

**“PELÍCULAS NANOESTRUCTURADAS Y
NANOFIBRAS DE POLIELECTROLITOS
CONTENIENDO L-AMINOÁCIDOS. ESTUDIOS DE
ADHESIÓN Y VIABILIDAD CELULAR”**

**Tesis Entregada A La Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

Doctor en Química

Facultad De Ciencias

Por

Matías Sebastián Leal Mejías

Marzo 2019

Directores de Tesis:

Dra. Marcela Del Pilar Urzúa Acevedo

Dr. Andrónico David Neira Carrillo

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

Matías Sebastián Leal Mejías

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día

Directores de Tesis:

Dra. Marcela Urzúa A.

Dr. Andrónico Neira C.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Marcelo Kogan B.

Dr. Raúl Quijada A.

Dra. María Victoria Encinas R.

Dr. Marcelo Vilches H.

“A man should look for what is, and not for what he thinks should be.”

“Un hombre debe buscar lo que es, y no lo que cree que es”

Albert Einstein

Dedicada a Juanita, María, Carolina y Jorge .

RESUMEN BIOGRÁFICO



Matías Sebastián Leal Mejías nació en Santiago el 9 de diciembre de 1989. Egresó de cuarto medio en el año 2007, del Instituto Nacional. El 2008 ingresó a la carrera de Licenciatura en Ciencias, mención Química en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Su Unidad de Investigación fue realizada bajo la tutela de la Dra. Marcela Urzúa Acevedo en el Laboratorio de Fisicoquímica de la misma facultad. Matías se integró al programa de Doctorado en Química de la Facultad de Ciencias en el año 2013, desarrollando su Tesis en el Laboratorio de Fisicoquímica a cargo de la Dra. Urzúa. Posteriormente, en el año 2015 se incorporó al Laboratorio del del Dr. Andrónico Neira del Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Durante su estadía en la Facultad de Ciencias, participó activamente en la Dirección de Extensión compartiendo su pasión por la ciencia con alumnos de colegios de sectores vulnerables. También fue parte de los miembros fundadores del Centro Deportivo de Estudiantes representando a la Selección de Fútbol Masculino de la Facultad de Ciencias, equipo que consiguió 4 Torneos Inter-Facultades.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Dra. Marcela Urzúa por darme la oportunidad de trabajar bajo su alero, brindándome su apoyo, conocimientos, experiencia, confianza y paciencia, participando en mi crecimiento como persona y creciente madurez como investigador. También quiero agradecer al Dr. Andrónico Neira por su conocimiento y experiencia entregada para el desarrollo de esta Tesis.

A los miembros de mi comisión evaluadora: Dr. Marcelo Kogan, Dr. Raúl Quijada, Dra. María Victoria Encinas y Dr. Marcelo Vilches por su excelente disposición y aportes brindados durante el desarrollo de esta Tesis.

Al Dr. Mehrdad Yazdani-Pedram, Dr. Hernán Ríos y a la Dra. Laura Tamayo por su disposición a aportar a esta Tesis con su experiencia, pensamiento crítico y conocimiento en el área de polímeros. A la Dra. María Luisa Valenzuela, Dr. Alejandro Roth y Dr. Ángel Leiva por la buena disposición para realizar distintos tipos de mediciones y análisis en sus respectivos laboratorios y aportar a la discusión de los resultados obtenidos.

Al Sr. Luis Garrido, nuestro eterno Director Técnico, por ser uno de mis grandes apoyos en la Facultad de Ciencias y por abrirme las puertas de la Selección de Fútbol de la Facultad de Ciencias. También a mis queridos compañeros y amigos de este gran equipo.

Quiero agradecer el apoyo y amor incondicional de mis padres Carolina y Jorge, mis abuelas Juanita y María, mis hermanos Vale y Maxi brindados durante todos mis años de estudio.

Agradezco a la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT), por la beca para Estudios de Doctorado y Gastos Operacionales N°21141219. A la Beca Luis Sepúlveda del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Finalmente agradezco a los Proyectos Fondecyt Regular N°11521221 (Dra. M.U), Proyecto anillo ACT-1412(Dra. M.U) y a los Proyectos Fondecyt Regular N° N°1171520.

ÍNDICE DE MATERIAS

RESUMEN BIOGRÁFICO	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE MATERIAS	v
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iv
1. Introducción	2
1.1 Antecedentes Generales.....	2
1.1.1 Polímeros	4
1.1.2 Polielectrolitos	5
1.2 Adsorción de Polielectrolitos Sobre Superficies Sólidas	7
1.3 Propiedades Superficiales.....	12
1.4 Copolímeros Derivados de Anhídrido Maleico.....	14
1.5 Nanofibras Poliméricas	17

1.6	Hipótesis.....	26
1.7	Objetivo General	26
1.8	Objetivos Específicos	27
2.	Materiales y Métodos	29
2.1	Materiales y Equipos	29
2.2	Reactivos	31
2.3	Fundamento Teórico.....	34
2.3.1	Peso Molecular del PSMA	34
2.3.2	Determinación del Porcentaje de Modificación	35
2.3.3	Elipsometría	36
2.3.4	Humectabilidad y Energía Superficial	37
2.3.5	Microscopía de Fuerza Atómica	40
2.3.6	Entrecruzamiento de Nanofibras.....	42
2.4	Metodología Capítulo I: Polielectrolitos Derivados de PSMA	44
2.4.1	Síntesis de Poli(anhídrido maleico- <i>alt</i> -estireno).....	44
2.4.2	Peso Molecular del PSMA	44
2.4.3	Modificación de PSMA con Aminoácidos	45
2.4.4	Caracterización Molecular de los Polielectrolitos.....	46
2.4.5	Determinación del Porcentaje de Modificación	47

2.4.6	Adsorción de los Polielectrolitos sobre Superficies Sólidas	47
2.4.7	Humectabilidad y Energía Superficial de las Películas de Polielectrolitos	49
2.4.8	Topografía y Rugosidad de Películas de Polielectrolitos.....	49
2.4.9	Adhesión y Viabilidad Celular.....	50
2.4.10	Inmunofluorescencia 4-HNE	50
2.5	Metodología Capítulo II: Polielectrolitos Derivados de PEMA.....	52
2.5.1	Determinación del Peso Molecular y Polidispersidad de PEMA.....	52
2.5.2	Modificación de PEMA con L-aminoácidos.....	52
2.5.3	Caracterización Molecular	54
2.5.4	Determinación del Porcentaje de Modificación	55
2.5.5	Determinación del pK_{ap}	55
2.5.6	Estudio de Solubilidad	55
2.5.7	Estudio de mezclas de PEMA-Aa/POE.	56
2.5.8	Determinación de Humectabilidad y Energía Superficial.....	57
2.5.9	Preparación y Caracterización de Nanofibras	58
3.	Resultados y Discusiones	64
3.1	Capítulo I: Polielectrolitos Derivados de PSMA	64
3.1.1	Caracterización de PSMA, PSMA-Gln, PSMA-Met y PSMA-Tyr.	64
3.1.2	Determinación del Porcentaje de Modificación de los Polielectrolitos	72

3.1.3	Comportamiento De Adsorción de Los Polielectrolitos sobres Superficies Sólidas	73
3.1.4	Humectabilidad de las Películas Poliméricas.....	79
3.1.5	Determinación de Energía Superficial	81
3.1.6	Topografía de las Películas Poliméricas	82
3.1.7	Adhesión Celular y Viabilidad Celular	86
3.2	Capitulo II: Polielectrolitos Derivados de PEMA	94
3.2.1	Caracterización de PEMA y PEMA-Aa.....	94
3.2.2	Determinación de los pK_{ap} de los Polielectrolitos	102
3.2.3	Determinación del Porcentaje de Modificación de los Polielectrolitos ...	104
3.2.4	Estudio de Solubilidad de los Polielectrolitos.....	105
3.3	Caracterización de Mezclas PEMA-Aa/POE	107
3.3.1	Determinación de Conductividad y Tensión Superficial de las Mezclas.	108
3.3.2	Determinación Humectabilidad y Energía Superficial de Películas Fabricadas a Partir de Mezclas de PEMA-Aa/POE.	113
3.3.3	Caracterización de las Mezclas PEMA-Aa/POE.	118
3.4	Electrohilado y Nanofibras Poliméricas.....	122
3.4.1	Efecto de la Concentración de las Mezclas en la Formación de Nanofibras	123
3.4.2	Morfología de las Nanofibras.	131

3.4.3	Entrecruzamiento de Nanofibras.....	140
4.	Conclusiones	142
5.	Bibliografía	145
6.	Anexo	151
6.1	Caracterización Molecular de PSMA-Aa.....	151
6.2	Determinación de Peso Molecular y Polidispersidad de PEMA	157
6.3	Caracterización Molecular de PEMA-Aa.....	161
6.3.1	Determinación de los pK _{ap}	176
6.4	Determinación de Interacciones en las mezclas PEMA-Aa/POE.	178

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Índice hidropático, H, de diferentes aminoácidos. ¹⁹	7
Tabla 2. Lista de equipos utilizados.	30
Tabla 3. Lista de reactivos y disolventes utilizados en el Capítulo I.	31
Tabla 4. Lista de reactivos y disolventes utilizados en el Capítulo II.	32
Tabla 5. Parámetros de electrohilado para las mezclas PEMA-Asp/POE.	59
Tabla 6. Parámetros de electrohilado para las mezclas PEMA-Met/POE.	59
Tabla 7. Parámetros de electrohilado para las mezclas PEMA-Tyr/POE.	60
Tabla 8. Parámetros de electrohilado para las mezclas PEMA-Arg/POE.	60
Tabla 9. Parámetros de electrohilado para las mezclas PEMA-Leu/POE.	61
Tabla 10. Bandas de adsorción IR asociadas a los principales grupos funcionales de los polielectrolitos derivados de PSMA.	67
Tabla 11. Masa molar de la unidad repetitiva de PSMA (U_{r0}) y los PSMA-Aa (U_{r100}), porcentaje de nitrógeno determinado por AE y porcentaje de modificación.	72
Tabla 12. Ángulo de contacto de avance (θ_a) y retroceso (θ_r) e histéresis ($\Delta\theta$) para las películas de PSMA-Gln, PSMA-Met y PSMA-Tyr 0.5 g/L obtenidas a pH 4.0 y 7.0 con 0.1 y 0.001 M de NaCl.	79
Tabla 13. Ángulos de contacto del par de disolventes agua-diyodometano sobre las películas de polielectrolitos 0.5 g/L a pH 4.0 y su energía superficial total con sus componentes polar y dispersiva.	81
Tabla 14. RMS de las películas de polielectrolitos obtenidas a diferentes fuerzas iónicas a pH 4.0.	84

Tabla 15. Bandas de absorción asociadas a los principales grupos funcionales de los polielectrolitos.....	98
Tabla 16. Valores de pK_{ap} determinados experimentalmente para los distintos polielectrolitos.....	103
Tabla 17. Masa molar de la unidad repetitiva de PEMA (U_{r0}) y los PEMA-Aa (U_{r100}), porcentaje de nitrógeno determinado por AE y porcentaje de modificación.....	105
Tabla 18. Solubilidad de PEMA, POE y de los polielectrolitos en disolventes con distinta constante dieléctrica a 25°C, (+) soluble, (-) insoluble.	106
Tabla 19. Valores de conductividad y tensión superficial para mezclas de PEMA-Asp/POE.....	108
Tabla 20. Valores de conductividad y tensión superficial para mezclas de PEMA-Met/POE.....	109
Tabla 21. Valores de conductividad y tensión superficial para mezclas de PEMA-Tyr/POE.	110
Tabla 22. Valores de conductividad y tensión superficial para mezclas de PEMA-Arg/POE.....	110
Tabla 23. Valores de conductividad y tensión superficial para mezclas de PEMA-Leu/POE.....	111
Tabla 24. Ángulos de contacto y energía superficial con su componente polar y dispersiva para películas obtenidas a partir de mezclas PEMA-Aa/POE.	114
Tabla 25. Diámetro promedio de las nanofibras de PEMA-Aa/POE (20%/10% p/v) en distintas proporciones.....	132

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. a) Esquema de la doble capa difusa. b) Esquema de la Teoría DLVO: describe las fuerzas que gobiernan el proceso de adsorción de un polielectrolito sobre una superficie.	9
Figura 2. Estructura de los copolímeros PEMA y PSMA utilizados.	17
Figura 3. Esquema de un equipo de electrohilado.	18
Figura 4. Esquema de ángulo de contacto de un líquido sobre una superficie sólida.	37
Figura 5. Esquema de la reacción de polimerización del copolímero PSMA.	44
Figura 6. Esquema de la reacción de modificación del copolímero PSMA con aminoácidos, R corresponde al grupo lateral de cada aminoácido: a) glutamina (Gln), b) metionina (Met) y c) tirosina (Tyr).	45
Figura 7. Esquema de la reacción de modificación de PEMA con aminoácidos, R corresponde a la cadena lateral de cada aminoácido: a) leucina, b) cisteína, c) metionina, d) tirosina, e) ácido aspártico y f) arginina.	53
Figura 8. Estructuras de los polielectrolitos: a) PSMA-Gln, b) PSMA-Met y c) PSMA-Tyr.	64
Figura 9. Espectro FT-IR obtenido para el PSMA.	65
Figura 10. Espectro FT-IR obtenido para el polielectrolito PSMA-Gln.	66
Figura 11. Espectros RMN- ¹ H obtenidos para a) PSMA y b) PSMA-Gln.	68
Figura 12. Espectros RMN- ¹³ C obtenidos para a) PSMA y b) PSMA-Gln.	70
Figura 13. Isotermas de adsorción obtenidas para a) y b) PSMA-Gln, c) y d) PSMA-Met and e) y f) PSMA-Tyr sobre superficies amino-terminales a pH 4.0 y 7.0 respectivamente,	

a fuerza iónica de (●) 0.1 M y (◆) 0.001 M g) Cantidad promedio de polielectrolito adsorbida en el plató bajo las mismas condiciones.....	75
Figura 14. Esquema general de adsorción de polielectrolitos sobre superficie sólida de carga opuesta. R corresponde a la cadena lateral de cada polielectrolito PSMA-Gln, PSMA-Met y PSMA-Tyr.....	77
Figura 15. Imágenes de AFM (1.5 x 1.5 μm) de las películas de polielectrolitos adsorbidos sobre una superficie sólida a pH 4.0 y concentraciones 0.001 y 0.1 M de NaCl.....	83
Figura 16. Conteo celular en función de las distintas condiciones de sustratos y tiempo de incubación.	86
Figura 17. Viabilidad celular evaluada mediante MTT.	87
Figura 18. Estrés oxidativo celular evaluado mediante 4-HNE.....	87
Figura 19. Imágenes de las células sembradas sobre los a) vidrio, b) polilisina, c) PSMA-Gln, d) PSMA-Met y e) PSMA-Tyr después de 48 horas.	89
Figura 20. a) Porcentaje de células agrupadas según el número de procesos. b) Diámetro promedio de los procesos de cada célula agrupados según el número de procesos.....	90
Figura 21. Imágenes SEM del cultivo celular de SH-SY5Y luego de 24 horas sobre las superficies de a) PMSA, b) PMSA-Gln, c) PMSA-Met y d) PMSA-Tyr con magnificaciones de 2000X, 6000X y 15000X.....	92
Figura 22. Estructuras de los polielectrolitos: a) PEMA-Asp b) PEMA-Arg, c) PEMA-Cys, d) PEMA-Leu, PEMA-Met y PEMA-Tyr.	95
Figura 23. Espectro FT-IR obtenido para el PEMA.	96
Figura 24. Espectro FT-IR obtenido para el polielectrolito PEMA-Asp.....	97
Figura 25. Espectros RMN- ¹ H obtenidos para a) PEMA y b) PEMA-Asp.....	99

Figura 26. Espectros RMN- ¹³ C obtenidos para a) PEMA y b) PEMA-Asp	101
Figura 27. Curva de titulación potenciométrica de a) PEMA-Arg y b) PEMA-Asp con HCl 0.1 M.	102
Figura 28. Disoluciones del polielectrolito PEMA-Cys a distintas concentraciones: a) 5% p/v, b) 8% p/v, c) 10% p/v, d) 15% p/v polielectrolito hinchado y e) 20% p/v polielectrolito hinchado.	107
Figura 29. Energía superficial (γ^{Total}), con sus componentes polar (γ^{p}) y dispersiva (γ^{d}), de las películas obtenidas a partir de mezclas de PEMA-Aa/POE.	116
Figura 30. Espectros FT-IR de mezcla PEMA-Asp/POE en proporciones 1:1, 1:2 y 1:3 y de sus componentes puros.	118
Figura 31. Termogramas de las mezclas PEMA-Asp/POE en distintas proporciones obtenidos mediante TGA.	119
Figura 32. Imagen de microscopía óptica de las gotas obtenidas durante electrohilado del polielectrolito PEMA-Tyr 20% p/v a) 40X y b) 100X	122
Figura 33. Imágenes de microscopía óptica para fibras de PEMA-Asp/POE en proporciones a) 1:1, b) 1:2 y c) 1:3, PEMA/POE en proporciones d) 1:1, e) 1:2 y f) 1:3 y PEMA-Tyr/POE en proporciones g) 1:1, h) 1:2 e i) 1:3 todas las mezclas a concentración 10% p/v, con aumento de 100X.	124
Figura 34. Figura 34. Figura 25. Imágenes de microscopía óptica para fibras obtenidas a partir de PEMA-Asp/POE en proporciones a) 1:1, b) 1:2 y c) 1:3, PEMA-Met/POE en proporciones d) 1:1, e) 1:2 y f) 1:3 y PEMA-Tyr/POE en proporciones g) 1:1, h) 1:2 e i) 1:3, todas las mezclas a concentración 15%/10% p/v, con aumento de 100X.	126

Figura 35. Imágenes de microscopía óptica para fibras obtenidas a partir de PEMA-Asp/POE en proporciones a) 1:1, b) 1:2 y c) 1:3, PEMA-Met/POE en proporciones d) 1:1, e) 1:2 y f) 1:3 PEMA-Tyr/POE en proporciones g) 1:1, h) 1:2 e i) 1:3, todas las mezclas a concentración 20%/10% p/v, con aumento de 100X.	128
Figura 36. Imágenes de microscopía óptica para fibras de PEMA-Arg/POE (20%/10% p/v) en proporciones a) 1:1, b) 1:2 y c) 1:3, PEMA-Leu/POE (20%/10% p/v) en proporciones d) 1:1, e) 1:2 y f) 1:3, con aumento de 100X.	130
Figura 37. Imágenes SEM de nanofibras de PEMA-Asp/POE (20%/10% p/v) en proporciones a) 1:1, b) 1:2 y c) 1:3 tomadas a 3000X y 15000X.	135
Figura 38. Imágenes SEM de nanofibras de PEMA-Met/POE (20%/10% p/v) en proporciones a) 1:1, b) 1:2 y c) 1:3 tomadas a 3000X y 15000X.	136
Figura 39. Imágenes SEM de nanofibras de PEMA-Tyr/POE (20%/10% p/v) en proporciones a) 1:1, b) 1:2 y c) 1:3 tomadas a 3000X y 15000X.	137
Figura 40. Imágenes SEM de nanofibras de PEMA-Arg/POE (20%/10% p/v) en proporciones a) 1:1, b) 1:2 y c) 1:3 tomadas a 3000X y 15000X.	138
Figura 41. Imágenes SEM de nanofibras de PEMA-Leu/POE (20%/10% p/v) en proporciones a) 1:1, b) 1:2 y c) 1:3 tomadas a 3000X y 15000X.	139

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico	PDVMA: Poli(anhídrido maleico- <i>alt</i> -divinileter)
AFM: Microscopía de Fuerza Atómica	PEMA: Poli(anhídrido maleico- <i>alt</i> -etileno)
AIBN: α,α -Azobisisobutironitrilo	PIBMA: Poli(anhídrido maleico- <i>alt</i> -isobutileno)
APTES: (3-aminopropil)triétoxissilano	PM: Peso Molecular
Arg: Arginina	POE: Poli(óxido de etileno)
ARN: Ácido Ribonucleico	PSMA: Poli(anhídrido maleico- <i>alt</i> -estireno)
Asp: Ácido Aspártico	PVPMA: Poli(anhídrido maleico- <i>alt</i> -vinilpirrolidona)
CMC: Carboximetilcelulosa	RMN-¹³C: Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13.
Cys: Cisteína	RMN-¹H: Resonancia Magnética Nuclear de Protones.
DLVO: Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek	RMS: Raíz Cuadrática Media de la Rugosidad
DMSO: Dimetilsulfóxido	SEC: Cromatografía de Exclusión por Tamaño
DMSO-D₆: Dimetilsulfóxido Deuterado	SiW: Silicon Wafers
DSC: Calorimetría Diferencial de Barrido	TEA: Trietilamina
EDA: Etilendiamina	TGA: Análisis Termogravimétrico
FT-IR: Espectroscopía Infrarrojo con Transforma de Fourier	THF: Tetrahidrofurano
GA: Glutaraldehído	Tyr: Tirosina
Gln: Glutamina	VIH-1: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
H: Índice Hidropático	
Leu: Leucina	
MEC: Matriz Extra-Celular	
Met: Metionina	
MTT: Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico	

RESUMEN

El uso de polielectrolitos para el desarrollo de materiales poliméricos con potenciales aplicaciones en el área de los biomateriales se ve favorecido dada la variedad de grupos funcionales y grupos ionizables que estos contienen en su estructura. Esta variedad estructural influye en la capacidad para atraer o repeler sistemas biológicos como células y proteínas, afectando el comportamiento de adhesión, crecimiento y viabilidad sobre el material polimérico.

El desarrollo de esta Tesis ha contribuido a la obtención de películas nanoestructuradas y nanofibras a partir de polielectrolitos derivados de poli(anhídrido maleico-*alt*-estireno) (PSMA) y poli(anhídrido maleico-*alt*-etileno) (PEMA) modificado con aminoácidos de diferente índice hidropático. Estos polielectrolitos fueron caracterizados mediante FT-IR, RMN-¹H, RMN-¹³C y análisis elemental. El grado de modificación de los polielectrolitos obtenidos fue de un 80% aproximadamente.

Las películas nanoestructuradas fueron preparadas a partir de polielectrolitos derivados de PSMA modificado con los aminoácidos L-glutamina, L-metionina y L-tirosina, denominados PSMA-Gln, PSMA-Met y PSMA-Tyr, respectivamente. Se estudió su comportamiento de adsorción sobre SiW modificado hidrofílicamente a pH 4.0 y 7.0 y a dos fuerzas iónicas (0.1 y 0.001M NaCl). A pH 4.0 el comportamiento de adsorción para PSMA-Gln, PSMA-Met y PSMA-Tyr a 0.1M NaCl está gobernado por interacciones hidrofóbicas, al igual que para PSMA-Gln y PSMA-Tyr a 0.001M NaCl. El comportamiento de adsorción para PSMA-Met a 0.001M está determinado por

interacciones electrostáticas. Las películas PSMA-Gln, PSMA-Met y PSMA-Tyr mostraron zonas hidrofóbicas e hidrofílicas en la superficie indicando la presencia de grupos carboxilatos, ácidos carboxílicos y fenilos. Las imágenes de AFM de las películas mostraron una morfología con nanoestructuras globulares bien definidas y nanoestructuras lineales densamente empaquetadas, determinadas por la conformación del polielectrolito en disolución conservándola en la superficie. Además, se estudió la adhesión y viabilidad de las células neuronales de la línea celular SH-SY5Y, estas células se propagaron en menor medida para las películas en comparación con los sustratos estándares. Se observó que las películas de PSMA-Met favoreció la peroxidación de lípidos presentes en la pared celular, sin embargo, estos tratamientos no afectaron la viabilidad celular lo que sugiere que PSMA-Met modificó la respuesta del neuroblastoma SH-SY5Y con el sustrato.

Además, se obtuvieron nanofibras a partir de mezclas de polielectrolitos derivados de PEMA con los aminoácidos L-ácido aspártico, L-arginina, L-leucina, L-metionina y L-tirosina con POE ($M_w = 300$ kDa) en distintas proporciones y concentraciones. Estas mezclas fueron estudiadas mediante FT-IR, TGA y DSC para establecer la miscibilidad de la mezcla. Se determinó que a una concentración de 20% p/v de polielectrolitos mezclados con POE 10% p/v se obtienen fibras continuas y sin defectos morfológicos con diámetros entre 200 y 350 nm.

Finalmente, no se logró entrecruzar las mallas de nanofibras obtenidas con ninguno de los agentes entrecruzantes utilizados. Lo anterior se debe a que las nanofibras interactúan

rápidamente con el disolvente, provocando una pérdida la conformación de las fibras y sus propiedades características.

ABSTRACT

The use of polyelectrolytes for the development of polymeric materials with potential applications in the area of biomaterials is favored given the variety of functional groups and ionizable groups they contain in their structure. This structural variety influences the ability to attract or repel biological systems such as cells and proteins, affecting the adhesion, growth and viability behavior on the polymeric material.

The development of this Thesis has contributed to the obtaining of nanostructured films and nanofibers from polyelectrolytes derived from poly (maleic anhydride-alt-styrene) (PSMA) and poly (maleic anhydride-alt-ethylene) (PEMA) modified with amino acids from different hydrophobic index. These polyelectrolytes were characterized by FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and elemental analysis. The degree of modification of the polyelectrolytes obtained was about 80%.

The nanostructured films were prepared from polyelectrolytes derived from PSMA modified with the amino acids L-glutamine, L-methionine and L-tyrosine, called PSMA-Gln, PSMA-Met and PSMA-Tyr, respectively. Their adsorption behavior on SiW modified hydrophilically at pH 4.0 and 7.0 and at two ionic strengths (0.1 and 0.001M NaCl) was studied. At pH 4.0 the adsorption behavior for PSMA-Gln, PSMA-Met and PSMA-Tyr at 0.1M NaCl is governed by hydrophobic interactions, as well as for PSMA-Gln and PSMA-Tyr at 0.001M NaCl. The adsorption behavior for PSMA-Met at 0.001M

is determined by electrostatic interactions. The PSMA-Gln, PSMA-Met and PSMA-Tyr films showed hydrophobic and hydrophilic areas on the surface indicating the presence of carboxylate, carboxylic acid and phenyl groups. The AFM images of the films showed a morphology with well-defined globular nanostructures and densely packed linear nanostructures, determined by the conformation of the polyelectrolyte in solution, preserving it on the surface. In addition, the adhesion and viability of the neuronal cells of the SH-SY5Y cell line were studied, these cells propagated to a lesser extent for the films compared to the standard substrates. It was observed that the PSMA-Met films favored peroxidation of lipids present in the cell wall, however, these treatments did not affect cell viability suggesting that PSMA-Met modified the response of the neuroblastoma SH-SY5Y with the substrate.

In addition, nanofibers were obtained from mixtures of polyelectrolytes derived from PEMA with the amino acids L-aspartic acid, L-arginine, L-leucine, L-methionine and L-tyrosine with POE (Mw = 300 kDa) in different proportions and concentrations. These mixtures were studied by means of FT-IR, TGA and DSC to establish the miscibility of the mixture. It was determined that at a concentration of 20% w/v of polyelectrolytes mixed with POE 10% w/v, continuous fibers are obtained and without morphological defects with diameters between 200 and 350 nm.

Finally, it was not possible to cross-link the nanofiber meshes obtained with any of the crosslinking agents used. The above is since the nanofibers interact rapidly with the solvent, causing a loss of conformation of the fibers and their characteristic properties

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES GENERALES

La ingeniería de tejidos abarca y aplica conocimientos de distintas disciplinas como medicina, biología celular, fisicoquímica de materiales e ingeniería para la creación y desarrollo de productos terapéuticos que combinados con sistemas celulares humanos o animales logren la reparación o regeneración de células o tejidos dañados por lesiones, accidentes o defectos cognitivos. Las estrategias generales aplicadas en este campo pueden clasificarse en 3 grupos: i) implantación de células aisladas o sustitutos celulares en un organismo, ii) suministrar sustancias que induzcan tejidos, por ejemplo, factores de crecimiento y iii) sembrar células sobre o dentro de diferentes matrices. ¹

Esta última estrategia es la que se asocia más frecuentemente a la ingeniería de tejidos y para lograr este objetivo, se trabaja en el desarrollo de andamios tridimensionales (3D) que simulen la arquitectura externa de la matriz extracelular, MEC, y que permitan la difusión de nutrientes, metabolitos y factores solubles hasta que las células sembradas puedan producir una nueva MEC funcional y regenerar las estructuras deseadas. La MEC nativa consta de una red compleja de proteínas estructurales y regulatorias que están alojadas en una matriz fibrosa. También contiene células con ligandos específicos para adhesión y migración celular y modula la función y proliferación celular. ²

El desarrollo del primer soporte biológicamente activo fue reportado en 1974 cuando se describió su comportamiento de degradación, su antigenicidad excepcional *in vivo*, y su comportamiento tromborresistente *in vivo*.³ La primera patente que describió estos

soportes fue otorgada en 1977 y en 1980 se describieron detalladamente los principios para sintetizar soportes biológicamente activos. A partir de este hito, comenzó a aumentar el interés de desarrollar biomateriales, primero a partir de polímeros naturales y luego utilizando polímeros sintéticos. En el proceso de desarrollo de un nuevo biomaterial, existe un gran número de factores como morfología, tamaño de poro, conectividad de los poros, propiedades mecánicas, propiedades superficiales y biodegradabilidad que se deben considerar en el diseño de un soporte, ya que todos estos pueden afectar la adhesión, proliferación y migración celular.⁴

Mientras más se avanza en esta área, nuevas necesidades han surgido, la ciencia básica busca cubrirlas, además de sintetizando y caracterizando un determinado material, mejorando su especificidad y potenciando su uso en estas múltiples aplicaciones. Para llevar esto a cabo, se han desarrollado algunas estrategias como la obtención de películas delgadas nanoestructuradas a partir de la modificación química de sistemas poliméricos con carbohidratos, aminoácidos o péptidos, la fabricación de nanomateriales como nanofibras o nanopartículas poliméricas, entre otras.^{5,6}

El uso de polielectrolitos para el desarrollo de biomateriales presenta ventajas debido a los grupos funcionales ionizables que contienen en su estructura. La variedad estructural de los polielectrolitos puede influir en la selectividad para atraer o repeler sistemas y/o especies biológicas como células, proteínas o bacterias dado que los diferentes grupos ionizables pueden interactuar de forma específica con estos materiales biológicos mediante interacciones electrostáticas, van der Waals, hidrofóbicas y puentes de hidrógeno.⁶

En este contexto, el desarrollo de esta tesis contribuirá en la obtención de películas nanoestructuradas y nanofibras a partir de polielectrolitos modificados con aminoácidos, desarrollando además una completa caracterización de ambas, proyectando una potencial aplicación en el campo de los biomateriales poliméricos.

1.1.1 Polímeros

Un polímero es una macromolécula formada por moléculas pequeñas que se repiten una y otra vez, unidas covalentemente entre ellas. Estas unidades básicas de construcción, denominadas monómeros, pueden ser iguales entre sí, o de dos o más tipos diferentes. Si el polímero está constituido por monómeros idénticos, se denomina *homopolímero*, por otro lado, si el polímero está constituido por dos o más monómeros distintos, se denomina *copolímero*.

Existen muchos polímeros que se encuentran en los seres vivos o que provienen de ellos, estos se denominan *polímeros naturales* y pueden ser considerados como los primeros materiales biodegradables utilizados clínicamente, ya que tienen propiedades bioactivas que les permiten tener mejores interacciones con células, permitiendo un aumento de la actividad celular en un sistema biológico. Los polímeros naturales más utilizados pueden separarse en tres grandes grupos: i) proteína como seda, colágeno, gelatina, fibrinógeno, elastina, queratina, actina y miosina; ii) polisacáridos como celulosa, amilosa, dextrano, quitina y iii) glucosaminoglicanos y polinucleótidos como el ADN y ARN. ⁷⁻¹⁰

Por otro lado, los *polímeros sintéticos* también han sido ampliamente utilizados para el desarrollo de biomateriales ya que presentan interesantes ventajas en relación con otros materiales. Por ejemplo, se pueden modular algunas propiedades mecánicas, variar

cinéticas de degradación o pueden ser obtenidos con distintas formas y morfologías para favorecer el crecimiento de un tejido. Dado que estos polímeros pueden ser sintetizados, se pueden incluir una gran variedad y cantidad de grupos funcionales. Los polímeros sintéticos más utilizados para el desarrollo de materiales bioactivos pertenecen a la familia de los poli(α -esteres) como el poli(ácido glicólico), poli(L-ácido láctico), poli(L-lactato-co-glicolato), poli(caprolactona), poli(dioxanona), los poliuretanos, los polianhídridos y los poliaminoácidos.^{7,11}

También se han utilizado distintos polielectrolitos tales como quitosano, alginato de sodio, hialuronato de sodio, poli(L-arginina), poli(L-lisina), poli(alilamina clorhidrato), poli(dialildimetilamonio clorhidrato), poli(anilina), poli(pirrol), polielectrolitos derivados de anhídridos, entre otros.^{12,13}

1.1.2 Polielectrolitos

Un polielectrolito es un polímero, ya sea sintético o natural, que contiene grupos ionizables en su cadena principal. En disolución acuosa, estos grupos pueden disociarse, dejando el polielectrolito cargado y liberando contraiones a la disolución. Dependiendo de la carga del polielectrolito, estos pueden clasificarse como polianiones, que poseen cargas negativas; policationes, que tienen cargas positivas y polianfolitos, que bajo condiciones determinadas pueden estar cargados positiva o negativamente.

Al ser macromoléculas cargadas, el comportamiento de los polielectrolitos en disolución es muy distinto al de un polímero no cargado, estos sistemas tienen la capacidad de autoagregación o autoorganización, adoptando diferentes conformaciones; las más

comunes son ovillos estadísticos al azar y/u ovillo extendido. Este comportamiento está regido por las interacciones electrostáticas existentes entre los segmentos cargados del polielectrolito y los contraiones presentes en la solución, y dependen principalmente de factores como el pH de la disolución, temperatura, concentración de sal adicionada o fuerza iónica, naturaleza química de los grupos ionizables, y peso molecular del polielectrolito.¹⁴

Utilizar polielectrolitos ofrece una considerable ventaja: se puede trabajar utilizando agua como disolvente, lo que significa una disminución en los costos económicos, se genera menos contaminación medioambiental y los dispositivos poliméricos obtenidos tienen mayor posibilidad de ser biocompatibles. Debido a esto, los polielectrolitos han adquirido un creciente y continuo interés, tanto en el ámbito científico, médico, tecnológico e industrial.

Considerando que la selectividad de la interacción es una ventaja importante en aplicaciones biológicas, algunos trabajos han potenciado esta característica a través de la modificación del polielectrolito con moléculas orgánicas o biológicas tales como azúcares, péptidos y enzimas, entre otros. En general, la modificación de polímeros con péptidos o aminoácidos como lisina, arginina, ácido aspártico y fenilalanina han mostrado efectos positivos en la adhesión, proliferación y diferenciación celular.¹⁵⁻¹⁸ Dado que existe un gran número de aminoácidos, con cadenas laterales de diferente naturaleza química, se desarrolló un indicador numérico de la hidrofobicidad o hidrofiliidad de estas cadenas, llamado índice hidropático (H). En este índice mientras más grande sea el valor

numérico, más hidrofóbico será el aminoácido.¹⁹ En la Tabla 1 se muestran los aminoácidos que se estudiarán en este trabajo con el valor del H:

Tabla 1. Índice hidropático, H, de diferentes aminoácidos.¹⁹

Aminoácido	Abreviación	H
L-Arginina	Arg	-4.5
L-Glutamina	Gln	-3.5
L-Ácido Aspártico	Asp	-3.5
L-Tirosina	Tyr	-1.3
L-Metionina	Met	1.9
L-Cisteína	Cys	2.5
L-Leucina	Leu	3.5

1.2 ADSORCIÓN DE POLIELECTROLITOS SOBRE SUPERFICIES SÓLIDAS

La adsorción es la acumulación de una sustancia en una interfase o superficie. Cuando la adsorción es dominada por interacciones físicas de largo o corto alcance, se denomina fisisorción. Si la energía de adsorción es del orden de la energía de un enlace químico, el proceso corresponde a una quimisorción.

La adsorción de polielectrolitos sobre superficies sólidas de carga opuesta es un fenómeno donde las cadenas de polielectrolitos se unen espontáneamente a una superficie con carga opuesta, es decir, se produce un *auto-ensamble*. A nivel molecular, los polielectrolitos no reaccionan covalentemente con la superficie, pero se mantienen unidos mediante

interacciones electrostáticas por cargas opuestas, por fuerzas atractivas de van der Waals y las fuerzas de hidratación.^{6,20}

El método más utilizado para obtener películas nanoestructuras es sumergir un sustrato cargado en una disolución de polielectrolito con carga opuesta. Durante este proceso, se forma una doble capa difusa de contraiones, como se muestra en la Figura 1a, cuyo espesor depende de la cantidad de sal adicionada en la disolución y está definido por la longitud de Debye (λ). Con el aumento de los niveles de sal, el aumento de la cantidad adsorbida conduce a películas más gruesas y más homogéneas. Las fuerzas de interacción entre las superficies recubiertas con capas de polielectrolito saturado se rigen a concentraciones bajas de sal mediante interacciones eléctricas de doble capa repulsivas, y las suspensiones de partículas son estables en estas condiciones. A concentraciones de sal apropiadamente altas, las fuerzas se vuelven atractivas, principalmente debido a las interacciones de van der Waals, pero eventualmente también a través de otras fuerzas, y las suspensiones se vuelven inestables. La teoría que mejor describe el balance entre las fuerzas de atracción de van der Waals y las fuerzas de repulsión electrostáticas, es el modelo DLVO (Derjaguin – Landau y Verwey – Overbeek) que originalmente fue descrita para coloides. La teoría DLVO (Figura 1b) establece de forma cuantitativa la barrera energética entre las fuerzas de atracción, que producen la coagulación entre coloides, y las fuerzas de repulsión, que producen la estabilización de las partículas coloidales, y se extiende a la adsorción de polielectrolitos en superficie ya que estos poseen propiedades similares a las partículas coloidales.^{21,22}

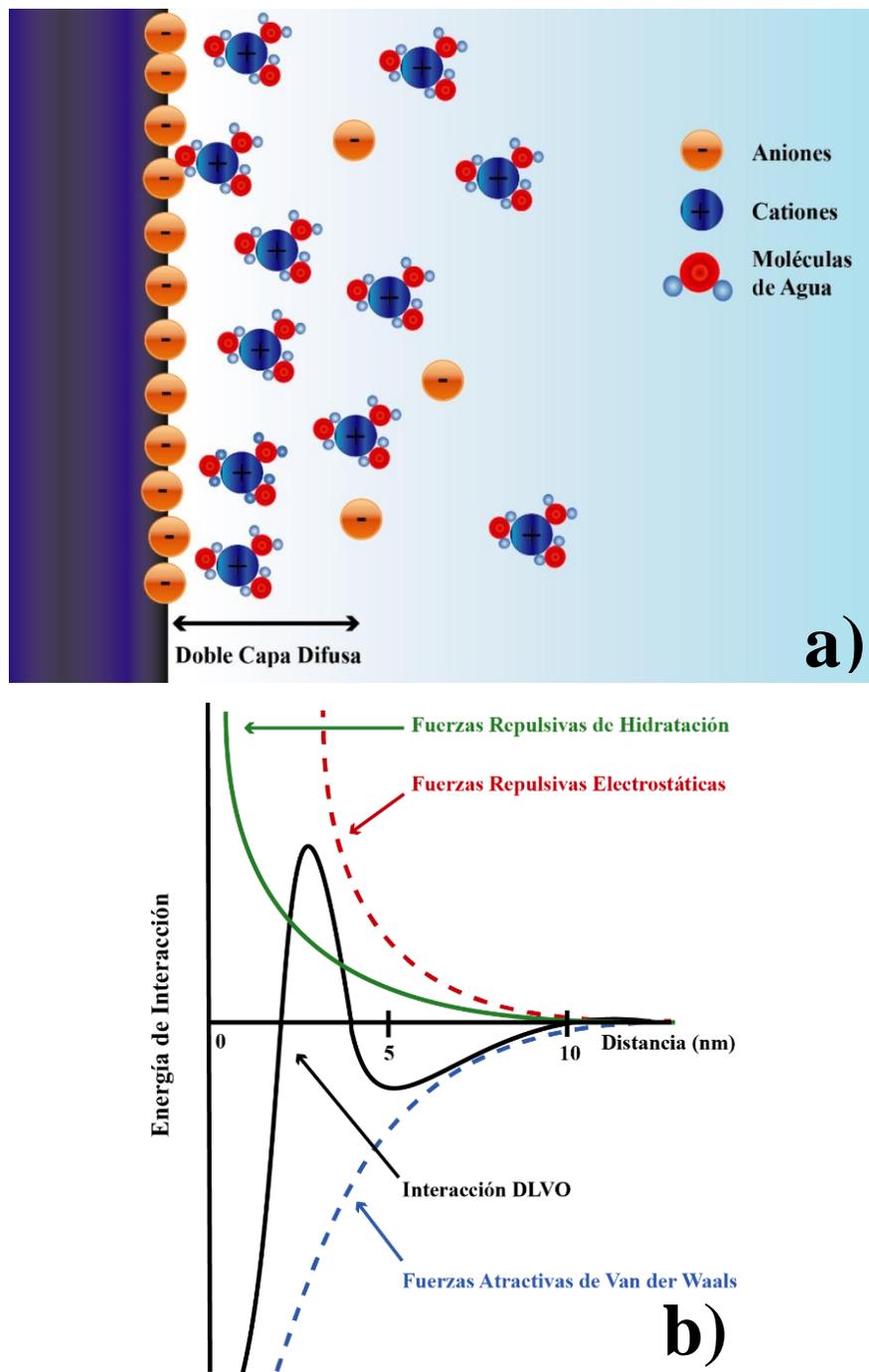


Figura 1. a) Esquema de la doble capa difusa. b) Esquema de la Teoría DLVO: describe las fuerzas que gobiernan el proceso de adsorción de un polielectrolito sobre una superficie.

Existen muchos estudios sobre los efectos que tiene la sal adicionada y también pH sobre el proceso de adsorción de polielectrolitos en el interfaz sólido/líquido.²³⁻²⁶ Van de Steeg y col.²⁵ se basaron en cálculos numéricos tomando en cuenta la concentración de la sal adicionada, establecieron su propia teoría que describe dos claros regímenes de adsorción. El primero de ellos es denominado “*adsorción reducida por apantallamiento*”; aquí la cantidad de polielectrolito adsorbida disminuye al aumentar la concentración de la sal. Se ha observado este comportamiento en polielectrolitos que presentan tanto alta como baja carga segmentar y con una densidad de carga lo suficientemente alta. Este efecto se espera si la atracción entre el polielectrolito y la superficie es principalmente de naturaleza electrostática, debido a que la sal no sólo apantalla la repulsión segmento-segmento, sino que también la atracción segmento superficie. El segundo caso, es el régimen “*adsorción aumentado por apantallamiento*”, en éste la cantidad de polielectrolito adsorbida aumenta junto con la concentración de la sal. Este caso, se ha observado en polielectrolitos altamente cargados. La idea es que con altas concentraciones de sal la fuerte repulsión entre los segmentos es apantallada y las cadenas de polielectrolitos se comienzan a comportar más como polímeros sin carga que como polímeros cargados. Es por ello por lo que pueden adoptar conformaciones del tipo “*loops*” y “*tails*”, para aumentar así la cantidad adsorbida. Esta situación es favorecida, sólo si hay una interacción atractiva entre los segmentos y la superficie, que no sea de naturaleza electrostática.

Petri y col. estudiaron el comportamiento de adsorción de carboximetilcelulosa (CMC) sobre superficies amino-terminales mediante elipsometría.²⁶ Se encontró que la cantidad de polielectrolito adsorbido disminuyó junto con la concentración de sal adicionada, en

concordancia con el régimen de “*adsorción reducida por apantallamiento*”, además se encontró que el pH influye de manera directa en el comportamiento de adsorción, a pH 3 se obtuvo una mayor cantidad de CMC adsorbida, a pH 5.5 esta cantidad fue mucho menor, mientras que a pH 7.0 no hubo adsorción de CMC sobre la superficie.

Además, nuestro grupo de laboratorio ha estudiado el efecto del grupo espaciador, la naturaleza química de la cadena lateral, el peso molecular del polielectrolito y la fuerza iónica de la solución mediante elipsometría en el comportamiento de adsorción en la interface sólido/líquido de polielectrolitos derivados de PSMA conteniendo grupos arilo, (fenil y naftil) y alquil-aril (etil-fenil, butil-fenil, etil-naftil y butil-naftil) en la cadena lateral del polielectrolito, sobre superficies modificadas tanto hidrofílica como hidrofóbicamente.^{27,28} Se encontró que los copolímeros que contienen grupos arilo mostraron un comportamiento de adsorción gobernado principalmente por interacciones electrostáticas donde la cantidad adsorbida de polielectrolito disminuye cuando se aumenta la concentración de sal adicionada. En el otro caso, donde los polielectrolitos contienen grupos alquilo-arilo el comportamiento de adsorción está determinado principalmente por interacciones hidrofóbicas, en consecuencia, la cantidad adsorbida de polielectrolito aumenta cuando se aumenta la cantidad de sal adicionada. Además, la caracterización mediante ángulo de contacto mostró que estas películas de polielectrolitos presentan una alta heterogeneidad química y una moderada hidrofiliidad.

1.3 PROPIEDADES SUPERFICIALES

Las propiedades superficiales de una película obtenida a partir de un biomaterial polimérico son determinantes en el comportamiento de adhesión, proliferación y crecimiento celular. Algunas propiedades como la energía superficial libre, el balance hidrofóbico/hidrofílico de la superficie, la estructura química y grupos funcionales, tipo y densidad de carga, topografía y rugosidad de las superficies afectan de forma importante la interacción entre estos materiales y los sistemas biológicos que son expuestos a ellos.

29,30

En este contexto, Comelles y col. estudiaron la relación que existe entre energía superficial y la rugosidad de las superficies modificadas con polimetilmetacrilato, poliestireno y polidimetilsiloxano con la biocompatibilidad de las superficies en la adsorción de proteínas y cultivos celulares MG-63 y como esta se ve afectada por esos factores. Las superficies fueron caracterizadas mediante ángulo de contacto y AFM, se encontró que la rugosidad de las películas no fue un factor determinante para la adsorción de proteínas sobre las superficies, pero sí la energía superficial. Se adsorbió una mayor cantidad de proteínas sobre la superficie con mayor hidrofobicidad y menor energía superficial. Las pruebas de adhesión celular y proliferación demostraron que no existe relación directa entre la cantidad de proteína adsorbida y el comportamiento celular sobre una misma superficie.³¹

También se ha determinado la energía superficial y se ha estudiado la humectabilidad de una serie de materiales utilizados comúnmente en cultivos celulares tales como placas de

cultivo celular de poliestireno, silicio, óxido de silicio y óxido de indio delgado, así como también, las moléculas clásicas utilizadas para adhesión celular como colágeno, fibronectina, poli-D-lisina y poli-L-ornitina, los resultados mostrados en este estudio proveen una útil base de datos para trabajar en el área biomédica.³²

En este mismo contexto, se determinaron las propiedades superficiales de películas delgadas de polímeros derivados de celulosa con distinto largo de cadena y la relación que existe entre la energía superficial y el tamaño de los grupos alquil-éster de la cadena lateral. Estas películas fueron caracterizadas mediante elipsometría, ángulo de contacto y microscopía de fuerza atómica (AFM). Se encontró que a medida que aumentó el tamaño del grupo alquil-éster de la cadena lateral la energía superficial disminuyó significativamente y además las interacciones tipo van der Waals se hicieron más débiles.

33

Por otro lado, se ha investigado el efecto individual, combinado y sinérgico que tiene la carga superficial y la humectabilidad de películas de polielectrolitos derivados de PIBMA sobre la adsorción de diferentes proteínas (albúmina de suero bovino y lisozima) y la adhesión de celular de fibroblastos 3T3. Se encontró que, para la adsorción de proteínas existen umbrales de humectabilidad y carga de la superficie; existe una mayor adhesión de proteínas en superficies de mayor ángulo de contacto, es decir en las superficies más bien hidrofóbicas, así como también en las superficies cargadas positivamente. Por su parte, para la adhesión de fibroblastos, tanto la carga superficial como la humectabilidad tuvieron un efecto sobre el comportamiento de adhesión; los efectos combinados de carga

positiva e hidrofiliidad conducen a una mayor adhesión celular, mientras que carga negativa e hidrofobicidad conducen a una adhesión celular más baja.³⁴

1.4 COPOLÍMEROS DERIVADOS DE ANHÍDRIDO MALEICO

El anhídrido maleico (AM) es una molécula orgánica que tiene la capacidad de formar copolímeros alternantes con una gran variedad de comonómeros vinílicos, es decir, monómeros que contienen al menos un doble enlace carbono-carbono en su estructura. Estos copolímeros y sus derivados son sistemas poliméricos de interés en distintas áreas, debido a la versatilidad que estos presentan. Por un lado, se pueden elegir comonómeros vinílicos de distinta naturaleza química tales como N-vinilpirrolidona, estireno, etileno o alquilviniléteres de distinto largo de cadena que influyen directamente determinan las propiedades de hidrofobicidad/hidrofiliidad del copolímero, y, por otro lado, el anillo de AM puede abrirse al reaccionar con nucleófilos moderados o fuertes en reacciones de amidación, esterificación, hidrólisis e imidación.^{28,35-37} Además a partir de copolímeros de AM, se pueden obtener polielectrolitos aniónicos mediante la neutralización de sus grupos cargados con diferentes contraiones.²⁷ El uso de polielectrolitos a base de AM, presenta ventajas relacionadas con la obtención de una plataforma de funcionalidad modulada, originando un alto grado de versatilidad química, la que puede ser potenciada a través de la modificación con biomoléculas que promuevan la bio-respuesta requerida.

38

Entre los copolímeros que contienen como unidad monomérica AM de interés se encuentran el poli(anhídrido maleico-*alt*-N-vinilpirrolidona), PVPMA, que ha sido

utilizado como agente transportador y liberador de fármacos, el poli(anhídrido maleico-*alt*-divinileter), PDVMA, que ha mostrado actividad antitumoral, antiviral y antibacteriana *per-sé*, el poli(anhídrido maleico-*alt*-estireno), PSMA, que presenta una amplia solubilidad y miscibilidad, capacidad para formar películas delgadas y biocompatibilidad. Se ha encontrado que derivados de PSMA tienen baja toxicidad celular y son eficaces inhibidores del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) en un modelo celular *in vitro*, así como también hidrogeles derivados de PSMA remueven cationes de metales pesados en disoluciones acuosas^{39,40}, y el poli(anhídrido maleico-*alt*-etileno), PEMA, que presenta actividad antiviral y un bajo impedimento estérico al llevar a cabo reacciones de apertura del anillo, lo que contribuiría a obtener copolímeros con un alto grado de modificación.⁴¹⁻⁴³

La modificación de copolímeros con aminoácidos y péptido es de interés, particularmente por sus propiedades de reconocimiento en sistemas biológicos, las que podrían ser transferidas al nuevo sistema polimérico modificado. A pesar de que la reacción de apertura del anillo en polímeros derivados de AM utilizando aminas alifáticas ha sido estudiada anteriormente⁴⁴, existen pocos reportes sobre modificación de PEMA o PSMA con distintas aminas, ya sea alifáticas o contenidas en biomoléculas. Un ejemplo, es la modificación de PEMA con hidroxilamina y N-metilhidroxilamina para el desarrollo de sistemas de liberación controlada de ketoprofeno sensibles al pH, estos sistemas liberaron una mayor cantidad de la droga a pH 9 y no fueron afectados por el pH ácido del estómago.³⁵ También, se ha reportado la modificación de PEMA con L-fenilalanina mediante la apertura del anillo del AM con el propósito de construir multicapas a través del método

*capa-por-cap*a, las que presentan potenciales aplicaciones en la identificación y separación de compuestos con actividad óptica.⁴⁵

Por otro lado, se ha reportado que polielectrolitos derivados de PSMA modificados con 4-aminofenol presentan actividad bactericida contra *E. coli* y *S. aureus* en ensayos “*shake flask*” a pesar de que no se observó ninguna zona de inhibición específica.⁴⁶ Más recientemente, se ha reportado el desarrollo de nuevas superficies antibacteriana formadas a partir de multicapas de derivados de PSMA modificados con amino-azúcares. Se encontró que este tipo de películas poliméricas inhiben la adherencia bacteriana sin causar la muerte del patógeno, lo que podría contribuir a prevenir la resistencia bacteriana.⁴⁷

Así, la elaboración de matrices poliméricas a partir de polielectrolitos modificados con aminoácidos permitiría obtener un material que conjuga diversidad en su funcionalidad química modulando el equilibrio hidrofílico/hidrofóbico y/o propiedad ácido-base del polielectrolito y, por otro lado, su capacidad de auto agregación o auto organización en medio acuoso.

