



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



Universidad  
Nacional  
de Quilmes

Soto Espinoza, Silvia L.

# Nanoconductos biohíbridos en membranas poliméricas de poros perfectos



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:*

Soto Espinoza, S. L. (2018). *Nanoconductos biohíbridos en membranas poliméricas de poros perfectos. (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/20.500.11807/861>

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

## **Nanoconductos Biohíbridos en Membranas Poliméricas de Poros Perfectos**

*TESIS DOCTORAL*

**Silvia L. Soto Espinoza**

sl\_soto@yahoo.com.ar

### **Resumen**

Las membranas poliméricas de poros/conductos perfectos, son estudiadas desde 1970 y se comercializan desde hace tres décadas, siendo los principales campos de aplicación la filtración, purificación y análisis de partículas en aire. No obstante, la evolución de la nanotecnología permitió desarrollar membranas con mejores rendimientos, nuevas funcionalidades y aplicaciones, como por ejemplo, en biocatálisis, separación selectiva de moléculas, detección de moléculas, biosensores y molde para construir otras estructuras nanométricas.

Por otro lado, el polietilentereftalato (PET) es un polímero que se caracteriza por tener una gran resistencia a agentes químicos, excelentes propiedades ópticas, bajos costos de fabricación, es biocompatible, hemocompatible y antimicrobiano, que lo hacen útil para diversas aplicaciones biológicas.

Dentro de este contexto, se presenta en este trabajo la preparación de membranas poliméricas de PET con nanoporos perfectos funcionalizados. Se estudió la preparación de membranas tipo track-etched mediante el proceso de grabado químico, evaluándose el efecto de las variables del proceso (temperatura, concentración del álcali, tiempo de incubación y el pretratamiento con luz UV). Se realizó la caracterización de las mismas mediante diferentes técnicas fisicoquímicas. Todas las variables estudiadas afectaron el diámetro final de los poros. Se obtuvieron membranas con poros de diámetro en un rango de 25 nm a 500 nm, con una distribución muy homogénea. Asimismo, las micrografías obtenidas por FESEM de cortes transversales de la membrana, permitieron determinar que los nanoconductos formados son cilíndricos y atraviesan toda la membrana, como se había predicho en base a las simulaciones usando el código computacional SRIM.

Para realizar estudios funcionales se desarrolló ad-hoc un dispositivo de microceldas (MCD), con el fin de evaluar el transporte de masa sobre estas membranas. A través de este estudio se logró determinar una condición óptima de grabado químico, para la cual se obtienen membranas con un transporte óptimo.

Se estudió la modificación de los nanoconductos con el monómero glicidil metacrilato (GMA), mediante dos métodos distintos de polimerización por injerto: la polimerización simultánea radioinducida y la polimerización iniciada por radicales remanentes. Para detectar el injerto introducido se desarrolló una nueva técnica indirecta de cuantificación por marcación fluorescente, de muy alta sensibilidad, que involucra la derivatización química y marcación fluorescente. La fluorimetría y microscopía confocal permitieron estudiar las modificaciones de los nanoconductos con suficiente sensibilidad, logrando así revelar la presencia del injerto introducido, cuantificarlo y determinar la localización específica del mismo sobre las paredes internas de los nanoconductos. Otros estudios funcionales, como transporte de masa y espectroscopia de la impedancia electroquímica, permitieron aseverar que se logró introducir una mínima modificación superficial del conducto con pGMA y este no afecta al transporte, ni obstruye el paso de moléculas ni iones a través de este.

Se investigó la funcionalización del injerto de pGMA con ligandos de bajo PM, con diferentes carga electrostática (cisteamina, B-mercaptoetanol y ácido tioglicólico), con el objetivo de preparar nanoconductos iónicos y evaluar la permeación selectiva. La caracterización de estas membranas se realizó mediante el estudio de transporte de masa y de espectroscopia de la impedancia, ambas técnicas se utilizan para evaluar el comportamiento del transporte en estructuras nanométricas. Se lograron medir diferencias entre el comportamiento de las membranas funcionalizadas, principalmente de las membranas con carga (+) funcionalizada con cisteamina y la de carga (-) funcionalizada con ácido tioglicólico. Los resultados obtenidos confirman que se logró funcionalizar el injerto de pGMA, ubicado en las paredes internas de los nanoconductos y que el ligando incorporado cambia las propiedades de los mismos.

Se profundizó en el estudio de la funcionalización, con ligandos de alto PM, con distintas proteínas como la GFP, GFP-Cis1 y B-Lactamasa, con el fin de utilizarlos como sistemas biohíbridos y su aplicación potencial como sistema biosensor o biocatalizador. Para ello, la funcionalización se realizó mediante reacciones de inmovilización covalente, de tipo monopuntual (reacción epoxi-tiol) y de tipo multipuntual (reacción glutaraldehído/amino). En ambos casos se logró la inmovilización. De la comparación de ambas técnicas se demostró que la inmovilización covalente de tipo multipuntual fue la más eficiente.

Los diferentes sistemas preparados (polímero-proteína) se caracterizaron en base a su potencial aplicación final, evaluándose la respuesta de los sistemas frente a cambios en las condiciones del entorno. Además se realizó lo mismo con la proteína libre para poder comparar los resultados.

El sistema membrana-GFP tuvo un perfil de respuesta similar al de la proteína libre, frente a los cambios de pH. La buena respuesta a los cambios de pH del medio permite que se lo considere como un potencial sensor fluorométrico de pH. Mientras, que el sistema Memb-  $\beta$  -Lactamasa presentó una muy buena estabilidad de almacenamiento a 8°C, en comparación a la altísima reducción de la enzima libre.

En este trabajo se describe por primera vez la modificación de membranas PET, a través de una técnica sitio específica de modificación de polimerización vía radicales remanentes, que no requiere de agentes químicos adicionales y de la cual no hay precedentes en literatura. Se obtuvieron sistemas biohíbridos enzimáticos o fluorescentes para aplicaciones potenciales como biosensor de pH y enzimático.

Este trabajo pionero abre las puertas para el desarrollo de nuevas aplicaciones de las membranas track-etched a través de nuevas funcionalidades que pueden sumarse a las ya conocidas propiedades de transporte.



Universidad  
Nacional  
de Quilmes



## Tesis Doctoral



# Nanoconductos Biohíbridos en Membranas Poliméricas de Poros Perfectos

Autora: Lic. Silvia L. Soto Espinoza

Director: Dr. Mariano Grasselli

Codirectora: Dra. Claudia Arbeitman

2016



**Universidad Nacional de Quilmes**

**Depto de Ciencia y Tecnología**

**Laboratorio de Materiales Biotecnológicos**

**(LAMABIO)**



**Nanoconductos Biohíbridos en  
Membranas Poliméricas de Poros  
Perfectos**

**Tesis Doctoral  
Lic. Silvia L. Soto Espinoza  
2016**

**Universidad Nacional de Quilmes**



**Nanoconductos Biohíbridos en  
Membranas Poliméricas de Poros  
Perfectos**

**Tesis presentada para optar al  
Grado de Doctor en Ciencia  
y Tecnología, por la Lic.  
Silvia L. Soto Espinoza  
2016**

*A mis padres, Evangelina y Benigno, que me enseñaron a ir siempre hacia adelante, dar lo mejor de uno y brindar una mano a quien lo necesite y A mis hermanos, Miguel, Marcelo, Verónica, Cristian, Jesica y Diego, por estar siempre, ayudarme a crecer y enseñarme a disfrutar de la vida. A mi director, Mariano G. que me abrió este camino y por ser mi referente, Y a Martín, por darme todo su amor y el regalo más lindo de la vida, nuestro hijo Tomás.*





## Agradecimientos

Quisiera agradecer a todos aquellos que permitieron y aportaron para que hoy pueda cerrar un primer ciclo.

- Dr. Mariano, Grasselli, por darme la oportunidad de integrar su grupo de investigación "LAMABIO", por brindarme la oportunidad de crecer profesional y científicamente, antes de ser formalmente becaria. Por su constante apoyo y disponibilidad para discutir resultados. Por su calidez humana, ser además de director consejero de la vida, compartir alegrías personales y dedicación durante estos años.
- Dra. Claudia Arbeitman, por brindarme su tiempo y disposición para analizar resultados y diseñar experimentos. Por responder dudas, por meterse de lleno con EIS desde cero y lograr que sea una herramienta de análisis para mis membranas y por ayudarme sobre todo en la última etapa, con la escritura y corrección de la tesis. Sin su aporte este trabajo no hubiera sido lo mismo.
- A todos los LAMABIENSES, que están y/o fueron parte del laboratorio desde que inicie mis pasos: a Claudia B. por ayudarme en mis primeros pasos en el laboratorio, a Sonia S. por su buen humor, confianza y apoyo; A Federico R. por su locura permanente, sus mates y poner buena música; a Romina H. por su buena onda; a Fernando D. por su extra súper locura, buena onda y tener una sonrisa dibujada; a Flavia Q. por la buena música, y mates compartidos; a Laura C. por ser una despistada linda y compartir alegrías; a Mirna S. por compartir buenas mateadas y darle glamur al laboratorio, a Leandro M. por traer los parlantes, poner buena música, compartir alegrías personales y aguantar a todo el plantel femenino; a Giuli E. por dejarme que la guie en su paso por el lab.; a Gonzalo C. por su energía juvenil e ímpetu; a Estefanía A. por ser una gran persona, siempre dispuesta a ayudar y estar siempre con una sonrisa; a Constanza A. por ser aplicada, continuar investigando otras aplicaciones de las membranas y compartir alegrías personales; a Gabriela T. por ser una loca linda, siempre con su alegría y buena onda; a Soledad D. por su calidez, preocuparse por uno y compartir mates, a Florencia R. por ser

buena, gentil y cálida; a Constanza F. por ser una gran amiga, cómplice y todo, en la ciencia y fuera de ella. Y un gracias muy especial desde Laura C. a Constanza F. por cuidar a Tomi cada vez que fui con él al laboratorio.

- A las chicas de enfrente...Vale, Eli, Andre, Andre, Majo, Mariana, Alfonso y los que fueron parte alguna vez: Hugo y Mati por hacer amenas las jornadas laborales.

- A los técnicos; del FESEM, del centro de microscopía avanzada UBA (Claudia M. y Silvio L.) por asistirme en las dudas y ponerle onda cada vez que iba a mirar los nanoporos. A Rodrigo V., técnico del microscopio confocal de Fluorescencia, del IBR de Rosario, por entusiasmarse con mis membranas, dedicarle tiempo y poner todo su conocimiento, para brindarme las mejores imágenes. Sin su aporte este trabajo no hubiera tenido la misma calidad.

- A las instituciones, ANPCyT y CONICET por la administración de la financiación (aportada por el Estado) para realizar este trabajo, a la Universidad Nacional de Quilmes por la formación académica y científica brindada, y al sistema educativo de este hermoso país, que me brindó una educación pública y gratuita, y además ofreció becas académicas, de posgrado y de viajes al exterior.

- Al personal de la UNQ, Bruno, Néstor, Silvia, Nati, Alejandra, Mary, Mirta, Hugo y los de seguridad, que hacen que la UNQ sea algo más que un lugar de trabajo.

- A las chichis (Maru, Geor, Cin, Caro, Ivi, Aleli, la Marilyn) y el Gusti que son el cable a tierra fuera de la ciencia.

- A mi familia, papas, hermanos, sobrinas, sobrinos, cuñado y cuñadas por estar siempre juntos, honrar la familia, ser mi refugio y un gran pilar en mi vida. Por acompañarme y alentarme durante tantos años, en todos y cada uno de los pasos que di.

- A mi conyugue-marido Martín G. por hacer realidad nuestro sueño, bancar noches de escritura, estrés y hacer que cada día sea más lindo.
- A mi hijo Tomás N. González por ser mi gran inspiración diaria, mi recarga de pilas y aguantar verme de espaldas mientras escribía.
- A mi familia política por cuidar a Tomi, darle todo su amor y apoyarnos en nuestro sueño.
- A mis tíos, tías, primos y primas, no me alanzaría las hojas para mencionarlos a todos, la familia es muy grande gracias a Dios. Porque mis tíos siempre han apoyado el crecimiento de sus sobrinos, alegrado con nuestros triunfos y preocupado cuando las cosas no salían como queríamos, y a mis primos por estar siempre en las buenas y no tan buenas, crecer juntos y mantenernos como nos enseñaron, juntos en familia. En especial a mi prima Noelia L. que estuvo ahí a lado en todo momento y fue un cable a tierra siempre, por sorprenderse cada vez que le contaba que es lo que hacía en el laboratorio y enorgullecía por su prima, a pesar de que es más gorda que yo, y ahora por ser la madrina de mi Tomi.
- A mi amiga de toda la vida María R. por su amistad fraternal y calidez. A Barbi por compartir salidas de recreación y su contención constante. A Sonia por escucharme siempre, brindarme su apoyo y opinión, desde una posición con más experiencia. A Valeria por mantener una amistad de gran cariño a la distancia.
- Y como no nombrarlos a ellos que fueron parte de este gran camino, con los que compartí vivencias, tardes de laboratorio, cenas, almuerzos, chistes, excursiones y hasta un acontecimiento tan importante como una boda Bangladeshina. La Jacobs University nos reunió... y desde entonces a pesar del paso de los años y la distancia mantenemos esa amistad mágica. Sirma, Amira, Noord, Sayeda, Asiim, Rajesh, Remi, James, Tuhidul y Ali. Un último agradecimiento a Marcelo F. L y su esposa Jessica por brindarme su calidez y confianza durante mi estadía en Bremen, Alemania.

## ÍNDICE

---

<b>I. LOS POLÍMEROS Y SU IRRADIACIÓN CON IONES ACELERADOS</b>	<b>1</b>
<b>1- Introducción</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1 - Desarrollo de Materiales</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2 – Polímeros</b> .....	<b>4</b>
1.2.1- Generalidades.....	4
1.2.2- Síntesis.....	4
1.2.3- Propiedades estructurales.....	6
1.2.4- Clasificación de los polímeros.....	8
<b>1.3 –Polietilentereftalato (PET)</b> .....	<b>9</b>
1.3.1- Características.....	9
1.3.2- Usos comerciales.....	10
<b>1.4 – Irradiación: conceptos básicos y aplicaciones</b> .....	<b>12</b>
1.4.1- Introducción.....	12
1.4.2- Iones acelerados.....	12
1.4.3- Tipos de aceleradores.....	13
1.4.4- Irradiación de materiales.....	14
1.4.4.1- Interacción de iones con la materia.....	14
1.4.4.2- Fenómenos físicos y químicos involucrados.....	14
Colisiones inelásticas.....	15
Colisiones elásticas.....	15
1.4.5- Poder de frenado nuclear y electrónico.....	17
1.4.5.1- Poder de frenado electrónico.....	19
1.4.5.2- Poder de frenado nuclear.....	20
1.4.6- Rango de iones.....	20

<b>1.5- Irradiación de polímeros con iones pesados acelerados .....</b>	<b>21</b>
1.5.1- Rango de los iones.....	21
1.5.2- Flujo y Fluencia.....	21
<b>1.6- Efecto de la irradiación sobre polímeros.....</b>	<b>21</b>
1.6.1- Ionización.....	21
1.6.2- Descripción física de las interacciones.....	22
1.6.3- Formación de las trazas latentes.....	23
1.6.4- Efecto de las perturbaciones.....	24
1.6.5- Descripción química de las interacciones.....	25
<b>1.7- Irradiación sobre films de PET.....</b>	<b>28</b>
Instalación en el Ciclotrón GANIL.....	28
Parámetros de la irradiación de los Films PET utilizados.....	29
<b>1.8- Simulaciones de la interacción ión-sólido.....</b>	<b>30</b>
1.8.1- Cálculos TRIM – SRIM.....	30
<b>Referencias.....</b>	<b>32</b>
<b>II. GRABADO QUÍMICO DE FILMS PET.....</b>	<b>35</b>
<b>2.- Introducción.....</b>	<b>37</b>
<b>2.1- Grabado químico: Generalidades.....</b>	<b>37</b>
<b>2.2 – Bases físicas y químicas que afectan al grabado químico.....</b>	<b>39</b>
2.2.1- Formación del conducto.....	41
<b>2.3- Factores que afectan al grabado químico.....</b>	<b>42</b>
2.3.1- Efecto térmico.....	42
2.3.2- Efecto químico.....	42

2.3.3- Efecto del tiempo.....	43
2.3.4- Efecto de la luz UV.....	43
<b>2.4- Preparación de membranas.....</b>	<b>44</b>
2.4.1- Materiales y Métodos.....	44
2.4.2- Grabado químico-protocolo general.....	44
<b>2.5 – Técnicas de caracterización de las membranas.....</b>	<b>45</b>
2.5.1- Microscopía electrónica de barrido de efecto de campo (FESEM),	45
2.5.2- Espectroscopia de infrarrojo (FT) por transformada de Fourier (IR) y reflectancia total atenuada (ATR).....	46
2.5.3- Cinética de transporte de masa (CTM).....	47
2.5.4- Absorción inespecífica.....	49
2.5.5- Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS).....	51
<b>2.6 - Resultados y Discusión.....</b>	<b>53</b>
Análisis por FESEM.....	53
Análisis por FTIR-ATR.....	63
Análisis por CTM.....	64
Estudio de Adsorción inespecífica de moléculas sobre membranas PC..	70
Análisis por CTM a distintas concentraciones del analito.....	71
Análisis por CTM sobre membranas PET.....	72
Evaluación CTM con aumento de la fuerza iónica, de la celda donora..	73
Estudio de EIS.....	75
<b>Referencias.....</b>	<b>78</b>
<b>III. POLIMERIZACIÓN POR INJERTO SOBRE MEMBRANAS TRACK-ETCHED DE PET</b>	<b>85</b>
<b>3- Introducción.....</b>	<b>87</b>

<b>3.1- Modificación química por injerto</b> .....	87
3.1.1- Polimerización iniciada por agentes químicos.....	87
3.1.2- Polimerización iniciada por ozonificación.....	88
3.1.3- Fotopolimerización.....	88
3.1.4- Polimerización simultánea radioinducida ( <i>PISR</i> ).....	89
3.1.5- Polimerización inducida por pre-irradiación .....	89
3.1.6- Polimerización vía radicales remanentes ( <i>PIVRR</i> ).....	90
<b>3.2- Modificación de Membranas</b> .....	93
3.2.1- Materiales y Métodos.....	93
3.2.2- <i>PISR</i> -Protocolo general.....	94
3.2.3- <i>PIVRR</i> -Protocolo general.....	94
<b>3.3- Técnicas de caracterización</b> .....	94
3.3.1- Microscopía electrónica FESEM.....	94
3.3.2- Espectroscopia FTIR con ATR.....	95
3.3.3- Derivatización química fluorescente.....	95
3.3.4- Microscopía confocal de fluorescencia.....	96
3.3.5- CTM.....	96
3.3.6- Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).....	96
3.3.1- EIS Electroquímica.....	97
<b>3.4- Resultados y discusión</b> .....	97
3.4.1- Análisis por FESEM.....	97
3.4.2- Análisis por FTIR-ATR.....	105
3.4.3- Análisis por derivatización química fluorescente.....	105
3.4.4- Análisis por microscopía confocal de fluorescencia.....	110
3.4.5- Análisis por CTM.....	112
3.4.6- Análisis por AFM.....	113
3.4.7- Análisis por EIS.....	114
<b>Referencias</b> .....	116



<b>IV.</b>	<b>PREPARACIÓN DE NANOCONDUCTOS IONICOS SOBRE MEMBRANAS <i>TRACK-ETCHED</i> DE PET</b>	<b>121</b>
<b>4.-</b>	<b>Introducción</b>	<b>123</b>
<b>4.1-</b>	<b>Funcionalización de membranas</b>	<b>123</b>
	Aplicaciones	123
	Derivatizaciones químicas generales del grupo epóxido	125
	Mecanismo de reacción epóxido-tiol	126
<b>4.2-</b>	<b>Funcionalización de membranas PET</b>	<b>126</b>
4.2.1-	Materiales y Métodos	126
	Funcionalización con cisteamina	127
	Funcionalización con $\beta$ -mercaptoetanol	127
	Funcionalización con Ac. Tioglicólico	127
<b>4.2-</b>	<b>Técnicas de caracterización</b>	<b>128</b>
	CTM	128
	EIS	128
<b>4.3-</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>128</b>
4.3.1-	Análisis por CTM	131
4.3.2-	Análisis por EIS	133
	<b>Referencias</b>	<b>136</b>
<b>V.</b>	<b>INMOVILIZACIÓN DE PROTEÍNAS EN NANOCONDUCTOS DE MEMBRANAS <i>TRACK-ETCHED</i> DE PET</b>	<b>141</b>
<b>5-</b>	<b>Introducción</b>	<b>143</b>
<b>5.1-</b>	<b>Inmovilización de proteínas sobre los nanoconductos</b>	<b>143</b>
	Covalente	144

No covalente.....	144
<b>5.2- Preparación de sistemas biohíbridos.....</b>	<b>144</b>
5.2.1- Materiales y Métodos.....	144
5.2.2- Obtención de proteínas recombinantes.....	145
5.2.3- Inmovilización Monopuntual.....	146
5.2.4- Inmovilización Multipuntual.....	146
<b>5.3- Caracterización de los sistemas Biohíbridos.....</b>	<b>147</b>
Fluorescencia directa de los sistemas membrana-GFP e GFP-Cis1.....	147
Determinación de la actividad enzimática del sistema Membrana- $\beta$ -Lactamasa.....	147
Estudios de estabilidad.....	148
<b>5.4- Resultados y discusión.....</b>	<b>148</b>
5.4.1- Inmovilización monopuntual Memb-GFP-Cis1.....	148
5.4.2- Inmovilización multipuntual Memb-GFP.....	149
Estabilidad en diferentes pH.....	153
Inmovilización multipuntual-Memb- $\beta$ -Lactamasa.....	153
Determinación de parámetros cinéticos-Michaelis Menten.....	156
Estabilidad durante el almacenamiento a 8°C.....	157
<b>Referencias.....</b>	<b>159</b>
<b>VI. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>163</b>

## Abreviaturas

AFM: Microscopía de fuerza atómica  
AM: Ácido metacrílico  
APET: Polietilentereftalato amorfo  
BC: Buffer carbonato/bicarbonato 0,1 M, pH 9  
BP: Buffer fosfato 30 mM, pH 7  
BT: Buffer Tris 50 mM, pH 7,5  
CPET: Polietilentereftalato cristalino  
CTM: Cinética de Transporte de Masa  
D: diámetro de poro  
DEGMA: Dietilenglicol metacrilato  
DMF: Dimetilformamida  
DTT: Ditiotreitól  
EDA: Etilendiamina  
EDL: Doble capa eléctrica  
EIS: Espectroscopía de Impedancia Electroquímica  
EtOH: Etanol  
FEP: Perfluoropolímero  
FESEM: Microscopía electrónica de barrido de campo  
FITC: Isotiocianato de Fluoresceína  
FTIR-ATR: Espectroscopía de Infrarrojo por Transformadas de Fourier y Reflectancia Total Atenuada  
GA: Glicidil acrilato  
GFP: Proteína fluorescente verde  
GFP-Cis1: Proteína verde fluorescente, con etiqueta N-terminal HCHSHS  
GMA: Glicidil metacrilato  
GQ: Grabado químico  
HEMA: Hidroximetil metacrilato  
LED: Diodo de emisor de luz  
LLDP: Porosimetría de desplazamiento líquido- líquido  
MCD: Dispositivo de celdas de microtransporte  
MMA: Metil metacrilato  
NaOH: Hidróxido de sodio

NIPAAm: N-isopropilacrilamida  
O.N.: incubación durante toda la noche (15 h)  
PA: Poliamida  
PBT: Polibutilen tereftalato  
PC: Policarbonato  
PE: Polietileno  
PE (HD): Polietileno de alta densidad  
PE (LD): Polietileno de baja densidad  
PE (LLD): Polietileno de baja densidad polimerizado a baja presión  
PET: Polietilenterftalato  
pGMA: Poliglicidil metacrilato  
PI: Poliimida  
PIRS: Polimerización por injerto radioinducido simultáneo  
PIVRR: Polimerización por injerto vía radicales remanentes  
PIVRR-c/SM: Polimerización por injerto vía radicales remanentes con adición de sal de Morh  
PM: Peso molecular  
PP: Prolipropileno  
PS: Polisulfona  
PVC: Policloruro de vinilo  
PVDF: Polifluoruro de polivinilideno  
RFU: Unidades relativas de fluorescencia  
 $S_A$ : Superficie de adsorción  
SHI: Iones pesados acelerados de alta energía  
SRIM: Frenado y rango de iones en la materia (código computacional)  
TCEP: Tris-2-carboxietilfosfina  
Tg: Temperatura de transición vítrea  
Tm: Temperatura de fusión  
tp-GQ: Tiempo posterior al grabado químico  
TRIM: Transporte de iones en la materia (código computacional)  
UV: Luz ultravioleta  
 $V_B$ : Velocidad de degradación del área no dañada por la irradiación  
 $V_T$ : velocidad de degradación de la traza

# **LOS POLÍMEROS Y SU IRRADIACIÓN CON IONES ACELERADOS**

## **CAPÍTULO I**

[1]



## 1. Introducción

Este capítulo se hace una breve introducción del desarrollo de materiales en base a polímeros, orientada en especial al polietilentereftalato - más conocido como PET- y sus características químicas, propiedades y aplicaciones.

También se introducen conceptos básicos de la irradiación con iones acelerados, los tipos de aceleradores según la energía del haz, la interacción con la materia y los fenómenos físicos producidos; para luego focalizar en la irradiación de polímeros con iones pesados acelerados de alta energía (SHI: *Swift Heavy Ions*). Se describen los parámetros más importantes inherentes a la irradiación sobre polímeros, la descripción físico-química de las interacciones que se producen y la generación de la traza latente. Por último se describen las condiciones de irradiación del PET utilizado en este trabajo de tesis, así como también las correspondientes trayectorias de iones simuladas utilizando el código SRIM (*Stopping and Range of Ions in Matter*).

### 1.1 Desarrollo de materiales

La historia de la humanidad ha estado ligada estrechamente al tipo de materiales que cada sociedad ha desarrollado y la capacidad de sus miembros para producir y conformar los materiales necesarios para satisfacer sus necesidades. Los historiadores han encontrado útil clasificar las etapas de las civilizaciones a partir de los materiales usados: Edad de Piedra, Edad del Cobre, Edad de Bronce o Edad del Hierro. La era más reciente se conoce como "Era de los polímeros". Los avances en química permitieron su desarrollo hasta lograr que pueda tener cualquier propiedad física. Así su uso se hizo tan masivo que define muy bien a las sociedades modernas como "sociedades plásticas".

En la actualidad la **ciencia de materiales** es el campo científico que se encarga del desarrollo de nuevos materiales, de investigar las relaciones entre las propiedades-estructura-procesamiento-funcionalidad de los mismos, o de diseñar o proyectar la estructura para conseguir un conjunto predeterminado de nuevas propiedades. Constituye un campo multidisciplinar que estudia

propiedades físicas macro y microscópicas y su posible aplicación en varias áreas de la ciencia e ingeniería.

Dentro de este contexto, la presente tesis tiene como objetivo general investigar la potencialidad de funcionalizaciones de un polímero a la escala micro y nanométrica. Los objetivos específicos se orientaron a la preparación y caracterización de membranas de poros perfectos con una funcionalización química definida.

## **1.2. Polímeros**

### **1.2.1 Generalidades**

Un polímero es una gran macromolécula construida por la repetición de pequeñas unidades químicas simples. La unidad estructural repetitiva es usualmente equivalente al monómero o material de partida del que se forma el polímero. Las macromoléculas más simples son cadenas hidrocarbonadas no saturadas, también existen macromoléculas con enlaces dobles o formadas por monómeros que contienen anillos aromáticos y/o heteroátomos en su estructura [1-5].

En la actualidad, los polímeros constituyen en volumen uno de los grupos de materiales de mayor aplicación tecnológica e industrial, dado que el conjunto de propiedades que poseen los hace sumamente atractivos. Sin embargo también poseen algunas características que limitan sus aplicaciones, como por ejemplo:

- ✓ Pueden verse afectados por la luz o por otras radiaciones, degradándose ó alterándose su comportamiento macroscópico.
- ✓ Suelen tener valores muy bajos de resistencia y rigidez.
- ✓ Su respuesta mecánica está seriamente afectada en condiciones extremas de temperatura; a temperaturas elevadas son mucho menos resistentes, y a temperaturas bajas a menudo se comportan como materiales frágiles.

### **1.2.2. Síntesis**



El proceso de síntesis de un polímero puede realizarse a través de dos métodos: adición o condensación.

La polimerización por adición requiere que los monómeros contengan dobles enlaces (C=C) que puedan reaccionar dando lugar a dos lugares de unión y favoreciendo la expansión de la molécula una vez que la reacción fue iniciada. La reacción continúa por la adición de nuevos monómeros a la cadena principal (ver Fig. 1.1) o bien por adición de cadenas cortas que se han formado paralelamente. El final de la polimerización se produce al agotarse los monómeros o cadenas cortas disponibles [1-5].

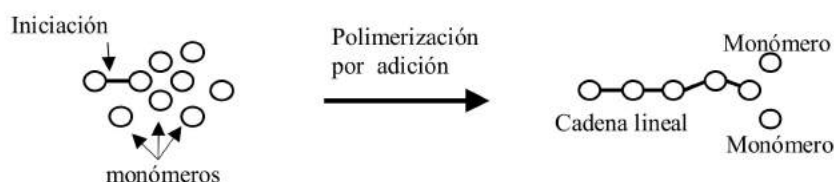


Fig. 1.1. Polimerización por adición.

Por otro lado, la polimerización por condensación es un proceso de unión de dos monómeros o dos cadenas cortas, con la generación de una molécula pequeña como subproducto (ver Fig. 1.2).



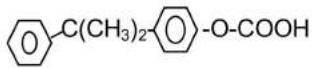
Fig.1.2. Polimerización por condensación para generar una poliamida.

A continuación se muestran ejemplos de las principales familias de polímeros producidos por adición y condensación (Tablas 1.1 y 1.2).

Tabla 1.1. Ejemplos de polímeros producidos por el proceso de adición.

Polímero	Monómero	Unidad repetitiva	Formula
<b>Poliétileno (PE)</b>	CH <sub>2</sub> =CH <sub>2</sub>	-(CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -	(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>
<b>Poliestireno (PS)</b>	$\begin{array}{c} \text{CH}_2=\text{CH} \\   \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{-(CH}_2\text{-CH)}_n\text{-} \\   \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	(C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> ) <sub>n</sub>
<b>Cloruro de Polivinilo (PVC)</b>	$\begin{array}{c} \text{CH}_2=\text{CH} \\   \\ \text{Cl} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{-(CH}_2\text{-CH)}_n\text{-} \\   \\ \text{Cl} \end{array}$	(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> Cl) <sub>n</sub>

**Tabla 1.2.** Ejemplos de polímeros producidos por el proceso de condensación.

Polímero	Monómero	Formula	Producto
<b>Poliamida Nilón-6,6 (PA)</b>	$(\text{CH}_2)_6\text{-NH-CO-(CH}_2)_4\text{-CO-NH}_2$	$((\text{CH}_2)_6(\text{CONH})_2(\text{CH}_2)_4)_n$	$\text{H}_2\text{O}$
<b>Policarbonato (PC)</b>		$(\text{C}_3\text{H}_6(\text{C}_6\text{H}_4)_2\text{CO}_3)_n$	$\text{H}_2\text{O}$
<b>Polietilentereftalato (PET)</b>	$\text{COOH-C}_6\text{H}_4\text{-COOH}$ + $\text{CH}_2\text{OH-(CH}_2)_2\text{-CH}_2\text{OH}$	$(\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4)_n$	$\text{H}_2\text{O}$

### 1.2.3. Propiedades estructurales

Los enlaces primarios entre los átomos de los propios monómeros y entre ellos son covalentes, con altas energías de enlace (entre 146-628 KJ.mol<sup>-1</sup>), proporcionando una gran estabilidad a los productos resultantes. Sin embargo la cohesión de los polímeros depende en gran medida de las fuerzas de enlace secundarias (Van der Waals, de dispersión de London y Puente hidrógeno) que mantienen unidas las cadenas poliméricas entre ellas y son débiles en relación con las fuerzas de enlace primario. El alto peso molecular (PM) de los polímeros permite que estas fuerzas sean lo suficientemente fuertes para impartir al material resistencia, estabilidad dimensional y otras propiedades mecánicas. [5].

Sea cual fuera el proceso de síntesis, el polímero es resultado de la reacción de  $n$  monómeros. El parámetro  $n$  se denomina grado de polimerización (GP) y es un indicador del tamaño de la molécula, siendo el PM  $n$  veces el peso de la unidad repetitiva. Mientras que sus propiedades estarán determinadas por varios parámetros (ver Fig. 1.3).

**Fig. 1.3.** Parámetros que definen las propiedades de un polímero.

La resistencia mecánica y la viscosidad del polímero se incrementan proporcionalmente con el aumento de su masa molecular. Por otro lado, el ordenamiento o empaquetamiento de las cadenas moleculares dentro del polímero durante el proceso de solidificación define dos regiones posibles: cristalina o amorfa. En las regiones cristalinas las cadenas se encuentran paralelas entre sí de acuerdo a algún arreglo particular. Mientras que en las regiones amorfas las cadenas están dispuestas en forma poco ordenada. La propiedad denominada “grado de cristalinidad” que se define como la relación entre la estructura amorfa y cristalina (ver Fig. 1.4); repercute en las propiedades mecánicas, a causa de su influencia en la cantidad de enlaces secundarios intermoleculares presentes [5].

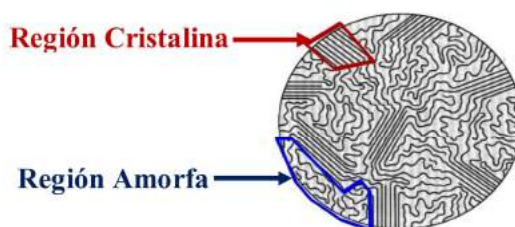


Fig. 1.4. Ordenamiento estructural de regiones amorfas y cristalinas, dentro de un polímero.

La estructura compleja de las macromoléculas hace prácticamente imposible la formación de polímeros 100% cristalinos. La mayoría de los polímeros usados industrialmente son semicristalinos (ver Tabla 1.3).

Los polímeros cristalinos poseen mayor densidad a causa de la compactación en el ordenamiento de las cadenas, son más resistentes a la disolución, al ablandamiento térmico y tienen mejores propiedades mecánicas, sin embargo poseen menor transparencia que los amorfos.

Los polímeros amorfos no tienen un punto de fusión específico ( $T_m$ ), pero experimentan -al igual que todos los polímeros- cambios en su comportamiento mecánico en un rango de temperatura acotado. A temperaturas bajas son duros, rígidos, frágiles o vidriosos; mientras que a temperaturas elevadas, son semejantes al hule. La temperatura a la cual ocurre dicha transición se denomina temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ).

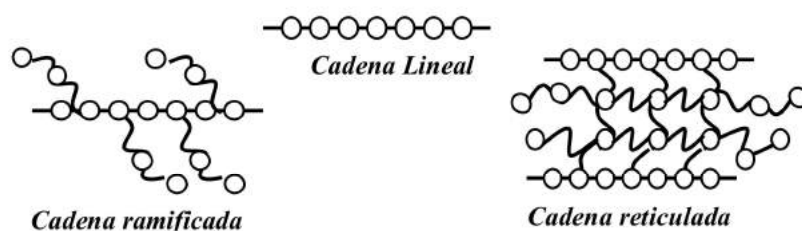
**Tabla 1.3.** Comportamiento de la cristalinidad, según el porcentaje de regiones cristalinas.

Porcentaje de segmentos cristalinos	Grado de cristalinidad	Ejemplos
> al 70	elevada	PE (HD), PP, PMO
40-70	media	PE (LLD), PE (LD)
25-40	baja	PET, PBT, PA

Asimismo se puede aumentar el cristalinidad de un polímero mediante procesos físicos de calentamiento por encima del  $T_g$  y posterior enfriamiento lento, permitiendo la generación de mayor cantidad de regiones cristalinas; o bien producir un estiramiento mecánico para aumentar la proporción de formas amorfas. Por ejemplo, el PET tiene una  $T_g=74^\circ\text{C}$ , a temperatura ambiente se puede encontrar en estado amorfo-transparente (APET) o semicristalino (CPET), con un 20-40% de cristalinidad [6].

#### 1.2.4. Clasificación de los polímeros

Dado la complejidad estructural de los polímeros, su clasificación no es sencilla. Se agrupan en función de la *distribución espacial de sus cadenas* que puede ser sencilla (cadenas lineales ó ramificadas) o compleja (estructuras reticuladas) (ver Fig. 1.5); posteriormente estas determinarán el comportamiento mecánico que presentarán los polímeros en función de la temperatura [4].

**Fig.1.5.** Posibles disposiciones estructurales de las cadenas de un polímero.

Otro de los criterios de clasificación más usados, es el comportamiento frente a la temperatura. Así los **polímeros termoplásticos**

son aquellos que al calentarse se convierten en productos viscosos fáciles de conferirle forma. Estos recuperan las características iniciales al enfriarse, y son susceptibles de someterse a numerosos ciclos de calentamiento-ablandamiento-enfriamiento sin degradarse. Los **polímeros termoestables**, en cambio, pueden ser calentados y ablandados de manera permanente y no se funden. Por último los **polímeros elastómeros**, son aquellos que al calentarse presentan un comportamiento elástico, de manera que son capaces de deformarse en gran manera y recuperar la forma inicial prácticamente en su totalidad. [4].

### 1.3. Polietilentereftalato

#### 1.3.1. Características

El polietilentereftalato (PET) -descubierto por John Rex Whilfield y James Tennant Dickson en 1941- se obtiene por policondensación entre el ácido tereftálico y el etilenglicol. Químicamente es un polímero que pertenece al grupo de los poliésteres, consiste en una cadena hidrocarbonada lineal compuesta de grupos etileno y tereftalato (ver Fig. 1.6) [6].

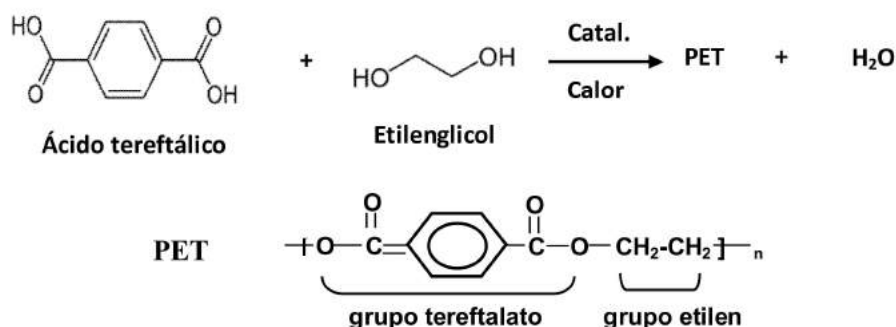


Fig. 1.6. Síntesis y estructura del PET.

Es un polímero termoplástico lineal, sin ningún tipo de enlace químico covalente entre las cadenas. Sin embargo, existen interacciones de tipo electroestáticas entre densidades de carga negativa de oxígeno del éster y densidades de carga positiva del carbono del carbonilo. De esta manera, cadenas vecinas pueden alinearse entre sí en una forma cristalina (CPET) dando lugar a fibras resistentes, lo cual lo diferencia del PET amorfo (APET).

Dada la regularidad estructural que presenta la unidad repetitiva del PET, éste muestra una alta tendencia a cristalizar, sin embargo, la presencia del anillo aromático hace que la cristalinidad alcanzada dependa fuertemente de la velocidad de enfriamiento [7].

Por otro lado, la existencia de grupos funcionales en su estructura química permite realizar modificaciones químicas del polímero y/o generar copolímeros en bloque.

### 1.3.2. Usos comerciales



**PET textil**, se lo utiliza como filamento continuo o como fibra cortada. Sus excelentes cualidades textiles (alta resistencia a la deformación y estabilidad mecánica) permitieron reemplazar en ciertos usos a las fibras naturales del lino y el algodón. Aunque presenta algunas limitaciones, como por ejemplo: su difícil tintura, la formación de bolitas, acumulación de electricidad estática y dureza al tacto. No obstante, el PET es uno de los polímeros sintéticos más usados en la industria textil [8].



**PET envases**, desde 1974 esta aplicación ha experimentado un gran crecimiento y una continua demanda, debido a las características favorables del PET en cuanto a resistencia contra agentes químicos, gran transparencia, ligereza (bajo peso) y bajo costos de producción. Si bien se lo asocia al embotellado de las bebidas, también se lo utiliza en el envasado de productos farmacéuticos, de reactivos químicos y de alimentos como salsas, mermeladas y miel [8].



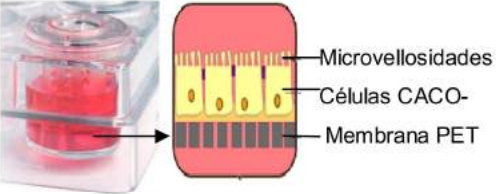
**PET de film**, todas las películas fotográficas de rayos X y de audio están hechas de este polímero. En este caso se utiliza el PET estirado biaxialmente, que es ópticamente traslucido, brillante, de excelente resistencia mecánica, buenas propiedades dieléctricas y coeficiente de fricción, resistente e inerte a muchos agentes químicos. Todas estas propiedades le confieren una versatilidad excepcional en comparación con otras películas poliméricas. Actualmente se las comercializa como films

antimicrobianos, películas de impresión / etiquetas, películas aislantes, láminas fotovoltaicas, láminas de seguridad y films de protección de superficies [8].


Una de las aplicaciones más innovadoras fue la generación de membranas a partir de estos films. Estas membranas, conocidas como *track etched* se fabrican en dos etapas: (1) la generación de traza y (2) el grabado químico. En la primer etapa una película polimérica de PET de alta pureza es irradiada con un haz de iones pesados acelerados como  $^{208}\text{Pb}$ ,  $^{125}\text{Xe}$ ,  $^{84}\text{Kr}$ , etc., generando áreas de daño sobre el material, denominadas trazas (ver más adelante). En la segunda etapa se realiza un proceso de grabado químico (GQ) donde se expone el film irradiado a un reactivo químico específico en condiciones controladas para generar poros/conductos cilíndricos de diámetro constante, en el rango de 0,01 a 3  $\mu\text{m}$ . [9-10].


Esta nueva generación de membranas tiene una gran variedad de aplicaciones en el área de ciencia, salud, farmacéutica y en procesos biotecnológicos. A continuación se enumeran algunas de las aplicaciones corrientes:

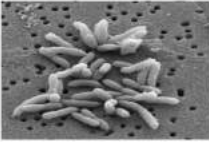
- ✓ En cultivo celular: como matriz de células eucariotas y para la investigación de quimiotaxia, invasión y migración debido a su permeabilidad controlada y difusión de los componentes del medio [11].



Microvellosidades  
Células CACO-  
Membrana PET
- ✓ En la detección rápida y cuantificación de partículas y microorganismos en microscopía de epifluorescencia, por su superficie lisa y translúcida [12].


- ✓ Como filtros de jeringa (en HPLC) por su mayor resistencia a disolventes orgánicos, ácidos y bases [13].


- ✓ Para la retención de células, enriquecimiento de microorganismos: levaduras, mohos, serratia y bacterias coliformes [12].



- ✓ Para la filtración de sangre y análisis de células, por ej.: glóbulos rojos, leucocitos y detección de células raras [12].



- ✓ En análisis de agua y aire: Determinación de halogenuros orgánicos, fosfatos y nitratos en aguas residuales, en agua potable y en suelo. Análisis de partículas en aire: polen, polvo y fibras de asbesto [12].



## 1.4. Irradiación: conceptos básicos y aplicaciones

### 1.4.1. Introducción

La irradiación con haces de iones pesados acelerados (SHI) constituye una tecnología desarrollada durante las últimas décadas, con el objeto de modificar y producir materiales avanzados. Estos materiales tienen aplicaciones en diferentes campos, que abarcan desde la microelectrónica hasta la medicina. Una de las principales ventajas del uso de haces de iones radica en la posibilidad de producir modificaciones de manera controlada y en áreas selectas del material. Dichas modificaciones producidas, sean estructurales o químicas, alteran las propiedades en la superficie del material o en las cercanías de ésta en función de la velocidad del ión incidente. El conocimiento de las interacciones entre los iones y los materiales sólidos es indispensable para poder fundamentar su aplicación en la modificación de materiales. En las próximas secciones se describe los factores inherentes al proceso de irradiación, así como las instalaciones requeridas para el mismo [14].

### 1.4.2. Iones acelerados

A diferencia de las fuentes radiactivas, donde existe un fenómeno físico natural de desintegración, las fuentes de iones acelerados son producidas por el hombre. Estas fuentes son los aceleradores que se caracterizan por acelerar iones con una determinada carga nuclear, masa,



energía, ángulo de impacto, dispersión angular definida, entre otros parámetros (ver Fig. 1.7) [14].

• Número atómico, Z	$1 \leq Z_{\min} \leq Z \leq Z_{\max} \leq 92$
• Voltaje de aceleración U ó energía del ión T	MV(mega volt) ó MeV.
• Frecuencia del acelerador	Nº de pulsos del haz/ seg.
• Intensidad del pulso	Intensidad del haz del ión.
• Intensidad del haz I	Tiempo intensidad promedio
• Emitancia del haz	$r^* \alpha$ (radio por ángulo de foco)
• Brillo del haz	$I/r^* \alpha$ (intensidad/emitanca <sup>2</sup> )

Fig.1.7. Parámetros característicos del acelerador de iones.

La energía del ión es constante y ajustada a los requerimientos según la aplicación. El acelerador puede ser apagado completamente una vez terminado el proceso de irradiación (a diferencia de la fuente radiactiva).

### 1.4.3. Tipos de aceleradores

Se distinguen cinco clases de aceleradores, según la máxima energía alcanzada [14]:

- a. **Aceleradores para *sputtering* y deposición:** el proceso de *sputtering* y deposición consiste en la expulsión de átomos superficiales, debido al intercambio de momento con los iones que impactan sobre la superficie y a la vez se depositan sobre este. Utiliza haces de iones de unos pocos keV. Tiene mucha aplicación en la industria electrónica, para la modificación de silicio.
- b. **Implantador de iones:** Se utilizan aceleradores de energías en el rango de 1- 100 keV. También se lo utiliza para la modificación de las propiedades electrónicas y superficiales del silicio y de otros sólidos.
- c. **Acelerador de iones de baja energía:** Estos equipos generan haces de iones con energías en el rango de 10 keV-10 MeV. Se

los utiliza para la generación de trazas de daño sobre materiales. También se aplica para analizar la composición de sólidos.

- d. **Acelerador de iones de mediana energía:** La energía de estos equipos ronda entre los 10 MeV y cercanas a 1 GeV. Estas energías son muy usadas en el campo de la producción de membranas tipo *track-etched*.
- e. **Acelerador de iones de elevada energías:** abarca energías mayores a 1 GeV, se usa exclusivamente en investigación. Existen muy pocos equipos en el mundo.

#### 1.4.4. Irradiación de materiales

La irradiación de materiales, ya sean partículas cargadas o radiación electromagnética (rayos gamma o X) se diferencian por la forma de interacción con la materia. Existen dos fenómenos posibles, la penetración y deposición ó transferencia de energía al material [15]. Las partículas cargadas tienen muy baja penetración y alta deposición de energía, mientras que la radiación electromagnética, como los rayos gamma, pierden gran parte de su energía en una sola interacción logrando afectar al material como un todo [15].

##### 1.4.4.1. Interacción de iones con la materia

Los iones “acelerados” son átomos cargados que tienen una energía cinética determinada. Estos, al impactar sobre un material, interactúan con los electrones y núcleos del material mediante fuerzas de Coulomb. La naturaleza de estas interacciones implica una transferencia de energía desde el ión acelerado hacia el átomo simple ó electrones del blanco [15].

##### 1.4.4.2. Fenómenos físicos y químicos involucrados

Los procesos físicos y químicos que ocurren durante la interacción de iones con la materia dependen de la masa ( $M_1$ ), del número atómico ó carga nuclear ( $Z_1$ ), de la energía cinética ( $E_1$ ) del ión y en segundo lugar de la masa

( $M_2$ ) y carga nuclear ( $Z_2$ ) del blanco. En base a lo expuesto se distingue la existencia de tres fenómenos importantes en la interacción ión sólido (ver Fig. 1.8) [14].

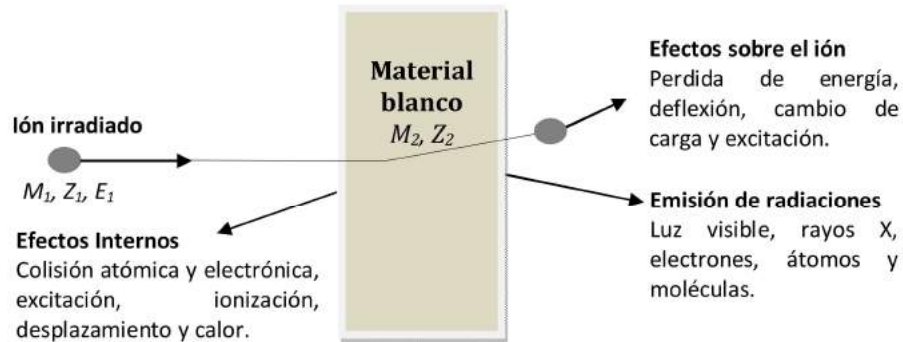


Fig. 1.8. Efectos observados en la interacción ión-sólido sobre superficies delgadas.

**Efectos sobre el ión:** El ión sufre cambios en su energía cinética, pudiendo excitarse (perder y/o ganar un electrón) y cambiar su carga. Finalmente podría perder la dirección lineal y deflexionar en otra dirección.

