcentaje de GMA en el polímero que en la solución mezcla inicial. Aunque no fue posible una caracterización del copolímero injertado, fue determinada su composición global junto con la descripción de un rango útil para la inmovilización de ligandos pseudo-bioespecíficos sobre membranas macroporosas de PE.

Con respecto a los copolímeros injertados que contienen una proporción mayor de DMAA, pusieron de manifiesto la mejora de las propiedades hidrofílicas y presentaron mayores velocidades de conversión de grupos epoxi en fenilalanina.

Hasta el 50 % en relación molar del GMA puede ser reemplazado en el copolímero injertado por otro monómero más hidrofílico como el DMAA, con una pequeña disminución en las propiedades de flujo de filtración. Una mayor proporción de DMAA reduce la permeabilidad a valores insignificantes. Membranas injertadas con poli-GMA (Figura 2.2, Esquema I) y coinjertadas con poli-(GMA-co-DMAA) (Figura 2.2, Esquema II) fueron utilizadas para inmovilizar Phe.

En este trabajo, el copolímero injertado mejoró las propiedades de reactividad de grupos epóxidos como se observó en la inmovilización de Phe. Se logró una conversión total de los grupos epóxidos en 24 horas de reacción en las condiciones estudiadas. Sin embargo, parte de estos epóxidos se hidrolizan. Además, comparando las membranas X-D/G con las membranas GMA, se obtiene un incremento de 1,5 veces en la concentración de Phe inmovilizada. Para el copolímero más hidrofílico, se obtuvieron rendimientos del 64 % en la conversión de los grupos epóxido a ligando.

Es de esperar un incremento en la capacidad máxima de adsorción específica de macromoléculas para el tipo de membranas M-G/D obtenidas con respecto a las M-G, si se tiene en cuenta las siguientes observaciones: 1) la densidad de ligando inmovilizado fue superior; 2) el entorno más hidrofílico del copolímero D/G y 3) una mayor homogeneidad en la distribución del ligando asumiendo que los monómeros se injertaron aleatoriamente para formar el copolímero.

Referencias

[1] Dorschner H., Lappan U., and Lunkwitz K. Electron beam facility in polymer research: radiation induced functionalization of polytetrafluoroethylene. *NIMB*, 139:495–501, 1998.

[2] Vasiljeva I. V., Mjakin S. V., Makarov A. V., Krasovsky A. N., and Varlamov A. V. Electron beam induced modification of poly(ethylene terephthalate) films. *Applied Surface Science*, 252:8768–8775, 2006.

[3] International Atomic Energy Agency (IAEA). *Advanced radiation chemistry research: current status*, TECDOC–834, Vienna, 1995.

[4] Yamagishi H., Saito K., Furusaki S., Sugo T., and Ishigaki I. Introduction of a high-density chelating group into a porous membrane without lowering the flux. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 30:2234–2237, 1991.

[5] Kim M., Kojima J., Saito K., Furusaki S., and Sugo T. Reduction of nonselective adsorption of proteins by hydrophilization of microfiltration membranes by radiation-induced grafting. *Biotechnol. Prog.*, 10(1):114–120, 1994.

[6] Tsuneda S., Shinano H., Saito K., Furusaki S., and Sugo T. Binding of lysozyme onto a cation-exchange microporous membrane containing tentacle-type grafted polymer branches. *Biotechnol. Prog.*, 10(1):76–81, 1994.

[7] Tsuneda S., Saito K., Sugo T., and Makuuchi K. Protein adsorption characteristics of porous and tentacle anion-exchanged membrane prepared by radiation-induced graft polymerization. *Radiation Physics and Chemistry*, 46(2):239–245, 1995.

[8] Camperi S. A., Grasselli M., Navarro del Cañizo A., Smolko E., and Cascone O. Chromatographic characterization of immobilized metal ion hollow-fiber affinity membranes obtained by direct grafting. *Journal of Liquid Chromatography*, 21:1283–1294, 1998.

[9] Camperi S. A., Navarro del Canizo A. A., Wolman F. J., Smolko E. E., Cascone O., and Grasselli M. Protein adsorption onto tentacle cation-exchange hollow-fiber membranes. *Biotechnol. Prog.*, 15(3):500–505, 1999.

[10] Tsuneda S., Saito K., Furusaki S., and Sugo T. J. High-throughput processing of proteins using a porous and tentacle anion-exchange membrane. *J. Chromatogr.*, 689:211–218, 1995.

[11] Matoba S., Tsuneda S., Saito K., and Sugo T. Highly efficient enzyme recovery using a porous membrane with immobilized tentacle polymer chains. *Bio/Technology*, 13:795–797, 1995.

[12] Yamazaki Z., Kanni F., Idezuki Y., Yamazaki N., Inagaki K., and Tsuda N. Immunoadsorbent. *Jpn. J. Artif. Organs*, 16:1203, 1987.

[13] Kiyohara S., Sasaki M., Saito K., Sugita K., and Sugo T. Amino acid addition to epoxy-group-containing polymer chain grafted onto a porous membrane. *J. Membr. Sci.*, 109:87–92, 1996.

[14] Kiyohara S., Sasaki M., Saito K., Sugita K., and Sugo T. Radiation-induced grafting of phenylalanine-containing monomer onto a porous membrane. *Reactive & Functional Polymers*, 31:103–110, 1996.

[15] Kubota N., Kounosu M., Saito K., Sugita K., Watanabe K., and Sugo T. Protein adsorption and elution performances of porous hollow-fiber membranes containing various hydrophobic ligands. *Biotechnology Progress*, 13(1):89–95, 1997.

[16] Kiyohara S., Kim M., Toida Y., Saito K., Sugita K., and Sugo T. Selection of a precursor monomer for the introduction of affinity ligands onto a porous membrane by radiation-induced graft polymerization. *Journal of Chromatography A*, 758:209–215, 1997.

[17] Onishi M., Shimura K., Seita Y., Yamashita S., Takahashi A., and Masuoka T. Preparation and properties of plasma-initiated graft copolymerized membranes for blood plasma separation. *Radiat. Phys.Chem.*, 39:569–576, 1992.

[18] Brandt S., Goffe R. A., Kessler S. B., O'Connor J. L., and Zale S. E. Membrane-based affinity technology for commercial scale purification. *Bio/Technology*, 6:779, 1988.

[19] Saito K., Tsuneda S., Kim M., Kubota N., Sugita K., and Sugo T. Radiation-induced graft polymerization is the key to develop high-performance functional materials for protein purification. *Radiation Physics and Chemistry*, 54:517–525, 1999.

[20] Kim M., Kiyohara S., Konishi S., Tsuneda S., Saito K., and Sugo T. Ring-opening reaction of poly-gma chain grafted onto a porous membrane. *J. Membr. Sci.*, 117:33–38, 1996.

[21] Razzak M. T. *Radiation grafting studies on the modification of fluoropolymers and natural rubber for biomaterials.* Phd thesis, Department of Nuclear Engineering, Faculty of Engineering. Tokyo, Graduated School of the University of Tokyo, 1988.

Capítulo 3

Copolimerización por injerto radioinducida por pre-irradiación en aire

3.1. Introducción

Este capítulo se va a referir a la técnica para realizar injertos por preirradiación en aire radioinducida. Al irradiar el material en presencia de aire u oxígeno se generan grupos peróxidos e hidroperóxidos estables sobre el polímero, que posteriormente en ausencia de oxígeno pueden utilizarse como iniciadores de polimerización de monómeros al descomponerse en radicales libres por efecto de la temperatura o por efecto de radiaciones UV [1, 2].

En las técnicas de preirradiación, dado que los monómeros no están expuestos a la radiación, se ven teóricamente libres del problema de formación de homopolímero que ocurre en la técnica en simultáneo. Sin embargo, pueden ocurrir procesos de transferencia de radicales del sólido al solvente o a los monómeros por lo cual la presencia de homopolímero no es totalmente eliminada [3, 4]. Otro inconveniente de estas técnicas es la escisión del polímero base debido a su irradiación directa, que pone de manifiesto la formación predominante de reacciones degradativas y de entrecruzamiento debido a las dosis elevadas de energía, así como también la descomposición de los radicales libres formados con la consecuente disminución en los rendimientos [5]. Las velocidades de dosis no pueden ser muy altas debido a la velocidad de difusión del O_2 [6, 7]. Para suprimir la homopolimerización (y reducir la temperatura de reacción de polimerización) puede añadirse a la mezcla de reacción iones metálicos de transición (Fe^{2+}, sal de Mohr, etc). La ventaja de la técnica de peroxidación es que el material, con los intermediarios peróxidos, puede almacenarse durante largos períodos antes de realizar la polimerización por injerto. Esto es conveniente cuando el acceso a una fuente de radiación es limitado [5, 8].

A continuación, se estudiará el proceso de injerto sobre PE poroso y no poroso por medio de radiaciones ionizantes por pre-irradiación en aire de monómeros de AAm y DMAA en diferentes condiciones de reacción (solvente, concentración de monómeros, presencia/ausencia de inhibidores de homopolimerización).

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Materiales

Polímeros base: HDPE (PE poroso) Porex® 4903 y 4916 de 1/16" de espesor; HDPE (PE no poroso) de 50 μm de espesor.

Monómeros: AAm, soluciones en agua al 0 %, 5 %, 10 %, 20 % p/v; DMAA en agua, etanol (EtOH) y mezcla de etanol/agua (1:1).

Otros reactivos: Solución madre de Sal de Mohr (40 mg/ml); Tween 80 (Tw80).

Todos los reactivos son de grado analítico o superior.

3.2.2. Procedimiento

Previo a la irradiación, los polímeros base son sometidos a un proceso de limpieza por sonicación en metanol (2 x 30 minutos). Luego son secados, pesados y preservados en temperatura ambiente hasta irradiación. La irradiación del HDPE (poroso y no poroso) se produce con dosis total de 25 kGy en atmósfera de aire. En una segunda etapa, los peróxidos serán los iniciadores en la incorporación de los monómeros sobre el polímero base, por incubación de los polímeros preirradiados con la solución de monómeros previamente degaseada por 20 minutos, a 70 ^{o}C durante toda la noche. Al finalizar la reacción, se realizan lavados sucesivos con agua a 70 °C. Se secan en estufa hasta peso constante y luego se pesan para obtener el % GI como se describe en la sección 1.4.1 del Capítulo I.

Análisis de superficie por SEM y ATR-IR: Las microscopías electrónicas de estos materiales son llevadas a cabo en el Centro de Microscopías Avanzadas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA (Buenos Aires, Argentina). Se usó el microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM 982 GEMINI. Este microscopio cuenta con un detector de electrones secundarios llamado IN-LENS que esta situado dentro de la misma columna y tiene la particularidad que permite obtener un mayor detalle de la morfología de la muestra. Además posee acoplado un dispositivo (INCA ENERGY, Oxford Instruments) para realizar análisis elemental por espectroscopía de energía dispersiva (EDS ó *Energy Dispersive Spectroscopy*). A partir del espectro obtenido pueden entonces, realizarse determinaciones cuali- y cuantitativas de los elementos presentes en el volumen de muestra.

3.3. Resultados y Discusión

3.3.1. Búsqueda de las condiciones de injerto de los monómeros de trabajo sobre PE pre-irradiados

En una primera instancia se procede a evaluar las condiciones de injerto de los dos monómeros de trabajo sobre ambos materiales base (PE poroso y PE no poroso).

N°	Material	Monómero	Monómero (% p/v)	Solvente	Pi (mg)	Pf (mg)	GI%
N0	HDPE	—	0	H_2O	49,8	49,8	0
N1	HDPE	AAm	10	H_2O/EtOH(1:1)	52,7	52,6	0
N2	HDPE	AAm	10	H_2O/EtOH(1:1) + Tw80 (1%)	49,2	49,2	0
N3	PE 4903	AAm	10	H_2O/EtOH(1:1)	328,8	328,7	0
N4	PE 4903	AAm	10	EtOH	631,6	631,2	0
N5	**PE 4903**	**AAm**	**10**	**H_2O**	**643,6**	**731,3**	**14**
N6	HDPE	AAm	20	H_2O	54,5	54,5	0
N7	HDPE	AAm	20	H_2O	49,3	49,3	0
N8	HDPE	DMAA	20	H_2O	49,3	49,2	0
N9	HDPE	DMAA	20	H_2O	43,3	43,3	0
N10	**PE 4903**	**AAm**	**20**	**H_2O**	**375,8**	**603,6**	**61**

Tabla 3.1 – Evaluación de las condiciones de reacción. GI% obtenidos para HDPE poroso (PE4903) y no pororoso (HDPE) injertados con AAm y DMAA.

En la Tabla 3.1 se exponen las condiciones de reacción (cantidad de monómero en el tubo de reacción y el tipo de solvente de trabajo) así como los resultados obtenidos (GI%). En el caso de PE no poroso, bajo las condiciones ensayadas de solvente (agua, mezcla de alcohol/agua, mezcla de alcohol/agua con agente tensioactivo) y con los monómeros de trabajo (AAm y DMAA), no hay reacción de injerto. No se observan cambios visibles a nivel macroscópico ni incremento en el peso bajo ninguna de las condiciones evaluadas para PE no poroso. Los ensayos (N1, N2, N6, N7, N8 y N9) no muestran un injerto detectable.

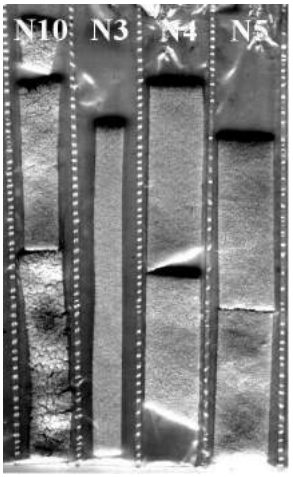


Figura 3.1 – Fotografía en contraste de las muestras finales de PE poroso. Observación de relieves e irregularidades de superficie.

En cambio, se observa resultado positivo de reacción de injerto para PE poroso, con AAm al 10% y 20% en agua como solvente, siendo los GI% de 14 y 60, respectivamente (N5 y N10, Tabla 3.1). Estos polímeros presentaron deformación macroscópica visible indicando que el proceso no fue a nivel superficial sino que se vio afectada toda su estructura interna (Figuras 3.1 y 3.2). Cambios en la rugosidad, formación de grietas, desprendimientos, estiramientos del material perdiendo su forma original, pérdida de la homogeneidad de estructura presentando diversos relieves, son algunos de los efectos observados, que se pueden visualizar y comparar con aquellos en los que no se obtuvo injerto (N3 y N4) con mayor detalle en las Figuras 3.2 y 3.3, siendo mucho menos

N°	AAm (%p/v)	Sal de Mohr (0,4 mg/ml)	Tiempo incubación a 70°C (h)	Pi (mg)	Pf (mg)	GI%
1	2	-	6,5	64,6	64,4	0
2	2	-	22	66,4	66,3	0
3	2	Si	1,3	63,3	63,5	0,30
4	2	Si	3	66,4	66,7	0,45
5	2	Si	6,5	66,5	66,5	0
6	2	Si	22	64,9	64,9	0
7	10	-	1,3	75,5	76,0	0,65
8	10	-	3	65,6	66,0	0,61
9	10	-	6,5	62,6	62,6	0
10	10	-	22	74,2	74,4	0,30
11	10	Si	1,3	72,0	72,4	0,60
12	10	Si	3	64,9	65,1	0,30
13	10	Si	6,5	64,1	63,9	0
14	10	Si	22	72,7	72,5	0

Tabla 3.2 – Evaluación del proceso de polimerización por injerto de AAm sobre HDPE en presencia/ausencia de inhibidor de homopolimerización, a dos concentraciones de monómero.

evidentes en el ensayo con menor grado de injerto (N5) que en el de mayor % GI (N10).

También se visualizó la formación de homopolímero en gran cantidad y los GI% para HDPE obtenidos fueron nulos. Por ello, en una segunda etapa, se introduce una variable de estudio sobre la polimerización por injerto sobre HDPE: la incorporación de un inhibidor de homopolimerización como la sal de Mohr [9]. Las reacciones de injerto de un monómero (M) sobre un polímero (P) por activación por peróxidos pueden describirse de manera simplificada como:

$$\begin{aligned} &P\cdot + PO_2 \rightarrow PO\cdot + \cdot OH \\ &PO\cdot + M \rightarrow POM\cdot \qquad \text{(copolimerización) y} \\ &\cdot OH + M \rightarrow HOM\cdot \qquad \text{(homopolimerización)} \end{aligned}$$

Al agregar una sal de hierro, entonces se produciría una reacción del tipo $POOH + Fe^{2+} \rightarrow PO\cdot + OH^- + Fe^{3+}$, con la consecuente inhibición de la homopolimerización [10].

A continuación se muestran los resultados del estudio en el tiempo del proceso de reacción de polimerización sobre HDPE (PE no poroso) con dos concentraciones de monómero AAm, 2% y 10%, en presencia y ausencia de sal de Mohr (0,4 mg/ml final) a 70 °C (Tabla 3.2).

El GI% obtenido sobre HDPE fue muy bajo para ambas concentraciones de AAm (2 y 10%) y no presenta diferencias en cuanto a la presencia o ausencia del inhibidor de homopolimerización en el tubo de reacción.

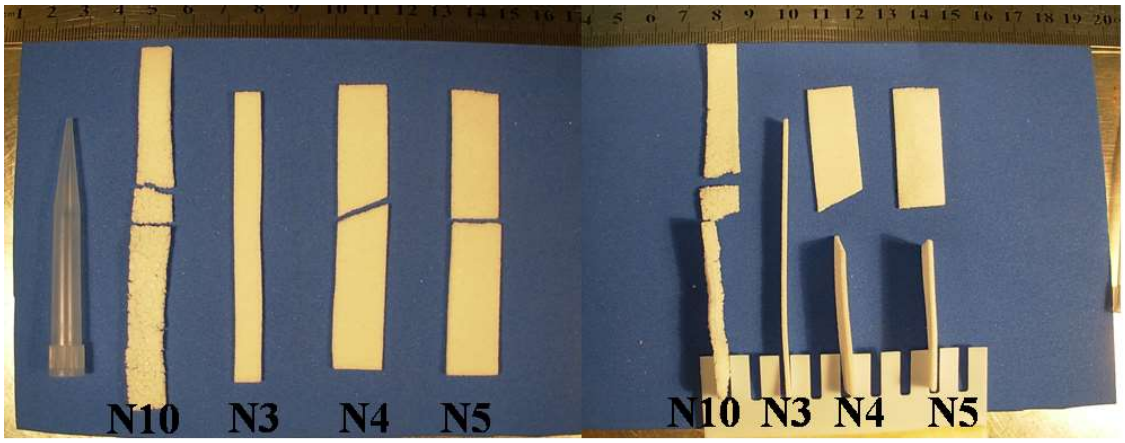


Figura 3.2 – Muestras de PE poroso modificadas con AAm. *Visualización de frente (izquierda) y de perfil (derecha) de los cambios a nivel macroscópico sobre el material base.*

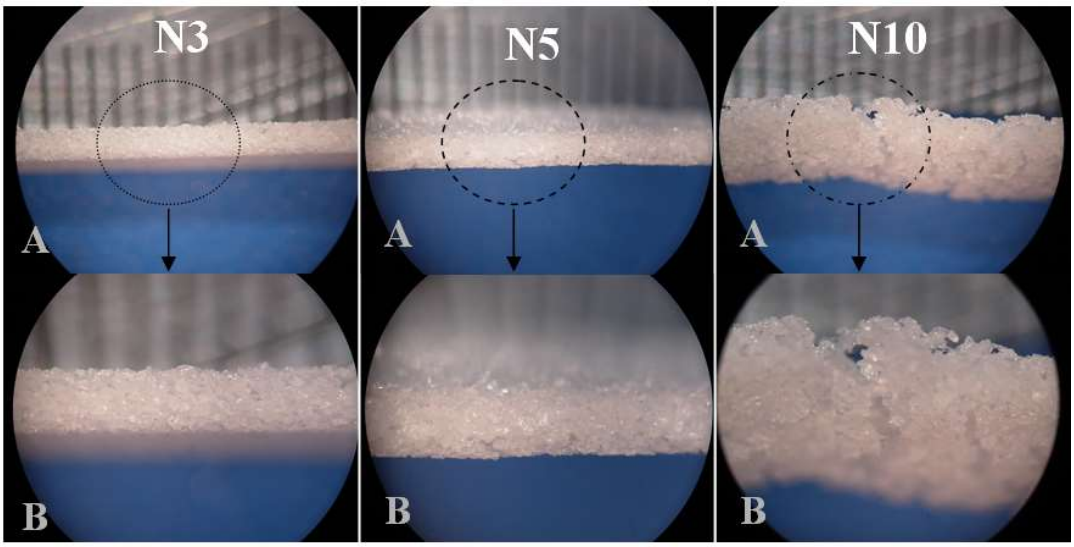


Figura 3.3 – Fotografías ampliadas de perfiles de PE poroso preirradiado en aire y copolimerizado con AAm: *N3 (10 % AAm, mezcla etanol agua), N5 (10 % AAm, en agua) y N10 (20 % AAm, en agua). Aumento 1,5x (A) y 3x (B) en lupa. En círculo: zona de A amplificada en B.*

Muestra	%AAm (% p/v)	Pi (mg)	Pf (mg)	GI%
1	0	191,8	191,3	0
2	0	230,3	229,7	0
3	5	239,1	241,8	1,3
4	5	183,5	183,8	0,2
5	10	239,3	312,2	30,5
6	10	246,3	289,7	17,6
7	20	207,7	362,4	74,5
8	20	221,9	399,7	80,1

Tabla 3.3 – GI% obtenido para PE poroso injertado con AAm.

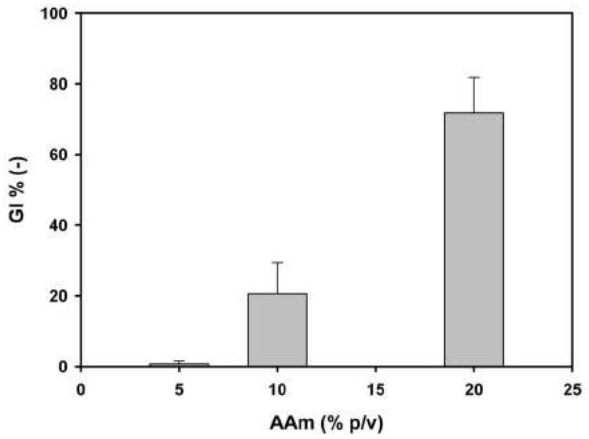


Figura 3.4 – GI% promedio obtenidos para PE en función de la cantidad de AAm.

Dado que los valores de GI% obtenidos se encuentran dentro del rango del error experimental, y sumado a que la relación superficie/volumen es muy baja, entonces puede considerarse que no hubo reacción de injerto significativo sobre este material.

3.3.2. Injerto de AAm sobre PE pre-irradiado

A continuación se presenta un resumen de los resultados obtenidos para diferentes concentraciones inicial de AAm (Tabla 3.3). Además, en la Figura 3.4 se exponen los resultados generales de GI% promedio de los PE porosos modificados. En las Figuras 3.5 y 3.6 se muestran fotografías de los materiales obtenidos.

Comparando material base, HDPE poroso y no poroso, se encuentran grandes diferencias en cuanto al grado de injerto. Sobre HDPE no poroso, aun en presencia de inhibidores de homopolimerización, el grado de injerto obtenido fue casi nulo, mientras que para PE

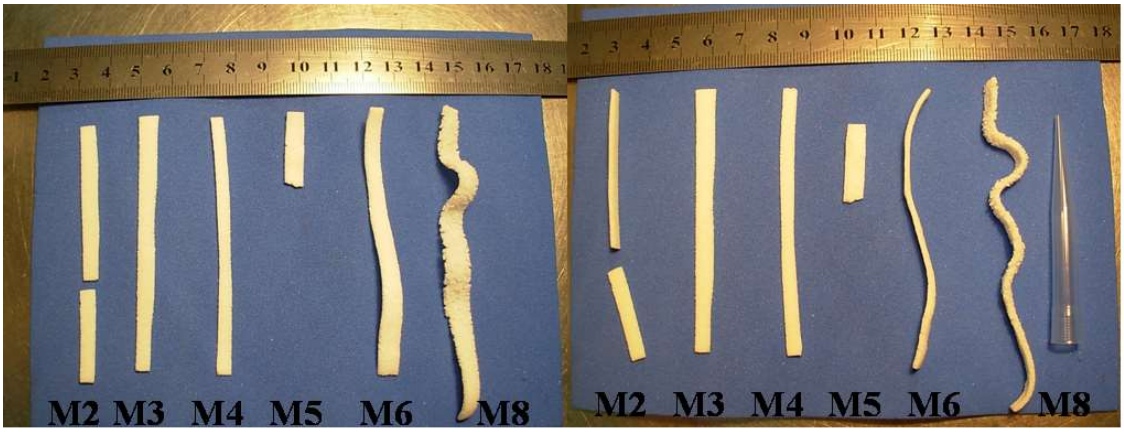


Figura 3.5 – Fotografías de PE poroso post reacción de injerto con AAm correspondientes a las muestras de la Tabla 3.3.

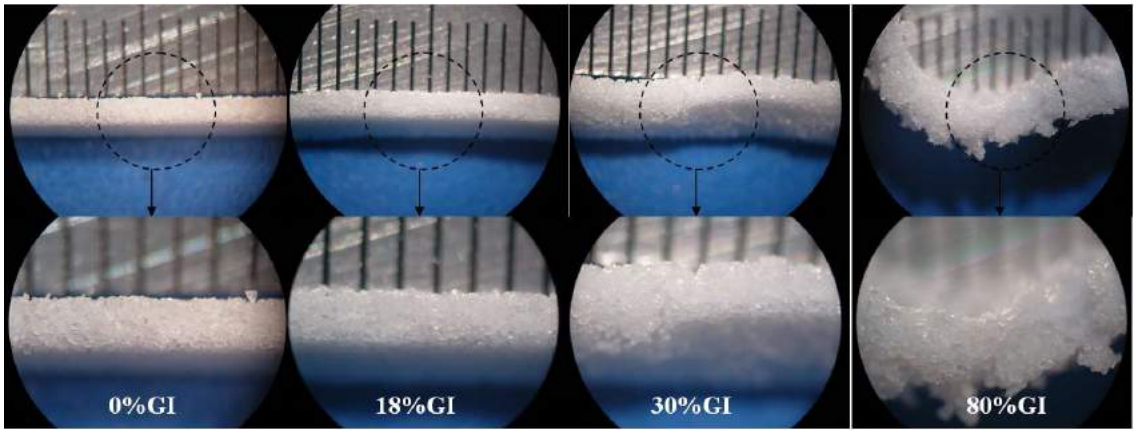


Figura 3.6 – Fotografías de perfil de PE poroso preirradiado en aire y copolimerizado con AAm. *De izquierda a derecha: 0 % GI (M2 ó control de copolimerización), 18 % GI (M6), 30 % GI (M5) y 80 % GI (M8). Aumentos en lupa: 1,5x (arriba) y 3x (abajo).*

poroso, en las mismas condiciones de reacción el grado de injerto fue veinte veces mayor. Llegando hasta % GI de 80 % con 20 %p/v de AAm inicial en solución. El mayor inconveniente presentado es la modificación en su estructura interna, con deformación y cambios visibles a nivel macroscópico, tornándose frágiles (Figura 3.5). Por ejemplo, a partir de la condición de 18 % GI (M6) se puede observar que las deformaciones son mayores a medida que el GI % aumenta (Figuras 3.5 y 3.6).

Estos efectos fueron verificados por microscopía electrónica de barrido, donde se pudo observar que a medida que aumenta el grado de injerto, tanto la estructura típica de PE (globular) como la homogeneidad en la estructura se fueron perdiendo, transformándose en otro material (*composite*) (Figuras 3.7 y 3.8). En las micrografías con mayor aumento (Figura 3.9) se puede observar que al fragmentar los materiales con AAm injertada se quiebran de distinta forma que el material base. En general, el PE se estira hasta romperse pero sin quebrarse, mientras que la poliAAm tiende a quebrarse; en el material mixto el efecto es una mezcla de ambos (se estira y se quiebra) con aspecto de fibras. En caso de que la modificación hubiera sido a nivel superficial se hubiese esperado diferenciar ambos materiales de acuerdo a estos efectos.

Otro efecto llamativo es que tanto en el PE preirradiado y como en el PE sin irradiar, la superficie tiene aspecto rugoso pero mantiene la homogeneidad (microestructura cristalina-amorfa típica de PE) mientras que con injerto comienza a mostrar protuberancias y mezclas de morfologías heterogéneas (Figura 3.9).

Para corroborar la presencia de AAm sobre el material, se determina la presencia de oxígeno y nitrógeno sobre el PE modificado con 18 % GI de AAm mediante espectroscopía de energía dispersiva (EDS). Esta es una técnica de microanálisis químico que es utilizada en conjunción con la microscopia electrónica de barrido y brinda información sobre la composición elemental del volumen de muestra analizado. El PE base solo contiene carbono e hidrógeno como elementos constitutivos.

En el espectro, aparece el elemento O pero no así el elemento N (ambos pertenecientes al grupo amida de la AAm). La señal del N se ubica muy cercana a la del C, por lo que es posible que la señal de N quede oculta dentro de la correspondiente al C. La presencia de O infiere la presencia de AAm en el polímero (Tabla 3.4 y Figura 3.10).

Elemento	Peso %	% Atómico	*Del procesamiento del espectro: sin picos omitidos*
C K	75,94	80,79	*Opción de procesamiento: Análisis de todos los elementos (normalizado)*
O K	24,06	19,21	*Número de iteraciones = 3*
Total	100,00		*Estándar: $CaCO_3$ (C); SiO_2 (O)*

Tabla 3.4 – Resultados del análisis de presencia de O y N por EDS sobre PE injertado con 18 % GI de AAm.

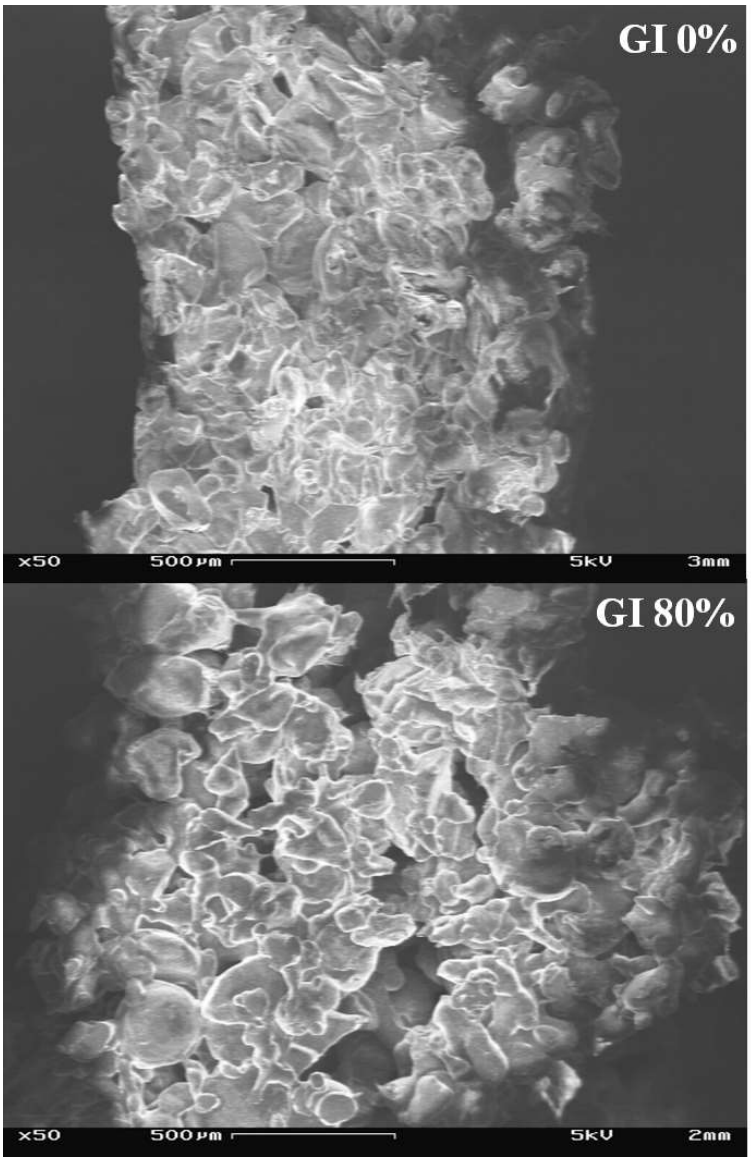


Figura 3.7 – Micrografía SEM. PE pre-irradiado sin injerto (M2) y con injerto al 80 % de AAm (M8).

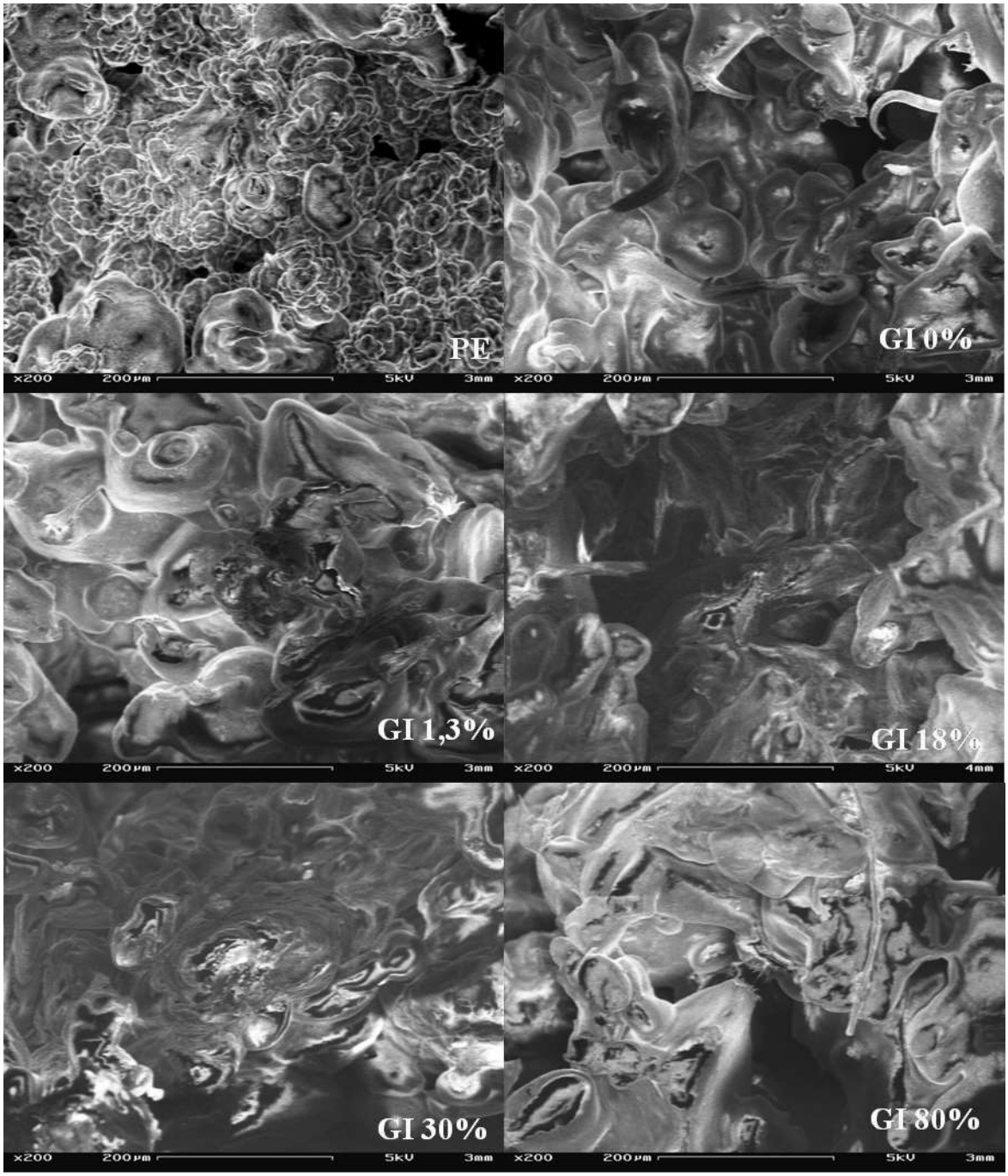


Figura 3.8 – Micrografía SEM. Aumento 200x. *Arriba (de izq a der): PE sin irradiar (control sin modificaciones) y PE pre-irradiado con GI 0 % (M2); medio (de izq a der): PE injertado con 1,3 % (M3) y 18 % de AAm (M6); Abajo (de izq a der): 30 %GI (M5) y 80 %GI de AAm (M8).*

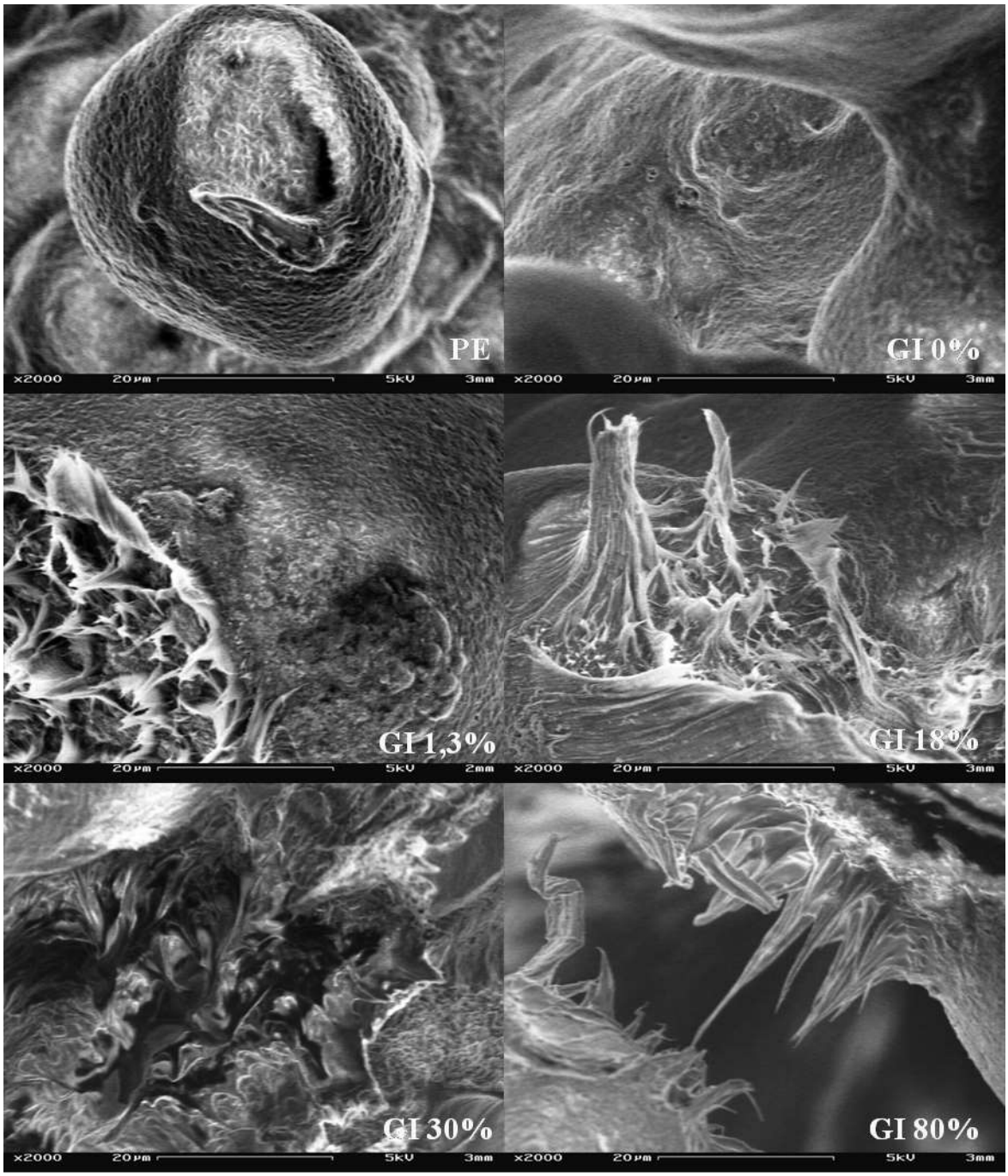


Figura 3.9 – Micrografía SEM. Aumento 2000x. *Arriba (de izq. a der.): PE sin irradiar y PE pre-irradiado con GI 0 % (M2); medio (de izq a der): PE injertado con 1,3 % (M3) y 18 % de AAm (M6); Abajo (de izq. a der.): 30 % GI (M5) y 80 % GI de AAm (M8).*



Figura 3.10 – Micrografía de la sección evaluada y espectro de EDS obtenido para esa sección del material.

3.4. Conclusión

Se ensayó la técnica de preirradiación en presencia de oxígeno sobre HDPE poroso y no poroso, variando las condiciones de reacción de injerto tanto en polaridad de solventes como diferentes concentraciones iniciales de AAm y DMAAm, así como también la presencia/ausencia de inhibidores de homopolimerización.

Con HDPE no poroso la reacción de injerto fue nula. Se ensayó el injerto con dos tipos de monómeros (AAm y DMAA), en agua sin éxito. Ambos monómeros poseen estructuras químicas similares.

Sobre el mismo tipo de polímero, utilizando AAm como monómero en distintas concentraciones de reacción, se evaluaron solventes como etanol, mezcla de etanol/agua (1:1) (con y sin detergente), agua (con y sin inhibidor de homopolimerización). Como inhibidor de homopolimerización se utilizó la sal de Mohr, sin observarse efectos positivos en cualquiera de los casos.

En cambio, con PE poroso los resultados fueron diferentes ya que se logró injertar AAm obteniéndose diferentes GI % en función de la concentración de monómero.

En la evaluación de las condiciones de injerto (tipo de solvente y cantidad de monómero) sobre PE poroso pre-irradiados en presencia de aire pudo establecerse que: (i) en este tipo de material, con AAm como monómero, en etanol o mezcla de etanol/agua (1:1) como solventes de reacción, no hay injerto; (ii) con AAm en agua como solvente hay presencia

de injerto, obteniendo % GI de hasta 80 % con AAm inicial al 20 % p/v.

El mayor inconveniente presentado fue que el injerto de la poliAAm ocurre en el interior de la estructura del PE, de esta manera el polímero pierde sus características morfológicas originales. Este inconveniente descarta esta técnica para los objetivos de este trabajo de tesis.

Referencias

[1] Garbassi F., Morra M., and Occhiello E. *Polymer Surfaces. From Physics to Technology.* John Wiley & Sons, Great Britain, 1998.

[2] Clough R. L. High-energy radiation and polymers: A review of commercial processes and emerging applications. *NIMB: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 185(1-4):8–33, 2001.

[3] Chapiro A. Mechanism of peroxidation of solid polymers as derived from the kinetics of the induced graft copolymerisation. *J. Polym. Sci. Symp.*, 50:181, 1975.

[4] Ringrose B. J. and Kronfli E. Preirradiation grafting of ethylene vinyl acetate copolymer resins. *Radiation Physics and Chemistry*, 55:451–460, 1999.

[5] Bhattacharya A. Radiation and industrial polymers. *Progress in Polymer Science*, 25:371–401, 2000.

[6] Curso de Postgrado. Polímeros modificados por radiaciones para usos biotecnológicos. UNQ, Bs. As. Argentina, 2000.

[7] Mazzei R., Smolko E., Torres A., Tadey D., Rocco C., Gizzi L., and Strangis S. Radiation grafting studies of acrylic acid onto cellulose triacetate membranes. *Radiation Physics and Chemistry*, 64:149–160, 2002.

[8] Dargaville T. R., George G. A., Hill D. J. T., and Whittaker A. K. High energy radiation grafting of fluoropolymers. *Progress in Polymer Science*, 28:1355–1376, 2003.

[9] Przybytniak G., Kornacka E. M., Mirkowski K., Walo M., and Zimek Z. Functionalization of polymer surfaces by radiation-induced grafting. *NUKLEONIKA*, 53(3):89–95, 2008.

[10] International Atomic Energy Agency (IAEA). *Advanced radiation chemistry research: current status*, TECDOC–834, Vienna, 1995.

Capítulo 4

Método de injerto en simultáneo

4.1. Introducción

La modificación de polímeros por injerto con radiación ionizante β ó γ activa a todo el polímero, entonces el injerto puede darse en todo el bloque material o en la superficie. Este es un método fisicoquímico independiente de la temperatura y de la estructura molecular. Pueden generarse varias clases de copolímeros, ya sea por el agregado de un solo tipo de monómero (Figura 4.1, esquema I) o por una mezcla de monómeros (Figura 4.1, esquema II).

La técnica en simultáneo requiere radiación durante todo el proceso de injerto, y aunque las dosis de energía son menores con respecto a los métodos indirectos (con dosis totales de 3 a 10 kGy), los rendimientos en injerto son mayores debido a que no se pierden radicales libres a través de reacciones de descomposición [1, 2]. Además el solvente ejerce un efecto protector (muchos radicales libres se generan en el solvente sin que se produzca la degradación del polímero base), y como característica indeseable se observa la formación de homopolímero con parte de los monómeros presentes en la solución. El oxígeno es inhibidor de la reacción [3].

Razzak propuso en sus estudios sobre la modificación de gomas naturales y flouropolímeros por radiación por injerto para producir biomateriales, que es necesario optimizar la concentración de monómero, la velocidad de dosis y la dosis total, así como el solvente [4]. De su trabajo surgen ciertas observaciones al respecto, como por ejemplo (1) que a mayor concentración de monómeros se favorece la formación de homopolímero, y en consecuencia puede presentar mayores dificultades en su posterior remoción; (2) generalmente, en el método en simultáneo, la velocidad de dosis juega un rol importante en el control del grado de injerto, ya que influenciaría a la velocidad de iniciación; (3) el efecto del solvente en el rendimiento en el proceso de copolimerización por injerto es bastante complejo y difícil de explicar de forma sencilla. En lo que se refiere a este último factor, se ha supuesto que la variación en los rendimientos asociada al solvente puede estar relacionada con (i) la capacidad de éste de solvatar (*"swelling"*) al polímero; esta capacidad está estrechamente vinculada con (ii) la miscibilidad y la difusión en el interior del polímero del monómero, ya que se favorecería la reacción de injerto si el solvente puede ser capaz de llevar a las moléculas del monómero lo más cerca posible de los centros activos formados en el polímero; y con (iii) la contribución del solvente en la formación de radicales libres que pueden ser transferidos al polímero o que actúen en la reacción de terminación en el proceso de injerto.

Unos años más tarde, Hongfei y col. en su trabajo sobre el estudio del efecto del pH en

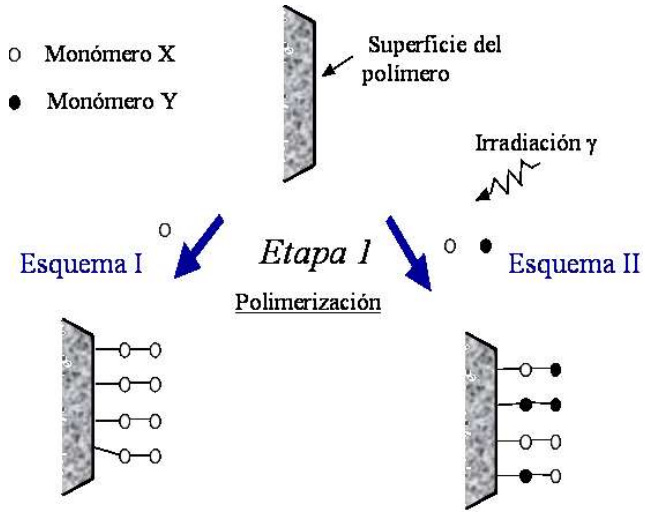


Figura 4.1 – Reacción de polimerización por injerto simultánea

la radiación por injerto en simultáneo, coinciden con Razzak al plantear que, en la elección del proceso de injerto, son importantes los efectos de la composición del polímero base, el tipo de monómero, el solvente, el método de radiación y la dosis total [5].

Mediante la técnica de modificación en simultáneo aplicada sobre fibras huecas de PE, el grupo de trabajo del Dr. Cascone estudió y optimizó los efectos de la dosis de radiación, inhibidores inorgánicos, concentración de monómero (GMA) y del solvente (metanol) sobre el grado de injerto [6]. En este trabajo se observó que el grado de injerto se encuentra estrechamente relacionado con la concentración de monómero GMA (Figura 4.2). En cuanto a la minimización de la formación de homopolímero durante el proceso de polimerización, los inhibidores salinos comúnmente utilizados en otros sistemas y recomendados por otros autores con este fin, no mostraron efectos diferenciales entre el proceso de homopolimerizacion y el de injerto (Tabla 4.1). Además, todas las sales evaluadas disminuyeron el rendimiento en el grado de injerto. Con respecto al solvente, el máximo rendimiento en la copolimerización es obtenido con concentraciones de metanol entre el 30 y 35 %, y a concentraciones mayores al 50 % no se produce injerto alguno (Figura 4.3). Mediante SEM visualizaron que las cadenas injertadas se forman en las paredes de los poros y además, observaron que el flujo de agua cae exponencialmente con el incremento en el grado de injerto.

4.1.1. Co-injerto en simultáneo con más de un monómero

Las membranas poliméricas hidrofílicas son de interés en el área biomédica para numerosas aplicaciones que van desde el tratamiento de sangre extracorpóreo hasta la separación y purificación de biomoléculas. Tanto el PP como el PE son polímeros hidrofóbicos y esta característica puede ser cambiada mediante tratamiento con surfactantes. Por ello es que

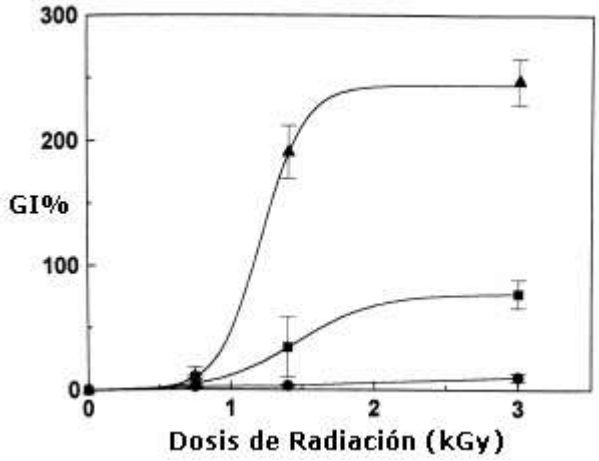


Figura 4.2 – Efecto de la dosis de radiación sobre el grado de injerto de fibras huecas de PE hidrofilizado inmersas en soluciones de 1 % (•), 5 % (▪) y 10 % (▲) de GMA en 50 % metanol. Dosis total 3 kGy, fuente Gamma-cell ^{60}Co (adaptada de Grasselli y col. [6]).