En el desarrollo de esta tesis se propone, la obtención de polielectrolitos de PEMA y PSMA (Figura 2) modificado con aminoácidos de diferente índice hidropático (denominados genéricamente PEMA-Aa y PSMA-Aa respectivamente) con el objetivo de modular tanto la carga del polielectrolito como su equilibrio hidrofóbico/hidrofílico.

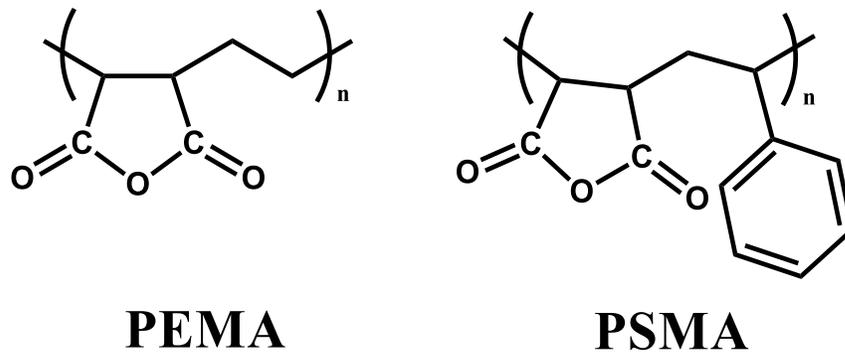


Figura 2. Estructura de los copolímeros PEMA y PSMA utilizados.

1.5 NANOFIBRAS POLIMÉRICAS

En las últimas décadas, el interés de obtener nanofibras en base a polímeros o polielectrolitos ha aumentado tanto en ciencia básica como aplicada. Las nanofibras poliméricas obtenidas mediante electrohilado poseen diámetros en la escala nanométrica (10-100 nm) y en la micrométrica (10-100 μm), presentan propiedades específicas como un área superficial muy grande en relación con el volumen que ocupan, flexibilidad en la funcionalidad de su superficie y un desempeño mecánico superior comparado con el mismo material procesado de cualquier otra forma. Todas estas características hacen que las nanofibras poliméricas puedan ser utilizadas en una variedad de aplicaciones en las que se incluyen la ingeniería de tejidos, textiles, elementos para cubrir heridas, medios de filtración, membranas especiales y diversas aplicaciones médicas tales como reemplazo de huesos, implantes dentales, sistemas de liberación de fármacos, injertos vasculares, vasos sanguíneos artificiales entre otros. ⁴⁸⁻⁵¹ Además, los soportes de nanofibras

poliméricas pueden ser fabricados con un tamaño de poro controlado, alta porosidad con poros conectados y permeabilidad. Estas propiedades estructurales contribuyen y facilitan un eficiente intercambio de nutrientes entre el soporte y el ambiente y provee una mayor área estructural para la adhesión, proliferación, migración y diferenciación celular, por lo que estas fibras son muy utilizadas en el área de la ingeniería de tejidos.^{52,53}

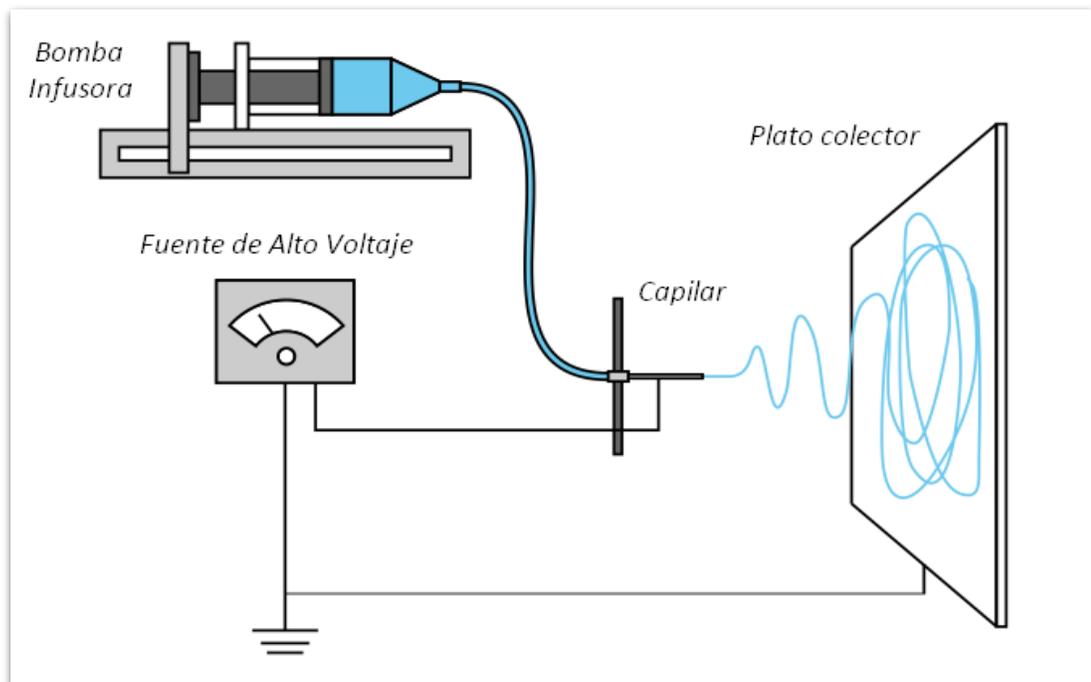


Figura 3. Esquema de un equipo de electrohilado.

Esta técnica utiliza una fuente de alto voltaje para inducir carga de una cierta polaridad a una disolución polimérica contenida en una aguja capilar, la cual es luego acelerada hacia un colector de polaridad opuesta, entre la punta de la aguja y el plato colector se genera un campo eléctrico mediante la aplicación de una diferencia de potencial (Figura 3). Cuando la fuerza de este campo eléctrico supera a la tensión superficial de la disolución

polimérica, la gota se distorsiona formando el cono de Taylor. Esta distorsión provoca la eyección de un chorro cargado eléctricamente hasta el colector, produciéndose la evaporación del disolvente y la deposición de las fibras sólidas sobre este. Estas fibras pueden ser colectadas de forma ordenada o al azar, dependiendo de si se utiliza un colector estacionario o rotatorio respectivamente. ^{48,54,55}

La obtención de nanofibras a través de la técnica de electrohilado está gobernada por diferentes parámetros relacionados con la disolución polimérica, el equipo y ambientales que influyen directamente en el proceso. Los parámetros de la solución polimérica tales como concentración, viscosidad, conductividad y tensión superficial se deben considerar para la fabricación de nanofibras poliméricas. ⁵⁶ Se ha estudiado que utilizando disolventes con mayor constante dieléctrica se reduce la formación de perlas (*beads*) de polímeros durante el proceso de formación de fibras. Por su parte, la viscosidad está determinada por la concentración de polímero en la disolución, encontrándose que, cuando la viscosidad es muy alta, se dificulta el paso de la disolución a través del capilar, mientras que cuando la viscosidad es muy baja, se obtienen gotas de la solución polimérica en el plato colector. Además, se ha estudiado la influencia de la conductividad de la disolución polimérica en el diámetro de las fibras; cuando existe un mayor transporte de carga, se produce un mayor estiramiento de la fibra, obteniéndose fibras con un menor diámetro. Finalmente, existen estudios que indican que cuando se tienen valores de tensión superficial muy alta, ocurre la aparición de defectos en las fibras, lo cual disminuye a medida que se disminuye la tensión superficial de la disolución. ^{49,55,57,58} En base a esto, se determinaron propiedades tales como solubilidad, viscosidad, conductividad y tensión

superficial a los distintos polielectrolitos mezclados con en diferentes concentraciones y proporciones.

Por otro lado, los parámetros del proceso, tales como, la velocidad de flujo del polímero y potencial eléctrico, los que influyen en el diámetro de la fibra. La distancia entre el capilar y el colector metálico determina el grado de evaporación del solvente, mientras que el movimiento del colector determina la formación de patrones durante la deposición de fibras.⁵⁸⁻⁶⁰ En esta tesis se determinaron todos los parámetros mencionados anteriormente para obtener nanofibras libres de defectos morfológicos, así como también garantizar la reproducibilidad de dichos experimentos.

Algunos sistemas poliméricos han presentado limitaciones en sus propiedades mecánicas una vez que han sido electrohiladas. En este sentido, el uso de mezclas de polímeros sintéticos y naturales ha presentado mejoras tanto en las propiedades mecánicas como en la biocompatibilidad del material final obtenido.⁶¹ En este contexto, ha sido reportado en literatura la obtención de nanofibras partir de mezclas de PEMA y almidón en distintas proporciones. Estas nanofibras altamente porosas fueron entrecruzadas térmicamente volviéndose insolubles en agua. Además, mediante análisis termogravimétrico (TGA), se encontró que a medida que aumenta la proporción de PEMA en la mezcla con respecto al almidón, se obtienen nanofibras con una mayor estabilidad térmica.⁶²

Sin embargo, la obtención de mezclas presenta algunos desafíos relacionados con la correcta elección del disolvente, la miscibilidad de sus componentes o la ausencia de interacciones intermoleculares entre los distintos componentes de la mezcla, entre otros factores.

Los polímeros predominantemente amorfos experimentan cambios importantes en algunas propiedades físicas, como por ejemplo su capacidad calorífica, volumen específico, coeficiente de expansión etc. asociados a una transición del polímero desde su estado vítreo (congelado) a un estado de alta elasticidad. La temperatura a la cual ocurre esta transición se denomina temperatura de transición vítrea (T_g) y se determina de manera relativamente sencilla mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).⁶³⁻⁶⁵ Esta técnica de análisis térmico entrega un gráfico del diferencial del calor absorbido o disipado por la muestra, comparado con una referencia.

Uno de los criterios adoptados para el estudio de miscibilidad en sistemas poliméricos se basa en el hecho de que la mezcla presente una o más temperaturas de transición vítrea. Si se considera un polímero A y un polímero B ambos con distintos valores T_g , la mezcla de ellos en proporción 50/50, puede formar una mezcla inmiscible, parcialmente miscible o miscible. En el caso que los polímeros formen una mezcla inmiscible, sus cadenas no interactúan entre sí, formando dominios separados, donde las cadenas del polímero A van a adquirir movilidad a la misma temperatura registrada como si estuvieran solas, sin sufrir interferencia del polímero B. Lo mismo ocurre para las cadenas del polímero B. En este caso se observan dos valores de T_g , las mismas de los componentes puros.

Adicionalmente, es probable que las cadenas de los polímeros A y B tengan alguna afinidad entre sí, de modo que existen dominios de A y B con alguna interpenetración de cadena de A en los dominios de B y viceversa. La presencia de cadenas de B (que adquieren movilidad a una temperatura más elevada) en los dominios de A dificultará la movilidad de estas cadenas elevando su T_g . Por otro lado, la presencia de cadenas A, ya

con movilidad en los dominios de B facilitará la movilidad de este último, reduciendo su T_g , obteniendo dos valores de T_g situadas entre los valores de las T_g de los componentes puros.

Cuando la interacción entre las cadenas de los polímeros A y B es completa, sus cadenas se interpenetran considerándose una misma estructura que forma un sistema homogéneo que adquiriendo movilidad de una sola vez, a una temperatura intermedia entre las T_g de los polímeros puros. Además, la T_g de una mezcla miscible va a depender de la composición de la mezcla. Un mayor contenido del polímero A en una mezcla miscible hará que la T_g esté más desplazada para el valor de la T_g del polímero A puro, y del mismo modo, un mayor contenido del polímero B hará que la T_g esté más desplazada hacia el valor de la T_g del polímero B puro.

Entre los polímeros más utilizados para realizar mezclas poliméricas que puedan ser electrohiladas se encuentra el poli(óxido de etileno), POE, este homopolímero no iónico, se caracteriza por su buena biocompatibilidad, baja toxicidad y buenas propiedades mecánicas. Este polímero es muy utilizado, ya que sus disoluciones ya sean acuosas o en disolventes orgánicos presentan propiedades como baja conductividad y alta viscosidad permitiendo que sea electrohilado de manera relativamente sencilla. Se ha estudiado el efecto de las propiedades de la disolución polimérica sobre el electrohilado de POE, reportándose la obtención de nanofibras sin defectos de este polímero a partir de disoluciones tanto en solventes orgánicos como en disoluciones acuosas.⁵⁷ Este polímero ha sido ampliamente utilizado para realizar mezclas con otros polímeros naturales como queratina y alginato, que no presentan las propiedades mecánicas adecuadas para ser

electrohilados por sí solos, se estudió el efecto de la proporción de POE en las mezclas poliméricas y se estudiaron las interacciones entre los componentes mediante FT-IR⁶⁶⁻⁶⁸ Además, como consecuencia de la gran variedad de pesos moleculares de POE disponibles, se ha estudiado el efecto de este sobre el electrohilado de alginato de sodio.⁶⁹ Se encontró que la adición de POE de pesos moleculares bajos ($M_w = 20$ kDa) no aumentó significativamente las propiedades mecánicas del alginato de sodio, lo cual se traduce en la imposibilidad de obtener nanofibras. Por su parte, la adición de POE de peso molecular alto ($M_w = 1000$ kDa), incrementó la capacidad del alginato de sodio para ser electrohilado. A pesar de este resultado, una gran cantidad de reportes señalan que mezclas de distintos polímeros con POE de peso molecular en un rango de $M_w = 100-500$ kDa, conducen a la correcta fabricación de nanofibras.^{57,66-68} Es por esto que previo a la obtención de nanofibras a partir de mezclas de polielectrolitos y POE, se estudiarán las interacciones de sus componentes mediante FT-IR y la estabilidad térmica de la mezcla mediante TGA y DSC.

El objetivo de este trabajo es obtener películas nanoestructuradas y nanofibras de polielectrolitos derivados de copolímeros de anhídrido maleico que sirvan como sustratos para la adhesión de células de interés en distintas áreas. La adhesión de células al sustrato desencadena una multitud de mecanismos de señalización celulares que modulan la sobrevivencia y diferenciación celular. En el caso particular de los cultivos neuronales, la modulación de los sustratos permite el establecimiento de sistemas de cultivo con características específicas (conectividad, mielinización, etc.).⁷⁰ En este contexto, la capacidad para diferenciarse de las células de neuroblastoma SH-SY5Y en células que

poseen un fenotipo similar a una neurona más madura mediante la manipulación del medio de cultivo ha brindado numerosos beneficios en el campo de la investigación en neurociencia. Las ventajas incluyen la capacidad de expansión a gran escala antes de la diferenciación, con relativa facilidad y bajo costo de cultivo en comparación con las neuronas primarias. Dado que estas células se consideran una línea celular, las preocupaciones éticas asociadas con el cultivo neuronal humano primario no están involucradas. Además, dado que las células SH-SY5Y son derivadas de seres humanos, expresan varias proteínas e isoformas de proteínas específicas para humanos que no estarían inherentemente presentes en cultivos primarios de roedores. Además, la diferenciación sincroniza el ciclo celular, que puede fluctuar dramáticamente en las células SH-SY5Y indiferenciadas y otras líneas celulares de uso común, para producir una población celular neuronal homogénea.⁷¹

En base a lo anterior se modificaron los copolímeros PEMA y PSMA con aminoácidos de distinto índice hidropático, obteniéndose polielectrolitos con un alto porcentaje de modificación. Estos polielectrolitos fueron caracterizados molecularmente mediante FT-IR, RMN-¹H, RMN-¹³C y análisis elemental. Se prepararon y caracterizaron películas delgadas de polielectrolitos derivados de PSMA modificado con los aminoácidos L-glutamina, L-metionina y L-tirosina, estudiando su comportamiento de adhesión en diferentes valores de pH y fuerza iónica, con el propósito de estudiar el efecto de la funcionalidad química de los distintos aminoácidos en la adhesión y viabilidad de células neuronales de la línea celular SH-SY5Y.

Además, se prepararon mezclas de los polielectrolitos derivados de PEMA modificado con los aminoácidos L-ácido aspártico, L-arginina, L-Leucina, L-Metionina y L-Tirosina con POE ($M_w = 300$ kDa) en distintas proporciones y concentraciones. Estas mezclas fueron estudiadas mediante FT-IR, TGA y DSC para establecer las interacciones y la miscibilidad de la mezcla. A partir de estas mezclas poliméricas y mediante la técnica de electrohilado, se obtuvieron fibras poliméricas de tamaño nanométrico, se determinó la concentración y proporción de cada polielectrolito en la mezcla para obtener nanofibras continuas que fueron caracterizadas en su morfología mediante SEM.

1.6 HIPÓTESIS

Polielectrolitos derivados de poli(anhídrido maleico-*alt*-estireno) modificados con aminoácidos de distinta hidrofiliidad/hidrofobicidad permiten obtener películas nanoestructuradas y mezclas de derivados de poli(anhídrido maleico-*alt*-etileno) modificados con aminoácidos de distinta hidrofiliidad/hidrofobicidad con poli(óxido de etileno) permiten obtener nanofibras con propiedades de adhesión y viabilidad celular.

1.7 OBJETIVO GENERAL

Obtener películas nanoestructuradas de polielectrolitos derivados de poli(anhídrido maleico-*alt*-estireno) y nanofibras a partir de mezclas de polielectrolitos derivados poli(anhídrido maleico-*alt*-etileno) con poli(óxido de etileno), los derivados de poli(anhídrido maleico-*alt*-estireno) y poli(anhídrido maleico-*alt*-etileno) contienen en su cadena lateral aminoácidos de diferente hidrofiliidad/hidrofobicidad. Evaluar las propiedades de adhesión y viabilidad celular de las películas nanoestructuradas y de las nanofibras.

1.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos son:

- Sintetizar y modificar los derivados de los copolímeros poli(anhídrido maleico-*alt*-estireno) y poli(anhídrido maleico-*alt*-etileno) modificados con aminoácidos de diferente hidrofiliidad/hidrofobicidad.
- Obtener películas nanoestructuradas de poli(anhídrido maleico-*alt*-estireno) modificado con aminoácidos de diferente hidrofiliidad/hidrofobicidad sobre superficies modificadas hidrofílicamente.
- Obtener nanofibras de mezclas de poli(anhídrido maleico-*alt*-etileno) modificado con aminoácidos de diferente hidrofiliidad/hidrofobicidad con poli(óxido de etileno) de diferentes proporciones y concentraciones de mezclas.
- Analizar las propiedades térmicas de las mezclas poliméricas obtenidas.
- Determinar las propiedades superficiales de las películas nanoestructuradas y de las nanofibras obtenidas.
- Evaluar las propiedades de adhesión y viabilidad celular de las películas nanoestructuradas y de las nanofibras.

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES Y EQUIPOS

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron los siguientes materiales de laboratorio:

- Agitador magnético.
- Balón de 3 bocas 250 mL.
- Desecadora.
- Espátulas metálicas.
- Frascos con tapa rosca 100-250 mL.
- Jeringa 5 mL y 10 mL aguja rosca.
- Membrana de celulosa 12 kDa.
- Micropipetas 20-200-1000 μ L.
- Pinzas metálicas.
- Pipeta parcial 5 mL y 10 mL.
- Pipeta total 15 mL y 25 mL.
- Puntas de jeringa.
- Refrigerante.
- Septum de goma.
- Soporte universal.
- Termómetros.
- Termómetros con esmerilado.
- Vasos de precipitado 600 mL.

- Viales 20 mL con tapa rosca.
- Viscosímetro Ubbelohde

Los equipos utilizados durante el desarrollo de este trabajo se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2. Lista de equipos utilizados.

Equipo	Marca	Modelo
Analizador DSC	Mettler-Toledo	<i>SDTA851</i>
Analizador Elemental	CE Instruments	<i>EA 1108</i>
Analizador TG	Mettler-Toledo	<i>821e</i>
Ángulo de Contacto	KRUSS	<i>Drop Shape Analyzer</i>
Balanza Analítica	ABJ	<i>80-4M - 83g 0,01/0,1 mg</i>
Centrífuga	---	<i>ECO-2645</i>
Conductímetro	Radiometer	<i>CDM 83</i>
Desionizador	SG-LaboStar	---
Electrohilador	Fluinatek	<i>eStretching LE-10</i>
Elipsómetro	Gaertner	<i>L116S300 STOKES</i>
Espectrómetro IR	Bruker	<i>Tenser 72</i>
Espectrómetro RMN	Bruker	<i>Ultrashield 400 MHz</i>
Estufa de vacío	LabTech	<i>VO-200</i>
HPLC	Shimadzu	<i>RID-6A</i>
Integrador	Itachi	<i>D-2520</i>
Liofilizador	ilShin	<i>TFD-5503</i>
Microscopio Electrónico de Barrido	JEOL	<i>7001F</i>
Microscopio Óptico	Olympus	<i>BX61</i>
pH-metro	Orion Research	<i>EA 940</i>
Placa Calefactora	Nuova	<i>Nuova II</i>
Rotavapor	Buchi	<i>R-220-EX</i>
Spin Coater	SCS	<i>G3P-8</i>
Ultrasonicador	GSET	<i>SU-234</i>

2.2 REACTIVOS

Los reactivos y disolventes utilizados para la síntesis del copolímero PSMA, la modificación de PSMA con aminoácidos, la modificación de superficies sólidas, la adsorción de polielectrolitos, la caracterización superficial de las películas poliméricas y los cultivos celulares se muestran en la Tabla 3:

Tabla 3. Lista de reactivos y disolventes utilizados en el Capítulo I.

Reactivo	Abreviación	Fórmula Molecular	Masa Molar (g/mol)	Marca
3-(aminopropil)- trietoxisilano	APTES	$C_9H_{23}NO_3Si$	221,37	Sigma
Ácido Clorhídrico	—	HCl	36,46	Merck
Agua Desionizada	—	H_2O	18,01	—
Anhídrido Maleico	AM	$C_4H_2O_3$	98,06	Aldrich
Benceno Anhidro	—	C_6H_6	78,11	Merck
Bicarbonato de Sodio	—	$NaHCO_3$	84,01	Aldrich
Bromuro de Potasio	—	KBr	119,00	Merck
Cloruro de Sodio	—	NaCl	58,4	Aldrich
Dimetilsulfóxido	DMSO	C_2H_6OS	78,13	Merck
Dimetilsulfóxido- D_6	DMSO- D_6	C_2D_6OS	84,17	Merck
Diyodometano	—	CH_2I_2		Aldrich
Estireno	S	C_8H_8	104,15	Aldrich
Hidróxido de Amonio 25%	—	NH_4OH	35,04	Merck
Hidróxido de Sodio	—	NaOH	40,01	Merck
L-Glutamina	Gln	$C_5H_{10}N_2O_3$	146,14	Aldrich
L-Metionina	Met	$C_5H_{11}NO_2S$	149,21	Aldrich

L-Tirosina	Tyr	$C_9H_{11}N_1O_3$	181,19	Aldrich
Nitrógeno Gaseoso	—	N_2	28,01	Indura
Nitrógeno Líquido	—	N_2	28,01	—
Peróxido de Hidrógeno 30%	—	H_2O_2	34,01	Merck
Tetrahidrofurano	THF	C_4H_8O	72,11	Merck
Tolueno	—	C_7H_8	92,14	Merck
Trietilamina	TEA	NC_6H_{15}	101,1	Merck
α,α -Azobisisobutironitrilo	AIBN	$C_8H_{12}N_4$	164,21	Merck

Los reactivos y disolventes utilizados para la modificación de PEMA con aminoácidos, la obtención de mezclas y fibras, la caracterización superficial y el entrecruzamiento de las fibras, se muestra en la Tabla 4:

Tabla 4. Lista de reactivos y disolventes utilizados en el Capítulo II.

Reactivo	Abreviación	Fórmula Molecular	Masa Molar (g/mol)	Marca
Ácido Clorhídrico	—	HCl	36,46	Merck
Agua Desionizada	—	H_2O	18,01	—
Bicarbonato de Sodio	—	$NaHCO_3$	84,01	Aldrich
Bromuro de Potasio	—	KBr	119,0	Merck
Cloruro de Sodio	—	NaCl	58,40	Aldrich
Dimetilsulfóxido	DMSO	C_2H_6OS	78,13	Merck
Dimetilsulfóxido- D_6	DMSO- D_6	C_2D_6OS	84,17	Merck
Estándares Dextrano HPLC	—	—	—	PSS
Etanol	—	C_2H_6O	46,07	Merck

Etilendiamina	—	C ₂ H ₈ N ₂	60,21	Merck
Hidróxido de Sodio		NaOH	40,01	Merck
L-Ácido Aspártico	Asp	C ₄ H ₇ NO ₄	133,1	Aldrich
L-Arginina	Arg	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174,2	Aldrich
L-Cisteína	Cys	C ₃ H ₇ NO ₂ S	121,16	Aldrich
L-Leucina	Leu	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,17	Sigma
L-Metionina	Met	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	149,21	Aldrich
L-Tirosina	Tyr	C ₉ H ₁₁ N ₁ O ₃	181,19	Aldrich
Metanol	—	CH ₃ OH	32,04	Merck
Nitrógeno Gaseoso	—	N ₂	28,01	Indura
Nitrógeno Líquido	—	N ₂	28,01	—
Óxido de Deuterio	—	D ₂ O	20,02	Merck
Poli(anhídrido maleico- <i>alt</i> -etileno) (M _w = 100-500 kDa)	PEMA	C ₆ H ₆ O ₃	126,11	Aldrich
Poli(óxido de etileno) (M _w = 300 kDa)	POE	(C ₂ H ₄ O) _n H ₂ O	—	Aldrich
Tetrahidrofurano	THF	C ₄ H ₈ O	72,11	Merck
Trietilamina	TEA	NC ₆ H ₁₅	101,1	Merck

Los copolímeros PSMA y PEMA junto con los aminoácidos utilizados L-leucina, L-metionina, L-cisteína, L-tirosina, L-ácido aspártico, L-glutamina y L-arginina fueron caracterizados molecularmente mediante FT-IR, RMN-¹H y RMN-¹³C para contrastarlos con los productos obtenidos luego de llevar a cabo las reacciones de modificación.

2.3 FUNDAMENTO TEÓRICO

2.3.1 Peso Molecular del PSMA

El peso molecular del PSMA se determinó por medio de viscosimetría capilar, utilizando la relación empírica de Mark-Houwink-Sakurada ⁷² definida por la Ecuación 1:

$$[\eta] = KM_v^a \quad (1)$$

Donde $[\eta]$ corresponde a la viscosidad intrínseca (en dL/g), M_v es el peso molecular viscosimétrico del polímero K y a son parámetros que dependen del polímero, el disolvente, la temperatura y la polidispersidad de las fracciones. Para PSMA estos valores son 5.07×10^{-5} y 0.81 respectivamente. ⁷³

Las ecuaciones más comunes para evaluar $[\eta]$ son las ecuaciones de Huggins (Ecuación 2) y de Kraemer (Ecuación 3). El procedimiento para determinarla es realizar una gráfica simultánea de ambas relaciones y extrapolar el valor a dilución infinita, siendo el intercepto de ambas rectas:

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

$$\frac{\eta_r}{c} = [\eta] - K_K[\eta]^2c \quad (3)$$

Donde c corresponde a la concentración de la disolución polimérica diluida, K_H y K_K son constantes empíricas definidas por las ecuaciones respectivas, η_{sp} corresponde a la viscosidad específica y η_r a la viscosidad relativa, que se calcularon a partir de los tiempos de escurrimiento mediante las Ecuaciones 4 y 5:

$$\eta_r = \frac{t}{t_0} \quad (4)$$

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0} \quad (5)$$

2.3.2 Determinación del Porcentaje de Modificación

El porcentaje de modificación se determinó utilizando un método matemático descrito en la literatura,⁷⁴ que relaciona el porcentaje en masa de nitrógeno (%N) presente en un polímero con la masa molar de la unidad repetitiva sin modificar (0% modificación, 0%N) y la masa molar de la unidad repetitiva del polímero modificado (100% de modificación, %N máximo teórico) mediante las Ecuaciones 6, 7 y 8:

$$N_x = m * Ur_x + b \quad (6)$$

Donde % N_x corresponde al porcentaje de nitrógeno de un polímero, Ur_x a la masa molar de la unidad repetitiva del polímero utilizado, m y b constantes que se calculan para cada polímero. Si se utiliza un sistema de ecuaciones a partir de la Ecuación 6, con los valores correspondientes a cuando el polímero no ha sido modificado y cuando está totalmente modificado, se pueden calcular las constantes m y b . Estas constantes, junto con el %N obtenido mediante análisis elemental, permiten encontrar la masa molar de la unidad repetitiva modificada, Ur . Esta masa molar Ur está relacionado con los valores de Ur_0 y Ur_{100} , mediante la Ecuación (7):

$$Ur = x * Ur_0 + y * Ur_{100} \quad (7)$$

Donde Ur_0 corresponde a la masa molar de la unidad repetitiva de polímero sin modificar, Ur_{100} a la masa molar de la unidad repetitiva modificada, x e y son las fracciones molares correspondientes a las unidades monoméricas del polímero sin modificar y modificado respectivamente, donde se cumple que:

$$x + y = 1 \quad (8)$$

Realizando un sistema de ecuaciones con las Ecuaciones 7 y 8, se puede conocer la fracción molar y , que indica la fracción molar del polielectrolito modificado, y puede ser luego expresado en un porcentaje de modificación.

2.3.3 Elipsometría

La elipsometría es una técnica de análisis óptica no destructiva y de gran resolución, que puede medir espesores de alrededor de 1 Å. Se basa en que la luz cambia su estado de polarización luego de que incide sobre una determinada superficie y ocurre reflexión de esta. Este cambio de polarización depende de las propiedades ópticas del sustrato, la capa superficial y el ambiente. El elipsómetro no mide de forma directa el espesor de la película depositada sobre la superficie del sustrato, sino que mide los cambios de fase (Δ) y amplitud (Ψ) del haz de luz incidente y reflejado desde una superficie plana y reflectora. Esto implica que los ángulos elipsométricos Δ y Ψ no entreguen ninguna información sobre la estructura o composición de la muestra y hace necesario la introducción de modelos ópticos teóricos para poder calcular las propiedades que se están buscando. Si las propiedades ópticas de las películas utilizadas son conocidas, el método elipsométrico resulta ser muy preciso y sencillo para determinar su espesor. El espesor de la película de

polielectrolito adsorbida fue calculado a partir de los ángulos elipsométricos Δ y Ψ utilizando un modelo de multicapas compuestas por sustrato-medio o sustrato-capa desconocida (APTES o película de polielectrolito)-medio, utilizando el programa computacional Elli, basado en la ecuación de elipsometría y cálculos iterativos con matrices de Jones.⁷⁵

2.3.4 Humectabilidad y Energía Superficial

Cuando se deposita una gota de un líquido sobre una superficie sólida, se forma un ángulo θ con la superficie, llamado ángulo de contacto, que se define como el ángulo entre la tangente a la interfaz líquido-fluido y la tangente a la interfaz sólida en la línea de contacto entre las tres fases (Figura 4).⁷⁶

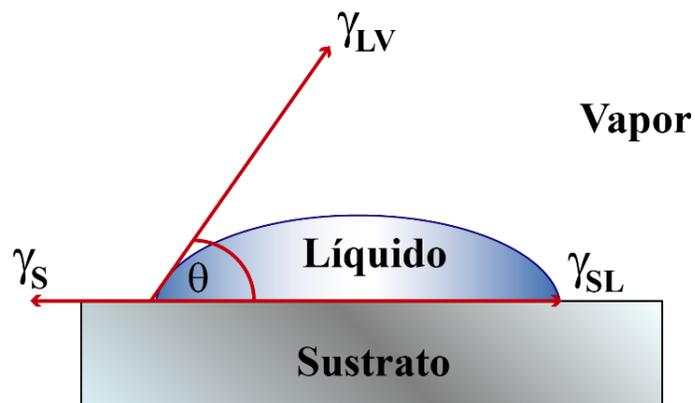


Figura 4. Esquema de ángulo de contacto de un líquido sobre una superficie sólida.

El ángulo de contacto depende de las fuerzas cohesivas de las moléculas del líquido y de las fuerzas de adhesión entre el líquido y el sólido. Cuando las fuerzas de adhesión entre el líquido y el sólido son mayores que las fuerzas cohesivas del líquido, la gota tiende a

expandirse sobre la superficie. Por otro lado, cuando las fuerzas cohesivas del líquido son mayores a las fuerzas de adhesión entre el líquido y la superficie, la gota se abulta y evita el contacto con la superficie.

Si el líquido que se utiliza sobre la superficie es agua, a este fenómeno se le llama humectabilidad y es inversamente proporcional al ángulo de contacto de la gota sobre la superficie.⁷⁷ Si el valor del ángulo de contacto es menor a 90° la humectabilidad de la superficie es alta y la superficie es hidrofílica, mientras que si el valor del ángulo de contacto es mayor a 90° la superficie es hidrofóbica.

Al depositar una gota de un líquido sobre una superficie, al cabo de un tiempo, esta se estabiliza y alcanza un valor máximo que se denomina ángulo de contacto de avance: si se disminuye el volumen de esta gota de solvente, el ángulo de contacto disminuye y alcanzará un valor mínimo denominado ángulo de contacto de retroceso. La diferencia entre los ángulos de contacto de avance y retroceso se denomina rango de histéresis. Este fenómeno se explica debido a que la tensión superficial del sólido puede cambiar de un punto a otro debido a la heterogeneidad química; de manera similar, la inclinación de la superficie sólida puede variar de una ubicación a otra debido a la rugosidad.⁷⁶

Para una gota que forma un ángulo de contacto θ sobre una superficie, en condiciones de equilibrio termodinámico, Young⁷⁸ demostró que:

$$\gamma_s = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} * \cos\theta \quad (10)$$

Donde γ_s es la energía superficial del sólido, γ_{SL} es la tensión interfacial entre el sólido y el líquido y γ_{LV} es la energía superficial o tensión superficial del líquido. En esta ecuación,

el ángulo de contacto θ puede ser medido y γ_{LV} puede ser medido u obtenido desde la literatura, sin embargo, γ_{SL} es desconocido y no puede ser medido directamente. Por lo tanto, γ_S puede ser calculado a partir de la Ecuación 10, sólo si γ_{SL} puede ser predicho basado en información adicional. Por esto, se han propuesto variados métodos para evaluar γ_S usando valores de ángulo de contacto formados por gotas de distintos solventes con tensiones superficiales reportadas en la literatura, entre ellos se destacan los métodos de Media Armónica y Media Geométrica.⁷⁹

Según Fowkes⁸⁰ la tensión superficial (γ) puede expresarse como la suma de las partes que resultan de distintos tipos de interacciones moleculares como se muestra en la Ecuación 11:

$$\gamma = \gamma^d + \gamma^i + \gamma^p + \gamma^h + \gamma^\pi + \gamma^{ad} + \gamma^e \quad (11)$$

Donde γ es la tensión superficial y los superíndices d se refiere a la dispersión, i al dipolo-dipolo inducido, p al dipolo-dipolo, h a las interacciones tipo puente de hidrógeno, π al enlace o acoplamiento π - π , ad a las interacciones aceptor-donor y e a las interacciones electrostáticas.

Desde un punto de vista más práctico, la tensión superficial (γ) puede ser considerada como la suma de todas sus componentes dispersivas (γ^d) y sus componentes no dispersivas o polares (γ^p) presentes en una fase:

$$\gamma^{\text{total}} = \gamma^d + \gamma^p \quad (12)$$

Wu propuso una expresión semiempírica para la tensión superficial dispersiva que extendió luego para sus componentes polares, este modelo se denomina modelo de

aproximación de la media armónica (Ecuación 13) y demostró que describe experimentalmente mejor las interacciones entre los líquidos de prueba y una superficie de polímero de baja energía superficial que el modelo de la media geométrica.⁸¹

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_{LV} - 4 \left(\frac{\gamma_{LV}^d \gamma_S^d}{\gamma_{LV}^d + \gamma_S^d} + \frac{\gamma_{LV}^p \gamma_S^p}{\gamma_{LV}^p + \gamma_S^p} \right) \quad (13)$$

Donde γ_S^d y γ_S^p son las componentes de dispersión y polar de la energía superficial del sólido y γ_{LV}^d y γ_{LV}^p son las componentes de dispersión y polar de la tensión superficial del líquido. Al combinar la Ecuación 13 con la Ecuación 12, se obtienen la Ecuación 14 que permite calcular las componentes polares y dispersivas de una superficie polimérica al medir ángulo de contacto con gotas de al menos dos líquidos diferentes:

$$\gamma_{LV}(1 + \cos\theta) = 4 \left(\frac{\gamma_{LV}^d \gamma_S^d}{\gamma_{LV}^d + \gamma_S^d} + \frac{\gamma_{LV}^p \gamma_S^p}{\gamma_{LV}^p + \gamma_S^p} \right) \quad (14)$$

donde γ_{LV}^d y γ_{LV}^p son los componentes dispersivos y polares de los distintos disolventes utilizados.

2.3.5 Microscopía de Fuerza Atómica

El microscopio de fuerza atómica es un instrumento mecano-óptico que puede detectar fuerzas de órdenes muy pequeños en la escala de los nanoNewton. Al analizar una muestra, se registra continuamente la altura sobre la superficie de una sonda o punta cristalina de forma piramidal. La sonda va acoplada a un listón microscópico, muy sensible al efecto de las fuerzas, de sólo unos 200 μm de longitud. La fuerza atómica se

puede detectar cuando la punta se aproxima a la superficie de la muestra. Se registra la pequeña flexión del listón mediante un haz láser reflejado en su parte posterior. Un sistema auxiliar piezoeléctrico desplaza la muestra tridimensionalmente, mientras que la punta recorre ordenadamente la superficie. Todos los movimientos son controlados por una computadora. La resolución del instrumento es de menos de 1 nm, y la pantalla de visualización permite distinguir detalles en la superficie de la muestra con una amplificación de varios millones de veces.

El microscopio de fuerza atómica puede realizar dos tipos de medidas: imagen y fuerza. En la modalidad de imagen, la superficie es barrida en el plano de la superficie por la punta. Durante el barrido la fuerza interatómica entre los átomos de la punta y los átomos en la superficie de la muestra provoca una flexión del listón. Esta flexión es registrada por un sensor adecuado (normalmente balanza óptica) y la señal obtenida se introduce en un circuito o lazo de realimentación. La fuerza interatómica se puede detectar cuando la punta está muy próxima a la superficie de la muestra. En medidas de fuerza la punta se hace oscilar verticalmente mientras se registra la flexión del listón. Las medidas de fuerza son útiles en estudios de fuerzas de adhesión y permiten estudiar a nivel de una sola molécula interacciones específicas entre moléculas o interacciones estructurales de las biomoléculas (plegado de proteínas) así como caracterizar la elasticidad de polímeros. También es útil en estudios de indentación de materiales blandos, como polímeros, que permitan caracterizar propiedades elásticas de la muestra como el módulo de elasticidad o viscoelásticas. El microscopio de fuerza atómica provee la imagen de una superficie sin que

intervengan los efectos eléctricos, al medir las fuerzas mecánicas en la punta detectora, por lo que también resulta útil para materiales no conductores.⁸²

2.3.6 Entrecruzamiento de Nanofibras

El entrecruzamiento o reticulación de polímeros es la formación de enlaces químicos o interacciones electrostáticas entre distintas cadenas poliméricas formando una red tridimensional conectada. La vulcanización del caucho utilizando azufre elemental es un ejemplo de reticulación, que convierte el caucho crudo de un plástico débil en un elastómero altamente resistente. La estrategia de la reticulación covalente se utiliza en varias otras tecnologías de interés comercial y científico para controlar y mejorar las propiedades de un sistema o interfaz de polímero resultante, como los termoestables y recubrimientos.⁸³

Existe una gran cantidad de nanofibras poliméricas que han sido obtenidas a partir de polímeros que contienen grupos polares o de polielectrolitos, que son inherentemente solubles en agua, por lo que se lleva a cabo el proceso de entrecruzamiento mediante una reacción química después de que estas nanofibras son obtenidas.^{84,85}

En general, estas reacciones se llevan a cabo entre grupos funcionales presentes en las cadenas poliméricas con una molécula que forme que tenga en su estructura otros grupos funcionales que puedan reaccionar fácilmente tales como aminas, aldehídos, ácidos carboxílicos, alcoholes o tioles. El glutaraldehído (GA) es uno de los agentes entrecruzantes más efectivos, reacciona fácilmente con distintos aminas y grupos -O-, se utiliza tanto en disolución como en fase de vapor ya que la exposición de nanofibras a estos vapores tienen pocos o ningún efecto citotóxico⁸⁶ y ha sido utilizado para

entrecruzar nanofibras de polímeros como polivinilalcohol (PVA) o hidrogeles a partir de pectina mediante la formación de enlaces amida.⁸⁷

El cloruro de calcio (CaCl_2) por su parte ha sido utilizado como agente entrecruzante principalmente para grupos funcionales con carga negativa como los iones carboxilatos. El ión Ca^{+2} interactúa electrostáticamente con dos grupos COO^- produciéndose la unión de dos cadenas poliméricas, se ha reportado el entrecruzamiento de nanofibras obtenidas a partir de mezclas de alginato/POE mediante la adición de una disolución 5% p/v de CaCl_2 .^{88,89}

Por último, se ha reportado la utilización de etilendiamina (EDA) para entrecruzar nanofibras de poli(ácido aspártico) sensibles al pH mediante la formación de enlaces amida entre sus respectivos grupos funcionalizado, también ha sido reportado el entrecruzamiento de nanofibras de poli(estireno-*co*-metacrilato de glicidilo) para aumentar la resistencia mecánica del material.^{90,91}

2.4 METODOLOGÍA CAPÍTULO I: POLIELECTROLITOS

DERIVADOS DE PSMA

2.4.1 Síntesis de Poli(anhídrido maleico-*alt*-estireno)

El copolímero PSMA fue sintetizado mediante polimerización radicalaria a partir de cantidades equimolares de los monómeros estireno y anhídrido maleico previamente purificados, utilizando benceno anhidro como disolvente y 8% de α,α -Azobisisobutironitrilo (AIBN) como iniciador. La síntesis se realizó a 60 °C en atmósfera de N₂, con agitación constante durante 2 horas (Figura 5):

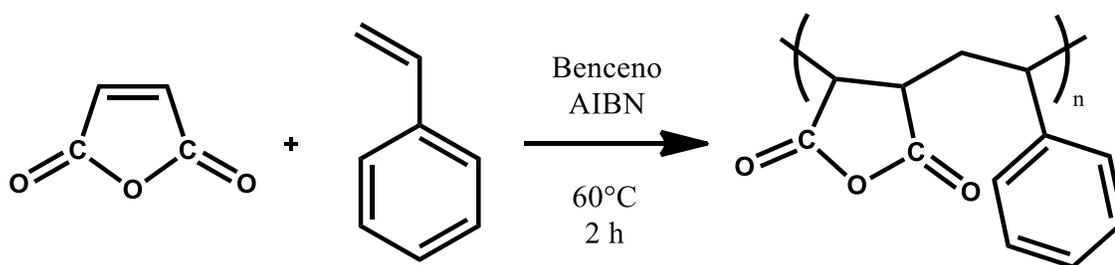


Figura 5. Esquema de la reacción de polimerización del copolímero PSMA.

2.4.2 Peso Molecular del PSMA

El peso molecular del PSMA se determinó por medio de viscosimetría capilar, utilizando la relación empírica de Mark-Houwink-Sakurada ⁷² definida por la Ecuación 1:

Para esto se prepararon disoluciones de PSMA en un rango de concentración entre 0.3 g/dL y 0.8 g/dL utilizando THF como disolvente. Se midieron los tiempos de

escurrimiento de las disoluciones de PSMA en el disolvente (t) y del disolvente puro (t_0) en un baño termorregulado a 30 °C.

2.4.3 Modificación de PSMA con Aminoácidos

La modificación del copolímero PSMA con los aminoácidos L-glutamina (Gln), L-metionina (Met) y L-tirosina (Tyr), que se muestra en la Figura 6, se realizó mezclando cantidades equimolares de PSMA con cada uno de los aminoácidos, utilizando DMSO como disolvente y 0.3% de TEA como base a una temperatura constante de 80 °C, en atmósfera de N₂.

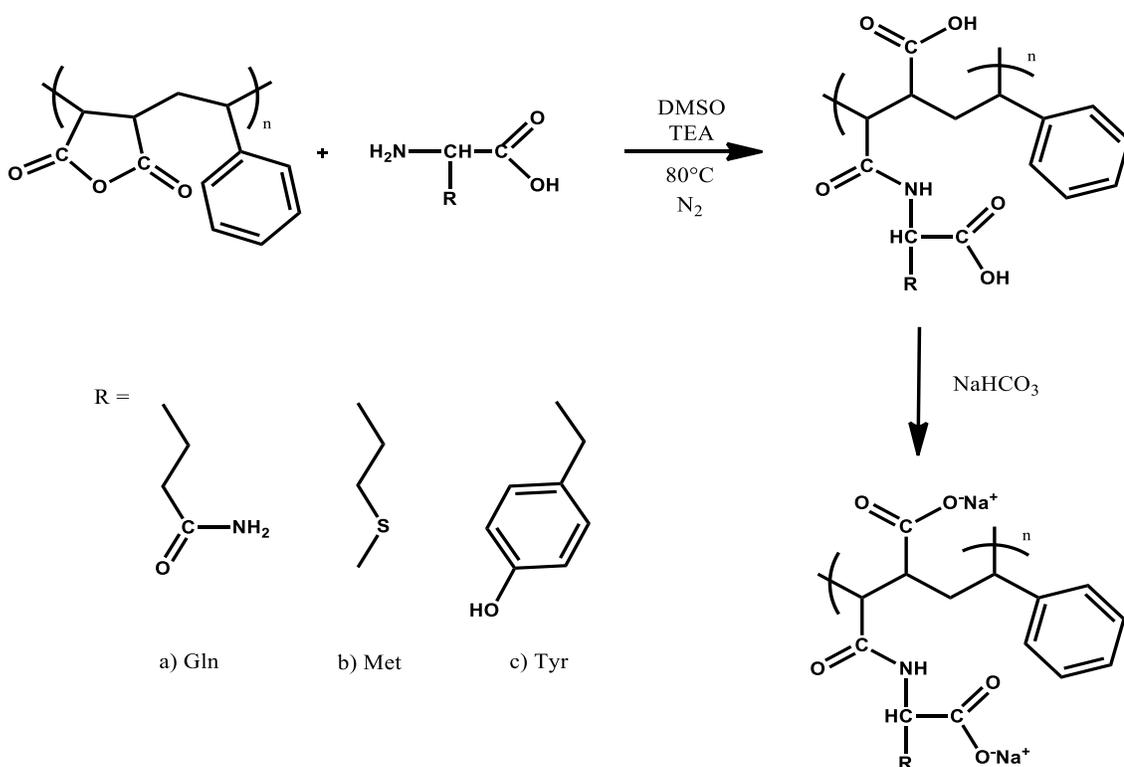


Figura 6. Esquema de la reacción de modificación del copolímero PSMA con aminoácidos, R corresponde al grupo lateral de cada aminoácido: a) glutamina (Gln), b) metionina (Met) y c) tirosina (Tyr).

El avance de las reacciones de modificación fue monitoreado mediante espectroscopía FT-IR, las reacciones fueron consideradas finalizadas cuando las bandas en 1854 cm^{-1} y 1779 cm^{-1} que pertenecen a los grupos carbonilos del AM, desaparecen y en su lugar aparecen las bandas $\sim 1660\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1710\text{ cm}^{-1}$ que pertenecen al grupo carbonilo del grupo amida y al grupo carbonilo del ácido carboxílico respectivamente.⁹² Las sales disódicas de los polímeros modificados fueron obtenidas tratando cada uno de ellos con una disolución acuosa de NaHCO_3 (en proporción 1:2 de polímero/ NaHCO_3) durante 10 días. Luego, estas soluciones fueron ultrafiltradas y finalmente liofilizadas. Los polielectrolitos obtenidos con los distintos aminoácidos L-glutamina, L-metionina y L-tirosina fueron denominados PSMA-Gln, PSMA-Met y PSMA-Tyr respectivamente (llamados genéricamente PSMA-Aa).

2.4.4 Caracterización Molecular de los Polielectrolitos

Los distintos polielectrolitos fueron caracterizados en forma complementaria mediante FT-IR, RMN- ^1H y RMN- ^{13}C . Para realizar FT-IR se mezclaron 2 mg de cada una de las muestras con 100 mg de KBr seco y se prepararon pastillas finas y homogéneas empleando una prensa hidráulica, el equipo utilizado fue un espectrofotómetro IR Bruker Tenser 27. Los espectros de RMN se obtuvieron a partir de disoluciones con 80 mg de cada una de las muestras en 500 μL de DMSO-D_6 en tubos para RMN, los análisis se llevaron a cabo en el equipo RMN Bruker 400 Ultrashield.

2.4.5 Determinación del Porcentaje de Modificación

Mediante análisis elemental, se obtuvo el porcentaje de masa de los elementos C, H, N y S presentes en cada uno de los PSMA-Aa. Se utilizaron 20 mg de cada uno de los PSMA-Aa secados previamente en una estufa a 110 °C, realizando el análisis por duplicado.

2.4.6 Adsorción de los Polielectrolitos sobre Superficies Sólidas

Las isothermas de adsorción de los polielectrolitos sobre superficies sólidas se obtuvieron mediante elipsometría *ex-situ* en un elipsómetro de ángulo variable L116S300 STOKES (Gaertner Scientific Corporation, USA) provisto de un láser de He-Ne con una longitud de onda de $\lambda = 632.8$ nm y un ángulo de incidencia, Φ de 70° a una temperatura de 25 °C ± 1 °C.

Para el proceso de adsorción de polielectrolitos sobre superficies sólidas, se utilizaron como sustratos sólidos obleas de silicio (silicon wafers, SiW) con una capa de óxido nativo de aproximadamente 2 nm de espesor. Los SiW fueron cortados en cuadrados de 1 cm² de dimensión y fueron lavados durante 30 min en una disolución oxidativa, mezcla de hidróxido de amonio (25% v/v), peróxido de hidrógeno (30% v/v) y agua desionizada en proporción de 1:1:5 respectivamente a 70 °C. Luego las placas fueron lavadas con agua desionizada y secadas con N₂ gaseoso y se determinó su espesor mediante elipsometría *ex-situ* utilizando los índices de refracción $n = 3.88 - i0.018$ para silicio puro, $n = 1.00$ para aire y $n = 1.462$ para capas finas de SiO₂.

Posteriormente, la modificación de las superficies de SiW se realizó introduciendo grupos amino-terminales utilizando APTES. Las placas fueron introducidas durante 30 s en una disolución de 1% v/v de APTES utilizando tolueno como disolvente a 60 °C.⁹³ Luego,

fueron lavadas con tolueno, secadas con N₂ gaseoso y su espesor fue determinado mediante elipsometría *ex-situ* utilizando los índices de refracción $n = 1.424$ para APTES y $n = 1.00$ para aire. Se utilizaron las placas cuyo espesor de APTES mostraron valores entre 0.8 y 0.9 nm, valor que corresponde al espesor de una monocapa de APTES.^{93,94}

Por último, para llevar a cabo la adsorción de los polielectrolitos sobre las superficies modificadas hidrofílicamente con APTES, se prepararon disoluciones de los distintos polielectrolitos a concentraciones entre 1.0×10^{-5} g/L y 1.0 g/L utilizando como disolvente disoluciones NaCl 0.1 M y 0.001 M a pH 4.0 y 7.0. Las placas de SiW modificadas con APTES se introdujeron en estas disoluciones durante 3 h, transcurrido este tiempo, se lavaron con agua desionizada. Finalmente las placas fueron secadas con N₂ gaseoso, se determinó su espesor mediante elipsometría *ex-situ* y guardadas en recipientes limpios para evitar contaminación o adhesión de polvo.

La cantidad de polielectrolito adsorbida (Γ) fue determinada utilizando la Ecuación 9^{75,95}:

$$\Gamma = \frac{d_{pol}(n_{pol} - n_0)}{\frac{d_n}{d_c}} = d_{pol} * c_{pol} \quad (9)$$

Donde n_{pol} y d_{pol} son el índice de refracción y el espesor del polielectrolito adsorbido, n_0 es el índice de refracción del disolvente determinado con un refractómetro Abbe, c_{pol} es la concentración de polielectrolito en la capa y d_n/d_c es el incremento del índice de refracción que tiene un valor de 0.16 mL/g.

2.4.7 Humectabilidad y Energía Superficial de las Películas de Polielectrolitos

Las mediciones de ángulo de contacto y la determinación de energía superficial sobre las superficies de las películas de PSMA-Gln, PSMA-Met y PSMA-Tyr, se realizaron en el equipo Drop Shape Analyzer DSA25S (KRUSS, Alemania) controlado por el software Advance (KRUSS, Alemania) utilizando el método de *Gota Estática (Sessile Drop)* a una temperatura de 25 °C. Se depositaron gotas de agua de 8 μL para determinar el ángulo de avance (θ_A) y luego se retiraron 4 μL para determinar el ángulo de retroceso (θ_R). La histéresis ($\Delta\theta = \theta_A - \theta_R$) se determinó como la diferencia entre el ángulo de contacto de avance y el ángulo de contacto de retroceso.