**Emisión de radiaciones:** Por la interacción ocurre emisión de radiaciones secundarias, las mismas son difíciles de observar por su baja energía. De este modo la observación de rayos X, luz visible, electrones, átomos y moléculas puede dar información acerca del proceso interno que ocurre en el material blanco.

**Efectos internos:** Estos corresponden a efectos que ocurren dentro del material, como por ejemplo, colisiones atómicas o electrónicas, excitación, ionización, desplazamiento y calor.

La pérdida de energía ó transferencia de energía (*scattering*) del ión que atraviesa un material ocurre principalmente a través de los siguientes procesos físicos [15]:

1. *Colisiones inelásticas* con los electrones del material
2. *Dispersión elástica* debido a la interacción con los núcleos de la muestra.

Las colisiones inelásticas son las que ocurre en mayor medida. En este tipo de colisiones la energía se transfiere desde la partícula a los electrones ligados, produciendo la ionización o excitación de los átomos del

material. La cantidad de energía transferida en cada colisión individual es en general muy pequeña, pero las colisiones son tan numerosas que el efecto logra observarse aún en films muy delgados. Asimismo las colisiones inelásticas se dividen en dos grandes grupos, según cuál sea el efecto que provocan:

1) Colisiones “suaves”, en las que el átomo es excitado.

2) Colisiones “duras”, en las que se transfiere suficiente energía como para ionizar el átomo. En algunas de las colisiones, la energía transferida es tal que el electrón eyectado puede provocar ionizaciones secundarias en su camino a través del material. Estos electrones energéticos son los denominados electrones delta (electrones  $\delta$ ).

A medida que la energía del ión disminuye (al final de su recorrido) es más importante la interacción con los núcleos atómicos del material. Sin embargo este fenómeno es menos frecuente que las colisiones electrónicas y en general la energía transferida es menor en este proceso. Al finalizar el recorrido del ión predomina la dispersión nuclear la cual produce una cascada de colisiones y una gran cantidad de desplazamientos atómicos (ver Fig.1.9 y 1.10) [15].

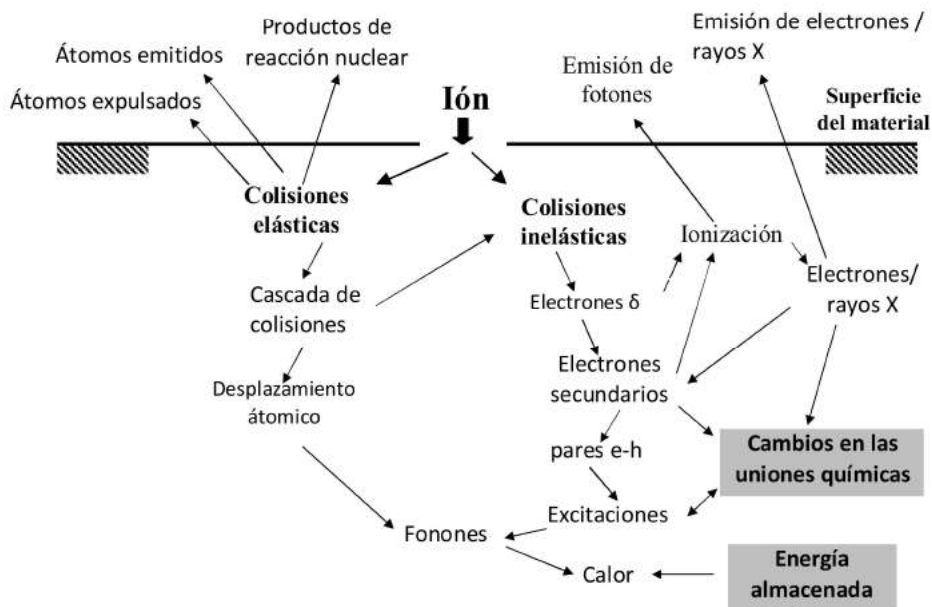
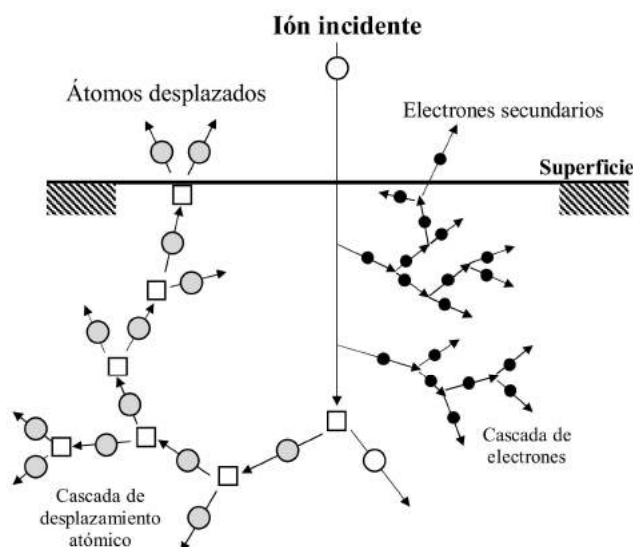


Fig. 1.9. Procesos físico-químicos que ocurren en un material irradiado con iones acelerados.



**Fig. 1.10.** Esquema del desplazamiento atómico y cascada de electrones producidos por un ión incidente sobre un material. El círculo blanco representa el ión incidente; los círculos grises, y cuadrados blancos representan las colisiones elásticas. Los círculos negros representan la cascada de electrones producida.

#### 1.4.5. Poder de frenado nuclear y electrónico

Durante décadas diversos investigadores (*N. Bohr, H. Bethe, F. Bloch, J. Lindhard*) han estudiado el proceso de pérdida de energía de un ión que penetra en un material. Los mismos concluyeron que en su camino a través del sólido, el ión pierde paulatinamente su energía por la interacción con el medio. Asimismo estudiaron cuantitativamente la cantidad de energía ( $dE$ ) que el ión pierde en el camino recorrido ( $dx$ ) como una función [14].

$$S(E) = -dE/dx \quad (1.1)$$

A tal función se la puede denominar de diferentes maneras, entre ellas: pérdida de energía, transferencia de energía lineal (LET) ó las más conocida (término usado en esta tesis) como **Poder de Frenado** (*Stopping power*). En el gráfico de la Fig.1.11 se muestra el gráfico típico del poder frenador  $S$  en función de pérdida de energía ( $E$ ) del ión incidente.

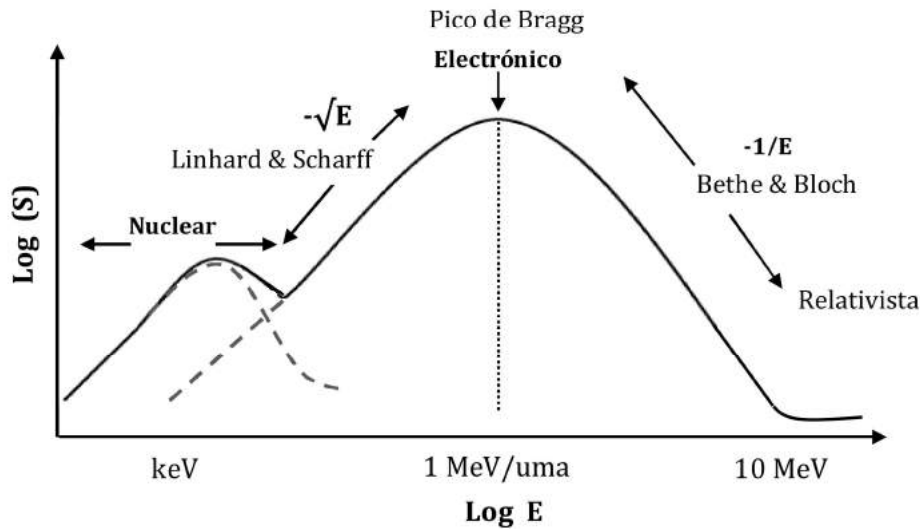


Fig. 1.11. Diagrama de la pérdida de energía  $S$  de un ión penetrando un sólido en función de la energía cinética ( $E$ ) del ión.

Como se puede observar, el poder frenador cambia en varios órdenes de magnitud su valor, por ello se representa en escala doble logarítmica. La función se divide en dos regiones separadas por un pico máximo localizado aproximadamente en  $1 \text{ MeV/uma}$  (denominado pico de Bragg); a energías mayores la función  $S(E)$  decrece como  $1/E$  (descrito por Bethe-Bloch (BB)) [16]; en cambio a energías menores al pico de Bragg la función decrece como  $\sqrt{E}$  (descrito por Lindhard-Scharff-Schiott (LSS)) [17].

La teoría de BB se aplica cuando la velocidad del proyectil es  $v \gg v_0 \cdot Z^{2/3}$  (donde  $v_0 = 2,2 \times 10^8 \text{ cm s}^{-1}$  es la velocidad de Bohr y  $Z_1$  es el número atómico del ión incidente); es decir para altas energías del ión incidente y velocidades no relativistas. Esta teoría es válida hasta que la velocidad se aproxima a  $v_0 \cdot Z^{2/3}$ . Para velocidades menores la carga efectiva del ión se reduce y tiende a neutralizarse, y el poder de frenado electrónico empieza a ser proporcional a la velocidad del ión incidente (zona descrita por LSS). Ambas teorías describen la conducta general del poder de frenado teniendo en cuenta la dependencia con la energía y su magnitud. Mientras que en la zona de transición de la curva (alrededor del máximo del poder frenador) el poder de frenado se describe con teorías semiempíricas desarrolladas a partir de datos experimentales.

En el rango de bajas energías cinéticas (del orden de los *keV*) predomina el poder de frenado nuclear (*nuclear stopping power*); el máximo de esta región se ubica aproximadamente en 0,1 MeV/uma.

En definitiva se considera que la pérdida de energía de los iones en el sólido ocurre principalmente mediante dos mecanismos: la energía transferida por el ión a los núcleos del medio (poder de frenado nuclear) y la energía transferida por el ión a los electrones del material (poder de frenado electrónico). Para energías alrededor de 1 MeV/uma (pico de Bragg) prevalece la transferencia de energía electrónica, región responsable de la creación de trazas latentes (*ion tracks*).

Los fenómenos de colisiones nucleares y electrónicas se pueden considerar independientes entre sí, por lo que el poder de frenado se expresa normalmente como la suma de dos términos proveniente de las colisiones electrónicas y de las nucleares.

$$\frac{dE}{dx} = \left. \frac{dE}{dx} \right|_{\text{nuclear}} + \left. \frac{dE}{dx} \right|_{\text{electrónico}} \quad (1.2)$$

#### 1.4.5.1. Poder de frenado electrónico

Al proceso se lo divide en dos fases:

- *Energía transferida*: En una primera fase la energía es transferida del ión a los electrones individuales del material. Debido a que la masa del electrón es mucho menor que la masa del ión, puede considerarse que este último casi no se desvía en su trayectoria. Mediante mediciones del ángulo y la energía antes y después de atravesar la muestra, puede determinarse la energía perdida por el ión.
- *Cascadas de colisiones electrónicas*: La segunda fase corresponde a la emisión de electrones (electrones  $\delta$ ), que transportan la energía en forma aproximadamente perpendicular a la dirección del ión y hasta distancias del orden cientos de nanómetros [18]. Estos electrones secundarios son los que debido a la gran energía que poseen pueden inducir ionizaciones secundarias.

### 1.4.5.2. Poder de frenado nuclear

Al disminuir la energía del proyectil las nubes electrónicas que rodean los núcleos del blanco se hacen más difíciles de penetrar por el ión incidente. En el caso límite el proceso de impacto se puede representar por la colisión de dos esferas rígidas de masa comparable. Si se incrementa la energía a valores mayores a 0,1 MeV/uma, las nubes electrónicas de ambos átomos se superponen y se puede observar un fenómeno del tipo de una dispersión de Rutherford apantallada. Las colisiones atómicas permiten una transferencia directa de momento y energía del proyectil al átomo del blanco [19].

Este fenómeno ocurre al final del recorrido del ión donde prevalecen las interacciones atómicas, originándose cascadas de colisiones. La dimensión de este tipo de cascada depende, entre otros factores, fuertemente de la energía y del material blanco. La zona afectada es aproximadamente del orden de 0,01  $\mu\text{m}$  [20].

### 1.4.6. Rango de iones

El rango del ión es la distancia recorrida dentro del material antes de perder toda su energía y detenerse. Depende especialmente del tipo de material, de la partícula y de su energía. Para un ión (proyectil) con energía inicial  $E_0$ , moviéndose a través de un material blanco la energía se pierde de acuerdo a [14]:

$$\Delta E = \left( -\frac{dE}{dx} \right) \Delta x \quad (1.3)$$

Integrando entre el la energía inicial  $E_0$  y el valor de la energía final  $E=0$ , se obtiene el rango (R) del proyectil para ese material blanco.

$$R = \int_0^{E_0} \left( \frac{dE}{dx} \right)^{-1} dx \quad (1.4)$$



## 1.5. Parámetros del haz de iones acelerados

### 1.5.1. Rango de los iones

En su trayectoria dentro del material, el ión disminuye su energía hasta llegar al reposo luego de atravesar cierto espesor. Se define como rango del ión, al alcance o espesor mínimo de material que resulte suficiente para que la partícula pierda totalmente su energía (ver ecuación 1.4). Este alcance está sujeto a una fluctuación estadística que hace que partículas con igual energía inicial tengan distinto alcance [14].

### 1.5.2. Flujo y fluencia

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

La fluencia es la integración del flujo en el tiempo, es decir la cantidad de partículas incidentes por unidad de superficie. Se expresa en  $\text{N}^\circ\text{iones} \cdot \text{cm}^{-2}$ .

En el presente trabajo se utilizaron polímeros irradiados con iones pesados de fluencias en el rango de  $10^5$ - $10^9$  iones/ $\text{cm}^2$ .

## 1.6 Efectos de la irradiación sobre los polímeros

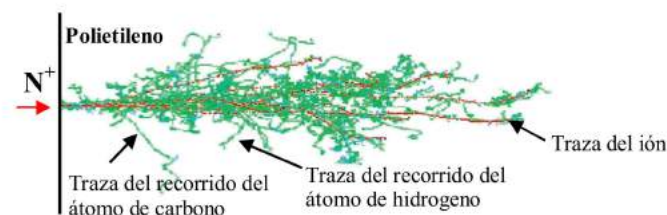
### 1.6.1 ionización

La irradiación con SHI, en el rango de Mev a Gev, genera modificaciones estructurales a nivel molecular sobre los polímeros. Las mismas ocurren por la transferencia de energía a través de las interacciones con electrones y núcleos. Estas interacciones generan zonas de daño donde se producen ionizaciones, eventos de excitación, radicales libres, ruptura y entrecruzamiento de cadenas poliméricas en pequeños volúmenes de la muestra denominados trazas latentes. La traza latente se genera únicamente alrededor de la trayectoria del ión y es una de las principales características de la irradiación con SHI [21].

### 1.6.2 Descripción física de las interacciones

Como se mencionó anteriormente, al penetrar el ión en el polímero se producen interacciones con los núcleos y electrones que disipan su energía (colisiona con miles de átomos de carbono, hidrógeno, oxígeno, azufre y/o nitrógeno, según la composición del polímero) produciendo una distribución de átomos ionizados y desplazados en la macromolécula. Estos desplazamientos y reacomodamientos de electrones y átomos debido a las cascadas de colisiones provocan modificaciones en el polímero. Los fenómenos de colisiones nucleares y electrónicas pueden considerarse como eventos independientes entre sí, por lo cual el poder de frenado ( $dE/dx$ ) se expresa como la suma de los dos términos (ver ecuación 1.2).

Generalmente los modelos y códigos computacionales utilizados en la simulación de los efectos de los iones en los sólidos, asumen como válida la expresión (1.2). Por ejemplo los códigos, tales como el TRIM (transporte de iones en la materia) y el SRIM (frenado y rango de iones en la materia) dan excelentes aproximaciones a los datos experimentales (disponibles en la página <http://www.srim.org/>). Se pueden predecir el rango del ión, la distribución de los defectos, de los fonones y de las interacciones de electrones y átomos. Ambos códigos computacionales utilizan el método Monte Carlo y son rutinariamente utilizados en la simulación de implantación de iones y la irradiación con iones sobre materiales, incluyendo polímeros [22]. En la Fig. 1.12 se presenta un ejemplo de irradiación de PE con iones  $^{13}\text{N}$  de 20 keV.



**Fig. 1.12.** Resultado del cálculo mediante el código TRIM, para la penetración de 10 iones de Nitrógeno a 20 keV, en PE.

La energía depositada en cada trayectoria es característica del tipo de ión, su energía y de la estructura química del material impactado. La naturaleza de los defectos formados sobre estos materiales debido a la

irradiación, son completamente diferentes según sea: un metal, semiconductor, cristal iónico ó polímero. A continuación, se citan ejemplos de procesos de irradiación de iones pesados SHI aplicados a distintos materiales, como por ej. iones de  $^{238}\text{U}$ ,  $^{208}\text{Pb}$ ,  $^{125}\text{Xe}$ ,  $^{209}\text{Bi}$ ,  $^{197}\text{Au}$  y  $^{84}\text{Kr}$  en materiales poliméricos; aunque también se aplican los iones  $^{238}\text{U}$ ,  $^{208}\text{Pb}$ ,  $^{197}\text{Au}$ ,  $^{139}\text{La}$ ,  $^{58}\text{Ni}$  y  $^{56}\text{Fe}$  en vidrio, y  $^{197}\text{Au}$  y  $^{58}\text{Ni}$  para irradiar mica. [23].

### 1.6.3. Formación de trazas latentes

Las zonas de un material que resultan perturbadas como consecuencia del impacto del ión se denominan trazas iónicas o latentes y para el caso de polímeros -al ser aisladores- sus efectos permanecen en el tiempo [24]. Aunque varios modelos describen los mecanismos de formación de las trazas, aun no existe un consenso general con respecto a los detalles de dichos procesos. No obstante, los modelos existentes coinciden en que la pérdida de energía electrónica  $S_e = (dE/dx)_e$  resulta dominante en el proceso, que la densidad de ionización debe ser muy elevada, y que la energía de excitación electrónica debe ser dispersada de manera lo suficientemente lenta para que la traza se forme. La extensión radial de las trazas queda determinada por los electrones secundarios (electrones  $\delta$ ) originados tras el paso del ión. Los defectos atómicos se reorganizan formando el denominado **núcleo de la traza**, una zona altamente perturbada de diámetro aproximado de 10 nm a lo largo del camino del ión. Los defectos producidos por los electrones dan origen a sitios activos (radicales) hasta una distancia de aproximadamente 100 nm denominada **penumbra o halo**, cuyo tamaño depende fuertemente de las características del ión incidente. Dado que los iones presentan un gradiente de energía radial en la traza, según lo visto en secciones anteriores se pueden distinguir dos zonas afectadas por el recorrido del ión, definiendo dos radios:

$r_c$ : **radio del core** o núcleo de la traza, zona central altamente afectada.

$r_{ch}$ : **radio químico**, que delimita una zona circular, en el cual se considera que se producen las modificaciones de interés, y cuyo valor se

encuentra entre  $r_c$  y el rango máximo de los electrones  $\delta$  emitidos por el ión a su paso (ver Fig.1.13) .

Para obtener dichos radios, en diferentes condiciones de irradiación se han realizado medidas de absorbancia de determinados grupos químicos en función de la fluencia [25,26].

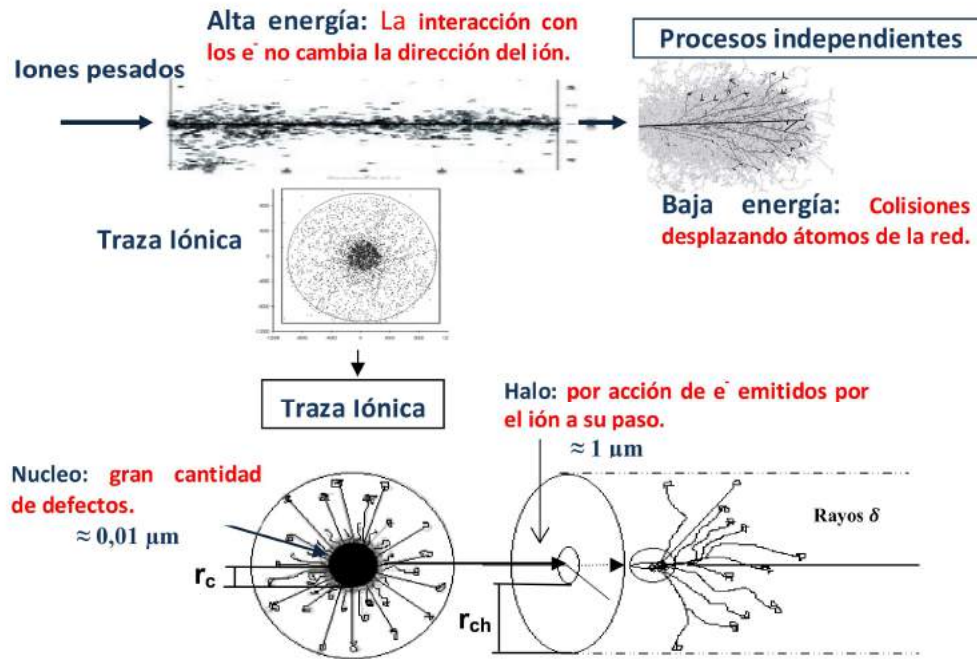


Fig. 1.13. Esquema de la formación de la traza producida por el paso del ión de alta energía, sobre un material sólido.

#### 1.6.4. Efecto de las perturbaciones

Las macromoléculas que constituyen los polímeros son estructuras estables mientras no existan influencias destructivas externas. Bajo la acción de un agente externo como la irradiación con iones SHI, se generan daños considerables de los enlaces químicos de la macromolécula [20].

La energía que se transfiere desde el ión al medio en un evento simple, que puede ser de magnitud mayor que las energías típicas de involucradas en un enlace químico. Dichas colisiones son las responsables de la ruptura de enlaces, dando paso a la formación de radicales libres y excitación de otras especies. Todas estas especies desencadenan una

compleja serie de procesos químicos secundarios que modifican de manera gradual y continua la estructura y las propiedades físicas del material. Los efectos típicos abarcan desde la modificación de la distribución del PM, el grado de cristalinidad, propiedades térmicas, mecánicas, la absorción óptica y la conductividad eléctrica [20].

Una de las aplicaciones de las trazas sobre films poliméricos es la generación de nano-microporos mediante el proceso de grabado químico. La misma será desarrollada ampliamente en el Cap. II.

### 1.6.5. Descripción química de las interacciones

Los iones interactúan principalmente con los átomos por procesos de colisiones inelásticas, que producen una ionización de los átomos y la excitación de los electrones ligados. Una de las características de la irradiación es la heterogeneidad de la distribución espacial en energía depositada. Esta energía se deposita en un pequeño volumen, con simetría de revolución a lo largo del camino del ión, denominada traza latente [20].

Cuando los iones atraviesan al polímero dañan algunos enlaces químicos originando radicales libres. Estas especies reactivas inestables evolucionan de manera más o menos compleja hacia una especie química más estable. En el esquema de la Fig. 1.14 se muestra la escala de tiempo a la cual suceden los diferentes efectos. Los fenómenos físicos (interacción primaria y cascada de colisiones atómicas) ocurren en el orden de los femtosegundos, mientras que los fenómenos químicos suceden mucho más lento, en el orden de los microsegundos. [27].

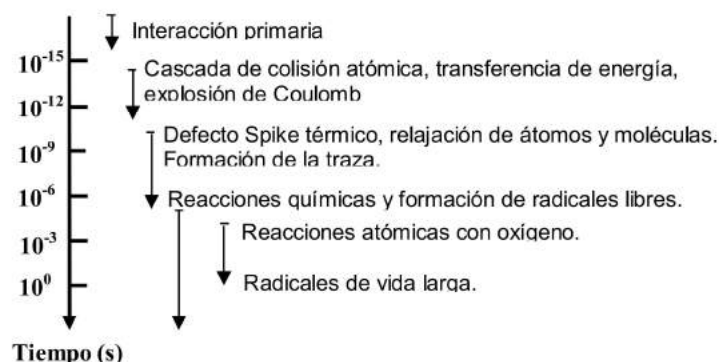


Fig. 1.14. Escala de tiempo de los diferentes efectos que ocurren a lo largo de la traza.

En definitiva, los cambios químicos producidos por efecto de la irradiación dependen fuertemente de la amplia gama de reacciones químicas que ocurren luego de la irradiación y de sus múltiples vías. La vía de propagación, la velocidad con la que ocurre y los productos finales de la reacción son difíciles de predecir. El camino de reacción depende fuertemente del tipo de polímero, del ión y de la post-modificación, esto es, la exposición a especies reactivas luego de la irradiación. Se observó que la energía necesaria para producir ionización primaria y excitación (20 - 30 eV) es mucho mayor que las energías de unión de muchas sustancias orgánicas simples (3 – 5 eV). Existen ciertas reglas, que no están del todo bien establecidas, que sirven de guía, por ej. en hidrocarburos lineales las uniones C-H (104 kcal/mol) se rompen más fácilmente que las uniones C-C (88 kcal/mol), a pesar de la menor energía de unión de esta última. Además los cambios físico-químicos dependen también del lugar donde ocurre la interacción en la molécula [20].

Los efectos que se observan en el polímero irradiado se correlacionan con el tipo de reacción química que haya tenido lugar. En una reacción de tipo ruptura, se destruye el material, ya que al cortar las macromoléculas se reduce su PM y por ende su resistencia mecánica. Por otro lado, la recombinación de radicales genera entrecruzamiento que aumenta el PM del material, eleva el punto de fusión del polímero y lo hace insoluble en los solventes. Según la composición química del polímero tendrá mayor tendencia a la degradación (por ej. PMMA) y otros al entrecruzamiento (PS y PE). Los polímeros que generan trazas de revelado “positivo” son los que tienen zonas dañadas que se disuelven más rápidamente con ataques químicos, que las zonas no afectadas por la irradiación. Mientras que en los polímeros donde predomina el entrecruzamiento generan un revelado “negativo”. En estos últimos las zonas irradiadas son menos solubles y son por lo tanto más resistentes al ataque químico.

Las reacciones descritas ocurren en vacío. La presencia de oxígeno post-irradiación produce un efecto de degradación oxidativo y generación de radicales peróxidos, los cuales a su vez evolucionan de distintas formas.

Existen numerosos trabajos publicados en los cuales se describen los cambios químicos producidos por la irradiación de SHI sobre PET. A

continuación se describen los sitios más probables de ruptura y los productos de degradación obtenidos experimentalmente (ver Fig. 1.15). [28-31].

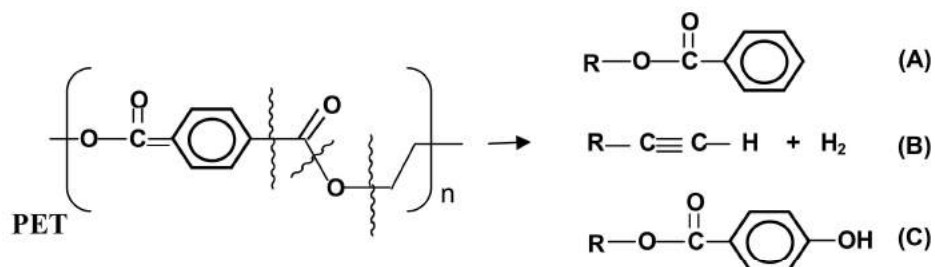


Fig. 1.15. Sitios de ruptura más probable del PET.

Dentro de los productos de la degradación se encuentra la formación de ácido benzoico (A), alquinos (B), a una distancia de 3 nm perpendicular al paso del ión, y alcoholes (C). A continuación se describe el mecanismo de degradación, en base a los productos encontrados experimentalmente (ver Fig. 1.16).

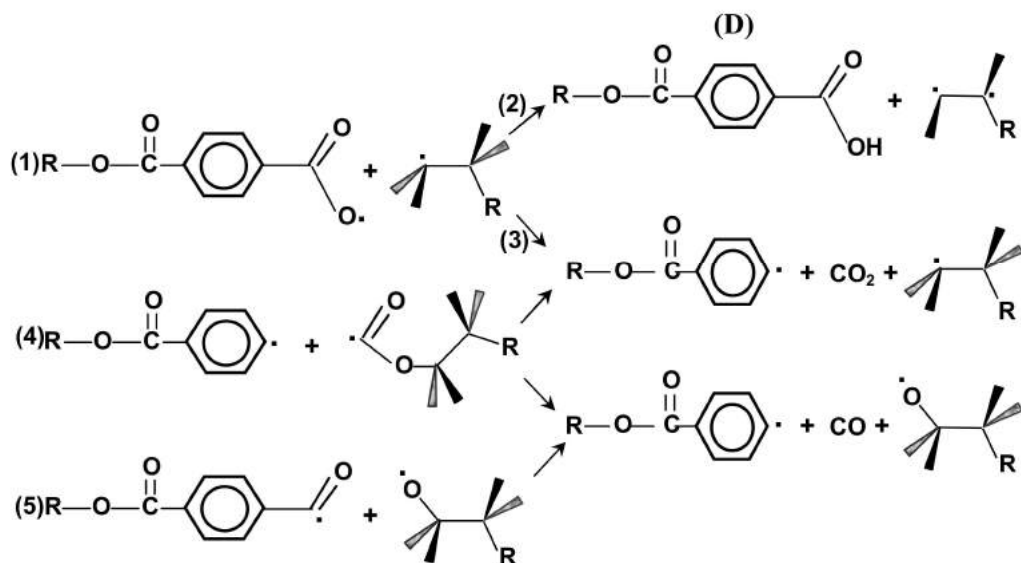


Fig. 1.16. Mecanismo de degradación y formación de alquinos para la irradiación en vacío.

Termodinámicamente, en base a consideraciones energéticas (Entalpia de formación de benzoato y radicales libres correspondientes), la reacción (1) es la más probable respecto de reacciones alternativas (4) y (5);

las reacciones subsecuentes (2) y (3) permiten la formación de ácido carboxílico (D) y residuos de ácido benzoico (A).

Una de las características encontradas en la irradiación con SHI respecto de la de rayos gamma, electrones ó rayos X, es la formación de alquinos como uno de los productos. La formación del triple enlace se produce principalmente por la elevada deposición de energía en el rango de los femtosegundos ( $10^{-15}$  s), y por la distribución espacial inhomogénea de la energía; además se encontró que la formación del mismo es independiente de la estructura del polímero irradiado [28-29].

## 1.7 Irradiación sobre films de PET

La irradiación de los films de PET (PET<sub>1</sub>-PET<sub>9</sub>), utilizados en la presente tesis, se llevaron a cabo en los siguientes ciclotrones: GANIL<sup>1</sup> (Caen, Francia) para los films de PET<sub>2-9</sub> y en DUBNA<sup>2</sup> (Rusia) para el PET<sub>1</sub>. Todos los films fueron generosamente donados por la Dra. M. Clochard, del ISI-Ecole Polytechnique, Palaiseau, Francia. A continuación se muestra el esquema básico de las instalaciones del ciclotron<sup>1</sup> (ver Fig. 1.17).

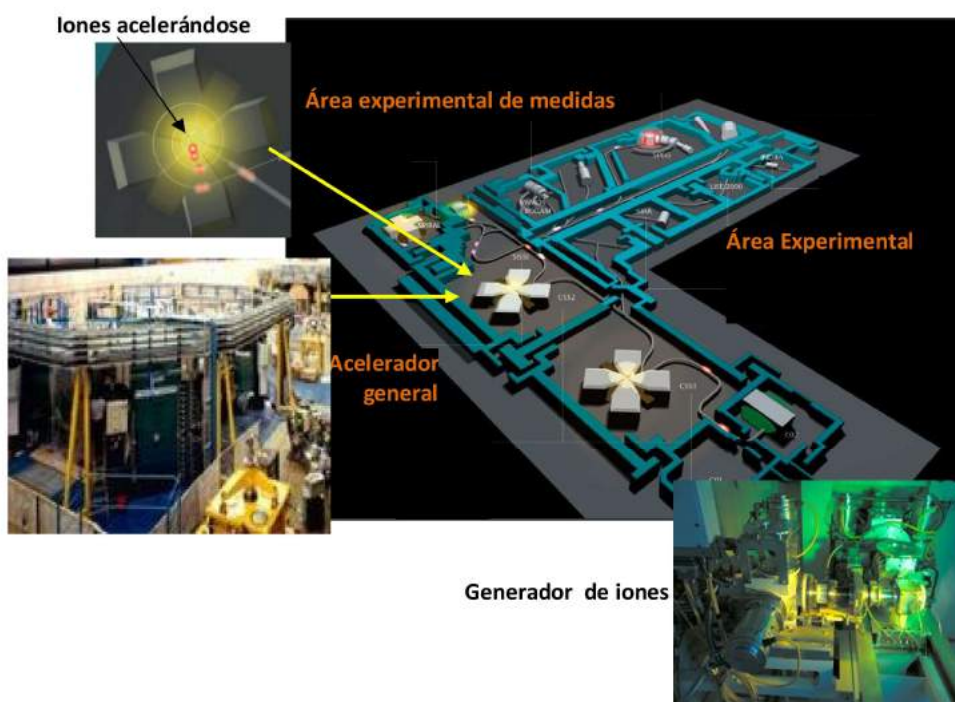


Fig. 1.17. Esquema general del Ciclotrón de iones pesado GANIL, Caen-Francia.



En este sistema es posible producir haces de SHI, desde  $^4\text{He}$  hasta  $^{238}\text{U}$  acelerados en un amplio rango de energías. Los átomos son primeramente ionizados en el **generador de iones**. Este proceso se realiza a través de un campo magnético o bien elevando la temperatura a  $1500^\circ\text{C}$ , de manera de conseguir que los electrones sean excitados y liberados del núcleo. Como resultado se obtiene una gran cantidad de iones de diferentes cargas (dependiente de la cantidad de electrones que perdió el átomo al ser excitado), que viajan a través de un conducto guía y son expuestos a imanes, a fin de ordenar los distintos iones y mantener aquellos que posean una carga dada (según las necesidades del experimento). De este modo el haz del ión seleccionado se conduce hasta el **acelerador**, constituido por una cascada de dos ciclotrones isócronos, donde el haz de iones es fuertemente acelerado y los iones adquieren una elevada energía hasta alcanzar la energía requerida (alcanzando energías mayores a  $50\text{ MeV/uma}$ ). Seguidamente el haz se conduce hacia al **área experimental**, donde se produce la irradiación con SHI uniformemente sobre la superficie de las muestras, en una cámara a alto vacío. Finalmente los productos de la reacción son detectados en el **área experimental de medidas**, donde se analizan y se da información de diferentes parámetros, como por ej., el ángulo de emisión, carga y masa de los productos de reacción generados por el impacto [32].

A continuación se exponen en la Tabla 1.4 los parámetros de la irradiación (tipo de ión, energía y fluencia) y el espesor del polímero de las distintas muestras de PET irradiadas, utilizadas en este trabajo de Tesis.

**Tabla. 1.4.** Tabla con los parámetros de irradiación de los iones sobre los films de PET

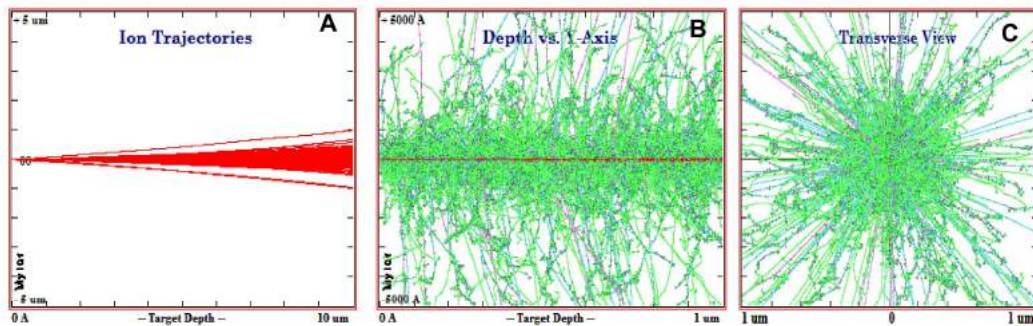
Polímero	Nomenclatura	Espesor ( $\mu\text{m}$ )	Ión	Energía de Irradiación (MeV/uma)	Fluencia ( $\text{n}^\circ\text{poros/cm}^2$ )
PET	PET <sub>1</sub>	10	$^{125}\text{Xe}$	0,95	$7,00\text{E}+07$
	PET <sub>2</sub>	12	$^{84}\text{Kr}$	2,97	$3,00\text{E}+07$
	PET <sub>3</sub>	16	$^{84}\text{Kr}$	2,97	$9,00\text{E}+07$
	PET <sub>4</sub>	23	ND*	ND*	$3,80\text{E}+08$
	PET <sub>5</sub>	16	$^{78}\text{Kr}$	9,2	$1,00\text{E}+05$
	PET <sub>6</sub>	16	$^{78}\text{Kr}$	9,2	$1,00\text{E}+06$
	PET <sub>7</sub>	16	$^{78}\text{Kr}$	9,2	$1,00\text{E}+07$
	PET <sub>8</sub>	16	$^{78}\text{Kr}$	9,2	$1,00\text{E}+08$
	PET <sub>9</sub>	23	$^{78}\text{Kr}$	4,4	$1,00\text{E}+09$

\*ND: No disponible

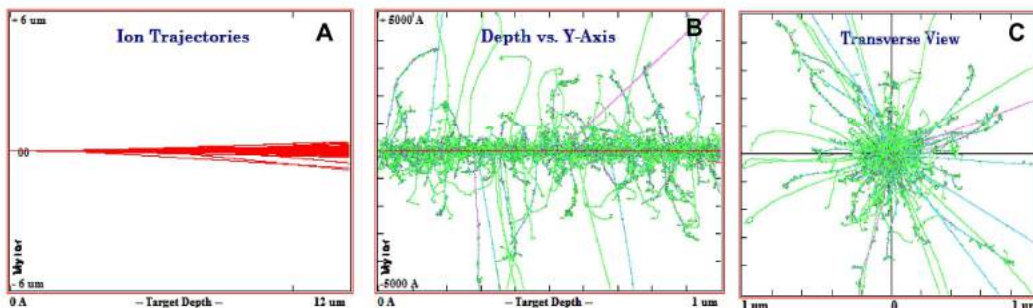
## 1.8. Simulaciones de la interacción ión-sólido

### 1.8.1 Cálculos TRIM – SRIM

El programa de simulación TRIM se lo utiliza rutinariamente para determinar el rango de iones en diversos materiales, así como la distribución de energía y el daño ocasionado por la irradiación. Este código simula los procesos que sufre el material al penetrar el ión a una determinada energía. En las siguientes figuras (Fig.1.18-22) se muestran las trayectorias simuladas para las distintas condiciones de irradiación. Todos los cálculos se realizaron considerando 2500 iones para poder comparar los resultados obtenidos. En color verde se representan los átomos de hidrógeno desplazados por el paso del ión, los átomos de carbono de color celeste y los de oxígeno en magenta. La trayectoria del paso del ión aparece en color rojo en todas las simulaciones.



**Fig. 1.18.** Simulación SRIM. PET<sub>1</sub> irradiado con Xe a 125 MeV. A- Rango del ión. B- Distribución del daño producido por la irradiación. C- Distribución radial del daño.



**Fig. 1.19.** Simulación SRIM. PET<sub>2</sub> irradiado con Kr a 250 MeV.

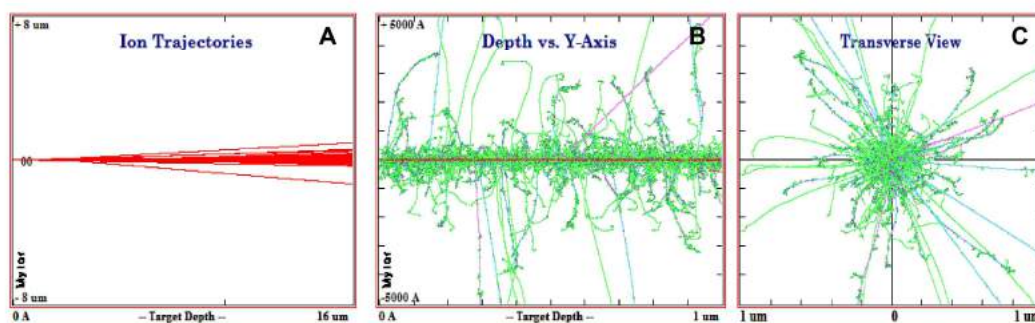


Fig. 1.20. Simulación SRIM. PET<sub>3</sub> irradiado con Kr a 250 MeV.

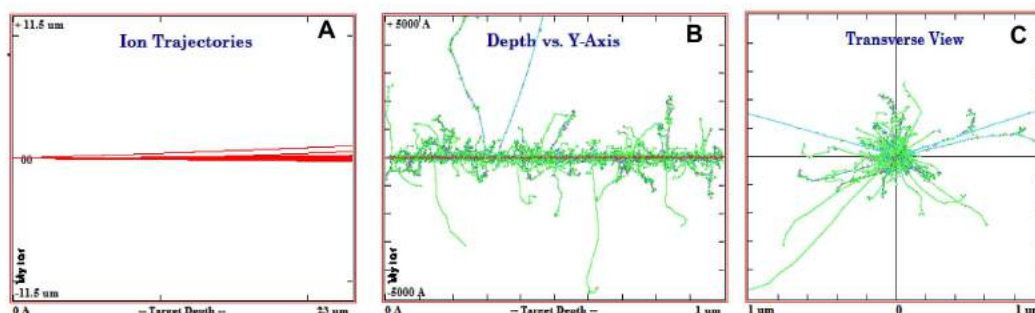


Fig. 1.21. Simulación SRIM. PET<sub>5-8</sub> irradiado con Kr a 773 MeV.

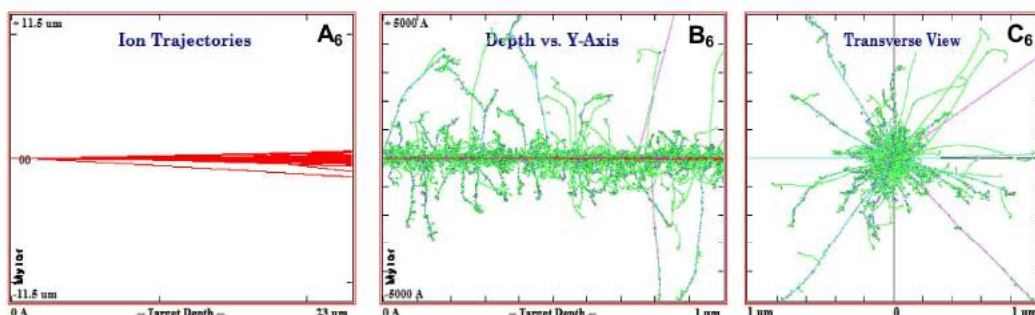


Fig. 1.22. Simulación SRIM. PET<sub>6</sub> irradiado con Kr a 370 MeV.

Utilizando este código se pudo determinar que la energía de los SHI fue suficiente para que el ión atravesase completamente el film PET. Por otro lado, se puede observar el aumento de la transferencia de energía electrónica a expensas de la nuclear, es decir mayor daño para iones de energía próxima al pico de Bragg (1MeV/uma), ver Tabla 1.4. El desplazamiento de <sup>2</sup>H puede generar radicales libres, por lo tanto en las zonas verdes de alta densidad alrededor de la traza existe una gran cantidad de radicales libres formados. Según las condiciones de irradiación, estos halos son de 200 nm de diámetro para el PET<sub>5-8</sub> llegando a 1 μm para el PET<sub>1</sub>.

**Referencias**

1. Rico, M. B., & Gomis, A. M. (2012). *Tecnología de polímeros. Procesado y propiedades*. Universidad de Alicante.
2. Billmeyer, F. W. (1975). *Ciencia de los polímeros*. Reverté.
3. De la Cierva, J. (1976) *Materiales Plásticos: Estructura y Propiedades de los polímeros*. Revista de plásticos modernos (Madrid)
4. Seymour, R. B., & Carraher, C. E. (1995). *Introducción a la química de los polímeros*. Reverté.
5. Callister, W. D. (2002). *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales* (Vol. 1). Reverté.
6. Ballesteros, M. N. S. (2009). *Tecnología de proceso y transformación de materiales*. Univ. Politèc. de Catalunya.
7. <http://tecnologiadelosplasticos.blogspot.com.ar/2011/05/pet.html>
8. <http://www.textoscientificos.com/polimeros/pet>
9. Apel, P. (2001). Track etching technique in membrane technology. *Radiation Measurements*, 34(1), 559-566.
10. Sartowska, B. A. (2012). Nanopores with controlled profiles in track-etched membranes. *Nukleonika*, 57, 575-579.
11. [https://media.vwr.com/interactive/publications/VWR\\_ES\\_Catalog/files/assets/basic-html/page677.html](https://media.vwr.com/interactive/publications/VWR_ES_Catalog/files/assets/basic-html/page677.html)
12. [http://www.hahnemuehle.com/fileadmin/user\\_upload/bilder/filtration/pdf/FILTRATION\\_Flyer\\_6seiter\\_TEM\\_Track\\_Etched\\_Membranes\\_EN.pdf](http://www.hahnemuehle.com/fileadmin/user_upload/bilder/filtration/pdf/FILTRATION_Flyer_6seiter_TEM_Track_Etched_Membranes_EN.pdf)
13. <http://www.dicromingenieria.com.ar/catalogo/251/chromafilpet.html?src=filtracion/membranas-filtrantes/filtros-jeringa-cervecera-farmaceutica-materia/>
14. Spohr, R. (1990). *Ion tracks and microtechnology: principles and applications*.
15. Hellborg Ragnar and Whitlow H. (2009). *Particle acceleration and detection. Ion Beams in Nanoscience and Technology*. Springer.
16. Ahlen, S. P. (1980). Theoretical and experimental aspects of the energy loss of relativistic heavily ionizing particles. *Reviews of Modern Physics*, 52(1), 121-173.

17. Lindhard, J., Scharff, M., & Schiøtt, H. E. (1963). *Range concepts and heavy ion ranges*. Munksgaard.
18. Schou, J. (1980). Transport theory for kinetic emission of secondary electrons from solids. *Physical Review B*, 22(5), 2141-2174.
19. Biersack, J. P., & Haggmark, L. G. (1980). A Monte Carlo computer program for the transport of energetic ions in amorphous targets. *Nuclear Instruments and Methods*, 174(1), 257-269.
20. Arbeitman C. (2012). Modificación por irradiación de polímeros para el mejoramiento de la compatibilidad con sistemas biológicos. Tesis Doctoral. Centro Atómico Constituyentes-Comisión Nacional de Energía Atómica. Facultad de Ingeniería - Universidad de Buenos Aires.
21. De Cicco, H., Saint-Martin, G., Alurralde, M., Bernaola, O. A., & Filevich, A. (2001). Ion tracks in an organic material: application of the liquid drop model. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 173(4), 455-462.
22. Kondyurin, A., & Bilek, M. (2014). *Ion beam treatment of polymers: application aspects from medicine to space*. Newnes.
23. Diwan, P. K., Singh, L., Singh, G., & Kumar, S. (2000). Study of heavy ion range in different solid state nuclear track detector materials. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 160(4), 449-452.
24. Bouffard, S., Gervais, B., & Leroy, C. (1995). Basic phenomena induced by swift heavy ions in polymers. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 105(1), 1-4.
25. Mazzei, R., Bermúdez, G. G., Chappa, V. C., del Grosso, M. F., & Fernandez, A. (2006). Grafting on nuclear tracks using the active sites that remain after the etching process. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 251(1), 99-103.
26. Fleischer, R. L., Price, P. B., & Walker, R. M. (1965). Ion explosion spike mechanism for formation of charged-particle tracks in solids. *Journal of applied Physics*, 36(11), 3645-3652.

27. Fink, D., Hnatowicz, V., & Apel, P. Y. (2004). Modifications on the molecular and supramolecular level. In *Fundamentals of Ion-Irradiated Polymers* (pp. 309-347). Springer Berlin Heidelberg.
28. Steckenreiter, T., Balanzat, E., Fuess, H., & Trautmann, C. (1997). Chemical modifications of PET induced by swift heavy ions. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 131(1), 159-166.
29. Steckenreiter, T., Balanzat, E., Fuess, H., & Trautmann, C. (1999). Pyrolytic effects induced by energetic ions in polymers. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 151(1), 161-168.
30. Takahashi, S., Yoshida, M., Asano, M., Notomi, M., & Nakagawa, T. (2004) Characterizations of heavy ion irradiated PET membranes. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 217(3), 435-441.
31. Zhu, Z., Liu, C., Sun, Y., Liu, J., Tang, Y., Jin, Y., & Du, J. (2002). Modification of polyethylene terephthalate under high-energy heavy ion irradiation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 191(1), 723-727.
32. <http://www.ganil-spiral2.eu/science-us/accelerator>

# **GRABADO QUÍMICO DE FILMS PET**

## **CAPÍTULO II**





## 2. Introducción

La preparación de membranas *track-etched* involucra un primer proceso de irradiación, descrito en el Cap. I, y posterior grabado químico (GQ) para generar poros perfectos. En general se utilizan SHI de  $^{125}\text{Xe}$  y  $^{84}\text{Kr}$ , en diferentes condiciones de irradiación.

En este Capítulo se presentan las generalidades acerca del proceso de grabado y los factores relevantes involucrados en el mismo. Seguidamente, se detalla la metodología y ajuste de las condiciones experimentales del grabado, así como también lo referido a la caracterización.

