

**POLIMERIZACIÓN POR INJERTO RADIO-INDUCIDO
DE MONÓMEROS HIDROFÍLICOS EN EL
POLI (3-HIDROXIBUTIRATO)**

Por:

MAYKEL GONZÁLEZ TORRES



**TESIS QUE PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN INGENIERÍA BIOMÉDICA.**

**UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA
UPAEP**

2013



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyla**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de textos, imágenes, gráficas, 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 de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

Los biopolímeros biodegradables han llamado mucho la atención de los científicos de la ingeniería biomédica debido a sus propiedades y aplicaciones. Entre los polímeros biodegradables más comunes están el poli (ácido láctico) (PLA), el poli (ácido glicólico) (PAG), y el poli (3-hidroxibutirato) (PHB). Este último es un poliéster biodegradable, termoplástico, obtenido microbiológicamente. Es valorado como material estratégico por ser de origen de fuente renovable, e importante para usar en el campo médico, como matriz para la liberación de fármacos y en ingeniería de tejidos. El uso del PHB está limitado actualmente por su costo, el cual es alrededor de cuatro veces más que el del polipropileno (PP), su inestabilidad térmica, su fragilidad y por su moderada hidrofobicidad, por lo que se hace necesario estudiar su modificación química. En este trabajo se modifica el PHB con el injerto de monómeros hidrofílicos para mejorar las propiedades hidrofílicas del biomaterial. Se utilizaron monómeros típicos tales como el acetato de vinilo (VAc), alcohol vinílico (VA), metacrilato de butilo (BuM), ácido metacrílico (MA), y la acrilamida (AAM). Luego se realizaron estudios para determinar los cambios en la estructura y propiedades de los nuevos materiales obtenidos. Para la síntesis de los nuevos materiales se escogió el método de copolimerización por injerto radio-inducido por radiaciones gamma de ^{60}Co (irradiación simultánea) por sus ventajas. El estudio implicó la síntesis de los copolímeros, su caracterización físico-química y el estudio de las propiedades hidrofílicas de los materiales. La estructura de los nuevos materiales obtenidos fue verificada con las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR), Análisis Termo-gravimétrico

(TGA), Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Difracción de Rayos X (DFRX) , entre otras. En la mayoría de los casos se realizó un estudio del efecto del disolvente en la copolimerización por injerto radio-inducido de los monómeros seleccionados en el PHB. Los resultados obtenidos indican que en todos los casos fueron obtenidos copolímeros por injerto de los diferentes monómeros utilizados, los cuales tienen diferente composición química de acuerdo con las condiciones de reacción utilizadas en cada caso. Se observaron picos de desdoblamiento en la temperatura de fusión de los copolímeros por injerto obtenidos los cuales son probablemente causados por recristalización del copolímero. Es decir, la introducción de grupos hidrofílicos en el PHB dificulta su cristalización disminuyendo el grado de cristalinidad del material. Los resultados indican que al realizar el estudio de hinchamiento en agua de los copolímeros por injerto obtenidos, el porcentaje de hinchamiento de los materiales se incrementa con respecto al PHB. Por lo tanto, las modificaciones químicas realizadas mejoran las características hidrofílicas del PHB, incrementando en todos los casos la hidrofiliidad. La posibilidad de utilizar algunos de los nuevos materiales obtenidos para darle una aplicación práctica es prometedora. Se escogió uno de los materiales (P (HB-g-VA)) y se identificó una posible aplicación en el campo de la Ingeniería Biomédica, mediante la síntesis de un sistema avanzado de liberación controlado de drogas, en forma de nano esferas (ADS).

RELACIÓN DE ABREVIATURAS UTILIZADAS.

PHA	Polihidroxiálcanoato.
PHB	Poli (3-hidroxibutirato).
GPC*	Cromatografía de permeación de geles.
DFRX (DRX)	Difracción de rayos x.
IC	Índice de cristalinidad.
CC	Criterio de cristalinidad.
Fig.	Figura.
ATG	Análisis termo-gravimétrico.
DSC*	Calorimetría diferencial de barrido.
PVAc	Poli acetato vinilo.
FT-IR*	Infrarrojo por Transformada de Fourier.
IR	Infrarrojo.
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13.
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica.
THF	Tetrahidrofurano.
AG	Análisis gravimétrico.
W	Grado de injerto.
C	Composición.
γ_g	Índice de injerto.
W _G	W calculado por análisis gravimétrico.
C _G	C calculado por análisis gravimétrico.
W _{ATG}	W calculado por análisis termogravimétrico.
C _{ATG}	C calculado por análisis termogravimétrico.
W _{RMN}	W calculado por análisis RMN- ¹³ C.
C _{RMN}	C calculado por análisis RMN- ¹³ C.
PFA	Politetrafluoroetileno/perfluoro (alcoxivinil-éter).
PP	Polipropileno.
PMMA	Poli (metil metacrilato).

PEG	Poli (etilén glicol).
PAAm	Poli (acrilamida).
XPS*	Microscopía fotoelectrónica de rayos x.
MMA	Metil metacrilato.
ATRP*	Polimerización radicalica por transferencia de átomo.
FRP*	Polimerización por radicales libres.
MA*	Anhídrido maleico.
PVK*	Poli (vinil cetona).
PHEMA	Poli (hidroxi-etil-metacrilato).
PHBV	Poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato).
PSt	Poliestireno.
PAAc	Poli (ácido acrílico).
PIp	Polisopreno.
SEM* (MEB)	Microscopía electrónica de barrido.
TEM* (MET)	Microscopía electrónica de transmisión.
PVC*	Cloruro de polivinilo.
PE	Polietileno.
DEPT*	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer.
min	Minutos.
mg	Miligramos.
sln	Solución.
NOE*	Nuclear Overhauser Effect.
$\overline{Mn}$	Masa molar promedio en número.
$\overline{Mw}$	Masa molar promedio en peso.
$\overline{Mz}$	Masa molar promedio en zeta.
A	Absorbancia.
I	Integración.
Exp	Experimento.

* Siglas en inglés.

APROBACIÓN PARA DERECHOS DE AUTOR.

El autor permite a la Universidad Popular Autónoma de Puebla el derecho de reproducir, por métodos apropiados, bajo previa petición, cualquier o toda parte de esta tesis. Se comprende que “una petición apropiada” consiste en un acuerdo mutuo, de la parte que realiza la petición, que indica que la reproducción es para uso personal, y que una reproducción subsecuente no ocurriría sin previa autorización del autor de la tesis. Además, cualquier parte de la tesis utilizada en libros, artículos, patentes, u otro trabajo, debe de ser apropiadamente referenciado a la misma.

Finalmente, el autor de esta tesis, se reserva el derecho de publicarla libremente, en la literatura, en cualquier momento, ya sea de forma parcial o total.

Autor: Maykel González Torres

Fecha: Septiembre de 2013

DEDICATORIA.

Quiero dedicar esta tesis a Dios. Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor. En especial por haberme dado la fuerza para continuar cuando todo parecía perdido.

A mi familia de Cuba. En especial a mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo, en la distancia, y por ser una motivación para esforzarme más cada día, haciéndolo con la esperanza de que este trabajo llene todos los espacios de mi ausencia y justifique tanto sacrificio y esfuerzo.

A mi familia de México. En especial a mis suegros Tony y Fermín, por toda la confianza depositada, y su apoyo en todos los sentidos.

A mi prometida María Dayana Pérez Ledesma, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor y dedicación.

A mis tutores de la tesis, amigos y compañeros de trabajo. En especial al Dr. Manuel González Pérez, Dr. Pablo Nuño de la Parra, Dra. María Eugenia y Dr. Juan Manuel Oglesby, sin cuyo apoyo este trabajo no hubiera sido posible. Gracias por su tiempo compartido y por impulsar el desarrollo de mi formación profesional.

ÍNDICE

RESUMEN.....	ii
RELACIÓN DE ABREVIATURAS UTILIZADAS.	iv
APROBACIÓN PARA DERECHOS DE AUTOR.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
LISTA DE FIGURAS.	xiv
LISTA DE TABLAS	xvii
AGRADECIMIENTOS.....	1
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1 Aspectos fundamentales de los polímeros.	8
2.1.1 Propiedades características de los polímeros.	8
2.1.2 Conceptos básicos de los polímeros.	9
2.1.3 Clasificación de los polímeros.....	10
2.2 Formación y estructura de los materiales poliméricos.....	10
2.2.1 Reacciones de polimerización.	11
2.2.2 Polimerización vía radicales libres.	12
2.2.3 Clasificación de los nuevos materiales poliméricos.....	15
2.3 Definiciones básicas sobre las radiaciones.	16
2.3.1 Concepto de energía de alta radiación.	16
2.3.2 Concepto de Dosis, Tasa de Dosis, y T 1/2.	17

2.3.3	Unidades de absorción de la radiación.....	17
2.4	Características generales del poli (3-hidroxibutirato).....	18
2.4.1	Síntesis del poli (3-hidroxibutirato) por bacterias.	19
2.4.2	Propiedades físicas del poli (3-hidroxibutirato).	20
2.5	Transformaciones moleculares en materiales poliméricos.	20
2.5.1	Biosíntesis de los copolímeros en bloque.....	21
2.5.2	Blendas con el poli (3-hidroxibutirato).	21
2.5.3	Copolimerización por injerto.....	22
2.5.4	Copolimerización por injerto vía química.....	23
2.6	Copolimerización por injerto por radiaciones.	24
2.6.1	Copolimerización por injerto inducido por radiaciones gamma.....	25
2.6.2	Modificaciones realizadas en materiales poliméricos con metacrilato de butilo.....	28
2.6.3	Modificaciones realizadas en materiales poliméricos con ácido metacrílico.	28
2.6.4	Modificaciones realizadas en materiales poliméricos con acetato de vinilo.....	29
2.6.5	Modificaciones realizadas en materiales poliméricos con acrilamida.	30
2.7	Métodos de copolimerización por injerto radio-inducido.	31
2.7.1	Método de la irradiación simultánea.....	33
2.7.2	Método de la pre-irradiación.	34
2.8	Aplicaciones biomédicas de los polihidroxialcanoatos.	35
2.9	Aplicaciones biomédicas de los copolímeros por injerto.	36
2.10	Antecedentes de copolimerización por injerto radio-inducido en el PHB.....	37
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.		43
3.1	Materiales.....	44

3.1.1 Purificación del PHB.	46
3.1.2 Purificación de los solventes.	46
3.2 Métodos.	46
3.2.1 Estudio de degradación del poli (3-hidroxibutirato).	46
3.2.2 Preparación de membranas densas de poli (3-hidroxibutirato).	46
3.3 Técnicas de caracterización.	47
3.3.1 Análisis por espectroscopia FTIR.	47
3.3.2 Análisis por Resonancia Magnética Nuclear.	48
3.3.3 Análisis por espectroscopia Raman.	48
3.3.4 Análisis por difracción de rayos X.	49
3.3.5 Análisis termogravimétrico.	49
3.4 Estudio de la cristalinidad.	50
3.4.1 Por DFRX.	50
3.4.2 Por FTIR.	50
3.5 Determinación de pesos moleculares por cromatografía de permeación de geles.	51
3.6 Estudio de hinchamiento de los copolímeros por injerto.	51
3.7 Síntesis de los copolímeros por injerto.	52
3.7.1 Síntesis del P (HB-g-VOH).	55
3.8 Estudio de la morfología del P (HB-g-AAm).	55
3.9 Preparación de las nanoesferas de P (HB-g-VA).	56
3.10 Análisis por Microscopía de Fuerza Atómica.	56
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	57
4.1 Consideraciones generales.	58
4.2 Polimerización por injerto radioinducido del acetato de vinilo en el poli (3-hidroxibutirato).	61

4.2.1	Resultados de los experimentos A, B de la síntesis del P (HB-g-VAc).	63
4.2.2	Estudio de hinchamiento del PHB en VAc.	63
4.2.3	Análisis calorimétrico de los experimentos de tipo A y B.	63
4.2.4	Determinación del índice de injerto del P (HB-g-VAc) de experimentos B.	67
4.3	Caracterización química física del copolímero por injerto P (HB-g-VAc).	70
4.3.1	Caracterización estructural del producto obtenido en experimentos de tipo B.	70
4.3.2	Análisis del copolímero P (HB-g-VAc) por RMN.	73
4.4	Análisis del copolímero P (HB-g-VAc) por FTIR.	74
4.5	Análisis del P (HB-g-VAc) por espectroscopía Raman.	77
4.6	Análisis por microscopía óptica de alta resolución.	78
4.7	Análisis de la cristalinidad del P (HB-g-VAc) obtenido en experimentos B.	79
4.8	Análisis de la cristalinidad del P (HB-g-VAc) por FTIR.	80
4.9	Análisis de la cristalinidad de P (HB-g-VAc) por DFRX.	82
4.10	Estudio de hinchamiento del copolímero en agua.	83
4.11	Análisis de los experimentos C, D.	85
4.11.1	Análisis de la degradación térmica oxidativa.	85
4.12	Caracterización química física de los productos de los Exp. de tipo C y D.	87
4.12.1	Caracterización por RMN- ¹³ C de los productos de los Exp. de tipo C y D.	87
4.12.2	Caracterización por ATG de los productos de los Exp. de tipo C y D.	89
4.12.3	Conclusiones de la caracterización de los productos C y D.	90
4.13	Estimado del rendimiento de polimerización.	91
4.14	Estimado de la longitud de cadena de injerto.	92
4.15	Efecto del solvente en la polimerización por injerto radioinducido del VAc en el PHB.	94

4.16	Análisis térmico de los copolímeros del experimento de efectos del solvente.	95
4.16.1	Estudio por RMN de los copolímeros.	97
4.16.2	Investigación por calorimetría diferencial de barrido de los materiales obtenidos.	98
4.17	Estudio del P (HB-g-VA) por FT-IR.	102
4.17.1	Investigación por DSC del P (HB-g-VA).	103
4.17.2	Análisis del grado de injerto en el P (HB-g-VOH).	104
4.17.3	Estudio de hinchamiento del P (HB-g-VA).	105
4.18	Polimerización de injerto radioinducido del MBu y el MA en el PHB.	106
4.19	Análisis térmico de los polímeros P (HB-g-MBu) y P (HB-g-MA).	107
4.19.1	Análisis termogravimétrico del P (HB-g-MA).	107
4.19.2	Análisis termogravimétrico del P (HB-g-MBu).	109
4.20	Estudio por DSC de los polímeros P (HB-g-MBu) y P (HB-g-MA).	110
4.20.1	Análisis calorimétrico del P (HB-g-MA).	110
4.20.2	Análisis calorimétrico del P (HB-g-MBu).	112
4.21	Estudios de espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier.	115
4.22	Estudios de hinchamiento de los copolímeros P (HB-g-MA) y el P (HB-g-MBu).	118
4.23	Polimerización por injerto radioinducido de la AAm en el PHB.	119
4.24	Análisis morfológico del P (HB-g-AAm) por SEM.	121
4.25	Análisis termogravimétrico del P (HB-g-AAm).	122
4.26	Estudio por FTIR de los copolímeros P (HB-g-AAm).	123
4.27	Estudio de la cristalinidad del P (HB-g-AAm).	126
4.28	Estudio por DSC de los copolímeros P (HB-g-AAm).	127
4.29	Análisis de la estructura por Resonancia Magnética Nuclear.	130
4.30	Estudio de hinchamiento de los copolímeros P (HB-g-AAm).	134

4.31	Propuesta de mecanismo de la reacción de polimerización por injerto radioinducido de monómeros en el poli (3-hidroxibutirato).....	135
4.32	Análisis del hinchamiento del PHB y los copolímeros por injerto obtenidos.	140
4.33	Estudio preliminar sobre la posible aplicación de los copolímeros por injerto obtenidos en la Ingeniería Biomédica.....	141
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES		143
CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES		146
CAPÍTULO 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		148

LISTA DE FIGURAS.

<i>Figura 1 : Clasificación de los nuevos materiales poliméricos de acuerdo a su funcionalidad</i>	<i>16</i>
<i>Figura 2 Estructura del poli (3-hidroxibutirato).</i>	<i>19</i>
<i>Figura 3 Representación esquemática de un copolímero por injerto.</i>	<i>27</i>
<i>Figura 4 Posibles radicales formados en la radiólisis del poli (3-hidroxibutirato).</i>	<i>59</i>
<i>Figura 5 Reactor utilizado para los experimentos de tipo A, B.</i>	<i>62</i>
<i>Figura 6 Ámpula de vidrio del tipo utilizada en los experimentos C, D.</i>	<i>62</i>
<i>Figura 7 ATG realizado al producto de la reacción en experimentos de tipo A.</i>	<i>65</i>
<i>Figura 8 ATG realizado al producto de la reacción en experimentos de tipo B.</i>	<i>65</i>
<i>Figura 9 Espectro RMN-¹³C, DEPT y RMN-¹H del P (HB-g-VAc) en experimentos B.</i>	<i>67</i>
<i>Figura 10 Espectro FTIR del PHB y el PHB-g-PVAc obtenido en experimentos B (región de 700-1500 cm⁻¹).</i>	<i>75</i>
<i>Figura 11 Espectro FTIR registrado en modo de transmitancia del PHB y el P (HB-g-VAc) obtenido en experimentos B (región de 700-3500 cm⁻¹).</i>	<i>76</i>
<i>Figura 12 Espectro FTIR del PHB y el PHB-g-PVAc obtenido en experimentos B (región de 1600—1800 cm⁻¹).</i>	<i>76</i>
<i>Figura 13 Espectro Raman del PHB-g-PVAc, PHB y PVAc (experimentos B).</i>	<i>77</i>
<i>Figura 14 Imagen del PHB, PVAc y P (HB-g-VAc) por microscopia óptica de alta resolución: (a) PHB (b) PVAc (c) P (HB-g-VAc) (de izquierda a derecha).</i>	<i>79</i>
<i>Figura 15 Patrón de difracción de rayos X del PHB y el PHB-g-PVAc en experimentos B.</i>	<i>83</i>
<i>Figura 16 Estudio de hinchamiento en agua de membranas de PHB, PVAc y PHB-g-PVAc de experimentos B.</i>	<i>84</i>
<i>Figura 17 Cromatograma de permeación de geles del poli (3-hidroxibutirato) original y degradado.</i>	<i>86</i>
<i>Figura 18 ATG y DTG del PHB-g-PVAc obtenido en experimentos C.</i>	<i>89</i>

<i>Figura 19 Polimerización por injerto radioinducido del VAc en el PHB y la posterior hidrólisis del copolímero.....</i>	<i>94</i>
<i>Figura 20 Análisis termogravimétrico de P (HB-g-VAc) obtenido en diferentes solventes.</i>	<i>95</i>
<i>Figura 21 Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ¹³C del P (HB-g-VAc) obtenido en estudios del solvente (Experimento F, representativo).....</i>	<i>98</i>
<i>Figura 22 Curvas de DSC del PHB y el P (HB-g-VAc) obtenidos en estudio del solvente.</i>	<i>99</i>
<i>Figura 23 Termograma del P (HB-g-VAc) obtenido por copolimerización radio-inducida (exp F).</i>	<i>101</i>
<i>Figura 24 Espectro FTIR del P (HB-g-VA) obtenido por saponificación del P (HB-g-VAc).....</i>	<i>102</i>
<i>Figura 25 DSC del copolímero por injerto P (HB-g-VA).</i>	<i>103</i>
<i>Figura 26 Estudio de hinchamiento del copolímero P (HB-g-VA).....</i>	<i>105</i>
<i>Figura 27 Reacción de polimerización radio-inducida del MA y el MBu en el PHB.....</i>	<i>107</i>
<i>Figura 28 Análisis Termogravimétrico del P (HB-g-MA) obtenido por copolimerización radio-inducida.</i>	<i>108</i>
<i>Figura 29 Análisis Termogravimétrico del P (HB-g-MBu) obtenido por copolimerización radio-inducida.....</i>	<i>109</i>
<i>Figura 30 Curvas de DSC del PHB y el P (HB-g-MA) en estudio del solvente para la obtención de copolímeros.</i>	<i>111</i>
<i>Figura 31 Curvas de DSC del PHB y el P (HB-g-MBu)</i>	<i>113</i>
<i>Figura 32 Espectro FTIR del PHB y el P (HB-g-MBu) obtenidos en diferentes solventes.</i>	<i>115</i>
<i>Figura 33 Espectro FTIR del PHB y el P (HB-g-MA) obtenidos en diferentes solventes.</i>	<i>117</i>
<i>Figura 34 Estudios de hinchamiento para (-▲-) PHB, (-■-) P (HB-g- MA) y (-●-) P (HB-g-MBu)</i>	<i>119</i>
<i>Figura 35 Reacción de polimerización por injerto radioinducido de acrilamida en el PHB.</i>	<i>120</i>
<i>Figura 36 Microscopía Electrónica de Barrido de las muestras M0 (izquierda) y M5 (derecha).</i>	<i>121</i>
<i>Figura 37 ATG del PHB y el P (HB-g-AAm) obtenidos por polimerización de injerto radioinducido en diferentes solventes.....</i>	<i>123</i>
<i>Figura 38 Espectro FTIR en modo de transmitancia del copolímero P (HB-g-AAm) obtenido en diferentes solventes: región 3500 a 2500 cm⁻¹.</i>	<i>124</i>
<i>Figura 39 Espectro FTIR en modo de transmitancia del copolímero P (HB-g-AAm) obtenido en diferentes solventes: región 2000 a 700 cm⁻¹.</i>	<i>125</i>

<i>Figura 40 Espectro FTIR en modo de absorbancia del copolímero P (HB-g-AAm) obtenido en diferentes solventes: región 1780 a 1600 cm⁻¹.</i>	126
<i>Figura 41 Curvas de DSC del PHB y los copolímeros P (HB-g-AAm) obtenidos en diferentes solventes.</i>	128
<i>Figura 42 Espectro RMN de Coherencia Cuántica Múltiple Heteronuclear del PHB.</i>	132
<i>Figura 43 Espectro RMN de Coherencia Cuántica Múltiple Heteronuclear del P (HB-g-AAm) (Muestra M5).</i>	133
<i>Figura 44 Estudio de hinchamiento de los copolímeros P (HB-g-AAm) obtenidos por polimerización de injerto radioinducido de la AAm en el PHB.</i>	134
<i>Figura 45 Fórmula general de un monómero hipotético.</i>	136
<i>Figura 46 Iniciación en la polimerización por injerto radioinducido de un monómero general en el PHB.</i>	136
<i>Figura 47 Etapa de propagación.</i>	137
<i>Figura 48 Etapa de terminación de la polimerización radioinducida.</i>	139
<i>Figura 49 Análisis del hinchamiento del PHB y los copolímeros por injerto obtenidos.</i>	140
<i>Figura 50 Imágenes de Microscopía de Fuerza Atómica de las nanoesferas de P (HB-g-VAc).</i>	142

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1 Condiciones generales de los experimentos realizados en la síntesis del copolímero P (HB-g-VAc).</i>	61
<i>Tabla 2 Resultados de los cálculos de composición y grado de injerto en los experimentos de tipo A y B obtenidos por gravimetría y termogravimetría.</i>	63
<i>Tabla 3 Asignación para la determinación del índice de injerto.</i>	68
<i>Tabla 4 Asignación de las principales señales de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear RMN-¹³C, RMN-¹H del P (HB-g-VAc) en experimentos de tipo B.</i>	73
<i>Tabla 5 Asignaciones a las señales del espectro Raman del PHB-g-PVAc.</i>	78
<i>Tabla 6 Estudio de la cristalinidad de las muestras de PHB y P (HB-g-VAc)</i>	82
<i>Tabla 7 Resultados de los análisis por GPC del PHB.</i>	86
<i>Tabla 8 Asignación de las principales señales de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear RMN-¹³C del P (HB-g-VAc) en experimentos C.</i>	87
<i>Tabla 9 Asignación de las principales señales de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear RMN-¹³C del P (HB-g-VAc) en experimentos D.</i>	88
<i>Tabla 10 Resultados de C, W y $\gamma g\%$ determinados en los experimentos de tipo A, B, C y D.</i>	90
<i>Tabla 11 Estimado de los rendimientos de polimerización.</i>	92
<i>Tabla 12 Cálculo de las macromoléculas de PHB y de las moléculas de VAc injertadas.</i>	93
<i>Tabla 13 Parámetros termodinámicos obtenidos de los termogramas del P (HB-g-VAc).</i>	97
<i>Tabla 14 Parámetros termodinámicos obtenidos de los termogramas del P (HB-g-MA).</i>	111
<i>Tabla 15 Parámetros termodinámicos obtenidos de los termogramas del P (HB-g-MA)</i>	114
<i>Tabla 16 Estudio de cristalinidad del PHB y el los copolímero por injerto obtenidos por copolimerización radio-inducida (P (HB-g-MBu) y P (HB-g-MA)).</i>	117

<i>Tabla 17 Experimentos de hinchamiento en P (HB-g-BuM) y P (HB-g-MA).</i>	<i>118</i>
<i>Tabla 18 Estudio de la cristalinidad del PHB y los copolímeros P (HB-g-AAm) obtenidos por polimerización de injerto radioinducido.</i>	<i>127</i>
<i>Tabla 19 Parámetros termodinámicos obtenidos de los termogramas DSC del PHB y los copolímeros P (HB-g-AAm).</i>	<i>129</i>

AGRADECIMIENTOS.

Quiero dar gracias a Dios por darme salud para llegar a este momento, enseñarme el camino, iluminarme con su voluntad para seguirlo y dotarme de la fuerza para defenderlo. Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo. Debo agradecer de manera especial y sincera al Dr. Manuel González por aceptarme para realizar esta tesis Doctoral bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis. Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mí prometida Dayana Pérez, a mis suegros Tony y Fermín, mis padres Miriam y Humberto, y mis padres políticos Miguel y Eliana, sin cuyo apoyo este trabajo no hubiera sido posible. Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigos. En especial a mi amigo Luis Ramón Velázquez Maldonado, cuyo apoyo con los trámites de la revalidación de mis estudios fue invaluable. A todos ellos muchas gracias. **PD: Esta investigación fue realizada con el Apoyo del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla.**

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN

Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son biopolímeros comúnmente producidos por bacterias. Estos pueden ser producidos por algunos microorganismos por acumulación como reserva de carbono y energía, en condiciones de limitaciones nutricionales en el medio. Estos materiales poliméricos han cobrado gran importancia y han llamado la atención de los investigadores de la biología, la medicina y la ingeniería biomédica debido a su amplia posibilidad de aplicación. Por ejemplo, pueden ser utilizados reemplazando otros materiales, que actualmente se han convertido en un serio problema de contaminación ambiental debido a su lenta degradabilidad; se han utilizado en la ingeniería de tejidos, implantes médicos, el diseño de nuevos sistemas de liberación controlada de drogas, diseño de nuevos materiales, suturas, productos de higiene, plataformas de crecimiento de células, biocombustibles, empaques de larga y corta duración e injertos utilizados en medicina.

El poli (3-hidroxi butirato) es el primer miembro de la familia de los polihidroxialcanoatos. Este último es un poliéster biodegradable, termoplástico, obtenido microbiológicamente. Es valorado como material estratégico por ser de origen de fuente renovable, e importante para usar en el campo biomédico, como matriz para la liberación de fármacos y en ingeniería de tejidos. El uso del PHB está limitado actualmente por su costo, el cual es alrededor de cuatro veces más que el del polipropileno (PP), su inestabilidad térmica, su fragilidad y por su moderada hidrofobicidad. Esta última limitación en particular puede ser un inconveniente para sus aplicaciones por lo que se hace necesario estudiar su modificación química.

Una contribución a la solución de este problema significaría un aporte científico novedoso y de utilidad práctica. Por lo expuesto anteriormente es que en este trabajo se traza como objetivo general:

- a) Obtener nuevos materiales poliméricos a partir de la modificación del PHB con el injerto de monómeros hidrofílicos.

Para ello se trazan como objetivos específicos:

- b) Sintetizar copolímeros por injerto a través de reacciones de copolimerización por injerto inducida por radiaciones gamma.
- c) Realizar la caracterización química física de los nuevos materiales obtenidos y estudiar sus propiedades hidrofílicas.

Para la obtención de los nuevos materiales, se utilizaron monómeros típicos tales como el acetato de vinilo (VAc), alcohol vinílico (VA), metacrilato de Butilo (BuM), ácido metacrílico (MA), y la acrilamida (AAm).

Se utilizó la técnica de copolimerización radio-inducida para la obtención de los nuevos materiales. Para los experimentos de radiación se utilizaron diferentes condiciones experimentales, variando diferentes parámetros como: la relación del peso monómero /polímero, el estado físico de las muestras, el disolvente, la dosis de radiación, la tasa de dosis de radiación, el tiempo de exposición a la radiación etc.

Las síntesis de los copolímeros se realizaron por el método de irradiación simultánea, por sus ventajas, ya que éste es el método más simple para la preparación de copolímeros por injerto. En éste método el polímero es irradiado en presencia del monómero en condiciones de alto vacío. El método escogido es apropiado debido a que pueden obtenerse biomateriales de alta pureza y no se necesitan catalizadores o iniciadores.

Además, por la alta energía de las radiaciones gamma pueden ser preparados nuevos materiales a bajas temperaturas, evitando el uso de altas temperaturas.

Las síntesis de los copolímeros por injerto de monómeros hidrofílicos en el PHB se realizaron con una fuente de ^{60}Co . Los productos de la reacción fueron purificados por lavado en soxhlet con diferentes disolventes, en relativamente extensos períodos de tiempo, para eliminar los homo-polímeros y residuos colaterales de la reacción, debido a que el uso de ésta técnica de síntesis implica la obtención de un sinnúmero de subproductos, lo que se hace necesario un exhaustivo procedimiento de purificación antes de la realización de las técnicas de caracterización.

La estructura de los nuevos materiales obtenidos fue verificada con las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Raman, Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR), Análisis Termo-gravimétrico (TGA), Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Difracción de Rayos X (DFRX), entre otras. En la mayoría de los casos se realizó un estudio del efecto del disolvente en la copolimerización por injerto radio-inducido de los monómeros seleccionados en el PHB.

Los resultados de la tesis están relacionados con las diferentes síntesis de los copolímeros por injerto mediante las reacciones de copolimerización por injerto radio-inducido, su caracterización físico-química, el estudio de hinchamiento y el uso de uno de los materiales para su aplicación en el área de la Ingeniería Biomédica, lo que constituye su aspecto de mayor novedad y relevancia.

Los estudios obtenidos indican que las cadenas de los monómeros utilizados se introducen por copolimerización por injerto inducido por radiaciones gamma en el sustrato PHB, obteniéndose copolímeros por injerto, los cuales tienen diferente

composición química de acuerdo con las condiciones de reacción y el tipo de monómero estudiado.

De forma general, se observaron picos de desdoblamiento en la temperatura de fusión de los copolímeros por injerto obtenidos los cuales son probablemente causados por recristalización del copolímero. Es decir, la introducción de grupos hidrofílicos en el PHB dificulta su cristalización disminuyendo el grado de cristalinidad del material.

Los productos obtenidos mostraron tendencia a mejores propiedades hidrofílicas que el PHB de partida, lo que se evidencia en una mayor absorción de agua en los experimentos de hinchamiento. Por lo tanto, las modificaciones químicas realizadas mejoran las características hidrofílicas del PHB, incrementando en todos los casos la hidrofiliidad.

La posibilidad de utilizar algunos de los nuevos materiales obtenidos para darle una aplicación práctica es prometedora. Se escogió uno de los copolímeros sintetizados (P(HB-g-VA)) y se identificó una posible aplicación en el campo de la Ingeniería Biomédica, mediante la síntesis de un sistema avanzado de liberación controlado de drogas, en forma de nano-esferas (ADS). Estos resultados constituyen un paso de avance en la búsqueda de aplicaciones prácticas para los materiales obtenidos.

CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1 Aspectos fundamentales de los polímeros.

Los polímeros son tan antiguos como la existencia de la vida. Su significado proviene del griego “poli” que significa muchos y “mero” que significa parte o segmento. De manera que todas las sustancias macromoleculares, ya sean naturales o sintéticas, se producen por reacciones de polimerización a partir de moléculas más pequeñas llamadas monómeros, que unidas a otros monómeros, por medio de enlaces químicos, producen los polímeros. Ejemplos de monómeros y polímeros son: a) Los aminoácidos son los monómeros de las proteínas y b) los ácidos grasos son los monómeros de los lípidos. (1)

2.1.1 Propiedades características de los polímeros.

Las propiedades de los materiales poliméricos provienen de su naturaleza macromolecular. Es decir, factores como la masa molecular y la estructura del polímero definen sus propiedades. De forma general, las propiedades más notables de los polímeros son a) La baja conductividad térmica, b) El bajo peso específico (g/cm^3), c) Tienen buenas propiedades dieléctricas d) Poseen buena resistencia a los reactivos químicos agresivos e) En su mayoría no son inflamables f) Son excelentes aislantes acústicos y térmicos f) El procedimiento de elaboración y moldeo es relativamente económico y g) Sus propiedades varían, en un amplio rango, de acuerdo a variación de la organización estructural. Estas propiedades son generales ya que cada polímero no las posee de forma simultánea sino que tiene características particulares. Los polímeros son sustancias poli-dispersas, en un mismo material, sus macromoléculas pueden tener diferentes pesos moleculares, lo que se utilizan valores promedios de masas moleculares. Por otra parte, el proceso de disolución de los polímeros es más complejo comparado con las sustancias de baja masa molecular.

La sustancia polimérica requiere de un proceso denominado hinchamiento donde el polímero de embebe en el disolvente durante cierto período de tiempo formando una disolución coloidal. Como consecuencia, los procesos de purificación de los polímeros son mucho más complicados ya que las impurezas o las imperfecciones de cadena polimérica originadas en un proceso de síntesis o transformación del material se pueden quedar atrapadas en el enrejado molecular o ser absorbidas por la superficie del polímero. Otras características notables que diferencian a los polímeros de las sustancias de bajo peso molecular es que no tienen presión de vapor, no tienen un punto de fusión definido y cristalizan con dificultad, lo que se determinan porcentajes de cristalinidad de acuerdo a la existencia de zonas amorfas y cristalinas coexistiendo en un mismo material polimérico.

(2)

2.1.2 Conceptos básicos de los polímeros.

Como ya se había mencionado, los polímeros se caracterizan por unidades que se repiten, denominadas unidades estructurales. De esta forma si la unidad estructural es $-M-$, el polímero sería $-M-M-M-M-M-M-$, donde se representa $(-M-)_n$, siendo n el número natural que define el número de veces que se repite la unidad estructural. Las valencias finales en el polímero se saturan con grupos univalentes como el hidrógeno (H) o el grupo hidroxilo (OH). Las unidades estructurales no tienen existencia independiente, sino que son radicales bivalentes que están relacionados con el monómero que origina al polímero. El número de veces que se repite la unidad estructural en la cadena de un polímero de denomina grado de polimerización y se representa por $(\overline{X}_n)$. De esta forma al multiplicar la masa molecular de la unidad estructural por el grado de polimerización se obtiene el valor promedio de la masa molecular en número. De forma análoga se obtienen los

promedios de masa molecular promedio en peso y zeta. Conocer los valores de masa molecular promedio en número, peso y zeta de un material polimérico es de vital importancia en su caracterización química física. (2)

2.1.3 Clasificación de los polímeros.

Se hace necesario clasificar al polímero dado su amplia naturaleza. Una primera forma de clasificarlos podría ser atendiendo a su naturaleza inorgánica u orgánica. A los polímeros inorgánicos pertenecen la mayoría de las rocas, los vidrios, los silicatos, el grafito, entre otros. El segundo grupo es aún muy amplio lo que se puede desglosar en polímeros orgánicos naturales o artificiales. Los polímeros naturales son los que se encuentran en la naturaleza, como las proteínas y el almidón. Los polímeros artificiales o semisintéticos son los polímeros naturales modificados. Otro grupo importante de clasificación de estos materiales son los polímeros sintéticos. Los polímeros sintéticos con aquellos que son completamente sintetizados por el hombre, estos se pueden dividir según su comportamiento mecánico en termoplásticos (cristalinos o no cristalinos), gomas o termofijos. Los termoplásticos son los materiales que funden por aplicación del calor. Las gomas son materiales que se caracterizan por sus propiedades elastómeras, es decir se deforman en gran extensión si son sometidas a fuerzas externas de tensión. Por último, los polímeros termofijos son materiales reticulados y por tanto son insolubles e infusibles. Es decir, estos materiales no funden (i.e resinas) (1) (2).

2.2 Formación y estructura de los materiales poliméricos.

Los materiales poliméricos pueden ser estudiados de acuerdo a su formación y estructura. De esta forma las reacciones de polimerización, en términos generales pueden ser de dos clases, polimerización de adición y polimerización de condensación. Los polímeros

adicionados se obtienen como consecuencia de la reacción de monómeros, que poseen por los menos un doble enlace entre dos átomos de carbono. La reacción transcurre por un mecanismo de tipo radical, adicionándose de forma sucesiva las moléculas de monómero. A diferencia de los poliadicionados, los policondensados se obtienen a partir de monómeros que tiene diferentes funciones químicas complementarias. (1)

2.2.1 Reacciones de polimerización.

El estudio de la síntesis de materiales poliméricos se ha dirigido a la investigación de métodos de polimerización que mejoren las propiedades físicas, químicas y mecánicas de los productos para así obtener nuevos materiales; con topología, composición, y funcionalidad determinada. De esta forma se puede obtener una completa relación propiedad-estructura que permita una correlación de la estructura molecular con sus propiedades macroscópicas y así utilizarlos en nuevas aplicaciones.

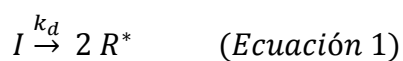
Las propiedades de los materiales poliméricos dependen de su peso molecular, fuerzas intermoleculares, configuración y conformación macromolecular.

De acuerdo con lo descrito anteriormente, existen muchos tipos de polimerización y varios sistemas para categorizarlos. Las categorías principales son: a) Polimerización por adición y condensación y b) Polimerización de crecimiento en cadena y en etapas. Esta última está relacionada con monómeros u oligómeros pasan a formar parte de la cadena de uno en uno. Primero se forman dímeros, después trímeros, a continuación tetrámeros, etc. La cadena se incrementa de uno en uno, monómero a monómero. La mayoría de las polimerizaciones por crecimiento en cadena es por poli-adición. En este trabajo nos concentraremos en las polimerizaciones por adición radicalica, o por radicales libres.

2.2.2 Polimerización vía radicales libres.

La polimerización por radicales libres (también conocida como una reacción en cadena) es uno de los métodos de síntesis que más se utiliza en la industria para la polimerización de una gran diversidad de materiales poliméricos (plásticos, fibras textiles, etc.), debido a la gran variedad de monómeros con dobles enlaces $-C=C-$ que pueden ser polimerizados, así como condiciones de reacción moderadas (ausencia de oxígeno y temperaturas entre 0-100 °C). El mecanismo de la reacción de polimerización vía radicales libres, consta de las etapas de iniciación, propagación y terminación.

La etapa de iniciación contiene dos pasos: El primero es la generación de radicales primarios (R^*), a partir de las moléculas de iniciador (I), donde k_d es la constante de velocidad de la disociación homolítica.



Luego, en el segundo paso, el radical R^* se adiciona al doble enlace $-C=C-$ del monómero (M) para formar los correspondientes radicales iniciales (RM^*), donde k_i es la constante de velocidad del paso de iniciación.

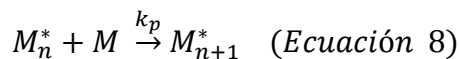
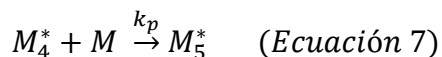
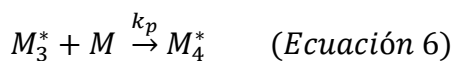
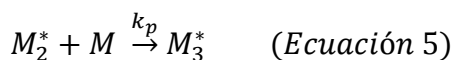


Por otra parte, la velocidad de reacción de los radicales primarios producidos por la homólisis del iniciador es dada por:

$$R_i = 2fk_d[I] \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde $[I]$ es la concentración del iniciador, f es el factor de eficiencia del iniciador que se define como la fracción de radicales producido en la reacción de homólisis que inicia las cadenas del polímero.