Sal	*Concentración de GMA (%)*	*Rendimiento en el Injerto (%)*	*Aspecto de la solución post-irradiación*	*Referencia*	*Efecto observado*
-	5	50	Gel blanco suave	-	-
	10	120	Gel blanco		
	20	320	Gel blanco duro		
Nitrato de cobre (5 mmol/L)	5	3	Solución límpida	Ratner y Hoffman (1974)	Inhibición del injerto a bajas concentraciones de monómero
	10	25	Gel suave blanco		
	20	270	Gel blanco duro		
Sulfato ferroso (10 mmol/L)	5	80	Gel suave blanco	Katbab et al. (1992)	Caída del GI% a altas concentraciones de monómero
	10	150	Gel blanco		
	20	190	Gel blanco duro		
Sal de Mohr (50 mmol/L)	5	60	Gel suave		Caída del GI% a altas concentraciones de monómero
	10	100	Gel		
	20	170	Gel duro		
Cloruro de Litio (200 mmol/L)	5	5	Solución	Haddadi-Asi et al (1994)	Inhibe injerto y homopolimerización
	10	10	Solución de baja viscosidad		
	20	10	Solución viscosa		
Cloruro cuproso (2 mmol/L)	5	75	Gel suave blanco	Abdel-Bary et al (1995)	Caída del GI% a altas concentraciones de monómero
	10	120	Gel blanco		
	20	200	Gel blanco duro		

Tabla 4.1 – Efecto de diferentes inhibidores salinos en el rendimiento del injerto radioinducido sobre fibras de PE hidrofilizadas, a tres concentraciones diferentes de monómeros y dosis de irradiación de 1,5 kGy (adaptada del trabajo de Grasselli y col. [6]).

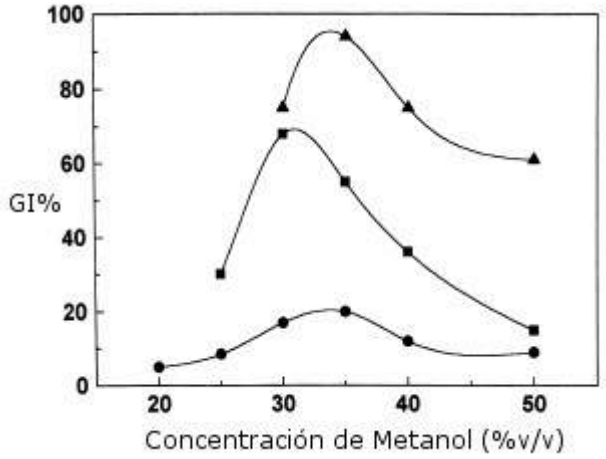


Figura 4.3 – Efecto de la concentración de metanol en el grado de injerto de fibras huecas de PE en soluciones de metanol-agua con 1 % (•), 3 % (▪) y 5 % (▲) de GMA. Dosis de radiación: 1,5 kGy (adaptada de Grasselli y col. [6]).

se estudió la incorporación a nivel superficial de monómeros hidrofílicos sobre diferentes materiales hidrofóbicos. Así, la DMAA se ha injertado mediante diferentes técnicas sobre PP o gomas naturales (GN) para conferir a estos materiales carácter hidrofílico [7, 8]. El grupo de Onishi obtuvo, mediante copolimerización por plasma a baja temperatura, una nueva membrana de PP-g-DMAA (15 % GI) sin cambios en la textura del material [7]. En el caso particular de Razzak y col., lograron evaluar la hemocompatibilidad de copolímeros de GN-g-DMAA obtenidos por injerto en simultáneo por radiación γ (^{60}Co) y observaron que con injertos mayores al 30 % mejoraban la performance con respecto a las gomas siliconadas de grado médico [8].

4.1.2. Modificación química de las membranas modificadas mediante ácido iminodiacético

El ácido iminodiacético (IDA) es un grupo quelante, tridentado, que forma complejos ternarios con iones metálicos de la primera serie de transición (Zn, Cu, Ni, Co, Fe) (Figura 4.4). También puede ser inmovilizado a través del grupo amino. Estas características lo hacen interesante para inmovilizarlo sobre los grupos epóxido de los polímeros injertados con GMA. Esta reacción es utilizada en este trabajo como reacción estándar para control positivo de polimerización, permitiendo evaluar visualmente la homogeneidad del polímero al incubar los materiales con soluciones de Cu^{2+}. También puede utilizarse para semicuantificar la cantidad de epóxidos a través de la adsorción/desorción del cobre (II) complejado; según datos anteriores se determinó que en estos materiales y condiciones se obtiene un rendimiento del 80 % [9].

Esta misma interacción es la que se pone en juego en la cromatografía de afinidad con

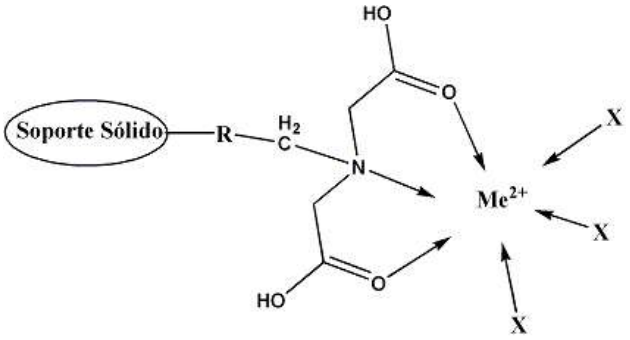


Figura 4.4 – Formación del complejo ternario. Donde X representa moléculas de agua, buffer o grupos funcionales superficiales de la proteína con afinidad por iones metálicos.

iones metálicos inmovilizados (IMAC) ya que se utiliza la capacidad de interacción de los sitios de unión a metales superficiales de la proteína (dados mayormente por histidinas) para establecer dicha interacción [10]. Otra utilidad de este tipo de matrices es la recuperación de pseudometales a partir de soluciones acuosas [11]. Entre algunas de sus ventajas se encuentran la alta capacidad de adsorción con altos rendimientos en la recuperación (>90 %), la selectividad (dada por el ión metálico), condiciones de elución y regeneración moderadas [12, 13].

En este capítulo se estudia la técnica de injerto radioinducida en simultáneo incorporando monómeros de GMA y DMAA sobre PSf como material base. Posteriormente se derivatiza químicamente mediante la reacción con IDA.

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Polímero base y monómeros

Membrana de PSf en configuraciones plana y de fibra hueca. Las membranas planas fueron adquiridas a Pall Chemical; Tuffryn® (PSf hidrófila de 0,45 μm de diámetro de poro, 70 % de porosidad, 165 μm de espesor, 25 mm de diámetro) y Supor® (polietersulfona hidrófila de 0,45 y 0,80 μm de diámetro de poro, 25 mm de diámetro, 152 μm de espesor típico). La membrana de fibra hueca (tipo D, 0,65 μm de diámetro del poro y 70 % de porosidad) fue donada por A/G Technology Co. (Needham, MA, USA; actualmente GE). Con 0,75 mm y 0,5 mm de diámetro externo e interno, respectivamente.



Micrografías electrónicas de los filtros planos de disco *Pall Chemical*: *Supor* (izquierda) y *Tuffryn* (derecha) (obtenidas de http://www.pall.com/).



Monómeros a injertar: GMA y DMAA. Adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Relaciones molares de las mezclas de monómeros

Membranas G: preparadas a partir de soluciones de monómero GMA, al 1 y 2 % en metanol:agua (1:1 v/v).

Membranas GD: preparadas a partir de soluciones de mezcla de monómeros de GMA y DMAA. Según la relación molar final GMA/DMAA se denominan GD1 (0,7:1), GD2 (0,8:1) y GD3 (1:1).

4.2.2. Reacción de polimerización por Injerto en Simultáneo en membranas macroporosas de PSf

Procedimiento

1. Las membranas se pesan al décimo de miligramo, luego se adiciona el solvente (metanol 50 %) previamente desoxigenado con nitrógeno gaseoso. Se adiciona el/los monómero/s y se mezcla por inversión.

2. Se empacan y se someten a irradiación (CNEA Ezeiza), a temperatura ambiente en una celda con fuente de radiación gamma de ^{60}Co (con dosis controlada entre 3-10 kGy). La dosis y velocidad de dosis son controladas mediante el uso de dosímetros.

3. Después de la irradiación, son lavadas con metanol al 50 % y secadas por 24 hs en un horno al vacío con temperatura entre 30 °C y 40 °C hasta peso constante. El grado de injerto se calcula según se describe en la sección 1.4.1.

4.2.3. Acoplamiento del ácido iminodiacético (IDA)

El IDA (PM 137,13) es acoplado a los grupos epóxido de los materiales injertados con GMA. El material modificado es sumergido en una solución de 0,5 mol/L de IDA disuelto en DMSO:agua (1:1), pH 11. La reacción es llevada a cabo a 80 ^{o}C por 10 hs, los grupos epóxido remanentes son hidrolizados a grupos dioles por medio de la incubación en ácido sulfúrico 0,5 mol/L por 2 hs a 80 ^{o}C [14].

4.2.4. Determinación de las modificaciones químicas

La concentración de ligando IDA es determinada indirectamente por complejación de iones. El material modificado con IDA es sumergido en una solución de $NiCl_2$ 0,1 M por 1 hora. Después de lavar con agua deionizada, el níquel es recuperado por incubación mezclándolo en agitación con EDTA 0,1 M, pH 7, a temperatura ambiente durante 2 hs. El contenido en níquel es determinado espectrométricamente como el complejo EDTA-Ni^{2+}

a 595 nm. La inmovilización de Cu^{2+} es realizada utilizando $CuSO_4$ 0,1 M como solución inicial y cuantificada después de la misma manera que en la determinación de Níquel. El complejo EDTA-Cu^{2+} es medido a 715 nm [14]. Ambas determinaciones requieren curva de calibración para ser cuantitativas.

4.2.5. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El área superficial y la porosidad del material modificado son analizados mediante SEM combinado con el sistema de microanálisis dispersivo de energía de rayos X (EDAX). Estos estudios se realizaron en CNEA-Constituyentes con Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) Philips PSEM 500, provisto con sistema EDAX de análisis elementales EDX. Resolución utilizada: 20.000X.

Tratamiento de la muestra: el material obtenido es secado bajo condiciones de presión reducida y fracturado en nitrógeno líquido. Se recubren las muestras con una microcapa evaporada de oro o grafito para asegurar su neutralidad eléctrica.

4.2.6. FT-IR e IR-ATR

El análisis por espectroscopía de infrarrojo (IR) se realiza con un espectrómetro Nicolet IMPACT 410 (Nicolet. Sistema FT-IR. Pike technologies, Inc.), con una resolución de 3 cm^{-1}.

Se utilizó el dispositivo de ATR de ángulo vertical variable (cristal KRS-5 (Thallium Bromide-Iodide) de 50 mm de longitud y espejos de 25 mm) para poder realizar análisis de IR por reflexión. También se utilizó la variante de reflexión única (cristal de diamante Golden Gate) sobre una superficie de muestreo de 1 mm^2. En este caso, el cristal enfoca el haz IR y provee la interfase de muestreo, maximizando la intensidad del haz, y logrando espectros de muy alta relación señal/ruido. Se utilizan 512 acumulaciones para mejorar la relación señal/ruido.

4.3. Resultados y Discusión

Como esquema de trabajo, en este capítulo se propuso primero realizar el injerto de GMA sobre el polímero base por copolimerización radioinducida en simultáneo. Luego se realizó la conversión química de los grupos epoxi incorporando IDA e hidrolizando los grupos epoxi remanentes mediante una hidrólisis ácida para convertir estos grupos en dioles y así disminuir la adsorción inespecífica. Posteriormente, se incorpora el metal (activación del IDA) y finalmente se realiza el análisis y comparación de los copolímeros desarrollados.

4.3.1. Caracterización del copolímero

Membranas de fibra hueca de PSf fueron sometidas al injerto simultáneo con las cantidades de monómero descriptas en la Tabla 4.2. Se obtiene una relación lineal entre el grado

Denominación	% GMA en el tubo de reacción	Masa inicial x 10 fibras (mg)	Masa final x 10 fibras (mg)	GI%
G-0	0	223,0	222,8	-0,1
G-A	1	225,1	251,6	11,8
G-B	2	228,0	293,9	28,9
G-C	3	230,0	327,4	42,4
G-D	4	217,8	344,7	58,3

Tabla 4.2 – Resultados obtenidos en la reacción de injerto de GMA sobre fibras de PSf.

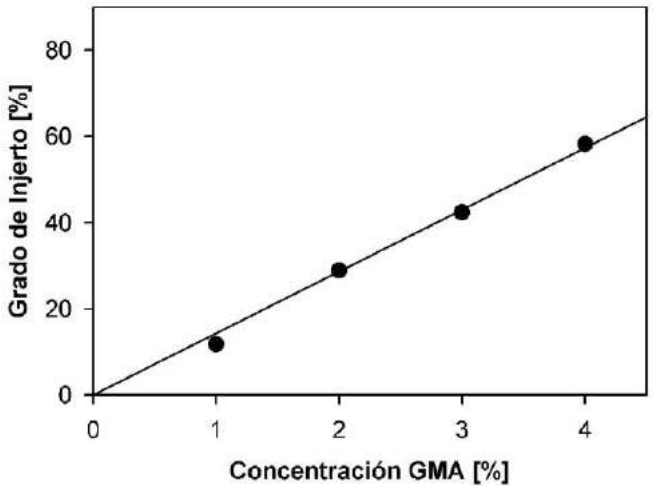


Figura 4.5 – Relación entre la cantidad inicial de GMA en el tubo de reacción y el GI% obtenido para fibras de PSf.

de injerto y la concentración de monómero inicial (Figura 4.5).

Las mezclas de reacción presentaron homopolimerización. Para evaluar la solubilidad y características físicas que presenta el homopolímero, se prueban varios solventes y combinaciones de ellos (Tabla 4.4) para así poder remover el exceso no injertado a temperatura ambiente.

De los solventes utilizados para solubilizar el homopolímero, ninguno resultó adecuado. De todas formas, se utilizó el lavado con etanol, etanol:agua (1:1), y/o agua destilada ya que el homopolímero se separa con facilidad (no adhesivo).

Análisis espectral IR-ATR

Se realizaron los espectros ATR sobre membranas sin modificar, modificadas con poliGMA y con poli(GMA-co-DMAA). En la Figura 4.6 se muestra el espectro de bandas correspondiente al polímero base y al polímero modificado con GMA. Comparando ambos

Composición del Copolímero	Relación Molar Inicial (GMA/DMAA)	Relación Molar Final (GMA/DMAA)	G.I.%
G1 (GMA)			20%
G2 (GMA)			19%
GD1 (GMA:DMAA)	0,9	0,2	18%
GD2 (GMA:DMAA)	1,7	0,4	29%
GD3 (GMA:DMAA)	2,5	1	11%

Tabla 4.3 – G.I% para diferentes copolímeros con GMA inicial al 1%. *Observaciones: En negrita se denotan los copolímeros sometidos posteriormente a pruebas de capacidad específica, desarrollados en el capítulo VI.*

Orden de prueba	Solvente	Aspecto
1	Etanol (EtOH)	Se precipita en forma de agujas amorfas.
2	EtOH + H_2O	
3	H_2O	
4	H_2O: DMSO (1:1)	Se abrió tipo lámina. Se solvata.
5	H_2O: DMSO (3:1)	Al incrementar la proporción de agua, precipitan en forma amorfa y color opaco.
6	H_2O: DMSO (7:1)	
7	H_2O: DMSO (15:1)	

Tabla 4.4 – Homopolimerización. Solubilidad del homopolímero.

espectros, se puede ver la modificación introducida sobre la superficie del polímero base por medio de la aparición de la señal a 1720 cm^{-1} característica del grupo carbonilo del GMA.

Utilizando la curva de calibración obtenida en la sección 2.3.1 se determina la composición del copolímero a partir del análisis de las señales de la Figura 4.8.

SEM y EDAX

Con el objetivo de estudiar la distribución completa y homogénea de la incorporación superficial de material al polímero base así como la estructura de los poros internos, se aplica la técnica de SEM/EDAX (Cu^{2+}) sobre el área superficial y cortes de área seccional del material modificado que posee IDA-Cu^{2+} inmovilizado.

El espectro EDAX obtenido mostró la presencia del elemento Cu en el material base (Figura 4.9). Con este resultado, se muestra (i) la funcionalidad incorporada y con ello, (ii) que la reacción de acoplamiento químico es efectiva, lo cual infiere que (iii) también es efectiva la incorporación del poliGMA sobre la superficie del material base. De las micrografías SEM, se observa la distribución homogénea del Cu^{2+}, tanto a nivel del área

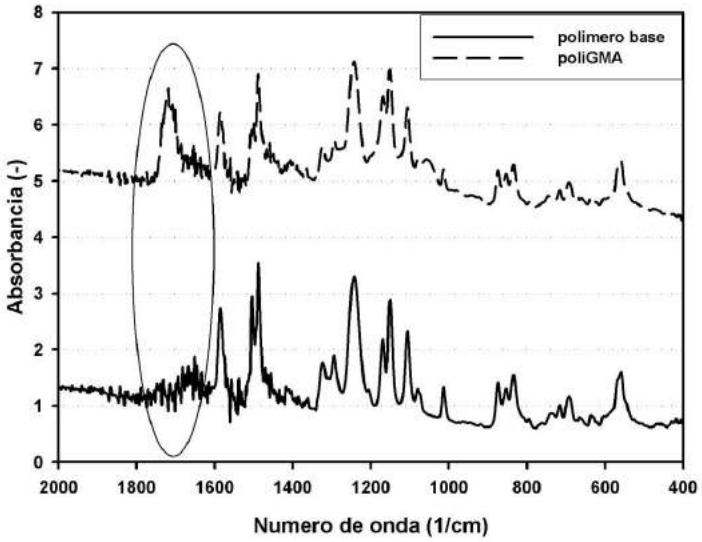


Figura 4.6 – Espectro ATR-IR sobre membranas modificadas con GMA. *Se denota los cambios introducidos sobre la superficie del polímero base.*

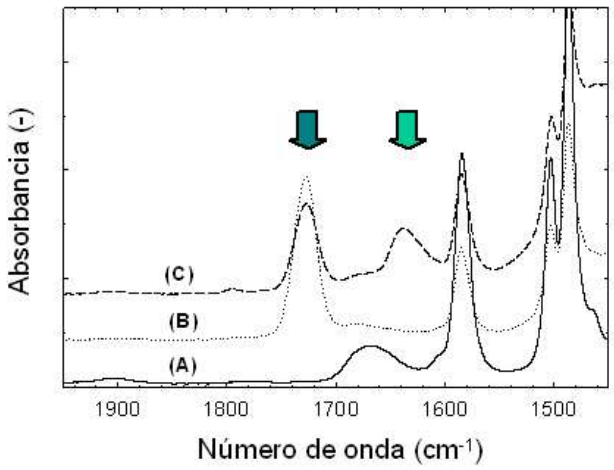


Figura 4.7 – Caracterización espectroscópica de la superficie mediante la técnica de ATR FT-IR. (A) Membrana de PSf, (B) con injerto de GMA, (C) con co-injerto de GMA y DMAA. *Del análisis de los primeros micrones de la superficie se observan los principales cambios introducidos sobre la superficie del polímero base: señal a 1640 cm^{-1} correspondiente al C=N de DMAA, y señal a 1720 cm^{-1} correspondiente al C=O de GMA. También se observa la disminución de señales del polímero base (por ejemplo a 1670 cm^{-1}).*

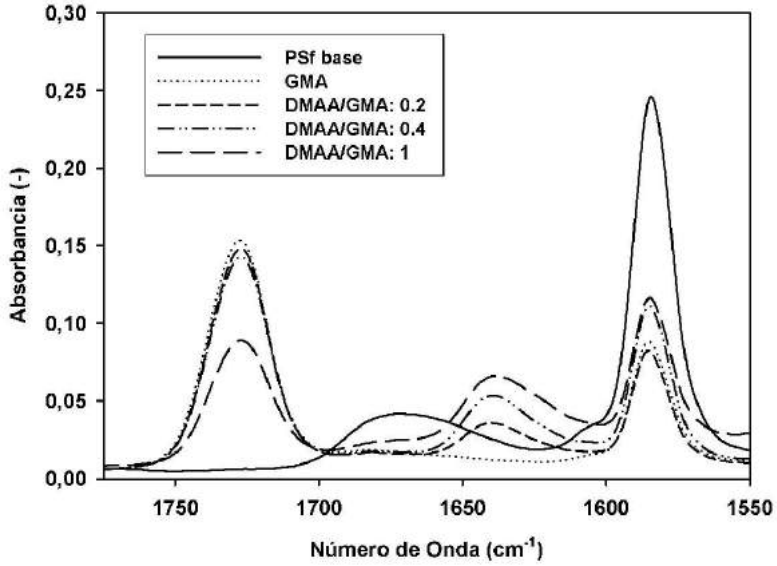


Figura 4.8 – Espectros IR de las modificaciones incorporadas al polímero base de PSf en función de la relación de monómeros final. *Ampliación en la zona del espectro donde los cambios sobre la superficie son evidentes (entre N° de onda 1800 cm^{-1} a 1550 cm^{-1}).*

superficial como en el corte de área seccional (Figura 4.10), por lo tanto, con estos resultados se demuestra una incorporación homogénea del copolímero sobre el material base durante el proceso de injerto.

Cuantificación de copolímero injertado

Los materiales porosos poseen una gran relación superficie/volumen lo cual permite que el grosor promedio de las capas de polímero injertado pudiese ser muy fino aún para una extensión importante de grado de injerto. Considerando que es homogéneo como se demostró previamente, el grosor promedio de la capa de polímero injertado puede ser estimado teniendo en cuenta (i) la densidad del polímero de poliacrilato como 1,25 g/ml; (ii) el área superficial interna del polímero base en el orden de 15 m^2/g según determinaciones por la técnica de BET; y (iii) el grado de injerto en el orden del 10 al 60 %. Asumiendo una distribución de injerto homogénea, el grosor de la capa injertada, en el estado deshidratado, es en el orden de los submicrones (0,005 - 0,03 μm). Dado que el tamaño promedio del poro es de 0,65 μm, este espesor representa del 1 al 5 % de diferencia en el tamaño del poro. Como esta diferencia no es apreciable por micrografías electrónicas, no se observaron diferencias en la estructura de poro entre materiales modificados y originales (datos no mostrados).

Los materiales modificados con IDA y la quelación de iones de níquel resulta en un típico coloro verde claro. La distribución del color sobre la superficie puede ser inspeccionada

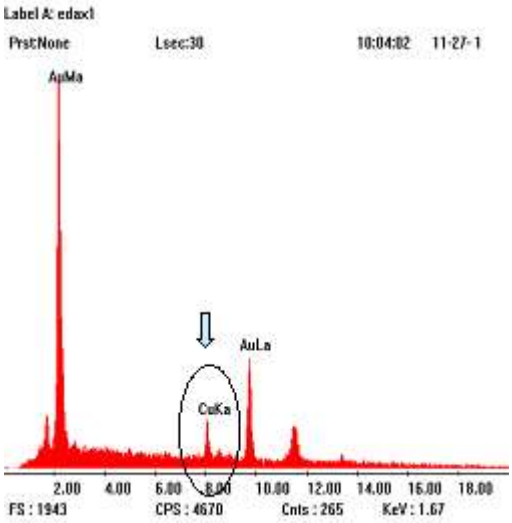


Figura 4.9 – Caracterización por Espectro de Emisión de Rayos X.

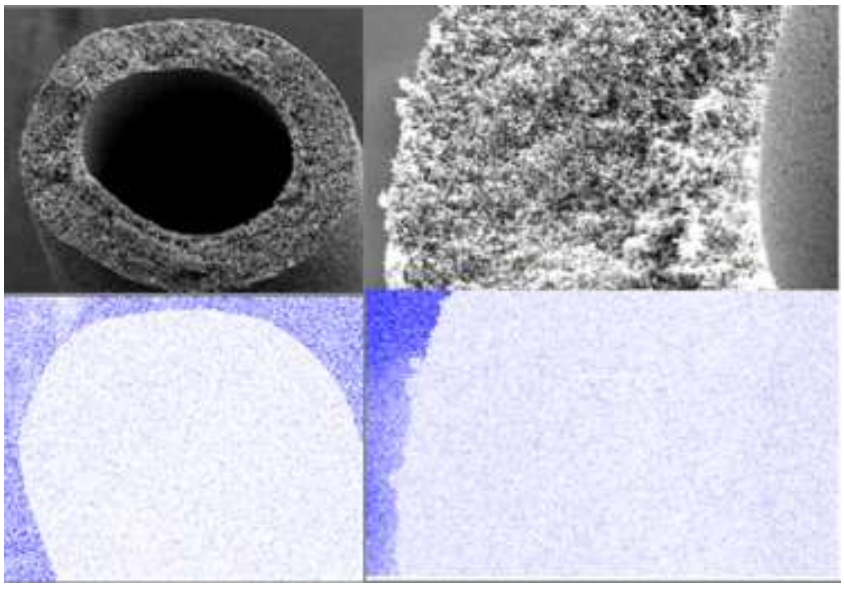


Figura 4.10 – Fotos SEM y Cu^{2+}-EDAX de corte transversal del material modificado con Cu^{2+}-IDA. *Factor de magnificación 400x y 90x, respectivamente de izquierda a derecha. Visualización de la distribución homogénea del* Cu^{2+}.

Denominación	**GI%**	**Capacidad Cu(II)** (μmol Cu(II)/ml membrana)	**Capacidad Ni(II)** (μmol Ni(II)/ml membrana)
G-A	11,8	137	73
G-B	28,9	336	254
G-C	42,3	501	295
G-D	58,3	590	429

Tabla 4.5 – Determinación de la capacidad de unión a metales de las fibras de PSf modificadas con GMA.

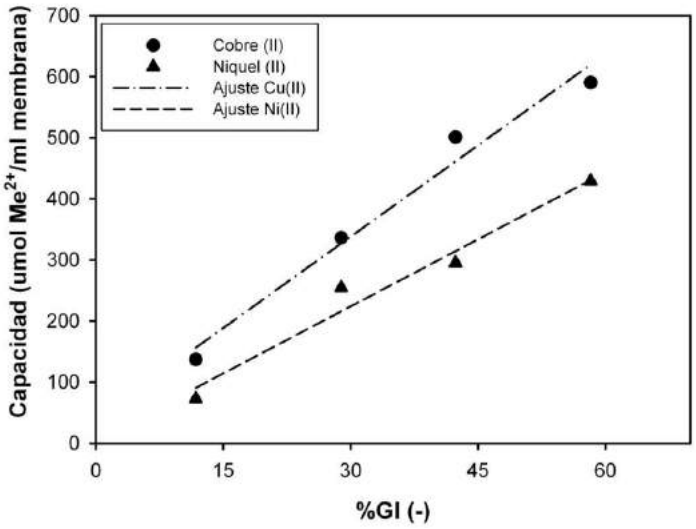


Figura 4.11 – Curvas de cuantificación de metal (II) en función del grado de injerto. *Siendo:* $y_{(Cu^{2+})} = 9,9694x + 38,9634$ *(R^2: 0,9788); e* $y_{(Ni^{2+})} = 7,3174x + 4,3918$ *(R^2: 0,9666).*

directamente a simple vista. Además, los iones níquel pueden ser fácilmente removidos y cuantificados (Figura 4.11).

Según datos de bibliografía se puede considerar que el rendimiento de la reacción de GMA con IDA en estas condiciones es del 80% [9]. Sin embargo, si correlacionamos los μmoles de GMA injertados (a partir del GI%) con los μmoles de Ni adsorbidos (a partir de la determinación de capacidad) este último es un 20% mayor respecto del primero. Esta relación se mantiene constante para el rango de injertos estudiados como se muestra en la Figura 4.12, por lo que se concluye que una proporción importante de los grupos IDA no son capaces de quelar iones posiblemente por ser inaccesibles al solvente.

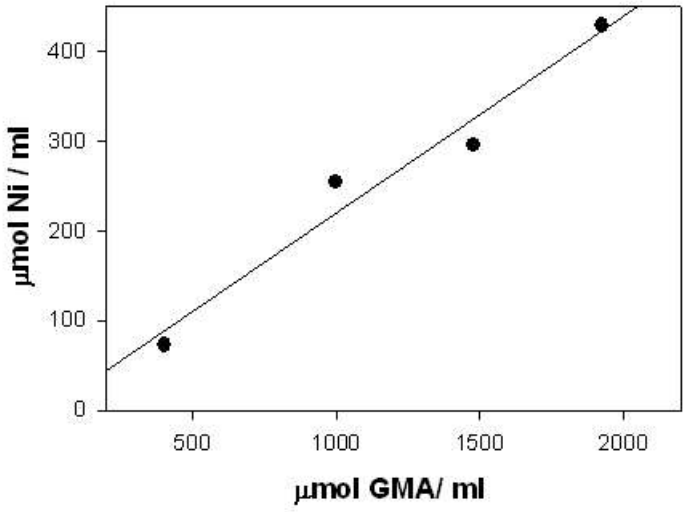


Figura 4.12 – Proporción molar de Ni(II) en función del GMA incorporado

4.4. Conclusión

En la caracterización de la reacción de polimerización por injerto en membranas macroporosas de PSf, el grado de injerto fue estandarizado en 20 %, siendo el porcentaje óptimo de acuerdo a trabajos previos [9], y los espectros IR-ATR no sólo muestran en la superficie del polímero los cambios introducidos sino también la presencia de las especies propuestas. A través de una curva de calibración obtenida de los espectros IR de mezclas conocidas de monómeros se pudo determinar la relación molar final en el copolímero injertado.

Se obtuvieron materiales con una capacidad de adsorción de entre 140 y 590 μmol Cu^{2+}/ml de matriz. La capacidad de adsorción de iones metales de la matriz comercial Chelatin Sepharose Fast Flow® (GE HealthCare, 2007) es de 23 μmol Cu^{2+}/ml de matriz. Las matrices desarrolladas en este capítulo superan a esta capacidad de 6 a 26 veces.

A diferencia de las membranas modificadas en el capítulo II, por la técnica de preirradiación en vacío, y del PE poroso del capítulo III, por la técnica de preirradiación en aire, estas membranas no presentaron ninguna modificación macroscópica de volumen ni tampoco algún efecto de hinchamiento en presencia de solvente.

Esta técnica fue elegida para continuar este trabajo dadas las características de modificación superficial alcanzadas.

Referencias

[1] Bhattacharya A. Radiation and industrial polymers. *Progress in Polymer Science*, 25:371–401, 2000.

[2] Dargaville T. R., George G. A., Hill D. J. T., and Whittaker A. K. High energy radiation grafting of fluoropolymers. *Progress in Polymer Science*, 28:1355–1376, 2003.

[3] Curso de Postgrado. Polímeros modificados por radiaciones para usos biotecnológicos. UNQ, Bs. As. Argentina, 2000.

[4] Razzak M. T. *Radiation grafting studies on the modification of fluoropolymers and natural rubber for biomaterials.* Phd thesis, Department of Nuclear Engineering, Faculty of Engineering. Tokyo, Graduated School of the University of Tokyo, 1988.

[5] Hongfei Ha., Xiaohong Lu, and Jilan Wu. Study on acid effect in mutual radiation grafting of aa, 4-vp and n-vp onto silicone rubber. In *Proceeding of International Symposium on Radiation Technology in Biomedical Materials*, memo 03-083, pages 85–91. JAERI, 1991.

[6] Grasselli M., Navarro del Canizo A.A., Camperi S.A., Wolman F. J., Smolko E. E., and Cascone O. Immobilized metal ion affinity hollow-fibre membranes obtained by the direct grafting technique. *Radiation Physics and Chemistry*, 55(2):203–208, 1999.

[7] Onishi M., Shimura K., Seita Y., Yamashita S., Takahashi A., and Masuoka T. Preparation and properties of plasma-initiated graft copolymerized membranes for blood plasma separation. *Radiat. Phys.Chem.*, 39:569–576, 1992.

[8] Razzak M. T., Otsuhata K., Tabata Y., Ohashi F., and Takeuchi A. Blood compatibility assessment of graft copolymer (nr-g-dmaa) tubes. In *Proceeding of international symposium on Radiation Technology in Biomedical Materials*, memo 03-083, pages 168–175. JAERI, 1991.

[9] Camperi S. A., Grasselli M., Navarro del Cañizo A., Smolko E., and Cascone O. Chromatographic characterization of immobilized metal ion hollow-fiber affinity membranes obtained by direct grafting. *Journal of Liquid Chromatography*, 21:1283–1294, 1998.

[10] Iwata H., Saito K., Furusaki S., Sugo T., and Okamoto J. Adsorption characteristics of an immobilized metal affinity membrane. *Biotechnol. Prog.*, 7(5):412–418, 1991.

[11] Nishiyama S., Saito K., Saito K., Sugita K., Sato K., Akiba M., Saito T., Tsuneda S., Hirata A., Tamada M., and Sugo T. High-speed recovery of antimony using chelating porous hollow-fiber membrane. *Journal of Membrane Science*, 214(2):275–281, 2003.

[12] Camperi S. A. *Purificación industrial de enzimas de interés comercial. Pectinasas.* PhD thesis, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, 1999.

[13] Camperi S. A., Navarro del Canizo A. A., Wolman F. J., Smolko E. E., Cascone O., and Grasselli M. Protein adsorption onto tentacle cation-exchange hollow-fiber membranes. *Biotechnol. Prog.*, 15(3):500–505, 1999.

[14] Camperi S. A., Grasselli M., and Cascone O. High-speed pectic enzyme fractionation by immobilised metal ion affinity membranes. *Bioseparation*, 9(3):173–177, 2000.

Capítulo 5

Método de injerto en simultáneo sobre polímeros bombardeados con iones pesados acelerados

5.1. Introducción

Los comienzos del desarrollo de las trazas por la tecnología de bombardeo de iones pesados acelerados se establecen a fines de los años '50. Es entonces cuando D.A. Young descubre las primeras trazas nucleares en un cristal de LiF [1]. Estas zonas dañadas constituyen sitios químicamente más activos que las zonas que rodean a estas áreas [2]. A partir de entonces, surgieron preguntas tales como: ¿qué tipo de daño produce una partícula pesada de alta energía sobre diferentes tipos de materiales?, ¿cuál es el mecanismo de este daño?, ¿cómo es la energía que pierde la partícula al interactuar con los electrones y núcleos del material bombardeado?, ¿cuáles son las posibles aplicaciones y desarrollos? Con ellas se generó un gran crecimiento en este campo de la ciencia junto con el desarrollo de nuevas tecnologías con aplicaciones en diferentes campos [1, 3, 4, 5]. Aunque muchos materiales forman trazas a través de este proceso, el mismo ha tenido un amplio desarrollo comercial en el campo de los plásticos.

A partir de los años '80, el uso de aceleradores de iones pesados, tuvo un fuerte impacto sobre este campo. La fuente de partículas de alta energía utilizada en la producción de las trazas es la principal diferencia entre las membranas de poros perfectos y las tradicionales [6].

Una de las principales ventajas del uso de estas nuevas técnicas es que no queda radioactividad residual en el material; también es posible variar la transferencia de energía lineal (LET) de las partículas formadoras de trazas, así como la distribución del ángulo del poro y las longitudes del mismo.

La creación de membranas micro y nanoporosas con geometría altamente uniforme (también llamadas de poro perfecto o membranas nucleares) es uno de los desarrollos más interesantes obtenidos en el procesamiento de polímeros por radiaciones. Estos materiales pueden ser obtenidos a partir de láminas delgadas de polímeros que al ser irradiadas con iones pesados acelerados, como $^{197}Au^{+}$, $^{238}U^{+}$, $^{208}Pb^{+}$, $^{209}Bi^{+}$, $^{84}Kr^{+}$, ó $^{129}Xe^{+}$, crean trazas latentes sobre el material (Figura 5.1, A). Se denomina traza latente a las modificaciones que se producen sobre el material y que persisten en una región de daño "congelado" alrededor de la trayectoria del ión. Posteriormente son "grabadas" por un agente químico (Figura 5.1, B). Esto permite preparar canales paralelos, cónicos o cilíndricos, de diámetro

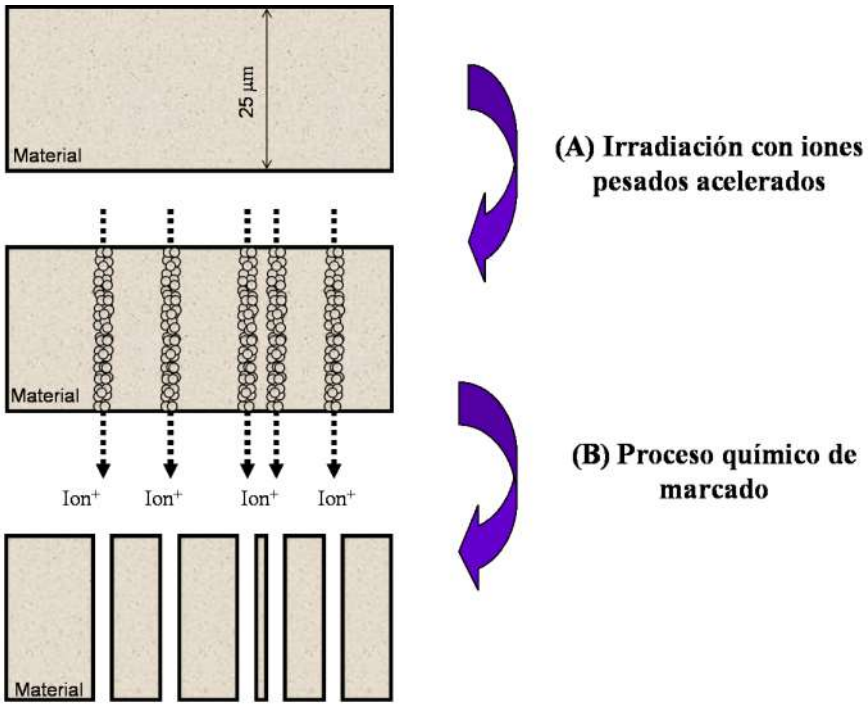


Figura 5.1 – Esquema del proceso de formación de los poros perfectos en una película de material polimérico: A) Bombardeo con iones pesados acelerados, formación de la traza latente; B) Marcado químico para formar el poro.

muy uniforme en el rango de unos nm a μm. El tamaño del poro en este tipo de material puede ser controlado por elección del tratamiento de irradiación y por las condiciones del procesamiento químico. Los materiales más utilizados son las láminas de policarbonato (PC) y de polietilentereftalato (PET) [7, 8], aunque también pueden ser utilizados otros polímeros como el fluoruro de polivinilideno (β-PVDF) [9]. Tanto el PET como el PC poseen baja reactividad biológica, termoestabilidad y resistencia a ataques químicos. El espesor típico del material es de 10 a 20 μm.

Las membranas producidas por la técnica de trazas ofrecen ventajas distintivas sobre las membranas convencionales debido a su estructura precisa. El tamaño de poro, la forma y la densidad pueden ser controladas, por lo cual pueden ser producidas membranas con características particulares de transporte y retención. A estas propiedades se suma la transparencia óptica. Por lo general, cuando el tamaño de poro es mayor que 5 μm son transparentes. En aplicaciones en las que se requiere exclusión de la luz, el ángulo de poro puede ser controlado para garantizar que la luz directa no pueda transmitirse a través de la membrana.

El uso de las membranas con poros perfectos ha comenzado a expandirse hacia la industria del diagnóstico *in vitro*, ya que se mejora la especificidad de los ensayos (por ejemplo, en captura de células, captura de partículas y aglutinación en látex, en ensayos

de inmunofiltración de partículas, en pruebas de deformidad eritrocitaria) y extendiendo su uso también como biosensores (ya que los poros pueden ser llenados, por ejemplo con el antígeno o las enzimas deseadas). Normalmente son utilizadas en el área de filtración controlada, por ejemplo en la filtración de muestras para HPLC, filtrado de aire contaminado y la estabilización de las bebidas [10]. Como consecuencia de las propiedades singulares encontradas en este tipo de membranas, su uso también se deriva a la posibilidad de estudiar actividades celulares en sistemas biológicos, como fenómenos de transporte, absorción y secreción. Pueden servir como modelo para investigar el transporte de líquidos, gases, partículas, solutos, electrolitos a través de los nano-canales. También pueden ser utilizados como molde para la síntesis de micro y nano materiales como alambres o tubos metálicos para pequeños dispositivos electrónicos o sensores [11].

5.1.1. Implantación y traza latente por bombardeo con iones pesados

El proceso de implantación de iones consiste en bombardear la superficie de un material con iones acelerados a energías adecuadas para que penetren hasta una cierta profundidad preestablecida. En estas condiciones se logran diversos efectos, tales como introducir daños en la red cristalina del material; modificar la estructura de la superficie y de las primeras capas atómicas; producir microaleaciones en capas muy delgadas; depositar determinadas substancias en posiciones intersticiales dentro de los cristales; modificar las propiedades superficiales suministrando dureza y resistencia a la corrosión; producir zonas aislantes en el interior de materiales conductores o semiconductores; inducir transformaciones de fase en materiales metálicos; producir polimerización de monómeros. Las propiedades modificadas, químicas y físicas, de la región dañada pueden tener entonces aplicaciones nanotecnológicas, como la implantación de trazas, nanolitografía y el marcado de trazas para formar nanocanales.

Aunque el efecto de traza latente es relativamente bien conocido, y la técnica es bastante sencilla y directa, no hay una única teoría que explica su formación. Los procesos físicos básicos, después de que la primera partícula cargada pierde su energía, son la ionización y la excitación de las moléculas del material. Esta primera fase, en la que la energía de los iones pesados acelerados es depositada en la materia y se distribuye radialmente a la trayectoria del ión, sucede en un tiempo muy corto (10^{-15} a 10^{-17} segundos). En ella, los electrones libres creados en estas interacciones primarias dan lugar a una serie de ionizaciones y excitaciones a medida que se produce el frenado, creando más electrones libres. La transferencia de energía lineal se debe principalmente a la presencia de electrones secundarios emitidos por el proceso de ionización en la transición de la partícula incidente cargada. Entonces, un gran número de electrones libres y moléculas dañadas se generan en los alrededores del camino seguido por las partículas. Las trazas de estos electrones pueden salir de la traza principal (halo periférico) o quedarse dentro del corazón según se esquematiza en la Figura 5.2. Una zona de daño se conoce como todo tipo de cambio físico y químico inducido por el ión incidente. En una segunda fase fisicoquímica se crean,

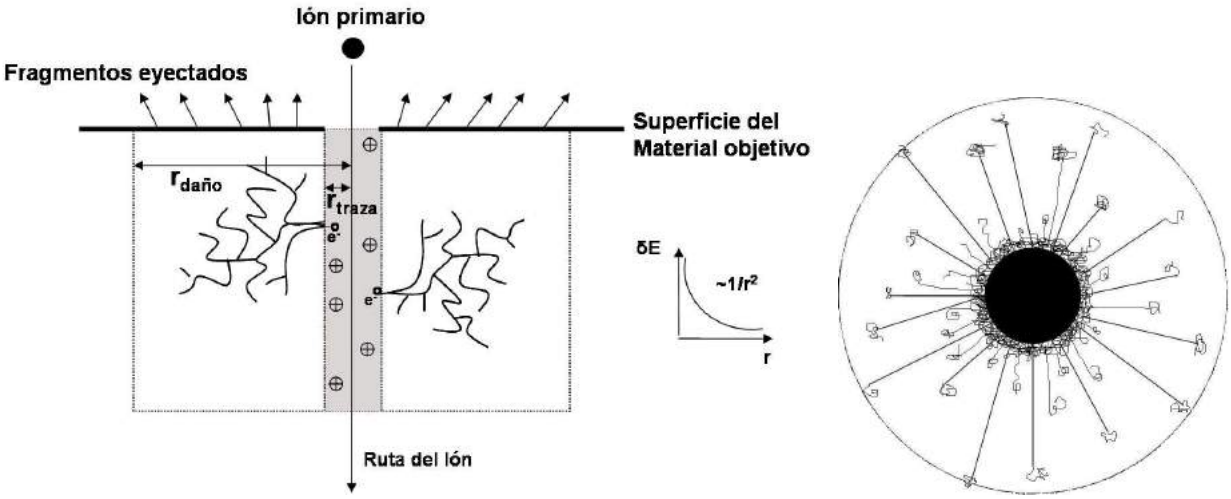


Figura 5.2 – Esquemas de corte longitudinal de la deposición inicial de energía en el material y estructura radial propuestos para una traza latente en un polímero, con una zona central y una zona periférica o halo (adaptados de: Kopniczky [11] y Betz [12]).

por interacciones entre las moléculas dañadas, nuevas especies químicas. Al producirse la excitación del ión primario sobre la superficie de impacto, también se produce en ella la eyección de partículas tales como protones, electrones, átomos, fragmentos moleculares y/o moléculas. La densidad de energía decae radialmente desde el centro en aproximadamente $1/r^2$ [11].

Para generar la traza y no el implante, la transferencia de energía del ión acelerado a la materia debe ser mayor. Como se detallará más adelante, las distintas interacciones para el frenado, en función de la energía, pueden ser nucleares o electrostáticas. Para generar mayor daño (equivalente a mayor energía transferida) es necesario entonces trabajar con iones de E correspondientes a la zona llamada "pico de Bragg". La masa del ión acelerado también es un factor a considerar, ya que a mayor masa se necesita bombardear con mayor energía para mantener las condiciones de interacción con la materia. En cuanto al material blanco, tanto la densidad como el espesor requieren ser lo más pequeños posibles para mantener una traza homogénea. Las trazas son rectilíneas, paralelas entre ellas y su orientación en relación a la superficie de la muestra es modulable. Tanto la anisotropía de deposición de la energía a escala submicrómica como el gran suministro de dosis local (en el corazón de la traza) son propiedades únicas de la irradiación con iones pesados acelerados [13].

5.1.2. Interacción de los iones pesados acelerados con la materia

El poder de frenado y la pérdida de energía son dos fenómenos que están estrechamente vinculados cuando un ión pesado acelerado interactúa con la materia. El poder de frenado (S) es definido como la pérdida de energía por unidad de camino recorrido, siendo expresado como S = -dE/dx. Es un valor promedio que tiene sentido sólo en el caso de partículas

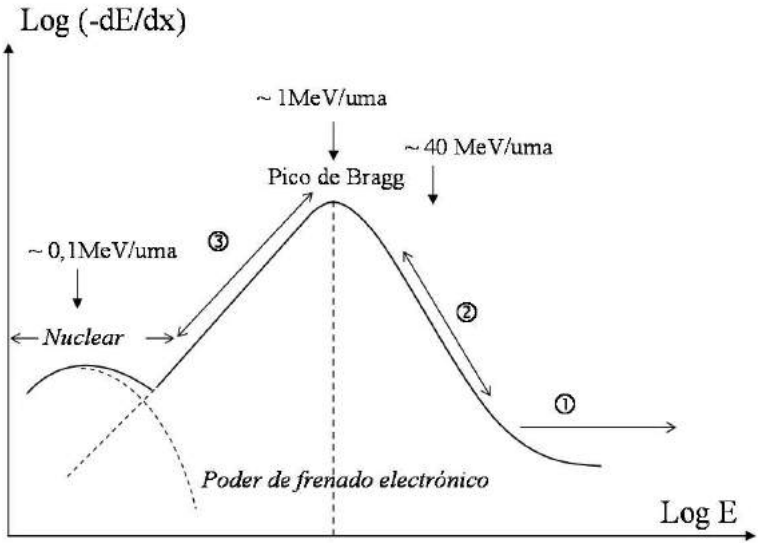


Figura 5.3 – Evolución del poder de frenado en función de la energía del ión incidente.

cargadas. Depende de la naturaleza y energía cinética de la partícula incidente así como del medio que atraviesa. Una partícula cargada, en movimiento dentro de un sólido, disipa su energía de acuerdo a la interacción con los átomos del material blanco, pudiendo ser una colisión elástica o inelástica. En la mayoría de los casos el poder de frenado y el LET son considerados iguales.

Si se representa la evolución del poder de frenado en función de la energía del ión incidente pueden distinguirse dos zonas relativas a los dos tipos de poder de frenado (Figura 5.3). Una zona representa a la detención de tipo nuclear, de baja energía, con un máximo localizado a aproximadamente a 0,1 MeV/uma, y la otra zona representa a la detención de tipo electrónica, de alta energía con un máximo localizado a pocas MeV/uma comúnmente denominado "pico de Bragg". En esta última zona pueden distinguirse tres campos: el (1) que se corresponde con los iones relativistas; el campo (2) localizado previo al pico de Bragg, donde el poder de frenado del ión varía aproximadamente en 1/E (teoría de Bethe) y donde el ión posee una velocidad mayor de detención que todos los electrones de un átomo; el poder de frenado aumenta hasta el pico de Bragg, donde el ión posee una velocidad comparable a aquella de los electrones de la capa K; a una baja velocidad, el poder de frenado disminuye (campo 3) tendiendo a cero aproximadamente como la raíz cuadrada de E (teoría de Lindhard-Sharff-Schiott).

Como características de la pérdida de energía electrónica se puede suponer que el modo de perder energía de los iones pesados acelerados depende más que nada de la velocidad de los iones sobre el material blanco, que de su energía (ya que no participa la masa de los iones). Debido a la baja masa de los electrones de los átomos del material objetivo, la pérdida de energía por colisión todavía es baja ante la energía del ión que, por lo tanto, experimenta un **frenado gradual** y **contínuo** durante su camino en el material.

El momento de transferencia de los iones a los electrones es bajo, por lo tanto, los iones prácticamente no son desviados. La pérdida de energía electrónica es de **naturaleza estadística**.

En cuanto a la distribución espacial de la energía, los iones pesados acelerados pierden su energía como resultado de ionizaciones y colisiones inelásticas. Los electrones expulsados van a depositar la energía en un volumen determinado a lo largo del trayecto del ión en el material. Esto es a lo que se llama **deposición radial de la energía** y genera una geometría anisotrópica de daño. La energía de los iones es depositada localmente (a lo largo de su trayectoria), con una simetría cilíndrica. La dependencia de la energía de iones en función de la trayectoria recorrida puede ser presentada por cálculos de gran complejidad que aquí no serán desarrollados [14].

5.1.3. Grabado químico

Si un material que contiene trazas latentes se ve expuesto a soluciones químicamente agresivas, como soluciones acuosas alcalinas, entonces las reacciones químicas serían más intensas a lo largo de las trazas que sobre el material sin daños. Sin embargo, no se sabe que especies químicas se forman después del paso de partículas a través del material, y la naturaleza del daño aún no es del todo conocida, por lo que diferentes teorías han sido desarrolladas con el fin de entender estos procesos [13]. Las soluciones acuosas de NaOH o KOH son las más utilizadas en este aspecto. El efecto general es que la solución química disuelve bajo condiciones adecuadas a la superficie del material, con una mayor velocidad en la región dañada. Este proceso es llamado "marcado" o "grabado" y transforma a la traza latente inicial en una traza mayor, pudiéndose crear canales muy uniformes de tamaño visible a lo largo de la traza.

Un estudio completo sobre los materiales que muestran el efecto traza fue presentado por Fleischer y colaboradores [15].

El proceso de grabado y formación de trazas se ha estudiado con mayor detalle sobre PVDF [9], donde se observa una dependencia química según el material polimérico. La condición para la formación de traza latente estable es comúnmente expresada como un valor límite de la resistencia del material. Sin embargo, no hay un único valor de la resistencia por encima del cual el efecto de traza siempre aparece. De esta manera, no puede servir como único criterio para la formación de trazas.