La caracterización de las membranas porosas se realizó a través de diversas técnicas de microscopía para observación directa de las modificaciones, espectroscopia para intentar caracterizar cambios químicos y técnicas de caracterización funcional de las membranas. Los fundamentos de las técnicas utilizadas así como las condiciones de medición son descriptos en detalle. Finalmente, se describen los resultados obtenidos en el GQ de films de PET

### 2.1 Grabado químico: Generalidades

El GQ de polímeros irradiados con SHI es un proceso químico que transforma las trazas latentes en un poro o conducto que se extiende a lo largo del daño producido por el ión (traza). Dependiendo de las condiciones del proceso se pueden obtener diferentes formas de conductos: cilíndricos, cónicos, bicónicos, entre otros [1].

Uno de los primeros trabajos sobre irradiación con SHI fue reportado por Fleischer en 1964, quien describió la irradiación de mica con fragmentos de fisión de núcleos pesados, como el  $^{288}\text{U}$  y  $^{252}\text{Cf}$  [2-4]. Con el transcurso de los años el proceso de irradiación con fuentes radioactivas fue reemplazado por sistemas más avanzados. El desarrollo de ciclotrones, sincrociclotrones, implantadores y aceleradores de iones pesados posibilitó la obtención de haces de cualquier tipo de ion en un amplio rango de energías y con un mejor control de las

variables involucradas en el proceso. Los haces de iones producidos en este tipo de instalaciones se caracterizan por su elevada capacidad de transferencia lineal de energía.

Cuando un haz de SHI en el rango de MeV a GeV de energía atraviesa una película delgada de polímero deposita una gran cantidad de energía a lo largo del camino recorrido. Esta energía se disipa por una nube de electrones que se desplazan en una dirección aproximadamente perpendicular a la trayectoria rectilínea que sigue el ion y a lo largo de la trayectoria del proyectil, formando la traza como se describe en el Capítulo I.

La distribución local de energía a lo largo de la traza se puede dividir en dos grandes zonas: **núcleo** de la traza (core), una zona altamente perturbada de un diámetro aproximado de 10 nm, mientras que los defectos producidos por los electrones  $\delta$  dan origen a la zona denominada **penumbra o halo** y cuyo tamaño depende fuertemente de las características del ion incidente (ver Cap. I). Estas trazas latentes se pueden convertir en poros útiles a través de un ataque químico (proceso denominado GQ), en el caso de utilizar polímeros de revelado positivo [5-10].

Una de las características más importantes del GQ es la posibilidad de controlar tanto el tamaño como la forma de los poros (conductos) formados, los cuales pueden presentar diámetros en el rango 0,1 nm a 1 $\mu$ m. Adicionalmente se tienen otras ventajas tales como (i) ausencia de contaminación radiactiva del material cuando la energía de los iones irradiados está por debajo de la barrera de Coulomb; (ii) las "n" trazas producidas por un haz de SHI poseen las mismas propiedades de grabado; (iii) puede seleccionarse el ion y la energía de irradiación, permitiendo que films de mayor espesor puedan ser atravesados; (iv) posibilidad de manipular el número de poros por unidad de superficie; (v) los iones pueden ser más pesados que los fragmentos de fisión (vi) es más fácil controlar el ángulo de impacto y producir trazas paralelas e incluso crear distribuciones de trazas angulares particulares que permitan generar poros interconectados [5].

La técnica de GQ se ha aplicado con éxito a varios polímeros tales como PET, PC, PVDF, PP, PI. Existe una gran variedad de trabajos dedicados al estudio del GQ y los diferentes parámetros del proceso. Entre ellos se destacan el estudio del efecto del pre-tratamiento con luz UV y uso de dimetil formamida (DMF) como solvente y la determinación de la velocidad del grabado [11-17].

## **2.2. Bases físicas y químicas del grabado químico**

En condiciones ideales, el reactivo utilizado en el proceso de GQ debe cumplir las siguientes características [1].

1. Ser capaz de distinguir y disolver entre las diferentes áreas del polímero, esto es, las zonas dañadas (trazas) de las intactas (resto del material). La disolución debe producirse solo en la zona dañada sin afectar ni disolver el polímero base.
2. La reacción con el polímero no debe producir ningún producto insoluble, ya que los mismos podrían acumularse en la superficie, impidiendo el transporte del disolvente al interior de la traza.
3. Debe poder utilizarse en altas concentraciones, para aumentar la cinética del proceso. Aunque existen muy pocas excepciones donde el material es altamente resistente, como los fluoropolímeros y donde la cinética del grabado es muy lenta, aún a altas concentraciones de reactivo.
4. Ser preferentemente estable a altas temperaturas y fotoestable.
5. Debe tener una baja tensión superficial, permitiendo la interacción con la superficie del polímero. Una humectación pobre proporciona un proceso no homogéneo, disminuyendo la calidad y distribución del mismo.

En la práctica, pocos reactivos verifican simultáneamente todas las características mencionadas. En la Tabla 2.1 se enumeran los reactivos utilizados con más frecuencia para diferentes polímeros, así como las condiciones de temperatura y tiempo de reacción típicos para cada uno [1].

**Tabla.2.1.** Lista de polímeros y sus respectivos reactivos y condiciones de GQ.

Polímero	Reactivo, temperatura y tiempo	Referencia
Polioximetileno	5% KMnO <sub>4</sub> , 60°C, 10 h	2
Poliamida	25% KmnO <sub>4</sub> , 100°C, 1.5 h	2
Poliimida	25% KMnO <sub>4</sub> , 100°C, 8 h	2
Polifenóxido	25% KMnO <sub>4</sub> , 100°C, 4 min	2
Polimetilmetacrilato	KMnO <sub>4</sub> saturado, 85°C, 8 min	2
Poliestireno	KMnO <sub>4</sub> saturado, 85°C, 2.5 h	2
Cloruro de polivinilo	KMnO <sub>4</sub> saturado, 85°C, 2.5 h	2
Polietilennaftalato	3-5 M NaOH, 45-65°C, h	54
Policarbonato	6.25M NaOH, 70°C, 20 min	2
<b>PET</b>	6.25 M NaOH, 70°C, 10 min	2
Polivinilacetato	6.25 M NaOH, 23°C, 4 h	2
Polietileno	10gr K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> + 35ml 30% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 85°C, 30 min	2
Polisulfona	100 ml 40% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 30gr CrO <sub>3</sub> , 50°C, 1 h	55

En el caso de los poliéteres, poliésteres y policarbonatos se utilizan para el GQ principalmente bases, que producen degradaciones en el polímero catalizadas por un mecanismo de hidrólisis de la cadena principal. Los grupos ésteres al reaccionar con el álcali forman carboxilatos, mientras que los éteres –al ser menos ácidos- sólo lo hacen a altas concentraciones del reactivo de GQ. En los otros polímeros, las uniones insaturadas, generadas por el daño, también pueden sufrir ataques a través de la degradación oxidativa con permanganato o dicromato [1].

La reacción principal de GQ sobre PET es la hidrólisis de las uniones esteres, dando como productos finales de la reacción el etilen glicol y el anión del ácido tereftálico [1].



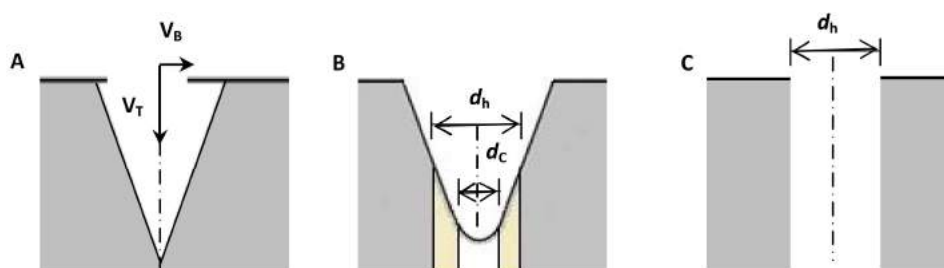
Adicionalmente, es posible modificar la cinética de la reacción agregando pequeñas cantidades de otros solventes, como el etanol o metanol, los cuales aumentan considerablemente la velocidad del ataque químico. Las moléculas de estos solventes al ser pequeñas y más hidrofóbicas que el agua

difunden en la matriz del polímero debilitando las uniones intermoleculares o bien pueden clivar uniones ésteres a través del mecanismo de alcoholisis. Otras especies químicas reducen la velocidad de reacción, como por ejemplo los surfactantes o tensioactivos, los cuales se adsorben sobre la superficie del polímero y actúan como protectores, limitando el ataque químico y finalmente influyendo en la geometría de los conductos durante el grabado [1].

Otros parámetros que influyen en el proceso de GQ son: concentración del reactivo, temperatura, tiempo del proceso y la pre-sensibilización o pre-tratamiento con luz ultravioleta (UV). Es importante destacar que el efecto final del grabado también dependerá de las condiciones de irradiación (tipo de ión, fluencia, dosis de irradiación), así como de las propiedades químicas del polímero.

### 2.2.1. Formación del poro o conducto

La formación del conducto durante el proceso de grabado se produce debido a que la velocidad de degradación de la traza ( $V_T$ ) es mayor que la velocidad de degradación del área no dañada por la irradiación o resto del material ( $V_B$ ). Una descripción simple de la forma geométrica del poro se basa en el uso de estos dos parámetros [18]. Si  $V_T$  y  $V_B$  son del mismo orden de magnitud la forma del conducto obtenido se asemejará a un cono (Fig. 2.1 A). La forma de la punta del cono dependerá del diámetro del core ( $d_c$ ) y del diámetro del halo ( $d_h$ ) (Fig. 2.1 B). En cambio si  $V_T \gg V_B$  se formará un canal cilíndrico de diámetro  $d_h$  (Fig. 2.1 C) [18].



**Fig.2.1.** **A-** Conducto cónico se obtiene cuando  $V_T \leq V_B$ . **B-** La geometría del cono depende de la relación entre  $d_c$  y  $d_h$ . En la forma de embudo  $d_c$  no es despreciable frente a  $d_h$ . **C-** Conducto cilíndrico se obtiene cuando  $V_T \gg V_B$  y el diámetro del conducto resulta ser  $d_h$ .

La  $V_B$  depende del material, del reactivo de GQ y de la temperatura, mientras que  $V_T$  depende además de la sensibilidad del material a la irradiación, las condiciones de irradiación, la conservación post irradiación y las condiciones del GQ [18]. El valor de  $V_B$  se puede determinar experimentalmente a través de diversos métodos directos e indirectos [19]. En este trabajo,  $V_B$  se calcula mediante la determinación de la  $V_{Transversal}$ , que resulta del ajuste lineal de la curva diámetro del poro en función del tiempo de GQ.  $V_{Trans}$  es del mismo orden que  $V_B$  [19]. Mientras que el valor de  $V_T$  generalmente se determina evaluando la conductancia durante el proceso de GQ. En el instante que se forma un conducto se observa un incremento brusco de la corriente. Entonces  $V_T$  se determina dividiendo el espesor del film por el valor del tiempo al cual se produce el salto de corriente [20,21]. En el presente trabajo,  $V_T$  se determina aproximadamente mediante el tiempo de GQ mínimo al cual se observa transporte.

### **2.3. Factores que afectan al grabado químico**

Las condiciones de almacenamiento y el procesamiento previo al GQ pueden producir modificaciones en las trazas. La exposición a luz UV, la temperatura, la exposición a un agente químico y tiempo que transcurre hasta que se realiza el grabado son factores que pueden aumentar o disminuir la sensibilidad de las trazas, según se describe brevemente a continuación [2].

#### **2.3.1. Efecto térmico**

La exposición del polímero irradiado a temperaturas mayores a la ambiente puede modificar  $V_T$  a lo largo de la traza del ión [2]. En el caso del PE y PP, por ejemplo, el calentamiento térmico entre 50-100° aumenta la sensibilidad de la traza por oxidación térmica [22,23].

#### **2.3.2. Efecto químico**

El tratamiento del material irradiado con agentes como  $O_2$ ,  $O_3$ ,  $H_2O_2$  y  $H_2O$  o aire incrementa la  $V_T$ , por efectos de oxidación. Cuando se preserva en vacío o atmósfera inerte esta no se modifica [2].

### 2.3.3. Efecto del tiempo

Otros factores a considerar son el tiempo que transcurre entre la irradiación de la muestra y el proceso de GQ así como las condiciones en las que se almacena el mismo. Experimentalmente se determinó que la  $V_T$  no se ve afectada al mantener en vacío films de PC irradiado con  $^{40}Ar$  durante 6 meses. Por el contrario, si se deja el polímero irradiado en contacto con oxígeno y/o luz UV se observa un aumento de  $V_T$  [24].

### 2.3.4. Efecto de la luz UV

El tratamiento de las muestras irradiadas con luz UV, fotones, electrones u otras partículas que no generan trazas latentes pueden afectar significativamente las propiedades de las trazas iónicas [25,26]. En trabajos previos donde se utilizó el pre-tratamiento con UV en presencia de oxígeno para PET y PC se observó un incremento de  $V_T$  sin afectar significativamente la  $V_B$  [27-30]. Otros trabajos, donde usan al polímero CR-39 reportan un aumento significativo de  $V_B$  [31, 32]. Estas diferencias se atribuyen a las diferencias de estructura química de los materiales, y a las diferentes condiciones experimentales.

La sensibilización por UV es un proceso muy utilizado ya que produce un aumento de  $V_T$  y la formación de poros cilíndricos durante el grabado [8,33]. Tal efecto se atribuye a la degradación foto-oxidativa de las cadenas del polímero en la zona dañada, donde el oxígeno tiene una alta permeabilidad comparada con el polímero prístino. Trabajos previos determinaron que la exposición a luz UV de PET irradiado con  $^{125}Xe$  a 450 MeV, produce durante el GQ un aumento de  $V_T$ , mientras que  $V_B$  se mantiene mayormente constante a lo largo del espesor. En dichas condiciones los conductos que se obtienen son cilíndricos [12].

## 2.4. Preparación de membranas

### 2.4.1- Materiales y Métodos

#### Materiales

Se usaron láminas de PET<sub>1-3</sub> irradiado (ver condiciones de la irradiación en el cap. I), de dimensiones de 19 cm de ancho x 21 cm de largo.

#### Metodología

En todos los ensayos se utilizan secciones rectangulares de la muestra, de 5,5 cm de ancho x 5,5 cm. Las muestras fueron colocadas en un dispositivo imantado que retiene al film polimérico por sus bordes dejando un área expuesta de 25 cm<sup>2</sup>, ver Fig. 2.2.

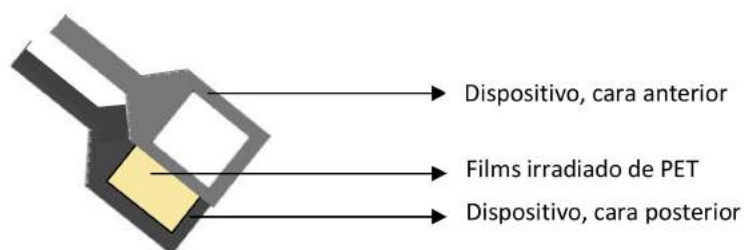


Fig.2.2. Esquema del dispositivo imantado.

### 2.4.2. Grabado químico - Protocolo general

- I. Lavado del film irradiado con agua destilada (H<sub>2</sub>O (d)). Se utilizaron 30 ml por cm<sup>2</sup> de muestra.
- II. Lavado con Etanol (EtOH) 70% y posterior secado a temperatura ambiente (T<sub>amb</sub>) durante 15 h (O.N.) y/o a 30°C durante 3 h.
- III. Incubación del PET en solución de NaOH a una determinada concentración molar y tiempos de incubación entre 0 y 45 min. Se usó una relación de 14 ml de solución por 1cm<sup>2</sup> de muestra.
- IV. Detención de la reacción, mediante la extracción de la muestra de la solución de GQ y lavado con agua desionizada (3 incubaciones de 5 min) utilizando una relación de 14 ml de agua por 1cm<sup>2</sup> de muestra.



V. Enjuague con etanol 70% y secado a  $T_{amb}$ .

El protocolo de GQ descrito se efectuó sobre dos conjuntos de muestras de PET irradiado. A un grupo se le realizó un pre-tratamiento con luz UV (302 nm de longitud de onda, potencia de 15W/tubo (4 tubos) y un tiempo de exposición de 1 h a cada lado del film) denominado **c/UV**. Al segundo grupo (**s/UV**) no se le realizó el pre-tratamiento. Para asegurar la homogeneidad del GQ, durante la incubación con NaOH se controla que el film quede totalmente inmerso en la solución sin tocar las paredes del vaso.

Se estudiaron además condiciones de GQ variando las concentraciones molares de NaOH, temperatura y tiempos de incubación.

## 2.5. Técnicas de caracterización de membranas

La caracterización de las membranas preparadas se realizó con el objetivo de analizar su constitución, estructura-morfológica y comportamiento frente a un determinado proceso. Las técnicas utilizadas se citan a continuación:

### **Técnicas**

- ✓ Microscopía electrónica de barrido de campo (FESEM).
- ✓ Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y reflectancia total atenuada (ATR).
- ✓ Cinética de transporte de masa (CTM).
- ✓ Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS).

Adicionalmente se evaluó la adsorción inespecífica de moléculas modelo.

A continuación se describen los fundamentos de las técnicas empleadas, así como la metodología y los equipos utilizados.

### 2.5.1. Microscopía electrónica de barrido de efecto de campo

Con esta técnica se pueden obtener imágenes de la topografía superficial de la membrana así como de secciones transversales de la misma. Con respecto a las imágenes obtenidas en un SEM (Microscopio electrónico de barrido), el efecto de barrido de campo (FESEM) permite obtener imágenes más claras y menos distorsionadas, con una resolución de aproximadamente 3 a 6 veces mayor y aumentos desde 20x hasta  $10^5$ x. Las imágenes se adquieren por el bombardeo con un haz de electrones con una energía entre los 3-50 keV sobre el material sólido a analizar. La gran cantidad de interacciones que se producen entre el material y el haz electrónico permiten obtener de manera indirecta la topografía de la muestra lo cual permite visualizar los poros presentes en la superficie de la membrana. Para evitar distorsiones en la imagen obtenida, la muestra debe ser conductora (caso contrario al no poder disiparse la energía del haz de electrones, el material puede cargarse y distorsiona la imagen obtenida). En general los polímeros deben ser metalizados para evitar este efecto.

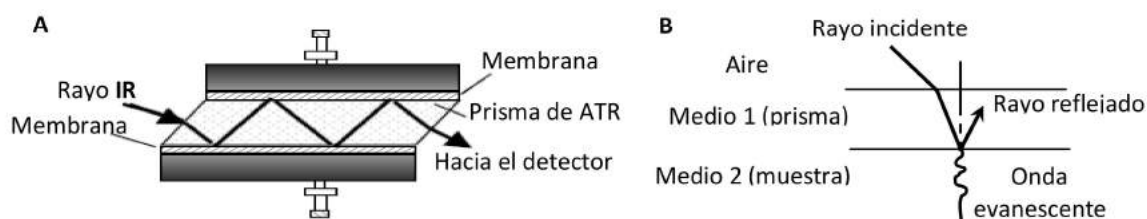
Las microscopías electrónicas se realizaron utilizando un microscopio FESEM Zeiss supra 40 (Carl Zeiss NTS, LLC) y una energía del haz de 3 kV; perteneciente al centro de Microscopías Avanzadas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA. De las imágenes obtenidas (magnificación de 100.000 o 200.000x) se determinaron los diámetros de los poros tomando el valor promedio de un mínimo de 30 mediciones +/- SD. El procesamiento de imágenes se realizó con el programa Image J.

### **2.5.2. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier y reflectancia total atenuada**

La adsorción de luz en el espectro infrarrojo (IR) es una de las técnicas espectroscópicas que da más información acerca de la estructura química de los polímeros. El espectro IR es muy característico de un material y puede utilizarse para establecer la identidad de dos compuestos o revelar uno nuevo. Su principal aplicación es la detección de grupos químicos funcionales, y el análisis cualitativo y cuantitativo de compuestos orgánicos. En los últimos años, los espectrómetros de IR dispersivos convencionales fueron reemplazados por equipos de IR por

transformada de Fourier (FT-IR) en los cuales se incorpora un interferómetro de Michelson para modular la radiación.

La superficie de films poliméricos pueden ser estudiados mediante la técnica de reflectancia total atenuada (ATR). En esta técnica la muestra a estudiar se coloca en una celda en contacto con un cristal que refleja completamente el haz infrarrojo. Cada vez que esto ocurre, una pequeña cantidad de energía forma una onda evanescente, que decae rápidamente con la distancia (en el orden del micrón), ver Fig. 2.3. El espectro de absorbancia resulta de la pérdida de las frecuencias absorbidas por el material de esta onda evanescente. Los espectros obtenidos proporcionan información de la composición de la estructura química, así como también del contenido de agua ó la orientación molecular, cerca de la superficie del cristal, con gran sensibilidad.



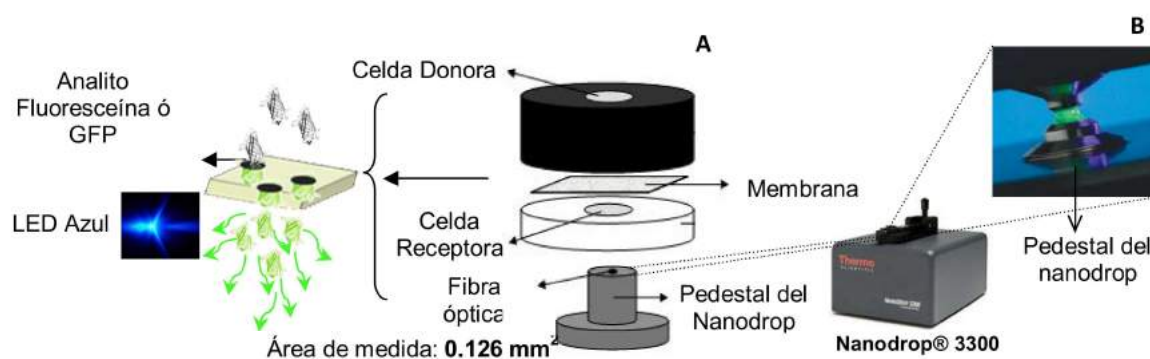
**Fig. 2.4.** A-Esquema del camino recorrido por el haz IR dentro del prisma. B- Detalle entre los dos medios.

En este trabajo, se tomaron los espectros FT-IR-ATR de las siguientes muestras: Films PET antes de la irradiación (virgen o prístino, denominado  $PET_p$ ), después de la misma (denominado  $PET_i$ ), y posterior al proceso de GQ (denominado  $PET_g$ ) para seguir la evolución en la absorción de luz IR, de diferentes grupos químicos funcionales. Los espectros se adquirieron en el IRAffinity 1 (Shimadzu) con el módulo PIKE GladiATR. Los parámetros de adquisición fueron:  $4\text{ cm}^{-1}$  de resolución, 60 scans y barrido entre los  $600\text{ cm}^{-1}$  y  $3000\text{ cm}^{-1}$ . Finalmente los espectros fueron corregidos por la línea de base y atmósfera.

### 2.5.3. Cinéticas de transporte de masa

La evaluación del transporte de masa a través de los nanoconductos se realizó utilizando un dispositivo de celdas de micro-transporte (**MCD**) desarrollado exclusivamente para este fin. El mismo se adaptó a un pequeño espectrofluorómetro de estado sólido (Nanodrop® 3300, Thermo Scientific, EE.UU.) de elevada sensibilidad (< femtomoles de moléculas fluorescentes). El acople de las celdas al Nanodrop permitió cuantificar el transporte de los analitos, mediante la cuantificación de fluorescencia in situ.

El dispositivo **MCD** se compone de dos cilindros huecos (medias celdas) de polímero acrílico (ver esquema Fig. 2.4). El diámetro interno de ambos corresponde al diámetro del pedestal del Nanodrop de 3 mm, mientras que el diámetro externo de 15 mm facilita la manipulación. El cilindro inferior es transparente a la luz visible de 2 mm de altura, con un área de intercambio de 7 mm<sup>2</sup> y funciona como celda receptora (volumen 14 µl). El disco superior (celda donora) posee 4 mm de altura y un volumen total de celda de 28 µl; además es de color negro para evitar la excitación del analito contenido en este, asegurando que las medidas durante el ensayo corresponden a la fluorescencia emitida por las moléculas presentes en la celda aceptora. La membrana a analizar se coloca entre los dos cilindros de acrílico con una pequeña cantidad de aceite de silicona, para sellar el sistema.



**Fig. 2.4.** **A**-Esquema del dispositivo de celdas utilizado para medir la cinética de transporte de masa a través de las membranas nanoporosas. **B**- Sistema estándar de medida del nanodrop.

La fuente de excitación, longitud de onda ( $\lambda$ ) del diodo emisor de luz (LED), y la longitud de emisión deben ser previamente determinados. En este

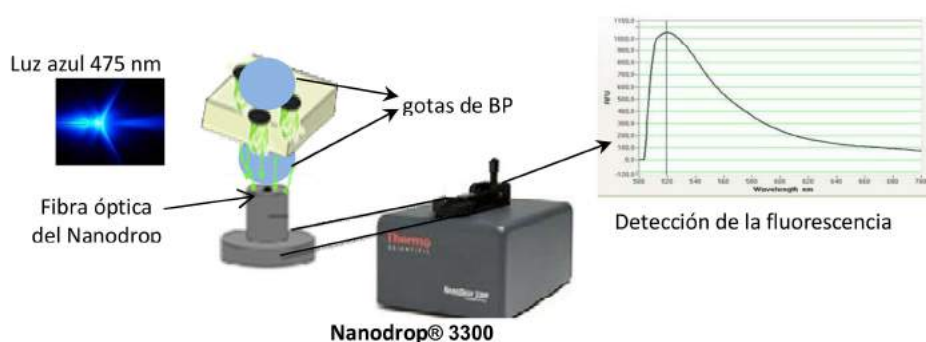
trabajo se usó el LED azul (475 nm) para excitar tanto a Fluoresceína como GFP y las lecturas se realizaron en unidades de fluorescencia relativas (RFU) al máximo de emisión (a 515 nm y 506 nm para Fluoresceína y GFP respectivamente). Por otro lado la distancia de paso de la luz del sistema MCD se cambió a 2 mm, respecto del valor preestablecido en el Nanodrop de 1 mm, por lo cual las medidas de RFU fueron corregidas.

El estudio de transporte de Fluoresceína y GFP se realizó inicialmente sobre membranas PC comerciales (SPI™), para mostrar el funcionamiento de la técnica. Las concentraciones de los analitos fue de 0,47  $\mu\text{M}$  para Fluoresceína y de 25  $\mu\text{g/ml}$  para GFP, ambos en buffer fosfato 30mM, pH 7 (BP (1)). Las muestras (secciones rectangulares de 0,3  $\text{cm}^2$ ) fueron previamente pre-acondicionadas O.N. en diferentes soluciones a) KCl 0,1M, b)  $\text{H}_2\text{O}$  (d), c)  $\text{H}_2\text{O}$  MiliQ, según la membrana y/o el requerimiento del ensayo. En todos los casos se llenó con 10  $\mu\text{l}$  del disolvente en la celda aceptora y 20  $\mu\text{l}$  de la solución del analito en la celda donora. El lapso de tiempo de la cinética fue de 30 min, con intervalos de medición de 1- 2 min. Las evaluaciones de las muestras se realizaron por triplicado, las mediciones de RFU fueron corregidas, y los resultados se presentan a través de curvas de cinética de transporte de masa expresados en RFU (-) o en moles transportados por área ( $\text{mm}^2$ ) en función del tiempo.

#### **2.5.4. Absorción Inespecífica**

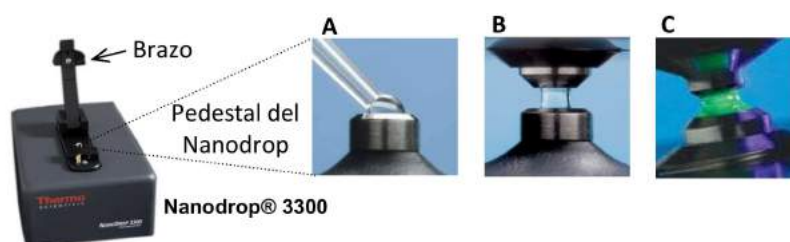
En este ensayo se evaluó la adsorción inespecífica de Fluoresceína y GFP a membranas mediante fluorimetría directa, usando el Nanodrop® 3300. El ensayo general se realizó pre-acondicionando la muestra (secciones de 0,3  $\text{cm}^2$  de membranas PC) O.N. en 1,5 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  (d). Luego se incubó en 1 ml de la solución del analito a evaluar (Fluoresceína 0,52  $\mu\text{M}$  o GFP 29,5  $\mu\text{g/ml}$ , ambas en BP (1)) durante 30 min. Se lavó con BP (1) por 30 min y en agitación constante. Las mediciones de fluorescencia sobre la membrana se realizaron excitando con luz azul (475 nm) y las lecturas al máximo de emisión del analito. Las mismas se midieron por quintuplicado sobre distintas áreas de la membrana. Los resultados se informan como el valor promedio de las medidas +/- SD.

La determinación de la fluorescencia directa de la membrana se efectuó con el uso de un dispositivo que sostiene la membrana de manera inclinada (ángulo de 30°), sobre el pedestal del nanodrop y deja un espacio de 1mm entre el pedestal y la misma, donde se coloca 2 µl del BP, además para asegurar la humectación de la muestra se colocan otros 2 µl del BP (1) por encima esta (ver esquema Fig. 2.5).



**Fig.2.5.** Esquema de la adaptación experimental sobre el nanodrop para hacer las mediciones cuantitativas de fluorescencia sobre las membranas.

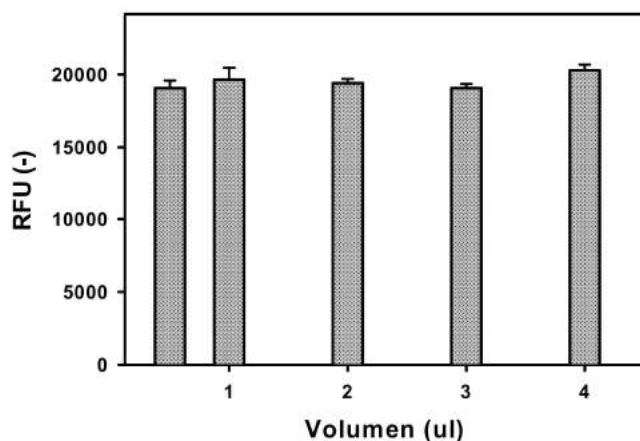
La cuantificación se realiza sobre un área de 0,126 mm<sup>2</sup> que corresponde a la sección de la fibra óptica. Esto permite que las mediciones realizadas bajo esta condición (Fig. 2.6), sean independientes del volumen de sembrado.



**Fig.2.6.** Esquema del procedimiento estándar de medida del equipo (muestras líquidas). **A-** Siembra de la muestra sobre el pedestal. **B-** Apoyo del brazo sobre el pedestal, toma de medida y formación de la columna de líquido de 1 mm de alto. **C-** Excitación de la muestra con la longitud de onda correspondiente y cuantificación de la emisión de fluorescencia.

Para corroborar la independencia de la medición respecto del volumen se realizó una determinación de fluorescencia con diferentes volúmenes de

muestra, todos superiores a 126 nl que corresponde al volumen de medida de la fibra óptica (0,4 mm diámetro y 1 mm altura). Como se observa en el gráfico de la Fig. 2.7, en todos los casos la fluorescencia medida fue igual.



**Fig.2.7.** Ensayo de cuantificación de fluorescencia con diferentes volúmenes de muestra.

### 2.5.5. Espectroscopia de Impedancia Electroquímica

La Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS) es una técnica analítica electroquímica no invasiva, que permite profundizar en el estudio de fenómenos que ocurren a nivel de interfases. Aplicando una perturbación senoidal de potencial eléctrico (V) de frecuencia variable ( $\omega$ ) se registra la respuesta en corriente (i) dentro de una celda electroquímica. El cociente  $V/i$  (impedancia: Z) varía con  $\omega$  en una forma que está relacionada con las propiedades del material. Esta técnica tiene la capacidad de segregar varios procesos, tales como la conducción óhmica, transferencia de carga, carga en la interfase, transferencia de masa, entre otros, que la hace adecuada para sistemas de membrana // electrolito. Permite la evaluación de la membrana y la solución de electrolito, con sus correspondientes contribuciones al proceso global.

Varias investigaciones han reportado el uso de EIS en la caracterización de membranas de polímero en las condiciones de trabajo, es decir, en contacto con soluciones de electrolitos, sobre sistemas compuestos por: electrodo / solución // membrana // solución / electrodo. Los espectros de

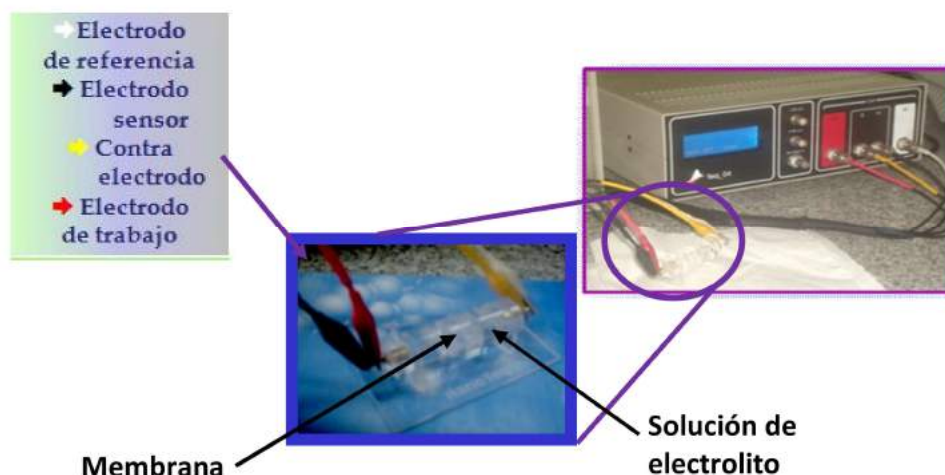
impedancia resultantes son dependientes de la estructura de la membrana [34-36]. Además, EIS es una herramienta valiosa que proporciona información acerca del proceso de transporte de iones a través de membranas [37, 38.], y también permite el análisis cuantitativo y la caracterización eléctrica del sistema. Este último se realiza mediante modelos de circuitos alternos equivalentes [39].

El transporte iónico a través de los poros de las membranas puede ser afectado cuando el diámetro de estos es comparable con el espesor de la doble capa eléctrica (EDL), que se puede generar en la superficie interna del poro. Dada su relación con la fuerza iónica, la EDL o longitud de Debye ( $\kappa^{-1}$ ), se puede modificar ajustando la fuerza iónica ( $I$ ) de la solución de electrolito. Por lo tanto, se realizaron determinaciones de EIS en diferentes concentraciones de KCl con el propósito de analizar este efecto. Se analizaron membranas de PC y PET, que poseen la característica de poseer grupos carboxilos sobre la pared interna de los conductos, generados durante el proceso de GQ, que le confieren carga (en el Cap. IV se desarrollará más sobre EDL).

Las mediciones de EIS fueron realizadas por la Dra. C. Arbeitman, utilizando un potencióstato AC TEQ (BA, Argentina), de la FFyB UBA. Con este dispositivo se aplicó una diferencia de potencial constante de 50 mV entre dos electrodos de Pt conectados a hemiceldas y se midió la conductividad resultante del sistema. Una amplitud de 10 mV de corriente alterna y una señal de compensación de polarización fueron utilizadas con el objeto de minimizar las reacciones faradaicas. Uno de los electrodos constituyó el electrodo de trabajo (W), utilizando el otro como contra electrodo de referencia (R). Las salidas de W y R se conectaron a un Módulo Analizador de Impedancia TEQ\_4Z (Argentina), desde el cual los datos son transferidos a una computadora para su almacenamiento y posterior procesamiento (ver Fig. 2.8). Se realizaron barridos de 50 frecuencias diferentes en el rango de 0,1 Hz a 1 Mega Hz. La celda donde se coloca la muestra está conformada por dos cámaras cilíndricas de igual volumen



y la membrana a caracterizar sujeta entre las mismas. Cada compartimiento contiene 2 ml de la solución de electrolito.



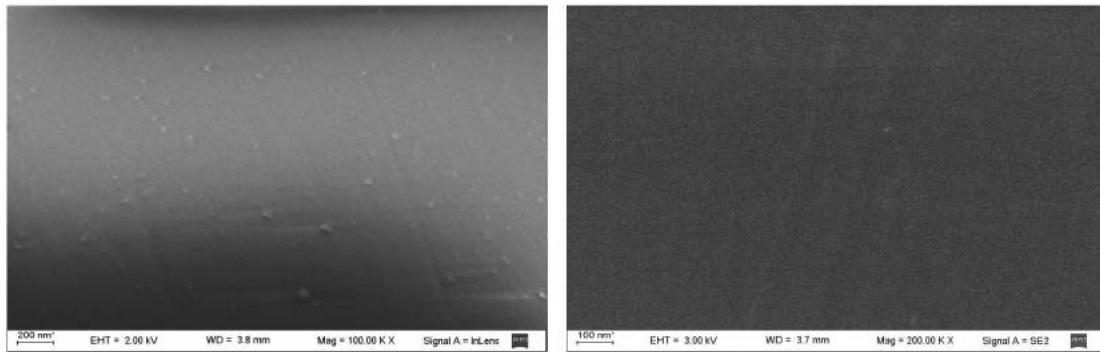
**Fig.2.8.** Dispositivo TEQ (Arg.) utilizado para las mediciones de EIS.

## 2.6. Resultados y discusión

El proceso de GQ de films de PET irradiados se realiza con una solución alcalina de NaOH en un baño de agua a temperatura controlada. Dado las variaciones experimentales que pueden existir en la preparación de membranas *track-etched*, en este Capítulo se ajustaron las condiciones experimentales para conocer y controlar el tamaño de poro generado. Por un tema de simplicidad, se utilizó la FESEM como técnica de estudio y seguimiento de la modificación de las membranas. Se obtuvieron imágenes de la superficie de las muestras con una magnificación de hasta 200.000x que permitió determinar con precisión la apertura del poro.

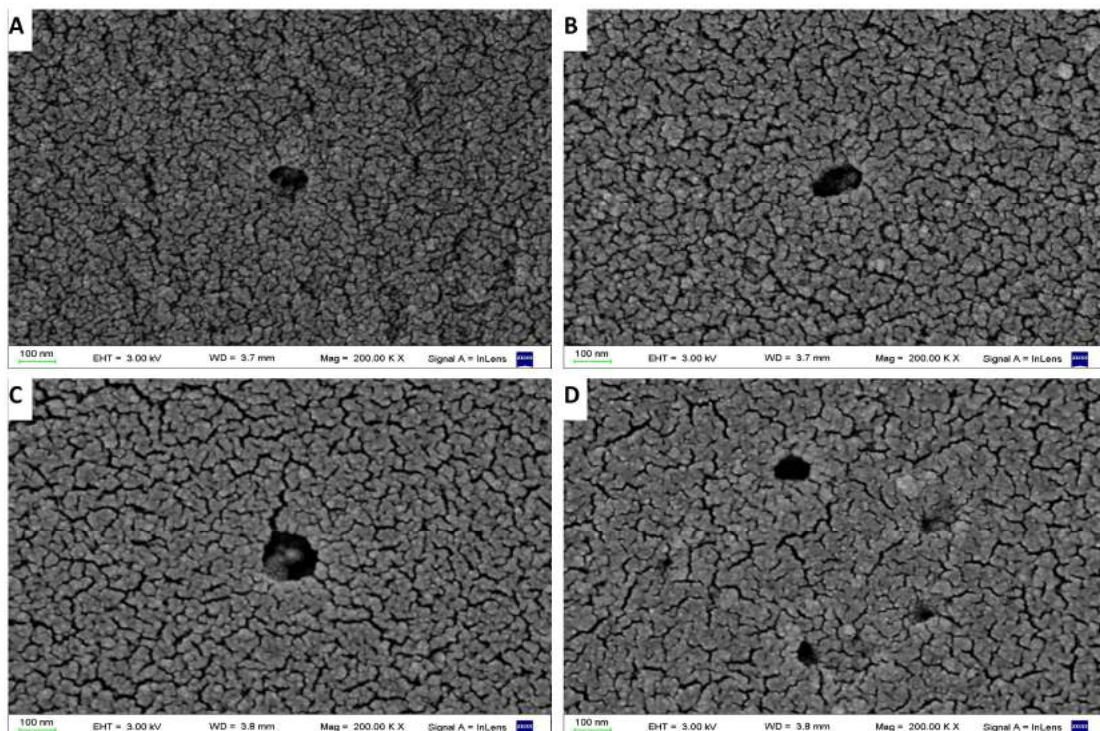
### 2.6.1 Análisis por FESEM

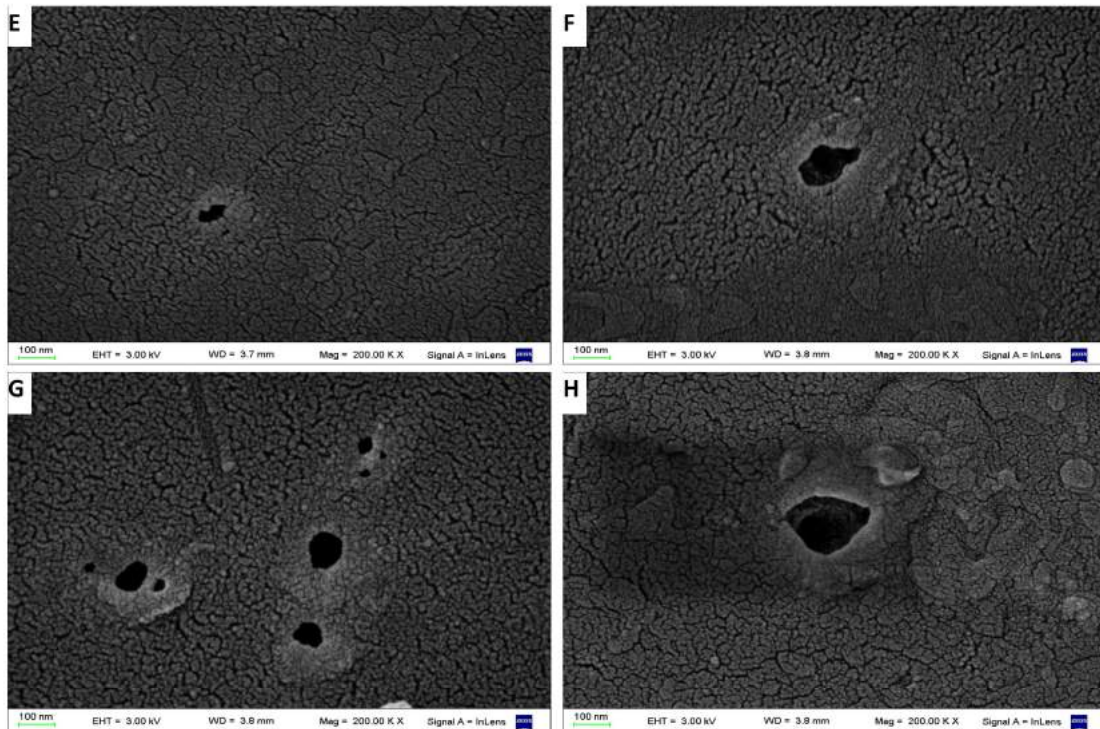
En la Fig. 2.9 se muestran las micrografías correspondientes a PET<sub>1</sub> irradiado sin realizar GQ. En la misma puede observarse una superficie de muy baja rugosidad y sin discontinuidades, en la escala nanométrica.



**Fig.2.9.** Micrografías FESEM de PET<sub>1</sub> (irradiado con iones Xe y fluencia  $7,10^7$  iones/cm<sup>2</sup>).

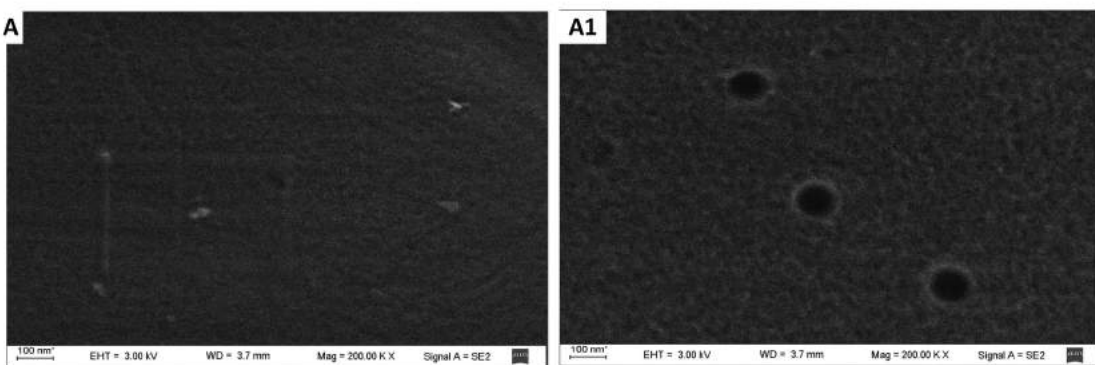
En un primer experimento se realizó el GQ de PET<sub>3</sub> según el protocolo general, utilizando una baja concentración de álcali (NaOH 0,25 M), incubando hasta 40 min a 50°C. Como puede observarse en la Fig. 2.10 se forman poros irregulares, tanto para las muestra sometidas a pre-tratamiento con UV (**c/UV**) como para las sin tratamiento (**s/UV**).

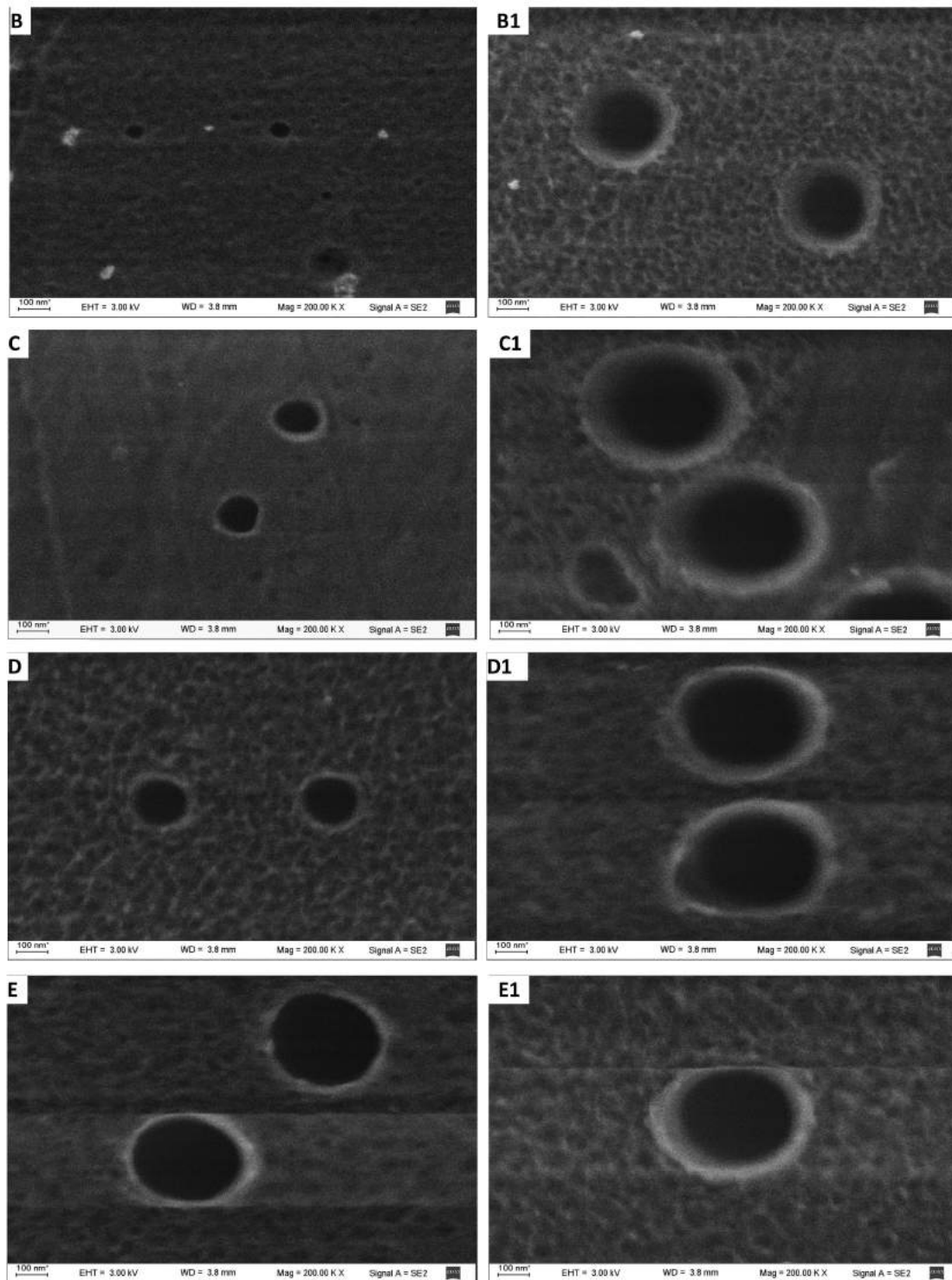




**Fig.2.10.** Micrografías FESEM de las membranas producidas por el GQ de PET<sub>3</sub> irradiado. Protocolo estándar s/UV (A-D) tiempos de GQ: A- 10 min. B- 20 min. C- 35 min. D- 40 min. Protocolo estándar c/UV (E-H) tiempo de GQ: E-10 min. F- 20 min. G- 35 min. H- 40 min.