En la etapa de propagación, la polimerización ocurre por la propagación de los centros reactivos de RM^* con la adición de moléculas de monómero; cada molécula de monómero que se adiciona a un centro reactivo regenera el centro reactivo, formándose un nuevo radical de diferente tamaño, donde k_p es la constante de propagación.



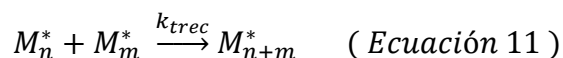
En este mecanismo descrito, todos los pasos de propagación tienen la misma velocidad de propagación (R_p), la cual se encuentra definida como:

$$\frac{-d[M]}{dt} = R_p \quad (\text{Ecuación 9})$$

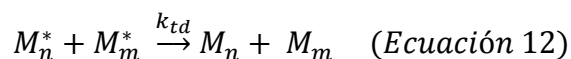
$$R_p = k_p [M][M^*] \quad (\text{Ecuación 10})$$

Donde $[M]$ es la concentración del monómero y $[M^*]$ es la concentración total de todas las cadenas crecientes.

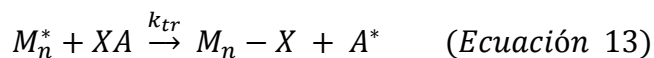
Por último, la terminación ocurre por la destrucción de los centros radicales por diferentes vías. La primera vía es la recombinación. Esta consiste en la combinación de dos macro-radicales para formar una macromolécula. La reacción de recombinación está dada por la siguiente ecuación, donde k_{rec} es la constante de terminación por recombinación.



La segunda vía de terminación es la desproporción. Una desproporción ocurre cuando un átomo de hidrógeno en posición beta al centro radical es transferido a otro centro radical dando como resultado la formación de dos moléculas de polímero, una insaturada y la otra saturada. La reacción desproporción está dada por la siguiente ecuación donde k_{td} es la constante de terminación por desproporción:



La tercera y última vía de reacción de terminación es la transferencia de cadena. Esta se lleva a cabo cuando se transfiere un átomo relativamente lábil de algún compuesto presente en el sistema (disolvente (D), monómero (M) e iniciador (I) o cualquier otro componente de la solución) al radical polimérico de modo que se desactiva el macro-radical formándose un nuevo radical A*. Este tipo de reacciones se puede representar por la siguiente ecuación:



Dónde XA puede ser el monómero, iniciador, disolvente u otra sustancia, y X es el átomo o la especie transferida.

El mecanismo descrito es para una polimerización por vía radicales libres, en general. En este trabajo se realizará la copolimerización por injerto de monómeros hidrofílicos en el PHB. Esta es una reacción de poliadición por vía radicales libres con características muy especiales porque se utiliza como iniciador radiaciones gamma de alta energía y se estudiará las particularidades de la reacción de los monómeros en la cadena carbonada del polímero y los productos de la reacción de acuerdo con las condiciones de síntesis. Es por eso que le damos especial importancia a la introducción de este mecanismo.

2.2.3 Clasificación de los nuevos materiales poliméricos.

Una manera de clasificar los nuevos materiales poliméricos es de acuerdo a la funcionalidad, composición y topología polimérica. La funcionalidad está relacionada con la formación de polímeros homo o heteroesqueléticos, es decir, polímeros lineales con una composición macromolecular linear variable de tipo AAA, ABA, AABB etc.; macromonómeros que son polímeros lineales de composición macromolecular donde en uno de sus extremos coexiste uno o varios dobles enlaces; los grupos laterales, los cuales son de especial interés en nuestro estudio porque son grupos en forma de peine que se injertan a una cadena carbonada para dar como resultado un copolímero por injerto; las hiper-ramificaciones que son funcionalidades asociadas a la formación de redes poliméricas semi-interpenetradas las cuales se caracterizan por ser materiales de alto peso molecular con temperaturas de fusión no definida y al igual que las formaciones en estrella, forma complejos reticulados, hidrogeles y otras formas poliméricas de interés. (Figura 1)

La clasificación de composición está relacionada con la formación de homopolímeros, copolímeros en bloque, estadísticos, o de gradientes y los injertos copoliméricos. En nuestro trabajo tenemos especial interés en los homopolímeros, que son los polímeros que se forman como producto de la homopolimerización de los monómeros hidrofílicos que no reaccionan con el PHB y en los injertos copoliméricos en los cuales se estudiará la composición por medio de las técnicas calorimétricas y espectroscópicas.

De acuerdo a la clasificación topológica (del griego τόπος, “lugar”, y λόγος, “estudio”), el nuevo material polimérico puede ser forma lineal, de peine (copolímero por injerto), de redes (red polimérica semi-interpenetrada, hidrogel), hiper-ramificado o estrella (ver

Figura 1). Estas clasificaciones son de vital importancia para la identificación de nuevos materiales y la relación estructura función. (3) (4)

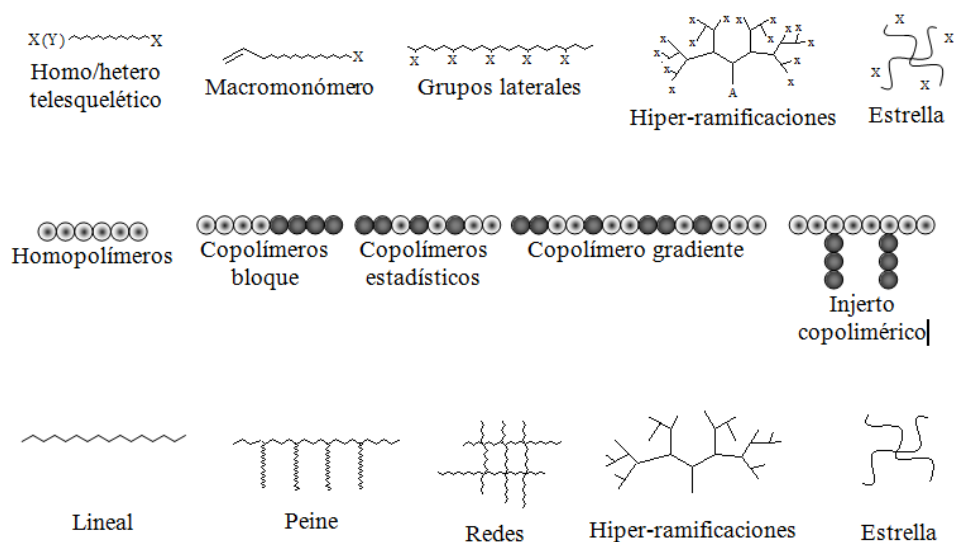


Figura 1 : Clasificación de los nuevos materiales poliméricos de acuerdo a su funcionalidad

2.3 Definiciones básicas sobre las radiaciones.

2.3.1 Concepto de energía de alta radiación.

Diferentes tipos de energía de alta radiación están comercialmente disponibles para los procesos de copolimerización por injerto. Ellas pueden ser clasificadas en: (1) radiación electromagnética (fotones), tales como rayos gamma y rayos x, y (2) radiación de partículas (partículas cargadas) tales como protones e iones pesados a alta velocidad. Los isótopos radiactivos tales como el Cobalto-60 (^{60}Co), y Cesio-137 (^{137}Cs), los cuales son productos de fisión de plantas nucleares, son las fuentes principales de radiación gamma. Sin embargo el ^{60}Co es más ventajoso y ha sido utilizado con mayor frecuencia dado su alta energía de emisión (1,25 MeV) comparado con 0.66 MeV para el ^{137}Cs , además de la

simplicidad, fácil preparación y bajo costo. Su $T_{1/2}$ es de 5,26 años, mientras que el $T_{1/2}$ del ^{137}Cs es de 30 años.

2.3.2 Concepto de Dosis, Tasa de Dosis, y $T_{1/2}$.

Con el término dosis, se define el cociente entre $d\varepsilon$ y dm , donde $d\varepsilon$ es la energía media impartida por la radiación ionizante a una masa dm de sustancia.

$$D = \frac{d\varepsilon}{dm} \quad (\text{Ecuación 14})$$

La tasa de dosis se define como:

$$\hat{D} = \frac{D}{t} = \frac{\frac{d\varepsilon}{dm}}{t} \quad (\text{Ecuación 15})$$

Donde D es la dosis y t es el tiempo de exposición a las radiaciones.

El tiempo necesario para la desintegración de la mitad de los núcleos presentes en la muestra radioactiva es siempre constante y no depende de la cantidad inicial de núcleos en la muestra. Este intervalo de tiempo se denomina período de semidesintegración ($T_{1/2}$).

2.3.3 Unidades de absorción de la radiación.

La energía de absorción ha sido tradicionalmente expresada como dosis en "rad", la cual es medida de la energía depositada en 1g de materia e igual a 102 erg/g o 102 J/Kg. La unidad más reciente en el sistema internacional de unidades es el Gray (Gy), que es igual a 104 erg/g o 1 J/Kg. Luego, la tasa de dosis, que no es más que la dosis absorbida por unidad de tiempo, puede ser expresada como Gy/s, Gy/h o kGy/h (J/Kg s).

El kilo-Gray (kGy) se utiliza para expresar mayores cantidades de dosis de radiación. Sin embargo algunas fuentes aún utilizan la antigua unidad Mega-rad (Mrad), la cual es equivalente a 10 kGy, como expresión de dosis.

2.4 Características generales del poli (3-hidroxibutirato)

Los polihidroxialcanoatos son poliésteres alifáticos lineales sintetizados por al menos 75 diferentes géneros de bacterias Gram-Positivas o Gram-Negativas. (i.e *Azospirillum brasilense*, *Alcaligenes eutrophus*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus subtilis*, etc.), como reservas de energía en las células (5) (6) (7). Estos materiales se acumulan en el interior de la célula hasta producirse una necesidad energética. La célula almacena estos biopolímeros en forma de gránulos en el citoplasma llegando en ocasiones a constituir cerca del 90% de su peso en seco. Las células son capaces de producir estos materiales cuando se les priva de algún nutriente fundamental como nitrógeno, magnesio, fosfatos y sulfatos. De esta forma es posible manipular el desarrollo de bacterias, algas y hongos para producir estos polímeros con las propiedades deseadas (5).

El poli (3-hidroxibutirato) es el primer miembro de la familia de los polihidroxialcanoatos. Es un poliéster microbiológico producido por microorganismos como reserva de energía y carbonos, es un polímero orgánico (Figura 2), y pertenece a la familia de los termoplásticos verdes, con propiedades mecánicas muy parecidas al polipropileno (PP), pero muy lejos de sustituirlo actualmente por su alto precio. Como se había mencionado, entre las propiedades que convierten a este polímero en un material de especial interés, se encuentra su buena biocompatibilidad, y su completa biodegradabilidad, que le brinda una versátil utilidad en el campo de la medicina tales como la liberación controlada de drogas, recubrimientos óseos e ingeniería de tejidos. Por otra parte, el último producto de su biodegradación, el ácido 3-hidroxibutírico es un metabolito común en la sangre humana, por lo que el PHB muestra una toxicidad despreciable. (7)

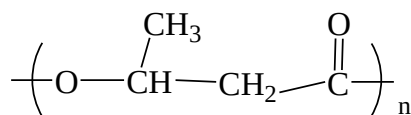


Figura 2 Estructura del poli (3-hidroxibutirato).

Sin embargo, en condiciones comunes el PHB presenta algunas deficiencias, es un material muy frágil, de baja elongación, presentando una considerable inestabilidad térmica sobre la temperatura de fusión y es ligeramente hidrofóbico. Lo que podría ser un inconveniente, sobre todo para su aplicación en el campo de la medicina. (6)

2.4.1 Síntesis del poli (3-hidroxibutirato) por bacterias.

Dado el interés que los científicos han mostrado por estos biopolímeros, muchos trabajos han sido realizados para la obtención microbiológica del poli (3-hidroxibutirato) (6). Silva *et al.*, produjeron el PHB por medio de bacterias utilizando xilosa, glucosa y bagazo hidrolizado de caña de azúcar. Los autores seleccionaron las bacterias Burkholderia cepacia IPT 048 y B. Sacchari IPT 101 para su estudio, indicando que se han encontrado cincuenta y cinco cepas de bacterias, provenientes del suelo, que fueron catalogadas como eficientes para su uso en la biosíntesis del PHB utilizando xilosa como medio de cultivo. (8). Por otra parte Yik-Kang Kek *et al.*, investigaron la habilidad del cupriavidus necator (Ralstonia eutropha) en convertir biológicamente los subproductos del ácido palmítico y del ácido kernel palmítico en poli (3-hidroxibutirato) (9). Sería inabordable el número de investigadores que se han dado a la tarea de buscar nuevas cepas de bacterias, sustratos y métodos genéticos para la producción del PHB (10). Esto se debe a que los investigadores buscan disminuir los costos de producción del material, por su potencial uso como plástico convencional.

2.4.2 Propiedades físicas del poli (3-hidroxibutirato).

Entre las propiedades físicas más importantes del PHB se encuentran a) Su masa molecular oscila entre $1-4 \cdot 10^6$ g/mol de acuerdo al método de síntesis utilizado para elaborarlo b) Su densidad puede oscilar entre 1.23-1.25 g/ml, c) El valor de su resistencia a la tensión (tracción) es de aproximadamente 3.44 kN/cm^2 , y su dureza al rebote (55 Shore D) indican la naturaleza frágil del material, d) La entalpía de fusión (ΔH_m) es de 62.31 J/g , e) La temperatura de fusión (T_m) es de aproximadamente 174°C , f) La temperatura de transición vítrea (T_g) tiene un rango aproximado de $10-18^\circ\text{C}$ y es difícil de determinar, g) La degradación térmica del material ocurre alrededor de los 250°C en un solo paso de la curva de pérdida de peso (ATG), h) El valor de la cristalinidad puede variar entre los 40-70 % indicando patrones de alto índice de cristalinidad y una fase cristalina ortorrómbica de tipo $P2_12_12_1$, e i) El análisis de las técnicas espectroscópicas Infrarrojo y Resonancia Magnética Nuclear (RMN- ^{13}C , RMN- ^1H) muestran las señales características de poliéster alifático (11).

2.5 Transformaciones moleculares en materiales poliméricos.

La síntesis de nuevos polímeros se ha convertido en una tarea de extrema importancia para los investigadores. Durante la última década los investigadores han concentrado su esfuerzo en el desarrollo de nuevas macromoléculas, basadas en la síntesis de nuevos sistemas poliméricos a través de reacciones de polimerización en bloque, blendas y copolímeros por injerto (12) (13) (14) (15) (16).

2.5.1 Biosíntesis de los copolímeros en bloque.

Un acercamiento prometedor para el mejoramiento de las propiedades físicas del PHB es la síntesis de copolímeros en bloque. Jun Mifune *et al.*, investigaron la síntesis del copolímeros en bloque (poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato)) mediante ingeniería genética dirigida de cromosoma del *Cupriavidus necator*, utilizando como medio aceite vegetal (17). Las propiedades mecánicas y térmicas, así como el comportamiento de la biodegradación de copolímeros en bloque de poli (éster-uretanos) fueron sintetizados a partir de PHB de origen bacteriano transesterificado (18). El grupo de investigación de Marchessault investigó la síntesis de copolímeros en forma de peine a partir de polihidroxialcanoatos de cadena media en forma de copolímeros en bloque (19) Jawed *et al.*, contribuyeron en la síntesis microbiana del poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato) producidas por *Aeromonas hydrophila* ATCC 14715 y *Pseudomonas putida* recombinante GPp104 (20). Asimismo pueden encontrarse trabajos de síntesis de copolímeros en bloque de polihidroxibutirato y polietilenglicol utilizando di-isocianato de hexametileno como agente de acoplamiento (21). Otros autores utilizaron el método de polimerización radicalica por transferencia de átomo, la utilización de nuevas cepas bacterianas aisladas, o el uso de nuevos precursores (agentes conectivos) para la formación de nuevos copolímeros en bloque (22) (23) (24) (25).

2.5.2 Blendas con el poli (3-hidroxibutirato).

Un segundo acercamiento en la búsqueda del mejoramiento de las propiedades físicas de PHB lo constituyen las blendas de este material con otros materiales poliméricos (26) (27). Se han estudiado un sinnúmero de blendas, tanto con polímeros parcialmente biodegradables como el poli (vinil acetato), como polímeros completamente

biodegradables como el poli (vinil alcohol), los polisacáridos o las poliláctidas (26). La blenda del polihidroxibutirato con otros polímeros no solo reduce tu temperatura de fusión y su cristalinidad, sino que también reduce su costo. Esto puede ser de gran importancia para el procesamiento industrial del material. Se ha comprobado que de todos los métodos utilizados con el propósito de realizar cambios en las propiedades del biopolímero, la blenda es el método más sencillo y económico (27). Varios estudios reportan blendas del PHB con quitosano (26), oligo [(R)-3-hidroxibutirato]-diol (28), (L)-Láctida (29), óxido de polietileno (30) y metacrilato de metilo (31) (32). Si se desea utilizar el producto final de la blenda en la ingeniería biomédica, es de vital importancia que los materiales obtenidos sean biodegradables.

2.5.3 Copolimerización por injerto.

La copolimerización por injerto es un tercer acercamiento a la obtención de nuevos materiales y el mejoramiento de las propiedades físicas de los polímeros de cadenas carbonadas lineales como el PHB. De todos los métodos de modificación mencionados la copolimerización por injerto se revela como el más atractivo y prometedor, lo que no resulta asombroso que esta disciplina cuente con el mayor número de investigaciones y que haya recibido mucha atención durante la última década. Bhattacharya *et al.*, realizaron una extensa revisión sobre la polimerización de injerto, sus técnicas, factores y aplicaciones (33). De acuerdo con el trabajo citado la copolimerización por injerto puede ser por vía química (iniciadores químicos, iniciadores enzimáticos etc.), o por radiaciones (radiaciones de alta energía, plasma, fotoquímica, etc.). Mohamed *et al.*, hicieron una exhaustiva revisión sobre la inmensa cantidad de trabajos de polimerización por injerto radio-inducido de monómeros polares en filmes no polares, así como el uso de los

productos como membranas de intercambio (34). En los siguientes epígrafes se realizará un mayor énfasis en la copolimerización por injerto inducida por radiaciones de alta energía, y específicamente las radiaciones gamma, pero se revisarán también las alternativas utilizadas por los investigadores que utilizaron la vía química u otra fuente de radiación para la obtención de copolímeros (33) (34).

2.5.4 Copolimerización por injerto vía química

Los métodos químicos utilizados en la síntesis de copolímeros por injerto no son menos importantes que los métodos donde se utilizan radiaciones. Sin embargo los mismos tienden a ser más complicados debido a la mayor cantidad de subproductos formados, la necesidad del uso de bajas temperaturas para la formación de los radicales y el incremento en el costo de producción de los productos. Sin embargo al utilizar iniciadores químicos para la preparación de nuevos materiales no solo se modifica la superficie de los materiales de partida, como es el caso de muchos métodos de copolimerización inducido por radiaciones, sino que es posible generar radicales desde las capas más internas del polímero base y por tanto es posible modificar el materiales de partida desde su interior y obtener nuevos materiales con propiedades físicas y químicas diferentes del material de partida. Es por eso que en la literatura encontramos también trabajos importantes sobre la copolimerización por injerto vía química, lo que hace necesario estudiar el polímero base y el monómero que se desea injertar antes de escoger el método de preparación del copolímero por injerto. Para una mejor concordancia con nuestro trabajo se escogió bibliografía de ejemplos que estén relacionados con el PHB. Cheng *et al.*, realizaron investigaciones sobre la copolimerización por injerto del anhídrido maleico (AM) en el

PHB utilizando peróxido de benzoilo como iniciador (35). Otros autores también utilizaron con éxito el peróxido de benzoilo como iniciador para injertar en el PHB la N-isopropil acrilamida (36) y la fenil vinil acetona (37). Shofie Nguyen, del grupo de investigación del profesor Robert Marchessault realizó un interesante trabajo donde preparó vía química macro-monómeros del PHB y luego los puso a reaccionar con metacrilato de metilo para obtener copolímeros P (HB-g-MMA) (38). Así se podrían mencionar múltiples trabajos de este tipo, pero en nuestro estudio nos enfocaremos más en el método de copolimerización inducido por radiaciones por sus ventajas las cuales se explicarán posteriormente.

2.6 Copolimerización por injerto por radiaciones.

Al actuar las radiaciones sobre un polímero, al igual que sobre un monómero surgen radicales libres, iones y macromoléculas excitadas que se encargan de iniciar las transformaciones químicas posteriores a la irradiación. Concretamente, se forman enlaces transversales (intramacromoleculares o intermacromoleculares), se rompen enlaces en la cadena principal y en las ramificaciones; se producen reacciones de injerto de nuevos monómeros, procesos de oxidación e isomerización y ciclización.

Los cambios moleculares en los materiales poliméricos , como resultado de las reacciones químicas inducidas por radiaciones , pueden ser clasificadas como: (1-) entrecruzamiento de cadenas , causando un incremento en el peso molecular (2-) ruptura o escisión de cadenas , causando una disminución del peso molecular y cambiando considerablemente las propiedades del material polimérico, (3-) pequeños productos moleculares, como resultado de las escisiones de la cadena principal, seguida por una reacción de abstracción o combinación o ambas a la vez (4-) cambios estructurales en el polímero acompañado de

la formación de productos moleculares. La extensión en que ocurre cada una de estas reacciones depende de la naturaleza química del polímero y las condiciones de irradiación.

2.6.1 Copolimerización por injerto inducido por radiaciones gamma.

El estudio de las modificaciones de los materiales poliméricos por radiación inducida es muy vasto, dentro de este campo se tiene especial interés en relacionar las modificaciones que han ocurrido en los polímeros biodegradables y más específicamente las realizadas en el sustrato PHB, y los diferentes materiales obtenidos por copolimerización de injerto radio-inducido según los monómeros y las condiciones de trabajo escogidas por los investigadores. Sería inabordable mencionar todos los trabajos que se han realizado en la obtención de materiales poliméricos por copolimerización de injerto radio-inducida. Existen estudios recientes de obtención de membranas injertadas por copolimerización radio-inducida de monómeros hidrofílicos en membranas hidrofóbicas para la aplicación de estos materiales como membranas de intercambio iónico. En esta revisión se pueden encontrar cientos de estos copolímeros obtenidos por esta vía y con diversas aplicaciones. (34).

Las principales modificaciones estructurales en los polímeros son el entrecruzamiento y la degradación. Ambos constituyen procesos químico-radiolíticos irreversibles. El entrecruzamiento es la formación de enlaces intermacromoleculares y la degradación es la ruptura de los enlaces en la cadena principal o en los grupos o cadenas laterales. Las modificaciones químicas que presuponen la introducción en las macromoléculas primarias de nuevos fragmentos moleculares, están directamente vinculadas a las reacciones de injerto.

La copolimerización por injerto inducida por radiaciones comenzó en los años 1950s y continua siendo un tema de investigación muy activo, a fin de obtener materiales modificados que pudieran tener diferentes aplicaciones. Con la aplicación de este método, se permite el cambio en las propiedades de los materiales poliméricos, como es la propiedad de absorción de la humedad, adhesión, propiedades de impresión, propiedades anti-neblina, biocompatibilidad, la hidrofilidad o hidrofobicidad etc.

La copolimerización por injerto inducida por radiaciones posee un gran potencial para la simplificación del proceso de tratamiento de los materiales poliméricos, puesto que no dejan residuos perjudiciales y reduce el costo de producción.

Este método tiene además la posibilidad de iniciar la polimerización en un amplio rango de temperaturas, incluyendo bajas temperaturas y en varios estados del monómero, ya sea en masa, solución, emulsión, e incluso en estado sólido. Se pudiera agregar, que este método, ofrece una forma única para combinar dos polímeros incompatibles, brindándole nuevas propiedades al copolímero por injerto obtenido. La naturaleza versátil de esta técnica se atribuye a la habilidad para controlar el grado de injerto por medio de la selección de las condiciones de irradiación

En principio, la copolimerización por injerto es un proceso en el cual las cadenas que se injertan de forma lateral son enlazadas covalentemente a la cadena principal del esqueleto carbonado del polímero para formar copolímeros ramificados.

Un copolímero de injerto puede ser representado como se ilustra en la Figura 3, donde A es la cadena principal de polímero, B_n y B_m son las cadenas que injertan de manera lateral, procedentes del monómero utilizado en la reacción de copolimerización. La magnitud de

la polimerización del injerto de B_n y B_m se denomina grado de injerto el cual es determinado gravimétricamente como el porcentaje del incremento de masa.

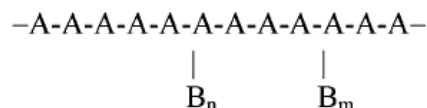


Figura 3 Representación esquemática de un copolímero por injerto.

La copolimerización por injerto toma lugar como resultado de la formación de centros activos en la cadena carbonada. Estos centros activos pueden ser radicales libres o grupos químicos iónicos, los cuales inician la reacción de polimerización.

La formación de centros activos en la cadena carbonada puede llevarse a cabo por diversos métodos químico y físicos como son: el tratamiento con plasmas (39), radiación de luz ultravioleta (40) (41), descomposición de iniciadores químicos (42) y energía de alta radiación (43).

De todos los métodos estudiados para la modificación de materiales poliméricos por reacción de copolimerización de injerto, el método de la copolimerización por injerto inducida por radiaciones de alta energía ha sido el más estudiado. Esto se debe a que este último tiene la ventaja de lograr modificaciones en los sustratos poliméricos en la superficie y en el interior del material, mientras que los demás métodos mencionados se limitan a modificaciones en la superficie.

2.6.2 Modificaciones realizadas en materiales poliméricos con metacrilato de butilo.

El metacrilato de butilo (MBu) ha sido utilizado en la modificación de materiales poliméricos. Xiang injertó el MBu en fibras de lana utilizando como iniciador un sistema redox. El investigador afirmó que se había elegido este monómero debido a que su homopolímero, el polimetacrilato de butilo tiene una baja temperatura de transición vítrea y por tanto no se espera que deteriore las fibras de lana sino que el injerto mejore su desempeño (44). Li Yu *et al.*, realizaron un estudio de la polimerización por injerto radioinducido del acrilato de butilo (monómero químicamente muy parecido al MBu) en quitosano. Los investigadores indican que el monómero fue escogido por su hidrofobicidad y suavidad, es decir, porque se espera que al injertarse en el quitosano se forme una nueva macromolécula relativamente más hidrofóbica y flexible (45). Otros trabajos, como los realizados por Haldar *et al.*, están relacionados con el injerto por tamizado de la superficie del caucho con el acrilato de butilo, utilizando energía de alta radiación de un haz de electrones. La finalidad de este tipo de investigaciones es recubrir la superficie de un material polimérico con otro material y así propiciar una mejor compatibilidad de la nueva superficie con polímeros polares y rellenos (46).

2.6.3 Modificaciones realizadas en materiales poliméricos con ácido metacrílico.

Se revisaron los trabajos realizados por otros investigadores que hayan utilizado ácido metacrílico (MA) para la obtención de algún nuevo material. Se encontraron trabajos donde se utilizó este monómero para recubrir fibras de polímeros convencionales. Nos llamó la atención el trabajo realizado por Gupta *et al.*, donde se utilizó la copolimerización

por injerto radioinducido por radiaciones gamma del ácido metacrílico en el polipropileno (PP), un polímero muy parecido al PHB por sus propiedades físicas. Se utilizó el método de radiación simultánea y se obtuvieron evidencias de injerto sobre este material (47). Otro trabajo donde se injertó el MA en polímeros convencionales, en este caso polietileno (PE), lo realizaron Young y sus colegas. Se utilizaron iniciadores químicos redox, por medio de una técnica que es conocida como técnica de injerto por peróxidos. Se utilizaron sales metálicas y ácido sulfúrico para controlar el grado de injerto en la superficie del PE peroxidizado por radiaciones (48). Por otra parte, se encontraron trabajos de injerto de MA en almidón y polivinil alcohol utilizando un sistema de iniciadores químicos redox, con la finalidad de obtener copolímeros por injerto que puedan ser utilizados como agentes de encolado (49) .

2.6.4 Modificaciones realizadas en materiales poliméricos con acetato de vinilo.

La polimerización de injerto post irradiación del acetato de vinilo en el politetrafluoroetileno (PTFE) en diferentes condiciones de reacción fue estudiada por investigadores egipcios (50). Otro grupo del mismo origen estudió la copolimerización por injerto radioinducido de acetato de vinilo y ácido acrílico en filmes de polietileno-vinil acetato (51). Se desconoce las razones de la síntesis de estos nuevos materiales, pero los autores de estos trabajos afirman que los productos tienen potencial para darles una utilidad práctica. Se ha encontrado que el injerto del acetato de vinilo en teflón y otros materiales tiene origen a fines de la década de los 50's con el trabajo de Restaino *et al.*, de la polimerización por injerto radioinducido y el estudio cinético de la reacción (52). Otro trabajo destacado en esta temática es el de Vigo *et al.*, que injertaron el acetato de vinilo en polivinil cloruro (PVC) para lograr el mejoramiento de sus propiedades hidrofílicas

(53). Una investigación posterior fue realizada por Ringrose *et al.*, en la copolimerización radio-inducida del VAc en polietileno de baja densidad (54). En otros estudios más recientes se injerta el VAc en gel de sílice (55). De esta forma, se podrían mencionar decenas de trabajos relacionados con este tema, ya que el uso del acetato de vinilo en injertos a diferentes materiales poliméricos es típico en la búsqueda de nuevas opciones de síntesis de materiales con utilidad práctica.

2.6.5 Modificaciones realizadas en materiales poliméricos con acrilamida.

De todos los monómeros, la acrilamida es el más controversial, debido a la incertidumbre relacionado con su uso, ya que está clasificada como "probable cancerígeno para los humanos", en base a estudios realizados con animales. De momento no está claro que estos resultados puedan extrapolarse al hombre. En la actualidad se han realizado estudios muy exhaustivos sobre las dosis de acrilamida contenida en los alimentos y la exposición de los seres humanos a esta sustancia (56). Con estos antecedentes cuando se realiza una investigación en el injerto de este monómero en algún material polimérico es casi seguro de que los investigadores tengan dificultades para publicar los resultados por la incertidumbre de si los productos de la copolimerización son también propensos a producir cáncer. A pesar de lo anteriormente dicho es posible encontrar brillantes trabajos de investigación en esta área. Por mencionar algunos, Han Sup *et al.*, investigaron la copolimerización por injerto radio-inducido de la acrilamida en el polihidroxitirato-co-hidroxitirato (P (HB-co-HV)) en forma de filme utilizando peróxido de benzoilo como iniciador (57). La investigación incluye la síntesis y la caracterización química física del copolímero obtenido. Un trabajo más reciente, realizado por Gupta *et al.*, estudió la

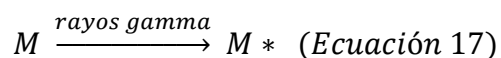
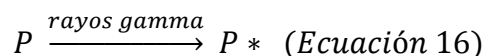
obtención del polietileno-g-poliacrilamida en forma de filme, obtenido por copolimerización por injerto radioinducido de la acrilamida en el polietileno utilizando el método de pre-irradiación, el cual se explicará en un epígrafe posterior (58). La superficie del nuevo material fue estudiada por diferentes técnicas espectroscópicas. La polimerización fotográfica es otro método utilizado para injertar la acrilamida en el PHBV. Este método fue utilizado en el año 2007 por Yu Ken *et al.*, quienes utilizaron la benzofenona como fotoiniciador (59). Una investigación muy interesante es la realizada por el equipo de Kutsevol y colabores con el dextrano (60). El dextrano es un polisacárido complejo y ramificado formado por numerosas moléculas de glucosa; unidades en cadenas de longitud variable. El polisacárido fue modificado con el injerto de la acrilamida por el método de iniciación redox por reducción del ion cérico. De acuerdo con esta referencia se escogió la acrilamida con la finalidad de obtener derivados aniónicos que muestren mejor comportamiento floculante que la poliacrilamida. De momento no hay ninguna evidencia de que los copolímeros obtenidos a partir de la acrilamida sean tóxicos o cancerígenos, lo que los investigadores continúan aunando esfuerzos en la búsqueda de nuevos materiales a partir de la acrilamida y polímeros base de diferente naturaleza.

2.7 Métodos de copolimerización por injerto radio-inducido.

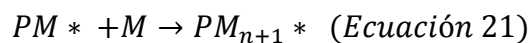
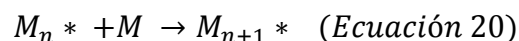
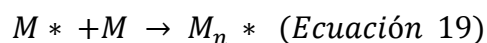
En el método de la copolimerización de injerto inducido por radiaciones, los centros activos se forman en la cadena carbonada utilizando para este fin la alta radiación de energía. Posteriormente el polímero irradiado reacciona con las unidades monoméricas correspondientes, los cuales se propagan para formar la cadena lateral de injerto. La reacción de copolimerización de injerto inducida por radiaciones conciernen tres pasos principales (iniciación, propagación y terminación), de acuerdo con las ecuaciones 1-11, que para este caso pueden ser representados con las siguientes ecuaciones químicas:

Esquema cinético general de la reacción química.

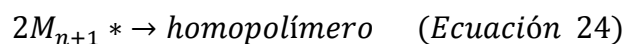
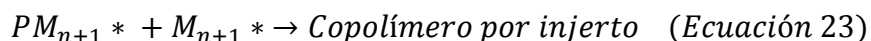
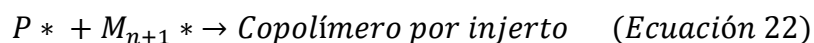
Iniciación



Propagación.



Terminación.



Donde P es el polímero, P* es el centro activo radical primario del polímero, M es la unidad monomérica, M* es el centro activo radical primario del monómero, PM* es el centro activo de la cadena inicial, PM_{n+1}* es el centro activo de la cadena de injerto en crecimiento y M_n* y M_{n+1}* son los centros activos de los radicales crecientes de la homopolimerización. Cualquier parámetro que afecte uno o más de estos pasos, causa una variación en el grado de injerto. Sin embargo, se presta especial atención al paso de iniciación donde la energía de alta radiación es considerada con mucha frecuencia, como una alternativa preferible frente a otros métodos. Los estudios más recientes en

copolimerización por injerto inducido por radiaciones conciernen dos métodos fundamentales:

(1) La irradiación simultánea y (2) la pre-irradiación, la cual puede ser llevada a cabo en presencia de aire o al vacío.

2.7.1 Método de la irradiación simultánea.

La irradiación simultánea es la técnica de irradiación más simple para la preparación de copolímeros por injerto. En este método la cadena carbonada es irradiada en presencia del monómero que se encuentra disponible en diferentes formas: vapor, líquido, o en solución. La irradiación se lleva a cabo preferiblemente bajo condiciones de vacío, principalmente si la reacción converge a la formación de radicales libres activos en la cadena de ambos polímeros y unidades monoméricas. El mecanismo de reacción en este sistema de injerto está en concordancia con las ecuaciones 16-25, y puede ser representado como sigue:

Irradiación: $P \xrightarrow{\text{rayos gamma}} P^*$ (Indica la formación de radicales primarios)

Iniciación: $P^* + M \rightarrow PM^*$ (Indica la formación de una cadena de injerto)

Propagación. $PM^* + nM \rightarrow PM_{n+1}^*$ (Son las cadenas crecientes de injerto)

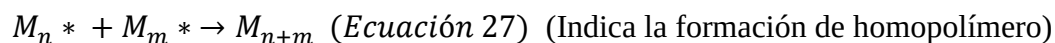
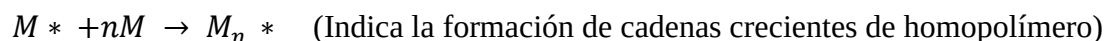
Terminación. $PM_n^* + PM_m^* \rightarrow PM_{n+m}$ (Formación de copolímeros por injerto)

Donde P es la matriz polimérica, en nuestro estudio el PHB, M es la unidad monomérica (en nuestro estudio es alguno de los monómeros escogidos) y P* y M* son los centros activos de sus radicales primarios respectivamente. Por otra parte PM* es el centro activo de la cadena de injerto iniciada, y PM_n* y PM_m* son los centros activos de las cadenas crecientes de injerto del copolímero.

En la irradiación simultánea, existe una alta posibilidad para la desactivación de los centros activos de los radicales primarios de la cadena carbonada (P*) por recombinación mutua. Esta desactivación puede ser representada por la ecuación:

$P^* + P^* \rightarrow PP$ Ecuación 26, Ecuación de recombinación.

De forma análoga, la homopolimerización iniciada por la reacción de radicales formados de la radiólisis del monómero con moléculas de monómeros que permanecen en la solución de injerto puede representarse de acuerdo a las ecuaciones 16-25 como:

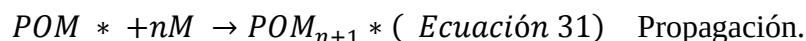
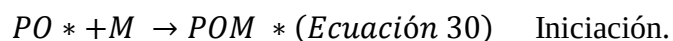
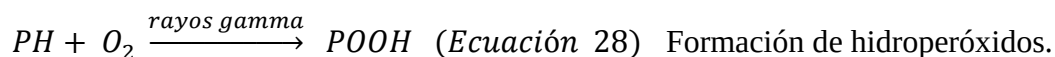


Donde M_n^* y M_m^* son los centros activos de las cadenas crecientes del homopolímero, respectivamente. La polimerización por injerto radio-inducido por el método de radiación simultánea, se ve limitado por el alto nivel de formación de la reacción de homopolimerización. Sin embargo un número de condiciones pueden ser adoptadas para solucionar esta problemática y mejorar la eficiencia del injerto, manteniendo la formación de radicales en la cadena carbonada en altas tasas con relación a la formación de radicales en las unidades monoméricas. Estas condiciones incluyen, la adición de inhibidores tales como sales de Fe^{++} y Cu^{++} , el uso de buenos agentes de hinchamiento (solventes), la selección de bajas tasas de dosis para evitar la terminación rápida de las cadenas de injerto en crecimiento o la adición del monómero o en vapor o en forma líquida a la cadena carbonada del polímero mientras este se encuentra en estado sólido. En nuestro trabajo realizaremos el estudio de la influencia del disolvente en el grado de injerto de los productos de la reacción.

2.7.2 Método de la pre-irradiación.

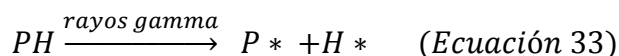
El método de pre irradiación está relacionado con la combinación de dos pasos (a) la irradiación de la cadena carbonada para formar radicales activos y (b) poner en contacto las cadenas carbonadas poliméricas irradiadas con el monómero a injertar. Si el paso de la irradiación se realiza al aire, los radicales generados reaccionan con el oxígeno para formar peróxidos e hidroperóxidos, los cuales inician el injerto una vez que se ponen en contacto con las unidades monoméricas por descomposición térmica. La reacción completa de cómo

ocurre la copolimerización de injerto del monómero en la cadena hidrocarbonada se puede representar por las siguientes ecuaciones:



Donde PH es la representación de la cadena carbonada, POOH es el hidroperóxido, $PO *$ es el radical primario y $POM *$ es el centro activo de la cadena de injerto inicial y $POM_{n+1} *$ es el centro activo de la cadena de injerto en crecimiento.

Adicionalmente, si la irradiación es llevada a cabo bajo vacío o en condiciones inertes, los radicales generados quedan atrapados en la cadena carbonada e inician el injerto en presencia del monómero según el siguiente mecanismo:



La estabilidad de $P *$ y $PM *$ depende fundamentalmente de la cristalinidad de la cadena carbonada, temperatura y período de almacenamiento de los filmes irradiados en caso de utilizar filmes. De acuerdo con el esquema cinético general de la reacción química, en el método de la pre-irradiación el paso de la iniciación se encuentra simplificado, no existiendo formación de $M *$ como bien puede observarse.