En general, el hecho de que la formación de una traza marcada no tiene lugar inmediatamente, sino sólo después de algún tiempo de exposición a las soluciones de marcado, indicaría que una serie de procesos no visibles ocurren previamente a la disolución de las zonas dañadas por el ión en el polímero. Fink y colaboradores proponen que el inicio de esta disolución requiere de por lo menos dos etapas, relacionadas con los procesos de transporte: (1) la penetración de la solución en la zona de la traza latente, y (2) la posterior fase de transición vítrea-gomosa del polímero que transforma a los polímeros insolubles en forma soluble [16]. Estos procesos son altamente complejos y aún son objeto de estudio.

Para permitir que cualquier líquido penetre en un polímero, ya sea por difusión o nanocapilaridad, se requiere de un volumen intrínseco. En presencia de la traza latente, el líquido

puede introducirse por la traza misma o por los alrededores, en las zonas no irradiadas. Esto depende de la microestructura específica que brinda la traza. La penetración de un líquido en un polímero esta siempre asociada con las interacciones de tipo Van der Waals que ocurren entre las moléculas del solvente y las cadenas de polímero, que dependen del grado de hidrofilicidad o hidrofobicidad del material. Como resultado de este proceso de hidratación, el polímero se "hincha", siendo el daño por radiación más pronunciado para el polímero.

Las modificaciones se atribuyen a los cambios estructurales producidos por las dosis de energía depositadas. Dos procesos competitivos se tienen en cuenta en estos cambios estructurales. Estos son, el entrecruzamiento de la molécula de polímero, que reduce la velocidad de disolución, y la escisión o ruptura de cadena, que aumenta las velocidades de grabado. El efecto de diferentes dosis de energía en varios polímeros típicos [17], en las características del grabado y la topografía superficial de los polímeros [18], ha sido estudiado por técnicas nucleares para continuar descifrando los mecanismos, y poder desarrollar modelos matemáticos y probabilísticos [19, 20].

5.1.4. Modificación de membranas de poros perfectos

Las membranas de poros perfectos, obtenidas a partir del bombardeo con iones acelerados, pueden ser además modificadas por copolimerización por injerto radio-inducido. El injerto de monómeros hidrofílicos proporciona altas cantidades de grupos funcionales, accesibles para sorción o acoplamiento, e incluso un recubrimiento superficial más efectivo de la matriz. Esto resulta en membranas conteniendo poros modificados con propiedades superficiales y con selectividad mejoradas, donde al mismo tiempo se preserva la estructura macroporosa.

La preparación de estas membranas involucra la exposición de láminas de polímero a iones pesados acelerados por un acelerador de partículas, seguido del marcado químico para así producir poros a través de la membrana. Las membranas entonces pueden ser copolimerizadas por tratamiento directo (sin grabado) con monómeros [21] o ser grabadas y posteriormente irradiadas con rayos gamma [22, 23]. Una tercera posibilidad es realizar un grabado suave y posterior injerto sobre la traza [24, 25].

La utilización de estos métodos permite dentro de un amplio límite, la elección del diámetro de poro, forma y porosidad de las membranas, además de la creación de sitios activos que pueden iniciar el injerto con monómeros que impartan al material diferentes características. Pudiendo entonces, clasificarlas en función de la propiedad del tipo de injerto como intercambiador de iones, quelantes o neutras. Por otra parte, la obtención de membranas con poros modificados podría aportar nuevas soluciones a los problemas asociados a microfiltros convencionales [26].

El grupo de trabajo de Betz logró injertar estireno sobre PVDF, por preirradiación inducida con iones pesados acelerados [21]. Tanto el rendimiento como la velocidad de injerto variaron según el tipo de ión utilizado. Shirkova y colaboradores, muestran en su trabajo la posibilidad de polimerización por injerto local en una traza latente en láminas de perfluoropolímero [27]. La reacción de polimerización por injerto de ácido metacrílico

(MAA) se realizó en ausencia de oxígeno posteriormente a la irradiación con iones pesados (Kr, 430 MeV, en rango de fluencias de 10^8-10^{12} iones/cm^2) en dos perfluoro polímeros comerciales. Otro grupo de trabajo de Argentina, logró obtener membranas de PVDF con características hidrofílicas por injerto de N-isopropilacrilamida (NIPAAm) utilizando radiación gamma sobre láminas de este material. Las láminas habían sido previamente bombardeadas con iones pesados con posterior marcado químico [22].

El objetivo de este capítulo es realizar la modificación por injerto y la derivatización química sobre los nanoporos y su caracterización mediante diferentes técnicas.

5.2. Materiales y Métodos

Muestras a ensayar

Láminas de HDPE de dimensiones 5 cm ancho x 12 cm de largo y 50 μm de espesor. Cedidas gentilmente por el Dr. Makuuchi K. del TRCRE- JAERI, Takasaki, Japón.

Dos láminas de PET (Hostaphan®) de 5 cuadrados de 4 x 4 cm. Una bombardeada con iones Kr (Hostaphan RE10, espesor 10 μm) y la otra con Xe (Hostaphan12, Lavsan, espesor 12 μm) con la misma fluencia de partículas de 3.10^9 iones/cm^2 (210 MeV, 450 MeV, incidencia 90°). La irradiación se llevó a cabo en GANIL (Francia) a menos que se especifique lo contrario. Una tercer lámina de PET irradiada con una fluencia de 3.10^{10} iones/cm^2. Para el estudio por SANS el tamaño de muestreo es de 20 mm x 20 mm.

5.2.1. Procedimiento

Grabado químico

1. Lavado de los polímeros base (PET) con agua destilada
2. Incubación en 0,25 N NaOH, 80 ^{o}C, 45 minutos (ΔT° ± 2 °C).
3. Lavados con agua bidestilada a temperatura ambiente.
4. Enjuague con metanol para secar y pesar.

Injerto

1. Determinación gravimétrica en balanza analítica
2. En tubos de vidrio con tapa a rosca, con una mezcla MeOH:H_2O (1:1) degaseada con N_2, 30 min. Adición del monómero GMA. Dosis 5 - 6 kGy. Fuente: *Gamma Cell.* (CNEA-EZEIZA). Dosímetro *Amber.*
3. Lavados con metanol y agua destilada. Secado y determinación gravimétrica en balanza analítica.

4. Concentraciones de GMA utilizadas en HDPE: 0,1 %; 0,3 %; 0,6 % v/v. En PET: 0,1 % y 2 % v/v.

Acoplamiento de IDA

1. Lavado de las membranas con metanol y luego con agua destilada.
2. Secado por enjuague con metanol a temperatura ambiente.
3. Incubación en solución de IDA (IDA 0,5 M en buffer fosfatos 100 mM, pH 10), 4 hs a 80 ^{o}C.
4. Lavados con agua destilada.
5. Inactivación de los grupos epóxido remanentes.

Inactivación de los grupos epóxido remanentes (hidrólisis ácida)

1. Incubación en H_2SO_4 0,5 M, 50 ^{o}C, 35 minutos.
2. Lavados con agua destilada.
3. Secado a temperatura ambiente.
4. Pesada a décima de miligramo.

Preparación del complejo IDA-Ni^{2+}/Cu^{2+}

1. Incubación con $NiCl_2$ 5 % p/v (o $CuSO_4$ 5 % p/v)
2. Lavados con agua destilada.
3. Detección y cuantificación del metal por re-extracción con solución de EDTA

5.2.2. Determinación del % GI por peso

Según sección 1.4.1, del Capítulo I.

5.2.3. Caracterización física de la muestra: microscopía electrónica y SANS

Las microscopías electrónicas de estos materiales son llevadas a cabo en el Centro de Microscopías Avanzadas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA (Buenos Aires, Argentina). Se usó el microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM 982 GEMINI.

Las distancias o diámetros de poros son medidos sobre las microfotografías electrónicas por medio del programa de procesamiento de imágenes Suri-Pluma de distribución gratuita

(`http://www.suremptec.com/`), en las micrografías con aumentos 100.000x o 200.000x. Estas determinaciones son promediadas sobre más de 50 mediciones, expresándose como promedio ± el desvío estándar (SD).

La técnica de dispersión de neutrones a pequeños ángulos (SANS) se realiza con el espectrómetro PAXE, para SANS, en el Laboratorio Leon Brillouin (LBB, Francia). El tamaño del arreglo del detector es de 64x64 con celdas de 1x1 cm^2, el multidetector de PAXE se llena con gas BF_3. La distancia de la muestra al detector es fijada en 5 m.

5.2.4. ATR-IR

Al igual que en capítulos previos, se utilizó un espectrómetro IMPACT 410, Nicolet, Sistema FT-IR (Pike Technologies, Inc.) con el dispositivo de ATR de ángulo vertical variable (cristal KRS-5 (Thallium Bromide-Iodide)). También se utilizó la variante de reflexión única (cristal de diamante Golden Gate) sobre una superficie de muestreo de 1 mm^2.

5.3. Resultados y Discusión

Láminas de PET bombardeadas con iones pesados acelerados (Kr y Xe), fueron sometidas al tratamiento de marcado químico para obtener los nanoporos, y posteriormente se les incorporó GMA mediante la técnica de irradiación en simultáneo con rayos γ (Figura 5.4). Se analizan los materiales por SANS y SEM. Por último, para cuantificar indirectamente la incorporación del GMA, se realiza una reacción de acoplamiento de IDA y se compleja con iones metálicos (Ni^{2+} ó Cu^{2+}).

5.3.1. Determinación del GI % por peso en HDPE

Dado que el diámetro de los poros se encuentra en la escala nanométrica (entre los 50 y 60 nm), la posibilidad de bloquear completamente el poro es muy alta (Figura 5.4, Caso II), por lo que es necesario entonces optimizar el espesor de injerto tal que los poros de PET no se vean obstruídos por el agregado del nuevo material. Con este fin, se trabaja primero sobre un material no poroso (HDPE) y, a partir del % GI obtenido con diferentes cantidades de monómero, se calcula el espesor del injerto y se establece la mejor condición para PET.

Tomando en cuenta las consideraciones detalladas a continuación (ítem 5.3.2) sobre el cálculo del espesor de poliGMA injertado superficialmente y considerando las áreas de la Tabla 5.1, se determinó que el espesor promedio de poliGMA es de 560 nm por cada un volumen % de GMA agregado al medio de polimerización. De este experimento se determina que la concentración de GMA tiene que ser de 0,1 % v/v para un diámetro de poro promedio de 56 nm (diámetro esperado -ver más adelante - según Figura 5.5).

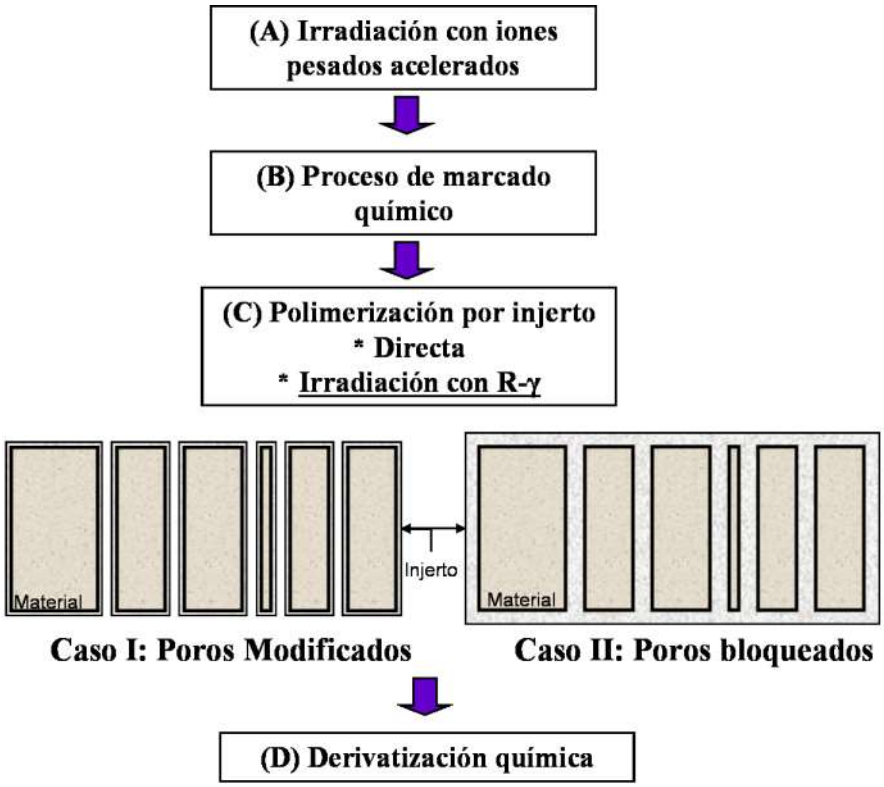


Figura 5.4 – Esquema de trabajo propuesto a desarrollar

Denominación	Área (cm^2)	% GMA inicial	P_0 (mg)	P_f (mg)	% GMA experimental
0	108	0	242,8	243,0	0,08
1	120	2	274,6	280,3	2,07
2	120	2	265,4	269,7	1,62
3	120	2	270,0	275,5	2,04
4	120	4	266,6	274,4	2,93
5	120	4	276,3	284,6	3,00
6	120	4	270,5	278,6	2,99

Tabla 5.1 – % GI obtenidos para HDPE

5.3.2. Cálculo de la superficie cubierta por el injerto

1. **GI teórico esperado**

   En base a las determinaciones del radio de los materiales injertados, la masa injertada se calcula a partir de la relación entre el volumen de injerto (considerando que se forma una película uniforme tal que el volumen = espesor del injerto * el área cubierta) y la densidad del poliGMA (δ=1,24 g/cm^3). Se contempla un valor promedio en peso para una lámina de PET de las dimensiones trabajadas en 31 mg.

2. **Área total a cubrir por el injerto**

   Área total a cubrir por el injerto = $\sum$ área superficial prisma cuadrangular base - 2 $\sum$ áreas circulares de impacto de las trazas + $\sum$ área superficial cilíndrica de los canales

3. **Área superficial**

   Siendo un prisma cuadrangular base, el área es la suma de las áreas de sus lados. Las dimensiones correspondientes al ancho, largo y espesor son 2 cm, 4 cm y 1,2.10^{-3} cm respectivamente. Se obtiene un área de 16,03 cm^2.

4. **Áreas circulares de impacto de las trazas**

   Se considera como πr^2 *número de poros, siendo el número de poros igual a la fluencia (número de iones por unidad de área) multiplicado por el área total expuesta.

5. **Área superficial cilíndrica de los canales**

   Se considera $2\pi r$ * h * fluencia * área total expuesta. Siendo r el radio obtenido luego del tratamiento químico; h es el espesor de la lámina.

5.3.3. Injerto de GMA en membranas de poros perfectos de PET

Utilizando concentraciones de GMA de un orden de magnitud menor que las utilizadas para otros materiales en capítulos previos se realizaron experimentos de injerto en simultáneo como se observa en la Figura 5.5. Aunque se utilicen concentraciones muy bajas de monómero se sigue obteniendo una correlación entre la concentración de monómero inicial y el grado de injerto. En la determinación del GI% por gravimetría se obtuvieron GI% del orden entre 1 y 6 para concentraciones de monómero en solución entre 0,1-0,6 %v/v para el PET bombardeado con Kr. En el caso del PET bombardeado con Xe los grados de injerto resultaron por debajo del 1 % en todos los casos.

Se continuó trabajando con las muestras de PET bombardeado con Kr y con menor GI (al 1 %).

Denominación	% GMA (v/v)	P_0 (mg) (grabado químico)	P_{f-I} (mg) (post injerto)	P_{f-D} (mg) (post derivatiz.)	GI%
Kr/G1	0,1	31,2	31,6	33,0	**1,3**
Kr/G2	0,3	32,5	33,3	33,9	**2,5**
Kr/G3	0,6	31,1	32,9	32,3	**5,8**
Xe/G4	0,1	39,3	39,7	41,4	**1,0**
Xe/G5	0,3	38,4	38,4	41,2	**0**
Xe/G6	0,6	61,3	61,9	62,7	**1,0**

Tabla 5.2 – Resultados determinación del % GI. *Observación: Para el % GI no se considera el valor de peso post derivatización química.*

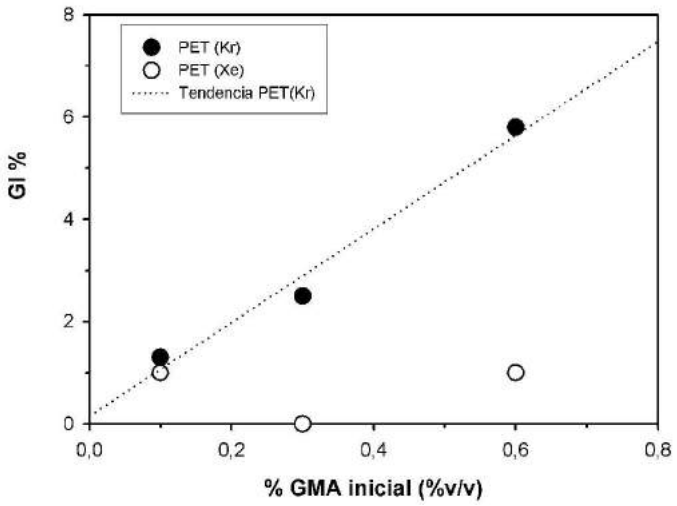


Figura 5.5 – % GI obtenido por gravimetría en las membranas PET sometidas a bombardeo de iones pesados en función del % GMA inicial en solución.

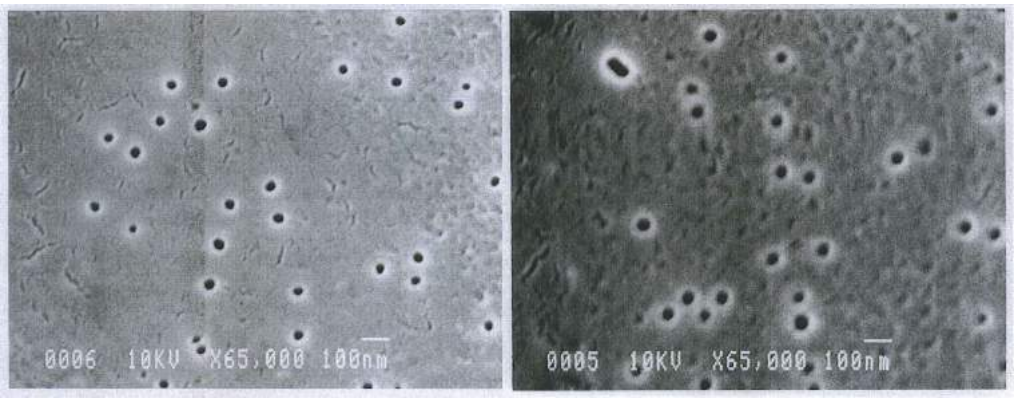


Figura 5.6 – Micrografías electrónicas (65000 x) de una muestra de PET Hostaphan (fluencia 3.10^9 iones Kr/cm^2) con marcado químico de 30 y de 45 minutos, respectivamente.

Estudio por Microscopía electrónica

Las microscopías electrónicas brindan imágenes directas de los canales, ya sea sobre la superficie de la lámina o sobre secciones transversales si se utiliza la criofractura en la preparación de la muestra. Sin embargo, unos pocos canales pueden ser observados en cada imagen. A continuación, se exponen como ejemplos dos micrografías electrónicas (65000 x) de una muestra de PET Hostaphan® irradiada con una fluencia de 3.10^9 iones Kr/cm^2 (α=0°) con marcado químico de 30 y de 45 minutos (Figura 5.6). Estas micrografías se llevaron a cabo en el Laboratorio Leon Brillouin (LLB) - CEA Saclay, (Francia) - y fueron realizadas y gentilmente cedidas por N. Betz y colaboradores.

En cada imagen, se observan sólo unos pocos poros y que a mayor tiempo de marcado químico, el diámetro de los poros es mayor. Los puntos negros grandes corresponden a los canales, y las más pequeñas pueden ser efectos debidos a la rugosidad de la superficie del polímero o al proceso de metalización.

Utilizando un SEM de emisión de campo se logró magnificar hasta 200.000x. De esta manera se puede visualizar una imagen directa de los canales del orden nanométrico realizada sobre la superficie de una lámina de PET.

La primera serie de micrografías (Figura 5.7) corresponde a la lámina de PET control (bombardeada con iones pesados con una fluencia de 3.10^9 iones/cm^2, sin grabado químico); en ella se puede observar una superficie lisa. Las resquebraduras observadas sobre el material, con mayor incidencia en los aumentos correspondientes a 100.000x y a 200.000x se deben al recubrimiento de oro.

En la segunda serie de micrografías, que corresponde a PET sometido al marcado químico (PET-R1), se observan claramente en las magnificaciones de 30.000x y 50.000x, la presencia de poros regulares con distribución aleatoria. Con mayor detalle, se visualizan en la micrografía correspondiente a 100.000x, los agujeros superpuestos debido al impacto de varios iones en un mismo lugar o en lugares muy próximos (Figura 5.8). El diámetro de poro promedio determinado según se describe en la sección 5.2.3 a partir de la magnificación de

200.000x es 64 ± 7,6 nm (Figura 5.13).

En la tercera serie, correspondiente al injerto de 0,1 % v/v de GMA en simultáneo por radioinducción (PET-R2) también se observa la presencia de poros regulares, con distribución aleatoria similar a los obtenidos en la Figura 5.8, siendo los poros de menor tamaño (Figura 5.9). El diámetro de poro determinado es de 54 ± 5,9 nm (Figura 5.13).

La cuarta serie de micrografías corresponde a la derivatización química con IDA de las láminas modificadas con GMA (PET-R3). Se observa que no se afecta significativamente al tamaño de poro (Figura 5.10 y Figura 5.12). El diámetro de poro estimado es de 52 ± 5,7 nm (Figura 5.13).

Para corroborar que una cantidad mayor de monómero en la mezcla de reacción podría ocluir completamente los poros (Figura 5.4, Caso II) se realiza un injerto con 2 % v/v de GMA inicial (20 veces mayor cantidad de monómero inicial). En la serie de micrografías correspondientes a esta muestra (PET R4) no se logró observar la presencia de nanoporos (Figura 5.11) aunque el PET previo al injerto si los tenía (Figura 5.8).

El mismo esquema de trabajo se repite para PET bombardeado con una fluencia de 3.10^{10} iones/cm^2 (Figura 5.14).

El tamaño de poro disminuye después de la incorporación de GMA sobre el PET marcado. No presenta variaciones significativas en cuanto a incorporación por modificación química de IDA sobre el GMA (Figura 5.12 y Figura 5.13). Los promedios fueron obtenidos sobre P cantidad de poros (para medir cada poro se hicieron 8 determinaciones independientes) y son descriptos en la Figura 5.13. Siendo para PET-R1: P=14; para PET-R2: P=15; y PET-R3: P=19.

El marcado químico realizado sobre láminas de PET irradiadas con una fluencia de 3.10^{10} iones/cm^2, dejó al polímero muy frágil produciéndose la ruptura de las láminas. Estas muestras fueron útiles para observar la topología interna de la traza seguida por los iones, y los canales paralelos y rectilíneos formados a partir de ella.

5.3.4. Estudio por dispersión de neutrones a pequeños ángulos (SANS)

Las técnicas de dispersión a pequeños ángulos (SAS), como son la de rayos X (SAXS) y de neutrones (SANS), ofrecen numerosas ventajas en la investigación de materiales porosos [28]. Se utilizan para estudiar las propiedades estructurales de los materiales en la llamada escala mesoscópica que cubre un rango de longitud de 10 a 1000 Å (a ángulos pequeños entre $0{,}1^{\circ}$ y 3° provee información de inhomogeneidades espaciales), y se aplica ampliamente en la ciencia de los materiales, química de polímeros, biología y magnetismo [29].

La dispersión de los neutrones (SANS o *small angle neutron scattering*) ofrece un excelente contraste que permite obtener espectros significativos de una lámina de polímero. Esta técnica permite obtener información general y comprender la estructura tridimensional de los poros [30].

Los neutrones son difractados por los poros cilíndricos, por lo que la imagen obtenida no es una visión directa. La intensidad observada es, dentro del marco de la teoría de la

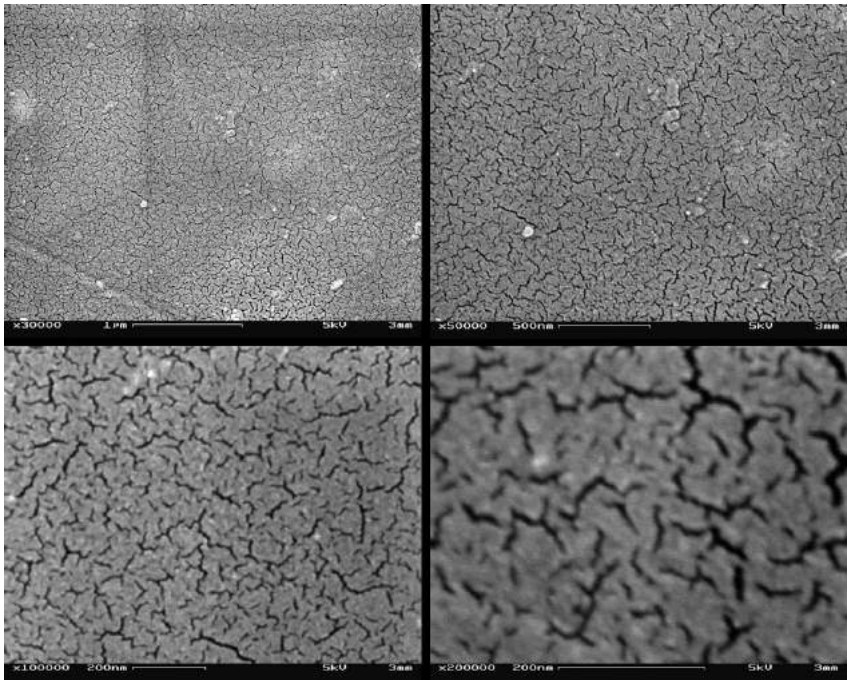


Figura 5.7 – Micrografías electrónicas de PET sin modificar, bombardedas con Kr (fluencia de 3.10^9 iones/cm^2)

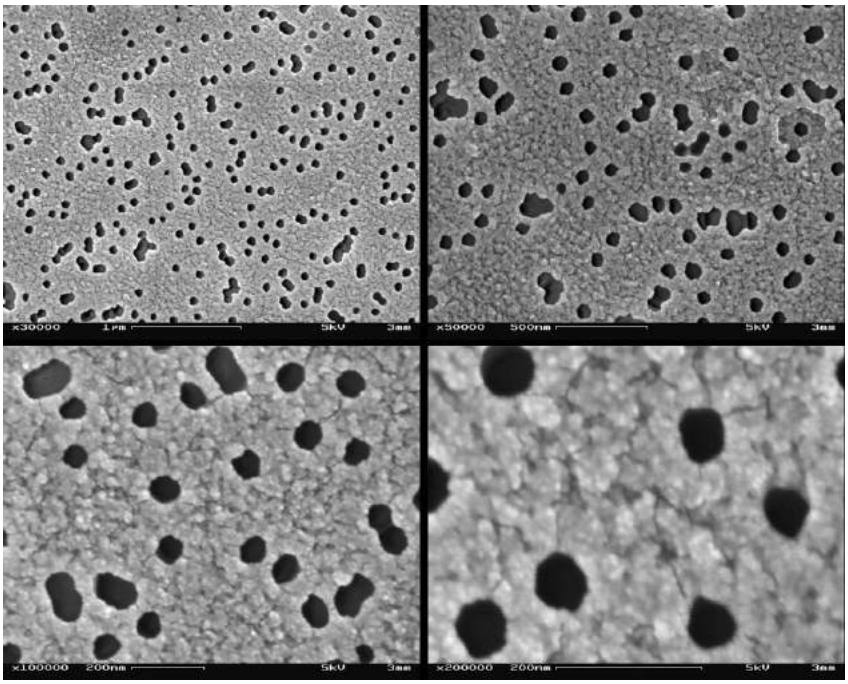


Figura 5.8 – Micrografías electrónicas de PET bombardedas con Kr (fluencia de 3.10^9 iones/cm^2) con marcado químico de 45 minutos (PET-R1).

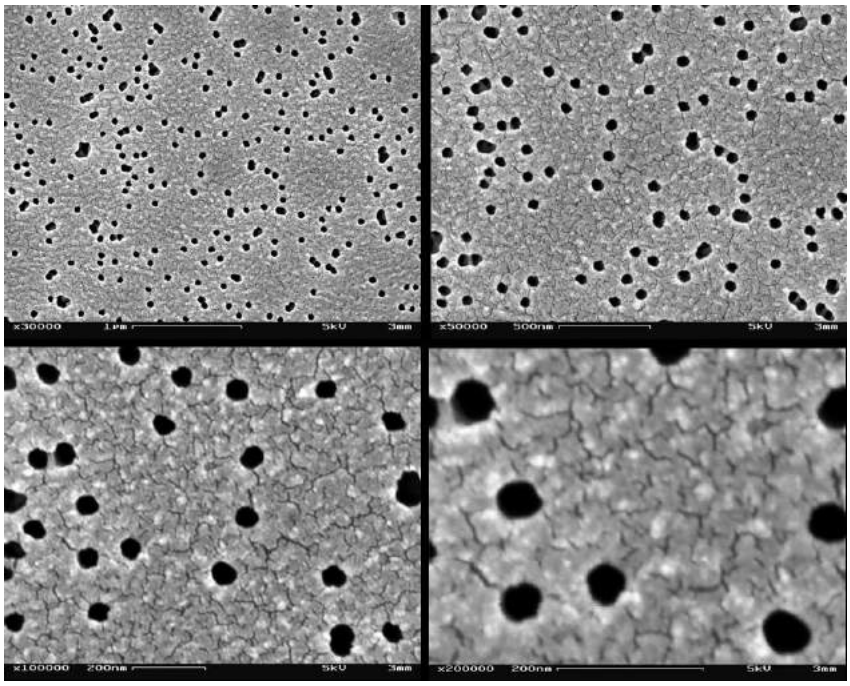


Figura 5.9 – Micrografías electrónicas de PET (bombardeado con fluencia 3.10^9 iones/cm^2) con marcado químico de 45 minutos y posterior injerto radioinducido con 0,1 % v/v GMA (PET-R2).

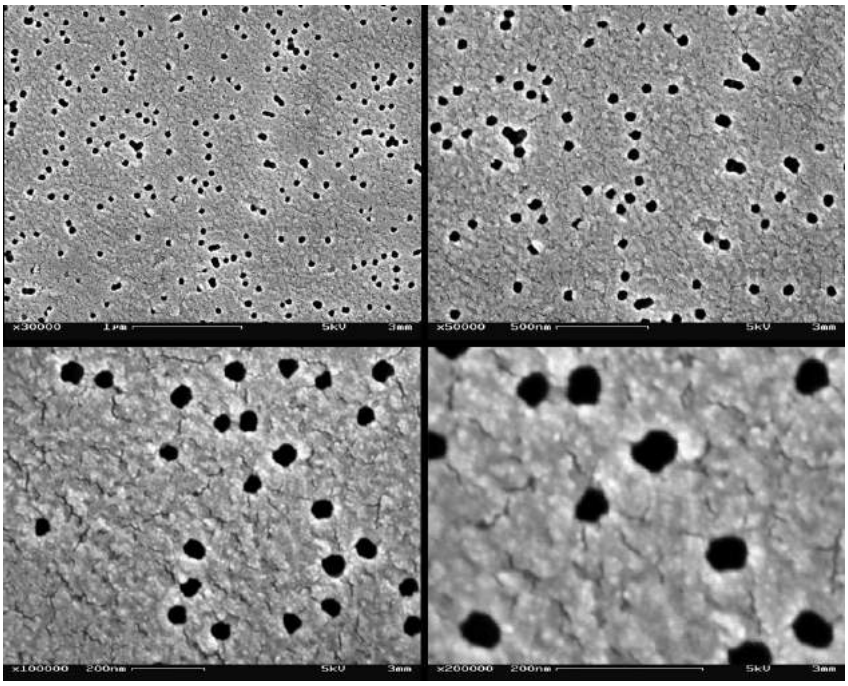


Figura 5.10 – Micrografías electrónicas de PET-R2 con posterior modificación química con IDA (PET-R3)

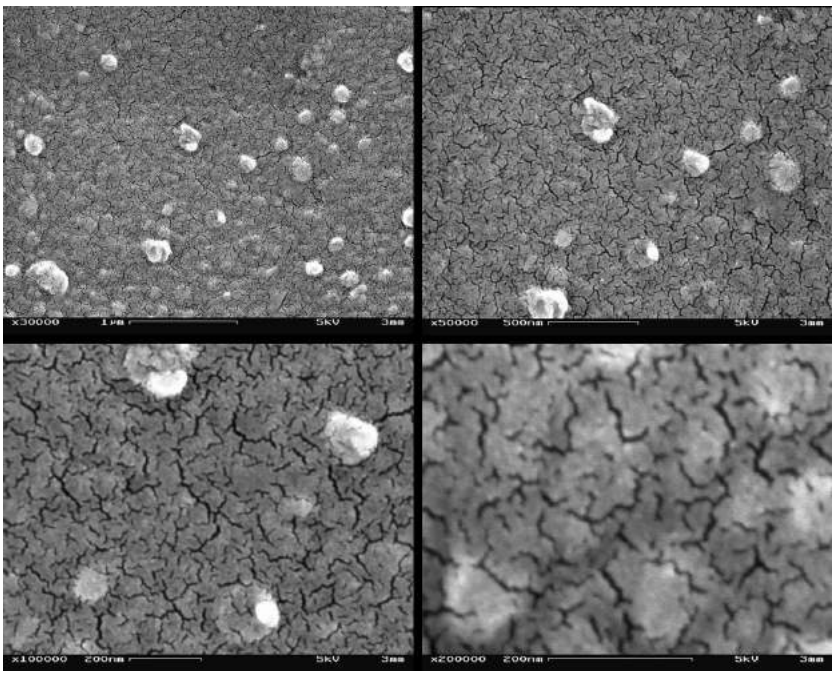


Figura 5.11 – Micrografías electrónicas de PET (bombardeado con fluencia 3.10^9 iones/cm^2) con marcado químico de 45 minutos y posterior injerto con 2 % v/v GMA (PET-R4).

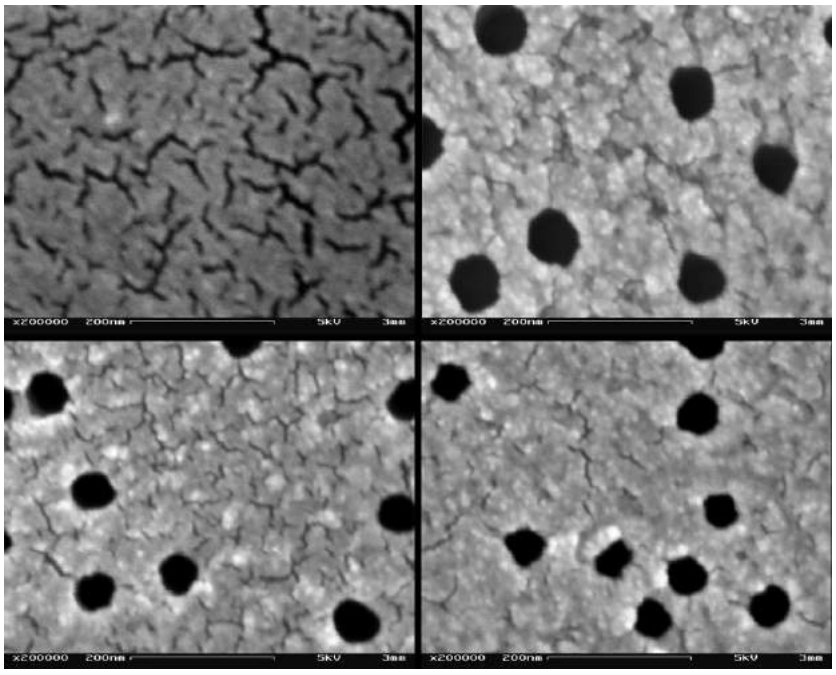


Figura 5.12 – Evolución del tamaño de poro en las distintas etapas de modificación de PET bombardeado con Kr (fluencia 3.10^9 iones/cm^2): (i) control; (ii) marcado químico de 45 minutos (PET-R1); (iii) injerto con 0,1 % v/v GMA (PET-R2); y (iv) modificación con IDA (PET-R3).

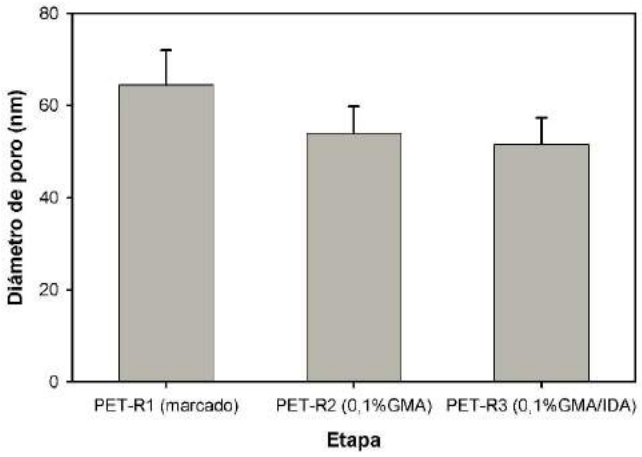


Figura 5.13 – Diámetros de poros obtenidos a partir de las micrografias SEM (100.000x y 200.000x), mediante el programa de procesamiento de imágenes Suri-Pluma.

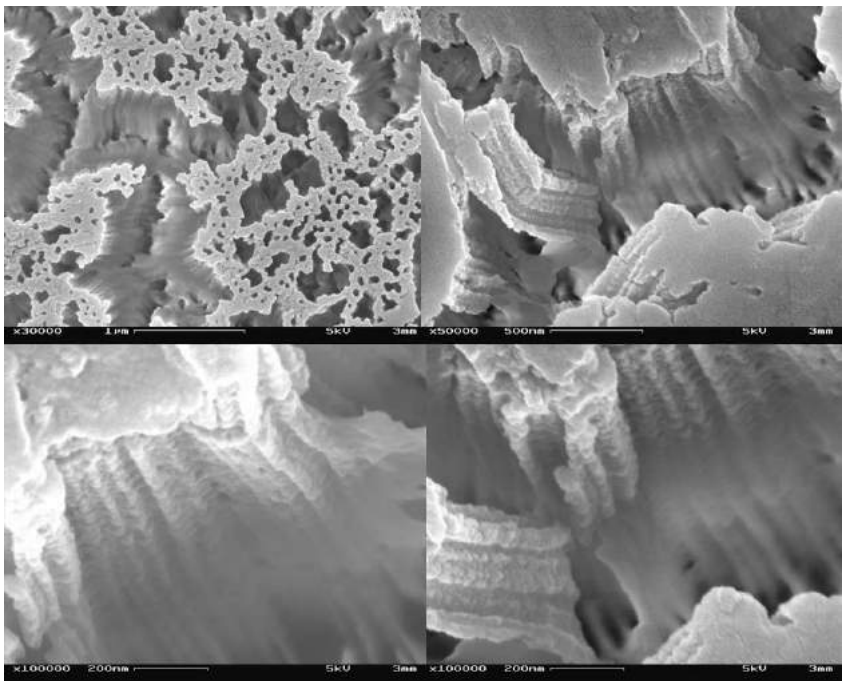


Figura 5.14 – Micrografías electrónicas de PET bombardeado con fluencia 3.10^{10} iones/cm^2; con marcado químico de 45 minutos (30.000x, 50.000x y 100.000x)

difracción, el cuadrado de la transformada de Fourier de una función contraste que describe la forma del canal. Por ello se dice que la intensidad es una función definida en el doble espacio de Fourier (en el espacio doble recíproco). Tanto los rayos X como los neutrones son adecuados para experimentos de dispersión, y aunque los rayos X poseen mejor función de resolución y un mayor espectro de vectores, los neutrones pueden fácilmente atravesar los materiales y son más convenientes, por ejemplo, para observar el marcado in situ. La sensibilidad de los neutrones isotópicos es particularmente útil para estudiar el injerto de materiales sobre los canales formados por las trazas [8].

Como los canales están relativamente apartados entre sí, se asume que la intensidad global es la suma de las intensidades dispersadas por cada canal, sin interacción entre canales vecinos. Debido a que el tamaño de los canales es grande (radio entre 10 y 100 nm) con respecto a la longitud de onda de los neutrones (λ es aproximadamente 1 nm por neutrón), la dispersión toma lugar a pequeños ángulos y se usan difractómetros especiales para realizar este tipo de estudios. Cuando la relación de aspecto del canal (R/L, siendo R el radio y L la longitud) es muy pequeña, los resultados experimentales dependen crucialmente de la orientación de la muestra.

Para SANS, el haz de neutrones seleccionado para ser dispersado por la muestra es un 10 % de $\Delta\lambda/\lambda$; los neutrones dispersados son colectados en un multidetector localizado a unos metros de la muestra

Cualitativamente, una imagen más simétrica corresponde a la orientación del canal a lo largo del eje del haz de neutrones. Proporciona información sobre la estructura radial. El hecho de que sea circular indica que no hay anisotropía inducida por el polímero inicial.

La calidad de los espectros y, en particular, la típica forma de la dispersión radial de Bessel muestran que los canales pueden tener la misma forma y orientación en una determinada muestra, mientras que la dispersión radial puede parecer ser mayor a la esperada por observación micrográfica. Para mejorar la función de resolución de los espectrómetros SANS de neutrones podría ser necesario, en algunos casos, introducir un factor de atenuación para corregir los espectros de neutrones obtenidos.

El modelo propuesto por Pépy y Kuklin, se basa en una modificación de la función de Bessel (la parte radial de la trasformada de Fourier de un cilindro), y es utilizado en el análisis de las muestras del presente trabajo [8]. En algunos casos, se pueden reconocer "jorobas" en los espectros que corresponden a la oscilación de la función Bessel por ello es que los autores incluyen un factor exponencial de atenuación para eliminar este fenómeno. Este modelo es mejorado mediante la inclusión de la función de resolución del espectrómetro y de diversas leyes de probabilidad que describen la dispersión del radio.

A continuación se expone un ejemplo gráfico de los resultados típicos obtenidos por SANS (Figura 5.15) y cuáles son los parámetros de importancia que surgen del análisis por el modelo de Bessel modificado (Figura 5.16).

La intensidad, el espesor de pared, el diámetro, la distribución radial son parámetros de estudio que se han tenido en cuenta en la optimización del modelo desarrollado. En el grosor de pared se asume que la densidad cambia linealmente.

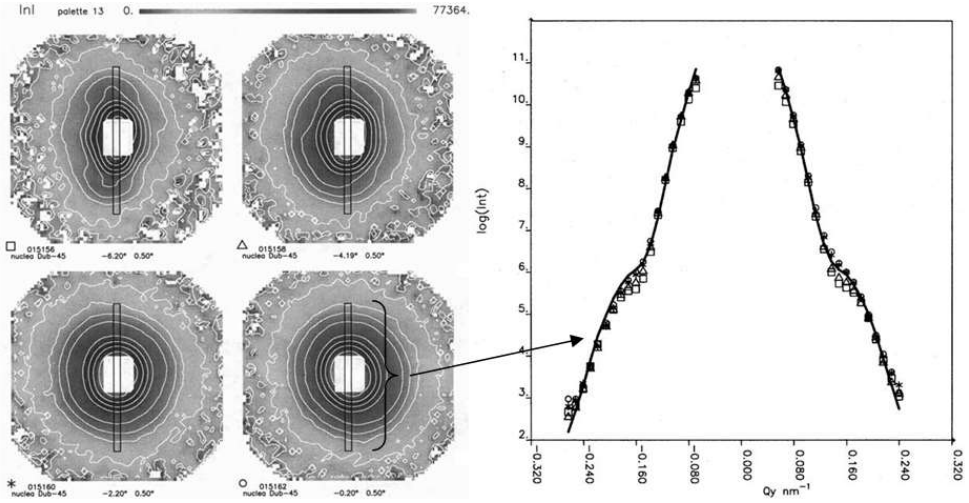


Figura 5.15 – Resultados típicos obtenidos por SANS para una muestra de PET mediante el análisis por el modelo de Bessel modificado [8]. *A partir de las imágenes traducidas por el multidetector (izquierda), se obtiene la gráfica simétrica del logaritmo de la Intensidad en función del vector frecuencia Qy (derecha).*

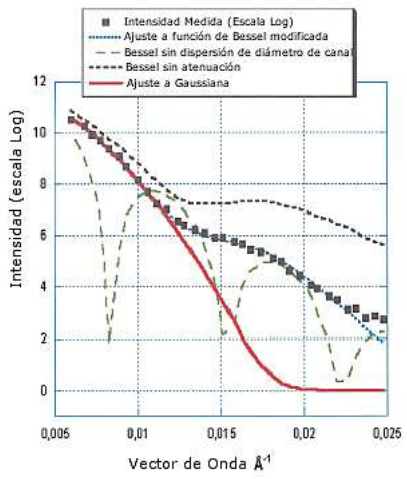


Figura 5.16 – Ejemplo de los ajustes para ilustrar el efecto de los distintos elementos en el modelo. Realizado sobre una lámina de PET irradiada con iones Kr (fluencia de 3.10^9 iones/cm^2) y marcado químico de 45 minutos.

Los píxeles agrupados en el filtro gráficamente se muestran *versus* el vector de onda Q. Estos datos están ajustados de acuerdo con el modelo propuesto por Pépy y a partir de ellos se obtienen el radio medio R_0, con dispersión ΔR y grosor medio de pared w. En las imágenes obtenidas en el multidetector, la intensidad de los píxeles del espectro de neutrones observada es proporcional al módulo del vector de onda $\|A(\mathbf{Q})\|^2$, que se encuentra normalizada al número de píxeles. Con el fin de conseguir una buena calidad de ajuste, es necesario incluir la dispersión para el radio cilíndrico (hasta 73 %), y un factor de atenuación $w = 0{,}027$ A^2. La resolución del espectrómetro no se encuentra incluída.

Según el modelo de Pépy, la transformada de Fourier A($\mathbf{Q}$) de un cilindro recto es el producto de un término radial (una función Bessel cuando la sección del cilindro es circular) y de un término oscilante longitudinal: A($\mathbf{Q}$)= 2*ρ*J$_1$(Q$\perp$R)/(Q$\perp$R)*sen(Q$_Z$L)/Q$_z$/L; donde J$_1$ es la función de Bessel J$_1$; Q$\perp$ y Q$_z$ son los componentes radial y longitudinal, respectivamente, del vector de onda $\mathbf{Q}$ (relativo a eje del canal de la muestra); L es la longitud media de los canales, R sus radios y ρ es la diferencia entre la longitudes de dispersión dentro y fuera del canal. En general,

Muestra	GMA agregado (% v/v)	Diámetro (nm)	W (ancho del daño)	dist-g %	Radio (nm)
PET-R1	0	**61,2**	7,5	22	0
PET-R2	0,1	**54,8**	7,2	20	3,2
PET-R3	0,1	**56,0**	6,9	19	2,6

Tabla 5.3 – Resumen de los parámetros obtenidos por SANS para PET

a mayor cantidad de oscilaciones de la función de Bessel, mejor definidas están las paredes del material. Esto significaría que en presencia de injerto, la resolución en cuanto a los parámetros de la pared del canal, sería mejor.

Los datos observados en general decaen más rápidamente que en una función de Bessel simple. Esta característica puede entenderse como el efecto de la variable densidad lineal sobre la pared del canal, de espesor medio w; que es introducido a través de otra integración. Por último, a valores grandes de Q se observa una variable extra de dispersión como variable Q^{-4}; esta dispersión de Porod es el sello de una rugosidad en tres dimensiones. Este efecto es distinto al de la variación en la densidad de la pared, que es radial y de una dimensión. Mientras tanto, a bajos valores de Q es difícil distinguir sus efectos de los efectos de la dispersión de radio, ya que ambos tienden a una oscilación suave.

La dispersión de neutrones (al igual que la dispersión de rayos X) puede entonces, brindar una descripción general de grandes zonas de muestra con información estadística concerniente a parámetros de la geometría del canal, que se complementa con la información brindada en las microscopías electrónicas.

A continuación se exponen algunos de los gráficos obtenidos por SANS (Figura 5.17) para PET en distintas etapas del proceso de modificación: con marcado químico (PET-R1); injerto con 0,1 % v/v inicial de GMA y tratamiento de hidrólisis de los grupos epoxi (PET-R2); e injerto con 0,1 % v/v inicial de GMA y reacción de incorporación de IDA (PET-R3). El resumen de los datos experimentales obtenidos por SANS mediante el tratamiento de datos detallado previamente se muestran en la Tabla 5.3.

A partir de las imágenes traducidas por el multidetector (izquierda), se obtiene la grafica simétrica del logaritmo de la Intensidad en función del vector frecuencia Q_x (derecha). Se muestra sólo una de las dos curvas ya que son simétricas. Se visualiza el comportamiento tipo Bessel modificado similares a los resultados típicos obtenidos por SANS para una muestra de PET (Figura 5.15). Luego se determina el GI % a partir de ellos (Tabla 5.4) según el tratamiento de datos de la sección 5.3.2.

Mediante SANS se obtuvo información de diferencias de diámetros de poro del orden de los 5 nm, con un 20 % de dispersión sobre el diámetro y un espesor de halo de traza W de 7 nm (Tabla 5.3).