Para la determinación de energía superficial, se depositaron gotas de 5 μL de agua y diyodometano sobre cada una de las superficies poliméricas. Se realizaron al menos tres mediciones para cada tipo de superficie polimérica con cada uno de los distintos solventes. La energía superficial fue calculada automáticamente por el software Advance (KRUSS, Alemania) a partir de los ángulos de contacto obtenidos para agua (θ_{agua}) y diyodometano ($\theta_{\text{diyodometano}}$) utilizando el método de la media armónica o método de Wu.

2.4.8 Topografía y Rugosidad de Películas de Polielectrolitos

El análisis de AFM de las películas delgadas de PSMA-Gln, PSMA-Met y PSMA-Tyr se llevó a cabo en el microscopio de fuerza atómica AFM/SPM Controller 9500 Series System, Keysight Technologies (CA, USA). Las superficies fueron escaneadas en el modo de contacto intermitente (*Tapping Mode*) con una frecuencia de escaneo de 0.3 Hz, utilizando puntas de silicio (Olympus AC200TS) con forma de “V”. Se determinó la altura

y la amplitud a temperatura ambiente (23-25 °C). Para procesar las imágenes y determinar la rugosidad RMS de la superficie se utilizó el software Keysight's PicoView.

2.4.9 Adhesión y Viabilidad Celular

Se cultivaron células SH-SY5Y de neuroblastoma humano (CRL-2266, American Type Culture Collection, Rockville, MD) (medio húmedo, 5% de atmósfera de CO₂ y 37°C) en medio MEM-F12 suplementado con FBS al 10%, aminoácidos no esenciales, antibiótico mezcla antimicótica, y tampón HEPES 20 mM, pH 7.2. El medio de cultivo celular se reemplazó cada dos días. El impacto de los polielectrolitos en la viabilidad celular se cuantificó mediante el ensayo MTT (Molecular Probes) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se colocaron en placa 5.000 células en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos y se cultivaron durante 24 horas en presencia de diferentes concentraciones de soluciones de polielectrolito (por triplicado). El medio de cultivo celular se reemplazó con 110 µL de medio fresco suplementado con MTT 1,1 mM (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) y se incubó durante 4 horas. La formación dependiente mitocondrial de un producto coloreado se terminó al agregar 100 µL de solución de SDS-HCl, seguido de 12 horas de solubilización a 37°C. La absorbancia, como medida de la formación del producto, se leyó a 570 nm. (25).⁹⁶

2.4.10 Inmunofluorescencia 4-HNE

Las células SH-SY5Y cultivadas en cubreobjetos lavados con ácido⁹⁷ o las películas de los polielectrolitos PSMA-Gln, PSMA-Met y PSMA-Tyr (0.6 g/L) se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se fijaron con paraformaldehído al 4%, sacarosa al 4% durante 20 minutos. Los sustratos se lavaron dos veces con PBS y las

células se permeabilizaron con Triton-X-100 al 0,2% en PBS. Los sitios de unión no específicos se bloquearon mediante una incubación de 4 horas en PBS + 4% de albúmina de suero bovino (BSA) seguida de una incubación durante la noche a 4 ° C con anticuerpo anti-HNE (1: 200). Las placas se lavaron 3 veces y se incubaron durante 1 hora con IgG anti-conejo de cabra conjugada con Alexa-488. Las placas se lavaron y se montaron en medio de montaje FluoSave. Las células marcadas se detectaron mediante microscopía confocal en un microscopio de escaneo láser confocal Zeiss LSM 710.

2.5 METODOLOGÍA CAPÍTULO II: POLIELECTROLITOS DERIVADOS DE PEMA

2.5.1 Determinación del Peso Molecular y Polidispersidad de PEMA

Debido a que el PEMA se obtuvo de manera comercial, se determinó el peso molecular (PM) y la polidispersidad previo a la modificación con los aminoácidos. La determinación del PM y la polidispersidad del copolímero PEMA se realizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Para esto se utilizó un equipo HPLC equipado con columnas Shodex. El volumen de inyección utilizado fue de 20 μ L y la velocidad de flujo se mantuvo constante a 0.3 mL/min.

Las curvas de calibración se realizaron con disoluciones de los estándares de dextrano de PM 100 kDa, 164 kDa, 236 kDa, 333 kDa, 400 kDa y 600 kDa en agua, NaCl y LiCl 0,3 M y tampón fosfato 0.1 M a pH 7.

Se utilizaron disoluciones de PEMA hidrolizado y PEMA neutralizado de concentración 1 mg/mL y 2 mg/mL. en agua, NaCl y LiCl 0,3 M y tampón fosfato 0.1 M a pH 7.

2.5.2 Modificación de PEMA con L-aminoácidos

La modificación del copolímero PEMA con los aminoácidos L-leucina, L-metionina, L-cisteína, L-tirosina, L-ácido aspártico, y L-arginina, que se muestra en la Figura 7, se realizó mezclando cantidades equimolares de PEMA y con cada uno de los aminoácidos, utilizando DMSO como disolvente y 0.3% de TEA como base. La reacción se llevó a cabo a una temperatura de 80 °C y en atmósfera de N₂.

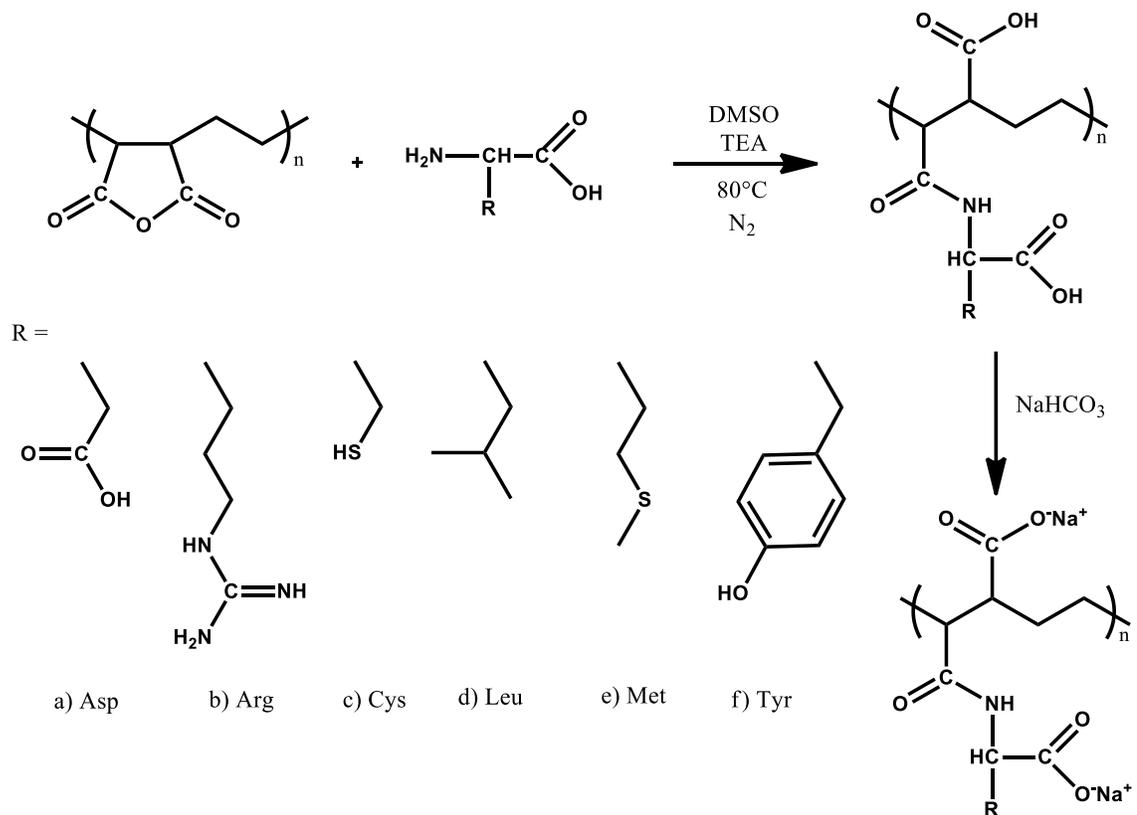


Figura 7. Esquema de la reacción de modificación de PEMA con aminoácidos, R corresponde a la cadena lateral de cada aminoácido: a) leucina, b) cisteína, c) metionina, d) tirosina, e) ácido aspártico y f) arginina.

El avance de las reacciones de modificación fue monitoreado mediante espectroscopía FT-IR. La modificación se consideró completa cuando las bandas características en 1854 cm^{-1} y 1771 cm^{-1} de los grupos carbonilos del PEMA desaparecen completamente y en su lugar aparecen las bandas características del grupo amida recién formado en $\sim 3340\text{ cm}^{-1}$ para N-H y $\sim 1604\text{ cm}^{-1}$ para C=O, así como también aparece una banda característica del grupo C=O del ácido carboxílico a $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$. Para la purificación de los copolímeros recién modificados, se buscaron disolventes precipitantes, sin embargo, ninguno de los

disolventes utilizados logró precipitar los copolímeros. Debido a esto, se extrajo el DMSO mediante evaporación a presión reducida utilizando un evaporador rotatorio conectado a una bomba de vacío. Luego, los copolímeros modificados libres de DMSO fueron neutralizados con una disolución acuosa de NaHCO_3 (en proporción 1:2 de polímero/ NaHCO_3). Posterior a la neutralización, las disoluciones de polielectrolitos fueron dializadas para eliminar el exceso de iones y moléculas de menor tamaño. Se utilizaron membranas de celulosa que retienen moléculas con un PM mayor a 12 kDa. El sistema se dejó agitando y el agua desionizada utilizada como medio externo a la membrana se cambió periódicamente hasta que la conductividad alcanzó un valor menor de $10 \mu\text{s}/\text{cm}$. La conductividad fue medida a temperatura ambiente con un conductímetro provisto de una celda conductimétrica con electrodo de platino.

Finalmente, estas soluciones fueron liofilizadas, obteniéndose las sales de los polielectrolitos modificados con los aminoácidos L-ácido aspártico, L-arginina, L-cisteína, L-leucina, L-metionina y L-tirosina, denominados PEMA-Asp, PEMA-Arg, PEMA-Cys, PEMA-Leu, PEMA-Met y PEMA-Tyr (llamados genéricamente PEMA-Aa) respectivamente.

2.5.3 Caracterización Molecular

Los distintos polielectrolitos fueron caracterizados en forma complementaria mediante FT-IR, RMN- ^1H y RMN- ^{13}C . Para realizar FT-IR se mezclaron 2 mg de cada una de las muestras con 100 mg de KBr seco y se prepararon pastillas finas y homogéneas empleando una prensa hidráulica, el equipo utilizado fue un espectrómetro IR Bruker Tenser 27. Los espectros de RMN se obtuvieron a partir de disoluciones con 80 mg de cada una de las

muestras en 500 μL de óxido de deuterio (D_2O) en tubos para RMN, los análisis se llevaron a cabo en un espectrómetro RMN Bruker 400 MHz Ultrashield.

2.5.4 Determinación del Porcentaje de Modificación

Mediante análisis elemental, se obtuvo el porcentaje de masa de los elementos C, H, N y S presentes en cada uno de los polielectrolitos. Se utilizaron 20 mg de cada uno de los PEMA-Aa secados previamente en una estufa a 110°C , realizando el análisis por duplicado.

El porcentaje de modificación se determinó utilizando el método matemático descrito anteriormente.⁷⁴

2.5.5 Determinación del pK_{ap}

Para determinar los valores de pK_{ap} del PEMA y los PEMA-Aa se realizaron titulaciones potenciométricas. Se prepararon soluciones de concentración 0.6 g/L para ser tituladas con disoluciones de HCl y NaOH 0.1 M. Los pK_{ap} fueron determinados a partir de las curvas de titulación de los polielectrolitos mediante el método de la primera derivada de cada curva y el método del paralelogramo.

2.5.6 Estudio de Solubilidad

Se realizó un estudio de solubilidad para los PEMA-Aa y el POE utilizando disolventes con distinta constante dieléctrica con el propósito de establecer un disolvente común para realizar mezclas y la posterior obtención de nanofibras.

2.5.7 Estudio de mezclas de PEMA-Aa/POE.

2.5.7.1 Preparación de las Mezclas de PEMA-Aa/POE.

La preparación de mezclas de los distintos polielectrolitos se realizó en dos etapas. En la primera etapa se utilizaron las disoluciones de los polielectrolitos PEMA-Asp, PEMA-Met y PEMA-Tyr a concentraciones 10% p/v, 15% p/v y 20% p/v que se mezclaron con una disolución acuosa de POE a una concentración 10% p/v. En la segunda etapa, se utilizaron disoluciones de los polielectrolitos PEMA-Arg, PEMA-Cys y PEMA-Leu a una concentración 20% p/v, mezcladas con la misma disolución acuosa de POE a una concentración 10% p/v. Todas mezclas de realizaron en las proporciones 1:1, 1:2 y 1:3 de PEMA-Aa/POE y fueron agitadas constantemente durante 24 horas.

2.5.7.2 Determinación de Conductividad y Tensión Superficial de las Mezclas PEMA-Aa/POE

Previo a la obtención de nanofibras, mediante la técnica de electrohilado, es importante conocer propiedades físicas de las disoluciones poliméricas tales como conductividad y tensión superficial. Para esto se utilizaron las mezclas preparadas en el punto 2.4.7.1.

La conductividad se determinó utilizando un conductímetro equipado con un electrodo de conductividad y un electrodo de temperatura. La tensión superficial se determinó utilizando el método del anillo con un tensiómetro Du Nouy. Todas las mediciones fueron realizadas a 25 °C.

2.5.7.3 Caracterización de las Mezclas PEMA-Aa/POE

Las mezclas de PEMA-Aa y el POE fueron caracterizadas mediante FT-IR, TGA y DSC, estas caracterizaciones permitieron determinar la miscibilidad de las mezclas. Se tomó 1 mL de las diferentes mezclas y se evaporó el disolvente en una estufa con vacío y temperatura. Para realizar FT-IR se mezclaron 2 mg de cada una de las muestras con 100 mg de KBr seco y se prepararon pastillas finas y homogéneas empleando una prensa. El equipo utilizado fue un espectrómetro IR Bruker Tensor 27. Para realizar TGA se utilizó un equipo TGA/SDTA851 Mettler-Toledo, y los datos fueron procesados usando el software STAR 8.1 (Mettler). Se utilizó alrededor de 7 mg de cada una de las muestras, que fueron calentadas desde 25 hasta 900 °C a una velocidad de 10 °C/min bajo una atmósfera de N₂. Los análisis de DSC fueron llevados a cabo en el equipo Mettler Toledo Star System (Model 821e, Mettler-Toledo International Inc., USA).

2.5.8 Determinación de Humectabilidad y Energía Superficial

Previo a la determinación de energía superficial, se deben preparar las películas poliméricas, determinar su espesor y medir el ángulo de contacto sobre estas superficies con distintos disolventes. Las películas poliméricas se prepararon en un equipo de Spin Coating (SCS G3P-8) utilizando un programa de velocidad determinado entre 3000 rpm y 5000 rpm durante 60s. Se utilizaron SiW de 1 cm² como sustrato, que fueron previamente tratadas con acetona para activar la superficie. Se depositó una gota de 0.2 mL de cada una de las mezclas de PEMA-Aa/POE en las distintas proporciones preparadas. Se realizaron tres placas para cada una de las mezclas poliméricas.

La determinación del espesor de la capa polimérica se llevó a cabo mediante elipsometría *ex-situ* en un elipsómetro de ángulo variable L116S300 STOKES (Gaertner Scientific Corporation, USA) provisto de un láser de He-Ne con una longitud de onda de $\lambda = 632.8$ nm y un ángulo de incidencia Φ de 70° a una temperatura de 25°C .

Las mediciones de ángulo de contacto y la determinación de energía superficial, se realizaron en el equipo de ángulo de contacto Drop Shape Analyzer DSA25S (KRUSS, Alemania) controlado por el software Advance® (KRUSS, Alemania) sobre superficies modificadas con los PEMA-Aa y mezclas PEMA-Aa/POE. Las mediciones de ángulo de contacto sobre las superficies poliméricas se llevaron a cabo mediante el método *Sessile Drop* a una temperatura de 25°C . Se depositaron gotas de $5\ \mu\text{L}$ de agua y diiodometano sobre cada una de las superficies poliméricas.

2.5.9 Preparación y Caracterización de Nanofibras

2.5.9.1 Preparación de Nanofibras

Para preparar las nanofibras se utilizaron las mezclas de PEMA-Aa y POE descritas anteriormente en el punto 2.4.7.1, estas mezclas fueron introducidas en jeringas de 5 mL ($d = 13.22$ mm) y puestas en el equipo de electrohilado (Fluinatek, eStretching LE-10). Este equipo consiste en una jeringa y una aguja conectada a una fuente de poder de voltaje positivo hasta 25 kV. Un colector metálico a una distancia variable entre 1 y 25 cm de la aguja (Figura 3). La velocidad de flujo de la solución es controlada por una bomba conectada a la jeringa con un rango de 0,1 mL/h hasta 2 mL/h. Todos los experimentos fueron realizados a 25°C .

Los parámetros voltaje, distancia del colector y velocidad de flujo fueron obtenidos experimentalmente para cada una de las mezclas y se muestran en las Tablas 5-9:

Tabla 5. Parámetros de electrohilado para las mezclas PEMA-Asp/POE.

PEMA- Asp/POE	Concentración Polielectrolito (p/v)	Voltaje Aplicado (kV)	Distancia Colector (cm)	Velocidad de Flujo (μL/h)
1:1	10%	11,3	15,0	300
1:2		13,0	15,0	750
1:3		13,5	15,0	1500
1:1	15%	10,0	15,0	300
1:2		10,0	15,0	500
1:3		11,0	15,0	1000
1:1	20%	13,0	15,0	900
1:2		11,5	15,0	500
1:3		12,0	15,0	750

Tabla 6. Parámetros de electrohilado para las mezclas PEMA-Met/POE.

PEMA- Met/POE	Concentración Polielectrolito (p/v)	Voltaje Aplicado (kV)	Distancia Colector (cm)	Velocidad de Flujo (μL/h)
1:1	10%	13,2	15,0	500
1:2		11,0	15,0	500
1:3		11,5	15,0	750
1:1	15%	14,0	15,0	500
1:2		11,5	15,0	750
1:3		11,5	15,0	750

1:1	20%	11,0	10,0	300
1:2		10,7	12,5	500
1:3		11,0	12,5	500

Tabla 7. Parámetros de electrohilado para las mezclas PEMA-Tyr/POE.

PEMA-Tyr/POE	Concentración Polielectrolito (p/v)	Voltaje Aplicado (kV)	Distancia Colector (cm)	Velocidad de Flujo (μL/h)
1:1	10%	11,5	15,0	500
1:2		11,0	15,0	700
1:3		11,0	15,0	750
1:1	15%	14,0	15,0	100
1:2		13,0	15,0	500
1:3		12,5	15,0	750
1:1	20%	14,0	15,0	250
1:2		14,7	15,0	400
1:3		15,0	15,0	600

Tabla 8. Parámetros de electrohilado para las mezclas PEMA-Arg/POE.

PEMA-Arg/POE	Concentración Polielectrolito (p/v)	Voltaje Aplicado (kV)	Distancia Colector (cm)	Velocidad de Flujo (μL/h)
1:1		15,0	15,0	700
1:2	20%	16,3	16,0	900
1:3		22,0	15,0	1200

Tabla 9. Parámetros de electrohilado para las mezclas PEMA-Leu/POE.

PEMA- Leu/POE	Concentración Polielectrolito (p/v)	Voltaje Aplicado (kV)	Distancia Colector (cm)	Velocidad de Flujo (μL/h)
1:1		12,0	15,0	525
1:2	20%	12,0	14,5	1000
1:3		12,4	15,0	1200

Para determinar si las disoluciones poliméricas fueron electrohiladas, se colectó muestra durante un minuto en un vidrio porta muestra y se llevó al microscopio óptico, se obtuvieron imágenes de 40X y 100X con las cuales se pudo determinar si existe la formación de fibras.

2.5.9.2 Morfología de las Nanofibras

Para determinar la morfología de las nanofibras obtenidas, se cortaron trozos de 1cm² de la placa metálica donde fueron colectadas. Esto trozos fueron depositados en un porta muestras para SEM y se realizó un baño de nanopartículas de oro previo a ser introducidas en el microscopio. Se obtuvieron imágenes con magnificaciones que van desde 200X hasta 30.000X. En las imágenes correspondientes a 15.000X se realizaron mediciones de los diámetros de las distintas nanofibras obtenidas, obteniéndose un diámetro promedio para cada una de ellas.

2.5.9.3 Entrecruzamiento de Nanofibras

Para entrecruzar las nanofibras obtenidas, se utilizaron diferentes agentes entrecruzantes tales como EDA, GA y CaCl_2 , cada uno de ellos con diferente metodología. En el primer método, se sumergieron placas de vidrios con nanofibras directamente en disoluciones de EDA 0.3 M, 0.6 M y 0.9 M utilizando etanol como disolvente. Para que ocurra la reacción, se colocaron en una estufa a vacío, calentando a 70 °C. Las placas se mantuvieron aproximadamente durante 4 horas.

El entrecruzamiento con GA se llevó a cabo en una desecadora, se puso en el fondo una disolución de GA al 50% v/v y placas de vidrio con nanofibras dentro de la desecadora. Luego, se hace vacío con una bomba de vacío y se dejan las placas durante 24 horas.

El entrecruzamiento con CaCl_2 se probó primero en las disoluciones de las mezclas de PEMA-Aa/POE, se agregó 1 mL de cada una de las mezclas en un tubo de ensayo y se adicionó un volumen determinado de una disolución de CaCl_2 4,5 M. Este volumen adicionado es el equivalente molar a la cantidad de moles de cada PEMA-Aa presente en cada una de las mezclas. Finalmente se sumergieron placas de vidrio con nanofibras en esta disolución de CaCl_2 durante 1 minuto y luego fueron secadas en una estufa.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 CAPITULO I: POLIELECTROLITOS DERIVADOS DE PSMA

3.1.1 Caracterización de PSMA, PSMA-Gln, PSMA-Met y PSMA-Tyr.

La caracterización del PSMA y de PSMA-Met, PSMA-Gln y PSMA-Tyr (Figura 8) se llevó a cabo mediante FT-IR, RMN-¹³C y RMN-¹H, estas técnicas se utilizaron de forma complementaria debido a que algunas bandas y señales características de sus grupos funcionales se superponen.

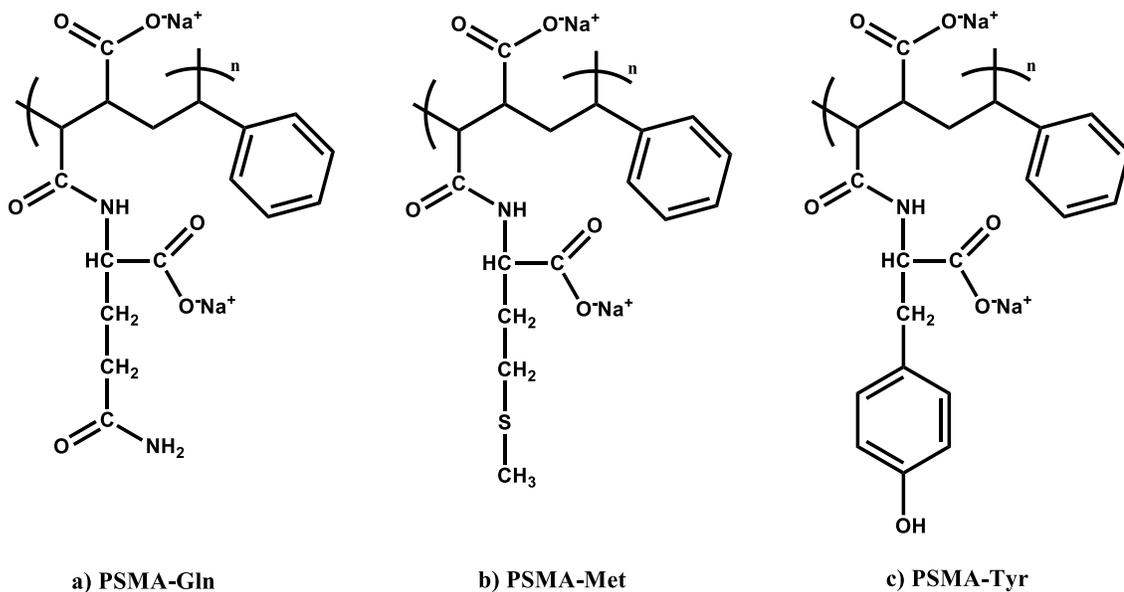


Figura 8. Estructuras de los polielectrolitos: a) PSMA-Gln, b) PSMA-Met y c) PSMA-Tyr.

La Figura 9 muestra el espectro FT-IR obtenido para el PSMA, se observaron las bandas características de este polímero reportadas previamente en literatura.⁴⁶

En 1856 y 1779 cm^{-1} aparecen las bandas correspondientes al estiramiento asimétrico y simétrico, respectivamente, de los grupos carbonilo de la unidad monomérica de AM, las bandas que aparecen en 1220 , 955 y 925 cm^{-1} son características del estiramiento de los enlaces C—O—C del AM. En 1494 y 1454 cm^{-1} aparecen las bandas características del estiramiento anillo aromático del estireno y una banda en 704 cm^{-1} correspondiente a un anillo aromático mono sustituido.

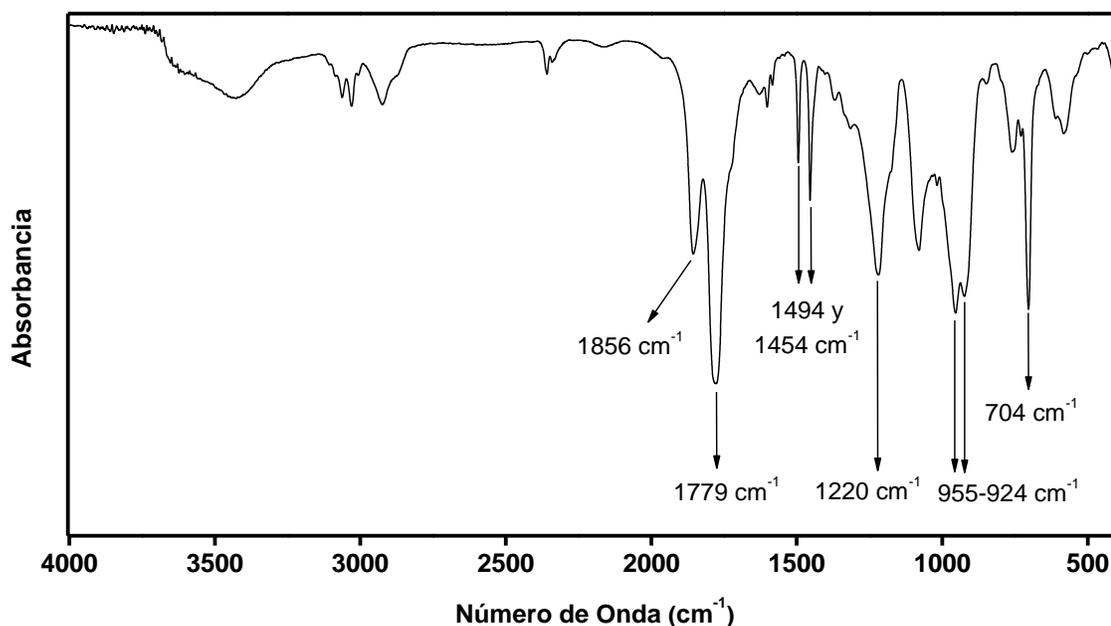


Figura 9. Espectro FT-IR obtenido para el PSMA.

En la Figura 10, se muestra el espectro FT-IR del PSMA-Gln. Se observó la desaparición de las bandas en 1856 y 1779 cm^{-1} de los grupos carbonilos del PSMA y la aparición de las bandas características en 3419 , 1693 y 1664 cm^{-1} que corresponden a los grupos N-H (estiramiento) de la amida, C=O (estiramiento asimétrico) de ácidos carboxílicos y C=O (estiramiento asimétrico) de la amida formada en la modificación del PSMA con los aminoácidos. En los espectros FT-IR de PSMA-Met y PSMA-Tyr (Anexo, Figura 1 y 2), se observaron bandas similares a las del PSMA-Gln, es decir se observó la desaparición de las bandas correspondientes al PSMA y la aparición de las bandas características cuando se produce la modificación química del PSMA con los aminoácidos

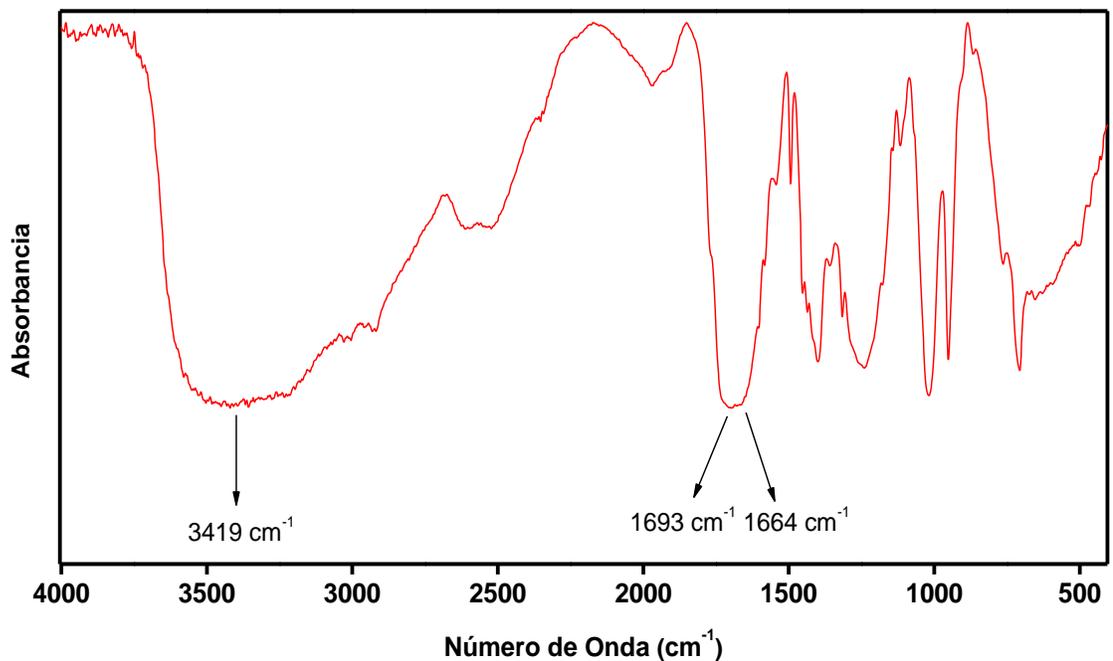


Figura 10. Espectro FT-IR obtenido para el polielectrolito PSMA-Gln.

En la Tabla 10 se muestran las bandas de absorción asociadas a los principales grupos funcionales de los distintos polielectrolitos y del PSMA.

Tabla 10. Bandas de adsorción IR asociadas a los principales grupos funcionales de los polielectrolitos derivados de PSMA.

Polímero/Polielectrolito	Bandas de absorción FT-IR (cm⁻¹)		
	C=O₁ (st)	C=O₂ (st)	N-H (st)
PSMA	1854	1771	–
PSMA-Gln	1693	1664	3419
PSMA-Met	1703	1660	3419
PSMA-Tyr	1718	1657	3427

En las Figura 11a y 11b se muestran los espectros RMN-¹H obtenidos para el PSMA y el PSMA-Gln respectivamente, obtenidos en DMSO-D₆, las señales de los distintos átomos de hidrógeno se asignaron mediante números a las estructuras correspondientes:

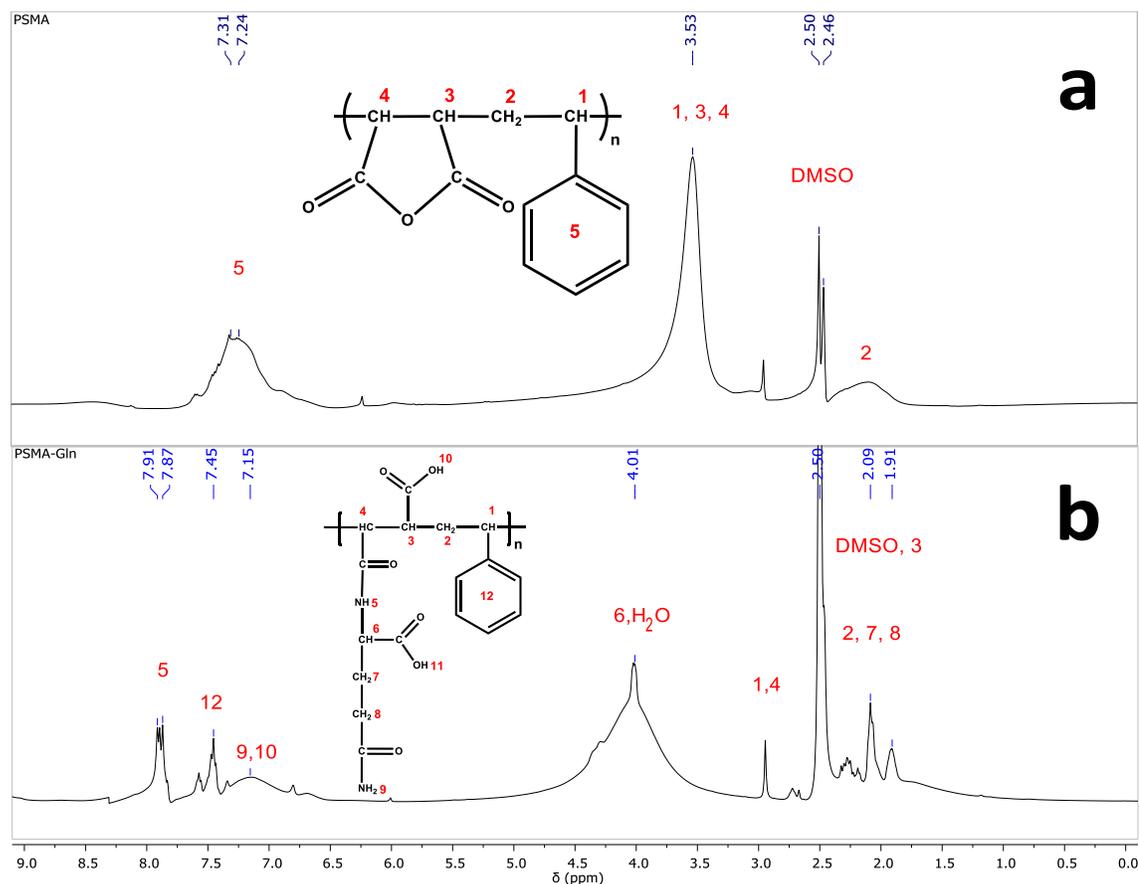


Figura 11. Espectros RMN-¹H obtenidos para a) PSMA y b) PSMA-Gln

En el espectro RMN-¹H obtenido para el PSMA apareció una banda ancha en 3.53 ppm y un peak en 2.46 ppm que son características para los átomos de hidrógeno de la cadena principal. Los peaks entre 7.20 y 7.30 ppm corresponden a los átomos de hidrógeno del anillo aromático del estireno. En el espectro RMN-¹H de PSMA-Gln, entre 1.5 y 4.0 ppm aparecen las señales de los átomos de hidrógeno de los CH y CH₂ de la cadena principal y de la cadena lateral del PSMA. Aparecen señales acopladas y anchas en la zona de 7.15

ppm que corresponden a los átomos de hidrógeno de los ácidos carboxílicos y de los grupos amida del PSMA. Estas señales no se observan claramente, ya que, por su estructura, los hidrógenos amídicos podrían estar interactuando mediante puente de hidrogeno con los átomos de oxígeno de los grupos carbonilos presentes en la cadena principal y lateral del PSMA-Gln.

Los espectros RMN-¹H obtenidos para PSMA-Met y PSMA-Tyr comparados con PSMA (Anexo, Figuras 3 y 4) tienen señales similares a las descritas para PSMA-Gln en su cadena principal, pero se diferencian en las señales que corresponden a las cadenas laterales del PSMA-Met y del PSMA-Tyr.

Las Figuras 12a y 12b muestran los espectros RMN-¹³C obtenidos para el PSMA y PSMA-Gln respectivamente, obtenidos en DMSO-D₆, las señales de los átomos de carbono se asignaron mediante números a las estructuras correspondientes:

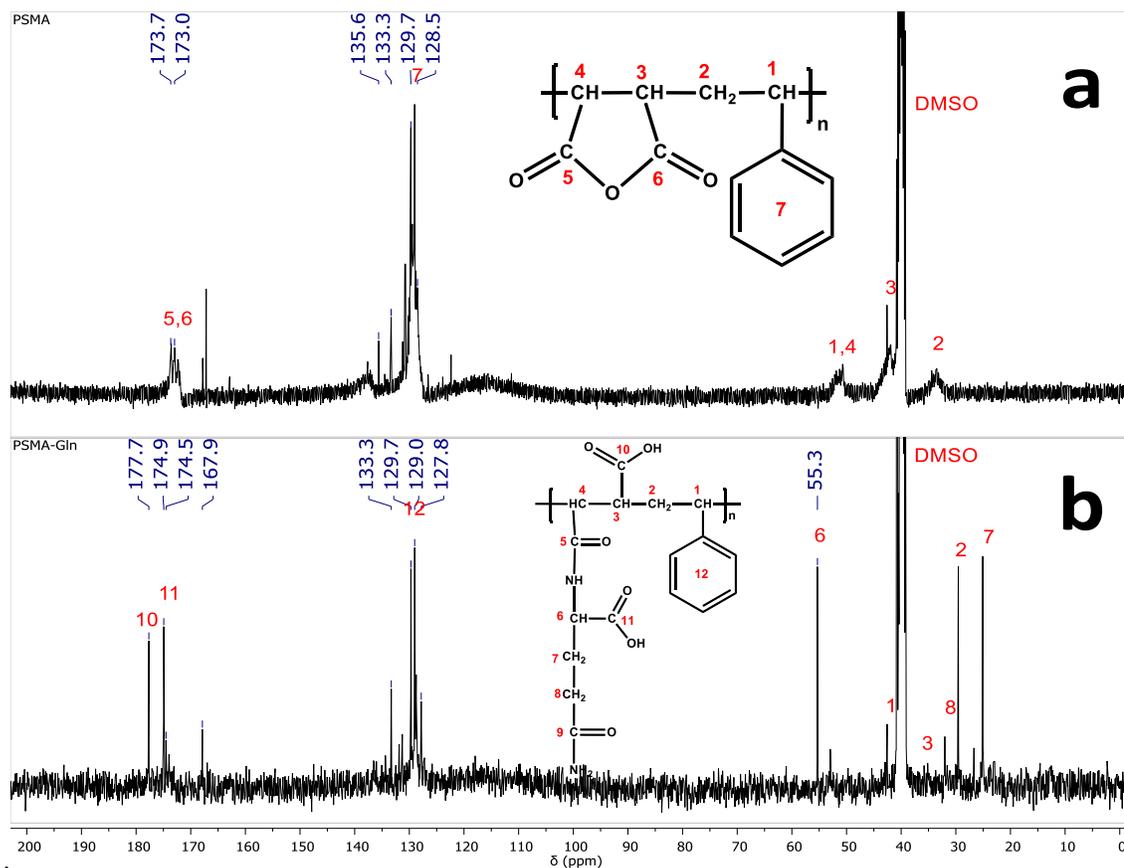


Figura 12. Espectros RMN-¹³C obtenidos para a) PSMA y b) PSMA-Gln.

En el espectro RMN-¹³C obtenido para el PSMA, entre 30 y 50 ppm se encuentran las señales correspondientes a los átomos de carbono de los CH y CH₂ de la cadena principal del PSMA. Entre 128 y 136 ppm, las señales características del anillo aromático del estireno y en 173.6 y 173.0 ppm las señales de los átomos de carbono de los dos grupos carbonilo. En el espectro RMN-¹³C obtenido para PSMA-Gln, entre 20 y 40 ppm se encuentran las señales de los CH y CH₂ de la cadena principal y de la cadena lateral del

PSMA-Gln. En 55.3 ppm aparece una señal que corresponde al CH de su cadena lateral que está unido al NH de la amida formada en la modificación química y a un grupo COOH. Entre 127 y 133 ppm se encuentran las señales características para el anillo aromático del estireno. Las señales en 177.7, 174.9 y 174.5 ppm corresponden a los átomos de carbono de los grupos carbonilos de la amida formada en la modificación y de los ácidos carboxílicos de la cadena lateral y de la cadena principal. La señal que aparece en 167.9 corresponde al carbonilo del ácido carboxílico que se forma cuando se produce la apertura del anillo, pero no hay modificación química con el aminoácido.

En los espectros RMN-¹³C obtenidos para PSMA-Met y PSMA-Tyr comparados con PSMA (Anexo, Figuras 5 y 6) tienen señales similares a las descritas para PSMA-Gln en su cadena principal, pero se diferencian en las señales que corresponden a las cadenas laterales del PSMA-Met y del PSMA-Tyr.

3.1.2 Determinación del Porcentaje de Modificación de los Polielectrolitos

Los resultados de análisis elemental revelaron el porcentaje de masa de nitrógeno contenido en cada uno de los polielectrolitos. En la Tabla 11 se muestra la masa molar de la unidad repetitiva (Ur) de cada polielectrolito, el porcentaje de nitrógeno obtenido mediante AE y el porcentaje de modificación calculado para cada uno de los PSMA-Aa.

Tabla 11. Masa molar de la unidad repetitiva de PSMA (U_{r0}) y los PSMA-Aa (U_{r100}), porcentaje de nitrógeno determinado por AE y porcentaje de modificación.

Unidad Repetitiva	Fórmula Molecular	U_{r0} o r_{100} (g/mol)	Nitrógeno Contenido (%)	Porcentaje de Modificación (%)
PSMA	$C_6H_6O_3$	202.063	0	0
PSMA-Gln	$C_{11}H_{18}O_5N_4Na_2$	415.062	3.25	81
PSMA-Met	$C_{10}H_{10}O_7NNa_3$	395.078	3.59	93
PSMA-Tyr	$C_9H_{11}O_5NSNa_2$	427.101	2.62	83

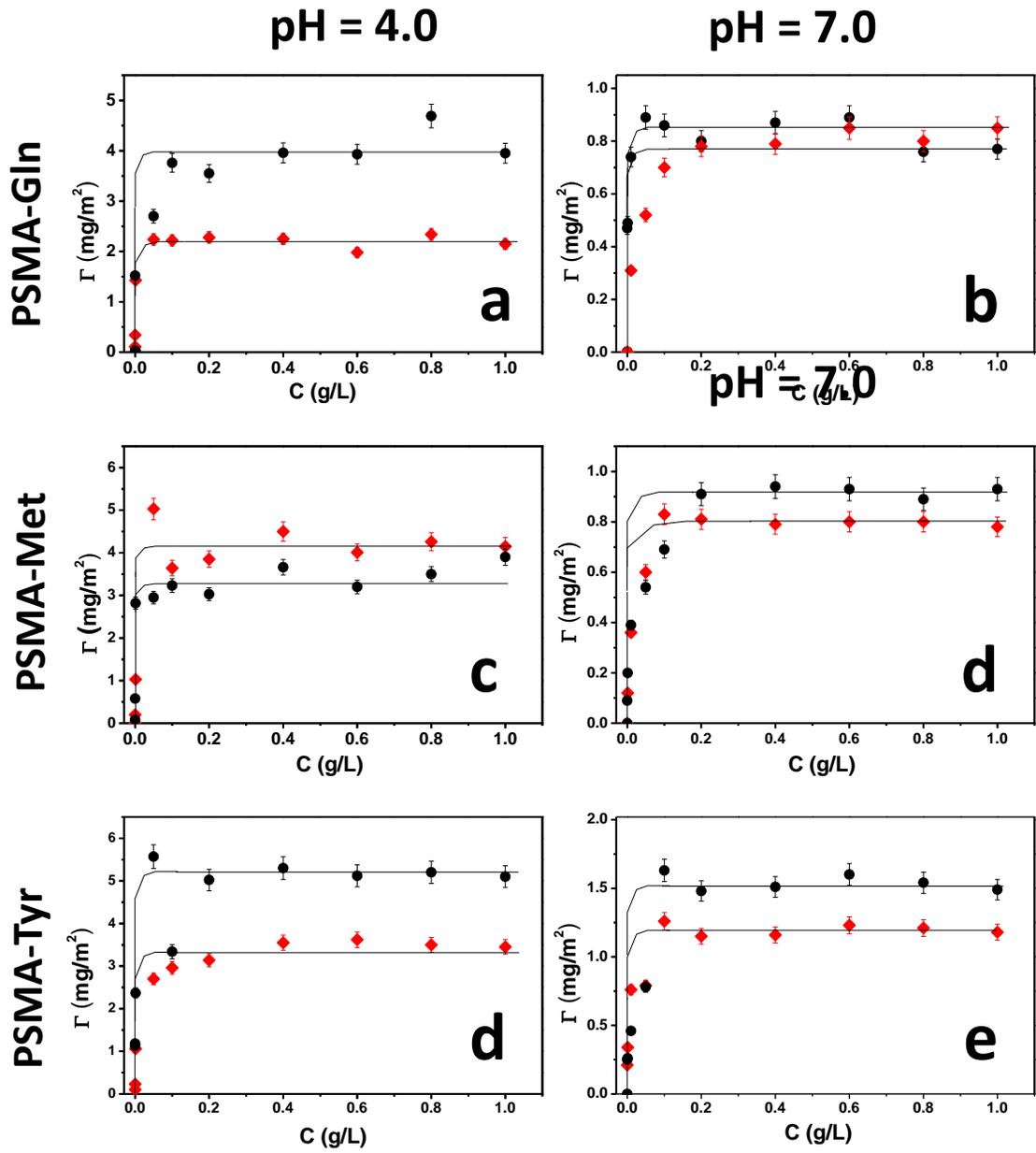
Los valores de los porcentajes de modificación de PSMA con cada uno de los aminoácidos se encuentran en un rango de 81-93%. Estos valores confirman la obtención de polielectrolitos derivados de PSMA con un alto grado de modificación. El PSMA-Gln y el PSMA-Tyr tienen menor porcentaje de modificación, en el caso del PSMA-Tyr, esto puede deberse al impedimento estérico entre el anillo aromático del PSMA y el anillo aromático de la tirosina, ya que ambos grupos son voluminosos. En el caso del PSMA-

Gln, puede deberse a que este aminoácido tiende a formar puentes de hidrógeno a medida que va siendo incorporado a la cadena, quedando menos disponible para la reacción química con el PSMA.

3.1.3 Comportamiento De Adsorción de Los Polielectrolitos sobre Superficies Sólidas

El comportamiento de adsorción de los polielectrolitos derivados de PSMA sobre superficies sólidas modificadas hidrofílicamente con grupos amino-terminales, fue analizado a través de isothermas de adsorción, que fueron obtenidas a partir de disoluciones acuosas de los polielectrolitos en NaCl 0.001 y 0.1 M a pH 4.0 y 7.0. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13:

:



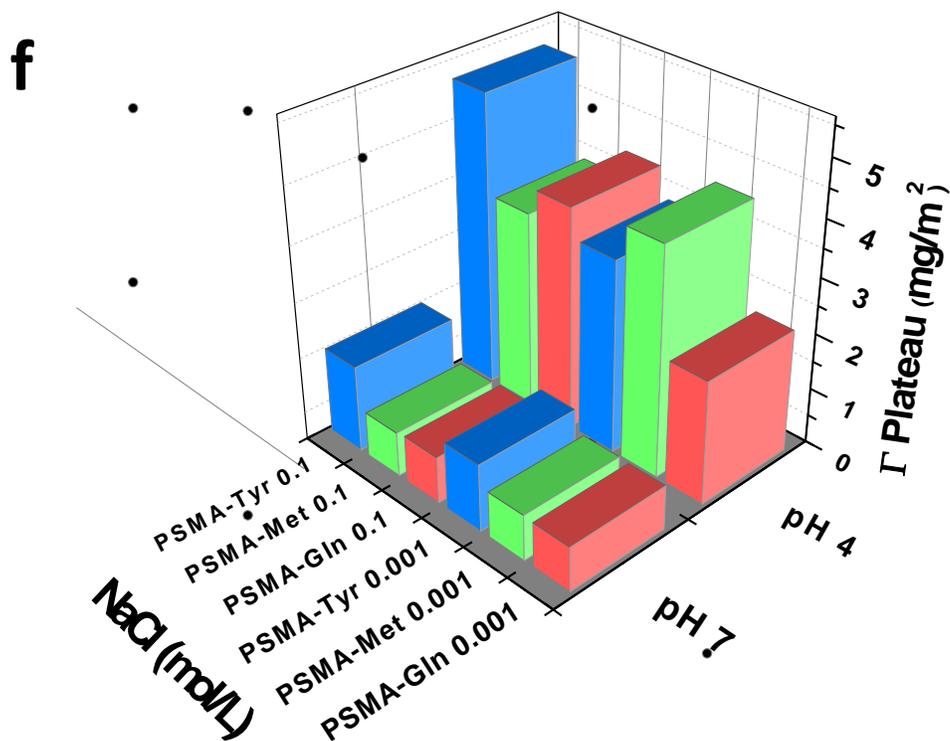


Figura 13. Isothermas de adsorción obtenidas para a) y b) PSMA-Gln, c) y d) PSMA-Met and e) y f) PSMA-Tyr sobre superficies amino-terminales a pH 4.0 y 7.0 respectivamente, a fuerza iónica de (●) 0.1 M y (◆) 0.001 M g) Cantidad promedio de polielectrolito adsorbida en el plató bajo las mismas condiciones.

Las isothermas de adsorción de los polielectrolitos PSMA-Gln y PSMA-Tyr a pH 4 y del polielectrolito PSMA-Met a pH 7.0 muestran que la cantidad adsorbida de polielectrolito sobre la superficie amino-terminal es mayor cuando la concentración de sal es mayor. En este caso, al aumentar la concentración de sal en la disolución, se produce un apantallamiento de los segmentos cargados de los polielectrolitos, provocando una

disminución en la repulsión entre las cadenas, lo que se traduce en un cambio conformacional de los polielectrolitos adoptando una forma más ovillada. Los polielectrolitos, se comportan entonces como un polímero neutro y se adsorben sobre la superficie formando agregados. Este comportamiento se ajusta al denominado régimen de “*adsorción aumentada por apantallamiento*” que sugiere que las fuerzas que modulan la interacción entre la superficie y el polielectrolito son principalmente del tipo hidrofóbicas. Mientras que en la adsorción del PSMA-Met a pH 4.0, la cantidad adsorbida de polielectrolito es mayor cuando la concentración de sal es menor. Al disminuir la concentración de sal en la disolución, existe un menor apantallamiento de los segmentos cargados de los polielectrolitos, provocando una mayor repulsión electrostática entre las cadenas de polielectrolitos, por lo que este se encontrará en una conformación de ovillo extendido. Este régimen se denomina “*adsorción disminuida por apantallamiento*” e implica que las fuerzas que modulan las interacciones entre la superficie cargada positivamente y el polielectrolito cargado negativamente son principalmente electrostáticas.

Además, la cantidad promedio adsorbida de polielectrolitos en el plató, que se muestra en la Figura 13g, a pH 4.0 fue entre 2 y 5 mg/m², mientras que a pH 7.0 fue de 1 mg/m². El cambio en el pH influye directamente sobre la densidad de carga de la superficie modificada con el grupo propil-amino, que tiene un pKa cercano a 3.7. A pH 7.0 la superficie amino-terminal tiene una mínima cantidad de cargas positivas, por lo que la interacción con polielectrolitos con carga opuesta es muy débil. Las pocas cadenas que se adsorben sobre la superficie se extienden sobre esta, para minimizar la repulsión entre sus cadenas cargadas negativamente que no interactuaron con esta, lo que provoca que la

superficie se sature rápidamente y la cantidad de polielectrolito sea pequeña. El efecto de la cadena lateral sobre la cantidad adsorbida de polielectrolito se observó para el PSMA-Tyr, que tiene la cadena lateral más voluminosa y también la cantidad adsorbida de polielectrolito más grande para ambos valores de pH.