2.8 Aplicaciones biomédicas de los polihidroxicanoatos.

Un número considerable de autores han investigado el uso potencial de los polihidroxicanoatos (PHA) en el área de la Ingeniería Biomédica. Una parte importante de los trabajos han estado enfocados al uso de los PHA en la liberación controlada o sostenida de fármacos (61). Koosha *et al.*, realizaron una revisión científica (review) del uso del PHB como agente portador de drogas (principios activos) para ser liberada in vitro

e in vivo (62). Es interesante percatarse como a finales de la década de los 80's ya existían diversos sistemas avanzados de liberación controlada de PHB y progesterona (63), metoclopramida (64), sulfametizol (65), etc. Otros investigadores realizaron el estudio de la liberación de agentes anticancerígenos tales como aclarubicin, doxorubicin, y bleomycin, utilizando matrices de PHB (66). También se encontraron reportes del uso de los PHB en polvo de talco médico, en la fabricación de bolsas de ostomía, pañales interiores y eyectores de tampón (67). Estudios más recientes revelan el uso de los PHA en lo que probablemente sea su uso más asombroso, la terapia de reemplazo de huesos, intervenciones quirúrgicas, ortopedia e ingeniería de tejidos (68).

2.9 Aplicaciones biomédicas de los copolímeros por injerto.

El uso biomédico de los copolímeros por injerto también ha sido extensamente estudiado (68). Los copolímeros por injerto que provienen de los PHA, mantienen sus aplicaciones anteriormente descritas y en la mayoría de los casos los injertos ayudan a ampliar su campo de aplicaciones al mejorar alguna de las propiedades físicas del material de partida, ya sea la hidrofiliidad, la biocompatibilidad o la biodegradabilidad (69). La inmovilización de proteínas es una de las aplicaciones más importantes de los copolímeros por injerto de polihidroxialcanoatos. Lisbeth *et al.*, realizaron un estudio de la síntesis del copolímero del ácido acrílico y el PHB (P (HB-g- AAc)) y la posterior reacción de los grupos carboxilos injertados del AAc mediante el enlace covalente con glucosamina (70). Los filmes del copolímero resultaron ser adecuados para este tipo de aplicación. De manera concluyente, encontramos que tanto los PHA como sus copolímeros tienen una gran variedad de aplicaciones, donde resalta el potencial de uso en la ingeniería biomédica. Con el creciente interés de los investigadores de encontrar nuevos materiales para ser

utilizados en la biomedicina, los copolímeros por injerto se convierten en un área de oportunidad muy extensa donde emergen cada vez mayor cantidad de nuevos materiales con utilidad práctica (68).

2.10 Antecedentes de copolimerización por injerto radio-inducido en el PHB.

En lo que respecta específicamente a los copolímeros por injerto obtenidos por copolimerización por injerto inducidos por radiaciones gamma en el poli (3-hidroxibutirato) es importante destacar que la literatura sobre este tema es muy escasa. Para conocer el estado del arte de la ciencia que sustenta esta investigación cabe mencionar que los primeros trabajos en este tema fueron realizados por Mitomo *et al.* (71) aunque la ciencia de la copolimerización por injerto tiene su origen en los años 50's con los estudios de Chapiro que fue el pionero de la ciencia del injerto radio-inducido (34) (72). En 1994 Mitomo estudió la degradación radio-inducido por radiaciones gamma del P (3HB) y el P (3HB-co-3HV) a temperatura ambiente, en aire y vacío y analizó la biodegradabilidad de los polímeros irradiados (71). Tres años después, el mismo autor realizó la que se cree fue su primera síntesis en esta disciplina, la copolimerización por injerto del ácido acrílico en el P (3HB) y el P (3HB-co-3HV) (73). Se utilizó una fuente de radiación gamma de ^{60}Co . El PHB se selló al vacío en ampollitas de vidrio, y fue pre-irradiado a 5 kGy, a una tasa de dosis de 10 kGy/h, a una temperatura de -78 °C. Una solución al 10% de AAc fue vertida sobre el PHB pre-irradiado para producir la reacción deseada. El experimento se realizó al vacío a temperatura constante por varios periodos de tiempo para variar la dosis. Se obtuvo el copolímero P (HB-g-AAc) por la técnica descrita y se analizó con diferentes técnicas químico físicas. Mitomo compara los resultados obtenidos con el injerto del metil metacrilato (MMA) y el hidroxietil metacrilato (HEMA)

obtenidos por la misma técnica, lo que se piensa que estos materiales fueron sintetizados y estudiados por el grupo de trabajo durante aproximadamente el mismo período de tiempo (74). Ese mismo año Bahari *et al.*, realizaron la investigación de la copolimerización por injerto radio-inducido del monómero estireno en el P (3HB) y el P (3HB-co-3HV), así como el estudio de su biodegradabilidad. Los estudios confirman que es posible injertar el estireno por las técnicas de pre-irradiación e irradiación simultánea, aunque los valores de grado de injerto obtenidos fueron inferiores a los obtenidos con los anteriores monómeros injertados por Mitomo (AAc, MMA, HEMA). Bahari demostró que al injertarse el estireno polimeriza de forma linear, sin entrecruzamientos o ramificaciones. El grado de injerto se incrementó con la dosis hasta alcanzar un valor máximo del 25% a las 4 horas de reacción a una temperatura de 80 °C, lo que se concluyó que no debía exponerse la reacción a una dosis mayor de 20 kGy (75). Por otra parte el estudio de la biodegradabilidad indicó que la estabilidad térmica del copolímero P (HB-g-St) mejoró con respecto al material de partida, lo que la biodegradabilidad enzimática disminuyó. Por lo tanto, desde el punto de vista de la aplicación el injerto del estireno podría ser un método para controlar la biodegradabilidad del P (3HB) y el P (3HB-co-3HV) mediante el recubrimiento con capas de poliestireno sobre filmes del biopolímero (76). Pasaron varios años sin que se encontraran nuevos reportes en este tema, hasta que en el 2001 se realizó una investigación sobre la síntesis de la copolimerización por injerto radio-inducido por radiaciones gamma del isopreno (IP) en el PHB. Tao Jiang *et al.*, aunaron esfuerzos para la síntesis del P (HB-g-IP), con la finalidad de mejorar la tenacidad (energía total que absorbe un material antes de alcanzar el punto de fractura). Este trabajo es una valiosa aportación porque una de las desventajas del PHB, es su fragilidad. Jiang

remarcó la importancia de estudiar las condiciones óptimas de reacción del injerto y fue el primero en hacer el estudio de los efectos del disolvente, encontrando que el disolvente más apropiado para injertar el isopreno es heptano. De esta forma otros parámetros como la concentración del monómero y la dosis de radiación fueron estudiadas. Las condiciones de reacción utilizadas por Tao Jian y Ping Hu fueron apropiadas (1.29 kGy/h, desgasificación por burbujeo de nitrógeno gaseoso, irradiación con fuente de ^{60}Co), ya que se logró la síntesis y la caracterización del nuevo material y por primera vez se utilizó la técnica de Resonancia Magnética Nuclear para dilucidar la estructura del material obtenido, ya que en las investigaciones de Mitomo *et al.*, solo se restringían al análisis calorimétrico dándole mayor importancia al estudio de la biodegradabilidad del copolímero (77). Otra investigación en este rubro, es realizada por Ye Herong *et al.*, en la polimerización por injerto inducida por radiaciones del anhídrido maleico en el PHB. Ye se enfocó en la obtención de un nuevo material para mejorar la termo-estabilidad del PHB. La reacción en masa se llevó a cabo por el método de la irradiación simultánea en atmósfera de nitrógeno. El proceso fue similar al utilizado por Jiang pero utilizando menores tasas de dosis (8.76 Gy/min). Uno de los temas que conciernen en la síntesis de copolímeros es la determinación del grado de injerto y la demostración de la formación del nuevo material. Ye *et al.*, demostraron creatividad al medir el grado de injerto por el método de titulación química y realizaron la dilucidación de la estructura del copolímero por RMN y técnicas calorimétricas complementarias (78).

También ha sido explorada la formación de redes poliméricas semi-interpenetradas que aunque no son copolímeros por injerto en forma de peine, se pueden formar mientras se sintetiza un copolímero por injerto. Una red polimérica semi-interpenetrada (IPN), es un

sistema en donde solo una red polimérica está unida covalentemente mientras que el monómero que se desea injertar esta embebido (sin enlaces covalentes, pero imposibilitado de salir de la red polimérica) en forma de polímero en la red inicial. En la literatura la información sobre este tema también es muy escasa, pero recientemente se han publicado algunos trabajos como la síntesis de una red semi-interpenetrada de PHB y polietilenglicol diacrilato (15) , y ácido acrílico (79). Estos trabajos deben de ser mencionados por la estrecha relación que tienen con la copolimerización por injerto radio-inducido. En nuestro trabajo haremos mención de una red polimérica semi-interpenetrada obtenida accidentalmente mientras se realizaba una síntesis de copolímero por injerto.

Estudios más recientes, en la copolimerización por injerto radioinducido del AAc en el P (3HB) y el P (3HB-co-3HV) fueron realizadas por Lisbeth *et al.* (70). Lo novedoso del trabajo de Lisbeth es la realización de la síntesis en filmes de P (3HB-co-3HV) y estudiar una posible aplicación mediante la inmovilización de proteínas a los grupos carboxilo del PAAc injertado. Por su parte, Yuki Wada *et al.*, también profundizaron en la síntesis del AAc en el PHB por copolimerización por injerto radioinducido, donde la aportación fue el uso de haz de electrones para la reacción de iniciación en vez de rayos gamma, la utilización del método de pre-irradiación y el estudio de la biodegradabilidad de los filmes copoliméricos (80).

En el año 2006, nuestro grupo de trabajo reportó por primera vez la síntesis por copolimerización de injerto radio-inducido del acetato de vinilo en el PHB, por el método de irradiación simultánea (81) (82).

En el año 2007, Yuki Wada *et al.*, también reportaron la copolimerización por injerto radio inducido del VAc en el PHB y el estudio de su biodegradabilidad. En el primer trabajo

Wada realizó la síntesis del copolímero por el método de pre-irradiación utilizando una emulsión con tensoactivo (surfactante) Nonion-L4, lo que constituye su mayor aporte (83). En el segundo trabajo se estudió la biodegradabilidad de los filmes obtenidos por tamizaje del VAc sobre la superficie del PHB obteniéndose un incremento de la biodegradabilidad al realizar la saponificación del filme injertado (84).

Por otra parte, Santos *et al.*, proponen un estudio más profundo sobre la relación entre el grado de injerto y el incremento de la hidrofiliidad en el PHB cuanto este es injertado con el VAc. Para este estudio utilizaron la técnica de ángulo de contacto en filmes del copolímero (85).

Estudios más recientes (2011), se realizaron en la síntesis y caracterización química física del 2-amino etil metacrilato (AEMA) en filmes de P (3HB-co-3HV), por copolimerización radio-inducida, por el método de irradiación simultánea. El injerto fue obtenido utilizando con una fuente de ^{60}Co , a una tasa de dosis de 2,2 kGy/h a diferentes concentraciones de AEMA. Los estudios también han demostrado que los injertos ocurren fundamentalmente en la zona amorfa del polímero. Lisbeth *et al.*, utilizaron entre otras técnicas, nano-partículas de oro en suspensión cítrica para demostrar el injerto que se había obtenido (86).

En este trabajo se modifica el PHB con el injerto de monómeros hidrofílicos con la finalidad de mejorar las propiedades hidrofílicas del biomaterial. Se utilizaron monómeros típicos tales como el acetato de vinilo (VAc), alcohol vínlico (VA), metacrilato de butilo (BuM), ácido metacrílico (MA), y la acrilamida (AAm). Para la síntesis de los nuevos materiales se escogió el método de copolimerización por injerto radio-inducido por radiaciones gamma de ^{60}Co (irradiación simultánea) por sus ventajas. No existen reportes

previos a las publicaciones de los resultados obtenidos para cada uno de los materiales sintetizados, lo que constituye su mayor novedad y relevancia.

De forma adicional, se realizaron estudios para determinar los cambios en la estructura y propiedades de los nuevos materiales obtenidos. El estudio implicó la síntesis de los copolímeros, su caracterización química física y el estudio de las propiedades hidrofílicas de los materiales. La estructura de los nuevos materiales obtenidos fue verificada con las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR), Análisis Termo-gravimétrico (TGA), Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Difracción de Rayos X (DFRX) , entre otras. En la mayoría de los casos se realizó un estudio del efecto del disolvente en la copolimerización por injerto radio-inducido de los monómeros seleccionados en el PHB. Otros estudios realizados implican el análisis cualitativo de los nuevos materiales, el grado de injerto etc. Los resultados obtenidos indican que en todos los casos fueron obtenidos copolímeros por injerto de los diferentes monómeros utilizados, los cuales tienen diferente composición química de acuerdo con las condiciones de reacción utilizadas en cada caso.

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales.

Se utilizó PHB suministrado por el Instituto de Investigaciones Tecnológicas de São Paulo, Sección Biotecnológica (Brasil). El mismo fue purificado por precipitación en etanol de una solución de cloroformo como se describe posteriormente. El peso molecular del PHB utilizado es de $\bar{M}_n = 27,000$ g/mol, $\bar{M}_w = 60,000$ g/mol y $\bar{M}_z = 98,000$ g/mol. La polidispersidad del polímero es de 2.22.

El monómero acetato de vinilo (VAc) es de calidad Merck y fue previamente destilado a presión normal, a una temperatura de 72,5 °C.

El monómero ácido metacrílico (MA) es de calidad Merck y fue previamente destilado a presión normal, a una temperatura de 161 °C.

El monómero metacrilato de butilo (MBu) es de calidad Merck y fue previamente destilado a presión normal, a una temperatura de 165 °C.

El monómero acrilamida es de calidad Sigma Aldrich y fue purificada por el método de recristalización.

Otras sustancias químicas fueron utilizadas sin previa purificación.

Etanol.

$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, de calidad Sigma Aldrich ,99.9%, P.M. 46.07 g/mol, p.e. 78.4 °C, n_D^{20} 1.360, ρ^{20} 0.789 g/cm³. Líquido incoloro, inflamable, tóxico.

Metanol.

CH_3OH , de calidad Sigma Aldrich, 99.9%, P.M. 32.04 g/mol, p.e. 65°C, n_D^{20} 1.3290, ρ^{20} 0.7918 g/cm³. Líquido incoloro, inflamable, tóxico.

Hexano.

C_6H_{14} , de calidad Sigma Aldrich, 99.8 %, P.M. 86.18 g/mol, p.e. 69 °C, n_D^{20} 1.375, ρ^{20} 0.6548 g/cm³. Líquido incoloro inflamable, irritante.

Acetato de etilo.

$CH_3COOCH_2CH_3$, de calidad Sigma Aldrich, 99.9%, P.M. 88.11 g/mol, p.e. 77 °C, n_D^{20} 1.3724, ρ^{20} 0.9 g/cm³. Líquido incoloro inflamable, irritante.

Cloroformo.

$CHCl_3$, de calidad Sigma Aldrich, 99.9%, P.M. 119.38 g/mol, p.e. 61 °C, n_D^{20} 1.4459, ρ^{20} 1.483 g/cm³. A temperatura ambiente, es un líquido volátil, no inflamable, incoloro, de olor penetrante.

Acetona.

$CO(CH_3)_2$, de calidad Sigma Aldrich, 99.8 %, P.M. 58.08 g/mol, p.e. 56 °C, ρ^{20} 1.791, n_D^{20} 1.359. Líquido incoloro, inflamable.

Dietil éter.

$CH_3CH_2OCH_2CH_3$, de calidad Sigma Aldrich, 99,5 %, P.M. 74.12 g/mol, p.e. 34.6 °C, n_D^{15} 1.35, ρ^{20} 0.7134 g/cm³. A temperatura ambiente, es un líquido incoloro, muy inflamable.

N-butanol.

$CH_3(CH_2)_3OH$, de calidad Sigma Aldrich, 99.8 %, P.M. 74.12 g/mol, p.e. 118 °C, n_D^{20} 1.399, ρ^{20} 0.81 g/cm³. A temperatura ambiente, es un líquido incoloro, e inflamable. Es extremadamente irritante para los ojos, el contacto repetido con la piel también puede causar irritación.

3.1.1 Purificación del PHB.

Para la purificación del poli (3-hidroxibutirato) se realizó la precipitación en etanol de la solución del polímero en cloroformo, bajo agitación. El experimento debe realizarse en proporción 1:10 (1 mL de solución de polímero en cloroformo por cada 10 mL de alcohol).

3.1.2 Purificación de los solventes.

La purificación de los solventes se llevó a cabo a través de una destilación simple (i.e El etanol se destila a una temperatura de 78.4 °C y el triclorometano (cloroformo) a 61 °C). Los solventes utilizados fueron de calidad Merck. Otras sustancias químicas fueron empleadas sin previa purificación.

3.2 Métodos.

3.2.1 Estudio de degradación del poli (3-hidroxibutirato).

El material en estudio fue degradado mediante una degradación térmico-oxidativa. Se pesó una masa conocida de PHB en una cápsula de porcelana. La estufa se preparó a una temperatura constante de 180 °C y se colocó la cápsula con la muestra por un período de 30 minutos. Luego se retiró la muestra, se dejó que alcanzara el equilibrio térmico y se colocó en la desecadora. Para evitar la contaminación, se mantuvo protegida la cápsula con una cubierta de vidrio de mayores dimensiones. Se estudió la degradación por la variación del peso molecular determinado por GPC.

3.2.2 Preparación de membranas densas de poli (3-hidroxibutirato).

Se prepara una disolución concentrada del polímero en cloroformo. Luego de haberse disuelto todo el soluto, se deposita el contenido de la disolución en una placa petri y se coloca la tapa de la placa petri cuidadosamente. Se puede dejar 24 horas a temperatura

ambiente o se puede poner a 30 grados en la estufa por un período de tres horas aproximadamente. Una vez que se evapora el solvente, se despegas de la placa la membrana con ayuda de la espátula de mango fino, si la membrana está muy adherida al vidrio puede usarse un poco de agua destilada para ayudarla a separarse. Posteriormente se mide el grosor y las dimensiones de la membrana con ayuda de una regla y un micrómetro.

3.3 Técnicas de caracterización.

3.3.1 Análisis por espectroscopia FTIR.

En el análisis del P (HB-g-VAc) se utilizó un espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) Jasco FT/IR- 460 Plus (Jasco Instrument Corp., Japón), controlado por una computadora personal Pentium-4 que utilizó el software Jasco. Las muestras (en el orden de los miligramos) se colocaron en el interior de la celda, en su forma sólida usual y se midió el espectro IR realizando 64 barridos a una resolución de 2 cm^{-1} , una velocidad de barrido de 2mm/s y una ganancia de 4.

Los estudios de espectroscopia infrarroja por espectros de transmitancia de los copolímeros P (HB-g-MBu) y P (HB-g-AM) se llevaron a cabo utilizando un espectrómetro Bruker Vertex 70 , a 520 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} . Los espectros fueron corregidos de su línea base. La muestra se preparó en forma de pastillas de KBr. El estudio se llevó a cabo con un accesorio de reflectancia difusa EasiDiff.

Por su parte el estudio de FTIR del copolímero P (HB-g-AAm) se realizó en un espectrómetro Thermo Nicolet Magna 550. Los espectros se midieron en modo de transmitancia, en el rango de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. La zona de corrimiento de muestras del equipo fue equipada con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR por sus siglas en ingles) que contiene un cristal de Germanio (número de serie del dispositivo:

ACJ9300125) con el propósito de obtener espectros de transmitancia y absorbancia. Se tomaron aproximadamente dos miligramos de muestra. La muestra estaba en forma de sólido seco. Se realizaron 50 scans/min a una resolución de 4 cm^{-1} .

3.3.2 Análisis por Resonancia Magnética Nuclear.

Se realizó la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de los núcleos ^1H , ^{13}C y DEPT del P (HB-g-VAc). Los espectros se registraron mediante un espectrómetro Bruker Ac-250F a las frecuencias de 250 MHz y 62.9 MHz en tubos de 5mm de diámetro interior. Las muestras se disolvieron en cloroformo deuterado. Se usó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna, respecto a la que se reportan los corrimientos químicos (ppm). Los espectros se registraron a la temperatura de 300K. Para los copolímeros P (HB-g-MBu) y P (HB-g-AM) no se realizó el análisis de RMN porque los productos resultaron ser insolubles en todo solvente estudiado, lo que no permitió dicho análisis. Los estudios de RMN de los núcleos ^1H y ^{13}C de los copolímeros de P (HB-g-AAm) se llevaron a cabo utilizando un espectrómetro Mercury 400 BB a la frecuencia de 400 MHz. Se utilizó la técnica de correlación de enlace múltiple heteronuclear (HMBC) para detectar enlaces de correlación a larga distancia entre carbonos y protones de las muestras.

3.3.3 Análisis por espectroscopia Raman.

Los espectros Raman se realizaron con un detector de tipo CCD Peltier, adecuado a una temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. El detector está acoplado a un microscopio óptico de alta resolución Renishaw inVia (Leika). Los micrográficos utilizan un filtro óptico de paso de banda adicional (rejillas de 1800 g/mm). Las líneas de excitación utilizadas fueron 614 y 633 nm y las mismas no presentaron diferencias significativas. Solo se realizaron estudios Raman en el P (HB-g-VAc).

3.3.4 Análisis por difracción de rayos X.

Para obtener el difractograma de rayos X, se utilizó la técnica de rayo ancho (WAXS), en polvo, en un equipo modelo Enraf Nonius generador de rayos x con filtro de níquel (Ni) y radiación de cobre $k\alpha$ de $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ en un rango de 2θ entre $6-60^\circ$, a una velocidad de $0.1/3s$. Solo se realizaron estudios de difracción en el P (HB-g-VAc).

3.3.5 Análisis termogravimétrico.

Para el análisis del P (HB-g-VAc) se utilizó la técnica termogravimétrica con un equipo Mettler TA 4000, a una velocidad de calentamiento de $20^\circ\text{C}/\text{min}$. El intervalo de temperaturas fue entre 50 y 600°C y la masa de las muestras entre $5-15 \text{ mg}$. Los análisis se realizan en presencia de oxígeno. Posteriormente, en el estudio del efecto del solvente se utilizó en el análisis calorimétrico un equipo Q500 TA Instruments, a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, utilizando el mismo intervalo de temperatura y peso de las muestras. Las propiedades térmicas de los materiales obtenidos en el estudio del efecto del solvente en la polimerización de injerto del VAc en el PHB fueron investigadas por calorimetría diferencial de barrido (DSC), en un equipo TA Instrument 2920, en atmósfera de nitrógeno. En los experimentos de DSC, primeramente la muestra se calentó de -30°C a 180°C (primer calentamiento de barrido), a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, y se mantuvo por algunos minutos a 180°C . Luego de eliminar la historia térmica del material, se repitió el procedimiento, se calentó de -30°C a 180°C , a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ (segundo calentamiento de barrido). Las temperaturas de transición y las entalpías se determinaron de los picos exotérmicos y endotérmicos en la segunda corrida. Los estudios calorímetros de los copolímeros P (HB-

g-MBu), P (HB-g-MA) y P (HB-g-AAm) se realizaron en los mismos equipos anteriormente descritos y siguiendo el mismo procedimiento.

3.4 Estudio de la cristalinidad.

3.4.1 Por DFRX.

El análisis del grado de cristalinidad se realiza por medio del difractograma. Los porcentajes de cristalinidad se calculan para muestras de igual peso. Los picos cristalinos son bien definidos en el difractograma y el grado de cristalinidad X_c se define como la relación entre las áreas para los difractogramas normalizados:

$$X_c = \frac{[(\text{Área total}) - (\text{Área amorfa})]}{(\text{Área total})} \quad (\text{Ecuación 35})$$

Todas las muestras fueron envejecidas como mínimo quince días, tiempo al cual se obtiene la máxima cristalización de estos materiales.

3.4.2 Por FTIR.

Los cambios en el grado de cristalinidad fueron observados por espectroscopia FTIR, analizando el inverso de la intensidad relativa de la banda situada a 1185 cm^{-1} la cual presenta mayor sensibilidad en intensidad entre los estados físicos amorfo y cristalino y la banda a 1382 cm^{-1} la cual es insensible a estos cambios.

$$A_c\langle PHB \rangle = \frac{A_{\gamma CH_3}}{A_{\gamma C-O-C}} = \frac{A_{1382 \text{ cm}^{-1}}}{A_{1185 \text{ cm}^{-1}}} \quad (\text{Ecuación 36})$$

Entonces, se define el índice de cristalinidad como la razón entre las intensidades (absorbancia) de las bandas 1382 cm^{-1} y 1185cm^{-1} en el espectro FTIR de absorbancia normalizada. Este índice de cristalinidad no es una medida absoluta del grado de cristalinidad, pero es un dato útil desde el punto de vista comparativo.

Otro criterio que se siguió para la determinación cualitativa de la cristalinidad de los materiales poliméricos estudiados es el criterio de cristalinidad (CC). El mismo se define como la relación entre el valor de la absorbancia a 1722 cm^{-1} y 1740 cm^{-1} .

$$CC = \frac{A_{1722\text{cm}^{-1}}}{A_{1740\text{ cm}^{-1}}} \quad (\text{Ecuación } 37)$$

3.5 Determinación de pesos moleculares por cromatografía de permeación de geles.

Para la determinación de las masas moleculares promedio por cromatografía de permeación de geles (GPC) se utilizó una bomba de la firma KNAUER HPLC PUMP 64 acoplado a un detector de índice de difracción diferencial de la KNAUER. Se utilizaron columnas PL-Gel de 10 conectadas en serie (102 Å , 103 Å , 104 Å , 105 Å , y 106 Å). Como fase móvil se utilizó el THF, a un flujo de 1 mL/min , 20 L de volumen de inyección y se registró una presión de 10 MPa . Se utilizaron para la curva de calibración, estándares de poliestireno de baja polidispersidad. Para la preparación de la muestra se disolvió el PHB en una solución cloroformo/ THF.

3.6 Estudio de hinchamiento de los copolímeros por injerto.

El estudio de hinchamiento se realiza sumergiendo una membrana del material polimérico (PHB, copolímero por injerto) en el solvente en estudio por períodos o intervalos de

tiempo definidos, en que se saca la membrana del solvente, se seca y se pesa. Se continúa el procedimiento hasta que la membrana mantenga un peso constante. Posteriormente se calcula el grado de hinchamiento.

$$S(\%) = \frac{(m - m_0)}{m} * 100 \quad (\text{Ecuación 38})$$

Donde S es el grado de hinchamiento, m_0 es la masa del polímero inicial y m es la masa del polímero hinchado.

Se estudió el hinchamiento de PHB en el monómero con el propósito de conocer la magnitud de la difusión del mismo en el interior del sustrato. Adicionalmente se estudió el hinchamiento del copolímero obtenido en agua bidestilada para evaluar el carácter hidrofílico de los diferentes materiales. Todos los experimentos de hinchamiento se realizaron a la misma temperatura (27°C) y condiciones de laboratorio. Los estudios se realizaron con membranas de igual peso y con reproducibilidad.

3.7 Síntesis de los copolímeros por injerto.

Los experimentos de irradiación se llevaron a cabo en un sistema al vacío, a temperatura ambiente. Se utilizaron a) películas densas de PHB /acetato de vinilo en solución de etanol (PHB (1g))/ VAc (300 g) y b) PHB en polvo / acetato de vinilo (PHB (1g))/ VAc (6 g). Las muestras se expusieron a una fuente de rayos gamma (^{60}Co), con una tasa de dosis de 1,57 kGy/h. El copolímero obtenido se purificó utilizando un Soxhlet y suficiente etanol y acetona durante 24 horas. Con este procedimiento se eliminan el monómero acetato de vinilo que no reaccionó y el homopolímero poli (acetato de vinilo) que se obtuvo como producto colateral de la reacción. El copolímero P (HB-g-VAc) obtenido se secó al vacío a 40 °C hasta alcanzar un peso constante.

Para determinar el grado de injerto W (%) en la reacción de copolimerización se utilizó la siguiente ecuación:

$$W (\%) = \frac{(m_g - m_i)}{m_i} * 100 \quad (\text{Ecuación 39})$$

Donde m_i (g) es el peso original del polímero base (PHB) y m_g (g) es el peso del copolímero por injerto producto de la reacción de injerto. Esta variable (W (%)) es una alternativa para determinar el grado de injerto a través del incremento de masa.

En este estudio se introducen dos nuevos parámetros para determinar el grado de injerto.

Uno de ellos es la composición (C (%)) y el otro es el índice de injerto (γ_g (%)).

La composición se determina por medio de la siguiente ecuación:

$$(C(\%)) = \left(\frac{m_c}{m_t}\right) * 100 \quad (\text{Ecuación 40})$$

Donde m_c (g) es la masa del material analizado (por ejemplo la masa de PVAc injertado en el PHB) y m_t (g) es la masa total de la muestra (por ejemplo m (PHB) + masa de PVAc injertado en el PH). Desde el punto de vista del grado de injerto la única diferencia entre W (%) y (C (%)) es la forma en que ellos son utilizados para calcular el grado de injerto ya que estos parámetros representan una medida de distribución de masa en el material polimérico en estudio.

Por otra parte el índice de injerto (γ_g (%)) se determina por la siguiente ecuación:

$$(\gamma_g(\%)) = \left(\frac{n_{ci}}{n_{ct}}\right) * 100 \quad (\text{Ecuación 41})$$

Donde n_{ci} es el número de carbonos injertados en el PHB (carbonos cuaternarios sustituidos) y n_{ct} es el número total de carbonos terciarios presentes en el polímero. En

base a los estudios realizados por Trudy *et al.*, los carbonos terciarios del PHB son los más favorecidos en la formación de radicales cuando el polímero es expuesto a las radiaciones gamma (43). Por consiguiente la ecuación 41 solo depende de la estructura del copolímero y se expresa en porcentaje de carbonos injertados.

Por su parte, en el estudio del efecto del solvente, en la copolimerización por injerto radioinducido del VAc en el PHB, los experimentos se llevaron a cabo en ampullas selladas al vacío a temperatura ambiente. Se utilizaron 200 mg del PHB, los cuales se adicionaron a 0.5 mL de acetato de vinilo y 1 mL de solvente. La relación polímero monómero fue $m(\text{PHB})/m(\text{VAc}) = 2.32$. La mezcla mencionada fue sometida a una fuente de rayos gamma ^{60}Co a una tasa de dosis de 1.62 kGy/h y una dosis de 10 kGy. Para el estudio del efecto del solvente se utilizaron: acetato de etilo, n-butanol, éter dietílico, hexano y acetona. Para la comparación se llevó a cabo la reacción en masa. El copolímero obtenido se purificó utilizando un Soxhlet y suficiente etanol y acetona durante 24 horas. El copolímero P (HB-g-VAc) obtenido se secó al vacío a 40 °C hasta alcanzar un peso constante.

La copolimerización por injerto radioinducido del ácido metacrílico y el metacrilato de butilo se llevaron a cabo en las mismas condiciones de reacción que el estudio del efecto del disolvente de la reacción de injerto del VAc en el PHB por la misma técnica. Para el estudio del efecto del solvente se utilizaron: etanol, cloroformo y acetona. Para la comparación se llevó a cabo la reacción en masa. El copolímero obtenido se purificó utilizando un Soxhlet y suficiente acetona durante 24 horas. Los copolímeros P (HB-g-MBu) y P (HB-g-AM) obtenidos en cada caso se secaron al vacío a 40 °C hasta alcanzar un peso constante.

Los experimentos de irradiación para la obtención del P (HB-g-AAm) se llevaron a cabo de la siguiente manera: se adicionaron 400 mg de PHB a 1 g de monómero acrilamida, luego se adicionaron 3 mL del solvente a la mezcla anterior. La relación polímero/monómero se mantuvo en 2.32 al igual que los experimentos anteriores. La combinación anteriormente descrita se expuso a una fuente de rayos gamma de ^{60}Co a una tasa de dosis de 0.83 kGy/h y una dosis de 10 kGy. Para el estudio del solvente se utilizaron: etanol, metanol, acetona, acetato de etilo, cloroformo y agua. No se realizó la polimerización en masa porque ambos polímero y monómero son sólidos. En el experimento con el agua se utilizó 1 mL del solvente y 200 mg de acrilamida, a una tasa de dosis de 1.62 kGy/h y una dosis de 10 kGy. Se obtuvo una red polimérica semi-interpenetrada de acrilamida y PHB (P (HB-ipn-AAm)). El procedimiento de secado de los copolímeros se realizó de manera similar a las reacciones anteriores.

3.7.1 Síntesis del P (HB-g-VOH).

El P (HB-g-VOH) se obtuvo a partir de la reacción de saponificación del P (HB-g-VAc) llevada a cabo en solución de metanol (0.05 M de NaOH) a 25 °C por un tiempo de aproximadamente 8 horas. El material obtenido fue analizado por FTIR y DSC en las mismas condiciones experimentales que el P (HB-g-VAc).

3.8 Estudio de la morfología del P (HB-g-AAm).

Se realizó el análisis de la superficie del copolímero por injerto P (HB-g-AAm) y de la red polimérica semi-interpenetrada obtenida en los experimentos donde se utilizó el agua como solvente por medio de un microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) JEOL JSM 5400. Se ocuparon electrones secundarios a 20 keV. Las muestras fueron cubiertas con oro para su análisis y la distancia focal fue de 18 mm. De forma

complementaria se utilizó una cámara digital Fujifilm Finepix AV de 12 megapíxeles para el estudio de la red polimérica P (HB-ipn-AAm). El estudio de la morfología no se extendió al resto de los copolímeros.

3.9 Preparación de las nanoesferas de P (HB-g-VA).

Para la preparación de las nanoesferas de P (HB-g-VA) se utilizó el método de emulsión de agua en aceite, por el procedimiento de extracción del solvente. El poli (3-hidroxibutirato) (5 g) se disolvió en cloroformo (100 mL) a 50 ° C. La solución orgánica se emulsificó en fase acuosa (500 mL) conteniendo una concentración de 4 % (w/v) de PVA como estabilizador. La emulsión resultante fue agitada a 10000 rpm y 50 °C hasta la extracción total del cloroformo. Las partículas obtenidas se lavaron con suficiente agua destilada y se secaron al vacío por 6 horas.

3.10 Análisis por Microscopía de Fuerza Atómica.

Para el análisis de Microscopía de Fuerza Atómica se utilizó un equipo marca Jeol, Modelo JSPM 5200. Se ocupó el modo de obseración *topography tapping mode*, que permite visualizar la muestra en tres dimensiones.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Consideraciones generales.

La química de radiaciones del poli (3-hidroxibutirato) ha sido estudiada por Trudy *et al.* (43). Este grupo de investigación es pionero en el estudio de los radicales que se forman cuando se expone el PHB a las radiaciones gamma y realizó el estudio de la estabilidad de los mismos por la técnica de resonancia de spin electrónico (ESR, por sus siglas en inglés). La Figura 4 indica todos los posibles radicales que se forman por radiólisis del PHB. De acuerdo con las investigaciones de Trudy *et al.*, y los resultados que hemos obtenido en este trabajo los radicales más estables son el II y VI (ver Figura 1), que representan los radicales de los carbonos metínicos y metilénicos del poli (3-hidroxibutirato) respectivamente. De esta forma, por evidencias experimentales se conoce que el radical del carbono terciario (metínico) del PHB está favorecido con relación al resto de los radicales. Es importante destacar que favorecido no implica que el resto de los radicales no se forman, de manera que al realizarse una copolimerización por injerto radio-inducido de algún monómero en el PHB ocurre una compleja reacción química donde se forman un sinnúmero de subproductos derivados de la polidispersidad del PHB y de la formación de los radicales productos de la radiólisis. Otras reacciones que ocurren son el entrecruzamiento de cadenas, la formación de pequeños productos moleculares que traen la obtención de otros subproductos no deseados, el rompimiento de cadenas por degradación radiolítica, etc. Por lo tanto es de esperar que se formen copolímeros por injerto de diferentes pesos moleculares y subproductos difíciles de caracterizar. Una parte importante de estos subproductos son eliminados en la purificación mientras que una

minoría aún son químicamente imposibles de separar con las técnicas químicas actuales, pero por las técnicas de caracterización que hemos utilizado conocemos que su porcentaje es bajo. Aunque sería muy difícil comprender la complejidad de la reacción de copolimerización por injerto radioinducido en su totalidad, posteriormente en nuestro trabajo realizamos un acercamiento al estudio del mecanismo de reacción del injerto radioinducido basado en las experiencias experimentales obtenidas por otros autores y las experiencias teóricas y experimentales de nuestro grupo de trabajo.

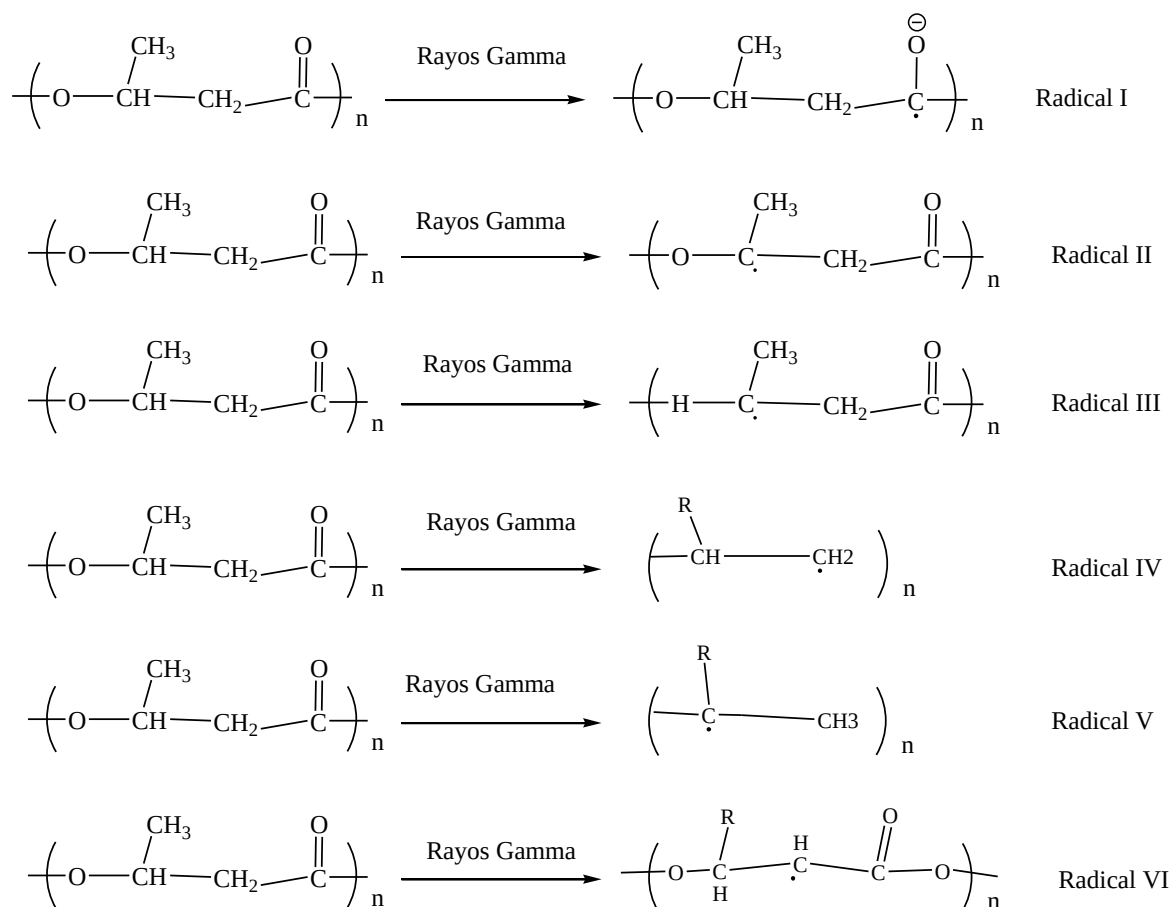


Figura 4 Posibles radicales formados en la radiólisis del poli (3-hidroxibutirato).

