



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**INJERTO DE GLICIDILMETACRILATO EN HULE DE SILICONA MEDIANTE RADIACIÓN
IONIZANTE PARA SU APLICACIÓN EN LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M.C. TANIA SEGURA MOCTEZUMA

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. S. Guillermina Burillo Amezcua

INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Manuel Navarrete

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

Dr. Humberto Vázquez

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

MÉXICO D.F. MARZO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por abrirme sus puertas y permitirme llevar a cabo mis estudios.

A mi asesora la Dra. Guillermina Burrillo por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de trabajo y brindarme todo su apoyo en la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología "CONACY T" por el otorgamiento de la beca (No. 173856) para llevar a cabo mis estudios de doctorado dentro del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas.

A cada uno de los sinodales gracias por sus aportaciones y comentarios, porque con ellos permitieron enriquecer este trabajo.

A la Dra. Carmen Alvarez-Lorenzo, Dra. Ana Puga y al Dr. Angel Concheiro de la Universidad de Santiago de Compostela, por toda su ayuda y su trabajo en la parte de carga y liberación de fármacos.

Al Instituto de Ciencias Nucleares, a su unidad de docencia y al personal de la biblioteca, por el apoyo para llevar a cabo mis estudios de doctorado.

Al físico Francisco García y al M.C. Benjamín Leal, adscritos a la unidad de irradiación y seguridad radiológica del ICN, por su valiosa ayuda en la irradiación de las muestras.

A la Dra. Martha Menes y a la M.C. Margarita Romero de la Facultad de Química, UNAM gracias por facilitarme los reactivos y brindarme su asesoría para llevar a cabo la inmovilización del ergosterol.

A la Dra. Alejandra Ortega y al Dr. Emilio Bucio por su ayuda técnica en el laboratorio de macromoléculas.

A los técnicos Mayra Ham y Saúl Trujillo por brindarme el material necesario para desarrollar este trabajo.

A los proyectos CONACyT- CNPq (174378) y CYTED (Red iberoamericana de nuevos materiales para el diseño de sistemas avanzados de liberación de fármacos en enfermedades de alto impacto socioeconómico, RIMADEL) por el apoyo económico para la realización de este proyecto.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de macromoléculas perteneciente al departamento de química de radiaciones y radioquímica del Instituto de Ciencias Nucleares en la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los avances de esta tesis fueron presentados en los siguientes congresos:

“VI Congreso Internacional de Materiales” CIM 2011

(Bogotá, Colombia. Del 27 al 30 de Noviembre 2011)

XXI Congreso Técnico Científico ININ-SUTIN. “USOS PACÍFICOS DE LA ENERGÍA NUCLEAR”

(Estado de México, México. Diciembre 2011)

“Ionizing Radiation and Polymers Symposium” IRAP 2012

(Cracovia, Polonia. Del 14 al 19 de Octubre 2012)

XXII Congreso Técnico Científico ININ-SUTIN “LA CIENCIA Y TECNOLOGÍA NUCLEAR EN EL NUEVO SEXENIO”

(Estado de México, México. Diciembre 2012)

“European Polymer Federation” EPF 2013

(Pisa, Italia. Del 16 al 21 de Junio 2013)

Los resultados de este trabajo fueron publicados en la revista *Radiation Physics and Chemistry*, 91, **2013**, 101-107.

ÍNDICE

| | página |
|--|---------------|
| ÍNDICE DE FIGURAS | 8 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 12 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 13 |
| SUMMARY | 14 |
| RESUMEN | 15 |
| 1.-INTRODUCCIÓN | 16 |
| 2.-GENERALIDADES | 20 |
| 2.1. Polimerización vía radicales libres..... | 20 |
| 2.2. Radiación gamma y polimerización..... | 23 |
| 2.3. Interacción de la radiación con la materia..... | 25 |
| 2.4. Copolimerización..... | 31 |
| 2.5. Copolimerización de injerto | 33 |
| 2.6. Copolimerización de injerto mediante radiación gamma..... | 33 |
| 2.6.1. Parámetros que influyen en el injerto..... | 36 |
| 2.6.1.1. Dosis..... | 36 |
| 2.6.1.2. Razón de dosis..... | 37 |
| 2.6.1.3. Temperatura..... | 37 |
| 2.6.1.4. Monómero..... | 38 |
| 2.6.1.5. Disolvente..... | 38 |
| 2.7. Siliconas..... | 38 |
| 2.7.1. Efecto de la radiación ionizante en PDMS..... | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 2.8. Glicidilmetacrilato..... | 41 |
| 2.9 Antecedentes sobre la síntesis del copolímero SR-g-GMA..... | 42 |
| 2.10. Liberación de fármacos en materiales poliméricos..... | 43 |
| 2.11. <i>Candida albicans</i> | 46 |
| 2.12. Natamicina..... | 46 |
| 2.13. Nistatina..... | 47 |
| 2.14. Ergosterol..... | 48 |
| 3.-OBJETIVOS..... | 49 |
| 3.1. Objetivo general..... | 49 |
| 3.2. Objetivos particulares..... | 49 |
| 4.-HIPÓTESIS..... | 49 |
| 5.-PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL..... | 50 |
| 5.1. Metodología..... | 50 |
| 5.2. Materiales..... | 50 |
| 5.3. Fuente de rayos gamma..... | 51 |
| 5.4. Metodología del injerto..... | 52 |
| 5.4.1. Preparación de las muestras previo a la irradiación..... | 52 |
| 5.4.2. Irradiación de las muestras..... | 52 |
| 5.4.3. Injerto..... | 52 |
| 5.4.4. Aislamiento y purificación del copolímero de injerto..... | 53 |
| 5.4.5. Cuantificación del injerto | 53 |
| 5.5. Inmovilización de ergosterol..... | 53 |
| 5.6. Carga del fármaco en el copolímero de injerto modificado con ergosterol..... | 54 |

| | |
|---|------------|
| 5.7. Liberación del fármaco..... | 54 |
| 5.8. Preparación de los liposomas..... | 55 |
| 5.9 Métodos de caracterización..... | 55 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 57 |
| 6.1 Injerto..... | 57 |
| 6.1.1. Efecto de la dosis de preirradiación..... | 57 |
| 6.1.2. Efecto de la concentración de monómero..... | 58 |
| 6.1.3. Efecto del tiempo de reacción..... | 59 |
| 6.1.4. Efecto de la temperatura de reacción..... | 60 |
| 6.1.5. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis del copolímero SR-g-GMA..... | 62 |
| 6.2. Inmovilización de ergosterol..... | 69 |
| 6.3. Caracterización..... | 72 |
| 6.3.1. IR-ATR..... | 72 |
| 6.3.2. TGA..... | 75 |
| 6.3.3. DSC..... | 78 |
| 6.3.4. SEM..... | 79 |
| 6.3.5. EDS..... | 80 |
| 6.4. Carga y liberación de los fármacos natamicina y nistatina..... | 82 |
| 7. CONCLUSIONES..... | 99 |
| 8. PERSPECTIVAS..... | 100 |
| 9. REFERENCIAS..... | 101 |
| 10. ANEXO | 109 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | página |
|---|---------------|
| Figura 1. Sistema para carga y liberación de fármacos antifúngicos..... | 19 |
| Figura 2. Etapa de iniciación..... | 20 |
| Figura 3. Etapa de propagación..... | 21 |
| Figura 4. Terminación por recombinación..... | 22 |
| Figura 5. Terminación por desproporción..... | 22 |
| Figura 6. Procesos de degradación y entrecruzamiento..... | 24 |
| Figura 7. Espectro electromagnético..... | 25 |
| Figura 8. Diagrama de decaimiento radioactivo de Co^{60} y Cs^{137} | 26 |
| Figura 9. Efecto fotoeléctrico..... | 29 |
| Figura 10. Efecto Compton..... | 29 |
| Figura 11. Producción de pares..... | 30 |
| Figura 12. Regiones de predominio de los tres principales mecanismos que se presentan cuando la radiación ionizante interactúa con la materia..... | 31 |
| Figura 13. Copolímeros y sus diferentes arquitecturas..... | 32 |
| Figura 14. Mecanismos mediante los cuales puede proceder el injerto..... | 33 |
| Figura 15. Métodos de irradiación de polímeros..... | 34 |
| Figura 16. Diferentes arquitecturas de PDMS..... | 39 |
| Figura 17. Principales rupturas de enlace en el PDMS, debido a la exposición a la radiación ionizante..... | 41 |
| Figura 18. Glicidilmetacrilato..... | 41 |
| Figura 19. Imagen SEM del copolímero SR-g-GMA sintetizado con plasma.. | 42 |

| | |
|--|----|
| Figura 20. Perfiles de liberación de fármacos para diferentes sistemas..... | 44 |
| Figura 21. Natamicina..... | 46 |
| Figura 22. Nistatina..... | 47 |
| Figura 23. Ergosterol..... | 48 |
| Figura 24. Diagrama de procedimiento..... | 50 |
| Figura 25. Irradiador gamma beam (651 PT, Nordion International)..... | 51 |
| Figura 26. Efecto de la dosis de preirradiación sobre el porcentaje de injerto..... | 58 |
| Figura 27. Efecto de la concentración de monómero sobre el porcentaje de injerto..... | 59 |
| Figura 28. Efecto del tiempo de reacción sobre el porcentaje de injerto..... | 60 |
| Figura 29. Efecto de la temperatura de reacción sobre el porcentaje de Injerto..... | 61 |
| Figura 30. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis del copolímero SR-g-GMA (preirradiación oxidativa)..... | 63 |
| Figura 30a. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis del copolímero SR-g-GMA (iniciación y propagación)..... | 64 |
| Figura 30b. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis del copolímero SR-g-GMA (terminación por desproporción)..... | 65 |
| Figura 30c. Posible producto obtenido mediante la terminación por desproporción | 66 |
| Figura 30d. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis del copolímero SR-g-GMA (terminación por recombinación)..... | 67 |
| Figura 30e. Posible producto obtenido mediante la terminación por recombinación | 68 |
| Figura 31. Láminas de hule de silicona y copolímero SR-g-GMA con diferentes porcentajes de injerto..... | 69 |

| | |
|--|----|
| Figura 32. Mecanismo de reacción propuesto para la inmovilización covalente de ergosterol..... | 70 |
| Figura 32a. Mecanismo de reacción propuesto para la inmovilización covalente de ergosterol..... | 71 |
| Figura 33. Espectros de IR-ATR..... | 74 |
| Figura 34. Termogramas de los sistemas SR. pGMA y SR-g-GMA..... | 75 |
| Figura 35. Termogramas de los sistemas estudiados..... | 76 |
| Figura 36. Termograma y curva derivada del ergosterol..... | 77 |
| Figura 37. Termograma y curva derivada del copolímero SR-g-GMA..... | 77 |
| Figura 38. Termograma y curva derivada del copolímero SR-g-GMA modificado con ergosterol | 78 |
| Figura 39. DSC de los sistemas hule de silicona, poliglicidilmetacrilato y del copolímero SR-g-GMA..... | 79 |
| Figura 40. Imágenes SEM de las muestras de hule de silicona (A), SR-g-GMA (15%injerto) (B)..... | 80 |
| Figura 41. Corte transversal de una lámina del SR-g-GMA mostrando los puntos analizados por EDS..... | 81 |
| Figura 42. Representación esquemática de la difusión del monómero a través del hule de silicona..... | 82 |
| Figura 43. Perfil de carga del fármaco natamicina..... | 83 |
| Figura 44. Perfil de carga del fármaco nistatina..... | 84 |
| Figura 45. Perfil de liberación del fármaco natamicina en medio sin liposomas (A) y en medio con liposomas (B)..... | 86 |
| Figura 46. Perfil de liberación del fármaco nistatina en medio sin liposomas (A) y en medio con liposomas (B)..... | 87 |
| Figura 47. Modelo de Rigter-Peppas aplicado a la liberación de natamicina, medio sin liposomas..... | 89 |

| | |
|--|----|
| Figura 48. Modelo de Rigter-Peppas aplicado a la liberación de natamicina, medio con liposomas..... | 89 |
| Figura 49. Modelo de Rigter-Peppas aplicado a la liberación de nistatina, medio sin liposomas..... | 90 |
| Figura 50. Modelo de Rigter-Peppas aplicado a la liberación de nistatina, medio con liposomas..... | 91 |
| Figura 51. Determinación de la velocidad de liberación de natamicina, mediante modelo de Higuchi (cinética de raíz cuadrada), medio sin liposomas..... | 93 |
| Figura 52. Determinación de la velocidad de liberación de natamicina, mediante la ecuación de cinética de orden cero, medio sin liposomas..... | 93 |
| Figura 53. Determinación de la velocidad de liberación de natamicina, mediante modelo de Higuchi (cinética de raíz cuadrada), medio con liposomas..... | 94 |
| Figura 54. Determinación de la velocidad de liberación de natamicina, mediante la ecuación de cinética de orden cero, medio con liposomas..... | 94 |
| Figura 55. Determinación de la velocidad de liberación de nistatina, mediante modelo de Higuchi (cinética de raíz cuadrada), medio sin liposomas..... | 95 |
| Figura 56. Determinación de la velocidad de liberación de nistatina, mediante la ecuación de cinética de orden cero, medio sin liposomas..... | 96 |
| Figura 57. Determinación de la velocidad de liberación de nistatina, mediante ecuación de Higuchi (cinética de raíz cuadrada), medio con liposomas..... | 96 |
| Figura 58. Determinación de la velocidad de liberación de nistatina, mediante la ecuación de cinética de orden cero, medio con liposomas..... | 97 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | página |
|---|--------|
| Tabla 1. Ejemplos de iniciadores empleados en la polimerización vía radicales libres..... | 21 |
| Tabla 2. Energías de enlace..... | 40 |
| Tabla 3. Descripción de algunos tipos de sistemas de liberación modificada..... | 43 |
| Tabla 4. Composición de los puntos analizados mediante EDS..... | 81 |
| Tabla 5. Datos de las muestras utilizadas para la carga de natamicina..... | 83 |
| Tabla 6. Datos de las muestras utilizadas para la carga de nistatina..... | 84 |
| Tabla 7. Valores de n para sistemas de liberación controlada con diferentes geometrías..... | 88 |
| Tabla 8. Valores de n y R ² obtenidos aplicando el modelo de Rigter-Peppas, para la liberación de natamicina..... | 91 |
| Tabla 9. Valores de n y R ² obtenidos aplicando el modelo de Rigter-Peppas, para la liberación de nistatina..... | 90 |
| Tabla 10 Velocidad de liberación de natamicina. Datos obtenidos mediante ajustes a cinéticas de raíz cuadrada (modelo de Higuchi) (k_H ; % $h^{-0.5}$) y de orden cero (k_0 ; % h^{-1}). Las desviaciones estándar estuvieron en todos los casos por debajo del 10% (n=3)..... | 95 |
| Tabla 11 Velocidad de liberación de nistatina. Datos obtenidos mediante ajustes a cinéticas de raíz cuadrada (modelo de Higuchi) (k_H ; % $h^{-0.5}$) y de orden cero (k_0 ; % h^{-1}). Las desviaciones estándar estuvieron en todos los casos por debajo del 10% (n=3)..... | 97 |

LISTA DE ABREVIATURAS

Cs¹³⁷: cesio 137

Co⁶⁰: cobalto 60

DOPC: 1,2 diolil-sn-glicerol-3-fosfocolina

DSC: calorimetría diferencial de barrido

EDS: espectroscopía de energía dispersiva de rayos X

FDA: food and drug administration

GMA: glicidilmetacrilato

GRAS: generally regarded as safe

HEPES: 4-(2-hidroxietyl)-piperazina 1-ácido etansulfónico

IR-ATR: infrarojo de reflectancia total atenuada

PDMS: polidimetilsiloxano

pGMA: poliglicidilmetacrilato

SEM: microscopia electrónica de barrido

SR-g-GMA: copolímero de injerto de glicidilmetacrilato en hule de silicona

TGA: análisis termogravimétrico

SUMMARY

This work describes the synthesis of a new polymeric material suitable for loading and controlled release of nystatin and natamycin, a group of antifungal agents to treat infections associated to the fungi *Candida albicans*. To design this material, first glycidylmethacrylate (GMA) was grafted onto silicone rubber (SR) by using the gamma-ray pre-irradiation method and then ergosterol was covalently immobilized to the copolymer.

Attenuated total reflectance Fourier transform infrared (IR-ATR) and scanning electron microscopy (SEM) showed that the surface of SR was uniformly grafted and electron scattering (EDS) analysis of the cross-section of the graft copolymer revealed that grafting occurred in the bulk and on the surface of the polymeric matrix and suggested that grafting proceeded by a grafting front mechanism. In this work the effect of preirradiation dose, temperature, time reaction, and monomer concentration on the degree of grafting was also investigated, it was found that these factors strongly influence on the degree of grafting.

The loading test showed that SR and the graft copolymer without ergosterol had very limited ability to uptake nystatin and natamycin. However, the loading of these antifungal drugs was notably improved when the graft copolymer was modified with ergosterol. On the other hand, the samples modified with ergosterol were able to release nystatin and natamycin in a medium that simulate an environment contaminated by fungi. These results suggest that ergosterol had an important role in the load and release of the antifungal drugs nystatin and natamycin.

RESUMEN

Este trabajo describe la síntesis de un nuevo material para la carga y liberación controlada de nistatina y natamicina, un grupo de fármacos antifúngicos utilizados en el tratamiento de infecciones ocasionadas por el hongo *Candida albicans*. Para diseñar este material, primero el glicidilmetacrilato fue injertado en hule de silicona, mediante el método de preirradiación oxidativa y posteriormente se llevó a cabo la inmovilización covalente de ergosterol en el copolímero de injerto.

Mediante espectroscopía de infrarrojo de reflectancia total atenuada (IR-ATR) y microscopía electrónica de barrido (SEM), se logró determinar que la superficie del hule de silicona fue injertada. El análisis de dispersión de electrones (EDS) de la sección transversal del copolímero, reveló que el injerto ocurrió en masa y en la superficie de la matriz polimérica por lo tanto el injerto procedió mediante un mecanismo tipo “grafting from”. En este trabajo también se estudio el efecto de la dosis de preirradiación, temperatura, tiempo de reacción y concentración de monómero sobre el grado de injerto, encontrando que estos factores influyen fuertemente en el grado de injerto.

Las pruebas de carga mostraron que el hule de silicona y el copolímero de injerto tuvieron una capacidad muy limitada para incorporar nistatina y natamicina. Sin embargo, la carga de estos fármacos antifúngicos mejoró notablemente cuando el copolímero de injerto fue modificado con ergosterol. Por otro lado, el copolímero de injerto modificado con ergosterol fue capaz de liberar nistatina y natamicina en un medio que simuló un ambiente contaminado con hongos. Estos resultados sugieren que el ergosterol tiene un importante papel en la carga y liberación de los fármacos antifúngicos nistatina and natamicina.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el uso de dispositivos médicos implantables se ha incrementado exponencialmente proporcionando una mejor calidad de vida a las personas y en algunos casos aumentando su supervivencia. Sin embargo, estos cuerpos extraños una vez implantados, son sitios apropiados para que los microorganismos se adhieran y crezcan sobre su superficie (*Reid, 1999*). Estos microorganismos establecen comunidades bien estructuradas conocidas como *biofilms*, los cuales son la principal fuente de infecciones locales o incluso sistémicas (*Padera, 2006*). Desafortunadamente, los biofilms son difíciles de erradicar porque suelen ser resistentes a los agentes antimicrobianos, así que la única vía para erradicarlos suele ser la remoción completa del dispositivo médico implantable. Sin embargo, esta medida tan radical conlleva altos riesgos y costos para el paciente, por lo que es necesario implementar mejores estrategias para prevenir la adhesión y proliferación de microorganismos en la superficie de estos dispositivos.

La solución más prometedora hasta este momento ha sido dotar a estos dispositivos de agentes antimicrobianos (*Muñoz-Bonilla y Fernández-García, 2012*) que pueden ser incorporados mediante unión covalente (*De Prejick et al, 2010*), interacciones electrostáticas o adsorción dentro de las superficies de los dispositivos implantables (*Bayston et al, 2009*). En esta intensa tarea, se ha recurrido a la modificación estructural de una amplia gama de polímeros empleados en la producción de dispositivos médicos implantables, utilizando técnicas como la copolimerización de injerto. A través de ésta técnica, se ha logrado el injerto en superficies poliméricas de polímeros de naturaleza antimicrobiana o polímeros con respuesta a estímulos externos como el pH o la temperatura, permitiendo cargar y liberar fármacos en forma controlada (*Curcio et al, 2010*). Además se han injertado polímeros que

evitan la adhesión de proteínas a la superficie del material (*Liu et al, 2010*) y la funcionalización de superficies poliméricas, mediante el injerto de polímeros que poseen grupos funcionales reactivos y que permiten la posterior incorporación de fármacos (*Nava-Ortiz et al, 2009*).

Considerando la necesidad de nuevas metodologías y fármacos para hacer frente al problema de las infecciones causadas por dispositivos médicos implantables, el presente trabajo propone el diseño y obtención de un material a base de hule de silicona que sea capaz de cargar y liberar fármacos antifúngicos de naturaleza poliénica, con el objetivo de prevenir la formación de biofilms en dispositivos médicos implantables a causa del hongo *Candida albicans*.

El nuevo material polimérico desarrollado, comprende un elastómero conocido como hule de silicona, cuya superficie es injertada con glicidilmetacrilato vía radicales libres utilizando radiación gamma. El copolímero de injerto obtenido SR-g-GMA, conserva las propiedades del hule de silicona pero contiene en su superficie los grupos epóxido del glicidilmetacrilato, los cuales son clave para que moléculas de ergosterol se unan al copolímero mediante enlaces covalentes. La presencia de ergosterol en el copolímero, facilita la carga de fármacos como natamicina y nistatina, debido a la alta afinidad que estos fármacos muestran por el ergosterol.

Para el diseño de este material, nosotros concentramos nuestra atención en el mecanismo de acción de fármacos de naturaleza poliénica como natamicina, anfotericina B y nistatina sobre la célula del hongo. Estos fármacos actúan enlazándose al ergosterol, un componente esencial de la célula del hongo. Esta interacción causa alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular debido a la formación de poros o canales a través de los

cuales el contenido citoplasmático escapa, provocando eventualmente la muerte celular.

En la síntesis del copolímero de injerto se hizo uso de radiación gamma, aplicando el método de preirradiación oxidativa. La alta penetración de los rayos gamma en la matriz polimérica, permite la rápida creación de radicales libres en el polímero sin el uso de iniciadores. Este, es un método limpio y rápido en donde el copolímero puede ser fácilmente aislado. Finalmente, la inmovilización de ergosterol en el copolímero de injerto, fue lograda utilizando trifluoroboroeterato, un ácido de Lewis que cataliza la apertura del anillo por parte del ergosterol.

El nuevo sistema desarrollado (figura 1) permite que la liberación del fármaco se produzca mediante un mecanismo competitivo en donde el ergosterol presente en el copolímero y el que se encuentra en la membrana celular del hongo, compiten por el fármaco antifúngico.

Los resultados de carga y liberación muestran que la presencia de ergosterol en el copolímero de injerto de glicidilmetacrilato en hule de silicona SR-g-GMA incrementó notablemente la carga de los fármacos natamicina y nistatina. Sin embargo, la nistatina parece tener una mejor afinidad por el sistema desarrollado.

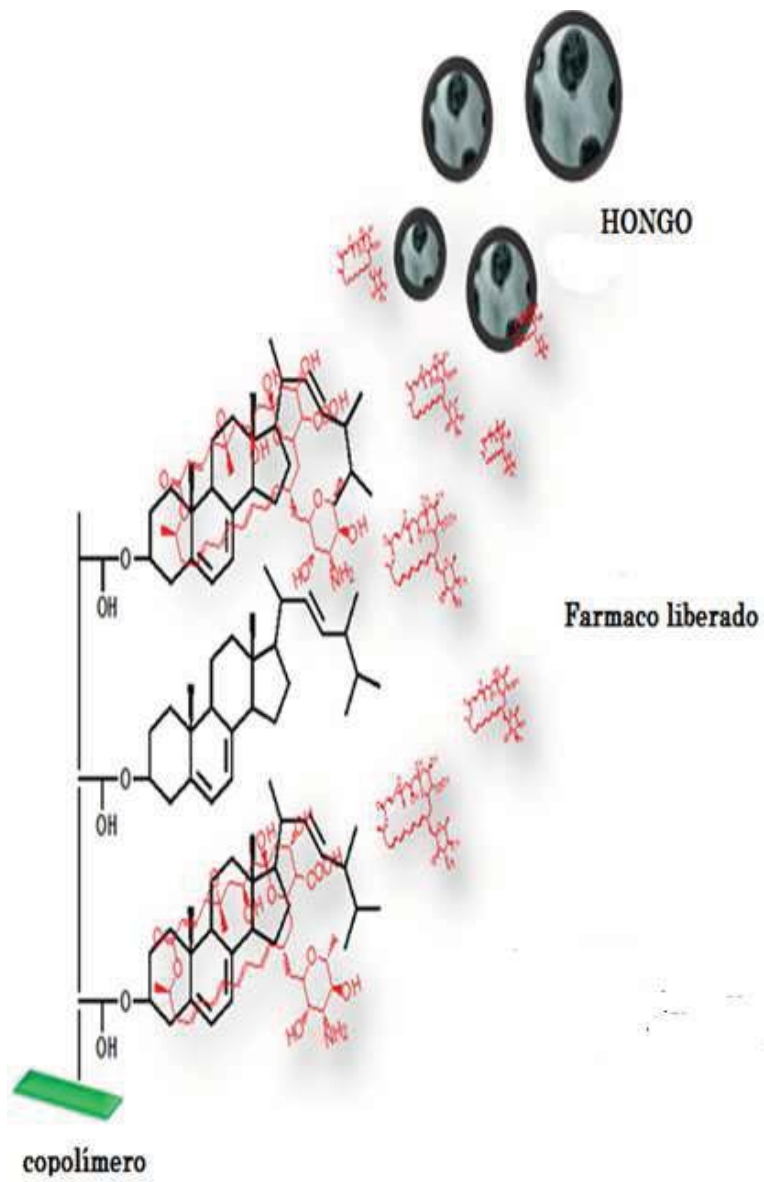


Figura 1. Sistema para carga y liberación de fármacos antifúngicos.

2. GENERALIDADES

2.1. POLIMERIZACIÓN VIA RADICALES LIBRES

La polimerización vía radicales libres, es una técnica versátil ampliamente usada en la polimerización de monómeros insaturados. Este, es un proceso en cadena en donde las especies activas son radicales libres y se caracteriza por formar polímeros de alto peso molecular, inmediatamente después de que la reacción comienza. La polimerización vía radicales libres, involucra un mecanismo de tres pasos: *iniciación*, *propagación* y *terminación* y durante este proceso se observa poca variación en la longitud promedio de las cadenas y una disminución continua de la concentración de monómero (*Young et al, 2011; Painter et al, 1997*).

La *iniciación* (figura 2) comprende la formación de una especie radical producto de la descomposición térmica, fotoquímica o química de una molécula denominada iniciador (figura 2a) (Tabla 1) y la consecuente obtención de un centro activo cuando el iniciador reacciona con una molécula de monómero (figura 2b).

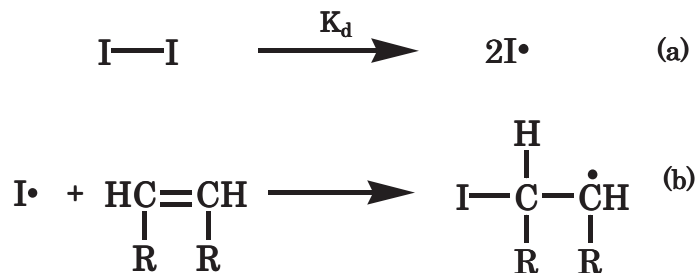


Figura 2. Etapa de iniciación

Tabla 1. Ejemplos de iniciadores empleados en la polimerización vía radicales libres

| INICIADORES | |
|---------------------|-------------------------------------|
| tipo | ejemplo |
| peróxidos | peróxido de benzoilo |
| compuestos azo | azobisisobutironitrilo |
| sistemas redox | persulfato+bisulfito |
| fotoquímico | luz UV |
| radiación ionizante | rayos gamma o electrones acelerados |

La etapa de *propagación* (figura 3) ocurre a través de una larga secuencia de eventos idénticos en donde las unidades de monómero se adicionan de manera consecutiva una tras de otra al centro activo, generando así el crecimiento de las cadenas.

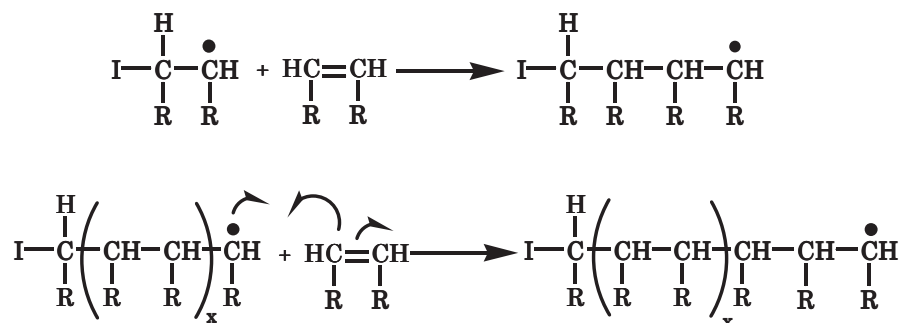


Figura 3. Propagación

La etapa de *terminación* puede ocurrir mediante dos diferentes mecanismos, *recombinación* (figura 4) o *desproporción* (figura 5). El más importante es la recombinación, que implica una interacción bimolecular entre dos centros activos, generando la formación de un enlace covalente entre dos cadenas en crecimiento. En la desproporción, un protón en la posición β al sitio activo de una cadena en crecimiento, es transferido a otra

cadena en crecimiento generando al final dos cadenas terminadas. En este caso una cadena terminada tendrá un carbono insaturado y la otra cadena será saturada.

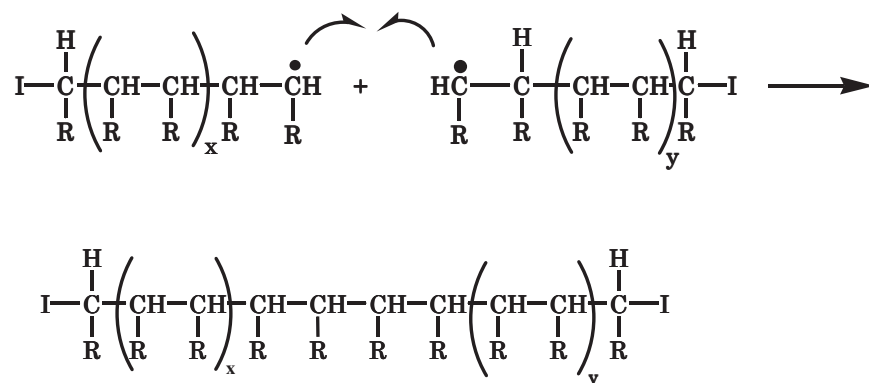


Figura 4. Terminación por recombinación

En el proceso de terminación la reacción de desproporción compite con la recombinación. Pero la desproporción se prefiere cuando los sustituyentes son voluminosos porque las olefinas están menos impedidas que los correspondientes compuestos saturados.