Al igual que en la sección 5.3.2 se calcula la superficie del injerto y se determina el GI %. Siendo el **área superficial base** de 16,03 cm^2; si se considera un radio promedio de $3{,}25.10^{-6}$ cm para la muestra PET-R1, el **área circular de impacto** para todas las trazas es 1,3 cm^2. El **área superficial cilíndrica promedio de los canales** considerando el

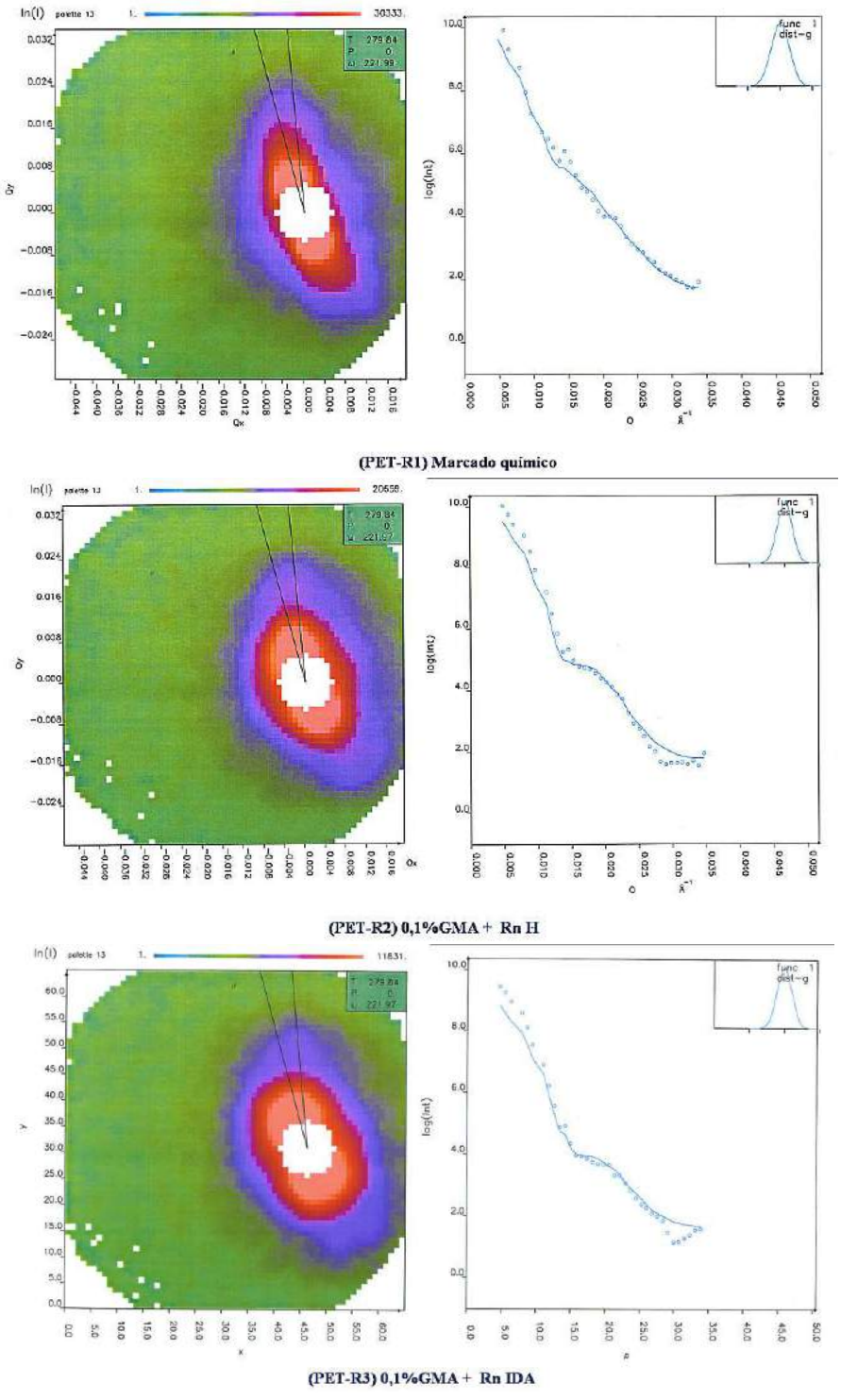


Figura 5.17 – Resultados obtenidos por SANS para las muestras de PET bombardeadas con Kr, que fueron sometidas a distintos tratamientos posteriores al injerto con GMA.

Denominación Muestra	GMA (% v/v)	Radio (nm)	Masa incorporada (g)	% GI	Descripción
PET-R1	0	0	0	**0**	Marcado químico
PET-R2	0,1	2,7	$2{,}1.10^{-4}$	**0,68**	Injerto + Hidrólisis ácida
PET-R2 (duplicado)	0,1	3,2	$2{,}3.10^{-4}$	**0,74**	
PET-R3	0,1	5,1	$3{,}9.10^{-4}$	**1,26**	Injerto + IDA
PET-R3 (duplicado)	0,1	2,6	$1{,}8.10^{-4}$	**0,58**	

Tabla 5.4 – Parámetros obtenidos por SANS para PET en la determinación del GI%

PET-R1 es 597,64 cm^2. Entonces la **superficie total a cubrir por el injerto** es de 615 cm^2. Las áreas obtenidas en (i) y (ii) representan juntas aproximadamente un 3% del valor obtenido para (iii), y podrían despreciarse en los cálculos.

Según los cálculos realizados teóricamente se incorporan entre 0,2 mg y 0,4 mg de GMA en el proceso de injerto. Estos valores son comparables a los determinados en la Tabla 5.2. Aunque se encuentran en el orden de error de la balanza analítica utilizada para la obtención del grado de injerto por gravimetría.

Considerando un valor promedio en peso de 31 mg para una lámina de las dimensiones trabajadas, el grado de injerto esperado teórico es de 0,64%, el GI% obtenido considerando todas las muestras (incluyendo duplicados) es de 0,9871 (SD ± 0,3211; n=7). En la Tabla 5.4 se ejemplifica con 4 de las 7 muestras trabajadas.

Análisis ATR-IR

En el análisis por espectroscopía de IR, se realizaron los espectros ATR de PET-R1 (B), PET-R2 (C) y PET-R3 (D). Dado que las diferencias son muy pequeñas, se realizaron espectros diferencia. En la Figura 5.18 se pueden visualizar, en los espectros diferencia (C)-(B) y (D)-(B), las señales características de los grupos carbonilo del GMA (a 1720 cm^{-1}) y del IDA (1690 cm^{-1}). En el espectro (D) se observa la desaparición de la señal correspondiente al grupo epóxido (908 cm^{-1}) presente en (C) (denotada con una flecha).

Cuantificación del metal

No se pudo detectar Cu(II) o Ni(II) después de la re-extracción con la solución de EDTA. Cálculos teóricos de las cantidades esperadas según el grado de injerto y consideraciones sobre el rendimiento de reacción de IDA señalan que se encuentran por debajo del límite de detección de este método

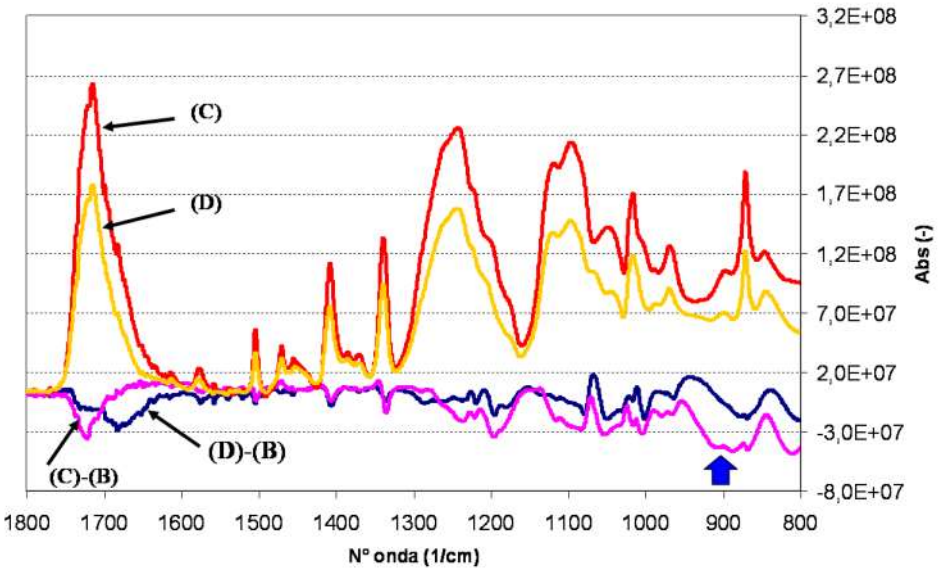


Figura 5.18 – Espectros ATR de (C) PET con injerto; (D) PET con injerto de IDA. Espectros diferenciales de (C) y (D) con respecto a (B) PET marcado.

Muestra	Diámetro de poro calculado por SANS (nm)	Diámetro de poro calculado por SEM (nm)
PET-R1	**61**	**64** (SD 7,6; n=14)
PET-R2	**55**	**54** (SD 5,9; n=15)
PET-R3	**56**	**52** (SD 5,7; n=19)

Tabla 5.5 – Tabla comparativa de los diámetros de poro obtenidos por SANS y SEM para las láminas de PET modificadas.

5.4. Conclusión

Láminas de PET fueron irradiadas con iones pesados acelerados y marcadas químicamente para lograr membranas de diámetro de poro en el orden de los 60 nm. Estas láminas de PET fueron injertadas con GMA por la técnica de injerto en simultáneo iniciada por radiación gamma. El diámetro de poro se midió por dos técnicas diferentes, imágenes SEM y análisis por SANS. Ambos métodos dan resultados similares como se muestra en la tabla comparativa (Tabla 5.5). Estos resultados junto con la microfotografía electrónica (Figura 5.14) donde se observa la naturaleza interna de los poros, indican que los poros serían de geometría cilíndrica. Sin embargo, para demostrar que el interior de los poros tiene esta configuración se debería realizar la técnica de réplica.

Los diámetros de poro se redujeron en el orden de los 6-10 nm después del injerto con GMA. Además se mantuvieron constantes después de la derivatización química con IDA,

como era lo esperable. Por SANS se estimó un GI% de 1 % y el rendimiento experimental en el injerto por gravimetría entre 0,6-0,7 %. En cuanto las determinaciones gravimétricas y al grado de injerto obtenidos, si bien ésta determinación se encuentra en el límite de su sensibilidad, coinciden con los valores de GI% calculados a partir de las determinaciones directas sobre las micrografías SEM.

La espectroscopía ATR-IR permitió determinar la modificación con poliGMA y la incorporación de IDA. La modificación con IDA no ha podido ser detectada por quelación de iones.

Referencias

[1] Nikezic D. and Yub K. N. Formation and growth of tracks in nuclear track materials. *Materials Science and Engineering R.*, 46:51–123, 2004.

[2] Young D. A. Etching of radiation damage in lithium fluoride. *Nature*, 182:375–377, 1958.

[3] Durrani S. A. Invited talk. nuclear tracks: A success story of the 20th century. *Radiation Measurements*, 34:5–13, 2001.

[4] Ilic R., Skvarc J., and Golovchenko A. N. Nuclear tracks: present and future perspectives. *Radiation Measurements*, 36:83–88, 2003.

[5] Price P. B. Science and technology with nuclear tracks in solids. *Radiation Measurements*, 40:146–159, 2005.

[6] Apel P. Swift ion effects in polymers: industrial applications. *NIMB*, 208:11–20, 2003.

[7] Clough R. L. High-energy radiation and polymers: A review of commercial processes and emerging applications. *NIMB: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 185(1-4):8–33, 2001.

[8] Pépy G. and Kuklin A. An orientation process to study nuclear membranes by small angle neutron scattering. *NIMB: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 185:198–203, 2001.

[9] Grasselli M. and Betz N. Making porous membranes by chemical etching of heavy-ion tracks in b-pvdf films. *NIMB*, 236:501–507, 2005.

[10] Omichi H., Yoshida M., Asano M., Nagaoka N., Kubota H., Kayakai R., Spohr R., Reber N., Wolf A., Alder G. M., Ang V., Bashford C. L., and Pasternak C. A. Application of ion beams to synthesis of environmentally responsive track membranes. *NIMB: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 131:350–356, 1997.

[11] Kopniczky J. *Nanoestructures Studied by Atomic Force Microscopy. Ions Tracks and Nanotextured films.* PhD thesis, Facultaty of Science and Technology, Uppsala, 2003.

[12] Betz N. *Etude des Effets d'Irradiations et du Radiogreffage, Induits dans le Polyfluorure de Vinylidène, par des Ions Lourds Rapides.* PhD thesis, These de Doctorat de l' Universite Pierre et Marie Curie (Paris VI) Spécialité: Chimie-Physique, 1992.

[13] Chadderton L. T., Montagu-Pollock H. M., and Torrens I. McC. Track in fission-fragment-bombarded lead iodide. *Journal of Applied Physics*, 34:3090–3094, 1963.

[14] De Cicco H., Saint-Martin G., Alurralde M., Bernaola O. A., and Filevich A. Ion tracks in an organic material: Application of the liquid drop model. *NIMB*, 173:455–462, 2001.

[15] Trautmann C. Observation and chemical treatment of heavy-ion tracks in polymers. *NIMB*, 105:81–85, 1995.

[16] Fink D., Ghosh S., Klett R., Dwivedi K. K., Kobayashi Y., Hirata K., Vacik J., Hnatowicz V., Cervena J., and Chadderton L. T. Transport processes during the incubation time of ion track etching in polymers. *NIMB*, 146:486–490, 1998.

[17] Tripathy S. P., Mishra R., Dwivedi K. K., Khathing D. T., Ghosh S., and Fink D. Proton dose-dependent modification in track etching response in some polymers. *Radiation Measurements*, 36:107–110, 2003.

[18] Mishra R., Tripathy S. P., Dwivedi K. K., Khathing D. T., Ghosh S., Muller M., and Fink D. Modification in etching characteristics and surface topography of some electron irradiated polymers. *Radiation Measurements*, 34:95–98, 2001.

[19] Fromm M., Meyer P., and Chambaudet A. Ion track etching in isotropic polymers: etched track shape and detection efficiency. *NIMB*, 107:337–343, 1996.

[20] Mazzei R. The relationship between tracks in solid nuclear track detectors (ssntd) and the submicroscopic kinetic theory. *Radiat. Meas.*, 26:577–583, 1996.

[21] Betz N. Ion track grafting. *NIMB*, 105:55–62, 1995.

[22] Mazzei R., Smolko E., Tadey D., and Gizzi L. Radiation grafting of nipaam on pvdf nuclear track membranes. *NIMB*, 170:419–426, 2000.

[23] Mazzei R., Smolko E., Torres A., Tadey D., Rocco C., Gizzi L., and Strangis S. Radiation grafting studies of acrylic acid onto cellulose triacetate membranes. *Radiation Physics and Chemistry*, 64:149–160, 2002.

[24] Mazzei R., Garcia Bermúdez G., Betz N., and Cabanillas E. Swift heavy ion induced graft polymerization in track etched membranes' submicroscopic pores. *NIMB*, 226:575–584, 2004.

[25] Mazzei R., Garcia Bermúdez G., Chappa V.C., del Grosso M.F., and Fernández A. Grafting on nuclear tracks using the actives sites than remain after the etching process. *NIMB*, 251:99–103, 2006.

[26] Nasef Mohamed Mahmoud and Hegazy El-Sayed Ahmed. Preparation and applications of ion exchange membranes by radiation-induced graft copolymerization of polar monomers onto non-polar films. *Progress in Polymer Science*, 29:499–561, 2004.

[27] Shirkova V. V., Orelovich O. I., Chihacheva L. P., Budris S. V., Evtushenko A. M., and Zubov V. P. Graft polymerization into the latent tracks of some perfluoropolymers films irradiated by heavy ions. *Radiation Measurements*, 34:61–64, 2001.

[28] Calo J. M. and Hall P. J. The application of small angle scattering techniques to porosity characterization in carbons. *Carbon*, 42:1299–1304, 2004.

[29] International Atomic Energy Agency (IAEA). *Small angle neutron scattering*, TECDOC-1486, Vienna, 2006.

[30] Shibayama M., Jnai H., and Hashimoto T. *Experimental methods in polymer science*, chapter 2: Neutron Scattering, page 57. T. Takana, Academic Press, 2000.

Parte III

Derivatización y Aplicaciones

Capítulo 6

Estudio de los compuestos arseniacales: Síntesis y caracterización

6.1. Ligandos Arseniacales

6.1.1. Introducción

Desde su descubrimiento en 1250 por Albertus Magnus, el arsénico ha tenido una historia colorida. Como veneno, posee un amplio espectro de efectos adversos sobre la salud humana, y hasta hace pocos años poseía la fama de ser la causa de muerte de un personaje notable como Napoleón Bonaparte. Es uno de los metaloides tóxicos más prevalentes en el medio ambiente. Se encuentra ampliamente distribuido en toda la corteza terrestre en fuentes de agua subterránea debido a la disolución de minerales, erosión de rocas, y actividad ígnea. Deriva de fuentes geoquímicas como rocas y minerales (en forma insoluble) y también de fuentes antropogénicas como los efluentes industriales y actividades mineras. Comercialmente se utiliza por ejemplo, en aleación y agentes conservantes de madera [1, 2]. Las especies de arsénico orgánico, abundante en pescados y mariscos, son menos nocivas para la salud humana y más fácilmente eliminadas por el organismo que las especies inorgánicas. Los efectos debido a cantidades acumulativas de arsénico por exposiciones prologadas se asocian con cáncer de piel, pulmón, vejiga y riñón [3].

Las propiedades tóxicas de arsénico han sido explotadas en la producción de herbicidas y plaguicidas. Un poco menos conocido es el hecho de que los primeros agentes antimicrobianos sintetizados específicamente para el tratamiento de enfermedades infecciosas fueran compuestos arsenicales orgánicos. Paul Ehrlich ganó el Premio Nobel en 1908 por la síntesis del Salvarsan (clorhidrato de dioxidiamidoarsenobenzol o arsefenamina) desarrollado para el tratamiento de la sífilis y de la enfermedad del sueño. Para el tratamiento de algunas enfermedades causadas por parásitos, como tripanosomiasis y leishmaniasis, los derivados orgánicos de arsénico (Melarsoprol, comercialmente Arsobal® para *Tripanosoma brucei gambiense* y *T.b. rhodosiense*) y los relacionados con antimonio aún siguen siendo elegidos como fármacos (Figura 6.1) [4, 5]. Posee dos estados de oxidación, As (V) y As (III), biológicamente importantes. Comúnmente se distribuye como ácido tetraoxoarsénico (ó ácido ortoarsénico, H_3AsO_4), ácido arsenioso (ácido ortoarsenioso, H_3AsO_3), y trióxido de arsénico (As_2O_3). Las formas reactivas de estos compuestos inorgánicos en solución varían en función del pH. Por ejemplo, a pH neutro, el ácido arsénico existe como ión arseniato AsO_4^{3-}, mientras que el ácido arsenioso se encuentra principalmente en su forma neutra $As(OH)_3$. Otro aspecto de la química del arsénico pertinente a la actividad biológica

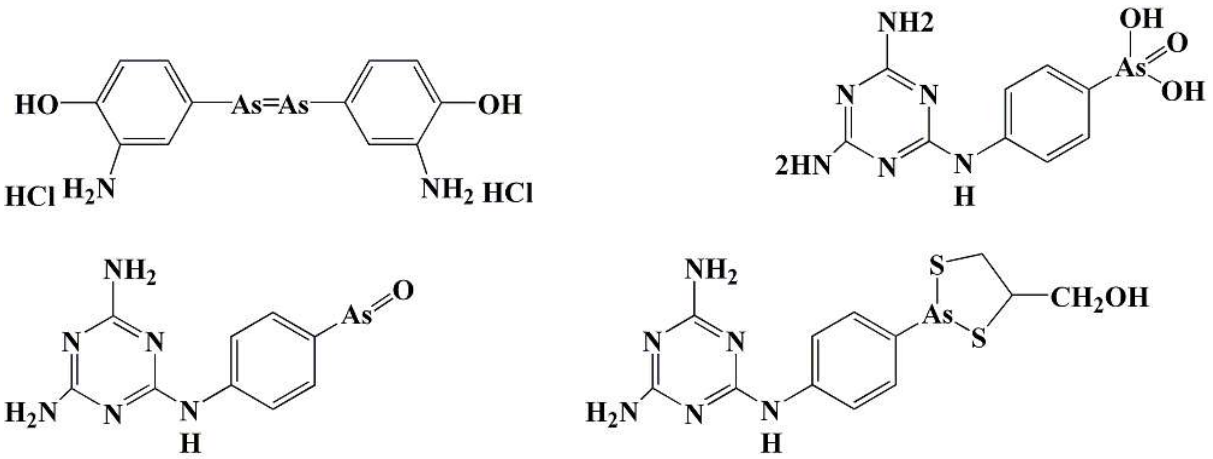


Figura 6.1 – Compuestos arseniacales orgánicos comerciales. *Salvarsan, Melarsen, Melarsenóxido y Melarsoprol (nombrados de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo).*

es la reactividad de As (III), ya que forma enlaces con grupos funcionales como los tiolatos de las cisteínas y los nitrógenos imidazol de los residuos de histidina [6].

Es conocido que las especies trivalentes son químicamente mas reactivas que las especies pentavalentes, y unen proteínas como tubulina y actina [7], proteína arsR [8], receptores de nicotina [9], metalotioneina humana [10], galectina-1 [11], tioredoxin peroxidasa II [12], tioredoxina y disulfuro isomerasa [13] y receptores de glucocorticoides, entre otros.

Los metaloides tienen propiedades metálicas y no metálicas. La toxicidad del arsénico se debe principalmente a que el As (III) actúa como un metal, formando enlaces metal-tiol con cisteínas vecinales, pudiendo provocar la inhibición de enzimas como la piruvato deshidrogenasa [14]. De hecho, la inhibición de la actividad enzimática por causa de arsenitos es usada en el diagnóstico de presencia/ausencia de residuos cisteína vecinales [13, 15]. Diferentes compuestos arseniacales han sido evaluados para su uso como sondas, para estudiar procesos bioquímicos y biofísicos *in vitro* e *in vivo* [16]. Ampliando el concepto, han sido propuestos como sondas en la caracterización de la naturaleza de la interacción en receptores neuronales [17], en la caracterización de dinámicas de unión a proteínas citosólicas y procesos de metilación del As [18], en la búsqueda de inhibidores o "antídotos" de la acción tóxica [19], en el modelado y determinación de estructura terciaria de proteínas [20], en el estudio del modelo de acción de drogas arseniacales en células tumorales [21]. También se han incorporado derivados de As (III) y As (V) a soportes cromatográficos [22, 23] y se han utilizado para separar, identificar y caracterizar proteínas con afinidad a arsénico [7, 12, 21, 24, 25].

La interacción de grupos sulfhidrilos de proteínas con fenilarsenóxido (PAO) y otros arilarsenóxidos estructuralmente relacionados ha sido empleada para estudiar la modificación de un amplio rango de efectos biológicos tales como reacciones enzimáticas y procesos de transporte [15, 26, 27, 28]. Una de las hipótesis del mecanismo de reacción de PAO involucra la formación de aductos 1,3,2-ditioarsenanos con dos tioles funcionales conve-

nientemente espaciados. La especificidad y selectividad estructural de esta modificación aun es objeto de estudio, la reactividad a través de proteínas con ditioles ha sido probada y caracterizada con análogos radiomarcados tal como el 4-[^{125}I] iodo-PAO [15]. En el trabajo de Kussmann fue usada como modelo una Trx para examinar la selectividad estructural del *p*-aminofenilarsenóxido (APAO) a través de grupos tioles llegando a la conclusión de que los aductos ditiarsenanos intramoleculares estables se dan por medio de dos cisteínas estructuralmente vecinales [28].

Hoffman y Lane proponen una teoría donde se postula que los tioles cercanos en la cadena primaria de aminoácidos forman ciclos al interaccionar con As(III) [15]. Otra teoría propuesta es la formación de un sitio de coordinación piramidal trigonal AsS_3 entre los grupos tioles de tres cisteínas con el As (III). Estos tres residuos de cisteína pueden estar cercanos en la secuencia primaria aminoacídica ó estar distantes el uno del otro en la secuencia primaria y al plegarse la proteína, quedan espacialmente cercanos a fin de que puedan interactuar con el As (III), y formar la unión metal-tiol [29, 30]. Ambas teorías son válidas.

El APAO inmovilizado sobre agarosa, para purificación por afinidad ha sido usado en la identificación de proteínas de unión a arsénico (III) en células de cáncer de mama [12], sistema que fue desarrollado originalmente para aislar compuestos con tioles [22]. Se han aislado al menos 50 proteínas con potencial de unión a arsénico en líneas celulares de cáncer de mama utilizando una sonda de APAO conjugado con biotina [21].

Algunos agentes quelantes son utilizados farmacológicamente en tratamientos de la toxicidad a metales (como arsénico, mercurio, plomo o cadmio), aunque dependiendo de la dosis también pueden resultar tóxicos. Entre ellos se encuentran, por ejemplo, los ditioles sintéticos 2,3-dimercaptopropanosulfato de sodio (DMPS) y el ácido *meso*-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) [31]. Estas son moléculas que se unen estrechamente a los metales en una estructura de tipo anillo, con constantes de estabilidad elevadas [32].

Estudios con péptidos sintéticos conjugados con fenilarsenoxido mostraron que el arsénico se une a las cisteínas y que la unión depende del número, accesibilidad, y posición relativa de los residuos [33].

En literatura se describe al compuesto arseniacal *p*-[bis-(*β*-hidroxietilmercapto)-arsino]-anilina (PBMA) como la forma activa de un ligando cromatográfico capaz de interaccionar con proteínas que contiengan al menos dos tioles cercanos espacialmente [14, 34]. El APAO es un precursor comercial del PBMA, sin embargo fue discontinuada su comercialización. No se encontraron antecedentes bibliográficos de la síntesis de PBMA a partir del ácido arsanílico (APAV).

En este capítulo se describe la obtención y caracterización de APAO y PBMA con estado de oxidación trivalente, así como el estudio de sus reactividades frente a distintas moléculas con tioles libres por medio de HPLC y métodos colorimétricos.

6.2. Materiales y Métodos

6.2.1. Reacción de síntesis del APAO

El APAV (10,9 g) es agregado a una solución conteniendo 30 ml de metanol, 24 ml de HCl, y 100 mg de yoduro de potasio. El dióxido de azufre es burbujeado a la solución en agitación por 30 minutos, produciéndose la precipitación de *p*-aminofenildicloroarsina-HCl (APACl). La solución es enfriada en baño de hielo y el precipitado es colectado y lavado con dietil éter. La dicloroarsina es disuelta en 200 ml de hidróxido de amonio al 10 %. Después de 15 minutos de agitación, el APAO comienza a precipitar y la solución es enfriada en baño de agua hielo. Se colecta por filtración, es lavado con dietiléter y secado bajo vacío sobre NaOH.

6.2.2. Reacción de síntesis del PBMA

Se mezcla APAV (1 gramo) en metanol (10 ml) con β-ME (2,5 ml; 14,3 M) y se incuba a temperatura ambiente en agitación hasta disolución total. Luego se evapora el metanol mediante burbujeo de N_2 y 60 °C ó con rotavapor a 60 °C. La extracción del β-ME remanente se realiza mediante lavados en frío con agua carbonatada (0,1 M $NaHCO_3$, pH 8). El precipitado se recupera por solubilización en acetona y posterior evaporación.

6.2.3. Determinación de Punto de Fusión

En tubo de *Thiele* y en aparato Tomas Hoover, Uni-Melt. Con capilares de vidrio sellados conteniendo de 1 a 2 mm de muestra empacada.

6.2.4. Análisis por cromatografía en capa fina (TLC)

El análisis por TLC, se realiza en cromatofolios de sílica gel F254 con base de aluminio (Merck). La siembra es estandarizada en 2 μl de mezcla de compuesto en el punto de siembra. Se visualiza por exposición al UV y se revelan los grupos amino con Ninhidrina.

6.2.5. Análisis por HPLC

Se utiliza un cromatógrafo Spectra System P1000. Detector Millipore® Waters. Lambda-Max. Model 481. LC Spectrophotometer.

Separación en gradiente

Columna Kromasil 100 RPC-18 (de 5 μm diámetro de partícula; 15 x 0,46 cm. TEKNOCROMA).

Volumen de siembra de 10 μl. Flujo: 1 ml/min. Longitud de onda del detector UV-V: 254 nm. Disolución de las muestras en agua bidestilada. Gradiente de separación: 0 %

Acetonitrilo (AcN) a 40 % AcN en 20 minutos. Se restituyen las condiciones iniciales con un gradiente de 40 % AcN a 0 % AcN en 5 minutos.

Condiciones de separación isocráticas

Columna: Luna 5 C18(2). Tamaño 250 x 4,60 mm (Phenomenex). Diámetro poro 100 ± 10 Å. Longitud de onda detector: 254 nm. Temperatura 24 °C. Flujo: 1 ml/min. *Loop* de inyección: 100 μl. Solvente: 30 % AcN: 70 % agua.

Soluciones patrón de compuestos arseniacales: APAV 100 mM (agua destilada llevando con NaOH 0,1 N a pH 8-9, hasta disolución total); APAO 10 mM (disolución a pH 12); PBMA 10 mM (disolución a pH 12). La concentración de trabajo final en el tubo de reacción es de 83,3 μM.

Soluciones patrón en concentración 100 mM de BAL ($C_3H_8OS_2$; PM 124,23; δ: 1,25 g/ml), β-ME (C_2H_6OS; 14.3 M), DTT ($C_4H_{10}O_2S_2$), EDA ($C_2H_8N_2$), MEA (C_2H_7ON), Gli ($C_2H_5O_2N$), Glicerol (GliOH). A partir de las soluciones patrón se preparan mezclas con relaciones molares a As(III) ó a As(V) en (1:1), (1:2), (1:4), (2:1), (4:1) y (8:1). Para β-ME y moléculas similares, se utiliza el doble de concentración ya que la relación es por lo menos dos a uno con respecto a moles de As(III).

6.2.6. Caracterización espectroscópica

FT-IR

Espectrómetro IMPACT 410 - Nicolet. FT-IR System; 512 acumulaciones. Manipulación de la muestra: Técnica de pastillaje con BrK: 300 mg BrK más 1 ó 2 mg de muestra sólida. Empastillado en prensa 5 a 10 minutos al vacío, luego otros 10-15 minutos bajo presión (10-12 ton).

Espectrometría UV

Espectrofotómetro Shimatzu UV-1603 (Rango: 400 nm -200 nm). Temperatura ambiente.

Barrido Espectral: Se realizan los barridos espectrales de las especies arseniacales APAO, APACl y APAV en medio ácido (HCl 0,1 N) a diferentes concentraciones. También mediante espectros se observa el comportamiento de estos compuestos frente DTT y β-ME en medio ácido (HCl 0,1 N), medio alcalino (NaOH 0,1 N) y buffer fosfatos (Tris-HCl 50 mM, pH 9,1) en diferentes concentraciones.

Cinética de reacción del APAO con DTT: Para estudiar la cinética de reacción entre el APAO y el DTT, se mezclan en relación molar 1:1 y sobre la misma muestra se determinan los espectros de absorción a diferentes tiempos. Concentraciones de trabajo en APAO y DTT de 50 μM. Todas las muestras contienen DMSO 0,15 %.

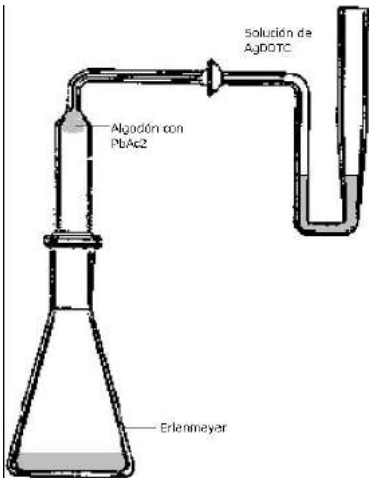
Cuantificación del ligando libre

Mineralización: Las muestras para la determinación de arsénico y sulfuros son digeridas en tubos de borosilicato (16 cm x 1 cm diámetro) en un bloque de aluminio con temperatura controlada. Primero se evapora el agua a 120-130 °C, luego se lleva hasta 210 °C por 3 hs.

Mezcla de digestión: 0,1060 g de ortovanadato de sodio (VO_4Na_3) disueltos en 65 ml de ácido nítrico (HNO_3) concentrado; se añaden 75 ml de ácido perclórico ($HClO_4$) concentrado y sobre esta mezcla, se añaden 0,4706 g de dicromato de potasio ($Cr_2O_6K_2$) disueltos en 16,75 ml de agua desionizada [35].

Arsénico total: Se determina arsénico total por medio de la detección de un compuesto coloreado (con un máximo de absorción en 538 nm) de dietilditiocarbamato de plata (AgDDTC) complejado con la arsina liberada de la muestra mineralizada.

Procedimiento: En el erlenmeyer del sistema colocar la muestra, 40 ml de agua destilada, 10 ml de solución de $SnCl_2$ en ácido clorhídrico concentrado (0,33 % p/v), 5 ml de solución de KI (15 % p/v) y 1 ml de solución de $CuSO_4$ (2 % p/v). Esta mezcla se deja reposar unos 15 minutos hasta total reducción del As(V) a As(III). Se añade luego, aproximadamente 1 g de Zn en polvo y se cierra el equipo por 60 minutos. Previamente, en el tubo de adsorción se colocan 3 ml de la solución de AgDDTC (0,5 % en piridina). Para una muestra de 5 μg de As, la exactitud del método es de 2,5 %. El límite de demostración estadístico se aproxima a 0,2 μg de As.



Es conveniente colocar a la salida del erlenmeyer, previo al sistema de AgDTTC, un algodón embebido en Ac_2Pb (10 % p/v) para retener trazas de SH_2. Interferente: SbH_3. Control positivo: talco con trióxido de arsénico.

Adaptación del método de Fiske-Subbarow: Se adapta el ensayo de determinación de fósforo para determinación de arsénico [22]. El fosfato inorgánico reacciona en medio ácido con el amonio molibdato. El complejo formado de fosfomolibdato absorbe luz a 340 nm [36]. Linealidad hasta 160 mg/L. Sensibilidad en espectrofotómetro: 0,2 mg/L.

Adaptación del método de Ellman: Otra estrategia consiste en determinar la cantidad de As disponible por medio de la reacción de complejación de los compuestos de As(III) con una cantidad conocida de DTT. Posteriormente se determina la cantidad de DTT libre a través de la reacción de Ellman [37, 38, 39].

El color amarillo intenso del anión NTB puede ser cuantificado mediante medida de la absorbancia a 425 nm (ϵ_{NTB}: 12.400 $M^{-1}cm^{-1}$). El rango de detección es de 8 μM a 48,3 μM de NTB.

Determinación del parámetro termodinámico Kd

La unión de APA(III) a ditioles es determinada mediante la titulación de tioles remanentes por medio del ensayo de DTNB, incubando concentraciones crecientes de APA(III) con una concentración constante de ditiol.

El cálculo de la constante de disociación (Kd) para la unión de APA(III) a tioles se realiza en base a los trabajos de Donoghue [13] y Hogg [40].

Procedimiento: Se utiliza el ensayo en microplacas de 96 pocillos. La mezcla de tioles y APA(III) se incuba 10 minutos a temperatura en agitación (volumen 195 μl) y luego se añade el DTNB (5 μl de una solución madre 15 mg/ml en DMSO) y se incuban otros 10 minutos en agitación. Se lee a 412 nm en lector de microplacas. El coeficiente de extinción del TNB a 412 nm y pH 7 es 14.150 $M^{-1}cm^{-1}$.

Solución de tioles (BAL, DTT, β-ME): 500 mM en buffer 0,1 M Hepes; 0,3 M NaCl; 1 mM EDTA (pHs: 6; 7 u 8). Concentración de trabajo: 50 μM.

La concentración del complejo APA(III)-ditiol (SI) se encuentra en función de la concentración total de APA(III) y es descripta mediante la siguiente ecuación:

$$[SI] = 0,5^*\{([S]_T + x[I]_T + Kd) - (([S]_T + x[I]_T + Kd)^2 - 4[S]_T x[I]_T)^*0,5\} \qquad (6.1)$$

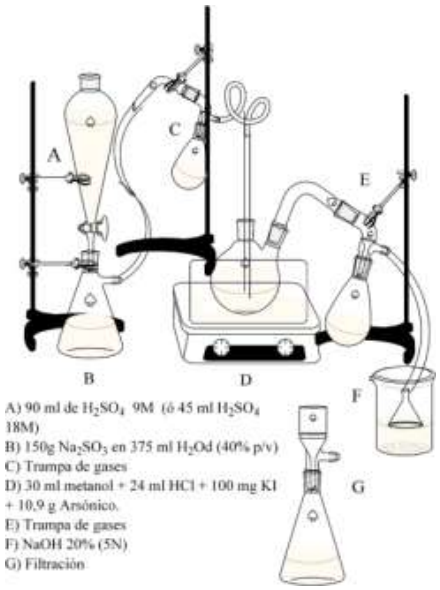
Donde x es un factor de ajuste; [SI] es la concentración molar del complejo; $[I]_T$ es la concentración inicial total del compuesto arseniacal, $[S]_T$ es la concentración inicial del compuesto a ensayar [40].

Los datos son ajustados mediante una regresión no lineal con **Kd** y **x** como los parámetros desconocidos por medio de herramientas Solver y Macros realizadas bajo el entorno de Excel (Microsoft®).

6.3. Resultados y Discusión

6.3.1. Síntesis del APAO

Dado que sólo se consigue comercialmente el derivado APAV, el APAO se sintetizó en el laboratorio. Se prosiguió según la técnica descrita por Stevenson con algunas modificaciones al protocolo original [14]. En la Figura 6.2 se muestra un esquema del sistema de síntesis. El SO_2 se preparó *in situ* por reacción entre Na_2SO_3 (aproximadamente 100 g, 40%p/v en agua) y H_2SO_4 concentrado (30 ml; se generan aproximadamente 1,26 moles de SO_2 ó 28,22 L). La reacción del gas se realiza en kitasato (B), al cual se le conecta una ampolla de decantación conteniendo el H_2SO_4 (A). Cuando el precipitado aparece es masivo, de color amarillo pálido-crema (D). El filtrado se realiza en un embudo de septo de vidrio.



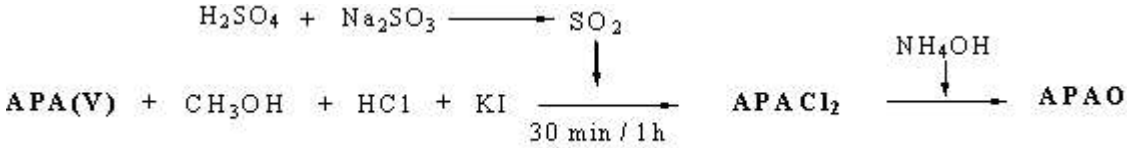


Figura 6.2 – Sistema de Síntesis.

Luego del lavado con éter, se disuelve el producto en NH_4OH. En frío se enturbia y comienza a precipitar. Se separa el producto en *butchner* (G).

El rendimiento obtenido del 33 % fue menor al esperado. Según Stevenson se obtiene un rendimiento del 66 % [14]. Se observan cristales en forma de agujas concéntricas en ramilletes, alargados de 2 a 3 mm de largo.

6.3.2. Síntesis de PBMA

Teniendo como base la preparación del antiparasitante *Filaricide* (ó *p*-[bis-(carboximetilmercapto)-arsino]-benzamida), el cual se obtiene mediante una reacción de condensación entre *p*-arsenosobenzamida y el ácido tioglicólico se propone la reacción de síntesis del PBMA [41]. Se desarrolló un camino sintético sencillo para la obtención del PBMA en ambiente reductor a partir de la reacción en un paso de APAV con exceso de β-ME. El β-ME produce por medio de una reducción y sustitución simultáneas la reducción de As(V) a As(III) (Figura 6.3). El rendimiento de la reacción de síntesis fue del 68 %.

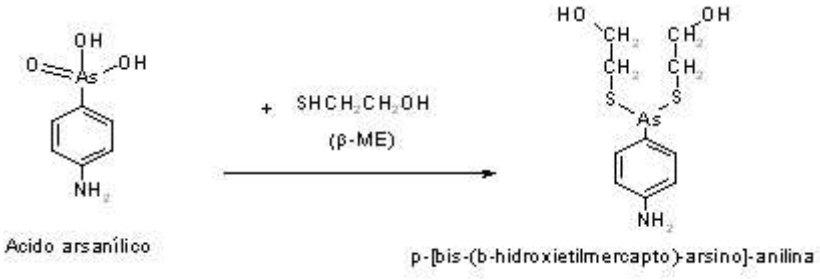


Figura 6.3 – Reacción de síntesis del ligando PBMA.

6.3.3. Caracterización fisicoquímica

En la siguiente Tabla (Tabla 6.1) se presentan los resultados obtenidos en la caracterización de los ligandos arseniacales: APAV (precursor), APAO, PBMA y el intermediario estable APACl.

Propiedades generales	**APA**	**APAO**	**APACl**	**PBMA**
Estado de oxidación	V	III	III	III
pK_a teórico anilina	4,63	4,63	4,63	4,63
pK_{a1}, pK_{a2} y pK_{a3} referencia (As inorgánico)	2,2; 6,9; 11,5	9,3; 14,2; 19,2	—	—
Punto de fusión	158-162 °C con ablandamiento a 40 °C	Ablandamiento 150°C. Cambio de coloración de ámbar a negro violáceo a 210 °C.	Ablandamiento a 115-116 °C. Fusión a 117-119 °C. Color ámbar.	Ablandamiento a 50 °C; sublimación parcial entre 146-148 °C. Cambios en la estructura cristalina
Estado de la materia	Sólido, polvo blanco cristalino	Sólido, polvo con tonalidad ámbar	Sólido, polvo blanco jabonoso	Líquido viscoso, de color ámbar cristalino
PM	217,05	183,04	237,94	321,29
Máximo de absorción al UV (en HCl 0,1N)	261 nm	233 nm	233 nm	nd
ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$) en HCl 0,1N	3760	2840	2840	nd
Solubilidad en agua	>20 mg/ml (>90 mM)	<1 mg/ml (<5,5 mM)	>20 mg/ml (>70 mM)	
Solubilidad en otros solventes	s. en agua caliente; p.s. en agua fría, alcohol y ácido acético; i.s. en acetona			s. en metanol, en acetona; p.s. en agua (25°C) e i.s en agua fría.

Tabla 6.1 – Características generales de los compuestos arseniacales. *Donde nd indica no determinado; s., soluble; p.s., poco soluble; i.s., insoluble. Otros APAO: fuerte tendencia a oxidarse a (V), fotosensible.*

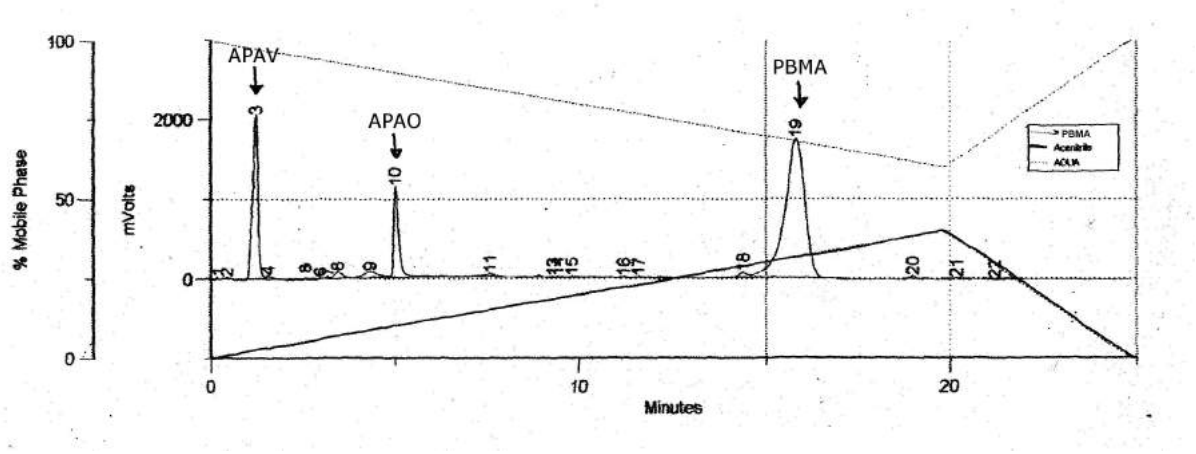


Figura 6.4 – Cromatograma HPLC en gradiente de la mezcla de reacción de síntesis de PBMA.

Caracterización por TLC

Se evaluaron distintos sistemas de solventes en polaridad creciente. Entre ellos mezclas de éter de petróleo: acetato de etilo en proporciones en volumen de (9:1); (3:1); (3:2); (1:1); (2:8), obteniéndose una separación deficiente (Rf de 0 ó de 1) entre los componentes a separar (PBMA, APAO; APAV). Con el sistema diclorometano:metanol (Cl_2CH_2: CH_3OH) en proporción (85:15) se obtuvo poca separación con Rf $_{(\text{APAO, PBMA, APACl})}$ de 0,3 y $Rf_{(\text{APAV})}$ de 0.

La mezcla Cl_2CH_3:MeOH (95:5) resultó ser la óptima para la separación de APA(V) y APA(III). Con el agregado de trietilamina (TEA) (una gota cada 3 ml de solvente) para anular las cargas, se mejoró la resolución. Aunque no se encontró un sistema en TLC que pueda separar APAO de APACl con buena resolución. Se obtuvieron $Rf_{(\text{APAO, PBMA, APACl})}$ de 0,5 y $Rf_{(\text{APAV})}$ de 0.

Resulta de interés también caracterizar el intermediario de síntesis APACl ya que pareciera ser más estable que el APAO, teniendo al Cl^- como un buen grupo nucleófilo para la reacción de sustitución que además no presentaría tautomería cetoenólica.

Análisis por HPLC

En el análisis HPLC-RP con gradiente se logró resolver los productos de reacción de la síntesis del PBMA a partir de APAV. Del análisis del cromatograma de una mezcla de reacción APAV + β-ME (Figura 6.4), se obtuvieron tres picos relevantes, uno de los cuales coincide con el APAV, mientras que los otros dos picos no tuvieron ninguna correspondencia con los reactivos utilizados durante la síntesis. Se propone, en base a los tiempos de retención obtenidos, que el pico mayoritario corresponde al PBMA (70 %) y el pico restante a APAO (10 %). En menor grado, también se observó la presencia de β-ME.

Esta asignación, a partir de los tiempos de retención, fue confirmada con los resultados obtenidos en el estudio por HPLC-MS y espectros de MS de cada pico cromatográfico. En la

Picos	Posible Asignación
P1	Anilina (93)
P2	APAO (183); Anilina (93)
P3	β-ME (78)
P4a	Fragmentos PBMA
P4b	PBMA (321) → (643): ¿dímeros? ¿aductos?

Tabla 6.2 – Asignación de especies de los picos característicos del HPLC-MS.

Figura 6.5 se muestra el cromatograma obtenido por detección UV (Figura 6.5 - superior) y de iones totales (Figura 6.5 - inferior). También se encuentran señalizados los lugares donde se tomaron los MS que se muestran en la Figura 6.6. A partir de los resultados observados en los espectros MS de esta figura se asignan las estructuras posibles que se resumen en la Tabla 6.2.

En cuanto a la evaluación de la reacción de síntesis de APAO, no se pudo establecer el grado de pureza porque la mezcla de APAO:APACl no ha podido ser resuelta bajo ninguna de las condiciones ensayadas. Se observó que el pico mayoritario posee el 91 % de las áreas relativas mientras que el 9 % restante se asigna a APAV. En cuanto a APACl el rendimiento en ese paso de reacción es del 90 % y el 10 % restante se asigna a APAV.

Tampoco se pudo resolver los picos cromatográficos correspondientes a APAO y APACl en columna analítica de Cianopropil (CN). La resolución fue mas baja que en las condiciones previamente ensayadas con la C-18.

Caracterización espectroscópica

Resonancia magnética nuclear (RMN):

RMN ^{1}H: 1) Desplazamiento químico (δ_H) según corresponde a los distintos H (asignados en Figura 6.7 y Tabla 6.3); y 2) Análisis cuantitativo e integración (presentados en Tabla 6.4).

Observación: La señal correspondiente a los protones del metileno adyacente al grupo -OH ($\delta_H = 3{,}5$; no incluída en Tabla 6.3) está saturada, esto puede deberse a la contribución del -CH_3 del metanol usado como solvente.

RMN ^{13}C: Asignación del Desplazamiento químico (δ_C) de la Figura 6.8 en Tabla 6.5.

Se denomina arbitrariamente C-1 al carbono conteniendo al grupo amino; a los carbonos equivalentes en posición *orto-* respecto al carbono con el sustituyente, se los denomina C-2; en posición *meta-*, C-3 y en posición *para-*, C-4. En cuanto a los carbonos alquílicos, C-5 se denomina al carbono unido al átomo de azufre y C-6 al carbono unido al átomo de oxígeno.

La asignación de las señales de los espectros de RMN ^{1}H y ^{13}C coincide con lo esperado para el PBMA sintetizado.

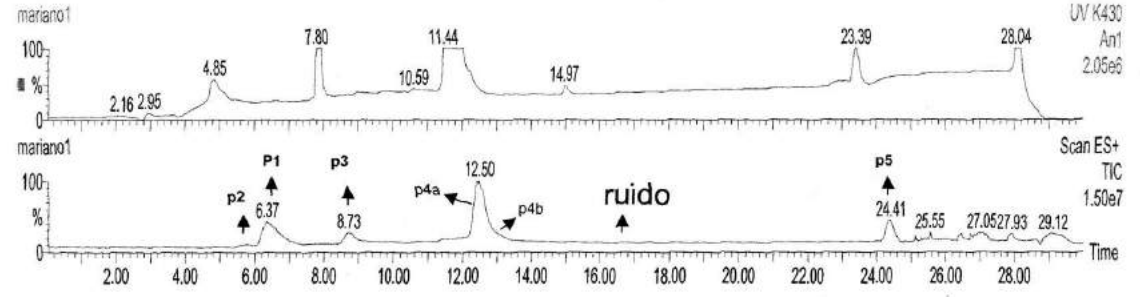


Figura 6.5 – HPLC-MS Reacción de síntesis de PBMA.

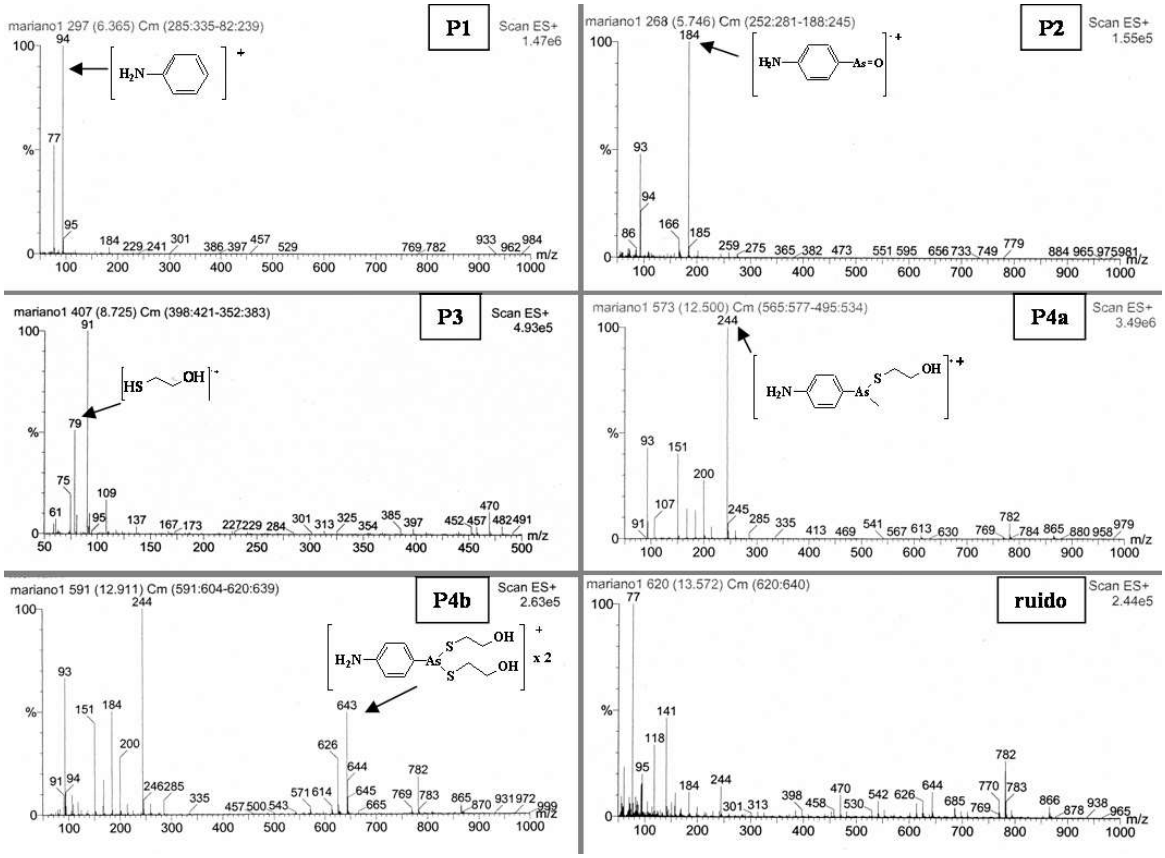


Figura 6.6 – Espectros de masas de los picos característicos del HPLC-MS señalizados en la figura previa.