Por otra parte es importante señalar que el concepto de grado de injerto encontrado en la literatura (ver ecuación 39) se limita a calcular el grado de injerto por el incremento en masa del polímero antes y después de la reacción de injerto. En nuestro trabajo profundizamos en el estudio del grado de injerto por incremento en masa y también se determinó el grado de injerto a través del cálculo de la razón del número de sitios injertados en la molécula y el del número de sitios posibles a injertar (ver ecuaciones 40 y 41). Estos cálculos se hicieron en consideración de que en el PHB los carbonos que son injertados son fundamentalmente los carbonos terciarios para formar carbonos cuaternarios sustituidos. En virtud de esto, el índice de injerto (ver ecuación 41) puede ser aplicado a cualquier polímero siempre y cuando se tenga una dilucidación de su estructura química y el mecanismo de reacción de injerto. Un ejemplo claro de que el grado de injerto (ecuación 39) limita el cálculo de la proporción en que un monómero es injertado en un polímero, lo constituye el injerto del VAc en el PHB. Es decir, una vez que el VAc es injertado en el PHB podemos calcular el grado de injerto y el índice de injerto del mismo. Pero luego, el copolímero poli (hidroxibutirato-g-acetato de vinilo) puede ser hidrolizado y obtenerse el poli (hidroxibutirato-g-alcohol vinílico). Este último copolímero tiene el mismo índice de injerto que el copolímero no hidrolizado, pero su grado de injerto se modificó porque ya no existe el mismo incremento en masa con respecto al PHB dado que el grupo acetato se ha transformado en grupo alcohol, disminuyendo el peso molecular del producto. De acuerdo con esto el grado de injerto también debe de ser estudiado a través de su estructura química. Dicho sea de paso en nuestro trabajo nos referiremos a un copolímero utilizando la letra g de "graft" (injerto por su nombre en inglés) entre el polímero y el monómero injertado (i.e P (HB-g-VAc)).

4.2 Polimerización por injerto radioinducido del acetato de vinilo en el poli (3-hidroxi butirato).

El estudio del injerto radioinducido del acetato de vinilo en el poli (3-hidroxi butirato) se realizó fundamentalmente en cuatro tipos de experimentos (A, B, C, D), los que se destacan a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1 Condiciones generales de los experimentos realizados en la síntesis del copolímero P (HB-g-VAc).

	A	B	C	D
Dosis (kGy)	23	10	10	10
m(PHB/PVAc)	1/300	1/6	1/6	1/6
Presión(Torr)	10^{-3}	10^{-3}	10^{-6}	10^{-6}
$\bar{M}_w$	60000	60000	60000	27000
Estado de las muestras reaccionantes.	Filme de PHB/VAc, solución de etanol (30% de VAc)	PHB en polvo /VAc	PHB en polvo /VAc	PHB degradado en polvo /VAc
Dispositivo.	Reactor	Reactor	Ámpula	Ámpula

En estos experimentos se utilizó la tasa de dosis de 26.17 kGy/min (1.57 kGy/h) y el valor del grado de injerto (i.e W (%)) se expresa en función del porcentaje de poli (vinil acetato) injertado en todos los casos. Para estos experimentos se utilizaron en algunos casos un reactor de vidrio (Figura 5), que se diseñó previamente o ámpulas de vidrio (Figura 6), manteniendo en todos los casos condiciones de alto vacío. El uso de un reactor te permite controlar el enfriamiento de la muestra en el proceso de desgasificación mediante el uso de la llave izquierda. Este proceso de desgasificación es importante para poder garantizar que no existan gases en la muestra. Por otra parte el uso de ámpulas implica una mayor dificultad del manejo del experimento y el uso de una línea de alto vacío o un reactor más sofisticado que permita su uso.



Figura 5 Reactor utilizado para los experimentos de tipo A, B.

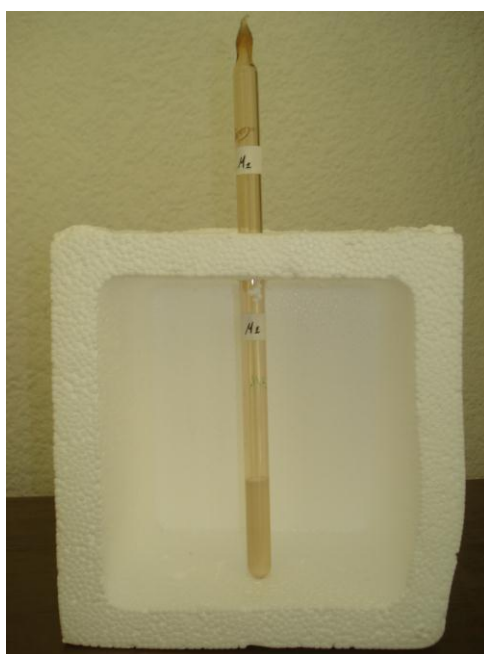


Figura 6 Ámpula de vidrio del tipo utilizada en los experimentos C, D.

4.2.1 Resultados de los experimentos A, B de la síntesis del P (HB-g-VAc).

4.2.2 Estudio de hinchamiento del PHB en VAc.

En esta primera fase se estudió el hinchamiento en membranas de PHB, de dimensiones 1 cm² de superficie y 4 µm de espesor, inmerso en VAc puro, con el fin de conocer sobre la absorción de este monómero en el polímero a injertar. Se observó que a los 15 minutos se obtuvo el hinchamiento máximo correspondiendo al 10 % de hinchamiento del PHB en VAc a temperatura ambiente, o sea, el PHB es limitadamente penetrado por el VAc, por lo que el injerto en los experimentos A ocurriría fundamentalmente en la superficie. De por sí, de acuerdo a la experiencia experimental si se utilizan membranas solo es posible lograr el injerto en el exterior y hasta cierto límite en el interior de la membrana. Esto se debe a la cristalinidad del material.

La membrana se coloca posterior a su máximo hinchamiento, en una solución de etanol, al 30 % de acetato de vinilo, con el propósito de favorecer la difusión del monómero hacia el interior del polímero en la reacción de polimerización.

4.2.3 Análisis calorimétrico de los experimentos de tipo A y B.

En la Tabla 2 se muestran los resultados experimentales de los experimentos de tipo A y B. En ambos tipos de experimentos se obtuvo un copolímero por injerto inducido por radiaciones P (HB-g-VAc), pero en el experimento de tipo B se obtuvo un copolímero de mayor composición y grado de injerto ($C(\%)$, $W(\%)$) que en el experimento tipo A.

Tabla 2 Resultados de los cálculos de composición y grado de injerto en los experimentos de tipo A y B obtenidos por gravimetría y termogravimetría.

Exp	W_G	C_G	W_{ATG}	C_{ATG}
A	---	---	10%	9%
B	43,5 %	30,3%	42%	29,5%

Los resultados anteriores pueden ser explicados por un efecto de masa $m(\text{VAc})/m(\text{PHB})=300$. El efecto de masa indica que está favorecida la homopolimerización del VAc. La membrana o filme polimérico se desgarra y se tienen pérdidas de masa debido a un aumento de fragilidad dada por el hinchamiento en VAc y la posterior exposición a altas dosis de radiación, la cual puede producir degradación por escisión de cadenas del PHB. Por esta razón no se pudo calcular el grado de injerto y la composición por análisis gravimétrico (W_G y C_G en la Tabla 2). Además se observó que la membrana se cubrió con una capa viscosa de PVAc, y luego de ser lavada en el soxhlet, se observa un cambio en la solubilidad del producto. Estas observaciones son consistentes con la formación de copolímero por injerto en la superficie en forma de tamizaje, lo que podría tener uso en la inmovilización de proteínas o como membrana selectiva. Sin embargo la difícil manipulación de las membranas y la posterior insolubilidad hace que se decida trabajar el PHB en forma de polvo.

Una membrana representativa de los experimentos de tipo A, fue analizada por análisis termogravimétrico (ATG). En la Figura 7 se muestra el termograma obtenido en un equipo Mettler 4000, al aire, a una velocidad de calentamiento de 20 °C/min. El termograma muestra el comportamiento de un copolímero por injerto, mostrando primeramente la descomposición del PHB a 290 °C y después a 310 °C, el pequeño escalón de la descomposición del PVAc injertado. La evaluación del termograma es de un copolímero por injerto de composición: 9 % de PVAc y 91 % de PHB (C_{ATG}) (Tabla 2). En el mismo se tiene una masa residual de 0.03 mg que representa el 1,5 % de la masa inicial.

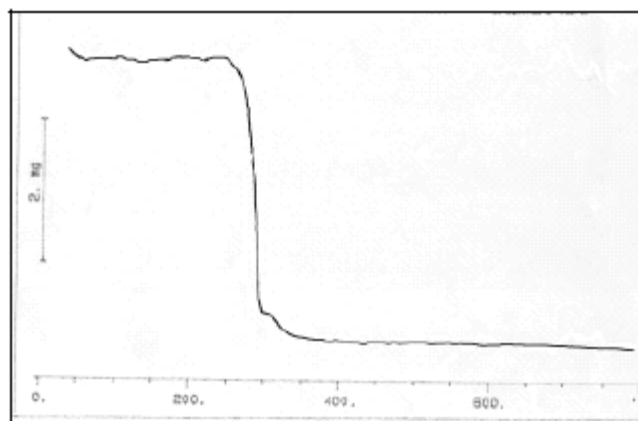


Figura 7 ATG realizado al producto de la reacción en experimentos de tipo A.

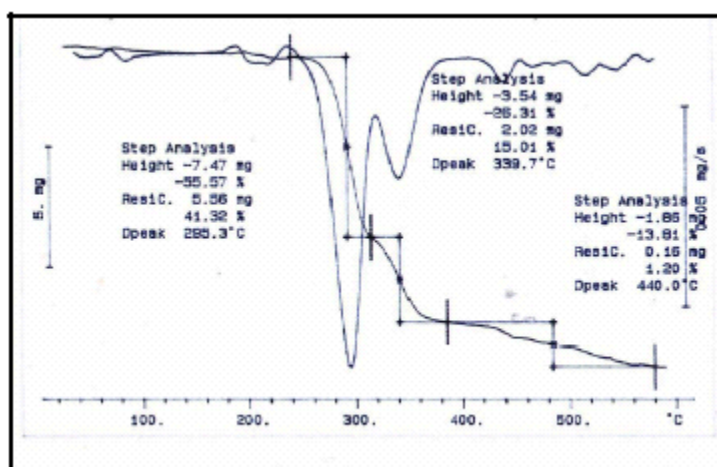


Figura 8 ATG realizado al producto de la reacción en experimentos de tipo B.

Comparativamente, en la Figura 8 se muestra el termograma obtenido al realizarse el ATG&DTG al producto obtenido en los experimentos B. El termograma también muestra el comportamiento de un copolímero por injerto. Se observa con claridad la presencia de tres saltos (pasos) en la curva de pérdida de peso. Esto se debe a que los procesos de

descomposición del PHB y el PVAc no son los mismos y por ende el PVAc se descompone en dos pasos en su curva característica de pérdida de peso. En este termograma se ve con mayor claridad la formación del copolímero por injerto.

El análisis del diferencial gravimétrico (DTG, por sus siglas en inglés) define la temperatura de la velocidad máxima de descomposición de estos tres pasos. El primer salto ocurre a 295 °C como temperatura característica del PHB. La segunda y tercera etapa del termograma corresponde a la descomposición térmica del poli (acetato de vinilo), que ocurre por la vía del sustituyente. El mecanismo de descomposición de estas últimas dos etapas podría estar dado, por la inicial descomposición del ácido acético de la escisión y la posterior descomposición térmica del polímero diénico. Es decir, la descomposición térmica poli (acetato de vinilo) procede por un mecanismo molecular con producción del ácido y la olefina correspondiente. En este caso, el mecanismo descrito se repite a lo largo de la cadena polimérica del PVAc, favorecido por el doble enlace formado en la unidad estructural anterior. En la Figura 8 las temperaturas que corresponden a las velocidades máximas de descomposición de estas últimas dos etapas de descomposición del PVAc son 339 °C y 440 °C respectivamente. La evaluación del termograma corresponde a un copolímero por injerto de composición $C_{ATG} = 29.5 \%$ de PVAc y un grado de injerto $W_{ATG} = 42\%$ (ver Tabla 2).

En los experimentos de tipo B, se obtuvieron buenos resultados con una excelente correspondencia entre las técnicas utilizadas, que resultó de manera concluyente en la obtención de copolímeros por injerto de una composición de 29.9 % de PVAc y un grado de injerto de 42.7 % de PVAc aproximadamente. Estos experimentos fueron más avanzados con relación a los experimentos de tipo A (87).



Como se había mencionado anteriormente, por medio de la determinación de los carbonos injertados en el PHB, obtenidos en la reacción de polimerización por injerto radioinducido, es posible calcular el número de sitios que han sido injertados en las moléculas de PHB y qué porcentaje representan del número total de sitios posibles a injertar. En este trabajo se utiliza la técnica de RMN- ^{13}C para determinar el índice de injerto de moléculas de PVAc en PHB.

En los espectros RMN (Figura 9) se encontraron carbonos de $\sim\text{CH}\sim$ del PVAc, unidos a los carbonos terciarios del PHB (carbono 10). La señal de los carbonos 10, aparece sumergida en la señal del cloroformo, en los 77,23 ppm, por eso se realizó la técnica de mejoramiento de la línea no distorsionada por transferencia de polarización (DEPT por sus siglas en inglés (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)). Esta técnica es muy útil para determinar la presencia de carbonos primarios, secundarios o terciarios, lo que se realizó para verificar que la señal a 77,23 ppm fuera primaria, secundaria o terciaria, concluyéndose que pertenecía a un carbono metínico (carbono terciario), en este caso el carbono 10, correspondiente al $-\text{CH}-$ del acetato de vinilo. Con los datos obtenidos en la cuantificación por extensión de NOE (se describe como la variación de la intensidad que experimenta la señal de un núcleo X al irradiar un núcleo A con el que X se encuentra en acoplamiento dipolar) se trabaja en el cálculo de la ecuación de índice de injerto (ver Tabla 3).

Tabla 3 Asignación para la determinación del índice de injerto.

Asignación	Señal	Integración
$\sim\text{C}_{10}\text{H}\sim$ (PVAc)	77,23 ppm	0,03
$\sim\text{C}_6\text{H}\sim$ (PHB)	67,58 ppm	0,09

Ecuación para el cálculo del índice de injerto de acetato de vinilo en el PHB:

$$\left(\gamma_g(\%)\right) = \left(\frac{n_{ci}}{n_{ct}}\right) * 100 = \frac{0.03}{(0.03 + 0.09)} = 0.25 * 100 = 25 \%$$

Es importante señalar que este cálculo se está realizando asumiendo varios puntos. El primer punto es que es posible utilizar la ecuación índice de injerto, porque los carbonos 9 (carbonos cuaternarios), los cuales no pudieron ser determinados por resonancia magnética nuclear, se encuentran en una proporción equivalente a los carbonos 10 (Figura 9). Luego, en segundo lugar, esta asunción proviene del hecho de que al formarse el radical del PHB por el sitio que consideramos más estable (radical del carbono terciario del PHB) el doble enlace del acetato de vinilo se adiciona por el CH, dado que esa reacción tiene menor energía de activación que la adición por el CH₂ del acetato de vinilo, ya que los grupos funcionales crean impedimento estérico. Un tercer punto a analizar es que las evidencias experimentales confirman estas asunciones. Entonces se desprende que si las señales obtenidas de los carbonos CH del acetato de vinilo injertado tienen una igual proporción a los carbonos cuaternarios del copolímero, la razón entre los carbonos CH del acetato de vinilo injertado y los carbonos terciarios del PHB, me ofrecen en cierta extensión una magnitud de cuanto injerto hubo en el copolímero. Sin embargo si se razona el hecho de que no es posible separar el PHB del PHB injertado de la muestra, entonces de manera concluyente los valores calculados son una aproximación al valor real. Como el carbono cuaternario no pudo ser observado por esta técnica se estima que el porcentaje de carbonos cuaternarios podría ser menor del 5% en la muestra que se estudia, lo que sus cantidades son insuficientes para ser cuantificado (87).

Además de los planteamientos descritos en las consideraciones generales, otro criterio que apoya a la existencia de la ecuación de “índice de injerto”, es que si las cadenas del polímero injertado son muy largas, el valor del grado de injerto puede tomar valores superiores al 100 %, lo que pierde sentido físico. Sin embargo el cálculo del índice de injerto no permite que la magnitud del injerto sea mayor que la unidad (100 %), lo que corresponde al injerto del total de todos los sitios posibles a injertar.

4.3 Caracterización química física del copolímero por injerto P (HB-g-VAc).

4.3.1 Caracterización estructural del producto obtenido en experimentos de tipo B.

Es bien conocido que existe una íntima relación entre las propiedades de los polímeros, sus estructuras químicas y sus composiciones, por lo tanto cualquier investigación relacionada con ellos debe abordar como aspecto esencial el problema de la caracterización estructural de los compuestos.

Muchas de las técnicas utilizadas para el análisis y caracterización química física de los copolímeros obtenidos por copolimerización por injerto radioinducido han sido mencionadas en conjunto con los copolímeros citados anteriormente.

No obstante, es necesario destacar las técnicas utilizadas en este trabajo. Entre las técnicas más aplicadas se encuentra el análisis térmico.

En la literatura se encuentran numerosos trabajos sobre el ATG y DSC del PHB y sus copolímeros), así como sus mecanismos de degradación térmica, hidrolítica y radiolítica y las cinéticas de estos procesos (88) (89) (90) (91) (92) (93) (94). En este trabajo se realiza el ATG&DTG para determinación cualitativa y cuantitativa de los copolímeros por injerto.

Dentro de este contexto, como ya se había mencionado el injerto por copolimerización radioinducida en el PHB ocurre fundamentalmente por el carbono terciario del PHB. Esto fue demostrado experimentalmente por Trudy *et al.* (43) , por Resonancia Magnética de Spin Electrónico y había sido estudiado en compuestos modelos algunos años antes por Sevilla y *et al.* (95). Por lo tanto en este trabajo no fue necesario demostrar la posición del sitio de injerto, pues los resultados espectroscópicos confirman los experimentos realizados por estos investigadores.

La otra técnica utilizada para la caracterización del copolímero por injerto radioinducido es la espectroscopia RMN (RMN- ^1H y RMN- ^{13}C). La espectroscopia RMN ha demostrado no solo ser el método más potente para las investigaciones micro-estructurales de polímeros, sino que en ocasiones es el único método confiable en la dilucidación de copolímeros. Se pueden encontrar diversidad de investigaciones donde se utiliza esta técnica para la caracterización del PHB (96) (97). Sin embargo, es importante destacar que pocos autores han incursionado en la caracterización microestructural de los copolímeros por injerto producidos por copolimerización de injerto radioinducido de monómeros hidrofílicos en el PHB. De las pocas referencias que existen se había mencionado anteriormente a Tao Jiang et al (77) que propuso un espectro de resonancia, en este caso RMN- ^1H para el P (HB-g-IP) y Herong *et al.*, que realizaron el estudio de RMN- ^{13}C del anhídrido maleico injertado en el PHB por polimerización de injerto radioinducido (78). El análisis realizado indica que el resto de los autores que han trabajado esta área de investigación no realizan un análisis microestructural, por ejemplo el grado de injerto, en todos los casos vistos es determinado por termogravimetría como la razón entre el aumento en peso y el peso del polímero a injertar. En este trabajo se

analizan por RMN- ^{13}C y ^1H la estructura de los materiales obtenidos cuando la solubilidad de los productos lo permite, ya que en algunos casos los materiales poliméricos obtenidos son insolubles en la mayoría de los solventes orgánicos deuterados que existen haciendo muy difícil la determinación de los mismos por esa técnica.

También se han utilizado para caracterizar los materiales poliméricos las técnicas FTIR, Raman, y DFRX. Por medio de las mismas se comprueba la presencia de un copolímero por injerto y se realiza el análisis de la cristalinidad antes y después de la reacción de injerto. Los estudios de cristalinidad en polihidroxialcanoatos, se realizaron por vez primera por Steven *et al.*, utilizando la espectroscopía FTIR (98). En las investigaciones de estos autores se calcula el índice de cristalinidad según la razón entre las bandas que son más sensibles y las que son menos sensibles a los cambios físicos. Mediante estos análisis se puede predecir la respuesta del material a una reacción puesto que la zona amorfa es generalmente la que mayor grado de transformaciones químicas experimenta. Galego *et al.*, estudiaron la cristalinidad del PHB y sus copolímeros por difracción de rayos X (99). Al parecer, las investigaciones realizadas por DFRX fueron basados en los estudios de Škrbic *et al.*, los cuales realizaron un riguroso trabajo en la caracterización del PHB por esta técnica (100).

En este trabajo se presentan los espectros FTIR, Raman y los patrones de DFRX del PHB y sus copolímeros por injerto radioinducido de VAc en PHB. Que sepamos no existen en la literatura estudios previos por espectroscopía Raman en estos polímeros. En este marco, el estudio realizado por Simopu *et al.*, sobre la caracterización del PVAc por espectroscopía Raman, fue de gran utilidad en la dilucidación de los espectros obtenidos (101).

4.3.2 Análisis del copolímero P (HB-g-VAc) por RMN.

En la Figura 9 se muestra el espectro RMN- ^{13}C del P (HB-g-VAc) de los experimentos de tipo B, y en la Tabla 4 se representa la asignación de sus principales señales. El análisis del espectro muestra los corrimientos químicos (δ) en ppm de los diferentes átomos de carbono del copolímero, que se identifican en la Figura 9 como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 7 y 8 respectivamente.

Tabla 4 Asignación de las principales señales de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear RMN- ^{13}C , RMN- ^1H del P (HB-g-VAc) en experimentos de tipo B.

No	Asignación		Señal en RMN- ^{13}C δ (ppm)
	Carbono	Representación	
1	(C1)	$-\text{[OCO-CH}_2\text{-CH(C * H}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{CH(OCO-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	19,7
2	(C2)	$-\text{[OCO-CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{CH(OCO-C * H}_3\text{)]}_m\text{-}$	20,9
3	(C3)	$-\text{[OCO-CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[C * H}_2\text{CH(OCO-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	39,1
4	(C4)	$-\text{[OCO-C * H}_2\text{-CH(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{CH(OCO-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	40,7
5	(C5)	$-\text{[OCO-CH}_2\text{-C * H(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{CH(OCO-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	66,3
6	(C6)	$-\text{[OCO-CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{C * H(OCO-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	67,6
7	(C7)	$-\text{[OC * O-CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{CH(OCO-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	169,1
8	(C8)	$-\text{[OCO-CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{CH(OC * O-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	170,4
9	(C9)	$\begin{array}{c} -\text{[OCO-CH}_2\text{-C * (CH}_3\text{)]}_n \\ \\ \text{CH(OCO-CH}_3\text{)} \\ \\ \text{CH}_2\text{]}_m \end{array}$	SNI
10	(C10)	$\begin{array}{c} -\text{[OCO-CH}_2\text{-C(CH}_3\text{)]}_n \\ \\ \text{C * H(OCO-CH}_3\text{)} \\ \\ \text{CH}_2\text{]}_m \end{array}$	77,2
11	cloroformo	$\text{Cl}_3\text{C * H}$	76,5-77,5
	Hidrógeno	Representación	Señal en RMN- ^1H δ (ppm)
1	A	$-\text{[OCO-CH}_2\text{-CH(CH}^*\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{CH(OCO-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	1,24-1,26
2	B	$-\text{[OCO-CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}^*\text{CH}_2\text{CH(OCO-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	1,75
3	C	$-\text{[OCO-CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{CH(OCO-CH}^*\text{)]}_m\text{-}$	2,00
4	D	$-\text{[OCO-CH}^*\text{CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{CH(OCO-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	2,49-2,54
5	E	$-\text{[OCO-CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{CH}^*\text{(OCO-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	4,85
6	F	$-\text{[OCO-CH}_2\text{-C H}^*\text{(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{CH(OCO-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	5,22-5,25
7	cloroformo	Cl_3CH^*	7,26

SNI Señal no identificada; n, mCN (grado de polimerización), (átomo de carbono determinado por RMN- ^{13}C), H*(átomo de hidrógeno determinado por RMN- ^1H).

Con los datos obtenidos se realizaron cálculos adicionales. A través de las ecuaciones 39 y 40 es posible calcular el grado de injerto y la composición del copolímero por injerto (C_{RMN} y W_{RMN}), por la técnica de RMN- ^{13}C . Esto se debe a que las unidades monoméricas de acetato de vinilo e hidroxibutirato (HB) tienen el mismo peso molecular (86 g/mol), siendo equivalente la composición a la fracción molar calculada cuantitativamente por extensión de NOE en los espectros RMN- ^{13}C de la señal de los grupos carbonilo del PVAc y el PHB respectivamente. Entonces, se calculan las intensidades de las señales de los grupos carbonilos del PHB y el PVAc y se determinan estas variables.

$$W_{RMN} = \frac{n(PVAc)}{n(PHB)} = \frac{m(PVAc)}{m(PHB)} = \frac{I_{C=O}(PVAc)}{I_{C=O}(PHB)} = 0.34 \quad (\text{Ecuación 42})$$

$$\begin{aligned} C_{RMN} &= \frac{n(PVAc)}{n(PHB) + n(PVAc)} = \frac{m(PVAc)}{m(PHB) + m(PVAc)} = \frac{I_{C=O}(PVAc)}{I_{C=O}(PHB) + I_{C=O}(PVAc)} \\ &= 1,1/(3,2 + 1,1) = 0.26 \quad (\text{Ecuación 43}) \end{aligned}$$

Como se puede observar el resultado de estos análisis es $C_{RMN} = 26\%$ y $W_{RMN} = 34\%$. Este resultado se manifiesta con una buena correspondencia con las técnicas de gravimetría y termogravimetría utilizadas (87).

4.4 Análisis del copolímero P (HB-g-VAc) por FTIR.

La técnica de espectroscopía infrarrojo fue utilizada para verificar el injerto del PVAc en el sustrato PHB. Las Figuras 10 y 11 muestran los espectros FTIR registrados en modo de absorbancia y transmitancia respectivamente.

En este último la región comprendida entre los $1000\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ se encuentra saturada. En los espectros no se observan nuevas bandas que correspondan al copolímero por injerto, esto se debe a que el PHB y el PVAc presentan los mismos grupos funcionales, por tanto solo pueden ser observadas bandas correspondientes a contribuciones de los diferentes estados físicos de estos polímeros.

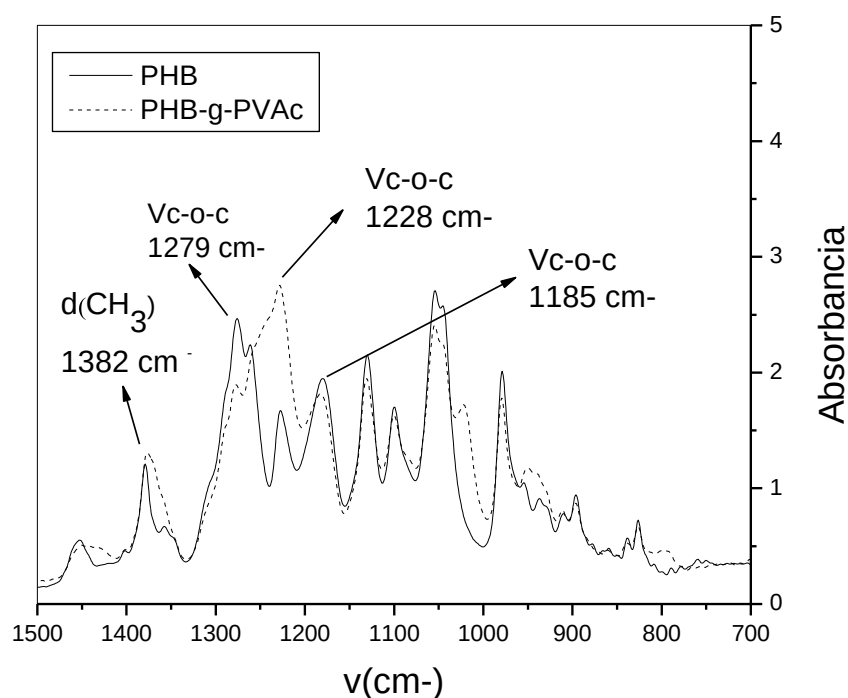


Figura 10 Espectro FTIR del PHB y el PHB-g-PVAc obtenido en experimentos B (región de $700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$).

En la Figura 11 se muestran las bandas de valencia en los $2870\text{-}3010\text{ cm}^{-1}$, que corresponden a las vibraciones de valencia CH de la cadena alifática.

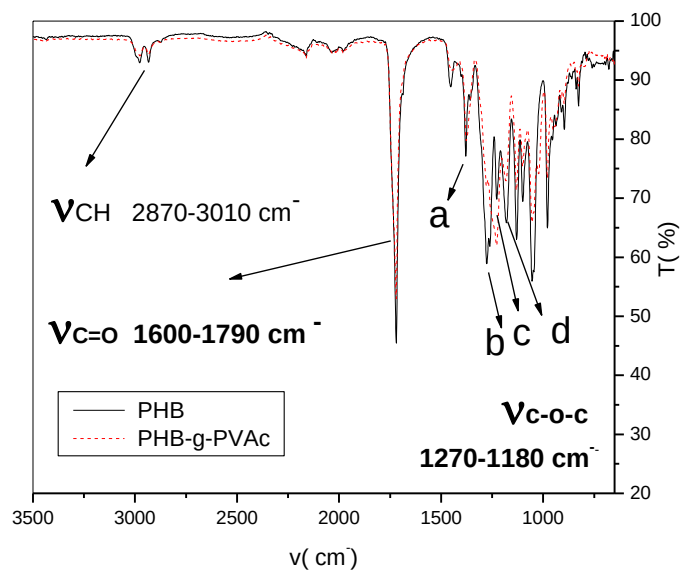


Figura 11 Espectro FTIR registrado en modo de transmitancia del PHB y el P (HB-g-VAc) obtenido en experimentos B (región de 700-3500 cm^{-1}).

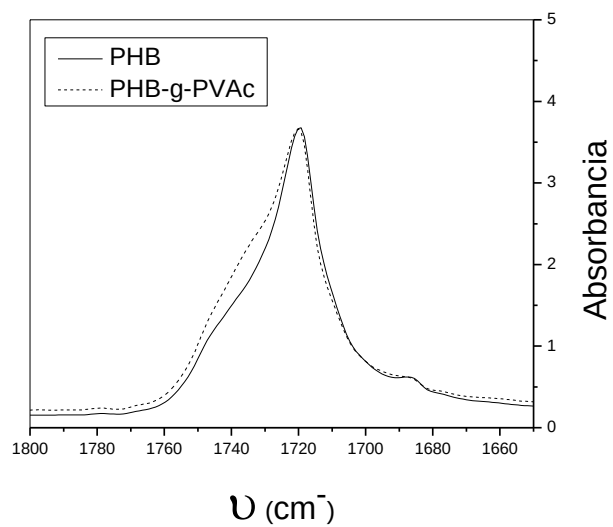


Figura 12 Espectro FTIR del PHB y el PHB-g-PVAc obtenido en experimentos B (región de 1600—1800 cm^{-1}).

Asimismo, se observan con mayor claridad en la Figuras 11, 12 las vibraciones de valencia C=O en la región $1600-1790\text{ cm}^{-1}$, centrada en 1720 cm^{-1} y se observan diferencias en las intensidades y la resolución de las bandas de valencia C-O-C en la región ($1280-1180\text{ cm}^{-1}$), específicamente en los 1185 cm^{-1} (d en Figura 11), 1228 cm^{-1} (c en Figura 11), 1279 cm^{-1} (b en Figura 11), al igual que la banda de doblaje δ_{CH_3} a los 1382 cm^{-1} (a en Figura 11). Estas últimas, como se discutió con anterioridad, son de gran importancia en el análisis cualitativo de la cristalinidad de estos materiales poliméricos (87).

4.5 Análisis del P (HB-g-VAc) por espectroscopía Raman.

La Figura 13 muestra los espectros Raman del PHB, P (HB-g-VAc) y PVAc en los experimentos de tipo B. Por medio del análisis de los resultados obtenidos se evidencia como en casos anteriores la presencia de materiales de naturaleza diferente, lo que verifica la presencia del copolímero por injerto y por consiguiente corrobora los resultados obtenidos por FTIR.

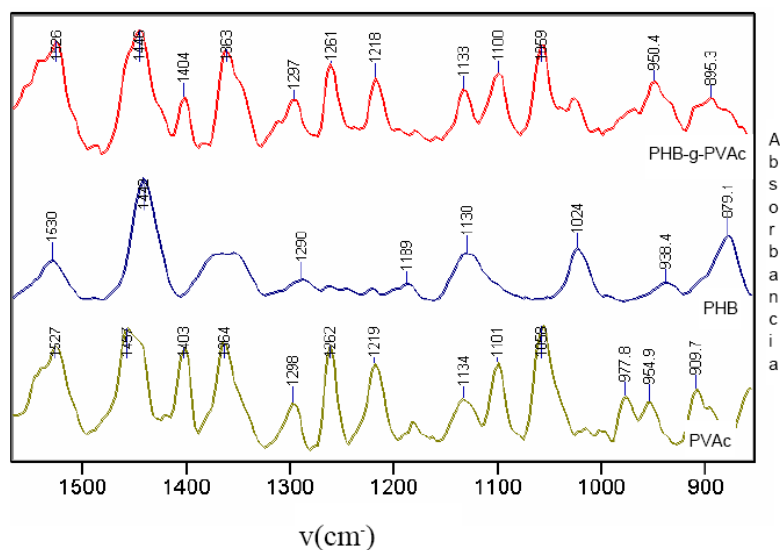


Figura 13 Espectro Raman del PHB-g-PVAc, PHB y PVAc (experimentos B).

En la Tabla 5 se reportan las asignaciones correspondientes al espectro del copolímero. Se pueden observar la identificación de las diferentes señales de las cadenas de PVAc y PHB participando de la misma macromolécula de copolímero. No se encontraron nuevas bandas, ni señales de la formación de carbonos cuaternarios sustituidos. Sin embargo se evidencian contribuciones de los diferentes estados físicos de manera similar al espectro FTIR estudiado (82).

Tabla 5 Asignaciones a las señales del espectro Raman del PHB-g-PVAc.

$\nu(\text{cm}^{-1})$	señal	estructura
153	$\delta(\text{COO})$	PVAc
364	$\delta(\text{COO})$	PVAc
431	$\delta(\text{COO})$	PHB
512,598,692	$\delta(\text{COO})$	PHB
629	$\delta(\text{COO})$	PVAc
838,950,1059	$\nu(\text{C-C})$	PHB
895,1070	$\nu(\text{C-C})$	PVAc
1100	$\delta(\text{CH}_3)$	PHB
1133	$\delta(\text{CH}_3)$	PVAc
1218-1404	$\delta(\text{CH}_2)$	PHB
1446	$\delta(\text{CH}_2)$	PVAc
1526	$\delta(\text{CH})$	PVAc, PHB
1730	$\nu(\text{C=O})$	PVAc, PHB

4.6 Análisis por microscopía óptica de alta resolución.

De los experimentos de microscopía óptica de alta resolución realizados al PHB, PVAc y PHB-g-PVAc (Figura 14), se puede observar una vez más, que estamos en presencia de materiales de diferente naturaleza. La micrografía del PHB muestra una superficie lisa,

característica de la fragilidad de este material. Por otro lado, la imagen del PHB-g-PVAc no presenta cambios morfológicos apreciables a esta resolución con respecto a la del PHB. Lo que puede inferirse que el injerto del PVAc en el PHB ocurre sin afectaciones apreciables en la morfología del sustrato. Comparativamente podemos afirmar que los materiales analizados tienen propiedades ópticas diferentes, pero ya no podríamos agregar algún otro argumento solo usando esta técnica. En el momento que se realizaron estos experimentos no se contaba con un microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés). Sin embargo se le dio mucha importancia ya que con las técnicas utilizadas ya está demostrada ampliamente la veracidad de la síntesis del material. Dado que el objetivo de la investigación es demostrar que el material fue sintetizado y ver sus propiedades hidrofílicas entonces ya no se profundizó en el estudio morfológico (82).



Figura 14 Imagen del PHB, PVAc y P (HB-g-VAc) por microscopia óptica de alta resolución: (a) PHB (b) PVAc (c) P (HB-g-VAc) (de izquierda a derecha).

4.7 Análisis de la cristalinidad del P (HB-g-VAc) obtenido en experimentos B.

Se conoce que las radiaciones gamma pueden afectar tanto las zonas amorfas como las zonas cristalinas de un polímero. Ha sido bien estudiado que es precisamente por las regiones amorfas por donde comienzan a experimentarse las modificaciones químicas. Es

por ello que es importante conocer el comportamiento de la cristalinidad del polímero en estudio. Podría verse como obvio que si introducimos un polímero amorfo (PVAc) en un polímero semicristalino (PHB), el copolímero por injerto de los dos anteriores devendría en un material menos cristalino. Sin embargo no se conoce a priori, en que extensión ocurre esta disminución de la cristalinidad, pues depende de muchos factores experimentales. Entre estos factores se puede mencionar que la variación de la cristalinidad es el efecto degradativo de las radiaciones ionizantes sobre el PHB y la composición del polímero injertado en el sustrato de partida. En virtud de lo anteriormente expuesto se procede al estudio de la cristalinidad del P (HB-g-VAc) por diferentes técnicas tales como FTIR y DFRX.

4.8 Análisis de la cristalinidad del P (HB-g-VAc) por FTIR.

La espectroscopía Infrarrojo por Transformada de Fourier, es de gran utilidad para tener un criterio de la cristalinidad de los polihidroxialcanoatos. Esto se debe a que los mismos poseen bandas que son sensibles a los estados amorfo y cristalino. Sin embargo el valor obtenido en esta técnica, es un resultado que solo puede ser utilizado como criterio comparativo de la cristalinidad del polímero, con respecto otras técnicas como la difracción de rayos x.

Las bandas que caracterizan el enlace c-o-c son las 1279, 1228, y 1185 cm^{-1} , y se diferencian entre sí en cuanto a la resolución y a la intensidad. Luego, el estudio de la cristalinidad del PHB, puede seguirse por medio de la intensidad de la banda 1185 cm^{-1} , la cual posee una mayor sensibilidad a la variación de estados físicos, o sea, muestra una mayor diferencia de intensidad entre los estados amorfo y cristalino. Se puede agregar que las bandas 1279, 1228 cm^{-1} tienen menor resolución que la banda 1185 cm^{-1} (Figura 10).

Por su parte la banda 1382 cm^{-1} , no presenta variabilidad en los estados amorfo y cristalino, lo que nos proporciona una referencia para la determinación del índice de cristalinidad (A_c), que puede definirse como la variación de las absorbancias normalizadas de las bandas 1382 y 1185 cm^{-1} (Ver ecuación 36) Se realizan los cálculos de A_c para el PHB y el copolímero, con los siguientes resultados:

$$A_c\langle PHB \rangle = \frac{A_{\gamma CH_3}}{A_{\gamma C-O-C}} = \frac{A_{1382\text{cm}^{-1}}}{A_{1185\text{cm}^{-1}}} = \frac{1,1784}{1,9028} = 0,62$$

$$A_c\langle PHB - g - PVAc \rangle = \frac{A_{\gamma CH_3}}{A_{\gamma C-O-C}} = \frac{A_{1382\text{cm}^{-1}}}{A_{1185\text{cm}^{-1}}} = \frac{1,017}{1,718} = 0,59$$

Realizados los cálculos correspondientes, se puede observar que el I_c del PHB es 0.62 y el valor para el I_c del PHB-g-PVAc es de 0,59 lo que se evidencia una disminución de la cristalinidad de este último. Al calcular el I_c (PHB-g-PVAc) se tuvo en cuenta restar la absorbancia del PVAc a ese mismo número de onda.