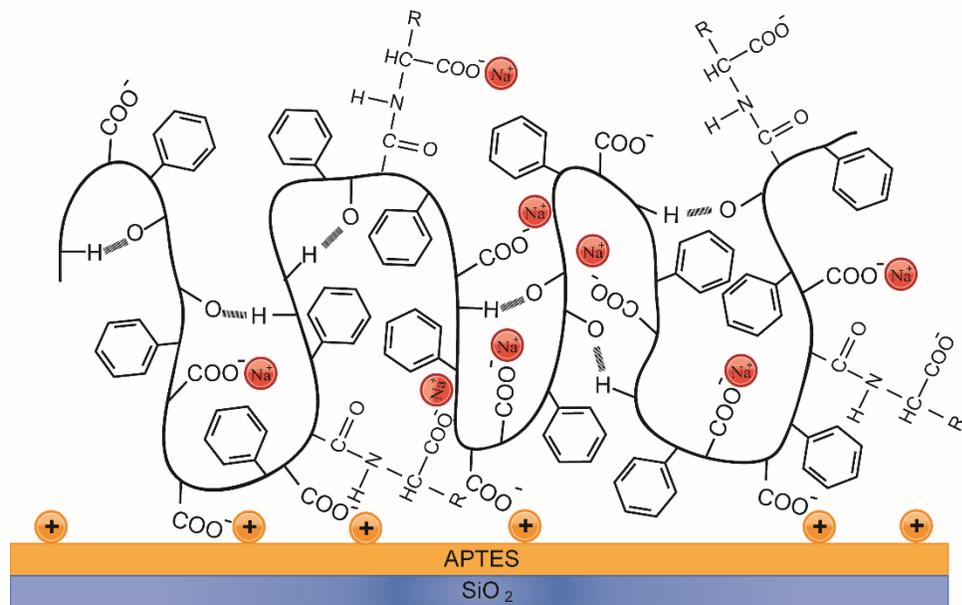


Figura 14. Esquema general de adsorción de polielectrolitos sobre superficie sólida de carga opuesta. R corresponde a la cadena lateral de cada polielectrolito PSMA-Gln, PSMA-Met y PSMA-Tyr.

La Figura 14 muestra un esquema de un modelo general de adsorción de los polielectrolitos derivados de PSMA sobre una superficie sólida con carga opuesta. La distinta naturaleza química de los aminoácidos pudo determinar el comportamiento de adsorción de los distintos polielectrolitos PSMA-Gln, PSMA-Met y PSMA-Tyr. El

PSMA-Gln tiene un grupo amida en el final de su cadena lateral, esto favoreció las interacciones intramoleculares de las cadenas de PSMA-Gln, principalmente a través de interacciones tipo puente de hidrógeno entre los átomos de oxígeno de los grupos carbonilos y los protones de sus dos grupos amida. Por su parte el PSMA-Met tiene una cadena lateral hidrofóbica, esta cadena lateral no favoreció interacciones intra ni intermoleculares, por lo que en este polielectrolito primó la repulsión electrostática entre los grupos cargados negativamente. El PSMA-Tyr tiene en su cadena lateral un anillo fenólico, este es el grupo lateral más voluminoso de los tres polielectrolitos. Este polielectrolito verá favorecidas interacciones tipo π - π entre sus anillos aromáticos.

3.1.4 Humectabilidad de las Películas Poliméricas

Los valores de ángulo de contacto de avance (θ_A), de retroceso (θ_R) medidos y la histéresis calculada para las películas de polielectrolitos obtenidas a diferente concentración de NaCl y, a pH 4.0 y 7.0, que aparecen en la Tabla 12, mostraron en general, que a pH 4.0 la humectabilidad es muy parecida para todas las películas, con pequeñas variaciones. Esto indica que los polielectrolitos fueron adsorbidos obteniéndose superficies heterogéneas con regiones en equilibrio entre grupos hidrofílicos e hidrofóbicos.

Tabla 12. Ángulo de contacto de avance (θ_a) y retroceso (θ_r) e histéresis ($\Delta\theta$) para las películas de PSMA-Gln, PSMA-Met y PSMA-Tyr 0.5 g/L obtenidas a pH 4.0 y 7.0 con 0.1 y 0.001 M de NaCl

pH	Concentración NaCl (M)	Película Polimérica	θ_a (°)	θ_r (°)	$\Delta\theta$
4.0	0.001	PSMA-Gln	67 ± 1	59 ± 1	8 ± 1
		PSMA-Met	68 ± 1	45 ± 1	23 ± 1
		PSMA-Tyr	60 ± 3	38 ± 2	22 ± 3
	0.1	PSMA-Gln	66 ± 1	47 ± 2	19 ± 2
		PSMA-Met	67 ± 2	44 ± 2	23 ± 2
		PSMA-Tyr	69 ± 1	54 ± 2	15 ± 2
7.0	0.001	PSMA-Gln	68 ± 2	41 ± 2	27 ± 2
		PSMA-Met	61 ± 2	40 ± 2	21 ± 2
		PSMA-Tyr	58 ± 1	35 ± 2	23 ± 2
	0.1	PSMA-Gln	72 ± 1	53 ± 1	19 ± 1
		PSMA-Met	74 ± 3	48 ± 1	26 ± 2
		PSMA-Tyr	73 ± 1	50 ± 3	23 ± 2

Las regiones hidrofílicas están dadas principalmente por la presencia de los grupos de ácido carboxílico tanto de la cadena principal como de las cadenas laterales de residuos de aminoácidos. Además, en la cadena lateral del PSMA-Gln existe otro grupo amida de carácter hidrofílico que contribuye a estas regiones. Por otro lado, las regiones hidrofóbicas están dadas principalmente por el grupo fenilo del estireno y en el caso de PSMA-Met y PSMA-Tyr por sus cadenas laterales hidrofóbicas. Los valores calculados para la histéresis, que se encuentran en un rango de 8-27°, confirman que las películas obtenidas tienen superficies heterogéneas químicamente. Como se explicó anteriormente, la distinta naturaleza química de los residuos de aminoácidos de la cadena lateral provocó mecanismos de adsorción gobernados por diferentes tipos de interacciones, propia para cada polielectrolito, obteniendo películas con similares propiedades en cuando a la humectabilidad.

A pH 7.0, hay la diferencia de ángulos de contacto es más notoria. A mayor concentración de sal adicionada, la humectabilidad disminuye. Debido a que existe un mayor apantallamiento de las cargas de los polielectrolitos, estos adoptan una conformación de ovillo más compacto, provocando que en la superficie haya una menor cantidad de grupos de ácido carboxílico disponibles lo que disminuye la hidrofiliidad de esta.

3.1.5 Determinación de Energía Superficial

Los valores de energía superficial determinados para las películas de los polielectrolitos, que se muestran en la Tabla 13, son similares para todos los polielectrolitos independiente de la cantidad de sal adicionada y el polielectrolito, este rango es de 53-59 mJ/m².

Tabla 13. Ángulos de contacto del par de disolventes agua-diyodometano sobre las películas de polielectrolitos 0.5 g/L a pH 4.0 y su energía superficial total con sus componentes polar y dispersiva.

Concentración NaCl (M)	Película Polimérica	θ_{agua} (°)	θ_{DYM} (°)	γ^d (mJ/m ²)	γ^p (mJ/m ²)	γ^{total} (mJ/m ²)
0.001	PSMA	49 ± 1	41 ± 1	39.53	23.63	63.16
	PSMA-Gln	67 ± 1	44 ± 1	38.12	14.94	53.06
	PSMA-Met	68 ± 1	33 ± 1	43.15	13.49	56.59
	PSMA-Tyr	60 ± 3	39 ± 1	40.84	17.55	58.39
0.1	PSMA	51 ± 1	42 ± 1	39.32	22.69	62.00
	PSMA-Gln	66 ± 1	38 ± 2	40.89	14.90	55.79
	PSMA-Met	67 ± 2	41 ± 2	39.53	14.41	53.95
	PSMA-Tyr	69 ± 1	42 ± 3	39.45	13.74	53.20

La contribución relativa de cada uno de los componentes a la energía superficial, γ^{Total} , está determinada por la composición química de la superficie. La componente polar, γ^p , está compuesta de varias interacciones polares en las que se incluyen puentes de hidrógeno, interacción dipolo-dipolo y dipolo-dipolo inducido, mientras que la componente dispersiva, γ^d , se está compuesta de las fuerzas de dispersión de London. Para las películas de PSMA-Gln, PSMA-Met y PSMA-Tyr la componente dispersiva es mucho

mayor que la componente polar en todos los casos, esto sugiere que las interacciones que gobiernan son las fuerzas de dispersión de London y en menor medida podría haber interacciones dipolo-dipolo o puentes de hidrógeno. Este resultado experimental confirma la adsorción de los polielectrolitos sobre la superficie hidrofílica en un equilibrio hidrofóbico/hidrofílico entre sus cadenas laterales y los grupos hidrofóbicos de la cadena principal tal como lo sugiere la humectabilidad de las distintas películas de polielectrolitos.

3.1.6 Topografía de las Películas Poliméricas

En las imágenes obtenidas mediante AFM, que se muestran en la Figura 15, se observa la topografía de las superficies de las películas de PSMA y de los polielectrolitos PSMA-Gln, PSMA-Met y PSMA-Tyr obtenidas a concentración 0.1 M y 0.001 M de NaCl y a pH 4.0.

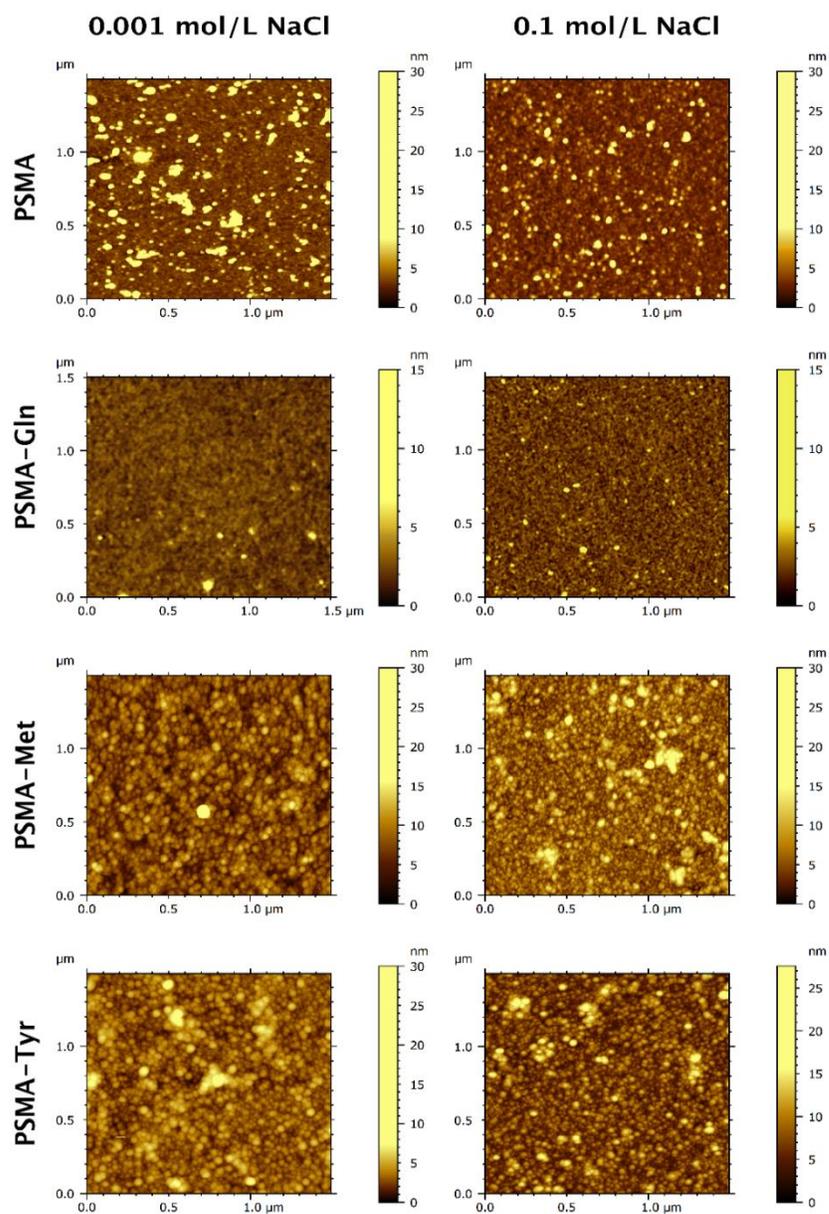


Figura 15. Imágenes de AFM ($1.5 \times 1.5 \mu\text{m}$) de las películas de polielectrolitos adsorbidos sobre una superficie sólida a pH 4.0 y concentraciones 0.001 y 0.1 M de NaCl.

Tabla 14. RMS de las películas de polielectrolitos obtenidas a diferentes fuerzas iónicas a pH 4.0.

Concentración de NaCl (M)	Película Polimérica	Rugosidad (RMS) (nm)
0.001	PSMA	2.24
	PSMA-Gln	0.59
	PSMA-Met	2.62
	PSMA-Tyr	2.99
0.1	PSMA	1.37
	PSMA-Gln	0.39
	PSMA-Met	2.39
	PSMA-Tyr	2.42

En todos los casos, a dos valores de fuerza iónica, se observan depósitos de polímeros muy homogéneos y regulares y adoptan dos tipos de morfología, siendo una nanoestructura globular bien definida para PSMA-Met y PSMA-Tyr y una estructura similar a nanofibras densamente empaquetada en el caso de PSMA-Gln.

Se observa que la concentración de sal adicionada tiene un efecto sobre estas nanoestructuras que forman las películas de los polielectrolitos. Aunque en todos los casos se conservan los dominios de morfología de la superficie, a una mayor cantidad de sal adicionada, se produce una ligera disminución en el tamaño de las nanoestructuras que forman los dominios de la superficie, lo que se refleja en los valores de rugosidad de las superficies.

A partir de los datos de la Tabla 14, se observa que para todas las películas de polielectrolitos la rugosidad es mayor cuando disminuye la concentración de sal

adicionada. A la concentración 0.001 M de NaCl, el efecto de apantallamiento de los contraiones Na^+ en el polielectrolito cargado será menor y, por lo tanto, existirá un mayor número de grupos cargados en la cadena de los polielectrolitos, provocando repulsión electrostática entre ellos, lo que promovería que el polímero se adopte una conformación de ovillo extendido, sin embargo debido a la presencia de contraiones, las cadenas no se extienden completamente, y los polielectrolitos se adsorben en forma de agregados por lo que la rugosidad es mayor que a mayor concentración de NaCl. Los parámetros de morfología y rugosidad de la superficie son consistentes con lo que se mencionó anteriormente sobre la humectabilidad y la energía superficial de las películas de los distintos polielectrolitos.

3.1.7 Adhesión Celular y Viabilidad Celular

Se colocaron 25.000 células de neuroblastoma SH-SY5Y sobre las películas de los polielectrolitos PSMA-Gln, PSMA-Met y PSMA-Tyr esterilizadas con luz UV y se compararon con células que crecían sobre cubreobjetos de vidrio (en presencia o ausencia de polilisina). Los campos aleatorios se fotografiaron con microscopía de contraste de fase y el número de células por campo se contó de forma doble ciego durante 24, 48 y 72 horas. Como se observa en la Figura 16, el número de células por campo aumentó de manera constante y proporcional al tiempo de duplicación de 27 horas reportado para estas células,⁷¹ lo que sugiere que la proliferación de células SH-SY5Y no se vio afectada significativamente:

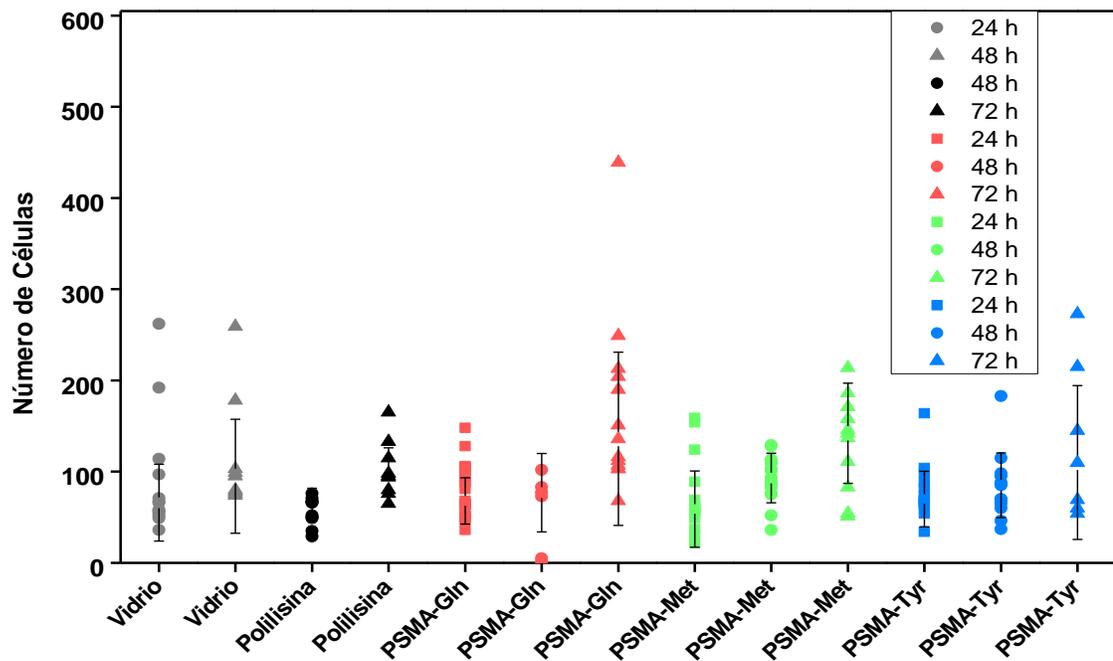


Figura 16. Conteo celular en función de las distintas condiciones de sustratos y tiempo de incubación.

La viabilidad celular fue evaluada utilizando el método MTT descrito anteriormente, mientras que el estrés oxidativo fue evaluado mediante 4-HNE, los resultados, que muestran en la Figura 17 y 18, fueron expresados en porcentaje de células vivas y porcentaje de % de 4-HNE en el cultivo:

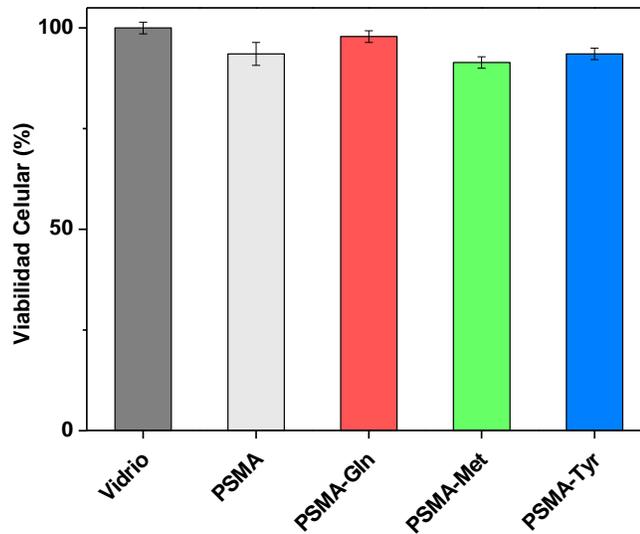


Figura 17. Viabilidad celular evaluada mediante MTT.

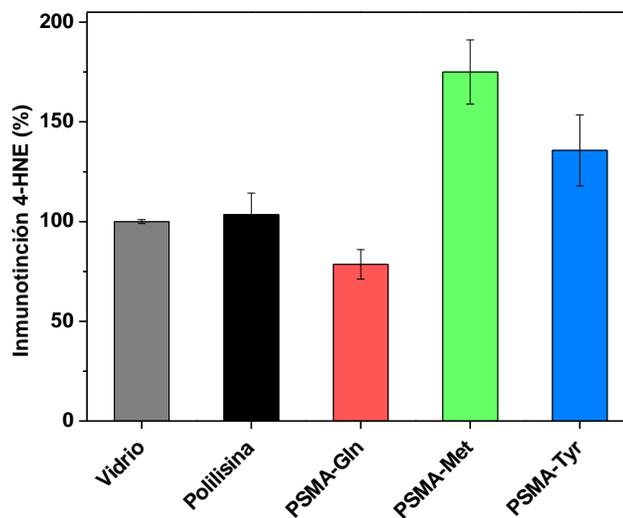


Figura 18. Estrés oxidativo celular evaluado mediante 4-HNE.

Las películas de los polielectrolitos provocaron diferentes respuestas en las células de neuroblastoma SH-SY5Y, lo que probablemente refleja las diferencias en la hidrofobicidad de la superficie expuesta.

Las células SH-SY5Y fueron capaces de propagarse fácilmente sobre cubreobjetos de vidrio lavado con ácido en ausencia o presencia de un recubrimiento de polilisina. Mientras que las películas de los polielectrolitos disminuyeron significativamente la propagación celular en comparación con los sustratos estándar, en la Figura 18 se observa que solo PSMA-Met induce un aumento de la peroxidación de lípidos, lo que podría interpretarse como una señal de estrés o un cambio en el metabolismo celular. El hecho de que estos tratamientos no afectaron la viabilidad celular, medido por el ensayo MTT (Figura 17), sugiere que PSMA-Met modifica la respuesta del neuroblastoma SH-SY5Y con el sustrato.

Las imágenes obtenidas de las células cultivadas sobre las distintas películas de polielectrolitos se muestran en la Figura 19.

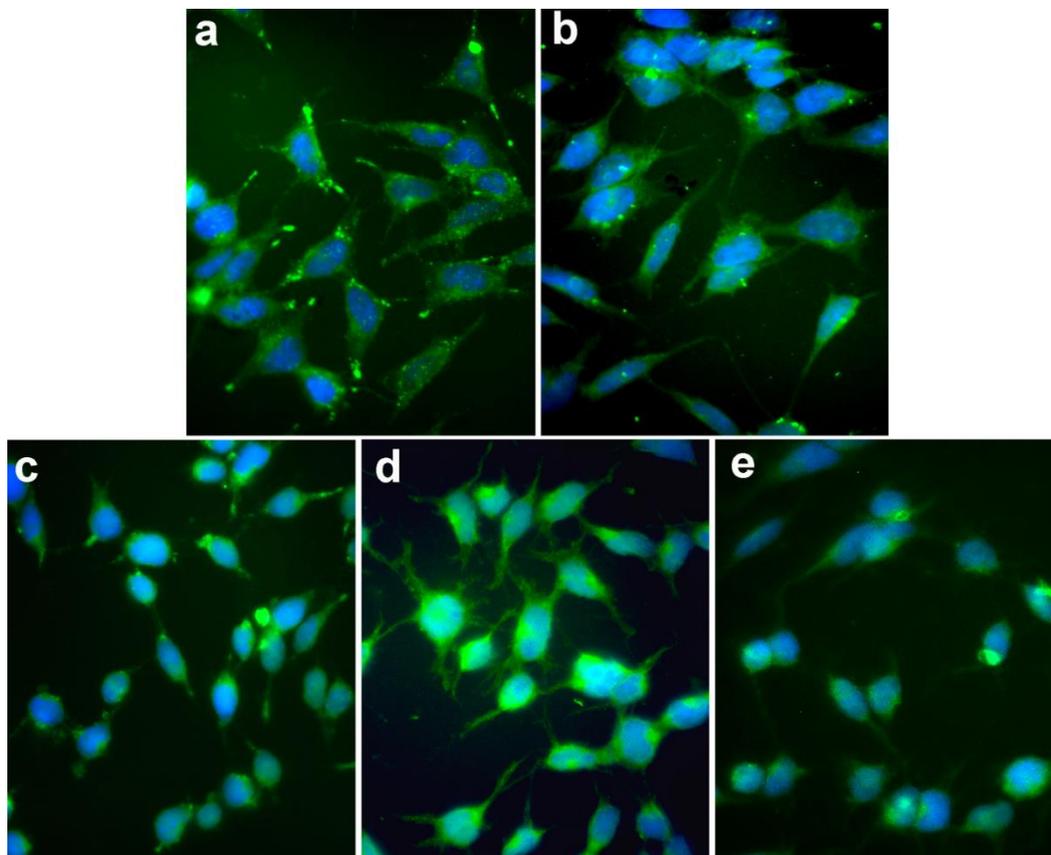


Figura 19. Imágenes de las células sembradas sobre los a) vidrio, b) polilisina, c) PSMA-Gln, d) PSMA-Met y e) PSMA-Tyr después de 48 horas.

Las células presentan una morfología clásica de células neuronales, se observan las diferentes prolongaciones o procesos de estas sobre las superficies. A partir de estas imágenes se determinó la morfometría de estas células determinando la cantidad de procesos de estas células y el largo de estos, los resultados se muestran en la Figura 20:

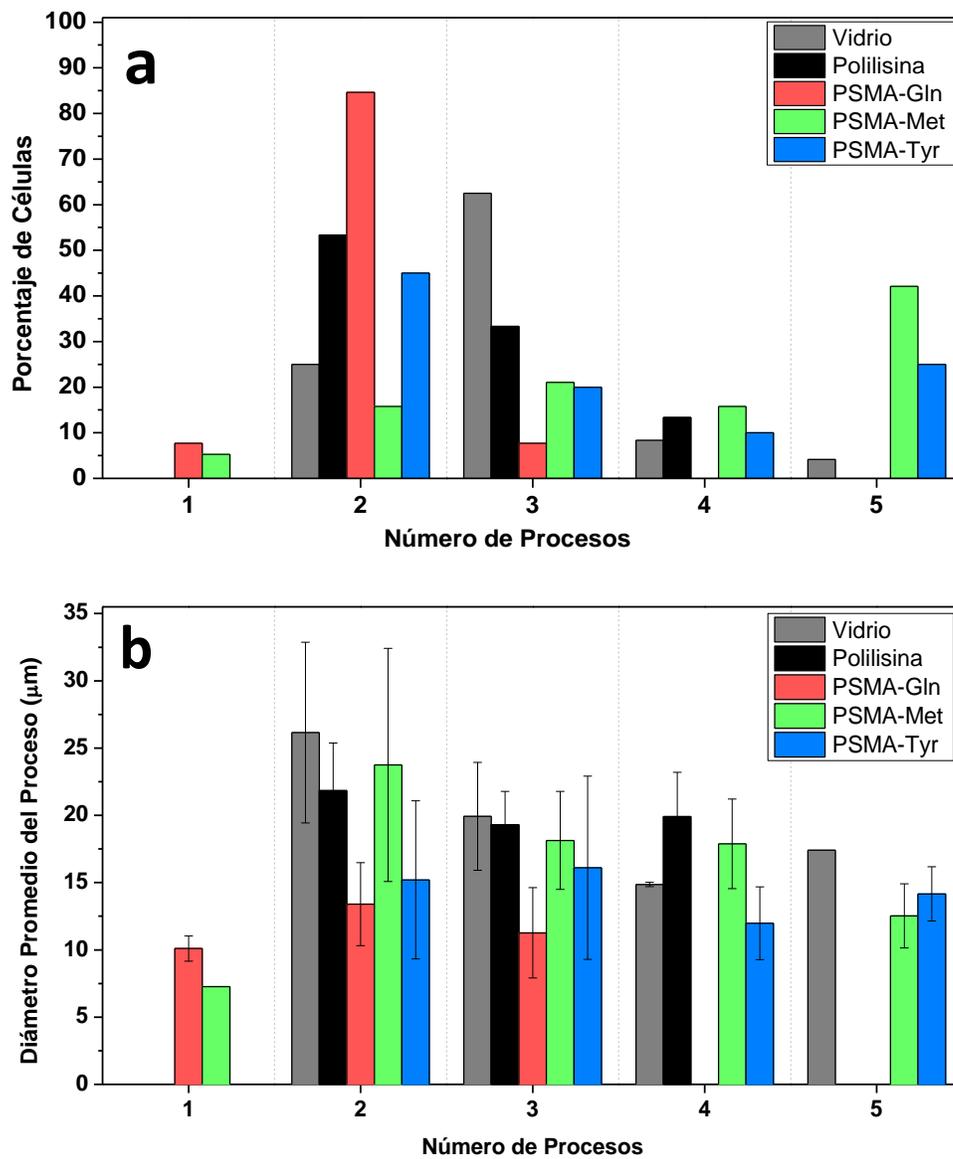


Figura 20. a) Porcentaje de células agrupadas según el número de procesos. b) Diámetro promedio de los procesos de cada célula agrupados según el número de procesos.

Como se determinó anteriormente, la forma de las células SH-SY5Y refleja la sensibilidad de estas células a las características diferenciales del sustrato PMSA. Mientras que las células de control (vidrio y polilisina, respectivamente) presentan consistentemente formas fusiformes (dos procesos) o piramidales (tres procesos) características de SH-SY5Y no diferenciadas. Del mismo modo, estas células también presentan áreas ricas en actina bien definidas que son consistentes con las adherencias focales. Cuando se cultivan sobre películas de PSMA-Met, las células SH-SY5Y presentan una forma estrellada con 5 o más procesos delgados ricos en actina que se extienden 5 μm o más desde el cuerpo celular (Figura 20). Por el contrario, cuando se siembran sobre películas de PSMA-Gln, las células SH-SY5Y presentan una morfología redonda con pocos procesos y más cortos, una forma que sugiere que estas células podrían estar en un mayor estado de proliferación, un efecto que no parece ser significativo cuando se evaluó la proliferación celular (Figura 16). Aunque son atractivos y sugerentes, estos resultados no arrojan luz sobre si los sustratos de PSMA-Gln podrían inhibir la proliferación celular del neuroblastoma o si los sustratos de PSMA-Met podrían inducir la diferenciación celular.

La Figura 20a y 20b muestra que las células cultivadas sobre PSMA-Gln, tienen en su gran mayoría dos procesos y que sus diámetros son los más pequeños, como las cultivadas sobre vidrio control. Las células cultivadas sobre PSMA-Tyr están distribuidas entre 2, 3, 4 y 5 o más procesos, encontrándose cerca de un 50% de células con dos procesos. El diámetro de estos procesos es intermedio entre PSMA-Met y PSMA-Gln. Por su parte, las células cultivadas sobre PSMA-Met están distribuidas en todos los números de procesos, con una mayoría en 5 o más procesos. Respecto al largo de estos procesos, se

puede ver que los procesos más largos corresponden a los de las células con 2 procesos y que en general son mayores que los de las células cultivadas sobre las películas de los otros polielectrolitos.

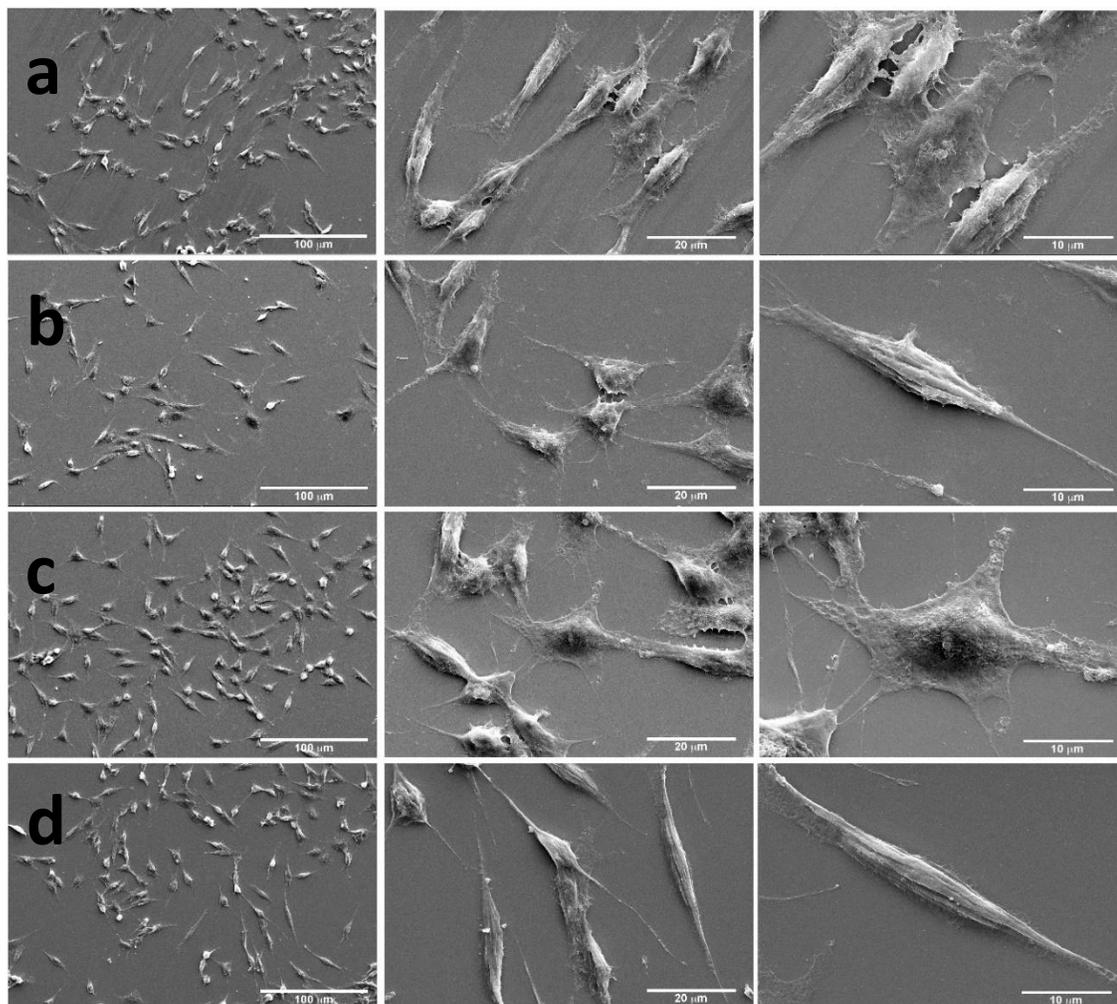


Figura 21. Imágenes SEM del cultivo celular de SH-SY5Y luego de 24 horas sobre las superficies de a) PMSA, b) PMSA-Gln, c) PMSA-Met y d) PMSA-Tyr con magnificaciones de 2000X, 6000X y 15000X.

La Figura 21 muestra la morfología de las células SH-SY5Y cultivadas sobre la superficie de PMSA, PMSA-Gln, PMSA-Met and PMSA-Tyr. Las células cultivadas sobre PSMA-Met muestran una morfología bien extendida caracterizada por un área celular mucho mayor en relación con PSMA-Gln y PSMA-Tyr. Las células en la superficie de PSMA no modificado y PSMA-Tyr muestran una morfología tipo-huso caracterizada por un área celular baja y una alta razón de aspecto. La morfología bien extendida que predomina sobre la superficie de PSMA-Met es asociada a su moderada humectabilidad y topografía. Aun cuando el índice hidropático de PSMA-Met es el más positivo (hidrofóbico), la orientación y conformación de PSMA-Met permite obtener una superficie de moderada humectabilidad asociado a la heterogeneidad de los dominios hidrofílicos debido a sus grupos polares ($-\text{COOH}$ y $-\text{NH}_2$) y sus grupos apolares (fenil, $-\text{S}-$) presente tanto en su cadena principal como lateral. La moderada humectabilidad de la superficie y la carga positiva de los grupos funcionales son los principales factores que promueve que incrementa la cantidad de células adheridas.

3.2 CAPITULO II: POLIELECTROLITOS DERIVADOS DE PEMA

3.2.1 Caracterización de PEMA y PEMA-Aa.

Para determinar el PM del copolímero PEMA, se realizaron varios ensayos con distintos parámetros (Anexo, Tabla 4), se encontró que el PM más cercano al reportado por el fabricante se obtiene cuando se utiliza PEMA sin neutraliza, agua como disolvente y la concentración de la muestra es 2 mg/mL. Bajo estas condiciones, se obtuvo un PM de 376 kDa, de esta misma curva se calculó la polidispersidad, obteniendo un valor de 2.1

La caracterización de los polielectrolitos obtenidos PEMA-Asp, PEMA-Arg, PEMA-Cys, PEMA-Leu, PEMA-Met, y PSMA-Tyr (Figura 22) se llevó a cabo mediante FT-IR, RMN-¹³C y RMN-¹H, estas técnicas se utilizaron de forma complementaria ya que por la compleja estructura de los polielectrolitos y el alto peso molecular que estos tienen, algunas bandas y señales características pueden superponerse.

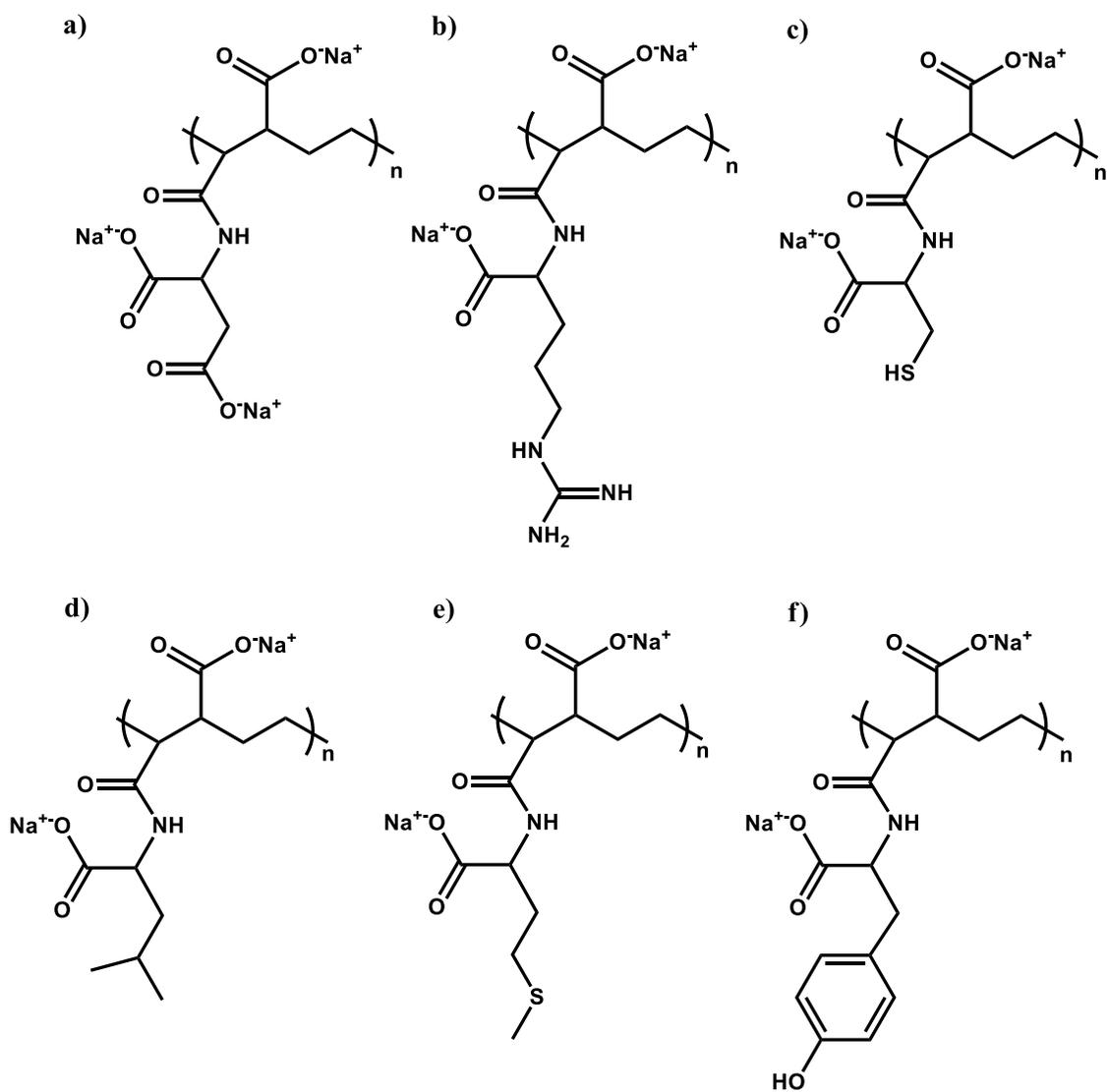


Figura 22. Estructuras de los polielectrolitos: a) PEMA-Asp b) PEMA-Arg, c) PEMA-Cys, d) PEMA-Leu, PEMA-Met y PEMA-Tyr.

La Figura 23, muestra el espectro FT-IR obtenido para el PEMA, se observaron las bandas características de este polímero reportadas previamente en la literatura.^{45,98} En 1854 y 1771 cm^{-1} aparecen las bandas correspondientes al estiramiento asimétrico y simétrico, respectivamente, de los grupos carbonilo de la unidad monomérica de AM, las bandas que aparecen en 1224, 960 y 921 cm^{-1} son características del estiramiento de los enlaces C—O—C del AM. En 2937 y 2874 cm^{-1} aparecen las bandas características del estiramiento de CH y CH_2 , y en 1457 y 1097 cm^{-1} las bandas correspondientes a deformaciones de CH_2 de la cadena principal del PEMA.

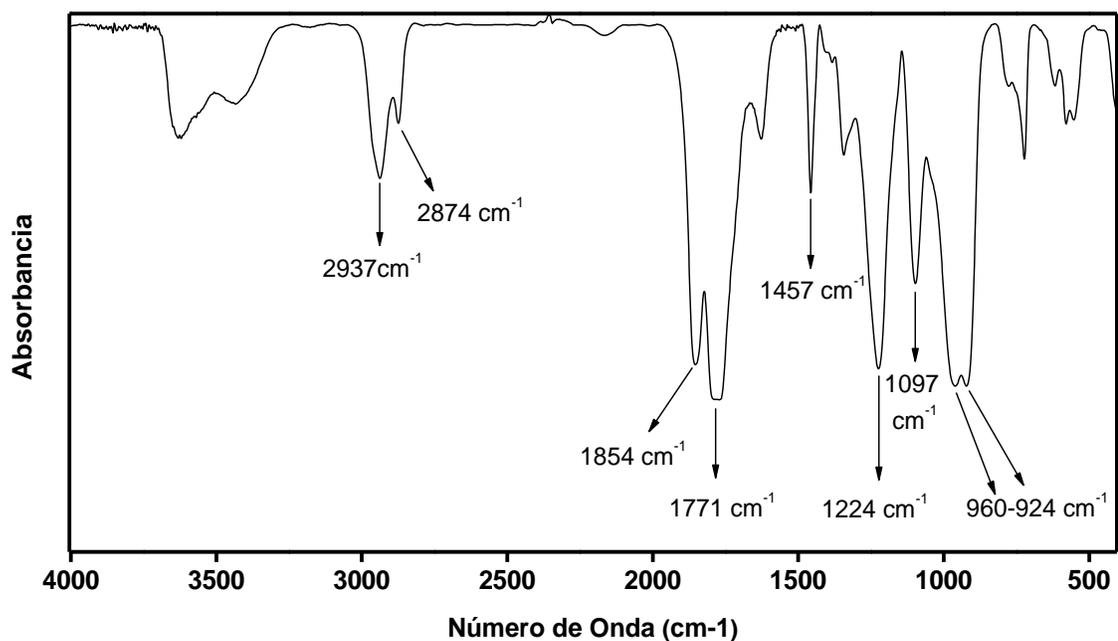


Figura 23. Espectro FT-IR obtenido para el PEMA.

En la Figura 24 se muestra el espectro FT-IR del polielectrolito PEMA-Asp. Se observó la desaparición de las bandas en 1854 y 1771 cm^{-1} de los grupos carbonilos del PEMA y la aparición de dos bandas fuertes en 1604 y 1598 cm^{-1} (estiramiento asimétrico) y bandas de mediana intensidad entre 1350 y 1450 cm^{-1} (estiramiento simétrico) de los grupos carbonilos de sales de ácido carboxílico de los polielectrolitos. También apareció una banda intensa en 1694 cm^{-1} (estiramiento C=O) y una banda ancha e intensa entre 3200 y 3500 cm^{-1} (estiramiento N-H) que corresponden al grupo amida que se forma cuando tiene lugar la modificación del PEMA con aminoácidos.

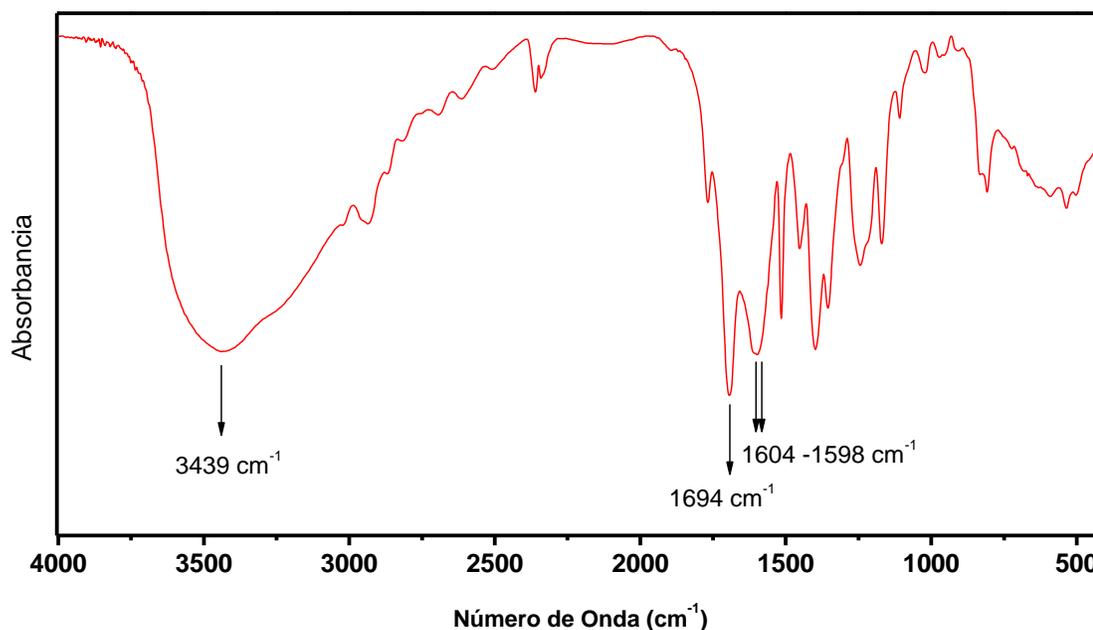


Figura 24. Espectro FT-IR obtenido para el polielectrolito PEMA-Asp.

En los espectros FT-IR obtenidos para PEMA-Arg, PEMA-Cys, PEMA-Leu, PEMA-Met y PEMA-Tyr (Anexo, Figuras 10-14), se encontró similar comportamiento, en todos ellos se observó la desaparición de las bandas de los grupos carbonilos del PEMA y en su lugar aparecieron bandas correspondientes a grupos carbonilos de sales de ácido carboxílico y las bandas correspondientes al grupo amida. En la Tabla 15 se muestran las bandas de absorción asociadas a los principales grupos funcionales de los distintos polielectrolitos y del PEMA:

Tabla 15. Bandas de absorción asociadas a los principales grupos funcionales de los polielectrolitos.

Polímero/ Polielectrolito	Bandas de absorción FT-IR (cm ⁻¹)			
	C=O ₁ (st)	C=O ₂ (st)	C=O ₃ (st)	N-H (st)
PEMA	1854	1771	–	–
PEMA-Asp	1694	1598	1604	3439
PEMA-Arg	1693	1590	–	3368
PEMA-Cys	1690	1600	–	3435
PEMA-Leu	1696	1601	–	3444
PEMA-Met	1696	1605	–	3434
PEMA-Tyr	1694	1598	–	3442

En las Figuras 25a y 25b se muestran los espectros RMN- ^1H obtenidos para PEMA y P-Asp en D_2O respectivamente, las señales se asignaron mediante letras a las estructuras correspondientes:

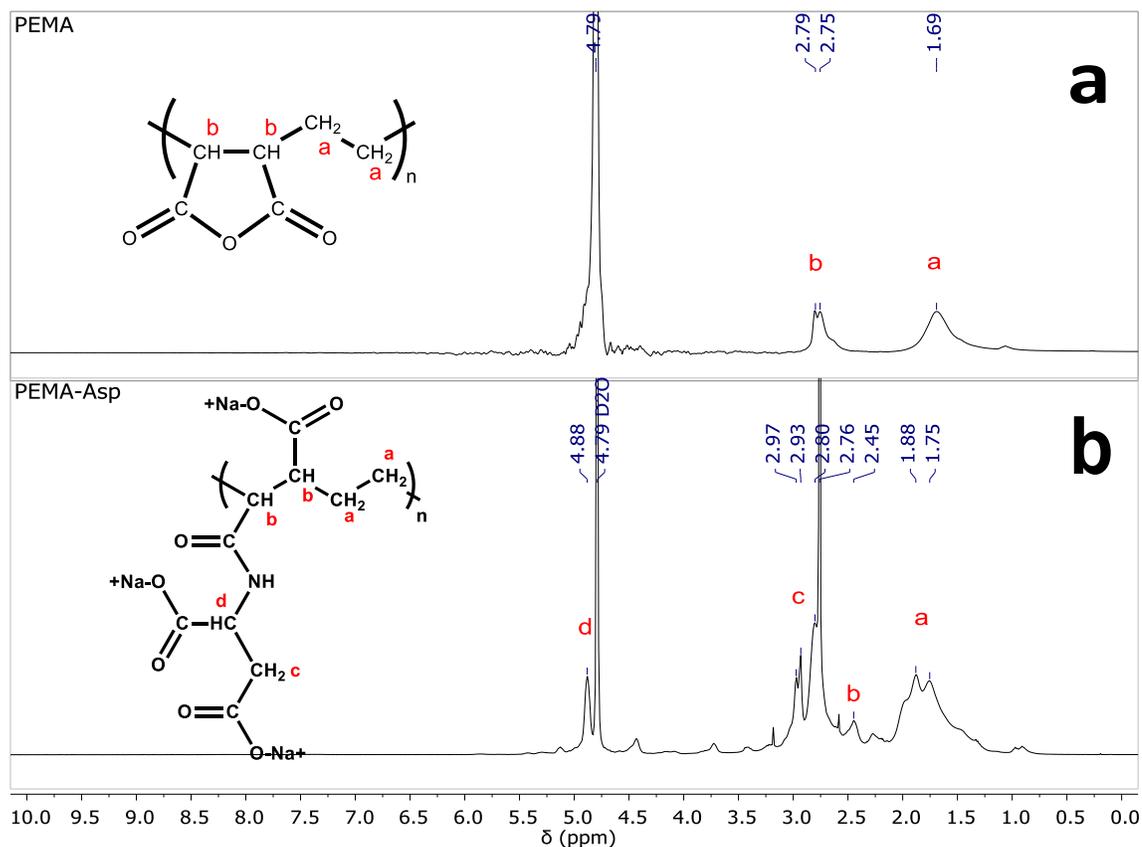


Figura 25. Espectros RMN- ^1H obtenidos para a) PEMA y b) PEMA-Asp.

En el espectro RMN- ^1H obtenido para el PEMA aparecieron señales en 2.79 y 1.69 ppm que son características para hidrógenos de los grupos CH y CH₂ respectivamente, presentes en la cadena principal del PEMA. En el espectro RMN- ^1H de PEMA-Asp, entre 1.75 y 2.97 ppm aparecen las señales correspondientes a los hidrógenos de los grupos CH y CH₂ tanto de la cadena principal como de la cadena lateral. En 4.88 ppm aparece la señal del hidrógeno del CH de la cadena lateral, que está unido al NH y un carboxilato.

La señal que corresponde al hidrógeno del grupo amida del PEMA-Asp no se observó claramente, debido a que puede estar interactuando por puente de hidrogeno con los grupos carbonilos presentes en la cadena principal y lateral del PEMA-Asp.

Los espectros RMN-¹H obtenidos para PEMA-Arg, PEMA-Cys, PEMA-Leu, PEMA-Met y PEMA-Tyr comparados con PEMA (Anexo, Figuras 15-19) tienen señales similares a las descritas para PSMA-Asp, pero se diferencian en las señales que corresponden a sus diferentes cadenas laterales.