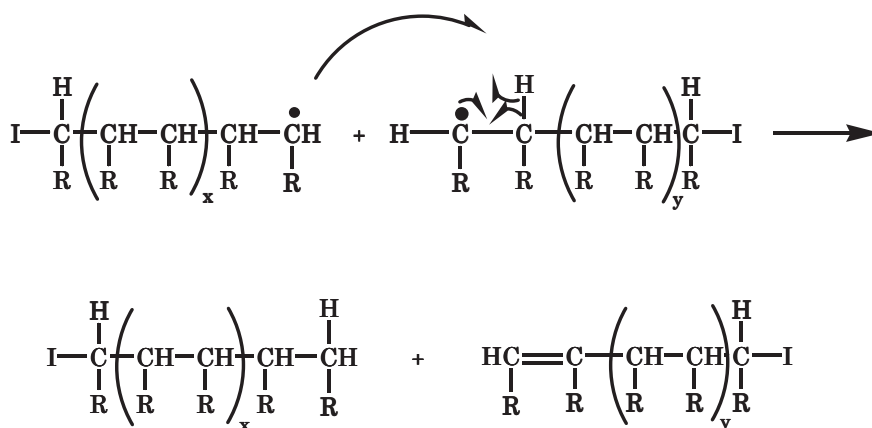


Figura 5. Terminación por desproporción

Durante el proceso de polimerización puede ocurrir una etapa de terminación previa denominada ***transferencia de cadena***, que conlleva a la formación de un polímero de cadena más corta de lo que se esperaba o con bajo peso molecular. Este proceso es característico de la polimerización en solución y se produce por la transferencia del centro activo de una cadena en crecimiento a otra molécula que puede ser el iniciador, el monómero, el polímero o bien el disolvente. La molécula entonces produce un nuevo radical y si es suficientemente activa generará una nueva cadena.

La polimerización vía radicales libres que se lleva a cabo en masa o en soluciones concentradas se caracteriza por presentar un efecto de autoaceleración conocido como ***efecto Trommsdorff o efecto gel***. Este efecto se distingue por presentar un marcado incremento en la velocidad de polimerización hacia el final de la reacción, en lugar de la reducción gradual esperada causada por la disminución en la concentración del monómero y el iniciador. Este efecto de autoaceleración, es un resultado directo del incremento de la viscosidad del medio que limita la difusión, impidiendo el paso de terminación, causando un aumento en el peso molecular de las cadenas que aún no han sido terminadas y provocando alta polidispersidad de los productos finales (*Cowie y Arrighi, 2001*).

2.2. RADIACIÓN GAMMA Y POLIMERIZACIÓN

La irradiación de monómeros y de materiales poliméricos ha sido un campo de extensa investigación debido a las modificaciones útiles que la radiación gamma puede inducir en ellos. La polimerización vía radicales libres inducida por rayos gamma difiere significativamente de aquellas efectuadas por iniciación térmica, química o fotoquímica. Con la radiación gamma la polimerización se puede realizar a temperatura ambiente y sin la presencia de un iniciador, incluso se puede llevar a cabo a bajas

temperaturas sin necesidad de adicionar sustancias extrañas a la mezcla de polimerización, además algunos monómeros sensibles pueden ser polimerizados sin efectos térmicos adversos (*Makuchi et al, 2012; Ivanov, 1992*).

Los principales cambios químicos observados durante la irradiación de polímeros son el proceso de degradación y el entrecruzamiento. El primero es ocasionado por la ruptura homolítica de los enlaces C-C, resultando en compuestos de bajo peso molecular, mientras que el entrecruzamiento se da por la recombinación de macroradicales (figura 6). Otros procesos como la evolución de ciertos gases y la creación de dobles enlaces también llegan a estar presentes.

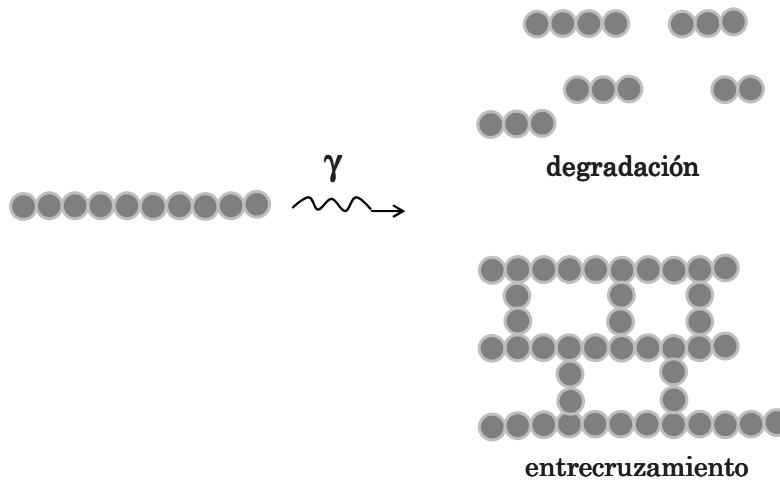


Figura 6. Procesos de degradación y entrecruzamiento

Los procesos de degradación y entrecruzamiento a menudo se presentan de forma simultánea en un polímero. Sin embargo, dependiendo de las condiciones de irradiación y la naturaleza química del polímero, uno de estos procesos puede ser predominante. Por ejemplo, se ha observado que los polímeros vinílicos que presentan un carbono tetrasustituido en alguna

unidad monomérica, experimentan degradación mientras que los polímeros cuya cadena principal contiene átomos de carbono sustituidos con al menos un átomo de hidrógeno, son susceptibles al entrecruzamiento (*Chapiro, 1962*).

2.3. INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN CON LA MATERIA.

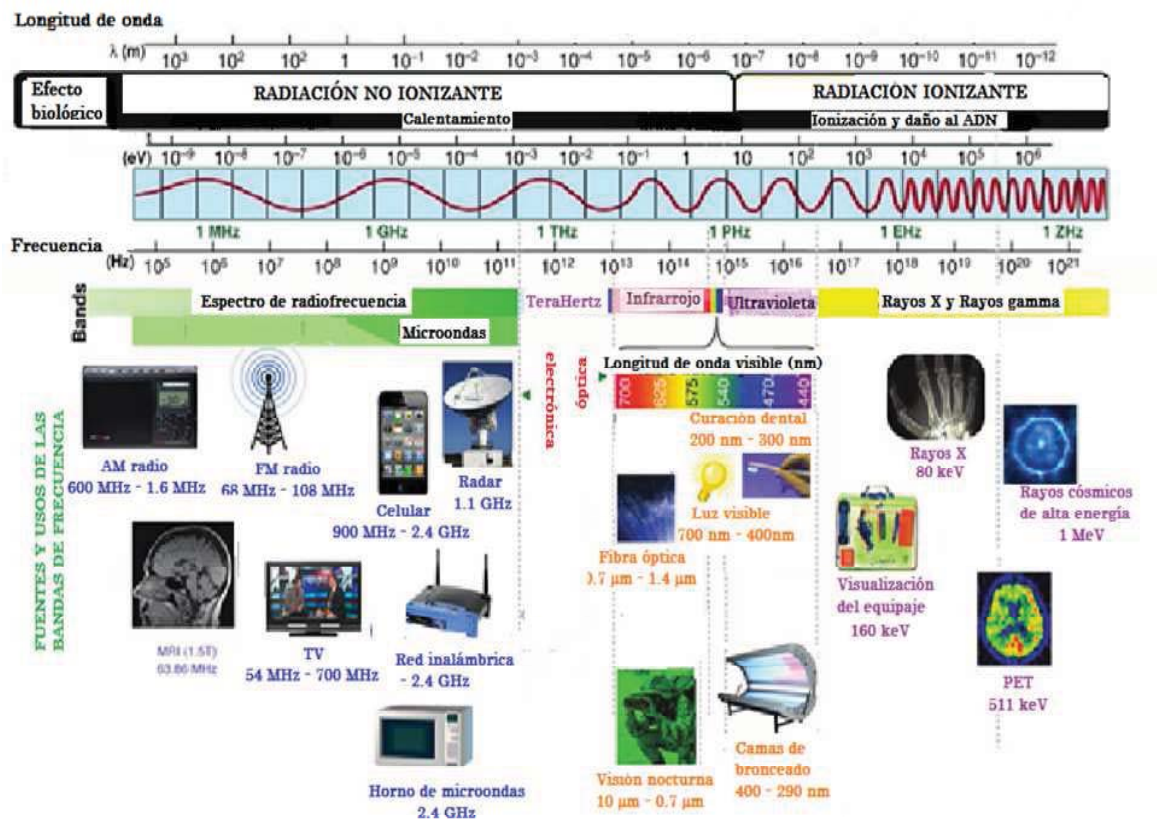


Figura 7. Espectro electromagnético

Los rayos gamma son un tipo de radiación ionizante emitidos por fuentes radioactivas, con longitudes de onda corta en la región del espectro electromagnético de 3×10^{-9} cm a 3×10^{-11} cm, en términos de energía ($E=hc/\lambda$) este intervalo llega a ser de aproximadamente 40 keV a 4 MeV (figura 7). Las

principales fuentes de rayos gamma comerciales son los isótopos **Cobalto 60** y **Cesio 137** (figura 8). El Cobalto 60 se obtiene a partir del isotopo estable Co 59 al ser expuesto a un flujo de neutrones, tiene una vida media de 5.24 años y decae a Níquel 60, esencialmente por la emisión de partículas β^- de 0.314 MeV emitidos por más del 99% de los átomos mientras que el 0.01% restante, emite partículas β^- de 1.488 MeV. El Níquel excitado alcanza su estado basal por emisión de rayos gamma de 1.173 MeV y 1.33 MeV.

El Cesio-137 se produce mediante fisión nuclear, tiene una vida media de 33 años y el 92% de sus átomos decaen a Bario 137, emitiendo partículas β^- de 0.514 MeV. El Bario 137 excitado o metaestable tiene una vida media de 2.6 minutos y experimenta una transición isomérica alcanzando su estado estable, al emitir un rayo gamma de 0.66 MeV. El 8% de los átomos de Cesio 137 restantes emiten partículas β^- de 1.17 MeV, cayendo directamente a Bario 137 estable. (Navarrete y Cabrera, 1993)

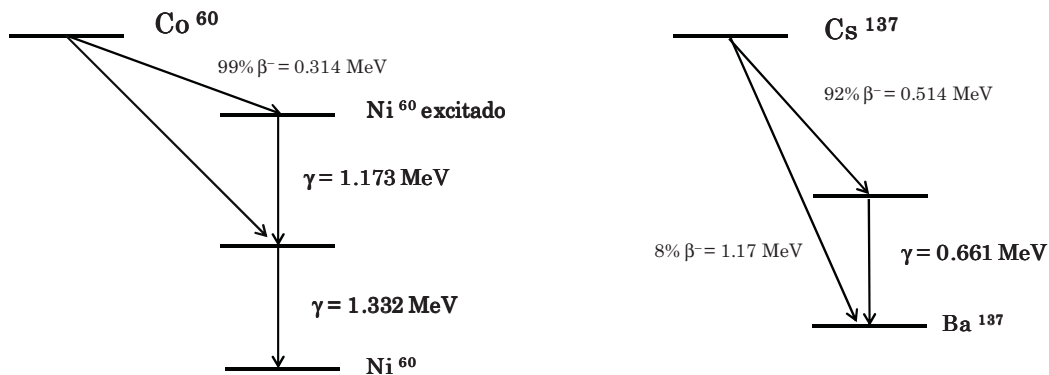
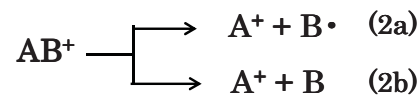


Figura. 8. Diagrama de decaimiento radioactivo de Co^{60} y Cs^{137} .

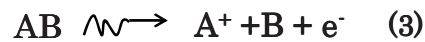
Cuando los rayos gamma u otro tipo de radiación ionizante interaccionan con las moléculas, aquellos pierden su energía por la interacción con los electrones, los cuales son expulsados de su órbita mediante un proceso

conocido como **ionización** o bien, pasan a un nivel de energía superior, fenómeno conocido como **excitación** (Chapiro, 1962).

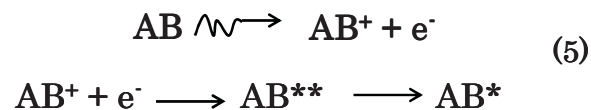
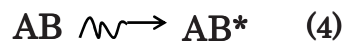
La ionización de moléculas puede generar iones positivos (1) si la energía que es liberada en la interacción es más grande que la energía de enlace del electrón que se va a expulsar. Estos iones positivos pueden o no llevar un exceso de energía, por lo tanto son a menudo inestables y pueden experimentar procesos de disociación, generando radicales (2a) o moléculas estables (2b).



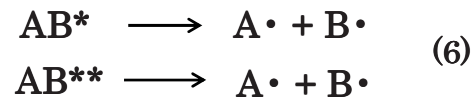
La interacción de la radiación ionizante con una molécula puede también permitir un proceso de ionización disociativa, en el cual las reacciones primarias 1, 2a y 2b ocurren casi simultáneamente (3).



La radiación ionizante puede producir moléculas excitadas directa (4) o indirectamente, mediante la neutralización de los iones formados por la ionización de la molécula (5).



Las moléculas altamente excitadas (AB^{**}) pierden rápidamente parte de su energía a través de colisiones con otras moléculas, cayendo a estados excitados de menor energía (AB^*) similares a aquellos que se forman en procesos fotoquímicos, pero ambas especies pueden dar lugar a la formación de radicales libres (6).



Los posibles mecanismos que tienen lugar cuando la radiación ionizante disipa su energía sobre la materia son *el efecto fotoeléctrico, el efecto Compton y la producción de pares* (Spinks et al, 1976).

El efecto fotoeléctrico (figura 9) tiene lugar cuando un fotón de baja energía E_0 (< 0.1 MeV) transfiere toda su energía, a un electrón que se encuentra en una de las capas internas del átomo. El electrón es expulsado del átomo con una energía igual a la diferencia entre la energía del fotón y la energía de enlace E_s del electrón en el átomo.

$$E_e = E_0 - E_s$$

La vacante creada por el electrón expulsado será cubierta por un electrón proveniente de una capa externa con la emisión de radiación X o un electrón de baja energía conocido como electrón Auger.

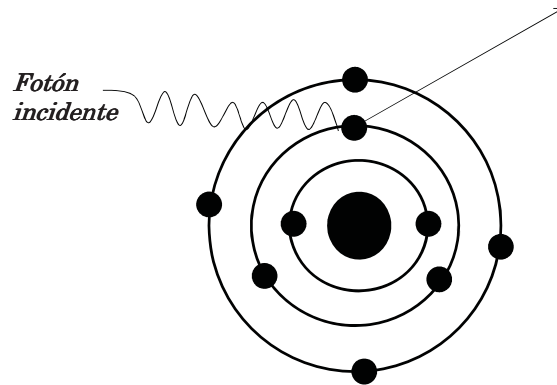


Figura 9. Efecto fotoeléctrico.

El efecto Compton (figura 10) ocurre cuando un fotón cuya energía es >1 MeV interactúa con un electrón, el electrón es acelerado y expulsado mientras que el fotón es desviado llevando menor energía y acaba siendo absorbido mediante el efecto fotoeléctrico.

El efecto Compton predomina para fotones cuya energía se encuentra entre 1 MeV y 5 MeV en materiales de alto número atómico (alto valor de Z) y en un intervalo más amplio en materiales de bajo número atómico (bajo valor de Z).

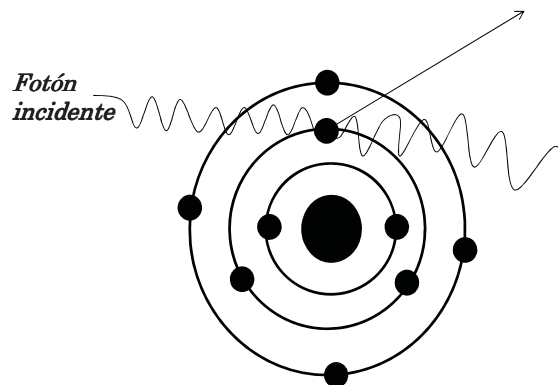


Figura 10 Efecto Compton.

La producción de pares (figura 11) involucra la absorción completa de un fotón en la vecindad del núcleo atómico, con la producción de dos partículas: un electrón y un positrón. El electrón causa ionización, mientras que el positrón se aniquila cuando interacciona con un electrón, produciéndose dos rayos gamma cuya energía es de 0.51 MeV.

La producción de pares solo puede ocurrir en fotones con una energía ≥ 1.02 MeV ya que para que este fenómeno tenga lugar, se requiere al menos una energía equivalente a la suma de las energías de las partículas formadas ($0.51 \text{ MeV} + 0.51 \text{ MeV} = 1.02 \text{ MeV}$).

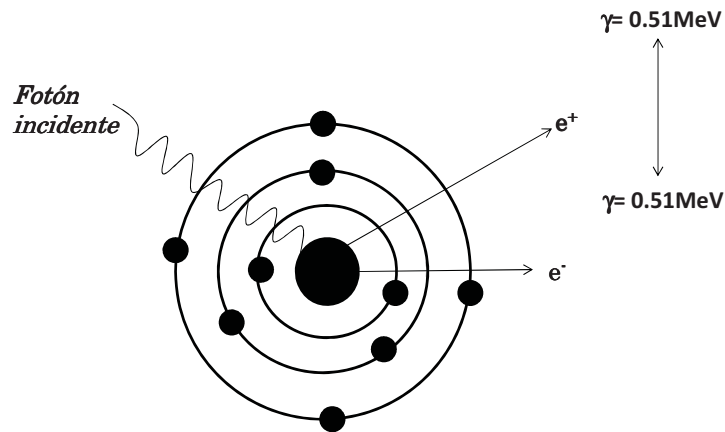


Figura 11. Producción de pares

En la figura 12 se resumen los efectos anteriormente explicados y que predominan cuando los rayos gamma inciden sobre la materia en función de la energía del fotón incidente. Como se observa en el gráfico, estos efectos se van a presentar dependiendo de la energía del fotón incidente y el valor de Z.

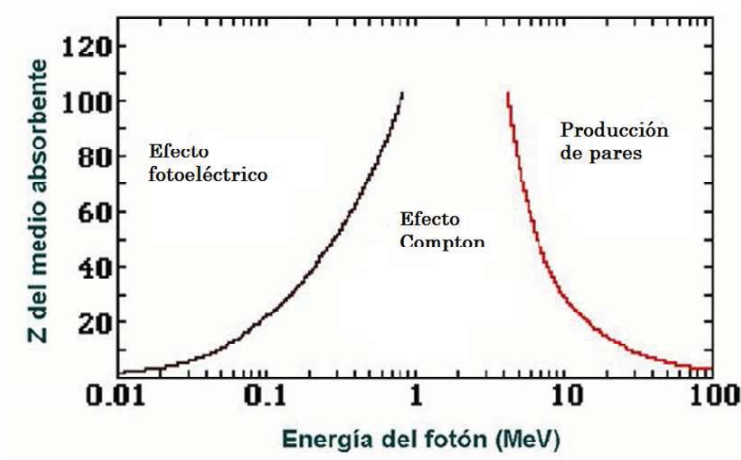


Figura 12. Regiones de predominio de los tres principales mecanismos que se presentan cuando la radiación ionizante interactúa con la materia. (Tomado de tesis doctoral de Susana Castillo UNAM, 2003).

Un parámetro de suma importancia para cuantificar los cambios químicos que experimenta la materia por efecto de la radiación, es el rendimiento radioquímico **G**. El valor de G indica el número de eventos químicos individuales que se producen por cada 100 eV de energía absorbida.

$$G(X) = \text{No. de eventos químicos} / 100 \text{ eV}$$

Estos eventos pueden referirse al número de moléculas, radicales o iones producidos o destruidos. El valor de G comprende valores de 0.1 hasta 10 y más adelante será abordado nuevamente para mostrar su utilidad en la irradiación de polímeros y monómeros.

2.4. COPOLIMERIZACIÓN

Este proceso permite obtener un nuevo material que combina las propiedades físicas y químicas de dos o más polímeros. Dependiendo del proceso de copolimerización, se pueden obtener diferentes arquitecturas como copolímeros de injerto, de bloque, alternados o al azar (Figura 13).

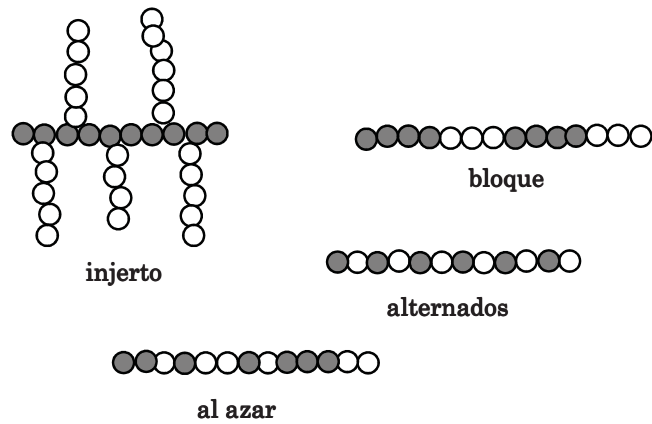


Figura 13. Copolímeros y sus diferentes arquitecturas

En este trabajo nuestro interés se centrará en los copolímeros de injerto, una clase de heteropolímeros ramificados que se construyen principalmente a partir de una cadena polimérica a la cual varias unidades de un monómero de naturaleza química diferente a la cadena polimérica principal, se unen de manera sucesiva mediante enlaces covalentes, formando ramificaciones. Cuando los centros reactivos se generan en el polímero y a partir de estos las cadenas pueden crecer se dice que el injerto es “*grafting from*” pero si las cadenas en crecimiento se unen a un polímero conteniendo centros activos se dice que el injerto es “*grafting onto*” (figura 14)

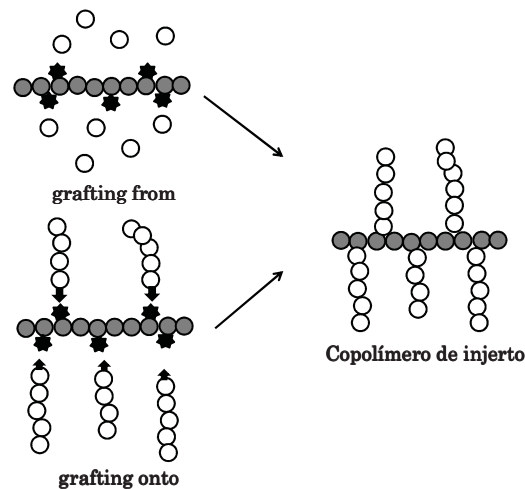


Figura 14. Mecanismos mediante los cuales puede proceder el injerto

2.5. COPOLIMERIZACIÓN DE INJERTO

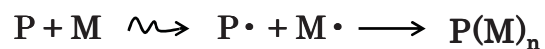
En los últimos años, la técnica de copolimerización de injerto ha cobrado gran relevancia en la funcionalización de superficies poliméricas debido a las interesantes propiedades que pueden ser incorporadas a un polímero mediante esta técnica. Actualmente se conocen y se encuentran descritos en la literatura diversos métodos para llevar a cabo procesos de copolimerización de injerto, tales como: ozonización, radiación-UV, plasma, métodos químicos o radiación ionizante como pueden ser rayos gamma o electrones acelerados. (Batthacharya et al, 2004; Kato et al, 2003; Batacharya et al, 2009).

2.6. COPOLIMERIZACIÓN DE INJERTO MEDIANTE RADIACIÓN GAMMA

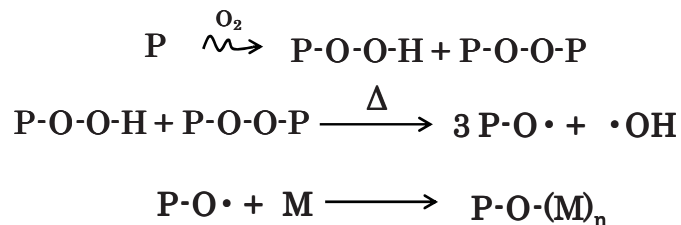
Como ya fue descrito anteriormente, la radiación gamma puede causar la ruptura homolítica de los enlaces covalentes que conforman un polímero generando macroradicales. Este fenómeno químico ha sido ampliamente aprovechado para llevar a cabo procesos de copolimerización de injerto con una inmensa variedad de polímeros y monómeros. El uso de radiación

ionizante en la síntesis de copolímeros de injerto fue introducido durante la segunda mitad de los años 50, por Adolph Chapiro y Arthur Charlesby quienes habían estado estudiando previamente la irradiación de algunos polímeros. Ambos investigadores lograron llevar a cabo el injerto de acrilonitrilo en polietileno y establecer los métodos de injerto que hasta hoy siguen siendo utilizados en la modificación de polímeros (*Chapiro, 1998*), estos métodos son conocidos como: pre-irradiación, peroxidación o preirradiación oxidativa y método directo (*Stannet et al, 1989*).

(a) Método directo



(b) Método de peroxidación



(c) Método de preirradiación

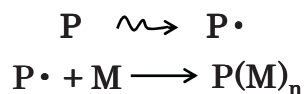


Figura 15. Métodos de irradiación de polímeros

En el *método directo o método simultáneo* el polímero y una solución de monómero se irradian al mismo tiempo preferentemente a vacío, generándose radicales libres en ambos, el polímero y el monómero los cuales reaccionan inmediatamente, iniciando el crecimiento de las cadenas injertadas. La reacción puede ocurrir a temperatura ambiente o baja temperatura. Una de

las complicaciones de este método es que el monómero puede reaccionar entre sí generando homopolímero, provocando que el injerto disminuya. Para evitar esta reacción secundaria en ocasiones se utiliza un inhibidor que retarda la homopolimerización, como la sales de hierro (*Nasef y Hagazy, 2004; Hegazy et al, 1985*).

En el **método de peroxidación o preirradiación oxidativa**, el polímero es irradiado en la presencia de aire u oxígeno. Bajo tales condiciones se forman en el polímero peróxidos e hidroperóxidos. El paso de injerto es llevado a cabo más tarde, cuando estas especies son activadas mediante calentamiento térmico para formar radicales que reaccionan en ausencia de oxígeno, con una solución de monómero presente en él medio. Mediante éste método, el polímero irradiado puede ser almacenado por largos periodos de tiempo a bajas temperaturas antes de llevar a cabo el paso de injerto, otra de las ventajas de este método es que el monómero no es expuesto a la radiación, con lo cual se minimiza la formación de homopolímero, aunque éste no puede ser erradicado completamente debido a la formación durante la descomposición térmica del radical OH encargado de activar la homopolimerización (*Enomoto et al, 2010*)

En el **método de preirradiación** el polímero se irradia en vacío o en la presencia de un gas inerte para formar radicales libres y posteriormente es puesto en contacto con el monómero en fase vapor o en fase líquida. Los radicales formados en el polímero inician la polimerización. Como el monómero no se irradia junto con el polímero la formación de homopolímero no es factible, a diferencia del método de peroxidación, en donde la presencia del radical OH pudiera favorecer la formación de homopolímero. Sin embargo, la técnica tiene baja eficiencia ya que durante y después de la irradiación muchos de los radicales formados se recombinan antes de que el

monómero pueda reaccionar con estos, además mantener condiciones libres de oxígeno durante el proceso llega a ser complicado (*Wojnarovits et al, 2010*)

Los parámetros que se deben considerar cuando se desea hacer uso de cualquiera de los métodos arriba mencionados son: ***la razón de dosis, la dosis de irradiación, la temperatura, la concentración de monómero y el disolvente***, puesto que se ha comprobado que estos parámetros influyen directamente sobre el proceso de injerto (*Battacharya y Misra, 2004*). Además, al seleccionar el método de irradiación y las condiciones de reacción, es indispensable tomar en cuenta la naturaleza del monómero y de la matriz polimérica. En este sentido el concepto de rendimiento radioquímico resulta útil ya que conociendo los valores de **G** para ambos polímero y monómero se puede seleccionar el método de irradiación adecuado para llevar a cabo el injerto. El rendimiento radioquímico, permite predecir y establecer si durante el proceso se va a favorecer la formación del copolímero o la del homopolímero. La copolimerización se favorece cuando el rendimiento radioquímico del polímero es más grande que la del monómero. En contraste la homopolimerización se incrementa cuando el rendimiento radioquímico del monómero es más grande que el del polímero (*Chapiro, 2002*)

2.6.1. PARÁMETROS QUE INFLUYEN EN EL INJERTO

2.6.1.1. DOSIS

La cantidad de energía que absorbe un material cuando este se irradia, se conoce como **dosis D** y se expresa en términos de Grays, (1 Gray equivale a 1 J/kg) o rads (1 rad es igual a 100 erg/g o 0.01 Gray). La dosis es una medida directa de la transferencia de energía al material irradiado, capaz de producir cambios químicos y físicos en este. En el proceso de copolimerización de injerto conforme aumenta la dosis de irradiación se produce una mayor cantidad de radicales libres en la matriz polimérica, lo que conlleva

directamente a un aumento en el grado de injerto. Sin embargo, el grado de injerto puede decaer conforme aumenta la dosis, debido a diferentes factores tales como: la recombinación de los macrorradicales formados, la degradación de la matriz polimérica o bien en el caso del método simultaneo una disminución en la concentración de monómero debido a que la homopolimerización se ve igualmente favorecida porque el monómero está directamente expuesto a la radiación.

2.6.1.2. RAZÓN DE DOSIS

La razón de dosis **I**, representa la dosis absorbida por unidad de tiempo y tiene las unidades Gray/h o rad/h. Este parámetro determina la velocidad de iniciación de polimerización, controla la cinética de polimerización y a consecuencia de ello controla el número y el tamaño de las cadenas injertadas. Si se emplea una razón de dosis baja entonces se da suficiente tiempo para que los radicales libres sobrevivan y las cadenas de polímero crezcan. Sin embargo, a una razón de dosis alta los radicales libres tienden a decaer más rápidamente por recombinación y en consecuencia hay menos sitios activos para el crecimiento de las cadenas. En algunos casos cuando se utiliza el método directo se puede observar una disminución en el grado de injerto cuando se incrementa la razón de dosis debido a la gran densidad de radicales que favorecen la homopolimerización y la gelación del medio.

2.6.1.3. TEMPERATURA

La temperatura es considerada uno de los factores importantes que influyen en el proceso de injerto, principalmente en el método de preirradiación oxidativa. Esto debido a que es responsable de la disociación de los radicales peroxi, necesarios para iniciar la reacción de injerto. Temperaturas muy altas pueden ocasionar una rápida difusión de las moléculas de monómero causando muy altas velocidades de injerto

obteniendo un grado de injerto alto. Sin embargo, a altas temperaturas también se puede dar el decaimiento de los radicales libres atrapados en la matriz polimérica, generando entonces un bajo grado de injerto.

2.6.1.4. MONÓMERO

Un incremento en la concentración de monómero involucra a menudo un aumento en el grado de injerto. Sin embargo, la disminución en el grado de injerto se puede deber a la formación de homopolímero en la solución, lo que permite un incremento en la viscosidad del medio provocando la retardación de la difusión del monómero a través de la matriz polimérica. El monómero también puede actuar como agente de transferencia de cadena favoreciendo la etapa de terminación.

2.6.1.5. DISOLVENTE

El disolvente es responsable del hinchamiento del polímero y de la difusión del monómero a través del polímero. Si el disolvente hincha el polímero eficientemente, el monómero difundirá fácilmente a través de este, llegando a los sitios activos favoreciendo el injerto. Si el disolvente tiene una constante de transferencia de cadena alta, el paso de terminación se llevará a cabo rápidamente permitiendo un grado de injerto bajo. Sin embargo, si la constante de transferencia de cadena es baja se favorece el paso de propagación permitiendo grados de injerto altos.

2.7. SILICONAS

Las siliconas o polisiloxanos son una clase de polímeros sintéticos compuestos de una cadena principal de átomos alternados de silicio y oxígeno Si-O-Si. Los átomos de silicio que conforman la cadena principal suelen estar unidos a grupos orgánicos, por ejemplo, grupos metilo. A esta clase de polisiloxanos se les conoce como polidimetilsiloxanos PDMS.

La estructura de los polisiloxanos se presentan en tres diferentes formas: lineales, entrecruzados y cíclicos (figura 16). Los polisiloxanos lineales son fluidos y su viscosidad depende de su peso molecular, los polisiloxanos entrecruzados son redes tridimensionales y son mejor conocidos como elastómeros mientras que los polisiloxanos cíclicos son utilizados para la síntesis de polisiloxanos lineales (Colas et al, 1996).

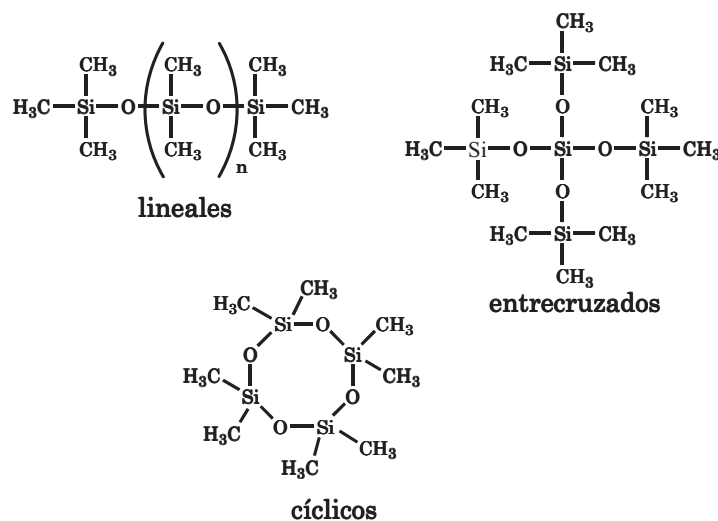


Figura 16. Diferentes arquitecturas de PDMS

Los polisiloxanos exhiben una serie de propiedades excepcionales que no se encuentran en otra clase de polímeros, tales como: estabilidad térmica, una temperatura de transición vítrea muy baja, alta hidrofobicidad y baja tensión superficial solo por mencionar algunas. Ciertas propiedades de estos polímeros pueden llegar a explicarse observando las interacciones entre las unidades y los enlaces químicos que conforman su estructura. La excelente estabilidad térmica se debe principalmente a que el enlace Si-O tiene una energía de enlace muy alta alrededor de 110 kcal/mol (ver tabla 2) y presenta una alta tendencia a la ionización, aproximadamente 50%. Los polisiloxanos además se caracterizan por tener una temperatura de transición vítrea T_g

baja, por ejemplo el hule de silicona, un PDMS entrecruzado, exhibe una Tg de -123°C, esto debido al valor tan alto del ángulo Si-O-Si (140°) y a la longitud del enlace Si-O $1.64 \text{ \AA} \pm 0.03$ que le permite al polímero tener cadenas flexibles y libre rotación alrededor del enlace Si-O. Por otro lado la presencia de grupos alquilo alrededor de la cadena principal Si-O-Si explica su carácter hidrofóbico y su baja tensión superficial.

Tabla 2. Energías de enlace

| Enlace | Energías de enlace kcal/mol |
|--------|-----------------------------|
| Si-O | 110 |
| C-O | 85.5 |
| C-C | 82.6 |
| Si-C | 76 |

2.7.1 EFECTO DE LA RADIACIÓN IONIZANTE EN PDMS

Los principales enlaces que pueden llegar a romperse cuando el PDMS es expuesto a la radiación de alta energía son Si-O, a causa de la ruptura de la cadena principal o C-H y Si-CH₃ debido a la abstracción de hidrogeno o del grupo metilo respectivamente (figura 17). Los macroradicales libres que se forman pueden experimentar entrecruzamiento, mientras que los pequeños radicales producen algunos gases tales como: hidrógeno, metano y etano. Pero, en presencia de oxígeno se producen especies inactivas que no contribuyen al entrecruzamiento. La presencia de grupos aromáticos en la estructura de los PDMS ha mostrado una resistencia a la radiación. Este incremento en estabilidad se atribuye a la deslocalización de los electrones del enlace p dentro del anillo aromático, este fenómeno permite que el anillo aromático pueda absorber grandes cantidades de energía antes de que se rompa el enlace. (*Palsule et al, 2008; Sati et al, 2008*)

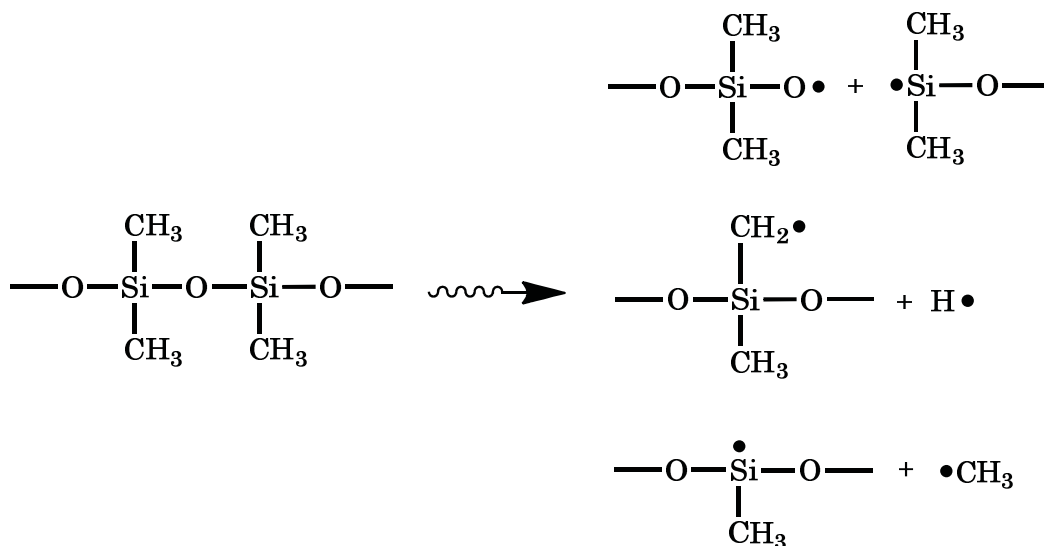


Figura 17. Principales rupturas de enlace en el PDMS, debido a la exposición a la radiación ionizante.

2.8 GLICIDILMETACRILATO

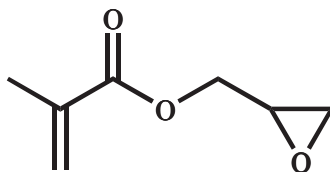


Figura18. Glicidilmetacrilato

El glicidilmetacrilato GMA (figura 18) es un éster vinílico derivado del ácido metacrílico. Este compuesto tiene una doble funcionalidad, ya que su estructura posee un doble enlace capaz de reaccionar vía radicales libres consigo mismo o con una matriz polimérica mediante copolimerización, a su vez contiene un grupo epóxido el cual puede reaccionar con moléculas de naturaleza nucleofílica. Debido a las interesantes características que presenta el glicidilmetacrilato, este ha sido utilizado para funcionalizar superficies poliméricas inertes, mediante el proceso de copolimerización de injerto (*Takács et al, 2012; Sekine et al; Sokker et al, 2009*), además la

apertura del grupo epóxido presente en su estructura, ha dado lugar a la inmovilización covalente de diversas moléculas de importancia biológica (Nava-Ortiz et al, 2009; Kartal et al, 2009; Baran-Teke et al, 2007).

2.9. ANTECEDENTES DE LA SINTESIS DEL COPOLÍMERO SR-g-GMA

El primero y único reporte de un injerto de glicidilmetacrilato en hule de silicona (SR) del que se tiene conocimiento, se publicó en 2001. En este se describe el uso de plasma para obtener el injerto, el cual es posteriormente utilizado para la inmovilización de una proteína en su superficie (Volker et al, 2001). Las imágenes de microscopia electrónica de barrido SEM (Figura 19) muestran las limitaciones de la técnica de plasma ya que se puede observar claramente que el injerto se limita exclusivamente a la superficie sin cubrir completamente esta de manera homogénea.

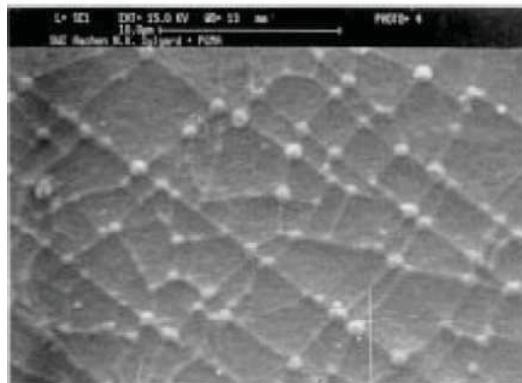


Figura 19. Imagen SEM del copolímero SR-g-GMA sintetizado con la técnica plasma.
(Tomado de Journal of Materials Science Materials Medicine 12, 2001, 111)

2.10. LIBERACIÓN DE FÁRMACOS EN MATERIALES POLIMÉRICOS.

La utilización de materiales poliméricos como soportes de principios activos para regular y dosificar su liberación ha cobrado gran relevancia. Estos materiales tienen la capacidad de liberar fármacos de forma modificada, es decir mediante la liberación no inmediata del fármaco. Los sistemas de liberación modificada, intentan desarrollar un esquema de entrega de fármacos al organismo que produzca un nivel terapéutico efectivo, de la manera más rápida posible y que luego esta concentración se mantenga durante un tiempo prolongado (figura 20) (Saez, 2004; Remington, 2002). Existen diferentes sistemas que son clasificados como de liberación modificada y algunos de estos son descritos en la tabla 3.

Tabla 3. Algunos tipos de sistemas de liberación modificada

| | |
|--|--|
| Liberación sostenida o prolongada | El fármaco es liberado lentamente a una velocidad regulada por el sistema. Desde el punto de vista de biodisponibilidad tiene como finalidad la prolongación de la duración de absorción del principio activo. |
| Liberación controlada | El fármaco se libera a una tasa constante y las concentraciones plasmáticas después de la administración no varían de forma significativa con el tiempo. |
| Liberación acelerada | La velocidad de liberación del fármaco es más rápida que la de una forma de liberación convencional destinada a la misma vía |
| Liberación retardada | La liberación del fármaco en el organismo no es inmediata ya que estos sistemas buscan mantener el fármaco dentro de su dosificación por algún tiempo antes de liberarlo. |

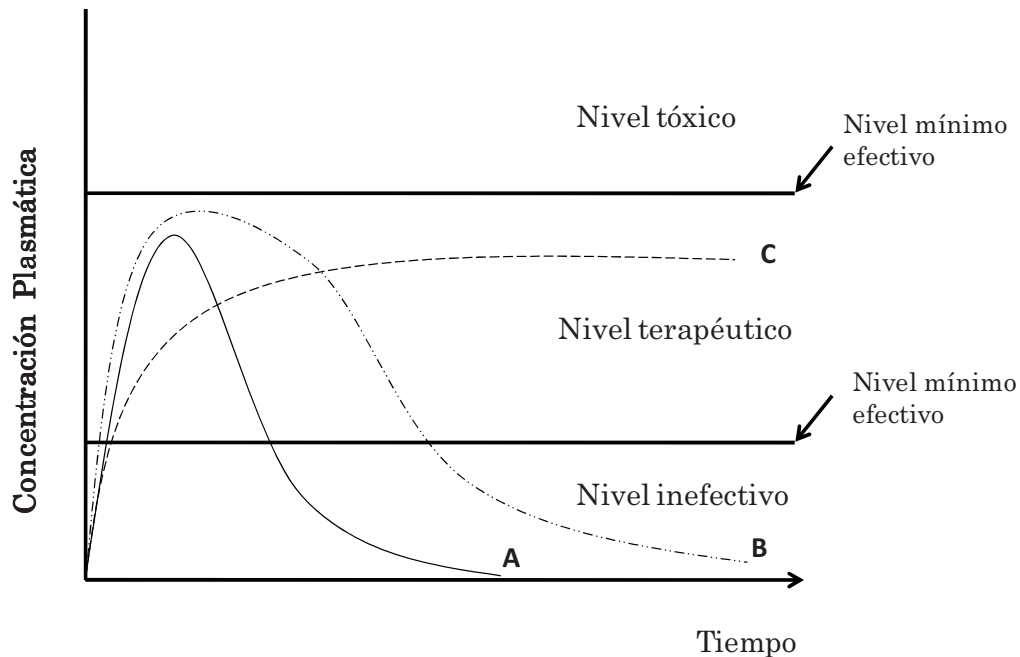


Figura 20. Perfiles de liberación de fármacos para diferentes sistemas. (A) Liberación convencional, (B) liberación prolongada, (C) liberación controlada.

Un buen ejemplo de sistemas de liberación modificada, lo comprenden los **sistemas implantables de liberación de fármacos**. Los cuales han sido desarrollados principalmente bajo un esquema de liberación controlada (Hoffman, 2008). Las ventajas de estos sistemas son múltiples, por ejemplo: la liberación local del fármaco se realiza a una velocidad constante, menos fármaco es requerido para tratar la enfermedad, ciertos efectos colaterales pueden ser minimizados y un incremento en la eficacia del tratamiento puede ser observado. Además, estos sistemas pueden ser capaces de proteger fármacos los cuales son inestables *in vivo* y que a su vez podrían requerir varios intervalos de dosificación (Alekha et al, 1998).

Los sistemas implantables de liberación de fármacos pueden ser puestos en dos categorías ***pasivos y activos*** (*Stevenson et al, 2012*):

Pasivos: un sistema en donde la liberación del fármaco es predeterminada por los materiales, métodos de formulación o formulación del fármaco y no puede ser controlada después de la implantación. Este tipo de sistemas utilizan como fuerza motriz la difusión, un potencial osmótico o gradientes de concentración.

Activos: Un sistema donde la liberación del fármaco es controlada después de la implantación mediante un efecto mecánico, eléctrico, laser u otros.

La efectividad de estos sistemas implantables de liberación de fármacos dependerá fuertemente de la forma y velocidad en la que el fármaco es liberado y esto vendrá determinado por el tipo de matriz polimérica dentro de la cual el fármaco es cargado, el tipo de fármaco utilizado (*Hupzey et al, 2007*).

Debido a la alta incidencia de infecciones a causa del uso de dispositivos médicos implantables se han llevado a cabo mejoramientos en estos sistemas bajo la combinación dispositivo implantable-antibiótico (*Wu et al, 2006*). Esto con la finalidad de crear sistemas implantables de liberación de antibióticos que puedan evitar la falla del dispositivo implantable a causa de la infección. Sin embargo, muchos de estos sistemas no son exitosos ya que no logran la cinética de liberación ideal. Una liberación ideal, debería asegurar concentraciones del antibiótico en el tejido blanco superior al valor de la concentración mínima inhibitoria *in vitro*, en un plazo lo suficientemente amplio para cubrir el periodo crítico que viene después de la implantación del dispositivo. Pero además, el antibiótico debería alcanzar una velocidad de liberación inicial alta bajo un perfil de liberación sostenida a fin de responder al elevado riesgo de infección (*Zilberman et al, 2008; Kwok et al, 1999*)

en la comida y clasificado como un compuesto GRAS (Generally Regarded As Safe). Así, la natamicina es usada en la industria alimentaria como preservativo de alimentos, en la prevención de contaminación de bebidas, quesos, frutas, carnes curadas y salchichas, extendiendo la vida de anaquel de estos productos. Debido a su baja toxicidad hacia las células de los mamíferos, la natamicina ha desempeñado un importante papel en la terapia antifúngica, trabajando en forma sinérgica con otros antifúngicos o compuestos antitumorales (*Bierhalz et al, 2010; Thomas et al, 2003*)

Como la mayoría de los antibióticos de naturaleza poliénica la estabilidad de la natamicina es afectada por la luz ultravioleta, pero también por condiciones de pH extremas, exposición al calor y oxidación. A valores de pH bajos, la natamicina se degrada produciendo micosamina por la hidrólisis del enlace glicosídico. Mientras que a valores de pH altos la lactona es rápidamente saponificada formando el ácido natamicoico, una molécula biológicamente inactiva.

2.13. NISTATINA

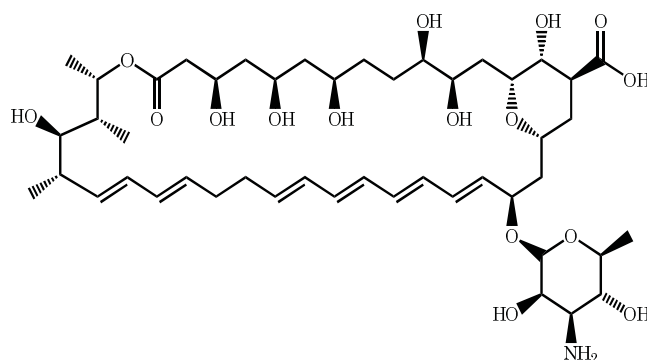


Figura 22. Nistatina

Al igual que la natamicina, la nistatina (figura 22) es un antibiótico, antifúngico aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para el

tratamiento de infecciones en la piel, la boca o de la vagina causadas por algunas especies del hongo *Candida*. Sin embargo, la estructura de nistatina por ser anfifílica y anfotérica, contribuye a la incompatibilidad con muchos otros fármacos y a una pobre solubilidad en medio acuoso (*Hac-Wydro et al, 2006*).

El mecanismo de acción de los antibióticos de naturaleza poliénica se deriva de los trabajos de De Kruijff y Demel sobre la interacción de algunos esteroides con la membrana celular. El mecanismo propone que los fármacos de naturaleza poliénica, forman complejos específicos con los esteroides de la membrana principalmente el ergosterol, generando canales transmembranales y poros que permiten una pérdida de iones y pequeñas moléculas de la célula, causándoles daño y finalmente la muerte al hongo. (*De Kruijff y Demel, 1974*).

2.14. ERGOSTEROL

El ergosterol (figura 23) es un compuesto de tipo esteroidal, componente de la membrana celular de los hongos. Además es un precursor de la vitamina D, se transforma a viosterol por acción de la luz ultravioleta y posteriormente en ergocalciferol que es una forma de la vitamina D (*Jusinghe et al, 2005*)

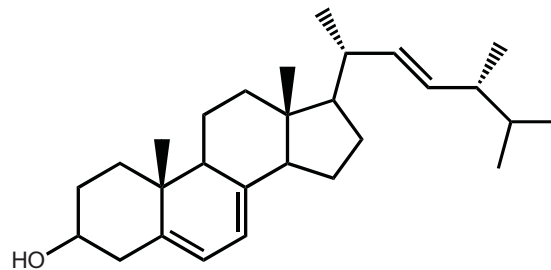


Figura 23. Ergosterol

3. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un nuevo sistema que permita la carga y liberación controlada de fármacos antifúngicos de naturaleza poliénica, mediante la síntesis y posterior modificación química, del copolímero de injerto SR-g-GMA.

3.1. OBJETIVOS PARTICULARES

Llevar a cabo la síntesis del copolímero SR-g-GMA utilizando radiación gamma a través del método de pre-irradiación oxidativa.

Evaluar cómo influyen los parámetros: dosis de irradiación, tiempo de reacción, concentración de monómero y temperatura de reacción en el porcentaje de injerto.

Inmovilizar ergosterol en el copolímero SR-g-GMA.

Llevar a cabo la caracterización del hule de silicona y de los sistemas obtenidos SR-g-GMA y (SR-g-GMA)-ergosterol.

Llevar a cabo las pruebas de carga y liberación de los fármacos antifúngicos: natamicina y nistatina.

4. HIPÓTESIS

Si los fármacos antifúngicos de naturaleza poliénica tienen una alta afinidad por el ergosterol, entonces será posible desarrollar un sistema de carga y liberación controlada de fármacos antifúngicos, mediante la inmovilización covalente de ergosterol a un copolímero SR-g-GMA.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1. METODOLOGÍA

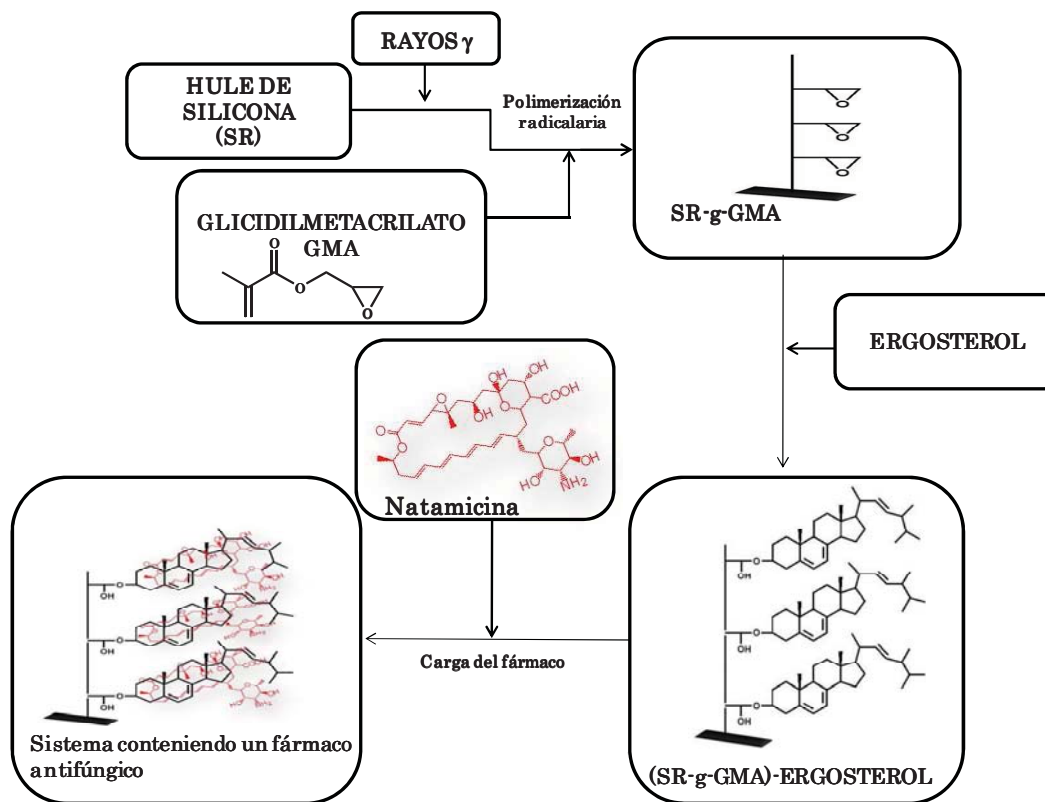


Figura 24. Diagrama de procedimiento

5.2. MATERIALES

El hule de silicona de 1 mm de espesor y una densidad de 1.1-1.5 g cm³, fue provisto por la compañía Goodfellow. El glicidilmetacrilato, el trifluoroboroeterato de etilo, el ergosterol, el HEPES (4-(2-hidroxietil)-piperazina 1-ácido etansulfónico y DOPC (1,2 diolil-sn-glicerol-3-fosfocolina) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co, (St. Louis MO, USA). El cloruro de sodio fue provisto por Panreac (Barcelona, España). La natamicina USP se obtuvo de AK Scientific (Union City CA, USA) y la nistatina de Alfa Aesar

(Karsruhe, Alemania). El GMA se destiló a presión reducida antes de usarse. Los disolventes como alcohol isopropílico, metanol, diclorometano y tetrahidrofurano, todos ellos grado analítico, se obtuvieron de Mallinckrodt Baker, México. El tetrahidrofurano fue secado con sodio metálico antes de su uso.

5.3. FUENTE DE RAYOS GAMMA

Para llevar a cabo la irradiación de las muestras se utilizó una fuente de ^{60}Co del irradiador GAMMABEAM 651-PT (Nordion International) ubicado en el Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM (figura 25).

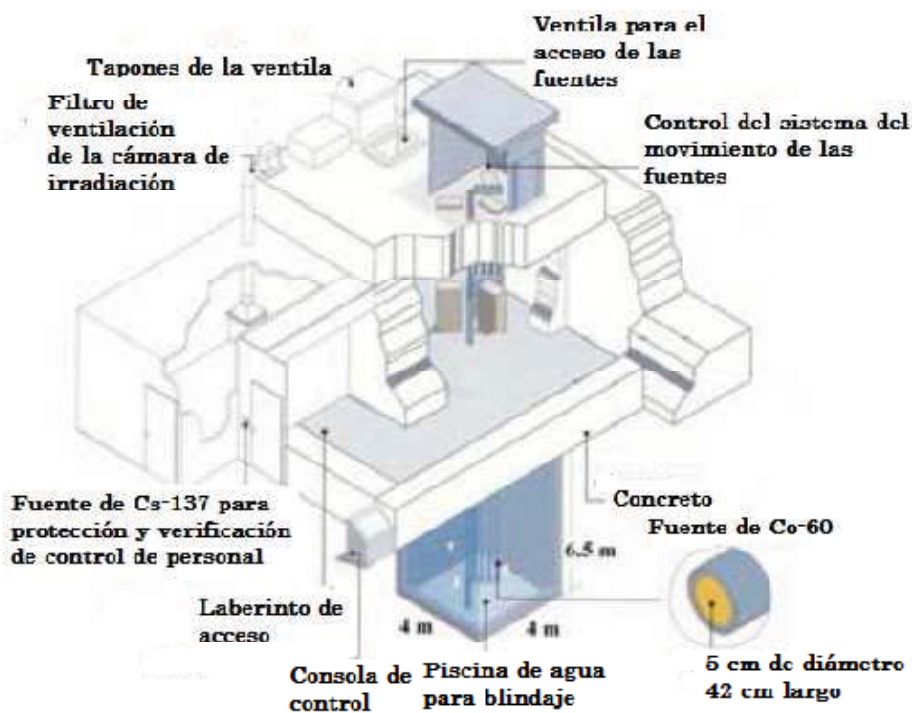


Figura 25. Irradiador gamma beam (651 PT, Nordion International)

5.4. METODOLOGÍA DE INJERTO

5.4.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PREVIO A LA IRRADIACIÓN.

El hule de silicona fue recortado en láminas de 1.1x5 cm. Las láminas fueron colocadas bajo agitación con alcohol isopropílico durante 24 h y posteriormente con diclorometano por 2 h para remover los aditivos que pudieran estar presentes. Después de terminar los lavados, las láminas fueron puestas a vacío para eliminar completamente el disolvente y para completar su secado, se colocaron en una estufa con vacío a 60 °C hasta obtener peso constante.

5.4.2. IRRADIACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las láminas secas y previamente pesadas fueron irradiadas en aire, utilizando una razón de dosis promedio de 13.5 kGy h⁻¹ con dosis de pre-irradiación entre 10 kGy a 120 kGy.

5.4.3. INJERTO

Las láminas pre-irradiadas fueron colocadas en ampollitas de vidrio con junta esmerilada 14/23, conteniendo diferentes concentraciones de una solución de glicidilmetacrilato/metanol (8 mL). Posteriormente, se colocaron en una línea de vacío para eliminar el oxígeno presente dentro de estas. Para ello, el contenido de las ampollitas se congeló con nitrógeno líquido y entonces se abrió el vacío durante 5 minutos, posteriormente el vacío se cerró y se procedió a descongelar. El procedimiento (congelar-descongelar) se repitió 7 veces, tiempo suficiente para expulsar completamente el oxígeno del interior de las ampollitas. Finalizado este proceso, las ampollitas se sellaron, manteniendo el vacío abierto y permaneciendo sumergidas en N₂ líquido. Las ampollitas selladas, se colocaron en un baño de agua a la temperatura y

tiempo de reacción establecido en cada experimento, dando paso a la reacción de copolimerización.

5.4.4. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL COPOLÍMERO DE INJERTO.

Terminado el tiempo de reacción, las láminas injertadas se retiraron de las ampollitas, se colocaron en recipientes con tapa conteniendo diclorometano y se mantuvieron en agitación durante 8 h. A continuación, se colocaron a reflujo en diclorometano durante 24 h, a fin de eliminar completamente el homopolímero y el monómero que hubiera quedado ocluido en su interior. Finalmente, las láminas injertadas se colocaron a vacío para retirar el disolvente y se secaron en una estufa a 60 °C hasta obtener peso constante.

5.4.5. CUANTIFICACIÓN DEL INJERTO

El porcentaje de injerto fue calculado aplicando la siguiente ecuación

$$\% \text{ de injerto} = \frac{W - W_0}{W_0} \times 100$$

Donde W_0 y W representan los pesos de la película de hule de silicona antes y después del injerto respectivamente (*Lazo-Jiménez, 2010*).

5.5. INMOVILIZACIÓN DE ERGOSTEROL

En un matraz equipado con un refrigerante en posición de reflujo y una barra de agitación magnética se colocaron láminas injertadas de hule de silicona con porcentajes de injerto entre 10 y 20% las cuales fueron hinchadas en tetrahidrofurano (THF) seco por 2 h. A continuación se adicionó una cantidad equimolar de ergosterol y el matraz fue evacuado con argón para entonces adicionar $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ mediante una jeringa. La reacción se mantuvo en agitación a reflujo durante 24 h. Inmediatamente después, las láminas

injetadas fueron retiradas del medio de reacción, lavadas varias veces con tolueno y colocadas a reflujo en tolueno durante 4 h a fin de eliminar el ergosterol que no reaccionó. Las láminas fueron colocadas a vacío y finalmente en una estufa a 60 °C hasta obtener peso constante. Finalmente los miligramos de ergosterol inmovilizado se calcularon mediante diferencia de peso.

5.6. CARGA DEL FÁRMACO EN EL COPOLÍMERO DE INJERTO MODIFICADO CON ERGOSTEROL

Láminas de SR-g-GMA con diferentes cantidades de ergosterol inmovilizado, se colocaron en frascos ámbar conteniendo disoluciones de natamicina (25 mg/L, 10 mL) y nistatina (20 mg/L, 10 mL) respectivamente. A tiempos preestablecidos y en ausencia de luz, se cuantificó la cantidad de natamicina y nistatina remanente en el medio a partir de medidas de absorbancia a 319 nm y 321 nm respectivamente. Como control en el proceso de carga de natamicina y nistatina se utilizaron láminas de SR y SR-g-GMA. La cantidad de fármaco cargado se estimó a partir de la diferencia de concentraciones inicial y final en las disoluciones de carga.

5.7. LIBERACIÓN DEL FÁRMACO

Liberación de natamicina y nistatina: Láminas cargadas con fármaco se extrajeron de las disoluciones de carga, se lavaron con agua, se secaron y se transfirieron individualmente a viales ámbar con 5 mL de medio de liberación. En este estudio se usaron dos medios de liberación diferentes: el primer medio consistió de una solución amortiguadora de (HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7). El segundo medio se preparó a partir de una dispersión coloidal de liposomas conteniendo ergosterol (DOPC 0.5 mM, ergosterol 0.125 mM) en una solución amortiguadora de HEPES pH 7. A tiempos

predeterminados, se midió la absorbancia de la disolución a 319 nm y 321 nm para natamicina y nistatina respectivamente, las mediciones se realizaron en ausencia de luz. Con los resultados obtenidos se estimó el porcentaje de fármaco cedido y se elaboraron perfiles de liberación ajustados a cinéticas de orden cero y raíz cuadrada (ecuación de Higuchi).

El medio de liberación se reemplazó diariamente para evitar cambios en la cinética de liberación e interferencias en la cuantificación del fármaco cedido, causadas por la desestabilización/agregación de los liposomas que se produce cuando interaccionan con el fármaco.

5.8. PREPARACIÓN DE LOS LIPOSOMAS

Los liposomas se prepararon a partir de una disolución de 63 mg de DOPC y 7.9 mg de ergosterol, los cuales se disolvieron en 3 mL de cloroformo. El disolvente se evaporó bajo flujo de nitrógeno y el residuo se desecó a vacío. El film lipídico formado se calentó a 50 °C y se hidrató con 10 mL de (HEPES 10 mM, -NaCl 100 mM, pH 7) posteriormente se agitó en un vortex hasta que todos los lípidos se removieron de las paredes del vial. La dispersión de liposomas se sometió a 8 ciclos de congelación-descongelación, utilizando nitrógeno líquido y un baño de aceite a 50 °C. Finalmente, los liposomas fueron extruidos 12 veces a través de filtros de membrana de policarbonato con una talla de poro de 0.2 µm, (Whatman International). La dispersión coloidal de liposomas se mantuvo a 4 °C hasta su uso.

5.9. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN.

Los grupos funcionales que conforman las estructura de los materiales obtenidos y de las materias primas utilizadas, se identificaron mediante la técnica de IR-ATR en un espectrómetro Perkin-Elmer spectrum 100 (Perkin

Elmer CETUS Instrument Norwalk, CT) con 16 scans. El intervalo de trabajo fue de 4000 a 600 cm^{-1} .

Las transiciones de fase de las muestras como punto de fusión y temperatura de transición vítrea, se determinaron por calorimetría diferencial de barrido en un DSC TA Instruments Model 2010 (TA instruments, New Castle, DE). Dentro de un intervalo de temperatura de 25 a 400 $^{\circ}\text{C}$ bajo atmósfera de nitrógeno, a una velocidad de flujo de 60 mL min^{-1} y a una velocidad de calentamiento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

La estabilidad térmica fue determinada por análisis termogravimétrico, utilizando un TGA Q50 (TA instruments, New Castle, DE) con una velocidad de calentamiento de 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, dentro de un intervalo de temperatura de 25 a 700 $^{\circ}\text{C}$ bajo atmosfera de nitrógeno.

La morfología de las muestras fue analizada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras fueron recubiertas con oro para su posterior análisis en un equipo LS15 (Seis Oberkochen, Alemania).

El análisis de la composición elemental de la sección transversal se realizó mediante espectroscopía de energía dispersiva de rayos X, empleando un EDS (FESEM ULTRA Plus). Los espectros de EDS fueron obtenidos aplicando una aceleración de voltaje de 4 keV.

La cuantificación del fármaco incorporado y liberado en el sistema se realizó mediante UV-visible en un espectrofotómetro (Agilent 8453, Alemania).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. INJERTO

El injerto de glicidilmetacrilato en hule de silicona se llevó a cabo utilizando radiación gamma con una razón de dosis promedio de 13.5 kGy/h, mediante el método de pre-irradiación oxidativa. Durante la fase experimental se evaluaron los parámetros que afectan directamente el proceso de copolimerización, tales como: dosis de preirradiación, tiempo de reacción, concentración de monómero y temperatura de reacción.

6.1.1. EFECTO DE LA DOSIS DE PREIRRADIACIÓN.

El efecto de la dosis sobre el porcentaje de injerto, se estudió en el intervalo de dosis de 10 a 120 kGy. El proceso de copolimerización se realizó en láminas de hule de silicona preirradiadas las cuales se colocaron en una solución de glicidilmetacrilato/metanol (2:8) a una temperatura de 60 °C, estableciendo como tiempo de reacción 12 h. Los valores de porcentaje de injerto obtenidos fueron graficados contra la dosis de preirradiación establecida.

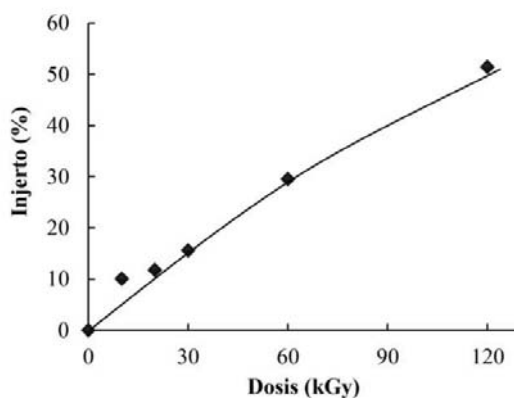


Figura 26. Efecto de la dosis de preirradiación sobre el porcentaje de injerto. Razón de dosis: 13.5 kGy h⁻¹. GMA/metanol 20/80% v/v, T=60 °C, t=12 h.

La tendencia observada en la figura 26 muestra que el porcentaje de injerto se incrementa conforme aumenta la dosis. Este comportamiento nos está indicando que un incremento en la dosis de irradiación provoca una mayor producción de radicales libres en el polímero, los cuales pueden reaccionar con el oxígeno presente en el aire, formando una gran cantidad de peróxidos dentro de la matriz polimérica. La formación de peróxidos es clave, ya que más tarde estos experimentan descomposición térmica, dando lugar a la formación de los macroradicales que inician el proceso de injerto. Un punto importante de resaltar es que si bien, aumentando la dosis de preirradiación se logra obtener un mayor porcentaje de injerto, notamos que a partir de 60 kGy obtenemos un copolímero de injerto rígido y quebradizo que no es apto para el uso que se le pretende dar al material, por lo tanto no es conveniente utilizar dosis de preirradiación muy altas en la síntesis de este sistema.

6.1.2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE MONÓMERO

El efecto de la concentración de monómero en el porcentaje de injerto, fue estudiado a diferentes concentraciones de GMA en metanol, en láminas de hule de silicona irradiadas a una dosis de 20 kGy. Las láminas pre-irradiadas se sometieron al proceso de copolimerización, a una temperatura de 60 °C y a un tiempo de reacción de 12 h. Con los resultados obtenidos se construyó una gráfica la cual se discute a continuación.

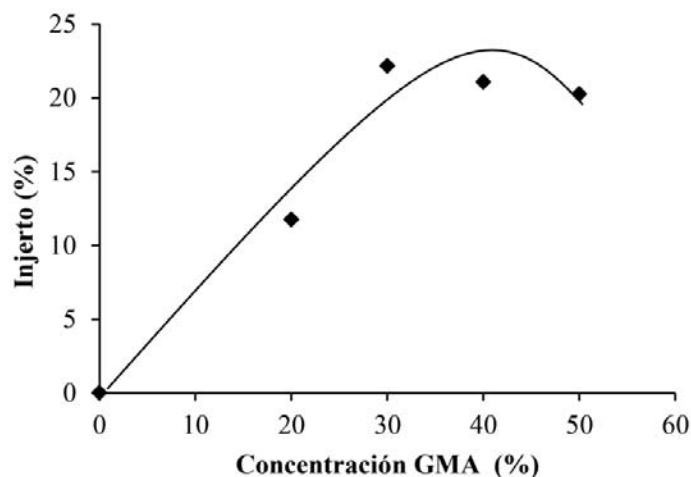


Figura 27. Porcentaje de injerto en función de la concentración de monómero. Razón de dosis: 13.5 kGy h^{-1} . Dosis 20 kGy , $T=60 \text{ }^\circ\text{C}$, $t=12 \text{ h}$.

En la figura 27 se observa que a medida que aumenta la concentración de GMA aumenta el porcentaje de injerto. Sin embargo, a partir de una concentración de 40% de monómero las variaciones en el porcentaje de injerto ya no son tan notorias y la forma que adopta la línea de tendencia indicaría que el injerto tiende a disminuir gradualmente. Esto puede deberse a que conforme la concentración de monómero aumenta, el medio de reacción es más viscoso dificultando la difusión del monómero a través de la matriz polimérica, lo que provoca que la reacción de injerto no se vea favorecida.

6.1.3. EFECTO DEL TIEMPO DE REACCIÓN

El estudio del efecto del tiempo de reacción en el porcentaje de injerto, se realizó con películas de hule de silicona preirradiadas a una dosis de 20 kGy , las cuales se sometieron al proceso de copolimerización a una temperatura de $60 \text{ }^\circ\text{C}$, utilizando diferentes concentraciones de GMA en metanol. Los tiempos de reacción evaluados fueron de 8 h hasta 14 h.

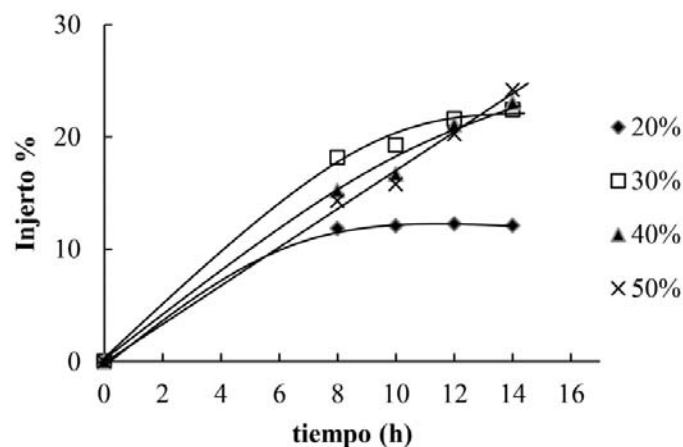


Figura 28. Porcentaje de injerto en función del tiempo para diferentes concentraciones de monómero. Razón de dosis: 13.5 kGy h⁻¹. Dosis 20 kGy, T=60 °C.

Cuando se analizó la variación en el porcentaje de injerto con respecto al tiempo de reacción a diferentes concentraciones de monómero (figura 28), se observó que el porcentaje de injerto incrementa gradualmente con el tiempo de reacción para todas las concentraciones. Sin embargo, cuando se utilizan concentraciones de 20% y 30% de GMA en metanol, el injerto incrementa con el tiempo de reacción y alcanza el equilibrio dentro de 10 h. Estos resultados se pueden deber a que a bajas concentraciones de monómero, este se consume más rápido y conforme el tiempo de reacción avanza, menos monómero se encuentra disponible para llevar a cabo la reacción de injerto, en consecuencia el porcentaje de injerto se mantiene invariable.

6.1.4. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE REACCIÓN

En el método de preirradiación oxidativa, la temperatura es un factor muy importante que influye en el porcentaje de injerto, debido a que ésta es responsable de la descomposición térmica de los peróxidos e hidroperóxidos, los cuales son formados en el polímero durante el proceso de preirradiación

en aire. Cuando los peróxidos e hidroperóxidos se someten a calentamiento térmico, dos diferentes especies son creadas: radicales $RO\cdot$ y radicales $\cdot OH$. Los primeros son capaces de iniciar la reacción de injerto, mientras que los últimos son responsables de iniciar el proceso de homopolimerización. A fin de investigar el efecto de la temperatura sobre el porcentaje de injerto, películas de hule de silicona fueron irradiadas a una dosis de 20 kGy. El intervalo de temperatura estudiado para llevar a cabo la copolimerización fue de 40 °C a 70 °C, con un tiempo de reacción de 12 h, empleando una solución de glicidilmetacrilato en metanol (2:8).

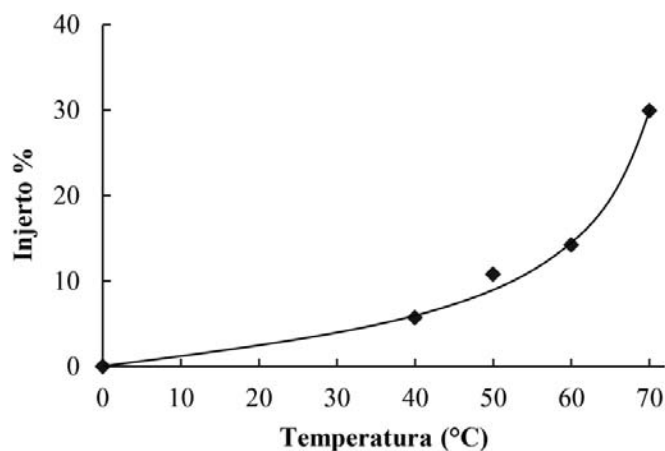


Figura 29. Porcentaje de injerto en función de la temperatura. Razón de dosis: 13.5 kGy h⁻¹.
Dosis 20 kGy, GMA/metanol 20/80%v/v, t=12 h.

La tendencia del gráfico (figura 29) nos indica que a medida que aumenta la temperatura de reacción, se incrementa el porcentaje de injerto. Se observa que por debajo de 50 °C el porcentaje de injerto disminuye gradualmente, por lo que a esa temperatura no hay suficiente energía de activación que permita la ruptura de los enlaces O-O, necesarios para iniciar la reacción de injerto. Estudios previos sobre injertos de GMA en matrices poliméricas diferentes al SR, muestran que la temperatura a la cual se favorece el injerto se encuentra

entre 60 °C y 70 °C, por lo que nuestros resultados están en concordancia con estas aseveraciones (*Bondar et al, 2004*).

6.1.5. MECANISMO DE REACCIÓN PROPUESTO PARA LA SÍNTESIS DEL COPOLÍMERO SR-g-GMA.

El mecanismo de reacción propuesto mediante el cual podría haberse llevado a cabo el injerto, es ilustrado en las figuras 30 y 30a-30e. De acuerdo a los antecedentes revisados sobre radiación de siliconas y copolimerización de injerto vía radicales libres, se propone como primer paso la ruptura homolítica de los enlaces Si-CH₃ y C-H en el hule de silicona por efecto de la radiación gamma. Los radicales formados en este primer paso, reaccionan con el oxígeno en su forma biradical formando peróxido radicales que pueden recombinarse con pequeñas fragmentos radicalarios como •H o •CH₃. (figura 30)

En un segundo paso se produce la ruptura homolítica de los enlaces O-O por efecto del tratamiento térmico. Los macroradicales que se forman, reaccionan con el GMA presente en el medio, dando paso a una reacción en cadena que permite el crecimiento de las cadenas de poliglicidilmetacrilato en el hule de silicona (figura 30a). Finalmente, se lleva a cabo un proceso de terminación que puede ocurrir mediante desproporción (figura 30b y figura 30c) o recombinación (figura 30d y figura 30e).

PREIRRADIACIÓN OXIDATIVA (INICIACIÓN)

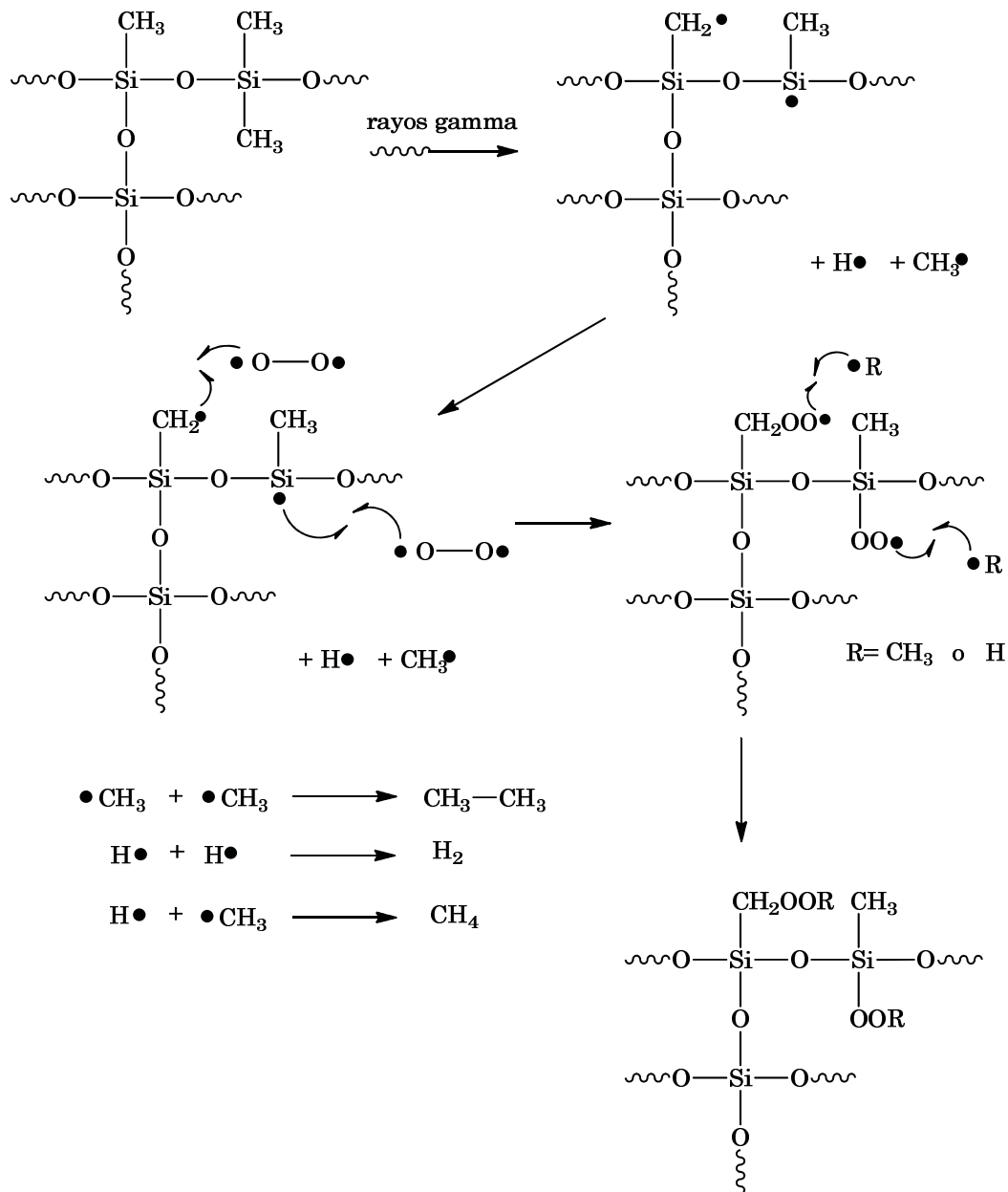


Figura 30. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis del copolímero SR-g-GMA (preirradiación oxidativa)

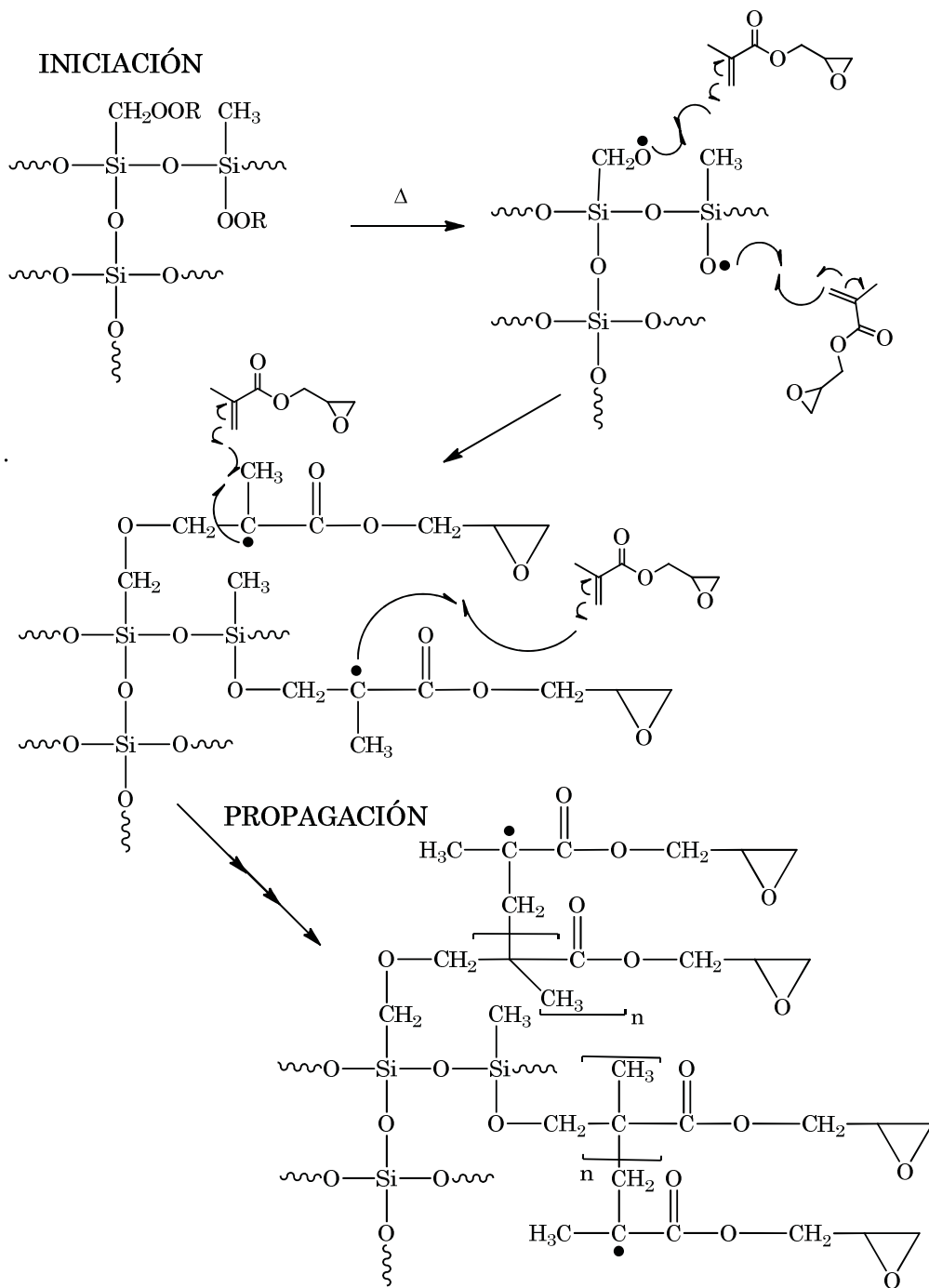


Figura 30a. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis del copolímero SR-g-GMA (iniciación y propagación)

TERMINACIÓN POR DESPROPORCIÓN

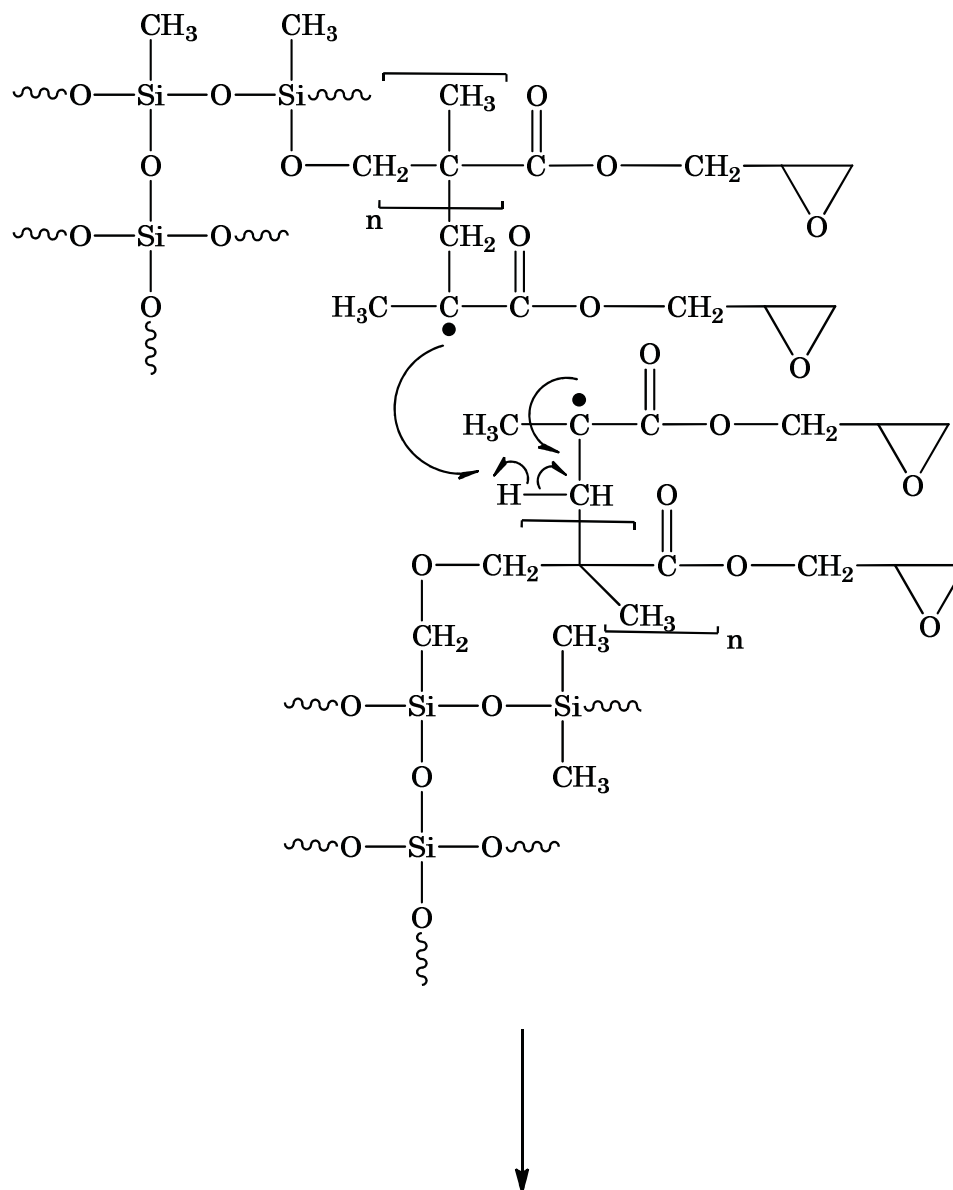


Figura 30b. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis del copolímero SR-g-GMA (terminación por desproporción)

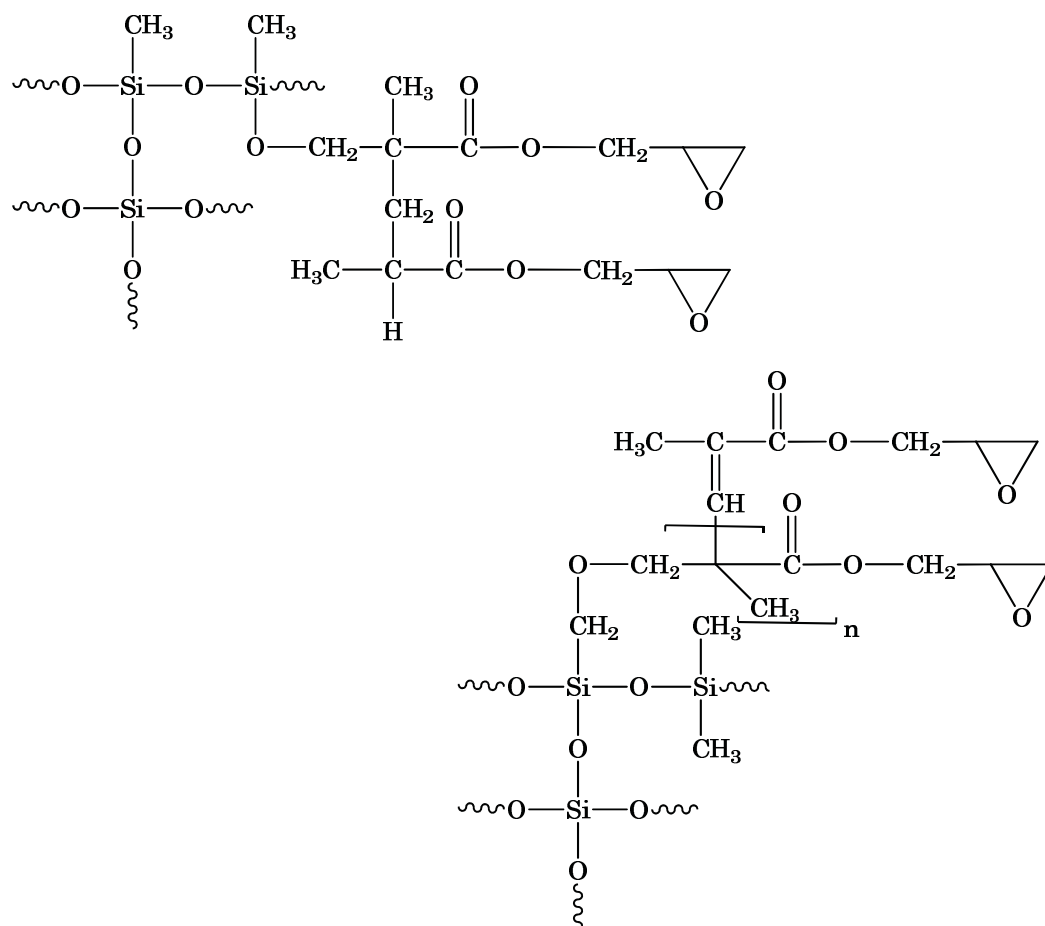


Figura 30c. Posible producto obtenido mediante la terminación por desproporción

TERMINACIÓN POR RECOMBINACIÓN

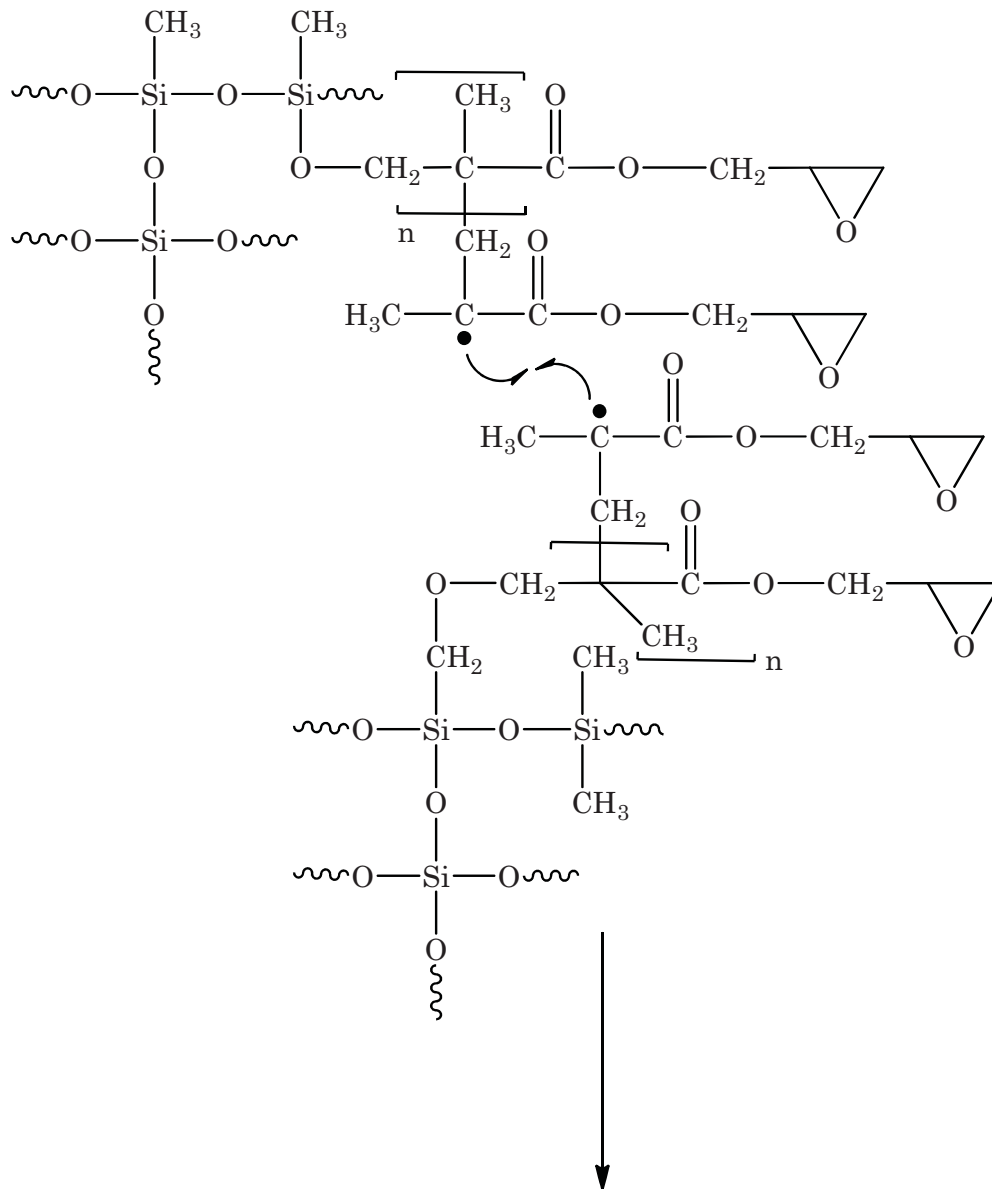


Figura 30d. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis del copolímero SR-g-GMA (terminación por recombinación)

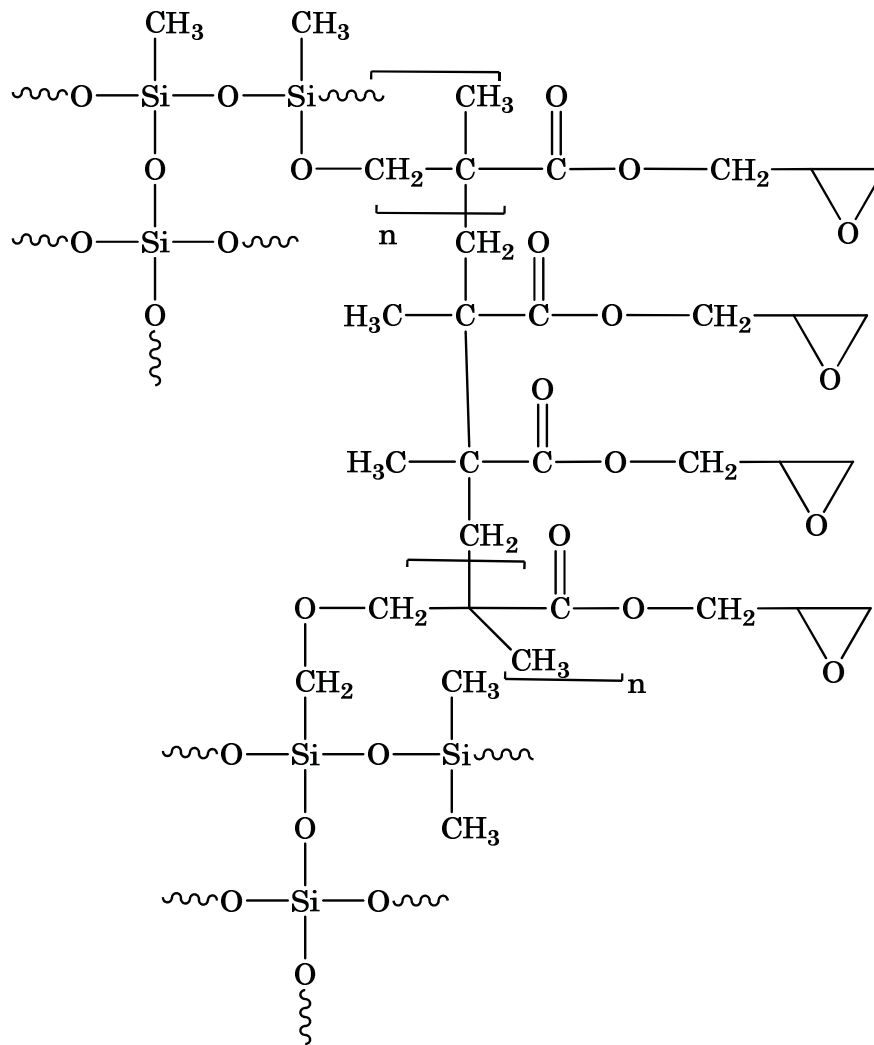


Figura 30e. Posible producto obtenido mediante la terminación por recombinación

El aspecto físico de las láminas antes y después del injerto se puede observar en la figura 31. En injertos $\leq 20\%$ se observan pequeños puntos blancos recubriendo toda la lámina mientras que en injertos $>20\%$ las láminas son completamente blancas y pierden su flexibilidad volviéndose muy rígidas. A raíz de estos resultados, las condiciones de reacción que fueron seleccionadas para desarrollar el nuevo sistema de carga y liberación fueron: razón de dosis 13.5 kGy/h, dosis 20 kGy, temperatura 60 °C y tiempo

de reacción comprendido entre 10 y 14 h. Bajo estas condiciones se obtiene un copolímero con porcentajes de injerto $\leq 20\%$.

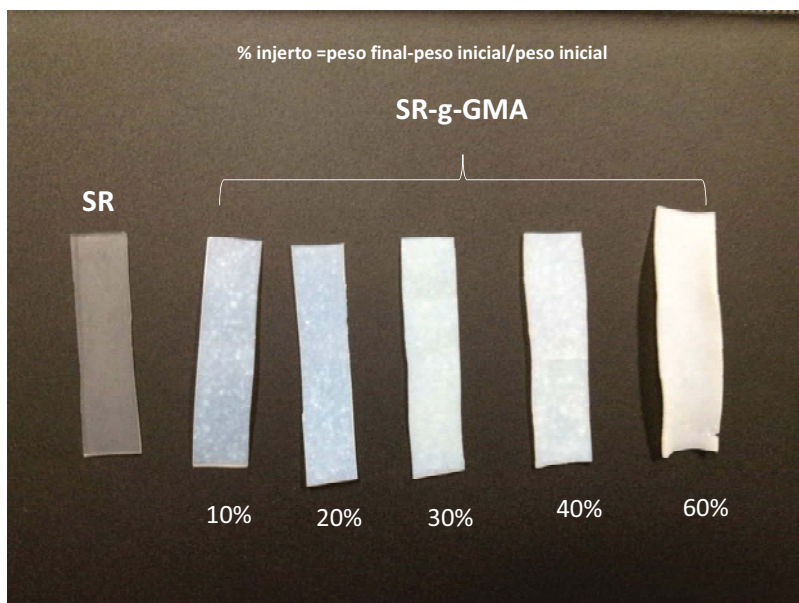


Figura 31. Láminas de hule de silicona y copolímero SR-g-GMA con diferentes porcentajes de injerto.

6.2. INMOVILIZACIÓN DE ERGOSTEROL

Después de funcionalizar el hule de silicona con glicidilmetacrilato mediante el proceso de injerto, se procedió a realizar la inmovilización covalente de ergosterol en aquellos copolímeros que presentaban porcentajes de injerto entre 10 y 20%. En el proceso de inmovilización, los grupos epóxido reaccionan con el ergosterol mediante una reacción de sustitución nucleofílica. La reacción es catalizada con $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$, el cual se coordina al oxígeno del grupo epoxi y facilita la apertura del anillo por el ergosterol (figura 32 y 32a).

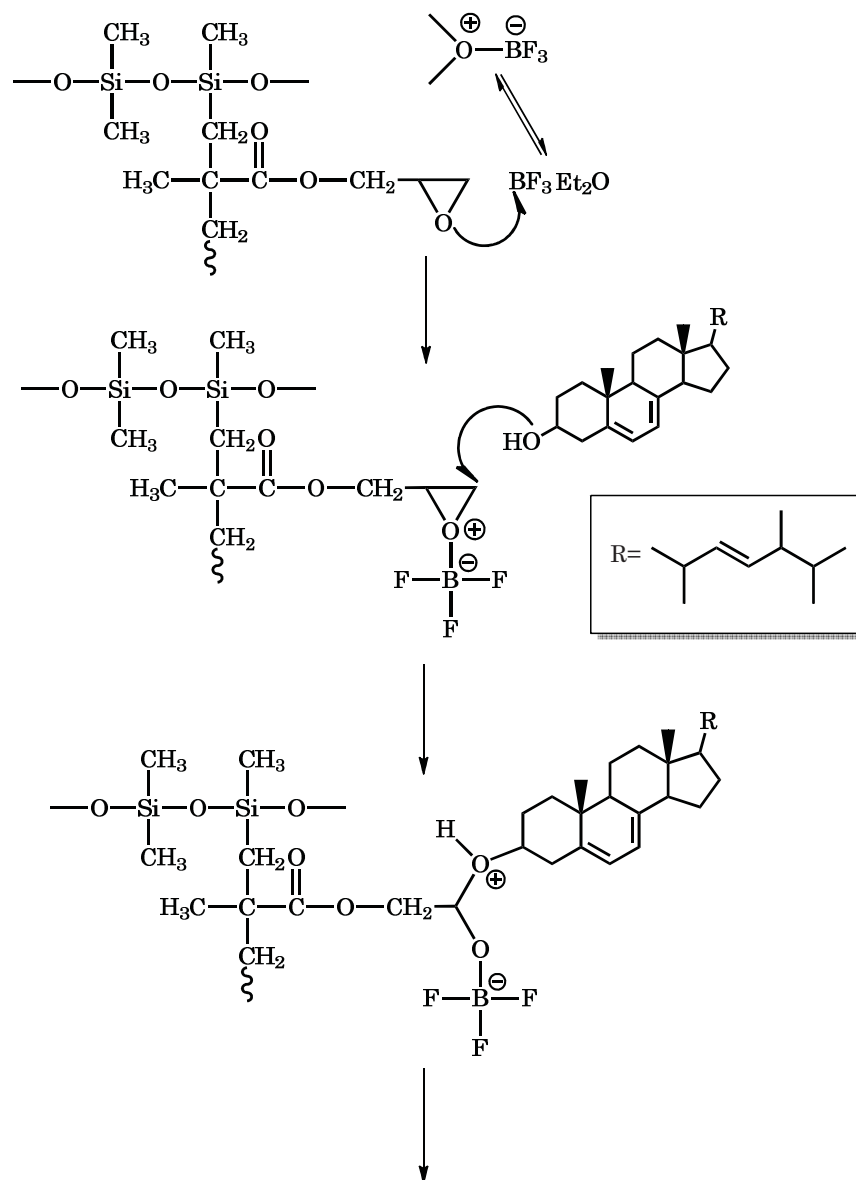


Figura 32. Mecanismo de reacción propuesto para la inmovilización covalente de ergosterol

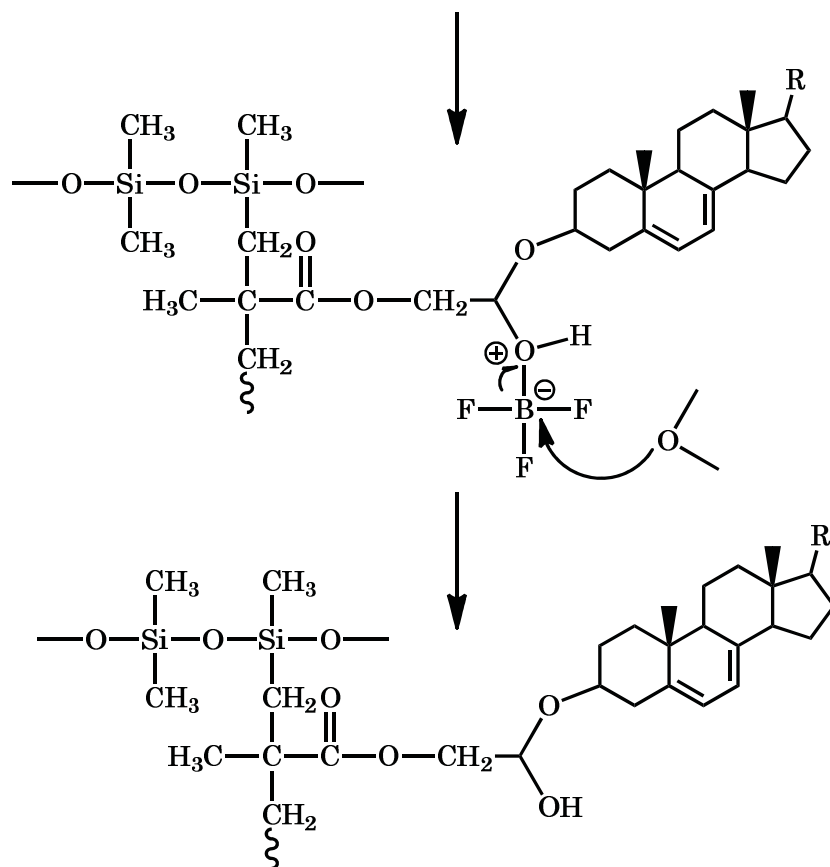


Figura 32a. Mecanismo de reacción propuesto para la inmovilización covalente de ergosterol

En esta reacción el disolvente juega un papel importante ya que este es responsable del hinchamiento del copolímero y promueve la difusión del ergosterol dentro de él. Sin embargo, a pesar de que la difusión del ergosterol se ve favorecida en el copolímero por el disolvente, las cadenas injertadas ejercen impedimento estérico y bloquean el acercamiento del ergosterol a los grupos epóxido. Debido a ello, solo se logró inmovilizar entre 10% y 3% del ergosterol presente en el medio de reacción.

6.3. CARACTERIZACIÓN

6.3.1. IR-ATR (Infrarrojo de Reflectancia Total Atenuada)

Con la técnica de IR-ATR se lograron caracterizar las materias primas y los sistemas que fueron sintetizados SR-g-GMA y (SR-g-GMA)-ergosterol. La figura 33 muestra los diferentes espectros de IR-ATR de los sistemas estudiados. El espectro de SR mostró las siguientes bandas de absorción: en 994 cm^{-1} la vibración de estiramiento $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$, en 1089 cm^{-1} la vibración de estiramiento Si-O-C, en 1259 cm^{-1} la vibración de flexión del enlace $\text{Si}-\text{CH}_3$ y en 864 cm^{-1} la vibración tipo rocking del enlace $\text{Si}-\text{CH}_3$. Otras bandas adicionales que se lograron observar, son las del acoplamiento entre los modos vibracionales de estiramiento del enlace $-\text{Si}-\text{C}$ y rocking del grupo CH_3 en 785 cm^{-1} . La banda de absorción en 1412 cm^{-1} debido a la vibración rocking de $-\text{CH}_2-$ como parte del dominio entrecruzado y las bandas de absorción presentes en 668 cm^{-1} y 2963 cm^{-1} correspondientes a la vibración del enlace C-H de los grupos metilo que conforman el polímero. El espectro de IR del copolímero de injerto muestra dos nuevas bandas de absorción una de ellas en 1728 cm^{-1} , la cual fue asignada a la vibración de estiramiento del enlace C=O indicando la presencia del grupo éster y las otra banda de absorción en 907 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de estiramiento asimétrico del enlace C-O-C del grupo epóxido. Comparando el espectro de SR con el del copolímero de injerto se puede observar que cuando se injerta el GMA, la intensidad de la banda de absorción en 1083 cm^{-1} aumenta, esto debido a la presencia del grupo éster en el copolímero, esta señal está relacionada a la vibración del enlace C-O-C del grupo éster.

Cuando se lleva a cabo la unión covalente del ergosterol en el copolímero de injerto, el espectro de IR-ATR del nuevo material, presenta una banda de absorción en 3426 cm^{-1} debida a la tensión del enlace O-H del grupo hidróxilo

que se forma por la apertura del epóxido. Se observan además dos bandas de absorción en 2963 cm^{-1} y 2863 cm^{-1} respectivamente, la primera producto de la vibración de estiramiento simétrico del enlace $C-H$ de los grupos metilo que conforman la molécula de ergosterol y la segunda debida a la vibración de estiramiento asimétrico del enlace $C-H$. Adicionalmente se observó que la banda de absorción en 907 cm^{-1} , que había sido asignada previamente a la vibración del grupo epóxido desaparece, con lo que se confirma así la apertura del epóxido.

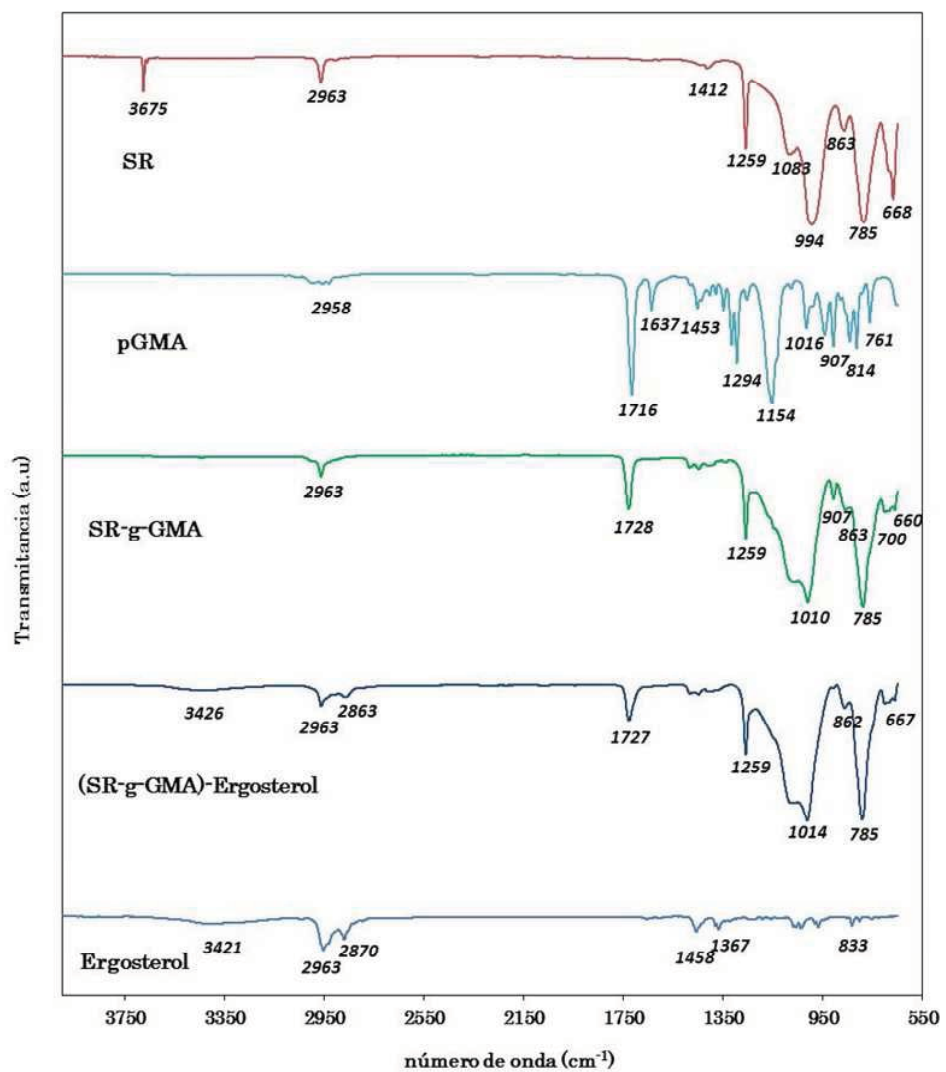


Figura 33. Espectros de IR-ATR. De arriba hacia abajo: hule de silicona *SR*, poliglicidimetacrilato *pGMA*, copolímero *SR-g-GMA* (15% injerto), copolímero con ergosterol (*SR-g-GMA*)-ergosterol y ergosterol.

6.3.2. TGA (ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO)

El análisis termogravimétrico nos permitió conocer el proceso de descomposición térmica de los sistemas SR, SR-g-GMA, y del poliglicidimetacrilato (figura 34). De los polímeros evaluados, el SR fue el material que presenta mayor resistencia térmica ya que la descomposición de la matriz polimérica inicia en 516 °C. El copolímero SR-g-GMA presentó dos pasos de degradación en 291 °C y 431 °C respectivamente. El primero se atribuye a la descomposición del poliglicidimetacrilato injertado en el hule de silicona y el segundo a la descomposición de la matriz polimérica. Claramente se puede observar que cuando el hule de silicona es injertado, su resistencia térmica disminuye. Por otro lado, el poliglicidimetacrilato puro mostró un solo paso de degradación en 251 °C y mostró, la menor resistencia térmica.

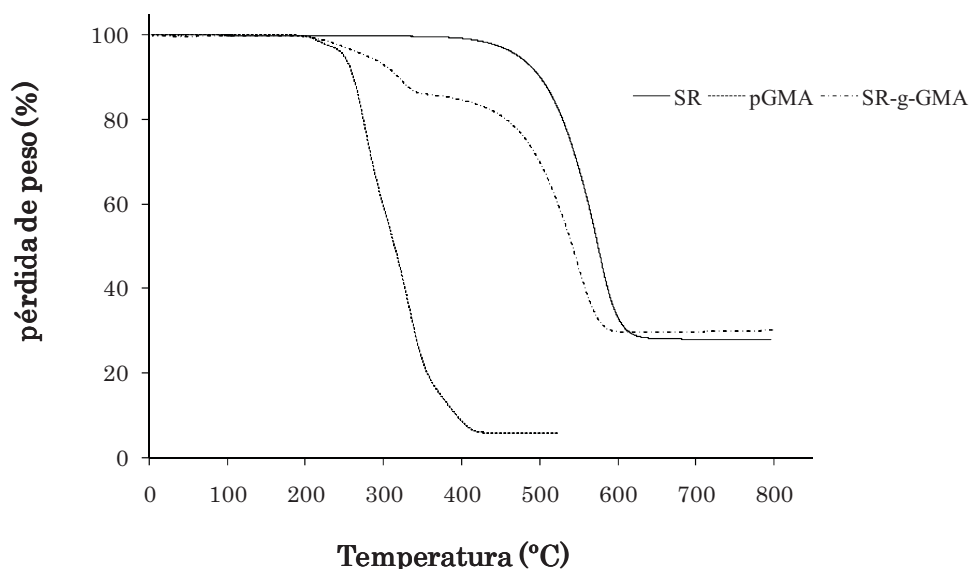


Figura 34. Termogramas de los sistemas SR, p-GMA y SR-g-GMA

El análisis termogravimétrico, también nos permitió confirmar la inmovilización de ergosterol en el copolímero. En la figura 35 se muestra los termogramas del ergosterol, del SR-g-GMA (15% injerto) y del copolímero con ergosterol (58 mg de ergosterol inmovilizado). Si bien los cambios pueden no ser tan claros en el termograma convencional, la curva derivada proporcionó mejor claridad del proceso de descomposición térmica de los sistemas estudiados (figuras 36, 37 y 38). El ergosterol presenta un paso de descomposición en 277 °C, mientras que el copolímero mostró dos pasos de descomposición en 546 °C y 322 °C. Finalmente el sistema (SR-g-GMA)-ergosterol presenta tres pasos de descomposición el primero en 570 °C, el segundo en 389 °C y el tercero en 280 °C.

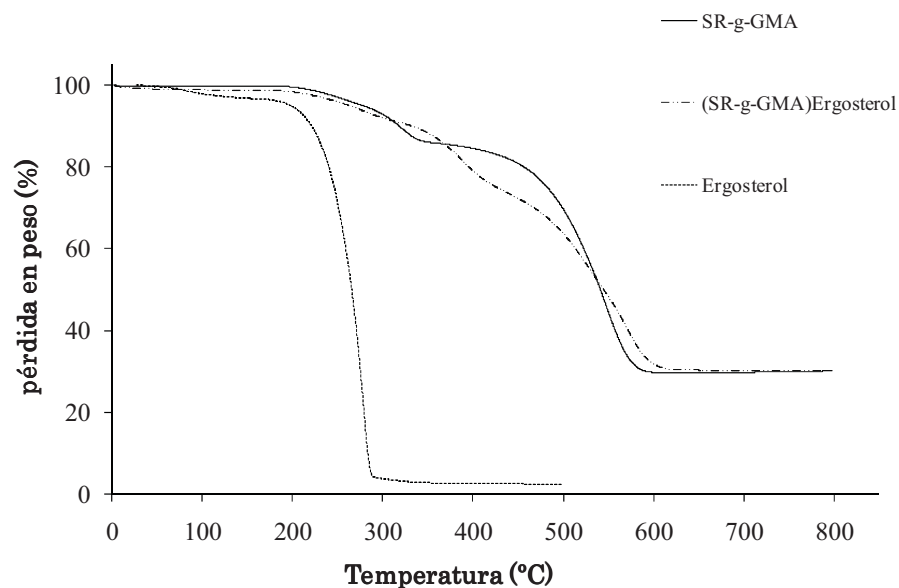


Figura 35. Termogramas de los sistemas estudiados

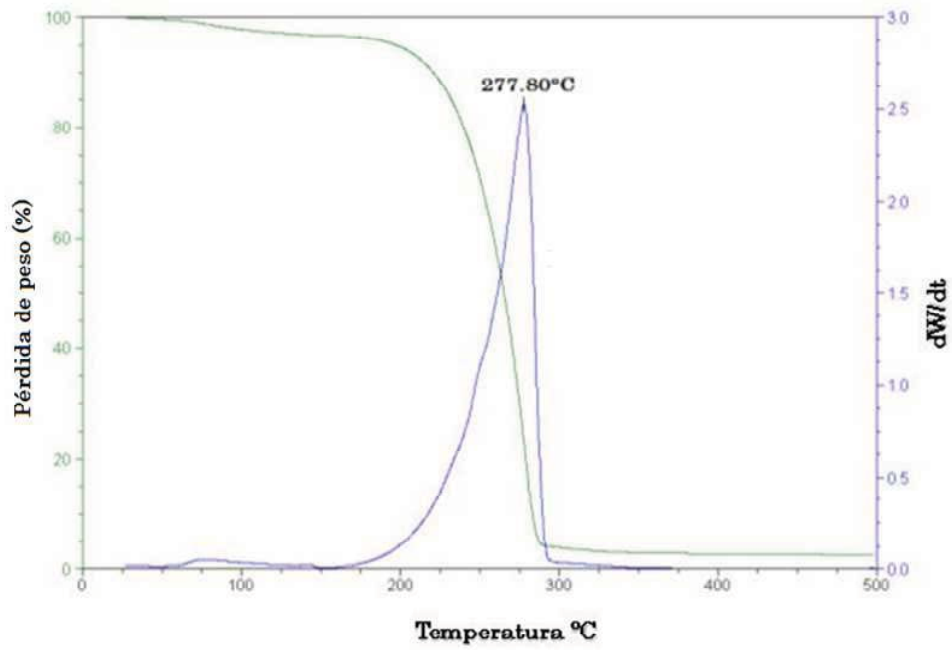


Figura 36. Termograma y curva derivada del ergosterol

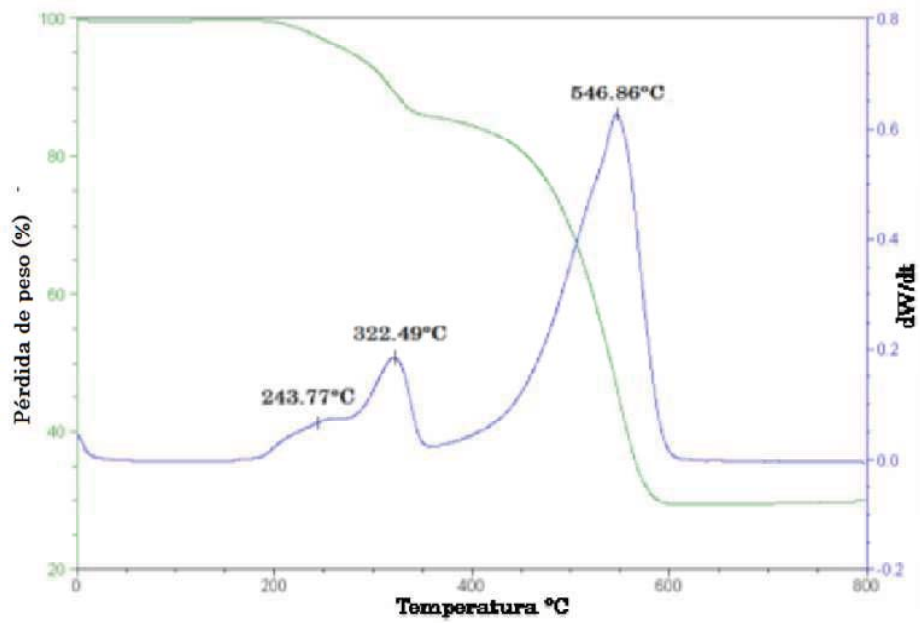


Figura 37. Termograma y curva derivada del copolímero SR-g-GMA

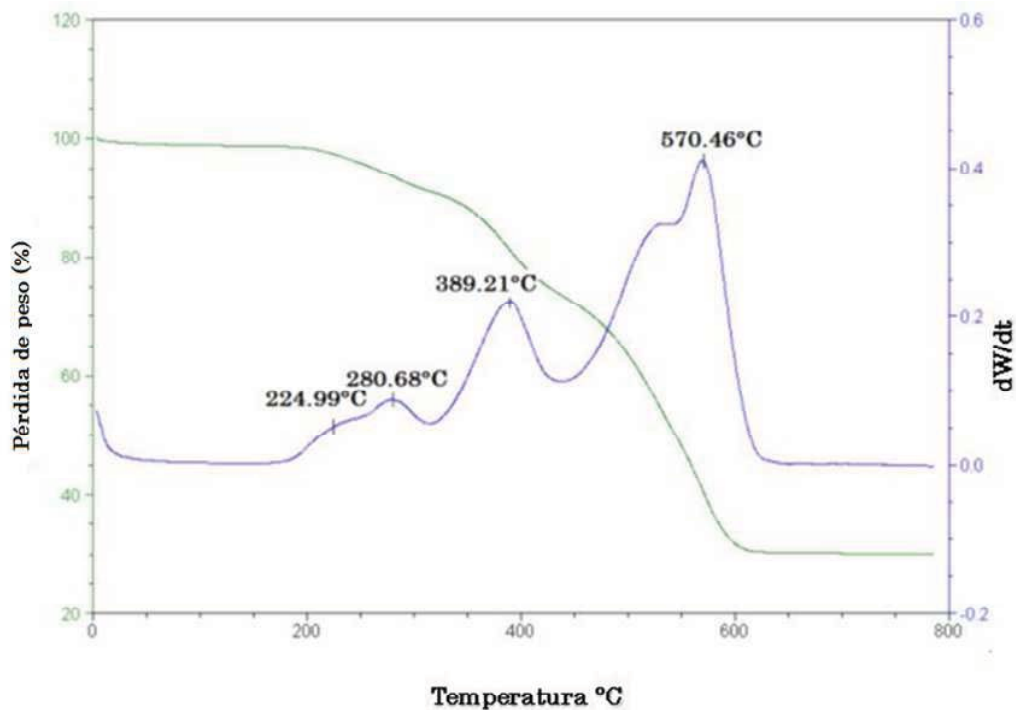


Figura 38. Termograma y curva derivada de SR-g-GMA modificado con ergosterol

6.3.3. DSC (CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO)

Las transiciones que aparecen en el diagrama DSC (figura 39) del copolímero SR-g-GMA en 267 °C y 87 °C, fueron asociadas con el punto de fusión y la temperatura de transición vítrea del poliglicidilmetacrilato respectivamente y confirman que el injerto se llevó a cabo. No fue posible observar las transiciones de fase del hule de silicona, debido a que el intervalo de temperatura de trabajo está muy por arriba de su Tg (-120 °C).

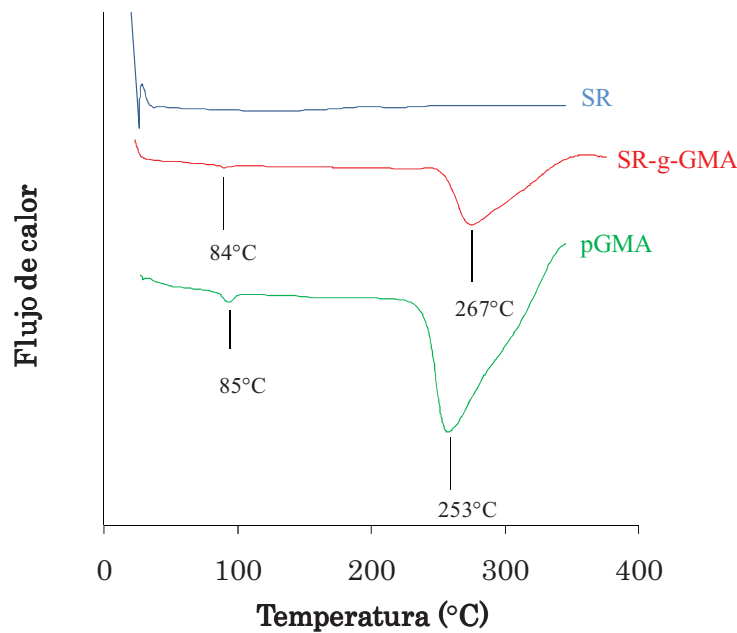


Figura 39. DSC de los sistemas hule de silicona SR, poliglicidimetacrilato-p-GMA y del copolímero SR-g-GMA.

6.3.4. SEM (Microscopía Electrónica de Barrido)

Los cambios en la estructura de la superficie inducidos por el injerto se investigaron mediante SEM. La figura 40 muestra las micrografías correspondientes al SR y al copolímero SR-g-GMA. Al estudiar las micrografías, podemos observar diferencias en la superficie del hule de silicona y en la superficie del copolímero de injerto, principalmente en las micrografías de 300 μm . La superficie del hule de silicona no es homogénea pero cuando esta es injertada con GMA la superficie es completamente homogénea lo que indica que el injerto cubrió completamente toda la superficie.

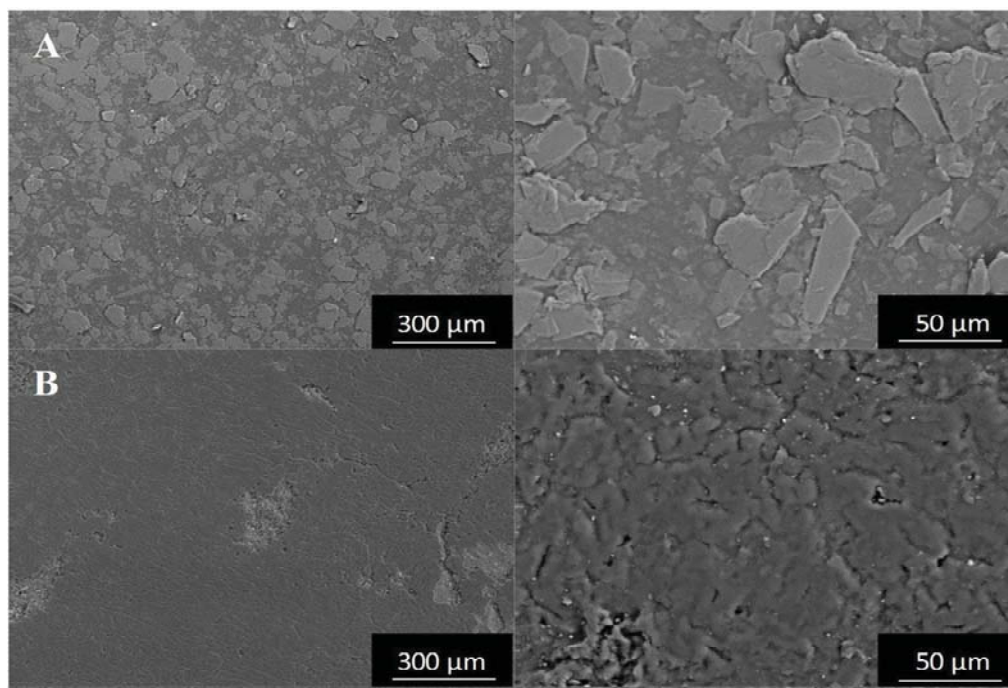


Figura 40. Imágenes SEM de las muestras (A) hule de silicona, (B) SR-g-GMA (15%injerto) con dos diferentes aumentos (300 μ m y 50 μ m).

6.3.5. EDS (Análisis de Energía Dispersiva de Rayos X)

Se deseaba conocer hasta donde había logrado penetrar el injerto en el hule de silicona. Para ello, se le realizó un corte transversal a la lámina injertada y se estudio mediante la técnica de EDS la composición química en tres puntos diferentes (Figura 41). El análisis de cada punto, presentó señales correspondientes a los elementos silicio, oxígeno y carbono. La composición porcentual de los elementos encontrados en cada punto analizado, se muestra en la tabla 4. Al comparar los valores obtenidos, se puede inferir que el injerto ocurrió tanto en la superficie como en masa porque no se observó una variación importante en la composición de la película, en los tres puntos analizados.

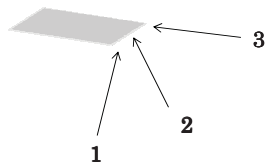


Figura 41. Corte transversal de una lámina del SR-g-GMA mostrando los puntos analizados por EDS-

| Elemento | Composición | | |
|----------------|-------------|-------|-------|
| | C | O | Si |
| Punto 1 | 25.08 | 40.60 | 34.32 |
| Punto 2 | 26.08 | 37.85 | 36.06 |
| Punto 3 | 26.15 | 39.25 | 34.60 |

Tabla 4. Composición porcentual de los puntos analizados mediante EDS en el copolímero SR-g-GMA

Para los fines que se requieren dar al nuevo material sintetizado, se deseaba que el injerto ocurriera preferentemente en la superficie de la matriz polimérica. Así que el disolvente seleccionado para llevar a cabo la reacción fue metanol, un disolvente miscible con el GMA pero que provoca muy poco hinchamiento en el hule de silicona. Por tanto, con el uso de metanol esperábamos que la difusión del monómero dentro de la matriz polimérica no ocurriera. Sin embargo, los resultados del análisis EDS muestran lo opuesto y sugieren que el proceso de copolimerización se llevó a cabo mediante un mecanismo tipo “grafting from”. Mediante éste mecanismo el injerto inicia en la superficie del polímero, pero las cadenas de poliglicidilmetacrilato que se encuentran en crecimiento empiezan a modificar la superficie del SR, haciéndola hidrofílica. Este cambio en la composición de la superficie del SR, promueve el hinchamiento de la matriz polimérica, con lo que se facilita la difusión del GMA a través del polímero. (figura 42). Cabe señalar que estos

resultados no afectaron la inmovilización de ergosterol en el copolímero, pero confirman lo observado en algunos trabajos previos que publican el mismo comportamiento con otros sistemas (Kimura *et al*, 2008; Nasef, 2001).

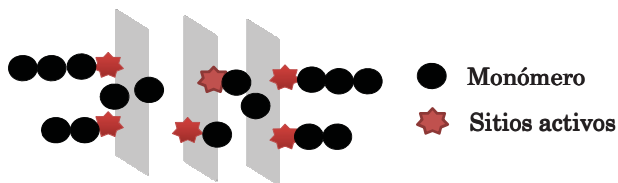


Figura 42. Representación esquemática de la difusión del monómero a través del hule de silicona.

6.4. CARGA Y LIBERACIÓN DE LOS FÁRMACOS NATAMICINA Y NISTATINA

Una vez inmovilizado el ergosterol en el copolímero de injerto, se procedió a llevar a cabo el estudio de carga y liberación de los fármacos natamicina y nistatina. La carga de los fármacos se realizó sumergiendo las láminas en soluciones acuosas que contenían el fármaco antifúngico. Como controles se utilizaron el hule de silicona sin modificar y el copolímero de injerto. Las láminas utilizadas en estos experimentos contenían diferentes cantidades de ergosterol.

Dentro de los resultados, se observó que las láminas de SR y del SR-g-GMA que no contenían ergosterol, presentaban una capacidad muy limitada para incorporar cualquiera de los dos fármacos. Por otro lado, las láminas modificadas con ergosterol cargaron de manera notable el fármaco nistatina (Tabla 6 y figura 44), esto nos indicó que la carga de nistatina en las láminas está condicionada a la presencia del ergosterol. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos para la carga de ambos fármacos, observamos que la presencia de ergosterol en las láminas no tuvo el mismo efecto en la carga de natamicina (Tabla 5 y figura 43). La carga de este fármaco en las láminas

conteniendo ergosterol estuvo muy por debajo de los valores obtenidos con nistatina. (la carga de nistatina fue de dos a cuatro veces más alta comparado con la carga de natamicina). Estos resultados sugieren que la nistatina podría tener una mayor afinidad por el ergosterol que la natamicina.

Tabla 5. Datos de las muestras utilizadas para la carga de natamicina.

| clave de la lámina | porcentaje de injerto | Ergosterol mg/g lámina | natamicina mg/g lámina |
|--------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| SR Control | X | X | 0.167± 0.05 |
| TAS 156 Control | 21% | X | 0.156±0.019 |
| TAS 285 Control | 10% | X | 0.169±0.008 |
| TAS 188 | 10% | 45 | 0.232±0.052 |
| TAS 219 | 14% | 70 | 0.247±0.023 |
| TAS 253 | 17% | 101 | 0.496±0.072 |
| TAS 159 | 15% | 110 | 0.350±0.048 |

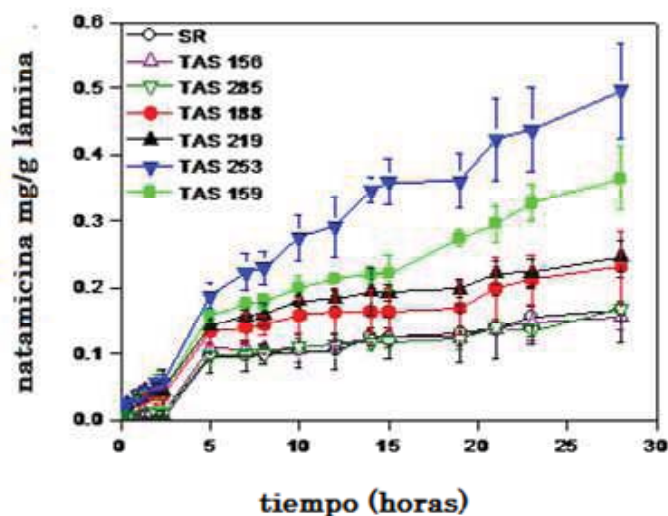


Figura 43. Perfil de carga del fármaco natamicina

Tabla 6. Datos de las muestras utilizadas para la carga de nistatina.

| clave de la lámina | porcentaje de injerto | ergosterol mg/g lámina | nistatina mg/g lámina |
|--------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| SR Control | X | | 0.223±0.053 |
| TAS 287 Control | 18% | X | 0.228±0.045 |
| TAS 113 | 18% | 15 | 0.490±0.028 |
| TAS 251 | 10% | 53 | 0.706±0.005 |
| TAS 203 | 15% | 75 | 0.871±0.013 |
| TAS 217 | 16% | 101 | 0.862±0.058 |

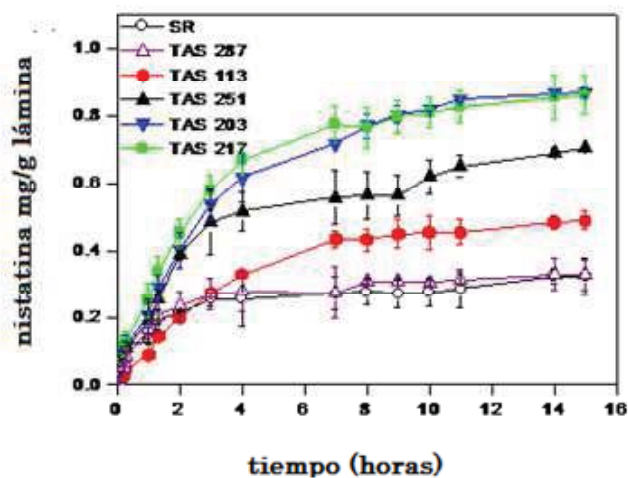


Figura 44. Perfil de carga del fármaco nistatina

Para llevar a cabo los estudios de liberación de los fármacos natamicina y nistatina se trabajó en dos medios diferentes, el primero una solución amortiguadora de HEPES pH 7, el segundo una solución amortiguadora de HEPES, pH 7 en una dispersión coloidal de liposomas conteniendo ergosterol. Este medio, mimetiza la membrana celular del hongo y pretende simular un ambiente contaminado por hongos. El medio de liposomas fue utilizado

porque es un modelo bien establecido para estudiar las interacciones de los antibióticos con la membrana celular del hongo. (*Silva L et al, 2006*)

En la solución amortiguadora de HEPES, sin liposomas, las láminas de SR y SR-g-GMA al día 7 ya habían cedido el 20% del fármaco natamicina y más del 10% del fármaco nistatina, mientras que las láminas modificadas con ergosterol retuvieron eficazmente el fármaco y fue hasta el día 14, cuando se observó la liberación de menos del 15% de la natamicina y menos del 6% de la nistatina. (Figuras 45A y 46A). Estos resultados sugieren que efectivamente existe una interacción entre el ergosterol inmovilizado en las láminas con los fármacos nistatina y natamicina que no permite que el fármaco se libere al medio, no obstante dicha interacción parece ser más fuerte entre la nistatina y el ergosterol que entre la natamicina y el ergosterol.

Por otro lado, cuando se llevó a cabo la liberación de los fármacos en la solución amortiguadora de HEPES con liposomas, se observó que las láminas modificadas con ergosterol eran capaces de liberar el fármaco al medio y en el día 8 se había logrado liberar entre el 50 y 60% de la nistatina y entre el 50 y 80% de natamicina. Este comportamiento hace suponer que la liberación del fármaco en las láminas modificadas, se regula por la presencia del ergosterol y pudiera ocurrir a través de un mecanismo en el cual el ergosterol inmovilizado en la lámina y el que se encuentra contenido en los liposomas compiten por el fármaco.

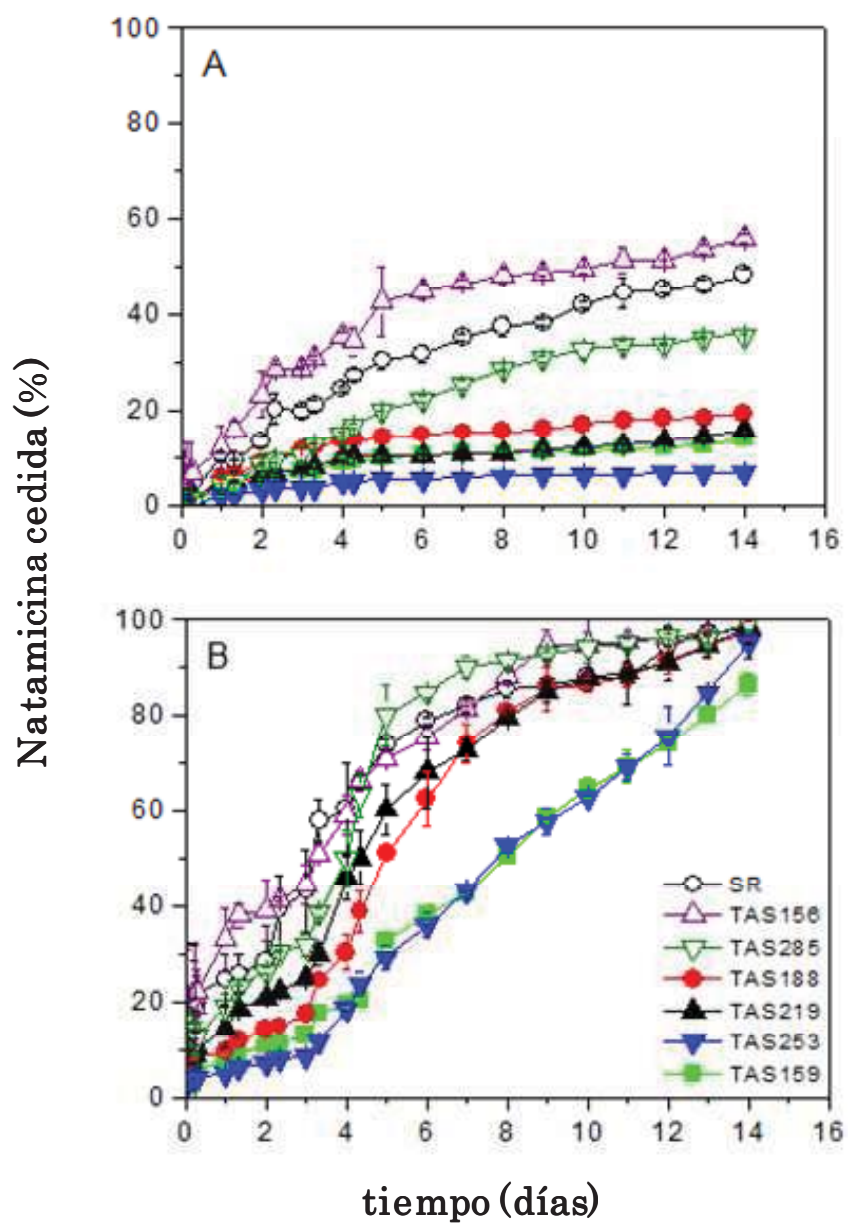


Figura 45. Perfil de liberación del fármaco natamicina en medio sin liposomas (A) y en medio con liposomas (B).

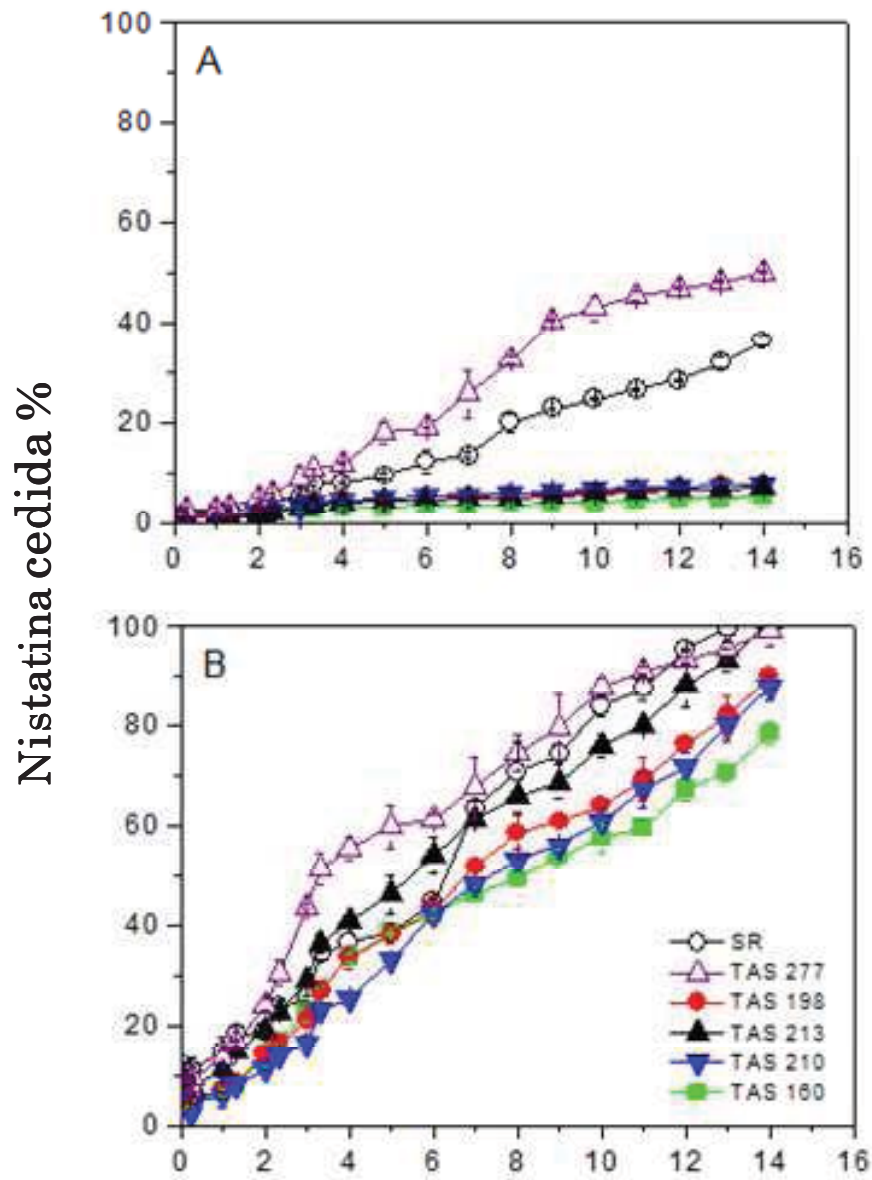


Figura 46. Perfil de liberación del fármaco nistatina en medio sin liposomas (A) y en medio con liposomas (B).

Para determinar el mecanismo por el cual el fármaco fue liberado, se utilizó el modelo semi-empírico de Ritger-Peppas que se describe mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = kt^n$$

Este modelo se ajusta al 60% del fármaco liberado y permite estimar el mecanismo de liberación de un fármaco mediante la determinación del valor del exponente difusional “n.” La tabla 7 muestra los valores de n asignados para diferentes sistemas de liberación. Para determinar el valor de n se graficó $\ln(Mt/M_{\infty})$ en función de $\ln t$, donde Mt es la cantidad de fármaco liberado a un tiempo t y M_{∞} es la cantidad máxima liberada (Sieepmann y Peppas, 2001; Ritger y Peppas, 1987). Los gráficos obtenidos para cada fármaco son mostrados a continuación en las figuras 47, 48, 49 y 50.

Tabla 7. Valores de n para sistemas de liberación con diferentes geometrías.

| exponente n | | | mecanismo de liberación | dependencia con el tiempo |
|------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|
| película delgada | cilindro | Esfera | | |
| 0.5 | 0.45 | 0.43 | difusión Fickiana | $t^{1/2}$ |
| $0.5 < n < 1$ | $0.45 < n < 0.89$ | $0.43 < n < 0.85$ | transporte anómalo | t^{n-1} |
| 1 | 0.89 | 0.85 | transporte caso II | independiente del tiempo |
| $n > 1$ | $n > 0.89$ | $n > 0.85$ | transporte super caso II | t^{n-1} |

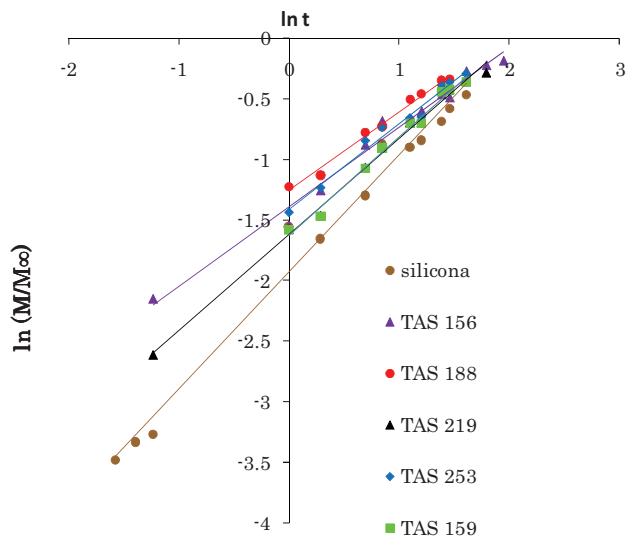


Figura 47. Modelo de Ritger- Peppas aplicado a la liberación de natamicina, medio sin liposomas.

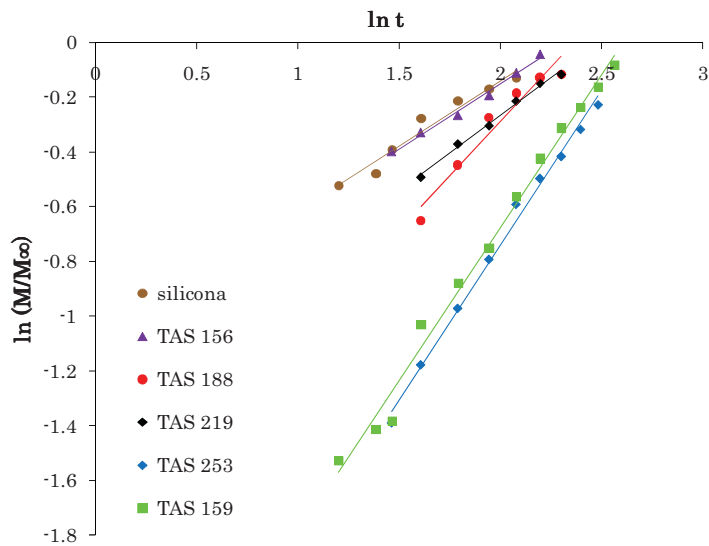


Figura 48. Modelo de Ritger-Peppas aplicado a la liberación de natamicina, medio con liposomas.

Tabla 8. Valores de n y R^2 obtenidos aplicando el modelo de Ritger-Peppas, para la liberación de natamicina.

| Muestra | medio sin liposomas | | medio con liposomas | |
|---------------------|---------------------|----------------|---------------------|----------------|
| | N | R ² | n | R ² |
| Silicona Control | 0.97 | 0.9821 | 0.48 | 0.9575 |
| TAS 156 Control | 0.7 | 0.9821 | 0.5 | 0.9906 |
| TAS 188 | 0.7 | 0.9893 | 0.8 | 0.9437 |
| TAS 219 | 0.8 | 0.994 | 0.6 | 0.9931 |
| TAS 253 | 0.7 | 0.9803 | 1.01 | 0.9936 |
| TAS 259 | 0.8 | 0.9886 | 1.01 | 0.9902 |

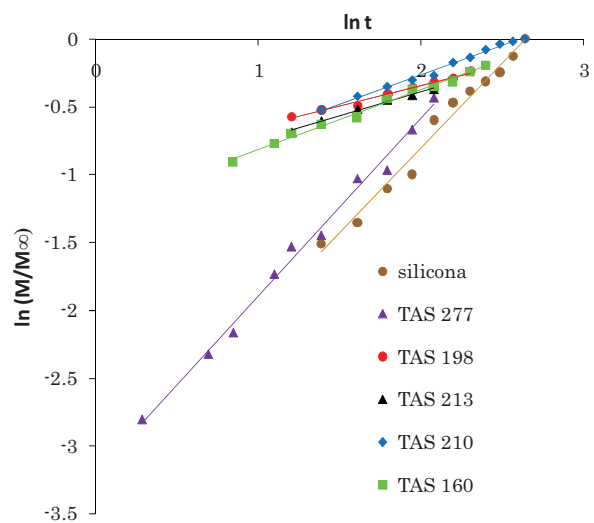


Figura 49. Modelo de Ritger-Peppas aplicado a la liberación de nistatina, medio sin liposomas.

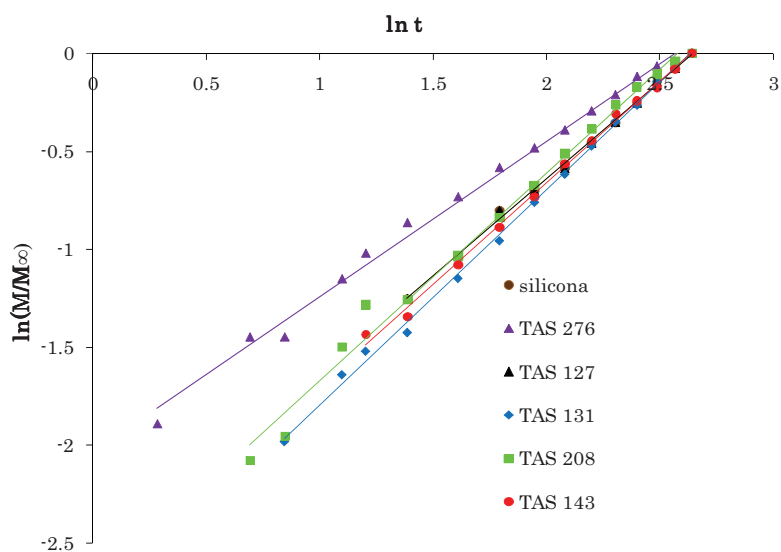


Figura 50. Modelo de Ritger-Peppas aplicado a la liberación de nistatina, medio con liposomas.

Tabla 9. Valores de n y R² obtenidos aplicando el modelo de Ritger-Peppas, para la liberación de nistatina.

| Muestra | medio sin liposomas | | medio con liposomas | |
|------------------|---------------------|----------------|---------------------|----------------|
| | N | R ² | n | R ² |
| Silicona Control | 1.3 | 0.9811 | 0.99 | 0.9978 |
| TAS 277 Control | 1.3 | 0.9925 | 0.80 | 0.9939 |
| TAS 198 | 0.3 | 0.9866 | 1 | 0.9971 |
| TAS 213 | 0.4 | 0.9806 | 0.99 | 0.9978 |
| TAS 210 | 0.4 | 0.9919 | 1 | 0.9980 |
| TAS 160 | 0.4 | 0.9907 | 1 | 0.9905 |

Los resultados obtenidos con el modelo de Ritger-Peppas para ambos medios con y sin liposomas se presentan en las tablas 8 y 9.

Al analizar los resultados obtenidos para el proceso de liberación en el medio que simuló la contaminación por hongos (medio con liposomas), observamos que los valores de n para las láminas modificadas con ergosterol conteniendo natamicina y nistatina, se encontraron dentro del intervalo de 0.5 a 1. Estos valores corresponden a un transporte caso II por lo que la liberación de los fármacos no ocurre mediante difusión Fickiana.

Por otro lado, al analizar los resultados obtenidos en el medio sin liposomas para el caso de nistatina se observan valores de n por debajo de 0.5 y el de natamicina entre 0.7 y 0.8. Sin embargo, estos resultados deben tomarse con cautela ya que no todos los perfiles de liberación alcanzaron el 60% de liberación en el medio sin liposomas. Cabe recordar que la liberación de nistatina fue menor al 6% y la liberación de natamicina menor al 15% (ver figura 45 y 46).

Debido a que el modelo de Ritger-Peppas no permite obtener conclusiones definitivas sobre el tipo de liberación, se decidió utilizar los modelos de cinética de orden cero y modelo de Higuchi con los que se determinó la velocidad de liberación de los fármacos nistatina y natamicina.

El modelo de Higuchi describe la liberación del fármaco como un proceso de difusión simple que sigue la ley de Fick y que depende de la raíz cuadrada del tiempo (*Sieepmann y Peppas, 2011*). La ecuación que describe este proceso se ilustra a continuación:

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = kt^{0.5}$$

Mientras tanto, una cinética de orden cero, describe un proceso ideal en donde la liberación del fármaco es constante durante todo el proceso (*Costa y Sousa, 2001*). Este modelo viene expresado por la siguiente ecuación

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = kt$$

Los gráficos obtenidos mediante ajustes a cinética de orden cero y raíz cuadrada (ecuación Higuchi) se presentan a continuación.

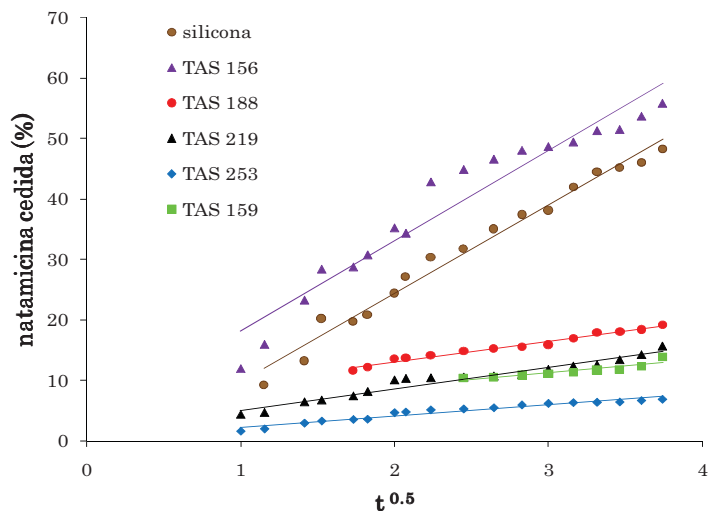


Figura 51. Determinación de la velocidad de liberación de natamicina, mediante modelo de Higuchi (cinética de raíz cuadrada), medio sin liposomas.

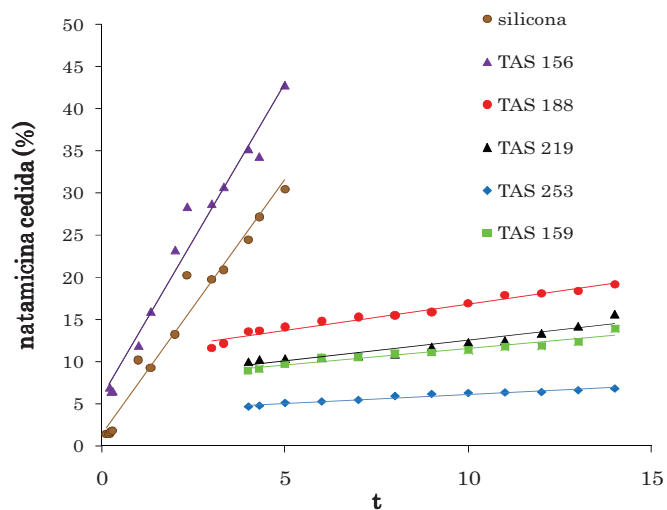


Figura 52. Determinación de la velocidad de liberación de natamicina, mediante la ecuación de cinética de orden cero, medio sin liposomas.

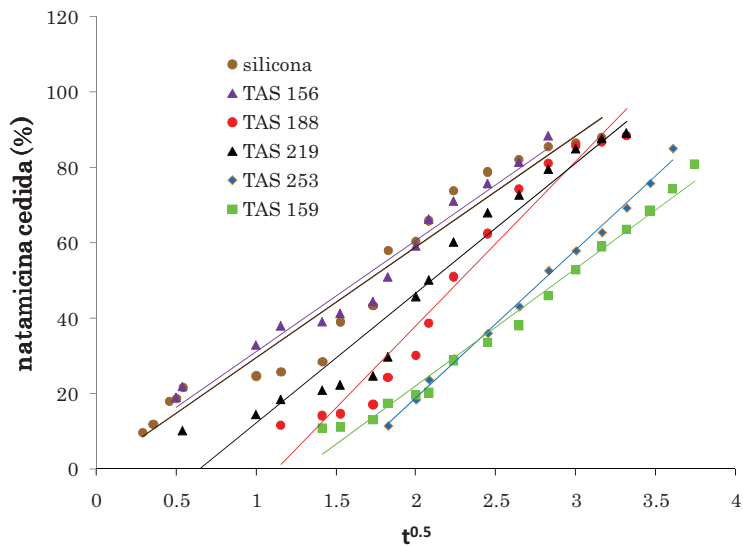


Figura 53. Determinación de la velocidad de liberación de natamicina, mediante modelo de Higuchi, medio con liposomas.

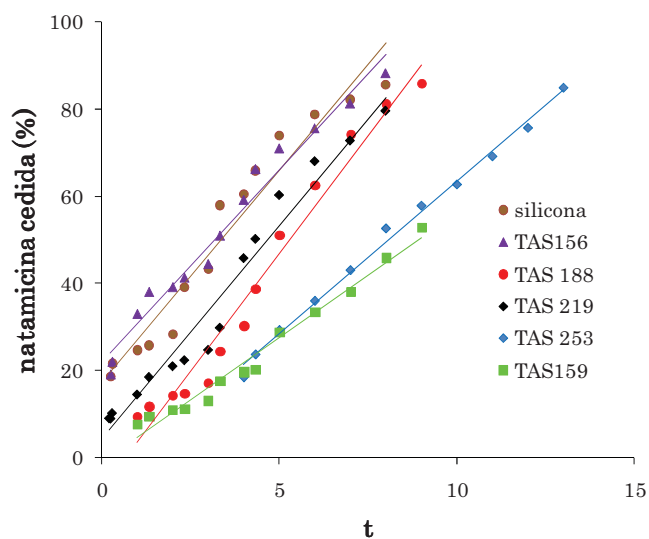


Figura 54. Determinación de la velocidad de liberación de natamicina, mediante la ecuación de cinética de orden cero, medio con liposomas.

Tabla 10 Velocidad de liberación de natamicina. Datos obtenidos mediante ajustes a cinéticas de raíz cuadrada (modelo de Higuchi) (k_H ; % $h^{-0.5}$) y de orden cero (k_0 ; % h^{-1}). Las desviaciones estándar fueron en todos los casos por debajo del 10% (n=3).

| clave de la muestra | solución amortiguadora de HEPES sin liposomas | | solución amortiguadora de HEPES con liposomas | |
|------------------------|---|----------------------------|---|----------------------------|
| | k_H (% $h^{-0.5}$); R^2 | k_0 (% h^{-1}); R^2 | k_H (% $h^{-0.5}$); R^2 | k_0 (% h^{-1}); R^2 |
| SR Control | 14.64; 0.9811 | 6.03; 0.9705 | 29.51; 0.9565 | 9,75; 0.9469 |
| TAS 156 Control | 14.93; 0.9360 | 7.42; 0.9738 | 25.57; 0.9557 | 8.85; 0.9738 |
| TAS 188 | 3.43; 0.9783 | 0.62; 0.9684 | 43.65; 0.9565 | 10.85; 0.9706 |
| TAS 219 | 3.58; 0.9491 | 0.50; 0.9184 | 34.48; 0.944 | 9.78; 0.961 |
| TAS 253 | 1.85; 0.9440 | 0.21; 0.9552 | 39.3; 0.9964 | 7.00; 0.9942 |
| TAS 159 | 3.75; 0.9385 | 0.39; 0.9343 | 31.33; 0.9832 | 5.75; 0.9793 |

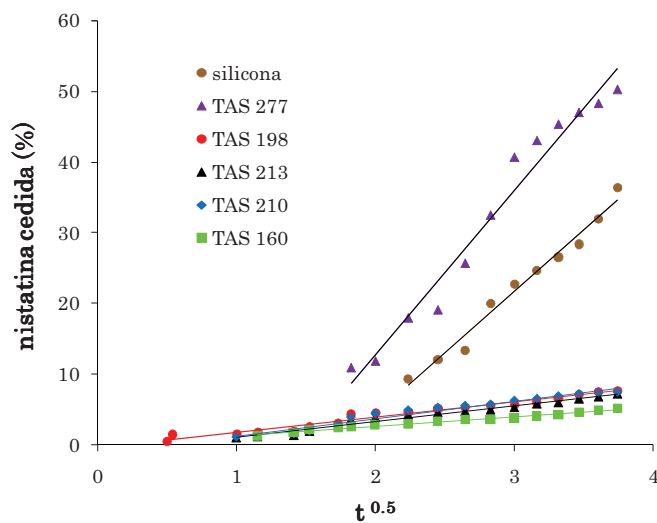


Figura 55. Determinación de la velocidad de liberación de nistatina, mediante modelo de Higuchi, medio sin liposomas.

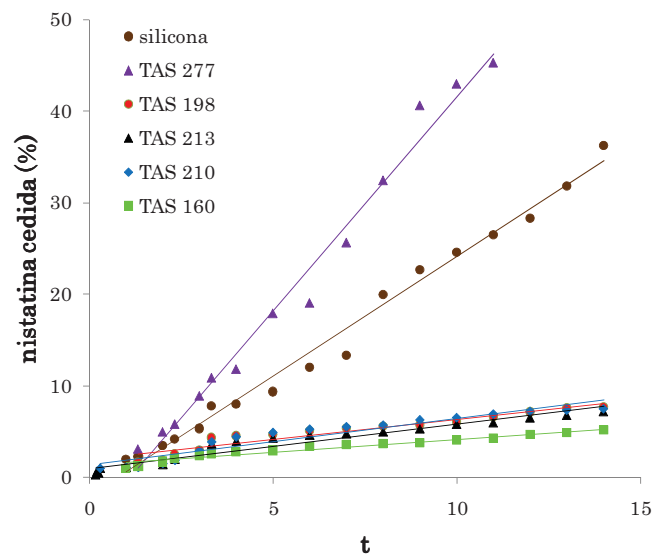


Figura 56. Determinación de la velocidad de liberación de nistatina, mediante la ecuación de cinética de orden cero, medio sin liposomas.

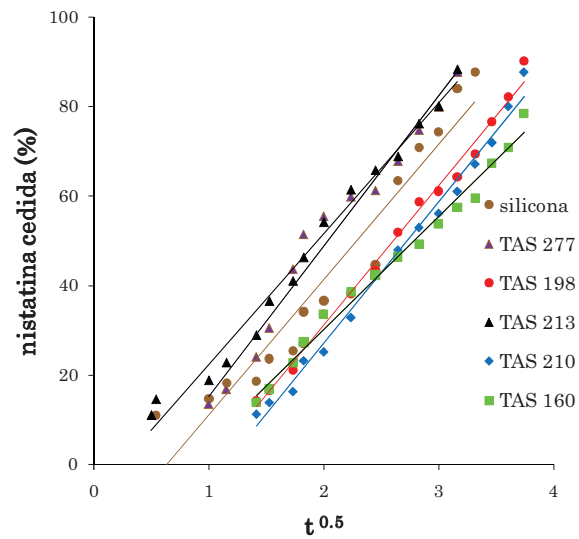


Figura 57. Determinación de la velocidad de liberación de nistatina, mediante el modelo de Higuchi, medio con liposomas.

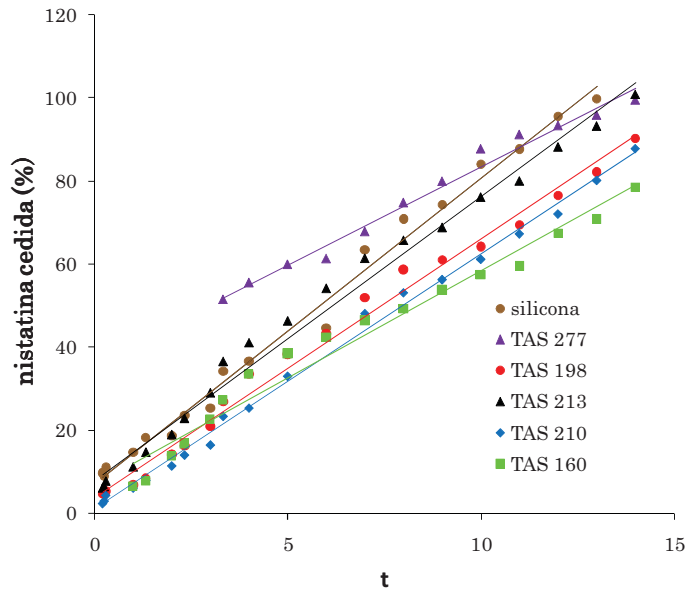


Figura 58. Determinación de la velocidad de liberación de nistatina, mediante la ecuación de cinética de orden cero, medio con liposomas.

Tabla 11 Velocidad de liberación de nistatina de los sistemas estudiados. Datos obtenidos mediante ajustes a cinéticas de raíz cuadrada (modelo de Higuchi) (k_H ; % $h^{-0.5}$) y de orden cero (k_0 ; % h^{-1}). Las desviaciones estándar fueron en todos los casos por debajo del 10% (n=3)

| Clave de la muestra | Solución amortiguadora de HEPES sin liposomas | | Solución amortiguadora de HEPES con liposomas | |
|------------------------|---|----------------------------|---|----------------------------|
| | k_H (% $h^{-0.5}$); R^2 | k_0 (% h^{-1}); R^2 | k_H (% $h^{-0.5}$); R^2 | k_0 (% h^{-1}); R^2 |
| SR Control | 17.40; 0.9805 | 2.61; 0.9877 | 30.16; 0.9306 | 7.38; 0.9900 |
| TAS 277 Control | 23.5; 0.969 | 4.68; 0.9844 | 33.54; 0.9697 | 4.74; 0.9832 |
| TAS 198 | 2.16; 0.9675 | 0.44; 0.919 | 31.19; 0.9926 | 6.20; 0.9905 |
| TAS 213 | 1.99; 0.9775 | 0.49; 0.9402 | 29.31; 0.9845 | 6.89; 0.9872 |
| TAS 210 | 2.49; 0.9615 | 0.51; 0.9116 | 31.72; 0.9908 | 6.15; 0.9947 |
| TAS 160 | 1.46; 0.97976 | 0.28; 0.952 | 25.26; 0.9876 | 5.15; 0.97 |

Los resultados obtenidos revelaron que en el medio sin liposomas, la velocidad de liberación de ambos fármacos a partir de las láminas no modificadas, fue considerablemente mayor que la velocidad de liberación a partir de las láminas modificadas con ergosterol. Esta tendencia fue completamente inversa en el medio con liposomas, en donde se observó un marcado incremento en la velocidad de liberación de ambos fármacos a partir de las láminas modificadas con ergosterol (tabla 10 y tabla 11). Dentro de los resultados también se observó que la velocidad de liberación del fármaco natamicina fue ligeramente mayor que la del fármaco nistatina, confirmando que la interacción del ergosterol presente en la lámina modificada, es más fuerte con la nistatina que con la natamicina.

De acuerdo a los valores de R^2 expresados en las tablas 10 y 11 la liberación de nistatina y natamicina en el medio con liposomas, se ajusta mejor a una cinética de orden cero, estos resultados están de acuerdo a los obtenidos cuando se aplicó el modelo de Ritger-Peppas para las láminas modificadas con ergosterol en el medio con liposomas..

7. CONCLUSIONES

Fue posible llevar a cabo el injerto de glicidilmetacrilato en hule de silicona utilizando radiación gamma mediante el método de pre-irradiación oxidativa.

El análisis del copolímero de SR-g-GMA por microscopía electrónica de barrido y de energía dispersiva de rayos X, muestran que el injerto cubrió completamente la superficie del hule de silicona y además ocurrió en masa.

Los resultados anteriores sugieren que el injerto procedió mediante un mecanismo “grafting from”.

Este trabajo confirma que los parámetros como dosis de preirradiación, temperatura, concentración de monómero y tiempo de reacción influyen directamente sobre el porcentaje de injerto.

Se lograron establecer los parámetros apropiados para la síntesis del copolímero de injerto los cuales fueron: razón de dosis 13.5 kGy/h, dosis 20 kGy, temperatura 60 °C y tiempo de reacción comprendido entre 10 y 14 h

Se logró llevar a cabo la inmovilización de la molécula de ergosterol en el copolímero de injerto SR-g-GMA confirmando su inmovilización mediante las técnicas de IR-ATR y TGA.

Los estudios de carga y liberación, demostraron que el ergosterol inmovilizado en el copolímero de injerto incrementa notablemente la carga de los fármacos nistatina y natamicina pero además, controla la liberación de estos fármacos.

Se logró desarrollar un nuevo sistema adecuado para cargar fármacos antifúngicos como la nistatina y natamicina, mediante la modificación estructural del polímero hule de silicona. El nuevo sistema fue capaz de liberar el fármaco antifúngico en un medio que simuló un ambiente contaminado con hongos. Sin embargo, este sistema tuvo una mejor respuesta para la carga y liberación del fármaco nistatina

8. PERSPECTIVAS

Funcionalizar el hule de silicona con otro tipo de monómeros a fin de obtener un copolímero que permita inmovilizar la molécula de ergosterol de manera más eficiente.

Llevar a cabo pruebas de estabilidad del fármaco natamicina, a fin de evaluar las posibles causas que pudieran haber afectado su baja respuesta con el sistema desarrollado.

Realizar pruebas microbiológicas con diferentes especies de hongos sensibles a natamicina y nistatina ya que hasta el momento las pruebas realizadas con *Candida albicans* no logran ser concluyentes.

9. REFERENCIAS

- Antoniadou, A., Dupont, B. Lipid formulations of amphotericin B: where are we today? *Journal of Micology Medicales*, 15, **2005**, 230-238.
- Alekha, K., Dash and Greggrey, C., Cudworth II. Therapeutic Applications of Implantable Drug Delivery Systems *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 40, **1998**, 1-12.
- Baran-Teke, A., Hamarat-Baysal, S. Immobilization of urease using glycidyl methacrylate grafted nylon-6-membranes. *Process Biochemistry*, 42, **2007**, 439-443.
- Battacharya, A., Misra, B.N. Grafting a versatile means to modify polymers. Techniques, factors and applications. *Progress in Polymer Science*, 29, **2004**, 767-814.
- Battacharya, A., Rawlins, J.W., Ray, P. Polymer Grafting and Crosslinking. Wiley A John Wiley & Sons, **2009**.
- Bayston, R., Fisher, L-E., Weber, K. An antimicrobial modified silicone peritoneal catheter with activity against both Gram positive and Gram negative bacteria. *Biomaterials*, 30, **2009**, 3167-3173.
- Bierhalz, A.C.K., da Silva, M.A., de Sousa, H. C., Braga, M.E.M., Kieckbusch, T.G. Natamycin release from alginate/pectin films for food packaging applications. *Journal of Food Engineering*, 110, **2012**, 18-25.
- Bondar, Y., Kim H.J., Yoon S.H., Lim Y., J. Synthesis of cation-exchange adsorbent for anchoring metals ion by modification of poly(glycidylmethacrylate) chains grafted onto polypropylene fabric. *Reactive Functional Polymer*, 58, **2004**, 43-51.

-
- Bouza, E, Muñoz, P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32, **2008**, S87-S91.
- Castillo-Rojas, B.S. Estudio de la dinámica de extinción de la reacción corazón de mercurio en medio de ácido sulfúrico utilizando Ce(IV) e irradiación. Tesis doctoral, UNAM, **2003**.
- Chapiro, A. Radiation Chemistry of polymeric Systems. John Wiley & Sons, New York, **1962**.
- Chapiro, A. The Contribution of Arthur Charlesby to the Radiation Chemistry of Polymers-Personal Experience. *Radiation Physics and Chemistry*, 51, **1998**, 9.
- Chapiro, A. XIIth international meeting on radiation processing Avignon 25-30 March 2001 (Polymer Irradiation: past-present and future). *Radiation Physics and Chemistry*, 63, **2002**, 207-209.
- Colas, A., Curtis, J. Silicone biomaterials: history chemistry and major application of silicones printed in Biomaterials Science: An introduction to Materials in Medicine 2nd edition, Elsevier Publications, **1996**.
- Costa, P., Sousa, L. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13, **2001**, 123-133.
- Cowie, J.M.G., Arrigui, V. Polymers: Chemistry and Physics of Modern Materials. 3rd ed., CRC Press, **2008**
- Curcio, M., Spizzirri, U.G., Lemma, F., Pouci, F., Cirillo, G., Parisi, O.I., Picci, N. Grafted thermo-responsive gelatin microspheres as delivery systems in triggered drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 76, **2010**, 48-55.

-
- De Kruijff, B., Demel, R.A. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. I. Specificity of the membrane permeability changes induced by the polyene antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta*, 339, **1974**, 30-43.
- De Prijck, K., De Smet, N., Coenye, T., Schacht, E., Nells, H-J. Prevention of *Candida albicans* Biofilm Formation by Covalently Bound Dimethylaminoethylmethacrylate and Polyethylenimine. *Mycopathologia* 170, **2010**, 213-221.
- Doroka-Bobkowska, B., Konopka, K., Düzgünes, N. Influence of antifungal polyenes on the adhesion of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to human epithelial cells in vitro. *Archives of Oral Biology*, 48, **2003**, 805-814.
- Enomoto, I., Katsumura, Y., Kudo, H., Sekiguchi, M. The role of hydroperoxides as a precursor in the radiation-induced graft polymerization of methyl methacrylate to ultra-high molecular weight polyethylene. *Radiation Physics and Chemistry*, 79, **2010**, 718-724.
- Hac-Wydro, K., Dynarowicz-Latka, P., Interaction between nystatin and natural membranes lipids in Langmuir monolayers.-The role of phospholipid in the mechanism of polyene mode of action. *Biophysical Chemistry*, 123, **2006**, 154-161.
- Hegazy, E.-S.A., Dessouki, A.M., El-Dessouky, M.M., El-Sawy, N.M., Crosslinked grafted PVC obtained by direct radiation grafting. *Radiation Physics and Chemistry*, 26, **1985**, 143-149.
- Hoffmann, A.S. The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 132, **2008**, 153-163

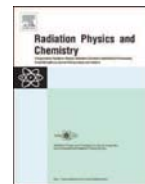
-
- Hupsey, M.A.Z., Ekins, S. Improving the drug selection and development process for combination devices. *Drug Discovery Today*, 12, **2007**, 844-852.
- Ivanov, V.S., (New concepts in polymer science) Radiation Chemistry of Polymers, VSP Utrecht, The Netherlands. **1992**.
- Jusinghe, V.J., Perera, C.O. Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effects on the conversion of ergosterol to vitamin D₂ by UV irradiation. *Food Chemistry*, 92, **2005**, 541-546.
- Kartal, F., Akkaya, A., Kilinc, A. Immobilization of porcine pancreatic lipase on glycidyl methacrylate grafted poly vinyl alcohol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57, **2009**, 55-61.
- Kato, K., Uchida, E., Kang, E-T., Uyama, Y., Ikada, Y., Polymer surface with graft chains. *Progress in Polymer Science*, 28, **2003**, 209-259).
- Kimura, Y., Asano, M., Chen, J., Maekawa, Y., Katakai, R., Yoshida, M. Influence of grafting solvents on the properties of polymer electrolyte membranes prepared by γ -ray preirradiation method *Radiation Physics. Chemistry*, 77, **2008**, 864-870.
- Kwok, C.S., Wan, C., Hendricks, S., Bryers J.D., Horbett T.A, Ratner B.D. Design of infection-resistant antibiotic-releasing polymers: I fabrication and formulation. *Journal of Controlled Release*, 62, **1999**, 289-299.
- Lazo-Jimenez, L. Síntesis de un nuevo sistema tipo peine, de 4-vinilpiridina/ácido acrílico injertado en polipropileno, mediante radiación gamma. Tesis doctoral, UNAM, **2010**.
- Liu, P-S., Chen, Q., Wu, S-S., Shen, J., Lin, S-C., Surface modification of cellulose membranes with zwitterionic polymers for resistance to protein

-
- adsorption and platelet adhesion. *Journal of Membrane Science*, **2010**, 350, 387-394.
- Leenders, N.H.J., Oosterheert, J.J., Ekkelenkamp, De Lange D.W., Hoepelman A.I.M., Peters E.J.G. Candidemic complications in patients with intravascular catheters colonized with *Candida* species: an indication for preemptive antifungal therapy? *International Journal of Infectious Diseases*, 15, **2011**, e453-e458.
- Makuuchi, K., Cheng S. Radiation Processing of Polymer Materials and its industrial applications, 1st ed., John Wiley and Sons. **2012**
- Muñoz-Bonilla, A., Fernandez-Garcia, M. Polymeric materials with antimicrobial activity. *Progress in Polymer Science*, 37, **2012**, 281-339.
- Nasef, M.M. Effect of solvents on radiation-induced grafting of styrene onto fluorinated polymer films. *Polymer International*, 50, **2001**, 338-346.
- Nasef, M.M., Hagazy, E.-S.A. Preparation and applications of ion exchange membranes by radiation-induced graft copolymerization of polar monomers onto non-polar films. *Progress in Polymer Science*, 29, **2004**, 499-561.
- Nava-Ortiz, C.A.B., Alvarez-Lorenzo, C., Bucio, E., Concheiro, A., Burillo, G. Cyclodextrin-functionalized polyethylene and polypropylene as biocompatible materials for diclofenac delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 382, **2009**.183-191.
- Navarrete M., Cabrera L. Introducción al estudio de los radioisótopos. Segunda edición, Facultad de Química-UNAM, **1993**.
- Painter, P.C., Coleman, M.M. Fundamentals of Polymer Science. 2nd ed., CRC Press, **1997**.

-
- Padera, R.F., Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm, *Cardiovascular Pathology*, 15, **2006**, 264-270).
- Palsule, A.S., Clarson, S.J., Widenhouse C.W. Gamma irradiation of silicones. *Journal of Inorganic. Organometallic .Polymer .Materials*, 18, **2008**, 207-221.
- Reid G. Biofilms in infectious disease and medical devices. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11, **1999**, 223-226.
- Remington Farmacia, Volumen 2, 20^a ed., Médica Panamericana, **2003**.
- Ritger, P.L., Peppas N, A. A simple equation for description of solute release I, Fickian and non-fickian release from non swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Control Release*, 5, **1987**, 23-26.
- Saenz, V., Hernaez, E., Sanz-Angulo L. Mecanismos de liberación de fármacos desde materiales polímeros. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 5, **2004**, 55-70.
- Satti, A.J., Andreucetti, N.A., Ressoa, J.A., Vallat, M.F., Sarmoria, C., Valles E.M. Modelling molecular weight changes induced in polydimethylsiloxane by gamma and electron beam irradiation. *European. Polymer Journal*, 44, **2008**, 1548-1555.
- Sekine, A., Seko N., Tamada M., Suzuki Y. Biodegradable metal adsorbent synthesized by grafting polymerization onto nonwoven cotton fabric. *Radiation Physics and Chemistry*, 79, **2010**, 16-21.
- Semis, R., Mendlovic, S., Polacheck, I., Segal, E. Activity of an intralipid formulation of nystatin in murine systemic candidiasis. *International Journal of Antimicrobial Agents* 38, **2011**, 336-340.

-
- Siepmann, J., Peppas, N.A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48, **2001**, 139-157.
- Siepmann, J., Peppas, N.A. Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. *International Journal Pharmaceutical*. 418, **2011**, 6-12.
- Silva, L., Coutinho, A., Fedorov, A., Prieto, M. Competitive binding of cholesterol and ergosterol to the polyene nystatin. A fluorescence study. *Bhiophysical Journal*, 90, **2006**, 3625-3631.
- Sims C.R. Ostrosky-Zeichne, L., Rex, J.H. Invasive Candidiasis in Immunocompromised Hospitalized Patients. *Archives of Medical Research*, 36, **2005**, 660-671.
- Sokker H.H., Badawy S.M., Zayed E.M., Nour-Eldien F.A., Farag A.M. Radiation induced grafting of glycidyl methacrylate onto cotton fabric waste and its modification for anchoring hazardous wastes from their solutions *Journal of Hazard of Materials*, 168, **2009**, 137-144.
- Spinks, J.W.T., Woods R.J., An introduction to Radiation Chemistry 2nd ed., John Wiley and Sons, **1976**.
- Stannett, V.T., Silvermann, J., Garnett, J.L. Polymerization by High-energy Radiation. *Comprehensive Polymer Science. Supplement*, 4, **1989**, 317-336.
- Stevenson, C.L., Santini Jr., J.T., Langer, R. Reservoir-based drug delivery systems utilizing microtechnology. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 64, **2012**, 1590-1602.
- Takács, E., Wojnárovits, L., Horvath E-K., Fekete T., Borsa J., Improvement of pesticide adsorption capacity of cellulose fibre by high-energy

-
- irradiation-initiated grafting of glycidylmethacrylate. *Radiation Physics and Chemistry*, 12, **2012**, 111-119.
- Thomas, L.V., Delves-Broughton, J. Encyclopedia of food sciences and nutrition. 2nd ed., **2003**, 4109-4115.
- Volker, N., Klee, D., Hocker, H., Langefeld, S. Functionalization of silicone rubber for the covalent immobilization of Fibronectin. *Journal of Materials Science Materials Medicine*. 12, **2001**, 111-119.
- Young, R.J., Lovell, P.A. Introduction to Polymers. 3rd ed., CRC Press Taylor and Francis Group. **2011**, 61-121.
- Wu, P., Grainger, D.W. Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis. *Biomaterials*, 27, **2006**, 2480-2467.
- Wojnárovits, L., Foldvály, Cs. M., Takács, E. Radiation-induced grafting of cellulose for adsorption of hazardous water pollutants: A review. *Radiation Physics and Chemistry*, 79, **2010**, 848-862.
- Zilberman, M., Elsner, J.J. Antibiotic-eluting *medical* devices for various applications *Journal of Controlled Release*. 130, **2008**, 202-215.



Radiation modification of silicone rubber with glycidylmethacrylate



Tania Segura, Guillermina Burillo*

Departamento de Química de Radiaciones y Radioquímica, Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Ciudad Universitaria, 04510 México D.F., Mexico

HIGHLIGHTS

- A graft copolymer with silicone rubber was synthesized by gamma pre-irradiation method.
- SEM–EDS analysis showed that the surface and the bulk of the new copolymer were grafted.
- The thermal properties of the silicone rubber used were modified with grafting.
- The new copolymer could be used to immobilize nucleophilic biomolecules.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 February 2013

Accepted 13 June 2013

Available online 20 June 2013

Keywords:

Silicone rubber

Grafting

Gamma irradiation

Glycidylmethacrylate

Pre-irradiation method

ABSTRACT

The grafting of glycidylmethacrylate(GMA) was grafted onto silicone rubber (SR) by using the γ -ray pre-irradiation grafting method under different conditions. The effect of reaction time, total dose, reaction temperature and monomer concentration on the graft yield was studied. It was found that the degree of grafting can be controlled by adjusting these parameters. The chemical structure of SR before and after grafting was characterized using FTIR-ATR and SEM–EDS. The analysis revealed that the surface of the SR was uniformly covered by GMA and the cross-section analysis indicated that the grafting occurred in the bulk. Thermogravimetric analysis (TGA) showed that the graft copolymer was more thermally stable than polyglycidylmethacrylate but less stable than SR, and the DSC confirmed that the GMA was grafting onto silicone rubber.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Polymeric structures are frequently modified by grafting (Zhu et al., 2012; Deng et al., 2009). Such graftings can be initiated by different methods widely described in the literature (Battacharya and Misra, 2004; Nasef and Hagazy, 2004.). Because gamma radiation has high penetrability and does not require chemical radical initiators, it has gained popularity over other grafting techniques (Park et al., 2005; Hasegawa et al., 2011). Moreover, gamma irradiation offers the ability to select from three irradiation methods available for grafting, depending on polymeric matrix type and monomer reactivity, the direct method, the simultaneous irradiation method and the pre-irradiation method (Stannett et al., 1989). Therefore, grafting by gamma radiation has been a powerful tool for modifying polymeric surfaces that can be applied in the biomedical field. In this field, the inert surface of silicone rubber, polyethylene or polypropylene has been modified to improve their biocompatibility (Cho et al., 2005) and hemocompatibility (Chapiro et al., 1981) or to prevent microbial adhesion and

biofilm formation (Contreras-García et al., 2011). Meanwhile glycidylmethacrylate is one of the most useful monomers with which to functionalize polymers through grafting (Kunita et al., 2005; Sekine et al., 2010; Takács et al., 2012), because it contains a reactive epoxy group that can be used to react with different nucleophilic functions, such as carboxylic, hydroxyl and amine groups (Kim and Saito, 2000; Sokker et al., 2009) or to provide sites for immobilization of biomolecules such as enzymes (Kartal et al., 2009) or cyclodextrins (Desmet et al., 2011). These changes have allowed the resulting polymers to be applied in the preparation of drug delivery systems (Nava-Ortiz et al., 2009), ion-exchange membranes (Choi et al., 2001), biosensors (Hervás-Pérez et al., 2006) and other uses. In recent years our laboratory has been involved in several projects pertaining to the functionalization of several inert polymeric structures to immobilize biomolecules through grafting by gamma radiation (Nava-Ortiz et al., 2010; García-Uriostegui et al., 2012). In this context, silicone rubber, an elastomer which belongs to polydimethylsiloxane family has occupied much of our attention. This polymer is one of the commonest biomaterial used in implantable medical devices due to its biocompatibility, low toxicity and good mechanical properties (Rochow, 1946). A variety of techniques have been proposed to functionalize the surface of silicone rubber with the aim of incorporating biologically important molecules

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56224674; fax: +52 55 56224707.
E-mail address: burillo@nucleares.unam.mx (G. Burillo).

Instruments, Norwalk, CT) with 16 scans, taken over the range of 4000 to 600 cm^{-1} .

2.4.2. DSC

The thermal properties of SR-g-GMA and polyglycidylmethacrylate were determined by differential scanning calorimetry DSC TA Instruments Model 2010 (TA Instruments, New Castle, DE) over the temperature interval from 25 °C to 400 °C, under nitrogen atmosphere at a flow rate of 60 mL min^{-1} and a heating rate of 10 °C min^{-1} .

2.4.3. TGA

The thermal stability of the SR, SR-g-GMA, and polyglycidylmethacrylate was determined by thermogravimetric analyses (TGA) using a TGA Q50 (TA Instruments, New Castle, DE) at a heating rate of 10 C min^{-1} in the temperature interval from 25 °C to 800 °C under nitrogen atmosphere.

2.4.4. SEM-EDS microscopy

The morphology of the original SR film and SR grafted was observed using a scanning electron microscope SEM operated at 1.5 kV (EVO LS 15), and energy distribution X-ray spectroscopy of the transversal sides was carried out using an EDS (FESEM ULTRA Plus). For the SEM analysis, small pieces of each sample were mounted on metal studs and were then observed under high vacuum. EDS spectra were obtained applying an acceleration voltage of 4 kV.

2.4.5. Contact angle

To confirm the surface modification of silicone rubber after grafting, contact angle was recorded using a drop shape analyzer Kruss DSA 100 apparatus (Matthews NC, USA). Small drops of bidistilled water were deposited onto dry films and the contact angle was measured after 1 min.

3. Results and discussion

High-energy radiation from gamma rays initiates ionization and free radical formation in polymer structures. This process may result in chain scission or crosslinking depending on the dose and the polymer structure (Chapiro, 1995). It is well known that polydimethylsiloxane undergoes mainly crosslinking when it is exposed to high-energy radiation and hydrocarbons such as ethane and methane are formed as a result of this radiation damages (Palsule et al., 2008). The high-energy radiation has the ability to break bonds in the polydimethylsiloxane structure such as Si–O due to chain scission or Si–C and C–H due to methyl or hydrogen abstraction respectively. The free radicals that are formed can react to produce crosslinking or some small molecules like ethane and methane however during irradiation in the presence of oxygen, inactive species are produced and do not contribute to the crosslinking (Satti et al., 2008).

3.1. Effect of the pre-irradiated dose

The influence of pre-irradiation dose on the degree of grafting was investigated in the irradiation range from 10 to 120 kGy and is illustrated in Fig. 1. As shown, the grafting percentage increases with the dose, which is expected because as the pre-irradiation dose increases, more free radicals are produced, which can react with oxygen in the air and generate peroxides within the polymer matrix (Menhofer et al., 1987, Chapiro, 1977). These peroxides later form macroradicals to initiate the grafting process upon heating. The formation of peroxides on irradiated silicone rubber in the

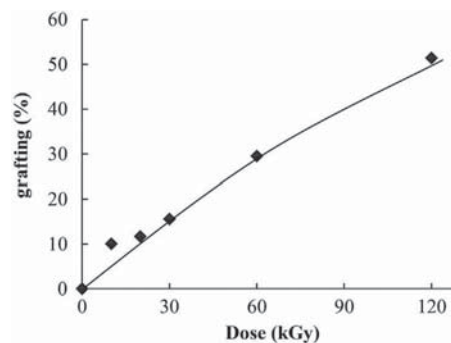


Fig. 1. Effect of the dose on the graft copolymerization. Dose rate: 13.5 kGy h^{-1} , GMA/MeOH 20/80 vol%, $T=60$ °C, and $t=12$ h.

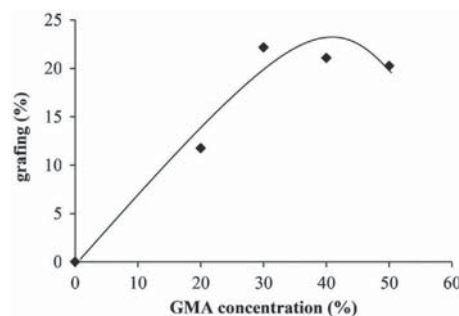


Fig. 2. Effect of the monomer concentration on the graft copolymerization. Dose rate: 13.5 kGy h^{-1} , dose 20 kGy, $T=60$ °C, and $t=12$ h.

presence of oxygen by the pre-irradiation method had been confirmed and reported previously (Li et al., 1999).

3.2. Effect of monomer concentration

Fig. 2 shows the effect of monomer concentration on the degree of grafting. The grafting yield increased with the monomer concentration up to a maximum and then decreased. The sudden drop can be explained as follows. Because the viscosity increases with monomer concentration, the grafting solution is very viscous; as a result, the diffusion of monomer into the polymer matrix is hindered, and homopolymer formation is enhanced. In this study, the enhancement in homopolymer formation was accompanied by insolubility of the polyglycidylmethacrylate homopolymer in methanol, which led to an increase in the viscosity of the grafting mixture as well.

3.3. Effect of reaction time

The variation in the degree of grafting with the reaction time for different monomer concentrations is shown in Fig. 3. The grafting yield increases gradually with the reaction time for all concentrations. However with 20% and 30% of GMA in methanol the degree of grafting increases with the reaction time and reaches equilibrium within 10 h. This behavior may be due to the fact that at low concentrations, the monomer is consumed more quickly, and with time, less monomer is available for the grafting reaction.

3.4. Effect of the reaction temperature

In the pre-irradiation method the temperature is a very important factor that affects the grafting reaction because it is responsible for the thermal decomposition of peroxides and

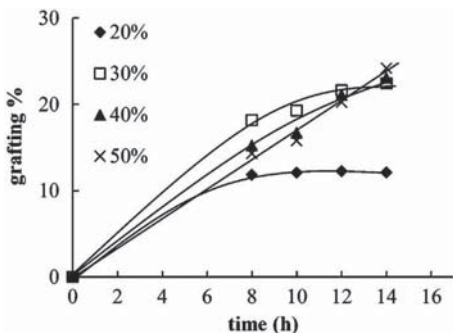


Fig. 3. Effect of the reaction time on the graft copolymerization at different monomer concentrations of GMA. Dose rate: 13.5 kGy h^{-1} , dose 20 kGy , $T=60 \text{ }^\circ\text{C}$, and $t=12 \text{ h}$.

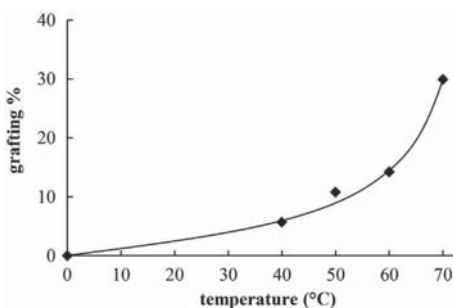


Fig. 4. Effect of the reaction temperature on the graft copolymerization. Dose rate: 13.5 kGy h^{-1} , dose 20 kGy , GMA/MeOH 20/80 vol%, $t=12 \text{ h}$.

hydroperoxides that are formed on the backbone of the polymer during pre-irradiation in air. When peroxides and hydroperoxides are heated, two different species are created an RO radical and an OH radical; the former is capable of initiating the grafting reaction, whereas the latter is responsible for the homopolymerization. Previous studies have shown that the temperature that favors grafting is between 60 and $70 \text{ }^\circ\text{C}$ (Bondar et al., 2004), as was clearly demonstrated by studying the effect of the temperature on the degree of grafting. Fig. 4 shows that almost no grafting was detected below $50 \text{ }^\circ\text{C}$. However in the range of 60 – $70 \text{ }^\circ\text{C}$, the degree of grafting increased considerably.

3.5. FTIR-ATR analysis

FTIR-ATR technique was used to confirm the incorporation of GMA onto SR. Fig. 5 shows IR spectra of the SR and SR-g-GMA films. The spectrum of the SR film shows an absorption band at 1000 cm^{-1} which corresponds to $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$ stretching vibration, furthermore, an absorption band occurs at 1263 cm^{-1} , which was assigned to the $-\text{Si}-\text{CH}_3$ deformation vibration, and the absorption band at 2978 cm^{-1} was assigned to the $-\text{C}-\text{H}$ bond of the CH_3 groups. By comparing the spectra of the grafted and non-grafted SR films, it can be noticed that after grafting, two new absorption bands appear, indicating the presence of the ester group: one at 1735 cm^{-1} , which was assigned to the $\text{C}=\text{O}$ stretching vibration, and the other at 1167 cm^{-1} , which was due to the $-\text{C}-\text{O}-\text{O}$ stretching asymmetric vibration. Absorption bands corresponding to epoxy ring appear at 917 cm^{-1} and 826 cm^{-1} respectively.

3.6. TGA analysis

TGA analysis (Fig. 6) was performed to investigate and compare the thermal degradation behavior of the SR, the grafted SR and polyglycidylmethacrylate. The virgin SR film showed one degradation

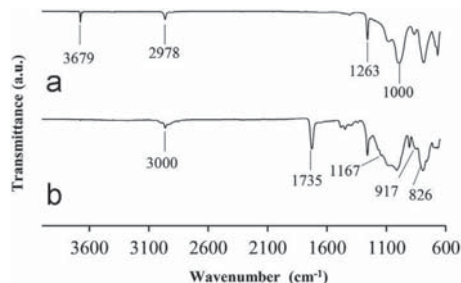


Fig. 5. FTIR-ATR spectrum of SR (a) and SR-g-GMA (b).

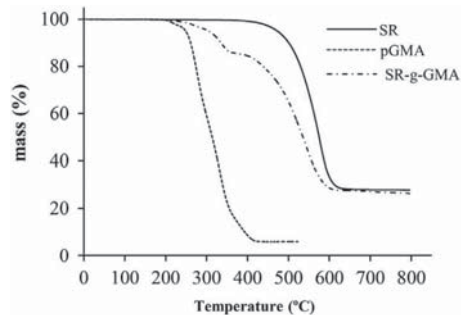


Fig. 6. TGA of SR, pGMA and SR-g-GMA.

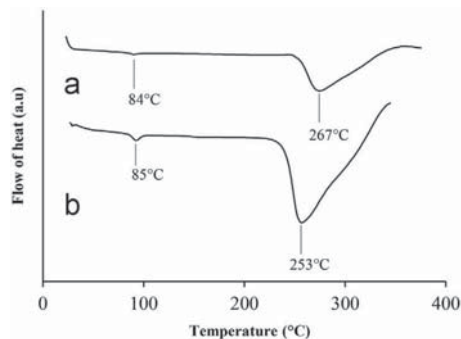


Fig. 7. DSC spectra of (a) SR-g-GMA and (b) pGMA.

step at $516 \text{ }^\circ\text{C}$, ascribed to the decomposition of the polymer main chain. Meanwhile, the SR-g-GMA film showed two degradation steps at $291 \text{ }^\circ\text{C}$ and $431 \text{ }^\circ\text{C}$. The first was attributed to the decomposition of polyglycidylmethacrylate and the second to the thermal degradation of the polymeric matrix. On the other hand, the pure polyglycidylmethacrylate showed one degradation step at $251 \text{ }^\circ\text{C}$. As can be seen in the thermogram, thermal stability followed the trend SR film > SR-g-GMA > pure polyglycidylmethacrylate.

3.7. DSC

The DSC thermograms of the grafted SR and polyglycidylmethacrylate are presented in the Fig. 7. We used this technique to confirm the grafting of glycidylmethacrylate onto silicone rubber. The polyglycidylmethacrylate presented a melting point of $253 \text{ }^\circ\text{C}$ and a glass transition temperature of $85 \text{ }^\circ\text{C}$. The transitions present in the DSC diagram of SR-g-GMA at $267 \text{ }^\circ\text{C}$ and $87 \text{ }^\circ\text{C}$ are associated with the melting point and the glass transition temperature of the pGMA, respectively, and confirm that grafting

was carried out, with an increase of 14 °C due to the formation of a new system.

3.8. SEM

The changes in the surface structure induced by grafting were investigated by SEM. Fig. 8 shows SEM micrographs of the SR and SR-g-GMA films. Compared with the virgin film, obvious changes can be observed in the grafting samples, which suggest that grafting occurred over the entire surface. On the other hand, the data obtained by EDS for an SR-g-GMA cross-section show signals corresponding to silicon, carbon, and oxygen. As shown in Table 1, there is no significant difference between the three analyzed points; these results confirm that grafting occurred over the surface and in the bulk of the polymer film.

We expected grafting to occur preferentially on the SR surface. Therefore, methanol was chosen as a solvent for the grafting reaction. Methanol is a good solvent for the monomer but is a bad swelling agent for SR; thus, we expected that monomer diffusion

into the polymer matrix would not occur. However, the results show the opposite. GMA may have diffused through the SR matrix because the graft chains on the surface promote the diffusion GMA through the polymer; thus, grafting would be initiated at the surface of the polymer and occur continuously through the film. These results are in agreement with those reported in previous studies which suggest that grafting proceeds by a front mechanism (Nasef, 2001; Kimura et al., 2008).

Table 1
Results of the three-points analysis by EDS.

| Element | Composition | | |
|---------|-------------|-------|-------|
| | C | O | Si |
| Point 1 | 4.86 | 18.53 | 24.25 |
| Point 2 | 4.87 | 16.57 | 25.72 |
| Point 3 | 5.27 | 18.23 | 25.61 |

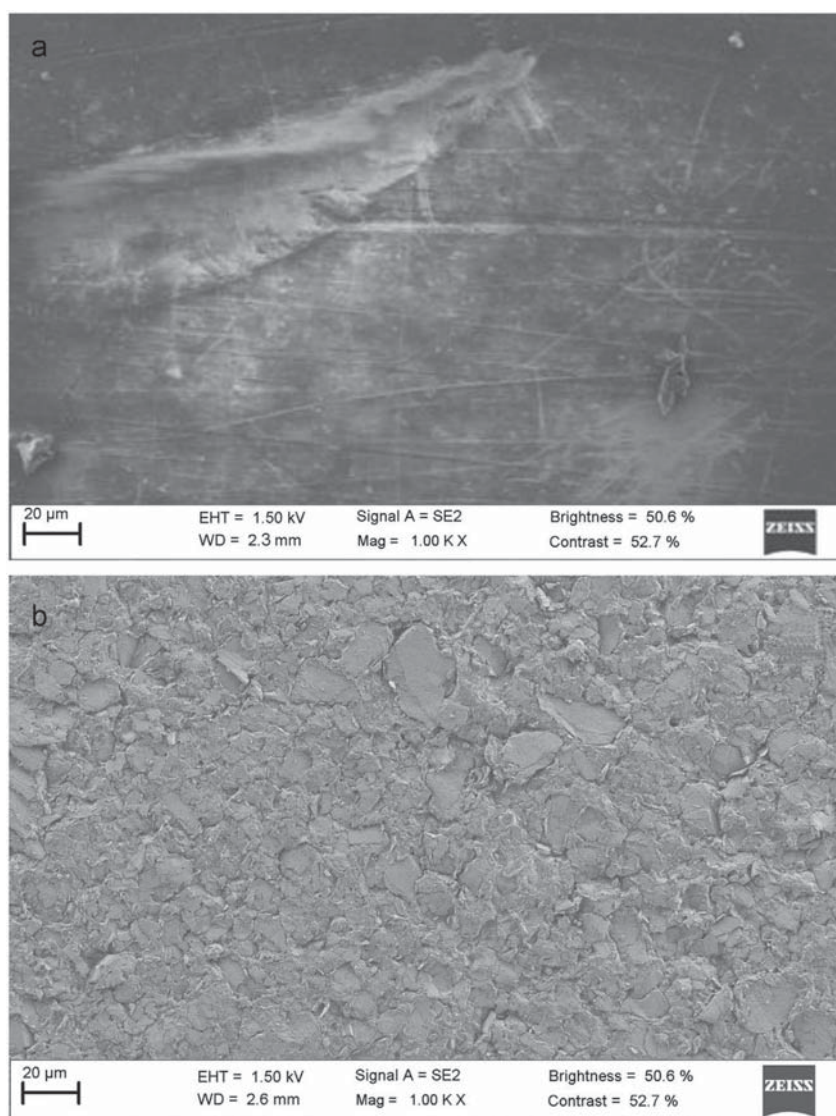


Fig. 8. SEM micrographs of (a)SR and (b)SR-g-GMA.

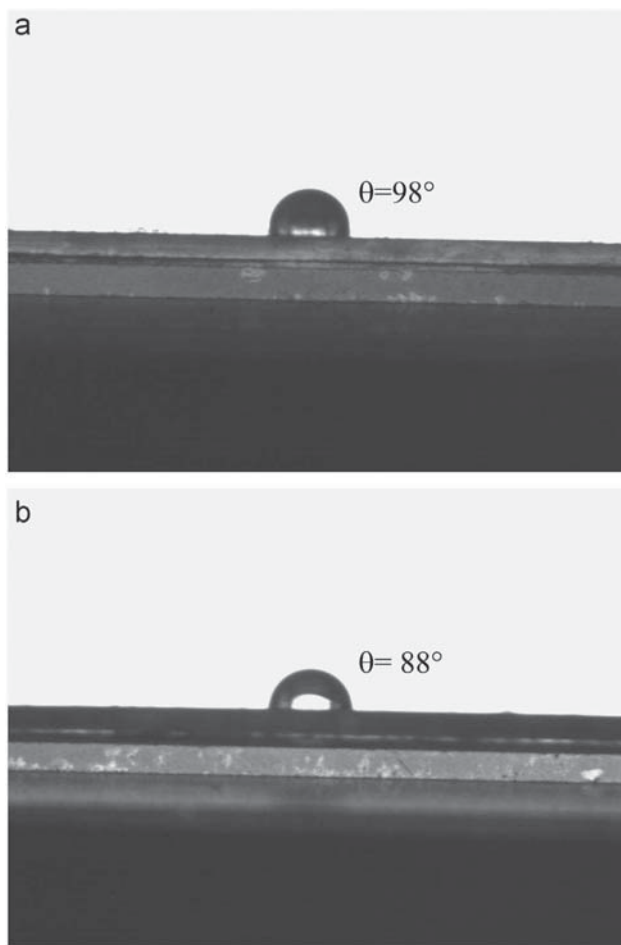


Fig. 9. Contact angle images of (a)SR and (b)SR-g-GMA.

3.9. Contact angle

Contact angle of SR film and SR-g-GMA was measured to determinate the changes in the surface after grafting. Fig. 9 shows that the contact angle value of SR-g-GMA was lower than SR. It is well known that the surface of SR is hydrophobic due to the presence of apolar methyl groups around the Si–O–Si polymer backbone but when GMA is grafted on silicone rubber surface, methyl groups are replaced and the polar groups present in the GMA such as carbonyl and epoxy promote the hydrogen bonding interactions and therefore the contact angle decreases.

4. Conclusion

The grafting of glycidylmethacrylate onto silicone rubber was achieved by the gamma pre-irradiation method. IR-ATR and SEM showed that the surface of SR was uniformly grafted. EDS analysis of the cross-section of SR-g-GMA film revealed that grafting occurred in the bulk and on the surface of the polymeric matrix and suggested that grafting proceeded by a front mechanism. The decrease of the contact angle on the SR-g-GMA was directly related to the presence of carbonyl and epoxy groups of GMA. Several factors such as the pre-irradiation dose, temperature, monomer concentration, and time of reaction were found to strongly influence the degree of grafting. The functionalization of

SR with GMA opens the possibility of immobilizing nucleophilic molecules on the surface of the copolymer synthesized.

Acknowledgments

The authors wish to express their thanks to B. Leal, F. García from ICN-UNAM for their technical assistance. This work was supported by Conacyt and DGAPA-UNAM Grant IN202311

References

- Battacharya, A., Misra, B.N., 2004. Grafting a versatile means to modify polymers techniques, factors and applications. *Prog. Polym. Sci.* 29, 767–814.
- Bondar, Y., Kim, H.J., Yoon, S.H., Lim, Y.J., 2004. Synthesis of cation-exchange adsorbent for anchoring metal ions by modification of poly(glycidylmethacrylate) chains grafted onto polypropylene fabric. *React. Funct. Polym.* 58, 43–51.
- Chapiro, A., 1977. Radiation induced grafting. *Radiat. Phys. Chem.* 99, 55–67.
- Chapiro, A., 1995. General consideration of the radiation chemistry of polymers. *Nucl. Instrum. Methods B* 105, 5–7.
- Chapiro, A., Domurado, D., Foëx-Milléquant, M., Jendrychowska-Bonamour, A.-M., 1981. Radiation grafting of N-vinylpyrrolidone into silicone tubes. Synthesis of polymers with improved hemocompatibility and implantation test and lambs. *Radiat. Phys. Chem.* 18, 1203–1206.
- Chen, H., Chen, Y., Sheardown, H., Brook, M.A., 2005. Immobilization of heparin on a silicone surface through a heterobifunctional PEG spacer. *Biomaterials* 26, 7418–7424.
- Cho, E.H., Lee, S.G., Kim, J.K., 2005. Surface modification of UHMWPE with gamma-ray radiation for improving interfacial bonding strength with bone cement (II). *Curr. Appl. Phys.* 5, 475–479.
- Choi, S.-H., Jeong, Y.H., Ryoo, J.J., Lee, K.-P., 2001. Desalination by electrodialysis with the ion-exchange membrane prepared by radiation-induced graft polymerization. *Radiat. Phys. Chem.* 60, 503–511.
- Contreras-García, A., Bucio, E., Brackman, G., Coenye, T., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, 2011. Biofilm inhibition and drug eluting properties of novel DMAEMA modified polyethylene and silicone surfaces. *Biofouling* 27, 123–135.
- Deng, J., Wang, L., Liu, L., Yang, W., 2009. Developments and new applications of UV-induced surface graft polymerizations. *Prog. Polym. Sci.* 34, 156–193.
- Desmet, G., Takács, E., Wojnárovits, L., Borsá, J., 2011. Cellulose functionalization via high-energy irradiation-initiated grafting of glycidyl methacrylate and cyclodextrin immobilization. *Radiat. Phys. Chem.* 80, 1358–1362.
- García-Urioste, L., Burillo, G., Bucio, E., 2012. Synthesis and characterization of thermosensitive interpenetrating polymer networks based on N-isopropylamide/N-acryloxisuccinimide, crosslinked with polylysine, grafted onto polypropylene. *Radiat. Phys. Chem.* 81, 295–300.
- Hasegawa, S., Takahashi, S., Iwase, H., Koizumi, S., Morishita, N., Sato, K., Narita, T., Ohnuma, M., Maekawa, Y., 2011. Radiation-induced graft polymerization of functional monomer into poly(ether ether ketone) film and structure-property analysis of the grafted membrane. *Polymer* 52, 98–106.
- Hervás-Pérez, J.P., Lopez-Cabarcos, E., López-Ruiz, B., 2006. The application of methacrylate-based polymers to enzyme biosensors. *Biomol. Eng.* 23, 233–245.
- Kartal, F., Akkaya, A., Kilinc, A., 2009. Immobilization of porcine lipase on glycidylmethacrylate grafted poly vinyl alcohol. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 57, 55–61.
- Kim, M., Saito, K., 2000. Radiation-induced graft polymerization and sulfonation of glycidyl methacrylate on to porous hollow-fiber membranes with different pore sizes. *Radiat. Phys. Chem.* 57, 167–172.
- Kimura, Y., Asano, M., Chen, J., Maekawa, Y., Katakai, R., Yoshida, M., 2008. Influence of grafting solvents on the properties of polymer electrolyte membranes prepared by γ -ray preirradiation method. *Radiat. Phys. Chem.* 77, 864–870.
- Kunita, M.H., Rinaldi, A.W., Giroto, E.M., Radovanovic, E., Muniz, E.C., Rubira, A.F., 2005. Grafting of glycidylmethacrylate onto polypropylene using supercritical carbon dioxide. *Eur. Polym. J.* 41, 2176–2182.
- Li, J., Zhai, M., Yi, M., Gao, H., Hongfei, H., 1999. Radiation grafting of thermosensitive poly(NIPAAm) onto silicone rubber. *Radiat. Phys. Chem.* 55, 173–178.
- Menhofer, H., Zluticky, J., Heusinger, H., 1987. The influence of irradiation temperature and oxygen on crosslink formation and segment mobility in gamma-irradiated polydimethylsiloxanes. *Radiat. Phys. Chem.* 33, 561–566.
- Nasef, M.M., 2001. Effect of solvents on radiation-induced grafting of styrene onto fluorinated polymer films. *Polym. Int.* 50, 338–346.
- Nasef, M.M., Hagazy, E.-S.A., 2004. Preparation and applications of ion exchange membranes by radiation-induced graft copolymerization of polar monomers onto non-polar films. *Prog. Polym. Sci.* 29, 499–561.
- Nava-Ortiz, C.A.B., Alvarez-Lorenzo, C., Bucio, E., Concheiro, A., Burillo, G., 2009. Cyclodextrin-functionalized polyethylene and polypropylene as biocompatible materials for diclofenac delivery. *Int. J. Pharm.* 382, 183–191.
- Nava-Ortiz, C.A.B., Burillo, G., Concheiro, A., Bucio, E., Mattheijs, N., Nelis, H., Coenye, T., Alvarez-Lorenzo, C., 2010. Cyclodextrin-functionalized polyethylene and polypropylene as biocompatible materials for diclofenac delivery. *Acta Biomater.* 6, 1398–1404.
- Palsule, A.S., Clarkson, S.J., Widenhouse, C.W., 2008. Gamma irradiation of silicones. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* 18, 207–221.

- Park, K.R., Kang, P.H., Nho, Y.C., 2005. Preparation of PFA-g-polystyrene sulfonic acid membranes by the γ -radiation grafting of styrene onto PFA films. *React. Funct. Polym.* 65, 47–56.
- Rochow, 1946. *An introduction to the Chemistry of the Silicones*. John Wiley & Sons, New York, NY, USA.
- Satti, A.J., Andreucetti, N.A., Ressa, J.A., Vallat, M.F., Sarmoria, C., Valles, E.M., 2008. Modelling molecular weight changes induced in polydimethylsiloxane by gamma and electron beam irradiation. *Eur. Polym. J.* 44, 1548–1555.
- Sekine, A., Seko, N., Tamada, M., Suzuki, Y., 2010. Biodegradable metal adsorbent synthesized by grafting polymerization onto nonwoven cotton fabric. *Radiat. Phys. Chem.* 79, 16–21.
- Sokker, H.H., Badawy, S.M., Zayed, E.M., Nour Eldien, F.A., Farag, A.M., 2009. Radiation induced grafting of glycidyl methacrylate onto cotton fabric waste and its modification for anchoring hazardous wastes from their solutions. *J. Hazard. Mater.* 168, 137–144.
- Stannett, V.T., Silvermann, J., Garnett, J.L., 1989. Polymerization by high-energy radiation. *Compr. Polym. Sci.* 4, 317–336.
- Takács, E., Wojnárovits, L., Horváth, E-K., Fekete, T., Borsa, J., 2012. Improvement of pesticide adsorption capacity of cellulose fibre by high-energy irradiation-initiated grafting of glycidyl methacrylate. *Radiat. Phys. Chem.* 81, 1389–1392.
- Volcker, N., Klee, D., Hocker, H., Langefeld, S., 2001. Functionalization of silicone rubber for the covalent immobilization of fibronectin. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 12, 111–119.
- Yang, H.-S., Park, E.-S., 2006. Mechanical properties and antimicrobial activity of silicone rubber compounds containing acrylated norfloxacin and its polymer. *Macromol. Mater. Eng.* 291, 621–628.
- Zhu, B., Dong, W., Wang, J., Song, J., Dong, Q., 2012. Modification of polypropylene via the free radical grafting ternary monomer in water suspension system. *J. Appl. Polym. Sci.* 126, 1844–1851.