En la región carbonílica del espectro FTIR, también puede ser estudiada la cristalinidad del PHB y el PHB-g-PVAc. En la Figura 12 se muestra el espectro ampliado, se ha considerado la región comprendida entre los $(1600\text{ y }1800\text{ cm}^{-1})$. Según los estudios realizados por Marchessault *et al.*, considerando las bandas a 1722 y 1740 cm^{-1} , la banda a 1722 cm^{-1} es característica del estado cristalino de estos polímeros y la segunda es característica del estado amorfo del mismo (96). Como se aprecia la banda a 1740 cm^{-1} presenta un hombro que sobresale a la izquierda para el copolímero, el cual puede ser interpretado como un aumento del estado amorfo en virtud de un incremento de los grados

de libertad conformacionales del polímero. Como consecuencia de estos análisis, según Cyras *et al.* (97), se puede definir el criterio de cristalinidad (CC) (Ver ecuación 37). Esta definición es también un criterio cualitativo de la cristalinidad de estos polímeros. En la Tabla 6 se presentan los resultados de los cálculos del A_c y el CC para el PHB y el PHB-g-PVAc en los experimentos B.

Tabla 6 Estudio de la cristalinidad de las muestras de PHB y P (HB-g-VAc)

Muestra	Porciento de cristalinidad	Índice de cristalinidad	Criterio de cristalinidad
PHB	59	62	2.52
PHB-g-PVAc	43	59	2.12

Como se puede observar los resultados obtenidos para el A_c y el CC concuerdan en una disminución de la cristalinidad. En este caso el análisis de CC muestra una mayor sensibilidad, lo que podría ser explicado por el efecto de formación del copolímero pues en el espectro FTIR del PVAc este presenta mayor intensidad en las bandas ν_a (C-O-C) que en las bandas ν (C=O) (87).

4.9 Análisis de la cristalinidad de P (HB-g-VAc) por DFRX.

La difracción de rayos x, es la técnica más importante para estudiar la cristalinidad. En la Tabla 7 y la Figura 15 se muestran los resultados del porciento de cristalinidad determinado por DFRX para el PHB y el P (HB-g-VAc) en los experimentos de tipo B, así como los patrones de difracción de los mismos. Estos difractogramas del PHB y el P (HB-g-VAc) son muy semejantes. En la Figura 15 se observa que no existen cambios significativos en el sistema cristalino. Sin embargo, puede observarse que para valores de

2θ de 10 a 20° o el copolímero presenta un incremento en la zona amorfa lo que se traduce en una disminución de la cristalinidad.

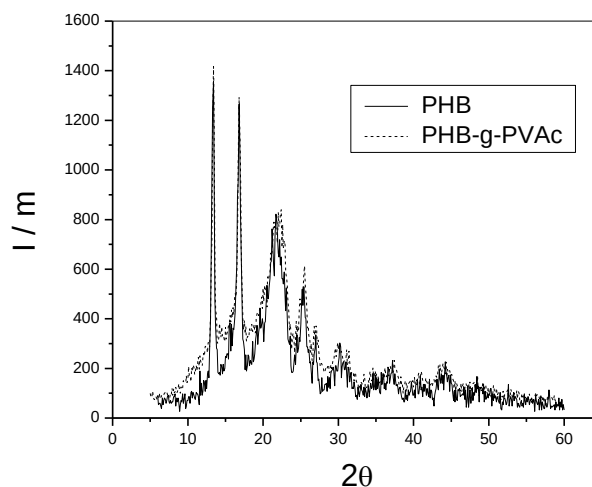


Figura 15 Patrón de difracción de rayos X del PHB y el PHB-g-PVAc en experimentos B.

El porcentaje de cristalinidad se calcula por esta técnica mediante la ecuación (35). Los porcentajes de cristalinidad X_C mostrados en la Tabla 7 corroboran los resultados obtenidos por FTIR. De manera concluyente la introducción de moléculas de PVAc en el PHB por copolimerización por injerto radioinducida incrementa la fase amorfa de este material y por ende disminuye la cristalinidad del mismo.

4.10 Estudio de hinchamiento del copolímero en agua.

Se escogió el producto obtenido de la reacción de copolimerización por injerto radio inducido de los experimentos de tipo B y se preparó una membrana para el estudio de hinchamiento en agua bidestilada. Los resultados de la Figura 16 muestran que el

hinchamiento en agua fue de 3,9 % para el PHB, 8,2 % para el PVAc y 4,1 % para el copolímero P (HB-g-VAc), lo que está en correspondencia con lo esperado. El PVAc injertado aumenta ligeramente las propiedades hidrofílicas del sustrato de partida.

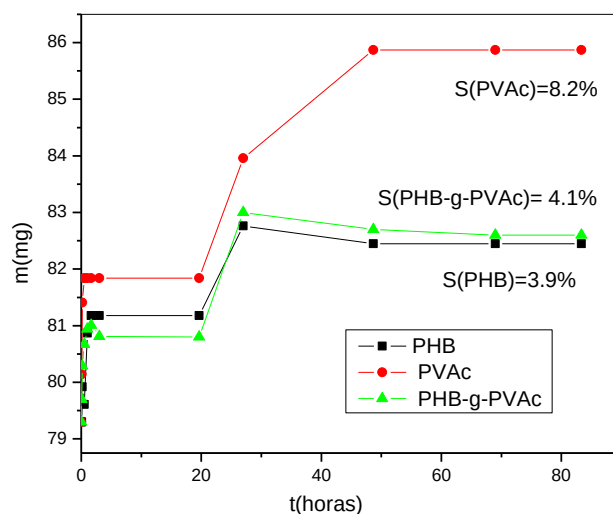


Figura 16 Estudio de hinchamiento en agua de membranas de PHB, PVAc y PHB-g-PVAc de experimentos B.

Esto podría deberse a que las cadenas de PVAc injertadas no pueden cambiar de manera considerable las propiedades hidrofílicas del polímero de partida. Lo que podría solucionarse con la realización de la hidrólisis de los grupos laterales de las cadenas injertadas para formar el poli (3-hidroxibutirato)-g- poli (vinil alcohol). La síntesis de este último compuesto no podría ser realizada directamente, puesto que el monómero vinil-alcohol no se ha podido obtener por ser termodinámicamente inestable.

Los resultados obtenidos están en buen acuerdo con los estudios realizados en el hinchamiento de los copolímeros de VAc en filmes de baja densidad de polietileno

obtenidos por copolimerización de injerto radioinducido por la técnica de irradiación mutua (102) y los copolímeros por injerto de VAc en poli (vinil cloruro) (103).

4.11 Análisis de los experimentos C, D.

Los resultados obtenidos se pueden considerar satisfactorios. Sin embargo en virtud de que no se obtuvieron señales de carbono cuaternario sustituido (Carbono 9 en Figura 9), se realizan cambios en las condiciones de experimentación, en vistas a obtener una mayor dilucidación de la microestructura del copolímero P (HB-g-PVAc); la obtención de nuevas señales que evidencien su formación y el aumento de la composición y el grado de injerto del mismo. Entre los múltiples parámetros a variar, en vistas en un mejoramiento de los resultados, se escogieron la disminución de la presión a alto vacío (10^{-6} Torr) para los experimentos de tipo C, D y la disminución del peso molecular para los experimentos de tipo D. Si tenemos en cuenta que en los experimentos de tipo A y B se realizaron con un reactor de vidrio a una presión $P=10^{-3}$ Torr y que el peso molecular del PHB original se considera alto, con las nuevas condiciones escogidas se espera que aumente la concentración de carbonos injertados y disminuya la probabilidad de reacciones de terminación por formación de peróxidos e hidroperóxidos según se describe en la revisión bibliográfica.

4.11.1 Análisis de la degradación térmica oxidativa.

Para disminuir el peso molecular se escogió la degradación térmica-oxidativa del PHB. Se conoce que el estudio de la degradación térmica de los materiales poliméricos se puede realizar en dos rangos de temperaturas: a temperaturas cercanas a la temperatura de fusión y a temperaturas superiores a la temperatura de descomposición. En este trabajo se realiza la degradación térmica oxidativa del PHB en el rango de la temperatura de fusión como se

describe anteriormente. La Tabla 7 muestra los resultados obtenidos de los estudios realizados de los pesos moleculares por GPC del PHB original y el PHB degradado.

Tabla 7 Resultados de los análisis por GPC del PHB.

Polímeros	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_z$	$\overline{M}_w / \overline{M}_n$
PHB original	27000	60000	98000	2.2
PHB degradado	9000	27000	51000	3

De acuerdo con los resultados obtenidos, es de notar que el polímero original disminuyó su peso molecular de manera considerable. El PHB degradado muestra una mayor polidispersidad que el PHB originalmente utilizado en los experimentos anteriores.

En la Figura 17 se muestran los cromatogramas del PHB original y degradado. Los tiempos de retención (t_r) de los máximos obtenidos para cada material se encuentran a los 37,41 minutos y 39,86 minutos respectivamente, separándose por 2,14 minutos, lo que evidencia la degradación del material.

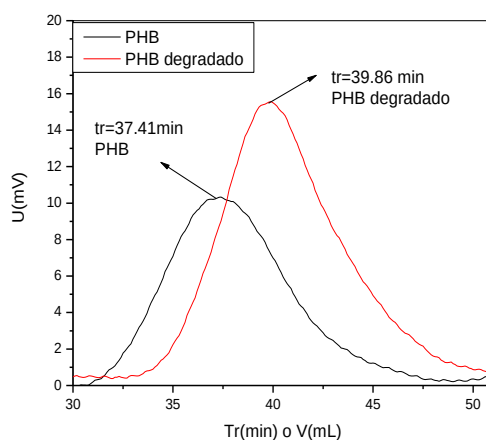


Figura 17 Cromatograma de permeación de geles del poli (3-hidroxibutirato) original y degradado.

4.12 Caracterización química física de los productos de los Exp. de tipo C y D.

4.12.1 Caracterización por RMN-¹³C de los productos de los Exp. de tipo C y D.

El resultado del análisis RMN-¹³C del material obtenido en experimentos C se muestra en la Tabla 8. El resultado obtenido es muy similar al obtenido en los experimentos B, con ligeros corrimientos de algunas señales. Por ejemplo la señal del carbono diez (C10) experimentó un corrimiento de 77, 23 a 77, 12 ppm. La composición y el grado de injerto calculados para los copolímeros sintetizados en estos experimentos fue de $C_{RMN}=36\%$ de PVAc y $W_{RMN} = 38\%$ de PVAc. No se pudo determinar el índice de injerto, por dificultades en la cuantificación de la señal del carbono 10 en el DEPT.

Tabla 8 Asignación de las principales señales de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear RMN-¹³C del P (HB-g-VAc) en experimentos C.

No	Asignación		Señal en RMN- ¹³ C δ (ppm)
	Carbono	Representación	
1	(C1)	$-\text{[OCO-CH}_2\text{-CH(C}^*\text{H}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{CH(OCO-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	19,23
2	(C2)	$-\text{[OCO-CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{CH(OCO-C}^*\text{H}_3\text{)]}_m\text{-}$	20,64
3	(C3)	$-\text{[OCO-CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[C}^*\text{H}_2\text{CH(OCO-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	38,58
4	(C4)	$-\text{[OCO-C}^*\text{H}_2\text{-CH(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{CH(OCO-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	40,47
5	(C5)	$-\text{[OCO-CH}_2\text{-C}^*\text{H(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{CH(OCO-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	65,97
6	(C6)	$-\text{[OCO-CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{C}^*\text{H(OCO-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	66,91
7	(C7)	$-\text{[OC}^*\text{O-CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{CH(OCO-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	168,44
8	(C8)	$-\text{[OCO-CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{CH(OC}^*\text{O-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	169,85
9	(C9)	$\begin{array}{c} -\text{[OCO-CH}_2\text{-C}^*\text{(CH}_3\text{)]}_n \\ \\ \text{CH(OCO-CH}_3\text{)} \\ \\ \text{CH}_2\text{]}_m \end{array}$	SNI
10	(C10)	$\begin{array}{c} -\text{[OCO-CH}_2\text{-C(CH}_3\text{)]}_n \\ \\ \text{C}^*\text{H(OCO-CH}_3\text{)} \\ \\ \text{CH}_2\text{]}_m \end{array}$	77,12
11	cloroformo	$\text{Cl}_3\text{C}^*\text{H}$	76,5-77,5

Por otro lado, se muestran en la Tabla 9 las principales señales del espectro RMN- ^{13}C del P (HB-g-VAc) obtenido en experimentos D. En el espectro se observan las señales correspondientes al PHB y al PVAc participando de la misma molécula. Sin embargo no se observa señal alguna del carbono cuaternario sustituido (C9 en Figura 9) y ni siquiera pudo ser observada la señal de los carbonos (C10 en Figura 9) por los cuales se realiza la cuantificación en los experimentos anteriores. Se determinaron copolímeros de composición $C_{\text{RMN}}=24\%$ de PVAc y grado de injerto $W_{\text{RMN}} = 31,5\%$, y se asume que el índice de injerto no puede determinarse pues la concentración del carbono C10 está por debajo del límite de detección de la técnica.

Tabla 9 Asignación de las principales señales de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear RMN- ^{13}C del P (HB-g-VAc) en experimentos D.

No	Asignación		Señal en RMN- ^{13}C δ (ppm)
	Carbono	Representación	
1	(C1)	$-\text{[OCO-CH}_2\text{-CH(C}^*\text{H}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{CH(OCO-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	19,74
2	(C2)	$-\text{[OCO-CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{CH(OCO-C}^*\text{H}_3\text{)]}_m\text{-}$	20,98
3	(C3)	$-\text{[OCO-CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[C}^*\text{H}_2\text{CH(OCO-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	38,6
4	(C4)	$-\text{[OCO-C}^*\text{H}_2\text{-CH(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{CH(OCO-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	40,47
5	(C5)	$-\text{[OCO-CH}_2\text{-C}^*\text{H(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{CH(OCO-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	67,25
6	(C6)	$-\text{[OCO-CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{C}^*\text{H(OCO-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	67,61
7	(C7)	$-\text{[OC}^*\text{O-CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{CH(OCO-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	169,14
8	(C8)	$-\text{[OCO-CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)]}_n\text{-g-[CH}_2\text{CH(OC}^*\text{O-CH}_3\text{)]}_m\text{-}$	170,35
9	(C9)	$\begin{array}{c} -\text{[OCO-CH}_2\text{-C}^*\text{(CH}_3\text{)]}_n \\ \\ \text{CH(OCO-CH}_3\text{)} \\ \\ \text{CH}_2\text{]}_m \end{array}$	SNI
10	(C10)	$\begin{array}{c} -\text{[OCO-CH}_2\text{-C(CH}_3\text{)]}_n \\ \\ \text{C}^*\text{H(OCO-CH}_3\text{)} \\ \\ \text{CH}_2\text{]}_m \end{array}$	---
11	cloroformo	$\text{Cl}_3\text{C}^*\text{H}$	77,4-77,6

4.12.2 Caracterización por ATG de los productos de los Exp. de tipo C y D.

Como puede observarse en el termograma obtenido al realizarse el ATG&DTG al producto obtenido en los experimentos C (Figura 18), el termograma muestra el comportamiento de un copolímero por injerto de manera similar a los resultados obtenidos en experimentos B.

De forma similar, se observa con claridad la presencia de tres saltos en la curva de pérdida de peso. Se detecta un ligero incremento de la temperatura de la velocidad máxima de descomposición del PHB con respecto al resultado obtenido en los experimentos B. Lo más probable debido a alguna variación en las condiciones de registro del termograma.

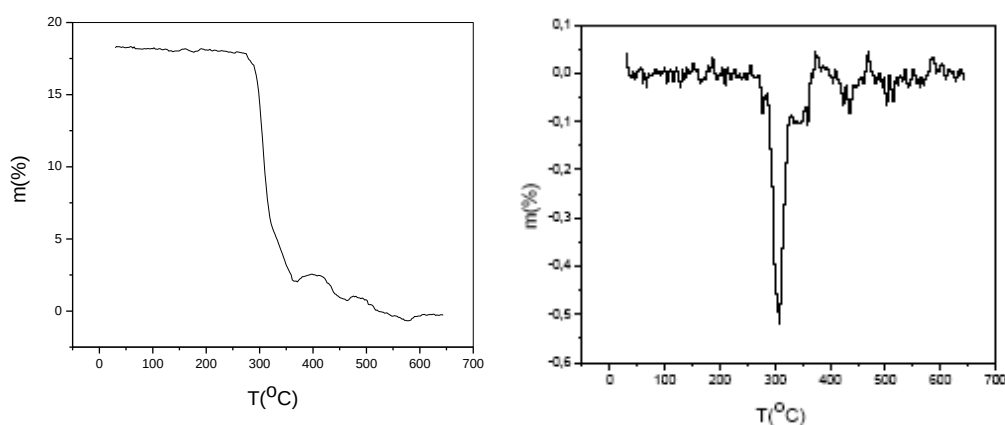


Figura 18 ATG y DTG del PHB-g-PVAc obtenido en experimentos C.

La evaluación del termograma corresponde a un copolímero por injerto de composición $C_{ATG}=34\%$ y grado de injerto de $W_{ATG}=36\%$ de PVAc lo cual queda reflejado en la Tabla 10. Un resultado similar fue el obtenido por Vigo *et al.*, al injertar por copolimerización radioinducida el VAc en PVC utilizando una relación $m(VAc)/m(PVC)=5$, relación similar a la utilizada en este trabajo ($m(VAc)/m(PHB)=6$) (103).

4.12.3 Conclusiones de la caracterización de los productos C y D.

El comportamiento de los termogramas de los experimentos de tipo D fue similar a los descritos para los experimentos de tipo A, B y C. La evaluación del termograma obtenido corresponde a un copolímero por injerto de composición $C_{ATG}=24\%$ de PVAc y un grado de injerto de $W_{ATG}=31,5\%$ lo cual queda también reflejado en la Tabla 10.

En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las técnicas utilizadas para la caracterización de los copolímeros P (HB-g-VAc) obtenidos en los experimentos A, B, C y D. Como puede observarse, continúa existiendo una buena correspondencia entre los resultados obtenidos por cada una de las técnicas utilizadas.

Tabla 10 Resultados de C, W y $\gamma_g(\%)$ determinados en los experimentos de tipo A, B, C y D.

Exp	W_G	C_G	W_{ATG}	C_{ATG}	W_{RMN}	C_{RMN}	$\gamma_g(\%)$
A	---	---	10%	9%	---	---	---
B	43,5 %	30,3%	42%	29,5%	34%	26%	25%
C	48,9%	32,8%	36%	34%	38%	36%	---
D	28,7%	22,3%	31,5%	24%	--	--	< 5%

Como puede observarse en los experimentos realizados existe una buena correspondencia entre las variables calculadas por las diferentes técnicas. Al contrario de lo que se esperaba el grado de injerto para los experimentos D disminuyó notablemente, esto podría explicarse por el aumento de la cristalinidad del sustrato de partida debido a la degradación térmica oxidativa a la cual el material fue sometido.

Los resultados más satisfactorios corresponden a los experimentos B. Los cambios realizados en la presión de desgasificación no produjeron variaciones significativas.

Mitomo y *et al.*, obtuvieron para el P (HB-g-St) una composición de hasta 15 % de PSt, para una reacción de copolimerización en masa con relación St/PHB de 30/70 (w/w) para dosis 10 kGy y composiciones de aproximadamente 30% de PMMA, para el P (HB-g-MMA) en masa para dosis de 5 kGy. Esto indica que el sistema estudiado presenta resultados con características similares a los resultados obtenidos en otros injertos realizados por estos autores (75).

4.13 Estimado del rendimiento de polimerización.

En el sistema en estudio ocurren dos reacciones de polimerización independientes.

- 1) La copolimerización, con la obtención del copolímero por injerto PHB-g-PVAc y
- 2) La homopolimerización del VAc con la obtención del PVAc.

En este epígrafe se hace un balance material que permite estudiar el rendimiento de cada una de las reacciones señaladas. De acuerdo con el procesamiento realizado se tiene que:

masa inicial (m_i) = masa del PHB (m_{PHB}) + masa del VAc (m_{iVAc})

masa final (m_f) = masa del copolímero ($m_{PHB-g-PVAc}$) + masa del filtrado ($m_{filtrado}$) + masa del producto extraído por el soxhlet ($m_{soxhlet}$).

Tanto el filtrado como el producto extraído en soxhlet fueron identificados como PVAc, mediante RMN y ATG.

Así $m_{filtrado} + m_{soxhlet} = \text{masa de PVAc } (m_{PVAc})$ y de acuerdo con el balance material.

$m_i = m_f$

Se calcula el rendimiento tomando como base el PVAc.

$m_{PHB-g-PVAc} - m_{PHB} = m_{PVAc}$ en el copolímero injertado.

$(m_{\text{PVAc}} \text{ en el copolímero injertado} / m_{\text{iVAc}}) = \text{Rendimiento de VAc en la reacción de copolimerización} = R_c$

$(m_{\text{PVAc}} / m_{\text{iVAc}}) = \text{Rendimiento del VAc en la reacción de homopolimerización} = R_h$

En la Tabla 11 se dan los resultados para los diferentes experimentos.

Como puede observarse, en todos los estudios realizados, se encuentra favorecida la reacción de homopolimerización, con valores en el rendimiento que oscilan entre 87 y 94%. En los experimentos C, se encontró un ligero incremento en el rendimiento de copolimerización.

Tabla 11 Estimado de los rendimientos de polimerización.

	$m_{\text{iVAc}} \text{ (g)}$	$m_{\text{PHB-g-PVAc}} \text{ (g)}$	$m_{\text{PVAc}} \text{ (g)}$	$R_c \text{ (\%)}$	$R_h \text{ (\%)}$
B	1.395	0.3900	0.1282	9.1	90.8
C	1.395	0.4324	0.1706	12.2	87.7
D	1.395	0.3284	0.0733	5.2	94.7

4.14 Estimado de la longitud de cadena de injerto.

Se realizó el cálculo de la longitud de cadena de injerto con la finalidad de conocer la proporción en que las cadenas de PVAc son injertadas en el PHB por el método estudiado.

El cálculo se realiza de la siguiente manera:

Para el PHB

$$\overline{X_n} = \frac{\overline{M_n}}{M_{ue}} = \text{longitud de cadena} \quad (\text{Ecuación 42})$$

$$\overline{X}_n = \frac{(27000 \text{ g mol}^{-1})}{86 \text{ g mol}^{-1}} = (314 \text{ unidades de monómero}) / \text{macromolécula de PHB}$$

Cada unidad monomérica tiene un carbono terciario susceptible a injertarse y solo se injerta el 25 % $(\gamma_g(\%))$

$$\phi = (\gamma_g(\%)) * \overline{X}_n \quad (\text{Ecuación 43})$$

$$\phi = 0.25 \times 314 = 79 \text{ sitios injertados por macromolécula de PHB}$$

En la Tabla 12 se muestran los cálculos de las macromoléculas de PHB y de las moléculas de VAc injertadas, de manera que los sitios totales injertados son:

$$\sigma = \phi * \text{macromoléculas de PHB} \quad (\text{Ecuación 44})$$

$$\sigma = 79 * 5.84 * 10^{18} = 461.36 * 10^{18} = 4.61 * 10^{20}$$

Así las moléculas de VAc se distribuirán entre los sitios totales injertados en el PHB. Esta distribución da un valor de 2 aproximadamente. De manera que se tiene un estimado de dos unidades monoméricas de VAc por injerto, o sea apenas un dímero de VAc resulta el injerto.

Tabla 12 Cálculo de las macromoléculas de PHB y de las moléculas de VAc injertadas.

	$\overline{M}_n (\text{g mol}^{-1})$	Masa(g)	Moles*	Moléculas**
PHB	27000	0.2618	9.6×10^{-6}	5.84×10^{18}
VAc	86	0.1282	1.49×10^{-3}	8.97×10^{20}

*masa/, ** moles x Na ($\text{Na} = 6.02 \times 10^{23} \text{ moléculas} \times \text{mol}^{-1}$)

Las evidencias estructurales indican que la interacción de los centros activos de PVAc y los radicales formados en el PHB por la irradiación está dada por la reacción de

acoplamiento radicalico. Puede explicarse entonces que solo los centros activos más pequeños del PVAc, tienen la movilidad suficiente para llegar a la cadena carbonada del polímero base y reaccionar (87).

4.15 Efecto del solvente en la polimerización por injerto radioinducido del VAc en el PHB.

Para el estudio del efecto del solvente en la polimerización por injerto radio-inducido del VAc en el PHB se escogieron solventes de bajo valor de constante de transferencia de cadena y de diferentes polaridades. En este caso los solventes escogidos fueron: acetato de etilo, n-butanol, éter dietílico, hexano y acetona. El estudio se llevó a cabo para estudiar el mejoramiento del grado de injerto a través del uso de solventes que facilite la difusión del monómero al interior del polímero (104).

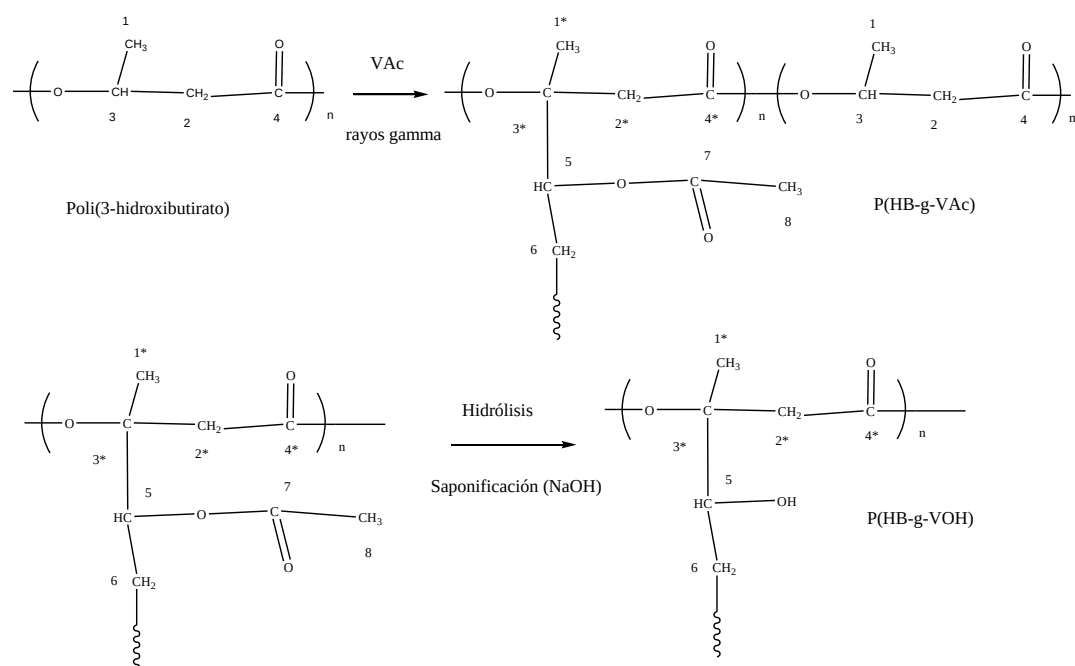


Figura 19 Polimerización por injerto radioinducido del VAc en el PHB y la posterior hidrólisis del copolímero.

La Figura 19 muestra el esquema de la reacción de polimerización por injerto radioinducido del VAc en el PHB y la posterior saponificación del P (HB-g-VAc) para obtener el injerto del alcohol vinílico (VA), es decir el P (HB-g-VA). Como se mencionó anteriormente, este injerto no puede obtenerse de forma directa porque el monómero VA es termodinámicamente inestable y en condiciones normales tautomeriza en acetaldehído, lo que para obtener el PVA es necesario hacerlo a través de la transformación química por medio de la hidrólisis de los enlaces éster del PVAc (104).

4.16 Análisis térmico de los copolímeros del experimento de efectos del solvente.

La Figura 20 muestra el termograma (ATG) de los copolímeros por injerto obtenidos bajo las mismas condiciones experimentales (PHB (200 mg)) inmerso en acetato de vinilo (0.5 mL) y 1 mL de disolvente) (A, B, C, D y E).

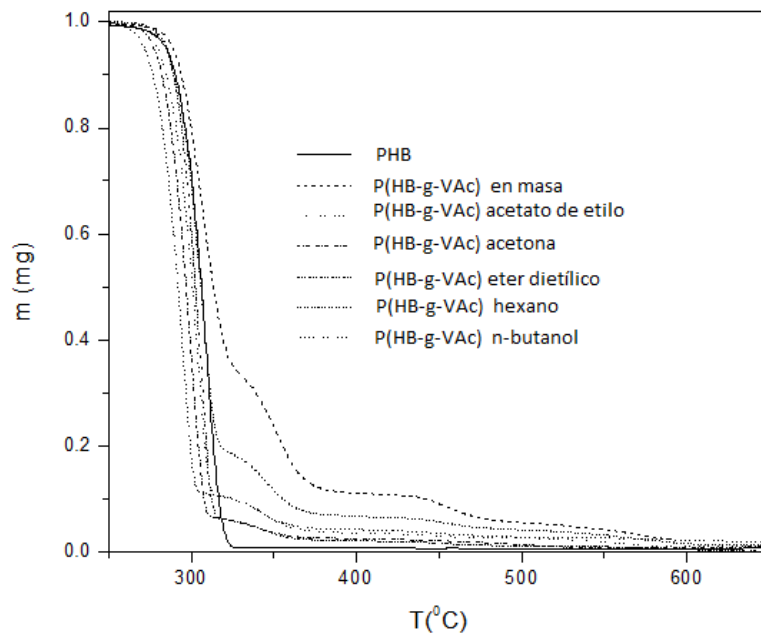


Figura 20 Análisis termogravimétrico de P (HB-g-VAc) obtenido en diferentes solventes.

Para comparar, adicionalmente se realizó la reacción en masa (ausencia de disolvente) (Experimento F). Es importante aclarar que los experimentos A, B, C y D descritos a continuación no guardan relación y no se refieren a los descritos con anterioridad sino a los experimentos del estudio del efecto del disolvente en la síntesis del P (HB-g-VAc).

En todos los casos el comportamiento térmico fue similar. La curva TG del PHB injertado con el poliacetato de vinilo muestra tres pasos en su curva suave de pérdida de peso. Esto se debe a las diferencias en las temperaturas de descomposición del PHB y el PVAc. Por ende el PVAc injertado, tiene dos pasos en su curva suave de pérdida de peso característica. Adicionalmente, el análisis termogravimétrico diferencial (ATGD) muestra tres mínimos en las tasas de pérdidas de peso (dW/dt) definiendo la temperatura de cada paso. El primer paso fue alrededor de los 290 °C y pertenece a la temperatura característica del PHB. El segundo y tercer paso alrededor de los 339 °C y los 440 °C corresponden a la descomposición del PVAc injertado (no se muestra en la Figura). De la Figura 20 se puede observar que la descomposición del PHB en el copolímero por injerto se puede calcular dividiendo la pérdida de peso del primer paso por la pérdida de peso total. De los resultados obtenidos del análisis térmico se encontró que de las condiciones de reacción, la más favorable fue la reacción en masa ($W (\%)=69,7\%$). Los grados de injerto obtenidos para todos los experimentos se encuentran registrados en la Tabla 13. Los resultados obtenidos con el uso de solventes son los siguientes: (1) el solvente más adecuado para la reacción de injerto es el hexano ($W (\%)= 26,2 \%$), (2) el grado de injerto es similar cuando se utiliza el acetato de etilo ($W (\%)=13,2\%$) y el n-butanol ($W (\%)=13,1\%$) y es bastante bajo cuando se utiliza éter dietílico ($W (\%)=7,7\%$) o acetona ($W (\%)=6,5\%$). Los resultados obtenidos se asemejan a los estudios de Tao *et*

al., que obtuvo mayor grado de injerto comparado con otros solventes cuando utilizó heptano para injertar isopreno en el PHB (77).

Tabla 13 Parámetros termodinámicos obtenidos de los termogramas del P (HB-g-VAc).

No	Polímero	W _{TGA} (%)	ΔH _c (J/g)	T _c (°C)	ΔH _m (J/g)	T _m (°C)	ΔH _{m corr} (J/g)
1	PHB	0	92,4	97,43	103,8	170,23	103,8
A	P(HB-g-VAc) acetona	6,54	79,0	85,65	96,9	174,32 166,28	103,27
B	P(HB-g-VAc) éter dietílico	7,7	74,9	83,01	96,5	173,84 164,79	103,25
C	P(HB-g-VAc) n-butanol	13,12	70,4	82,30	91,2	173,11 163,67	103,13
D	P(HB-g-VAc) acetato de etilo	13,21	61,7	80,62	80,4	173,42 163,5	91,066
E	P(HB-g-VAc) hexano	26,27	51,3	71,38	82,2	170,54	103,78
F	P(HB-g-VAc) masa	69,75	51,8	73,34	66,5	168,47	112,86
G	P (HB-g-VA)	42,85	16 12	66,02 58,43	31,9	162,91	45,52

4.16.1 Estudio por RMN de los copolímeros.

Se utilizó la Resonancia Magnética Nuclear RMN-¹³C para observar evidencias de injerto en los copolímeros obtenidos. De acuerdo con el espectro RMN-¹³C del P (HB-g-VAc) (Figura 21), se puede observar una señal a los 77,23 ppm, la cual es una evidencia significativa de injerto. Es importante señalar que todos los copolímeros por injerto obtenidos en este estudio mostraron esa señal en el RMN-¹³C, la cual demuestra firmemente la formación de un nuevo material polimérico. Sin embargo, se llevó a cabo la posterior hidrólisis del copolímero obtenido en masa, así como la caracterización química física del polímero hidrolizado.

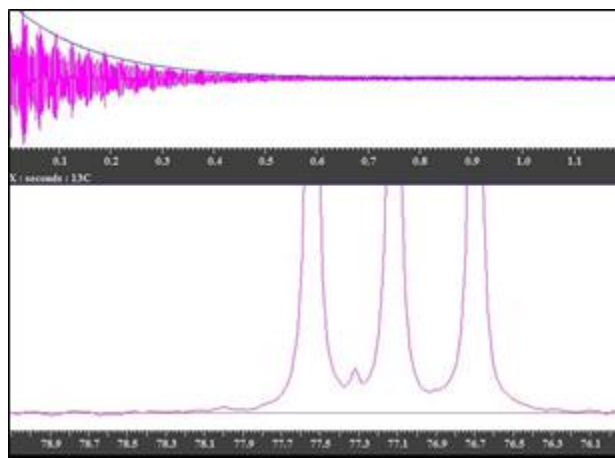


Figura 21 Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C del P (HB-g-VAc) obtenido en estudios del solvente (Experimento F, representativo).

4.16.2 Investigación por calorimetría diferencial de barrido de los materiales obtenidos.

En la Figura 22 se muestran las curvas de calor típicas de calorimetría diferencial de barrido para el PHB y los copolímeros por injerto P (HB-g-VAc). Se observó que los valores de la temperatura de fusión cambiaron ligeramente. Por otro lado, con la introducción del acetato de vinilo, las curvas de fusión están aparentemente casi invariables así como el área de los picos. Sin embargo, los copolímeros por injerto mostraron en algunos casos picos de fusión dobles compuestos por el pico principal y otro más chico a una temperatura menor que la temperatura principal.

Este fenómeno se denomina recristalización e implica que el injerto no solo ocurre en la región amorfa sino además procede de forma heterogénea en las regiones cristalinas (35).

El pico de fusión que se encuentra a una temperatura menor se podría atribuir a la

fusión de los cristales formados durante el proceso de enfriamiento y el pico de fusión de mayor temperatura (principal) se podría atribuir a los cristales que recrystalizaron durante el proceso de calentamiento del material (105).

La temperatura de cristalización (T_c) decrece con el incremento del injerto del acetato de vinilo, lo cual implica cambios en el comportamiento de la cristalización del PHB luego de la irradiación e injerto del acetato de vinilo.

Dado que la T_g del PVAc es 25 °C, y para el PHB es -1 °C, es natural que la T_g de los copolímeros por injerto se incremente con la introducción del PVAc. Por ejemplo, en el experimento F la T_g incrementó su valor desde -1 °C (PHB) a 10 °C P (HB-g-VAc). En la mayoría de los casos la T_g no fue observada claramente. Esto debe de haber sido probablemente a que la técnica de calorimetría (DSC) no es la más adecuada para la determinación de la temperatura de transición vítrea (104).

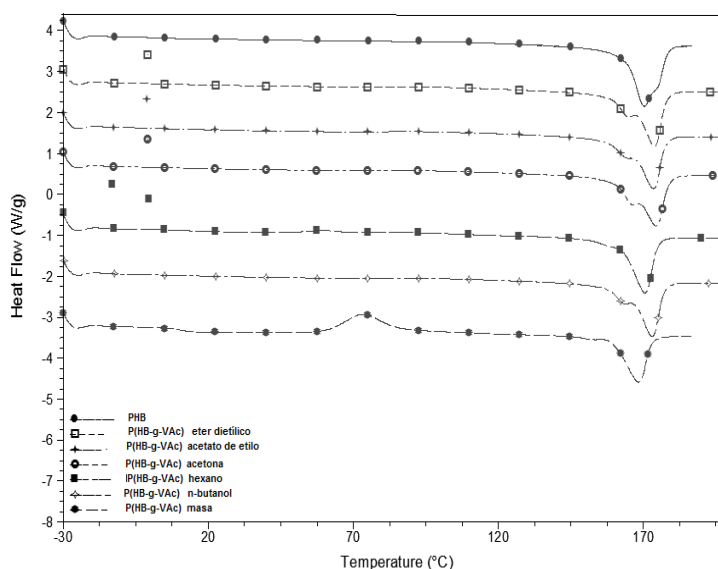


Figura 22 Curvas de DSC del PHB y el P (HB-g-VAc) obtenidos en estudio del solvente.

La Tabla 13 muestra los parámetros termodinámicos obtenidos de los termogramas (CDB) de las muestras de los experimentos (A, B, C, D, F y G, variables asignadas al estudio del solvente). Se realizó un resumen de las temperaturas de fusión (T_m), la temperatura de cristalización (T_c), y las entalpías de cristalización (ΔH_c), las entalpías de fusión (ΔH_m), y las entalpías de fusión corregidas por la fracción de peso del polímero que conforma al copolímero por injerto, calculado por la siguiente ecuación:

$$(\Delta H_m)_{\text{corr}} = (\Delta H_m)(1 + W(\%))$$

El (ΔH_m) de los copolímeros por injerto decrecieron en valor con respecto al incremento del grado de injerto. Sin embargo este decremento se deba probablemente al relativo descenso del contenido de PHB en el copolímero por injerto. Por tanto, el ΔH_m fue corregido. De los resultados obtenidos se observó que en algunos casos (éter dietílico, acetona, n-butanol y hexano), el (ΔH_m)_{corr} permaneció prácticamente invariable y en otros casos (acetato de etilo y reacción en masa) mostró cambios significativos. Se podría inferir que en los primeros casos, el injerto es escasamente introducido en las regiones cristalinas, mientras que en el segundo caso el injerto procedió uniformemente en las regiones cristalinas luego de afectar las regiones amorfas del material polimérico.

Por otro lado, la Tabla 13 muestra que la entalpía de cristalización (ΔH_c) disminuye con el incremento del grado de injerto. Esto implica además que decline la cristalinidad del polímero base luego del injerto del acetato de vinilo.

El valor más alto del grado de injerto se obtuvo en la reacción en masa. La Figura 23 muestra el termograma del copolímero de injerto radio-inducido en el experimento F (en masa). En el termograma de la primera corrida térmica no se observaron anomalías. Sin embargo en el termograma de la segunda corrida térmica se observó un comportamiento

extraño porque no se detectó el pico de cristalización en el enfriamiento para el P (HB-g-VAc). Hasta el momento no existe una explicación clara para este fenómeno (104).

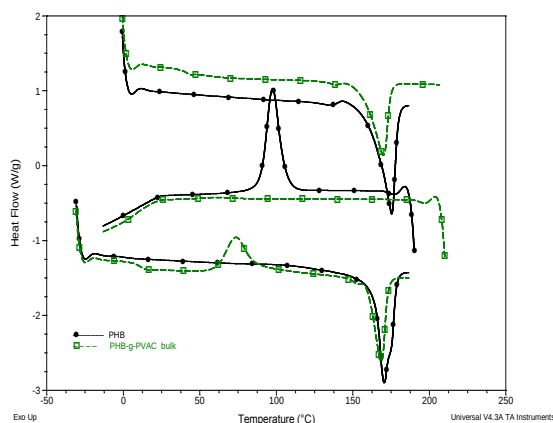


Figura 23 Termograma del P (HB-g-VAc) obtenido por copolimerización radio-inducida (exp F).