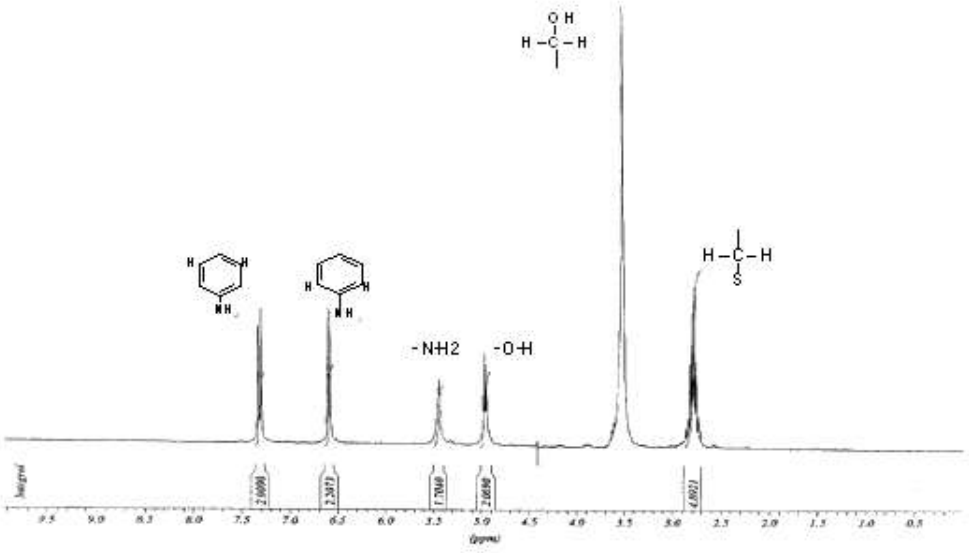


Figura 6.7 – Espectro de RMN ^{1}H del PBMA. *Fuente: LANAIS-RMN-CONICET.*

# pico	δ_H (ppm)	Asignado a
1	7,329	protones en meta a grupo amino aromático (Triplete)
2	7,307	
3	7,301	
4	6,606	H en orto a grupo amino aromático (Triplete)
5	6,583	
6	6,577	
7	5,451	H del -NH_2 (Singulete)
8	4,977	H del -OH (Triplete)
9	4,959	
10	4,940	
11	2,837	
12	2,815	H del metileno adyacente al grupo tiol (Septuplete)
13	2,794	
14	2,773	
15	2,769	
16	2,751	
17	2,730	

Tabla 6.3 – Asignación de las señales de RMN ^{1}H.

Grupo de H	Integración (del espectro)	Teórica esperada
Aromáticos	4,2	4
-NH_2	1,7	2
-OH	2,1	2
-S-CH_2	4,9	4
-O-CH_2	nd	4

Tabla 6.4 – Integración de las señales del espectro de RMN^{1}H.

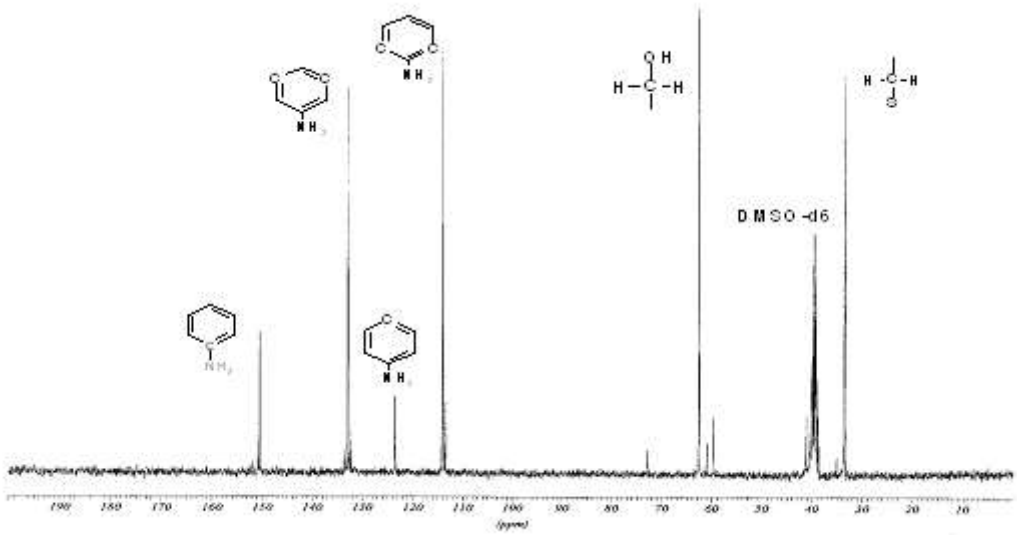


Figura 6.8 – Espectro de RMN ^{13}C del producto. *Fuente: LANAIS-RMN-CONICET.*

# pico	δ_C (ppm)	δ_C (ppm) teórico esperado	Asignado a
3	150,5	147,7	C-1 aromático
5	132,9	129,8	C-3 aromático
7	123,5	119,0	C-4 aromático
8	114,0	116,1	C-2 aromático
12	62,6	63,0	C-6 alquilo
15	41,2	39,7	DMSO-d6
17	33,5	35,0	C-5 alquilo

Tabla 6.5 – Asignación de las señales de RNM ^{13}C.

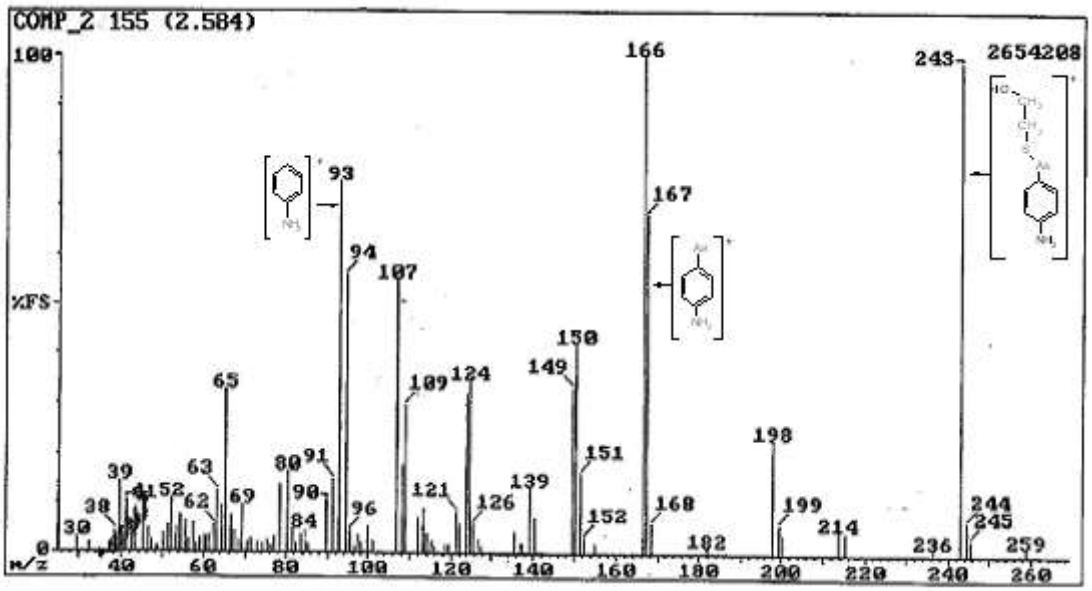


Figura 6.9 – Espectro de masas. *Fuente de ionización: Impacto electrónico. LANAIS-EMAR-CONICET.*

Espectroscopía de masas (MS): Se realizó un espectro de masas por impacto electrónico. En estas condiciones no se detectó el ión molecular (m/z 321).

Sin embargo, se encontraron iones característicos de menor m/z (o iones fragmento), por el valor de masa asignado y por el estudio de la abundancia isotópica correspondiente, que coinciden con la estructura propuesta. Se señalan sobre el espectro (Figura 6.9) y se exponen en la Tabla 6.6.

En general, los compuestos que contienen anillos aromáticos en sus estructuras presentan iones a valores de m/z característicos, como ser los picos de alta abundancia m/z 66 y 65 resultantes de la pérdida de los átomos de hidrógeno (como iones estables H y HCN) del grupo amino y/o el pico (m - 2), que representa la transferencia de protones vía rearreglos en una amina o en un alcohol.

Todos los (m + 1) y (m + 2) dan valores aproximados a los esperados por cálculo, excepto (m_1 + 1) donde la intensidad puede estar afectada por la presencia de otro ión fragmento de la misma masa, diferente al ion por abundancia isotópica.

El pico m_4 puede ser la suma de dos fragmentos ya que el H puede haberse perdido tanto en el grupo hidroxilo como en el grupo amino, resultando en la misma relación m/z (denotados en negrita, en la Figura 6.9).

La suposición de la existencia de este ion (m/z 243), que podría corresponder con una estructura parcial de la molécula buscada y presentaría la unión buscada entre el arsénico y el azufre, se basa tanto en la correspondencia de masa como en el estudio de abundancia isotópica del mismo.

Se complementa con la información brindada por otros picos presentes en el espectro

Pico	m/z	Intensidad relativa (al pico base)	Intensidad relativa a m	Contribución de isótopos (calculada)	Estructura posible asignada
m_1	93	74,7 %	100 %		[Anilina]$^{+\cdot}$
$m_1 + 1$	94	55,6 %	74,4 %	7,1 %	
m_2	167	67,9 %	100 %		[*p*-arsenoanilina]$^{+\cdot}$
$m_2 + 1$	168	5,7 %	8,5 %	7,1 %	
m_3	198	23,2 %	100 %		[*p*-arsenoanilina]$^{+\cdot}$-S
$m_3 + 1$	199	6,5 %	28,1 %	7,8 %	
$M_3 + 2$	200	3 %	12,5 %	4,4 %	[*p*-[(*β*-hidroxietil-mercapto)-arsino]-anilina]$^{+\cdot}$
m_4	243	98,8 %	100 %		
$m_4 + 1$	244	6,8 %	6,9 %	10,2 %	
$m_4 + 2$	245	2,9 %	2,4 %	4,4 %	

Tabla 6.6 – Posibles fragmentos característicos del compuesto de interés.

que denotarían la presencia de anilina (m/z 93, 94 y 91) y de una anilina con el átomo arsénico en posición *para-* (m/z 167 y 168).

FT-IR: En la interpretación de los espectros de FT-IR (Figura 6.10), por comparación directa de los mismos y extrapolación a estudios de moléculas simples, es posible establecer la presencia/ausencia de ciertos grupos funcionales en el compuesto de estudio (Tabla 6.7).

Para el APAV no fue posible lograr una pastilla de BrK bien traslúcida por lo cual el espectro obtenido es de baja calidad. Según los espectros, el producto de síntesis (PBMA) comparte bandas características comunes (OH, C-H alifáticos, C-O) al *β*-ME y al APAV, y señales diferenciales con respecto al *β*-ME. En cuanto a las bandas diferenciales entre el PBMA y el *β*-ME, se detecta en el espectro del primero la presencia de bandas correspondientes a aminas primarias y a estructuras aromáticas y la ausencia de la señal característica S-H, que sí aparece en el espectro del *β*-ME (2600-2500 cm^{-1}).

La señal C-S tiene poco valor en la determinación estructural debido a la variabilidad de la posición (700-600 cm^{-1}).

Espectrometría UV

Barridos espectrales de las especies arseniacales: Con respecto a la especie As(V) se observa que posee un máximo de absorción localizado en 260 nm, que se corresponde con los datos de bibliografía, mientras que los compuestos de As(III) muestran un corrimiento del máximo hacia longitudes de onda menores ($\lambda = 230$ nm) (Figura 6.11).

No se ha podido diferenciar entre los compuestos APAO y APACl mediante espectrofotometría UV.

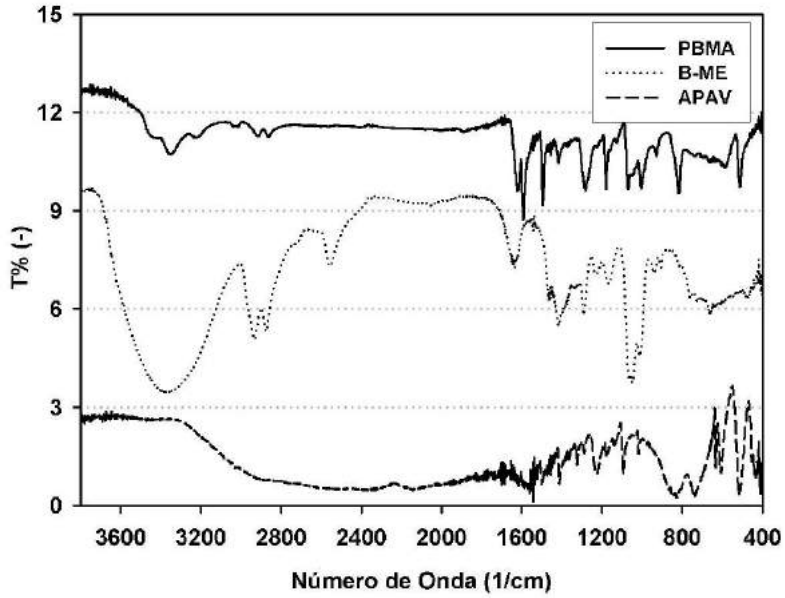


Figura 6.10 – Espectro de IR de PBMA, APAV y β-ME.

N°	Número de onda (cm^{-1})	Asignado a	Presencia en el espectro		
			PBMA	β-ME	APAV)
1	3500-3300	N-H (amina 1°)	+	-	nd
2	3400-3200	O-H	+	+	nd
3	3200-3050	C-H aromáticos	+	-	nd
4	3000-2800	C-H alifáticos	+	+	nd
5	2600-2500	S-H	-	+	-
6	1650-1500	Aromático 1,4-disustituído	+	-	+
7	1450-1250	C-C	+	+	+
8	1050-1000	C-O	+	+	+
9	700-600	C-S	nd	nd	nd

Tabla 6.7 – Análisis del espectro de IR. *Donde nd indica no determinado.*

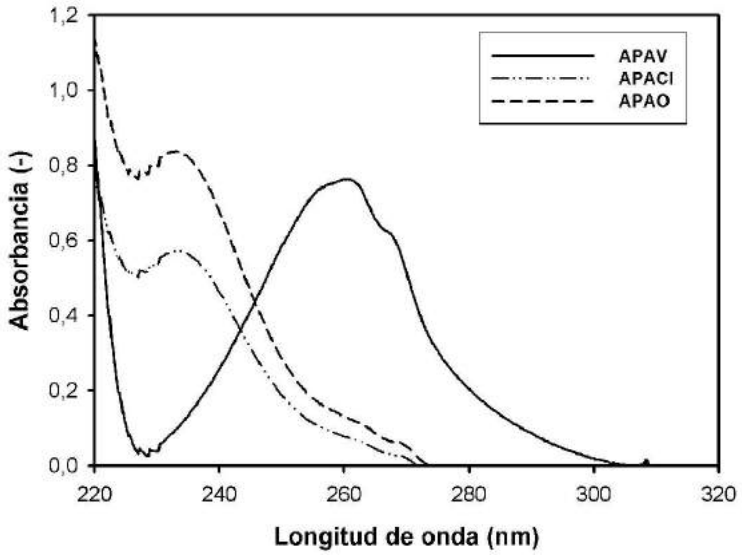


Figura 6.11 – Espectros UV de APAV, APACl (90 % pureza) y APAO (90 % pureza) en HCl 0,1 N.

6.3.4. Cuantificación del ligando en solución

Con el objetivo de realizar la cuantificación del ligando se propusieron tres estrategias: (i) la determinación de arsénico total a través de la formación de un complejo coloreado de dietilditiocarbamato de plata luego de una mineralización; (ii) la adaptación del método colorimétrico para fósforo inorgánico (método de Fiske-Subbarow) para determinar arsénico total; y por último, (iii) la determinación de arsénico en estado III de oxidación a través de una reacción química colorimétrica acoplada.

Como el arsénico se encuentra en una cadena carbonada con un anillo bencénico (APAV) es conveniente realizar, previo a las determinaciones de las estrategias (i) y (ii), una digestión química oxidante. Se ensayan diversas condiciones: (a) con mezcla de ácido nítrico, perclórico y dicromato de potasio; (b) con ácido nítrico, calor y agua oxigenada; y (c) con ácido sulfúrico.

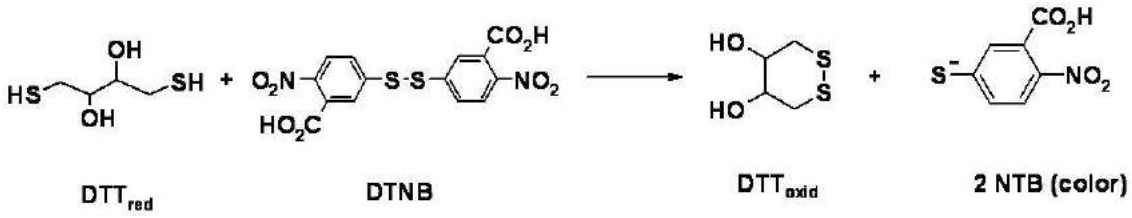
En la digestión previa a la determinación por el complejo de plata [35], se modifica el catalizador en la mezcla de digestión (metavanadato de amonio por ortovanadato de sodio) y se refieren todas las masas y volúmenes correspondientes.

Se logró optimizar la puesta a punto del sistema de determinación por liberación de arsina a partir de arsénico inorgánico soluble (estrategia i) pero no fue efectivo con los compuestos organoaseniacales en estudio cuando estos fueron inmovilizados sobre los materiales modificados. En cuanto a la adaptación del método de Fiske-Subbarow (estrategia ii), se realizaron las curvas de calibración pre y post mineralización a partir de soluciones madre de APAV. En un primer ensayo, en la post-mineralización se obtuvo linealidad hasta 20

μg/ml y sensibilidad (ensayada) hasta 2 μg/ml con $y_{(A340nm)} = 0,0454x_{(\mu g/ml)} - 0,0135$ ($R^2 = 0,9828$).

La tercera estrategia propuesta (iii), resultó la más sencilla y sensible, requiriendo muy baja cantidad de muestra. En ella se establecía determinar la cantidad de As(III) disponible por defecto. Esta tercer estrategia consiste en utilizar la reacción de complejación de los compuestos de As(III) con un exceso conocido de DTT para posteriormente determinar la cantidad de DTT libre a través de la reacción de Ellman [42].

El ácido 5,5´-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) reacciona con el DTT de acuerdo a la siguiente reacción:



En presencia de grupos sulfidrilos, el DTNB se reduce generando una sustancia cromogénica conocida como nitrobenzoato (NTB) (Ec. 6.4).

La oxidación del DTT involucra dos pasos [37]. El ión tiolato es el agente reductor que produce el ataque en medio alcalino (pH 8) sobre el puente disulfuro formando un disulfuro mixto (Ec. 6.2). Luego se produce la reducción de la molécula pues la reacción de oxidación del DTT es casi instantánea ya que involucra la formación de un anillo muy estable ($K_{equilibrio}$=10^4 M)(Ec. 6.3).

$$NTB{-}S{-}S{-}NTB(DTNB) + HS{-}DTT{-}SH \rightarrow HS{-}DTT{-}S{-}S{-}NTB + NTB \quad (6.2)$$

$$HS{-}DTT{-}S{-}S{-}NTB \rightarrow [^{DTT}_{S-S}] + NTB \quad (6.3)$$

$$DNTB + HS{-}DTT{-}SH \rightarrow [^{DTT}_{S-S}] + 2\ NTB\ (color) \quad (6.4)$$

Esta reacción también ha sido utilizada para cuantificar la cantidad de residuos sulfidrilos inmovilizados sobre un soporte sólido, dado que se produce la liberación del nitrobenzoato (NTB) al medio [43].

Sin embargo, presentó un comportamiento diferente al esperado. Al determinar la concentración de APAO por el agregado de un exceso conocido de DTT se observó que la reacción de color se incrementaba con el tiempo (ver discusión en la sección 6.3.6). Según datos de literatura la reacción DTT-APAO es muy estable por la formación de un anillo [34].

6.3.5. Estudio de la reactividad de los compuestos obtenidos

Se estudió la reactividad de los compuestos arseniacales frente a diferentes moléculas conteniendo tioles cercanos como el β-ME, el DTT y el BAL. La etilendiamina (EDA), la mono-etanolamina (MEA), la glicina (ácido aminoacético) y el glicerol se encuentran entra

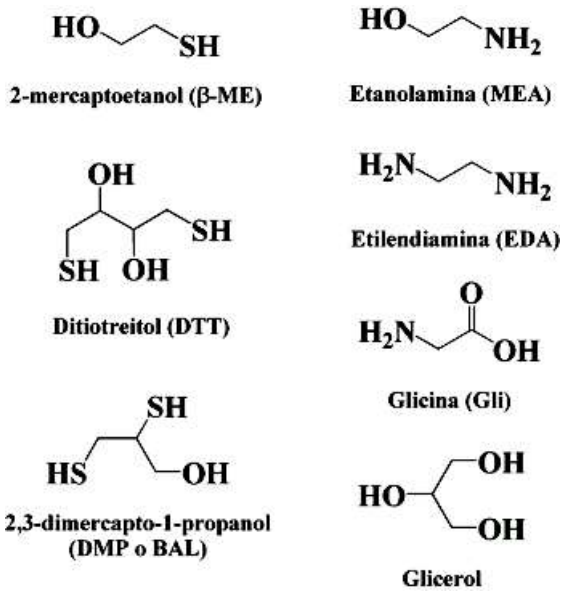


Figura 6.12 – Estructura de los compuestos orgánicos utilizados frente a los diferentes compuestos arseniacales.

las moléculas de estructura similar a las anteriores pero conteniendo aminas e hidroxilos en vez de tioles Figura 6.12.

El análisis de la reactividad se realizó por diferentes técnicas: RP-HPLC, espectrometría UV y por reacciones químicas acopladas (por colorimetría).

Reactividad por HPLC

Mediante RP-HPLC se estudió la interacción de APAV, APAO y PBMA frente a estas pequeñas moléculas orgánicas conteniendo o no tioles (mono y ditioles). La reactividad se evaluó observando la aparición de nuevas especies y correlacionando con la relación entre las intensidades (y/o áreas relativas) de los picos cromatográficos obtenidos variando las relaciones molares.

Del análisis por HPLC en los ensayos de APAV frente al β-ME en ninguna las proporciones molares ensayadas (1:1 y 1:100) se observó reacción, en este último caso posiblemente no hubo reacción debido a que se trabajó a temperatura ambiente.

Se observó la presencia de nuevas especies a partir de la interacción de APA(III) con los compuestos tiólicos. En la Figura 6.13 se muestran las especies obtenidas con APAO.

Resultados similares se visualizaron con APACl. A medida que se aumenta la proporción de grupos tioles, las áreas de los picos cromatográficos fueron también en aumento. Es por ello que en base a la integración de los picos cromatográficos, se construyeron las siguientes gráficas, a partir de las cuales se puede obtener información acerca de la reactividad y el grado de conversión alcanzados para cada compuesto arseniacal frente a determinada molécula conteniendo tioles en su estructura.

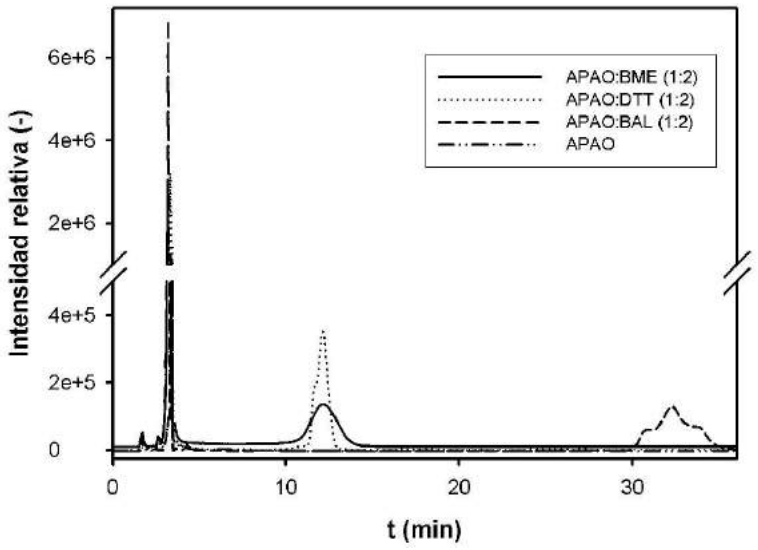


Figura 6.13 – Cromatogramas de RP-HPLC de mezclas de reacción de APAO con (–) β-ME, (...) DTT, (- -) BAL.

Tanto APACl y APAO poseen reactividades y porcentajes de conversión similares frente a moléculas como β-ME, DTT y BAL (Figura 6.14 y Tabla 6.8), derivando ambos a las mismas nuevas especies (poseen los mismos tiempos de retención). Cabe aclarar que estas nuevas especies son distintas entre sí, dependiendo su naturaleza de compuesto con tioles del cual derivan. Podría usarse alternativamente APACl en vez de APAO. En las condiciones de trabajo evaluadas, APAV no presenta reacción.

Se necesita menor proporción molar de los compuestos ditiolicos para alcanzar el 50 % de conversión que para el caso de monotiol. A su vez, el compuesto BAL es el que menor proporción molar presentó para interactuar con el APA(III) (ya sea APACl o APAO). Esto concuerda con los datos de literatura donde exponen que se formaría un aducto cíclico más estable con BAL que el que se forma con el DTT. En una proporción molar de (1:1) ya se obtiene con APAO el 80 % de conversión y con APACl el 70 %. Con DTT, la proporción aumenta a 2:1 para obtener el 70 % de conversión en el caso de APACl. No se puede decir lo mismo con el APAO dado que hubo puntos experimentales que tuvieron que ser descartados. Sin embargo, aunque no se pudo obtener esta información sí se pudo observar el comportamiento global. En cuanto al β-ME, para ambos compuestos, se requiere una mayor proporción molar (4:1) para obtener conversiones del 70 al 80 %.

Para estimar la concentración efectiva, es decir, cual es la distancia entre dos moléculas libres en solución, se recurre al análisis probabilístico. Mediante la distribución de Poisson, se puede explicar el porqué de la efectividad del BAL y del DTT a menor concentración comparable a la efectividad del β-ME a elevadas concentraciones. Por ejemplo, se requiere de una concentración de 2 M a 0,5 M de β-ME (a mayor concentración, menor distancia

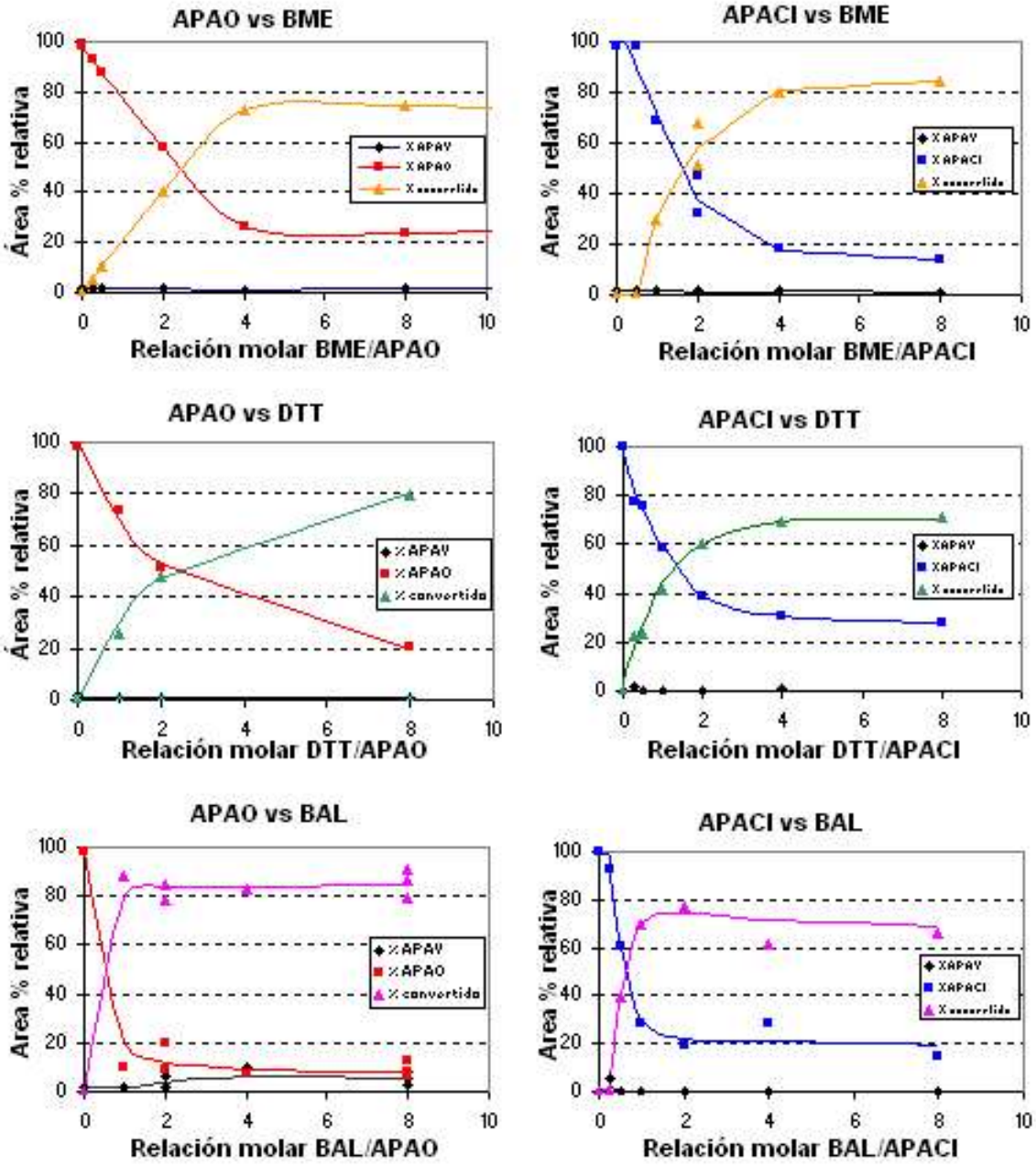


Figura 6.14 – Interacción de los compuestos arseniacales con ditioles.

	Parámetro	APACl	APAO	APAV
β-ME	Relación molar As:X en el punto de inflexión (50 % área)	1,8	2,3	No presenta reacción en las condiciones de trabajo
	Rendimiento (% final conversión)	82	74	
DTT	Relación molar As:X en el punto de inflexión (50 % área)	1,5	2	
	Rendimiento (% final conversión)	>75	80	
BAL	Relación molar As:X en el punto de inflexión (50 % área)	0,6	0,5	
	Rendimiento (% final conversión)	75	86	

Tabla 6.8 – Comparación de reactividades y rendimientos entre APAO, APACl y APAV.

entre moléculas) para encontrar una molécula libre de β-ME a la distancia de 5 a 9 Å (distancia aproximada entre los átomos de azufre en la molécula de DTT).

Cuando se realizaron los ensayos de APAO, APACl y APAV frente a moléculas como EDA, MEA, glicina, glicerol, de estructura similar a los ditioles y monotioles evaluados pero con grupos hidroxilo o aminas en vez de los tioles, no se visualizó la aparición de ninguna nueva especie y además las área relativas por estudios de HPLC permanecieron en la misma proporción.

Al incubar PBMA con DTT, se observa la aparición de la señales de β-ME y de la especie APAO-DTT, con la desaparición del PBMA. Esto podría corresponderse con la formación de una especie de estructura "biciclo" más estable que la estructura del PBMA propuesta. Según el trabajo de Donoghue, pequeñas moléculas sintéticas, péptidos y proteínas con ditioles forman un complejo cíclico de alta afinidad con el compuesto arseniacal GSAO (compuesto sintetizado en base a APAO) [13]. Esta afinidad disminuye a medida que aumenta el tamaño de la estructura de anillo formada con el arsénico.

Reactividad por espectrofotometría UV

En esta sección se analizan los espectros UV de algunas de las especies en estudio (APAO y APAV) en presencia/ausencia de DTT.

Los diferentes espectros obtenidos se muestran en la Figura 6.15. Cabe aclarar que la leve disminución en la intensidad de absorción del "APAV + DTT" se atribuye a un factor de dilución.

Bajo las condiciones de trabajo establecidas, se observa que para el caso del APAV, no se observan cambios en los espectros de absorbancia cuando se le agrega DTT en relación equimolar. En cambio, para el APAO se visualiza un corrimiento hacia longitudes de onda mayores y cambios en la forma del espectro de absorción.

Los espectros diferencia de los compuestos APACl-βME y APACl-DTT frente APACl en diferentes condiciones (en HCl 0,1 N; NaOH 0,1 N y buffer Tris-HCl 50 mM pH 9,1) realizados en el rango entre 200 y 400 nm, no mostraron rasgos diferenciales. Estos son los

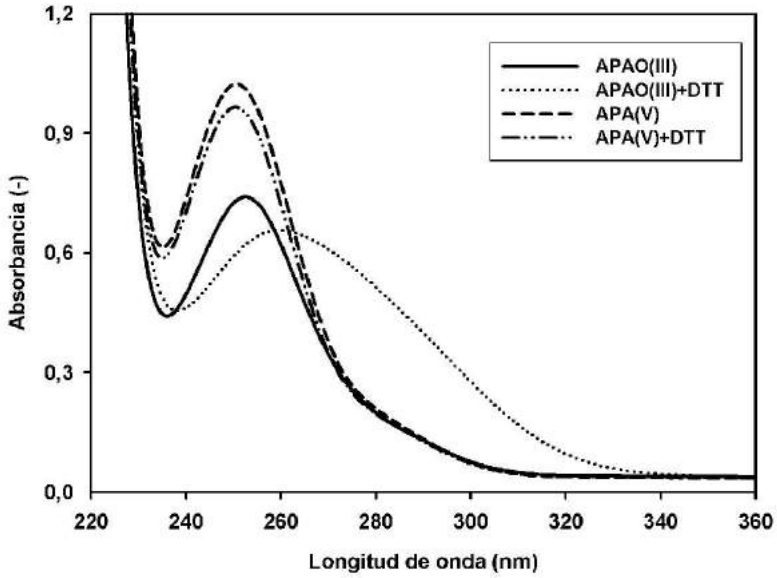


Figura 6.15 – Espectros en UV de mezclas con DTT de APAO y APAV (relación molar 1:1 en H_2O:DMSO 3,3 %).

pHs generalmente usados para solubilizar al APACl y al APAO.

Se prosiguió a realizar una cinética de reacción sobre el APAO mediante el agregado de DTT para verificar la transformación hacia otro compuesto (aducto APAO-DTT). Este cambio estaría denotado por variaciones en la banda de absorción característica.

Como se observa en la Figura 6.16, se visualizó una cinética de interconversión de una sustancia en otra, representada por el corrimiento de la banda de absorción característica del APAO (252 nm) hacia longitudes de onda mayores (259 nm), contando con la presencia de un punto isosbéstico que nos indica que se está observando una única reacción.

Al realizar los espectros UV diferenciales de cada compuesto arseniacal pre- y post-incubación con DTT, se observa que en el caso del intermediario APACl (Figura 6.17, C) la longitud de onda máxima del aducto APACl-DTT es similar a la obtenida en la reacción de APAO-DTT (Figura 6.17, O). APAV no presenta reacción (Figura 6.17, F).

6.3.6. Reactividad por reacciones acopladas

La reactividad química de los derivados arseniacales a los compuestos con mono- y ditioles es también analizada por medio del ensayo de Ellman. Diferentes cantidades del ligando son incubadas con una concentración constante de tioles a diferentes pHs. Los tioles libres remanentes son cuantificados espectrofotométricamente (Figura 6.18) para así determinar las constantes de disociación en el equilibrio (Kd) de As(III).

Conociendo las concentraciones iniciales de los dos compuestos y determinando la cantidad libre de tioles se puede determinar la Kd de la reacción. Los valores de Kd fueron

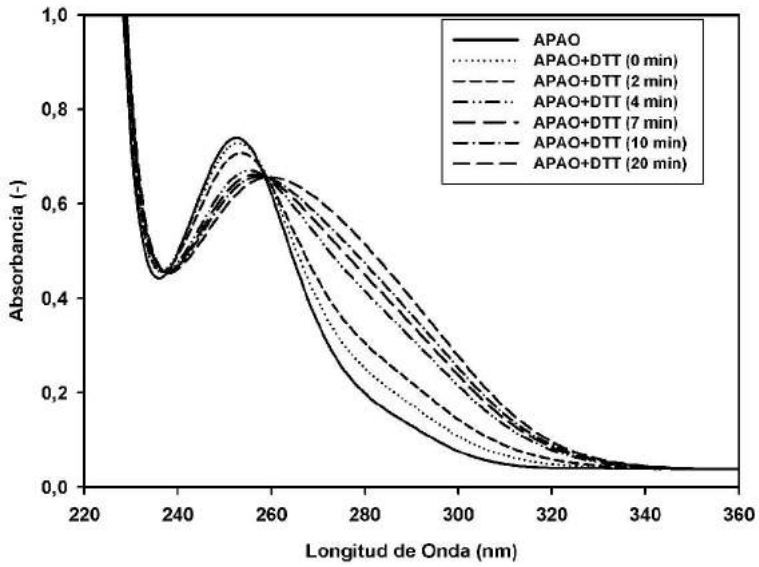


Figura 6.16 – Espectro UV de la interacción entre APAO y DTT. Cinética de Reacción.

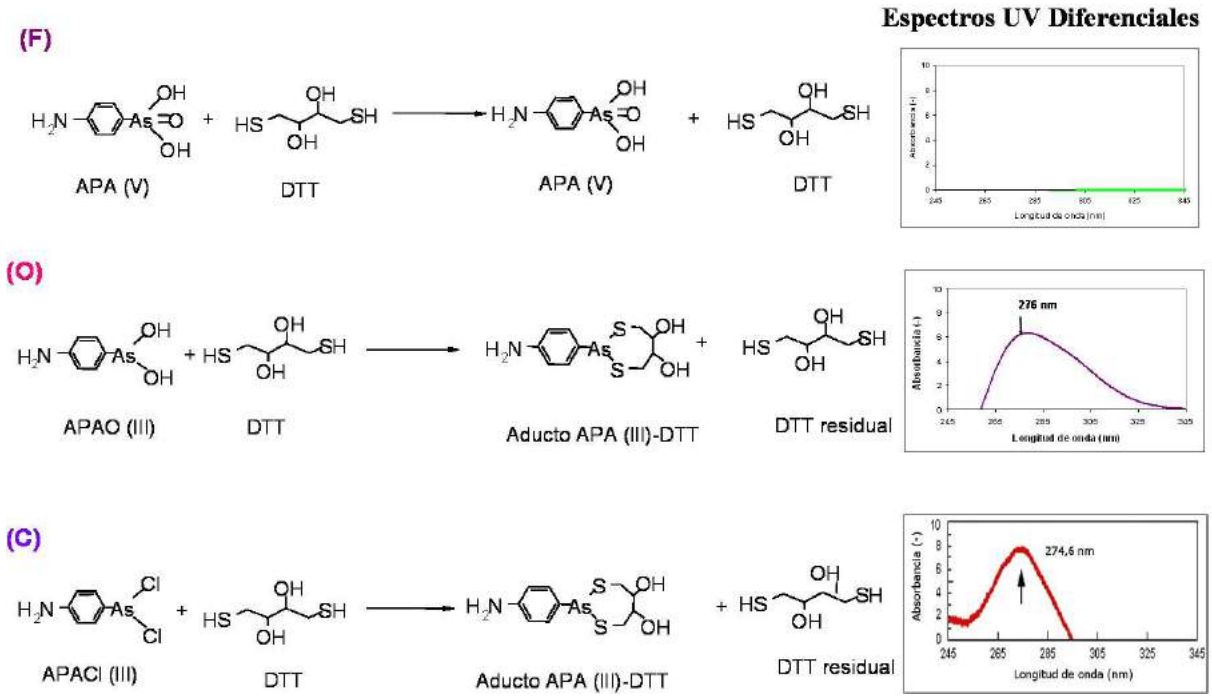


Figura 6.17 – Interacción de precursores con un modelo químico de dos sulfhidrilos cercanos (DTT).

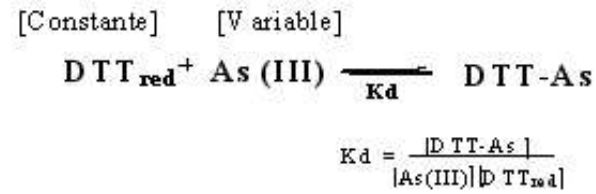


Figura 6.18 – Ecuaciones de los compuestos involucrados en la determinación de la reactividad química

pH	Kd (μM)		
	APACl-DTT	APAO-DTT	APAV-DTT
6	6,5	5,6	>1000
7	13,5	1,1	>1000
8	>1000	3,9	>1000

Tabla 6.9 – Tabla comparativa de valores de Kd obtenidos en el estado libre para la reacción a diferentes pHs, entre los diferentes compuestos arseniacales y Trx.

calculados mediante el ajuste de los datos experimentales a una regresión no lineal [13], descrito en el ítem 6.2.6. En la Figura 6.19 se muestra un gráfico representativo de las determinaciones experimentales realizadas.

En la Tabla 6.9 se exponen las Kd obtenidas APACl, APAO y APAV frente al DTT a partir de las gráficas correspondientes tales como la Figura 6.19. Puede observarse que las reactividades entre el APACl y el APAO son diferentes en función del pH.

A pH 6, la capacidad de unión del APACl y del APAO al DTT es similar. No obstante, mientras que APAO mantiene relativamente constante su Kd en el rango de pH entre 6 y 8, para APACl aumenta el orden de Kd a medida que el pH aumenta, siendo que a pH 8 ya no reacciona. El APAV no reacciona con DTT en las condiciones de trabajo.

El DTT tiene la capacidad de formar derivados de arsenito, donde los grupos SH son bloqueados. El agregado de arsenito de sodio (25 veces en exceso sobre la cantidad de DTT) presenta reacción completa en 5 minutos a 20 °C y pH 8 [44]. La estabilidad de aductos As(III) con tioles es potenciada si se forman ditioarsenitos cíclicos, lo cual es una evidencia de ditioles vecinales.

El APAO puede ser aplicado dentro de un rango amplio de pH (4-8) sin pérdida apreciable de la especificidad química. Se cree que la reacción de APAO involucra la formación de aductos 1,3,2-ditioarsenanos con dos sulfihidrilos espaciados adecuadamente. Sin embargo la especificidad química y selectividad estructural de esta modificación no han sido caracterizadas en detalle. Los ditioles forman ditioarsinas con diferentes afinidades dependiendo de la naturaleza del anillo formado. El anillo de 7 miembros formado por 1,4-ditiol es menos estable que el de 5 y 6 miembros dado por 1,2- y 1,3-ditioles, respectivamente.

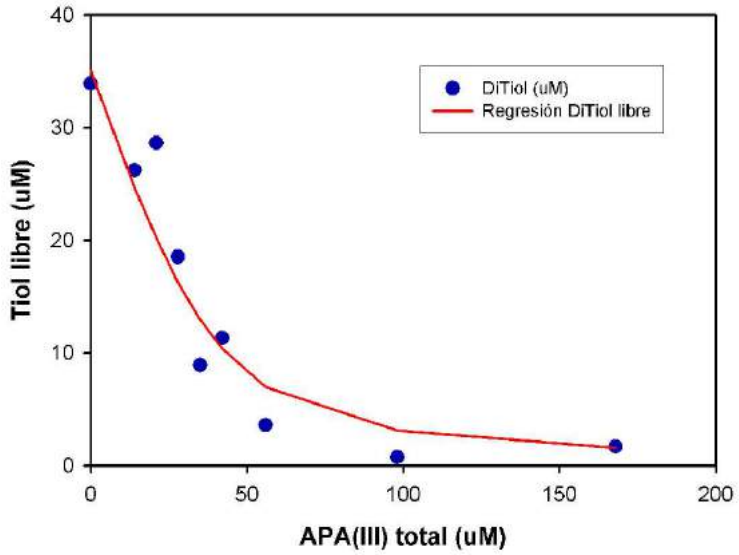


Figura 6.19 – Obtención de Kd para APAO-DTT pH 6, en solución. Ajuste de los datos experimentales.

Por lo tanto, 1,2- y 1,3- se unen con mayor afinidad que 1,4-ditiol. Tanto BAL (1,2-) como el ácido lipoico (1,3-ditiol) son más efectivos que el DTT (1,4-), por lo que se utilizan para reactivar enzimas inhibidas por la acción de As(III) y APAO [45]. Existen registros de que los complejos con ditioarsina formados entre BAL y APAO reaccionan muy lentamente con DTNB [45]. Siendo que 1,3- es más estable que 1,4-, entonces es factible el comportamiento entre el complejo DTT-APAO y DTNB, con velocidades de reacción lentas. Los resultados obtenidos a diferentes pHs, se encuentran en concordancia con la dependencia de la reactividad química de los componentes de reacción frente al pH. En la Tabla 6.10 se exponen valores de Kd obtenidos de diversos trabajos científicos.

Del análisis de esta tabla surge que las Kd de las reacciones entre los compuestos con dos tioles (entre ellos péptidos y proteínas con dos cisteínas) y distintos organoarseniacales están en el orden micromolar. Los valores de Kd obtenidos a pH 7 por el ensayo de DTNB determinado para APAO-DTT son comparables en orden a los de literatura. No se encontraron estudios sobre el efecto del pH en literatura.

Se decidió realizar una cinética después del agregado del reactivo de Ellman (DTNB). Los resultados de esta cinética muestran la existencia de dos eventos. Uno muy rápido (absorbancia a tiempo cero) y otro más lento. El evento rápido corresponde a la reacción del DTT libre con el DTNB; y el evento lento, a la disociación completa del equilibrio DTT-APAO por acción del DTNB pues es notablemente marcada la tendencia de la curva hacia el máximo de disociación (correspondiente al DTT libre) (Figura 6.20).

Los datos experimentales ajustan a una regresión no lineal del tipo hiperbólico $y = y_0 + \mathbf{a}x/(\mathbf{b}+x)$, donde **a** representa al valor y_{max} alcanzado y **b** al tiempo medio ($t_{\frac{1}{2}}$) o tiempo

Ditiol	Compuesto	Tamaño anillo*	Kd (μM)	Metodología y pH	Cita
BAL	GSAO	5	0,13 ± 0,04	DTNB, A_{412nm} pH 7	[13]
Ácido 6,8 tioctico	GSAO	6	0,20 ± 0,05	DTNB, A_{412nm} pH 7	[13]
DTT	GSAO	7	0,42 ± 0,08	DTNB, A_{412nm} pH 7	[13]
Péptido TCGPCL	GSAO	15	1,42 ± 0,45	DTNB, A_{412nm} pH 7	[13]
Péptido TCGHCL	GSAO	15	0,87 ± 0,27	DTNB, A_{412nm} pH 7	[13]
Trx	GSAO	15	0,37 ± 0,18	DTNB, A_{412nm} pH 7	[13]
Péptido con $diC_{:i,i+3:}$ CKACAA-NH_2	PSAO		0,05 ± 0,01	Espectrofotometría de flujo pH 7	[46]
Péptido con $diC_{:i,i+3:}$ CKACAAKAAAA-NH_2	PSAO		0,09 ± 0,03	Espectrofotometría de flujo pH 7	[46]

Tabla 6.10 – Datos comparativos para Kd obtenidos de bibliografía.
**Número de átomos en la estructura formada con el arsénico; PSAO: p-succinilamidafenil arsenóxido; GSAO: 4-(N-(S-glutationilacetil)amino)fenilarsenóxido.*

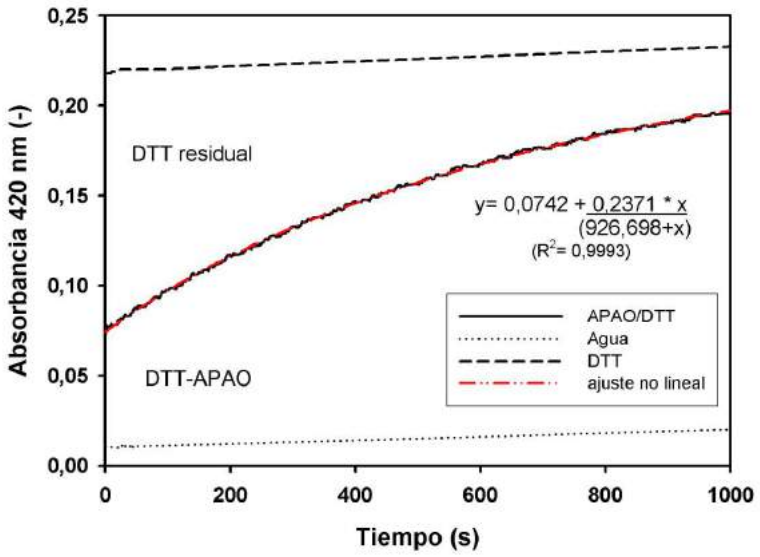


Figura 6.20 – Cinética de disociación del APAO-DTT

en que transcurre el 50 % de una conversión.

La ocurrencia de esta segunda reacción permite realizar la cuantificación del ligando inmovilizado de forma a directa a través del DTT complejado en lugar de utilizar las medidas de DTT por defecto (reacción a tiempo cero), siendo de esta manera los resultados más exactos.

Las ecuaciones de las reacciones propuestas para explicar este fenómeno serían similares a las descritas por Hamilton y col. [47]:

$$DTT - APAO + DNTB \rightarrow NTB - DTT - APAO + NTB \tag{6.5}$$

$$NTB - DTT - APAO \rightarrow [^{DTT}_{S-S}] + APAO + NTB \tag{6.6}$$

$$DTT - APAO + DNTB \rightarrow [^{DTT}_{S-S}] + APAO + 2NTB(color) \tag{6.7}$$

La reacción de intercambio tiol/disulfuro es una forma especial de alquilación (S-alquilación), es fácilmente reversible y usada en cromatografía de intercambio iónico. La reacción involucra dos pasos de desplazamiento nucleofílico en el cual se forma un intermediario mixto disulfuro. Esta reacción también puede ser descripta como un proceso redox, desde que el estado de oxidación de los átomos de azufre varía hacia disulfuro con una mayor deficiencia en electrones. La velocidad de esta reacción aumenta al aumentar el pH. Una gran cantidad de tiol (exceso) es necesario para reducir disulfuros (Keq $\approx$ 1) y viceversa [48]. Los tioles también se ven involucrados en reacciones de ionización (RSH $\rightarrow$ RS^- + H^+) con pKa en el rango de 8 a 10,5 ya que el ión tiolato (especie altamente nucleofílica) existe a pH neutro y levemente alcalino. La dependencia de esta reacción con el pH se aplica a tioles alifáticos de bajo peso molecular (por ejemplo, pKa_{SH} de β-ME es 9,5 y de etanolamina es 8,3) y a algunos tioles de proteínas. En el caso del DTT (con pKa 8,3 y 9,5) el poder reductor del ión tiolato aumenta en el rango de pH de 7 a 9,5, aunque a pH menores es también efectivo.