Las Figura 26a y 26b muestran los espectros RMN- ^{13}C obtenidos en D_2O para PEMA y PEMA-Asp respectivamente, las señales fueron asignadas mediante letras a su correspondiente estructura:

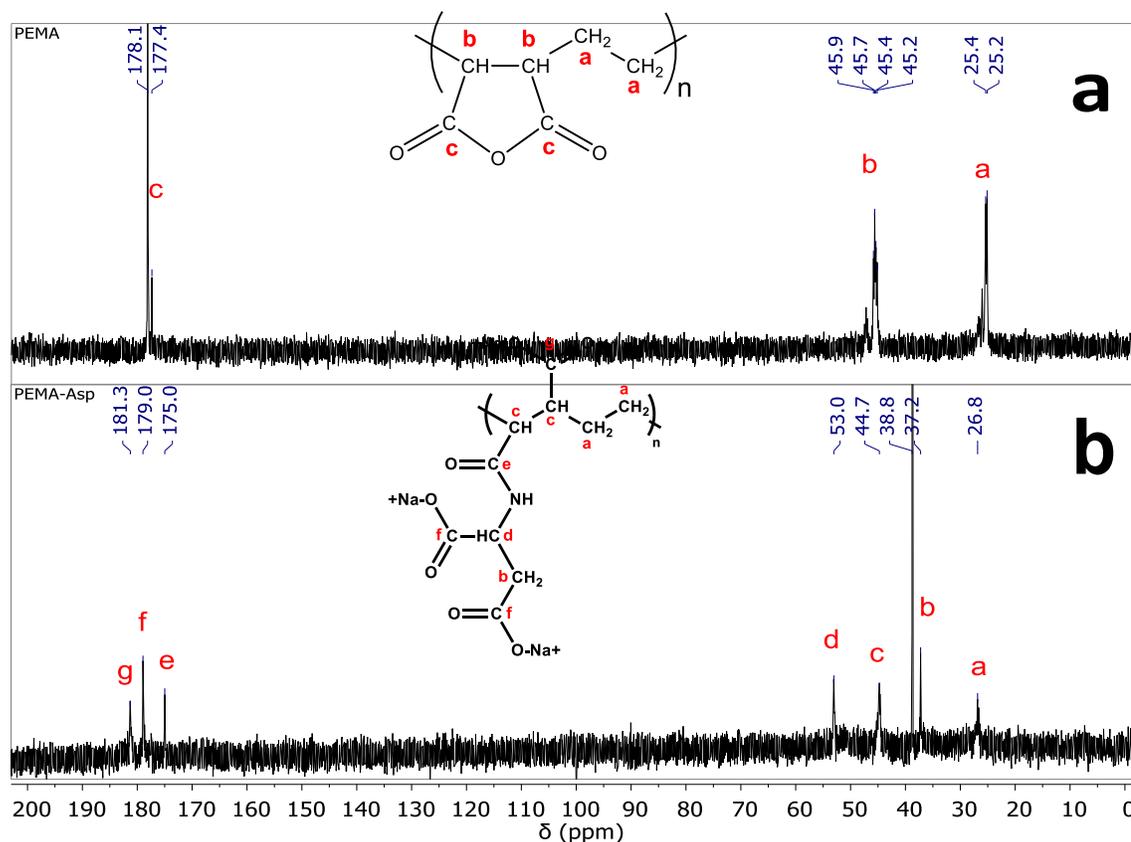


Figura 26. Espectros RMN- ^{13}C obtenidos para a) PEMA y b) PEMA-Asp

En el espectro RMN- ^{13}C obtenido para el PEMA, en 25.4 y 45.7 ppm se encuentran las señales de los átomos de carbono de los CH y CH₂ de la cadena principal del PEMA. En 178.1 y 177.4 ppm se encuentran las señales características de los átomos de carbono de los dos grupos carbonilo del PEMA. En el espectro RMN- ^{13}C obtenido para PEMA-Asp, entre 26.8 y 53 aparecen las señales de los átomos de carbono de los CH y CH₂ de la

cadena principal y de la cadena lateral. Las señales en 181.3, 179 y 175 ppm corresponden a los átomos de carbono de los grupos carbonilo presentes en el PSMA-Asp.

Los espectros RMN- ^{13}C obtenidos para PEMA-Arg, PEMA-Cys, PEMA-Leu, PEMA-Met y PEMA-Tyr comparados con PEMA (Anexo, Figuras 20-24) tienen señales similares a las descritas para PSMA-Asp, pero se diferencian en las señales que corresponden a los grupos de las cadenas laterales del PEMA-Arg, PEMA-Cys, PEMA-Leu, PEMA-Met y PEMA-Tyr.

3.2.2 Determinación de los pK_{ap} de los Polielectrolitos

La Figura 27a y 27b muestra las curvas de titulación potenciométrica de los polielectrolitos PEMA-Arg y PEMA-Asp respectivamente:

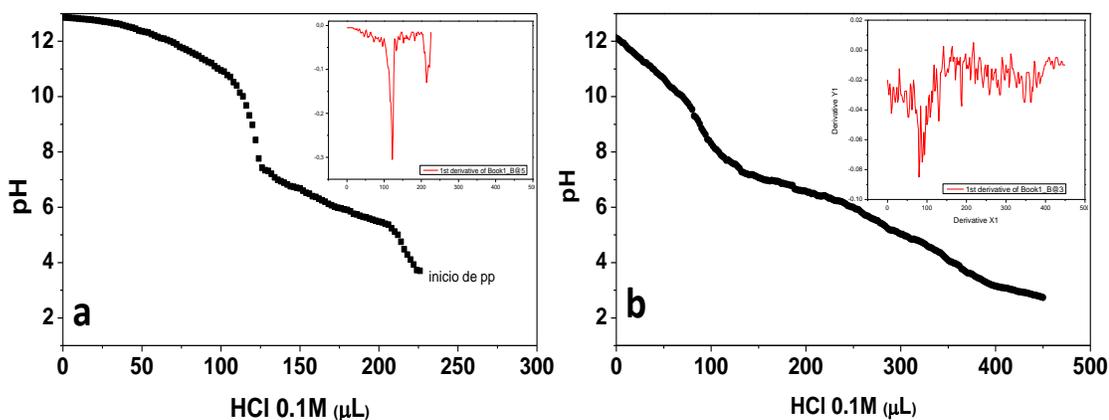


Figura 27. Curva de titulación potenciométrica de a) PEMA-Arg y b) PEMA-Asp con HCl 0.1 M.

La curva de titulación del polielectrolito PEMA-Arg (Figura 27a), teóricamente debería mostrar 3 puntos de inflexión asociados a 3 valores de pK_{ap} distintos, sin embargo, al

avanzar la titulación, la disolución polimérica se vuelve opalescente y a un valor de pH inferior a 4.0, comienza a precipitar. Por su parte la curva de titulación del polielectrolito PEMA-Asp (Figura 27b) también debería mostrar 3 puntos de inflexión asociados a los 3 pK_{ap} del polielectrolito, sin embargo, en la curva sólo se pueden ver dos puntos de inflexión a lo largo de la titulación, esto se debe principalmente al aumento progresivo de la densidad de carga en el polielectrolito a medida que se remueve el primer y el segundo protón, haciéndose más difícil la remoción del tercero.

Los valores de los pK_{ap} de los polielectrolitos y del poli(ácido maleico-*alt*-etileno), PEMAc, fueron determinados a partir de las curvas de titulación potenciométrica (Anexo, Figuras 25-28), mediante el método de la primera derivada o del método del paralelogramo, estos valores de muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Valores de pK_{ap} determinados experimentalmente para los distintos polielectrolitos.

Polielectrolito	pK_{ap1}	pK_{ap2}
PEMAc	4.66	7.85
PEMA-Arg	4.75	8.43
PEMA-Asp	3.96	9.34
PEMA-Cys	3.97	8.71
PEMA-Leu	3.90	7.96
PEMA-Met	4.11	9.00
PEMA-Tyr	3.81	8.47

Se determinó que los valores de los pK_{ap1} se encuentran en un rango aproximado de 4-5, mientras que los valores de pK_{ap2} están en un rango aproximado de 8-9, estos valores son distintos a los pK_{ap} del PEMAc, hecho experimental que contribuye a confirmar la modificación del PEMA con los distintos aminoácidos.

La diferencia entre ambos pK_{ap} de los dos grupos carboxilo del PEMAc, puede deberse a que después de la desprotonación del primer grupo ácido, el aumento en la densidad de carga inhibe la remoción del segundo protón carboxílico, aumentado el pH al que ocurre esta desprotonación. Esta diferencia aumenta para los polielectrolitos, debido principalmente a que el segundo grupo carboxilato se encuentra estructuralmente en la cadena lateral del polielectrolito presentando un mayor impedimento estérico para la remoción protónica.

3.2.3 Determinación del Porcentaje de Modificación de los Polielectrolitos

Los resultados de análisis elemental revelaron el porcentaje de masa de nitrógeno contenido en cada uno de los polielectrolitos. En la Tabla 17 se muestra la masa molar de una unidad repetitiva (Ur) de cada polielectrolito, el porcentaje de nitrógeno obtenido mediante AE y el porcentaje de modificación calculado para cada uno de los PEMA-Aa

Tabla 17. Masa molar de la unidad repetitiva de PEMA (U_{r0}) y los PEMA-Aa (U_{r100}), porcentaje de nitrógeno determinado por AE y porcentaje de modificación.

Unidad Repetitiva	Fórmula Molecular	U_{r0} o U_{r100} (g/mol)	Nitrógeno Contenido (%)	Porcentaje de Modificación (%)
PEMA	$C_6H_6O_3$	126.110	0	0
PEMA-Arg	$C_{11}H_{18}O_5N_4Na_2$	332.264	15.2	93
PEMA-Asp	$C_{10}H_{10}O_7NNa_3$	325.158	3.59	83
PEMA-Cys	$C_9H_{11}O_5NSNa_2$	291.231	6.00	81
PEMA-Leu	$C_{12}H_{17}O_5NNa_2$	301.246	3.98	85
PEMA-Met	$C_{11}H_{15}O_5NSNa_2$	319.285	3.95	90
PEMA-Tyr	$C_{15}H_{15}O_6NNa_2$	351.262	3.32	83

Los valores de los porcentajes de modificación de PEMA con cada uno de los aminoácidos se encuentran en un rango de 81-93%. Este alto porcentaje de modificación se atribuye a que estructuralmente el PEMA, no tiene grupos voluminosos que puedan ejercer impedimento estérico durante la reacción de modificación con cada aminoácido.

3.2.4 Estudio de Solubilidad de los Polielectrolitos

Un aspecto importante para la fabricación de las nanofibras es el disolvente que se utiliza para preparar soluciones de los polielectrolitos y sus mezclas respectivas. La preparación de las mezclas requiere un disolvente común para ambos componentes de esta, en la Tabla 14 se muestra la solubilidad del PEMA, POE y de los polielectrolitos en disolventes con distintas constantes dieléctricas.

Tabla 18. Solubilidad de PEMA, POE y de los polielectrolitos en disolventes con distinta constante dieléctrica a 25°C, (+) soluble, (-) insoluble.

Disolvente	e*	PEMA	POE	PEMA-Arg	PEMA-Asp	PEMA-Cys	PEMA-Leu	PEMA-Met	PEMA-Tyr
agua	80.0	+**	+	+	+	+	+	+	+
dimetilsulfóxido	46.7	+	-	-	-	-	+**	+	-
dimetilformamida	38.3	+	-	-	-	-	+**	-	-
acetonitrilo	37.5	-	-	-	-	-	-	-	-
metanol	33.0	-	-	-	-	-	+	+	+
etanol	24.0	-	-	-	-	-	-	-	-
acetona	21.0	+	-	-	-	-	-	-	-
propanol	20.0	-	-	-	-	-	-	-	-
butanol	18.0	-	-	-	-	-	-	-	-
diclorometano	9.10	-	+	-	-	-	-	-	-
tetrahidrofurano	7.50	-	-	-	-	-	-	-	-
acetato de etilo	6.02	-	-	-	-	-	-	-	-
cloroformo	4.81	-	+	-	-	-	-	-	-
benceno	2.27	-	-	-	-	-	-	-	-
dioxano	2.25	-	-	-	-	-	-	-	-
tetracloruro de carbono	2.25	-	-	-	-	-	-	-	-

*constante dieléctrica.

**Soluble a una temperatura de 50°C.

El POE se solubilizó en distintos disolventes, sin embargo, los polielectrolitos sólo se solubilizaron en agua, que es el disolvente que presenta la mayor constante dieléctrica y por lo tanto una mayor polaridad. Debido a esto las mezclas se harán a partir de disoluciones acuosas de POE y de cada uno de los polielectrolitos.

3.3 CARACTERIZACIÓN DE MEZCLAS PEMA-Aa/POE

Las mezclas fueron preparadas a partir de disoluciones acuosas de los polielectrolitos PEMA-Arg, PEMA-Asp, PEMA-Leu, PEMA-Met y PEMA-Tyr a distintas concentraciones, mezcladas con una disolución acuosa de POE a una concentración de 10% p/v.

La preparación de PEMA-Cys a 20 y 15% p/v presentó un aumento de su volumen (hinchamiento) en ausencia de un efecto de solubilización (Figura 28e y 28d). Debido a esto, se prepararon soluciones a 10%, 8% y 5% p/v obteniendo disoluciones poco traslúcidas y de apariencia lechosa, sin embargo, luego de 1 h se observó la presencia de un sólido marrón en el vial (Figuras 28a, 28b y 28c respectivamente). Por los que no obtuvieron mezclas apropiadas para la obtención de fibras a partir del polielectrolito PEMA-Cys.

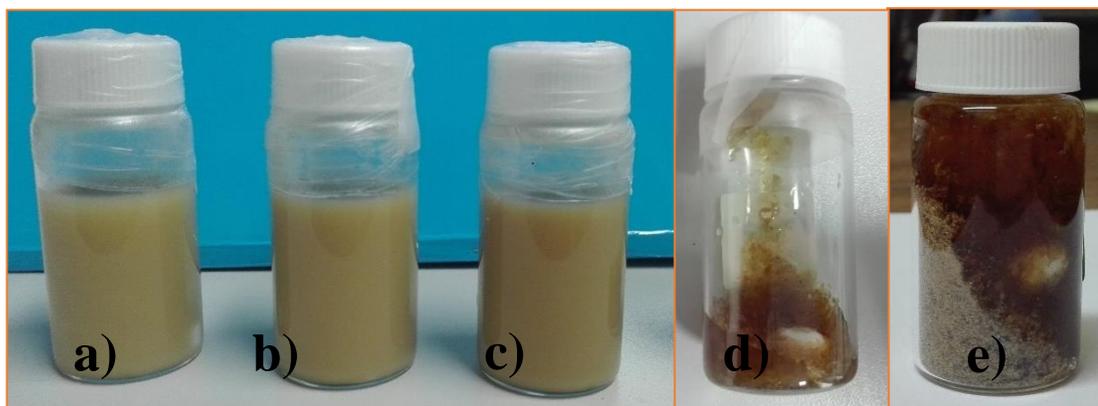


Figura 28. Disoluciones del polielectrolito PEMA-Cys a distintas concentraciones: a) 5% p/v, b) 8% p/v, c) 10% p/v, d) 15% p/v polielectrolito hinchado y e) 20% p/v polielectrolito hinchado.

3.3.1 Determinación de Conductividad y Tensión Superficial de las Mezclas

La conductividad del agua desionizada utilizada fue de $5 \mu\text{S}/\text{cm}$, mientras que la tensión superficial medida fue de $71.2 \text{ mN}/\text{m}$. Para la disolución acuosa de PEO 10% p/v la conductividad fue de $207 \mu\text{S}/\text{cm}$ y la tensión superficial fue $63.3 \text{ mN}/\text{m}$. Los valores de conductividad y tensión superficial obtenidos para las mezclas se muestran en las Tablas 19-23.

Tabla 19. Valores de conductividad y tensión superficial para mezclas de PEMA-Asp/POE.

Concentración PEMA-Asp (p/v)	Proporción PEMA-Asp/POE	Conductividad σ (mS/cm)	Tensión Superficial γ (mN/m)
10%	1:0	18.3	56.7
	1:1	5.7	56.4
	1:2	4.0	60.0
	1:3	3.2	62.4
15%	1:0	22.5	60.3
	1:1	9.5	48.3
	1:2	8.4	56.3
	1:3	3.6	57.4
20%	1:0	25.8	42.6
	1:1	11.6	56.7
	1:2	6.10	58.7
	1:3	3.56	60.3

Tabla 20. Valores de conductividad y tensión superficial para mezclas de PEMA-Met/POE.

Concentración PEMA-Met (p/v)	Proporción PEMA-Met/POE	Conductividad σ (mS/cm)	Tensión Superficial γ (mN/m)
10%	1:0	12.79	45.2
	1:1	4.80	51.7
	1:2	3.16	54.2
	1:3	2.28	54.7
15%	1:0	15.25	41.6
	1:1	7.01	47.7
	1:2	4.41	51.6
	1:3	3.02	53.0
20%	1:0	18.23	30.6
	1:1	8.05	47.8
	1:2	5.18	52.3
	1:3	4.05	53.8

Tabla 21. Valores de conductividad y tensión superficial para mezclas de PEMA-Tyr/POE.

Concentración PEMA-Tyr (p/v)	Proporción PEMA-Tyr/POE	Conductividad σ (mS/cm)	Tensión Superficial γ (mN/m)
10%	1:0	11.9	57.0
	1:1	3.9	57.1
	1:2	2.4	56.7
	1:3	2.1	60.5
15%	1:0	15.0	54.2
	1:1	6.3	55.7
	1:2	3.8	57.9
	1:3	2.9	60.2
20%	1:0	18.6	45.5
	1:1	8.3	57.9
	1:2	5.5	59.6
	1:3	3.9	61.9

Tabla 22. Valores de conductividad y tensión superficial para mezclas de PEMA-Arg/POE.

Concentración PEMA-Arg (p/v)	Proporción PEMA-Arg/POE	Conductividad σ (mS/cm)	Tensión Superficial γ (mN/m)
20%	1:0	7.89	41.4
	1:1	3.77	44.5
	1:2	2.38	49.4
	1:3	1.81	53.6

Tabla 23. Valores de conductividad y tensión superficial para mezclas de PEMA-Leu/POE.

Concentración PEMA-Leu (p/v)	Proporción PEMA-Leu/POE	Conductividad σ (mS/cm)	Tensión Superficial γ (mN/m)
20%	1:0	14.7	36.2
	1:1	6.90	42.1
	1:2	4.56	45.8
	1:3	3.88	51.4

Los valores de conductividad para las distintas disoluciones acuosas de los polielectrolitos puros mostraron que a concentración 20% p/v, el valor de conductividad más alta fue alcanzado por el polielectrolito PEMA-Asp (25.8 mS/cm), esto se debe a que es el único polielectrolito que presenta 3 grupos carboxilatos y por lo tanto libera una mayor cantidad de iones a la disolución. Por otro lado, el valor menor de conductividad lo presentó el polielectrolito PEMA-Arg (7.89 mS/cm), esto se debe a que este polielectrolito contiene en su cadena lateral un grupo guanidino que presenta una carga positiva que podría interactuar electrostáticamente con uno de los grupos carboxilatos cargados negativamente de la cadena principal, disminuyendo así la conductividad de la disolución.

Además, se observó que a medida que se aumentó la concentración del polielectrolito aumentó el valor de conductividad de la disolución. Esto se debe a que la conductividad depende de los grupos ionizables presentes en cada uno de los polielectrolitos, y por lo tanto al aumentar la cantidad de polielectrolito en la disolución, el valor de conductividad será mayor. Con respecto a la conductividad de las mezclas PEMA-Aa/POE, se observó que, al aumentar la proporción de POE en la mezcla, disminuyó el valor de la

conductividad. Esto se debe en primer lugar a que la conductividad de la disolución acuosa POE es muy baja ($207 \mu\text{S}$) y en segundo lugar a la existencia de interacciones entre los grupos ionizables de cada uno de los polielectrolitos con el POE.

La tensión superficial depende principalmente de la naturaleza química del disolvente, del polímero y de la temperatura. En general, distintos disolventes pueden contribuir a diferentes valores de tensión superficial. Además, la tensión superficial disminuye con la temperatura, esto se debe a que, si hay una mayor agitación térmica, disminuyen las fuerzas de cohesión. En el proceso de electrohilado, la tensión superficial influye directamente sobre la morfología de las nanofibras, se ha reportado que valores de tensión superficial muy altos inhiben la obtención de fibras y que a medida que disminuye el valor de la tensión superficial, se obtienen fibras sin defectos morfológicos como perlas y gotas.

Los valores de tensión superficial para los distintos polielectrolitos puros a concentraciones 10%, 15% y 20% p/v son menores que los valores de tensión superficial del POE 10% p/v debido principalmente a la formación de puentes de hidrógeno entre los átomos de oxígeno de los grupos carboxilato de los polielectrolitos con el agua.

También se observó que a medida que se aumentó la concentración de los polielectrolitos, disminuyó el valor de la tensión superficial. Cuando los componentes puros se mezclan con POE, en general existe un aumento de los valores tensión superficial a medida que aumenta la proporción de POE en la mezcla. Las mezclas PEMA-Tyr/POE en distintas proporciones presentan una mayor tensión superficial respecto a las demás mezclas PEMA-Aa/POE, y las nanofibras obtenidas a partir de estas mezclas, son las que presentan un mayor valor de diámetro promedio.

3.3.2 Determinación Humectabilidad y Energía Superficial de Películas Fabricadas a Partir de Mezclas de PEMA-Aa/POE.

En la Tabla 24 se muestran los valores de ángulo de contacto medidos para agua y diyodometano sobre las películas obtenidas a partir de cada una de las mezclas de polielectrolitos 20% p/v con POE 10% p/v en distintas proporciones y la energía superficial calculada a partir de ellos con sus componentes polar y dispersiva.

Los valores de ángulo de contacto del agua sobre la superficie de las distintas películas de los polielectrolitos puros se encuentran en un rango de 16-51°, estos valores revelan que las superficies son más bien hidrofílicas. Además, estos ángulos de contacto están inversamente relacionados con el índice de hidropatía de los aminoácidos utilizados para la modificación. Los polielectrolitos PEMA-Arg, PEMA-Asp y PEMA-Tyr presentaron valores de ángulo de contacto más altos, es decir, sus superficies son más hidrofóbicas mientras que los aminoácidos correspondientes tienen índices de hidropaticidad negativos, es decir son más hidrofílicos. Por otro lado, los polielectrolitos PEMA-Leu y PEMA-Met tienen ángulos de contacto más pequeños, es decir, son más hidrofílicos, mientras que sus aminoácidos correspondientes son más bien hidrofóbicos. Esta relación se explica por el comportamiento de los polielectrolitos en disolución previo a ser depositados sobre la superficie. Los polielectrolitos PEMA-Met y PEA-Leu tienen cadenas laterales hidrofóbicas, estas cadenas no favorecen interacciones inter ni intramoleculares, lo que produce que haya una mayor cantidad de cadenas libres de polielectrolitos que tienen gran repulsión electrostática entre ella, debido a los grupos COO⁻ cargados. Cuando estos polielectrolitos son depositados sobre la superficie quedan

con una mayor cantidad de grupos hidrofílicos hacia el exterior, provocando entonces que el ángulo de contacto sea menor.

Tabla 24. Ángulos de contacto y energía superficial con su componente polar y dispersiva para películas obtenidas a partir de mezclas PEMA-Aa/POE.

Mezclas	PEMA-Aa/POE	θ_{agua} (°)	θ_{dym} (°)	γ^D (mJ/m ²)	γ^P (mJ/m ²)	γ^{Total} (mJ/m ²)
	1:0	30 ± 2	58 ± 2	31.6 ± 0.9	36.2 ± 1.5	67.8 ± 0.6
PEMA-Asp/POE	1:1	43 ± 2	47 ± 1	36.1 ± 0.1	25.9 ± 0.6	62.0 ± 0.4
	1:2	44 ± 1	55 ± 5	32.8 ± 2.0	28.5 ± 0.5	61.3 ± 2.0
	1:3	49 ± 0	41 ± 0	39.3 ± 0.1	19.0 ± 0.1	58.3 ± 0.2
	1:0	51 ± 3	49 ± 1	34.6 ± 0.9	19.7 ± 1.4	54.3 ± 2.3
PEMA-Arg/POE	1:1	61 ± 2	48 ± 3	35.6 ± 2.1	13.3 ± 0.9	48.9 ± 2.0
	1:2	67 ± 3	41 ± 1	39.0 ± 0.6	9.1 ± 1.2	48.0 ± 2.0
	1:3	71 ± 1	42 ± 1	38.5 ± 0.4	7.2 ± 0.1	45.6 ± 0.4
	1:0	25 ± 5	52 ± 1	33.2 ± 1.0	35.3 ± 3.0	68.4 ± 2.1
PEMA-Leu/POE	1:1	32 ± 3	33 ± 3	42.7 ± 1.5	26.6 ± 2.1	69.3 ± 0.6
	1:2	57 ± 3	54 ± 2	32.2 ± 1.0	17.0 ± 1.6	49.2 ± 1.4
	1:3	62 ± 3	49 ± 2	34.9 ± 1.2	13.2 ± 2.1	48.1 ± 0.9
	1:0	16 ± 1	42 ± 1	38.4 ± 0.3	35.5 ± 0.4	73.9 ± 0.3
PEMA-Met/POE	1:1	44 ± 4	29 ± 4	43.7 ± 5.3	20.9 ± 4.4	64.7 ± 0.9
	1:2	46 ± 4	32 ± 6	40.8 ± 4.6	23.3 ± 8.4	64.1 ± 3.7
	1:3	42 ± 4	40 ± 1	39.8 ± 0.5	22.6 ± 2.7	62.4 ± 2.2
	1:0	35 ± 6	51 ± 5	34.5 ± 3.0	30.2 ± 4.2	63.9 ± 3.3
PEMA-Tyr/POE	1:1	65 ± 1	19 ± 1	48.1 ± 0.3	7.5 ± 0.3	55.6 ± 0.0
	1:2	64 ± 3	24 ± 1	46.4 ± 0.5	8.4 ± 1.3	54.7 ± 1.2
	1:3	66 ± 8	36 ± 4	41.5 ± 2.2	8.5 ± 4.4	50.2 ± 4.1

El caso contrario a este comportamiento, se observó para el polielectrolito PEMA-Arg, el aminoácido Arg es el aminoácido más hidrofílico de los 6 utilizados, sin embargo la película obtenida a partir de PEMA-Arg es la que tiene un mayor ángulo de contacto, es decir, es la superficie menos hidrofílica (o más hidrofóbica) esto se explica porque los protones del grupo guanidino de la cadena lateral tiende a formar interacciones de puente de hidrógeno con los átomos de oxígeno de los grupos carbonilos tanto de la cadena lateral, como de la cadena principal. Debido a esto, la película obtenida a partir de este polielectrolito tiene menos grupos funcionales hidrofílicos disponibles hacia la superficie, aumentando el ángulo de contacto.

Este comportamiento se confirma con los valores de la energía superficial de las películas de polielectrolitos puros. Los valores más grandes son para los polielectrolitos PEMA-Met y PEMA-Leu, los que tienen una componente polar muy grande, casi de la misma magnitud que sus componentes dispersivas. En el caso contrario, la película obtenida a partir del PEMA-Arg tiene el menor valor de energía superficial y también el valor más pequeño de su parte polar.

La energía superficial de las películas de polielectrolitos puros es mayor que la energía superficial de sus correspondientes mezclas y, a medida que la proporción de POE en las mezclas va aumentando, la energía superficial va disminuyendo.

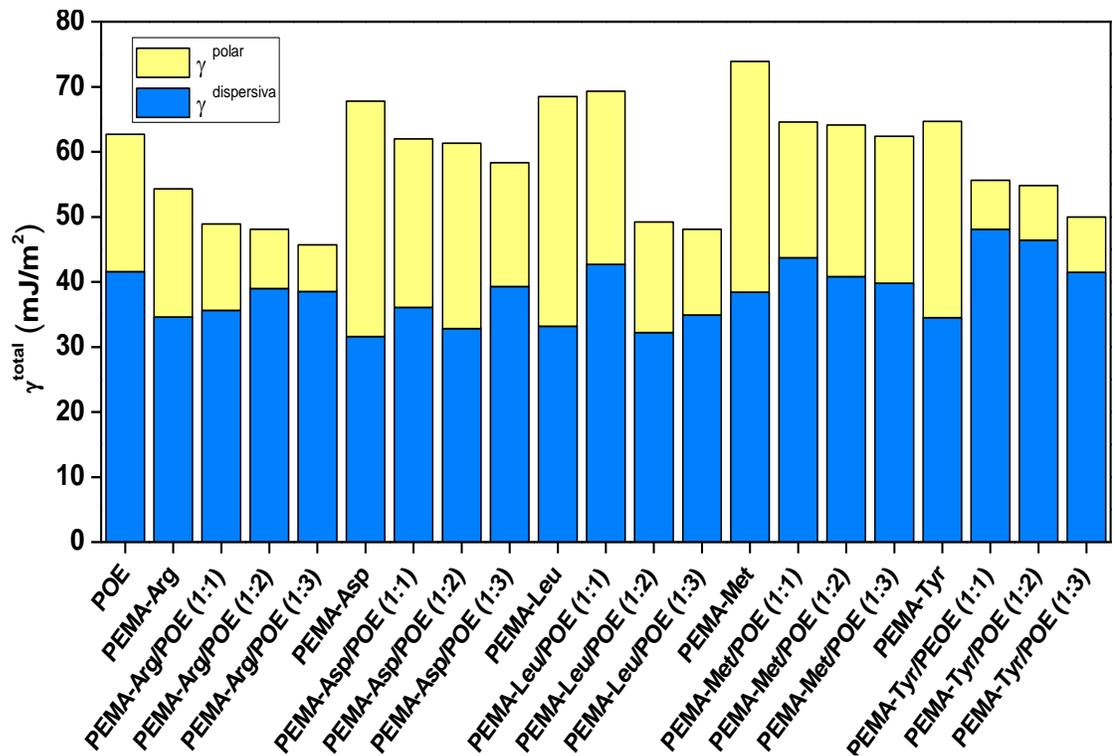


Figura 29. Energía superficial (γ^{Total}), con sus componentes polar (γ^p) y dispersiva (γ^d), de las películas obtenidas a partir de mezclas de PEMA-Aa/POE.

En la Figura 29, se observa que la componente polar de la energía superficial (γ^p) es la que más disminuye, lo que significa que la superficie tiene una menor contribución de interacciones polares como puentes de hidrógeno o dipolo-dipolo, debido a que existen menos grupos polares disponibles en la superficie. Este fenómeno indica que existe una interacción entre los grupos funcionales de los polielectrolitos y el POE.

El valor de energía superficial más alto se obtuvo para las mezclas de PEMA-Met/POE y el valor más bajo se obtuvo para las mezclas de PEMA-Arg/POE. Se observa de inmediato

que estos valores de energía superficial no están directamente relacionados con el índice hidropático de los respectivos aminoácidos.

A partir de la disociación de la energía superficial en sus componentes *polar* (γ^p) y *dispersiva* (γ^d) se puede inferir el tipo de interacción predominante de la superficie en una interfase. En el caso de la mezcla P-Met/POE se observó una alta contribución tanto de la parte polar como la parte dispersiva, lo que indica que esta superficie interactúa tanto mediante interacciones polares como puente de hidrógeno, energía de dipolo y la energía de inducción, como mediante fuerzas de dispersión de London. Por su parte, las mezclas PEMA-Arg/POE y P-Tyr/POE poseen una contribución de la parte polar muy pequeña, lo que se sugiere que estas superficies interactúan principalmente mediante fuerzas dispersivas.

3.3.3 Caracterización de las Mezclas PEMA-Aa/POE.

3.3.3.1 Espectroscopía FT-IR.

Mediante FT-IR observó la presencia de señales características de sus componentes puros analizando el desplazamiento de bandas para las mezclas con distintas proporciones de composición. La Figura 30 muestra los espectros FT-IR obtenidos para la mezcla PEMA-Asp/POE en distintas proporciones y de sus componentes puros.

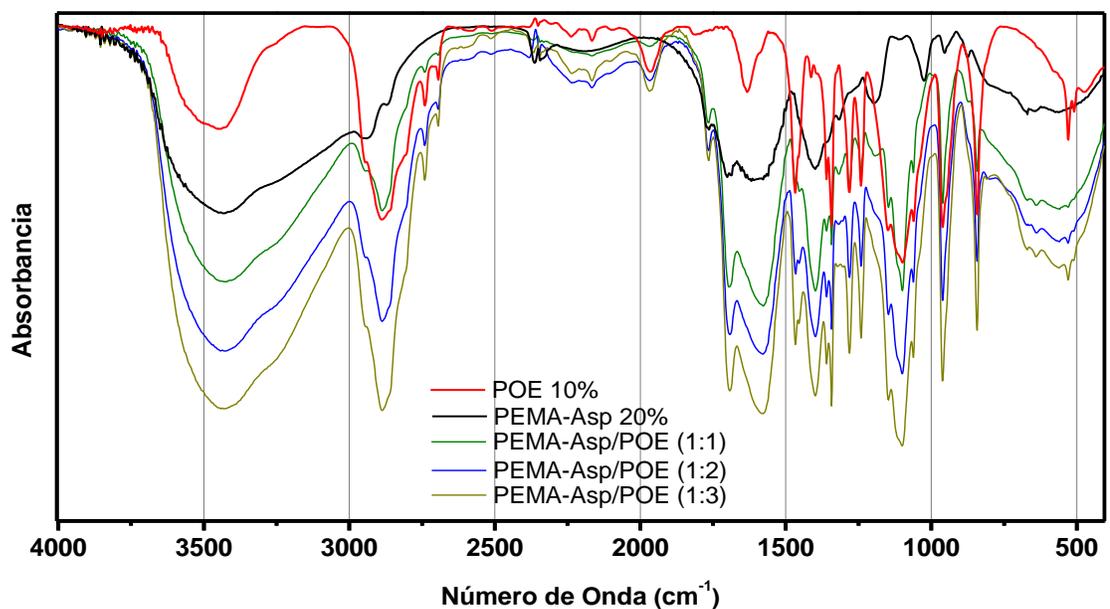


Figura 30. Espectros FT-IR de mezcla PEMA-Asp/POE en proporciones 1:1, 1:2 y 1:3 y de sus componentes puros.

En este caso se sigue las señales correspondientes a los grupos carbonilos de los grupos carboxilatos que originalmente aparecen en 1687 y 1618 cm^{-1} para P-Asp. Estas bandas de absorción presentaron pequeños desplazamientos cuando se encuentra mezclados con POE. Para las mezclas P-Asp/POE 1:1 aparecen en 1695 y 1557 cm^{-1} , mientras que para las proporciones 1:2 y 1:3 estas señales aparecen en 1692 y 1578 cm^{-1} para las dos

mezclas. El mayor desplazamiento se observó al mezclarse P-Asp y POE en partes iguales, esto indica que sí existen interacciones entre ambos componentes, posiblemente interacciones de puente de hidrogeno entre las cadenas -OH terminales del POE y los grupos C=O de los carboxilatos del PEMA-Asp. Este mismo comportamiento se observó para PEMA-Arg, PEMA-Leu, PEMA-Met y PEMA-Tyr (ver Anexo Figuras 29-32).

3.3.3.2 Análisis Térmico

La Figura 31 muestra las curvas de TGA de la mezcla PEMA-Asp/POE en distintas proporciones y de sus componentes puros:

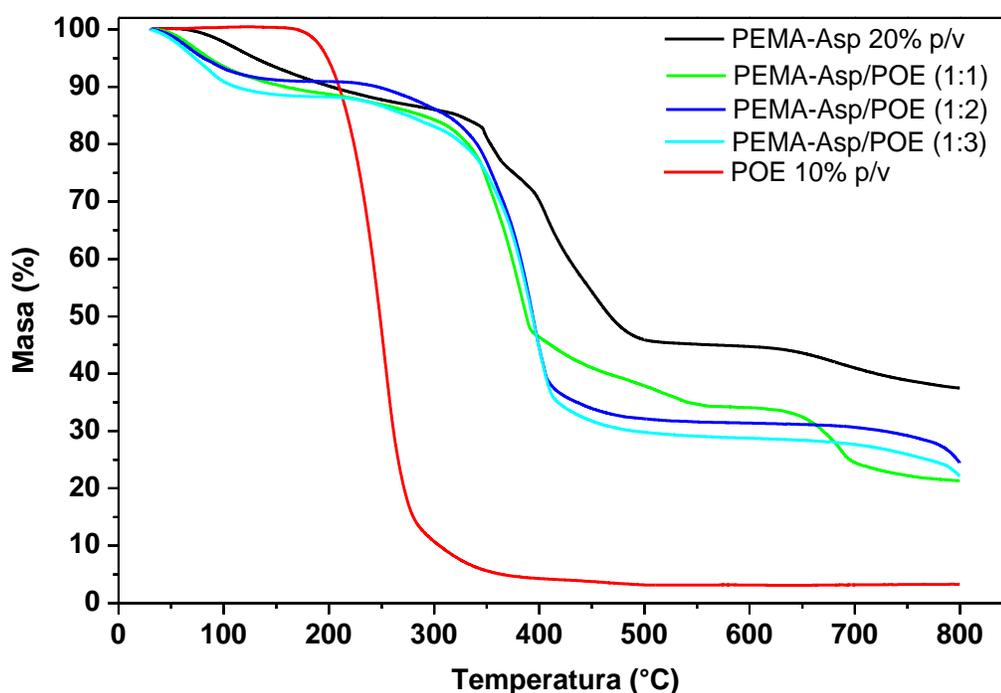


Figura 31. Termogramas de las mezclas PEMA-Asp/POE en distintas proporciones obtenidos mediante TGA.

La curva de degradación térmica del POE muestra que se mantiene estable durante más tiempo y la degradación ocurre en una sola etapa a una temperatura cercana a 417°C.

La curva de degradación térmica de polielectrolito PEMA-Asp muestra varios procesos de descomposición térmica, la primera etapa ocurre a una temperatura cercada a 100°C, lo que indica que en primer lugar se evaporó el agua retenida en el polielectrolito debido a su alta higroscopicidad producto de los 3 grupos de ácido carboxílico presentes en su estructura, durante la segunda etapa (342-353°C) y tercera etapa (390-438°C) ocurre la degradación de la cadena lateral y de la cadena principal del polielectrolito, respectivamente. Las curvas de degradación de PSMA-Asp y sus diferentes mezclas, tienen un porcentaje de su masa que no es degradado que corresponde a los contraiones Na^+ presentes en su estructura los que abarcan un alto porcentaje de su masa.

En el caso de las mezclas, se observó que la degradación térmica de PEMA-Asp/POE (1:1) ocurre en 3 etapas claras (98°C, 358°C y 420°C), mostrando un comportamiento parecido al del polielectrolito PEMA-Asp puro, a medida que aumenta la proporción de POE en la mezcla, se observaron solo 2 etapas en la degradación, para PEMA-Asp/POE (1:2) ocurre en 90°C y 429°C mientras que para PEMA-Asp/POE (1:3) ocurre en 77°C y en 427°C. Se observó una disminución en la temperatura de la primera etapa de degradación a medida que aumentó el POE, debido a que los grupos de ácido carboxílico comienzan a interactuar con el POE dejando salir más fácilmente el agua retenida. Además, debido a esta entre POE y el PEMA-Asp, la temperatura a la que ocurre la segunda etapa de la degradación aumenta ligeramente desde 418°C hasta 427°C, lo que confirma que existen interacciones entre ambos componentes de la mezcla. Similares

comportamientos se encontraron para las mezclas PEMA-Arg, PEMA-Leu, PEMA-Met y PEMA-Tyr (Anexo, Figuras 33-36).

Además, se realizó análisis DSC a todas las mezclas y sus componentes puros con el fin de determinar sus Tg. Se determinó la Tg del POE a -50°C , valor que se condice con lo reportado en literatura, sin embargo, no se pudo determinar claramente la Tg de las mezclas, ya que sus valores se solapan con los valores de la temperatura de fusión del POE.

3.4 ELECTROHILADO Y NANOFIBRAS POLIMÉRICAS

El primer paso para la formación de nanofibras poliméricas fue electrohilar los polielectrolitos puros PEMA-Asp, PEMA-Arg, PEMA-Leu, PEMA-Met y PEMA-Tyr a concentraciones 10%, 15% y 20% p/v. Se ensayaron distintos de parámetros de voltaje, distancia aguja-colector y velocidad de flujo, sin embargo, no se alcanzó la condición de electrohilado, pero si la de electroespray, como se muestra en la Figura 32. Esto se debe a que las disoluciones de los polielectrolitos presentan una conductividad muy alta, baja tensión superficial y una viscosidad baja producto de la baja concentración del polielectrolito, la combinación de estos valores al límite provoca que no puedan ser electrohilados correctamente, tal como se describe en la literatura.^{58,99}

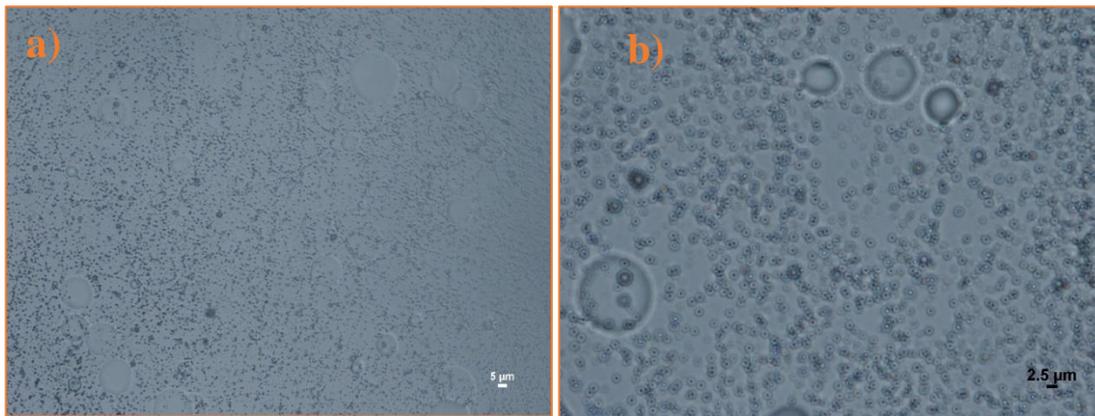


Figura 32. Imagen de microscopía óptica de las gotas obtenidas durante electrohilado del polielectrolito PEMA-Tyr 20% p/v a) 40X y b) 100X

Para el caso del POE, existen parámetros reportados en la literatura para obtener fibras ultra finas a partir de disoluciones de POE en agua a distintas concentraciones.⁵⁷ En este

caso se utilizó una distancia aguja colector de 20 cm, una velocidad de flujo de 500 $\mu\text{L/h}$ y un potencial de 15-18 kV.

Finalmente, se electrohilieron las mezclas poliméricas de PEMA-Aa/POE, y se analizaron las muestras en el microscopio óptico para verificar la obtención de fibras. Se observó un efecto de la concentración de la disolución del polielectrolito y un efecto de la cantidad de POE adicionado en la mezcla.

3.4.1 Efecto de la Concentración de las Mezclas en la Formación de Nanofibras

Las imágenes de las fibras obtenidas a partir de las mezclas PEMA-Asp/POE, PEMA-Met/POE y PEMA-Tyr/POE (10%/10% p/v) depositadas sobre el colector metálico obtenidas desde el microscopio óptico con magnificación de 100X se muestran en la Figura 33:

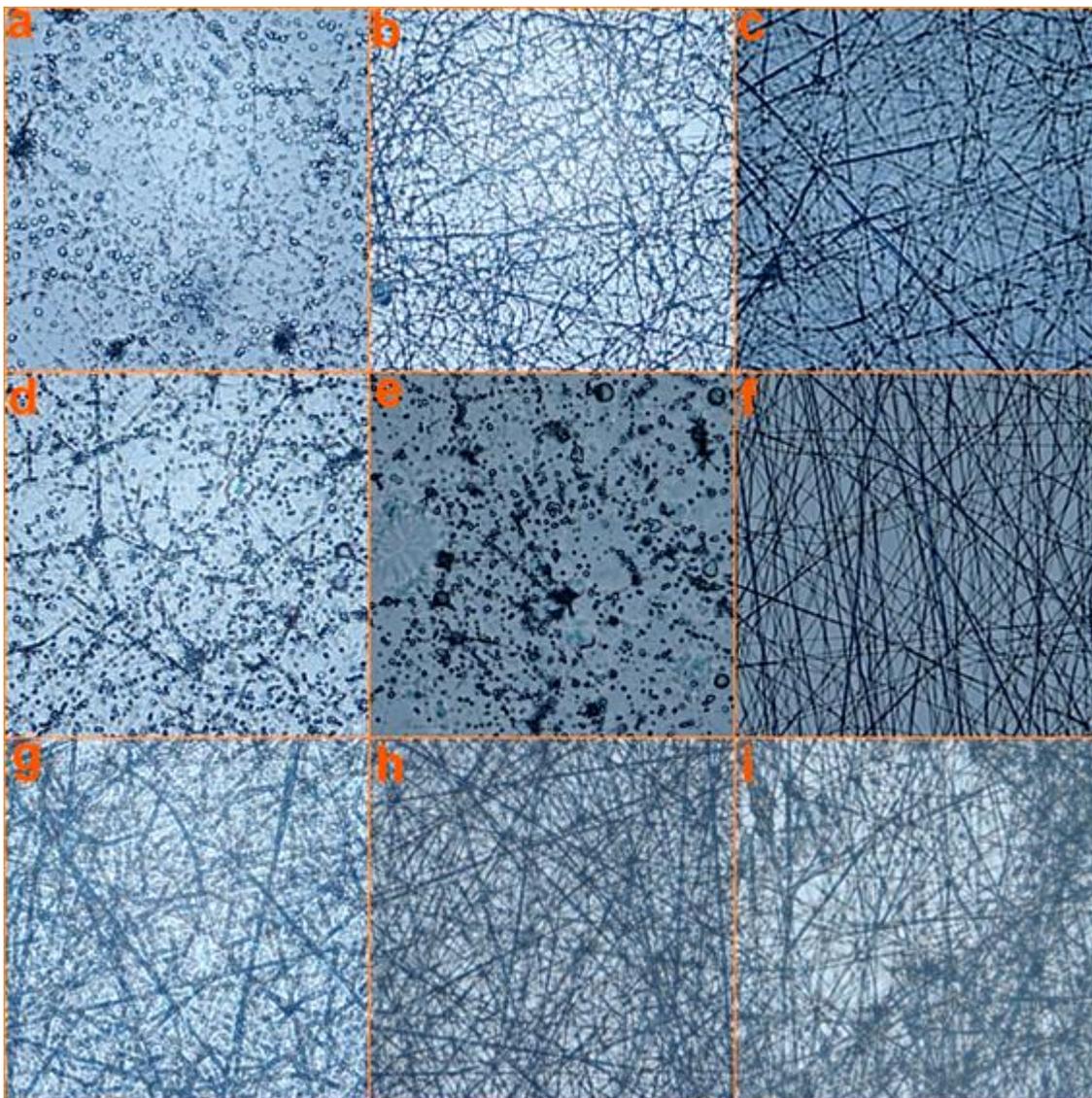


Figura 33. Imágenes de microscopía óptica para fibras de PEMA-Asp/POE en proporciones a) 1:1, b) 1:2 y c) 1:3, PEMA/POE en proporciones d) 1:1, e) 1:2 y f) 1:3 y PEMA-Tyr/POE en proporciones g) 1:1, h) 1:2 e i) 1:3 todas las mezclas a concentración 10% p/v, con aumento de 100X.

Se observó que para las mezclas PEMA-Asp/POE en proporción 1:1 se obtuvieron gotas de la solución polimérica (Figura 33, imagen a). En la medida que se aumentó la proporción de POE en la mezcla a 1:2 y 1:3, se observó la aparición de algunas fibras mezcladas con algunas gotas pequeñas de solución polimérica (Figura 33, imágenes b y c respectivamente).

Para la mezcla PEMA-Met/POE, se observó la formación de gotas de solución polimérica en las proporciones 1:1 y 1:2 (Figura 33, imágenes d y e respectivamente). Al aumentar la proporción de POE en la mezcla a 1:3, se observó la aparición de fibras continuas con gotas en su interior (Figura 33, imagen f).

Para la mezcla PEMA-Tyr/POE se observó la formación de fibras en todas las proporciones, sin embargo, estas fibras presentan defectos llamados “perlas” que están contenidas dentro de las fibras. Estas perlas se encuentran en grandes cantidades en todas las proporciones de POE en la mezcla (Figura 33, imágenes g, h e i respectivamente).

En general, en las fibras obtenidas a partir de mezclas PEMA-Aa/POE (10%/10% p/v), se observó que a medida que se aumentó la proporción de POE en la mezcla, aumentó la formación de fibras, sin embargo, estas fibras no fueron totalmente continuas y presentaron defectos superficiales conocidos como perlas, estas perlas se forman debido a que una pequeña porción de la disolución polimérica no puede ser completamente electrohilada y en su lugar, se forman algunas gotas de disolución polimérica dentro de las fibras. Para mejorar estos defectos, se debe aumentar la concentración de las disoluciones de polielectrolitos en las diferentes mezclas.

Las imágenes de las fibras obtenidas a partir de las mezclas PEMA-Asp/POE, PEMA-Met/POE y PEMA-Tyr/POE (15%/10% p/v) se muestran en la Figura 34:

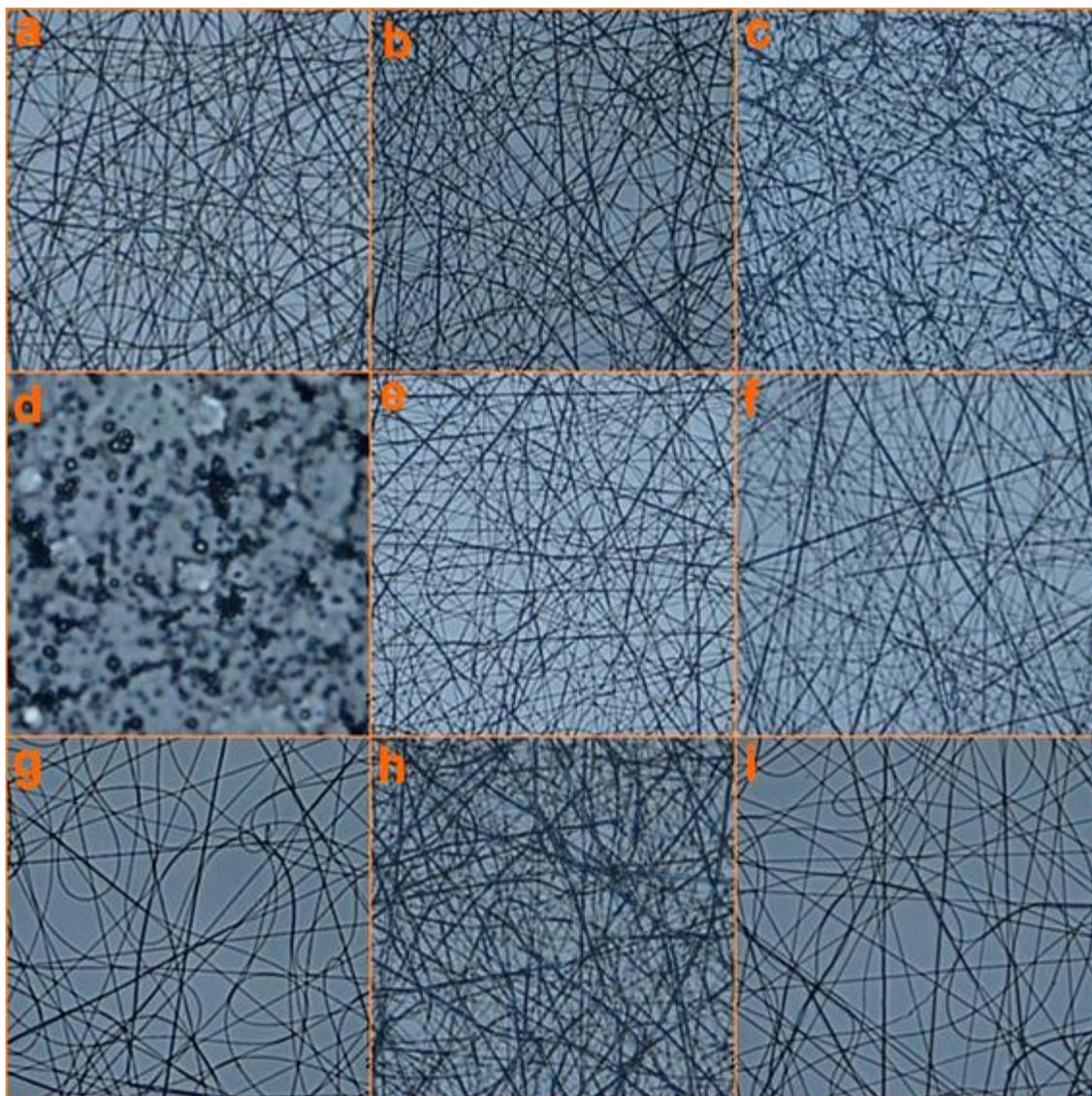


Figura 34. Imágenes de microscopía óptica para fibras obtenidas a partir de PEMA-Asp/POE en proporciones a) 1:1, b) 1:2 y c) 1:3, PEMA-Met/POE en proporciones d) 1:1, e) 1:2 y f) 1:3 y PEMA-Tyr/POE en proporciones g) 1:1, h) 1:2 e i) 1:3, todas las mezclas a concentración 15%/10% p/v, con aumento de 100X.

En la Figura 34, imágenes a, b y c, se observó la formación de fibras continuas en todas las proporciones de la mezcla PEMA-Asp/POE (15%/10% p/v), sin embargo, todas estas fibras contienen perlas o gotas de solución polimérica. Esto significa que cuando la concentración de PEMA-Asp es 15% p/v en cada una de las mezclas es suficiente para la formación de fibras, pero aún se necesita aumentar esta concentración para obtener fibras sin defectos morfológicos.