Una explicación podría ser que ocurren cambios estructurales en el proceso de cristalización provocado por la reacción de injerto. El resultado más interesante fue el observado en la tercera corrida térmica cuando se detectaron tanto los mínimos exotérmicos como los máximos endotérmicos. Es importante mencionar que este fenómeno solo fue observado en el experimento E. Se conoce que la habilidad de cristalización del PHB se debilita debido a la introducción del acetato de vinilo, lo que puede entorpecer su cristalización. Como consecuencia de esto, el incremento del grado de injerto (69,7%) conlleva a un incremento de la cantidad de cristales imperfectos, y por tanto resulta en un cambio dramático en el comportamiento de la cristalización.

4.17 Estudio del P (HB-g-VA) por FT-IR.

Los estudios por Infrarrojo por Transformada de Fourier se llevaron a cabo con el propósito de confirmar la síntesis del copolímero por injerto P (HB-g-VA). Utilizando esta técnica se obtuvo la evidencia de injerto. La Figura 24 muestra el espectro FT-IR de modo de transmitancia del PHB puro y el P (HB-g-VA).

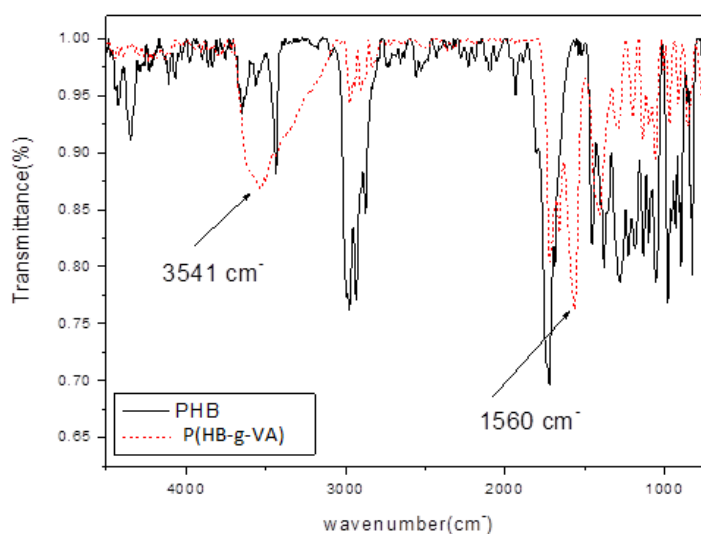


Figura 24 Espectro FTIR del P (HB-g-VA) obtenido por saponificación del P (HB-g-VAc).

Del espectro FTIR, se observaron señales típicas de PHB a 1185, 1228 y 1279 cm^{-1} características de δ (C-O-C) y una banda a 1382 cm^{-1} característico del δ (CH₃). En la región del éster carbonílico se puede considerar la banda de valencia carbonílica C=O (1729 cm^{-1}). Todas las señales mencionadas son comunes para ambos materiales. Sin embargo, en el copolímero por injerto, se observaron dos señales adicionales. El pico a los 3541 cm^{-1} (pico ancho) corresponde a ν (OH). Se puede observar en la Figura 24 la

diferencia entre el PHB y (OH) presente en los terminales de la cadena carbonada y la banda más ancha del copolímero por injerto hidrolizado. La posición del pico a los 1560 cm^{-1} probablemente se deba al grupo alcohol y podría representar la absorción δ (OH). La frecuencia de absorción de la vibración de enlace del alcohol está bien separada de la frecuencia de absorción de la vibración de valencia del grupo carbonilo. Los nuevos picos observados son una fuerte evidencia de injerto e indica claramente la formación de un nuevo copolímero por injerto (104).

4.17.1 Investigación por DSC del P (HB-g-VA).

Se llevó a cabo el análisis térmico del copolímero por injerto P (HB-g-VAc) obtenidos en diferentes solventes y en masa, antes y después de la saponificación. Las propiedades térmicas del P (HB-g-VAc) y el copolímero saponificado se investigaron por DSC. La Tabla 13 muestra los parámetros termodinámicos obtenidos del termograma. La Figura 25 muestra el termograma del copolímero por injerto P (HB-g-VA).

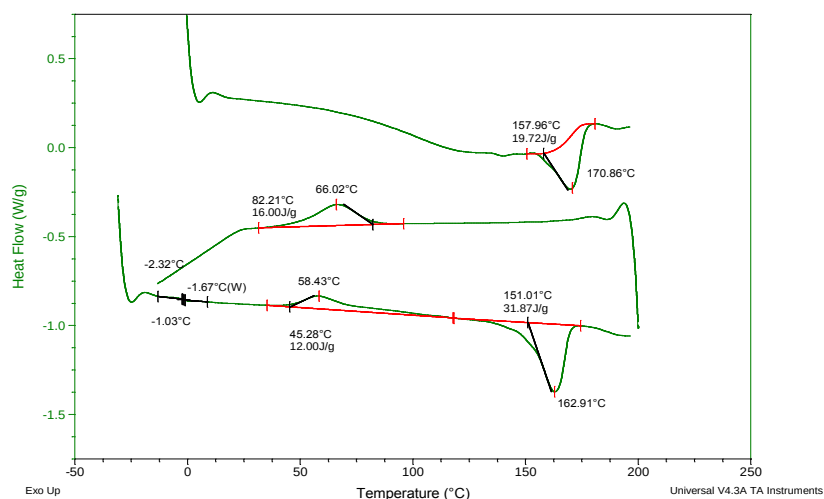


Figura 25 DSC del copolímero por injerto P (HB-g-VA).

La primera diferencia observada entre ambos materiales se identificó en los termogramas DSC de la primera corrida. El copolímero hidrolizado mostró una temperatura de fusión menor ($T_m=162\text{ }^{\circ}\text{C}$) con respecto al copolímero de injerto del PHB con el acetato de vinilo P (HB-g-VAc) ($T_m=168\text{ }^{\circ}\text{C}$). Esta disminución refleja la introducción de los grupos de alcohol vinílico no solamente en la región amorfa sino también en las regiones cristalinas del PHB. Además en termograma de la segunda corrida se observó que la temperatura de cristalización cambió su valor de $73,34\text{ }^{\circ}\text{C}$ correspondiente al P (HB-g-VAc) obtenido en masa, a $66,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ correspondiente al P (HB-g-VA) y la entalpía de cristalización (ΔH_c) cambió su valor de $51,77\text{ J/g}$ (P (HB-g-VAc)) a 16 J/g (P (HB-g-VA)). En la tercera corrida térmica se detectó de forma anómala, otro pico endotérmico, correspondiente a la temperatura de cristalización a los $58,43\text{ }^{\circ}\text{C}$, que implica cambios en el comportamiento de cristalización. Por otra parte, el valor de la entalpía de fusión (ΔH_m) del P (HB-g-VAc) fue de $66,49\text{ J/g}$ y para el copolímero saponificado fue de $31,87\text{ J/g}$, lo que difieren en aproximadamente en 34 unidades (J/g). Los resultados confirman por la técnica de DSC que se obtuvo exitosamente el copolímero por injerto P (HB-g-VA) (104).

4.17.2 Análisis del grado de injerto en el P (HB-g-VOH).

El grado de injerto del P (HB-g-VA) disminuyó con respecto al P (HB-g-VAc). Esto se debe a que el cálculo está basado en un balance de masas. La reacción de saponificación implica un detrimento en el peso molecular. Este resultado sugiere que el grado de injerto (W (%)) es dependiente de la masa. El grado de injerto debería ser invariable pues la hidrólisis actúa en las cadenas del acetato de vinilo injertado pero no crea nuevos sitios de injerto. Como ya se había comentado anteriormente se hace necesario el estudio de la

estructura química para determinar el índice de injerto. Sin embargo para el caso del P (HB-g-VA) se deduce que el valor del índice de injerto es el mismo que el obtenido para el P (HB-g-VAc) ya que la hidrólisis no afecta de forma significativa los posibles sitios a injertar ni los sitios injertados, lo que no se incluyó en este trabajo un estudio por Resonancia Magnética Nuclear de este material.

4.17.3 Estudio de hinchamiento del P (HB-g-VA).

Se realizó el estudio de hinchamiento del copolímero P (HB-g-VA). La Figura 26 muestra el grafico de peso (mg) vs tiempo del PHB, el P (HB-g-VAc) obtenido por injerto en masa (experimento B antes del estudio de solvente), y el P (HB-g-VA) obtenido por hidrólisis del polímero anterior. Se realizaron las membranas densas de sendos polímeros por el procedimiento descrito anteriormente.

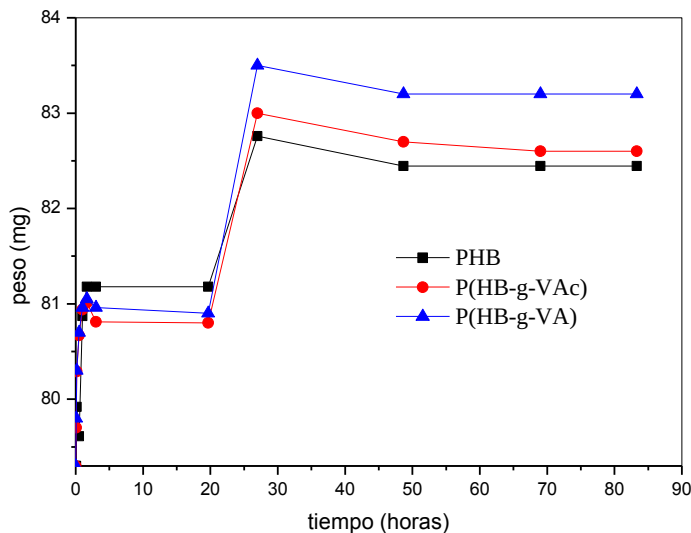


Figura 26 Estudio de hinchamiento del copolímero P (HB-g-VA).

De los resultados obtenidos se desprende que pasadas las 24 horas de estudio del hinchamiento en agua bidestilada, se obtuvieron los valores máximos de hinchamiento y luego la variación no fue importante, ya que las membranas alcanzaron el máximo hinchamiento y el peso de la misma se mantuvo invariable. Es de notar que el hinchamiento de los tres materiales es muy pobre, por los tamaños tan pequeños de las membranas (1 cm^2) y el relativamente bajo grado de injerto, pero se observa una clara tendencia de los copolímeros a incrementar su hidrofiliidad con respecto al PHB. El valor del grado de hinchamiento S (%) del PHB fue 3.9 %, siendo reproducible el experimento. Así mismo el hinchamiento del P (HB-g-VAc) fue de 4,3 % y el valor del hinchamiento del copolímero hidrolizado P (HB-g-VA) fue de 4.91 % mostrando un aumento con respecto a su antecesor. De manera concluyente el incremento del S (%) en ambos casos indica que se han obtenido materiales poliméricos con características más hidrofílicas que el PHB.

4.18 Polimerización de injerto radioinducido del MBu y el MA en el PHB.

Se prosiguió el estudio de la polimerización de injerto radioinducido en otros monómeros. Se escogieron dos monómeros típicos para su estudio, el ácido metacrílico y el butil metacrilato.

La Figura 27 muestra un esquema para la reacción de polimerización de injerto radioinducida de del ácido metacrílico y el butil metacrilato en el PHB. Esta es una propuesta basada en los resultados experimentales descritos anteriormente. Sin embargo, se necesitan más resultados experimentales que los obtenidos para probar y completar el mecanismo de la reacción. Sobre la base general de la polimerización de injerto radioinducida, se podría suponer que a pesar de la inactividad química del PHB, los

monómeros seleccionados pueden reaccionar hasta cierto punto, luego de la abstracción del protón del carbono terciario de la cadena carbonada del PHB y la formación del radical. Al igual que en el estudio anterior, se seleccionaron algunos solventes de baja constante de transferencia y diferentes polaridades (acetona, etanol y cloroformo) para la reacción de polimerización de injerto, con el propósito de mejorar el grado de injerto ($W(\%)$) de los monómeros seleccionados. Para realizar una comparación se realizó la reacción en masa (libre de solventes) (106).

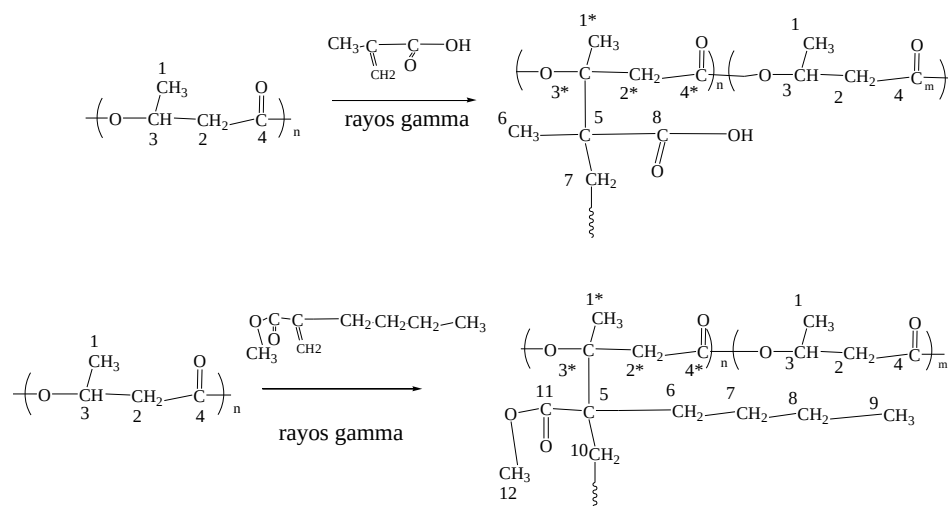


Figura 27 Reacción de polimerización radio-inducida del MA y el MBu en el PHB.

4.19 Análisis térmico de los polímeros P (HB-g-MBu) y P (HB-g-MA).

4.19.1 Análisis termogravimétrico del P (HB-g-MA).

Se estimó el grado de injerto de los copolímeros con MA y MBu por medio de las mediciones de termogravimetría (ATG). Los resultados de la termogravimetría proveen evidencias de la formación del copolímero por injerto basado en la cadena carbonada del

PHB y los monómeros elegidos. En general, la curva de termogravimetría del PHB injertado muestra dos pasos en su curva suave de pérdida de peso. Estos resultados indicaron que las temperaturas de descomposición del PHB y el monómero son diferentes. La composición en el copolímero por injerto puede ser determinada por el cálculo de la razón entre la pérdida de peso del primer paso y la pérdida de peso total. La Figura 28 muestra las curvas de TGA del PHB y los copolímeros por injerto P (HB-g-MA) obtenido en diferentes disolventes. Los resultados del análisis térmico mostraron que el grado de injerto es similar cuando se utiliza cloroformo (5,48 %) y acetona (5,16 %) para la reacción del MA en el PHB. Por otro lado, un mayor grado de injerto pudo ser alcanzado cuando se utiliza etanol (10,9 %) o una reacción en masa (9,69 %). En todos los casos, la masa residual es menor de 0.07 mg, lo que representa del 1-1,5 % de la masa inicial (106).

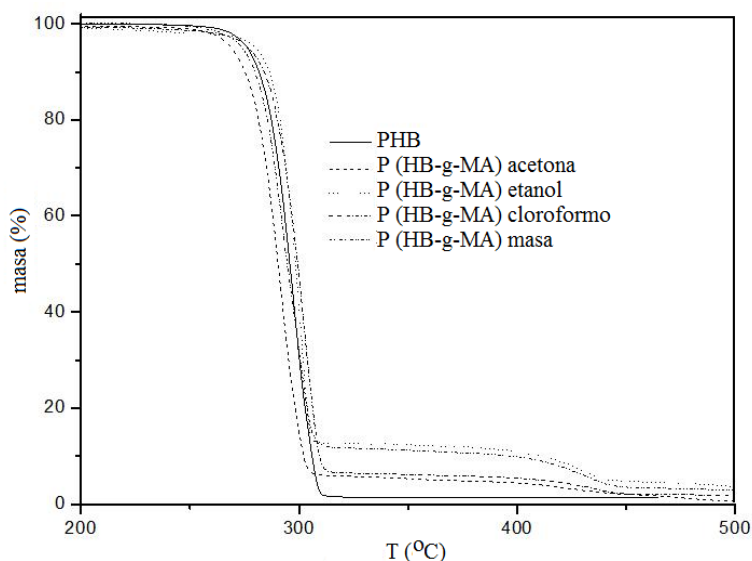


Figura 28 Análisis Termogravimétrico del P (HB-g-MA) obtenido por copolimerización radio-inducida.

4.19.2 Análisis termogravimétrico del P (HB-g-MBu).

Además, la Figura 29 muestra las curvas de ATG del PHB y los copolímeros por injerto P (HB-g-MBu) obtenidos en los diferentes solventes. El grado de injerto fue relativamente bajo en la reacción en masa (6%), mientras que un mayor grado de injerto puede ser obtenido para el MBu en el PHB si se utiliza etanol (32,21 %) y acetona (22,5 %) como disolventes. Si se utiliza el disolvente cloroformo el monómero no puede ser injertado en el PHB. Se concluyó que el etanol es el disolvente más favorable para las condiciones utilizadas, para el injerto del MBu y el MA en el PHB por copolimerización de injerto radio-inducida (106).

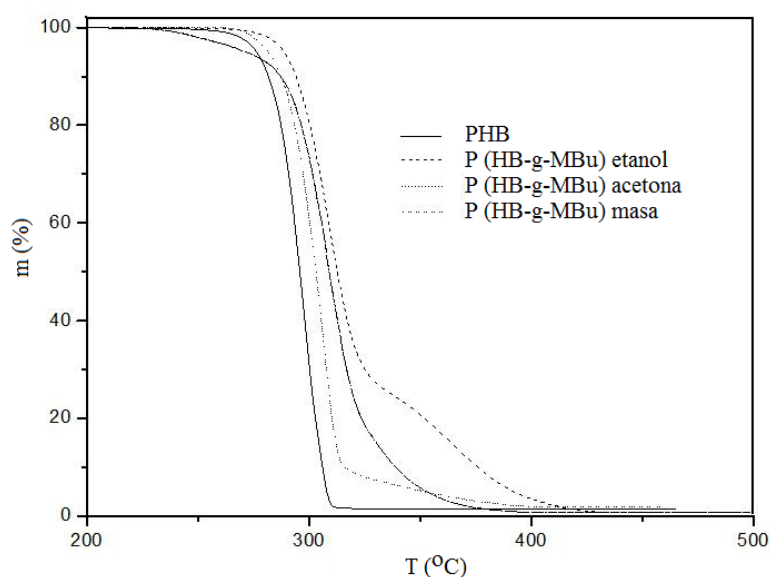


Figura 29 Análisis Termogravimétrico del P (HB-g-MBu) obtenido por copolimerización radio-inducida.

4.20 Estudio por DSC de los polímeros P (HB-g-MBu) y P (HB-g-MA).

4.20.1 Análisis calorimétrico del P (HB-g-MA).

Por otra parte se realizó el estudio calorimétrico de los copolímeros por la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido. La Figura 30 muestra el termograma del PHB puro y del copolímero por injerto P (HB-g-MA) sintetizado en las mismas condiciones experimentales pero en diferentes solventes. Se observó en el termograma de la segunda corrida térmica que en todos los casos los copolímeros por injerto mostraron dobles picos de fusión. Como ya se había mencionado, de acuerdo a previas investigaciones, la aparición del doblete de fusión se atribuye a procesos de recristalización e implica que el injerto no solo en regiones amorfas sino también en regiones cristalinas del PHB (105). Por tanto, los picos con la temperatura más alta se atribuyen a cristales recristalizados durante el proceso de calentamiento y el resto de los picos son probablemente consecuencia de la fusión de los cristales formados durante el proceso de enfriamiento. Es obvio que estos resultados son una importante evidencia de la perturbación que crea el injerto en la cristalinidad del PHB (106).

Por su parte, la Tabla 14 contiene los parámetros termodinámicos obtenidos de los termogramas de DSC de las muestras de los experimentos de tipo A3, B3, C3, D3 y E3, tales como la temperatura de fusión (T_m), la temperatura de cristalización (T_c), y la entalpía de cristalización (ΔH_c), la entalpía de fusión (ΔH_m), y la entalpía de fusión corregida por la fracción de peso del polímero que conforma el injerto, calculado por la siguiente ecuación:

$$(\Delta H_m)_{corr} = (\Delta H_m)(1 + W(\%)) \quad \text{Ecuación 45}$$

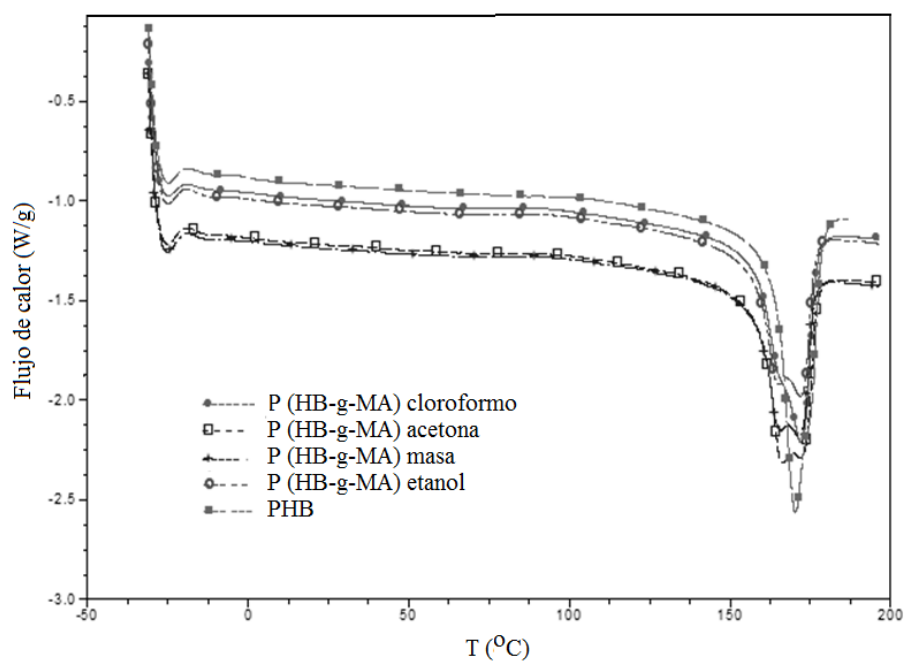


Figura 30 Curvas de DSC del PHB y el P (HB-g-MA) en estudio del solvente para la obtención de copolímeros.

Tabla 14 Parámetros termodinámicos obtenidos de los termogramas del P (HB-g-MA).

Muestra	Polímero	W (%)	ΔH_c (J/g)	T_c (°C)	ΔH_m (J/g)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g) _{corr}	T_g (°C)
A3	PHB	0	92,45	97,43	103,8	170,23	103,8	1
B3	P(HB-g-MA) acetona	5,16	71,50	82,81	52,29 y 41,98	167,90 y 172,47	54,98 y 44,14	9,5
C3	P(HB-g-MA) cloroformo	5.48	70,89	78,76	47,39 y 49,21	166,30 y 172,13	49,98 y 51,90	5,4
D3	P(HB-g-MA) masa	9.69	63,37	82,65	31,68 y 53,27	165,84 y 171,48	34,72 y 58,38	8
E3	P(HB-g-MA) etanol	10.9	65,92	83,67	32,16 y 55,72	165 y 171,97	35,67 y 61,80	7,5

De los resultados recopilados en la Tabla 14, se puede observar que el (ΔH_m) y el $(\Delta H_m)_{corr}$ del copolímero por injerto disminuyó con el incremento del grado de injerto. Se concluyó que la disminución observada no se debe al relativo descenso del contenido del PHB en el copolímero de injerto, sino que es probablemente una consecuencia del injerto uniforme en las regiones cristalinas del PHB luego de haber reaccionado en las regiones amorfas.

Sin embargo, la temperatura de fusión y de cristalización disminuyó en todos los casos con respecto al valor de la temperatura del PHB, pero no se encontró diferencia significativa con la variación del grado de injerto. Por tanto, se puede concluir que los resultados del grado de injerto son bastante bajos y similares para los resultados experimentales encontrados. Consecuentemente, se observa en estos parámetros una cierta variación aleatoria. Por otro lado, la temperatura de transición vítrea (T_g) mostró el siguiente comportamiento: El valor de la T_g aumentó su valor en todos los casos con respecto al PHB, pero no se observó una relación directa con el $W(\%)$. Esto podría deberse a cambios estructurales que ocurrieron en la molécula de PHB, los cuales no podrían ser explicados en la base de los resultados de la DSC (106).

4.20.2 Análisis calorimétrico del P (HB-g-MBu).

Las curvas típicas de DSC del PHB y de los copolímeros por injerto obtenidos de la copolimerización de injerto radio-inducida del BuM con el PHB en diferentes solventes (A, F, G y H) se muestran en la Figura 31. Por analogía con los resultados obtenidos para el injerto del MA en el PHB, se puede discutir que el P (HB-g-MBu) también mostró en todos los casos un doble pico de fusión, lo cual implica lo discutido anteriormente, cambios en el comportamiento de la cristalización. Los resultados sugieren que la

habilidad de cristalización del PHB se debilita debido a la introducción del metacrilato de butilo, el cual puede perturbar su cristalización como sucedió con el MA.

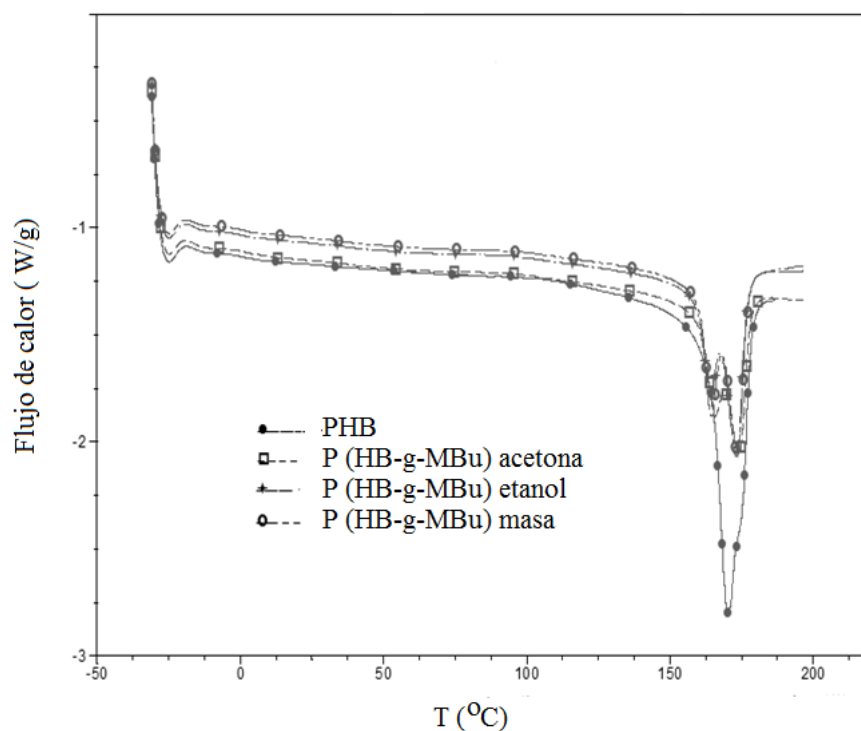


Figura 31 Curvas de DSC del PHB y el P (HB-g-MBu)

El análisis de los datos de la Calorimetría Diferencial de Barrido del PHB y los copolímeros P (HB-g-MBu) se muestran en la Tabla 15. Se encontró que todos los parámetros termodinámicos (ΔH_m , $(\Delta H_m)_{corr}$, T_c y T_m) de los copolímeros de injerto, disminuyeron su valor con respecto al PHB, con el incremento del grado de injerto $W(\%)$. Es sorprendente como se observa en el mayor grado de injerto una tendencia a aumentar su valor en todos los casos. Sin embargo la explicación para este fenómeno no

es aún clara, esto podría deberse a cambios estructurales, pero es necesario obtener más evidencias experimentales para explicarlo (106).

Tabla 15 Parámetros termodinámicos obtenidos de los termogramas del P (HB-g-MA)

Muestra	Polímero	W (%)	ΔH_c (J/g)	T_c (°C)	ΔH_m (J/g)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g) _{corr}	T_g (°C)
A3	PHB	0	92,45	97,43	103,8	170,23	103,8	1
F3	P(HB-g-BuM) masa	6	54,34	87,18	37,40 y 32,95	164,31 y 173,52	39,64 y 34,93	4,5
G3	P(HB-g-BuM) acetona	22,5	46,71	82,21	30,08 y 34,38	165,83 y 174,04	36,848 y 42,11	4,9
H3	P(HB-g-BuM) etanol	32,21	50,98	83,13	35,70 y 40,18	163,86 y 173	47,19 y 53,12	5,7

Se realizó el análisis de los datos obtenidos. Se puede observar con claridad que la temperatura de transición vítrea aumenta con el incremento del grado de injerto. Esta observación implica que probablemente ocurre una interacción más fuerte del MBu con el PHB que aquella ocurrida entre el polímero y el MA. Además, una inspección visual del grado de injerto muestra claramente que la extensión del grado de injerto es mayor en el MBu que en el MA, donde el grado de injerto escasamente varía.

De manera concluyente, es necesario entonces señalar que en virtud de los resultados obtenidos en las investigaciones por DSC, los mismos están en completo acuerdo con la formación de copolímeros de MA y MBu en el PHB (106).

Es importante destacar que el estudio de Resonancia Magnética Nuclear de los copolímeros P (HB-g-MBu) y P (HB-g-MA) no se pudieron realizar debido a la insolubilidad de los copolímeros en solventes orgánicos. Por lo tanto se recurrió a otras técnicas para verificar el injerto.

4.21 Estudios de espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier.

Se utilizó la espectroscopia Infrarrojo con Transformada de Fourier para verificar el injerto del MBu y el MA en el PHB. Se muestran en las Figuras 32 (P (HB-g-MBu)) y 33 (P (HB-g-MA)) los espectros de transmitancia FTIR de los copolímeros por injerto obtenidos en diferentes solventes. Como los espectros fueron medidos en el modo de transmitancia entonces los picos de la región $1000\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ están saturados (No se muestra la región en la Figura).

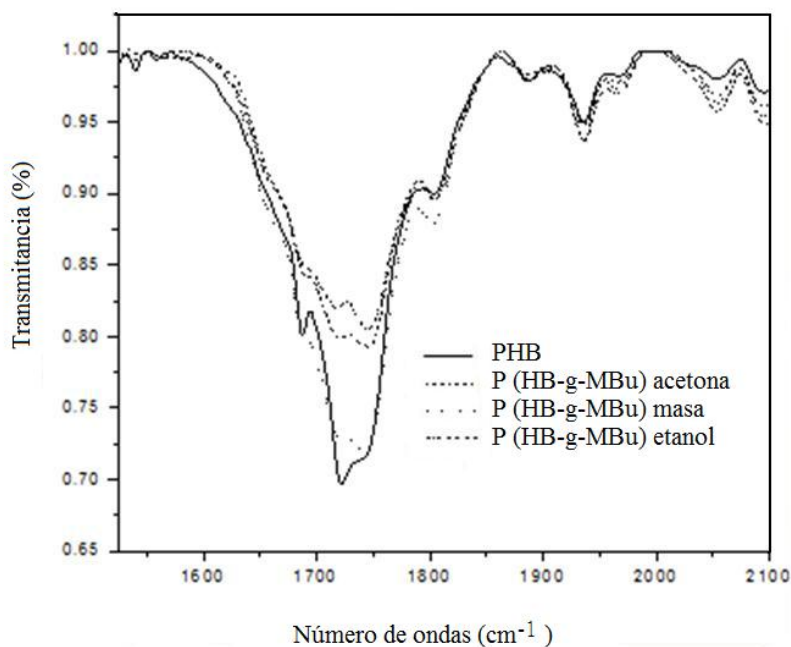


Figura 32 Espectro FTIR del PHB y el P (HB-g-MBu) obtenidos en diferentes solventes.

El PHB muestra bandas a 1185 , 1228 y 1279 cm^{-1} , características de ν (C-O-C) y una banda a 1382 cm^{-1} característica del δ (CH₃). En la región del éster carbonílico se puede considerar la banda de valencia carbonílica C=O (1729 cm^{-1}). Todas las señales

mencionadas son comunes para ambos materiales. Desafortunadamente, el espectro de los copolímeros por injerto no mostró diferencias significativas en la posición de las bandas, porque los monómeros utilizados para el injerto tienen los mismos grupos funcionales que el PHB. Este hecho explica porque no se observan otras bandas. Sin embargo algunas diferencias fueron encontradas para verificar el injerto. El espectro infrarrojo del P (HB-g-MBu) (Figura 32) muestra el siguiente comportamiento (a) Diferencias en las intensidades de las bandas carbonílicas (1724 cm^{-1} , 1740 cm^{-1}), (b) la intensidad de las bandas disminuye con el incremento del grado de injerto. Este resultado es consistente con la variación del grado de cristalinidad como una consecuencia del injerto. Con el propósito de determinar la variación relativa del grado de cristalinidad, se calculó el criterio de cristalinidad (CC (%)). La banda a 1722 cm^{-1} es característica del estado cristalino, y la banda a 1740 cm^{-1} , es característica del estado amorfo. El CC (%) se define como la razón entre el valor de la absorbancia a 1722 cm^{-1} y su valor a 1740 cm^{-1} . Es importante mencionar que esta última definición representa una medición relativa del grado de cristalinidad. La Tabla 16 muestra estos resultados. Se observa con claridad que el CC (%) del P (HB-g-MBu) disminuye con el incremento del grado de injerto.

Por otro lado, la Figura 33 muestra el espectro infrarrojo del PHB y los copolímeros P (HB-g-MA) obtenidos en diferentes solventes, en la región ($3300\text{-}3900\text{ cm}^{-1}$). La banda ancha se asigna a la valencia OH característica del ácido carboxílico y la valencia del OH que se encuentra en los grupos terminales de la cadena carbonada del PHB. Además, el espectro muestra una variación en las intensidades de la banda centrada en los 3430 cm^{-1} como una evidencia adicional del injerto del MA (106).

Tabla 16 Estudio de cristalinidad del PHB y el los copolímero por injerto obtenidos por copolimerización radio-inducida (P (HB-g-MBu) y P (HB-g-MA)).

	PHB	P(HB-g-MA)				P(HB-g-MBu)		
		acetona	cloroformo	masa	etanol	masa	acetona	etanol
W (%)	0	5.16	5.48	9.69	10.9	6	22.5	32.2
CC (%)	1.028	1.004	0.991	1.025	1.012	0.9926	0.9920	0.985

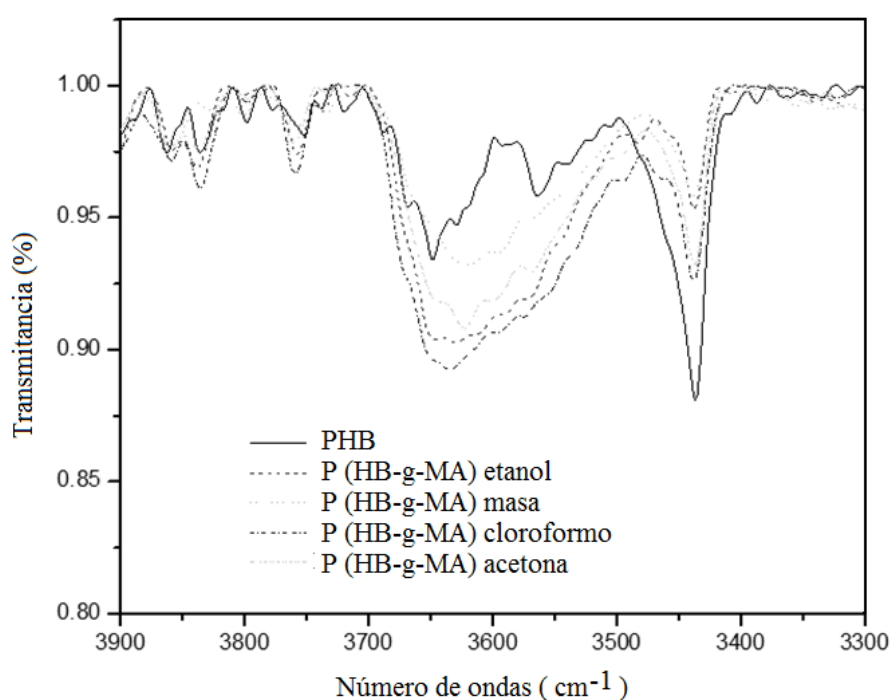


Figura 33 Espectro FTIR del PHB y el P (HB-g-MA) obtenidos en diferentes solventes.

La evidencia más sólida de que ocurrió injerto, fue observada en el espectro con la aparición de una banda en crecimiento en intensidad, la cual es muy ancha y está centrada a los 3630 cm^{-1} . El grado de cristalinidad fue también determinado para este material. El

CC (%) para el copolímero disminuyó en todos los casos. Sin embargo, no se encontró una relación clara con respecto al grado de injerto. Probablemente, la explicación de esto sea que el grado de injerto es bastante bajo y similar para el material estudiado (Tabla 16)

4.22 Estudios de hinchamiento de los copolímeros P (HB-g-MA) y el P (HB-g-MBu).

La Tabla 17 muestra los datos del porcentaje de hinchamiento ($S(\%)$) para el P (HB-g-MA) y el P (HB-g-MBu). Los valores tabulados son los más altos que se obtuvieron por los copolímeros de injerto luego de 30 minutos de estudio. En cada caso, los porcentajes de hinchamiento son invariantes. Además, la Tabla 17 muestra las velocidades de iniciación del proceso de hinchamiento (masa de agua (mg) que el polímero toma al inicio del proceso de hinchamiento por hora). Estos valores fueron calculados por regresión lineal de los datos de la masa de agua absorbida por los materiales poliméricos vs tiempo al inicio. Las tangentes de estas líneas son las velocidades de iniciación del proceso de hinchamiento (106).

Tabla 17 Experimentos de hinchamiento en P (HB-g-BuM) y P (HB-g-MA).

Muestra	S (%)	V_o (agua mg/ horas)
PHB	3,3	1.22
P(HB-g-BuM)	208	67,30
P(HB-g-MA)	118	26,36

S (%): Porcentaje de hinchamiento; V_o : (agua mg/ horas) tasas iniciales del proceso de hinchamiento

La Figura 34 muestra el gráfico del porcentaje de hinchamiento $S(\%)$ versus tiempo para el PHB, el P (HB-g-MA) y P (HB-g-MBu) de los experimentos de injerto realizados en etanol, es decir se prepararon membranas del copolímero de máximo grado de injerto.

De la Figura se observa que los copolímeros de injerto mejoraron su hidrofiliidad. Estos resultados son consistentes con el incremento de las características hidrofílicas del PHB.