Para que la reacción de reducción o intercambio tiol-disulfuro sea completa es necesario utilizar un exceso de tiol (RSH) o usar un tiol con potencial redox mucho mas negativo que el tiol generado por la reducción. En el caso del β-ME como agente reductor, se requiere por lo menos de 10 veces más concentración que para DTT, posiblemente debido a su ($pKa_{\beta-ME}$ 9,5 vs pKa_{DTT} 8,3) y a la probabilidad de potencial redox menos negativo [44]. Los grupos sulfihidrilos de las proteínas tambien son oxidados con un exceso de disulfuros de bajo peso molecular. Uno de estos reactivos es el DTNB [49].

Con esta información sobre las características químicas del As y de los grupos tioles, puede decirse que el sistema de interacción entre ellos presenta equilibrios diversos, y que las especies reactivas predominantes dependen fuertemente del pH y de la naturaleza de las moléculas, afectando las reactividades y los valores de Kd.

6.3.7. Otros aportes a la reactividad...

Se propone además realizar una evaluación del comportamiento de As(III) inorgánico frente a DTNB a distintos pHs, mediante el siguiente procedimiento:

1. As(III) (6,2 mg/ml de As_2O_3) + DTNB (15 mg/ml en DMSO) + 5 minutos de incubación a T^{o} amb.

2. Lectura a 410 nm ($\epsilon_{412nm,\ pH7}$: 14.125 $M^{-1}cm^{-1}$), t = 0 y 24 hs. Volumen final reacción: 200 μl. Buffer fosfatos (BP) de reacción: 0,1 M BP, 1 mM EDTA, pH 7 (ó pH 8, ó pH 6).

Del resultado de la interacción de As_2O_3 con DTNB a pH 6, 7 y 8, sólo presentó reactividad a pH 8. A pHs alcalinos, el As_2O_3 se encuentra soluble en la forma de arsenito H_3AsO_3 ($As_2O_3 + 4OH^- \rightarrow 2\ HAsO_3^= + H_2O$). Las especies predominantes de As(V) y As(III) a pH 8 son $H_2AsO_4^-/HAsO_4^=$ y $H_3AsO_3/\ H_2AsO_3^-$.

Se pudo observar una correlación lineal entre la concentración de As(III) y el NTB generado ($y_{(\mu M\ NTB)} = 0{,}8569$ x $_{(\mu M\ As_2O_3)} + 0{,}6924$) en el rango 3-30 μM evaluado. De esta forma, se podría titular el arsenito a pH 8 por medio de la reacción de Ellman.

6.4. Conclusión

Se realizó un nuevo camino sintético para la obtención de la *p*-[bis-(hidroxietilmercapto)-arsino]-anilina (PBMA), ligando específico para ditioles vecinales, no descripto en literatura.

Los datos obtenidos de la caracterización espectroscópica por RMN^{1}H y RMN^{13}C, muestran la presencia de carbonos e hidrógenos alifáticos y aromáticos en la relación adecuada al producto esperado. El espectro de masa muestra iones fragmento posibles y el espectro infrarrojo permitió identificar los grupos funcionales buscados. Toda esta información se corresponde con la estructura propuesta para el PBMA.

El ligando amino-fenilarseniacal (APA) puede encontrarse en diferentes estados oxidativos (III) y (V), como óxido y ácido, APAO y APAV, respectivamente. En el estado (III) también puede existir como derivado clorado (APACl). Este derivado es un intermediario de la reacción de síntesis de APAO a partir de APAV, por lo cual fue necesario sintetizarlo y caracterizarlo en el laboratorio.

La reactividad química a mono y ditioles de los compuestos arseniacales sintetizados fue estudiada por medio de RP-HPLC, por UV y por reacciones colorimétricas acopladas.

Del análisis de la reactividad del APACl y del APAO con DTT por espectrofotometría UV surge que ocurre una única reacción derivando en un único compuesto. Los productos derivados de estas dos reacciones también presentaron por RP-HPLC el mismo tiempo de retención, que se asigna al aducto APA(III)-DTT.

Utilizando RP-HPLC se pudo determinar la reactividad y los porcentajes de conversión para los organoarseniacales sintetizados. En todos los casos estudiados se alcanzó entre un 70 % y 80 % de conversión utilizando los derivados APA(III).

La determinación en el estado libre del parámetro termodinámico en el equilibrio (Kd) de los diferentes compuestos arseniacales frente a moléculas pequeñas conteniendo ditioles, se llevó a cabo por reacciones acopladas. El menor valor de Kd obtenido fue de 1,1 μM a pH 7 con APAO-DTT que se puede considerar similar a los encontrados en literatura para

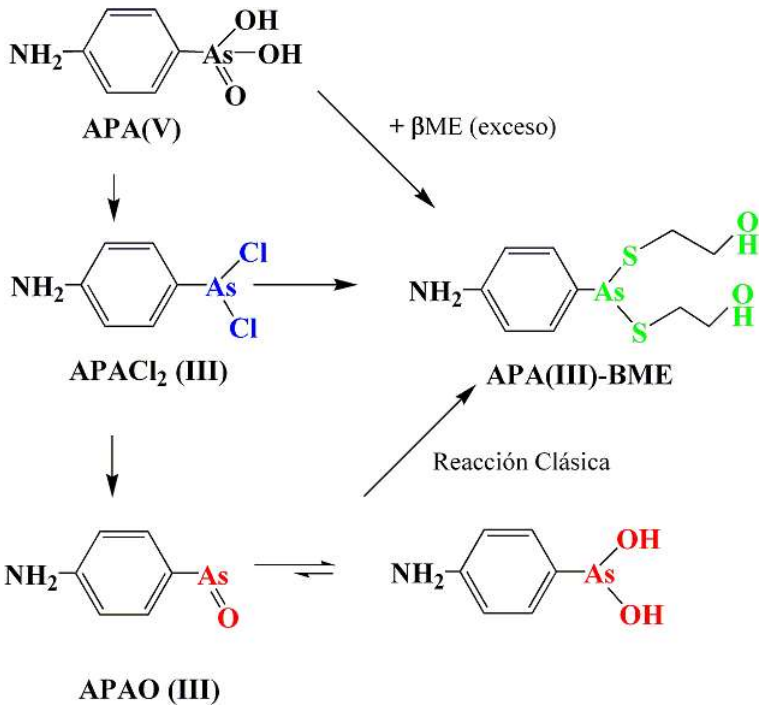


Figura 6.21 – Rutas alternativas para la síntesis de APA(III)-βME (PBMA).

compuestos similares. Se pudo detectar una diferencia de reactividad entre los derivados APAO y APACl. A pH 8 el APAO mantiene reactividades similares a las de pHs más ácidos, mientras que el derivado clorado no reacciona.

Referencias

[1] Mukhopadhyay R., Rosen B. P., Phung L. T., and Silver S. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26(3):311–325, 2002.

[2] Bhattacharya P., Welch A. H., Stollenwerk K. G., McLaughlin M. J., Bundschuh J., and Panaullah G. Arsenic in the environment: Biology and chemistry. *Sci. Total Environ.*, 379:109–120, 2007.

[3] World Health Organization (WHO). http://www.who.int/mediacentre/factsheets/en/ & http://www.who.int/topics/arsenic/en/. Digital, 2001.

[4] Ericsson O., Schweda E. K., Bronner U., Rombo L., Friden M., and Gustafsson L. L. Determination of melarsoprol in biological fluids by high-performance liquid chromatography and characterisation of two stereoisomers by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 690(1-2):243–251, 1997.

[5] Keiser J. and Burri C. Physico-chemical properties of the trypanocidal drug melarsoprol. *Acta Trop.*, 74(1):101–104, 2000.

[6] Rosen B. P. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett.*, 529(1):86–92, 2002.

[7] Menzel D. B., Hamadeh H. K., Lee E., Meacher D. M., Said V., Rasmussen R. E., Greene H., and Roth R. N. Arsenic binding proteins from human lymphoblastoid cells. *Toxicol Lett.*, 105(2):89–101, 1999.

[8] Shi W., Dong J., Scott R. A., Ksenzenko M. Y., and Rosen B. P. The role of arsenic-thiol interactions in metalloregulation of the ars operon. *J. Biol. Chem.*, 271(16):9291–9297, 1996.

[9] Dou Y. M., McHugh T., Lane W. V., Rossant C. J., and Loring R. H. Interactions of dithiols with p-aminophenyldichloroarsine and nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.*, 269(32):20410–20416, 1994.

[10] Ngu T. T. and Stillman M. J. Arsenic binding to human metallothionein. *J. Am. Chem. Soc.*, 128(38):12473–12483, 2006.

[11] Lin C. H., Huang C. F., Chen W. Y., Chang Y. Y., Ding W. H., Lin M. S., Wu S. H., and Huang R. N. Characterization of the interaction of galectin-1 with sodium arsenite. *Chem. Res. Toxicol.*, 19(3):469–474, 2006.

[12] Chang K. N., Lee T. C., Tam M. F., Chen Y. C., Lee L. W., Lee S. Y., Lin P. J., and Huang R. N. Identification of galectin i and thioredoxin peroxidase ii as two arsenic-binding proteins in chinese hamster ovary cells. *Biochem. J.*, 371(Pt 2):495–503., 2003.

[13] Donoghue N., Yam P. T., Jiang X. M., and Hogg P. J. Presence of closely spaced protein thiols on the surface of mammalian cells. *Protein Sci.*, 9(12):2436–2445, 2000.

[14] Stevenson K. J., Hale G., and Perham R. N. Inhibition of pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from escherichia coli with mono- and bifunctional arsenoxides. *Biochemistry*, 17(11):2189–2192, 1978.

[15] Hoffman R. D. and Lane M. D. Iodophenylarsine oxide and arsenical affinity chromatography: new probes for dithiol protein. *J. Biol. Chem.*, 267:14005–14011, 1992.

[16] Adams S. R., Campbell R. E., Gross L. A., Martin B. R., Walkup G. K., Yao Y., Llopis J., and Tsien R. Y. New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications. *J. Am. Chem. Soc.*, 124(21):6063–6076, 2002.

[17] Pike A. and Loring R. H. Effects of p-aminophenyl dichloroarsine on reduced high-affinity [3h]nicotine binding sites from chick brain: A covalent, yet reversible, agent for neuronal nicotinic receptors. *Eur. J. Neurosci.*, 4(12):1362–1368, 1992.

[18] Styblo M. and Thomas D. J. Binding of arsenicals to proteins in an in vitro methylation system. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 147(1):1–8, 1997.

[19] Liebl B., Muckter H., Doklea E., Fichtl B., and Forth W. Reversal of oxophenylarsine-induced inhibition of glucose uptake in mdck cells. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 27(1):1–8, 1995.

[20] Happersberger H. P., Przybylski M., and Glocker M. O. Selective bridging of bis-cysteinyl residues by arsonous acid derivatives as an approach to the characterization of protein tertiary structures and folding pathways by mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 264(2):237–250, 1998.

[21] Zhang X., Yang F., Shim J. Y., Kirk K. L., Anderson D. E., and Chen X. Identification of arsenic-binding proteins in human breast cancer cells. *Cancer Lett.*, 255(1):95–106, 2007.

[22] Hannestad U., Lundqvist P., and Sorbo B. An agarose derivative containing an arsenical for affinity chromatography of thiol compounds. *Anal. Biochem.*, 126(1):200–204, 1982.

[23] Huang R. N., Yeh H. Y., Cheng S. C., Chow L. P., and Lee T. C. Arsanilic acid-sepharose chromatography of pyruvate kinase from kb cells. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 740(1):109–116, 2000.

[24] Kalef E., Walfish P. G., and Gitler C. Arsenical-based affinity chromatography of vicinal dithiol-containing proteins: purification of l1210 leukemia cytoplasmic proteins and the recombinant rat c-erb a beta 1 t3 receptor. *Anal. Biochem.*, 212(2):325–334, 1993.

[25] Thorn K. S., Naber N., Matuska M., Vale R. D., and Cooke R. A novel method of affinity-purifying proteins using a bis-arsenical fluorescein. *Protein Sci.*, 9(2):213–217, 2000.

[26] Jhun B. H., Hah J. S., and Jung C. Y. Phenylarsine oxide causes an insulin-dependent, glut4-specific degradation in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 266(33):22260–22265, 1991.

[27] Wang C., Hsieh C. H., and Wu W. G. Phenylarsine oxide inhibits insulin-dependent glucose transport activity in rat soleus muscles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 176(1):201–206, 1991.

[28] Kussmann M. and Przybylski M. Tertiary structure-selective characterization of protein dithiol groups by phenylarsine oxide modification and mass spectrometric peptide mapping. *Methods in Enzymology*, 251:430–435, 1995.

[29] Bhattacharjee H. and Rosen B. P. Spatial proximity of cys113, cys172, and cys422 in the metalloactivation domain of the arsa atpase. *J. Biol. Chem.*, 271(40):24465–24470, 1996.

[30] Rosen B. P. Families of arsenic transporters. *Trends Microbiol.*, 7(5):207–212, 1999.

[31] Rooney J. P. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. *Toxicology*, 234(3):145–156, 2007.

[32] Aposhian H. V. and Aposhian M. M. Arsenic toxicology: five questions. *Chem. Res. Toxicol.*, 19(1):1–15, 2006.

[33] Kitchin K. T. and Wallace K. Arsenite binding to synthetic peptides based on the zn finger region and the estrogen binding region of the human estrogen receptor-alpha. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 206(1):66–72, 2005.

[34] Invitrogen. *ThioBond^{TM} Resin*, 1998. Instruction manual. Version C 171027/ 25-0032.

[35] Lundquist P., Martensson J., Sorbo B., and Ohman S. Turbidimetry of inorganic sulfate, ester sulfate, and total sulfur in urine. *Clin. Chem.*, 26(8):1178–1181, 1980.

[36] Fiske C.H and Subbarow Y. The colorimetric determination of phosforous. *Journal of Biological Chemistry*, 66:375–400, 1925.

[37] Cleland W. W. Dithiothreitol, a new protective reagent for sh groups. *Biochemistry*, 3:480–482, 1964.

[38] Creighton T. E. *Protein: Structure: A practical approach*, pages 155–159. W. Freeman, Ed. IRL PRESS. Oxford University Press, 1989.

[39] Creighton T. E. *Proteins: Structure and Molecular Properties*, pages 18–21. W.H. Freeman Ed., 1993.

[40] Hogg P. J. and Jackson C. M. Heparin promotes the binding of thrombin to fibrin polymer. quantitative characterization of a thrombin-fibrin polymer-heparin ternary complex. *J. Biol. Chem.*, 265(1):241–247, 1990.

[41] Maren H. Preparation of a filaricide. p-[bis-(carboxy-methylmercapto)-arsino]-benzamide. *J. Am. Chem. Soc.*, 68:1864, 1946.

[42] Creighton T. E. Chapter 1: Chemical propierties of polypeptides. In *Proteins: structure and molecular propiertie*, pages 240–399 and 155–159. W. Freeman Ed., 1993.

[43] Hermenson G. T., Mallia A. K., and Smith P. K. *Immobilized affinity ligand technique*. Academic Press, INC, 1992.

[44] Jocelyn P. C. Chemical reduction of disulfides. *Methods Enzymol.*, 143:246–256, 1987.

[45] Kalef E. and Gitler C. Purification of vicinal dithiol-containing proteins by arsenical-based affinity chromatography. *Methods Enzymol.*, 233:395–403, 1994.

[46] Cline D. J., Thorpe C., and Schneider J. P. Effects of as(iii) binding on alpha-helical structure. *J. Am. Chem. Soc.*, 125(10):2923–2929, 2003.

[47] Hamilton C. J., Saravanamuthu A., Eggleston I. M., and Fairlamb A. H. Ellman's reagent mediated regeneration of trypanothione in situ: substrate economical microplate and time dependent inhibition assays for trypanothione reductase. *Biochem. J.*, 369(Pt 3):529–537, 2003.

[48] Janson J-C. and Ryden L. G. *Protein purification. Principles, high resolution methods, and applications*, chapter 9: Covalent chromatography. Wiley-VCH, 1998.

[49] Teh-Yung Liu. Chapter 3: the role of sulfur in proteins. In Neurath & Hill Editors, editor, *The proteins*, volume 1, pages 240–399. Academis Press, 3rd edition, 1975.

Capítulo 7

Inmovilización de los compuestos arseniacales y estudio de la interacción con proteínas

7.1. Introducción

El reconocimiento bio-macromolecular, tal como la interacción antígeno-anticuerpo, es un fenómeno muy sofisticado de complementariedad entre superficies moleculares. El uso de esta herramienta biológica en la ciencia de los polímeros expande la aplicación de estos últimos en el campo de la medicina.

Las técnicas de inmunodiagnóstico sobre fase sólida son ampliamente usadas para evaluar estados fisiológicos (glucemia, fertilidad, embarazo, etc.) o distintos estados patológicos, y posibilitan un diagnóstico rápido, sensible, simple, específico y reproducible. En los soportes utilizados normalmente en los kits de diagnóstico, la adsorción del material biológico de captura al material polimérico se realiza en base a la adsorción física. Las proteínas que se desnaturalizan fácilmente y aquellas que presentan epitopes conformacionales de reconocimiento no pueden ser inmovilizadas de esta manera sobre el soporte ya que la interacción física puede provocar cambios en su conformación y con ello alterar las propiedades inmunoquímicas (Figura 7.1).

En las últimas décadas, la inmovilización de proteínas sobre polímeros, especialmente anticuerpos y antígenos bacterianos, ha sido descripta utilizando la tecnología de radiación [1, 2, 3, 4, 5]. Sin embargo, en la mayoría de los casos la inmovilización no se ha realizado a través de una orientación específica de las proteínas sobre la superficie del polímero.

El crecimiento exponencial de la ingeniería genética ha hecho posible tener disponible proteínas recombinantes y también nuevas proteínas como son las proteínas de fusión o quimeras. Estas últimas son creadas a partir de la unión de dos o más genes que originalmente codifican diferentes proteínas. La traducción de esta unión resulta en una única proteína con propiedades funcionales derivadas de cada una de ellas. Dentro de las proteínas mas utilizadas para la construcción de proteínas de fusión se encuentra la tiorredoxina (Trx) y sus mutantes dado su termoestabilidad y propiedades de fácil replegado molecular [6, 7].

La Trx-GAD65 es una proteína de fusión construída a partir de la Trx y la isoforma de 65 kDa de la ácido glutámico decarboxilasa (GAD65). La GAD proviene de las células neuroendocrinas y cataliza la síntesis del ácido γ-amino butírico (GABA) a partir del ácido glutámico [7]. La presencia de anticuerpos (GADA) contra esta molécula en la sangre humana es un indicador temprano dominante de la *Diabetes mellitus* autoinmune y también

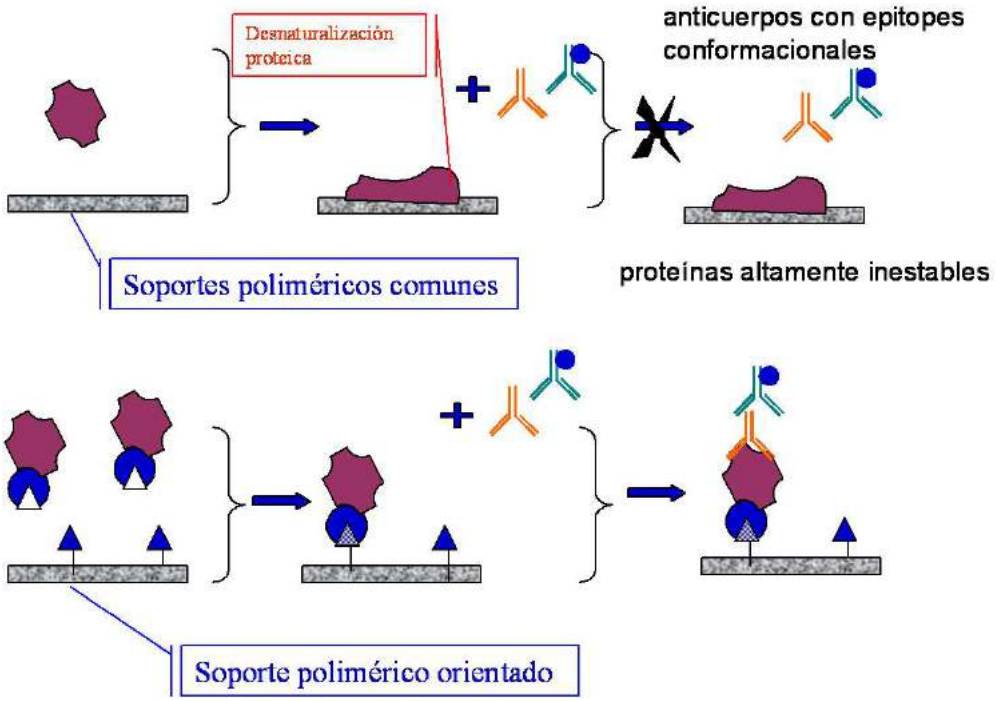


Figura 7.1 – Ventajas de la inmovilización orientada de proteínas

del síndrome de *Stiff-Man* [8]. Dado que la mayoría de los epitopes de GAD65 son del tipo discontinuo conformacional, el plegado nativo es un factor muy importante en el reconocimiento molecular de este antígeno por el anticuerpo GADA. Por lo tanto, es de crucial importancia considerar que la conformación nativa de GAD puede perderse por la interacción inespecífica con la superficie del polímero que se utiliza para el diseño del método analítico en fase sólida para la detección de GADA [9]. Con lo cual el procedimiento de inmovilización de proteína debe preservar y mantener el estado nativo de la GAD.

Si la Trx actuara como puente entre el antígeno y el soporte sólido, evitándose entonces el contacto directo soporte-antígeno, el uso de una proteína de fusión a Trx es una alternativa al problema del mantenimiento de la conformación nativa. Y si además, el antígeno asumiera una posición orientada, se mejoraría la reactividad inmunoquímica.

La inmovilización del PBMA tiene entonces como finalidad, la generación de un material que posea especificidad de unión por proteínas que contengan ditioles vecinales en su estructura como la Trx (Figura 7.2).

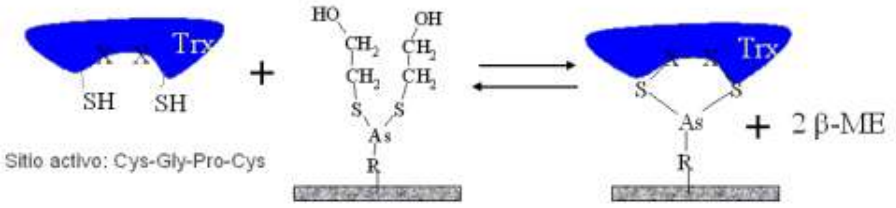


Figura 7.2 – Interacción Ligando - Trx

7.2. Materiales y Métodos

7.2.1. Muestras proteicas

Lisado *E.coli* sobreexpresado en Trx adecuado a las condiciones de reacción o Trx liofilizada (obtenida según se detalla en Apéndice B). En el caso de utilizar Trx purificada, se agrega BSA (1 mg/ml) para evitar adsorciones inespecíficas. En todos los casos, se agrega una alícuota de β-ME para reducir a la proteína, y se cambia el buffer por medio de una columna de exclusión molecular (Sephadex G-25, columnas PD10, Pharmacia Biotech, Suecia).

Lisado *E.coli* sobreexpresado en TrxGAD65 y TrxGAD65 purificada por resina Thio-Bond con el agregado de BSA (1 mg/ml) en el buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7; 100 mM NaCl, 1 mM EDTA). La producción de TrxGAD65 recombinante se detalla en el Apéndice B.

7.2.2. Determinaciones analíticas

Medida de proteínas totales por Método de Bradford y por absorbancia en 280 nm. Se considera $\epsilon_{Trx,\ 280nm}$: 1,14 $(cm.mg/ml)^{-1}$. La actividad enzimática se determina según Holmgren [10] usando un volumen de reacción final de 1 ml, volumen de muestra de 250 μl (ver técnicas en apéndice C).

7.2.3. Protocolo de inmovilización del PBMA

Se utilizaron membranas planas y de fibra hueca modificadas por injerto directo con GMA y GMA/DMAA.

1. Solución de reacción: solución 150 mM APAV en H_2O:DMSO (1:1). Llevar a pH de reacción con NaOH 10 N. Burbujear 15 minutos con N_2 gaseoso.

2. Agregar esta solución a tubos de vidrio conteniendo las membranas con injerto. Incubación toda la noche a 40-45 °C.

3. Lavar con una solución DMSO:H_2O (1:1), incubando en baño a 60 °C (2 x 30 minutos). Ídem con agua destilada.

4. Reacción con β-ME (2,5 %v/v), en agua o en DMSO:H_2O (1:1), 2-3 hs a 60 °C. Lavados con agua destilada.

5. Preservar en frío (4 °C) con H_2O y β-ME (75 mM).

7.2.4. Control por hidrólisis ácida del grupo epóxido (membranas H)

Incubar las membranas con injerto en ácido sulfúrico 0,5 M (1 N); a 80 °C por 2 hs. Lavados con agua destilada.

7.2.5. Control por inactivación del grupo epóxido por β-ME (membranas E)

Incubar las membranas con injerto con β-ME en agua o en DMSO:H_2O (1:1) (100 mM ó 2,5 % v/v); 2,5 hs a 60°C. Lavados con agua destilada.

7.2.6. Cuantificación de As total

La técnica se describe en la sección 6.2.6 del capítulo VI. Se determina arsénico total luego de una mineralización sulfo-nitro-perclórica (oxidación por vía húmeda) de materia orgánica.

Procedimiento:

1. Se mide, corta y prepara el material (membranas modificadas) y se coloca en tubos de vidrio con condensador a la salida.

2. Se agrega HNO_3 cc y se incuba 16 hs a temperatura ambiente

3. Se añade el $HClO_4$ cc y el H_2SO_4 cc y se mantiene 4 hs a 70-80 °C

4. Se sube la temperatura a 120 °C y se mantiene 1 h. Si no se observa mineralización, se aumenta la temperatura hasta 180 °C.

Proporción en la mezcla de digestión: 3/4 partes de HNO_3 cc (65 %); 1/10 parte de H_2SO_4 cc (98 %); 1/20 parte de $HClO_4$ cc (70 %) y 1/10 parte de muestra. Curva patrón con APAV (0 a 15 μg).

7.2.7. Cuantificación de As por la técnica de Ellman modificada

Procedimiento:

1. Incubación de las membranas modificadas en 0,5 ml de DTT 100 mM (50 μmoles por tubo de reacción) toda la noche en agitación.

2. Lavados exhaustivos con agua destilada

3. Reacción de Ellman: en el tubo de reacción colocar 490 μl de agua destilada, 1 cm de membrana y 100 μl de BP 100 mM, pH 8. Por último agregar 6 μl del reactivo de Ellman. Mantener en agitación y a temperatura ambiente. Se evalúan distintos tiempos de reacción.

Cálculos:

$$A_{425nm\ corregida} = (A^{t_f}_{425nm} - A^{t_0}_{425nm})_{membrana-As} - (A^{t_f}_{425nm} - A^{t_0}_{425nm})_{membrana-H} \quad (7.1)$$

$$[DTT] = A_{425nm\ corregida}/\epsilon_{425nm,\ NTB}\ ^*0,5\ ^*V_f/V_{mtra}\ ^*1000mM/M = [PBMA] \quad (7.2)$$

Donde: $\epsilon_{425nm,\ NTB}$ es 12400 $M^{-1}cm^{-1}$; 606 μl es el V_f (volumen final en el tubo de reacción); V_{mtra} es el volumen de membrana. El factor 0,5 se corresponde con que por cada mol de NTB se consume 1/2 mol de DTNB.

7.2.8. Determinación de la Capacidad máxima de Adsorción específica a Trx

1. Lavados de la membrana con el buffer BP_{Cap}.

2. Incubación de la muestra proteica con la membrana, toda la noche a 4 °C y en agitación.

3. Lavados con buffer BP_{Cap}; hasta A_{280nm} en solución menor que 0,005.

4. Elución con β-ME (100 mM concentración final) y buffer BP_{Cap}. Incubación toda la noche, en agitación, a temperatura ambiente.

5. Extracción de alícuotas pre- y post- incubaciones, para luego realizar las determinaciones analíticas.

Buffer para Capacidad a Arsónicas (BP_{Cap}): Buffer fosfato (30 mM fosfatos; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA; pH 7,5)

7.2.9. Determinación de la Especificidad

Se utiliza una adaptación del protocolo de revelado de la técnica de *Western blot* [11].

1. Incubación de las membranas modificadas con la proteína (Trx ó TrxGAD65) en agitación a 4 °C, toda la noche.

2. Lavados con Buffer de Lavado

3. Lavados con Buffer de Bloqueo.

4. Reacción de *blotting* con anticuerpos de conejo anti-Trx y antisuero anti-conejo conjugado con peroxidasa (Px) para Trx. Para TrxGAD65, con anticuerpos monoclonales de ratón direccionados a GAD65 (GAD6, *Developmental Studies Hybridoma Bank*, Universidad de Iowa, Iowa, USA) y antisuero de conejo anti-ratón conjugado con Px (IgG-HRP P260 para Mab TrxGAD65, Santa Cruz, CA. USA). Los anticuerpos fueron gentilmente donados por el Laboratorio del Dr. Ermácora, UNQ). Posterior a cada incubación con anticuerpos se realizan lavados con buffer de Lavado.

5. Revelado a temperatura ambiente con α-cloronaftol (18 mg en 6 ml de metanol y 30 ml de TBS) y H_2O_2 (al 30 %, 30 μl), protegiendo de la luz inmediatamente y manteniendo en agitación.

Buffers: (a) Buffer de Bloqueo: Buffer TBS (Tris base 6 g/L, NaCl 11,69 g/L; pH 7,4), 3 % leche en polvo descremada (LPD); (b) Buffer de Lavado: TBS, Tween20 0,05 %; (c) Buffer de incubación de anticuerpos: TBS, LPD 3 %, Tween 0,05 %.

7.2.10. Tratamiento de Deshidratación y Rehidratación

1. Secado: lavado con metanol, secado a temperatura ambiente.

2. Reactivación: Pre-incubación con β-ME 500 mM toda la noche, ó 2 hs a 50 °C. Lavados con buffer buffer fosfato 30 mM; NaCl 200 mM; pH 7, en agitación.

7.2.11. Análisis cinético y de unión en el equilibrio en el estado sólido. Estudio de la interacción As-Proteína

El acoplamiento a la superficie del sensor se produce entre los grupos carboxilatos del carboximetildextrano (CMD) y el grupo amino primario de la molécula de APA(III) vía la química de etanolamina/succinimida (EDC/NHS). La concentración a testear de ligando para optimizar (a pH óptimo) es entre 5-50 μg/ml. Primero se evalúa la concentración de ligando y el tiempo de incubación por medio de interacción electrostática (sin activar). Luego se procede a inmovilizar activando la matriz. Después de la inmovilización del ligando sobre la placa del biosensor, se procede a evaluar el sistema frente a distintas concentraciones de proteína (con y sin β-ME). Los sensogramas son obtenidos y analizados a partir de las series de puntos experimentales por medio del programa IAsys del equipo.

Procedimiento:

Ciclos de regeneración: 1) Activación con β-ME; 2) Lavados con PBST; 3) acondicionamiento con PBST + β-ME 2 mM; 4) incubación con Trx + 2 mM β-ME; 5) Elución con β-ME 100 mM; 6) Pulso de HCl 10 mM + lavados con PBST.

Materiales

Proteína Trx en PBST. Concentraciones a ensayar: 2 mg/ml; 1,5 mg/ml, 1 mg/ml. Con y sin agregado de β-ME 2 mM.

PBST: Buffer fosfatos salino + Tween, pH 7.

Buffer de inmovilización AcONa: Buffer acetato de sodio 10 mM, pH 5,0.

Buffer fosfato salino (PBS): cloruro de sodio 7,650 g; Fosfato disódico 0,724 g; Fosfato monopotásico 0,210 g; pH 7,2 en 1 litro de agua destilada (bioMerieux, Ref. 75511, 4 x 1L).

7.3. Resultados y Discusión

7.3.1. Inmovilización y síntesis del ligando *in situ*

Los inconvenientes de la inmovilización APAO (precursor clásico) son (i) la inestabilidad química del ligando por oxidación del As (III) a As (V) y su consecuente inactivación, (ii) que presenta insolubilidad en medio neutro/alcalino (condiciones óptimas incorporación al soporte) y además (iii) presenta equilibrio cetoenólico y oligomerización.

Dado los resultados obtenidos en el capítulo anterior, donde la reacción de obtención de PBMA a partir de APAV es completa y ocurre en condiciones suaves de reacción, y siendo que los derivados As(III) son más inestables tendiendo a la oxidación, se plantea en este capítulo la síntesis directa sobre el soporte sólido a partir del derivado APAV.

La reacción de inmovilización del PBMA se realiza sobre las diferentes membranas activadas previamente por polimerización por injerto (desarrolladas en el capítulo IV). Esta reacción involucra en primer término a la inmovilización del precursor en membranas epoxi-activadas. La reacción de adición del precursor en los diferentes copolímeros es por medio de una sustitución nucleofílica SN_2, donde tanto el grupo amino del ácido arsanílico como el grupo tiol del β-ME atacan al grupo epóxido reactivo del copolímero (nucleófilo). Como controles negativos se desarrollaron dos tipos de membranas (H y E, Figura 7.3) en las cuales este grupo es inactivado. Llevada a cabo la reacción de inmovilización se procede con la reacción de síntesis en fase sólida (síntesis *in situ*) mediante el agregado de β-ME, en similitud a la reacción de síntesis en solución (sección 6.3.2 del capítulo VI).

En la Figura 7.3, se esquematizan las posibles reacciones sobre el soporte modificado (A). Entre ellas se encuentran la reacción de adición del precursor (F) y la posterior síntesis del ligando y bloqueo de grupos epóxido residuales (P), así como también las reacciones para generar los controles negativos ya sea por hidrólisis ácida con H_2SO_4 (H) o por agregado de β-ME (E).

Se utilizaron las membranas G1 y GD1 (Tabla 7.1) sobre las cuales se realizaron la inmovilización del ligando (C) y las reacciones control (H y E) de acuerdo a la descripción de la Figura 7.3.

En primera instancia, una vez sintetizado el PBMA *in situ* sobre las membranas modificadas se debe confirmar la potencialidad de este ligando para unir específicamente proteínas. Para ello, como primera evaluación, membranas con PBMA (GD1-C) y membranas

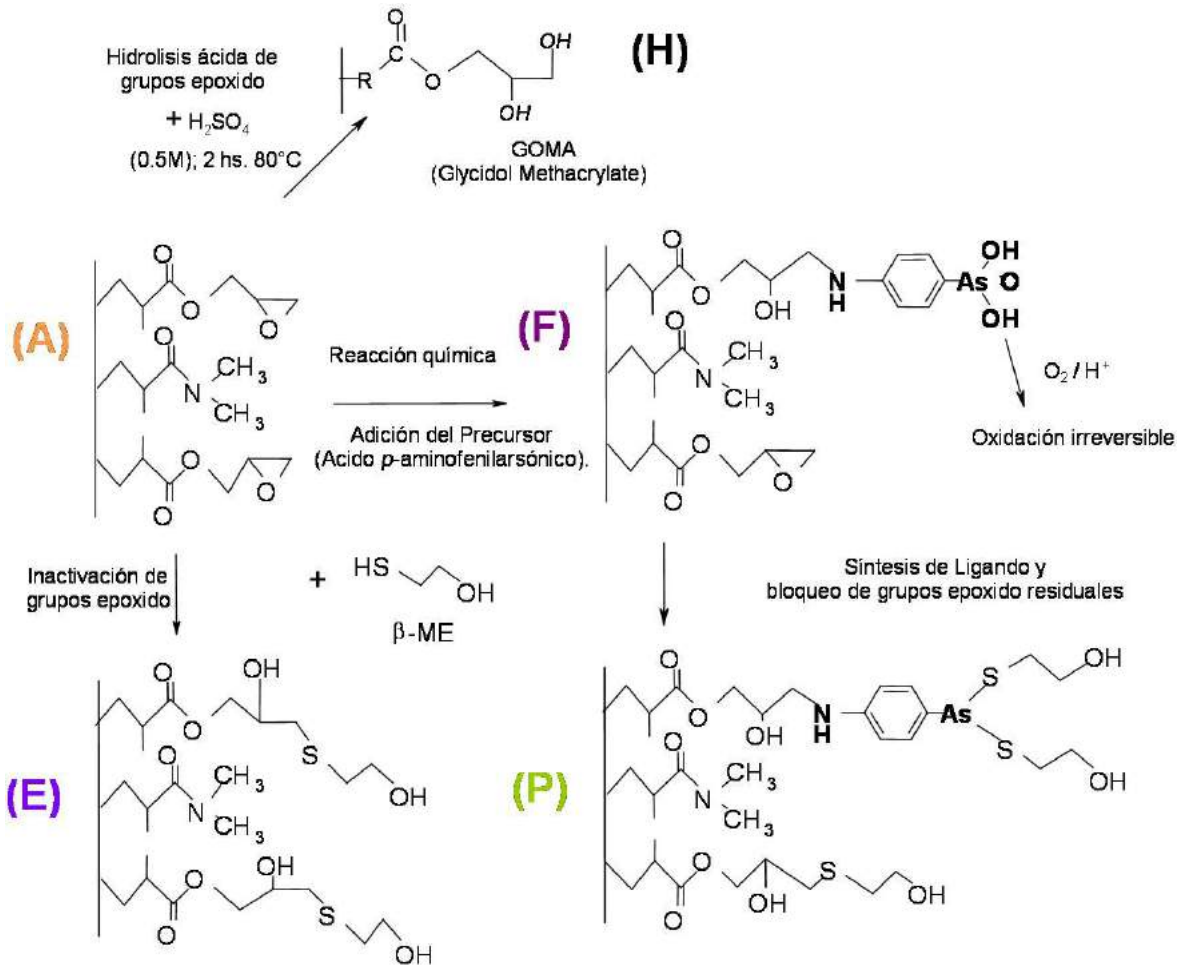


Figura 7.3 – Reacciones de inmovilización y síntesis del ligando.

Composición del Copolímero	G.I.%	GMA:DMAA
G1 (GMA)	20%	
GD1 (GMA:DMAA)	18%	0,2
GD2 (GMA:DMAA)	29%	0,4

Tabla 7.1 – Diferentes copolímeros sometidos a pruebas de capacidad y *blotting*.

Condición de reacción (en base a la Fig. 7.3)	**Condición de pH**	**G1** (GMA)	**GD1** (GMA/DMAA)	**GD2** (GMA<<DMAA)
Reacción F (sin β-ME)	pH 5	+/-	+/-	+/-
	pH 8,5	+/-	+/-	+/-
	pH 12	+/-	+/-	+/-
	Control H	-	-	-
Reacción P (con β-ME)	pH 5	+++	+++	+++
	pH 8,5	++	+++	+++
	pH 12	++	++	++
	Control E	-	-	-

Tabla 7.2 – Resultados del *blotting* en la optimización de las condiciones de reacción. *Siendo +++: azul intenso ++: azul +:azul claro +/-: gris -: blanco. Fuente proteica: Lisado de E.coli sobreexpresado en Trx.*

control (GD1-H) se incubaron con Trx recombinante purificada y luego se determinó la presencia/ausencia de esta proteína sobre las membranas mediante el revelado de la técnica de *Western blot* utilizando anticuerpos anti-Trx.

El tiempo y temperatura de la reacción de síntesis se establecieron en base a datos de bibliografía sobre inmovilización de anilina a soportes epoxi-activados [12].

Luego se evaluaron estas condiciones sobre los otros dos tipos de membranas desarrolladas previamente (G1 y GD2, Tabla 7.1) para determinar cual resulta más adecuado como soporte para el PBMA.

Una vez establecida la potencialidad del PBMA para unir específicamente Trx se prosiguió a optimizar el pH para su síntesis en fase sólida. Se realizó la síntesis sobre membranas GD en tres condiciones de pH diferentes (pH 5, pH 8,5 y pH 12). La visualización de las proteínas inmovilizadas se realiza mediante el revelado de la técnica de *Western blot* utilizando un lisado celular sobreexpresado en Trx.

Según los resultados expuestos en la Tabla 7.2, es conveniente realizar la reacción de inmovilización a pH 5, aunque también puede ser a pH 8,5. El copolímero DMAA/GMA (GD1 y GD2) presenta mejores condiciones que el copolímero GMA (G). Este resultado coincide con los resultados obtenidos en capítulos anteriores, ya que con el agregado de DMAA (monómero más hidrofílico y por lo tanto más soluble) sobre los materiales se contrarresta el carácter hidrofóbico que le confiere la adición del ligando y se logra un copolímero con una capacidad de adsorción mejorada.

La especificidad es debida a la presencia del ligando ya que en su ausencia (H y E, Figura 7.3) no se observa una señal positiva por Western blot. También se observa que para el caso de membranas con el precursor inmovilizado (reacción parcial F, Figura 7.3) tampoco da reacción positiva.

Se propusieron además otras rutas alternativas de inmovilización de precursores de PBMA (Figura 7.4) que fueron evaluadas por las mismas técnicas.

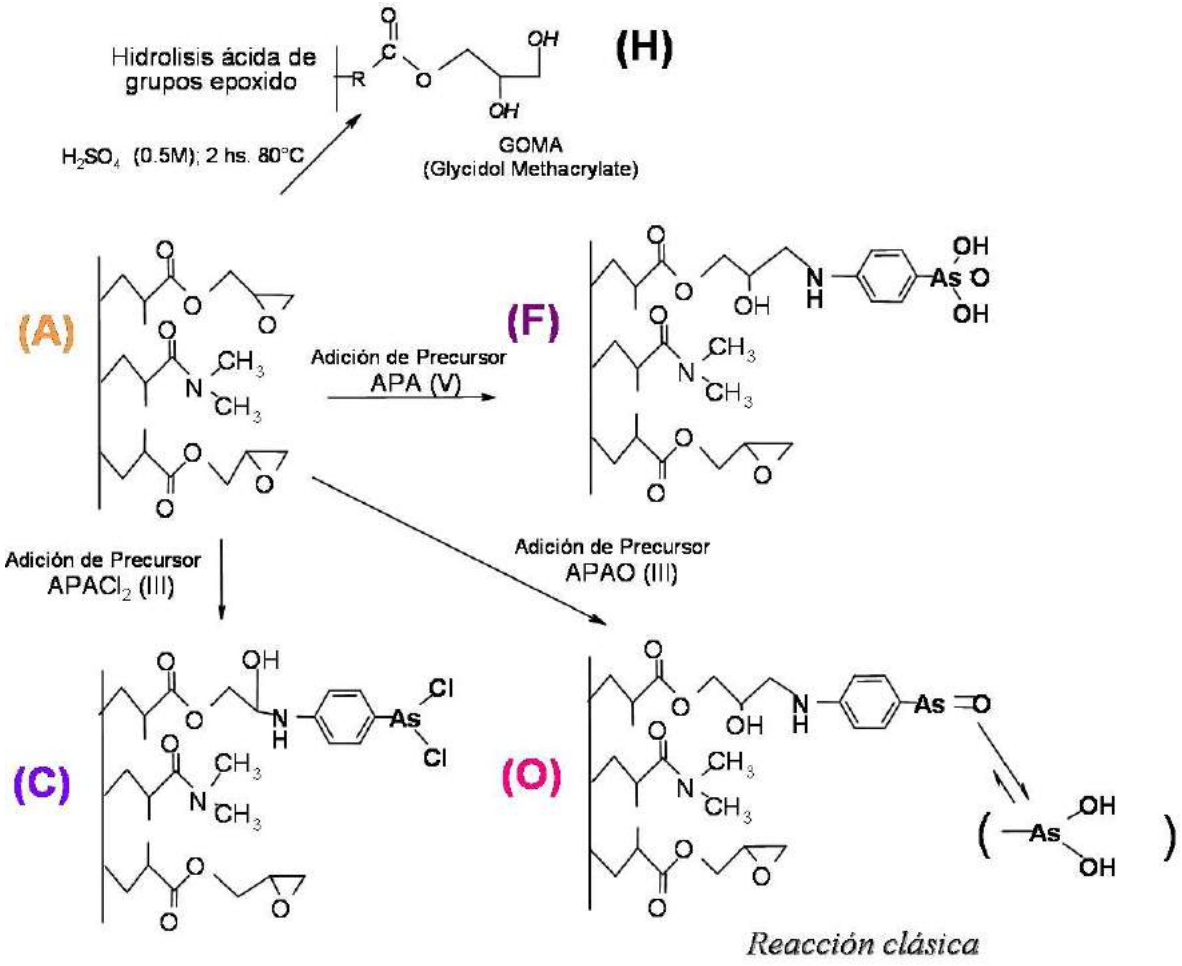


Figura 7.4 – Alternativas de inmovilización de precursores.

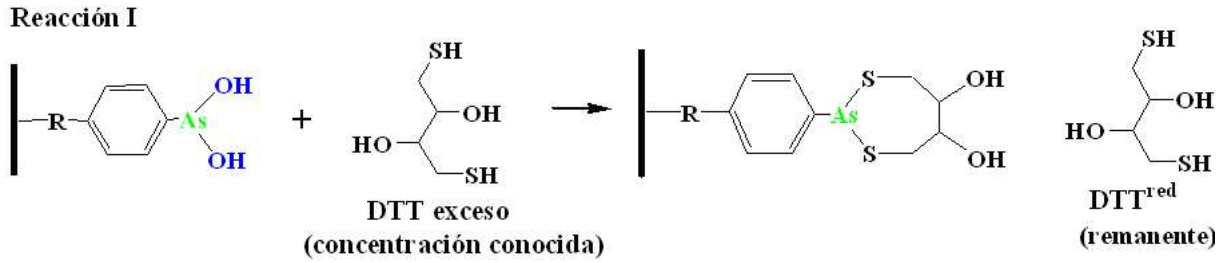
7.3.2. Cuantificación de As total

La determinación de As total inmovilizado en los materiales no fue posible. El paso de mineralización de los materiales presentó serios inconvenientes ya que la PSf es altamente resistente al medio ácido y oxidante. Cabe señalar que dada la alta estabilidad física y química del polímero hasta el momento no fue posible solubilizar la matriz sin destruir la estructura del ligando unido covalentemente.

La mineralización sulfo-nitro-perclórica posee la desventaja de que a medida que el ácido nítrico se consume, comienza a manifestarse el efecto deshidratante y oxidativo del ácido sulfúrico que se traduce en la liberación de vapores de dióxido de azufre y comienzo de la carbonización, al modificarse las condiciones del medio (de oxidante se hace reductor) ciertos elementos pueden eliminarse, parcial o totalmente, por volatilización como es el caso del arsénico.

7.3.3. Cuantificación de As(III) inmovilizado por la técnica de Ellman modificada

El As(III) inmovilizado reacciona con sulfuros, en algunos casos formando un aducto estable (Esquema de Reacción I). Así, la cantidad de As de la matriz puede cuantificarse indirectamente por medio de la liberación de TNB en solución resultante de la reacción del DNTB con sulfuros remanentes o directamente por desplazamiento del DTT tal como fue estudiado en el capítulo previo.



Por lo tanto para la cuantificación del ligando inmovilizado se procedió a saturar los materiales modificados con PBMA con una solución de DTT y después de un exhaustivo lavado, se incuba con DTNB hasta que se mantenga constante la absorbancia en 425 nm.

Es importante destacar que las matrices cromatográficas comerciales como la Thiobond® son inactivadas irreversiblemente por el DTT con la pérdida de la vida útil de la matriz [13]. Este resultado abre la oportunidad de regeneración de este tipo de soportes cromatográficos. Además, estos resultados coinciden con lo discutido en la sección 6.3.6 del capítulo VI sobre el trabajo de Kalef [14].

En la Tabla 7.3 se muestran los resultados de la inmovilización de APAO sobre membranas de PSf injertados con GMA como se describe en el capítulo IV. Cantidades progresivas mayores de APAO también fueron encontradas en materiales con grado de injerto mayor. Sin embargo, en este caso, el rendimiento de reacción es menor que en el caso de IDA. La densidad de APAO fue de 2 a 5 veces menor que la obtenida para el IDA. Este efecto es asignado a la naturaleza más hidrofóbica de este ligando y a la estructura tridimensional. El mismo resultado se observa cuando es inmovilizado APAV y se deriva a PBMA.

En las membranas con mayor grado de injerto, el As(III) disponible determinado por la técnica de injerto aumenta proporcionalmente y luego satura a partir de 40 % GI.

La densidad de ligando fue significativamente diferente cuando se modificó el polímero injertado. El copolímero más hidrofílico (pGMA-co-DMAA) incorporó más ligando que el de pGMA (Figura 7.5). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el capítulo II, aunque la técnica de modificación del polímero utilizada fue diferente y el grado de injerto en este caso es 10 veces menor al utilizado previamente.

La densidad final de ligando obtenida fue equivalente para dos condiciones de síntesis diferente.

En otros trabajos donde se inmoviliza APAO sobre diferentes matrices mediante diferentes técnicas se obtuvieron de 4 a 14 μmol As(III)/ gramo de gel húmedo (Sheparose

Tipo de Material	GI (%)	APAO (O)	PBMA (F)
		Densidad APA(III) (μmol/ml memb)	Densidad APA(III) (μmol/ml memb)
PSf-GMA	12	49	24
PSf-GMA	30	74	27
PSf-GMA	42	85	29
PSf-GMA	58	89	nd

Tabla 7.3 – Densidad de APA(III) obtenido a partir de las rutas sintéticas O y F propuestas sobre PSf macroporosa injertada con GMA.

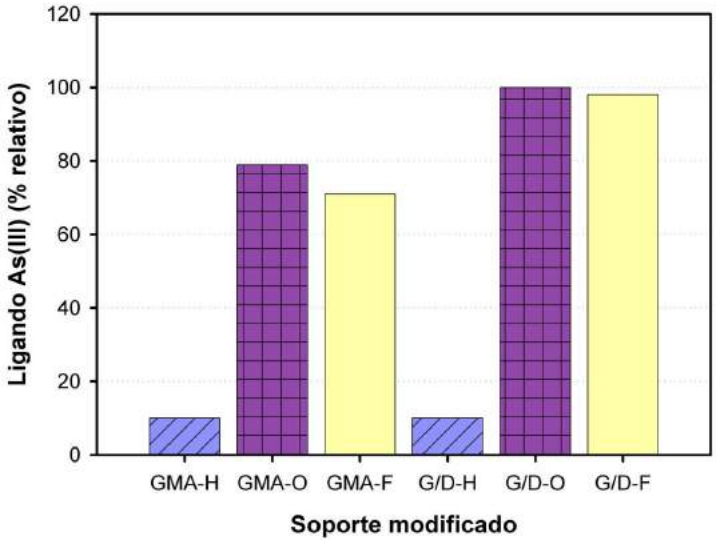


Figura 7.5 – Densidad de ligando inmovilizado (soporte - precursor) en % relativo. *Soportes: PSf-GMA y PSf-GD. En bordó cuadriculado, PBMA a partir de APAO + β-ME; en amarillo PBMA a partir de APAV + β-ME; en azul rayado, control por hidrólisis ácida.*

4BCL- APAO) [14] y 4 μmol As/ml gel (Sheparose 4B- APAO) [15].