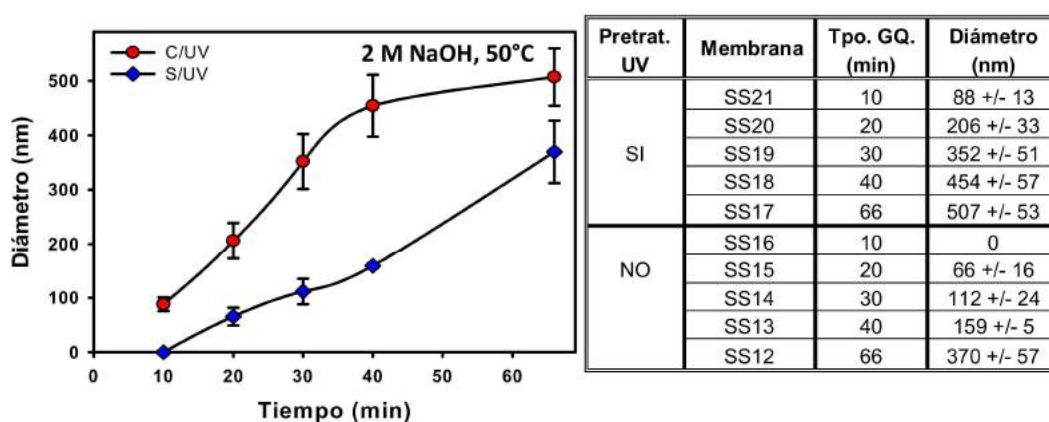
Para mejorar el proceso de GQ se aumentó la concentración de NaOH a 2 M. La Fig. 2.11 muestra las imágenes FESEM de las membranas obtenidas a partir de PET<sub>2</sub>. Para todas las muestras (**c/UV** - **s/UV**) se pueden visualizar poros del orden nanométrico de forma regular, cuyos diámetros aumentan conforme lo hace tiempo de GQ, siendo mayores en el grupo c/UV.





**Fig.2.11.** Micrografías FESEM de las membranas producidas por GQ de PET2 irradiado, con NaOH 2 M; grupo s/UV (A-D), con tiempo de GQ. A- 10 min. B- 20 min. C- 30 min. D- 40 min. Grupo c/UV (A1-D1), con tiempo de GQ. A1- 10 min. B1- 20 min. C1- 30 min. D1- 40 min.

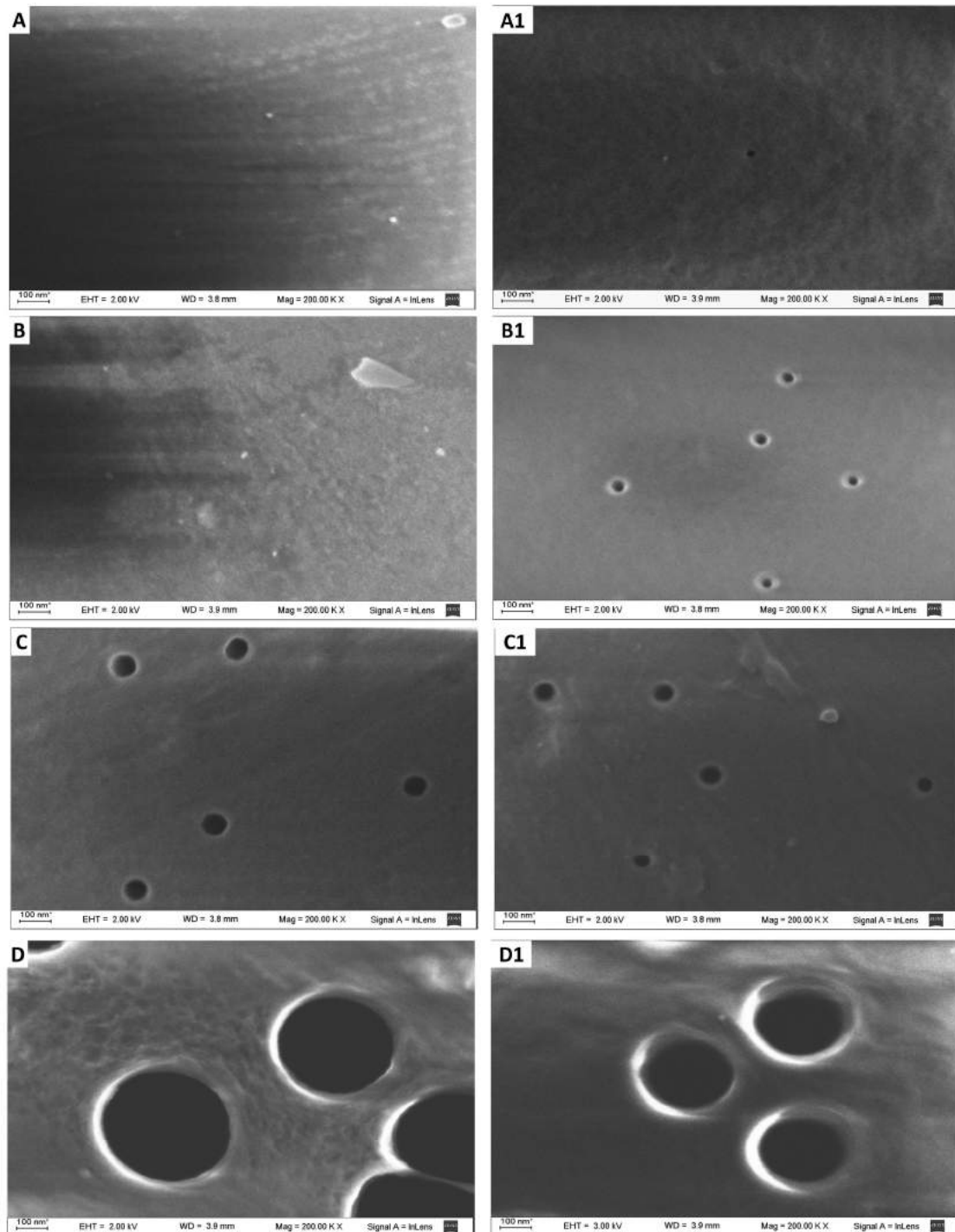
Los valores promedio de diámetro de poros, obtenido del análisis estadístico de las imágenes FESEM, se graficaron en función del tiempo de GQ (ver Fig. 2.12). A partir del gráfico se determinó un valor de  $V_B$  de  $4,5 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$  y de  $13 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ , s/UV y c/UV respectivamente. La  $V_T$  se determinó de forma aproximada, empleando el tiempo mínimo de GQ al cual se observa transporte (ver Tabla 2.6), resultando ser  $\geq 40 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$  (s/UV) y  $\geq 120 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$  cuando se utiliza el pre-tratamiento con luz UV. Siendo  $V_T \gg V_B$  en ambas condiciones (c/UV y s/UV).



**Fig.2.12.** Gráfico del diámetro de los poros en función del tiempo de GQ, para muestras c/UV (círculo) y s/UV (diamante).

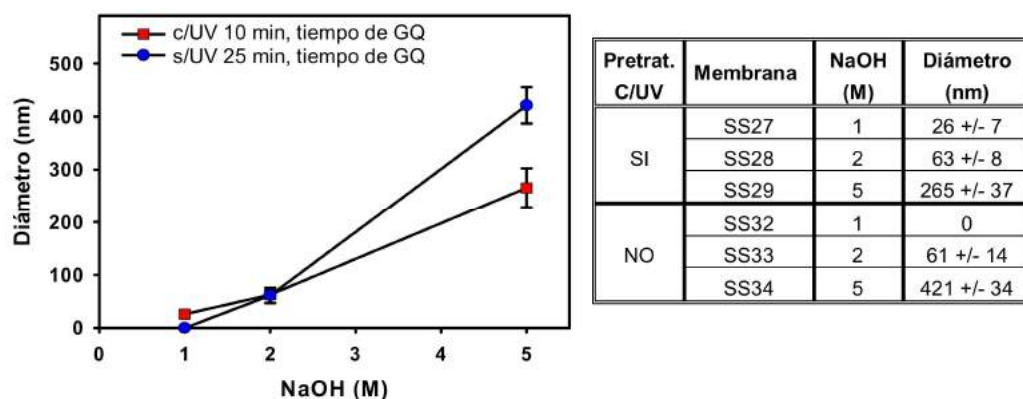
Dado la gran dependencia observada en el GQ con el NaOH, se decidió estudiar el efecto de la concentración de este. Para ello se fijaron dos tiempos de GQ diferentes de acuerdo a que las muestras estén o no pre-tratadas con UV, por la gran diferencia de  $V_T$ .

En la Fig. 2.13 se muestran las micrografías de las membranas preparadas a partir de  $PET_1$ , cambiando la concentración molar de NaOH y un tiempo de GQ de 25 min y 10 min para las muestras s/UV y c/UV respectivamente. Se observa la formación de poros en las muestras s/UV a concentraciones mayores a 1 M. En cambio para las muestras c/UV se forman poros, aún en la más baja concentración de álcali estudiada.



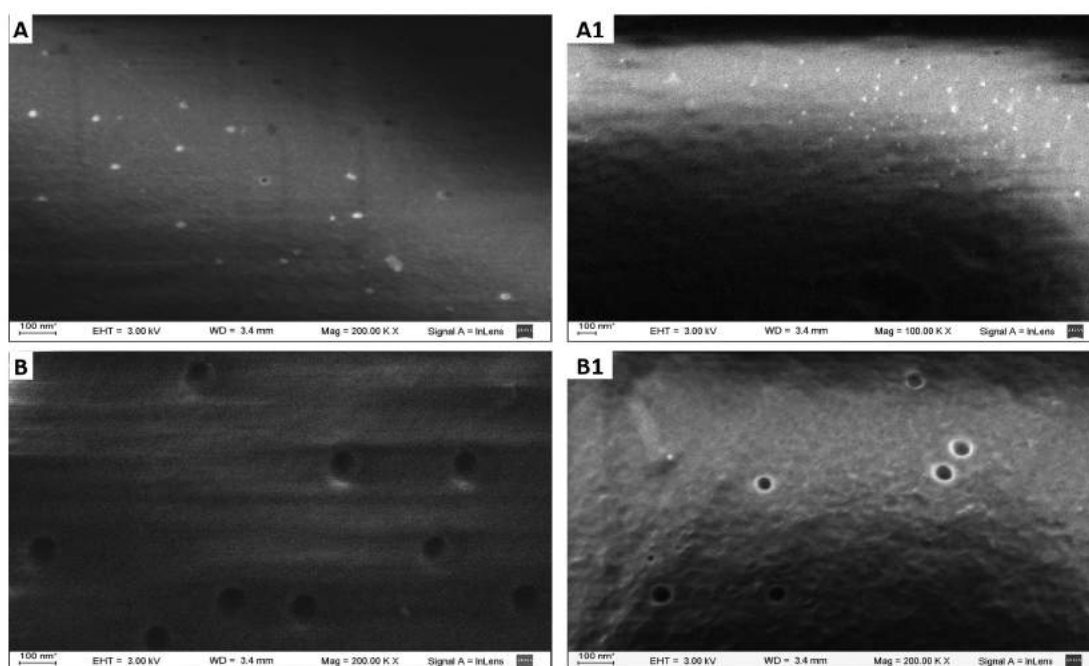
**Fig.2.13.** Micrografías FESEM de las membranas producidas por GQ de PET<sub>1</sub> irradiado, a NaOH (M) variable. Grupo s/UV a 25 min de GQ (A-D), A- 0,25 M. B- 1 M. C- 2 M. D- 5 M. Grupo c/UV a 10 min de GQ (A1-D1), A1- 0,25M NaOH. B1- 1 M. C1- 2 M. D1- 5 M.

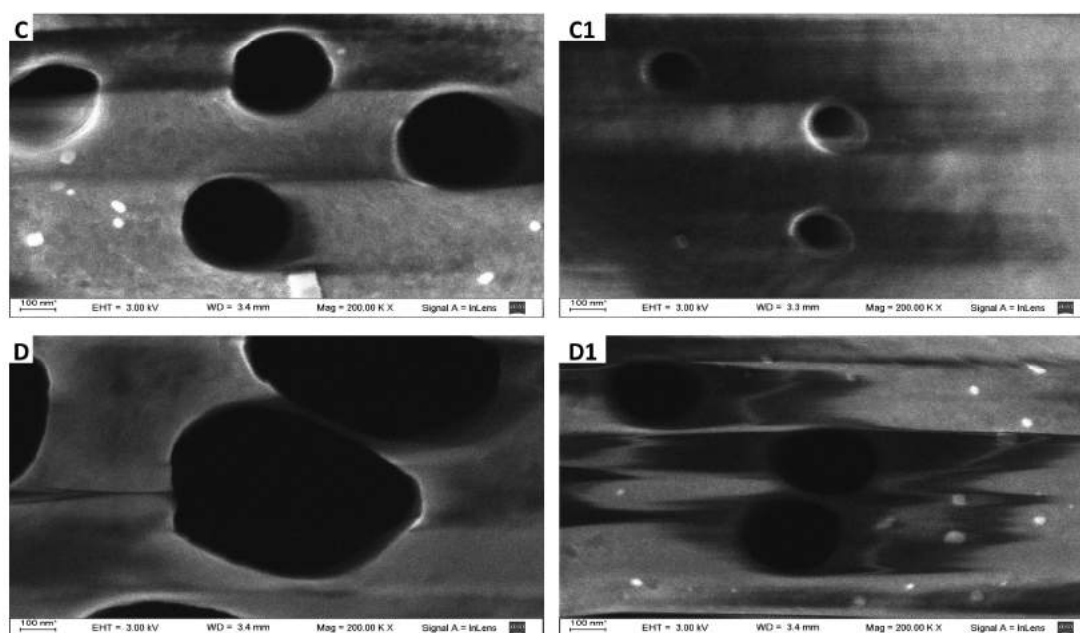
Los valores promedio de los diámetros se graficaron en función de la concentración de álcali (ver Fig. 2.14). Como es de esperar, el diámetro de los poros aumenta con el incremento de la concentración del reactivo



**Fig.2.14.** Gráfico de los valores promedio de diámetro (+/- SD) de los poros en función de la concentración del NaOH (M), para el grupo c/UV (cuadrado) y s/UV (círculo).

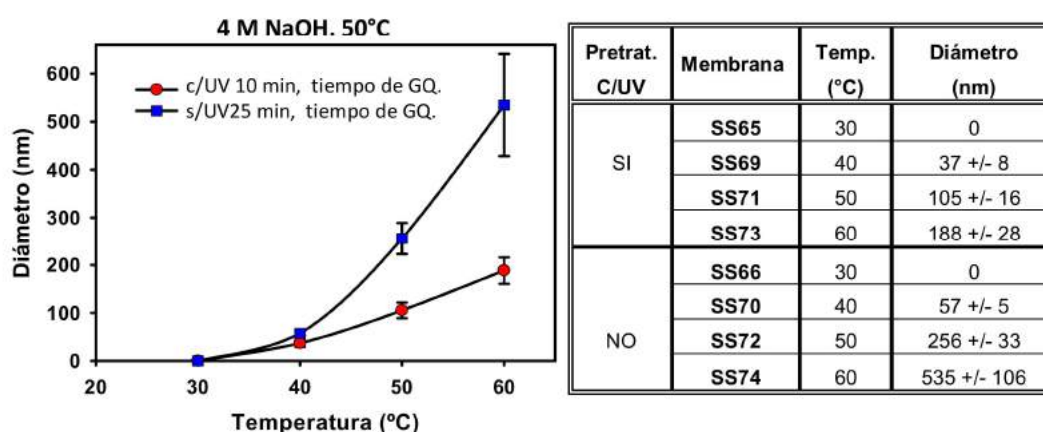
Utilizando el mismo tiempo de incubación para los respectivos tratamientos s/UV y c/UV y seleccionando la concentración 4 M de NaOH (a partir del experimento anterior), se estudió el efecto de la temperatura de GQ. En la Fig. 2.15A se muestran las micrografías de las membranas obtenidas a partir de PET<sub>1</sub>. La temperatura se modificó en un rango de 30 °C a 60 °C en intervalos de 10 °C.





**Fig.2.15A.** Micrografías FESEM de las membranas obtenidas por GQ de PET<sub>1</sub> irradiado a NaOH 4M, a temperatura variable y tiempo de GQ de 10 min y 25 min para el grupo c/UV y s/UV respectivamente. A- 30°C. B- 40°C. C- 50°C. D- 60°C. (A-D s/UV y A1-D1 c/UV)

Como puede observarse en las micrografías solo la condición a 30 °C no mostró poros, en todas las demás se observa la presencia de poros regulares en la superficie de los films. Para todas las muestras el diámetro de los poros se incrementa conforme lo hace temperatura del proceso de GQ. En la Fig. 2.16 los valores promedio de los diámetros fueron graficados en función de la temperatura.



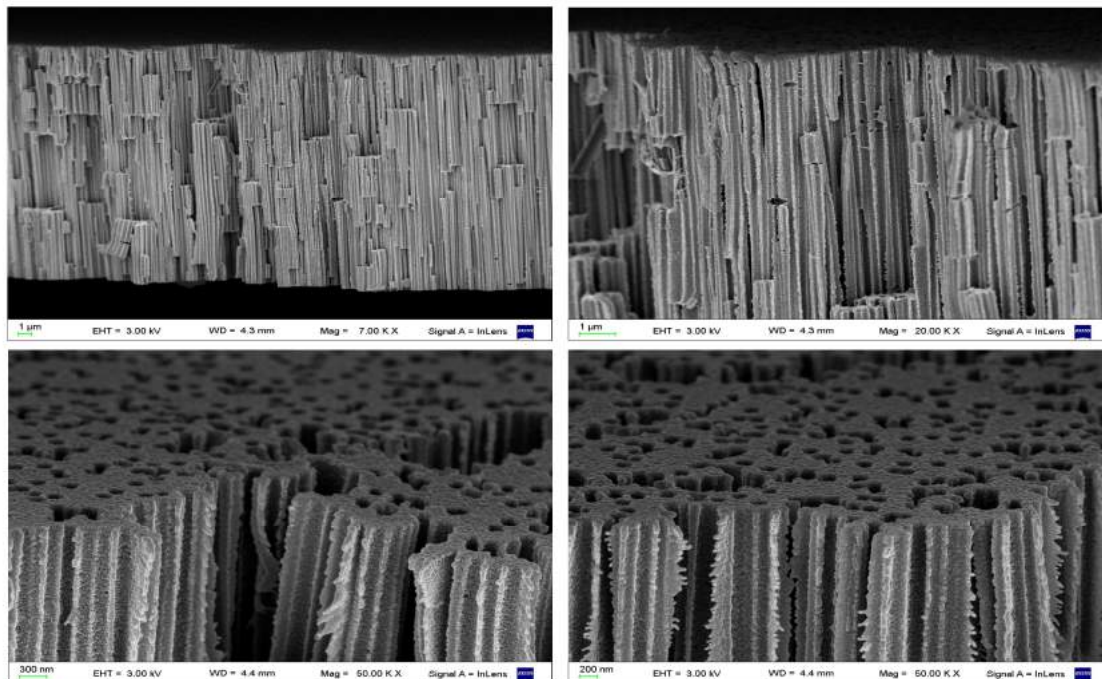
**Fig.2.16.** Gráfico de los valores promedio de diámetro de los poros en función de la temperatura del GQ; para el grupo c/UV (círculo) y s/UV (cuadrado).



Con esta serie de experimentos realizados se obtuvieron suficiente cantidad de resultados experimentales que permiten obtener membranas con poros regulares del tamaño deseado a partir de films previamente irradiados con un haz de SHI de energía cercana a 1 Mev/uma.

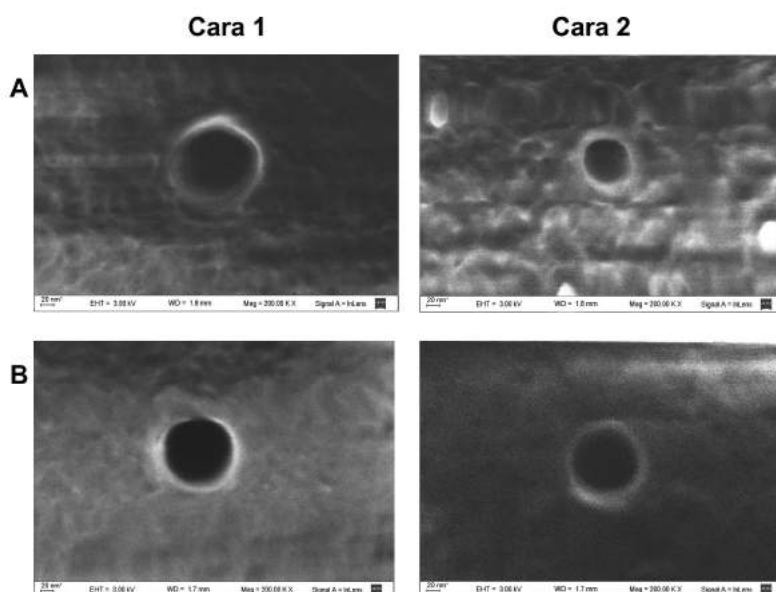
Cuando se utilizó una concentración muy baja (0,25 M) de NaOH a 50°C solo se obtienen poros irregulares, inclusive a tiempos de incubación largos (40 min). A mayores concentraciones de NaOH se obtuvieron poros regulares, obteniéndose membranas con poros de diámetro desde 25 nm a 500 nm de acuerdo a las condiciones del GQ. Para todas las variables estudiadas se observó un efecto directo y proporcional sobre el diámetro de los poros.

En la Fig. 2.15B se muestran microscopías FESEM de cortes transversales que confirman la presencia de nanoconductos a lo largo del poro de forma cilíndrica, como se predijo en la simulación realizada en el código TRIM (Cap. I) y una condición de  $V_T \gg V_B$  durante el proceso de GQ.



**Fig.2.15B.** Micrografías electrónicas del corte transversal de la membrana PET<sub>9</sub> con GQ a 2 N NaOH, c/UV, 60°C y 15 minutos de incubación, a diferentes magnificaciones.

Dado la diferencia encontrada en la  $V_T$  con el pre-tratamiento UV, se evaluó la posibilidad de obtener poros cónicos de una manera sencilla. La metodología utilizada actualmente aplica surfactantes y celdas electroquímicas [19]. Para ello se irradió con luz UV una sola cara de un film de PET<sub>1</sub> durante 1 h. Posteriormente se realizó el GQ con NaOH 2 M, 50°C por 20 min. Las membranas obtenidas se observaron por FESEM (ver Fig. 2.17).



**Fig. 2.17.** Microscopía de las membranas obtenidas por pre-tratamiento asimétrico de UV. **A-** PET<sub>1</sub> cara 1, con pre-tratamiento UV 1h, cara 2 no pre-tratada. **B-** PET<sub>1</sub> pre-tratado con UV en ambas caras a 1 h por cara.

Para estimar la formación de poros cónicos, se determinó la conicidad ( $c$ ) que corresponde a la diferencia de los diámetros de un tronco de cono y la altura ( $h$ ) del mismo (espesor del film).

$$C = D_1 - D_2 / h = 2r_1 - r_2 / h$$

**Tabla 2.2.** Tabla con los valores obtenidos de diámetros y % de conicidad. **A-** Pre-tratamiento no homogéneo. **B-** Pre-tratamiento homogéneo de luz UV.

Membrana PET1	lado 1 (nm)	lado 2 (nm)	Conicidad %
A	109 +/- 16	72 +/- 6	0,31
B	105 +/- 18	99 +/- 14	0,05

Los valores determinados de % de conicidad (Tabla 2.2) muestran que la geometría de los nanoconductos obtenidos por este tratamiento asimétrico puede ser mensurable a pesar de estar en el rango de los nanométrico. Sin embargo, el grado de conicidad resulta muy pequeño para aplicaciones tecnológicas, aunque es posible realizar una optimización.

### 2.6.2. Análisis por FTIR-AR

Con el propósito de identificar las modificaciones químicas producidas en el PET irradiado por el GQ se aplicó la técnica de FTIR-ATR. Esta técnica ha sido utilizada en numerosos trabajos para mostrar los cambios producidos por los diferentes tipos de irradiaciones (de distinta naturaleza) sobre la composición química del PET, por ej. con irradiación gamma [40], electrones acelerados [41] y diferentes iones acelerados; como  $^{12}\text{C}$  [42],  $^{82}\text{Kr}$  [43],  $^7\text{Li}$  [44], e iones  $^{107}\text{Ag}$  [45]. En consecuencia, cualquier modificación, aparición o supresión de señales espectrales se relaciona directamente con cambios químicos estructurales en las moléculas, mientras que cambios en la intensidad de absorbancia proveen información cuantitativa acerca de las modificaciones químicas producidas [46].

Se realizaron espectros FTIR-ATR de PET prístino ( $\text{PET}_p$ ), PET irradiado ( $\text{PET}_i$ ) y el PET con GQ ( $\text{PET}_g$ ) como se describió en M y M. En la Fig. 2.18 se superponen los espectros obtenidos, para las diferentes muestras analizadas.

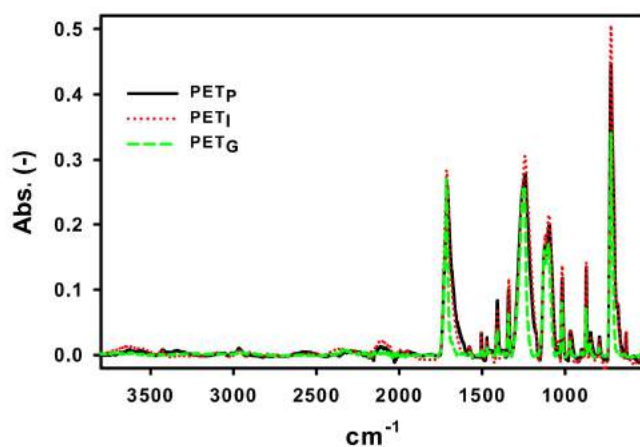


Fig.2.18. Espectro FTIR-ATR de las muestras  $\text{PET}_p$ ,  $\text{PET}_i$  y  $\text{PET}_g$

Como se observa en la Fig. 2.18 el espectro del PET<sub>P</sub> contiene una gran cantidad de picos, los cuales coinciden con los reportados en bibliografía [46,47]. Los más importantes se destacan en la Tabla 2.3. Al comparar los espectros del PET<sub>P</sub>, PET<sub>I</sub> y PETg no se observan diferencias significativas entre ellos, no detectándose variaciones importantes de corrimiento o intensidad de los picos presentes ni aparición o supresión de los mismos.

**Tabla. 2.3.** Picos característicos del PET, presentes en el espectro de FTIR-ATR.

Long. de onda (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
730	Vibración planar de los dos C=O, sustituidos en el anillo aromático.
870	Vibración de los dos pares de H adyacentes a los anillos aromáticos.
980	Estiramiento del O-CH <sub>2</sub> , del etilenglicol.
1238	Estiramiento del C(O)-O, del grupo ester.
1615	
1470	Estiramiento del esqueleto aromático.
1430	
1409	
1715	Estiramiento del grupo C=O.
2910	Estiramiento alifático del C-H.
2972	Estiramiento aromático del C-H.
3432	Estiramiento del O-H.

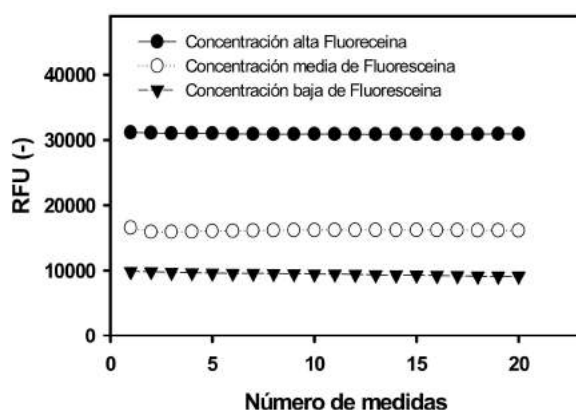
El bajo grado de modificación del polímero por la baja fluencia de irradiación de la muestra ( $10^7$  iones/cm<sup>2</sup>) es la responsable de la muy baja cantidad de modificaciones químicas presentes. Las mismas se encuentran por debajo del límite de sensibilidad de la técnica. En literatura se describe que es necesario una fluencia  $\geq$  a  $10^{12}$  iones/cm<sup>2</sup> para observar modificaciones por esta técnica [43,44]. Sin embargo, esa fluencia no permite hacer estudios de GQ y modificaciones químicas acopladas por destrucción del material.

### 2.6.3. Análisis por CTM

Un estudio funcional de los conductos (o poros) de las membranas se realizó evaluando el transporte de moléculas a través de estos, determinando cinéticas de transporte de masa (CTM). El sistema tradicional de análisis del transporte de solutos se basa en el uso de un tubo en forma de U (conformado por dos ramas que se conectan entre sí). El mismo requiere de volúmenes en el orden de los mililitros, secciones considerables de membrana ( $\text{cm}^2$ ) que se ubica entre ambas ramas de tubo y detección *off-line* [48-50]. En el caso de evaluar CMT de proteínas se requieren de varios miligramos de proteína por experimento [51]. En este trabajo se utilizó para el estudio de CTM un sistema de microceldas descrito previamente, denominado MCD, que utiliza detección fluorescente *in situ*.

Previo al análisis de las membranas de PET preparadas anteriormente, se evaluó el sistema de MCD, para descartar posibles errores de detección por fotoblanqueo (*Photobleaching*).

El fotoblanqueo corresponde a la disminución de la fluorescencia por la exposición continua a la luz. Tres concentraciones de Fluoresceína fueron medidas 20 veces de manera continua en el Nanodrop 3300. Este número de repeticiones corresponde a la cantidad de determinaciones a realizar en un experimento de CTM (ver Fig. 2.19).



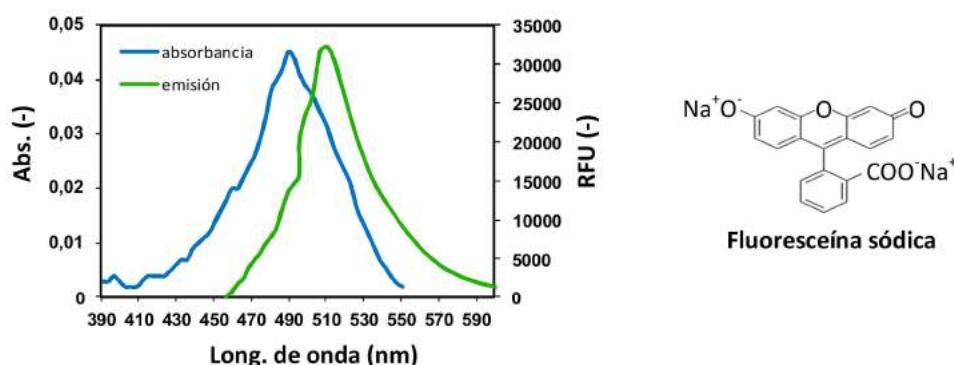
**Fig. 2.19.** Ensayo de Blanqueamiento, para tres soluciones de fluoresceína. ● 0,7 µM. ○ 0,37 µM. ▼ 0,22 µM.

En el gráfico de la Fig. 2.19 se muestra la evolución de la fluorescencia (unidades relativas de fluorescencia - RFU). En todos los casos las RFU se mantienen relativamente constantes durante la totalidad del ensayo, con una reducción de 1%, 3% y 7% de las RFU iniciales para Fluoresceína de alta, media y

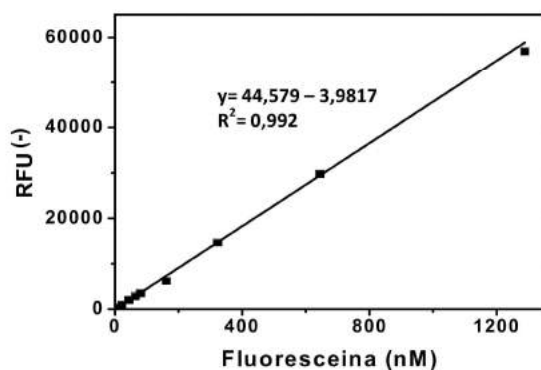
baja concentración. La baja energía de excitación del LED y el reducido tiempo de exposición, de 2-10 s para cada adquisición de fluorescencia, producen un bajo efecto de fotoblanqueo. Se puede considerar, sin tener un error apreciable, que el fotoblanqueamiento no afectará significativamente los resultados de CTM.

El ensayo de CTM se realizó con membranas comerciales de PC, de diferentes diámetros de poro de: 10, 30, 50 y 80 nm, (denominadas M10, M30, M50 y M80, respectivamente) utilizando Fluoresceína. Las membranas M80 tienen una fluencia de  $4,10^8$  poros/cm<sup>2</sup> y  $6,10^8$  poros/cm<sup>2</sup> las restantes. El espesor de las mismas es de 6 µm. Las muestras fueron pre-acondicionadas en KCl 0,1 M previo al estudio de CTM.

En la Fig. 2.20 se muestra la estructura química y propiedades ópticas de la Fluoresceína. En la Fig. 2.21 la curva de calibración de la Fluoresceína en función de la concentración.



**Fig. 2.20.** Estructura molecular y espectro de absorción y de emisión de la Fluoresceína sódica. Absorbe luz a una longitud de onda máx en 495 nm y emisión en 515 nm.



**Fig. 2.21.** Curva de calibración de Fluoresceína.

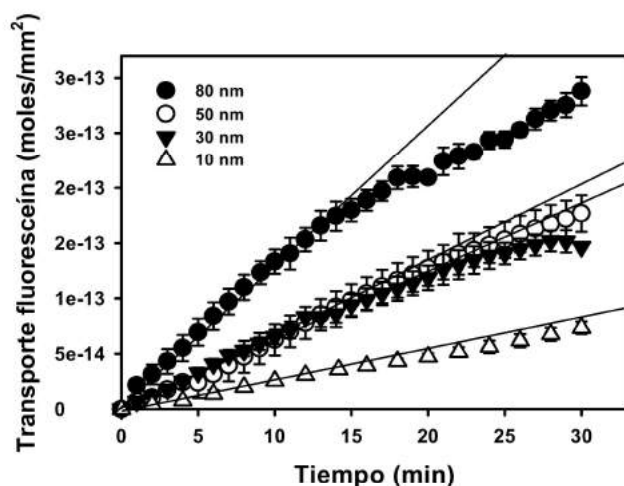
La regresión lineal de la curva (Fig. 2.21) y el volumen de medida teórico del Nanodrop (126 nl) permitió establecer la relación RFU/masa de Fluoresceína. La misma se utilizó en la conversión de los valores de RFU a masa.

$$20948 \text{ RFU} = 5,92\text{E-}14 \text{ moles fluoresceína}$$

Los resultados de las CTM sobre las membranas PC se representan en la Fig. 2.22. Las curvas fueron corregidas por un factor de área de transporte, debido a las diferentes fluencias (poros/cm<sup>2</sup>) entre membranas (la corrección se realizó en base la fluencia determinada experimentalmente por FESEM, ver Tabla 2.4).

**Tabla 2.4.** Valores de fluencia obtenida por microfotografías FESEM y factor de corrección por fluencia normalizada.

Membrana PC	Fluencia (nº poros/cm <sup>2</sup> )	Factor de corrección por Fluencia normalizada
M10	9,6 +/- 2,4 x 10 <sup>8</sup>	1,0
M30	7,9 +/- 2 x 10 <sup>8</sup>	1,2
M50	8,1 +/- 2,7 x 10 <sup>8</sup>	1,2
M80	6 +/- 1,7 x 10 <sup>8</sup>	1,6



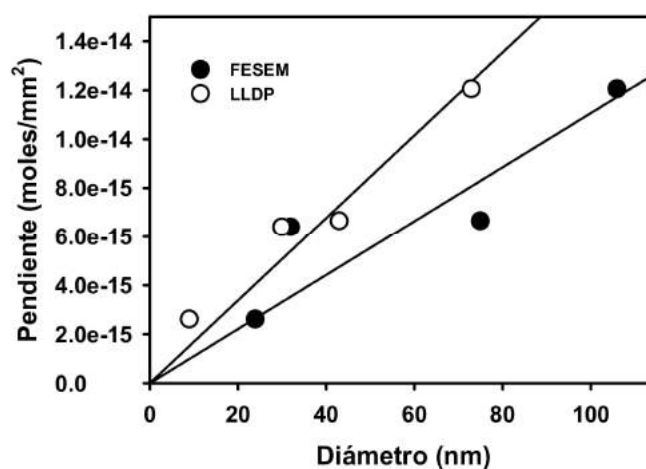
**Fig. 2.22.** Ensayos de CTM. Se representa el transporte de moles/mm<sup>2</sup> de fluoresceína transportada en función del tiempo.

La CTM se obtiene de la pendiente inicial de la curva. El análisis de estos resultados (Tabla 2.5) se realizó por comparación con los diámetros de poro obtenidos por FESEM y por Porosimetría de Desplazamiento Líquido-Líquido (LLDP) (realizado por el Dr. Ochoa en la Universidad Nacional de San Luis).

**Tabla 2.5.** Diámetro de poros determinado por FESEM e LLDP y pendientes de CTM correspondientes.

Membrana PC	FESEM Diámetro de poro (nm)	LLDP Diámetro de poro (nm)	Pendiente (moles/mm <sup>2</sup> )
M10	24 +/- 3	9 +/- 0,6	2,61E-15
M30	32 +/- 9	30 +/- 1,7	6,40E-15
M50	75 +/- 6	43 +/- 0,5	6,65E-15
M80	106 +/- 10	73 +/- 1,3	1,20E-14

Como se observa en la Tabla 2.5 la pendiente incrementa conforme lo hace el diámetro de poro de la membrana, tanto para FESEM como para LLDP, como se esperaba. Asimismo, se observa que los valores de las pendientes obtenidos para M30 y M50 son muy próximos entre sí, a pesar de existir una gran diferencia en sus diámetros por ambas técnicas. Para intentar un análisis más profundo se correlacionaron los diámetros obtenidos con la pendiente de CTM en la Fig. 2.23.



**Fig. 2.23.** Pendiente de CTM con Fluoresceína en función del diámetro determinado por la técnica de ● FESEM y ○ LLDP.

Como se observa en la Fig. 2.23 la curva para LLDP se ajusta mejor por regresión lineal ( $R^2=0,933$ ) respecto de la obtenida con los datos de FESEM ( $R^2=0,77$ ). Esta peor correlación con los datos de microscopía pueden explicarse en base a que por FESEM obtenemos un dato de la “apertura” del poro en la superficie de la membrana. Adicionalmente la determinación de LLDP se realiza



en estado líquido, al igual que la del ensayo de CTM. En este medio los polímeros pueden presentar una superficie hidratada por el solvente en el interior de los conductos.

El ensayo de CTM utilizando la proteína GFP de 26,9 kDa (Fig. 2.24) se realizó sobre las mismas membranas PC. Las membranas se pre-acondicionaron en H<sub>2</sub>O (d) y las curvas de CTM obtenidas se presentan en la Fig. 2.25. Para poder convertir los valores de RFU a masa de GFP se utilizó la relación RFU/masa de 19629 RFU = 1,16E-13 moles GFP (esta relación fue realizada mediante la determinación de la concentración por Bradford, datos no mostrados, y considerando el volumen teórico de medida del Nanodrop (126 nl)).

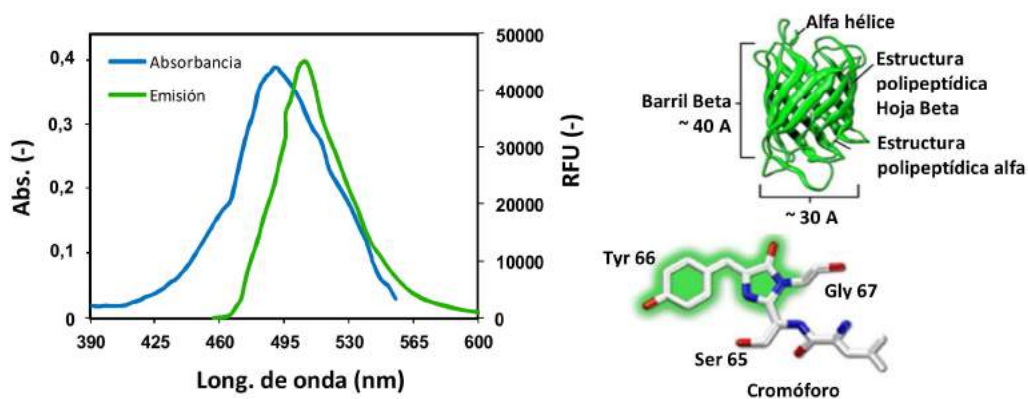


Fig. 2.24. Espectro, estructura molecular y del cromóforo, de la proteína GFP.

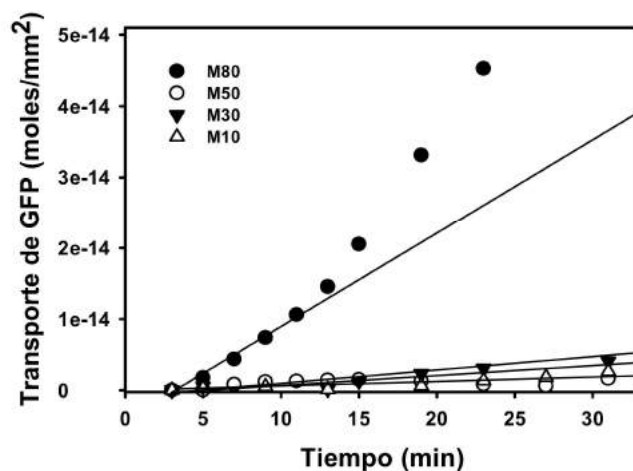
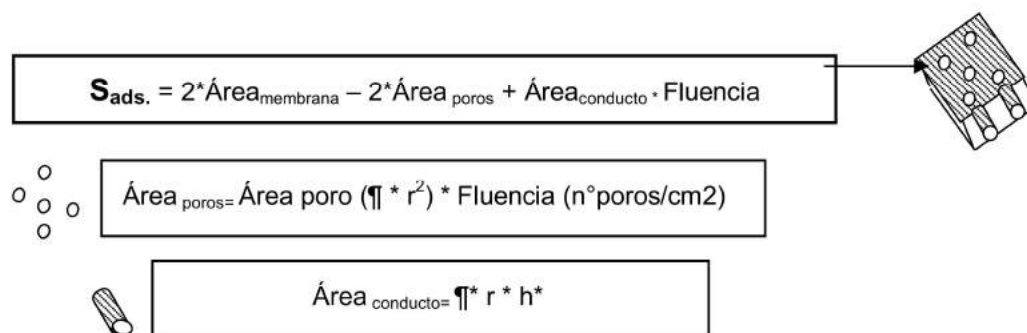


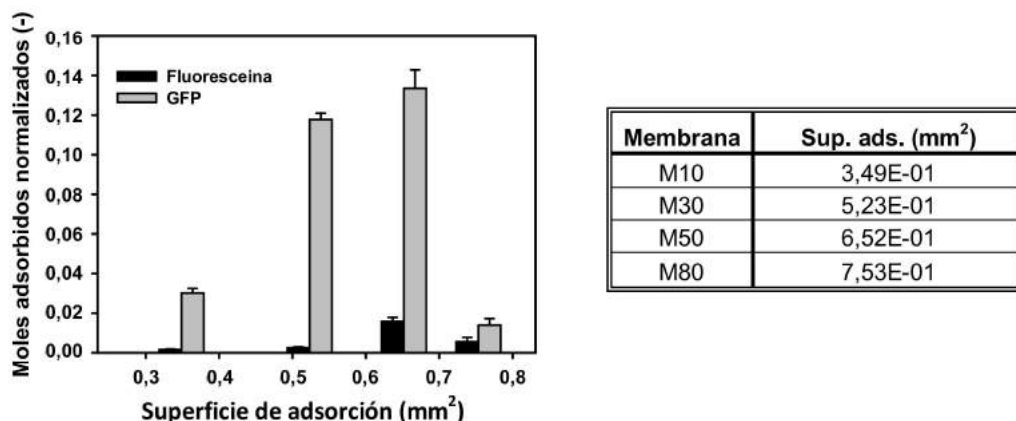
Fig. 2.25. Cinética de transporte de GFP utilizando las membranas comerciales de PC.

Como puede observarse en la Fig. 2.25 para todas las membranas de PC se detecta un retraso inicial en las curvas de CTM, por ej. para M80 es de aproximadamente 4 min. De los gráficos de CTM se obtuvo la pendiente inicial, resultando M80 la de mayor transporte, con una pendiente de  $1,67E-15$  moles GFP/mm<sup>2</sup>. Las membranas de menor tamaño de poro no mostraron transporte en la escala de tiempo estudiada y concentración inicial del analito usado. En principio esto se debe a la diferencia de tamaño entre ambas moléculas, siendo la GFP de mucho mayor tamaño que la Fluoresceína. Sin embargo para poder hacer una comparación más realista deberían haberse realizado ambos experimentos a la misma concentración molar.

Para descartar la reducción del transporte por obstrucción de los conductos por adsorción de solutos se realizó un *Ensayo de Adsorción Inespecífica* de ambos solutos como se detalló previamente. Para poder cuantificar los solutos en la membrana se utilizó la relación RFU/masa de Fluoresceína considerando la regresión lineal de la curva de Fluoresceína (Fig. 2.20) y la establecida para GFP.

Los resultados se expresan en moles adsorbidos (normalizados por la cantidad inicial) en función de la superficie de adsorción (**S<sub>ads</sub>**) de cada membrana, los cálculos se realizaron tomando el área de medida de la fibra óptica=0,126mm<sup>2</sup> y los valores de fluencia determinados por FESEM y del diámetro de poro determinado por LLDP. Los resultados se exponen en la Fig. 2.26.

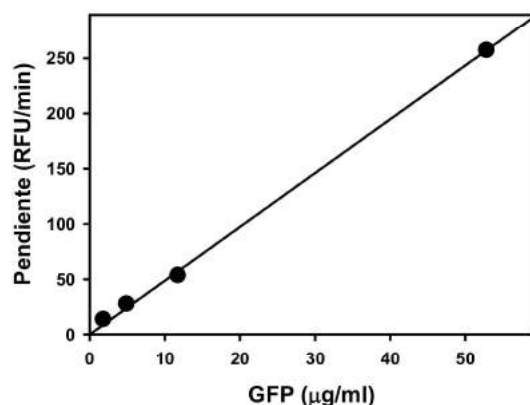




**Fig. 2.26.** Adsorción inespecífica de Fluoresceína y de GFP sobre las membranas.

Los resultados de la Fig. 2.26 muestran que los moles incrementan proporcional a la  $S_{ads}$  para las membranas M10, M30 y M50. La membrana M80, resultó tener el menor valor de moles adsorbidos de GFP. Mientras que para Fluoresceína la adsorción fue mínima en todos los casos, M50 presenta una mayor adsorción respecto al resto de membranas, sin embargo la cantidad es despreciable comparada a la adsorción de GFP. Asimismo la  $S_{ads}$  aumenta conforme lo hace el diámetro (ver Tabla junto al gráfico). Los resultados obtenidos, de bajo transporte para GFP (ver Fig. 2.25) en las membranas M10, M30 y M50 podría deberse a la adsorción inespecífica de la proteína y obstrucción de los nanoconductos.

La concentración del analito en el reservorio puede ser un factor influyente de la CTM. En el siguiente experimento se ensayó la CTM con distintas concentraciones iniciales de GFP en la membrana M80. La metodología de trabajo fue la misma que se describió en el ensayo anterior (transporte de GFP) y los resultados se presentan como la cinética de transporte (RFU/min) en función de la concentración de GFP, ver Fig. 2.27.



**Fig. 2.27.** Efecto de la concentración del analito (GFP) sobre el comportamiento de la CTM, en la membrana M80.

En el gráfico de la Fig. 2.27 se observa una relación directamente proporcional entre el transporte y la concentración inicial de GFP. Este comportamiento es el esperado para una difusión libre dentro del nanoconductor [46].

La evaluación de CTM para las membranas PET se realizó pre-acondicionando las muestras en H<sub>2</sub>O (d) y empleando una solución de Fluoresceína, en la celda donora, en la concentración indicada según el protocolo descrito previamente. En la Tabla 2.6 se detallan las muestras analizadas y los resultados de las CTM. Además se incluyen las condiciones de GQ utilizadas en la preparación de cada membrana.

**Tabla 2.6.** Tabla con los datos de las membranas PET analizadas por CTM.

Código de Membrana	PET	GQ Temperatura (°C)	NaOH (N)	GQ Tiempo (min)	Pre-irradiación UV	Diámetro <sup>1</sup> (nm)	Pendiente <sup>2</sup> (RFU/min)	R <sup>2</sup>
SS13	PET <sub>2</sub>	50	2	40	NO	159 +/- 5	10	0,9922
SS12	PET <sub>2</sub>	50	2	66	NO	370 +/- 57	77	0,9901
SS21	PET <sub>2</sub>	50	2	10	SI	88 +/- 12	13	0,982
SS89	PET <sub>1</sub>	60	2	10	SI	98 +/- 12	103	0,9996
SS71	PET <sub>1</sub>	50	4	10	SI	105 +/- 16	65	0,9914
SS73	PET <sub>1</sub>	60	4	10	SI	188 +/- 28	334	0,9842
SS90	PET <sub>1</sub>	60	3	10	SI	209 +/- 7	337	0,9988

<sup>1</sup>Determinado por FESEM; <sup>2</sup>Para Fluoresceína en BP (1), intervalo de tiempo 2 min y lectura en 515 nm.

En la Fig. 2.28 se presenta como ejemplo una de las curvas obtenidas con la membrana SS89.

Al analizar la Tabla 2.6 se realizan las siguientes observaciones:

1. El comportamiento del transporte se ve afectado por la temperatura del proceso de GQ. Esto se debe al efecto de la temperatura sobre el diámetro final de los nanoconductos, como se observa por FESEM.
2. La CTM de las membranas preparadas a 60°C (SS73, SS89 y SS90) fueron las que mostraron los mayores valores de CTM, incluso mayor transporte respecto de otras de mayor diámetro de poro preparadas a menor temperatura, (SS73 y SS12).
3. El transporte en membranas producidas con pre-tratamiento UV es mayor respecto de las que no recibieron este pre-tratamiento.

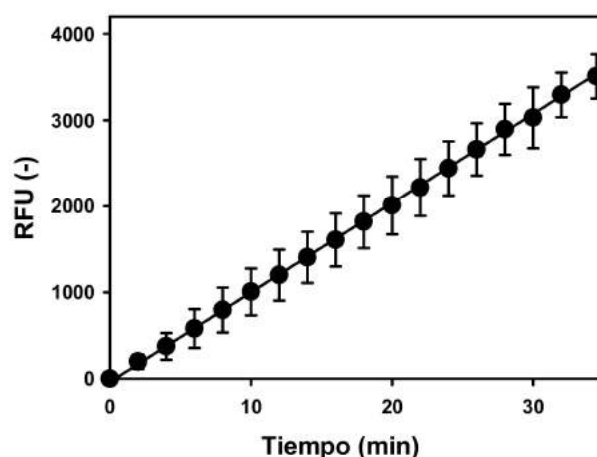
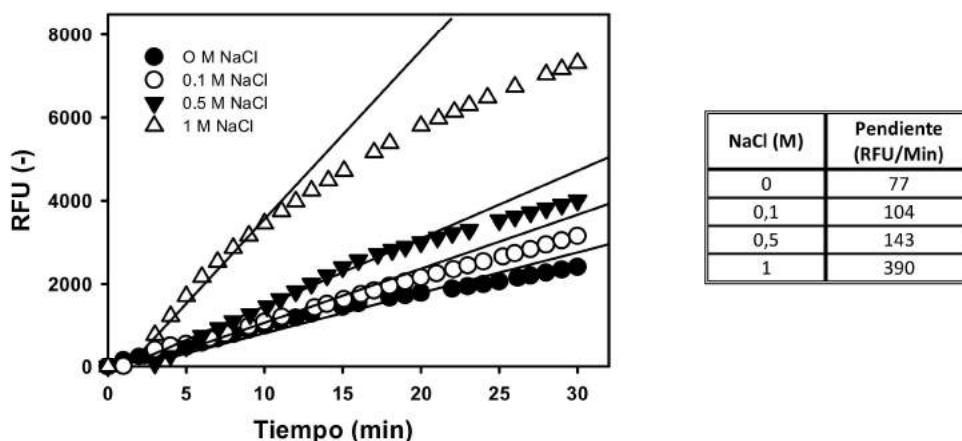


Fig. 2.28. Ejemplo de CTM usando Fluoresceína en la membrana SS89.

Para estudiar si un gradiente iónico puede afectar las CTM, la membrana SS12 (pre-acondicionada en  $H_2O_d$  (d)) fue estudiada con Fluoresceína 0,47  $\mu M$  en BP (1) + NaCl (0,1; 0,5 y 1 M) como iones acompañantes. La celda aceptora se llenó con BP (1), ver Fig. 2.29.



**Fig. 2.29.** Gráfico de la cinética de transporte a distintas fuerzas iónicas, en la celda dadora.

Como puede observarse en la Fig. 2.29 la CTM de la membrana SS12 (diámetro  $370 \pm 57$  nm) aumenta inicialmente conforme lo hace la fuerza iónica en la celda dadora; incrementando de 77 RFU/min (sin NaCl) a 390 RFU/min (1 M NaCl), como se detalla en la Tabla adjunta al gráfico. También es notorio en el gráfico que en los primeros 3 minutos iniciales, para las condiciones con NaCl, se observa un retraso en el transporte. Esto puede deberse a un efecto de osmosis entre ambas celdas; mientras que después de los primeros 20 min de difusión, las pendientes de todas las condiciones se igualan.

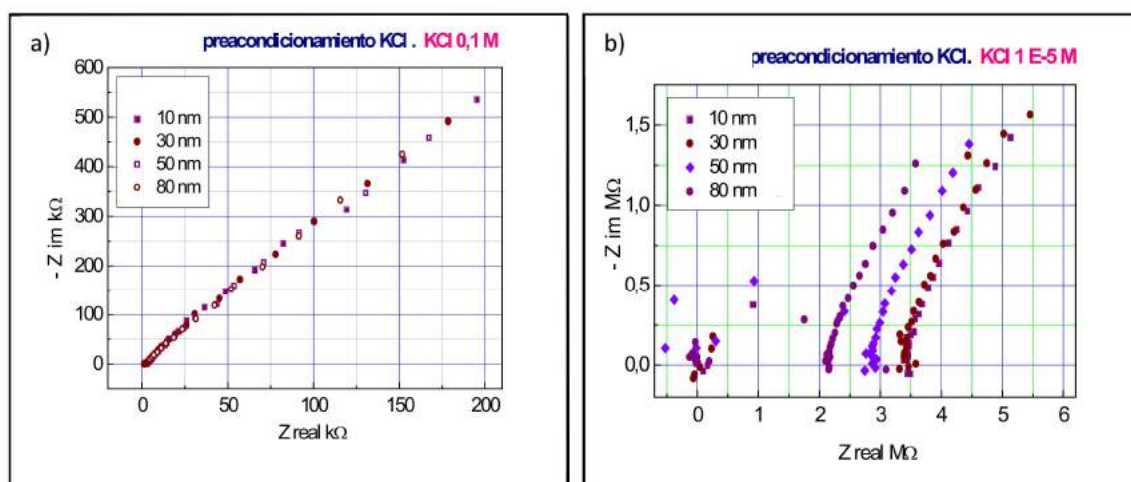
Los resultados obtenidos en los ensayos de CTM indican que el dispositivo MCD empleado es una herramienta útil para evaluar el transporte sobre de poros perfectos. A través de CTM es posible distinguir membranas de diferentes diámetros de poro. Sin embargo es necesario mantener todas las otras variables fijas y constantes para evitar falsas interpretaciones.

Esta técnica tiene requerimientos mínimos de área de membrana ( $0,3 \text{ cm}^2$ ), bajo volumen de llenado de celdas ( $\mu\text{l}$ ), baja concentración de analito y análisis en el término de minutos. Como limitaciones se puede citar la imposibilidad de determinar coeficientes de difusión, ya que el sistema no cumple con los requerimientos de la ley de Fick (control de la temperatura, homogenización del sistema y concentración constante de la celda donora ( $C^\infty$ )).

[52]. Este estudio permitió establecer una temperatura óptima de GQ ( $60^{\circ}\text{C}$ ) para la preparación de membranas PET, a la cual se obtiene un óptimo transporte.

#### 2.6.4. Análisis por EIS

Se realizó el estudio de impedancia del sistema celda-membrana, con el fin de caracterizar el proceso de transporte de iones a través de las membranas PC comerciales y las PET preparadas en este Capítulo. Previamente, se realizó el ajuste de las condiciones experimentales empleando membranas PC (M10, M30, M50 y M80). Las mediciones se efectuaron sobre muestras, de sección  $1 \times 1 \text{ cm}$ , previamente pre-acondicionadas 24 h con KCl, a diferentes concentraciones ( $0,1\text{M}$  y  $10 \text{ E-}5\text{M}$ ). La concentración de electrolito en las hemiceldas durante la EIS fue de  $10 \text{ E-}5 \text{ M KCl}$ . Los resultados se muestran en la Fig. 2.30.



**Fig. 2.30.** Gráfico de Nyquist correspondiente a las mediciones de EIS de las membranas PC. a- pre-acondicionadas con KCl  $0,1\text{M}$ - b- pre-acondicionadas con KCl  $1 \text{ E-}5 \text{ M}$ .

En el gráfico de Nyquist ( $Z_{\text{im}}$  vs.  $Z_{\text{real}}$ ) de la Fig. 2.30.a se muestran las curvas de impedancia correspondientes a las membranas PC de diferentes diámetros pre-acondicionadas a alta fuerza iónica ( $10^{-1} \text{ M KCl}$ ). Como se observa, en esta condición el comportamiento del sistema respecto a su impedancia es el mismo para todos los diámetros de poro, y no es posible diferenciar entre las

distintas muestras. Mientras que al pre-acondicionar con KCl a baja fuerza iónica ( $10^{-5}$  M) Fig. 2.30.b, se obtuvo una significativa diferencia entre los diámetros de poro. Secciones transversales mayores tienen resistencias menores, y fue posible la distinción entre membranas. Estos resultados muestran que para el KCl se observa la dependencia de los valores de impedancia con la concentración de electrolito utilizada. El corrimiento de la componente real de la impedancia del sistema hacia el rango de los mega ohms, cuando disminuye la concentración de KCl en las hemiceldas, puede ser atribuida a la dependencia de la cinética de llenado capilar de los poros con el electrolito [35].

Adicionalmente, se verifica que a bajas fuerzas iónicas los espectros EIS están conformados por un semicírculo poco definido en la región de altas frecuencias; mientras que a frecuencias bajas la curva de impedancia presenta una pendiente mayor a  $45^\circ$ , lo cual se corresponde con la recta de impedancia Warburg ( $Z_W$ ) asociada a procesos de transferencia de masa por difusión [53]. El valor de  $Z_{real}$  en el cual el espectro de impedancia pasa por  $Z_{im} = 0$  define la resistencia del sistema [54, 55].

En conclusión, a partir de determinaciones EIS fue posible determinar por un lado, información cualitativa acerca del transporte iónico a través de las membranas porosas, considerando que para la región de bajas frecuencias, una curva de tipo  $Z_W$  se correlaciona con un proceso controlado por difusión. Además, a través de los gráficos de Nyquist se puede determinar cuantitativamente la magnitud de la resistencia del sistema, ver Tabla 2.7.

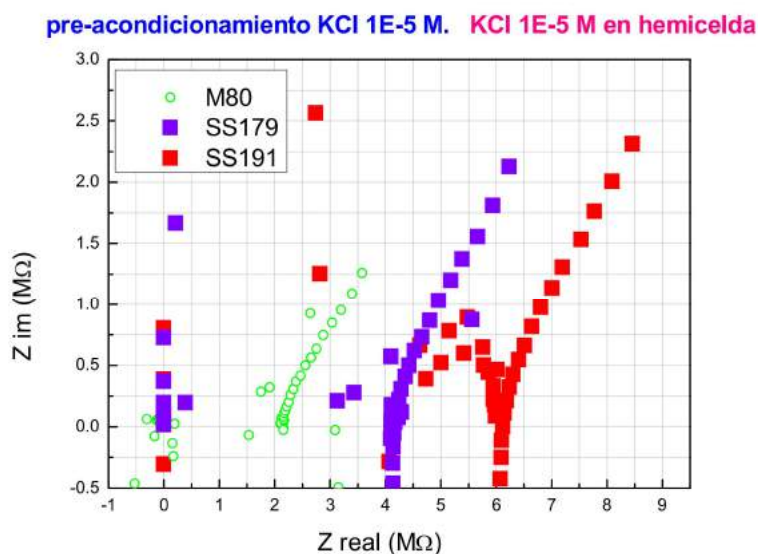
**Tabla. 2.7.** Determinación de las resistencias del sistema, en membranas PC.

RESISTENCIAS SISTEMA MEMBRANAS PC [KΩ]				
Membrana	M10	M30	M50	M80
<b>Hemicelda con KCl <math>1 \times 10^{-5}</math> M</b>				
<b>Pre-acondic. KCl 0,1 M</b>	0,2 ± 0.03	0,2 ± 0.02	0,3 ± 0.02	0,3 ± 0.03
<b>Pre-acondic. KCl <math>1 \times 10^{-5}</math> M</b>	3500 ± 150	3480 ± 130	2900 ± 100	2100 ± 100

Una vez ajustada la técnica se procedió a realizar determinaciones EIS en las membranas PET. Se evaluaron las membranas SS179 y SS191 (de GQ a NaOH 2 N, 60°C, c/UV, 15 y 25 min de GQ, respectivamente). El diámetro de poro



fue determinado por FESEM, resultando ser de  $199 \pm 15$  y  $323 \pm 13$  nm, respectivamente. Mientras que la fluencia correspondiente de las membranas es de  $1E+9$  poros/cm<sup>2</sup> (SS179) y de  $3E+8$  poros/cm<sup>2</sup> (SS191). Las mediciones EIS fueron realizadas como se describió anteriormente, utilizando KCl  $1E-5$  M en la pre-incubación y en las hemiceldas. Para realizar una comparación se incluyó la curva de la muestra M80, de fluencia  $6E+8$  poros/cm<sup>2</sup>, pre-acondicionada también en KCl  $1E-5$ M. Los resultados se muestran en la Fig. 2.31.



**Fig. 2.31.** Gráfico de Nyquist correspondiente a las mediciones de EIS de membranas pre-acondicionada con KCl  $1E-5$  M. PET SS179 (cuadrado violeta ■), SS191 (cuadrado rojo ■) y PC M80 (círculo vacío ○).

Como puede observarse en la Fig. 2.31 las membranas PET tienen un comportamiento más resistivo que la membrana PC M80. El incremento del tiempo de proceso se asocia a un mayor diámetro de poro, este produce un aumento de los valores de impedancia. La densidad de carga superficial aumenta con el diámetro de poro conforme lo hace el área lateral del nanoconductor: mayores diámetros resultan en una mayor área lateral, por lo tanto la membrana SS191 tienen un comportamiento resistivo alto.

De los resultados obtenidos con las técnicas de CTM y EIS se pueden extraer las siguientes conclusiones.

- 1) Ambas técnicas permitieron caracterizar la funcionalidad de los conductos. Asimismo se verifica que los conductos se encuentran libres al transporte de analitos.
- 2) La EIS permitió evaluar el efecto de la concentración del electrolito en el transporte a través de nanoconductos. Para altas concentraciones de electrolito, el transporte iónico es menos afectado por las características del poro. Los efectos sobre el transporte a través de las membranas son más pronunciados cuando el EDL comienza a ser comparable con la sección transversal de los nanoconductos. A baja fuerza iónica (KCl  $1 \text{ E}-5 \text{ M}$ ) la EDL solapa los poros de 10, 30 y 50 nm y ocupa gran porcentaje de la sección transversal del poro de 80 nm. La sección eficaz para el transporte se encuentra disminuida lo que justifica el aumento de la resistencia que se observa, permitiendo distinguir entre los diferentes diámetros.
- 3) Manipulando la fuerza iónica, mediante EIS se pudo discriminar entre diámetros de los nanoconductos cuando el EDL formada dentro de los mismos se superpone con su sección transversal.

### Referencias

1. Fink, D., & Hnatowicz, V. (2004). Transport Processes in Low-Energy Ion-Irradiated Polymers. *Springer series in materials science*, 65, 47-92.
2. Fleischer, R. L., Price, P. B., & Walker, R. M. (1975). Nuclear tracks in solids: principles and applications. Univ of California Press.
3. Spohr, R. (1990). Ion tracks and microtechnology: principles and applications.

4. Fleischer, R. L., Price, P. B., Symes, E. M., & Miller, D. S. (1964). Fission-track ages and track-annealing behavior of some Micas. *Science*, 143(3604), 349-351.
5. Flerov, G. N., Apel, P. Y., Didyk, A. Y., Kuznetsov, V. I., & Oganessian, R. T. (1989). Use of heavy-ion accelerators to produce nuclear membranes. *Soviet Atomic Energy*, 67(4), 763-770.
6. Lück, H. B., Matthes, H., Gemende, B., Heinrich, B., Pfestorf, W., Seidel, W., & Turuc, S. (1990). Production of particle-track membranes by means of a 5 MV tandem accelerator. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 50(1), 395-400.
7. Bieth, C., & SAIF Group. (1991). Perspectives applications of tracks at GANIL. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part D. Nuclear Tracks and Radiation Measurements*, 19(1), 875-880.
8. Apel, P. Y. (1995). Heavy particle tracks in polymers and polymeric track membranes. *Radiation measurements*, 25(1), 667-674.
9. Siwy, Z., Apel, P., Dobrev, D., Neumann, R., Spohr, R., Trautmann, C., & Voss, K. (2003). Ion transport through asymmetric nanopores prepared by ion track etching. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 208, 143-148.
10. Hama, Y., Oka, T., Kudoh, H., Sugimoto, M., & Seguchi, T. (2003). Irradiation effects in polymers by heavy ions: The distribution of the chemical structure transformation in polymers. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 208, 123-132.
11. Karim, S., Ensinger, W., Mujahid, S. A., Maaz, K., & Khan, E. U. (2009). Effect of etching conditions on pore shape in etched ion-track polycarbonate membranes. *Radiation Measurements*, 44(9), 779-782.
12. Zhu, Z. Y., Duan, J. L., Maekawa, Y., Koshikawa, H., & Yoshida, M. (2004). Bulk and track etching of PET studied by spectrophotometer. *Radiation measurements*, 38(3), 255-261.

13. Yamazaki, I. M., Paterson, R., & Geraldo, L. P. (1996). A new generation of track etched membranes for microfiltration and ultrafiltration. Part I. Preparation and characterisation. *Journal of membrane science*, 118(2), 239-245.
14. Apel, P. Y., Akimenko, A. P., Blonskaya, I. V., Cornelius, T., Neumann, R., Schwartz, K. & Trautmann, C. (2006). Etching of nanopores in polycarbonate irradiated with swift heavy ions at 15K. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 245(1), 284-287.
15. Waheed, A., Forsyth, D., Watts, A., Saad, A. F., Mitchell, G. R., Farmer, M., & Harris, P. J. (2009). The track nanotechnology. *Radiation Measurements*, 44(9), 1109-1113.
16. Spohr, R., Zet, C., Fischer, B. E., Kiesewetter, H., Apel, P., Gunko, I. & Westerberg, L. (2010). Controlled fabrication of ion track nanowires and channels. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 268(6), 676-686.
17. Moiseev, Y. V., & Zaikov, G. E. (1979). Chemical stability of polymers in aggressive media. *Khimiya, Moscow*.
18. Apel, P. (2001). Track etching technique in membrane technology. *Radiation Measurements*, 34(1), 559-566.
19. Zhao, Z., Qi, D., & Guo, Z. (2004). Etching characteristics for tracks of carbon cluster ions in polycarbonate. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 217(4), 621-626.
20. Suzuki, Y., Yamaki, T., Koshikawa, H., Asano, M., Voss, K. O., Neumann, R., & Yoshida, M. (2007). Preparation of ion-track membranes of poly (p-phenylene terephthalamide): Control of pore shape by irradiation with different ion beams. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 260(2), 693-695.
21. Apel, P. Y., Blonskaya, I. V., Oganessian, V. R., Orelovitch, O. L., & Trautmann, C. (2001). Morphology of latent and etched heavy ion tracks in radiation resistant polymers polyimide and poly (ethylene naphthalate). *Nuclear*

*Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 185(1), 216-221.

**22.** Apel, P. Y., Didyk, A. Y., & Salina, A. G. (1996). Physico-chemical modification of polyolefins irradiated by swift heavy ions. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 107(1), 276-280.

**23.** Fleischer, R. L., Price, P. B., & Walker, R. M. (1965). Effects of temperature, pressure, and ionization of the formation and stability of fission tracks in minerals and glasses. *Journal of Geophysical Research*, 70(6), 1497-1502.

**24.** Henke, R. P., Benton, E. V., & Heckman, H. H. (1970). Sensitivity enhancement of plastic nuclear track detectors through photo-oxidation. *Radiation Effects*, 3(1), 43-49.

**25.** Crawford, W. T., DeSorbo, W., & Humphrey, J. S. (1968). Enhancement of track etching rates in charged particle-irradiated plastics by a photo-oxidation effect.

**26.** Henke, R. P., & Benton, E. V. (1971). On geometry of tracks in dielectric nuclear track detectors. *Nuclear Instruments and Methods*, 97(3), 483-489.

**27.** Desorbo, W., & Humphrey Jr, J. S. (1970). Studies of environmental effects upon track etching rates in charged particle-irradiated polycarbonate film. *Radiation effects*, 3(2), 281-282.

**28.** Guillot, G., & Rondelez, F. (1981). Characteristics of submicron pores obtained by chemical etching of nuclear tracks in polycarbonate films. *Journal of Applied Physics*, 52(12), 7155-7164.

**29.** Ferain, E., & Legras, R. (1994). Track-etched membrane: dynamics of pore formation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 84(3), 331-336.

**30.** Apel, P. Y., & Pretzsch, G. (1986). Investigation of the radial pore-etching rate in a plastic track detector as a function of the local damage density around the ion path. *International Journal of Radiation Applications and*

*Instrumentation. Part D. Nuclear Tracks and Radiation Measurements*, 11(1), 45-53.

**31.** Wong, C. F., & Hoberg, P. (1982). A comparison of the effects of ultraviolet radiation on CR-39 and Lexan plastics irradiated by alpha particles. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 203(1), 443-449.

**32.** Khayrat, A. H., & Durrani, S. A. (1995). The effect of UV exposure on the track and bulk etching rates in different CR-39 plastics. *Radiation measurements*, 25(1), 163-164.

**33.** Kuznetsov, V. I., Didyk, A. Y., & Apel, P. Y. (1991). Production and investigation of nuclear track membranes at JINR. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part D. Nuclear Tracks and Radiation Measurements*, 19(1), 919-924.

**34.** Coster, H. G., Chilcott, T. C., & Coster, A. C. (1996). Impedance spectroscopy of interfaces, membranes and ultrastructures. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 40(2), 79-98.

**35.** Ramos Barrado, J., Benavente, J., & Heredia, A. (1993). Electrical conductivity of differently treated isolated cuticular membranes by impedance spectroscopy. *Archives of biochemistry and biophysics*, 306(2), 337-341.

**36.** Benavente, J., & Vázquez, M. I. (2004). Effect of age and chemical treatments on characteristic parameters for active and porous sublayers of polymeric composite membranes. *Journal of colloid and interface science*, 273(2), 547-555.

**37.** Freger, V., & Bason, S. (2007). Characterization of ion transport in thin films using electrochemical impedance spectroscopy: I. Principles and theory. *Journal of Membrane Science*, 302(1), 1-9.

**38.** Freger, V., & Bason, S. (2007). Characterization of ion transport in thin films using electrochemical impedance spectroscopy: I. Principles and theory. *Journal of Membrane Science*, 302(1), 1-9.

**39.** Orazem, M. E., & Tribollet, B. (2008). An integrated approach to electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta*, 53(25), 7360-7366.

- 40.** Aarya, S., Dev, K., Raghuvanshi, S. K., Krishna, J. B. M., & Wahab, M. A. (2012). Effect of gamma radiation on the structural and optical properties of Polyethyleneterephthalate (PET) polymer. *Radiation Physics and Chemistry*, 81(4), 458-462.
- 41.** Vasiljeva, I. V., Mjakin, S. V., Makarov, A. V., Krasovsky, A. N., & Varlamov, A. V. (2006). Electron beam induced modification of poly (ethylene terephthalate) films. *Applied surface science*, 252(24), 8768-8775.
- 42.** Kumar, V., Sonkawade, R. G., Chakarvarti, S. K., Singh, P., & Dhaliwal, A. S. (2012). Carbon ion beam induced modifications of optical, structural and chemical properties in PADC and PET polymers. *Radiation Physics and Chemistry*, 81(6), 652-658.
- 43.** Steckenreiter, T., Balanzat, E., Fuess, H., & Trautmann, C. (1997). Chemical modifications of PET induced by swift heavy ions. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 131(1), 159-166.
- 44.** Singh, N., Sharma, A., & Avasthi, D. K. (2003). Effects of high energy (MeV) ion beam irradiation on polyethylene terephthalate. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 206, 1120-1123.
- 45.** Biswas, A., Lotha, S., Fink, D., Singh, J. P., Avasthi, D. K., Yadav, B. K., & Avasthi, A. M. (1999). The effects of swift heavy ion irradiation on the radiochemistry and melting characteristics of PET. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 159(1), 40-51.
- 46.** Korolkov, I. V., Mashentseva, A. A., Güven, O., Niyazova, D. T., Barsbay, M., & Zdorovets, M. V. (2014). The effect of oxidizing agents/systems on the properties of track-etched PET membranes. *Polymer Degradation and Stability*, 107, 150-157
- 47.** Biswas, A., Lotha, S., Fink, D., Singh, J. P., Avasthi, D. K., Yadav, B. K., & Avasthi, A. M. (1999). The effects of swift heavy ion irradiation on the radiochemistry and melting characteristics of PET. *Nuclear Instruments and*

*Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 159(1), 40-51.

**48.** Belkova, A. A., Sergeeva, A. I., Apel, P. Y., & Beklemishev, M. K. (2009). Diffusion of aniline through a polyethylene terephthalate track-etched membrane. *Journal of Membrane Science*, 330(1), 145-155.

**49.** Chun, K. Y., & Stroeve, P. (2002). Protein transport in nanoporous membranes modified with self-assembled monolayers of functionalized thiols. *Langmuir*, 18(12), 4653-4658.

**50.** Yu, S., Lee, S. B., Kang, M., & Martin, C. R. (2001). Size-based protein separations in poly (ethylene glycol)-derivatized gold nanotubule membranes. *Nano Letters*, 1(9), 495-498.

**51.** Nguyen, Q. H., Ali, M., Bayer, V., Neumann, R., & Ensinger, W. (2010). Charge-selective transport of organic and protein analytes through synthetic nanochannels. *Nanotechnology*, 21(36), 365701.

**52.** Barroo, G. M. (1976) Química física para las ciencias de la vida.

**53.** Pänke, O., Balkenhohl, T., Kafka, J., Schäfer, D., & Lisdat, F. (2007). Impedance spectroscopy and biosensing. In *Biosensing for the 21st Century* (pp. 195-237). Springer Berlin Heidelberg.

**54.** Park, S. M., & Yoo, J. S. (2003). Peer reviewed: electrochemical impedance spectroscopy for better electrochemical measurements. *Analytical chemistry*, 75(21), 455-A.

**55.** Li, N., Yu, S., Harrell, C. C., & Martin, C. R. (2004). Conical nanopore membranes. Preparation and transport properties. *Analytical chemistry*, 76(7), 2025-2030.



**POLIMERIZACIÓN POR INJERTO SOBRE MEMBRANAS  
*TRACK-ETCHED* DE PET**

**CAPÍTULO III**



### 3. Introducción

La obtención de membranas *track-etched* funcionales a través de la modificación de sus poros o nanoconductos, puede realizarse a través de diferentes metodologías.

En este Capítulo, se describen técnicas de modificación de polímeros que pueden ser aplicadas a la modificación de membranas. Se seleccionaron solamente aquellas basadas en la polimerización por injerto, dada la alta densidad de modificación lograda por estas técnicas. Seguidamente, se detalla la metodología experimental de las técnicas seleccionadas, resultados obtenidos y caracterización de las modificaciones.

#### 3.1 Modificación química por injerto: Generalidades

Films o membranas poliméricas pueden ser modificadas por polimerización de injerto. Existen diferentes técnicas que difieren en la generación de los radicales libres que inician la polimerización. A continuación se enumeran las más importantes:

- Tratamiento Químico.
- Ozonificación.
- Foto polimerización por injerto (hv).
- Injerto Simultáneo radioinducido.
- Polimerización por injerto por pre-irradiación.
- Polimerización por injerto Vía radicales remanentes.

La introducción de un injerto de polímero a partir de monómeros hidrofílicos, por ej. acrilatos, proporciona gran cantidad de grupos funcionales accesibles para reacciones químicas de derivatización, acoplamiento de ligandos funcionales, o mejoramiento del recubrimiento superficial. A continuación se detallan las técnicas más empleadas para la modificación química por injerto.

##### 3.1.1. Polimerización iniciada por agentes químicos

La polimerización iniciada por químicos puede suceder vía radicalaria o iónica. La presencia de un iniciador determinará la vía del proceso. En la primera, los radicales libres generados por un iniciador, son transferidos al polímero base para reaccionar con el monómero y lograr el injerto; un iniciador muy utilizado en esta vía es el persulfato [1]. Aunque también pueden generarse radicales directamente sobre el polímero por oxidación con metales de transición, como por ejemplo,  $Ce^{+4}$ ,  $Cr^{+6}$ ,  $V^{+5}$  y  $Co^{+3}$ . Otro mecanismo similar, es el de la polimerización radicalaria por transferencia atómica (ATRP: *Atom Transfer Radical Polymerization*), en este caso se requiere de la presencia de un halogenuro de alquilo, que puede ser externo o pertenecer al polímero [2].

### **3.1.2. Polimerización iniciada por ozonificación**

En este método se utiliza un pretratamiento con ozono para crear hidroperóxidos por oxidación sobre el polímero. Estos son estables a temperatura ambiente pero se descomponen al incrementar la temperatura, produciendo radicales que son el punto de inicio de una polimerización. Una de las variables del proceso es el tiempo de pretratamiento con ozono. Se han reportado varios trabajos donde se aplica esta técnica en la modificación de fibras de PP con diversos monómeros, como por ejemplo, glicidil metacrilato (GMA) [3-6], ácido metacrilico (AM) y sus derivados [7,8], hidroxietil metacrilato (HEMA) [9] y dietilenglicol metacrilato (DEGMA) [9].

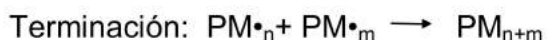
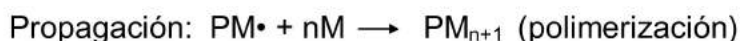
### **3.1.3. Fotopolimerización**

En este proceso la polimerización se inicia mediante radicales libres generados por la descomposición de moléculas fotosensibles al absorber luz. El grupo fotosensible puede ser propio del polímero o bien externo [10]. Tradicionalmente el iniciador es externo y es denominado fotoiniciador. Entre los más usados se encuentran la bezofenona, benzoin etil éter, 2,7 sulfato de antraquinona y xantona, entre otros. Al exponerlos a luz UV los radicales generados difunden hacia el polímero captando  $H^*$  y provocando así la formación

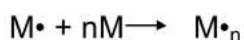
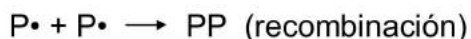
de radicales libres sobre la macromolécula, que inician la polimerización por injerto [1].

### 3.1.4. Polimerización radioinducida

En este método el material polimérico es irradiado junto al monómero (que puede estar en forma líquida, solución o vapor) con radiación ionizante. La radiación ionizante (Rayos X,  $\gamma$  o electrones acelerados) generan radicales libres en toda la muestra irradiada. La irradiación puede realizarse sobre una atmosfera de  $N_2$ , vacío o aire. En esta última se favorece la formación de peróxidos. Asimismo el método es independiente de la temperatura y de la estructura molecular. El mecanismo general de reacción se muestra a continuación.



*Aunque también puede producirse, en ciertas condiciones, recombinación del polímero y homopolimerización del monómero:*



Una de las limitaciones del método es la formación de homopolímero, debido a la gran cantidad de radicales libres de monómero formado. Una estrategia para inhibir este fenómeno consiste en adicionar sal de Morh o sales de  $Fe^{2+}$  o  $Cu^{2+}$ , que secuestran los radicales libres de la solución.

### 3.1.5. Polimerización inducida por pre-irradiación

Se basa en la generación de radicales libres a través de radiación ionizante sobre el polímero base. Si la irradiación se hace en vacío o atmosfera inerte se generan radicales del polímero (que son muy inestables). Si se realiza en

aire u oxígeno se generarán radicales peróxidos un poco más estables. Posteriormente el polímero es incubado con el monómero (que puede estar en forma líquida, vapor o en solución) para producir la polimerización al aumentar la temperatura. Una ventaja frente al método simultáneo es la ausencia de homopolímero, dado que los radicales solo se producen sobre el polímero. Sin embargo la irradiación directa puede degradar al material, modificando las propiedades del mismo [1].

### 3.1.6. Polimerización vía radicales remanentes

En este método el inicio de la polimerización proviene de radicales libres que fueron formados durante el bombardeo con SHI y localizados sobre la traza (zona núcleo y penumbra). En el caso realizar un GQ, los mismos quedarán al descubierto en la zona de penumbra. A diferencia de la modificación por radioinjerto (simultáneo), en esta técnica la modificación es sitio-específica. Por el contrario, el alto poder de penetración de los rayos  $\gamma$ , produce radicales en todo el volumen del polímero produciendo una polimerización masiva [11].

El mecanismo de reacción es similar al proceso de polimerización por injerto radio inducido.

Formación de radicales libres:  $P \xrightarrow{\text{SHI o G,Q}} P\cdot$  (radicales primarios)

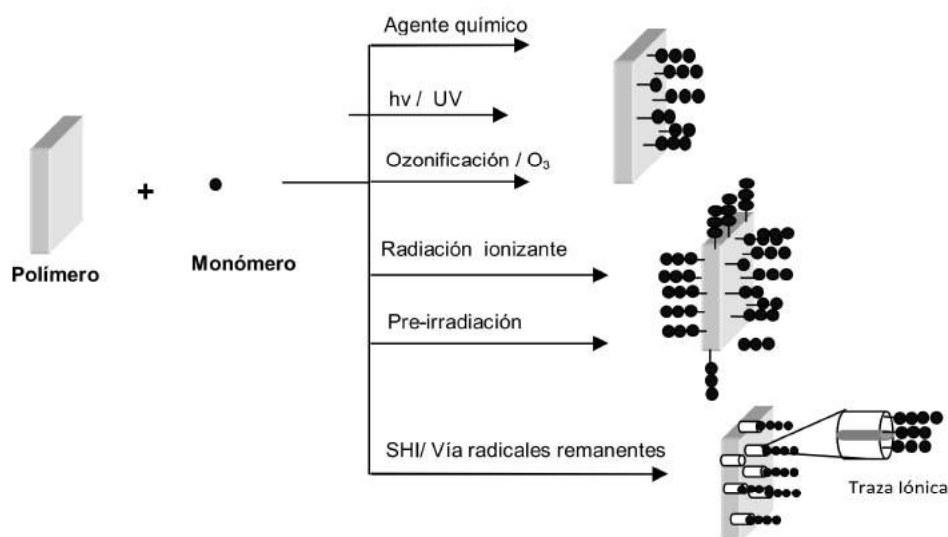
Iniciación:  $P\cdot + M \rightarrow PM\cdot$  (injerto)

Propagación:  $PM\cdot + nM \rightarrow PM_{n+1}$  (injerto en crecimiento)

Terminación:  $PM\cdot_n + PM\cdot_m \rightarrow PM_{n+m}$  (copolimerización)

En la actualidad existen trabajos donde se describe la modificación de láminas de polímeros por esta vía, como por ej. láminas de PVDF con injertos de estireno [12], o con metil metacrilato [13] y de láminas de perfluoropolímero (FEP) con ácido metacrílico [14]. Sin embargo no ha sido posible la modificación de membranas PET por esta técnica.

A continuación se esquematizan, a modo interpretativo, las diferentes densidades de modificación alcanzadas por las distintas técnicas de polimerización por injerto (ver Fig. 3.1)



**Fig. 3.1.** Representación de las densidades de modificación, alcanzadas por las diferentes técnicas.

La elección de la técnica de modificación dependerá del objetivo deseado. Aplicado en membranas poliméricas se podrían obtener poros modificados con propiedades superficiales y con selectividad mejoradas, confiriéndoles nuevas funcionalidades y al mismo tiempo se preserva la estructura macroporosa del polímero.

Desde hace más de dos décadas existe interés en producir membranas de polímero con poros "inteligentes" que respondan a algún fenómeno físico-químico; o bien con otras aplicaciones específicas en el campo de la biología y biotecnología, además de sus propiedades de separación sólido/líquido. Es importante resaltar que para obtener una funcionalidad se requiere tener un control estricto de la modificación interna de los poros.

Las membranas poliméricas *track-etched* o de poros perfectos son un tipo especial de membranas donde los conductos se construyen 'uno a uno' por bombardeo de films poliméricos con SHI y posterior exposición a GQ, donde se

produce la degradación de la traza generada por la irradiación y formación de los conductos, como se describió ampliamente en el Cap. II. Dentro de las ventajas del proceso de producción de estas membranas se encuentra: el manejo del diámetro de poro, desde unos pocos nanómetros hasta el micrón, la forma del conducto y el número de poros por área [15].

Actualmente, existen productos comerciales con diferentes aplicaciones, como por ej., separación de células, control de partículas de aire, etc., como se describió en el Cap. I. Además se han descrito aplicaciones novedosas como la preparación de sensores especiales [16] y en cultivo de neuronas [17].

Respecto a la modificación de estas membranas, la mayoría de los trabajos publicados corresponden a la funcionalización química por la vía tradicional de polímeros, mediante procedimientos de química húmeda. Las paredes internas de estas membranas de PC o PET contienen grupos carboxílicos, que provienen de la degradación química por el GQ de la traza. Estos grupos pueden ser modificados selectivamente mediante reacciones químicas clásicas [18-20]. Sin embargo, se requieren de reactivos químicos específicos, varios pasos de reacción y se generan una gran cantidad de subproductos.

En cuanto a la modificación por polimerización por injerto, se encuentran descritas en la literatura la modificación de PET mediante ozonificación [21] y fotopolimerización iniciada por benzofenona y luz UV [22]. Sin embargo estas técnicas modifican toda la superficie disponible (poros + superficie de la membrana) y una limitada modificación del interior de los conductos por la reducida accesibilidad del tratamiento.

Otros polímeros, como el PVDF, han sido modificados por polimerización por injerto simultáneo radioinducido [23]. En este caso, como se describió anteriormente, se obtiene una modificación masiva. El injerto excesivo de la superficie exterior llega a bloquear los conductos.

La polimerización vía radicales remanentes ha sido descrita para la modificación de PP y PVDF [24], siendo esta la técnica más sitio-específica para la modificación de los conductos. Sin embargo, para que esto suceda debe existir



una cantidad de radicales remanentes suficientes para la polimerización, la cual depende del diámetro del poro. Para el caso de membranas de PVDF, el número de radicales remanentes depende con el  $1/r^2$  del poro. Así en la irradiación de PVDF con iones Kr (10 MeV/uma), el número de radicales llega a ser despreciable a los 50 nm de diámetro de poro. Si el GQ se extiende más allá de este diámetro no se inicia la polimerización [25]. Por lo tanto no siempre es factible realizar las modificaciones por esta técnica sobre cualquier tamaño de poro y/o en otros materiales. En el caso de membranas de PET no hay descritas publicaciones previas en las que se aplique esta técnica.

En este trabajo de tesis, con el objetivo de modificar membranas de PET, se estudia la Polimerización por Injerto Simultáneo Radioinducido (*PISR*) y por Injerto Vía Radicales Remanentes (*PIVRR*).

## 3.2. Modificación de Membranas

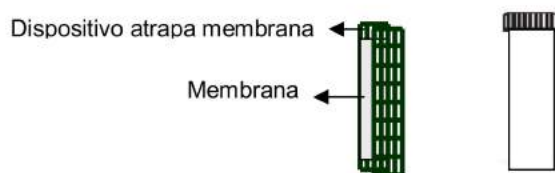
### 3.2.1. Materiales y Métodos

#### Materiales

Se utilizaron membranas producidas a partir de los polímeros irradiados PET<sub>1</sub> y PET<sub>2</sub>, mediante el GQ (según condiciones descritas en el Cap. II).

#### Metodología

Las reacciones de modificación se realizaron en frascos de 10 ml sobre secciones de membrana de 1,5 cm x 4 cm (6 cm<sup>2</sup>). Las membranas fueron dispuestas en dispositivos plásticos que la retienen (ver Fig. 3.2).



**Fig.3.2.** Dispositivo y frasco usado en las reacciones de modificación.

### **3.2.2 Polimerización PISR – Protocolo general**

- I. Preparación de la solución de monómero GMA 0; 0,3 y 0,6 % p/v, en etanol:agua, 1:1 (v/v) y burbujeo con N<sub>2</sub> durante 10 min.
- II. Incubación de la muestra en 10 ml de solución de monómero, en frasco de vidrio con tapa a rosca.
- III. Irradiación de la muestra en la planta PISI de <sup>60</sup>Co en el Centro Atómico CNEA-Ezeiza, con una dosis total de 10 kGy, y a una tasa de irradiación de 1 kGy/h.
- IV. Lavado alternado con agua destilada (H<sub>2</sub>O (d)) y etanol. Se realizaron 3 lavados con cada uno con 20 ml de H<sub>2</sub>O (d) y/o etanol.
- V. Secado de las membranas con papel absorbente.

### **3.2.3 Polimerización PIVRR – Protocolo general**

- I. Preparación de la solución de monómero GMA 10 % en etanol:agua, 1:1 (v/v) y burbujeo con N<sub>2</sub> durante 10 min.
- II. Incubación de la muestra en 10 ml de solución de monómero en frasco de vidrio con tapa a rosca.
- III. Incubación de la muestra en baño termostático a 50°C durante 4 h.
- IV. Lavado, como en el método anterior.
- V. Secado de la membrana con papel adsorbente.

## **3.3. Técnicas de caracterización de membranas**

### **3.3.1. Microscopía electrónica FESEM**

Se obtuvieron imágenes con el FESEM descrito en el capítulo anterior, de magnificación de 100.000 o 200.000x. Los diámetros de los poros se determinaron tomando el valor promedio de un mínimo de 30 mediciones +/- SD. El procesamiento de imágenes se realizó con el programa *Image J*.

### 3.3.2. Espectroscopia FTIR con ATR

Los espectros de FTIR-ATR se adquirieron en el describió en el Cap. II. Los parámetros de adquisición fueron: 4  $\text{cm}^{-1}$  de resolución, 60 scans y barrido entre 600  $\text{cm}^{-1}$  y 3000  $\text{cm}^{-1}$ . Finalmente los espectros fueron corregidos por la línea de base y atmósfera.

### 3.3.3. Derivatización química fluorescente

El procedimiento de derivatización química de marcado fluorescente de membranas modificadas utilizado fue realizado como se describe a continuación:

- I. Preparación de una solución de cisteamina, de 10 mg/ml en B. Tris 50 mM, pH 7,5 (BT) (se ajusta a pH con NaOH hasta pH 7,5). Se adiciona TCEP 126 mg/ml, en relación de 1  $\mu\text{l}$  TCEP/ml de solución de cisteamina.
- II. Incubación O.N. de las muestras (secciones de 0,7x 3 cm), en 2 ml de la solución de cisteamina con agitación constante.
- III. Lavado con BT, 3 veces con 10 ml.
- IV. Secado con papel adsorbente.
- V. Pre-incubación de la membrana derivatizada en buffer carbonato/bicarbonato 0,1 M pH 9 (BC), durante 10 min con agitación constante.
- VI. Incubación O.N. de las muestras en 2 ml de solución de FITC 0,25 mg/ml en BC con agitación constante.
- VII. Lavado de las muestras: 1 lavado con BC y 3 con BP (1), de 10 ml cada uno.
- VIII. Almacenamiento de las muestras en BP (1) hasta su medición.

La determinación de la fluorescencia sobre la membrana se realizó en todos los casos como se describió en el Cap. II. Las medidas de fluorescencia se tomaron en 520 nm, por quintuplicado sobre distintas regiones de la membrana.

Los resultados se informan como el valor promedio de las medidas corregidas por el blanco negativo (PET<sub>G</sub>) de reacción +/- SD.

#### **3.3.4. Microscopía confocal de fluorescencia**

El microscopio de fluorescencia es una variación del microscopio de luz ultravioleta en el que los objetos son iluminados por rayos de una determinada longitud de onda. El principio de la microscopía confocal se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco y se toma el haz luminoso que proviene del plano focal, eliminándose los haces procedentes de los planos inferiores y superiores. Para ello el sistema óptico del microscopio confocal ilumina una pequeña zona (un punto y a una cierta profundidad) del material, con fuentes luminosas de gran potencia, habitualmente un láser y utiliza filtros apropiados que dejan pasar solo la emisión de longitud de onda deseada. Esta metodología tiene una mayor resolución que el microscopio de fluorescencia. Se pueden obtener imágenes de mayor nitidez y contraste, mayor resolución vertical y horizontal, y sobre todo se puede de obtener "secciones ópticas" de la muestra, lo cual permite reconstruir una imagen 3D de la misma.

Las micrografías de fluorescencia se realizaron en el microscopio Nikon Eclipse TE 2000-E2, bajo los siguientes parámetros de adquisición 60.0x/1,4/0,13 (1,4 de apertura numérica, 0,13 mm distancia de trabajo) y *pinhole* de 33,3  $\mu\text{m}$ ; perteneciente al centro de Microscopia del Instituto de BMyC de Rosario (IBR). Secciones rectangulares (0,5 x 1 cm) de las muestras se dispusieron en un portaobjeto, se agregó una gota de BP (1) y cubrió con cubreobjeto. El procesamiento de las imágenes se realizó con el programa *Image J*.

#### **3.3.5. Cinética del transporte de masa**

Se utilizó la técnica descrita en el Cap. II. La misma permite evaluar de manera sencilla las propiedades de transporte a través de membranas.

#### **3.3.6. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)**

Esta técnica es muy utilizada en la caracterización de diferentes tipos de superficies y se distingue de otras técnicas microscópicas por su gran resolución, logrando ampliaciones de hasta  $10^8x$ , permitiendo visualizar entornos atómicos y moleculares. Se pueden realizar imágenes tridimensionales y operar en diferentes medios (vacío, líquido, aire u otros gases).

El escaneo se realizó en el equipo DI-VEECO- MMAFM NANOSCOPE IIIA perteneciente al Centro de Microscopia Avanzadas de la UBA, en la modalidad contacto.

### **3.3.7. Espectroscopia de Impedancia Electroquímica**

Se utilizó el equipamiento EIS descrito en el Cap. II.

## **3.4. Resultados y discusión**

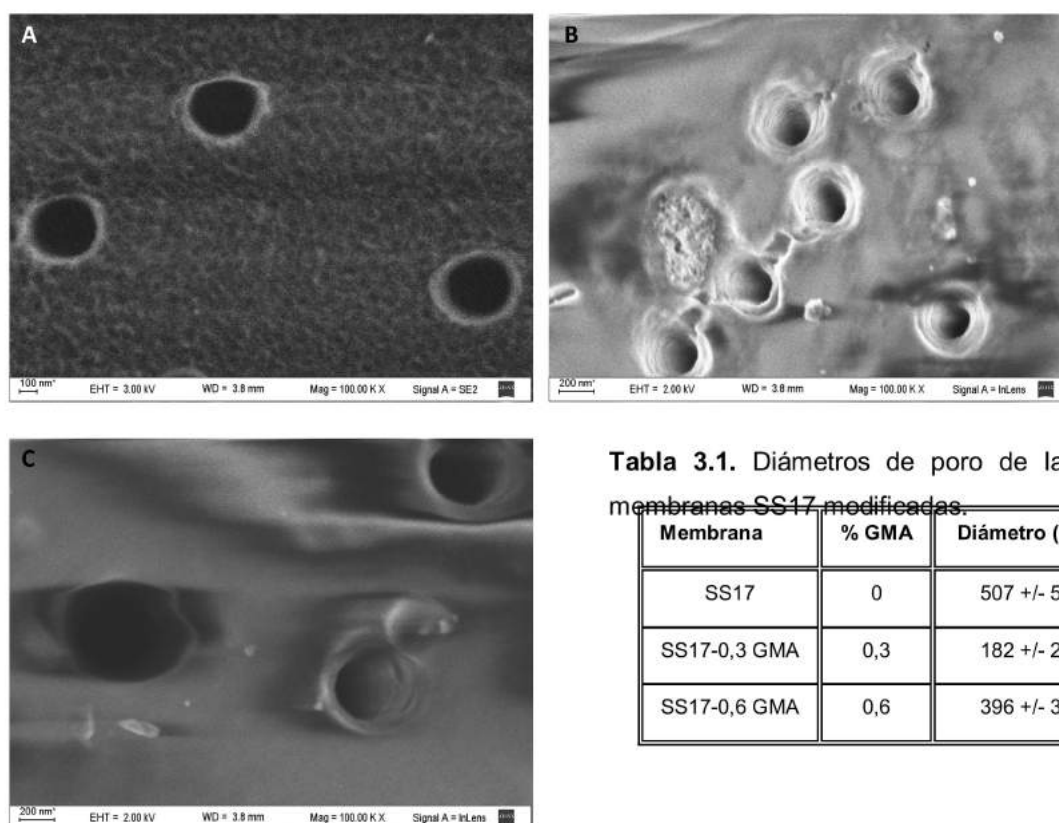
En este capítulo se evaluaron las técnicas **PISR** y la **PIVRR**, para lograr la modificación interna de los nanoconductos. Se estudiaron los parámetros que dominan el proceso de la técnica **PIVRR**. Además, se realizó una caracterización de las membranas preparadas empleando diversas técnicas fisicoquímicas, espectroscópicas y microscópicas.

### **3.4.1. Análisis por FESEM**

Inicialmente se estudió la técnica de modificación **PISR** sobre las membranas *track-etched* de PET utilizando el monómero GMA como reactivo. Es importante destacar que el LaMaBio tiene una muy amplia experiencia en esta técnica [26]. Se utilizó a la microscopia FESEM para seguir las modificaciones obtenidas.

Dado la muy baja superficie específica de las membranas *track-etched* de PET se decidió utilizar una concentración de monómero de aproximadamente diez veces menor a las condiciones habituales para modificación de membranas convencionales [26]. Se realizó la modificación **PISR** con concentraciones de GMA 0,3 y 0,6%.

En la Fig. 3.3 se muestran micrografías de la membrana PET SS17, donde se observa injerto superficial de polímero pGMA, respecto del blanco negativo (0% GMA). En todas las micrografías tomadas se visualizan poros abiertos, siendo el de mayor diámetro el del blanco (0% GMA), mientras que en las condiciones 0,3 y 0,6% de GMA se reduce el diámetro. Sin embargo, la condición de mayor modificación correspondió a 0,3 % (ver tabla 3.1). La deformación de la imagen en Fig. 3.2-C corresponde a carga superficial por no ser conductora (muestra no metalizada).



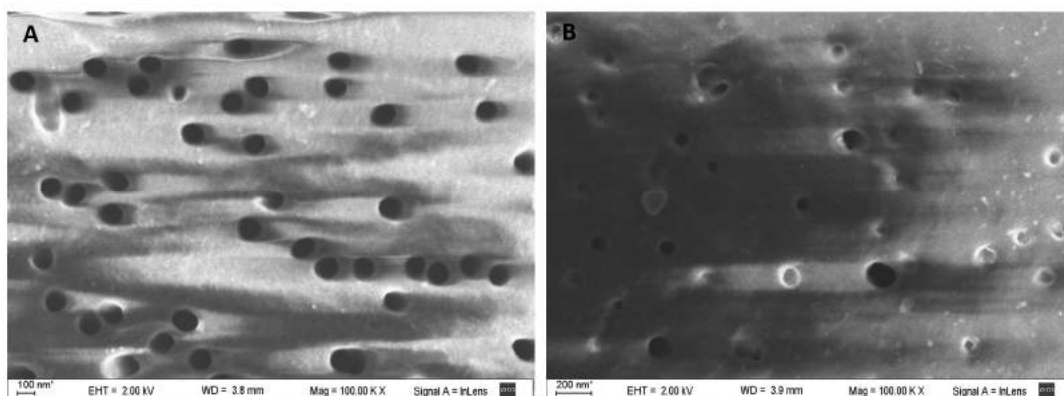
**Tabla 3.1.** Diámetros de poro de las membranas SS17 modificadas.

Membrana	% GMA	Diámetro (nm)
SS17	0	507 +/- 53
SS17-0,3 GMA	0,3	182 +/- 21
SS17-0,6 GMA	0,6	396 +/- 32

**Fig.3.3.** Micrografías obtenidas por FESEM de las membranas de PET preparadas y modificadas por PISR. A- 0 %. B- 0,3% y C- 0,6% GMA.

Adicionalmente se evaluó la **PISR** sobre una membrana *track-etched* de PC, de 80 nm de diámetro de poro, a la concentración de 0,3 % GMA. Las

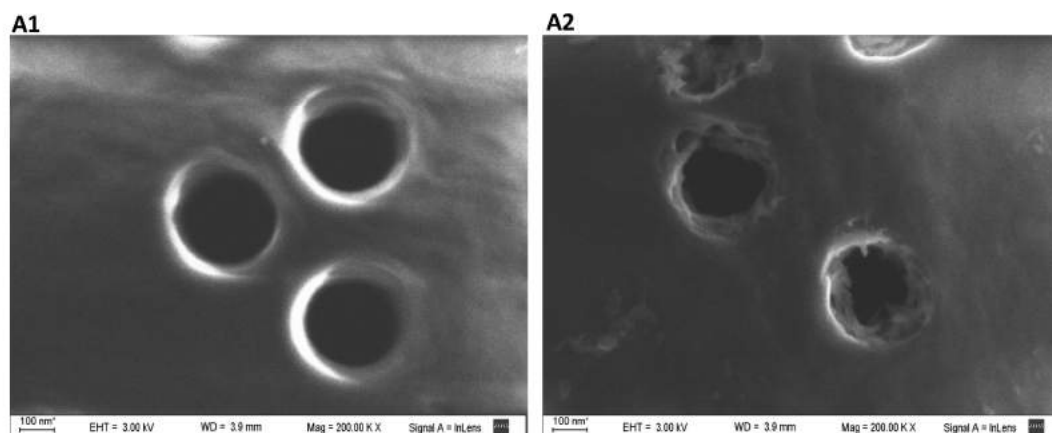
micrografías de la Fig. 3.4 B muestra presencia de pGMA sobre la superficie de la membrana, respecto del blanco, además se observa una gran reducción del tamaño de los poros y obstrucción de muchos de ellos

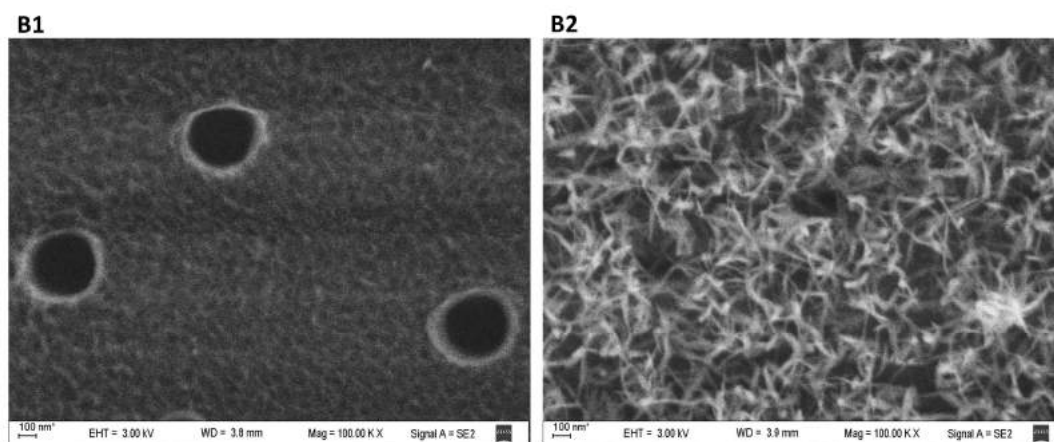


**Fig.3.4.** Micrografías FESEM de membranas comerciales PC modificadas por PISR. A- 0 % y B- 0,3% GMA.

Con el objetivo de disminuir la presencia de homopolímero y controlar la modificación por injerto al interior de los nanoconductos se realizó el procedimiento *PIVRR* con sales de *Mohr* (*PIVRR-C/SM*). En esta polimerización se utilizaron de las membranas PET SS34 y SS17 con 10% GMA, 60 °C y un tiempo de reacción de 1 h y O.N. adicionado de 0,1% de sal de *Mohr* en el medio de reacción.

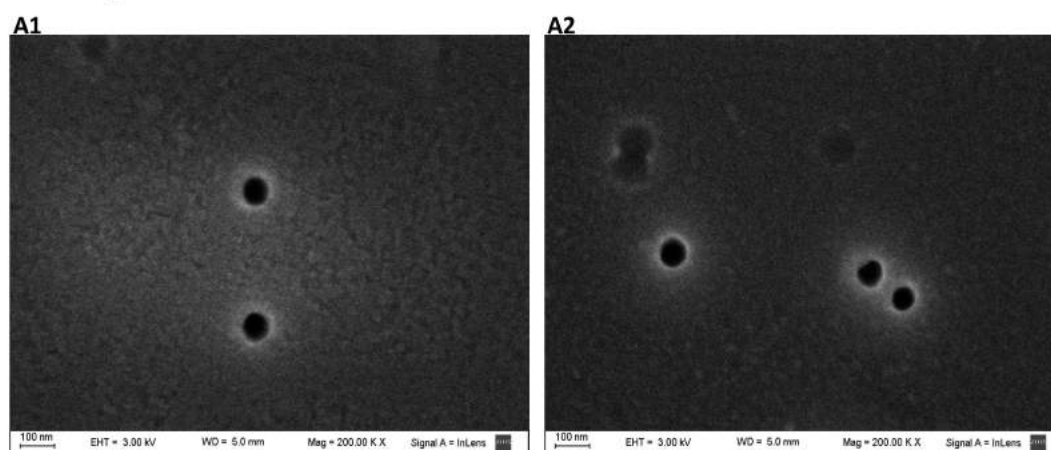
Las microfotografías de la Fig. 3.5 revelan la presencia de depósitos de cristales de la sal de *Morh* sobre la superficie de la membrana y sobre el poro. La condición O.N. mostro una superficie totalmente cubierta de cristales.



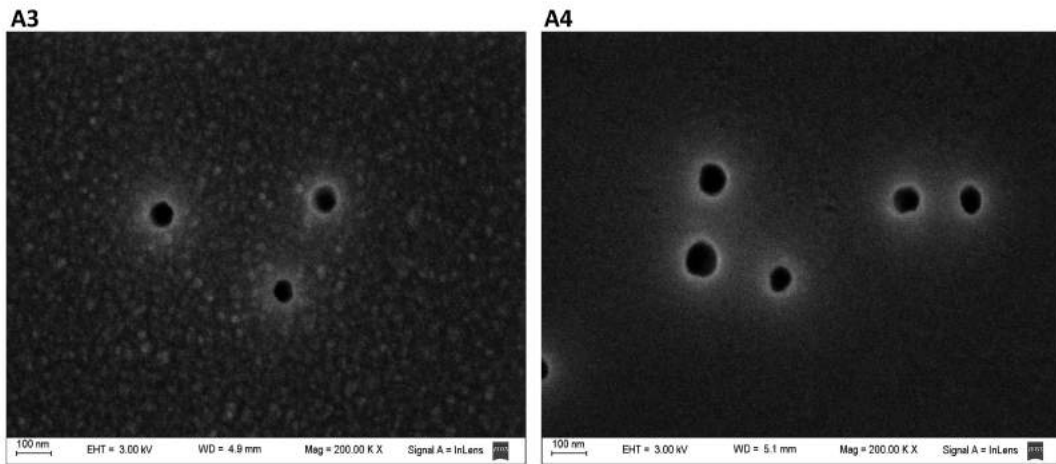


**Fig.3.5.** Micrografías de membranas PET modificadas por la técnica *PIVRR-C/SM*. A-1. Membrana SS34. A-2. Membrana SS34 modificada, 1h. B-1. Membrana SS17. B-2. Membrana SS17 modificada, O.N.

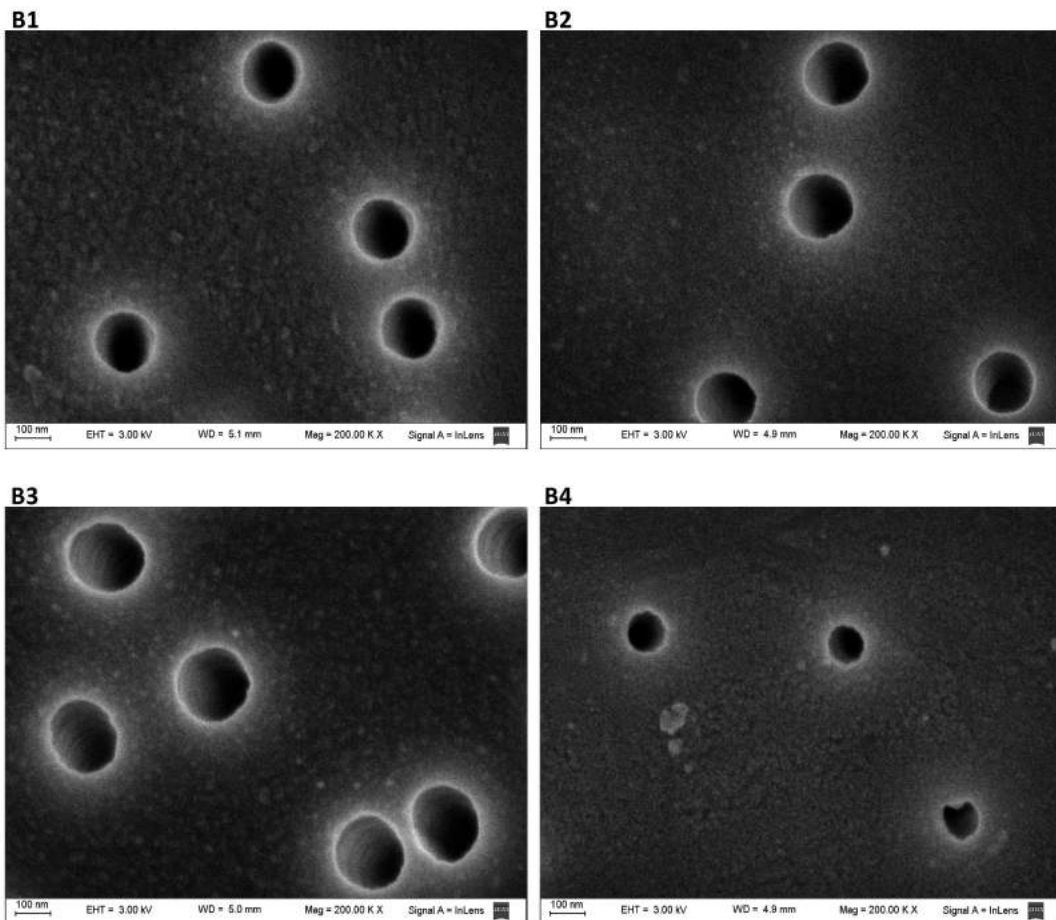
Por último se decidió estudiar el método *PIVRR* sin el agregado de sal de *Mohr* por las precipitaciones encontradas en las muestras. Las membranas SS81 y SS85 (preparadas con GQ de NaOH 4 M, 50°C, c/UV, 15 min y 30 min de incubación respectivamente) fueron sometidas al proceso *PIVRR* a distintos tiempos de polimerización, entre 0,5 a 4 h. En todos los casos se observaron poros abiertos, sin aparente presencia de pGMA en la superficie de la membrana, pero con una importante reducción del diámetro de poro a las 2 h de polimerización (ver Fig. 3.6.A y 3.6.B). En la Fig. 3.7 se muestra la evolución del diámetro en función del tiempo de la reacción.

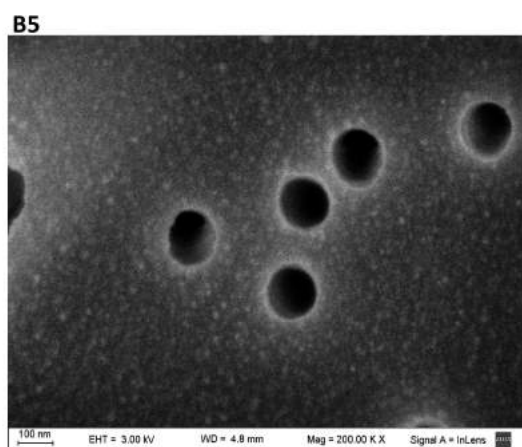




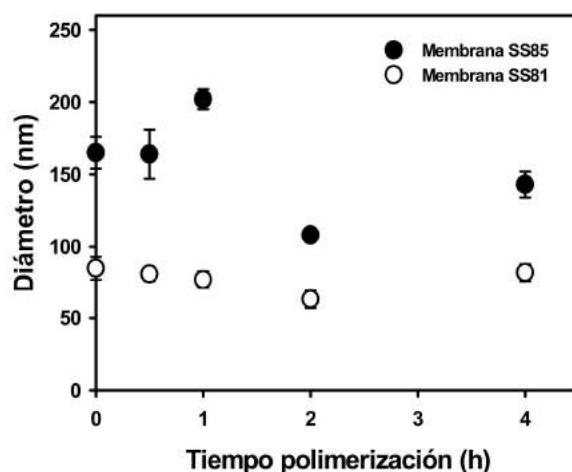


**Fig.3.6.A.** Micrografías de las membranas modificadas por *PIVRR*, a 200.000x. **A.1-** Membrana SS81 sin modificar (85 +/- 8 nm de diámetro de poro). **A.2-** 1 h (77 +/- 6 nm). **A.3-** 2 h (63 +/- 6 nm) **A.4-** 4 h (82 +/- 6 nm).





**Fig.3.6.B.** Micrografías de membranas modificadas por PIVRR, a 200.000x. **B.1-** Membrana SS85 sin modificar (165 +/- 11 nm de diámetro de poro) **B.2-** 0,5 h (164 +/- 17 nm). **B.3-** 1 h (202 +/- nm). **B.4-** 2 h (108+/- 3 nm) **B.5-** 4 h (143+/- 9 nm).



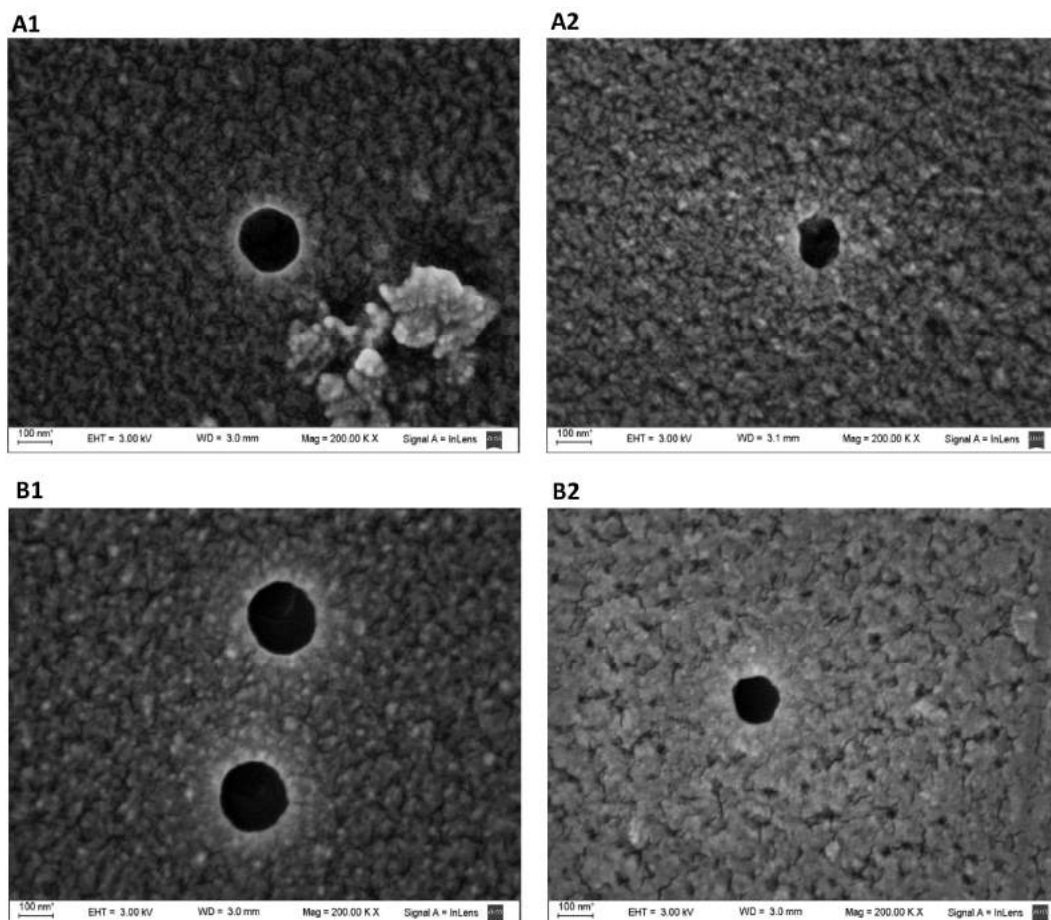
**Fig. 3.7.** Gráfico del diámetro de poro en función del tiempo de polimerización.

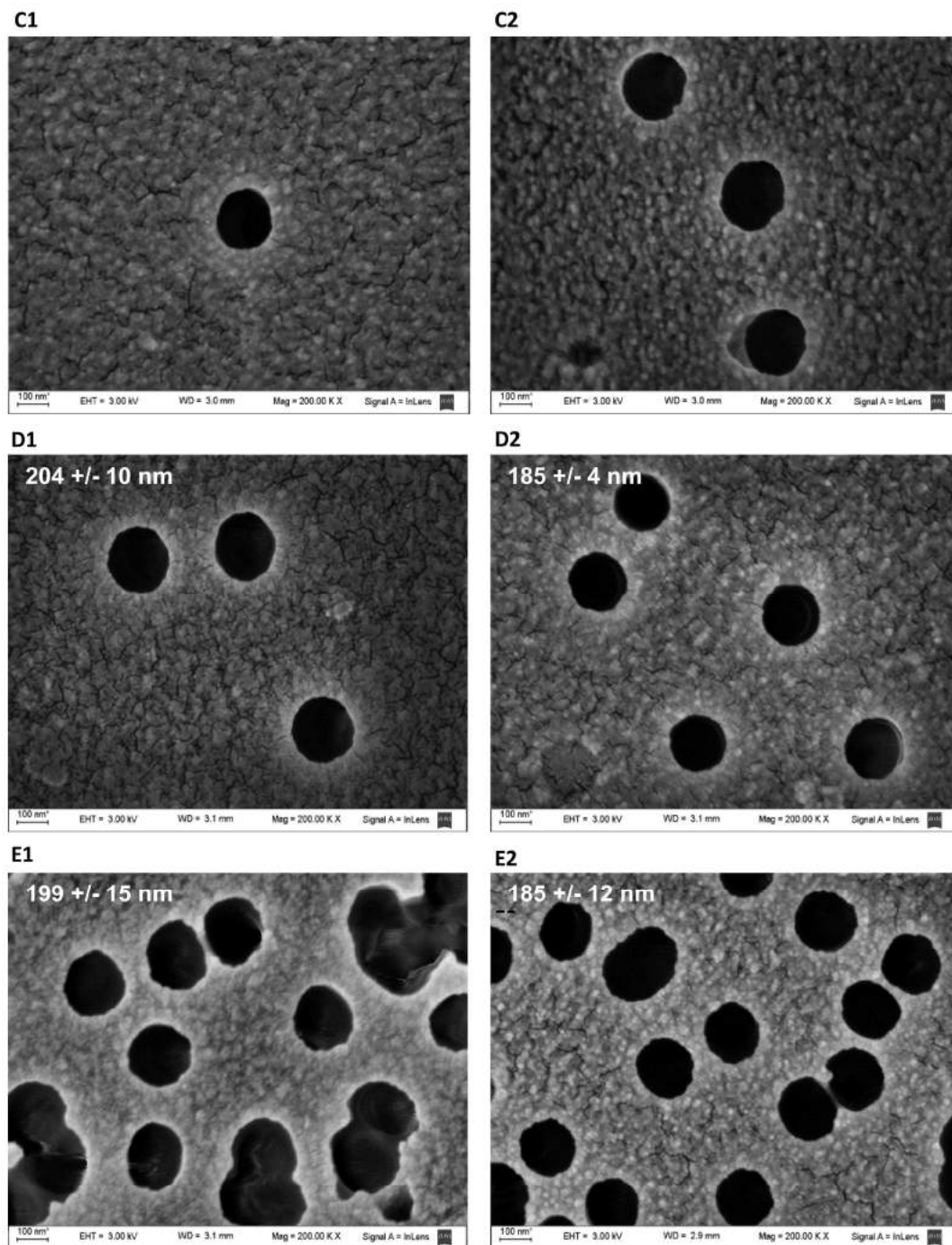
Los resultados obtenidos por FESEM muestran que la técnica de modificación *PIVRR*, sin adición de sal de Morh, muestran un reducción del diámetro de los poros sin afectar la superficie de la membrana. Se observó también en algunas muestras diámetro de poro igual o mayor al inicial. Este comportamiento se puede asociar a dos fenómenos que ocurren durante la reacción de polimerización: (i) la incorporación de injerto sobre las paredes,

produciendo una reducción del diámetro (ii) un proceso de degradación de la traza remanente, lo cual provoca el incremento del diámetro.

Con el fin de ahondar en el estudio de este tipo de polimerización, se propusieron una serie de experimentos para estudiar las principales variables que lo afectan.

Membranas de PET<sub>5-9</sub> (ver Tabla 1.4) fueron también modificadas por *PIVRR* con 10% de GMA, a 60 °C y 2,5 h de reacción. Las micrografías correspondientes se presentan en la Fig. 3.7. En estas se evidencia la reducción del diámetro de poro para la mayoría de las muestras evaluadas.



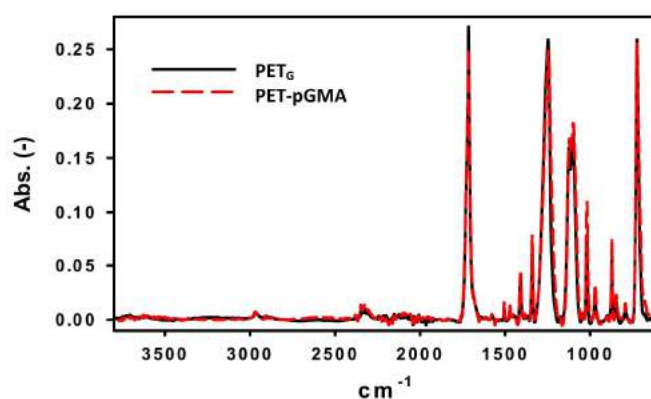


**Fig.3.8.** Micrografías FESEM de membranas  $PET_{5-9}$  modificadas, a 200.000x. **A1 a E1-** Membranas sin modificar;  $PET_{5-9}$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ , y  $10^9$  poros/ $cm^2$  respectivamente. **A2 a E2-** Membranas  $PET_{5-9}$  modificadas por *PIVRR*.

Las micrografías de la Fig. 3.8 correspondiente a membranas de distintas fluencias modificadas por *PIVRR* evidencian la modificación sitio-específica de los nanoconductos.

### 3.4.2. Análisis por espectroscopia FTIR con ATR

Los espectros de FTIR-ATR de la membrana PET<sub>9</sub> modificada (PET-pGMA) y sin modificar (PET<sub>G</sub>) modificados en la sección anterior se describen en la Fig. 3.9.



**Fig.3.9.** Espectro FT-IR-ATR de la membrana modificada (PET-pGMA) y sin modificar (PET<sub>G</sub>).

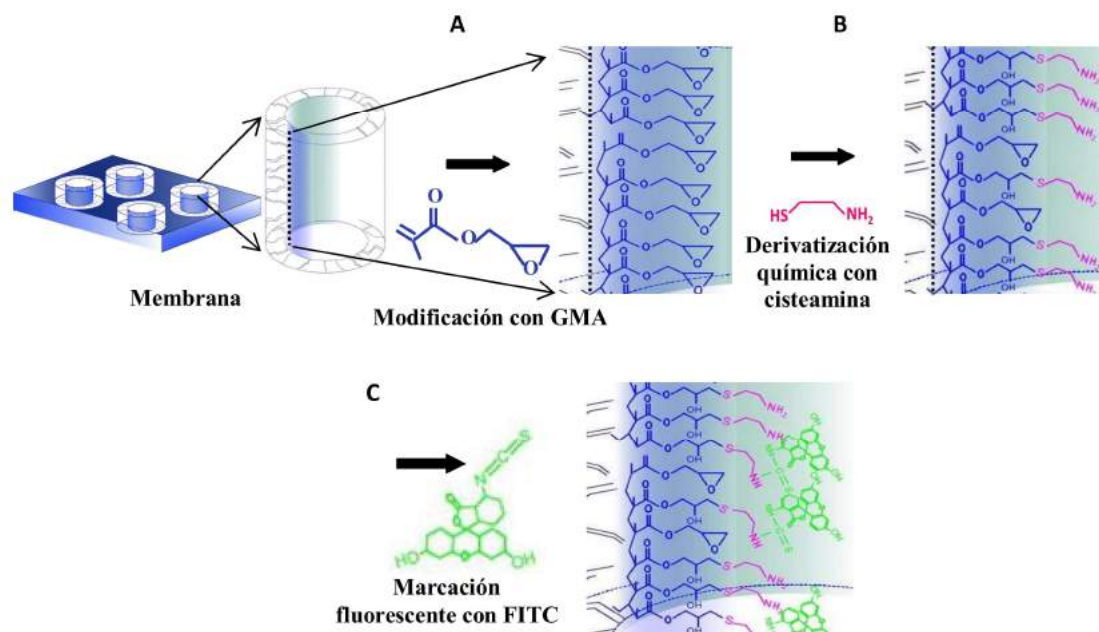
Como se observa en la Fig. 3.9 los espectros contiene una gran cantidad de picos, los cuales coinciden con los reportados en bibliografía para PET, como se describió en el Cap. II. Asimismo no se evidencian diferencias entre ambos espectros, ni presencia de los picos correspondientes al carbonilo (a 1700 y 600 cm<sup>-1</sup>), característicos del pGMA. Es posible que los picos del carbonilo perteneciente al PET interfieran con la detección del injerto. La no detección de este puede ser debida a la baja fluencia de poros y al bajo grado de modificación.

### 3.4.3. Análisis por derivatización química fluorescente

Dado la falta de sensibilidad de la técnica FT-IR para detectar la modificación del PET, se decidió realizar derivatizaciones químicas que permitan revelar de manera indirecta la presencia del injerto (pGMA).

La derivatización química planteada en esta sección combina una secuencia de dos reacciones químicas, la primera entre el grupo epóxido del pGMA y el grupo tiol (-SH) de la cisteamina, generando un enlace tioéter. La cisteamina posee un grupo amino libre además del sulfhidrilo, que le confiere la propiedad de molécula bifuncional. Así el amino libre se conjuga en una segunda reacción con el fluoróforo Isotiocianato de Fluoresceína (FITC). De esta manera la presencia del injerto puede revelarse por fluorescencia.

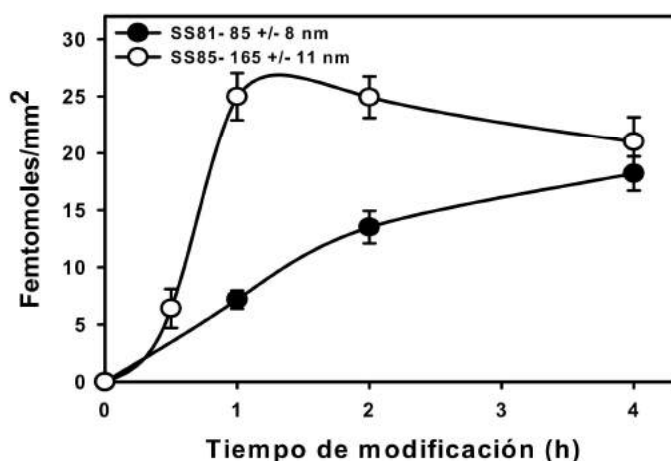
En el esquema de la Fig. 3.10 se representa el proceso completo de modificación, derivatización y marcación con FITC de las membranas (SS81 y SS85).



**Fig.3.10.** Esquema de la modificación de la membrana. **A-** Polimerización por injerto *PIVRR* sobre la pared interna del nanoconducto. **B-** Derivatización química con cisteamina. **C-** Marcación fluorescente con FITC.

En la Fig. 3.11 se muestra la evolución del *PIVRR* mediante el revelado y cuantificación fluorescente. Como puede observarse los valores de las medidas se encuentran en el rango de los femtomoles, sin embargo la sensibilidad de la técnica fue suficiente para detectar, de manera indirecta, la presencia del injerto

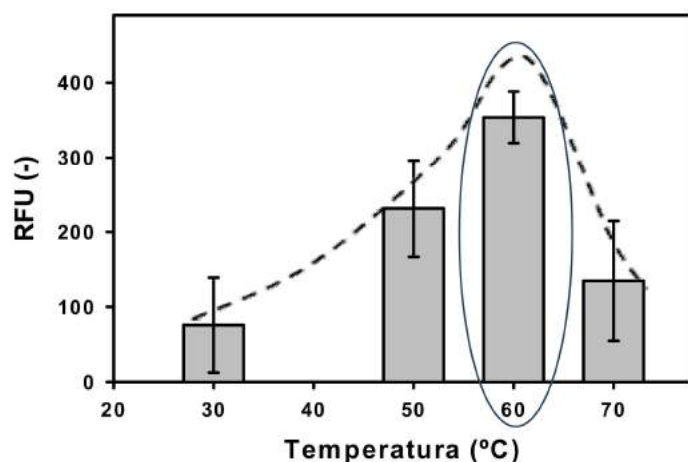
pGMA. Como puede observarse, la membrana de poro más grande tiene una cinética propia de una polimerización radicalaria, con una velocidad inicial rápida y saturable, mientras que en la de poro más pequeño aumenta progresivamente. Esto puede ser debido a una limitación en la difusión del monómero.



**Fig. 3.11.** Gráfico de la cinética de incorporación de injerto en función del tiempo de polimerización.

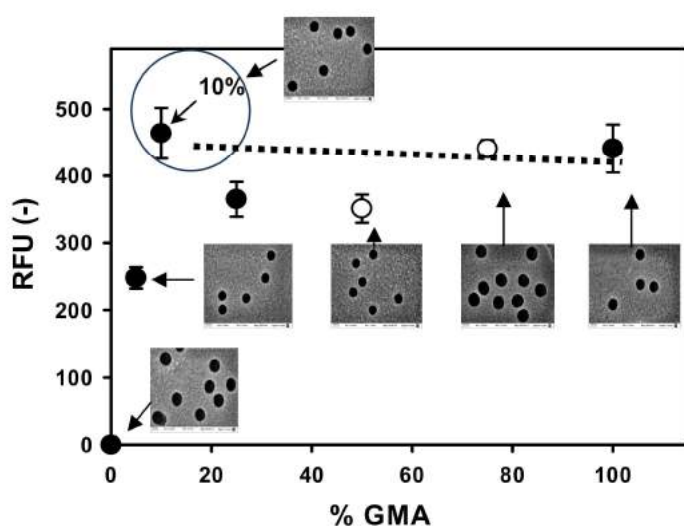
Posteriormente, se estudiaron otras variables del *PIVRR* como concentración de GMA, temperatura y tiempo post-GQ (tiempo que transcurre entre el proceso de GQ y la *PIVRR* (denominado  $t_p$ -GQ)); dejando como parámetro fijo el tiempo de polimerización en 2,5 h.

Los ensayos se realizaron sobre la membrana (SS101), con un diámetro de los poros de  $163 \pm 9$  nm. Las membranas modificadas se revelaron según el protocolo anterior. Los resultados se muestran en las Fig. 3.12 a 3.14.



**Fig. 3.12.** Gráfico del rendimiento de *PIVRR* en función de la temperatura.

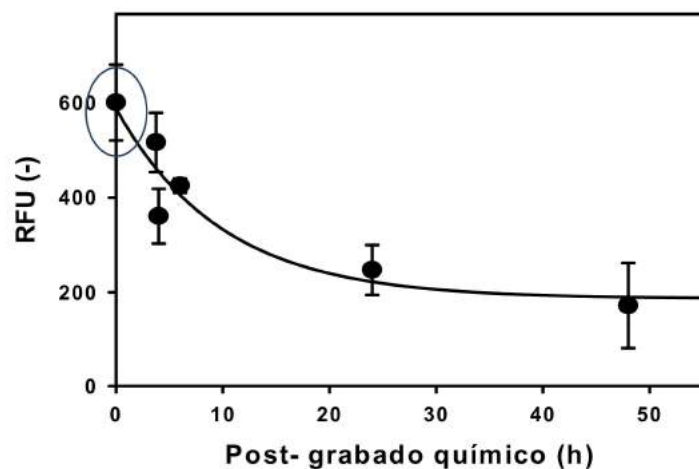
Cómo se observa en la Fig. 3.12 las medidas de fluorescencia directa (RFU) aumentan en función de la temperatura hasta alcanzar un máximo a 60°C, a temperaturas mayores se observa una reducción de la misma. El incremento de la polimerización en función de la temperatura puede deberse a la activación de los radicales remanentes y al incremento de la velocidad de difusión del monómero [11]. Mientras que la reducción del rendimiento a temperaturas mayores a 60°C podría deberse a la cercanía con la temperatura de transición vítrea del PET ( $t_g$  74 °C), que aumenta la inactivación de radicales por el movimiento de la macromolécula [27].



**Fig. 3.13.** Gráfico del comportamiento de la polimerización en función del % de GMA. ● Corresponde a soluciones homogéneas de GMA. ○ Soluciones heterogéneas de GMA. Insertos: micrografías de FESEM a 200.000x.

En la Fig. 3.13 se observa que las medidas de fluorescencia se incrementan directamente con el % de GMA en la mezcla de reacción, alcanzando un máximo de polimerización a 10% de GMA. Para concentraciones mayores se observa un comportamiento constante, aunque ligeramente menor al alcanzado con 10% GMA. Esto también coincide con la reducción de diámetro (exceptuando la condición de 80% de GMA). Las soluciones de 50% y 75% de GMA resultaron ser heterogéneas, sin embargo no impidieron la reacción de polimerización.





**Fig. 3.14.** Gráfico del comportamiento de la polimerización en función del tiempo post GQ (tp-GQ).

En la Fig. 3.14 se observa que el rendimiento de la **PIVRR** disminuye conforme incrementa el tiempo post-GQ, siendo el valor máximo de polimerización el correspondiente al tiempo cero ( $t_0$ ). A medida que este se incrementa la polimerización disminuye de forma exponencial. Este comportamiento refleja que los radicales remanentes luego del GQ son inestables y desaparecen en el término de unas pocas horas. Hasta 2 h posterior al GQ se maximiza la cantidad de radicales disponibles.

A partir de los resultados obtenidos en la derivatización química y marcación fluorescente del injerto se pudo determinar una condición óptima para la técnica de modificación **PIVRR**, a **10% GMA, 2,5 hs a 60°C, y tp-GQ menor a 30 min**. Las mismas se encuentran marcadas con un círculo en los gráficos correspondientes.

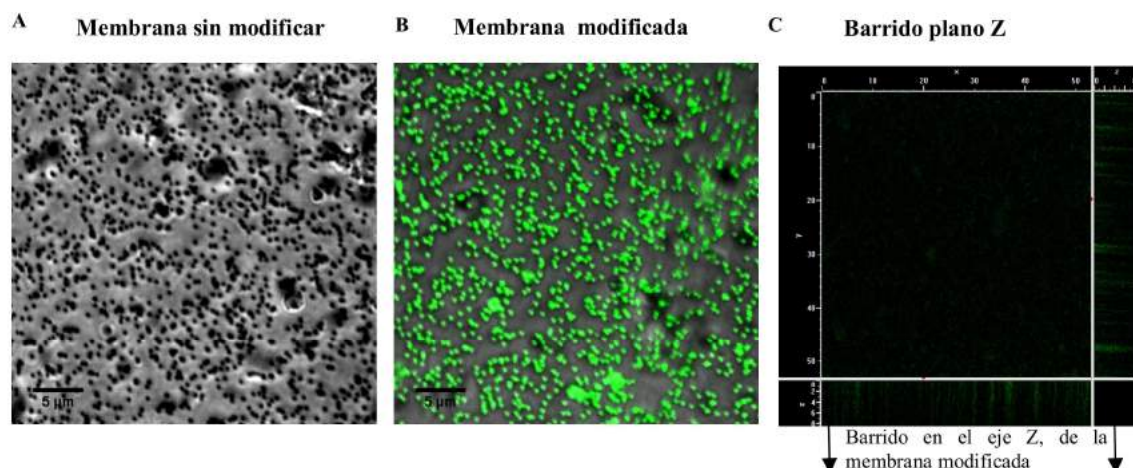
De este estudio se determinó que la temperatura y el tiempo post-GQ son las variables que más afectan al proceso. En particular este último parámetro se debe a la vida media de los radicales activados durante el GQ, que son los que posteriormente inician la polimerización.

En conclusión, el revelado indirecto del nanoinjerto y la cuantificación a través de la marcación fluorescente permitió optimizar las condiciones de la reacción de modificación.

### 3.4.4. Análisis por microscopía confocal de fluorescencia

Esta técnica 3D, permite revelar la ubicación *in situ* de la fluorescencia sobre la membrana. En principio, la microscopía FESEM sugiere que la modificación o incorporación de injerto se realiza sobre la cara interna del poro, por haber observado la reducción del diámetro de poro y ausencia de modificación de la superficie.

Las micrografías obtenidas con un microscopio de fluorescencia sobre la membrana SS29 con y sin modificación confirman la presencia de injerto fluorescente sobre los poros. Las imágenes muestran la ubicación específica del injerto. Mientras que el barrido del plano Z, a diferentes profundidades, detectan la presencia del fluoróforo a lo largo de los nanoconductos, confirmando la modificación del conducto en toda su longitud, ver Fig. 3.15.



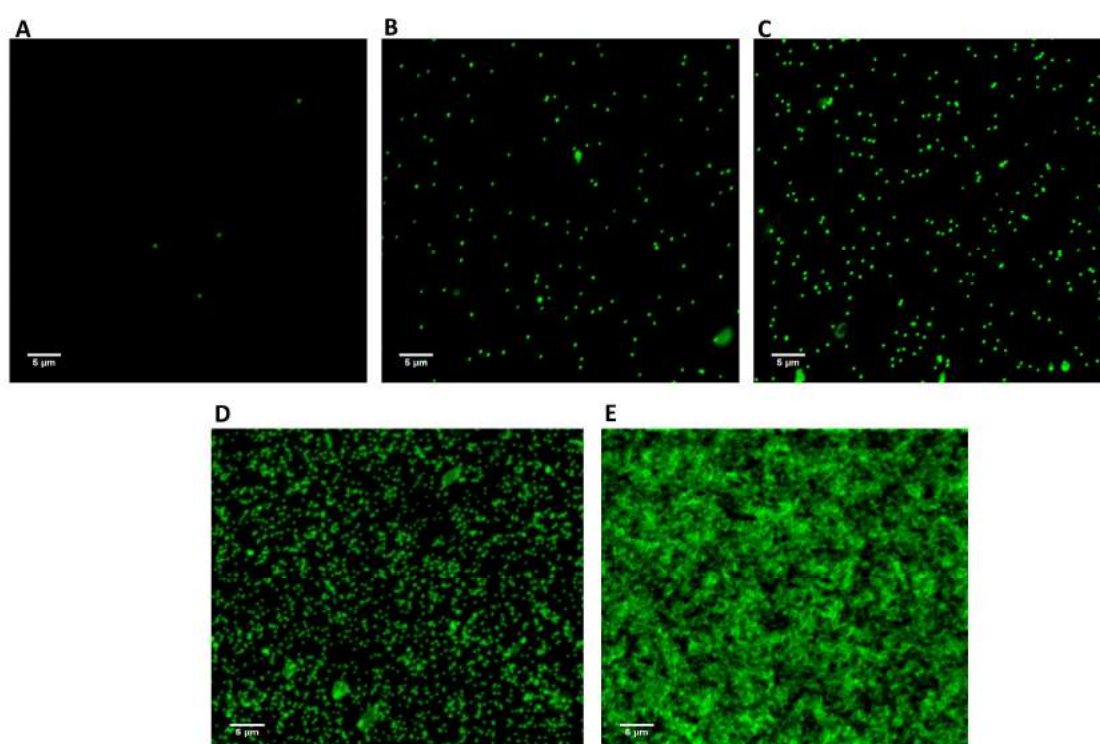
**Fig.3.15.** Imágenes de microscopía de fluorescencia, con un zoom de imagen de 4x (magnificación total 240x). **A** Membrana sin modificar. **B**. Membrana modificada y derivatizada. **C**. Microscopía Confocal de barrido en el eje Z, se tomaron secciones cada 0,25 µm (distancia en el eje Z= 8 µm).

Al determinar la fluencia de poros en ambas micrografías de la membrana sin modificar (nro. poros/área) y modificada (nro. puntos fluorescentes/área), se observa que los valores obtenidos son iguales, indicando que la modificación ocurre en el 100% de los poros, ver Tabla 3.2.

**Tabla. 3.2.** Determinación de la fluencia de las membranas sin modificar y modificada.

Membrana PET	Fluencia (n° poros/cm <sup>2</sup> )
Sin modificar	7,3 +/- 0,5E+07
Modificada	7,6 +/- 0,3E+07

Las micrografías de fluorescencia de las membranas modificadas PET<sub>5-9</sub> (distintas fluencias), derivatizadas y marcadas con FITC, como se describió anteriormente, se presentan en la Fig. 3.16.

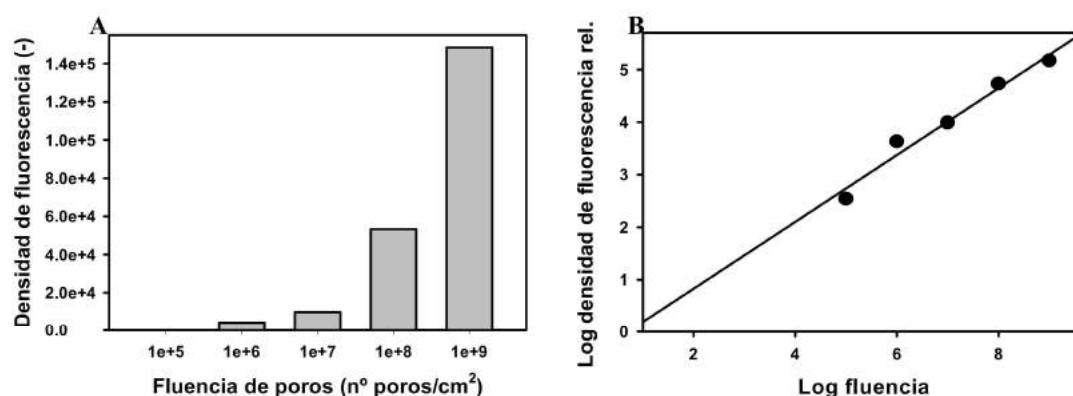


**Fig.3.16.** Micrografías obtenidas en confocal, con un zoom de imagen de 4x, siendo la magnificación total 240x, para membranas modificadas y marcadas, de diferente fluencia. **A-**  $10^5$  poros/cm<sup>2</sup>. **B-**  $10^6$  poros/cm<sup>2</sup>. **C-**  $10^7$  poros/cm<sup>2</sup>. **D-**  $10^8$  poros/cm<sup>2</sup>. **E-**  $10^9$  poros/cm<sup>2</sup>.

Como se observa en la Fig. 3.16 la cantidad de los puntos fluorescentes (poros) se incrementa al aumentar la fluencia. Para la fluencia más alta (PET<sub>9</sub>) se obtuvo una imagen sobresaturada. Tal saturación produce un efecto de *quenching* (disminución de la fluorescencia), que también fue encontrado al cuantificar dicha membrana con el Nanodrop (datos no mostrados). Adicionalmente, los puntos

fluorescentes observados en las micrografías se ven de menor tamaño, comparados a los de la muestra analizada anteriormente (membrana SS29 modificada). Esto se debe a que el diámetro de los poros son de menor tamaño, en un rango de 184 +/-7 a 204 +/-10 nm, respecto de la membrana SS29 modificada, de diámetro de poro de 263 +/- 39 nm.

En la Fig. 3.17 se realizó una correlación entre la densidad de fluorescencia, determinada con el software *image J*, y la fluencia.



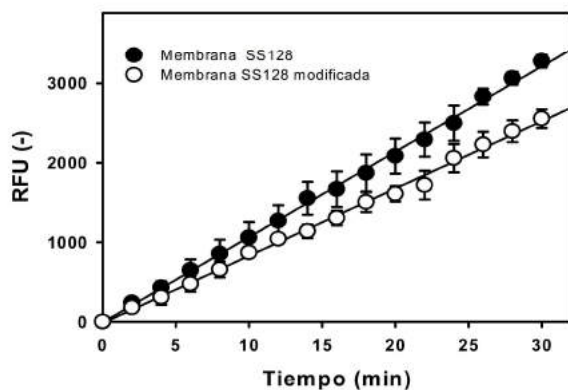
**Fig.3.17.** A- Gráfico de la densidad de fluorescencia en función de la fluencia (n° poros/cm<sup>2</sup>). B- Gráfico del log de la fluorescencia en función del log de la fluencia, log (n° poros/cm<sup>2</sup>).

En conclusión, la microscopia confocal permitió identificar la ubicación específica del nanoinjerto, así como también determinar que la modificación de los poros fue completa y a lo largo de todo el espesor de los conductos.

### 3.4.5. Análisis por cinética del transporte de masa

Como se describió en el Cap. II esta técnica permite evaluar de manera sencilla las propiedades de transporte a través de membranas.

En este ensayo se utilizó la membrana SS128, con un diámetro de poro de 153 +/- 6 nm (sin modificar) y de 145 +/- 6 nm (modificada por *PIVRR*). Las mediciones de CTM para ambas membranas se realizaron por triplicado siguiendo el protocolo descrito en el Cap. II, pre-acondicionando las muestras en H<sub>2</sub>O (d). Los resultados se presentan a través de la curva de transporte, donde se gráfica el promedio de las mediciones +/- SD (ver Fig. 3.18).



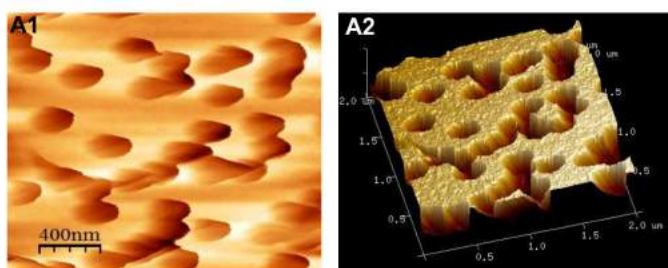
**Fig.3.18.** Gráfico de CTM para la membrana SS128 modificada y sin modificar.

Como se observa en el gráfico se detecta una diferencia significativa entre la membrana modificada y sin modificar. La membrana con injerto resultó tener una menor cinética de transporte respecto del control sin modificar.

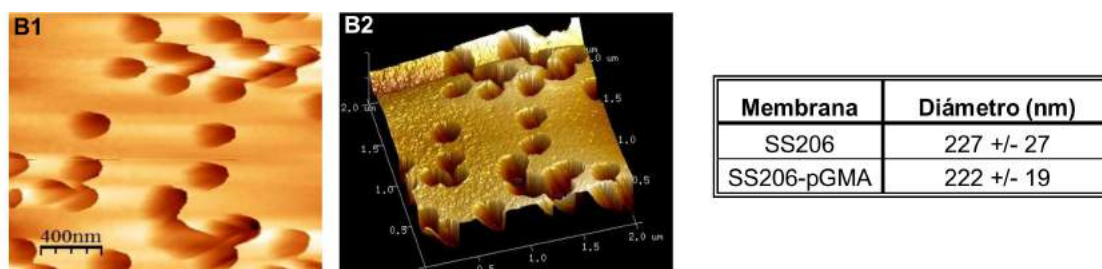
Estos resultados indican, en primera instancia, que el pGMA injertado no obstruye el transporte a través de la membrana PET modificada, y permite discernir la presencia de una modificación interna del conducto. Esta diferencia podría deberse a una diferencia entre el diámetro de poro o debido a la diferencia de carga. Estas dos alternativas podrían ser discriminadas por EIS.

### 3.4.6. Análisis por Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)

Se realizó un escaneo con un AFM en la modalidad contacto. Se evaluaron las membranas PET (SS206) (preparadas con GQ de NaOH 2 M, 60°C, c/UV y 18 min de incubación), de fluencia  $1E+09$  iones/cm<sup>2</sup> y su par modificado (SS206-pGMA) usando la condición óptima de *PIVRR* (ver Fig. 3.19).



**Fig. 3.19.** Micrografías de AFM. **A1-** Topografía de la membrana SS206- **A2-** Topografía tridimensional de la membrana SS206. **B1-** Topografía de la membrana SS206-pGMA. **B2-** Topografía tridimensional de la membrana SS206-pGMA.

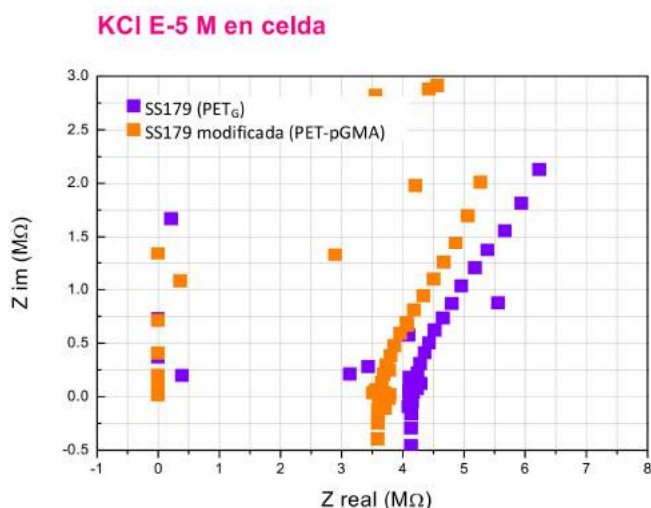


Como se observa en las micrografías de la Fig. 3.19 no se detectan diferencias evidentes entre las muestras (SS206 y SS206-pGMA). La superficie de ambas membranas presenta las mismas características, superficie lisa sin presencia evidente de injerto en la superficie. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos por FESEM y microscopía confocal. La modificación realizada se produce específicamente sobre la pared interna de los nanoconductos. El nanoinjerto incorporado en los conductos no obstaculiza el transporte a través de estos. La determinación del diámetro por AFM se realizó tomando el valor promedio de un mínimo de 10 mediciones +/- SD. Mientras que la determinación por FESEM (tomando el valor promedio de un mínimo de 30 mediciones +/- SD) dio un valor de 288 +/- 22 nm (SS206) y de 276 +/- 15 nm (SS206-pGMA). En ambas técnicas se observa una reducción del diámetro de poro, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa.

#### 3.4.7. Análisis por EIS

Como se describió en el Cap. II esta técnica permitió estudiar el transporte de iones a través de los nanoconductos en membranas PC y PET, determinándose que el comportamiento de la impedancia depende de las características de poro. En base a este precedente se estudia una membrana (PET<sub>G</sub>) de su par modificado (PET-pGMA). Se utilizaron las membranas SS179 (preparadas con GQ de NaOH 2 M, 60°C, c/UV y 15 min de incubación), de fluencia 1E+09 iones/cm<sup>2</sup>, con un diámetro de poro de 199 +/- 15 nm (sin modificar) y de 190 +/- 10 nm (modificada), las condiciones del proceso y de

medición fueron las mismas que se describieron en el Cap II. Los resultados se presentan en el gráfico de la Fig. 3.20.



**Fig. 3.20.** Gráfico de Nyquist correspondiente a las mediciones de EIS de membranas pre-acondicionada con KCl 1 E-5 M. PET SS179 (cuadrado violeta ■), SS179 modificada (cuadrado naranja ■).

Como se puede ver en la Fig. 3.20 se observa una diferencia significativa entre el comportamiento resistivo de los sistemas evaluados. La membrana PET-pGMA presenta una resistividad menor, respecto de PET<sub>G</sub>. Este comportamiento indica que las propiedades de los nanoconductos son distintas. Si la modificación no hubiera injertado pGMA sobre el conducto, la carga previa proveniente de los carboxilos haría que el comportamiento de la membrana PET-pGMA se asemeje a PET<sub>G</sub>, o bien que tenga una resistividad mayor, por ser de menor diámetro. Sin embargo se observa lo contrario, la reducción de la resistividad se asocia al cambio en las propiedades de los nanoconductos, impartidas por la presencia de pGMA. Estos resultados junto a los obtenidos con las otras técnicas reafirman que la modificación realizada se produce específicamente sobre la pared interna de los nanoconductos.

**Referencias:**

1. Bhattacharya, A., & Misra, B. N. (2004). Grafting: a versatile means to modify polymers: techniques, factors and applications. *Progress in polymer science*, 29(8), 767-814.
2. Singh, N., Husson, S. M., Zdyrko, B., & Luzinov, I. (2005). Surface modification of microporous PVDF membranes by ATRP. *Journal of membrane science*, 262(1), 81-90.
3. Cartier, H., & Hu, G. H. (1998). Styrene-assisted melt free radical grafting of glycidyl methacrylate onto polypropylene. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 36(7), 1053-1063.
4. Huang, H., & Liu, N. C. (1998). Nondegradative melt functionalization of polypropylene with glycidyl methacrylate. *Journal of applied polymer science*, 67(12), 1957-1963.
5. Chen, L. F., Wong, B., & Baker, W. E. (1996). Melt grafting of glycidyl methacrylate onto polypropylene and reactive compatibilization of rubber toughened polypropylene. *Polymer Engineering & Science*, 36(12), 1594-1607.
6. Sun, Y. J., Hu, G. H., & Lambla, M. (1995). Melt free-radical grafting of glycidyl methacrylate onto polypropylene. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 229(1), 1-13
7. Rao, G. S., Choudhary, M. S., Naqvi, M. K., & Rao, K. V. (1996). Functionalization of isotactic polypropylene with acrylic acid in the melt: synthesis, characterization and evaluation of thermomechanical properties. *European polymer journal*, 32(6), 695-700.
8. Patel, A. C., Brahmhatt, R. B., Jain, R. C., & Devi, S. (1998). Grafting of 2-HEMA on IPP and in situ chlorinated PP through solution polymerization. *Journal of applied polymer science*, 69(11), 2107-2113.
9. Ratner, B. D., & Castner, D. G. (Eds.). (1997). *Surface modification of polymeric biomaterials*. New York: Plenum Press.
10. Darkow, R., Yoshikawa, M., Kitao, T., Tomaschewski, G., & Schellenberg, J. (1994). Photomodification of a poly (acrylonitrile-co-butadiene-co-styrene)



containing diaryltetrazolyl groups. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 32(9), 1657-1664.

11. Nasef, M. M., & Hegazy, E. S. A. (2004). Preparation and applications of ion exchange membranes by radiation-induced graft copolymerization of polar monomers onto non-polar films. *Progress in Polymer Science*, 29(6), 499-561.

12. Betz, N. (1992). *Etude des effets d'irradiation et du radiogreffage, induits dans le polyfluorure de vinylidène, par des ions lourds rapides* (Doctoral dissertation).

13. Betz, N. (1995). Ion track grafting. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 105(1), 55-62.

14. Shirkova, V. V., Orelovich, O. L., Chihacheva, I. P., Budris, S. V., Evtushenko, A. M., & Zubov, V. P. (2001). Graft polymerization into the latent tracks of some perfluoropolymers films irradiated by heavy ions. *Radiation measurements*, 34(1), 61-64.

15. Siwy, Z., Apel, P., Dobrev, D., Neumann, R., Spohr, R., Trautmann, C., & Voss, K. (2003). Ion transport through asymmetric nanopores prepared by ion track etching. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 208, 143-148.

16. Waheed, A., Forsyth, D., Watts, A., Saad, A. F., Mitchell, G. R., Farmer, M., & Harris, P. J. (2009). The track nanotechnology. *Radiation Measurements*, 44(9), 1109-1113.

17. Unsain, N., Higgins, J. M., Parker, K. N., Johnstone, A. D., & Barker, P. A. (2013). XIAP regulates caspase activity in degenerating axons. *Cell reports*, 4(4), 751-763.

18. Alem, H., Duwez, A. S., Lussis, P., Lipnik, P., Jonas, A. M., & Demoustier-Champagne, S. (2008). Microstructure and thermo-responsive behavior of poly (N-isopropylacrylamide) brushes grafted in nanopores of track-etched membranes. *Journal of Membrane Science*, 308(1), 75-86.

19. Friebe, A., & Ulbricht, M. (2007). Controlled pore functionalization of poly (ethylene terephthalate) track-etched membranes via surface-initiated atom transfer radical polymerization. *Langmuir*, 23(20), 10316-10322.
20. Smuleac, V., Butterfield, D. A., & Bhattacharyya, D. (2004). Permeability and separation characteristics of polypeptide-functionalized polycarbonate track-etched membranes. *Chemistry of materials*, 16(14), 2762-2771.
21. Korolkov, I. V., Mashentseva, A. A., Güven, O., Zdorovets, M. V., & Taltenov, A. A. (2015). Enhancing hydrophilicity and water permeability of PET track-etched membranes by advanced oxidation process. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 365, 651-655.
22. Korolkov, I. V., Mashentseva, A. A., Güven, O., & Taltenov, A. A. (2015). UV-induced graft polymerization of acrylic acid in the sub-micronchannels of oxidized PET track-etched membrane. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 365, 419-423.
23. Mazzei, R., Smolko, E., Tadey, D., & Gizzi, L. (2000). Radiation grafting of NIPAAm on PVDF nuclear track membranes. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 170(3), 419-426.
24. Mazzei, R., Bermúdez, G. G., Chappa, V. C., del Grosso, M. F., & Fernandez, A. (2006). Grafting on nuclear tracks using the active sites that remain after the etching process. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 251(1), 99-103.
25. Barsbay, M., Güven, O., Bessbousse, H., Wade, T. L., Beuneu, F., & Clochard, M. C. (2013). Nanopore size tuning of polymeric membranes using the RAFT-mediated radical polymerization. *Journal of Membrane Science*, 445, 135-145.

26. Carbajal, M. L., Espinoza, S. L. S., Valdez, S. N., Poskus, E., Smolko, E. E., & Grasselli, M. (2009). Arsenical grafted membranes for immobilization of thioredoxin-like proteins. *Reactive and Functional Polymers*, 69(11), 816-820.
27. Seymour, R. B., & Carraher, C. E. (1995). *Introducción a la química de los polímeros*. Reverté.



**PREPARACIÓN DE NANOCONDUCTOS IONICOS SOBRE  
MEMBRANAS *TRACK-ETCHED* DE PET**

**CAPÍTULO IV**



## 4. Introducción

Dado que el diámetro de los nanoporos de una membrana tipo *track-etched* puede ser tan pequeño como unas décimas de nanómetro, las propiedades de la pared de los mismos tendrá una enorme influencia en el transporte a través de ellos. En este Capítulo se describen potenciales aplicaciones de membranas que poseen diferentes ligandos químicos inmovilizados en los nanoporos. Se describe la química aplicada para su modificación, la metodología experimental y técnicas utilizadas en la caracterización para demostrar la presencia de las modificaciones.

### 4.1. Funcionalización de membranas: Generalidades

En la actualidad se están estudiando aplicaciones de membranas *track-etched* funcionalizadas en tres grandes áreas: (i) procesos separativos; (ii) materiales adsorptivos y (iii) desarrollo de sensores. Las tres aplicaciones comparten las características de tener poros del tamaño sub-micrométrico y la pared de los mismos modificados para cumplir con diferentes funciones [1]. A continuación se describirán con detalle las tres áreas mencionadas.

Dentro de la primer área se utilizan funcionalizaciones simples en base a compuestos orgánicos de bajo PM, que producen cambios en la permeabilidad de los conductos [2]. Este tipo de efecto se puede producir primeramente mediante cambios de la carga electrostática (y/o densidad de carga), es decir cambiando las propiedades electroquímicas de los conductos. La presencia de carga le conferirá a la membrana propiedades de permeabilidad selectiva, restricción o inhibición frente a diferentes especies iónicas, tendiendo a excluir los co-iones (iones de carga similar a la del conducto). Asimismo dentro de este primer grupo hay principalmente dos estrategias de funcionalización: la inmovilización de aminoácidos mediante uniones covalentes por reacción química directa de los grupos carboxilos presentes en los conductos de PET y PC [3], y la

funcionalización vía injerto de polímeros, por ejemplo a través de injerto de pGMA para generar cargas negativas a través del acoplamiento de grupos sulfónicos [4], o carga positiva por adición de aminas [5], entre otros. Aunque también se puede restringir la permeabilidad de los conductos a través de la polimerización por injerto de polímeros termorreversibles, como el poli(N-isopropil-acrilamida) (pNIPAAm). Membranas *track etched* de PET modificadas con este polímero no presentan transporte a temperaturas menores a 31°C, debido a que el pNIPAAm se encuentra hidratado. A temperaturas mayores libera el agua retenida, abriendo el conducto y permitiendo el transporte [6,7]. Por último, otras modificaciones involucran la inmovilización de moléculas a través del recubrimiento con oro y la absorción química de tioles [8], esta modificación cambia las propiedades eléctricas del conducto, como se observó al estudiar el transporte de Lisozima y Albumina bovina en membranas PC modificadas por esta técnica [9].

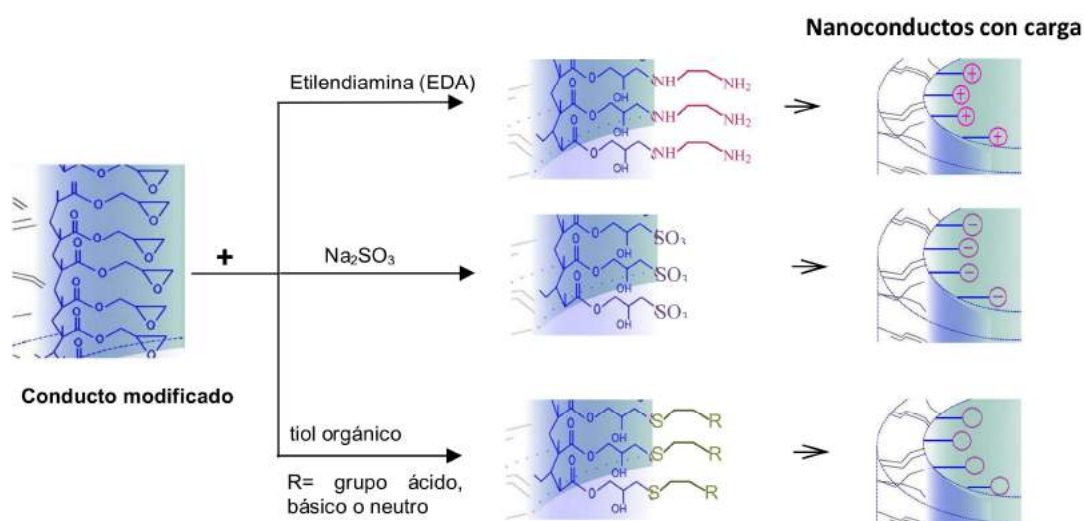
La membranas de tipo adsorptivas involucran la funcionalización con moléculas más complejas, como ligandos de afinidad, péptidos, anticuerpos, antígenos y proteínas [10,11], con el fin de adquirir una afinidad por una molécula específica. Una de las ventajas del uso de membranas como sistemas adsorbentes, respecto de los sistemas particulados tradicionales, es la rápida separación y bajo volumen de buffer necesario para lograr la separación de biomoléculas.

Por último se encuentra la generación de nuevos sensores. Abarca la funcionalización con ligandos químicos especiales que respondan a algún fenómeno físico-químico, como por ejemplo cambios de temperatura, pH o presencia de un analito específico [12-15]. Esta aplicación es la más novedosa, encontrándose actualmente en pleno desarrollo. Uno de los primeros sensores desarrollados sobre membranas fue la modificación por injerto con polímeros que responden a la temperatura [11]. Otra aplicación corresponde a membranas sensoras de glucosa, a través de la inmovilización por activación química de la enzima glucosa oxidasa sobre los conductos de membranas PET [16] o bien la producción de una membrana biosensora amperométrica de glucosa, sobre nanoporos modificados por electrodeposición, para formar nanotubos orgánicos



conductores sobre los cuales se inmoviliza la enzima glucosa oxidasa [17]. También se desarrollaron sensores ópticos, mediante la inmovilización de un agente químico que cambia sus propiedades ópticas; el sistema se basa en la inmovilización de N,N-difenilbenzidina, en el interior de los conductos de membranas PET, que cambia de adsorbancia dependiendo del potencial redox [18].

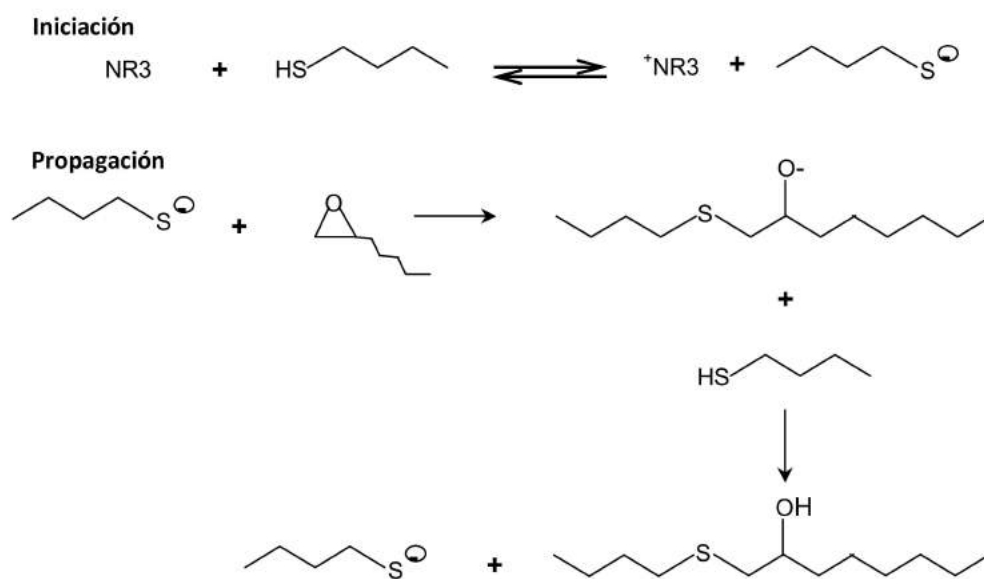
En el presente Capítulo se estudia la funcionalización de los nanoconductos con ligandos de bajo PM. La reacción química de derivatización utilizada fue la apertura del anillo epoxi (presentes en el injerto de pGMA de las membranas modificadas) con nucleófilos. A continuación se esquematizan los ligandos utilizados en la derivatización del epóxido, ver Fig. 4.1 [19,20].



**Fig.4.1.** Esquema de las reacciones de derivatización del epóxido con nucleófilos.

De los ejemplos mencionados, se utilizó la reacción química entre el grupo epóxido y el grupo tiol, para generar un enlace covalente tioéter entre el pGMA y diferentes ligandos. Esta reacción es muy similar a las reacciones denominadas "Click". Este tipo de química fue descrita por Sharpless, *et al* [21] para generar moléculas complejas mediante reacciones sencillas y termodinámicamente favorables, donde generalmente se involucran uniones entre átomos de carbono y heteroátomos [22].

El mecanismo de la reacción epoxi-tiol se basa en la adición catalizada a través de un ataque nucleofílico ( $S_N2$ ) del anión tiolato. Esto sucede en presencia de una base (puede ser el mismo buffer de la reacción) que deprotona al tiol y lo transforma en anión tiolato. El mismo actúa como un nucleófilo atacando al anillo del grupo epóxido para formar un alcóxido, que forma un nuevo anión tiolato mediante un equilibrio acido-base (Fig. 4.2) [23,24].



**Fig.4.2.** Esquema del mecanismo de reacción epóxi-tiol catalizada por una amina.

La oxidación de los tioles y posible formación de disulfuros se evita con agentes reductores como el ditiotreitol (DTT), 2-mercaptoetanol, o Tris-2-carboxietilfosfina (TCEP) o manteniendo la mezcla de reacción libre de oxígeno.

## 4.2. Funcionalización de Membranas PET

### 4.2.1. Materiales y Métodos

#### Materiales

Se utilizó la membrana SS131 proveniente del film PET<sub>1</sub> (ver tabla 1.4). La misma fue preparada con GQ a NaOH 2 N, 60°C, C/UV y 10 min y modificación por **PIVRR** (GMA10%, 60°C, 2,5 h y un tp-GQ menor a 30 min).

### **Metodología**

Las reacciones de derivatización química se realizaron con secciones de membrana de 0,7 cm x 3 cm, en tubos tipo *Eppendorf* de 2 ml.

#### ***Funcionalización con Cisteamina***

La reacción de derivatización con cisteamina se realizó de acuerdo al protocolo descrito en el Cap. III.

#### ***Funcionalización con $\beta$ -mercaptoetanol***

La reacción se realizó usando la misma concentración molar que la cisteamina y agente reductor (TCEP) en igual concentración molar que el reactivo. El procedimiento de reacción empleado se describe a continuación:

- I. Preparado de una solución de  $\beta$ -mercaptoetanol, de 88  $\mu$ moles/ml (7mg/ml), en BT (se ajustó el pH a 7,5 con sc de NaOH) y TCEP (126mg/ml) en relación 1 $\mu$ l TCEP/ ml de solución de  $\beta$ -mercaptoetanol.
- II. Incubación O.N. de la muestra en 2 ml de solución de  $\beta$ -mercaptoetanol en agitación constante.
- III. Lavado de la muestra con BT (3 lavados con 10 ml de BT).
- IV. Secado de la membrana con papel adsorbente.

#### ***Funcionalización con Ac. Tioglicólico***

El procedimiento se realizó de manera equivalente a la reacción anterior, pero con una solución de Ac. tioglicólico de 8 mg/ml.

## 4.2. Técnicas de caracterización de membranas

Se estudiaron membranas modificadas por injerto *PIVRR* con GMA y con la derivatización con diferentes ligandos.

Una caracterización funcional de las modificaciones se realizó mediante la técnica de CTM. La misma fue descrita en detalle en el Cap. II, pero con las siguientes modificaciones. Las membranas fueron pre-acondicionadas en una solución 0,1 y 1E-05 M de KCl. La celda aceptora se llenó con 10µl de agua desionizada (H<sub>2</sub>O MiliQ), mientras que la celda dadora, con 20 µl de solución de Fluoresceína 2,5 µM en H<sub>2</sub>O MiliQ, pH 5,5.

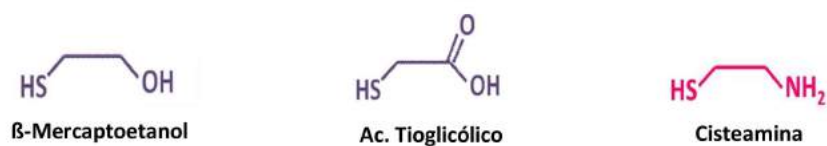
El estudio por EIS también se realizó como se describió en el Cap.II, considerando las preincubaciones de las membranas como se describe arriba.

## 4.3. Resultados y discusión

Los nanoconductos de membranas pueden ser además funcionalizados a través de diferentes reacciones químicas y reactivos para conferirles nuevas propiedades fisicoquímicas [25,29]. La mayoría de los trabajos publicados corresponden a la funcionalización química tradicional de polímeros, mediante procedimientos de química húmeda. Por ejemplo, en membranas de poros perfectos de PC o PET las paredes internas de estas contienen grupos carboxílicos, que provienen de la degradación química por el GQ sobre la traza; los mismos pueden ser modificados selectivamente mediante reacciones químicas clásicas [30-32]. Sin embargo, se requieren de reactivos químicos específicos, varios pasos de reacción y generación de una gran cantidad de subproductos.

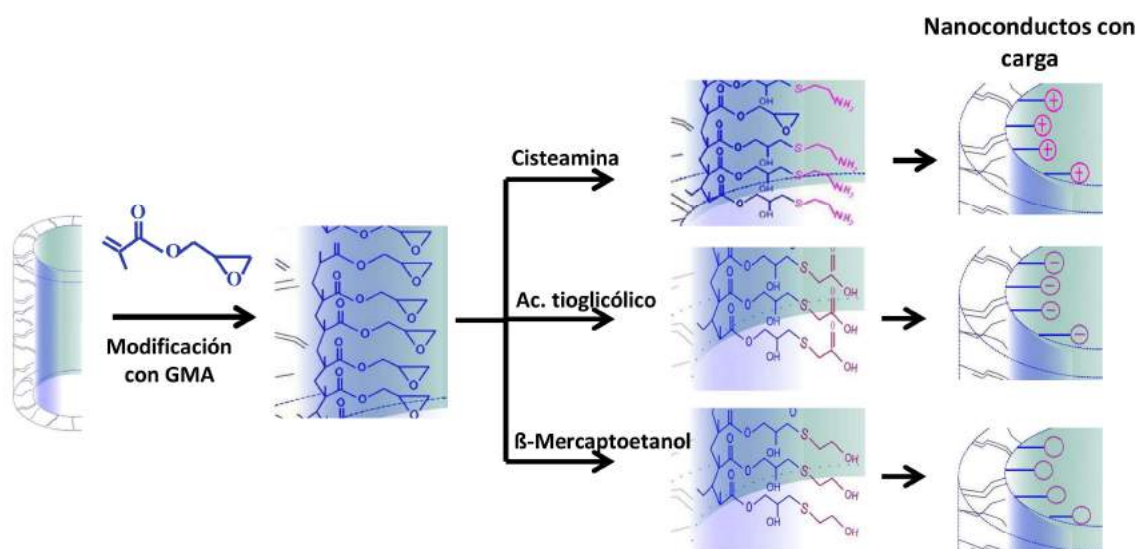
En el Cap. III se describió una nueva técnica de derivatización de membrana PET, que permitió obtener un nanoinjerto de gran homogeneidad de recubrimiento. Este logro permitió evaluar otras modificaciones, que fueron estudiadas por técnicas de transporte como CMT y EIS.

Para evitar la degradación de las modificaciones obtenidas por *PIVRR*, por efectos de altas temperaturas de reacción o condiciones muy drásticas de pH, se estudiaron reacciones de inmovilización tipo “Click”. Dado la presencia de una gran cantidad de grupos epoxi en el polímero injertado pGMA, se realizó la reacción epoxi-tiol con tres ligandos bifuncionales que contienen, además de un grupo tiol, otro grupo funcional libre (OH-, NH<sub>2</sub> e COOH), como se muestra en la Fig 4.3.



**Fig. 4.3.** Estructura de los tres ligandos utilizados.

La membrana SS131 posee un diámetro de 153 +/- 6 nm (sin modificar) y de 153 +/- 5 nm (*PIVRR* con GMA), según datos determinados por FESEM. En la Fig. 4.4 se esquematizan las funcionalizaciones realizadas sobre los nanoconductos.



**Fig. 4.4.** Esquema representativo de la funcionalización de los nanoconductos (membrana SS131) modificados previamente con pGMA.

El esquema de la Fig 4.4 representa las cargas adquiridas en la condición de pH de trabajo (pH 5,5 en H<sub>2</sub>O MiliQ).

La caracterización de estas membranas se realizó estudiando el comportamiento del transporte. Las técnicas empleadas fueron CTM y EIS según se describen en el Cap. II.

Los fenómenos físicos que ocurren en fluidos a través de nanoestructuras son completamente diferentes a los que ocurren en macrofluidos y microfluidos. Esto es debido a la gran relación entre el área y volumen (mayor a los  $10^9 \text{ m}^{-1}$ ) de estos materiales. En membranas nanoporosas el transporte de masa se ve afectado por la naturaleza química de las paredes del nanoconducto y por la densidad de carga que poseen [33]. Una superficie con carga electrostática, en contacto con agua forma una doble capa eléctrica (*EDL*, en inglés) con un cierto ordenamiento. La misma está conformada principalmente por los iones presentes en el medio y con el fin de neutralizar la carga superficial. El espesor de dicha capa ( $\lambda_D$  o  $1/k$ ) se denomina longitud de *Debye* y su dimensión depende de la carga potencial de la superficie y de la naturaleza de los electrolitos presentes en el medio acuoso. Por ejemplo, al aumentar la concentración del electrolito el espesor de la doble capa disminuye. El mismo puede determinarse a través de la Ec. 4.1.

$$\lambda_D = 1/k \quad \kappa = \left( \frac{e^2 \sum_i n_i^\infty z_i^2}{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T} \right)^{1/2} \quad (4.1)$$

Donde:  $\epsilon_r$ = permisividad eléctrica;  $\epsilon_0$ = permisividad eléctrica del vacío

K= constante de Boltzman

T= temperatura absoluta

n= concentración molar del electrolito

Z= Carga del ión

e= carga eléctrica de un electrón

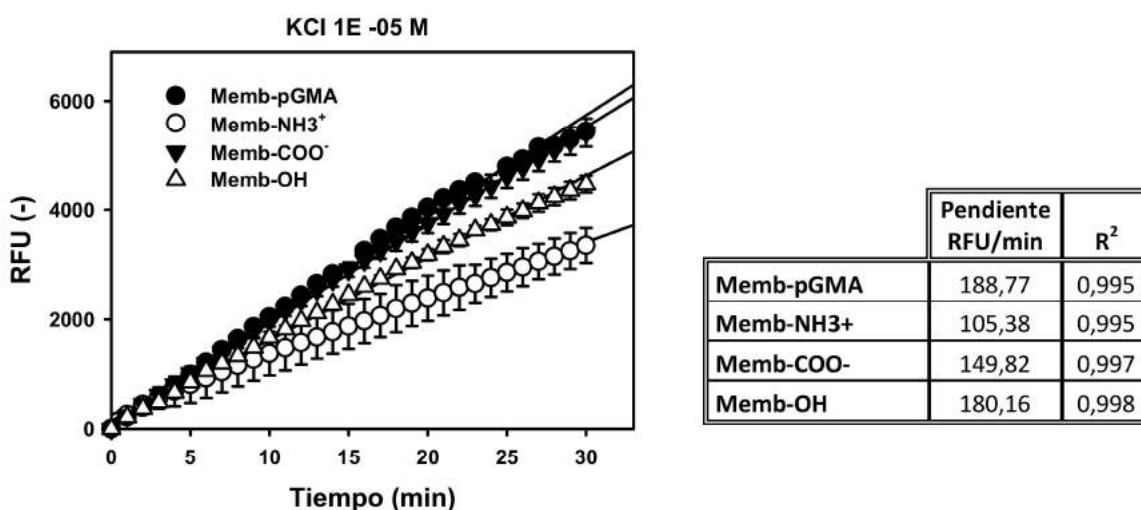
El transporte a través de los nanoconductos se verá afectado cuando el espesor de la doble capa es comparable a las dimensiones de este. En estas

condiciones, el flujo de contra-iones (respecto de la carga del nanoconductor) es preponderante.

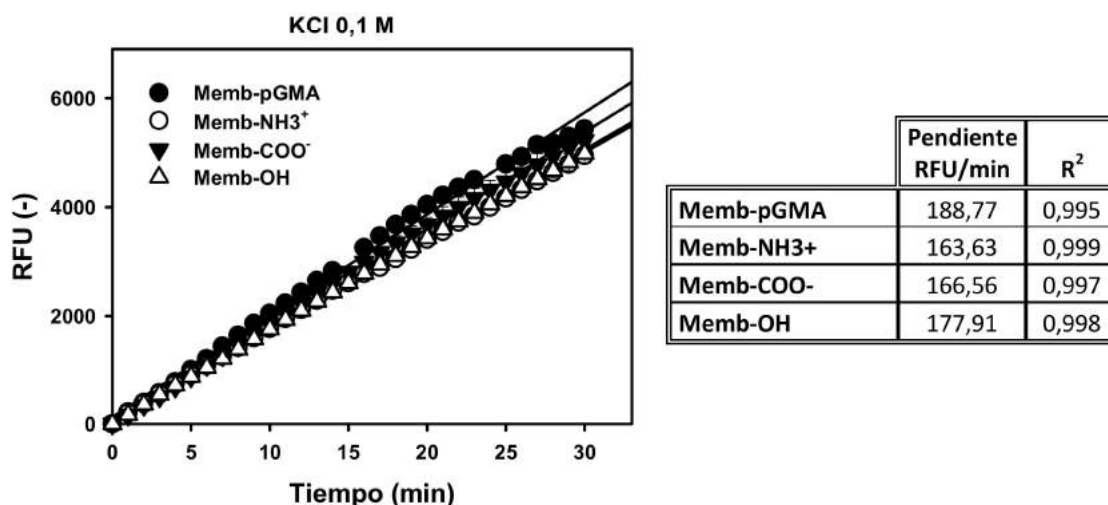
Como puede deducirse de la ecuación anterior es posible controlar el espesor de la EDL ajustando la fuerza iónica del medio [33-35]. Para ello, se pre-trataron las membranas con dos concentraciones diferentes de electrolito O.N. con el objeto de lograr una EDL estabilizada. Las medidas de transporte se realizaron en agua desionizada para no afectar la EDL formada durante el pre-acondicionamiento.

#### 4.3.1. Análisis por CTM

Los resultados del estudio de CTM se presentan a través de la curva de transporte, para las dos condiciones de EDL generadas sobre las membranas. Cada punto experimental corresponde al promedio de las mediciones con su correspondiente desvío estándar. Junto al gráfico se encuentran las pendientes correspondientes a la regresión lineal de cada una de las curvas (ver Fig. 4.5 y 4.6 y Tabla insertada).



**Fig. 4.5.** Gráfico de CTM de fluoresceína a través de membranas funcionalizadas (pre-acondicionada en KCl 1E-05 M) y de la membrana pGMA (blanco) (pre-acondicionada en H<sub>2</sub>O MilliQ).



**Fig. 4.6.** Gráficos de CTM de fluoresceína a través de membranas funcionalizadas (pre-acondicionada en KCl 0,1 M) y de la membrana blanco (pre-acondicionada en H<sub>2</sub>O MiliQ).

Las pendientes obtenidas para las diferentes membranas se presentan en Tabla junto a los gráficos (ver Fig. 4.5 y Fig. 4.6). En la Tabla 4.1 se muestra la variación de pendiente ( $\Delta$  slope) y el porcentaje de variación de las membranas funcionalizadas respecto del blanco, correspondiente a las concentraciones de KCl evaluadas.

**Tabla 4.1.** Variación de pendiente entre la membrana (blanco) y las funcionalizadas, para ambas condiciones de pre-acondicionamiento, con KCl 1 E-05 y 0,1 M.

KCl 1E-05 M	$\Delta$ slope	% variación	KCl 0,1 M	$\Delta$ slope	% variación
Memb-NH3+	83	44	Memb-NH3+	25	13
Memb-COO-	39	21	Memb-COO-	22	12
Memb-OH	9	4,5	Memb-OH	11	6

En el gráfico de la Fig. 4.5 y en la Tabla 4.1 puede observarse la variación de pendiente de las distintas funcionalizaciones, respecto al blanco. La curva de mayor pendiente corresponde; a la membrana neutra (con  $\beta$ -mercaptoetanol), de similar valor que la membrana blanco (pGMA y sin



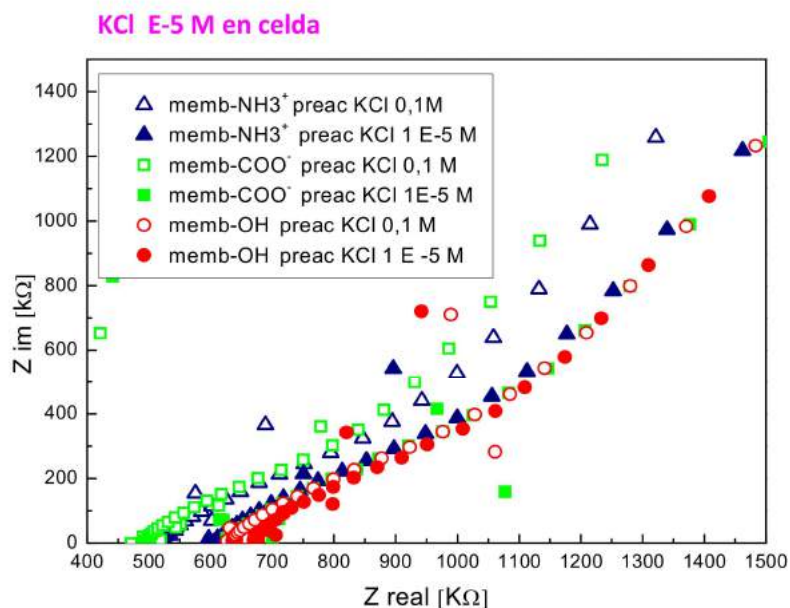
funcionalizar). Mientras que las membranas que poseen cisteamina y Ac. tioglicólico dieron una menor cinética de transporte. Estos resultados indicarían la presencia de carga sobre el conducto (positiva (+), negativa (-) y neutra (0)). La gran diferencia entre las pendientes de las membranas cargadas (+) y (-) se puede atribuir a la presencia de una *EDL* ( $\lambda$ ) inducido por la presencia del electrolito en la solución de pre-incubación (KCl 1E-05 M). A esta concentración el  $\lambda$  calculado es de 90 nm [35], que reduce el diámetro efectivo del nanoconducto y en consecuencia afecta al transporte de masa del analito. La Fluoresceína, además es un ácido débil con un  $pK_a= 6,4$ , por lo cual al pH de trabajo no adquiere carga. Mientras que el transporte en las membranas de carga neutra ( $\beta$ -mercaptoetanol y la membrana blanco) se comporta de manera similar por a la ausencia de doble capa, por lo tanto no hay reducción del diámetro efectivo.

En el gráfico de la Fig. 4.6 y tabla 4.1 se observan curvas de transporte semejantes, las membranas funcionalizadas y la membrana blanco poseen similar tendencia lineal. Esto se debe a que fueron pre-acondicionadas en 0,1 M de KCl y la membrana blanco en H<sub>2</sub>O (MiliQ), en estas condiciones las membranas con carga electrostática pueden adquirir un  $\lambda$  en el orden de 1 nm y 0,3 nm respectivamente. Para estas concentraciones de electrolito el EDL es despreciable, no se modifica el diámetro efectivo del nanoconducto.

Además, a mayor concentración del electrólito se anulan más eficientemente las cargas superficiales y el efecto de repulsión. En consecuencia, el transporte no se verá afectado en gran medida. Este efecto también se observó en los ensayos de CTM realizados en BP (1), en el Cap. II y III; donde la concentración y naturaleza del electrolito usado permitieron despreciar el EDL y su efecto.

#### **4.3.2. Análisis por EIS**

Por último, se realizó el estudio de EIS sobre las membranas funcionalizadas. Las condiciones experimentales fueron las mismas que se detallaron en el Cap. II. Los gráficos complejos de impedancia alcanzados por estos sistemas se muestran en la Fig. 4.7.



**Fig. 4.7.** Gráfico de Nyquist correspondiente a las mediciones de EIS de membranas funcionalizadas, pre-acondicionada con KCl 0,1 M y 1 E-5 M. Memb-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> (triángulo vacío  $\triangle$ ), mem-COO<sup>-</sup> (cuadrado vacío  $\square$ ) y memb-OH (círculo vacío  $\circ$ ) pre-acondicionadas en KCl 0.1M. Memb-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> (triángulo azul  $\blacktriangle$ ), mem-COO<sup>-</sup> (cuadrado verde  $\blacksquare$ ) y memb-OH (círculo rojo  $\bullet$ ) pre-acondicionadas en KCl 1 E-5 M.

Como se puede observar en la Fig. 4.7 existe una diferencia significativa entre el comportamiento resistivo de los sistemas evaluados. La membranas con carga (+) y (-) presentan una resistividad menor cuando son pre-acondicionadas a alta fuerza iónica, mientras que la de carga neutra no se ve afectada, como se observó anteriormente en el análisis de CTM.

Como conclusión general de la utilización de las técnicas EIS y CTM, y de su evaluación en base al efecto del EDL, los resultados indican que el transporte a través de los nanoconductos es un fenómeno complejo. Si bien las técnicas no se correlacionan linealmente con los diámetros de poro ni con la fuerza iónica, las mediciones permitieron inferir el mecanismo de transporte dominante para los distintos casos y distinguir entre diferentes tipos de membranas. A escala nanométrica, los efectos de transporte son más pronunciados debido a que -entre otros factores- el EDL comienza a ser comparable a la sección transversal de los nanoconductos. La longitud de Debye típicamente varía de 1 a 100 nm en soluciones electrolíticas acuosas en función

de la concentración de iones. Para altas concentraciones, en el que la longitud de Debye, es mucho más pequeña que el tamaño del conducto, la concentración de iones dentro de los poros es la misma que el exterior. El apantallamiento provocado por esta atmósfera iónica densa determina que el potencial eléctrico sea cercano a cero en la mayor parte del nanoconducto, lo cual se traduce en menores resistencias al transporte. La densidad de carga debe ser lo suficientemente alta para controlar efectivamente la concentración de los iones y la polaridad en los nanoconductos y, en consecuencia, afectar su conductancia o transporte. Por el contrario, a una concentración de iones baja, el espesor de la EDL se solapa en la sección transversal del poro, con lo que se altera el potencial eléctrico dentro del mismo. Además, los contra-iones se acumulan mientras co-iones son excluidos del conducto resultando en una solución unipolar en el interior. La concentración media se determina por la densidad de carga superficial,  $\sigma_s$ . El efecto electrostático influye en todo conducto que tenga diámetro cercano a la longitud de Debye. Si la superficie está cargada negativamente, el nanoconducto será rico en cationes. Por el contrario, superficie cargada positivamente producirá la acumulación de aniones en el interior del canal. Tales efectos no se observan en poros de dimensiones en el rango de los micrones debido a su menor relación superficie-volumen.

En consecuencia, el efecto de la carga de la superficie, de la composición iónica y del transporte en nanoconductos conduce a diversos fenómenos únicos que no se pueden conseguir a otras escalas y que pueden ser explotados con el fin de lograr caracterizar materiales con poros nanométricos.

**Referencias:**

1. Ulbricht, M. (2006). Advanced functional polymer membranes. *Polymer*, 47(7), 2217-2262.
2. Kawai, T., Saito, K., & Lee, W. (2003). Protein binding to polymer brush based on ion-exchange, hydrophobic, and affinity interactions. *Journal of Chromatography B*, 790(1), 131-142.
3. Marchand-Brynaert, J., Deldime, M., Dupont, I., Dewez, J. L., & Schneider, Y. J. (1995). Surface functionalization of poly (ethylene terephthalate) film and membrane by controlled wet chemistry: chemical characterization of carboxylated surfaces. *Journal of colloid and interface science*, 173(1), 236-244.
4. Kim, M., & Saito, K. (2000). Radiation-induced graft polymerization and sulfonation of glycidyl methacrylate on to porous hollow-fiber membranes with different pore sizes. *Radiation Physics and Chemistry*, 57(2), 167-172.
5. Sundberf L., & Porath J. (1974) Preparation of adsorbents for bioespecific affinity chromatography. *Journal of Chromatography* 90, 87-89.
6. Reber, N., Küchel, A., Spohr, R., Wolf, A., & Yoshida, M. (2001). Transport properties of thermo-responsive ion track membranes. *Journal of Membrane Science*, 193(1), 49-58.
7. Park, Y. S., Ito, Y., & Imanishi, Y. (1998). Permeation control through porous membranes immobilized with thermosensitive polymer. *Langmuir*, 14(4), 910-914.
8. Martin, C. R., Nishizawa, M., Jirage, K., & Kang, M. (2001). Investigations of the transport properties of gold nanotubule membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(10), 1925-1934.
9. Yu, S., Lee, S. B., Kang, M., & Martin, C. R. (2001). Size-based protein separations in poly (ethylene glycol)-derivatized gold nanotubule membranes. *Nano Letters*, 1(9), 495-498.

10. Butterfield, D. A., Bhattacharyya, D., Daunert, S., & Bachas, L. (2001). Catalytic biofunctional membranes containing site-specifically immobilized enzyme arrays: a review. *Journal of Membrane Science*, 181(1), 29-37.
11. Nasef, M. M., & Hegazy, E. S. A. (2004). Preparation and applications of ion exchange membranes by radiation-induced graft copolymerization of polar monomers onto non-polar films. *Progress in Polymer Science*, 29(6), 499-561.
12. Iwata, H., & Matsuda, T. (1988). Preparation and properties of novel environment-sensitive membranes prepared by graft polymerization onto a porous membrane. *Journal of membrane science*, 38(2), 185-199.
13. Ito, Y., Park, Y. S., & Imanishi, Y. (1997). Visualization of critical pH-controlled gating of a porous membrane grafted with polyelectrolyte brushes. *Journal of the American Chemical Society*, 119(11), 2739-2740.
14. Iwata, H., Oodate, M., Uyama, Y., Amemiya, H., & Ikada, Y. (1991). Preparation of temperature-sensitive membranes by graft polymerization onto a porous membrane. *Journal of membrane science*, 55(1), 119-130.
15. Park, Y. S., Ito, Y., & Imanishi, Y. (1998). Permeation control through porous membranes immobilized with thermosensitive polymer. *Langmuir*, 14(4), 910-914.
16. Fink, D., Klinkovich, I., Bukelman, O., Marks, R. S., Kiv, A., Fuks, D., & Alfonta, L. (2009). Glucose determination using a re-usable enzyme-modified ion track membrane sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(8), 2702-2706.
17. Kros, A., Nolte, R. J., & Sommerdijk, N. A. J. M. (2002). Conducting polymers with confined dimensions: Track-etch membranes for amperometric biosensor applications. *Advanced Materials*, 14(23), 1779-1782.
18. Dybko, A., Wroblewski, W., Maciejewski, J., Brzozka, Z., Romaniuk, R. S., & Kielkiewicz, J. (1996). Polymer track membranes as a trap support for reagent in fiber optic sensors. *Journal of Applied Polymer Science*, 59(4), 719-723.
19. May, C. (Ed.). (1987). *Epoxy resins: chemistry and technology*. CRC press.
20. Ellis, B. (Ed.). (1993). *Chemistry and technology of epoxy resins* (1st ed., pp. 42-43). London: Blackie Academic & Professional.

- 21.** Chan, J. W., Yu, B., Hoyle, C. E., & Lowe, A. B. (2009). The nucleophilic, phosphine-catalyzed thiol–ene click reaction and convergent star synthesis with RAFT-prepared homopolymers. *Polymer*, *50*(14), 3158-3168.
- 22.** Jones, M. W., Mantovani, G., Ryan, S. M., Wang, X., Brayden, D. J., & Haddleton, D. M. (2009). Phosphine-mediated one-pot thiol–ene “click” approach to polymer–protein conjugates. *Chemical Communications*, (35), 5272-5274.
- 23.** Ware, T., Simon, D., Hearon, K., Kang, T. H., Maitland, D. J., & Voit, W. (2013). Thiol-click chemistries for responsive neural interfaces. *Macromolecular bioscience*, *13*(12), 1640-1647.
- 24.** EAF Petrie - 2006 - McGraw-Hill Publishers, USA pp.107-109.
- 25.** Kwon, H. J., Jung, C. H., Hwang, I. T., Choi, J. H., & Nho, Y. C. (2009). Surface Functionalization of Poly (Ethylene Terephthalate) for Biomolecule Immobilization by Ion Implantation. *Journal of Korean Physical Society*, *54*, 2071.
- 26.** Deldime, M., Dewez, J. L., Schneider, Y. J., & Marchand-Brynaert, J. (1995). Reactivity assay of surface carboxyl chain-ends of poly (ethylene terephthalate)(PET) film and track-etched microporous membranes using fluorine labelled-and/or 3 H-labelled derivatization reagents: tandem analysis by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and liquid scintillation counting (LSC). *Applied surface science*, *90*(1), 1-14.
- 27.** Yu, S., Lee, S. B., Kang, M., & Martin, C. R. (2001). Size-based protein separations in poly (ethylene glycol)-derivatized gold nanotubule membranes. *Nano Letters*, *1*(9), 495-498.
- 28.** Kim, M., & Saito, K. (2000). Radiation-induced graft polymerization and sulfonation of glycidyl methacrylate on to porous hollow-fiber membranes with different pore sizes. *Radiation Physics and Chemistry*, *57*(2), 167-172.
- 29.** Cuscito, O., Clochard, M. C., Esnouf, S., Betz, N., & Lairez, D. (2007). Nanoporous  $\beta$ -PVDF membranes with selectively functionalized pores. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, *265*(1), 309-313.

- 30.** Alem, H., Duwez, A. S., Lussis, P., Lipnik, P., Jonas, A. M., & Demoustier-Champagne, S. (2008). Microstructure and thermo-responsive behavior of poly (N-isopropylacrylamide) brushes grafted in nanopores of track-etched membranes. *Journal of Membrane Science*, 308(1), 75-86.
- 31.** Friebe, A., & Ulbricht, M. (2007). Controlled pore functionalization of poly (ethylene terephthalate) track-etched membranes via surface-initiated atom transfer radical polymerization. *Langmuir*, 23(20), 10316-10322.
- 32.** Smuleac, V., Butterfield, D. A., & Bhattacharyya, D. (2004). Permeability and separation characteristics of polypeptide-functionalized polycarbonate track-etched membranes. *Chemistry of materials*, 16(14), 2762-2771.
- 33.** Prakash, S., Piruska, A., Gatimu, E. N., Bohn, P. W., Sweedler, J. V., & Shannon, M. A. (2008). Nanofluidics: systems and applications. *Sensors Journal, IEEE*, 8(5), 441-450.
- 34.** Eijkel, J. C., & Van Den Berg, A. (2005). Nanofluidics: what is it and what can we expect from it? *Microfluidics and Nanofluidics*, 1(3), 249-267.
- 35.** Schoch R.B., Han J., & Renaud P. (2008) Transport phenomena in nanofluidics. *Review of Modern Physics* (80), 839-883.





**INMOBILIZACION DE PROTEINAS EN NANOCONDUCTOS  
DE MEMBRANAS *TRACK-ETCHED* DE PET**

**CAPÍTULO V**



## 5. Introducción

La generación de nuevos sensores basados en membrana *track etched* involucra la modificación de los nanoporos con diferentes moléculas químicas complejas y/o proteínas. Los resultados obtenidos en el Cap. IV permitieron avanzar en la preparación de *Sistemas biohíbridos de polímero y proteína (SBP&P)*, usando técnicas de inmovilización de macromoléculas. La caracterización de los sistemas preparados se realizó estudiando la funcionalidad de los mismos.

En este Capítulo se describen generalidades del sistema polímero-proteína, técnicas de inmovilización y los resultados experimentales obtenidos en la obtención de estos sistemas biohíbridos.

### 5.1. Inmovilización de proteínas sobre los nanoconductos

En los últimos años las membranas poliméricas han tenido un especial interés como soporte para la inmovilización específica de biomoléculas, debido a la alta área específica y gran accesibilidad al sitio de interacción, parámetros de importancia para optimizar la capacidad de unión. En el caso de las membranas de poros perfectos estos parámetros se puede optimizar controlando el diámetro de los poros, la estructura y superficie de funcionalización.

El interés en estos sistemas se centra en la inmovilización de macromoléculas como DNA y proteínas, para aplicaciones en el área de la Medicina y Biotecnología. Aunque también se aplican para inmovilizar partículas virales [1,2], y enzimas para sistemas catalíticos, como por ejemplo, la inmovilización de glucosil transferasas o fructosil transferasas en membranas PET [3,4], y de lipasa y lacasa sobre membranas de PVDF [5].

La inmovilización de proteínas se realiza en general según dos metodologías principales: (i) a través de una unión covalente y (ii) no covalente. Independientemente del método de inmovilización, la misma busca incrementar la

estabilidad de la macromolécula, su recuperación, reutilización y posibilidad de almacenamiento, respecto de la proteína nativa en solución [6].

En la inmovilización covalente se requiere la presencia de un sitio de unión sobre la membrana propios, como ocurre en membranas PET y PC, o bien ser introducidos, mediante diferentes técnicas de modificación (ver Cap.III). Como ejemplo de este tipo de inmovilización, se puede citar la inmovilización de lacasa sobre membranas PP [7], alfa amilasa sobre membrana Nylon [8] y lipasa sobre membranas PE [9].

En la inmovilización no covalente la unión puede ser de tipo hidrofóbica, hidrófila o por interacción electrostática entre la membrana y la proteína. La adsorción mediante fuerzas de Van der Waals es el mecanismo más simple de unión no covalente. Si bien este tipo de uniones son de sencilla preparación, al ser uniones débiles puede producirse la liberación de la proteína del sistema [10]. Algunos ejemplos de estos sistemas son la  $\beta$ -galactosidasa sobre membranas de intercambio iónico [11], peroxidasa sobre membranas PP [12] y lipasa sobre membranas de PSF [13].

## 5.2. Preparación de sistemas biohíbridos

### 5.2.1. Materiales y Métodos

#### Materiales

Se utilizaron membranas provenientes del films PET<sub>1</sub> para inmovilizar GFP y GFP-Cis1, y de PET<sub>4</sub> para la enzima  $\beta$ -Lactamasa. Los datos de irradiación de los Films PET usados se encuentran en la Tabla 1.4.

Las membranas se prepararon con GQ de NaOH 2 M o NaOH 3 M, C/UV, 10 min y 60°C (PET<sub>1</sub>), denominadas SS144 y SS145, y NaOH 2 M, C/UV, 25 min y 60°C (PET<sub>4</sub>), denominada SS192. Mientras que la reacción de **PIVRR** se realizó en ambos casos con GMA 10%, 60 °C, 2,5 h y un tp-GQ menor a 30 min

(denominadas en adelante Memb-pGMA). La reacción de cisteamina se realizó según se describe en el Cap. III.

## Metodología

### 5.2.2. Obtención de proteínas recombinantes

La GFP y GFP-Cis1 fueron obtenidas a partir de la expresión de cepas *E. coli* BL-21 (DE) conteniendo el plásmido de expresión pET-28a(+) con el gen de GFP con un *tag* de 6 histidinas en el N-terminal (GFP) y con el gen de GFP más el *tag* His-Cys-His-Ser-His-Ser (GFP-Cis1). Ambas cepas transformadas fueron crecidas en agar LB (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l y glucosa 2 g/l) con ampicilina 100 µg/ml a 37 °C O.N. Posteriormente se inoculó una colonia de cada cepa, por separado, en 200 ml de medio LB y 20µl de ampicilina (100 mg/ml) y dejó crecer a 37 °C, 200 rpm O.N. Este cultivo fue usado como preinóculo para la producción de las proteínas GFP y GFP-Cis1. Las mismas se produjeron en el biorreactor de 5 L BioFlow III (New Brunswick), con 3 L de medio Reisemberg [14]. La purificación de las proteínas expresadas se realizó como describe Kikot P. *et al* [15].

La enzima β-Lactamasa fue generosamente donada por el Dr. Ermacora de la Universidad Nacional de Quilmes.

Las reacciones de inmovilización de GFP se realizaron en tubos tipo *Eppendorf* de 2 ml, utilizando muestras de membranas de secciones rectangulares de membrana modificada de 0,7 x 3 cm y para β-Lactamasa en secciones circulares de 0,5 cm de diámetro.

Se utilizó la relación RFU/masa para GFP, descrita en el Cap. II (19629 RFU = 1,16E-13 moles GFP) y para GFP-Cis1 se utilizó una relación de 15284 RFU = 1,58E-13 moles GFP-Cis1. La relación se obtuvo mediante la determinación de la concentración de proteína por Bradford y fluorescencia con el

[145]

Nanodrop 3300, datos no mostrados, (considerando el volumen teórico de medida del Nanodrop de 126 nl).

### **5.2.3. Inmovilización Monopuntual de GFP-Cis1**

- I. Preparación de una solución stock GFP-Cis1 de 1 mg/ml en BP (1). Se adiciona DTT 1M BP (1), en relación 10  $\mu$ l DTT/ml de solución de proteína., y se la deja 1 h.
- II. Acondicionamiento de la solución stock de proteína. La mezcla GFP-Cis1 + DTT se pasa por una columna PD-10, de columna de desalado, equilibrada con BT.
- III. Preparación de la solución de GFP-Cis1, de 5 y 10  $\mu$ g/ml en B. Tris 50 mM, pH 7,5 (BT), por dilución de la solución stock de proteína acondicionada.
- IV. Incubación de la Memb-pGMA en 2 ml de la solución de GFP-Cis1 en agitación constante y  $T_{amb.}$  por 4 h.
- V. Lavado alternado de las muestras con 10 ml de BT, H<sub>2</sub>O (d) y BP (1).
- VI. Almacenamiento en BP (1) a 8°C.

### **5.2.4. Inmovilización Multipuntual, por pre-activación con Glutaraldehído**

- I. Preparación de soluciones de glutaraldehído de 0,25 y 2,5 % (Stock 50%) en BP 200 mM, pH 7 (BP (2)).
- II. Incubación O.N. de la membrana funcionalizada (Memb-cisteamina) de sección 0,7 x 3 cm en 2 ml de las soluciones de glutaraldehído con agitación constante.
- III. Lavado alternado de las muestras con 10 ml de BP (2), H<sub>2</sub>O (d) y BP (1)
- IV. Almacenamiento en BP (1) a  $T_{amb.}$   
Membrana denominada Memb-Gluta.

### **Inmovilización Multipuntual de GFP y $\beta$ -Lactamasa**

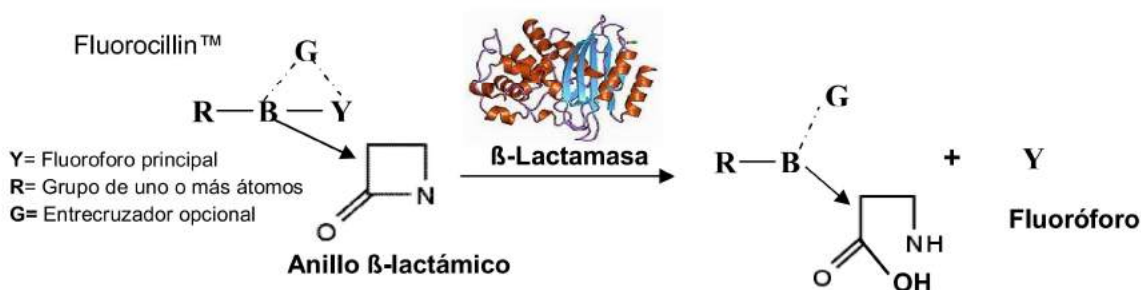
- I. Preparación de una solución de proteína de 50 µg/ml en BP (1).
- II. Incubación de la Memb-Gluta en 2 ml de la solución de la proteína, con agitación constante a temperatura ambiente, O.N.
- III. Lavado alternado de la muestras con 10 ml de BP (1), de B.P (2), de H<sub>2</sub>O (d) y nuevamente BP (1).
- IV. Almacenamiento en BP (1) a 8°C.

### 5.3. Caracterización de los sistemas biohíbridos

La caracterización de los sistemas se realizó mediante técnicas que permitan detectar la actividad o fluorescencia de la proteína inmovilizada.

Los sistemas Memb-GFP se caracterizaron mediante fluorescencia directa sobre las membranas, usando el Nanodrop 3300 como se describe en el Cap. II. Las medidas fueron realizadas por quintuplicado, los valores de las muestras fueron corregidos por el valor del blanco (correspondiente a la membrana sin pGMA incubada en GFP o GFP-Cis1), convertidos a moles de proteína, usando la relación mencionada en M y M. Los valores fueron promediados y graficados con su correspondiente +/- SD.

Los sistemas Memb-β-Lact. se caracterizaron mediante la cuantificación de un producto fluorescente generado por la actividad hidrolítica de la enzima β-Lactamasa, sobre el sustrato comercial Fluorocillin™ (Fig. 5.1). El mismo produce un producto soluble y fluorescente con un máximo de emisión en 525 nm.



**Fig.5.1.** Esquema de la acción hidrolítica de la β-Lactamasa sobre el Fluorocillin™.

El sustrato comercial Fluorocillin™ se utilizó en una concentración de 10 µg/ml (stock de 250 µg/ml en DMF) y volumen de reacción de 100 µl en BP salino (30 Mm pH 7 + 0,15 M NaCl). La actividad enzimática se siguió mediante la cinética de hidrólisis del mismo en un rango de tiempo de 1 h, las mediciones se realizaron en intervalos de 5 minutos, en la longitud de emisión máxima (525 nm).

Se realizaron ensayos de estabilidad de almacenamiento.

## **5.4. Resultados y discusión**

El PET es un polímero que además de poseer una elevada resistencia frente a agentes químicos, tiene una gran transparencia y menores costos de fabricación. Es un material biocompatible, hemocompatible y antimicrobiano, por lo cual, es empleado en diversas aplicaciones biológicas. No obstante, para lograr la inmovilización específica de biomoléculas se necesita modificar y funcionalizar la superficie y tales procesos pueden influir sobre propiedades como la biocompatibilidad y funcionalidad [16-20].

En este Cap. se usó la inmovilización covalente de tipo monopuntual y multipuntual, para inmovilizar GFP y β-Lactamasa, sobre Memb-pGMA preparadas en los Cap. precedentes. Se seleccionó la inmovilización covalente, de tipo puntual que utiliza la reacción epoxi (del pGMA) y tiol (de la proteína) y la inmovilización multipuntual con glutaraldehído. Esta última es una de las técnicas más populares para inmovilizar proteínas y enzimas [21-25].

### **5.4.1. Inmovilización monopuntual**

Se utilizó la membrana SS145 modificada (SS145-pGMA), de diámetro de poro de 226 +/-25 nm. La inmovilización se realizó como se describió en M y M utilizando GFP-Cis1. La fluorimetría de las muestras se realizó por quintuplicado y corregidas por el blanco negativo (membrana sin pGMA expuesta a la reacción de inmovilización). Los valores promedio +/- SD se presentan en la Tabla 5.1.



**Tabla.5.1.** Determinación fluorométrica de los sistemas Memb-GFP-Cis1, evaluado a dos concentraciones distintas.

GFP-Cis1 Conc. $\mu\text{g/ml}$	RFU GFP-Cis1 inmov.	RFU Blanco	GFP-Cis1 fmoles/ $\text{mm}^2$
5	4692 +/- 354	3630	64 +/- 21
10	6437 +/- 5	6378	3,6 +/- 0,3

Como se observa en la Tabla 5.1 se detecto una mayor cantidad de proteína unida a la menor concentración evaluada. Sin embargo, considerando que la membrana blanco tuvo valores altos de fluorescencia. Se deduce que existe una unión no covalente, de tipo hidrofóbica entre la proteína y la membrana [10].

#### 5.4.2. Inmovilización multipuntual de GFP

La inmovilización de GFP se realizó en las membranas SS144 y SS145 modificadas, de diámetro de poro 130 +/- 23 y 226 +/-25 nm, respectivamente. La caracterización fue realizada de manera similar al sistema anterior. Para realizar esta técnica el soporte debe poseer grupos aminos para lo cual se realizó el acoplamiento de cisteamina según se describe en el Cap. IV. Respecto de la proteína no se requiere que posea un tiol libre, por lo que se utilizó la proteína GFP estándar.

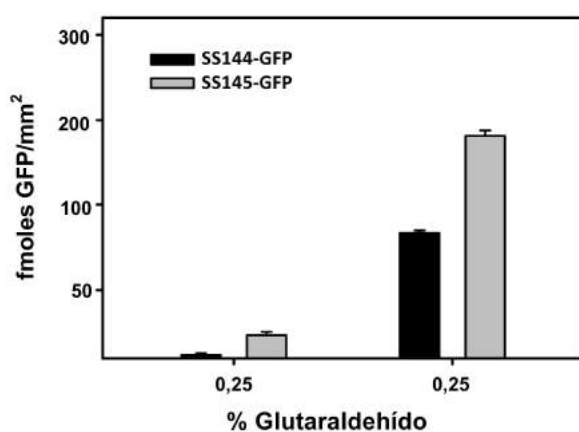
Esta inmovilización se realizó utilizando glutaraldehído como reactivo de acoplamiento. La estructura química exacta que toma el glutaraldehído al unirse al soporte aún está en discusión. Se describieron 13 estructuras químicas diferentes que puede adoptar este en solución, dependiendo del pH, concentración y temperatura. En soluciones diluidas y en el rango de pH de 3 a 8, predomina la conformación cíclica de hemiacetal (ver Fig. 5.2) [26].



**Fig.5.2.** Estructura y ciclación del glutaraldehído en soluciones diluidas y en el rango de pH de 3 a 8.

En estas condiciones el reactivo puede formar también mezclas de dímeros y monómeros, por lo cual la reacción puede suceder entre una o dos moléculas de glutaraldehído por grupo amino; el dímero tiene mayor reactividad, logrando inmovilizar macromoléculas a una mayor velocidad respecto del monómero. Sin embargo, las propiedades de la macromolécula inmovilizada no se ven afectada por la forma reactiva del glutaraldehído [27-28].

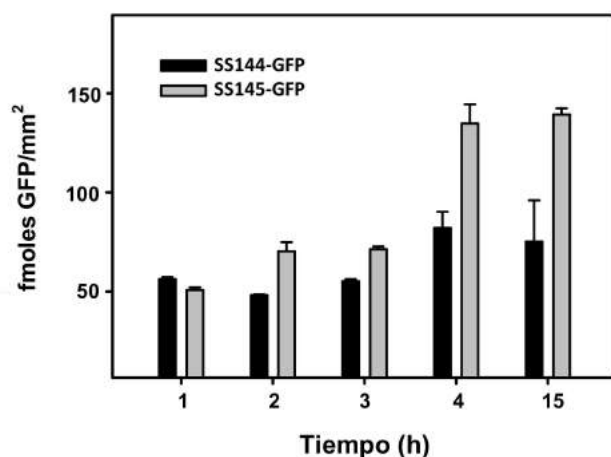
Las medidas obtenidas por la inmovilización multipuntual fueron expuestas en el gráfico con su correspondiente  $\pm$  SD (ver Fig. 5.3).



**Fig. 5.3.** Inmovilización multipuntual de GFP a concentraciones de glutaraldehído 0,25 y 2,5%.

El gráfico de la Fig. 5.3 muestra que la mejor condición de inmovilización a tiempo O.N. corresponde a la concentración de glutaraldehído 2,5 %, en ambas membranas evaluadas. La membrana de mayor diámetro de poro muestra una mayor inmovilización de GFP. En este ensayo la cantidad de proteína inmovilizada fue mayor a la del ensayo anterior, además el valor correspondiente al blanco negativo de la reacción obtenido fue más bajo a comparación del ensayo de inmovilización monopuntual (datos no mostrados).

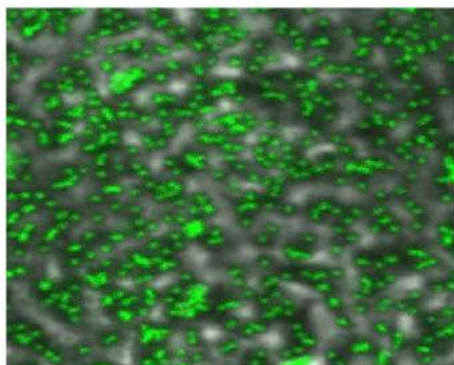
Adicionalmente se evaluó la cinética de inmovilización de ambas membranas en un rango de tiempo de 1,5 a 15 h, para la condición de glutaraldehído 2,5 %. Las mediciones se realizaron por quintuplicado en el Nanodrop y los valores obtenidos fueron corregidos por el blanco correspondiente, promediados y expuestos en el gráfico de la Fig. 5.4.



**Fig.5.4.** Cinética de inmovilización con 2,5% de Glutaraldehído. Membrana de 130 nm (SS144) y 226 nm (SS145) de diámetro de poro.

Como se observa en la Fig. 5.4 el tiempo óptimo de inmovilización fue 8 h para ambas membranas. A tiempos mayores no se aprecian diferencias significativas.

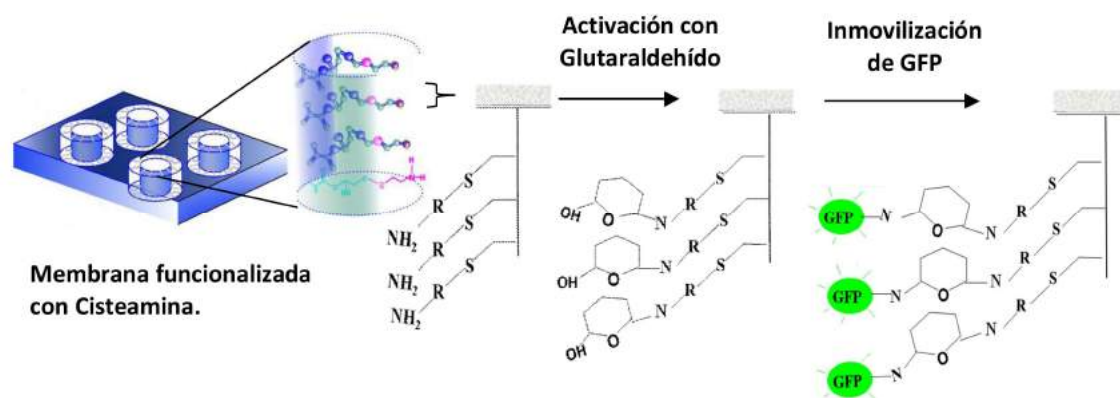
El sistema biohíbrido Memb-GFP de 226 nm de diámetro de poro fue analizado con un microscopio confocal. Las micrografías de fluorescencia se adquirieron de manera similar a la descrita en el Cap. III (Fig.5.5).



**Fig.5.5.** Micrografía confocal de la membrana (SS145 modificada) con GFP inmovilizada, con glutaraldehído 2,5 %, durante 8h, (Zoom total 240x).

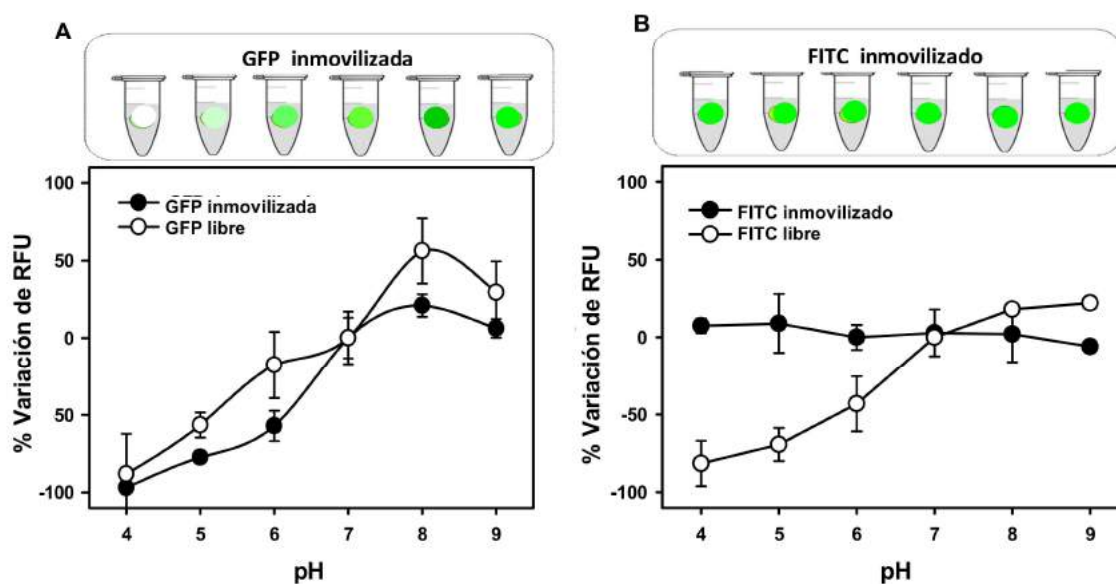
En la micrografía de fluorescencia (Fig. 5.5) pueden observarse que la GFP está localizada específicamente en los poros, y no distribuida en el resto de la superficie. Este resultado junto con la cuantificación fluorométrica realizada en el

Nanodrop 3300, confirman la inmovilización la proteína dentro de los conductos. En la Fig. 5.6 se esquematiza la reacción de inmovilización involucrada.



**Fig.5.6.** Esquema de preparación del sistema biohíbrido mediante inmovilización multipuntual. (Memb-GFP).

El sistema biohíbrido Memb-GFP fue evaluado a distintos pHs en un rango de pH 4 a 9. El ensayo consistió en incubar durante 5 min secciones circulares (0,5 cm de diámetro) del sistema biohíbrido en tubos tipo *Eppendorf*, con 1 ml de BP de distintos pHs. Las muestras resultantes se evaluaron por fluorometría directa y por triplicado. Como comparación, se utilizó una solución de GFP de igual concentración (31 ug/ml) en los distintos pHs. También se comparó con un sistema Memb-cisteamina-FITC, preparado a partir de la membrana SS145 (según las condiciones descritas en el Cap. III). Los valores medidos se representan como el promedio +/- SD (ver Fig. 5.7).



**Fig.5.7.** Gráfico de la respuesta fluorescente porcentual, a cambios de pH del entorno. **A-** Sistema Memb-GFP y **B-** Sistema Memb-cisteamina-FITC.

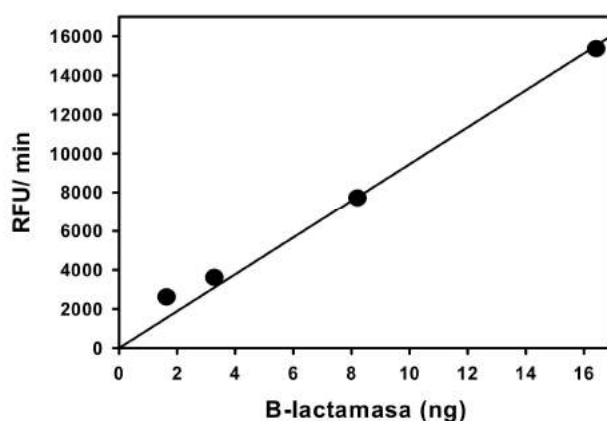
Como se puede observar en el gráfico de la Fig. 5.7.A el sistema Memb-GFP responden a los cambios de pH de manera similar a la GFP, con una menor sensibilidad al pH. Mientras que el sistema Memb-cisteamina-FITC (Fig.5.7.B) no responde a estos cambios, a diferencia del reactivo fluorescente en solución. Este efecto se podría asignar a un efecto de “apilamiento” o agregación de las moléculas de FITC en un espacio reducido, interfiriendo en la respuesta de fluorescencia. Ambos fluoróforos tienen una baja emisión de fluorescencia a pHs ácidos y alta a pHs básicos. Sin embargo en forma inmovilizada, en las paredes de los conductos, solo la GFP responde a los cambios de pH.

### Inmovilización de $\beta$ -Lactamasa

El sistema biohíbrido Memb- $\beta$ -Lact. se preparó utilizando la membrana SS192-pGMA, con un tamaño de poro de de 340 +/- 12 nm. El procedimiento utilizado para la inmovilización fue el multipuntual utilizando las condiciones óptimas determinadas para GFP (2,5% glutaraldehído y 8 h de inmovilización).

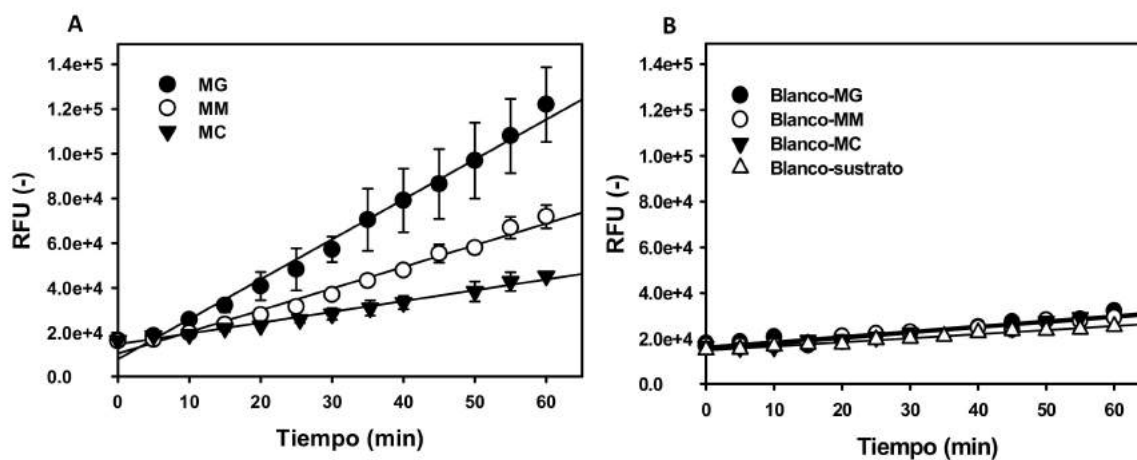
El sistema resultante se caracterizó a través de la actividad enzimática utilizando el sustrato comercial Fluorocillin™.

Inicialmente se determinó la correlación entre la cantidad de la enzima libre y la fluorescencia del producto a un determinado tiempo de incubación, para poder cuantificar a la enzima a partir de la cantidad de sustrato convertido (Fig. 5.8). Se considera que no existen limitaciones difusionales adicionales en el caso de los sistemas Memb- $\beta$ -Lact, en las condiciones del ensayo. En el rango estudiado la correlación fue lineal.



**Fig.5.8.** Actividad enzimática de B-Lactamasa a diferentes concentraciones.

Seguidamente se realizó el ensayo de actividad enzimática del sistema, utilizando secciones circulares de diferentes diámetros, denominados MG (0,7 cm), MM (0,5 cm) y MC (0,3 cm). Al variar el tamaño del sistema se modifica la cantidad de enzima inmovilizada. Para descartar el posible efecto de hidrólisis del sustrato inducido por la membrana utilizada como soporte o por hidrólisis espontánea, se realizaron los blancos de reacción correspondientes, con Memb-pGMA sin enzima inmovilizada (denominados blanco-MG, blanco-MM y blanco-MC) y del sustrato solo (denominado blanco-sustrato). Los resultados obtenidos se representan en la Fig. 5.9.



**Fig.5.9.A-** Determinación de la actividad enzimática de  $\beta$ -lactamasa, a distintas cantidades de enzima inmovilizada: ● Sección circular de 0,7 cm (MG); ○ Sección circular de 0,5 cm (MM); ▼ Sección circular de 0,3 cm (MC); **B-** Blanco negativos de las reacciones correspondientes con Memb-pGMA (●○▼). Δ sustrato solo.

En el gráfico de la Fig. 5.9.A se puede observar la actividad enzimática de las distintas secciones de Memb-Lact. En cada uno se observa un incremento lineal y proporcional de las RFU en función del tiempo. Además se observa que la actividad enzimática (determinada por la pendiente de la curva) incrementa conforme lo hace el área de sección, indicando que la enzima está homogéneamente distribuida en la membrana. Mientras que en el gráfico B de la misma figura (5.9) se presentan los resultados obtenidos para los blancos de reacción, donde solo se observa un leve aumento de las RFU que indica una hidrólisis espontánea del sustrato. Además se observa, en ambos gráficos que la cinética inicia a un valor de RFU distinto de cero, lo cual indica que el sustrato se encuentra parcialmente hidrolizado.

Con los resultados obtenidos en la determinación de la actividad enzimática del sistema, y la curva de la actividad enzimática de la enzima, se determinó la cantidad de enzima inmovilizada en las distintas secciones evaluadas. Además, considerando el PM de la enzima (30 kDa), se calculó la relación fmoles  $\beta$ -Lact./mm<sup>2</sup> correspondientes a las distintas secciones de muestra, los resultados se exponen en la Tabla 5.2.

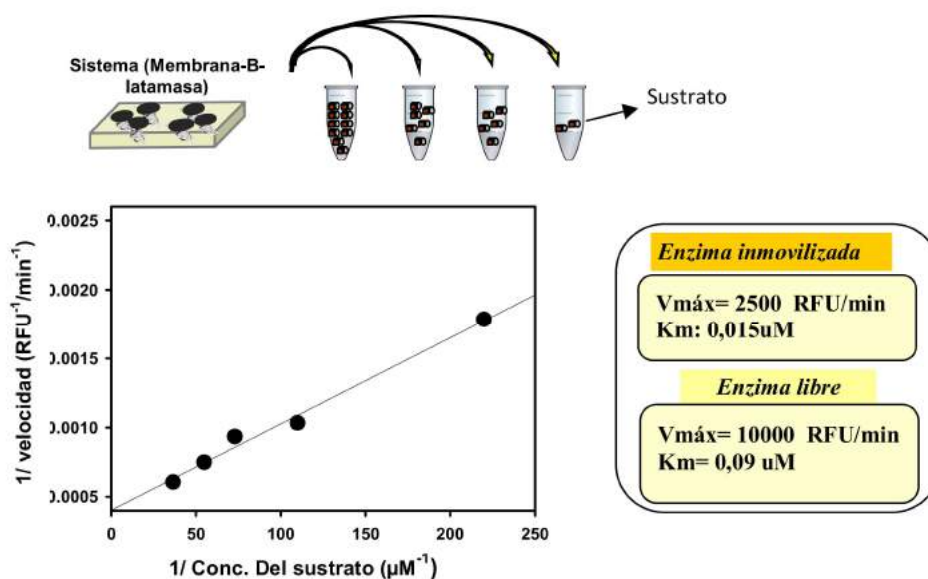
**Tabla.5.2.** Cantidad de enzima inmovilizada en las Memb- $\beta$ -Lact.

Secciones del sistema	ng $\beta$ -Lactamasa	ng $\beta$ -Lactamasa/mm <sup>2</sup>	fmoles $\beta$ -Lac/mm <sup>2</sup>
MG	1,39	0,036	1,204
MM	0,64	0,033	1,087
MC	0,25	0,035	1,179

De los datos de la Tabla 5.2 se determina que la cantidad promedio de  $\beta$ -Lactamasa por área de membrana corresponde a  $1,157 \pm 0,061$  fmoles  $\beta$ -Lactamasa/mm<sup>2</sup>. Mientras que de la fluorimetría del sistema Memb-GFP se obtuvo una relación de 100 veces mayor ( $147$  fmoles GFP/mm<sup>2</sup>). Sin embargo hay que considerar que en este caso la cantidad de  $\beta$ -Lactamasa corresponde a la cantidad de enzima activa.

Seguidamente se estudió la determinación de los parámetros cinéticos de la enzima libre e inmovilizada, utilizando el modelo de Michaelis Menten. La curva se realizó utilizando el sustrato en el rango de  $4,5$  a  $27$  nM, para la Memb- $\beta$ -Lact. MM y la enzima libre.

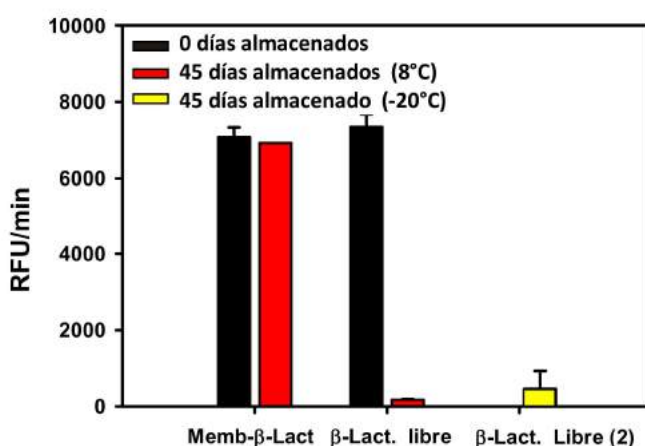
Los valores obtenidos para el sistema Memb- $\beta$ -Lact MM se presentan en el gráfico de doble inversa de la Fig. 5.10. Se determinó la  $V_{m\acute{a}x}$  de reacción y la constante  $K_m$ , que representa la afinidad de la enzima por el sustrato.

**Fig.5.10.** Actividad enzimática del sistema biohíbrido en función de la concentración.



A partir de los datos obtenidos en el gráfico de la Fig. 5.10 se pudieron determinar los parámetros cinéticos correspondientes, usando el modelo de Michaelis Menten. El comportamiento cinético de la enzima inmovilizada fue levemente diferente al de la enzima libre, obteniéndose una  $V_{m\acute{a}x}$  cuatro veces más pequeña (2500 RFU/min y 10000 RFU/min respectivamente). Este comportamiento es esperable ya que la inmovilización puede alterar significativamente el comportamiento cinético de las enzimas y su actividad. La misma puede verse afectada, por ejemplo, por efectos difusionales, estéricos y del microentorno provocados por la inmovilización [10]. Por otro lado el valor de la constante  $K_m$  obtenido para el sistema biohíbrido, fue aproximadamente 4 veces menor al obtenido para la enzima libre, indicando que la unión enzima-sustrato (E-S) tiene una mayor afinidad por el sustrato. Los resultados obtenidos se corresponden con lo que generalmente se obtiene cuando se inmoviliza una enzima a un soporte [29].

Se evaluó la estabilidad frente al almacenamiento y conjuntamente el reuso del sistema. El mismo se realizó almacenando el sistema Memb- $\beta$ -Lact. MM, durante 45 días en BP a 8 °C, asimismo se mantuvo en las mismas condiciones una cantidad similar de la enzima en BP. Las muestras se evaluaron a través de la actividad hidrolítica sobre el sustrato comercial, como se describió anteriormente. Los resultados se exponen en la Fig. 5.11.



**Fig.5.11.** Determinación de la estabilidad al almacenamiento.

Como se puede observar en el gráfico de la Fig. 5.11 el almacenamiento durante 45 d a 8 °C no modifico la actividad del sistema Memb- $\beta$ -Lact., mientras que la enzima libre se vio reducida en más del 90%, al igual que la enzima almacenada a -20°C.

Los datos obtenidos en la caracterización muestran que el sistema biohíbrido Memb- $\beta$ -Lact. posee una gran estabilidad al almacenamiento a 8°C en BP. Esto le confiere una importante propiedad de reúso, además de las ventajas de fácil manipulación y control de la reacción que ofrece el sistema.

De los resultados obtenidos en este Capítulo se puede enunciar las siguientes observaciones:

Para el caso del sistema membrana-proteína fluorescente (Memb-GFP), se obtuvo un material con un perfil de respuesta fluorescente al pH, similar al de la proteína libre. Este resultado demuestra la potencialidad del material como un potencial sensor de pH. Actualmente este tipo de sensores son de gran interés, dada la importancia de la determinación del pH en el medio de reacción en pequeños volúmenes y con materiales descartables. Además el sistema desarrollado en base a la fluorometría incrementa la sensibilidad de medición y permite la miniaturización del sistema [30].

Mientras que el sistema Memb- $\beta$ -Lact. muestra la posibilidad de inmovilización de enzimas para potenciales aplicaciones de sistemas sensores enzimáticos. La preparación de este sistema requirió cantidades mínimas de enzima por área de membrana (0,5 mg/cm<sup>2</sup>), en relación a otros sistemas descritos en la literatura. Por ejemplo, Teke et al [31] describió la inmovilización de ureasa en membranas *track-etched* de nylon utilizando una relación de 1,6 mg/cm<sup>2</sup>, mientras que Koolpal et al [32] describió una relación de 15 mg/cm<sup>2</sup>, en la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa. Al comparar la cantidad de enzima activa inmovilizada por área de membrana, el sistema resulto poseer una relación mil veces menor (3,3-3,6 ng/cm<sup>2</sup>), respecto al sistema presentado por Sternberg et al [33], que obtuvo una relación de 3,8-13  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>, en la inmovilización de glucosa oxidasa sobre membranas de acetato de celulosa.

**Referencias:**

1. Specht, R., Han, B., Wickramasinghe, S. R., Carlson, J. O., Czermak, P., Wolf, A., & Reif, O. W. (2004). Densonucleosis virus purification by ion exchange membranes. *Biotechnology and bioengineering*, 88(4), 465-473.
2. Wickramasinghe, S. R., Han, B., Carlson, J. O., Teske, C., Hubbuch, J. B., & Ulbricht, M. (2006). Designing adsorptive membranes using confocal microscopy. *J Membr Sci. Submitted for publication*.
3. Basile, A., & Gallucci, F. (Eds.). (2010). *Membranes for membrane reactors*. Wiley. pp 45.
4. Hicke, H. G., Becker, M., Paulke, B. R., & Ulbricht, M. (2006). Covalently coupled nanoparticles in capillary pores as enzyme carrier and as turbulence promoter to facilitate enzymatic polymerizations in flow-through enzyme-membrane reactors. *Journal of Membrane Science*, 282(1), 413-422.
5. Jolival, C., Brenon, S., Caminade, E., Mougin, C., & Pontié, M. (2000). Immobilization of laccase from *Trametes versicolor* on a modified PVDF microfiltration membrane: characterization of the grafted support and application in removing a phenylurea pesticide in wastewater. *Journal of Membrane Science*, 180(1), 103-113.
6. Kumar A. Stability of responsive polymer-protein bioconjugates. *Prog. In Polym. Sci.* **35** (2010) 459-486.
7. Georgieva, S., Godjevargova, T., Portaccio, M., Lepore, M., & Mita, D. G. (2008). Advantages in using non-isothermal bioreactors in bioremediation of water polluted by phenol by means of immobilized laccase from *Rhus vernicifera*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 55(3), 177-184.
8. Smuleac, V., Butterfield, D. A., & Bhattacharyya, D. (2006). Layer-by-layer-assembled microfiltration membranes for biomolecule immobilization and enzymatic catalysis. *Langmuir*, 22(24), 10118-10124.
9. Goto, M., Kawakita, H., Uezu, K., Tsuneda, S., Saito, K., Goto, M., & Sugo, T. (2006). Esterification of lauric acid using lipase immobilized in the micropores

of a hollow-fiber membrane. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(3), 209-213.

10. Jochems, P., Satyawali, Y., Diels, L., & Dejonghe, W. (2011). Enzyme immobilization on/in polymeric membranes: status, challenges and perspectives in biocatalytic membrane reactors (BMRs). *Green chemistry*, 13(7), 1609-1623.

11. Heng, M. H., & Glatz, C. E. (1994). Ion exchange immobilization of changed  $\beta$ -galactosidase fusions for lactose hydrolysis. *Biotechnology and bioengineering*, 44(6), 745-752.

12. Liu, Z. M., Tingry, S., Innocent, C., Durand, J., Xu, Z. K., & Seta, P. (2006). Modification of microfiltration polypropylene membranes by allylamine plasma treatment: Influence of the attachment route on peroxidase immobilization and enzyme efficiency. *Enzyme and microbial technology*, 39(4), 868-876.

13. Ye, P., Jiang, J., & Xu, Z. K. (2007). Adsorption and activity of lipase from *Candida rugosa* on the chitosan-modified poly (acrylonitrile-co-maleic acid) membrane surface. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 60(1), 62-67.

14. Kweon D.H. Overproduction of *Phytoalacca insularis* protein in batch and fed-batch culture of recombinant. *Escherichia coli* Proc. Biochem. 36 (2001) 537-542.

15. Kikot, P., Polat, A., Achilli, E., Fernandez Lahore, M., & Grasselli, M. (2014). Immobilized palladium (II) ion affinity chromatography for recovery of recombinant proteins with peptide tags containing histidine and cysteine. *Journal of Molecular Recognition*, 27(11), 659-668.

16. Kwon H.J. Surface Functionalization of Poly(Ethylene Terphthalate) for Biomolecule Immobilization by Ion Implantation. *J. of the Korean Phys. Soc.* 54 (2009) 2071-2075.

17. Ikeyama M. DLC coating on inner walls of PET bottles by a simplified PBII technique. *Nucl. Inst. And Meth. B* 257 (2005) 741-745.

18. Kereszturi K. Surf. Surface chemical and nanomechanical alterations in plasma immersion ion implanted PET. *Interface Anal.* 40 (2008) 664-667.

19. Han Z. J. Electrical conductivity of poly(ethylene terephthalate) modified by titanium plasmaAppl. Polym. Sci. 107 (2008) 3332-3336.

20. Liu Y. Improved blood compatibility of poly(ethylene terephthalate) films with L-arginine. *Biomater. Sci. Poly. Edit.* 19 (2008) 497-507.
21. Burteau N. Stabilization and immobilization of penicillin amidase. *FEBS Lett.* 258 (1989) 185-189.
22. Van Aken BP. Co-immobilization of manganese peroxidase from *Phlebia radiata* on porous silica beads. *Biotechnol. Lett* 8 (2000) 641-646.
23. Dos Reis-Costa L.S. Immobilization of lipases and assay in continuous fixed bed reactor. *Protein Peptide Lett.* 10 (2003) 619-628.
24. Magnan E. Immobilization of lipase on a ceramic membrane: activity and stability. *J. Membr. Sci.* (2004) 161-166.
25. Seyhan T.S. Immobilization and kinetics of catalase onto magnesium silicate. *Process Biochem.* 39 (2004) 2149-2155.
26. Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., & Waldron, K. C. (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*, 37(5), 790-806.
27. Migneault I. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques* 37 (2004) 798-802.
28. Betancor L. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enz. And Technol.* 39 (2006) 877-882.
29. Krajewska, B. (2004). Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and microbial technology*, 35(2), 126-139.
30. Lin, J. (2000). Recent development and applications of optical and fiber-optic pH sensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19(9), 541-552.
31. Teke, A. B., & Baysal, Ş. H. (2007). Immobilization of urease using glycidyl methacrylate grafted nylon-6-membranes. *Process biochemistry*, 42(3), 439-443.
32. Koopal, C. G. J., Feiters, M. C., Nolte, R. J. M., De Ruiter, B., & Schasfoort, R. B. M. (1992). Glucose sensor utilizing polypyrrole

incorporated in tract-etch membranes as the mediator. *Biosensors and Bioelectronics*, 7(7), 461-471.

33. Sternberg, R., Bindra, D. S., Wilson, G. S., & Thevenot, D. R. (1988). Covalent enzyme coupling on cellulose acetate membranes for glucose sensor development. *Analytical Chemistry*, 60(24), 2781-2786.

## **CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS**

### **CAPÍTULO VI**





## Conclusiones

El trabajo de tesis consistió en la preparación de membranas PET funcionales a través de la técnica PIVRR. De acuerdo a nuestro conocimiento, la misma constituye uno de los primeros trabajos científicos en el tema.

En el Cap. I se describieron los efectos de la radiación con SHI sobre los polímeros y las condiciones óptimas para lograr membranas de poros perfectos.

En el Cap. II se describieron y prepararon experimentalmente membranas de diferentes diámetros de poro, en un rango de 25 nm a 500 nm, según las condiciones de grabado utilizadas. Se obtuvo una condición óptima de GQ utilizando NaOH 2 N, 60°, c/UV y 10 min de incubación, a la cual se obtienen membranas con mejores propiedades de transporte. Los estudios de microscopía electrónica mostraron que las membranas obtenidas tienen conductos cilíndricos, individuales y no conectados entre ellos. Para su estudio funcional se desarrolló *ad hoc* un sistema de microceldas de transporte (**MCD**) que permitió estudiar el transporte de masa, adaptando un pequeño espectrofluorómetro de estado sólido de elevada sensibilidad fluorométrica. Mientras que la técnica de EIS permitió estudiar propiedades de los conductos.

En el Cap. III se analizaron diferentes alternativas de modificación de las membranas *track-etched* de PET, por métodos de polimerización por injerto. Para el estudio de los diferentes métodos fue necesario desarrollar una nueva metodología, no descrita en literatura, con la sensibilidad suficiente para poder seguir el proceso de modificación. En la que se utilizó un conjunto de reacciones químicas de alto rendimiento, un reactivo fluorescente y un espectrofluorómetro, que permitió realizar medidas de fluorométricas directas, sobre las membranas *track-etched*.

La química de derivatización desarrollada, en base al grupo epoxi del pGMA y el grupo tiol del reactivo cisteamina, y posterior marcación fluorescente con FITC, permitió cuantificar de manera indirecta la modificación y revelar la ubicación específica del mismo. Esta no había podido ser detectada por otras

técnicas, como FTIR-ATR, por encontrarse por debajo del límite de sensibilidad. Asimismo se demostró que la modificación por injerto es muy robusta, ocurriendo en el 100% de los conductos y en todo su volumen. Adicionalmente no se detectó la presencia de homopolímero y los conductos no fueron obstruidos en ningún caso.

Utilizando esta técnica fluorométrica fue posible el seguimiento y optimización de la modificación por injerto vía radicales remanentes. En base a ello se obtuvo que las mejores condiciones de modificación fueron: 60°C, 10% GMA, tp-GQ inmediato (menor a 30 min) y 2,5 h de polimerización, que permite introducir pGMA sobre el PET, específicamente sobre las paredes internas de los nanoconductos.

En el Cap. IV se obtuvieron membranas con permeabilidad selectiva, con diferente carga superficial, PET-pGMA-cistemina (Memb-MH<sub>3</sub><sup>+</sup>), PET-pGMA-ac. tioglicólico (Memb-COO<sup>-</sup>) y PET-pGMA-β-mercaptoetanol (Memb-OH). La permeabilidad de la Fluoresceína (analito en estudio) se vió alterada en las diferentes membranas, al controlar el espesor de doble capa y su efecto, mediante ajustes en la concentración del electrolito de pre-incubación (KCl).

Por último, en el Cap. V se obtuvieron sistemas de membranas biohíbridas, mediante la química de inmovilización mono y multipuntual covalente de proteínas, utilizando dos químicas diferentes. La inmovilización monopuntual, se realizó empleando la reacción epoxi-tiol, entre el epóxido del pGMA (injerto en el conducto) y el grupo tiol- de la proteína. Mientras que en la inmovilización multipuntual se utilizó glutaraldehído, empleando membranas PET-pGMA-cistemina. La condición óptima de inmovilización correspondió a 2,5 % Glutaraldehído, en BP 200 mM pH 7 y una incubación de 15 h.

El sistema Memb-GFP se evaluó como un potencial sensor fluorescente de pH. Determinándose que el perfil de respuesta fue similar al de la proteína libre. Mientras, que el sistema Memb-β-Lactamasa se evaluó como sistema biocatalítico. La actividad catalítica del sistema presento una menor V<sub>máx</sub>, pero mayor afinidad respecto de la enzima libre. Además, evidencio una elevada estabilidad de almacenamiento a 8°C, con una pérdida de actividad menor al 5%,

en relación a la enzima libre, la cual tuvo una reducción mayor al 90%, al cabo de 45 días de almacenamiento. Las propiedades adquiridas, como la facilidad de recuperación de la enzima y posibilidad de reuso, sin afectar significativamente el rendimiento de la misma, hacen al sistema interesante en su aplicación para el desarrollo de sistemas enzimáticos.

Los sistemas biohíbridos desarrollados en este trabajo, independientemente de la concentración de proteína inmovilizada presentan características diferenciales a los soportes biocatalíticos standard, que es la localización específica de las proteínas en el interior de los poros y que se suman a las ya conocidas propiedades de las membranas *track-etched*, perfecto control del diámetro y cantidad de canales/poros disponibles por área de membrana. La presencia de canales/ poros individuales y no interconectados permite imaginar nuevas aplicaciones, donde la distribución geométrica de las enzimas inmovilizadas juegue un rol importante en el ensamblado de una secuencia de reacciones acopladas.