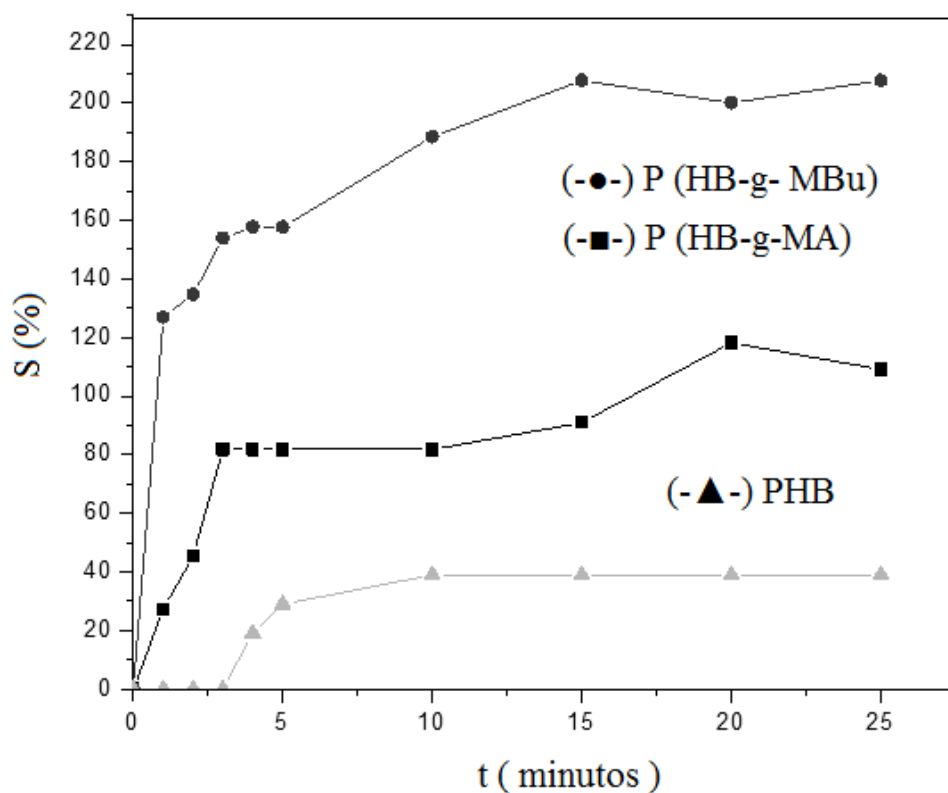


Figura 34 Estudios de hinchamiento para (-▲-) PHB, (-■-) P (HB-g- MA) y (-●-) P (HB-g-MBu)

4.23 Polimerización por injerto radioinducido de la AAm en el PHB.

Para el estudio de la polimerización por injerto radioinducido de la acrilamida en el PHB por el método de irradiación simultánea y el estudio del efecto del solvente en la síntesis del copolímero, se utilizó la siguiente nomenclatura. Se designó M00 al polímero PHB no irradiado, M0 al polímero PHB irradiado, M1 (copolímero obtenido en acetona), M2

(copolímero obtenido en metanol), M3 (copolímero obtenido etanol), M4 (copolímero obtenido en acetato de etilo), M5 (copolímero obtenido en cloroformo). Al igual que en los estudios anteriores, los solventes escogidos son de bajo valor de constante de transferencia de cadena, para evitar las reacciones de terminación por transferencia de cadena y diferentes polaridades. Los valores M1, M2, M3, M4 y M5 constituyen la nomenclatura de tipos de experimentos donde se evaluó la repetitividad del experimento por un mínimo de 5 veces obteniéndose diferencias no significativas en la determinación del grado de injerto. No se realizó la polimerización en masa porque la AAm es un monómero sólido y no es posible obtener copolímeros en masa utilizando esta técnica.

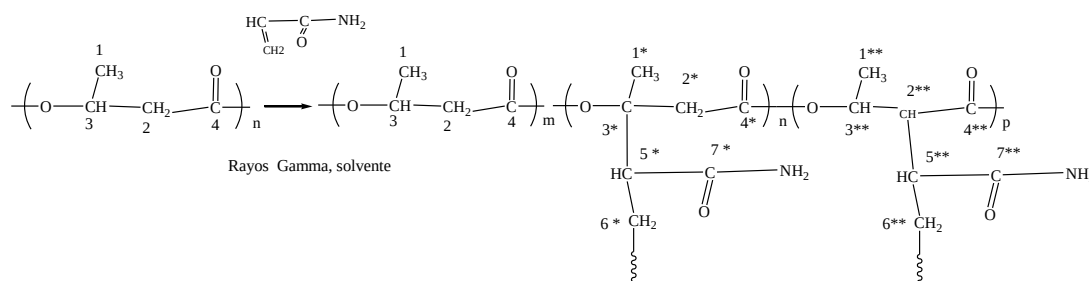


Figura 35 Reacción de polimerización por injerto radioinducido de acrilamida en el PHB.

La Figura 35 muestra la reacción general de polimerización por injerto radioinducido de la AAm en el PHB. Al igual que los copolímeros anteriores, el esquema de la reacción y la estructura sugerida se realizó de acuerdo con las evidencias experimentales que se han encontrado. También se tuvo en cuenta la variable solvente, por ser uno de los parámetros obvios que afectan la reacción de polimerización. En la estructura se sugirió el injerto no solo por el carbono metínico sino por el carbono metilénico del PHB. Esta sugerencia

proviene de resultados experimentales que se mostrarán posteriormente. La selección de la fuente, la dosis y tasa de dosis fue realizada tomando en cuenta la experiencia de síntesis en estos materiales (82) (106) (104) (107).

4.24 Análisis morfológico del P (HB-g-AAm) por SEM.

La Figura 36 muestra el análisis de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés) y presenta la morfología del PHB en polvo, antes y posterior al injerto.

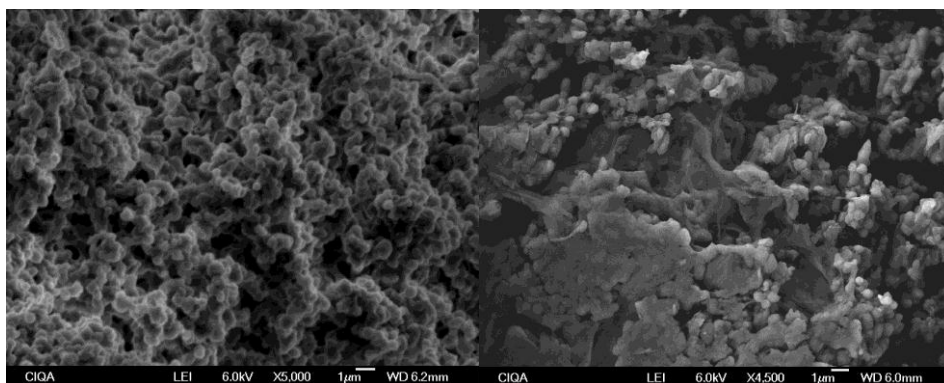


Figura 36 Microscopía Electrónica de Barrido de las muestras M0 (izquierda) y M5 (derecha).

El comportamiento de la morfología fue similar en todos los casos (M1-M5) pero se escogió el copolímero de los experimentos de tipo M5, porque son los que mejor confirman los cambios de la superficie del polímero. La Figura 36 claramente muestra que la superficie del PHB es uniformemente ondulatoria con pequeños poros claramente definidos. Sin embargo la micrografía del copolímero P (HB-g-AAm) (M5) muestra una menor porosidad, y menos cavidades que M0. También se observa que la superficie de M5 se transforma parcialmente en una apariencia lisa. La superficie cambia substancialmente luego del injerto, tornándose áspera, probablemente porque la AAm ha

afectado las zonas amorfas del PHB de partida. De manera concluyente, la comparación de ambos materiales conlleva a la confirmación del injerto por la notable diferencia en la morfología de ambos materiales poliméricos.

4.25 Análisis termogravimétrico del P (HB-g-AAm).

Los resultados del ATG proveen evidencia de la formación del copolímero por injerto basado en el PHB de partida y el monómero seleccionado. La Figura 37 muestra las curvas termogravimétricas del PHB y los copolímeros P (HB-g-AAm) obtenidos en diferentes solventes. El grado de injerto se estimó utilizando esta técnica. Del gráfico se puede observar que la curva termogravimétrica muestra dos pasos en la curva de pérdida de peso. Esta observación indica con claridad que la temperatura de descomposición del PHB y el copolímero son diferentes. El grado de injerto y la composición del copolímero pueden ser determinadas a partir de la relación de la pérdida de peso del primer salto comparado con la pérdida de peso total. El análisis térmico indica que el grado de injerto es similar cuando se utiliza solventes polares como metanol, etanol y acetona, obteniéndose valores de 31.5 % (M1), 38 % (M2), y 27.3 % (M3) respectivamente. Un mayor valor del grado de injerto (48.1 %) se obtuvo cuando se utilizó acetato de etilo como solvente. El valor más alto del grado de injerto se obtuvo en la muestra M5, con el uso del solvente cloroformo, obteniéndose valores de hasta 91 %, lo que se concluyó que este es el solvente más favorable para esta reacción química. Los resultados fueron sorprendentes porque se esperaba que el cloroformo no fuera un solvente apropiado para esta reacción por los iones cloruro que son conocidos por ser iones que provocan reacciones de terminación. Al parecer la reacción de copolimerización se vio favorecida porque el PHB se disuelve en cloroformo, lo que permitió que las moléculas de AAmm y

de PHB estuvieran en estrecho contacto durante la reacción química. Por su parte, en todos los termogramas obtenidos, la masa residual es menor a 0.07 mg, que representa menos del 2% de la masa inicial.

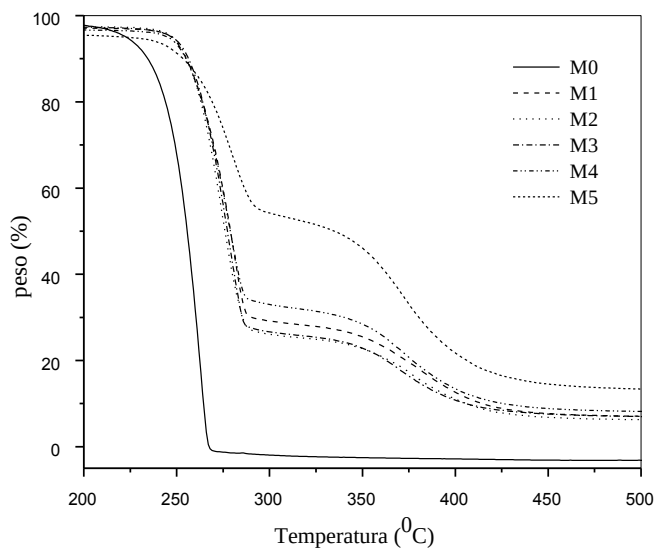


Figura 37 ATG del PHB y el P (HB-g-AAm) obtenidos por polimerización de injerto radioinducido en diferentes solventes.

4.26 Estudio por FTIR de los copolímeros P (HB-g-AAm).

La técnica de espectroscopia infrarroja se utilizó para verificar el injerto radioinducido de la AAm en el PHB. Las Figuras 38 y 39 muestran los espectros de FTIR en modo de transmitancia de los copolímeros estudiados en los diferentes solventes. Los estudios se realizaron en la región de 3500 a 2500 cm^{-1} (Figura 38) en la región de 2000 a 700 cm^{-1} (Figura 39).

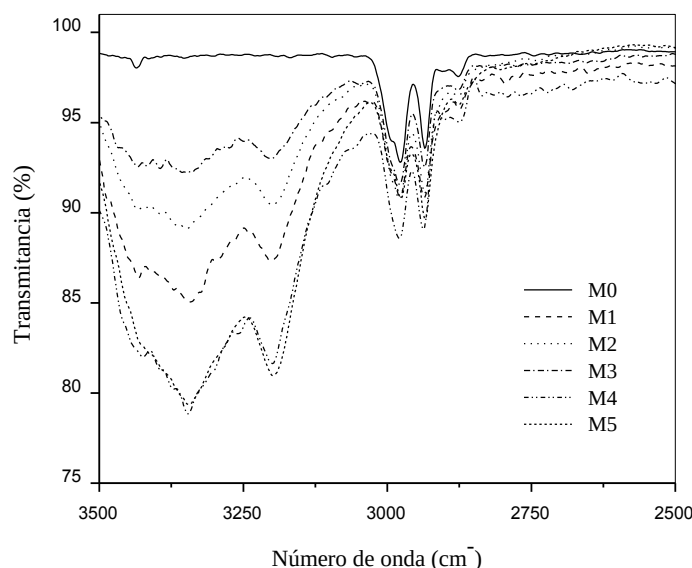


Figura 38 Espectro FTIR en modo de transmitancia del copolímero P (HB-g-AAm) obtenido en diferentes solventes: región 3500 a 2500 cm^{-1} .

Como los espectros fueron medidos en el modo de transmitancia entonces los picos de la región $1000\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ están saturados. Las bandas a 1185 cm^{-1} , 1228 cm^{-1} , y 1279 cm^{-1} son las características que ya se conocen de las vibraciones de valencia del grupo éster del PHB. Por su parte, la banda a 1382 cm^{-1} , corresponde a las vibraciones de doblaje del grupo C-H ($\delta(\text{CH}_3)$). En la región éster carbonílica, se observa la banda C=O a los 1729 cm^{-1} . Las señales anteriormente descritas son comunes para el PHB y el copolímero en estudio. Sin embargo el P (HB-g-AAm) muestra las siguientes nuevas señales: a) Los picos a 3345 cm^{-1} y 3197 cm^{-1} se asignan a los grupos NH_2 que corresponden a las vibraciones de valencia simétricas y antisimétricas de los enlaces N-H. b) El pico a 1665

cm^{-1} corresponde a las vibraciones de valencia del grupo carbonilo de la PAAm y c) El pico a 1453 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de doblaje N-H (δ (N)).

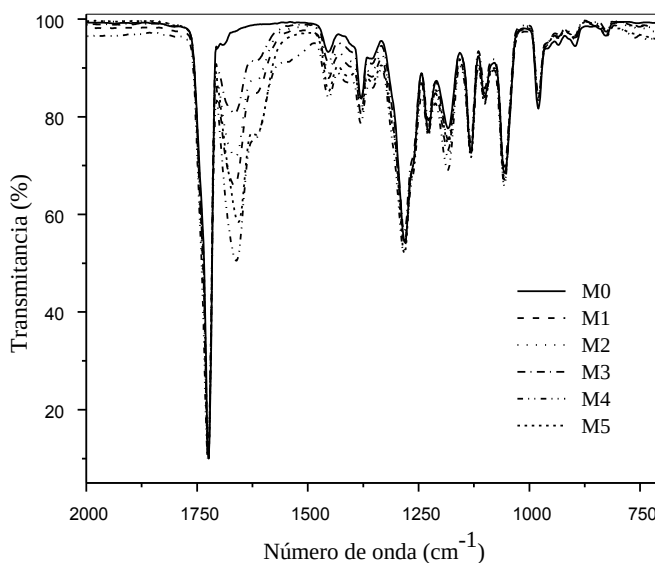


Figura 39 Espectro FTIR en modo de transmitancia del copolímero P (HB-g-AAm) obtenido en diferentes solventes: región 2000 a 700 cm^{-1} .

La Figura 39 muestra las diferencias en las intensidades de las señales del espectro de cada uno de los copolímeros por injerto obtenidos en diferentes condiciones experimentales. Es importante destacar que la señal a 1610 cm^{-1} que corresponde al monómero acrilamida (doble enlace), no es importante en este espectro, y su presencia se debe probablemente a cantidades pequeñas de monómeros que han quedado atrapadas en el enrejado molecular del poli (3-hidroxibutirato) y que no pudieron ser separadas del mismo a través de los métodos de purificación utilizados. La presencia de estas señales

de poliacrilamida bien separadas de las señales del PHB verifica que el injerto radioinducido de la AAm en el PHB fue obtenido.

4.27 Estudio de la cristalinidad del P (HB-g-AAm).

El espectro FTIR en modo absorbancia del PHB y los copolímeros P (HB-g-AAm) obtenidos en diferentes solventes se muestran en la Figura 40.

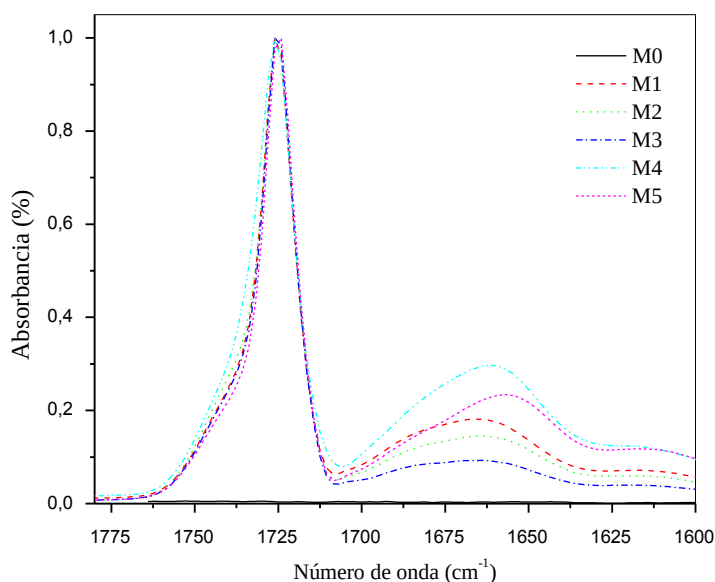


Figura 40 Espectro FTIR en modo de absorbancia del copolímero P (HB-g-AAm) obtenido en diferentes solventes: región 1780 a 1600 cm^{-1} .

Este espectro muestra las siguientes características: a) Diferencias entre las intensidades de las bandas a 1724 cm^{-1} y 1700 cm^{-1} y b) La intensidad de las bandas decrece con el incremento del grado de injerto. Estos resultados son consistentes con la variación del grado de cristalinidad como consecuencia del injerto. Se realizó el cálculo del criterio de cristalinidad CC (%), y el índice de cristalinidad A_c (%), para determinar la variación relativa de estos parámetros.

Tabla 18 Estudio de la cristalinidad del PHB y los copolímeros P (HB-g-AAm) obtenidos por polimerización de injerto radioinducido.

Muestra	$A_c(\%)$,	$CC(\%)$	$C(\%)$	$W(\%)$
M0	68.0	5.02	0.00	0.00
M2	64.6	3.66	0.21	0.38
M3	66.0	3.58	0.21	0.27
M1	63.0	3.40	0.24	0.32
M4	62.0	3.40	0.25	0.48
M5	60.0	3.30	0.48	0.91

La Tabla 18 resume el estudio del grado de cristalinidad del PHB y de los copolímeros P (HB-g-AAm) obtenidos por polimerización de injerto radioinducido de la AAm en el PHB en diferentes solventes, con respecto al grado de injerto. Se puede observar con claridad que el grado de cristalinidad de los copolímeros decrece con respecto al PHB con el aumento del grado de injerto. Sin embargo, se pueden observar algunas irregularidades debido a que los polímeros obtenidos en los experimentos de tipo M1, M2 y M3 tienen valores similares del grado de injerto. El resultado es consistente con la variación esperada del grado de cristalinidad como consecuencia del injerto.

4.28 Estudio por DSC de los copolímeros P (HB-g-AAm).

De las investigaciones anteriores conocemos el comportamiento calorimétrico del PHB y sus copolímeros obtenidos por injerto radioinducido. La Figura 41 muestra los termogramas DSC del PHB y los copolímeros P (HB-g-AAm) obtenidos en diferentes condiciones experimentales. Se puede observar dobles picos de fusión en todos los casos.

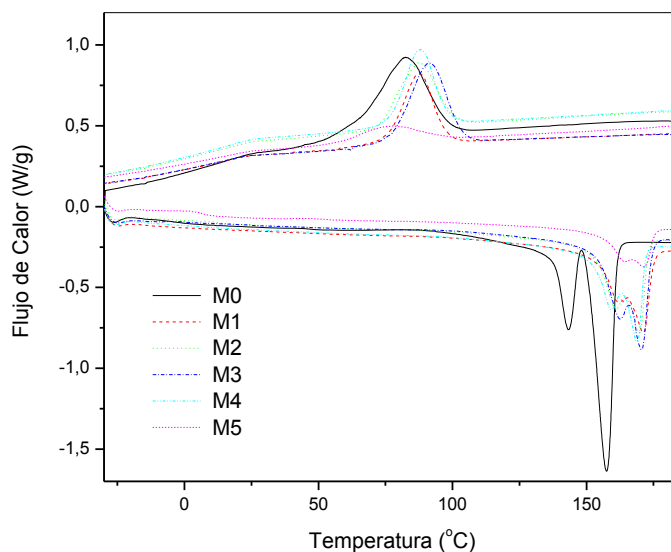


Figura 41 Curvas de DSC del PHB y los copolímeros P (HB-g-AAm) obtenidos en diferentes solventes.

En la literatura se explica que el pico con menor temperatura de fusión podría identificarse como el del valor verdadero de la temperatura de fusión y representa a los cristales de PHB que no han sido afectados por la eliminación de la historia térmica, es decir los cristales de PHB que no han sufrido cambios en su microestructura (unannealed, por su traducción en inglés), mientras que el pico de fusión a mayor temperatura representan a los cristales que experimentan cambio microestructurales a esas temperaturas (108) (109). Con relación a esto, se ha concluido que la aparición de doblaje en los picos de fusión se atribuye a complejos procesos de recrystalización. Por otra parte el análisis calorimétrico del PHB no irradiado (M00) indica que este material no presenta doble pico de fusión lo que indica que este fenómeno no es solo consecuencia del injerto sino una influencia de las radiaciones ionizantes (110) (111).

El primer barrido del estudio calorimétrico (ver Figura 41) muestra la variación en las curvas endotérmicas del proceso de enfriamiento, proveyendo una importante evidencia de la distorsión de la cristalinidad del material polimérico posterior a la reacción de injerto (104) (106).

Tabla 19 Parámetros termodinámicos obtenidos de los termogramas DSC del PHB y los copolímeros P (HB-g-AAm).

Muestra	$\Delta H_c (J/g)$	$T_c (^\circ C)$	$\Delta H_m (J/g)$	$(\Delta H_m)_c (J/g)$	$T_m (^\circ C)$
M00	92.5	97.4	103.8	103.8	170.2
M0	73.9	82.6	53.5; 21.9	53.5; 21.9	157.5 ; 143.2
M2	40.4	87.6	53.3	73.5	169.6 ; 160.9
M3	50.9	90.9	61.5	78.3	170.5 ; 162.7
M1	39.7	87.6	45.7	60	171.2 ; 162
M4	39.4	87.9	51.5	76.3	169 ; 159.4
M5	16.8	76.1	24.3	46.4	171.2 ; 164.2

La Tabla 19 enlista los parámetros termodinámicos obtenidos por los termogramas DSC de las muestras M00, M0, M1, M2, M3, M4 y M5, tales como la temperatura de fusión (T_m), la temperatura de cristalización (T_c), y la entalpía de cristalización (ΔH_c), la entalpía de fusión (ΔH_m), y la entalpía de fusión corregida por la fracción de peso del polímero que conforma el injerto, calculado por la ecuación 45.

De la Figura 41 y la Tabla 19, la cual resume los resultados, se puede notar que hay una clara tendencia a la disminución de los valores termodinámicos con el incremento del grado de injerto de la AAAm en el PHB. La temperatura de cristalización disminuyó con respecto a M00 en todos los casos. Los valores se muestran similares comparado con los diferentes grados de injerto (M1-M4), mostrando un ligero descenso para el producto M5,

que es el de mayor grado de injerto. Por su parte la entalpía de fusión muestra una similar disminución con respecto a M0 y M00, valores similares para los productos (M1-M4) y un descenso sustancial para el producto M5. En estos experimentos no se encontraron cambios importantes en la temperatura de fusión y no fue posible detectar por esta técnica la temperatura de transición vítrea. Se concluye que los resultados obtenidos en el DSC son consistentes con los resultados del FTIR en la verificación de la formación de copolímeros por injerto y la disminución del grado de injerto con el incremento del grado de injerto. Estos resultados sugieren que la habilidad de cristalizar del PHB se torna débil debido a la introducción del monómero AAm en la cadena carbonada del polímero y que el injerto no solo ocurre en la zona amorfa del biomaterial sino que perturba parcialmente su región cristalina.

4.29 Análisis de la estructura por Resonancia Magnética Nuclear.

Dado el grado de complejidad de la reacción de polimerización radioinducida, varios tipos de productos son obtenidos de forma simultánea. Los productos más importantes son: a) PHB que no reaccionó, b) copolímero por injerto y c) copolímero por injerto ramificado. El copolímero por injerto obtenido (P (HB-g-AAm)) fue analizado y resultó ser insoluble en todos los solventes orgánicos. Un resultado similar ocurrió con el producto del injerto del MBu y el MA en el PHB, lo que impidió poder realizar el análisis por Resonancia Magnética Nuclear. A sabiendas de esto, se decidió estudiar la fracción soluble en cloroformo deuterado caliente, la cual fue separada y estudiada por RMN con la finalidad de encontrar alguna evidencia estructural del injerto de la AAm. En un primer acercamiento se realizó el análisis RMN-¹³C de la muestra M5. Se escogió la muestra M5 por ser la de mayor grado de injerto. Se obtuvo una señal a los 94.4 ppm, la cual fue

descartada como una evidencia de injerto, ya que en previos estudios se había detectado esta señal como una señal de ruido del equipo.

En un segundo acercamiento, se realizó la técnica de correlación de enlace múltiple heteronuclear (HMBC, por sus siglas en inglés), se llevó a cabo para detectar acoplamientos de largo alcance entre protones y carbonos en el copolímero por injerto.

En las Figuras 42 y 43, los corrimientos del RMN- ^1H , a $\delta = 0,9-1,15$ ppm, $\delta = 2,5-3$ ppm, y $\delta = 5,0-5,5$ ppm pertenecen a los protones de $-\text{CH}_3$, CH_2 y CH respectivamente de los materiales PHB y P (HB-g-AAm).

En el espectro se observó que las señales del copolímero son más anchas que las del material de partida lo que generalmente es una consecuencia de la polimerización. De forma adicional se obtuvo el espectro RMN- ^{13}C y se encontró que además de las señales típicas del PHB ($\delta = 19$ ppm, $\delta = 40$ ppm, $\delta = 76-77$ ppm y $\delta = 169$ ppm, correspondiente a los carbonos de CH_3 , CH_2 , cloroformo, y CH respectivamente) se obtuvieron dos nuevas señales en la región $\delta = 24-34$ ppm, las cuales se atribuyeron a señales de resonancia de los corrimientos de los carbonos de los grupos CH_3 y CH_2 de acuerdo con un nuevo entorno molecular debido al injerto.

Por los resultados, se espera que el injerto ocurra en cierta extensión en los carbonos metínicos y metilénicos del PHB, pero con una mayor afinidad al sitio metilénico.

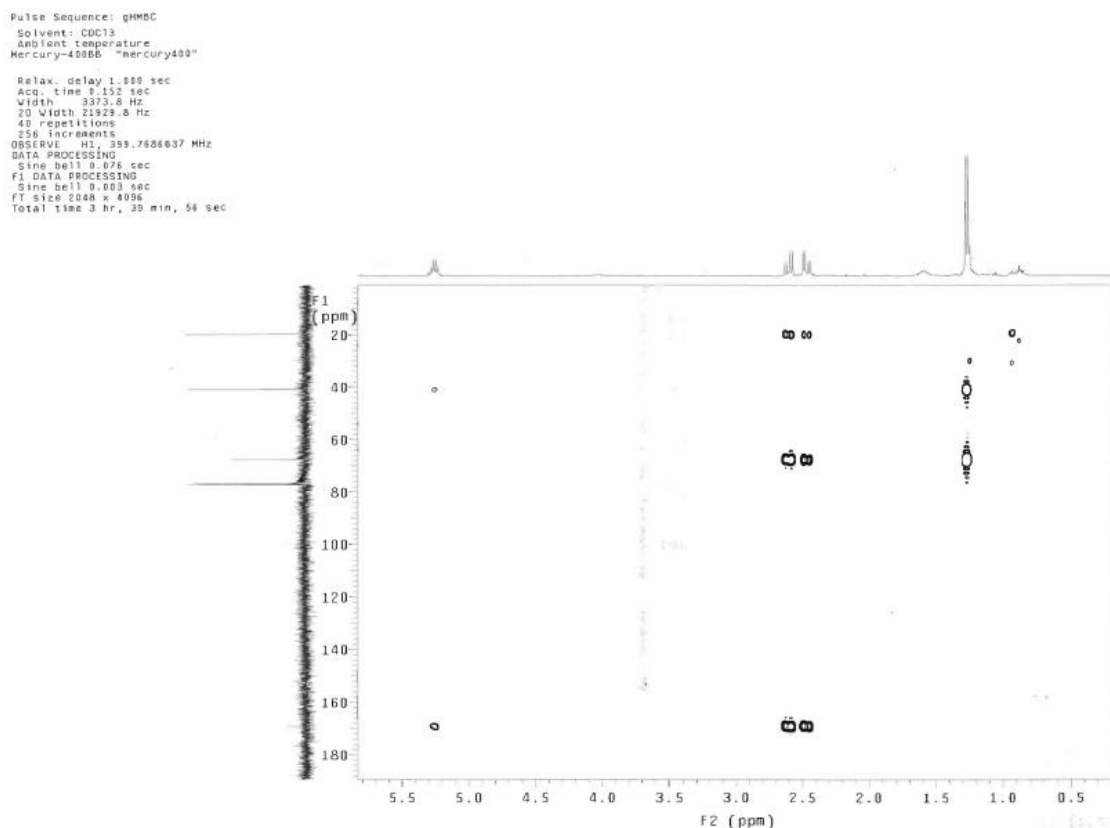


Figura 42 Espectro RMN de Coherencia Cuántica Múltiple Heteronuclear del PHB.

La expectativa anterior fue confirmada por la técnica HMBC (Figuras 42 y 43). En la zona de la huella del espectro se encontraron dos diferencias importantes: a) El acoplamiento $\text{CH}^*-\text{C}^*\text{H}_3$ y b) el acoplamiento $\text{CH}^*_3-\text{C}^*\text{H}_3$. Las diferencias indican la posibilidad de injerto por el sitio metilénico del PHB. Esta última interacción se observó en la huella del espectro, que probablemente muestra la separación debido al átomo de oxígeno del grupo carboxilo que desplaza la interacción con $-\text{C}^*\text{H}_3$. Por otra parte se observa que interacción de la huella $\text{CH}^*_3-\text{C}^*\text{H}_2$ desaparece del espectro del copolímero, pero no se encontró relación de esta diferencia con las estructuras.

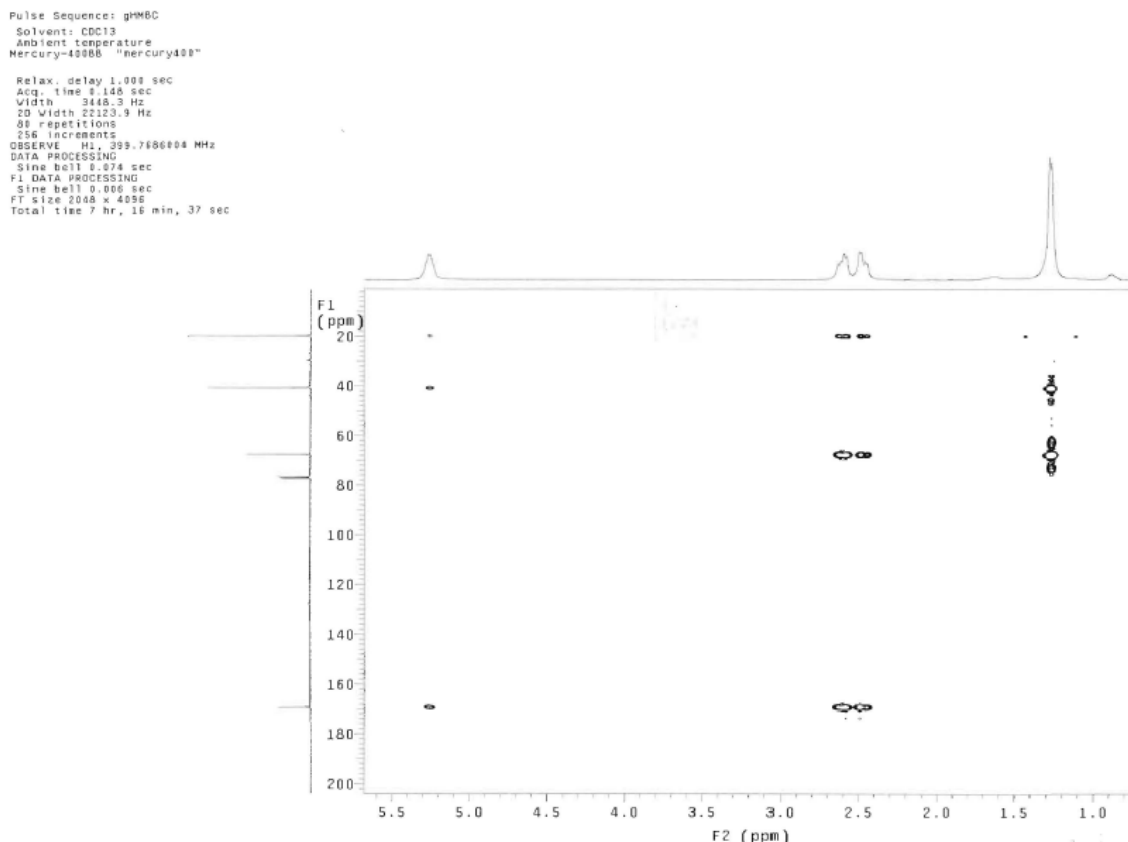


Figura 43 Espectro RMN de Coherencia Cuántica Múltiple Heteronuclear del P (HB-g-AAm) (Muestra M5).

La reacción de injerto por el grupo metínico se sostuvo por los resultados experimentales previos obtenidos en la investigación de la polimerización por injerto radioinducido de monómeros en el poli (3-hidroxibutirato) (43) (87). Sin embargo, la estructura no parece estar justificada o los carbonos cuaternarios sustituidos no tienen suficiente concentración para producir una señal en el espectro RMN-¹³C.

Adicionalmente, se realizó el análisis de las intensidades de las señales carbonílicas, y se encontró variación en las mismas mostrando un incremento de las señales C=O, -CH y CH₃ en el copolímero comparado con el PHB. Se realizó un estimado del índice de

injerto basado en las áreas bajo los picos de los protones metínicos y metilénicos y se obtuvo un valor de 6.5 %. De la experiencia previa en estas reacciones se desprende que la longitud de las moléculas de PAAm que se injertan en el PHB es muy corta, lo que es consistente con el injerto de oligómeros de PAAm en el sustrato.

4.30 Estudio de hinchamiento de los copolímeros P (HB-g-AAm).

El estudio de hinchamiento fue realizado también, para conocer las características hidrofílicas de los copolímeros P (HB-g-AAm) obtenidos por polimerización de injerto radioinducido de la AAm en el PHB, comparado con el material de partida.

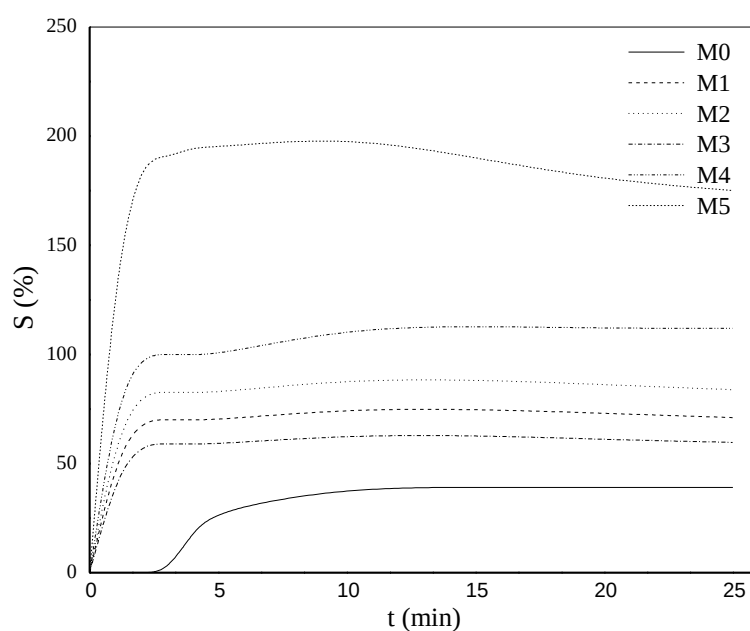


Figura 44 Estudio de hinchamiento de los copolímeros P (HB-g-AAm) obtenidos por polimerización de injerto radioinducido de la AAm en el PHB.

La Figura 44 muestra la gráfica de grado de hinchamiento S (%) vs tiempo, del estudio realizado en membranas del PHB y los copolímeros. La gráfica se escaló para una mejor

visualización de los resultados. Se observa que el grado de hinchamiento se incrementó con relación al PHB (M0) en todos los casos $S(\%) = 3.9\%$. Por otra parte la dependencia del grado de hinchamiento con el grado de injerto es directa, lo que se incrementó el grado de hinchamiento con el incremento del grado de injerto. Otro resultado observado es que cuando se utilizaron solventes polares (M1, M2 y M3) el grado de hinchamiento fue similar, mientras que la muestra M4 mostró una mayor hidrofiliidad y la M5 incrementó el valor del grado de hinchamiento de forma considerable. Los valores cuantitativos fueron: $S(M1) = 7,1\%$, $S(M2) = 8,3\%$, $S(M3) = 5.9\%$, $S(M4) = 11,2\%$, y $S(M5) = 17,5\%$. Los resultados indican claramente que los copolímeros obtenidos mejoraron sus propiedades hidrofílicas con respecto al PHB.

4.31 Propuesta de mecanismo de la reacción de polimerización por injerto radioinducido de monómeros en el poli (3-hidroxibutirato).

Basado en la experiencia experimental adquirida en las síntesis de los copolímeros por injerto, la revisión realizada de la literatura y las ecuaciones generales de polimerización radicalica, se realizó una propuesta de mecanismo de la reacción de polimerización por injerto inducido por radiaciones gamma de monómeros (en general) en el poli (3-hidroxibutirato). La propuesta se basa en el mecanismo de polimerización de crecimiento en cadena y en etapas. Para describirlo la Figura 45 indica la formulación de un monómero general, representado por su doble enlace característico, y un grupo funcional que denominaremos R1.

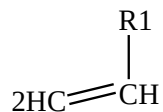


Figura 45 Fórmula general de un monómero hipotético.

El mecanismo de la polimerización por injerto radioinducido, conlleva los pasos de iniciación, propagación y terminación característicos de una reacción en cadena radicalica. Como fue descrito anteriormente, en el paso de la iniciación, cuando se expone el PHB a las radiaciones ionizantes, se obtienen seis diferentes tipo de radicales (Figura 4). Cualquiera de estos radicales pueden reaccionar para dar un nuevo producto. Se establece en el mecanismo, de forma arbitraria a uno solo de los radicales, el más estable, en este caso el radical II (Figura 4), de acuerdo con todas las evidencias experimentales mostradas en el trabajo. De esta forma se simplifica el mecanismo que se propone, aunque conocemos la complejidad de la reacción y que los radicales del PHB son competitivos en la formación de copolímeros.

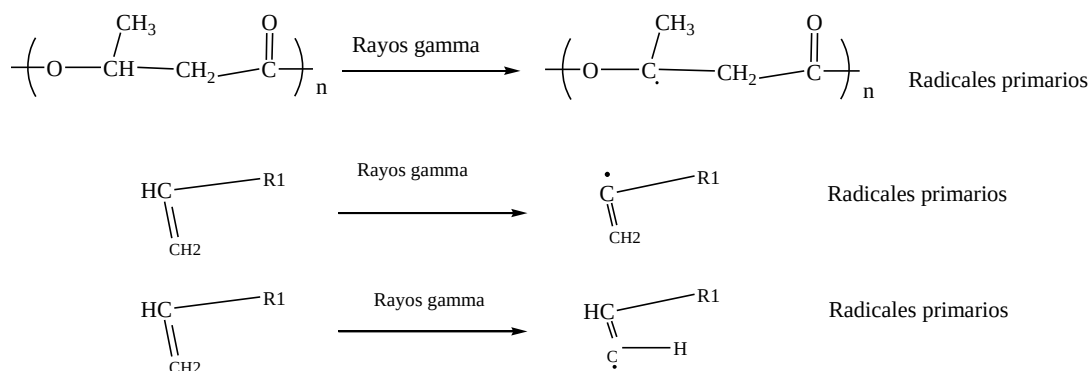
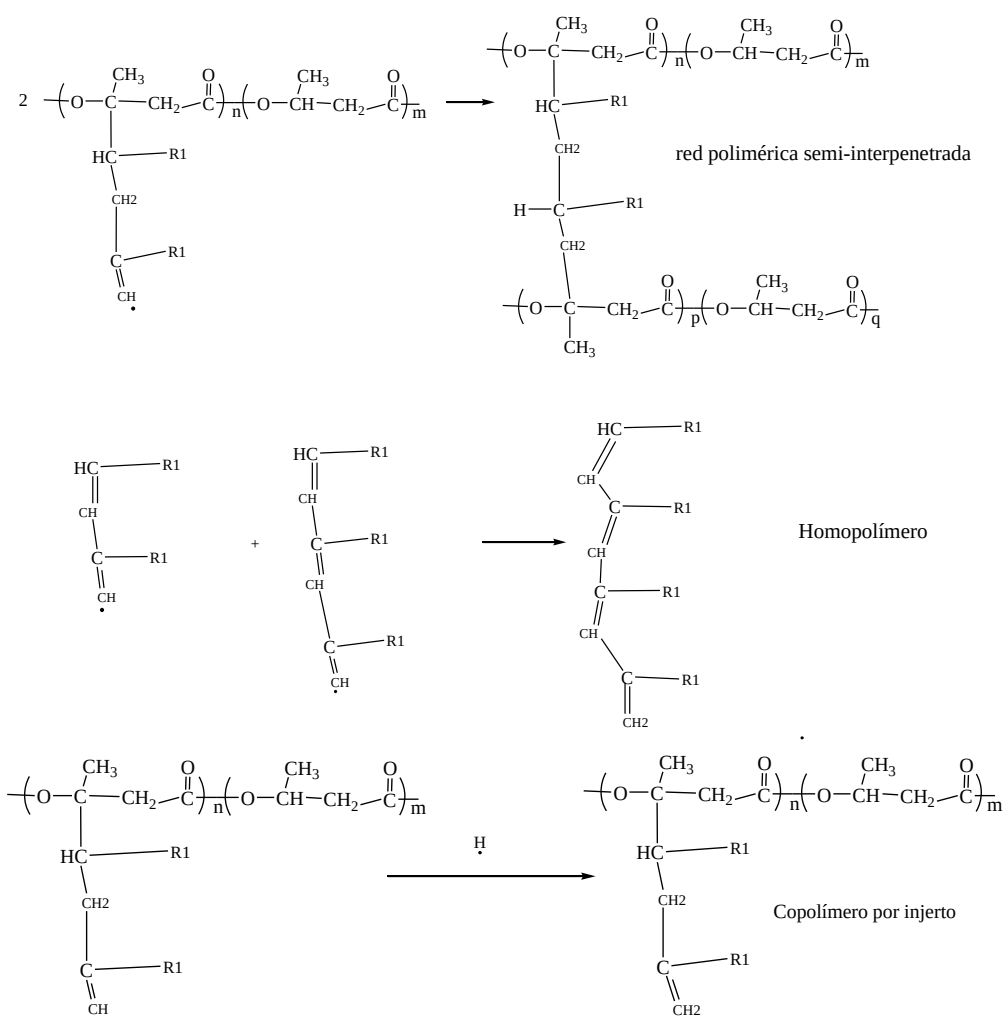


Figura 46 Iniciación en la polimerización por injerto radioinducido de un monómero general en el PHB.

Las ecuaciones descritas en la Figura 47 muestran la adición del monómero al centro activo de la **cadena de injerto** iniciada. En esta etapa de propagación se obtienen cadenas crecientes de homopolímero y **cadena de injerto creciente**. De acuerdo con los resultados experimentales la reacción de homopolimerización está más favorecida, ya que esta es una característica del método de irradiación simultánea. Por otra parte, no se han obtenido evidencias experimentales de que exista la molécula **cadena de injerto** o de la formación de la molécula **cadena de injerto creciente**, lo que no podemos afirmar que estas existan.



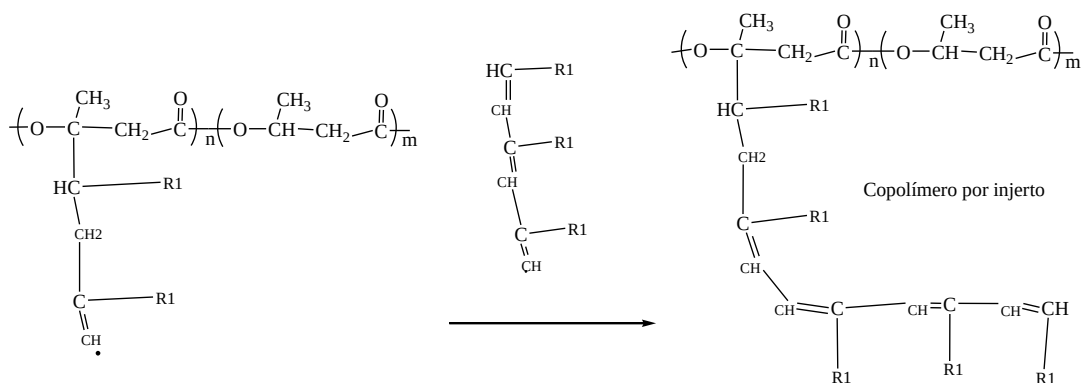


Figura 48 Etapa de terminación de la polimerización radioinducida.

En la etapa de terminación, ocurre la desactivación del radical primario formado en la radiólisis del PHB por recombinación. Considerando que el radical primario del PHB es el radical II (Figura 4) y que el CH^* del monómero acopla con el radical II, entonces obtendremos una especie muy parecida a **cadena de injerto** (Figura 47). Esta última especie es inestable y puede reaccionar: a) con el monómero para dar la molécula **cadena de injerto creciente**, de la cual no tenemos evidencia de que exista b) puede reaccionar con una molécula **cadena creciente de homopolímero** para dar un copolímero por injerto o c) Puede reaccionar con algún radical que haya en el medio como H^* , CH_2^* , CH_3^* u otro y terminar la reacción con la formación de un copolímero.

Por su parte la reacción de homopolimerización puede ocurrir por acoplamiento o dismutación. Por acoplamiento, las **cadenas crecientes de homopolímero** acoplan entre sí para dar como resultado el homopolímero (i.e. $\text{C}^* + \text{C}^* = \text{CC}$), mientras que en la dismutación el radical primario del monómero es oxidado y reducido al mismo tiempo de manera que el producto de la reacción es también el homopolímero (i.e. $2(\text{R}_1\text{CH}_2\text{CH}^*) \rightarrow \text{R}_1\text{CH}_2=\text{CH}_2 + \text{R}_1\text{CH}_2\text{CH}_2$).

4.32 Análisis del hinchamiento del PHB y los copolímeros por injerto obtenidos.

Para el estudio del hinchamiento del PHB y los copolímeros por injerto obtenidos por copolimerización por injerto inducido por radiaciones gamma de los monómeros VAc, VA, MBu, MA, y AAm, se tomó el máximo valor obtenido del grado de injerto utilizando la técnica de termogravimetría (W_{ATG}), las mismas condiciones experimentales y normalizando las masas para garantizar el acoplamiento del gráfico. Para su mejor comprensión se estandarizaron los valores del grado de hinchamiento obtenido en todos los casos. La Figura 49 muestra los resultados del análisis. El grado de hinchamiento para el PHB fue de 3,9 %, mientras que el valor de S (%) para el P (HB-g-VAc) fue de 4.3 % mostrando una tendencia a mayor hidrofiliidad. Posteriormente con la hidrólisis se obtuvo un valor de S (%) de 4,3 % ya que los grupos OH del (P (HB-g-VA)) son más hidrofílicos que los grupos acetatos del P (HB-g-VAc).

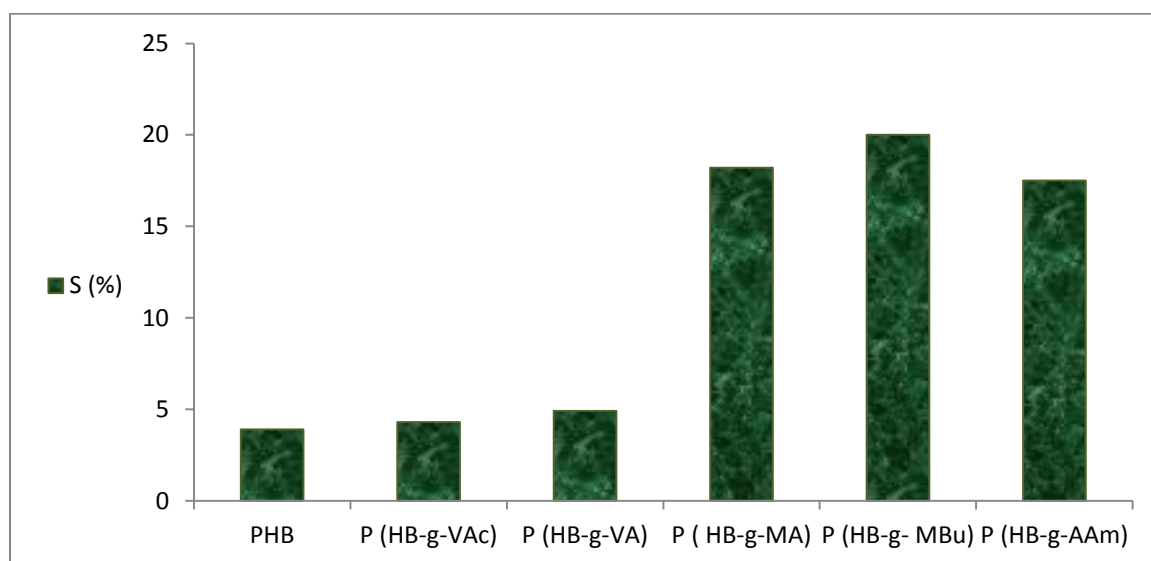


Figura 49 Análisis del hinchamiento del PHB y los copolímeros por injerto obtenidos.

Para los siguientes copolímeros se obtuvieron resultados muy similares, con valores de S (%) de 18,2 %, 20 %, 17,5 % respectivamente según la Figura 49. De manera concluyente los materiales poliméricos obtenidos muestran una mayor hidrofiliidad que el PHB de partida, lo que se manifiesta en una mejor capacidad de absorción de agua y en incremento de la insolubilidad en solventes orgánicos como el cloroformo, donde el PHB se disuelve con facilidad.

4.33 Estudio preliminar sobre la posible aplicación de los copolímeros por injerto obtenidos en la Ingeniería Biomédica.

Para el estudio preliminar de la aplicación de los copolímeros obtenidos, se eligió el P (HB-g-VA) ya que por sus características químicas resulta un material atractivo para su uso en la ingeniería Biomédica porque tanto el PHB como el PVA son materiales biodegradables y biocompatibles.

Se realizó la preparación de nanopartículas del copolímero por el método de emulsión de agua en aceite (o/w) y extracción del solvente de acuerdo a lo descrito anteriormente. Las partículas obtenidas fueron caracterizadas en un Microscopio de Fuerza Atómica (AFM, de sus siglas en inglés Atomic Force Microscope).

La Figura 50 muestra Imágenes de Microscopía de Fuerza Atómica de las nanoesferas de P (HB-g-VAc). Las nanoesferas obtenidas tienen un diámetro aproximado de 40-50 nm. Se realizó el análisis por Microscopía Electrónica de Barrido, pero no se pudo tener una imagen clara de las nanoesferas porque dado su tamaño y las características del material, se presentaron dificultades como degradación frente al haz de electrones, deformación por enfriamiento etc.

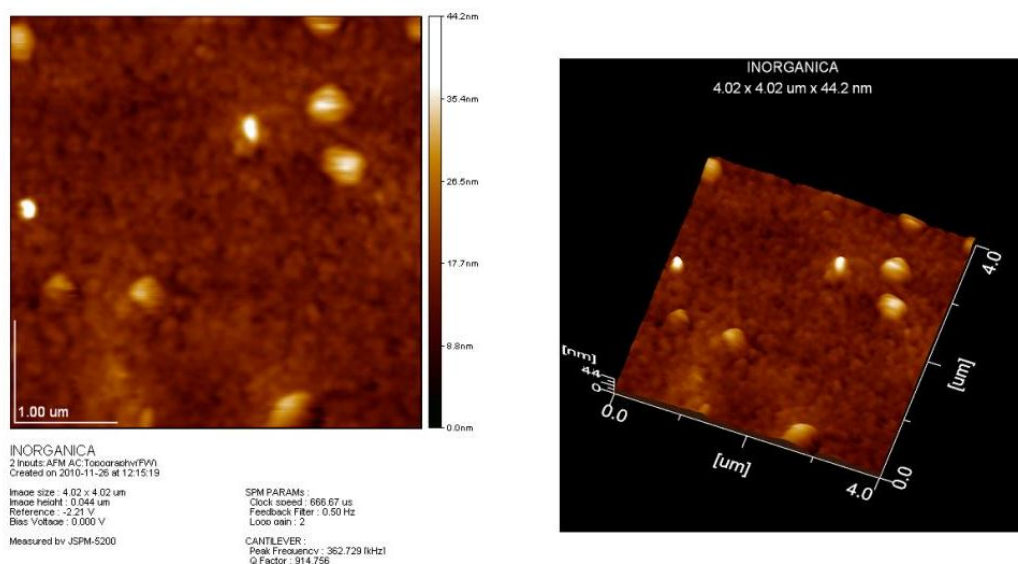


Figura 50 Imágenes de Microscopía de Fuerza Atómica de las nanoesferas de P (HB-g-VAc)

Otro problema que se presentó en la síntesis es la irregularidad del tamaño de partículas. No todas las partículas poseían el mismo tamaño lo que está relacionado en parte por la polidispersidad del material. Las nanoesferas obtenidas podrían ser utilizadas en la nanoencapsulación de fármacos y ser utilizado como sistema avanzado de liberación controlada (ADS, por sus siglas en Inglés, Advanced Delivery System) en la liberación de sustancias tales como antiinflamatorios, anticancerígenos etc en la terapia de enfermedades crónicas degenerativas. Es necesario realizar un mayor esfuerzo en la investigación de las posibles aplicaciones de estos materiales, pero es evidente que por sus propiedades su utilidad práctica es prometedora.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

Los estudios realizados revelan que las cadenas los monómeros utilizados se introducen por polimerización de injerto inducidos por radiaciones gamma en el sustrato PHB obteniéndose un copolímero por injerto en cada caso.

- 1- Se logró la síntesis de los copolímeros por injerto de los monómeros VAc, VA, MBu, MA, AAm por copolimerización de injerto radioinducida en el PHB, utilizando el método de irradiación simultánea.
- 2- Se obtuvieron nuevos materiales (P (HB-g-VAc); P (HB-g-VA); P (HB-g-MBu); P (HB-g-MA), y P (HB-g-AAm) a partir de la modificación del PHB, con el injerto de los monómeros (VAc, VA, MBu, MA, AAm) respectivamente, por medio de una reacción de polimerización de injerto inducida por radiaciones de alta energía.
- 3- Se demostró la formación de los copolímero por medio de su caracterización química física a través de técnicas espectroscópicas y calorimétricas tales como RMN, FTIR, DFRX, Raman, Microscopía , DSC , y ATG, obteniéndose resultados consistentes que indican la formación de los nuevos materiales, la composición , el grado de injerto, el grado de cristalinidad , los parámetros termodinámicos, los grupos funcionales, la morfología y la estructura de los nuevos materiales.
- 4- El grado de cristalinidad de los copolímeros disminuyó con respecto al PHB lo que indica que la introducción de los monómeros utilizados en la cadena

carbonada del PHB altera la cristalización del mismo. Estos resultados sugieren que la habilidad de cristalizar del PHB se torna débil debido al injerto del monómero que el mismo no solo ocurre en la zona amorfa del biomaterial sino que perturba parcialmente su región cristalina.

- 5- De los resultados experimentales se corrobora que el injerto de los monómeros utilizados ocurre por los carbonos metínicos y metilénicos del PHB, pero fundamentalmente por el carbono terciario del PHB, por medio de una reacción de acoplamiento radicalico entre los centros activos de los radicales primarios de la cadena carbona del PHB y los centros activos de las cadenas crecientes del homopolímero.
- 6- Todos los estudios realizados indican que los copolímeros por injerto obtenidos son más hidrofílicos que el PHB, lo que se manifiesta en un mayor grado de hinchamiento de las membranas estudiadas.

CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES.

- 1- Realizar un estudio sobre la posible aplicación de los materiales obtenidos en la Ingeniería Biomédica.
- 2- Optimizar la síntesis de las nanoesferas obtenidas a partir del P (HB-g-VA) para su uso como sistema avanzado de liberación de fármacos.
- 3- Obtener un producto nanoencapsulado que pueda ser utilizado para la terapia de alguna enfermedad crónica degenerativa.

CAPÍTULO 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Guzman, Martin G. *Introducción a la Química Física de las Macromoléculas*. La Habana: Instituto del Libro; 1970.
2. Fernández NG, Covas CP. *Introducción a la Química Física de los Polímeros*. La Habana: ENPES; 1990.
3. Science S. http://www.springerimages.com/Images/RSS/1-10.1007_978-90-481-3278-2_1-2. [Online].; 2013 [cited 2013 February 13. Available from: <http://www.springerimages.com>.
4. Tomislav P, Matyjaszewski K. Atom transfer radical addition and polymerization reactions catalyzed by ppm amounts of copper complexes. *Chemical Society Reviews*. 2008; 37(6): p. 1087-1097.
5. Reddy CSK, Ghai R, Rashmi , Kalia VC. Polyhydroxyalkanoates : an overview. *Bioresource Technology*. 2003; 87: p. 137-146.
6. Zinn M, Witholt B, Egli T. Occurrence , Synthesis and medical application of polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001; 53: p. 5-21.
7. Bonartsev AP, Bonartseva GA, Shaitan KV, Kirpichnikov MP. Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate)-Based Biopolymer System. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2011; 5(1): p. 10-21.
8. Silva LF, Taciro MK, Ramos MM. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose , glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2004 March; 31: p. 245-254.
9. Kek YK, Wing-Hin , Sudesh K. Efficient bioconversion of palm acid oil and palm kernel acid oil to poly(3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator*. *Can. J. Chem*. 2008 April; 86: p. 533-539.
10. Thirumala M, Reddy SV, Mahmood SK. Production and characterization of PHB from two novel strains of bacillus spp. isolated from soil and activated sludge. *J. Ind Microbiol Biotechnol*. 2010 January; 37: p. 271-278.
11. Pal S, Paul AK. Physico-chemical characteristics of poly (3-hydroxybutyric acid) isolated from *Azotobacter chroococcum* MAL-201. *Research Communications*. 2002 December 25; 83(12): p. 1565-1568.

12. Ghaffar , Abdel AM. Radiation synthesis of acrilamide/ N,N-(dimethylamino) ethyl metacrylate grafted onto low density polyethylene films. *Radiation Effects & Defects in Solids*. 2011 February; 166(2): p. 150-159.
13. Wang Y, Ni Q, Liu Z, Zou J, Zhu X. Grafting modification and properties of polypropylene with pentaerythritol tetra-acrylate. *J Polym Res*. 2011 May; 18: p. 2185-2193.
14. Sophie N, Robert H M. Atom Transfer Radical Copolymerization of bacterial poly (3-hydroxybutyrate) macromonomers and methyl methacrylate. *Macromolecules*. 2005 September; 38: p. 290-296.
15. Martellini F, Mei LHI, Lora S, Carenza M. Semi-interpenetrating polymer networks of poly (3-hydroxybutyrate) prepared by radiation induced polymerization. *Radiation Physics and Chemistry*. 2004; 71: p. 255-260.
16. Dufresne A, Reche L, Marshessault RH, Lacroix M. Gamma ray crosslinking of poly (3-hydroxyoctanoate-co-undecenoate). 2001; 29: p. 73-82.
17. Mifune J, Nakamura S, Fukui T. Targeted engineering of cupriavidus necator chromosome for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from vegetable oil. *Can. J Chem*. 2008; 86: p. 621-627.
18. Gamal R S, Hartmut S. Biodegradable copolymers based on bacterial poly((R)-3-hydroxybutyrate): thermal and mechanical properties and biodegradation behaviour. *Polymer Degradation and Stability*. 2004 April; 83: p. 101-110.
19. Hany R, Bohlen C, Geiger T, Hartmann R, Kawada J, Schmid M, et al. Chemical synthesis of crystalline Comb polymers from olefinic medium chain length poly (3-hydroxyalkanoates). *Macromolecules*. 2004; 37: p. 385-389.
20. Asrar J, Valentin HE, Berger PA, Tran M, Padgett SR, Garbow JR. Biosynthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) polymers. *Biomacromolecules*. 202 June; 3: p. 1006-1012.
21. Zhao Q, Cheng G. Preparation of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) and poly(ethylene glycol) multiblock copolymers. *Journal of Materials Science*. 2004; 39: p. 3829-3831.
22. Zhang X, Yang H, Liu Q, Zheng Y, Xie H, Wang Z, et al. Synthesis and characterization of biodegradable triblock copolymer based on bacterial poly (3-hydroxybutyrate) by atom transfer radical polymerization. *Journal of Polymer Science : Part A: Polymer Chemistry*. 2005; 43: p. 4857-4869.

23. Chanprateep S, Katakura Y, Visetkoop S, Shimizu H, Kulpreecha S, Shioya S. Characterization of New isolated *Ralstonia eutropha* strain A-04 and kinetic study of biodegradable copolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) production. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2008 August; 35: p. 1205-1215.
24. S.Vigneswari , Vijaya S, Majid M, Sudesh K, Sipaut C, Azizan M, et al. Enhanced production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer with manipulated variables and its properties. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2009 February; 36: p. 547-556.
25. Saad GR, Khalil TM, Sabaa MW. Photo- and bio-degradation of poly (ester-urethane)s films based on poly(R)-3-hydroxybutyrate) and poly (ε-caprolactone) blocks. *J Polym Res*. 2010; 17: p. 33-42.
26. Chen C, Zhou X, Zhuang Y, Dong L. Thermal behavior and intermolecular interactions in blends of poly(3-hydroxybutyrate) and maleated poly(3-hydroxybutyrate) with Chitosan. *Journal of Polymer Science : Part B: Polymer Physics*. 2005 August; 43: p. 35-47.
27. El-Taweel SH, Stoll B, Hohne GWH, Mansour AA, Seliger H. Stress Strain behavior of blends of bacterial polyhydroxybutyrate. *Journal of Applied Polymer Science*. 2004 July; 94: p. 2528-2537.
28. Saad G. Blends of bacterial poly((R)-3-hydroxybutyrate) with oligo ((R,S)-3-hydroxybutyrate)-diol. *Polym Int*. 2002 November; 51: p. 338-348.
29. Focarete ML, Scandola M. Miscibility and mechanical properties of blends of (L)-Lactide copolymers with atactic poly (3-hydroxybutyrate). *Macromolecules*. 2002 June; 35: p. 8472-8477.
30. Zhao L, Kai W, He Y, Zhu B, Inoue Y. Effect of aging on fractional crystallization of poly(ethylene oxide) component in poly(ethylene oxide)/poly (3-hydroxybutyrate) blends. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*. 2005 June; 43: p. 2665-2676.
31. Ceccorulli G, Scandola M, Adamus G. Compatibilizing effect of a graft copolymer on bacterial poly (3-hydroxybutyrate) / poly(methyl methacrylate) blends. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*. 2002; 40: p. 1390-1399.
32. Cimmino S, D'Alma E, Lorenzo MD, Silvestre C. Influence of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) on miscibility and properties of atactic poly (methyl methacrylate). *Polym Int*. 2004 October; 53: p. 809-814.
33. Bhattacharya A, Misra BN. Grafting: a versatile means to modify polymers. *Techniques , factors and application. Prog. Polym. Sci*. 2004 May; 29: p. 767-814.

34. Nasef MM, Hegazy EsA. Preparation and applications of ion exchange membranes by radiation-induced graft copolymerization of polar monomers onto non-polar films. *Prog. Polym. Sci.* 2004 February; 29: p. 499-561.
35. Chen C, Peng S, Fei B, Zhuan Y, Dong L, Feng Z. Synthesis and characterization of maleated poly (3-hydroxybutyrate). *Journal of Applied Polymer Science*. 2003; 88: p. 659-668.
36. Elsayy MA, Saad GR, Elsabee MZ. Grafting of N-isopropyl acrylamide onto bacterial polyhydroxybutyrate/hydroxyvalerate copolymers. *Polymer Plastics Technology and Engineering*. 2011; 50: p. 1055-1063.
37. Park J, Park JG, Choi WM, Ha CS, Cho WJ. Synthesis and photo biodegradabilities of poly ((hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)-g-phenyl vinyl ketone). *Journal of Applied Polymer Science*. 1999; 74: p. 1432-1439.
38. Nguyen S, Marchessault RH. Synthesis and properties of graft copolymers based on poly (3-hydroxybutyrate) macromonomers. *Macromol. Biosci.* 2004; 4: p. 262-268.
39. Rouxhet L, Legras R. Modifications induced by swift heavy ions in poly (3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) (PHB/HV) and poly (ε-caprolactone)(PCL) films. Part 1. Thermal behavior and molecular mass modifications. *Nuclear Instruments and methods in Physics Research B*. 2000; 171: p. 487-498.
40. Zhijiang C, Guoxiang C, Mingming G, Zhiyuan T. Surface modification of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) by photografting and its properties evaluation. *Journal of Polymer Research*. 2004; 11: p. 99-104.
41. Hao J, Deng X. Semi-interpenetrating networks of bacterial poly(3-hydroxybutyrate) with net-poly(ethylene glycol). *Polymer*. 2001; 42: p. 4091-4097.
42. Zhijiang C, Zhihong W. Preparation of biodegradable poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) and poly (ethylene glycol) (PEG) graft copolymer. *J Mater Sci*. 2007; 42: p. 5886-5890.
43. Carswell-Pomerantz T, Hill David J, O'Donnell JH, Pomery PJ. An electron spin resonance study of the radiation chemistry of poly (hydroxybutyrate). *Radiat.Phys.Chem.* 1995; 45(5): p. 737-744.
44. Meng , Xiang-Ying. Chemical and mechanical properties of butyl methacrylate grafted wool fiber. *Journal of Applied Polymer Science*. 2003; 91: p. 3813-3817.
45. Yu L, He Y, Bin L, Yue'e F. Study of radiation induced graft copolymerization of butyl acrylate onto chitosan in acetic acid aqueous solutions. *Journal of Applied*

Polymer Science. 2003; 90: p. 2855-2860.

46. Haldar SK, Singha NK. Grafting of butyl acrylate and methyl methacrylate on butyl rubber using electron beam radiation. *Journal of Applied Polymer Science*. 2006; 101: p. 1340-1346.
47. Mukherjee AK, Gupta BD. Radiation induced graft copolymerization of methacrylic acid onto polypropylene fibers. I. Effect of synthesis conditions. *Journal of Applied Polymer Science*. 1985; 30: p. 2643-2653.
48. Nho YC, Jin JH. Graft polymerization of acrylic acid and methacrylic acid onto radiation peroxidized polyethylene film in presence of methalic salt and sulfuric acid. *J of Appl Polym Sci*. 1997; 63: p. 1101-1106.
49. Beliakova MK, Aly A, Mohdy FA. Grafting of poly (methacrylic acid) on starch and poly (vinyl alcohol). *Starch*. 2004; 56: p. 407-412.
50. Ahmed M, Dessouki AH, Zahran , Hegazy NEA. The post radiation grafting of vinyl acetate onto poly (tetrafluoroethylene) films. *Radiat. Phys. Chem*. 1987; 29(6): p. 463-467.
51. Mokhtar SM. Radiation induced grafting of acrylic acid and vinyl acetate monomer onto heavy duty poly(ethylene-vinyl acetate) films. *Polymer International*. 1997; 42: p. 335-339.
52. Restaino AJ, Reed WN. Kinetics of the gamma induced graft copolymerization of vinyl acetate to Teflon. *Journal of Polymer Science*. 1959; 26: p. 499-510.
53. Vigo F, Uliana C. Ultrafiltration membranes obtained by grafting hydrophilic monomers onto poly(vinyl chloride). *Journal of Applied Polymer Science*. 1989; 38: p. 1197-1209.
54. Ringrose BJ, Kron E. Preparation of hydrophilic materials by radiation grafting of poly (ethylene-co-vinyl acetate). *European Polymer Journal*. 2000; 36: p. 591-599.
55. Nguyen V, Yoshida W, Cohen Y. Graft polymerization of vinyl acetate onto silica. *Journal of Applied Polymer Science*. 2003; 87: p. 300-310.
56. Dybing E, Farmer PB, Andersen M, Fennell TR, Lalljie SPD, Muller DJG, et al. Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food and Chemical Toxicology*. 2005; 43: p. 365-410.
57. Lee HS, Lee TY. Graft polymerization of acrylamide onto poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) films. *Polymer*. 1997; 38(17): p. 4505-4511.

58. Gupta B, Anjum N. Surface structure of radiation grafted polyethylene-g-polyacrilamide films. *Journal of Applied Polymer Science*. 2002; 86: p. 1118-1122.
59. Ke Y, Wang Y, Ren L, Lu L, Wu G, Chen X, et al. Photografting Polymerization of polyacrylamide on PHBV films (I). *Journal of Applied Polymer Science*. 2007; 104: p. 4088-4095.
60. Kutsevol N, Guenet JM, Melnik N, Sarazin D, Rochas C. Solution properties of dextran polyacrilamide graft copolymers. *Polymer*. 2006; 47: p. 2061-2068.
61. Pouton CW, Akhtar S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1996; 18: p. 133-162.
62. Koosha F, Muller RH, David SS. Polyhydroxybutyrate as drug carrier. *Rev. Ther Drug Carrier Systems*. 1989; 6: p. 117-130.
63. Gangrade N, Price JC. Properties of implant able pellets prepared from a biodegradable polyester. *Drug Dev. Ind Pharm*. 1992; 18: p. 1633-1648.
64. Jones RD, Price JC, Stuedemann JA, Bowen JM. In vivo and in vitro release of metoclopramide from a subdermal diffusion matrix with potential in preventing fescue toxicosis in cattle. *J. Controlled Release*. 1994; 30: p. 35-44.
65. Brophy MR, Deasy PB. In vitro and in vivo studies on biodegradable polyester microparticles containing sulphamethiazole. *Int. J. Pharm*. 1986; 29: p. 223-231.
66. Juni K, Nakano M. Poly(hydroxy acids) in drug delivery. *CRC Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Systems*. 1987; 3: p. 209-232.
67. Francesco M, Luigi P, Paolo V, inventors; European Patent patent 0226439. 1987.
68. Philips S, Keshavarz T, Roy I. Review Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with range of applications. *Journal of chemical technology and biotechnology*. 2007; 82: p. 233-247.
69. Nguyen S, Marchessault R. Graft copolymer of methyl methacrylate and poly ((R))-3-hydroxybutyrate macromonomers as candidates for inclusion in acrylic bone cement formulations: compression testing. *J Biomed Mater Res B -Appl Biomater*. 2006; 77: p. 5-12.
70. Grondahl L, Chandler A, Trau M. Polymeric grafting of acrylic acid onto poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate): surface functionalization for tissue engineering applications. *Biomacromolecules*. 2005; 6: p. 2197-2203.

71. Mitomo H, Watanabe Y, Ishigaki I, Saito T. Radiation induced degradation of poly (3-hydroxybutyrate) and the copolymer hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate. *Polymer degradation and stability*. 1994; 45: p. 11-17.
72. Chapiro A. Radiation induced grafting. *Int. J. Radiat. Phys. Chem.* 1977; 9: p. 55-67.
73. Mitomo H, Sasaoka T, Yoshii F, Makunuchi K, Saito T. Radiation induced graft polymerization of acrylic acid onto poly (3-hydroxybutyrate) and its copolymer. 1996; 52(11): p. 623-626.
74. Mitomo H, Enjôji T, Watanabe Y, Yoshii F, Makuuchi K, Saito T. Radiation-Induced Graft Polymerization of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Its Copolymer. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*. 1995; 32(3): p. 429-442.
75. Bahari K, Mitomo H, Enjoji T, Hasegawa S, Yoshii F, Makuuchi K. Radiation induced graft polymerization of styrene onto poly (3-hydroxybutyrate) and its copolymer with 3-hydroxybutyrate. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*. 1997; 250(4352): p. 31-44.
76. Bahari K, Mitomo H, Enjoji T, Yoshii F, Makuuchi K. Degradability of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymer grafted with styrene by radiation. *Polymer Degradation and Stability*. 1998; 61: p. 245-252.
77. Jian T, Hu P. Radiation induced graft polymerization of isoprene onto polyhydroxybutyrate. *Polymer Journal*. 2001; 33(9): p. 647-653.
78. Ye H, Yang D, Hu P, Zhang F, Qi Q. Radiation induced graft polymerization of maleic anhydride onto poly-3-hydroxybutyrate. *Key Engineering Materials*. 2005; 288-289: p. 477-480.
79. Zaldivar MP, Fernández NG, Peña CG, Paneque MR, Valentín SA. Synthesis and characterization of a new semi-interpenetrating polymer network hydrogel obtained by gamma radiations. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2011; 106(3): p. 725-730.
80. Wada Y, Mitomo H, Kasuya Ki, Nagasawa N, Seko N, Katakai A, et al. Control of biodegradability of poly (3-hydroxybutyric acid) film with grafting acrylic acid and thermal remolding. *Journal of Applied Polymer Science*. 2006; 101: p. 3856-3861.
81. Torres MG. Síntesis y caracterización química física del poli (3-hidroxibutirato g-acetato de vinilo) obtenido por copolimerización por injerto inducido por radiaciones. Tesis de Maestría. La Habana: Instituto de Ciencias y Tecnología de Materiales, Polímeros; 2006.

82. Torres MG, Fernández NG, Toro POd, Paneque MR. Raman Spectroscopy of poly (3-hydroxybutyrate) modified with poly (vinyl acetate) by radiation induced copolymerization. *Nucleus*. 2007; 42: p. 41-45.
83. Wada Y, Tomada M, Seko N, Mitomo H. Emulsion grafting of vinyl acetate onto preirradiated poly (3-hydroxybutyrate) film. *Journal of Applied Polymer Science*. 2008; 107: p. 2289-2294.
84. Yuki W, Noriaki S, Naotsugu N, Masao T, Ken-ichi K, Hiroshi M. Biodegradability of poly (3-hydroxybutyrate) film grafted with vinyl acetate : Effect of grafting and saponification. *Radiation Physics and Chemistry*. 2007; 76: p. 1075-1083.
85. Santos B, Rozsa C, Galego N, Michels AF, Behar M, Zawislak FC. Hydrophilic transformations in polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Polymer Anal. Charact*. 2011; 16: p. 431-441.
86. Luk JZ, Rondeau E, Trau M, White JC, Grondahl L. Characterization of amine functionalised poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) surfaces. *Polymer*. 2011; 52: p. 3251-3258.
87. Torres MG, Ortíz P, Rapado M, Galego N. Radiation induced graft copolymerization of vinyl acetate onto poly (3-hydroxybutyrate): Synthesis and Characterization. *International Journal of Polymer Anal. Charact*. 2008; 13: p. 376-392.
88. Grasie N, Murray EJ, Holmes PA. The thermal degradation of poly (-(D)-Hydroxybutyric acid) : Part 3 The reaction mechanism. *Polymer Degradation and Stability*. 1984; 6: p. 127-134.
89. Grassie N, Murray EJ, Holmes. PA. The thermal degradation of poly (-(D)-hydroxybutyric acid): Part 2 Changes in molecular weight. *Polymer Degradation and Stability*. 1984; 6: p. 95-103.
90. Mitomo H, Watanabe Y, Ishigaki I, Saito T. Radiation induced degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and the copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Polymer Degradation and Stability*. 1994; 45: p. 11-17.
91. Li SD, Yu PH, Cheung MK. Thermogravimetric analysis of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxybutyrate). *J Appl Polym Sci*. 2001; 80: p. 2237-2244.
92. He JD, Cheung MK, Yu PH, Chen GQ. Thermal Analyses of poly (3-hydroxybutyrate), poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *J Appl Polym Sci*. 2001; 82: p. 90-98.

93. Li SD, He JD, Yu PH, Cheung MK. Thermal degradation of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) as studied by TG, TG-FTIR, and Py-GC/MS. *J Appl Polym Sci.* 2003; 89: p. 1530-1536.
94. Yang H, Liu J. Thermal analysis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) irradiated under vacuum. *Polym Int.* 2004; 53: p. 1677-1681.
95. Sevilla M, Morehouse K, Swarts S. Un estudio de ESR de reacciones electrónicas con ésteres y triglicéridos. *J. Phys. Chem.* 1981; 85(7): p. 923-927.
96. Yu G, Marchessault RH. Characterization of low molecular weight poly (3-hydroxybutyrate) , alkaline and acid hydrolisis. *Polymer.* 2000; 41: p. 1087-1098.
97. Cyras V, Fernández G, Vázquez A. Biodegradable films from PHB- 8HV copolymers and polyalcohols blends: crystallinity, dynamic mechanical analysis and tensile properties. *Polymer International.* 2000; 48: p. 705-712.
98. Bloembergen S, Holden DA, Hamer GK, Bluhm TL, Marchessault RH. Studies of composition and crystallinity of bacterial poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate). *Macromolecules.* 1986; 19(11): p. 2865-2871.
99. Galego N, Rozsa C, Sánchez R, Fung J, Vázquez A, Tomás JS. Caracterización y aplicación de poli (β -hidroxialcanoatos) de la familia como biomateriales compuestos. *Polymer Testing.* 2000; 19(5): p. 485-492.
100. Skrbic Z, Divjaković V. Temperature influence on changes of parameters of the unit cell of biopolymer PHB. *Polymer.* 1996; 37(3): p. 505-507.
101. Simopu A, Mucklich M, Kunath D, Heitz G. Uber Raman und ultrarotspektroskopische untersuchungen and hochpolymeren. *Journal of Polymer Science.* 1958; 30: p. 201-226.
102. Naeem M, El SA. Radiation initiated graft copolymerization of acrylic acid and vinyl acetate onto LDPE films in two individual steps. *Polym. Int.* 1993; 32: p. 131-135.
103. Vigo F, Uliana C. Ultrafiltration membranes obtained by grafting hydrophilic monomers onto poly (vinyl chloride). *J. Appl. Polym. Sci.* 1989; 38: p. 1197-1209.
104. González M, Ortiz P, Rapado M, Galego N. Effect of solvents on gamma radiation induced graft copolymerization of vinyl acetate onto poly (3-hydroxybutyrate). *International Journal of Polymer Anal. Charact.* 2009; 14(3): p. 231-245.
105. Chen C, Fei B, Peng S, Zhuang Y, Dong L, Feng. Z. Nonisothermal crystallization and melting behaviour of poly(3-hydroxybutyrate) and maleated poly(3-

- hydroxybutyrate). *Eur. Polym. J.* 2002; 38: p. 1663-1670.
106. González M, Rapado M, Pérez A, González M. Radiation induced graft copolymerization of metacrylic acid and butyl methacrylate onto poly (3-hydroxybutyrate). *International Journal of Polymer Anal. Charact.* 2009; 14: p. 179-195.
 107. Torres MG, Paneque MR, Zaldivar MP, Valentín SA, González GB. Radiation induced graft copolymerization of acrylamide onto poly (3-hydroxybutyrate). *Nucleus.* 2008; 43: p. 3-7.
 108. Yang H, Li J. Thermal analysis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) irradiated under vacuum. *Polymer International.* 2004; 53(11): p. 1677-1681.
 109. Xie Y, Kohls D, Noda I, Schaefer DW, Akpalu YA. Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) nanocomposites with optimal mechanical properties. *Polymer.* 2009; 50(19): p. 4656-4670.
 110. You JW, Chiu HJ, Don TM. Spherulitic morphology and crystallization kinetics of melt-miscible blends of poly (3-hydroxybutyrate) with low molecular weight poly (ethylene oxide). *Polymer.* 2003; 44(15): p. 4355-4362.
 111. Hu Y, Sato H, Zhang J, Noda I, Ozaki Y. Crystallization behavior of poly (L-lactic acid) affected by the addition of a small amount of poly (3-hydroxybutyrate). *Polymer.* 2008; 49(19): p. 4204-4210.