7.3.4. Especificidad y capacidad de adsorción de proteínas

Evaluación de la adsorción de la Trx sobre los soportes (con PBMA)

Para evaluar si las membranas desarrolladas son aptas como soporte para cromatografía se realiza un ensayo para determinar la capacidad de adsorción específica a Trx en distintas condiciones.

Las membranas modificadas son expuestas a una concentración saturante de Trx el tiempo suficiente (10 hs) como para que se establezca un equilibrio entre la Trx libre y la unida a la matriz. El volumen de membrana utilizado en todos los caso fue de 0,4 ml.

Luego de la saturación total de las membranas con la muestra, se determinó la masa de Trx en la elución para membranas con ligando (G1-C) y control (G1-E), mediante la diferencia entre estos valores obtenidos se calcula la *Capacidad de Adsorción específica y reversible* que resultó en 1,36 mg Trx/ml matriz. La capacidad asignada a adsorción inespecífica fue despreciable (control G1-E).

Evaluación de la especificidad de los soportes

Se evalúa la especificidad a Trx mediante la técnica de *blot* modificada [11]. En la Figura 7.6 se muestran los resultados de las pruebas de *blotting* de las distintas membranas que fueron expuestas previamente a una solución de Trx. Tanto las membranas control (H y E) como el blanco de reacción dieron resultado negativo, con esto se descarta adsorción inespecífica de la Trx, y que es necesario la presencia del ligando para que exista interacción con esta proteína.

La reacciones de *blotting*, altamente específicas a Trx, permitieron demostrar inequívocamente la presencia del PBMA inmovilizado *in situ* (membranas C). Tanto las membranas sin ligando (H y E) como las que tienen inmovilizado el precursor (B) no presentaron señal positiva de presencia de Trx.

Las membranas de GD1-C presentaron una densidad de color mayor que las G1-C a iguales condiciones de trabajo (Figura 7.6). Este resultado implica la presencia de una mayor cantidad de proteína Trx interactuando con la matriz.

En cuanto a la configuración, la homogeneidad en el color debido a la presencia de la proteína se puedo observar sin lugar a dudas en las membranas planas (Figura 7.6). En la configuración de fibra hueca, el resultado positivo fue considerado cuando presentó homogeneidad en toda la superficie (indicado con flechas). La presencia de coloración dispersa se asignó a inconvenientes con los lavados.

Continuando con la evaluación, sobre las membranas de GMA/DMAA (GD1-C) se estimó la mínima cantidad de Trx detectable por unidad de superficie de membrana. Esta estimación se realizó por medio de un ensayo de diluciones seriadas donde la sensibilidad está limitada a la propia del método colorimétrico utilizado. Este procedimiento colorimétrico de detección involucra el uso de un anticuerpo antiTrx seguido de un segundo

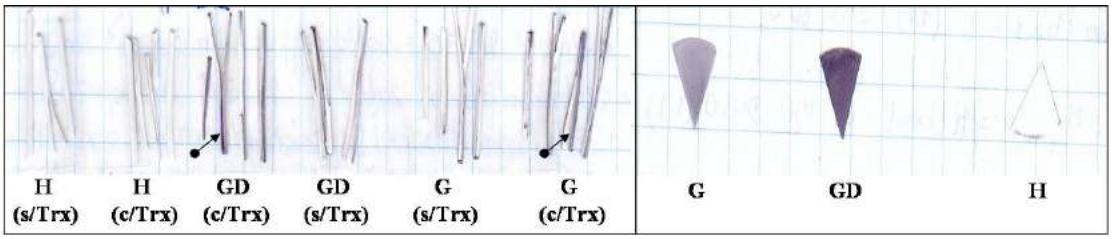


Figura 7.6 – Resultados del *blotting* para ambas configuraciones (fibra hueca y lámina plana)

Condición	Blotting
Membranas húmedas GD1-C	++
Membranas secas GD1-C	+
Membranas húmedas G1-C	+
Membranas secas G1-C	+/-
Control GD1-E	-
Control Blanco	-

Tabla 7.4 – Resultados del Tratamiento de Rehidratación. *Siendo ++: azul; +: azul claro; +/-: gris; -: blanco*

anticuerpo peroxidasa conjugado. El valor obtenido fue de 0,5 ng de Trx sobre 1 cm^2 de membrana de afinidad.

Ensayo de deshidratación y rehidratación

Con el objetivo de estudiar la estabilidad de la proteína inmovilizada y cual es la mejor forma de almacenar el material derivatizado, todas las membranas desarrolladas se someten a un tratamiento de deshidratación/rehidratación para así evaluar su eficiencia luego de la reconstitución. Se evalúa si es factible su preservación en seco.

Las membranas con el tratamiento de rehidratación presentaron resultado positivo pero con menor intensidad que las membranas que no lo sufrieron (Tabla 7.4).

Por lo tanto, no conviene deshidratar las membranas porque se obtiene una respuesta menor luego de la rehidratación del polímero.

7.3.5. Inmovilización orientada de HP-rTrx

Con el objetivo de demostrar la inmovilización a través de sitios específicos al polímero, se comparan los sistemas de inmovilización (i) a través de un *patch* de histidinas y (ii) a través de las Cys del sitio activo. Es de interés notar que las mutantes de *His patch* tioredoxina (HP-rTrx) se unen tan bien a cobre como a níquel, aunque ambos metales poseen diferentes tamaños y sitios de coordinación. Esto sugiere que los grupos ligantes en

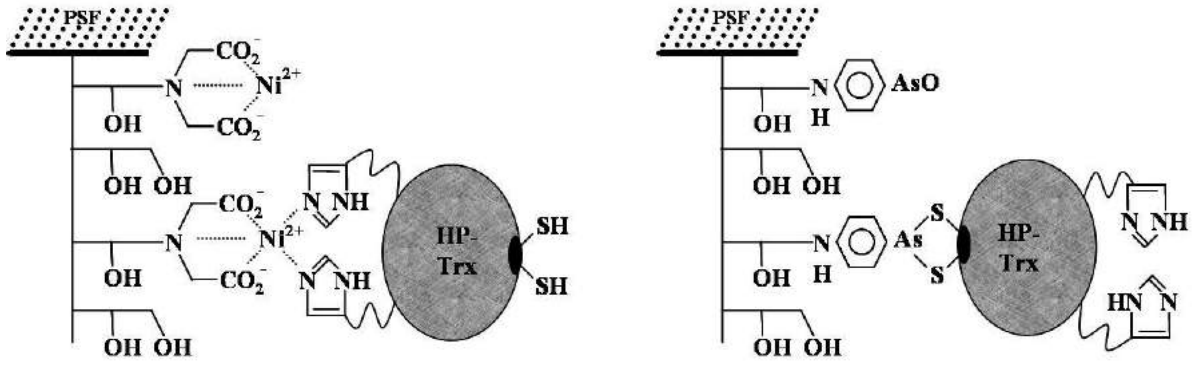


Figura 7.7 – Esquemas propuestos para la interacción de HP-rTrx al material-IDA-Ni^{2+} y material-APAO. *Los grupos sulfihidrilos en HP-rTrx están involucrados en el sitio activo de la enzima.*

Tipo de Material	Pre-incubación	Presencia de HP-rTrx
GMA-PSf	HP-rTrx	-
IDA-PSf	HP-rTrx	-
IDA-Ni^{2+}-PSf	-	-
IDA-Ni^{2+}-PSf	HP-rTrx	+
PAO-PSf	-	-
PAO-PSf	HP-rTrx	+

Tabla 7.5 – Presencia de HP-rTrx sobre los soportes poliméricos por inmunodetección con anticuerpos específicos.

los mutantes poseen suficiente flexibilidad conformacional para adaptarse en la unión a los distintos metales [6].

Para ello se sintetizó PSf-IDA-Ni(II) según se describe en capítulos previos y PSf-APAO. Ambos tipos de materiales de afinidad, APAO e IDA-Ni^{2+}, son utilizados para inmovilizar a la proteína HP-rTrx por dos mecanismos diferentes descriptos en la Figura 7.7. La principal diferencia entre ellos es que, en PSf-APAO, la HP-rTrx tiene el sitio activo bloqueado.

En la Tabla 7.5 se esquematiza la condición de pre-incubación y combinación de materiales con HP-rTrx. Así, el procedimiento es realizado sumergiendo los materiales en la solución de HP-rTrx en el buffer apropiado descrito en Materiales y Métodos. Después de un procedimiento de lavados intensivos, ambos materiales muestran la presencia de HP-rTrx por medio del revelado de *Western blot*.

Adicionalmente, se adapta la técnica de determinación enzimática con detección fluorescente a muestras sólidas (descripta en Apéndice C). La HP-rTrx cataliza la reducción de los dos puentes disulfuros intercatenarios de la insulina, produciéndose la escisión de ésta en sus dos cadenas constitutivas A y B. El resultado final es el incremento en la fluorescencia específica en función del tiempo cuando se desarrolla una reacción homogénea

(Figura 7.8, Trx libre). Además, Heuck y Wolosiuk reportaron la presencia de un período de retardo corto previo al minuto de reacción, donde es observada una disminución en la intensidad de emisión en la florescencia como consecuencia de especies intermediarias transientes [16]. Este período de retardo no es detectado para HP-rTrx libre (Figura 7.8) como consecuencia del tiempo de muestreo. Sin embargo, este efecto es representativo para la HP-rTrx inmovilizada sobre el material Ni^{2+}-IDA. Estudios futuros deberían ser llevados a cabo para un análisis profundo del mecanismo de reacción enzimática involucrado sobre la fase sólida.

Los diferentes materiales expuestos en la Tabla 7.5, preincubados o no con HP-rTrx, son utilizados para medir la actividad de la HP-rTrx inmovilizada. En la Figura 7.8 se muestra la variación de la insulina fluorescente que indica la actividad de HP-rTrx sobre los distintos materiales. En el caso de los materiales conteniendo IDA-Ni^{2+}, donde la HP-rTrx es inmovilizada a través de su patch de histidinas quedando el motivo con sulfihidrilos (el sitio activo) libre para catalizar la reducción de di-FTC-Insulina, se observó actividad enzimática. Por el contrario, no se detectaron cambios en la fluorescencia de di-FTC-Insulina para el material con GMA hidrolizado ni para el material con IDA pero sin el ión metálico, que fueron también pre-incubados con una solución de HP-rTrx. Estos controles negativos son utilizados para descartar uniones inespecíficas de la di-FTC-Insulina.

Tampoco se detecta actividad en el caso del material con APAO (Figura 7.8) ya que HP-rTrx interactúa con el As(III) por medio del sitio activo. Una prueba adicional realizada previo a la determinación de la actividad enzimática sobre el material IDA-Ni^{2+}-HP-rTrx, fue preincubar el sistema con una solución de APAO observándose inhibición de la actividad (se bloquea el sitio activo)

7.3.6. Análisis cinético y de unión en el equilibrio en el estado sólido. Estudio de la interacción As-Proteína

Tanto la capacidad de unión en el equilibrio como las cinéticas de asociación/disociación en el estado sólido, son analizadas mediante el Biosensor IAsys®.

Este equipo se basa en la técnica espectroscópica de Resonancia de Plasmones de Superficie (SPR), donde la detección de eventos de asociación y disociación de moléculas se asocian a cambios en la masa sobre la superficie del sensor, y comúnmente es utilizado en el estudio de la interacción proteína - proteína. El ligando arseniacal es inmovilizado sobre la superficie del carboximetildextrano (CMDextran) vía la química de EDC/NHS. En literatura no se han encontrado ejemplos del uso con compuestos arseniacales, pero en el manual del equipo se cita la posibilidad de su uso con moléculas orgánicas aunque no especifica cuales.

Usando CMD y la química de NHS/EDC se logró inmovilizar con éxito compuestos órgano-arsénicales APAO y APACl. El APAO exhibió un bajo rendimiento debido a su baja solubilidad, presentando además una gran tendencia a oxidarse y perder actividad. En cambio el derivado clorado permaneció estable.

Utilizando APACl como ligando inmovilizado y HP-rTrx como molécula blanco, se

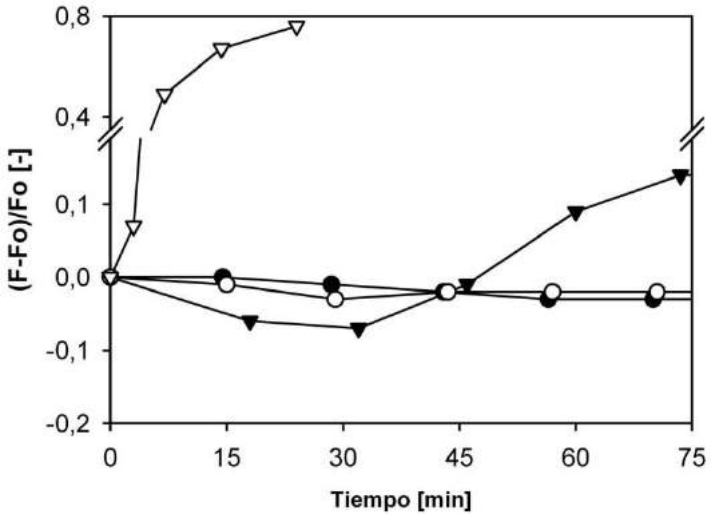


Figura 7.8 – Cinética sobre la fluorescencia de la di-FTC-Insulina por efecto de la reducción bioquímica. *Cambios en la fluorescencia son catalizados por HP-rTrx libre (▽) o inmovilizada sobre el material-IDA-Cu^{2+}, grado de injerto 40 % (▼) y HP-rTrx inmovilizada sobre el material-APAO, con grado de injerto 24 % (•). El material-GMA hidrolizado, preincubado con HP-rTrx (○) no presenta cambios en la fluorescencia en el transcurso del tiempo.*

obtuvieron las constantes de disociación (k_{diss}) y de asociación (k_{ass}) para el sistema. El oxígeno resultó una interferencia importante aumentando la desviación estándar (SD) de las medidas. Los estudios realizados en atmósfera de nitrógeno presentaron un comportamiento más estable.

Los datos de las constantes cinéticas se obtuvieron a partir de gráficas de K_{on} *vs* concentración como las que se muestran en la Figura 7.9. Donde K_{on} representa una constante aparente o de pseudo primer orden dependiente de la concentración ($K_{on} = k_{diss} + k_{ass}$ * [ligando]). Las constantes k_{diss} y k_{ass} para el sistema resultaron entre 10^{-2} - 10^{-1} s^{-1} y 10^{3} - 10^{4} $M^{-1}s^{-1}$, respectivamente, con 15-20 % de SD.

A partir de las isotermas de adsorción realizadas a cada pH, se obtienen las Kd que se muestran en la Tabla 7.6. A continuación se muestra como ejemplo, la isoterma determinada a pH 6 (Figura 7.10).

Los valores de Kd para HP-rTrx en el estado sólido fueron similares a pHs en rango de 6 a 8. No se presentan grandes cambios, siendo Kd en el orden de 100 μM (Tabla 7.6 y Figura 7.11).

No se encontraron datos de literatura sobre Kd de proteínas con APA(III) en estado sólido. En la Tabla 7.7 se muestran valores de literatura obtenidos para sistemas en solución. De la comparación con los valores de Kd experimentales obtenidos, se observa una diferencia de un orden de magnitud menor a los obtenidos y de hasta 100 veces para arsénico inorgánico.

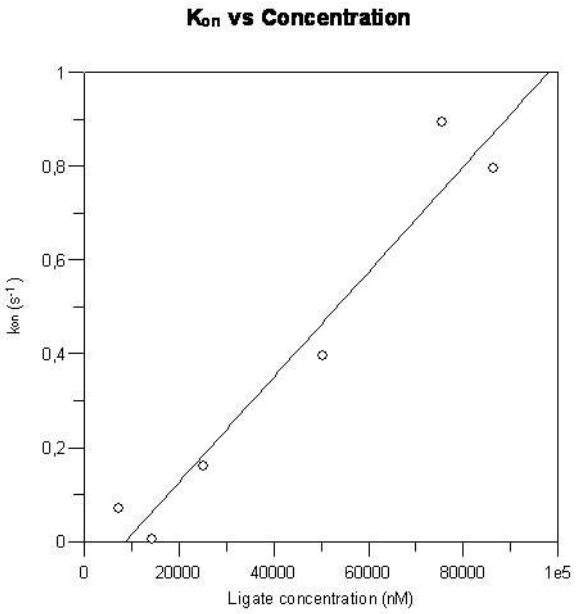


Figura 7.9 – Gráfica a partir de las cuales el sistema IAsys calcula las constantes de velocidad de asociación y disociación para la interacción entre Trx y APACl.

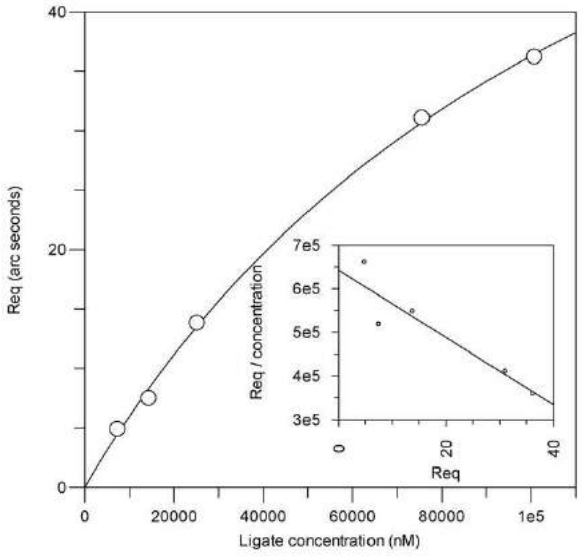


Figura 7.10 – Isoterma de adsorción de Trx a APACl a pH 6.

pH	Kd (μM)	SD
6,0	96,8	± 33,1
6,5	104,9	± 51,5
7,0	73,5	± 17,9
8,0	132,0	± 21,3

Tabla 7.6 – Tabla comparativa de valores de Kd obtenidos en el Biosensor para la reacción entre APACl y Trx a diferentes pHs

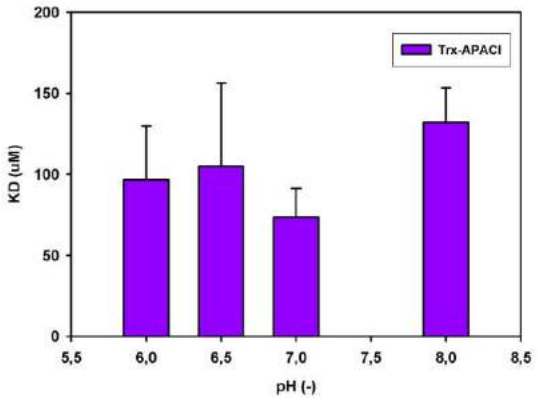


Figura 7.11 – Evaluación de Kd en función del pH - Estado sólido

Proteína/péptido	Compuesto arseniacal	Kd (μM)	Constantes cinéticas K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	Metodología y pH	Ref.
Péptido 3 (20aa; CXXC)	PSAO	0,05 ± 0,02	1420 ± 120	Espectroscopía UV (A_{300nm})	[17]
Péptido 7 (20 aa; CXXC)	PSAO	0,09 ± 0,03	23910 ± 300	Espectroscopía UV (A_{300nm})	[17]
Péptido 19 (24aa; 1 SH libre)	[^{73}As] arsenito	124	Nd	Radiomarcado; pH 7,5	[18]
Péptido TCGPCL	GSAO	1,42 ± 0,45	Nd	DTNB, A_{412nm}; pH 7	[19]
Péptido TCGHCL	GSAO	0,87 ± 0,27	Nd	DTNB, A_{412nm}; pH 7	[19]
Trx	GSAO	0,37 ± 0,18	Nd	DTNB, A_{412nm}; pH 7	[19]

Tabla 7.7 – Kd en solución de proteínas de unión a arsénico (III) obtenidas de literatura. *Siendo GSAO: 4-(N-(S-glutationilacetil) amino) fenil arsenóxido; PSAO: p-succinilamido fenil arsenóxido. Observación: Péptidos sin Cys, Kd > 9600 μM [18].*

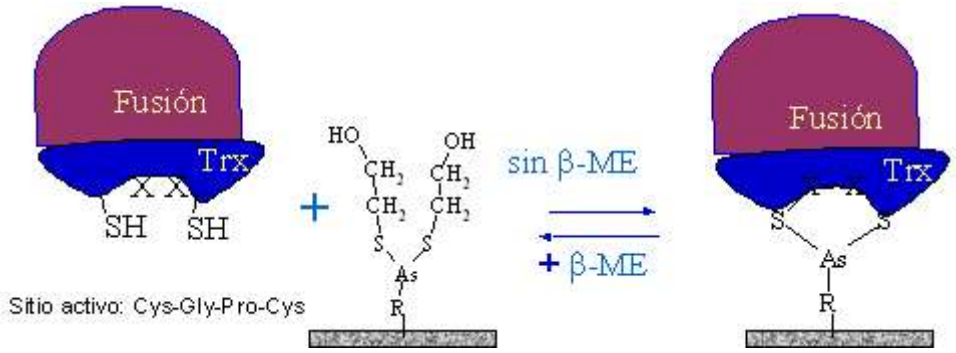


Figura 7.12 – Interacción Ligando - Trx/ proteína fusión

La posible explicación de esta menor afinidad encontrada puede deberse a impedimentos estéricos por la presencia del soporte sólido. Esta hipótesis también concuerda con el hecho de que las k_{ass} determinadas son del mismo orden de magnitud que las registradas en solución (ver Tabla 7.7) por lo que el aumento en la Kd se debe al aumento de la velocidad de disociación.

7.3.7. Inmovilización de proteínas de fusión a Trx

La inmovilización de Trx-GAD65 sobre el polímero modificado encuentra entre sus objetivos mantener la estabilidad de la estructura nativa de la proteína (preservando su actividad enzimática y la exposición de los epitopes conformacionales requeridos para el reconocimiento biológico). La Trx posee actividad *protein disulfuro reductasa*, dada por la presencia del motivo estructural C-X-X-C en su sitio activo. Proteínas de fusión a Trx y otras proteínas que contengan un motivo estructural similar, presentarían el mismo comportamiento frente a los compuestos arseniacales en estado sólido (Figura 7.12). Las proteínas escogidas para el estudio de interacción con los compuestos organoarseniacales son Trx de *Escherichia coli* y una proteína de fusión a Trx, la Trx-GAD65 humana.

La ácido glutámico decarboxilasa65-Tioredoxina (TrxGAD65), fue previamente desarrollada por los grupos del Dr. Poskus y Dr. Ermácora como antígeno efectivo para la detección de anticuerpos anti GAD (GADA), para su aplicación en la detección precoz de la Diabetes Mellitus Insulinodependiente (DMID) [7, 9]. Esta proteína de fusión en el estado conformacional apropiado, así como la GAD, es reconocida por GADA ya que este reconoce epitopes conformacionales.

La creación de esta proteína de fusión permitió el desarrollo de variantes optimizadas de enzimoinmunoensayos (ELISA). Sin embargo, uno de los principales inconvenientes de estos sistemas es la inestabilidad propia de la GAD (proteína de membrana) y la necesidad de reconocimiento de epitopes conformacionales, que derivan en la dificultad para establecer una estandarización del ensayo.

La GAD cataliza la decarboxilación del ácido glutámico y como productos finales se obtienen ácido γ-aminobutírico (GABA) y CO_2. El ensayo de referencia para la determi-

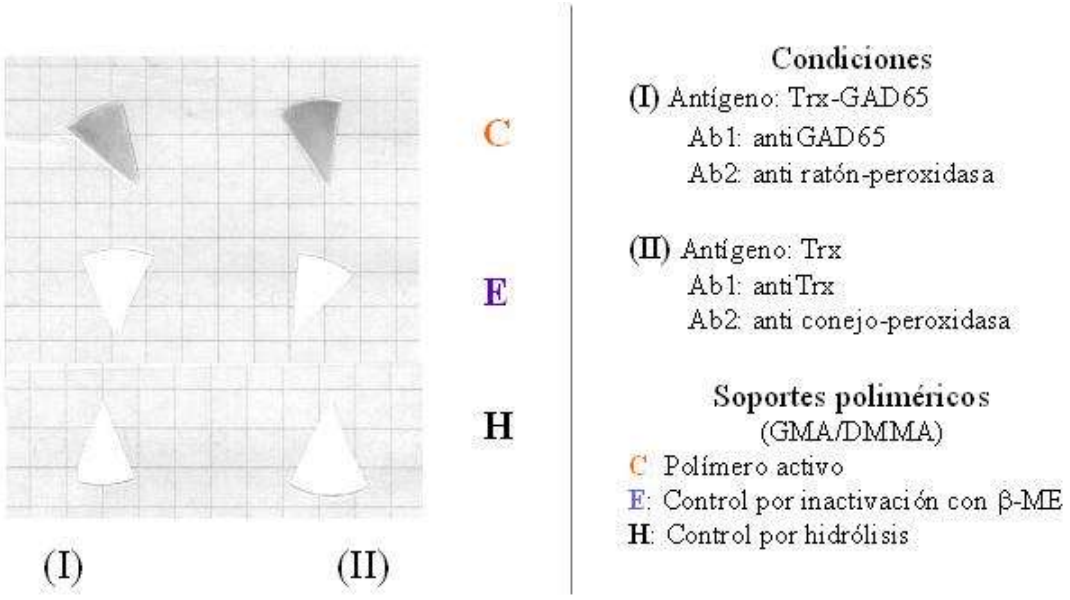


Figura 7.13 – Evaluación del soporte para reacciones inmunológicas usando como antígenos Trx y TrxGAD65. *Fuente de Trx: Lisado E.coli(Trx) recombinante. Fuente de Trx-GAD: Lisado de E.coli (Trx-GAD65) recombinante.*

nación de la actividad decarboxilasa de la GAD se basa en la medición del $^{14}CO_2$ formado a partir de L-[1-^{14}C] ácido glutámico (descripta en Apéndice C).

La Trx-GAD65 es muy inestable en solución, para su almacenamiento requiere de aditivos como trehalosa, fosfato de piridoxal (PLP), Tween20, aprotinina, entre otros [20].

Según los resultados de la reacción inmunológica (Figura 7.13), el ligando inmovilizado también tiene especificidad por proteínas de fusión a Trx como la Trx-GAD65. Con ello, se abre la perspectiva para el desarrollo de estos polímeros como soportes en estado sólido para kits de detección inmunológica.

A continuación se realizaron ensayos preliminares de estabilidad y almacenamiento de la TrxGAD65 inmovilizada.

Estudios de estabilidad

Se ensayaron dos variables generales de almacenamiento: (i) temperatura y (ii) entorno. Las condiciones de temperatura serán 25 ^{o}C, 4 ^{o}C, -20 ^{o}C y -50 ^{o}C mientras que las dos condiciones de entorno serán almacenado en medio líquido (M) y almacenado en seco, con membranas embebidas en buffer fosfatos (S).

Los polímeros modificados se incubaron con Trx-GAD65 y Trx, toda la noche en agitación suave y a 4 ^{o}C. La ocurrencia de la Trx-GAD65 sobre los polímeros fue detectada por reconocimiento de anticuerpos policlonales, y la estabilidad fue deducida por medio de determinaciones de actividad enzimática sobre el soporte sólido a través de un sustrato

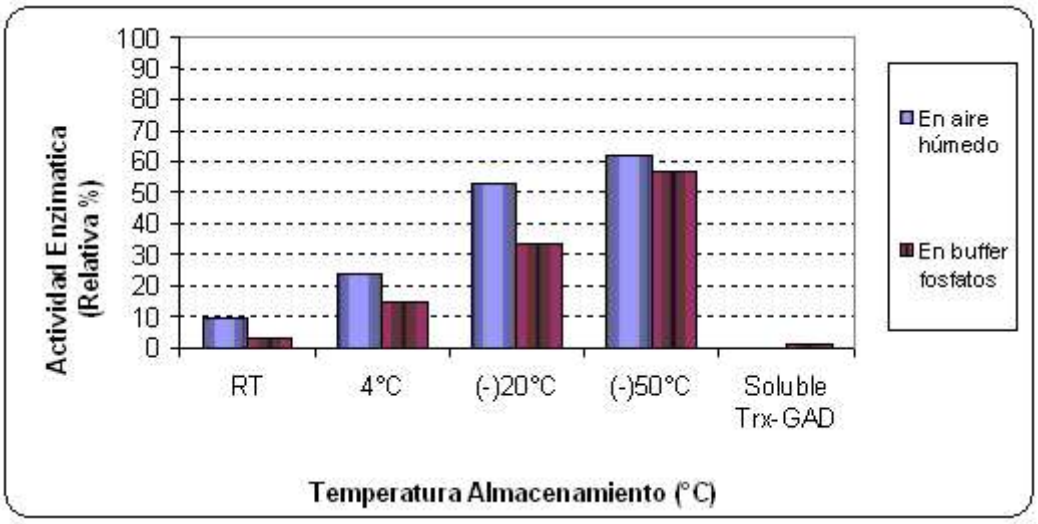


Figura 7.14 – Estudios de estabilidad - Evaluación de las condiciones de Almacenamiento (Día 8)

marcado radioactivamente (detallado en Apéndice C).

Una vez establecida la presencia de la GAD se prosiguió con la evaluación de las condiciones de almacenamiento del soporte mediante el seguimiento de la actividad enzimática, en períodos de 7 días. En la Figura 7.14 se muestra la evaluación de las condiciones de temperatura en función del entorno a los 8 días de almacenado. En todos los casos, la condición de almacenado en aire húmedo (condición S) resultó mejor que la condición de guardado en medio líquido (M), y ambas a su vez mantuvieron mayor actividad enzimática, con respecto a la condición inicial, que la proteína en solución (un 10 %).

En la Figura 7.15 se visualiza la variación de la actividad enzimática (%) en función del tiempo para las distintas condiciones de temperatura evaluadas, en la condición preestablecida de almacenado en ambiente húmedo (condición de entorno S). Según esta progresión, durante la primer semana de almacenado es cuando se registra la mayor pérdida en la actividad (desde un 90 hasta un 40 %). A menor temperatura de almacenado, mejor capacidad de conservación, aunque a lo largo de 55 días de experiencia se visualiza una tendencia común de todas las condiciones hacia la pérdida del 95 % de la actividad.

Es notable que durante un período de 8 días se pierde completamente la actividad en el caso de la proteína en solución a 4^{o}C, mientras esto no ocurrió en ningún caso para la Trx-GAD inmovilizada (Figuras 7.15 y 7.16).

La proteína inmovilizada en el soporte es más estable que en solución, sin embargo esta estabilidad es representativa dentro de los primeros 15 días, mientras que se requiere una estabilidad de meses para un producto que se quiera introducir al mercado. Esto implica la necesidad de estudiar el uso de aditivos que puedan mejorar las condiciones de almacenamiento hasta ahora a logradas.

Como desarrollo futuro se propone mejorar las condiciones de almacenado a -20 ^{o}C y/o

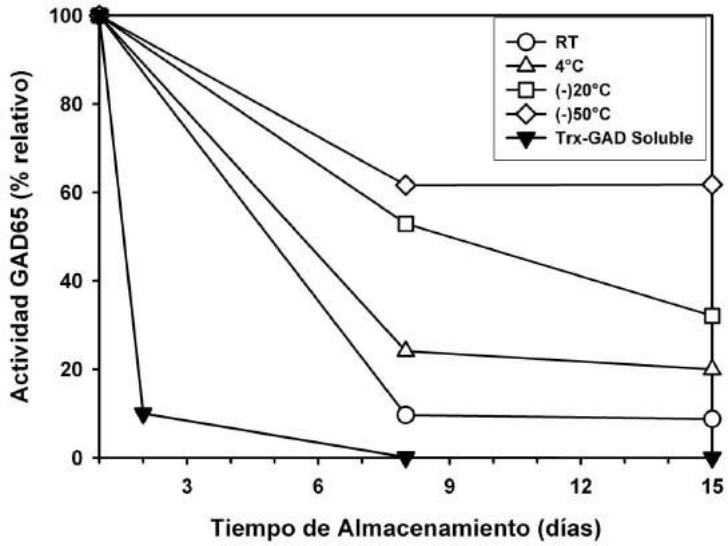


Figura 7.15 – Evaluación del Tiempo de Almacenamiento a diferentes temperaturas en la condición S (ambiente húmedo)

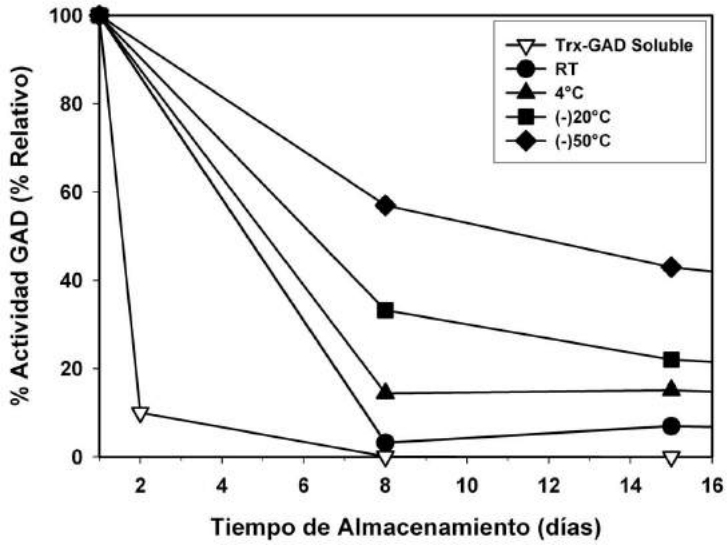


Figura 7.16 – Evaluación del Tiempo de Almacenamiento a diferentes temperaturas en la condición M (ambiente líquido)

a 4 ^{o}C (previendo la facilidad al acceso del público a tales condiciones de refrigeración en caso de lograr desarrollar el producto), contando con la presencia en el medio de aditivos que pudiesen preservan mejor la estabilidad de la proteína (cabe aclarar que las condiciones hasta ahora evaluadas fueron realizadas en soluciones simples). Entre las variantes de aditivos que se podrían a evaluar, ya sea en condiciones únicas y/o combinadas, se sugiere, el agregado de un antioxidante como el 2-aminoetilisotiouronio bromo (AET), de un detergente como el Tween20 (pues se trata de una proteína de membrana), del cofactor de la enzima (PLP) y/o de un criopreservante como la trehalosa. Todos ellos tuvieron un efecto positivo en la estabilización de la Trx-GAD65 en solución [20].

7.4. Conclusión

Es factible la inmovilización del precursor (ácido arsanílico) sobre las membranas modificadas y la posterior reacción de síntesis del PBMA *in situ*. Esto es una gran ventaja ya que la síntesis en fase sólida del ligando es mucho más limpia y sencilla.

En este capítulo también se describió la inmovilización de los compuestos arseniacales APAO y APACl. Ambas rutas de síntesis demostraron ser eficientes, siendo la inmovilización de APACl una opción interesante ya que no presenta tendencia a oxidarse como el APAO.

Se establecieron las condiciones óptimas de reacción en la inmovilización y en la síntesis del ligando. Es conveniente realizar la reacción de inmovilización a pH 5, aunque también puede ser a pH 8,5. El copolímero G/D presenta mejores condiciones que el copolímero G, lo cual es esperable ya que mediante el agregado de DMAA se logra un copolímero con mayor capacidad de adsorción.

El polímero injertado G/D mostró mayor capacidad de adsorber Trx frente a G. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para la inmovilización de Phe (capítulo II). Aunque en este caso también se muestra mayor accesibilidad de las proteínas al ligando inmovilizado.

Para nuestro sistema, fue obtenida una capacidad de Adsorción específica y reversible de Trx sobre los materiales desarrollados del orden de 1 mg/ml. Recientemente se ha publicado la síntesis de una membrana de afinidad con maltosa como ligando para la purificación de proteínas de fusión a MBP (proteínas de unión a maltosa). La capacidad determinada para estas membranas fue de aproximadamente 0,55 mg/ml [21]. La capacidad de adsorción específica obtenida para este sistema de afinidad es comparable con otros desarrollos similares.

Las reacciones de *blotting*, altamente específicas a Trx, permitieron demostrar inequívocamente la presencia del PBMA inmovilizado. Tanto las membranas sin ligando como las que tienen inmovilizado el precursor no presentaron señal positiva de presencia de Trx. La superficie polimérica injertada con G/D demostró una performance satisfactoria para su uso futuro como soporte de estado sólido en *kits* de inmunodetección.

Se ha comprobado la bioespecificidad PBMA como ligando de afinidad a Trx, proteína muy utilizada en la obtención de proteínas de fusión recombinantes en *E.coli*.

Se ha demostrado la inmovilización orientada de la HP-rTrx en dos orientaciones diferentes sobre los materiales de PSf modificados. La PSf macroporosa es primero modificada por injerto radioinducido, seguida de la inmovilización química de ligandos específicos.

La inmovilización de la Trx mostró una afinidad del orden de 10 veces menor que lo esperado según datos de bibliografía. Aunque en este caso la Kd corresponde a un sistema sólido-liquido donde la presencia de un soporte sólido puede afectar la interacción por impedimento estérico. Este hecho también se ve reflejado en el aumento de la k_{diss}. El agregado de un brazo espaciador podría ser necesario en caso de querer mejorar la adsorción al soporte.

Se ha establecido la aplicación potencial de estos materiales poliméricos como soportes específicos para reactivos de diagnóstico donde el mantenimiento de la estructura conformacional de la proteína de fusión es en muchos casos el factor crítico del ensayo. Las membranas, planas y de fibra hueca, injertadas y modificadas con un ligando de pseudo-afinidad a Trx desarrolladas pueden utilizarse como soporte para inmunodetección.

Referencias

[1] Müller-Schulte D. and Horster F. A. Radiation grafted polyethylene as carrier for protein immobilization. *Polymer Bulletin*, 7(8):395–399, 1982.

[2] Hoffman A. S., Gombotz W. R., Uenoyama S., Dong L. C., and Schmer G. Immobilization of enzymes and antibodies to radiation grafted polymers for therapeutic and diagnostic applications. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry. Special Issue Use of Radiation Technology for Immobilization of Bioactive Materials*, 27(4):265–273, 1986.

[3] Docters E. H., Smolko E. E., and Suarez C. E. Gamma radiation grafted polymers for immobilization of antigen in diagnostic test studies. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry*, 35(1-3):102–106, 1990.

[4] Ferreira L. M., Rocha J. M. S., Andrade M. E., and Gil M. H. Preparation and characterization of polyethylene based graft copolymers. applications in the immobilization of enzymes. In *Radiation Physics and Chemistry. Proceedings of the 10th International Meeting on Radiation Processing*, volume 52, pages 207–212, 1998.

[5] Safrany A. and Deelder A. Surface modification by electron irradiation for improved immunoassay. *Radiation Physics and Chemistry*, 55(5-6):681–684, 1999.

[6] Lu Z., DiBlasio-Smith E. A., Grant K. L., Warne N. W., LaVallie E. R., Collins-Racie L. A., Follettie M. T., Williamson M. J., and McCoy J. M. Histidine patch thioredoxins. mutant forms of thioredoxin with metal chelating affinity that provide for convenient purifications of thioredoxin fusion proteins. *J. Biol. Chem.*, 271(9):5059–5065, 1996.

[7] Papouchado M. L., Valdez S. N., Ghiringhelli D., Poskus E., and Ermacora M. R. Expression of properly folded human glutamate decarboxylase 65 as a fusion protein in escherichia coli. *Eur. J. Biochem.*, 246(2):350–359, 1997.

[8] Baekkeskov S., Aanstoot H., Christgai S., Reetz A., Solimena M., Cascalho M., Folli F., Richter-Olesen H., and Camilli P.-De. Identification of the 64k autoantigen in insulin- dependent diabetes as the gaba-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*, 347(6289):151–156, 1990.

[9] Papouchado M. L., Valdez, S. N., Ermacora M. R., Ganan S., and Poskus E. Highly-sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assays for gad65 autoantibodies using a thioredoxin-gad65 fusion antigen. *J. Immunol. Methods*, 207(2):169–178, 1997.

[10] Holmgren A. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J. Biol. Chem.*, 254(19):9627–9632, 1979.

[11] Maniatis T., Sambrook J., and Fritsch E. F. *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)*, 1989.

[12] Kubota N., Kounosu M., Saito K., Sugita K., Watanabe K., and Sugo T. Protein adsorption and elution performances of porous hollow-fiber membranes containing various hydrophobic ligands. *Biotechnology Progress*, 13(1):89–95, 1997.

[13] Invitrogen. *ThioBond^{TM} Resin*, 1998. Instruction manual. Version C 171027/ 25-0032.

[14] Kalef E. and Gitler C. Purification of vicinal dithiol-containing proteins by arsenical-based affinity chromatography. *Methods Enzymol.*, 233:395–403, 1994.

[15] Hannestad U., Lundqvist P., and Sorbo B. An agarose derivative containing an arsenical for affinity chromatography of thiol compounds. *Anal. Biochem.*, 126(1):200–204, 1982.

[16] Heuck A. P. and Wolosiuk R. A. Di-fluoresceinthiocarbamyl-insulin: a fluorescent substrate for the assay of protein disulfide oxidoreductase activit. *Anal. Biochem.*, 248(1):94–101, 1997.

[17] Cline D. J., Thorpe C., and Schneider J. P. Effects of as(iii) binding on alpha-helical structure. *J. Am. Chem. Soc.*, 125(10):2923–2929, 2003.

[18] Kitchin K. T. and Wallace K. Arsenite binding to synthetic peptides based on the zn finger region and the estrogen binding region of the human estrogen receptor-alpha. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 206(1):66–72, 2005.

[19] Donoghue N., Yam P. T., Jiang X. M., and Hogg P. J. Presence of closely spaced protein thiols on the surface of mammalian cells. *Protein Sci.*, 9(12):2436–2445, 2000.

[20] Antón E. A. Glutamato decarboxilasa recombinante: procedimiento para su conservación y liofilización. Master's thesis, Departamento de Ciencia y Tecnología; Universidad Nacional de Quilmes, 1998.

[21] Cattoli F. and Sarti G. C. Separation of mbp fusion proteins through affinity membranes. *Biotechnol. Prog.*, 18(1):94–100, 2002.

Parte IV

Conclusiones

Capítulo 8

Discusión General y Conclusión

En el plan de trabajo se propuso la obtención de nuevos materiales con propiedades adsortivas de pseudoafinidad para su uso en purificación de proteínas y como soporte para inmovilización de proteínas recombinantes para kit de diagnóstico.

Para tal fin se emplearon y evaluaron diferentes metodologías de activación de polímeros por radiaciones ionizantes con fuentes tanto de naturaleza corpuscular como de naturaleza electromagnética. Estas técnicas demostraron ser, en cuanto al grado de modificación, ampliamente superiores a la química de derivatización convencional.

Los materiales base modificados fueron polímeros sintéticos comúnmente utilizados en las tecnologías de micro y ultrafiltración como el polietileno de alta y baja densidad, polietilentereftalato y polisulfona. Se seleccionaron los monómeros GMA y DMAA para ser coinjertados en función de sus características funcionales. Se trabajó sobre la hipótesis de que el copolímero injertado sobre el material base comparta las propiedades deseadas de ambos monómeros: reactividad química y permeación (propiedades de filtración elevada) de las membranas injertadas con GMA y la hidrofilicidad de aquellas injertadas con DMAA.

En el capítulo II se desarrolló la metodología de modificación por injerto por pre-irradiación en vacío y se logró la obtención de un copolímero injertado en membranas macroporosas de fibra hueca de polietileno (PE) por medio de la activación por bombardeo con haces de electrones acelerados. Los % GI alcanzados en estas fibras fueron entre 20-200 %. Como ligando pseudoespecífico se incorporó fenilalanina y el grado de conversión (de grupo epoxi a ligando) alcanzado para el copolímero DMAA/GMA (2:1) fue cercano al 70 %.

En el capítulo III, se modificó PE incorporando AAm sobre los grupos peróxidos reactivos generados por la acción de rayos gamma de ^{60}Co utilizando la técnica de pre-irradiación en aire. En este caso la modificación resultó a nivel global, afectando a todo el material con su consecuente deformación macroscópica.

La técnica de injerto directa o en simultáneo fue desarrollada en el capítulo IV. Mediante esta técnica, utilizando rayos gamma de ^{60}Co como fuente de radiación, se modificaron varios polímeros base como PET y PSf incorporando sobre ellos GMA y mezcla de monómeros GMA/DMAA. Fue posible obtener membranas con elevada concentración de grupos químicamente reactivos y con gran superficie interna de adsorción (red polimérica tridimensional) aumentando el rendimiento en la inmovilización y en la capacidad de adsorción de este tipo de membranas.

En el siguiente y último capítulo sobre la modificación de materiales por radiaciones ionizantes, se estudió la combinación de dos metodologías: (i) el bombardeo con iones pesados acelerados y (ii) el injerto en simultáneo por irradiación γ. Sobre láminas de PET

de 12 μm de espesor, bombardeadas con iones pesados acelerados (Kr, fluencia de 3.10^9 iones/cm^2) y posterior marcado químico con álcali se generaron poros de diámetro en el rango de 50 nm a 60 nm. Luego se incorporaron poliacrilatos en la superficie de la traza mediante injerto en simultáneo. El espesor de injerto resultó en el orden de los 5 nm cuando se obtiene un GI del 1 %. Esto fue demostrado por las técnicas de SEM y SANS.

En la caracterización física y química de los nuevos materiales obtenidos, se utilizaron diversas técnicas para el análisis de superficie. Entre ellas la espectroscopía de IR de superficies (técnica de ATR) y microscopías ópticas y electrónicas (SEM y EDAX). En el caso de los materiales obtenidos a partir de trazas, se analizó también por la técnica de dispersión de neutrones a pequeños ángulos (SANS). A partir de los espectros de ATR-IR se determinó la composición del copolímero en base a la relación de señales características de los monómeros presentes. Con microfotografías electrónicas de superficie (SEM) se pudo evaluar el grado de modificación macroscópica de la superficie interna del polímero. Se complementa la caracterización con la obtención de imágenes de emisión de Rayos X (EDAX), que aportó datos sobre la presencia de nuevos elementos inmovilizados y la homogeneidad de la modificación.

De todas las técnicas estudiadas, la técnica de injerto en simultáneo resultó la más conveniente para continuar con el desarrollo de la segunda parte de este plan de trabajo dado que se obtuvo una modificación superficial. Las membranas modificadas que presentaron las mejores características de flujo, densidad de ligando inmovilizado y capacidad de adsorción se tomaron como base para incorporar ligandos específicos de naturaleza arseniacal. Estos compuestos arseniacales reaccionan con moléculas conteniendo tioles libres en su estructura química.

El compuesto amino-fenilarseniacal (APA) puede encontrarse en diferentes estados oxidativos (III) y (V), como óxido y ácido, APAO y APA (V), respectivamente. En el estado (III) también puede existir como derivado clorado (APACl). Este derivado es un intermediario de la reacción de síntesis de APAO a partir de APA (V), por lo cual fue necesario sintetizarlo y caracterizarlo en el laboratorio.

El compuesto arseniacal PBMA es la forma activa del ligando derivada de la reacción de APAO con β-ME. En el capítulo VI se sintetizó al PBMA por dos rutas sintéticas diferentes, a partir del precursor APAV. En la caracterización, se estudiaron las propiedades fisicoquímicas y espectroscópicas. Se caracterizó por RMN de C e H, por espectroscopía de masas, IR y UV. También se caracterizó por diferentes cromatografías (TLC y HPLC-RP), y se realizaron estudios que involucraron la interacción con moléculas sintéticas conteniendo ditioles. Dichos estudios permitieron obtener parámetros cinéticos y termodinámicos en el equilibrio. Se encontró que en presencia DTNB, y en función del pH, los aductos formados como el APA(III)-DTT y APA(III)-BAL se descomponen reversiblemente.

En el capítulo VII, se describe la derivatización de membranas de PSf injertadas con GMA y GMA/DMAA a las cuales se les incorporó APA (V) en medio neutro o levemente alcalino, con posterior reducción a PBMA mediante β-ME. También se estudió la incorporación de intermediarios de reacción para evaluar el rendimiento de reacción. Tanto el óxido como el derivado clorado poseen rendimientos similares. Este último presentó mejor solubilidad y mayor estabilidad frente al oxígeno.

Mediante determinaciones analíticas específicas se cuantificó la cantidad de ligando incorporado a la matriz y se calculó el grado de conversión epoxi-ligando alcanzado en cada uno de los casos. Obteniéndose hasta 90 μmoles de PBMA/ml de membrana, 430 μmoles de Ni(II)/ml de membrana y 590 μmoles de Cu(II)/ml de membranas.

Se determinaron las condiciones óptimas de adsorción específica de Trx (temperatura de reacción, tiempo de reacción, pH, entre otros). Este sistema se utilizó como sistema modelo de unión de proteínas para el ligando escogido. La presencia de la proteína se determinó por *western blot* utilizando anticuerpos anti-Trx siendo 0,5 ng de Trx la mínima cantidad de proteína detectable por cm^2. Con proteínas de fusión a Trx fue obtenido un desarrollo similar.

La capacidad máxima de adsorción de estas membranas fue del orden de 1 mg/ml. Este resultado es relevante si se lo compara con la capacidad determinada para una membrana de afinidad con maltosa como ligando para la purificación de proteínas de fusión a MBP (proteínas de unión a maltosa) donde resulta en aproximadamente 0,55 mg/ml.

Se comprobó la inmovilización orientada de proteínas sobre los polímeros porosos injertados de PSf desarrollados. La HP-rTrx fue inmovilizada en dos orientaciones distintas por mecanismos diferentes sobre los materiales de PSf modificados derivatizados químicamente. Estos mecanismos involucran la interacción de los tioles del motivo estructural proteico con el ligando específico PBMA y en el otro la interacción de un motivo de tres histidinas con IDA-Ni(II).

Mediante de la tecnología de Biosensor IASys® se realizó el análisis cinético de asociación/disociación y el estudio de la capacidad de unión en el equilibrio en el estado sólido para el sistema APA(III)-Trx. La Kd determinada resultó en un orden de magnitud mayor que las encontradas en literatura para el estado libre. Este fenómeno es asignado a un posible efecto estérico por la presencia de un soporte sólido.

Por último se evaluó la utilidad de las membranas con PBMA para inmovilizar una proteína de fusión a Trx de interés en diagnóstico médico. La Trx-Glutamato decarboxilasa (TrxGAD65) pudo ser inmovilizada detectándose la misma mediante el revelado con anticuerpos específicos y ensayos de actividad en estado sólido. La proteína inmovilizada mantuvo una actividad del 20 % a los 8 días de almacenamiento a 4 °C frente a una actividad nula en solución. En condiciones de menor temperatura de almacenamiento se llegó a mantener hasta un 60 % de la actividad sin el uso de aditivos preservantes.