Para la mezcla PEMA-Met/POE en proporción 1:1 (Figura 34, imagen d), se observó que no existe formación de fibras y solo gotas de la solución polimérica fueron observadas, sin embargo, al aumentar la proporción de POE en la mezcla a 1:2 y 1:3, se observó la formación de fibras continuas, pero mezcladas con gotas y perlas (Figura 34, imágenes e y f respectivamente)

Para la mezcla PEMA-Tyr/POE se observó formación de fibras en todas sus proporciones. Sin embargo, estas fibras tienen pequeñas perlas en su interior. Este efecto fue más notorio en la proporción 1:2 (Figura 34, imagen h), se observó la formación de nanofibras con pequeñas perlas dentro de ellas. Las fibras obtenidas en proporción 1:2 y 1:3, presentaron menos gotas en su interior (Figura 34, imágenes g e i respectivamente)

En general, se observó que las fibras obtenidas a partir de las mezclas PEMA-Aa/POE (15%/10% p/v) son más continuas y contienen menor cantidad de gotas y perlas que para concentraciones menores. Sin embargo, se debe aumentar más la concentración para obtener fibras sin defectos en todas las proporciones de POE.

Las imágenes de las fibras obtenidas a partir de las mezclas PEMA-Asp/POE, PEMA-Met/POE y PEMA-Tyr/POE (20%/10% p/v) se muestran en la Figura 35:

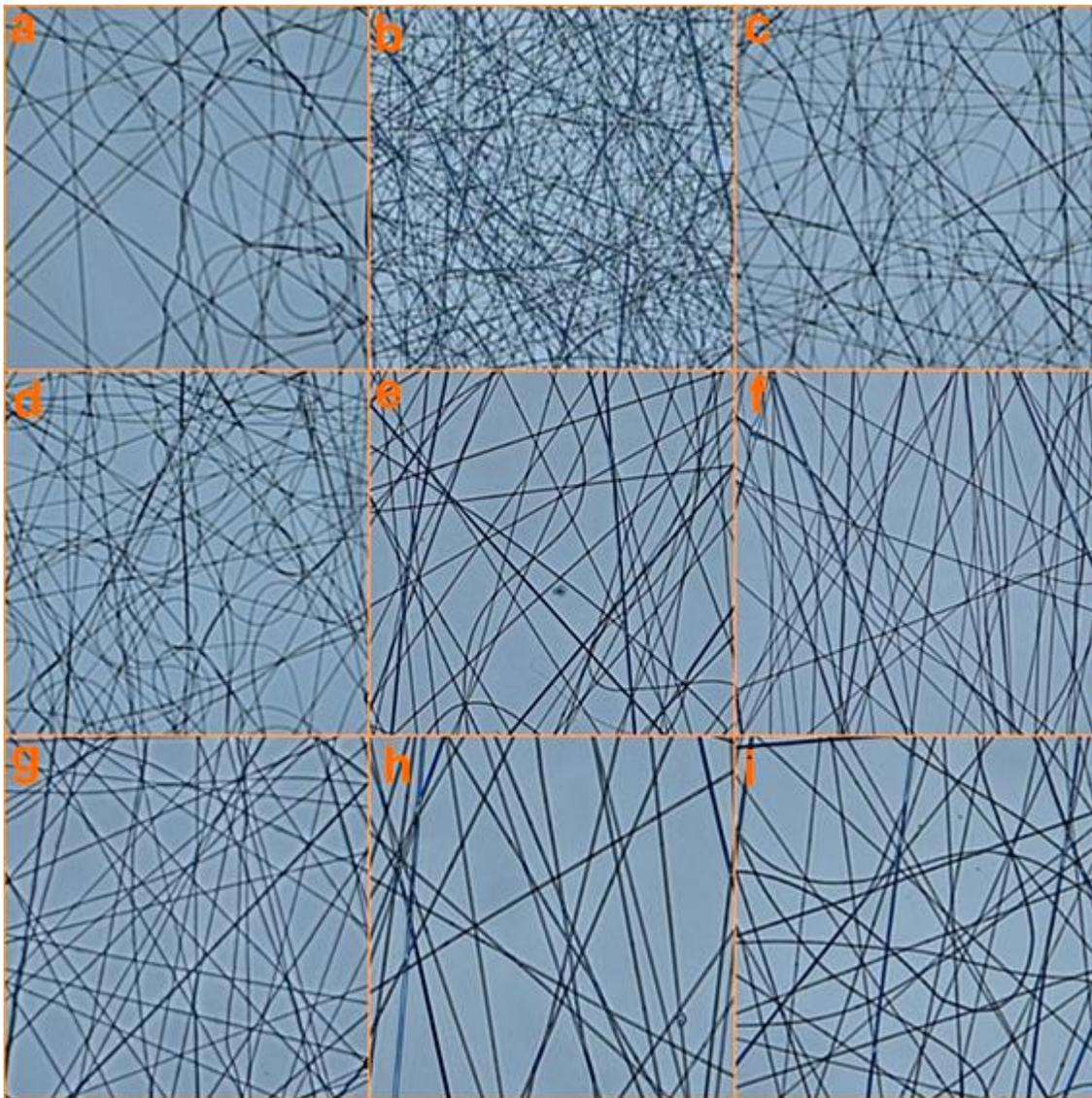


Figura 35. Imágenes de microscopía óptica para fibras obtenidas a partir de PEMA-Asp/POE en proporciones a) 1:1, b) 1:2 y c) 1:3, PEMA-Met/POE en proporciones d) 1:1, e) 1:2 y f) 1:3 PEMA-Tyr/POE en proporciones g) 1:1, h) 1:2 e i) 1:3, todas las mezclas a concentración 20%/10% p/v, con aumento de 100X.

En general, para las mezclas PEMA-Asp/POE (Figuras 35, imágenes a, b y c), PEMA-Met/POE y PEMA-Tyr/POE a concentraciones 20%/10% p/v, se observó la formación de fibras continuas y sin defectos superficiales como gotas y cuentas. Para esta concentración de polielectrolito en la mezcla, y a diferencia de las concentraciones 10% y 15% p/v, la formación de fibras es independiente de la proporción de POE en la mezcla.

Se estableció que la concentración necesaria de polielectrolitos en las mezclas para la formación de nanofibras continuas y sin perlas es de 20% p/v, mezclado con POE 10% p/v. Para los polielectrolitos PEMA-Arg y PEMA-Leu solamente se prepararon mezclas cconcentración de 20% p/v, sin pasar por concentraciones menores.

Las imágenes de las fibras obtenidas a partir de las mezclas PEMA-Arg/POE y PEMA-Leu/POE (20%/10% p/v) depositadas sobre el colector metálico obtenidas desde el microscopio óptico con magnificación de 40X se muestran a continuación en la Figura 36:

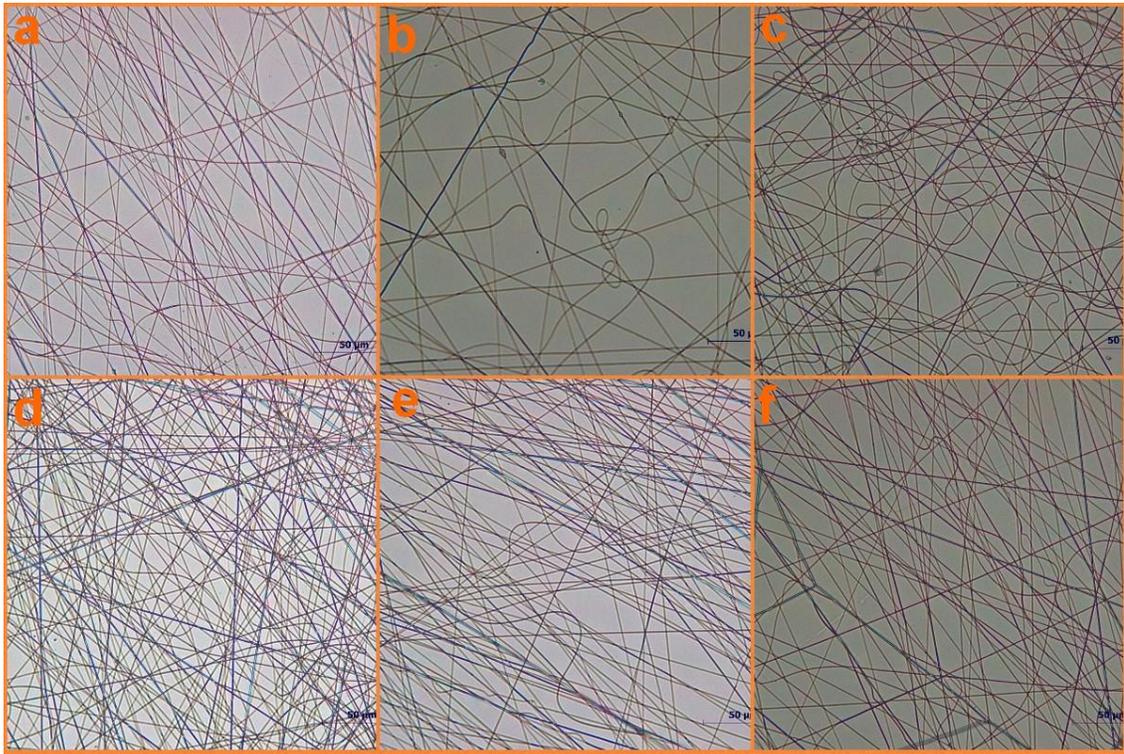


Figura 36. Imágenes de microscopía óptica para fibras de PEMA-Arg/POE (20%/10% p/v) en proporciones a) 1:1, b) 1:2 y c) 1:3, PEMA-Leu/POE (20%/10% p/v) en proporciones d) 1:1, e) 1:2 y f) 1:3, con aumento de 100X.

Se observó la formación de fibras continuas y sin gotas para la mezcla PEMA-Arg/POE (20%/10% p/v) en todas las proporciones (Figura 36, imágenes a, b y c) y también para la mezcla PEMA-Leu/POE (20%/10% p/v) en todas las proporciones (Figura 36, imágenes d, e y f).

Al comparar todas las imágenes obtenidas mediante microscopía óptica, se puede concluir que para todas las mezclas PEMA-Aa/POE, con concentración de PEMA-Aa 20% p/v se forman nanofibras continuas y sin defectos morfológicos. Debido a esto, las nanofibras

que se observaron mediante SEM son las obtenidas a partir de las mezclas PEMA-Aa/POE a una concentración de (20%/10% p/v).

3.4.2 Morfología de las Nanofibras.

Las Figuras 37-41 corresponden a las imágenes de SEM de las nanofibras obtenidas a partir de mezclas de los polielectrolitos PEMA-Asp, PEMA-Met, PEMA-Tyr, PEMA-Arg y PEMA-Leu 20% p/v con POE 10% p/v en proporciones 1:1, 1:2 y 1:3. Estas imágenes fueron obtenidas con un aumento de 3000X y 15000X. A partir de estas imágenes se determinó el diámetro de las distintas nanofibras, y con esta información determinó el diámetro promedio de fibras para cada polielectrolito en sus distintas proporciones, que se muestran en la Tabla 25:

Con respecto al diámetro de fibra promedio obtenido para cada mezcla de PEMA-Aa/POE, se observó que los valores se encontraron en un rango entre 170-350 nm, con un promedio de 200 nm, lo que confirmó la obtención de fibras poliméricas de tamaño nanométricas. No se encontró una relación directa entre el diámetro de fibra y el índice hidropático de cada aminoácido. Se encontró que las fibras con mayor diámetro son las obtenidas a partir de las mezclas de PEMA-Tyr/POE, este polielectrolito es el que presenta mayor masa molar y tiene una cadena lateral más voluminosa e hidrofóbica que los demás polielectrolitos.

Tabla 25. Diámetro promedio de las nanofibras de PEMA-Aa/POE (20%/10% p/v) en distintas proporciones.

Mezcla	Proporción PEMA-Aa/POE	Diámetro Promedio (nm)
PEMA-Asp/POE	1:1	228 ± 9
	1:2	197 ± 44
	1:3	218 ± 41
PEMA-Arg/POE	1:1	258 ± 21
	1:2	190 ± 26
	1:3	244 ± 50
PEMA-Leu/POE	1:1	226 ± 104
	1:2	195 ± 51
	1:3	174 ± 32
PEMA-Met/POE	1:1	199 ± 30
	1:2	195 ± 39
	1:3	244 ± 38
PEMA-Tyr/POE	1:1	264 ± 32
	1:2	350 ± 20
	1:3	300 ± 32

En la Figura 37 se muestran las nanofibras obtenidas a partir de las mezclas PEMA-Asp/POE en distintas proporciones. En general, estas nanofibras no presentan mayores defectos morfológicos, pero sí tienen un aspecto “húmedo” y aplanado. Esto puede deberse a que el polielectrolito PEMA-Asp presenta 3 grupos carboxilatos en su estructura, estos grupos pueden retener moléculas de agua en la nanofibra, provocando una evaporación desigual del disolvente y el colapso de la forma redonda de la fibra.

Además, como la cantidad de contraiones en las disoluciones de PEMA-Asp es mayor, existe mayor repulsión de Coulomb en los jets, lo que también puede generar fibras un poco más aplanadas.¹⁰⁰ Otro aspecto que considerar es que estas nanofibras fueron obtenidas a una velocidad de flujo mayor que las demás mezclas lo interfiere con la evaporación total del disolvente de la disolución polimérica. También se observó que a medida que se aumentó la proporción de POE en la mezcla PEMA-Asp/POE, desde 1:1 hasta 1:3 (Figura 37, imagen a, b y c), se obtuvieron nanofibras más lisas, mejor definidas, pero no mostraron un cambio significativo en su diámetro.

En la Figura 38 se muestran las nanofibras obtenidas a partir de las mezclas PEMA-Met/POE en distintas proporciones. Estas nanofibras no tienen mayores defectos morfológicos, y al igual que para la mezcla PEMA-Asp/POE, a medida que se aumentó la proporción de POE en la mezcla desde 1:1 hasta 1:2 y 1:3 las fibras obtenidas fueron más lisas y mejor definidas, además en proporción 1:3 existe un pequeño aumento en el diámetro promedio de las fibras.

En la Figura 39, se muestran las nanofibras obtenidas a partir de las mezclas PEMA-Tyr/POE en distintas proporciones. Estas nanofibras no tiene defectos morfológicos en superficie, son más definidas que las fibras obtenidas a partir de las mezclas de los otros polielectrolitos y además tienen un diámetro promedio mayor. Como se dijo anteriormente, el PEMA-Tyr es el polielectrolito que tiene la cadena lateral más voluminosa, lo que puede contribuir a la formación de nanofibras con diámetros mayores. Experimentalmente, estas nanofibras fueron obtenidas a una baja velocidad de flujo y con voltajes mayores que los otras mezclas, lo está de acuerdo con autores que sugieren que

aplicando mayor voltaje se transporta más fluido en el chorro resultando fibras con mayores diámetros.⁴⁸

En la Figura 40 se muestran las nanofibras obtenidas a partir de las mezclas PEMA-Arg/POE en distintas proporciones. Estas nanofibras son lisas, bien definidas y sin mayores defectos morfológicos en su superficie. No se observaron cambios importantes tanto en su morfología como en el diámetro de las nanofibras al aumentar la proporción de POE en la mezcla.

En la Figura 41 se muestran las nanofibras obtenidas a partir de las mezclas PEMA-Leu/POE en distintas proporciones. Estas nanofibras son lisas, bien definidas y no presentan mayores defectos morfológicos. Al aumentar la proporción de POE en la mezcla, el diámetro promedio de fibra disminuye, contrario a lo que se esperaba, pues el aumento de POE en la mezcla disminuyó la conductividad y el aumento en la tensión superficial, ambos factores determinantes en la obtención de fibras más gruesas. Además, se observó un efecto de la velocidad de flujo en el diámetro de las fibras (al aumentar la cantidad de POE), el aumento en la velocidad permitió obtener fibras más gruesas, tal como se informa en literatura.

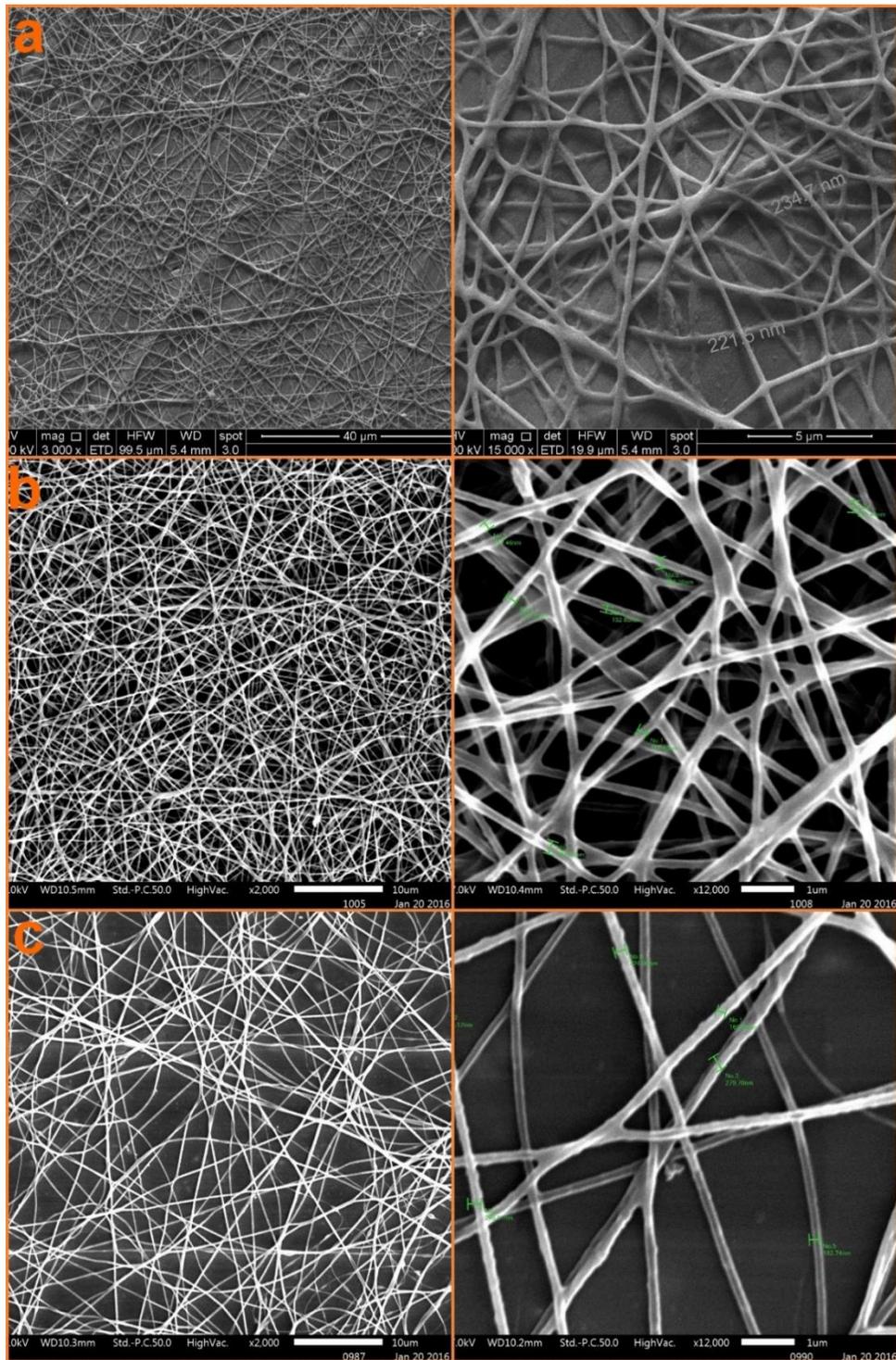


Figura 37. Imágenes SEM de nanofibras de PEMA-Asp/POE (20%/10% p/v) en proporciones a) 1:1, b) 1:2 y c) 1:3 tomadas a 3000X y 15000X.

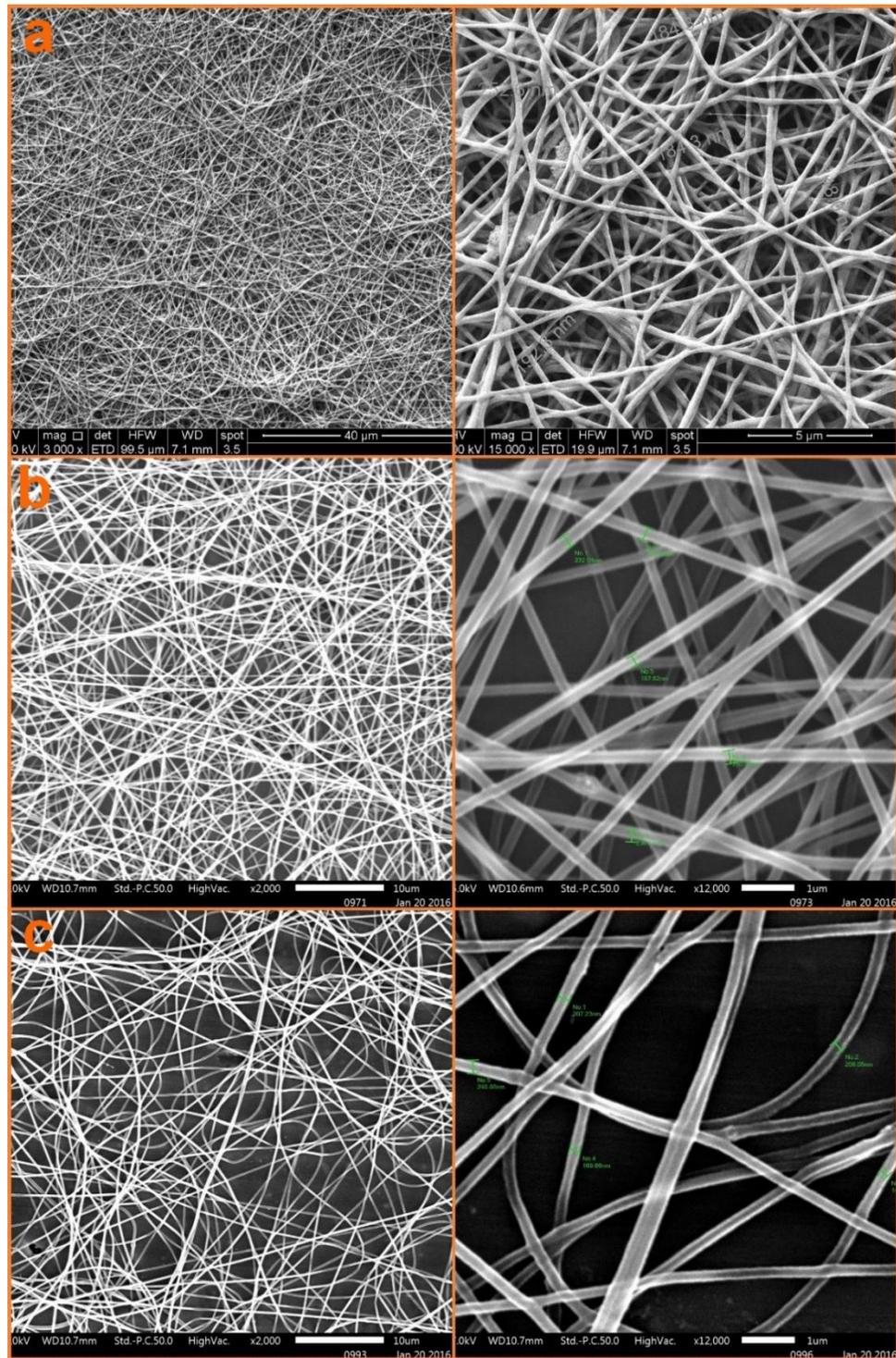


Figura 38. Imágenes SEM de nanofibras de PEMA-Met/POE (20%/10% p/v) en proporciones a) 1:1, b) 1:2 y c) 1:3 tomadas a 3000X y 15000X.

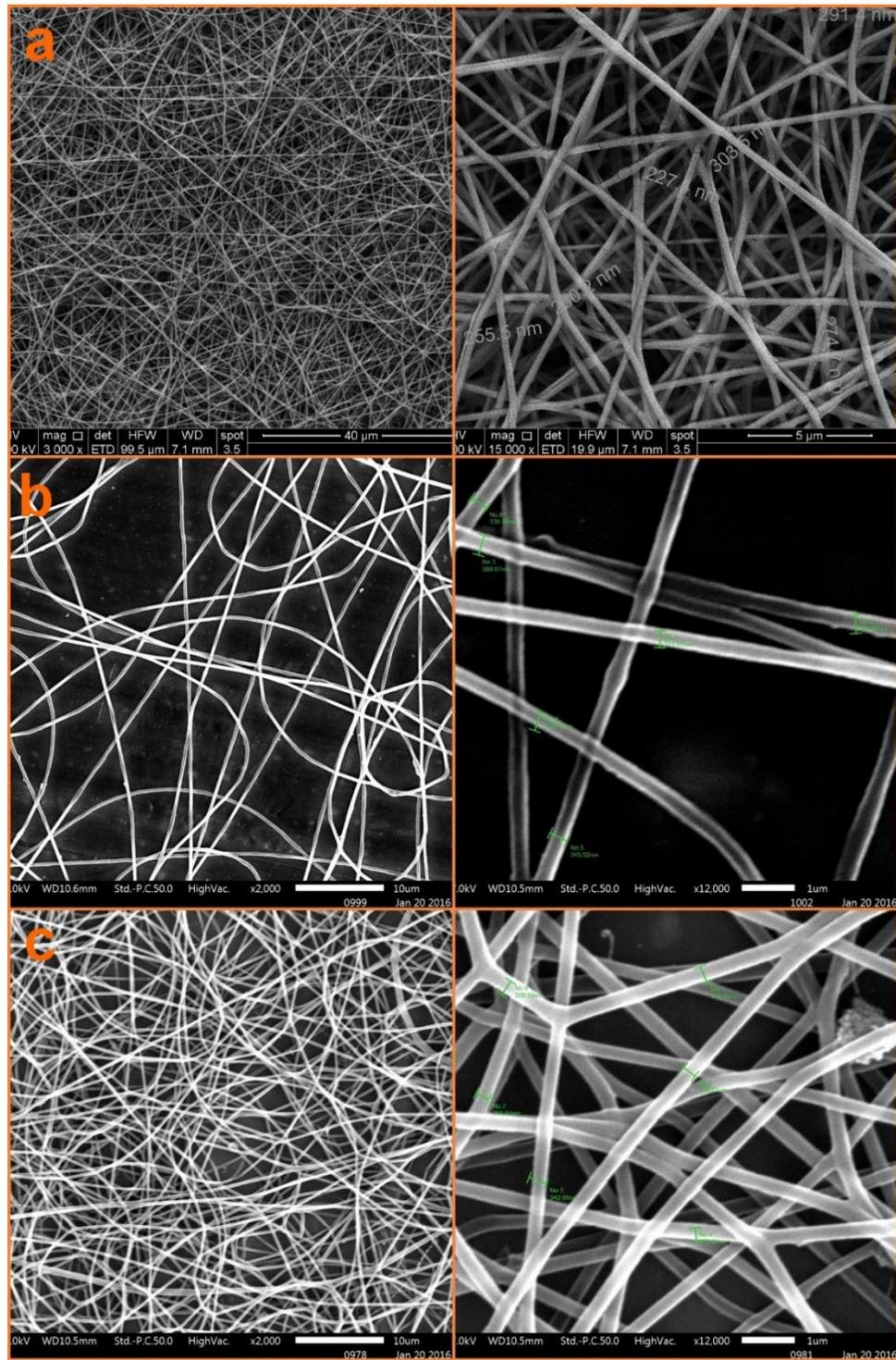


Figura 39. Imágenes SEM de nanofibras de PEMA-Tyr/POE (20%/10% p/v) en proporciones a) 1:1, b) 1:2 y c) 1:3 tomadas a 3000X y 15000X.

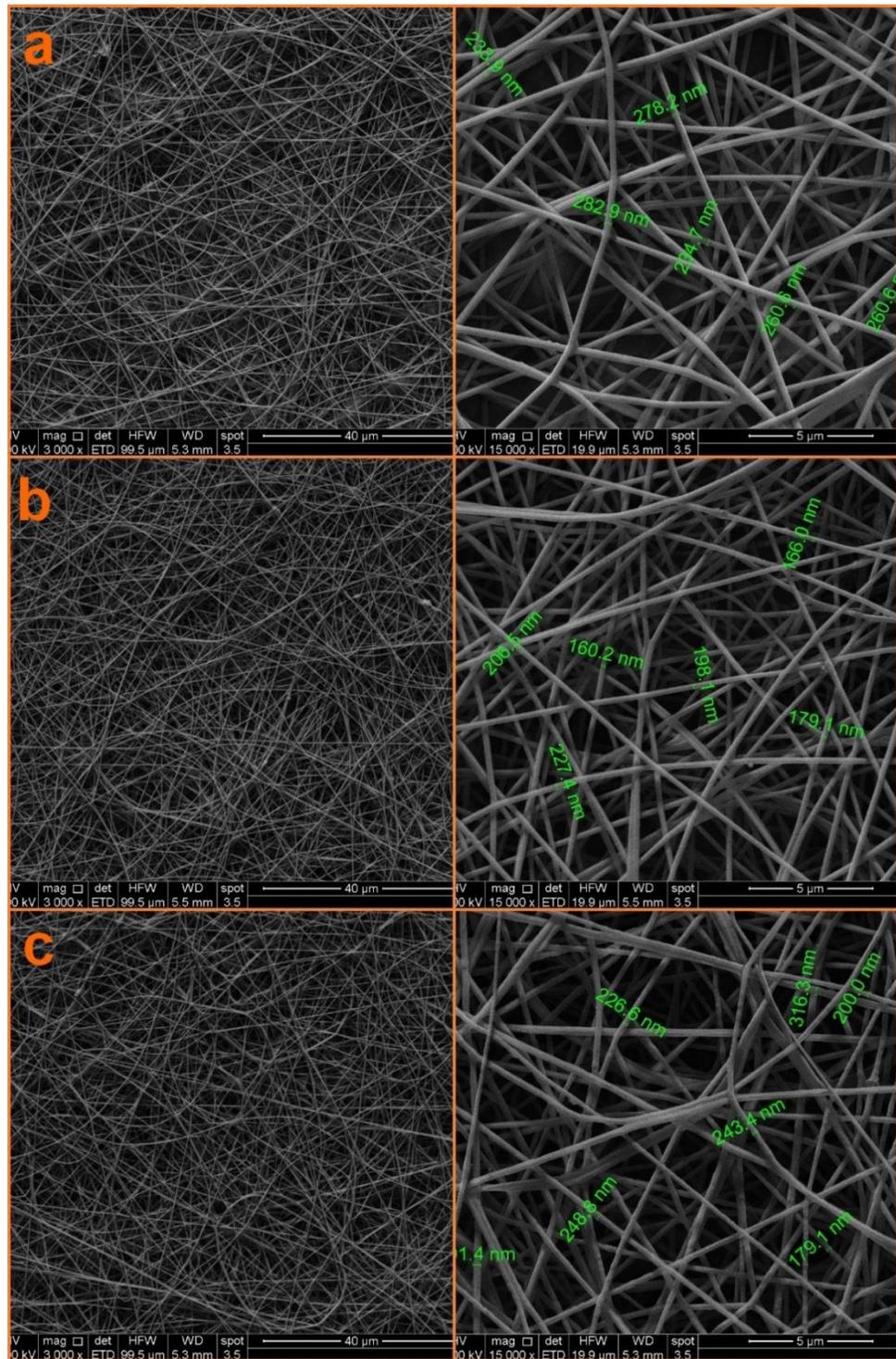


Figura 40. Imágenes SEM de nanofibras de PEMA-Arg/POE (20%/10% p/v) en proporciones a) 1:1, b) 1:2 y c) 1:3 tomadas a 3000X y 15000X.

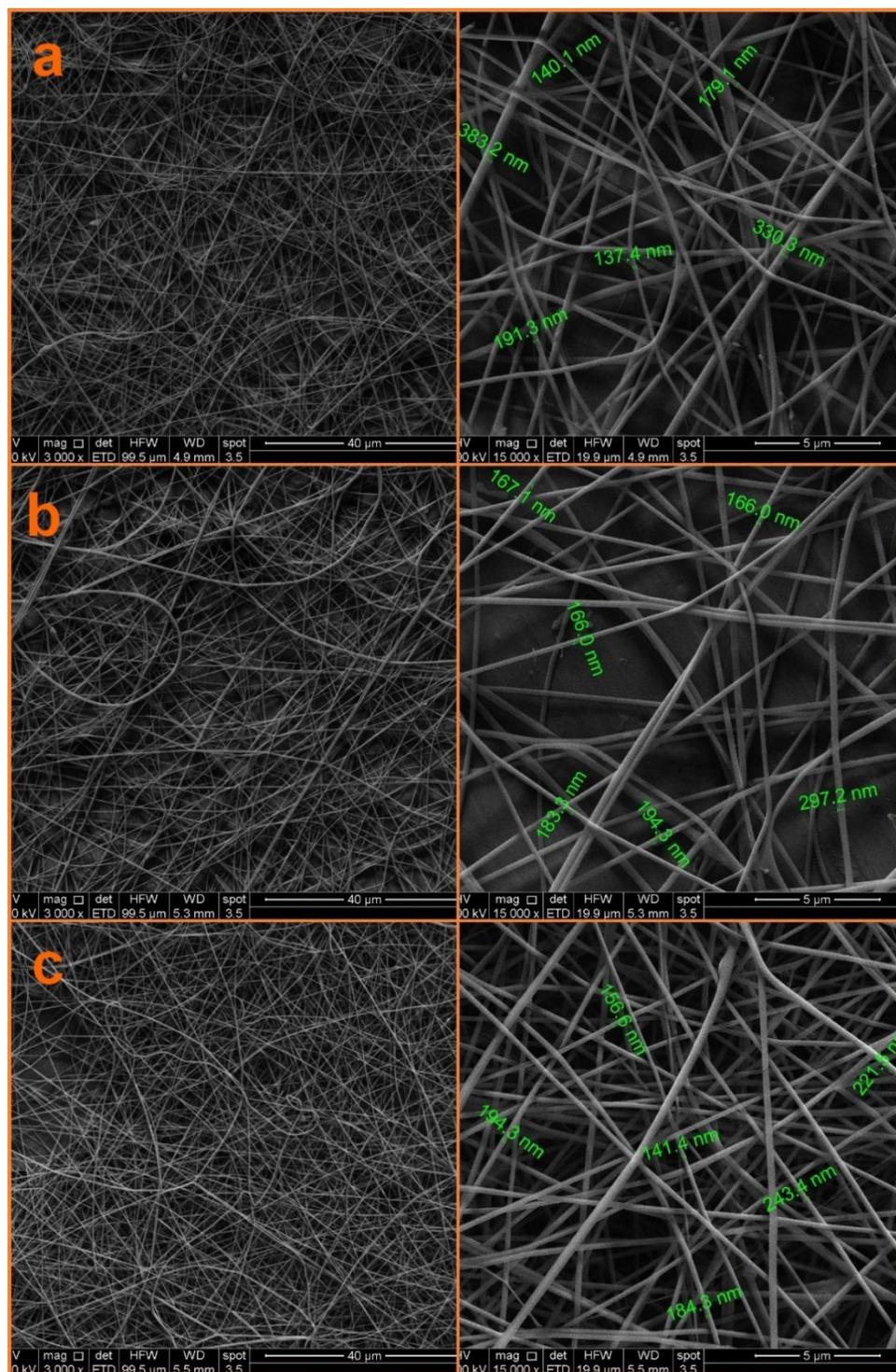


Figura 41. Imágenes SEM de nanofibras de PEMA-Leu/POE (20%/10% p/v) en proporciones a) 1:1, b) 1:2 y c) 1:3 tomadas a 3000X y 15000X.

3.4.3 Entrecruzamiento de Nanofibras

Para el entrecruzamiento con etilendiamina, se sumergieron placas de vidrio con nanofibras directamente en disoluciones de etilendiamina 0.3 M, 0.6 M y 0.9 M utilizando etanol como disolvente. Se utilizó etanol porque los polielectrolitos son insolubles en este disolvente. Luego de las 4 horas de calentamiento en la estufa se retiraron las nanofibras, las placas tomaron una ligera coloración amarilla producto de la etilendiamina. Las placas fueron observadas al microscopio óptico. Las imágenes revelaron que las nanofibras no se entrecruzaron exitosamente y pierden su aspecto de fibras.

El entrecruzamiento con vapores de glutaraldehído al 50% v/v, tampoco resultó exitoso ya que la humedad que generó la disolución de glutaraldehído alteró las nanofibras, rompiéndolas y en algunos casos disolviéndolas.

En entrecruzamiento con CaCl_2 funcionó cuando se probó con las disoluciones de las distintas mezclas PEMA-Aa/POE, se obtuvieron precipitados insolubles en agua para todos los polielectrolitos sobre todo cuando la proporción de la mezcla fue de 1:1. Sin embargo, al sumergir las fibras en la disolución de CaCl_2 y luego de secarlas, quedó una delgada capa de polímero que al microscopio óptico se observó la pérdida de la nanofibras por lo que este método tampoco resulta útil para entrecruzar las nanofibras poliméricas y volverlas insolubles en disoluciones acuosas.

Este resultado no permite evaluar sus propiedades de adhesión y citotoxicidad sobre cultivos celulares, debido a que las fibras se disuelven en el medio de cultivo perdiendo totalmente su estructura tridimensional.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES

El comportamiento de adsorción de PSMA-Gln, PSMA-Met y PSMA-Tyr a 0.1M NaCl está gobernado por interacciones hidrofóbicas, similar comportamiento se observó para PSMA-Gln y PSMA-Tyr a 0.001M NaCl. El comportamiento de adsorción para el PSMA-Met a 0.001M está gobernado por interacciones electrostáticas.

Las propiedades superficiales están determinadas por los grupos funcionales que presentan los residuos aminoacídicos y no por el carácter hidrofílico/hidrofóbico, es decir por el índice hidropático del aminoácido.

Las películas nanoestructuradas presentaron una morfología con nanoestructuras globulares bien definidas y nanoestructuras lineales densamente empaquetadas, determinadas por la conformación del polielectrolito en disolución conservándola en la superficie.

La humectabilidad de las películas nanoestructuradas de los PSMA-Gln, PSMA-Met y PSMA-Tyr está determinada por la presencia de zonas hidrofóbicas e hidrofílicas presentes en la superficie, no se observó influencia de la cadena lateral de los polielectrolitos.

Las películas nanoestructuradas de los PSMA-Gln, PSMA-Met y PSMA-Tyr presentaron diferencias en su heterogeneidad química. PSMA-Met presentó una menor heterogeneidad química comparado con PSMA-Gln y PSMA-Tyr, este comportamiento está determinado por el índice H de la metionina.

Las células cultivadas sobre las películas nanoestructuradas de PSMA-Gln y PSMA-Tyr presentaron una morfología circular con un menor número de procesos y de menor diámetro. Las células cultivadas sobre las películas nanoestructuradas de PSMA-Met presentaron una morfología más bien extendida con mayor número de procesos. Este comportamiento está determinado principalmente por la histéresis de la superficie.

Las películas nanoestructuradas de PSMA-Gln, PSMA-Met y PSMA-Tyr favorecen la adhesión y viabilidad celular de las células SH-SY5Y sobre ellas.

Se obtuvieron nanofibras a partir de los polielectrolitos derivados de PEMA modificados con aminoácidos PEMA-Arg, PEMA-Asp, PEMA-Leu, PEMA-Met y PEMA-Tyr mezclados con POE en distintas proporciones y concentraciones. Las imágenes SEM mostraron que las nanofibras son continuas, sin defectos morfológicos y con diámetros entre 200 y 350 nm aproximadamente.

No se encontró una relación entre los residuos aminoacídicos con diferentes índices H de cada aminoácido con ninguna propiedad (porcentaje de modificación, conductividad, tensión superficial, ángulo de contacto o energía superficial) de los polielectrolitos ni con sus mezclas con POE. Tampoco hubo con los parámetros de obtención de fibras ni con el diámetro promedio de estas.

Finalmente, no se logró entrecruzar las mallas de nanofibras obtenidas con ninguno de los agentes entrecruzantes utilizados. Lo anterior se debe a que las nanofibras interactúan rápidamente con el disolvente, provocando una pérdida la conformación de las fibras y sus propiedades características.

CAPÍTULO 5

5. BIBLIOGRAFIA

- (1) Asghari, F.; Samiei, M.; Adibkia, K.; Akbarzadeh, A.; Davaran, S. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **2017**, *45*, 185.
- (2) Heydarkhan-Hagvall, S.; Schenke-Layland, K.; Dhanasopon, A. P.; Rofail, F.; Smith, H.; Wu, B. M.; Shemin, R.; Beygui, R. E.; MacLellan, W. R. *Biomaterials* **2008**, *29*, 2907.
- (3) Yannas, I. V.; Burke, J. F.; Huang, C.; Gordon, P. L. *American Chemical Society, Polymer Preprints, Division of Polymer Chemistry* **1975**, *16*, 209.
- (4) Sakai, R.; John, B.; Okamoto, M.; Seppälä, J. V.; Vaithilingam, J.; Hussein, H.; Goodridge, R. *Macromolecular Materials and Engineering* **2013**, *298*, 45.
- (5) Wang, X.; Ding, B.; Li, B. *Materials Today* **2013**, *16*, 229.
- (6) Lee, I. *Langmuir* **2013**, *29*, 2476.
- (7) Nair, L. S.; Laurencin, C. T. *Progress in Polymer Science* **2007**, *32*, 762.
- (8) Shelke, N. B.; James, R.; Laurencin, C. T.; Kumbar, S. G. *Polymers for Advanced Technologies* **2014**, *25*, 448.
- (9) Hu, X.; Liu, S.; Zhou, G.; Huang, Y.; Xie, Z.; Jing, X. *Journal of Controlled Release* **2014**, *185*, 12.
- (10) Thakur, V. K.; Thakur, M. K.; Gupta, R. K. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization* **2014**, *19*, 256.
- (11) Tian, H.; Tang, Z.; Zhuang, X.; Chen, X.; Jing, X. *Progress in Polymer Science* **2012**, *37*, 237.
- (12) Hong, D.; Ho Yang, S. *Cationic Polymers for Coating Living Cells*, 2018.
- (13) Ning, C.; Zhou, Z.; Tan, G.; Zhu, Y.; Mao, C. *Progress in Polymer Science* **2018**, *81*, 144.
- (14) Dobrynin, A. V.; Rubinstein, M. *Progress in Polymer Science* **2005**, *30*, 1049.
- (15) Layek, B.; Singh, J. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 485.
- (16) Zhu, D.; Zhang, H.; Bai, J.; Liu, W.; Leng, X.; Song, C.; Yang, J.; Li, X.; Jin, X.; Song, L.; Liu, L.; Li, X.; Zhang, Y.; Yao, K. *Chinese Science Bulletin* **2007**, *52*, 3207.
- (17) Gao, Y.; Xu, Z.; Chen, S.; Gu, W.; Chen, L.; Li, Y. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, *359*, 241.
- (18) Lv, H.-X.; Zhang, Z.-H.; Wang, X.-P.; Cheng, Q.-Q.; Wang, W.; Huang, X.-H.; Zhou, J.-P.; Zhang, Q.; Hou, L.-L.; Huo, W. *Molecules* **2011**, *16*, 6778.
- (19) Kyte, J.; Doolittle, R. F. *Journal of Molecular Biology* **1982**, *157*, 105.
- (20) Szilagyi, I.; Trefalt, G.; Tiraferri, A.; Maroni, P.; Borkovec, M. *Soft Matter* **2014**, *10*, 2479.
- (21) Tsapikouni, T. S.; Missirlis, Y. F. *Materials Science and Engineering: B* **2008**, *152*, 2.
- (22) Dobrynin, A. V.; Deshkovski, A.; Rubinstein, M. *Macromolecules* **2001**, *34*, 3421.
- (23) Samanta, T.; Mukherjee, M. *Polymer* **2012**, *53*, 5393.

- (24) Song, X.; Cao, M.; Han, Y.; Wang, Y.; Kwak, J. C. T. *Langmuir* **2007**, *23*, 4279.
- (25) Van de Steeg, H. G. M.; Cohen Stuart, M. A.; De Keizer, A.; Bijsterbosch, B. H. *Langmuir* **1992**, *8*, 2538.
- (26) Fujimoto, J.; Petri, D. F. S. *Langmuir* **2001**, *17*, 56.
- (27) Briones, X. G.; Encinas, M. V.; Petri, D. F. S.; Pavez, J. E.; Tapia, R. A.; Yazdani-Pedram, M.; Urzúa, M. D. *Langmuir* **2011**, *27*, 13524.
- (28) Urzúa, M. D.; Briones, X. G.; Carrasco, L. P.; Encinas, M. V.; Petri, D. F. S. *Polymer* **2010**, *51*, 3445.
- (29) Paterlini, T. T.; Nogueira, L. F. B.; Tovani, C. B.; Cruz, M. A. E.; Derradi, R.; Ramos, A. P. *Biophysical Reviews* **2017**, *9*, 683.
- (30) Wang, Y.-X.; Robertson, J. L.; Spillman, W. B.; Claus, R. O. *Pharmaceutical Research* **2004**, *21*, 1362.
- (31) Comelles, J.; Estévez, M.; Martínez, E.; Samitier, J. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2010**, *6*, 44.
- (32) Harnett, E. M.; Alderman, J.; Wood, T. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2007**, *55*, 90.
- (33) Kosaka, P. M.; Kawano, Y.; Petri, D. F. S. *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, *316*, 671.
- (34) Guo, S.; Zhu, X.; Li, M.; Shi, L.; Ong, J. L. T.; Jańczewski, D.; Neoh, K. G. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2016**, *8*, 30552.
- (35) Kenawy, E.-R.; Abdel-Hay, F.; El-Newehy, M.; Ottenbrite, R. M. *Polymer International* **2008**, *57*, 85.
- (36) Stoilova, O.; Ignatova, M.; Manolova, N.; Godjevargova, T.; Mita, D. G.; Rashkov, I. *European Polymer Journal* **2010**, *46*, 1966.
- (37) Gunbas, I. D.; Wouters, M. E. L.; Van Benthem, R. A. T. M.; Koning, C. E.; Noordover, B. A. J. *Progress in Organic Coatings* **2013**, *76*, 1720.
- (38) Pompe, T.; Zschoche, S.; Herold, N.; Salchert, K.; Gouzy, M.-F.; Sperling, C.; Werner, C. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1072.
- (39) Hasanzadeh, R.; Moghadam, P. N.; Samadi, N.; Asri-Rezaei, S. *Journal of Applied Polymer Science* **2013**, *127*, 2875.
- (40) Najafi Moghadam, P.; Hasanzadeh, R.; Khalafy, J. *Iranian Polymer Journal* **2013**, *22*, 133.
- (41) Guha, S. K.; Singh, G.; Srivastava, A.; Das, H. C.; Bhardwaj, J. C.; Mathur, V.; Koul, V.; Malhotra, R. L.; Das, S. K. *Contraception* **1998**, *58*, 165.
- (42) Veronese, F. M.; Morpurgo, M. *Il Farmaco* **1999**, *54*, 497.
- (43) Lai, X.; Sun, C.; Tian, H.; Zhao, W.; Gao, L. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, *352*, 66.
- (44) Kluger, R.; Hunt, J. C. *Journal of the American Chemical Society* **1984**, *106*, 5667.
- (45) Jiang, X.; Cui, L.; Wang, H.; Xu, K.; Zhou, C.; Li, J. *Reactive and Functional Polymers* **2009**, *69*, 619.
- (46) Jeong, J.-H.; Byoun, Y.-S.; Lee, Y.-S. *Reactive and Functional Polymers* **2002**, *50*, 257.

- (47) Villalobos, V.; Leiva, Á.; Ríos, H. E.; Pavez, J.; Silva, C. P.; Ahmar, M.; Queneau, Y.; Blamey, J. M.; Chávez, F. P.; Urzúa, M. D. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2018**, *10*, 28147.
- (48) Huang, Z.-M.; Zhang, Y. Z.; Kotaki, M.; Ramakrishna, S. *Composites Science and Technology* **2003**, *63*, 2223.
- (49) Raghavan, P.; Lim, D.-H.; Ahn, J.-H.; Nah, C.; Sherrington, D. C.; Ryu, H.-S.; Ahn, H.-J. *Reactive and Functional Polymers* **2012**, *72*, 915.
- (50) Biazar, E. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **2017**, *66*, 53.
- (51) Biazar, E. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **2016**, *65*, 957.
- (52) Biazar, E. *Polymers for Advanced Technologies* **2016**, *27*, 1404.
- (53) Rogina, A. *Applied Surface Science* **2014**, *296*, 221.
- (54) Doshi, J.; Reneker, D. H. *Journal of Electrostatics* **1995**, *35*, 151.
- (55) Bhardwaj, N.; Kundu, S. C. *Biotechnology Advances* **2010**, *28*, 325.
- (56) Haider, A.; Haider, S.; Kang, I.-K. *Arabian Journal of Chemistry* **2018**, *11*, 1165.
- (57) Son, W. K.; Youk, J. H.; Lee, T. S.; Park, W. H. *Polymer* **2004**, *45*, 2959.
- (58) Sill, T. J.; von Recum, H. A. *Biomaterials* **2008**, *29*, 1989.
- (59) Martins, A.; Reis, R. L.; Neves, N. M. *International Materials Reviews* **2008**, *53*, 257.
- (60) Heydarkhan-Hagvall, S.; Schenke-Layland, K.; Dhanasopon, A. P.; Rofail, F.; Smith, H.; Wu, B. M.; Shemin, R.; Beygui, R. E.; MacLellan, W. R. *Biomaterials* **2008**, *29*, 2907.
- (61) Prabhakaran, M. P.; Ghasemi-Mobarakeh, L.; Ramakrishna, S. *Journal of nanoscience and nanotechnology* **2011**, *11*, 3039.
- (62) Oktay, B.; Baştürk, E.; Kayaman-Apohan, N.; Kahraman, M. V. *Polymer Composites* **2013**, *34*, 1321.
- (63) Utracki, L. A. *Advances in Polymer Technology* **1985**, *5*, 33.
- (64) Aubin, M.; Prud'homme, R. E. *Macromolecules* **1988**, *21*, 2945.
- (65) Ramli, H.; Chan, C. H.; M. M. Ali, A. *Thermal Properties and Morphology of Poly(ethylene oxide)/Poly(n -butyl methacrylate) Blends*, 2018; Vol. 382.
- (66) Aluigi, A.; Varesano, A.; Montarsolo, A.; Vineis, C.; Ferrero, F.; Mazzuchetti, G.; Tonin, C. *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, *104*, 863.
- (67) Aluigi, A.; Vineis, C.; Varesano, A.; Mazzuchetti, G.; Ferrero, F.; Tonin, C. *European Polymer Journal* **2008**, *44*, 2465.
- (68) Lu, J.-W.; Zhu, Y.-L.; Guo, Z.-X.; Hu, P.; Yu, J. *Polymer* **2006**, *47*, 8026.
- (69) Nie, H.; He, A.; Wu, W.; Zheng, J.; Xu, S.; Li, J.; Han, C. C. *Polymer* **2009**, *50*, 4926.
- (70) Liazoghli, D.; Roth, A. D.; Thostrup, P.; Colman, D. R. *ACS Chemical Neuroscience* **2011**, *3*, 90.
- (71) Kovalevich, J.; Langford, D. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2013**, *1078*, 9.
- (72) Abuin, E., Gargallo, L., Lissi, E., Radic, D. *Macromoléculas en Solución*; UNESCO: Santiago, 1987.

- (73) Ohno, N.; Nitta, K.; Makino, S.; Sugai, S. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition* **1973**, *11*, 413.
- (74) Rocuant, C. S., Universidad de Chile, 2016.
- (75) Azzam, R. M. A.; Bashara, N. M. *Ellipsometry and polarized light*; North-Holland Pub. Co., 1977.
- (76) Marmur, A. *Soft Matter* **2006**, *2*, 12.
- (77) Shafrin, E. G.; Zisman, W. A. *The Journal of Physical Chemistry* **1960**, *64*, 519.
- (78) Glasstone, S. *Textbook of Physical Chemistry*; 2nd ed. D. Van Nostrand: Toronto, Canada, 1946.
- (79) Bouali, B.; Ganachaud, F.; Chapel, J.-P.; Pichot, C.; Lanteri, P. *Journal of Colloid and Interface Science* **1998**, *208*, 81.
- (80) Fowkes, F. M. *The Journal of Physical Chemistry* **1962**, *66*, 382.
- (81) Wu, S. *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia* **1971**, *34*, 19.
- (82) Hugel, T.; Seitz, M. *Macromolecular Rapid Communications* **2001**, *22*, 989.
- (83) Dunn, A. S. *Polymer International* **1991**, *25*, 258.
- (84) Emami, S. H.; Salovey, R. *Journal of Applied Polymer Science* **2003**, *88*, 1451.
- (85) Zhou, C.; Wang, Q.; Wu, Q. *Carbohydrate Polymers* **2012**, *87*, 1779.
- (86) Destaye, A. G.; Lin, C.-K.; Lee, C.-K. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2013**, *5*, 4745.
- (87) Yoshimura, T.; Sengoku, K.; Fujioka, R. *Pectin-based superabsorbent hydrogels crosslinked by some chemicals: Synthesis and characterization*, 2005; Vol. 55.
- (88) A. Park, S.; Eun Park, K.; Kim, W. *Preparation of Sodium Alginate/Poly(ethylene oxide) Blend Nanofibers with Lecithin*, 2010; Vol. 18.
- (89) Saarai, A.; Kasparkova, V.; Sedlacek, T.; Saha, P. In *Proceedings of the 4th WSEAS international conference on Energy and development - environment - biomedicine*; World Scientific and Engineering Academy and Society (WSEAS): Corfu Island, Greece, 2011, p 384.
- (90) Zhang, C.; Wu, S.; Qin, X. *Materials Letters* **2014**, *132*, 393.
- (91) Özden, E.; Menciloğlu, Y. Z.; Papila, M. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2010**, *2*, 1788.
- (92) Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Badertscher, M. *Structure determination of organic compounds: Tables of spectral data*, 2009.
- (93) Siqueira Petri, D. F.; Wenz, G.; Schunk, P.; Schimmel, T. *Langmuir* **1999**, *15*, 4520.
- (94) Basarir, F.; Yoon, T.-H. *Journal of Colloid and Interface Science* **2009**, *336*, 393.
- (95) De Feijter, J. A.; Benjamins, J.; Veer, F. A. *Biopolymers* **1978**, *17*, 1759.
- (96) Mosmann, T. *Journal of Immunological Methods* **1983**, *65*, 55.
- (97) Fischer, A. H.; Jacobson, K. A.; Rose, J.; Zeller, R. *Cold Spring Harbor Protocols* **2008**, 2008, pdb.prot4988.

-
- (98) Socrates, G.; John, W.; Sons *Infrared and Raman characteristic group frequencies : tables and charts*; John Wiley & Sons: Chichester [etc.], 2013.
- (99) Deitzel, J. M.; Kleinmeyer, J.; Harris, D.; Beck Tan, N. C. *Polymer* **2001**, 42, 261.
- (100) Lina Marcela Duque Sánchez; Leonardo Rodriguez; López, M. *Revista Iberoamericana de Polímeros* **2013**, 14, 17.

CAPÍTULO 6

6. ANEXO

6.1 CARACTERIZACIÓN DE PSMA-Aa

La Figuras 1 y Figuras 2 muestran los espectros FT-IR de los polielectrolitos PSMA-Met y PSMA-Tyr respectivamente.

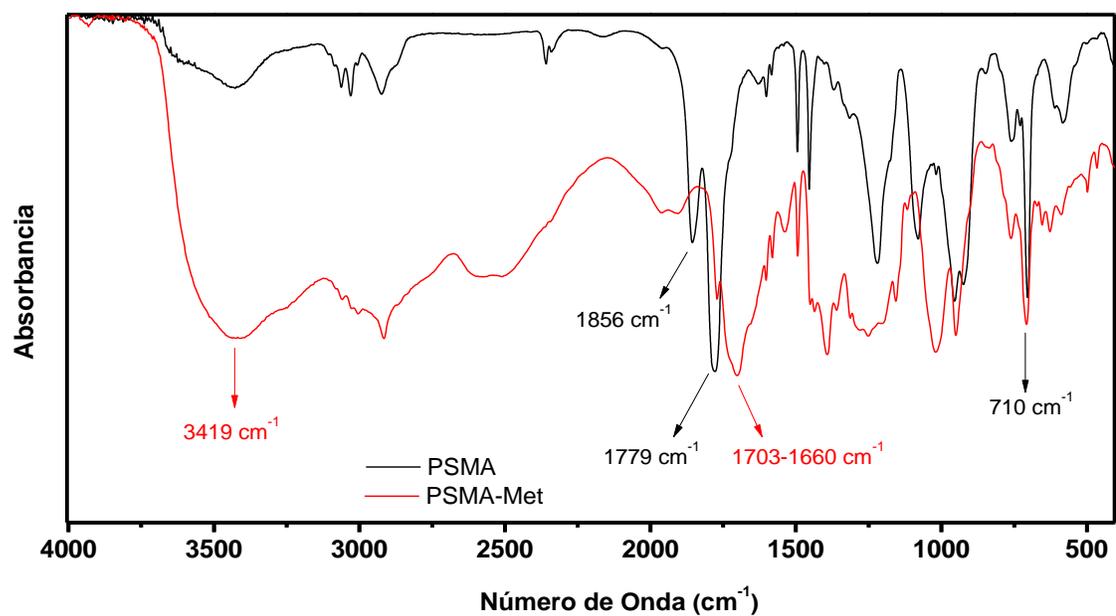


Figura 1. Espectros FT-IR obtenidos para PSMA y PSMA-Met.

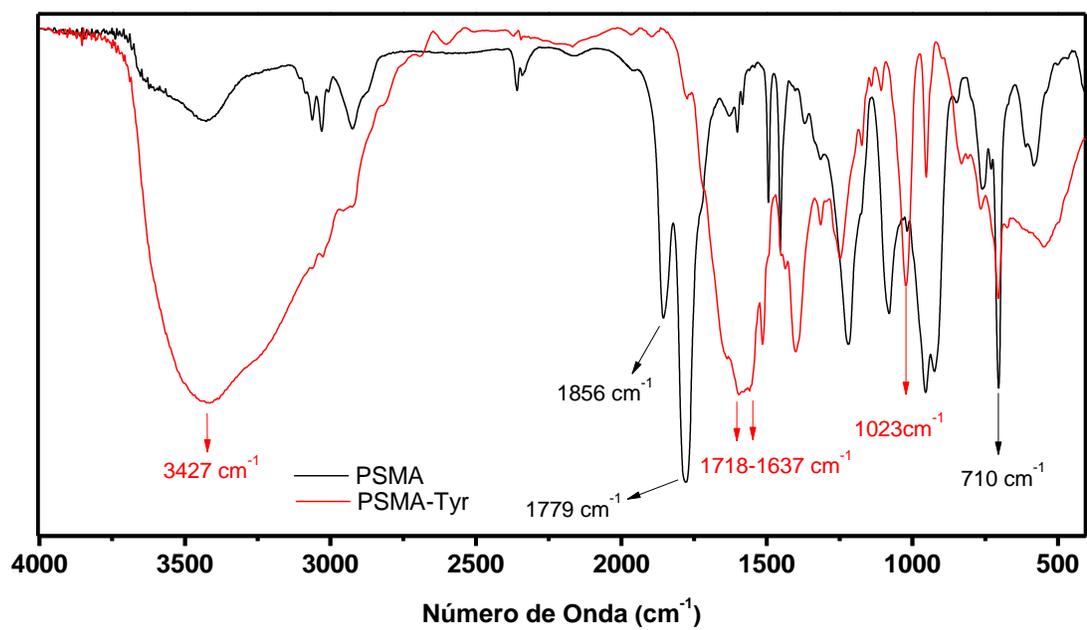


Figura 2. Espectros FT-IR obtenidos para PSMA y PSMA-Tyr.

Los espectros de RMN-¹H obtenidos para PSMA y PSMA-Met se muestran en la Figura 3a y 3b respectivamente, las señales fueron asignadas mediante números a las estructuras correspondientes:

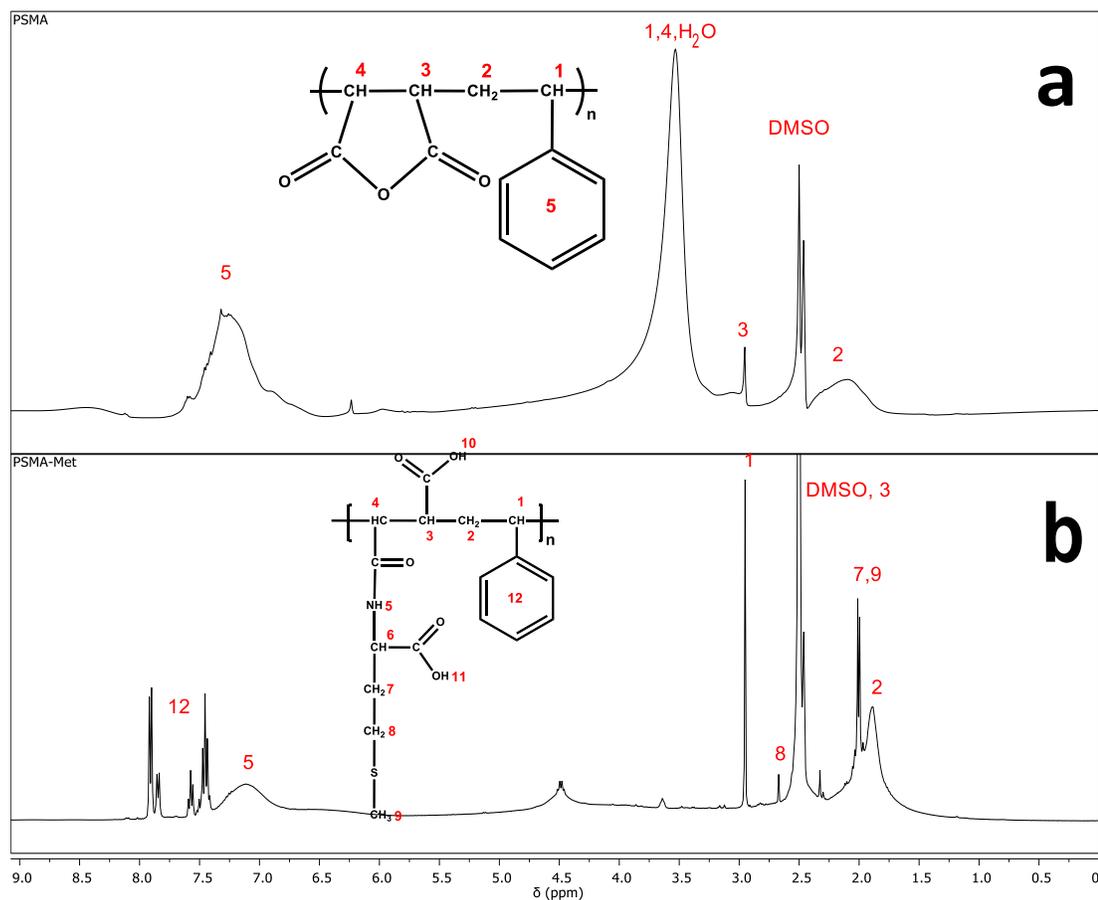


Figura 3. Espectros RMN-¹H obtenidos para a) PSMA y b) PSMA-Met.

Los espectros de RMN-¹H obtenidos para PSMA y PSMA-Tyr se muestran en la Figura 4a y 4b respectivamente, las señales fueron asignadas mediante números a las estructuras correspondientes:

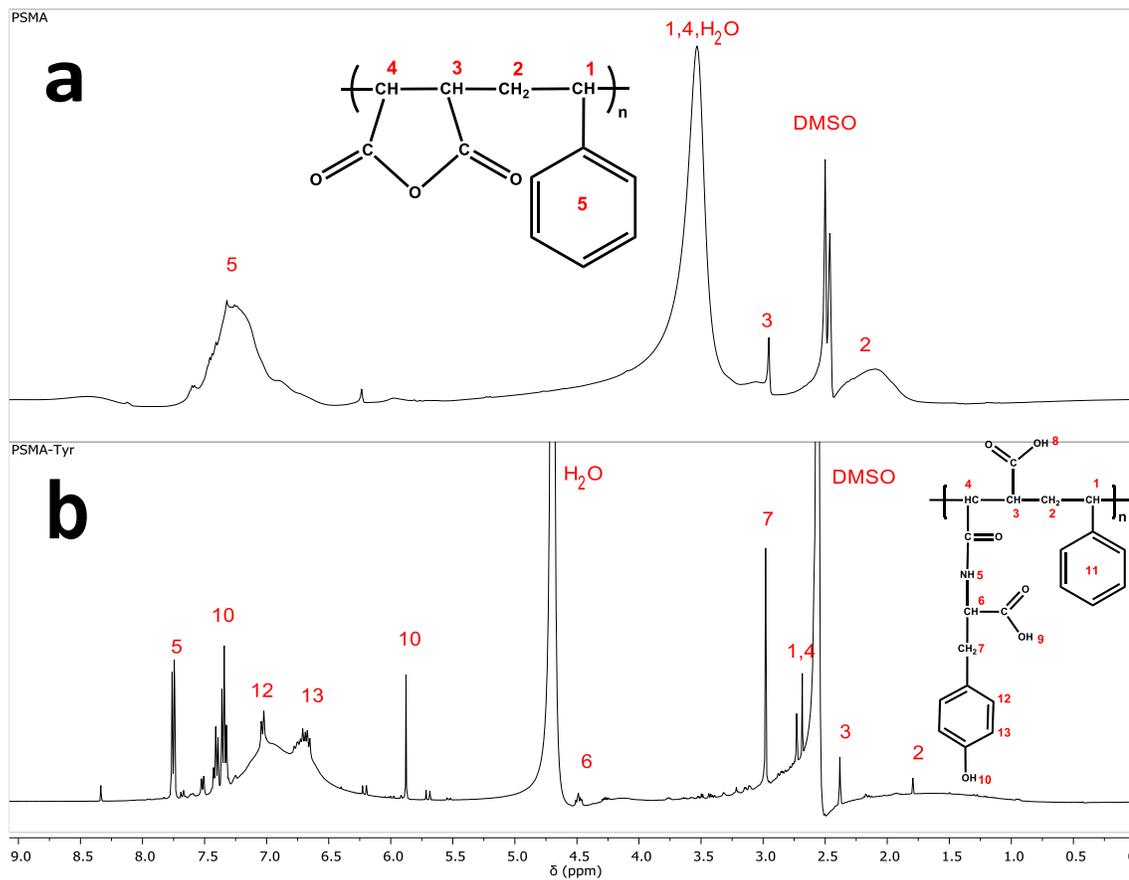


Figura 4. Espectros RMN-¹H obtenidos para a) PSMA y b) PSMA-Tyr.

Los espectros de RMN-¹³C obtenidos para PSMA y PSMA-Met se muestran en la Figura 5a y 5b respectivamente, las señales fueron asignadas mediante números a su correspondiente estructura:

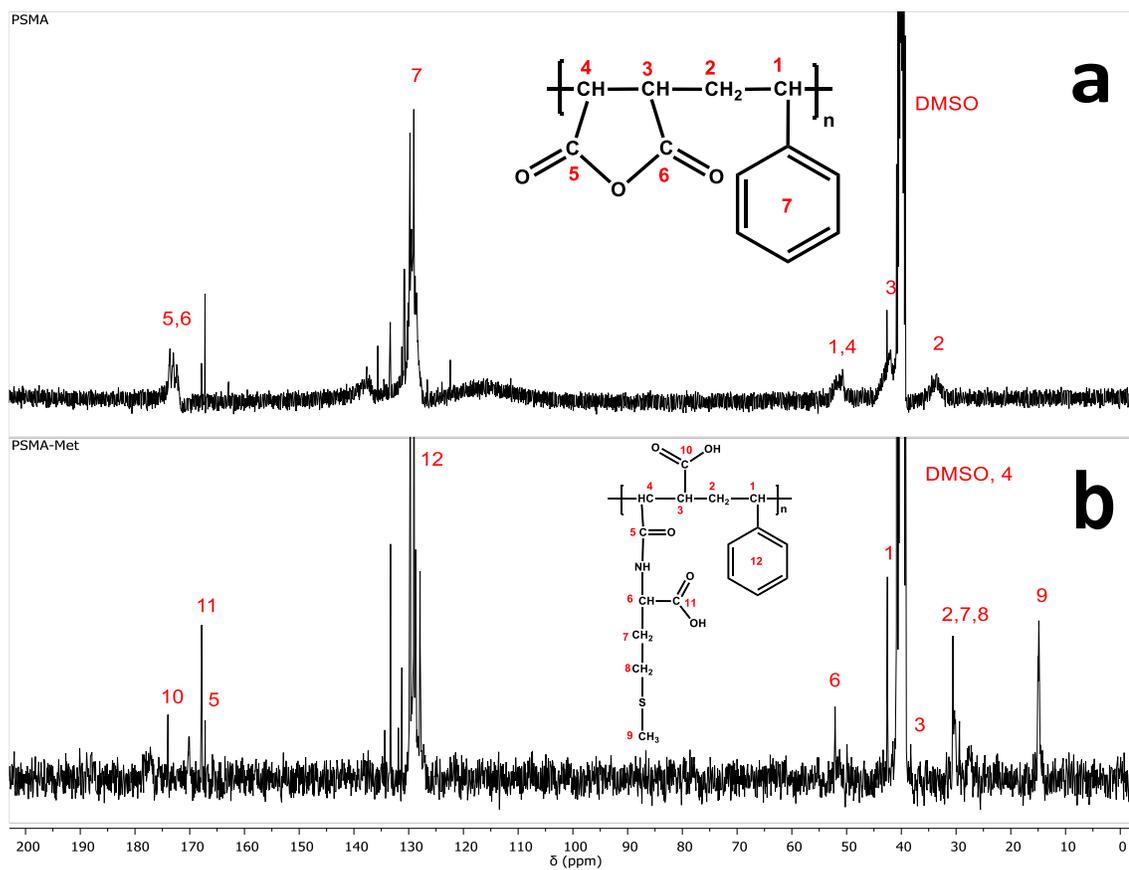


Figura 5. Espectros RMN-¹³C obtenidos para a) PSMA y b) PSMA-Met.

Los espectros de RMN- ^{13}C obtenidos para PSMA y PSMA-Tyr se muestran en la Figura 6a y 6b respectivamente, las señales fueron asignadas mediante números a su correspondiente estructura:

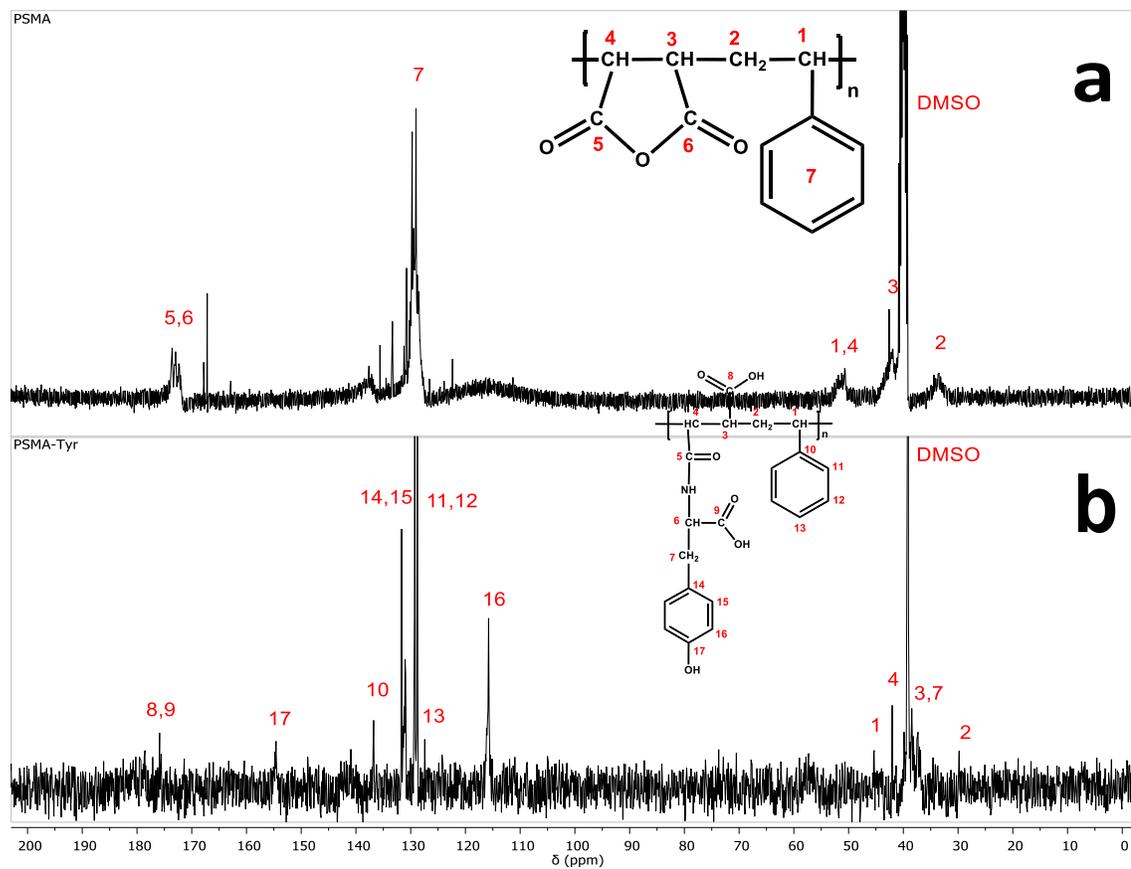


Figura 6. Espectros RMN- ^{13}C obtenidos para a) PSMA y b) PSMA-Tyr.

6.2 DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR Y POLIDISPERSIDAD DE PEMA

Para realizar la curva de calibración, se utilizaron estándares de dextrano 1 mg/mL y agua a pH 7 como disolvente, el flujo se mantuvo constante a una velocidad de 0.3 mL/min. De la curva de calibración se obtuvo un $R = -0.99974$, $A = 9.68486$ y $B = -0.31035$.

Tabla 1. Datos curva de calibración para estándares de dextrano en agua a pH 7.

Peso Molecular (Da)	Tiempo Retención (min)	Volumen Retención (mL)	Log PM
100000	50.28	15.084	5.000
164000	48.09	14.427	5.215
236000	46.28	13.884	5.373
333000	44.70	13.410	5.522

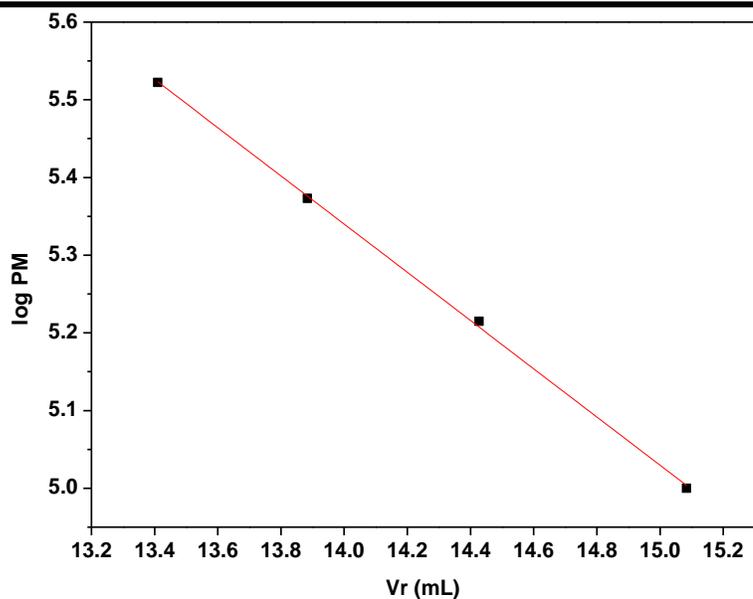


Figura 7. Curva de calibración estándares dextrano en agua a pH 7.

Se utilizaron estándares de dextrano 1 mg/mL, utilizando tampón fosfato pH 7 como disolvente, velocidad de flujo 0,3 mL/min. De la curva de calibración se obtuvo un $R = -0.98244$, $A = 9.41856$ y $B = -0.2775$.

Tabla 2. Datos Curva de Calibración estándares dextrano en tampón fosfato a pH 7.

Peso Molecular (Da)	Tiempo Retención (min)	Volumen Retención (mL)	Log PM
100000	52,55	15,765	5,000
164000	50,96	15,288	5,215
236000	48,96	14,688	5,373
333000	46,44	13,932	5,522

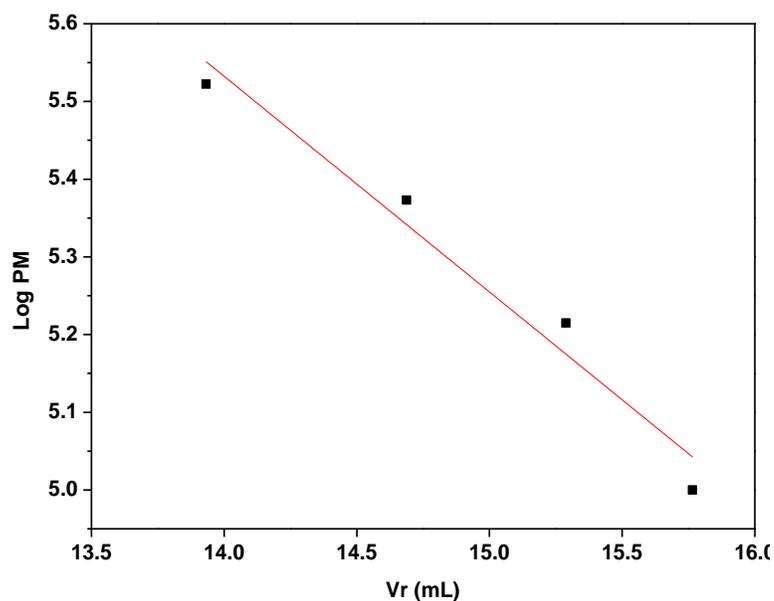


Figura 8. Curva de calibración estándares dextrano en tampón fosfato a pH 7.

Se utilizaron estándares de dextrano 1 mg/mL, utilizando solución 0.3 M de NaCl como disolvente, flujo 0.3 mL/min. De la curva de calibración se obtiene un $R = -0.97006$, $A = 9.6914$ y $B = -0.30898$.

Tabla 3. Datos Curva de Calibración estándares dextrano en solución 0.3 M de NaCl.

Peso Molecular (Da)	Tiempo Retención (Min)	Volumen Retención (mL)	Log PM
100000	49,810	14,943	5,000
164000	49,258	14,770	5,215
236000	46,560	13,950	5,373
333000	44,920	13,477	5,522

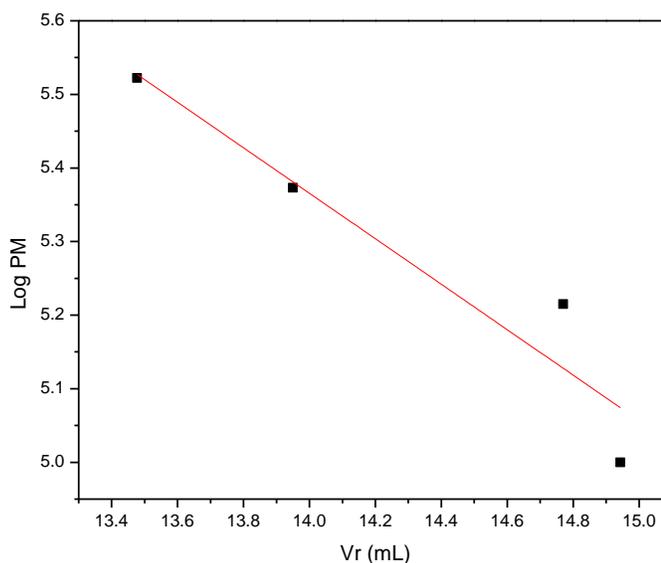


Figura 9. Curva de calibración estándares dextrano en solución 0.3 M de NaCl.

Luego de realizar las 3 curvas de calibración con los diferentes eluyentes, se procedió a determinar el peso molecular del PEMA sin neutralizar (PEMA Hid) y PEMA

neutralizado (PEMA Neu). De los cromatogramas entregados por el equipo, se obtuvieron los tiempos de retención con los cuales se calcula el volumen de retención y posteriormente el PM

Tabla 4. Resumen determinación del PM de PEMA.

Muestra	Eluyente	Tr (min)	Vr (mL)	PM	Observación
PEMA Neu	Agua	34,31	10,29	≈3000000	Peso molecular muy alto.
PEMA Hid	Agua	-----	-----	-----	No aparece señal en el cromatograma.
PEMA Hid	Agua	44,09	13,227	≈376000	Concentración de polímero 2mg/mL.
PEMA Hid	LiCl 0.3 M	-----	-----	-----	No aparece señal en el cromatograma.
PEMA Hid	Tampón	-----	-----	-----	Se pierde línea de base, señal muy ancha
PEMA Hid	Tampón	-----	-----	-----	Duplica concentración, no aparece nada.
PEMA Hid	Tampón	46,33	13,932		
PEMA Neu	Tampón	(1) 49,98 (2) 42,40	14,994 12,720	≈1000000 ≈660000	Cromatograma Bimodal.
PEMA Neu	NaCl 0.3 M	28,7575	8,596	≈1000000 0	Peso molecular muy alto.

6.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PEMA-Aa

Las Figuras 10-14 muestran los espectros FT-IT obtenidos para los polielectrolitos PEMA-Arg, PEMA-Cys, PEMA-Leu, PEMA-Met y PEMA-Tyr, respectivamente, comparados con el espectro FT-IR del PEMA.

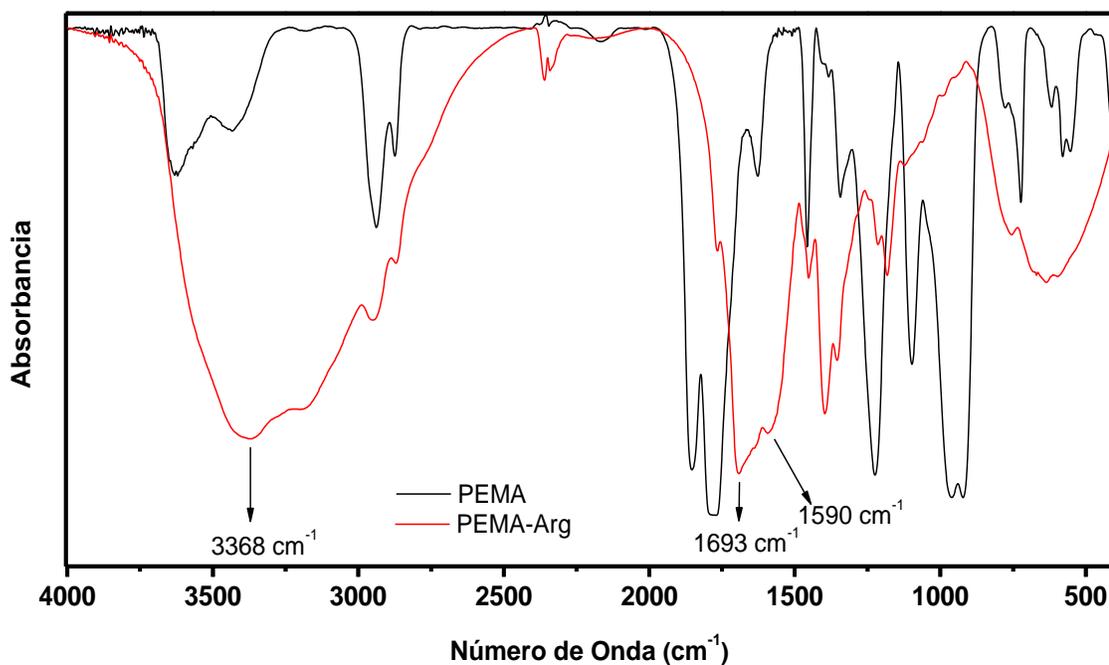


Figura 10. Espectros FT-IR obtenidos para PEMA y PEMA-Arg.

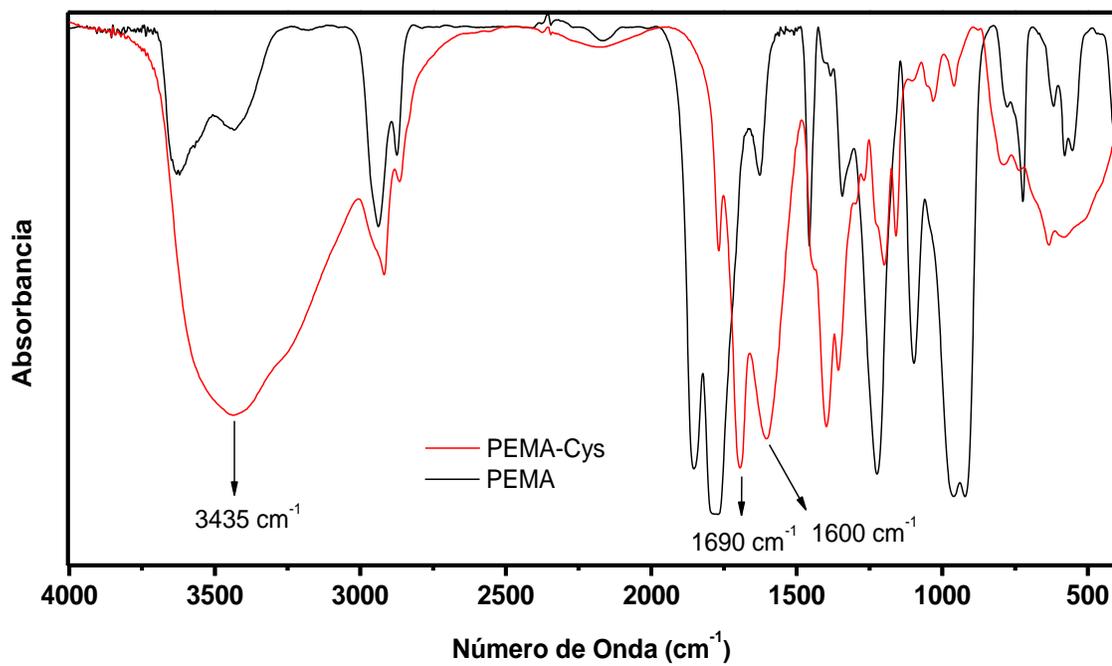


Figura 11. Espectros FT-IR obtenidos para PEMA y PEMA-Cys.

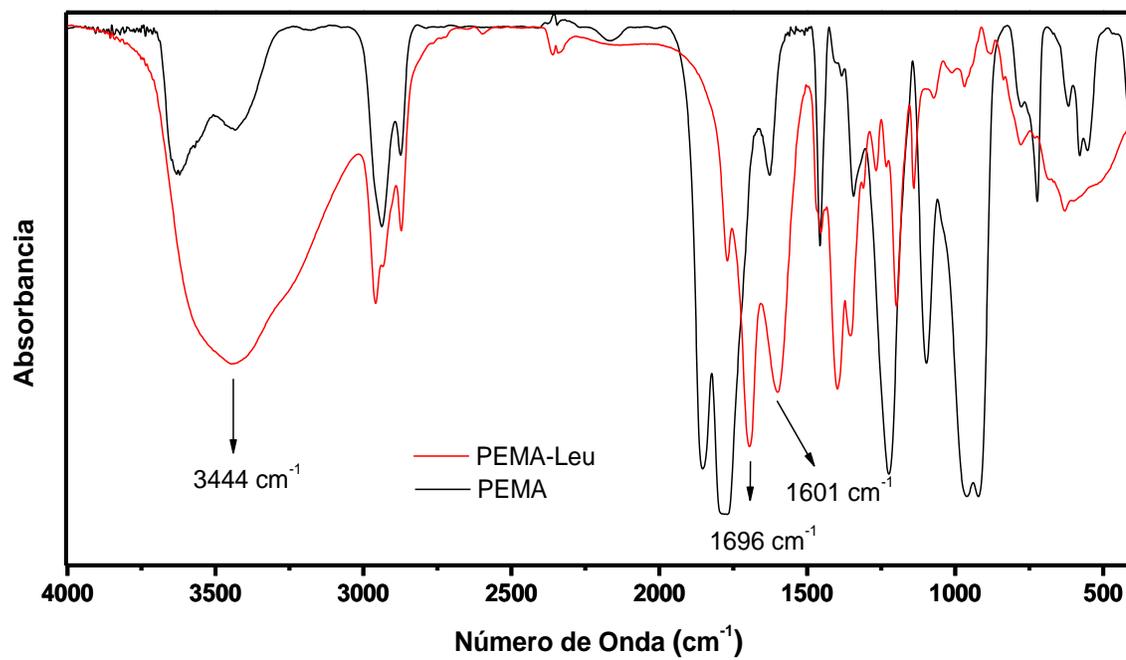


Figura 12. Espectros FT-IR obtenidos para PEMA y PEMA-Leu.

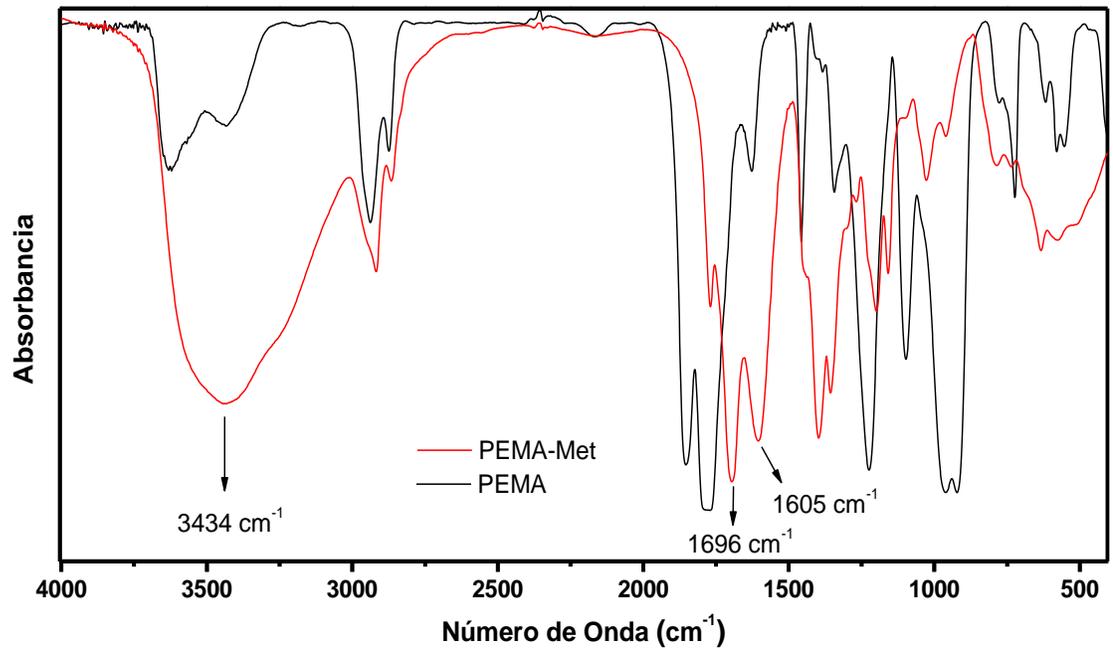


Figura 13. Espectros FT-IR obtenidos para PEMA y PEMA-Met.

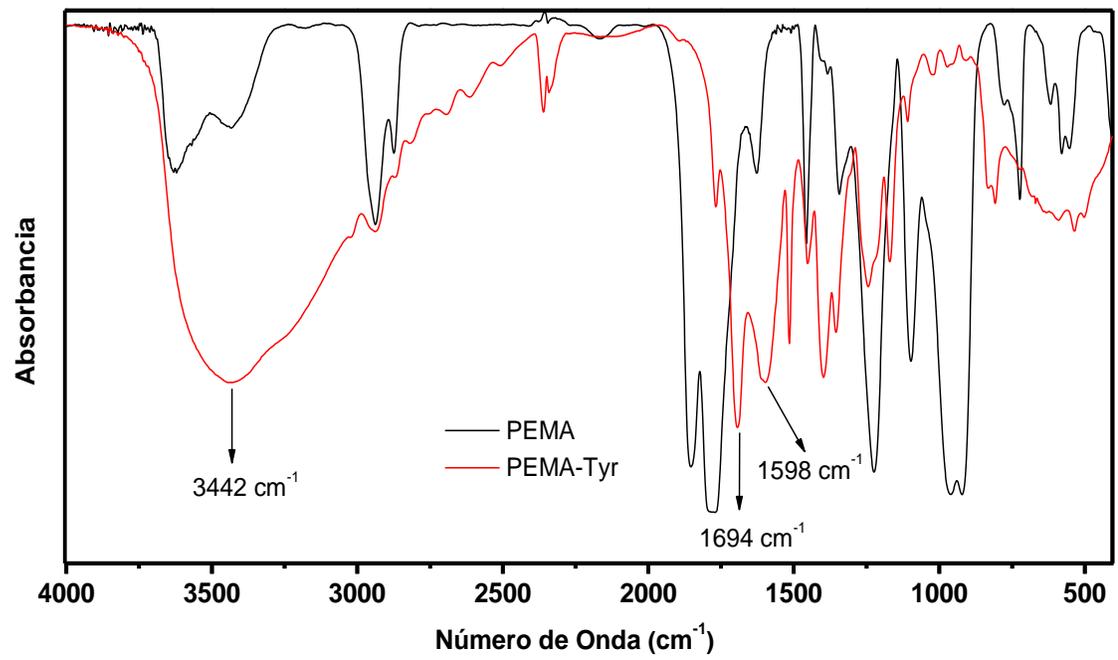


Figura 14. Espectros FT-IR obtenidos para PEMA y PEMA-Tyr.

Los espectros de RMN-¹H obtenidos para PEMA y PEMA-Arg se muestran en la Figura 15a y 15b respectivamente, las señales fueron asignadas mediante letras a las estructuras correspondientes:

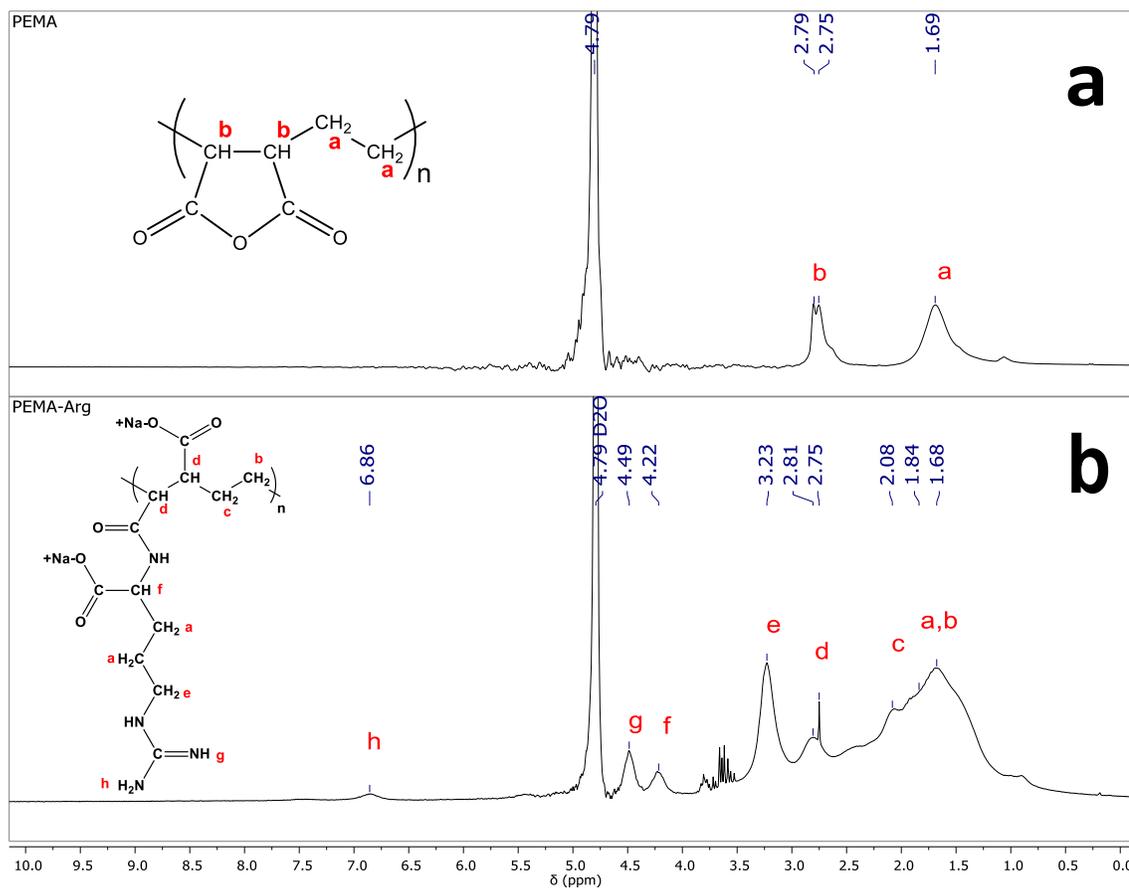


Figura 15. Espectros RMN-¹H obtenidos para a) PEMA y b) P-Arg.

Los espectros de RMN-¹H obtenidos para PEMA y PEMA-Cys se muestran en la Figura 16a y 16b respectivamente, las señales fueron asignadas mediante letras a las estructuras correspondientes:

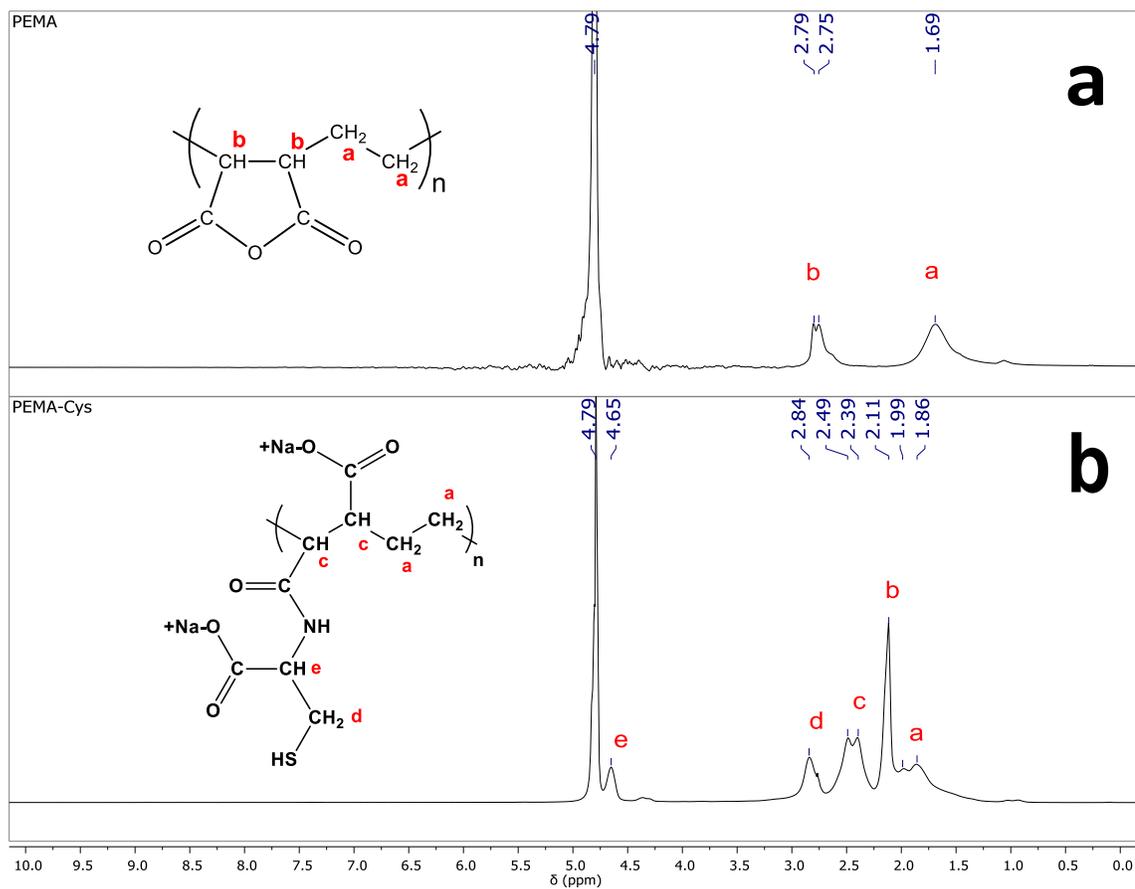


Figura 16. Espectros RMN-¹H obtenidos para a) PEMA y b) P-Cys.

Los espectros de RMN-¹H obtenidos para PEMA y PEMA-Leu se muestran en la Figura 17a y 17b respectivamente, las señales fueron asignadas mediante letras a las estructuras correspondientes:

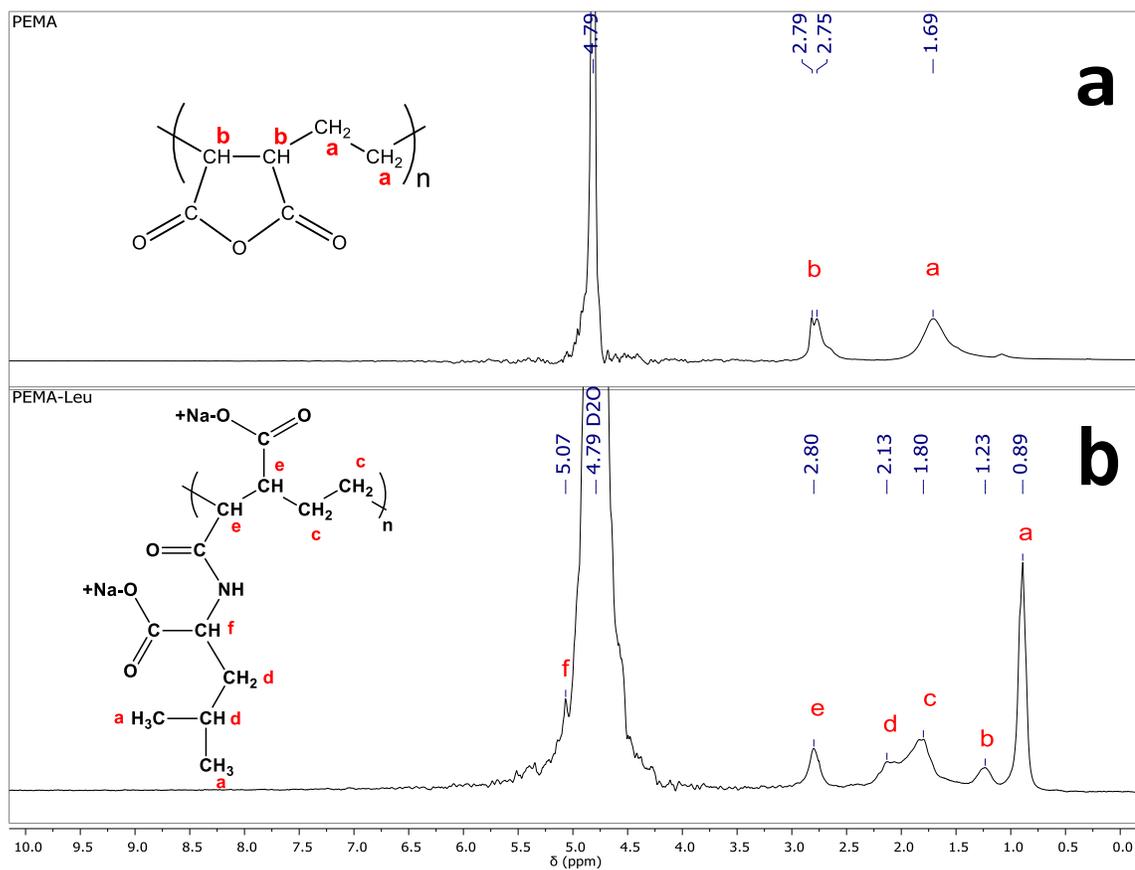
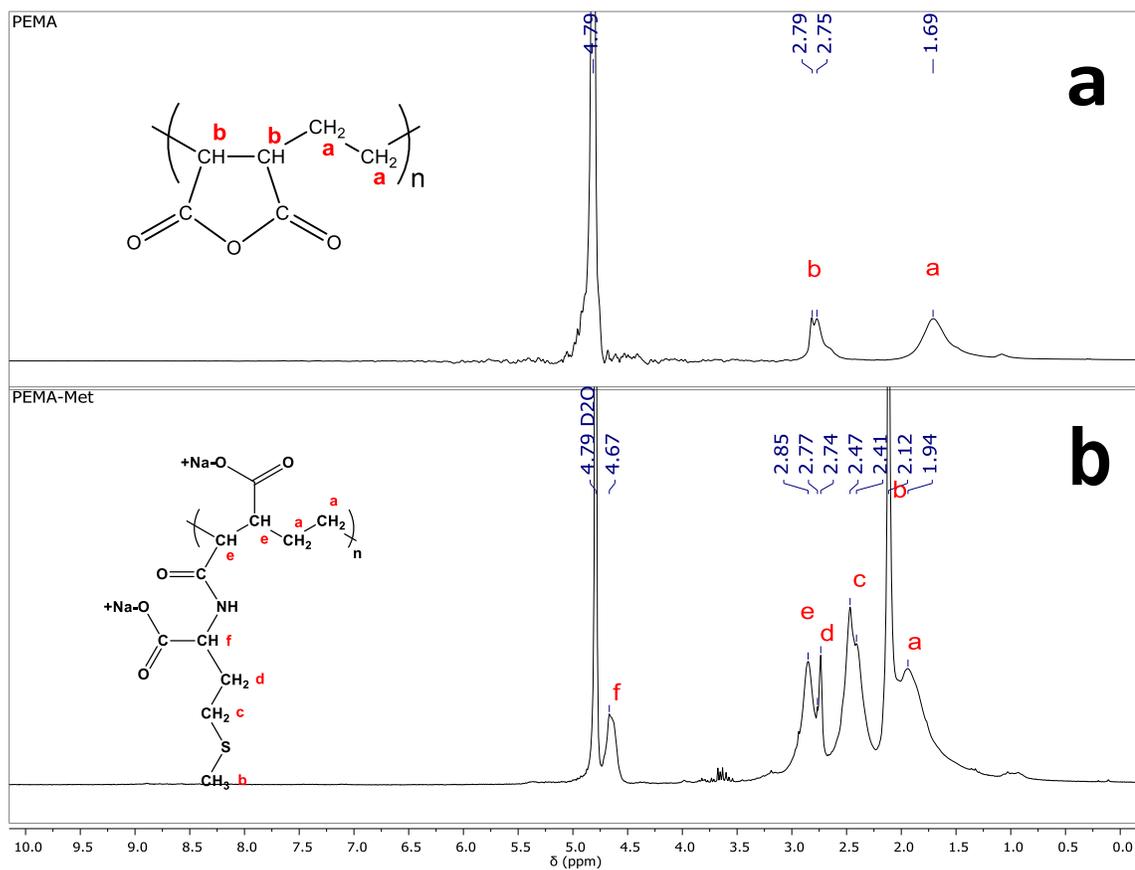


Figura 17. Espectros RMN-¹H obtenidos para a) PEMA y b) PEMA-Leu.

Los espectros de RMN-¹H obtenidos para PEMA y PEMA-Met se muestran en la Figura 18a y 18b respectivamente, las señales fueron asignadas mediante letras a las estructuras correspondientes:



Los espectros de RMN-¹H obtenidos para PEMA y PEMA-Tyr se muestran en la Figura 19a y 19b respectivamente, las señales fueron asignadas mediante letras a las estructuras correspondientes:

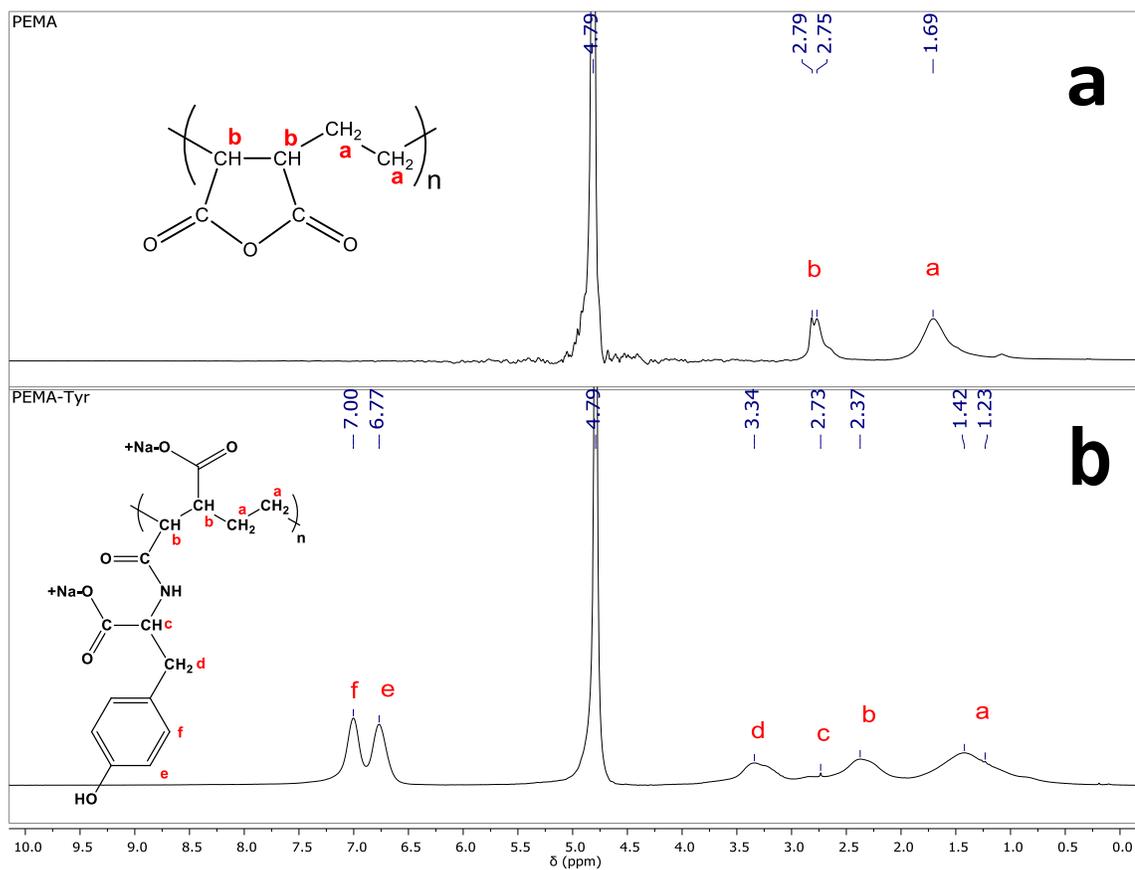


Figura 19. Espectros RMN-¹H obtenidos para a) PEMA y b) PEMA-Tyr.

Los espectros de RMN- ^{13}C obtenidos para PEMA y PEMA-Arg se muestran en la Figura 20a y 20b respectivamente, las señales fueron asignadas mediante letras a su correspondiente estructura:

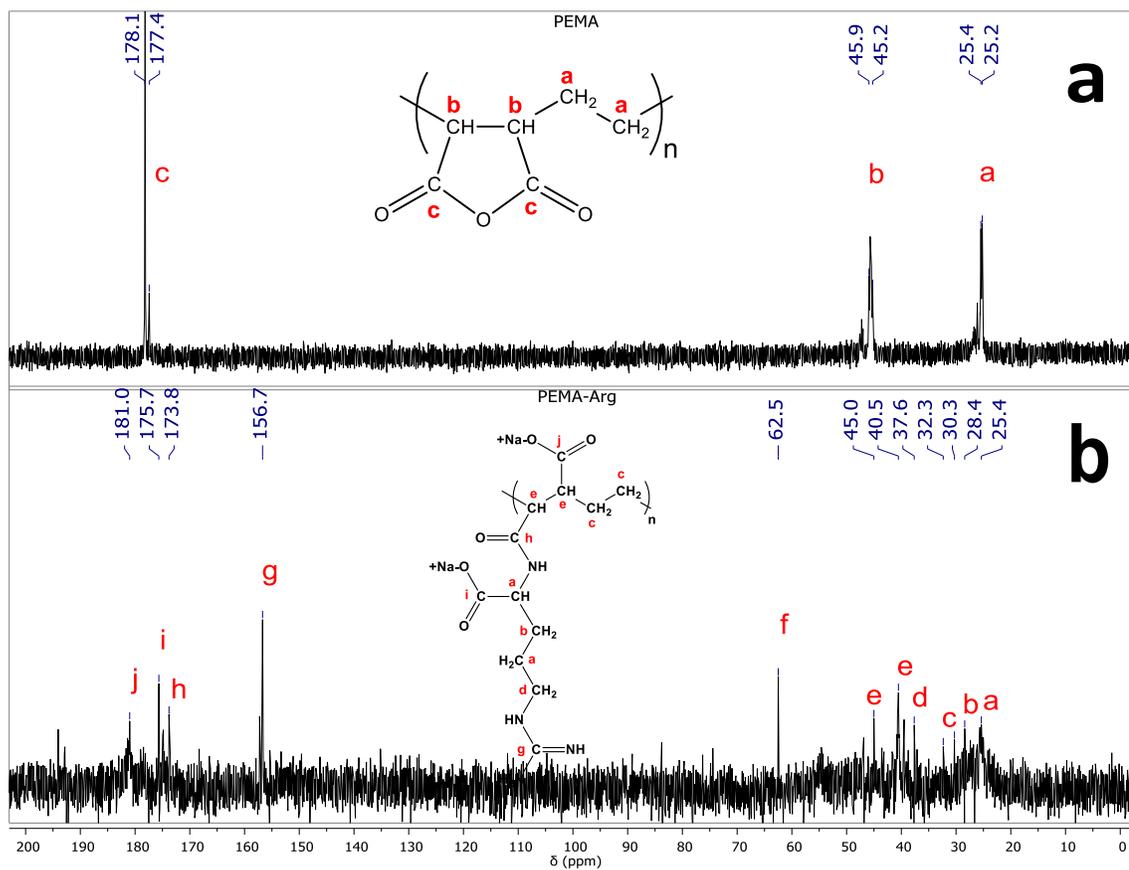


Figura 20. Espectros RMN- ^{13}C obtenidos para a) PEMA y b) PEMA-Arg.

Los espectros de RMN- ^{13}C obtenidos para PEMA y PEMA-Cys se muestran en la Figura 21a y 21b respectivamente, las señales fueron asignadas mediante letras a su correspondiente estructura:

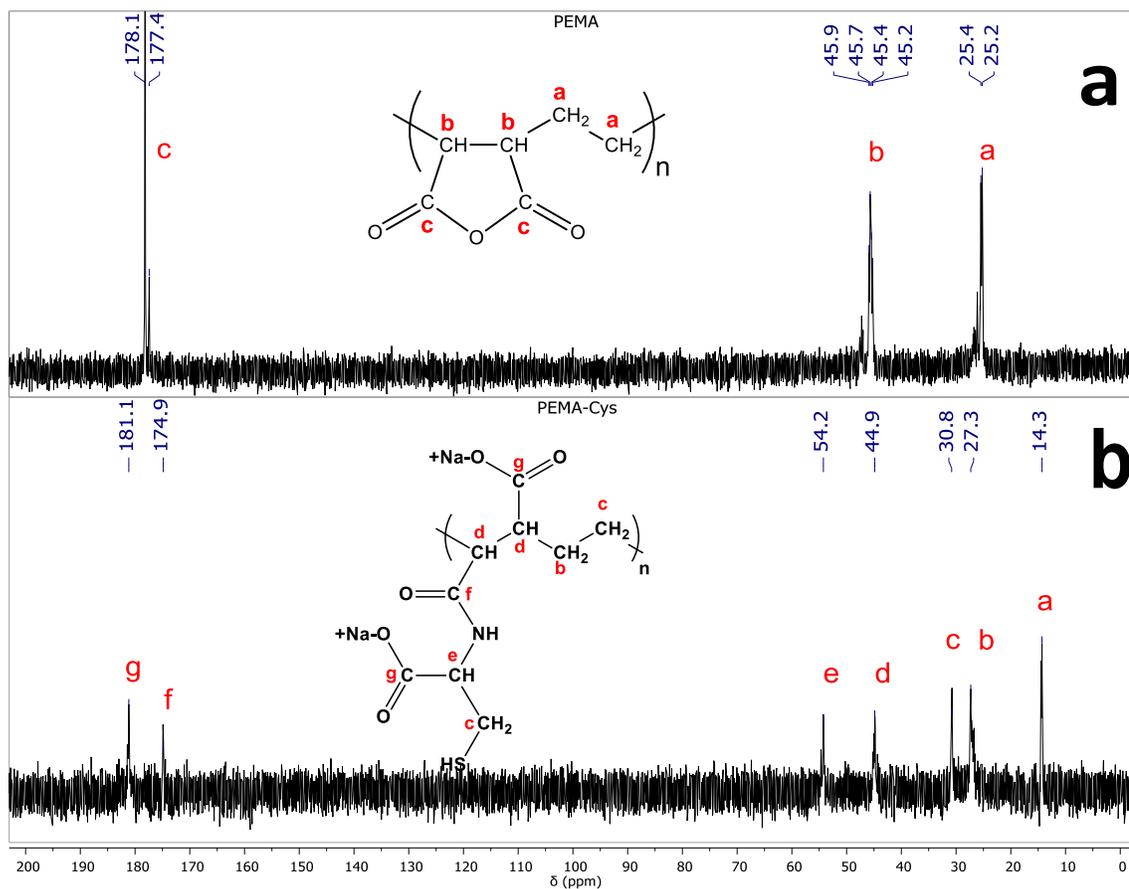


Figura 21. Espectros RMN- ^{13}C obtenidos para a) PEMA y b) PEMA-Cys.

Los espectros de RMN- ^{13}C obtenidos para PEMA y PEMA-Leu se muestran en la Figura 22a y 22b respectivamente, las señales fueron asignadas mediante letras a su correspondiente estructura:

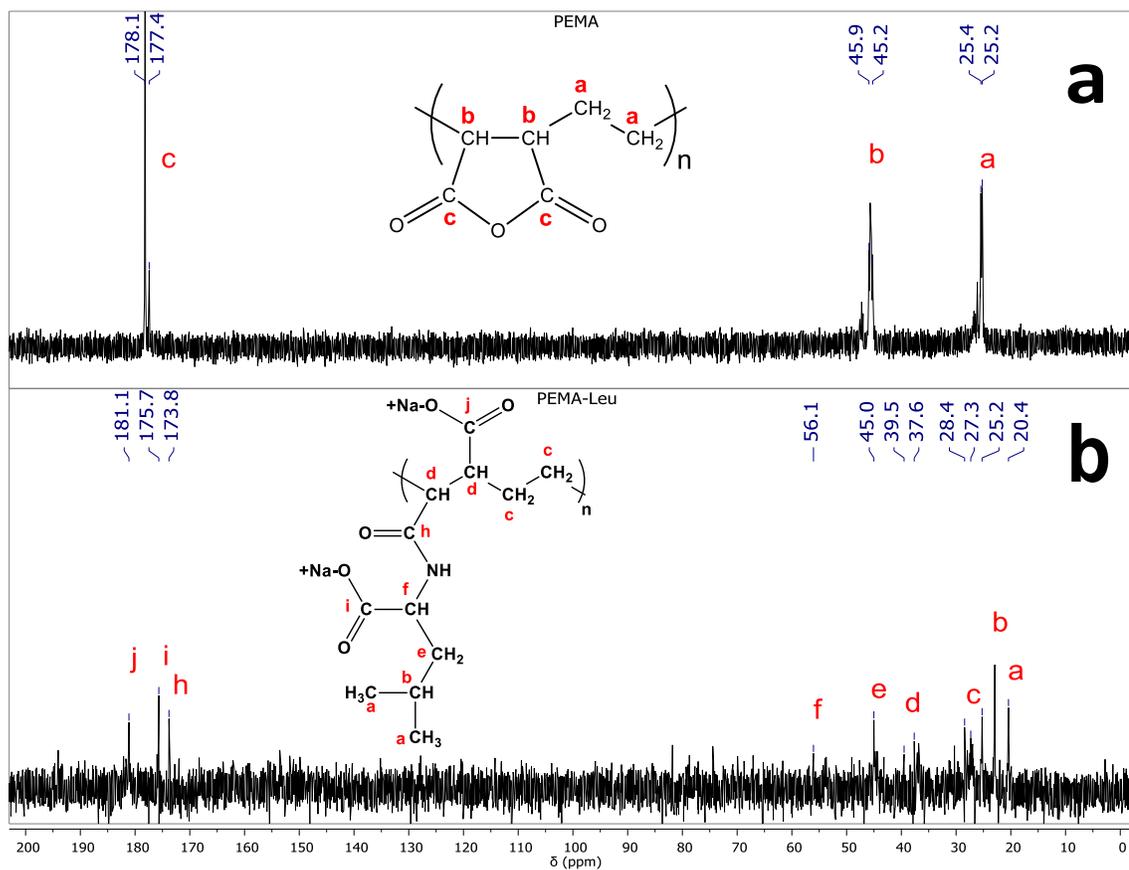


Figura 22. Espectros RMN- ^{13}C obtenidos para a) PEMA y b) PEMA-Leu.

Los espectros de RMN- ^{13}C obtenidos para PEMA y PEMA-Met se muestran en la Figura 23a y 23b respectivamente, las señales fueron asignadas mediante letras a su correspondiente estructura:

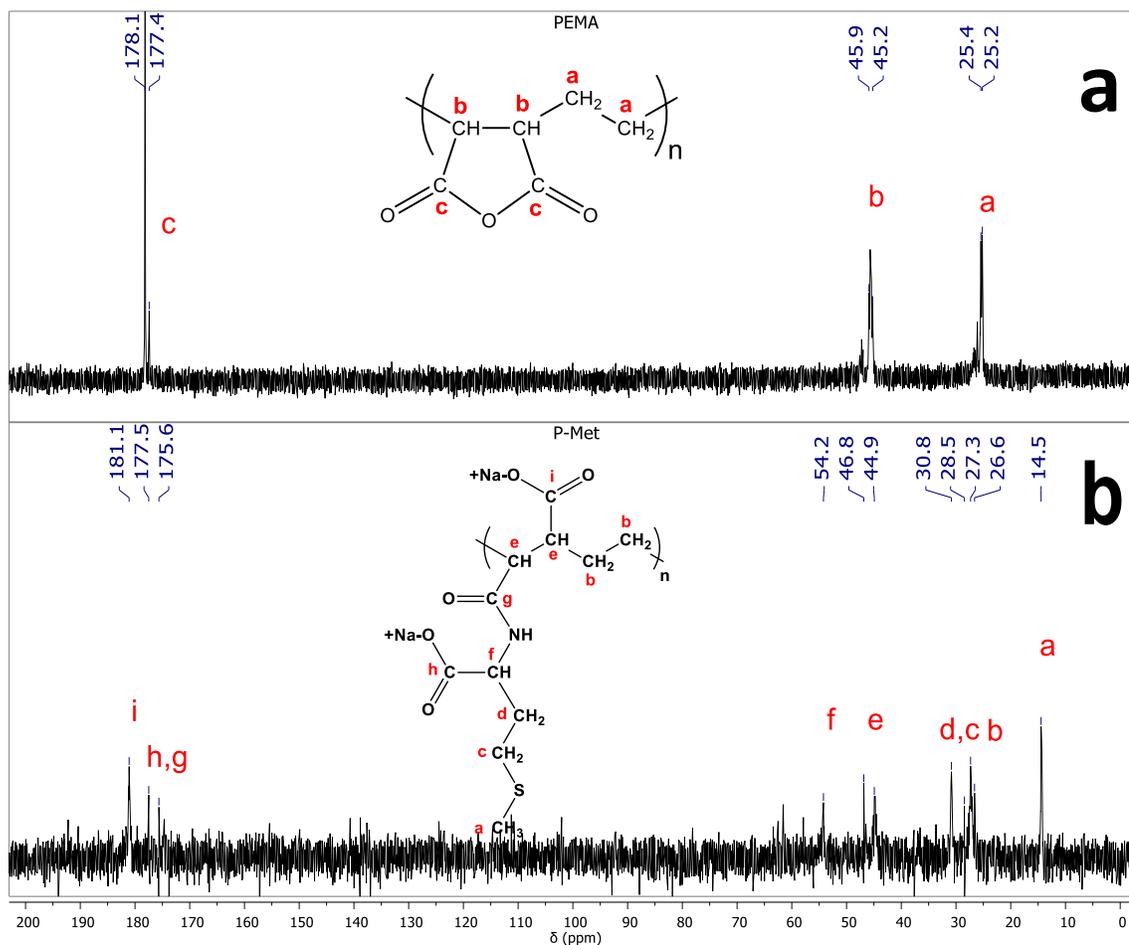


Figura 23. Espectros RMN- ^{13}C obtenidos para a) PEMA y b) PEMA-Met.

Los espectros de RMN- ^{13}C obtenidos para PEMA y PEMA-Tyr se muestran en la Figura 24a y 24b respectivamente, las señales fueron asignadas mediante letras a su correspondiente estructura:

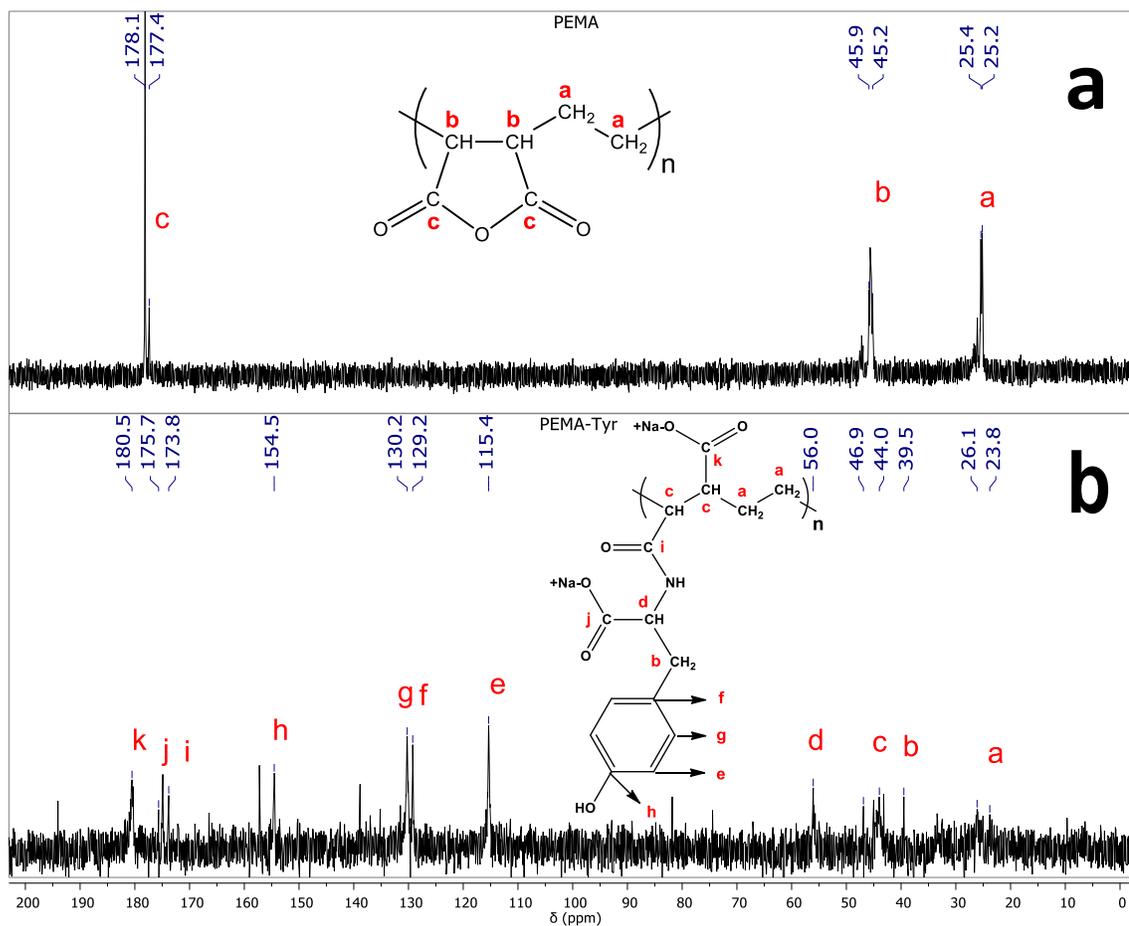


Figura 24. Espectros RMN- ^{13}C obtenidos para a) PEMA y b) PEMA-Tyr.

6.3.1 Determinación de los pK_a.

Las curvas de titulación potenciométrica de los polielectrolitos PEMA-Cys, PEMA-Leu, PEMA-Met y PEMA-Tyr, se muestra en las Figuras 25, 26, 27 y 28 respectivamente.

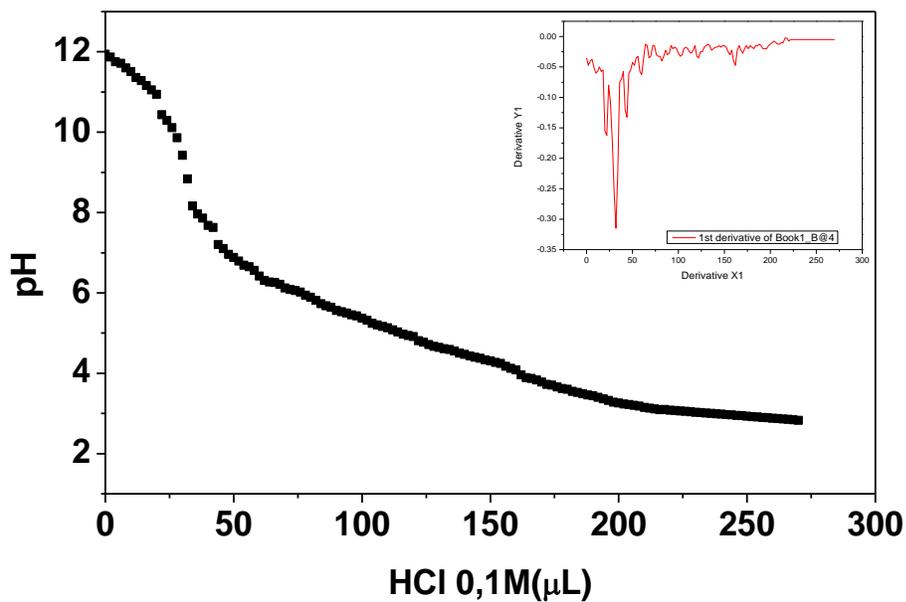


Figura 25. Curva de titulación potenciométrica de PEMA-Cys.

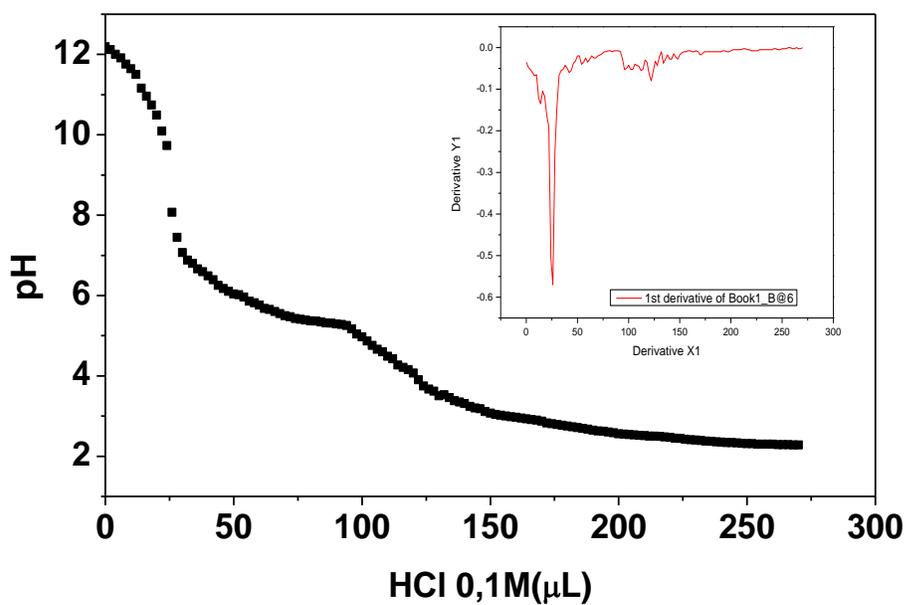
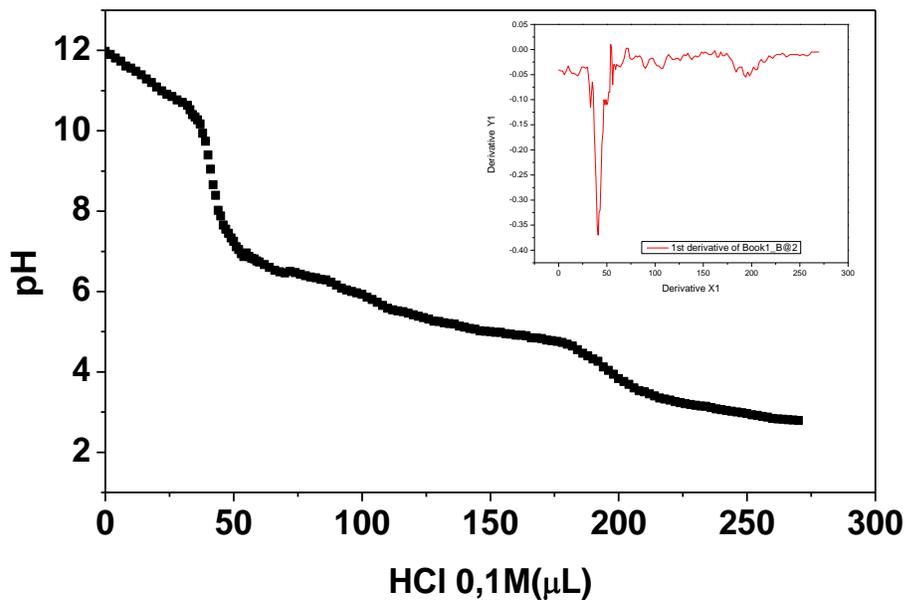
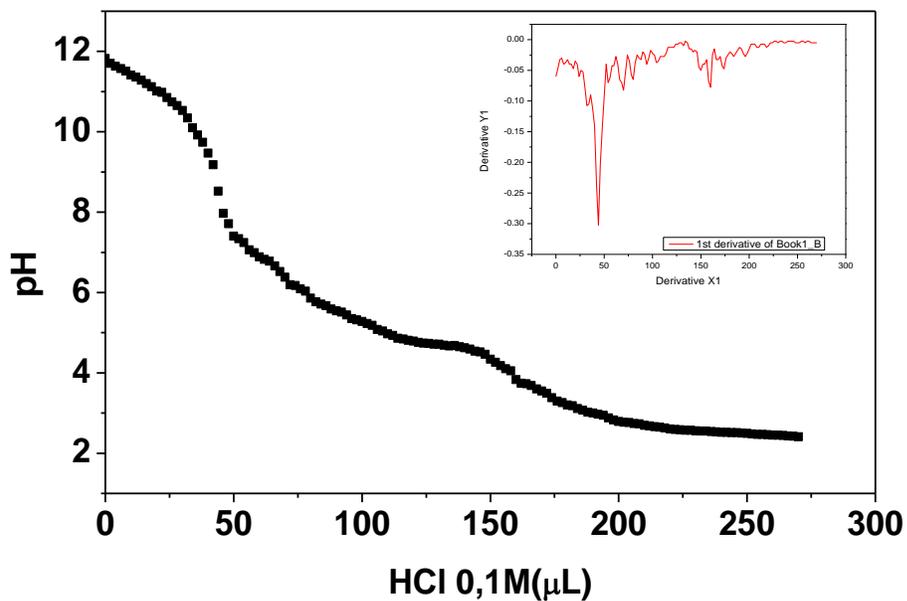


Figura 26. Curva de titulación potenciométrica de PEMA-Leu.**Figura 27.** Curva de titulación potenciométrica de PEMA-Met.**Figura 28.** Curva de titulación potenciométrica de PEMA-Tyr.

6.4 DETERMINACIÓN DE INTERACCIONES EN LAS MEZCLAS PEMA-Aa/POE.

6.4.1.1 Espectroscopía FT-IR.

La Figura 29 muestra los espectros FT-IR obtenidos para la mezcla PEMA-Arg/POE (20%/10% p/v) en distintas proporciones y de sus componentes puros.

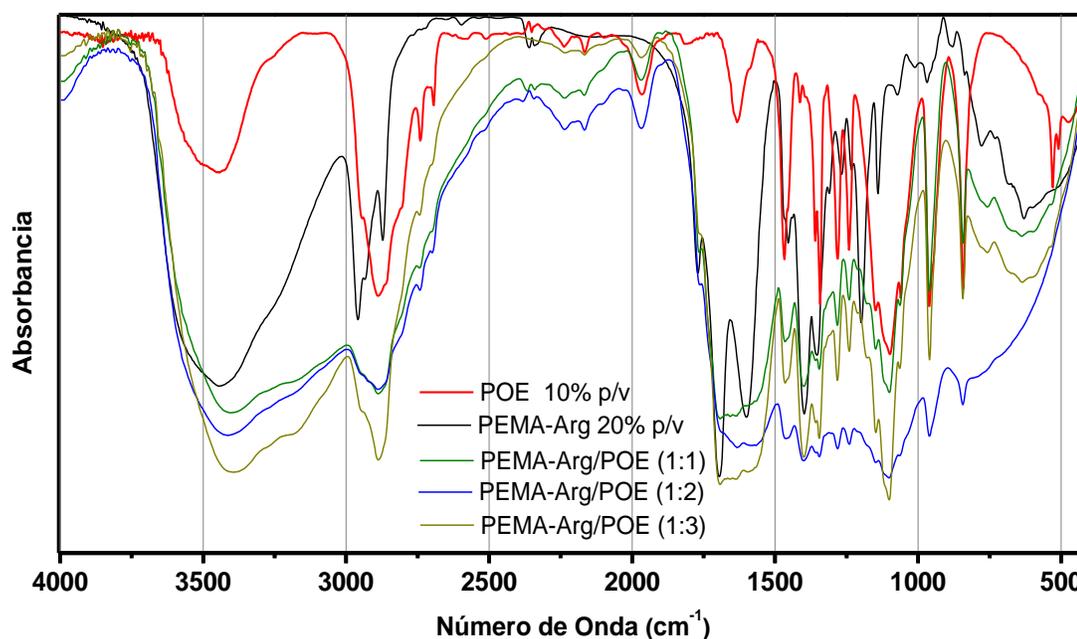


Figura 29. Espectros FT-IR de PEMA-Arg/POE (20%/10% p/v) en proporciones 1:1, 1:2 y 1:3 y de sus componentes puros.

En este caso se sigue las señales correspondientes a los grupos C=O de los grupos carboxilatos y amida que originalmente aparecen en 1692, 1604 y 1597 cm⁻¹ para PEMA-Arg. Estas señales características presentan pequeños desplazamientos cuando se encuentra mezclados con POE. Para las mezclas PEMA-Arg/POE 1:1 aparecen en 1636 y

1589 cm^{-1} , mientras que para PEMA-Arg/POE 1:2 estas señales aparecen en 1633 y 1585 cm^{-1} y para PEMA-Arg/POE 1:3 estas señales aparecen en 1633 y 1588 cm^{-1} . El mayor desplazamiento se observa cuando el polielectrolito pasa de estar puro a mezclarse en partes iguales con POE, esto indica que sí existen interacciones entre ambos componentes, posiblemente interacciones de puente de hidrogeno entre las cadenas -OH terminales del POE y los grupos C=O de los carboxilatos del PEMA-Arg.

La Figura 30 muestra los espectros FT-IR obtenidos para la mezcla PEMA-Leu/POE (20%/10% p/v) en distintas proporciones y de sus componentes puros.

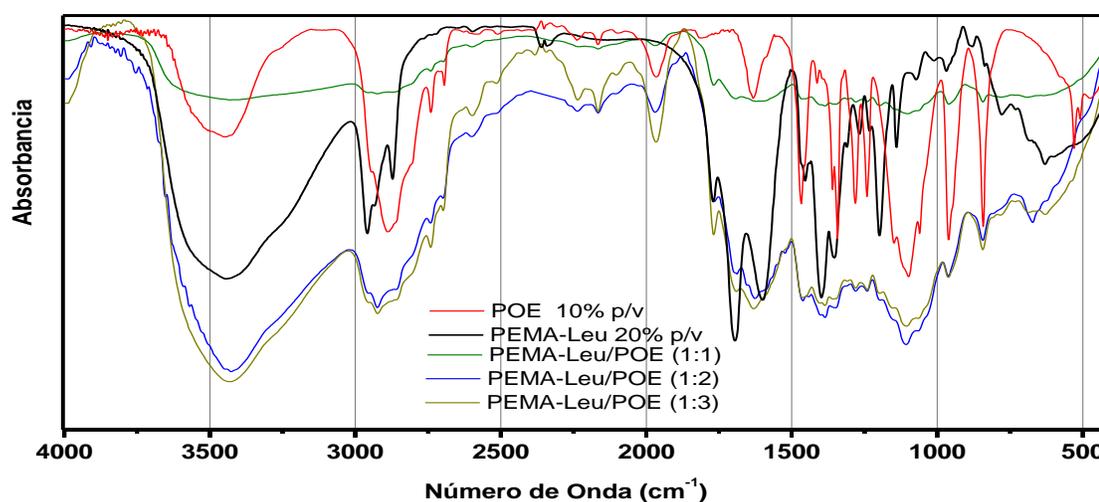


Figura 30. Espectros FT-IR de PEMA-Leu/POE (20%/10% p/v) en proporciones 1:1, 1:2 y 1:3 y de sus componentes puros.

En este caso se sigue las señales correspondientes a los grupos C=O de los grupos carboxilatos y amida que originalmente aparecen en 1696 y 1601 cm^{-1} para PEMA-Leu. Estas señales características presentan pequeños desplazamientos cuando se encuentran mezclados con POE. Para las mezclas PEMA-Leu/POE 1:1 aparecen en 1693 y 1623 cm^{-1}

¹, mientras que para PEMA-Leu/POE 1:2 estas señales aparecen en 1688 y 1623 cm^{-1} y para PEMA-Leu/POE 1:3 estas señales aparecen en 1687 y 1632 cm^{-1} . El mayor desplazamiento se observa cuando el polielectrolito pasa de estar puro a mezclarse en partes iguales con POE, esto indica que sí existen interacciones entre ambos componentes, posiblemente interacciones de puente de hidrogeno entre las cadenas -OH terminales del POE y los grupos C=O de los carboxilatos del PEMA-Leu.

La Figura 31 muestra los espectros FT-IR obtenidos para la mezcla PEMA-Met/POE (20%/10% p/v) en distintas proporciones y de sus componentes puros.

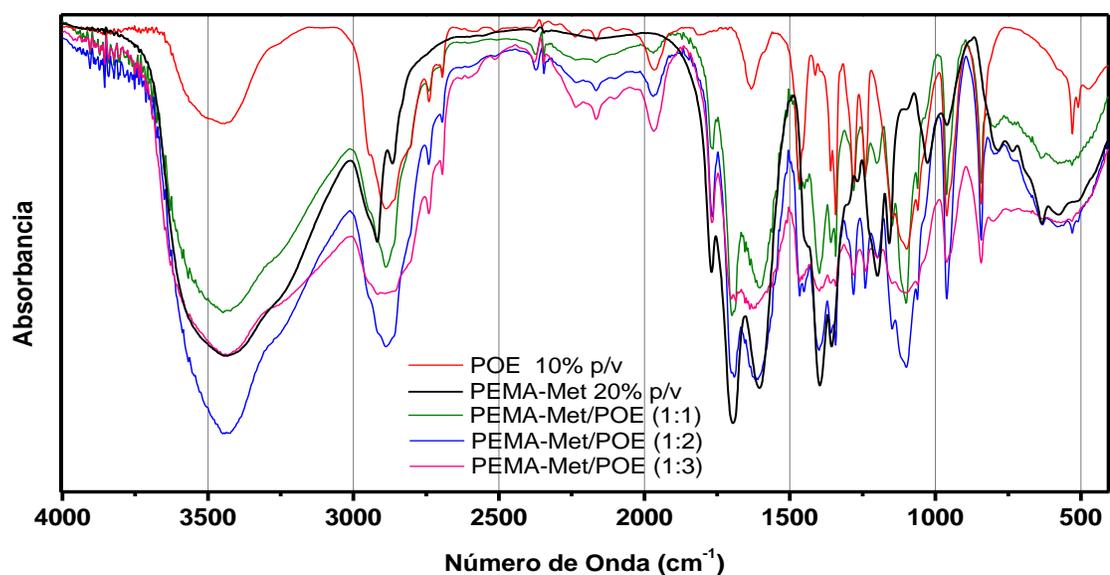


Figura 31. Espectros FT-IR de PEMA-Met/POE (20%/10% p/v) en proporciones 1:1, 1:2 y 1:3 y de sus componentes puros.

En este caso se sigue las señales correspondientes a los grupos C=O de los grupos carboxilatos y amida que originalmente aparecen en 1696 y 1605 cm^{-1} para PEMA-Met. Estas señales características presentan pequeños desplazamientos cuando se encuentra

mezclados con POE. Para las mezclas PEMA-Met/POE 1:1 aparecen en 1699, 1655 y 1604 cm^{-1} , mientras que para PEMA-Met/POE 1:2 estas señales aparecen en 1691 y 1618 cm^{-1} y para PEMA-Met/POE 1:3 estas señales aparecen en 1696 y 1637 cm^{-1} .

La Figura 32 muestra los espectros FT-IR obtenidos para la mezcla PEMA-Tyr/POE (20%/10% p/v) en distintas proporciones y de sus componentes puros.

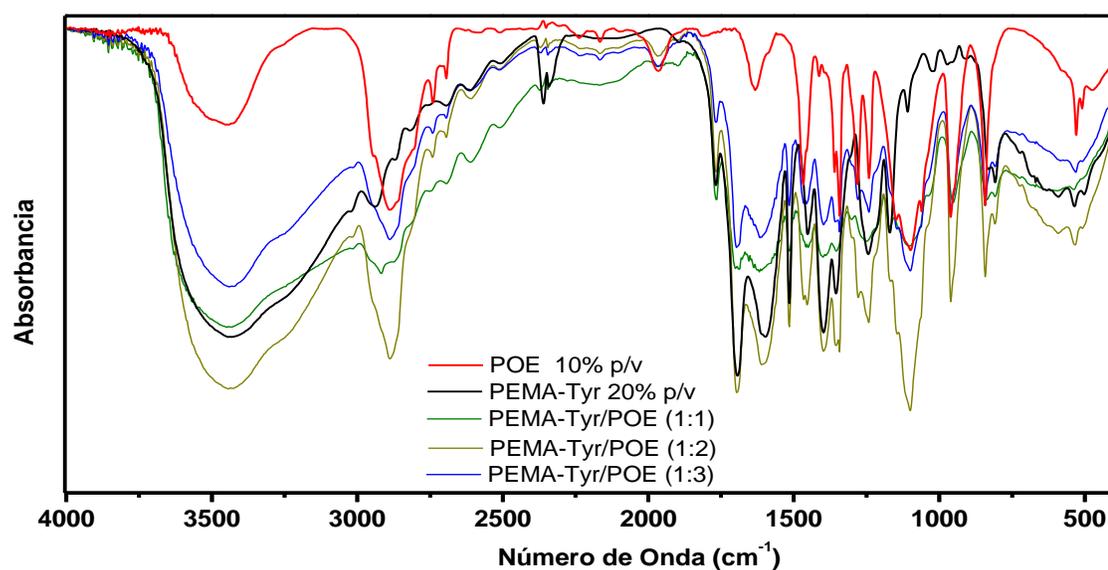


Figura 32. Espectros FT-IR de PEMA-Tyr/POE (20%/10% p/v) en proporciones 1:1, 1:2 y 1:3 y de sus componentes puros.

En este caso se sigue las señales correspondientes a los grupos C=O de los grupos carboxilatos y amida que originalmente aparecen en 1693 y 1598 cm^{-1} para PEMA-Tyr. Estas señales características presentan pequeños desplazamientos cuando se encuentra mezclados con POE. Para las mezclas PEMA-Tyr/POE 1:1 aparecen en 1687 y 1618 cm^{-1} , mientras que para PEMA-Tyr/POE 1:2 estas señales aparecen en 1696 y 1610 cm^{-1} y para PEMA-Tyr/POE 1:3 estas señales aparecen en 1697 y 1616 cm^{-1} . El mayor

desplazamiento se observa cuando el polielectrolito pasa de estar puro a mezclarse en partes iguales con POE, esto indica que sí existen interacciones entre ambos componentes, posiblemente interacciones de puente de hidrogeno entre las cadenas -OH terminales del POE y los grupos C=O de los carboxilatos del PEMA-Tyr.

La Figura 33, 34, 35 y 36 muestran las curvas de TGA de la mezcla PEMA-Arg/POE, PEMA-Leu/POE, PEMA-Met/POE y PEMA-Tyr/POE, respectivamente, en distintas proporciones y de sus componentes puros:

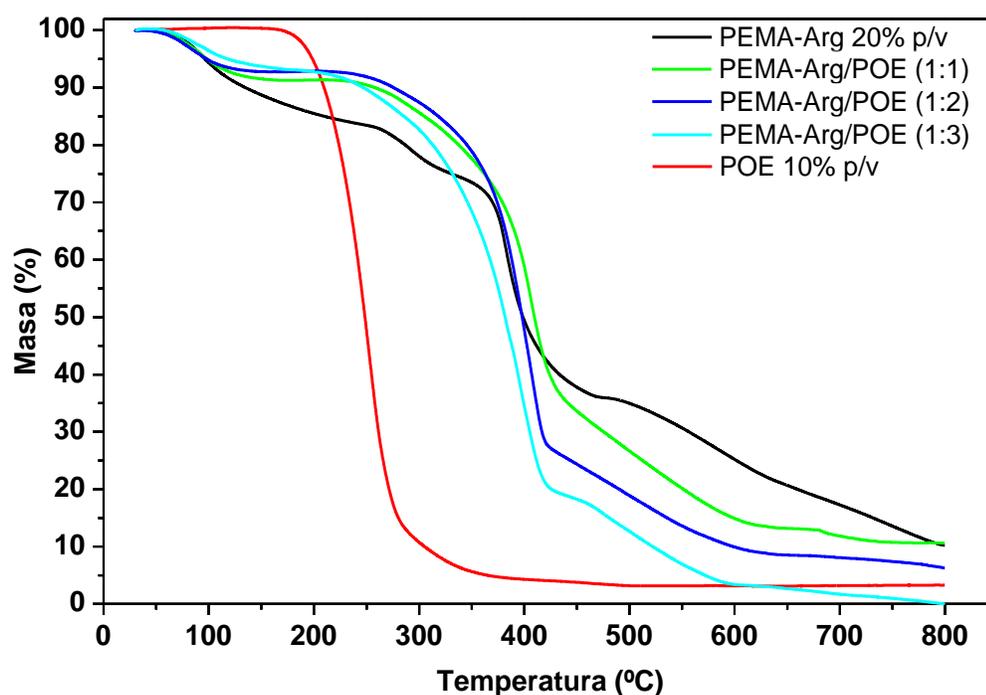


Figura 33. Termogramas de las mezclas PEMA-Arg/POE en distintas proporciones obtenidos mediante TGA.

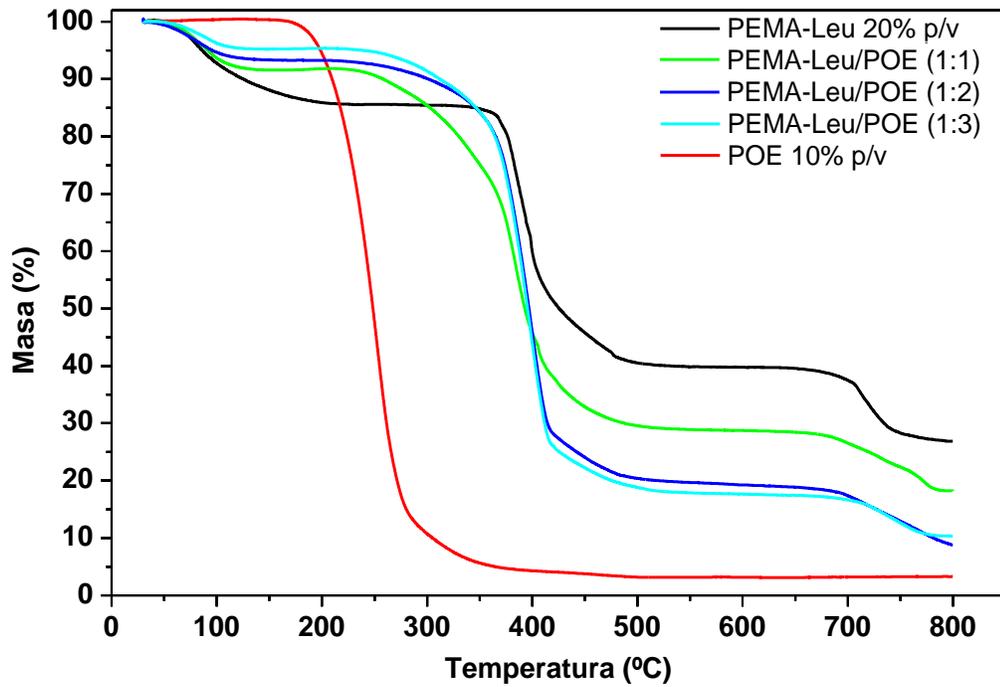


Figura 34. Termogramas de las mezclas PEMA-Leu/POE en distintas proporciones obtenidos mediante TGA.

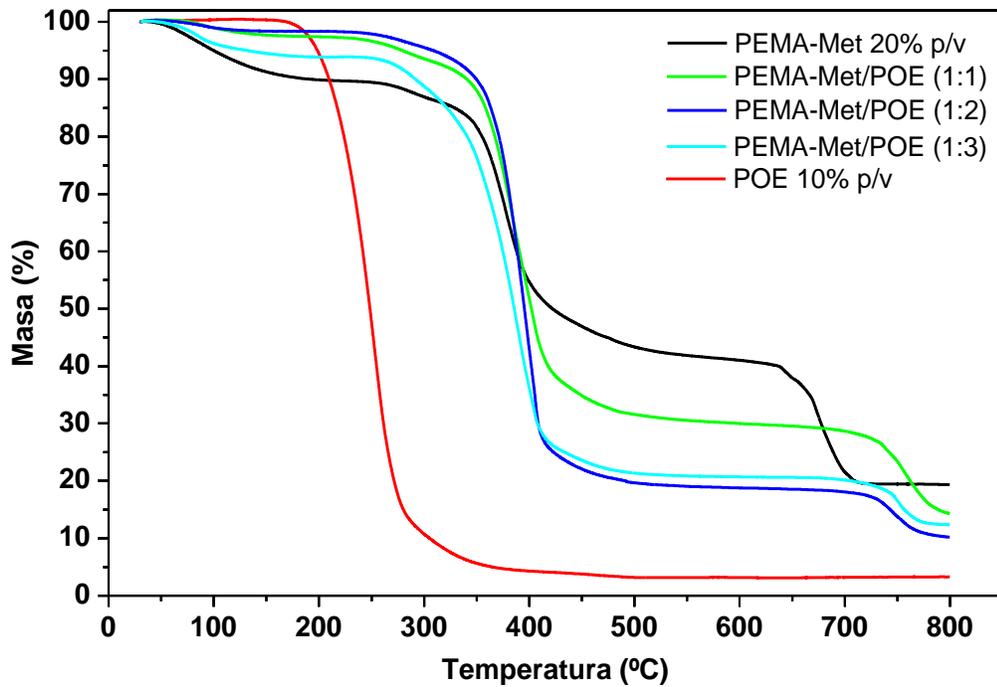


Figura 35. Termogramas de las mezclas PEMA-Met/POE en distintas proporciones obtenidos mediante TGA.

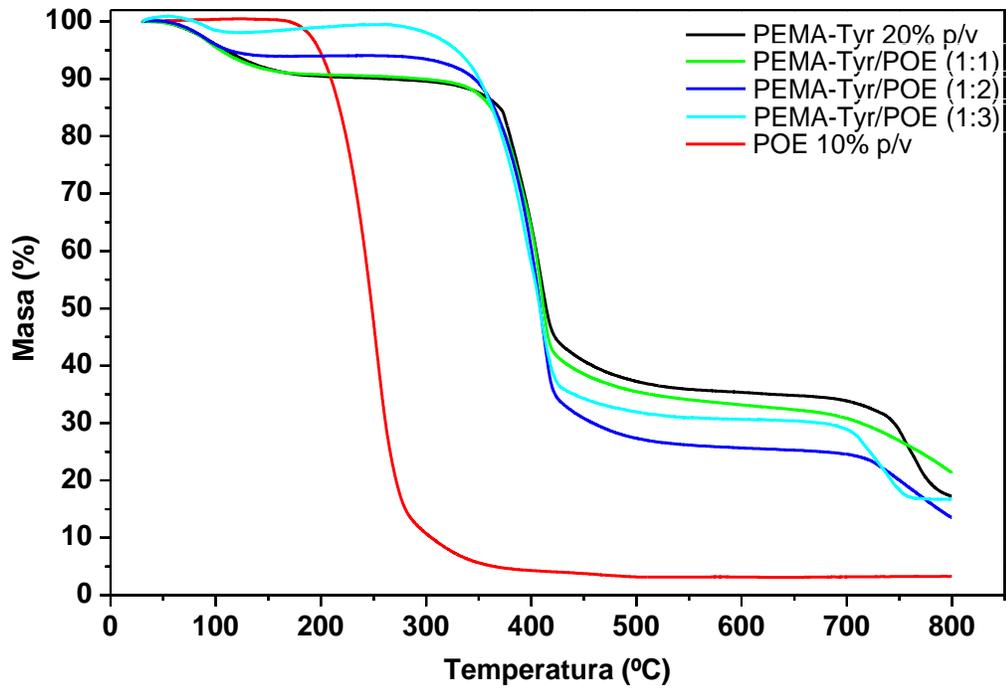


Figura 36. Termogramas de las mezclas PEMA-Tyr/POE en distintas proporciones obtenidos mediante TGA.