Estos resultados promisorios permiten avizorar el uso de estos polímeros en el campo del diagnóstico en fase sólida.

Parte V

Anexos

Apéndice A

Estructura y Nomenclatura de polímeros

En la Tabla A.1 se resume la nomenclatura de la IUPAC de copolímeros según la secuencia de las unidades monoméricas A y B[1].

La tacticidad o distribución estereoespecífica de los sustituyentes sobre la cadena polimérica también puede ser tenida en cuenta utilizando los prefijos [iso], [syndio] y [a] para diferenciar entre isotacticidad (orientados sobre un mismo lado de la cadena), sindiotacticidad (regularidad alternada entre ambos lados) y atacticidad (distribuidos al azar sobre ambos lados), respectivamente.

[1]Pure and Appl. chem, 1985, 57, 1427 IUPAC Macromolecular Nomenclature Source-based Nomenclature for Copolymer 1985 IUPAC(`http://goldbook.iupac.org/P04740.html`).

Tipo	**Conector**	**Ejemplo**	**Descripción**	**Estructura Esquemática**
Inespecífico	*-co-*	poli(A-*co*-B)	Bipolímero sin secuencia específica.	
Estadístico	*-stat-*	poli(A-*stat*-B)	Son aquellos en el cual la distribución secuencial de las unidades monoméricas obedece leyes estadísticas conocidas; por ejemplo, puede seguir la estadística Markovian de cero (Bernoullian), primer, segundo, o de orden mayor.	...aabaaaabbabbbabaaabab...
Random o Arbitrario	*-ran-*	poli(A-*ran*-B)	Es un caso especial de copolímero estadístico. Donde la probabilidad de encontrar una unidad monomérica dada en cualquier sitio dado de la cadena es independiente de la naturaleza de las unidades vecinas a esa posición (distribución de Bernoullian).	...aaabaabbabbbabaaaba...
Alternado	*-alt-*	poli(A-*alt*-B)	Las unidades monoméricas se distribuyen en una secuencia alternada. Se representa el arreglo como -ABABABAB- o $(AB)_n$.	...abababababababab...
Periódico	*-per-*	poli(A-*per*-B)	Los monómeros aparecen periódicamente ordenados en la secuencia.	...abbabbabbabbabbabb...
Bloque	*-block-*	poli(A)-*block*-poli(B)	Presenta un arreglo lineal en bloque de sus componentes monoméricos. Un bloque se define como una porción de moléculas de polímero en el cual las unidades monoméricas poseen al menos características constitucionales o configuracionales ausentes de las porciones adyacentes.	a.....ab.....b
Injerto	*-graft-*	poli(A)-*graft*-poli(B)	Abarca bloques de moléculas de una o mas especies conectadas como cadenas laterales a la cadena principal. Estas cadenas laterales poseen características funcionales o configuracionales que difieren de la cadena principal. El primer monómero nombrado (A en este caso) representa a la cadena principal o polímero base y el segundo (B) representa a las cadenas laterales.	$...a-a-a.....a-a-a.....aa...$ $\quad\quad\quad

Apéndice B

Obtención de las proteínas Tioredoxina y de fusión Trx-Glutamato Decarboxilasa 65

B.1. Introducción

Las proteínas escogidas para el estudio de la interacción de los compuestos organoarseniacales son Tioredoxina (rTrx) de *Escherichia coli* y una proteína de fusión a Trx, la Trx-GAD65 (TrxGAD65).

En el presente Anexo se exponen brevemente las características de estas proteínas, así como también se desarrollan los procedimientos y consideraciones para la obtención y purificación de cada caso en particular.

B.2. Materiales y Métodos

En la obtención de las diferentes proteínas de trabajo, se siguen métodos y procedimientos de carácter general. En la Figura B.1 se exponen las etapas de este proceso integral. Cada una de ellas contempla la naturaleza y particularidad de cada proteína.

Para el seguimiento del proceso general, se utilizan métodos de determinación de proteínas totales, de actividad enzimática si la hubiese, seguimiento de la inducción y crecimiento bacteriano, y métodos de control de pureza que se resumen en la Tabla B.1.

En el Apéndice C se encuentran los materiales y métodos generales relacionados con proteínas.

B.3. Resultados y Discusión

B.3.1. Obtención de Trx de *Escherichia coli* recombinante

La Trx es una pequeña y estable enzima con actividad redox. Todas las tioredoxinas conocidas, de procariotas y eucariotas, poseen estructuras tridimensionales similares, que comprenden un núcleo central de cinco láminas-β rodeadas por cuatro α-hélices. Todas cuentan con un sitio activo conservado en bucle (Trp-Cys-Gly-Pro-Cys) que es un sello distintivo de las proteínas y que interviene en la formación y ruptura de enlaces disulfuro por reacciones de intercambio inter-proteínas [1].

Como sistema modelo se ha utilizado el sistema de expresión His-Patch ThioFusion™ (*Invitrogen*). El vector de expresión pThioHis incluye una versión modificada de la proteína

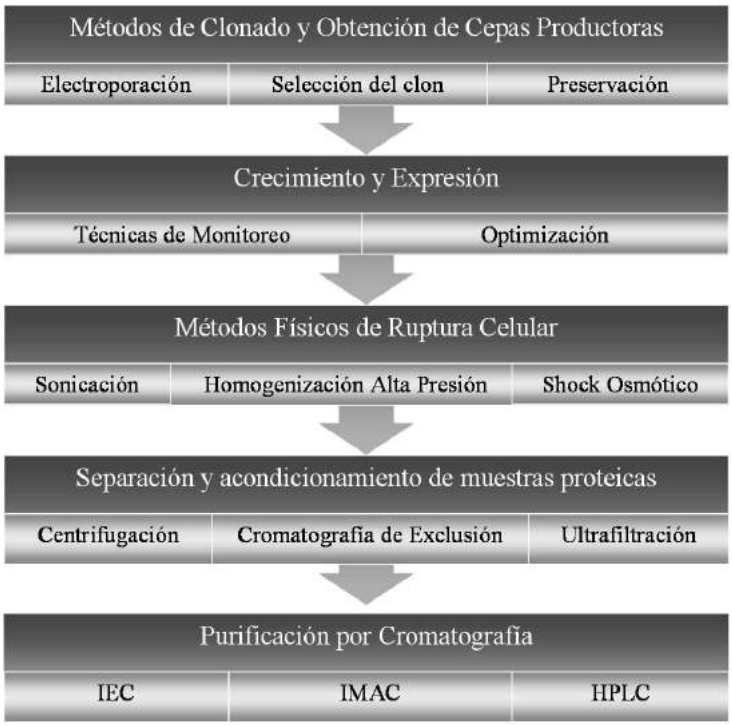


Figura B.1 – Cuadro Resumen. Proceso integral de obtención de proteínas

Métodos en común	
Métodos de determinación de Proteínas Totales	▪ Absorbancia en UV ▪ Colorimétricos
Métodos de determinación de Actividad Enzimática	▪ Trx: turbidimétrico y fluorométrico. Adaptación a microensayo ▪ TrxGAD56: radioisótopos
Métodos de Seguimiento en el Crecimiento e Inducción de cultivos	▪ Densidad óptica ▪ Determinación de glucosa residual ▪ Proteínas Totales y Actividad Enzimática ▪ Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
Métodos de control de Pureza	▪ Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Tabla B.1 – Resumen de los métodos en común utilizados para el seguimiento de las diferentes proteínas

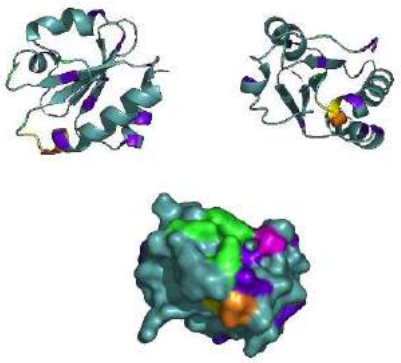


Figura B.2 – Esquema estructural de rTrx. *Sitio activo con motivo CXXC (naranja y amarillo); Patch de* ***Histidinas*** *(en verde); Residuos* ***Arginina*** *(en violeta),* ***Nt*** *(en magenta). Las figuras fueron realizadas con el programa PyMol con la secuencia en formato .pdb extraída del Gene Bank*

Trx de *E.coli* (trxA). La inclusión, por mutación, de un dominio de unión a metales (dado en la estructura terciaria por tres residuos histidina cercanos) en el gen de Trx permite facilitar la purificación de la proteína de fusión por cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC), en particular por IDA-Ni^{2+} (Figura B.2) [2]. También puede aprovecharse su actividad protein disulfuro reductasa (los residuos cisteína de su sitio activo que cataliza los intercambios tiol-disulfuro con los grupos sulfhidrilos o enlaces disulfuro de las proteínas sustrato) para purificar por afinidad utilizando un ligando inmovilizado que reaccione con los ditioles en el sitio activo de esta Trx (un ejemplo es el ligando oxido de fenilarsina en la resina comercial ThioBond).

La inclusión del sitio para enterokinasa más el sitio de clonado múltiple hacen que el peso molecular de esta Trx modificada sea de aproximadamente 16 kDa (siendo la Trx *wt* de 11,7 kDa).

Adaptación del método de determinación de actividad protein disulfuro reductasa de Trx por medio de turbidimetría a microensayo en microplacas: Sobre el ensayo estándar para la determinación de la actividad enzimática de Trx (ver sección C.2.1) se introduce una adaptación a microplacas. Para ello se llevó el volumen final de la mezcla de reacción a un quinto del volumen final estándar y la densidad óptica se establece en 595 nm. Se realizaron cinéticas de actividad sobre diluciones seriadas de Trx.

El rango óptimo en el cual se mantiene una buena correlación entre diluciones, se estableció entre 0,0252 mg/ml y 0,126 mg/ml de rTrx; y la linealidad del método en $y_{(ua/min)} = 0,1059x_{(mg/ml)} + 0,0047$; R^2=0,9837.

Crecimiento y Expresión de Trx Recombinante (rTrx): Sobre la cepa *E.coli* Top10 se aplicó la técnica de transformación bacteriana por electroporación para incorporar el vector de expresión *pThioHis C*. El plásmido *pThioHis C* y *E.coli Top10* son obtenidos de *Invitrogen* (Carlsbad, CA, USA). Se prosiguió con la selección del clon, purificación de plásmidos por el método de lisis alcalina (*miniprep*), y realización de mapas de restricción para confirmar presencia del plásmido correcto. Los clones positivos seleccionados se

cultivaron hasta saturación en medio Luria-Bertani (LB: 1 % triptona, 0,5 % extracto de levadura, 1 % NaCl) conteniendo 0,1 mg/ml de ampicilina a 37 °C, en agitación, según indicaciones del proveedor. Se generon *stocks* de almacenamiento, preservándolos a -80 °C en glicerol estéril al 10-15 % [3, 4]. Luego se prosiguió con el desarrollo, la optimización y caracterización de las condiciones de cultivo e inducción hasta lograr su máxima expresión en modo Batch.

En modalidad frasco agitado, las cepas de *E.coli* TOP10 previamente seleccionadas son cultivadas en LB conteniendo 0,1 mg/ml de ampicilina a 37º C en agitación (200-220 rpm). A 0,5 unidades de densidad óptica en 550 nm se añade el agente inductor isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG) en una concentración final de 0,5 mmol/L [4]. Las células son incubadas por 3 horas en las mismas condiciones, luego son recolectadas por centrifugación.

Una vez establecidas las condiciones se procede a **cultivar en batch en fermentador** de 5 litros Bioflo, alimentando con pulsos de glucosa y extracto de levadura en el inicio de la inducción. Se establece el tiempo final de la inducción entre 3 y 4 horas. La velocidad de crecimiento específica promedio (μ_{prom}) en frasco agitado en medio LB fue establecida en 0,52 ± 0,065 hs^{-1} (n=12) a partir del seguimiento en el tiempo por absorbancia en 550 nm. En Bioreactor Bioflo®, en las condiciones de crecimiento e inducción desarrolladas, fue de 0,74 ± 0,04 hs^{-1}.

La rTrx (ó también HP-rTrx) es recuperada de las células por medio de alguno de los métodos de ruptura descriptos a continuación (en función de las masas celulares obtenidas) y posteriormente es purificada por cromatografía en columna (IEC e IMAC).

Se utilizaron diferentes técnicas físicas de **ruptura celular**: sonicación, shock osmótico y homogenización de alta presión (APV). Para muestras de volúmenes pequeños el método de ultrasonido fue el apropiado, mientras que para muestras de volúmenes mayores se utilizó el homogenizador de alta presión. La homogenización de alta presión resultó ser la técnica escogida para la disrupción celular de los cultivos provenientes del bioreactor ya que por batch se obtuvieron pesos húmedos en células del 20 % p/v. Se estandarizó en 3 a 4 pasajes. Los extractos proteicos crudos provenientes del lisado celular fueron acondicionados por cromatografía de exclusión molecular ó por diafiltración.

En el caso de esta proteína, es recomendable proseguir con una **cromatografía DEAE** y posteriormente con la **cromatografía** de afinidad por iones metálicos **IMAC** (IDA-Ni^{2+}) [5]. Se logró un buen grado de purificación considerando solo IMAC (80 %) (Figura B.3). Con el protocolo completo de purificación se logró un 95 % de pureza (Figura B.4).

En la purificación de rTrx proveniente de cultivos de *E.coli* de alta densidad celular fue necesario invertir el tren de purificación en pos de mantener el rendimiento.

Por *batch* de 3 litros de cultivo, se producen aproximadamente 4 gramos de Trx y se recuperaron 100 mg con pureza >95 %. Este rendimiento puede ser mejorado si se logran identificar los puntos críticos.

B.3.2. Obtención de TrxGAD65

La preparación del pGAD65(Trx) y la expresión de la GAD65 (PM 77 kDa) como proteína de fusión a Trx fue realizada por Papouchado a partir del vector comercial de

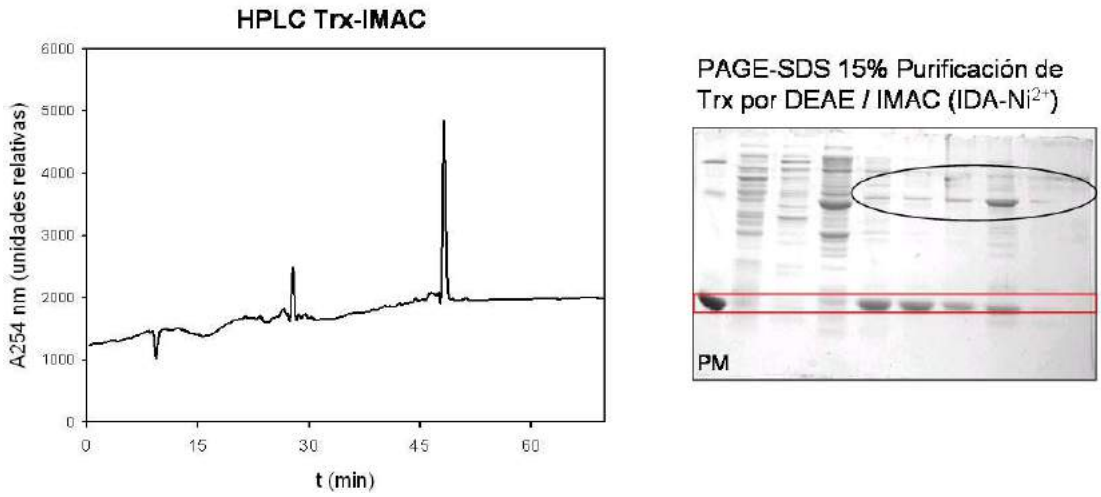


Figura B.3 – Análisis del proceso de purificación de rTrx en un solo paso a través de una IMAC (IDA-Ni^{2+}). *Cromatograma HPLC-RP y PAGE-SDS 15 %, factor de pureza estimado >80 %. Se observa a la Trx (recuadro) y a las proteínas contaminantes que son separadas por la DEAE (óvalo).*

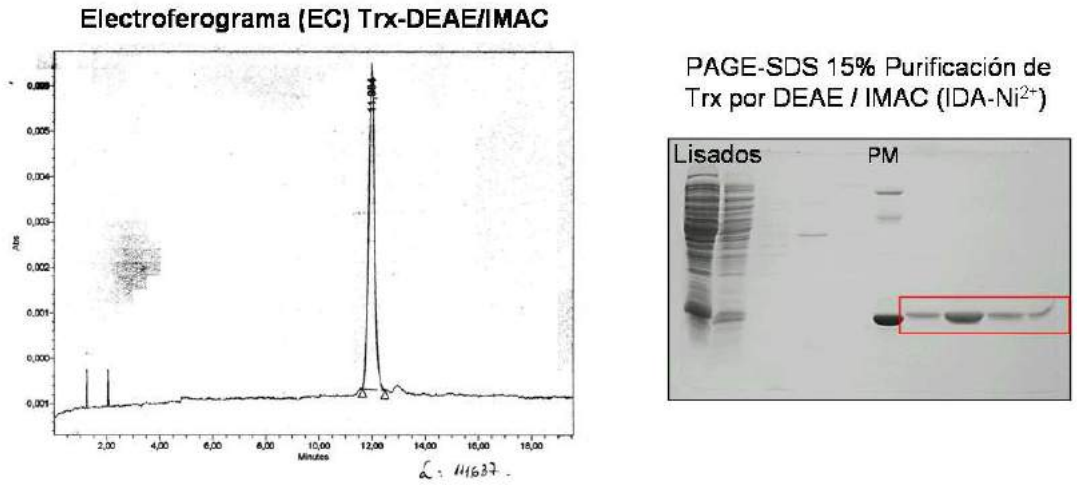


Figura B.4 – Análisis del proceso de purificación completo de rTrx por DEAE e IMAC (IDA-Ni^{2+}). *Electroferograma EC y PAGE-SDS 15 %, factor de pureza estimado >95 %.*

expresión en bacterias, pTrxFus (Invitrogen, San Diego, CA. USA) [6]. La construcción genética utilizada para su expresión en *E.coli* se esquematiza en la Figura B.5.

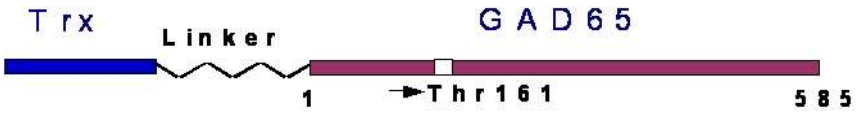


Figura B.5 – Esquema de la construcción genética para la expresión de GAD65 en *E. coli*.

En la obtención de los extractos crudos para la incubación con las membranas modificadas y posterior revelado con anticuerpos, se adopta el procedimiento seguido por el laboratorio del IDEHU. En términos generales, y siguiendo el protocolo de Papouchado, el crecimiento de la cepa productora de TrxGAD65 (*E.coli* GI698GAD) se realiza a partir del plaqueo del clon mantenido a -80 °C, con posterior repique en medio líquido e incubación a 30 °C [6]. Este cultivo se utiliza como inóculo (al 1 %) para el crecimiento e inducción en 200 ml de medio de cultivo fresco. La inducción se produce con Trp (0,1 mg/ml final) cuando la densidad óptica a 600 nm es de 0,5 a una temperatura de 30 °C hasta tiempo final 3 hs. Las células se cosechan por centrifugación a 7.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, y luego de descartar el sobrenadante, se resuspenden en 2 ml de buffer de corrida (50 mM Tris-HCl, pH 7; 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) suplementado con Aprotinina (0,01 mg/ml), PMSF (0,01 mM), β-ME (1 mM). La ruptura se realiza por dos ciclos de sonicación. Luego de la primer sonicación se agrega en frío 0,1 % de Tritón X100 y se mantiene 10 minutos en baño de agua/hielo. Se centrifuga a 12.000g ó 10.000 rpm por 15 minutos para separar el sobrenadante y sobre el *pellet* se agregan nuevamente 2 ml de buffer de corrida suplementado con Aprotinina, PMSF y β-ME. Se repite el procedimiento de ruptura, agregado de Tritón y recuperación del sobrenadante. Ambos sobrenadantes se juntan en una sola fracción y se agrega β-ME hasta concentración final de 5 mM.

El protocolo general de producción de bacterias, inducción, lisis bacteriana, purificación (resina Thiobond®) y recuperación de la TrxGAD65 fue llevado a cabo por la Bioquímica Silvina Valdez del IDEHU, Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA, en estrecha colaboración con nuestro grupo de trabajo [6].

La **purificación** de TrxGAD65 se lleva a cabo por medio de la resina Thiobond® según las indicaciones del proveedor [7]. Es preservada en glicerol al 5 %, PLP (0,2 mM), Tween20 (0,05 %), Aprotinina (0,01 mg/ml) y PMSF (0,05 mg/ml).

Se obtiene TrxGAD65 purificada de concentración aproximada 100 mM (0,2 mg/ml). Para los ensayos de inmovilización en los soportes es recomendable diluir la proteína purificada 10 veces con el buffer correspondiente suplementado con BSA (1 mg/ml).

Referencias

[1] Messens J., Van Molle I., Vanhaesebrouck P., Limbourg M., Van Belle K., Wahni K., Martins J. C., Loris R., and Wyns L. How thioredoxin can reduce a buried disulphide bond. *J. Mol. Biol.*, 339(3):527–537, 2004.

[2] Lu Z., DiBlasio-Smith E. A., Grant K. L., Warne N. W., LaVallie E. R., Collins-Racie L. A., Follettie M. T., Williamson M. J., and McCoy J. M. Histidine patch thioredoxins. mutant forms of thioredoxin with metal chelating affinity that provide for convenient purifications of thioredoxin fusion proteins. *J. Biol. Chem.*, 271(9):5059–5065, 1996.

[3] Maniatis T., Sambrook J., and Fritsch E. F. *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)*, 1989.

[4] Invitrogen. *His-Patch ThioFusion Expression system*, 1999. Instruction manual. Version C 171123/ 25-0120.

[5] Holmgren A. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J. Biol. Chem.*, 254(19):9627–9632, 1979.

[6] Papouchado M. L., Valdez, S. N., Ermacora M. R., Ganan S., and Poskus E. Highly-sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assays for gad65 autoantibodies using a thioredoxin-gad65 fusion antigen. *J. Immunol. Methods*, 207(2):169–178, 1997.

[7] Invitrogen. *ThioBond^{TM} Resin*, 1998. Instruction manual. Version C 171027/ 25-0032.

Apéndice C

Materiales y Métodos Generales en la Obtención de Proteínas

C.1. Métodos de determinación de proteínas totales

C.1.1. Absorbancia en UV

La absorción UV de las proteínas se debe a la presencia de los aminoácidos triptófano y tirosina, que poseen un máximo de absorción en las cercanías de 280 nm.

Se considera un coeficiente de extinción específico en 280 nm $\epsilon_{\text{promedio}}$ ó $\epsilon_{\text{proteínas}} = 1$ $(\text{cm.mg/ml})^{-1}$ para mezcla de proteínas; $\epsilon_{\text{Trx}} = 1{,}14$ $(\text{cm.mg/ml})^{-1}$ [1]; $\epsilon_{\text{Trx–GAD65}} = 1{,}13$ $(\text{cm.mg/ml})^{-1}$ [2].

El aporte por contaminación con ácidos nucleicos sobre la absorción a 280 nm puede ser corregido por medio de la determinación de la absorbancia a 260 nm utilizando la ecuación[1] **Proteína (mg/ml)= 1,55** A_{280} **- 0,76** A_{260} [3]. Cuando la relación A_{260}/A_{280} es de 1,8 también puede estimarse que un 5 % del valor de A_{280} corresponde a la cantidad de proteínas presentes en la muestra [4].

C.1.2. Colorimétricos

Bajo condiciones apropiadas, los grupos ácidos y básicos de las proteínas interactúan con grupos disociados de colorantes orgánicos (Orange G, Negro de Amida, Coomassie Brilliant Blue G-250, etc.) para formar precipitados coloreados.

Determinación de Bradford

Dependiendo de la unión a proteínas, preferentemente a residuos básicos (arginina) y aromáticos, el máximo de absorción del Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) se desplaza de 465 nm a 595 nm [5].

Procedimiento según fabricante para ensayo de Bradford en microplacas:

1. Mezclar 160 μl muestra con 40 μl reactivo de trabajo concentrado. Incubar 5 minutos a T° ambiente.

2. Lectura en fotocolorímetro a 595 nm. Color estable 60 minutos a T° ambiente.

[1] Este ajuste lineal es obtenido por el autor a partir de datos experimentales.

Linealidad: hasta 80 μg/ml;

Sensibilidad: 8 μg/ml.

Reactivos: Reactivo de trabajo concentrado: contiene CBB, ácido fosfórico y metanol. BSA estándar: 1 mg/ml.

Kit: *Bio-Rad Protein Assay®*.

Determinación de Biuret

Los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el ión cúprico en medio alcalino para dar un color violeta con máximo de absorción a 540 nm, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas [6].

Procedimiento según fabricante:

1. Mezclar 40 μl muestra mg/ml con 1,4 ml de reactivo de trabajo concentrado. Incubar 15 minutos a 37 °C.

2. Lectura en fotocolorímetro a 540 nm. Color estable 12 horas.

Sensibilidad: 0,2 mg/ml.

Linealidad: hasta 120 mg/ml.

Reactivos de trabajo: Suero patrón: 50 mg/ml. EDTA/Cu en NaOH; preparados según indicaciones del proveedor.

Kit: *Proti2® Wiener Lab.*

C.2. Métodos de determinación de actividad enzimática

C.2.1. Trx: Turbidimétrico. Adaptación a microensayo.

El procedimiento turbidimétrico se basa en la reducción de los enlaces disulfuro intercatenarios de la insulina y en la detección de la precipitación de la cadena B de esta proteína [7].

Para facilitar el procesado de las muestras, se realiza una adaptación del ensayo turbidimétrico a microensayo en microplacas.

Procedimiento para macroensayo

1. Buffer (300 mM fosfatos, 3 mM EDTA; pH 6,6): 330 μl
2. Muestra: x μl (donde x = 100, 125, 250 μl, etc.)
3. Agua destilada: (430-x) μl
4. Insulina (bovina, altamente purificada, corriente neutra 100 UI/ml, 27 U/mg, marca Betasint®, adquirida en el mercado local): 200 μl
5. DTT (10 mM): 40 μl (iniciador de reacción)
6. Mezclar y medir a intervalos de tiempo regulares (en minutos) a 650 nm.

Volumen de reacción: 1 ml

Procedimiento para ensayo en microplacas

1. Buffer (300 mM fosfatos, 3 mM EDTA; pH 6,6): 70 μl
2. Muestra: 50 μl
3. Insulina (bovina, altamente purificada, corriente neutra 100 UI/ml, 27 U/mg, marca Betasint® adquirida en el mercado local): 40 μl
4. DTT (2 mM): 40 μl (iniciador de reacción)
5. Mezclar y medir a intervalos de tiempo regulares (en minutos) a 595 nm.

Reacción a T° ambiente; Volumen final de reacción: 200 μl.

Rango óptimo: 0,148 a 0,361 UA/ml de Trx. Linealidad: $\mathbf{y}_{(UA/ml)} = 2,1176\mathbf{x}_{(mg/ml)} + 0,0947$; $R^2 = 0{,}9837$.

Una unidad de actividad de Trx (UA) se define como la cantidad de Trx que causa un incremento de la absorbancia en 595 nm de una unidad (ua) por minuto. [UA]= (ua/min).

C.2.2. Trx: Fluorométrico.

El método fluorométrico es un método alternativo para determinar la actividad de Trx [8, 9]. Se adapta el ensayo estándar para determinar actividad en el estado sólido (sobre el soporte modificado). La preparación y purificación de la *di-fluoresceintiocarbamil-insulina (di-FTC-insulina)* se llevan a cabo según el procedimiento de Heuck & Wolosiuk [10].

Procedimiento

1. Se sumergen 0,15 ml del material modificado con Trx adsorbida en 3 ml de solución de trabajo, se mantiene en agitación.

2. Se agrega DTT (0,1 mM concentración final) como iniciador de reacción.

3. A intervalos de tiempo regulares (minutos), el material es temporalmente removido para medir la intensidad de emisión de fluorescencia a 519 nm mientras se excita a 495 nm, en fluorómetro de mesa Perkin Elmer.

Una unidad de actividad de Trx (ua) se define como la cantidad de enzima que transforma un μmol de *diFTC-insulina* por minuto y se expresa como el incremento en la emisión de fluorescencia en el tiempo [ua] = (Δ[(F-F_0)/F_0]/min). Cuando se normaliza a 1 ml de muestra se denomina UA.
Temperatura de reacción: 22 °C.
Solución de trabajo: 100 mM fosfatos, pH 7,5; 0,5 mM EDTA; 0,2 μM *diFTC-insulina.*

C.2.3. TrxGAD65: radioisótopos. Adaptación a estado sólido

La GAD cataliza la decarboxilación del ácido glutámico generando ácido γ-aminobutírico (GABA) y CO_2. Para el ensayo se utiliza L-[1-^{14}C] ácido glutámico. El $^{14}CO_2$ desprendido es cuantificado en un contador de centelleo líquido [11, 12, 13].

Procedimiento

1. En tubos de vidrio cónicos, se agrega:

   a) Buffer AE (2X), 100 μl.

   b) agua destilada, 98 μl (u 88 μl para proteínas en solución)

   c) reactivo marcado, 2 μl (ácido Glutámico NEC-290E, L-[^{14}C(1)], 1999; Perkin Elmer, NEN, MA, USA) de actividad específica 250 mCi/mmol.

   d) soporte modificado con proteína inmovilizada (ó 10 μl de proteína en solución)

2. Luego se introduce en el tubo un papel Whatman 3MM embebido con 30 μl Tiamina (1M en metanol), evitando el contacto con la solución, y tapando con tapón de goma.

3. Se incuba 30 minutos en baño a 37 ^{o}C con agitación.

4. Se detiene la reacción inyectando 250 μl de H_2SO_4 2M, a través del tapón de goma, sin tocar el papel. Se incuba 1 hora en baño a 37 ^{o}C con agitación.

5. Se transfiere el papel de filtro a un vial con 2 ml de líquido de centelleo para radiación β y se coloca en el contador de centelleo líquido (*Liquid Scintillator Analizer Model 1600TR*, Packard, Canberra, Australia).

Buffer AE (2X): PB 100 mM, pH 7,2; cofactor PLP 0,4 mM; antioxidante AET 2 mM, EDTA 2 mM, Glutámico frío 40 mM.

Para mantener la homogeneidad en los resultados se mantiene todo en frío hasta el momento de incubar a temperatura de reacción, pues ésta comienza inmediatamente al agregar la GAD.

Las unidades registradas por el contador requieren de una ecuación que contempla factores internos de conversión para poder expresarlas en unidades enzimáticas. La deducción lleva a la siguiente ecuación de transformación:

$$[U/min.cm^2] = X * A/(B * C) \tag{C.1}$$

Donde,

X: cuentas, en dpm.

***A*:** 5714 μmol totales de CO_2/μmol $^{14}CO_2$

***B*:** 1,25.10^{11} dpm/mmol de $^{14}CO_2$ * 1000 μmol $^{14}CO_2$/mmol $^{14}CO_2$.

***C*:** factor de corrección que contempla el tiempo de reacción (30 min) y el área superficial (0,2 cm^2), siendo C = 6 min.cm^2.

Se define una unidad enzimática en el estado sólido como: 1U = 1 μmol $^{14}CO_2$ /minuto a 37 ^{o}C por cm^2.

Para estandarizar el área expuesta, el polímero modificado fue fraccionado en pequeños círculos de 0,5 cm de diámetro (área 0,2 cm^2). Polímero Plano 10 injertado con GMA derivatizado con PBMA.

En la determinación de actividad específica, la concentración proteica se estima por medición de absorbancia a 280 nm.

C.3. Métodos para el seguimiento del crecimiento celular e inducción

C.3.1. Determinación de la velocidad de crecimiento de las células

El crecimiento celular es monitoreado por seguimiento del aumento en la densidad óptica (DO), midiendo la dispersión de la suspensión celular a 550 nm de longitud de onda.

Se define velocidad de crecimiento específica μ como $\mu = d[ln(DO_{550nm})]/dt$, siendo [$\mu$]=1/h.

C.3.2. Determinación enzimática de consumo de glucosa

La glucosa de la muestra es oxidada a ácido glucónico por acción de la glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno producido, en presencia de peroxidasa, 4-AF y fenol, forma una quinoneimina con un pico de absorción a 505 nm. La intensidad de color es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

Condiciones de Reacción

1. Mezclar 200 μl de muestra con 800 μl de reactivo de trabajo. Incubar 15 minutos a 37^{o}C. En ensayo en microplaca se mantiene la proporción siendo 160 μl reactivo + 40 μl muestra.

2. Leer en espectrofotómetro a 505 nm o fotocolorímetro (a 490 nm ó a 530 nm). Color estable por 60 minutos.

Linealidad: hasta 4,5 g/L;

Sensibilidad: 0,03 g/L (a 505 nm).

Glucosa estándar: 1 g/L. Diluciones de trabajo: 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0 g/L.

Kit: GT Lab. Método GOD/PAP Trinder Color® Wiener Lab.

Reactivos de trabajo: mezcla de los reactivos 4-AF (4-aminofenazona en buffer tris), Fenol y GOD/POD (glucosa oxidasa y peroxidasa) preparados según indicaciones del proveedor.

C.3.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Realizada según el método de Laemmli modificado para PAGE-SDS discontinuo.

Características generales: Gel concentrador (*"stacking"*) 5 % de acrilamida. Geles de separación (*"running"*) al 12 %, 15 %, y 18 % de acrilamida, según el caso. Espesor del gel: 0,75 mm. Fuente de poder con corriente constante: 11-12 mA/ unidad de gel. Tinción con *Coomasie Blue R250* 0,3 %, en solución de etanol: ácido acético: agua (3:1:6). Decoloración con solución de etanol: ácido acético: agua (3:1:6).

Tratamiento sobre las muestras a analizar: según la concentración, se diluyeron al medio con un volumen de Buffer de Muestra (2X), o al cuarto con 3 volúmenes de muestra y un volumen de Buffer de Muestra (4X). Luego son sometidas a tratamiento térmico (baño de agua 100 °C por 1-2 minutos) y pulso de centrifugación, previo a sembrar en el gel. Salvo que se indique lo contrario, para todos los casos el volumen de siembra es de 30 μl/calle.

Patrón de pesos moleculares (PM): 1 mg/ml Lisozima (Lz, 14.300 Da); 1 mg/ml β-Lactamasa (β-Lac wt, 30.000 Da); 1,2 mg/ml Ovoalbúmina (OvA, 45.000 Da); 1 mg/ml Seroalbúmina Bovina (BSA, 66.000 Da). Siembra del PM: 5-25 μg/calle.

Composición de las soluciones madre: 30 % acrilamida/ 0,8 % bisacrilamida; Buffer 0,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS, pH 6,8 (4X); Buffer 1,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS, pH 8,8 (4X); Buffer de Muestra 0,1 M Tris-HCl, 24 % glicerol, 0,01 % azul de bromofenol, 8 % SDS, pH 6,8 (2X); Buffer de Electroforesis 0,6 % Tris, 2,9 % Glicina, 0,1 % SDS (1X). APS 10 %, TEMED. Todos reactivos de grado analítico.

Densitometría del SDS-PAGE Se utiliza el *software* (Kodak) Sigma Gel. Tomando como referencia al patrón de peso molecular, se realiza una estimación de concentración de proteínas en base a la intensidad de color sobre la imagen digitalizada.

C.4. Métodos de clonado y obtención de las cepas productoras

Se utilizaron los procedimientos y técnicas estandarizados según manuales de los proveedores. En cada caso en particular de las proteínas desarrolladas, si es requerido, se amplia descripción en la sección correspondiente.

C.4.1. Crecimiento y Expresión

Optimización de las condiciones de cultivo (nutrientes, tiempos de crecimiento e inducción, concentración de inductor). Crecimiento en modo batch [14, 15, 16].

Cultivo en Bioreactor (modo Batch)

1. ***Inóculo***: a partir del stock preservado a -80 °C en frasco agitado en el medio de cultivo correspondiente, suplentado con antibiótico selector (0,1 μg/ml). Incubación toda la noche a 37 °C, en agitación a 200 r.p.m. en *shaker*.

2. ***Crecimiento***: transferencia del "Inóculo" (2 - 2,5 % final) al reactor de 5 litros New Brunswick (BioFloIII) conteniendo 3L de medio fresco con antibiótico (100 μg/ml). Incubación a 37 °C manteniendo el oxígeno disuelto (O.D) mayor a 30 %. El pH se mantiene entre 6,8 con NH_4OH 12,5 %.

3. ***Inducción***: La DO_{550} en la cual se agrega el inductor varía según la cepa de trabajo. Se añade al cultivo celular, junto con el inductor, glucosa (5 g/L) y extracto de levadura (5 g/L). Inducción hasta tiempo final preestablecido según el caso.

4. ***Cosecha***: Se mide el volumen final de cultivo y se procede a recuperar las células por centrifugación, a 5^{o} C, 12 minutos a 10.000 rpm (15300g en rotor JA-14, Beckman J2-MC). Descarte del medio de cultivo, resuspensión y lavado con buffer fosfatos 30 mM pH 7. Centrifugar nuevamente y descartar el sobrenadante. Si no son procesados en el momento, los *pellets* celulares se mantienen en -20 °C.

Análisis del proceso: El monitoreo del crecimiento celular se realiza según lo descrito en el ítem C.3 por medio de DO_{550nm}, determinación de glucosa remanente, proteínas totales, actividad enzimática y PAGE-SDS.

C.5. Métodos físicos de ruptura celular

C.5.1. Por ultrasonido (sonicación)

Procedimiento

1. El *pellet* celular de cada tubo se resuspende en 0,5 ml de Buffer de Lisis frío (mantenido en baño de agua/hielo, 0-4 °C). *Buffer de Lisis Trx*: 20 mM Tris-HCl, pH 8; 2,5 mM EDTA; 5 mM imidazol; 0,5 μg/ml PMSF.

2. Sonicación: 3 pulsos de ultrasonido de 15 segundos con intervalos de reposo de 10 segundos a 3-4 watt de potencia de trabajo, en frío.

3. Luego de los ciclos de sonicado, se clarifica la muestra por medio de una centrifugación de 10 minutos a 14.000 rpm, a 4 °C (microcentrífuga de mesa). Se recupera el sobrenadante y se procede con los métodos analíticos correspondientes.

C.5.2. Shock Osmótico

La permeabilidad celular involucra tres pasos principales: i) cosecha y lavado de las células; ii) equilibrado con solución hipertónica; y iii) shock osmótico. Se utilizaron las condiciones estándar del protocolo citado en el trabajo de Fonseca et al [17].

C.5.3. Homogenizador de Alta Presión

Homogenizador APV-1000 Invensys. Presión de trabajo: 800 bar; Flujo: 22 L/h. Estandarizado en cuatro pasajes de ruptura, con control de la temperatura de la muestra a la entrada y salida del homogeneizador. Alimentación con una suspensión celular de aproximadamente 30 % peso húmedo en buffer adecuado, sin aglomeraciones sólidas.

C.6. Separación y acondicionamiento de las muestras proteicas

C.6.1. Ultrafiltración (UF) y Diafiltración

Materiales

Cartuchos para UF/Diafiltración: *Hemoflow F4*. Dializador capilar. *Fresenius Polysulfone*® UF 2.8 (15kD) y Cartucho *Sartorius*® (10kD). Bomba peristáltica: *Watson Marlow*. Mangueras *MasterFlex* o equivalentes. Lisado bacteriano proveniente del paso de ruptura y previamente filtrado de ser necesario. Buffer de acondicionamiento (buffer A), generalmente buffer fosfatos (BP) 10-30 mM pH 7.

Procedimiento Ultrafiltración

1. Se determina el flujo de recirculación con agua destilada y luego el flujo de filtración. Se ajusta la presión para obtener un flujo de filtración de aproximadamente 10 ml/min (Cartucho *Hemoflow*).

2. Se lleva a volumen final 3-4 veces el volumen inicial de la muestra inicial con el buffer de acondicionamiento.

3. Determinación de proteínas totales y actividad enzimática en el crudo, filtrado y en el concentrado, para obtener los parámetros del proceso y verificar la eficiencia del método.

4. Realización de 2 ó 3 ciclos de UF, hasta lograr las condiciones finales requeridas para el paso siguiente del proceso.

Procedimiento Diafiltración

Ídem UF, sólo que se mantiene el volumen del recirculado al final del proceso igual al volumen inicial (no se concentra). Utilizado como opción para el desalado de soluciones proteicas.

C.6.2. Cromatografía de Exclusión (SEC): separación de grupos (desalado y cambio de buffer)

Materiales

Columna XK50: Sephadex G-25 (gruesa), con rango de fraccionamiento de proteínas globulares entre 1000-5000. Volumen de lecho (VC): 370 ml (diámetro de columna: 5 cm). Columnas PD10 (*Pharmacia Biotech, Suecia*): Sephadex G-25. VC: 8,8 ml.

Procedimiento PD10

1. Lavado con agua destilada 1 VC
2. Equilibrado con buffer de trabajo 1 VC.
3. Siembra de 2,5 ml de muestra
4. Elución con 3,5 ml de buffer de trabajo.
5. Lavado y reacondicionamiento de la matriz para su preservación en etanol 20 %.

Procedimiento Columna XK50

1. Lavado de la columna con agua destilada con 1-2 VC. Establecimiento del Flujo volumétrico de trabajo: 20 ml/min. (2-3 VC/hora). Cálculo del flujo lineal del proceso.
2. Equilibrado con el Buffer de trabajo A. Mínimo volumen para el equilibrado: 1VC
3. Siembra de muestra, volumen máximo 30 % VC.
4. Elución con 1 VC Buffer A. Recolección en fracciones de 50 ml. Seguimiento por A_{280nm} y por conductimetría.
5. Acondicionamiento para la preservación de la matriz: lavado con agua (1 VC) y luego con etanol al 20 % en agua destilada (1 VC).
6. Cromatogramas: Absorbancia y Conductividad *vs* volumen acumulado (volumen de eluído). Absorbancia y Conductividad *vs* la relación volumen de eluído/volumen total (Ve/Vt). Cálculo del % de recuperación. Selección de fracciones.

C.7. Purificación por cromatografía

C.7.1. Cromatografía de Intercambio Iónico (IEC)

Materiales

Matriz: DEAE Sepharose™ Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech AD, Uppsala Sweden). Columna mediana tipo Sigma: Volumen de lecho (VC): 9,7 ml (diámetro de columna: 1,5 cm). Columna pequeña Sigma: VC: 2,4 ml (diámetro de columna: 1 cm).

Procedimiento

1. Equilibrado con 10 VC con buffer $BP_{trabajo}$ (30 mM fosfatos, pH 7 para Trx).
2. Siembra: carga máxima 10 mg proteína/ml de matriz.

3. Lavados con $BP_{trabajo}$, con 2 VC o hasta A_{280nm} 0,1. Recolección de fracciones de 0,5 VC.

4. Elución por medio de gradiente salino en etapas. NaCl 100 mM, 300 mM y 500 mM. Recolección en fracciones de 0,5 VC. Se monitorea por medida de absorbancia a 280 nm y por actividad enzimática (se considera $\epsilon_{proteína}$= 1 $(cm.mg/ml)^{-1}$).

5. Lavado y acondicionamiento de la columna para su almacenamiento

Materiales

Matriz: SP-FF y CM Sepharose^{TM} FF (Amersham Pharmacia Biotech AD, Uppsala Sweden). Columna mediana tipo Sigma: Volumen de lecho (VC): 9,7 ml (diámetro de columna: 1,5 cm). Columna pequeña Sigma: VC: 2,4 ml (diámetro de columna: 1 cm).

Procedimiento

1. Equilibrado con 10 VC con buffer $AcONa_{trabajo}$ (10 mM Acetato de Sodio, pH 4,9).

2. Siembra: carga máxima 10 mg proteína/ml de matriz.

3. Lavados con $AcONa_{trabajo}$, con 2 VC o hasta A_{280nm} 0,1. Recolección de fracciones de 0,5 VC.

4. Elución por medio de gradiente salino. NaCl 100 mM, 300 mM y 500 mM. Recolección en fracciones de 0,5 VC. Se monitorea por medida de absorbancia a 280 nm y por actividad enzimática (se considera $\epsilon_{proteína}$= 1 $(cm.mg/ml)^{-1}$).

5. Lavado y acondicionamiento de la columna para su almacenamiento

C.7.2. Cromatografía de afinidad por iones metálicos IMAC

Materiales

Resina IDA (Pharmacia). Metal: Ni^{2+}. Columna pequeña sigma: Altura, 2,5 cm; Diámetro de columna, 1 cm. Volumen de columna: 2 ml. Columna preparativa XK-50: Diámetro de columna: 5 cm. Volumen de columna: 100 ml.

Condiciones de trabajo: Flujo lineal: 1,27 cm/min (flujo: 20 ml/min).

Procedimiento

1. Volumen de siembra: carga máxima 10 mg proteína/ml de matriz.

2. Lavado con buffer de siembra (30 mM fosfatos, pH 7; 500 mM NaCl), hasta A_{280nm} 0,1.

3. La elución se realiza con gradiente escalonado de Imidazol (50, 100, 200 y 500 mM) hasta A_{280nm} 0,1. Recolección de fracciones equivalente a un volumen de columna. La segunda opción de elución es mediante gradiente escalonado de pH (pHs 7, 6, 5 y 4), en 30 mM fosfatos, 500 mM NaCl.

4. Se monitorea por medida de absorbancia a 280 nm y se evalúa la actividad enzimática en las fracciones más representativas de cada paso. Verificación por PAGE-SDS 15 % para comprobar pureza.

Reconstitución y acondicionamiento de la Columna IDA-Ni^{+2}

1. Lavado con EDTA 100 mM, pH 7. Lavado con agua destilada.

2. Adición del metal ($NiCl_2.6H_2O$ 5 %). Lavado con agua destilada

3. Acondicionamiento con buffer (30 mM fosfatos, pH 7; 500 mM NaCl).

4. Después de usar, se lava con NaCl 1 M, agua destilada y luego buffer fosfatos 30 mM, pH 7 y etanol 20 %. Preservado en cámara fría (4 °C).

C.8. HPLC

Confirmación por RP-18 HPLC del porcentaje de pureza alcanzado. Solvente: mezcla agua:acetonitrilo, 0,1 % TFA; gradiente 20 a 80 % Acetonitrilo.

C.9. Electroforesis Capilar (EC)

El empleo de un microextractor monolítico modificado con IDA-Cu(II), acoplado en línea con el tubo capilar EC, permite a la retención selectiva y la separación de péptidos conteniendo histidinas [18]. Este método de separación por afinidad, si bien fue estandarizada para péptidos, puede resultar una herramienta analítica alternativa en el control de pureza en el caso de la HP-rTrx.

La EC es realizada en colaboración con el grupo de trabajo de la Dra. Nora Vizioli con el sistema *Capillary Ion Analyzer* (Waters, Milford, MA, USA). Los datos son procesados mediante el software Millennium™ 2010 (Waters). El sistema de EC es termostatizado a temperatura constante de 25 °C. Para la introducción de muestras y soluciones de elución se utiliza inyección hidrostática (diferencia de altura 10 cm). Detección UV a 214 nm (lámpara de mercurio). Solución de elución: 5 mM Imidazol.

Referencias

[1] Lu Z., DiBlasio-Smith E. A., Grant K. L., Warne N. W., LaVallie E. R., Collins-Racie L. A., Follettie M. T., Williamson M. J., and McCoy J. M. Histidine patch thioredoxins. mutant forms of thioredoxin with metal chelating affinity that provide for convenient purifications of thioredoxin fusion proteins. *J. Biol. Chem.*, 271(9):5059–5065, 1996.

[2] Antón E. A. *Obtención y caracterización de variantes de Glutamato decarboxilasa humana.* PhD thesis, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, 2006.

[3] Layne E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in Enzymology*, 3:447–454, 1957.

[4] Maniatis T., Sambrook J., and Fritsch E. F. *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)*, 1989.

[5] Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248–254., 1976.

[6] Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193(1):265–275, 1951.

[7] Holmgren A. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J. Biol. Chem.*, 254(19):9627–9632, 1979.

[8] Heuck A. P. *Estudio del intercambio tiol/disulfuro en las proteínas. Caracterización y análisis de la Protein Disulfuro Isomerasa de colza (Brassica napus).* PhD thesis, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Instituto de Investigaciones Bioquímicas. Universidad de Buenos Aires, 1997.

[9] Heuck A. P. and Wolosiuk R. A. Di-fluoresceinthiocarbamyl-insulin: a fluorescent substrate for the assay of protein disulfide oxidoreductase activit. *Anal. Biochem.*, 248(1):94–101, 1997.

[10] Heuck A. P. and Wolosiuk R. A. Fluoresceinthiocarbamyl-insulin: a potential analytical tool for the assay of disulfide bond reduction. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 34(3):213–225, 1997.

[11] Wu J. Y., Matsuda T., and Roberts E. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from mouse brain. *J. Biol. Chem.*, 248(9):3029–3034, 1973.

[12] Antón E. A. Glutamato decarboxilasa recombinante: procedimiento para su conservación y liofilización. Master's thesis, Departamento de Ciencia y Tecnología; Universidad Nacional de Quilmes, 1998.

[13] Sha D., Wei J., Wu H., Jin Y., and Wu J. Y. Molecular cloning, expression, purification, and characterization of shorter forms of human glutamic decarboxylase 67 in an e. coli expression system. *Brain. Res. Mol. Brain Res.*, 136(1-2):255–261, 2005.

[14] Mori H., Yano T., Kobayashi T., and Shimizu S. High density cultivation of biomass in fed-batch system with do-stat. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 12(4):313–319, 1979.

[15] Riesenberg D., Menzel K., Schulz V., Schumann K., Veith G., Zuber G., and Knorre W. A. High cell density fermentation of recombinant escherichia coli expressing human interferon alpha 1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34(1):77–82, 1990.

[16] Kleman G. L., Chalmers J. J., Luli G. W., and Strohl W. R. Glucose-stat, a glucose-controlled continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(4):918–923, 1991.

[17] Fonseca L. P. and Cabral J. M. S. Penicillin acylase release from escherichia coli cells by mechanical cell disruption and permeabilization. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 77:159–167, 2002.

[18] Vizioli N. M., Rusell M. L., Carbajal M. L., Carducci C. N., and Grasselli M. On-line affinity selection of histidine-containing peptides using a polymeric monolithic support for capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 26:2942–2948, 2005.



Los materiales funcionales avanzados son altamente demandados por diferentes campos para una amplia variedad de aplicaciones. Campos que abarcan desde la biocatálisis hasta la cromatografía, y del diagnóstico hasta los sensores.

La propuesta es obtener nuevos materiales con propiedades superficiales modificadas que establezcan una interacción específica con proteínas naturales y recombinantes. Estos materiales poliméricos tienen una aplicación directa en los sistemas de purificación de proteínas y en sistemas de diagnóstico.

M.L.C.

Universidad Nacional de Quilmes
CONICET Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas