

Universidad de Sonora

División de Ingeniería

Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales

Programa de Maestría en Ciencia de Materiales

Tesis

Síntesis y caracterización de hidrogeles de Poli(ácido-gamma-glutámico).

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencia de Materiales

Presenta:

Lic. Q. Yaniris Garmendía Diago

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual de la Universidad de Sonora y del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del director de tesis, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director de la Tesis.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al DIPM, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Castro', with a stylized flourish at the end.

Dra. Teresa del Castillo Castro Jefe del Departamento

Diago, han dictaminado que el trabajo cumple satisfactoriamente como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencia de Materiales, otorgado por la Universidad de Sonora.

Dora Evelia Rguez. F.

Dra. Dora Evelia Rodríguez Félix
Presidente

Maria Mónica Castillo Ortega

Dra. María Mónica Castillo Ortega
Secretaria

Hisila Santacruz O.

Dra. Hisila del Carmen Santacruz Ortega
Sinodal

Maribel Plascencia Jatomea

Dra. Maribel Plascencia Jatomea
Sinodal

Antonio S. Ledezma P.

Dr. Antonio Serguei Ledezma Pérez
Sinodal Externo

Dedicatoria

*A mi familia, en especial a mi madre y a mi hermana, por ser mi mayor
inspiración y la razón para seguir adelante cada día.*

Agradecimientos

- A la Universidad de Sonora por la oportunidad de superación académica brindada.
- A la dirección y coordinación del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, en especial a la Dra. Teresa del Castillo, a la Dra. Hisila Santacruz y a la Lic. Edna María García por el apoyo brindado en el proceso de aceptación al posgrado y la excelente atención recibida.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado durante el período de duración del posgrado.
- A mi directora de tesis, la Dra. Dora Evelia Rodríguez Félix, por su excelente asesoría y sabias enseñanzas, por su gran apoyo, paciencia y amistad. Gracias por ser tan buena profesora y una maravillosa persona.
- A mis sinodales, la Dra. Maribel Plascencia, gracias por recibirnos en el DIPA con tanta paciencia y cariño. Al Dr. Antonio Ledezma, Dra. María Mónica Catillo y Dra. Hisila Santacruz. Gracias a todos por sus valiosas enseñanzas y recomendaciones en el transcurso de la Maestría.
- Al Dr. Refugio Pérez, Dra. Silvia Burruel y Dra. Irela Santos por su ayuda y colaboración en los estudios de caracterización de los materiales.
- A todos mis profesores desde la enseñanza primaria, secundaria, preuniversitaria, nivel superior y los maestros del posgrado, mil gracias a todos por aportar su granito de arena en mi formación académica.
- A mis compañeros de trabajo en la Empresa Farmacéutica Roberto Escudero en Cuba, en especial al personal del Departamento de Investigaciones. Gracias a todos por su valiosa amistad y por ser parte importante de mi formación profesional.
- A mis compañeros y amigos de toda la vida, gracias por tanto apoyo y cariño.
- A mis compañeros del DIPM, gracias por recibirnos con tanto cariño y amabilidad, por compartir momentos tan agradables e inolvidables durante de estos dos años.
- A Ana Daymi Cabrera González, por aventurarnos juntas en esta maravillosa experiencia lejos de nuestra tierra. Gracias por todos los momentos que hemos compartido juntas y las experiencias vividas.
- A Danay Pérez Caballero y familia, muy agradecida de haberlos conocido. Gracias por tu apoyo en todo momento, tu linda amistad y por brindar lo mejor de ti a todo el que te rodea.
- Agradezco infinitamente a mi familia por su amor incondicional, porque a pesar de estar lejos siempre me dan las fuerzas y el ánimo para seguir superándome y alcanzar nuevas metas y proyectos. Los resultados de todo mi esfuerzo y dedicación son y serán siempre dedicados a ustedes.

Índice

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABLAS.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Hipótesis.....	2
1.2. Objetivo general.....	2
1.3. Objetivos específicos.....	2
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Materiales Poliméricos. Generalidades.....	3
2.2. Hidrogeles. Generalidades.....	3
2.2.1. Definición, propiedades y características.....	3
2.2.2. Mecanismo de hinchamiento y deshidratación de hidrogel.....	4
2.2.3. Clasificación de los hidrogeles.....	5
2.2.4. Síntesis de hidrogeles.....	6
2.2.4.1. Reticulación física.....	6
2.2.4.2. Reticulación química.....	6
2.2.5. Hidrogeles, materiales inteligentes.....	7
2.2.5.1. Hidrogeles sensibles al pH.....	7
2.2.5.2. Hidrogeles sensibles a la temperatura.....	8
2.2.6. Aplicación de los hidrogeles en sistemas de liberación controlada de fármacos.....	9
2.3. Poli (ácido- γ -glutámico) [γ -PGA].....	10
2.3.1. Estructura química.....	10
2.3.2. Historia.....	11
2.3.3. Obtención del γ -PGA.....	11
2.3.3.1. Cepas que producen γ -PGA.....	11
2.3.3.2. Biosíntesis del γ -PGA.....	11
2.3.3.3. Influencia de la composición y condiciones del medio de cultivo.....	12
2.3.4. Propiedades físico-químicas del γ -PGA.....	13
2.3.5. Aplicaciones del γ -PGA.....	13
2.4. Entrecruzantes. Generalidades.....	14
2.4.1. Urea como entrecruzante.....	14
2.4.1.1. Aplicaciones fundamentales de la Urea.....	15
2.5. Técnicas de caracterización.....	16
2.5.1. Espectroscopía de Infrarrojo (IR). Aspectos fundamentales.....	16
2.5.2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Aspectos fundamentales.....	18
2.5.3. Análisis Térmico.....	19
2.5.3.1. Análisis Termogravimétrico (TGA).....	20

2.5.3.2. Análisis térmico diferencial (DTA).....	20
2.5.3.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	21
2.5.4. Cinética de Hinchamiento.....	22
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	24
3.1. Reactivos.....	24
3.2. Metodologías.....	25
3.2.1. Obtención del γ -PGA.....	25
3.2.1.1. Biosíntesis del γ -PGA.....	25
3.2.1.2. Purificación del γ -PGA mediante diálisis.....	26
3.2.1.3. Determinación del peso molecular del γ -PGA.....	27
3.2.2. Síntesis de hidrogeles de γ -PGA.....	27
3.3. Técnicas de caracterización.....	28
3.3.1. Espectroscopía de infrarrojo (IR).....	28
3.3.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	28
3.3.3. Análisis térmico.....	28
3.3.3.1. Análisis Termogravimétrico (TGA).....	28
3.3.3.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	29
3.3.4. Cinética de hinchamiento.....	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
4.1. Obtención del γ -PGA.....	30
4.1.1. Biosíntesis del γ -PGA.....	30
4.1.2. Purificación del γ -PGA mediante diálisis.....	30
4.1.3. Determinación del peso molecular del γ -PGA.....	30
4.2. Caracterización del γ -PGA por espectroscopía de infrarrojo (IR).....	31
4.3. Análisis térmico del γ -PGA.....	34
4.3.1. Análisis Termogravimétrico (TGA).....	34
4.3.2. Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	35
4.4. Síntesis de hidrogeles de γ -PGA y Urea.....	35
4.5. Caracterización de los hidrogeles por Espectroscopía de Infrarrojo (IR).....	36
4.6. Caracterización de los hidrogeles por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	38
4.7. Análisis térmico de los hidrogeles de γ -PGA.....	39
4.7.1. Caracterización de los hidrogeles por Termogravimetría (TGA).....	39
4.7.2. Caracterización de los hidrogeles por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	41
4.8. Estudio de la cinética de hinchamiento de los Hidrogeles de γ -PGA y Urea.....	42
4.8.1. Mecanismo de hinchamiento de los Hidrogeles de γ -PGA y Urea.....	46
5. CONCLUSIONES.....	48
6. RECOMENDACIONES.....	48
7. BIBIOGRAFÍA.....	49

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.	Estados colapsado e hinchado de un hidrogel.....	4
Fig. 2.	Esquema general del tipo de hidrogeles de acuerdo con la naturaleza de las uniones que forman la red tridimensional.....	7
Fig. 3.	Esquema representativo del hinchamiento y liberación de fármaco de un hidrogel como respuesta a varios estímulos físicos y químicos.....	7
Fig. 4.	Vías convencionales de administración de fármacos.....	9
Fig. 5.	Estructura química del Poli (ácido- γ -glutámico).....	10
Fig. 6.	Ruta biosintética del γ -PGA en especies <i>Bacillus</i> dependientes e independientes del ácido L-glutámico, a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA).....	12
Fig. 7.	Estructura química de la Urea.....	15
Fig. 8.	Tipos de movimientos vibracionales en una molécula poliatómica.....	16
Fig. 9.	Esquema de la técnica de reflectancia total atenuada.....	18
Fig. 10.	Esquema de un Microscopio Electrónico de Barrido.....	19
Fig. 11.	Esquema de un Analizador Termogravimétrico.....	20
Fig. 12.	Esquema de un Analizador Térmico Diferencial.....	21
Fig. 13.	Esquema de un Calorímetro Diferencial de Barrido.....	21
Fig. 14.	Imágenes del proceso de propagación de la cepa de la bacteria <i>B. licheniformis</i>	25
Fig. 15.	Imágenes del proceso de producción del γ -PGA.....	26
Fig. 16.	Imágenes del proceso de diálisis del γ -PGA.....	26
Fig. 17.	Determinación de la viscosidad relativa de la solución de γ -PGA.....	27
Fig. 18.	Imágenes del proceso de obtención de los hidrogeles de γ -PGA y Urea.....	28
Fig. 19.	Imagen del γ -PGA obtenido en el laboratorio.....	30
Fig. 20.	Curva de calibración Peso Molecular (M_w) versus $\ln \eta_{rel}$	31
Fig. 21.	Espectros de IR del γ -PGA _{crudo} : (a) Polímero obtenido en el laboratorio; (b) Polímero proporcionado por el CIQA.....	32
Fig. 22.	Espectro de IR del γ -PGA purificado por diálisis.....	33
Fig. 23.	Termograma de TGA del γ -PGA.....	34
Fig. 24.	Esquema del mecanismo de descomposición térmica del γ -PGA.....	35
Fig. 25.	Reacción química de entrecruzamiento entre las cadenas poliméricas de γ -PGA con Urea.....	35
Fig. 26.	Imágenes de los hidrogeles de γ -PGA y Urea.....	36
Fig. 27.	Espectros de IR del γ -PGA y el Hidrogel.....	37
Fig. 28.	Imágenes de SEM de los Hidrogeles: a) y b) Magnificación 75 X; c) Magnificación 350 X.....	38
Fig. 29.	Termograma de TGA de la Urea.....	39
Fig. 30.	Termograma de TGA del EDC.....	39

Fig. 31.	Termograma de TGA del Hidrogel.....	40
Fig. 32.	Curvas termogravimétricas del γ -PGA, Urea, EDC e Hidrogel.....	40
Fig. 33.	Gráficos de hinchamiento del hidrogel de γ -PGA en agua desionizada a 25 y 37°C.....	42
Fig. 34.	Gráficos de hinchamiento del hidrogel de γ -PGA en soluciones buffers de pH=3.6, 7.4 y 10.0, a 25°C.....	43
Fig. 35.	Esquema del comportamiento de hinchamiento de hidrogeles por efecto del pH.....	44
Fig. 36.	Gráficos de hinchamiento del hidrogel de γ -PGA en solución buffer de pH= 7.4 a 25 y 37 °C.....	44
Fig. 37.	Representación esquemática del efecto de protección de iones.....	45
Fig. 38.	Región lineal para las curvas de Ln F vs Ln t obtenidas de los datos de hinchamiento de los hidrogeles; (a) Definición de Crank (FC), (b) Definición de Karadag et al. (FK).....	46

LISTA DE TABLAS

Tabla. 1.	Composición del Medio E.....	12
Tabla. 2.	Regiones del espectro IR.....	17
Tabla. 3.	Asignación de las señales características de los espectros de IR del γ -PGA _{crudo} : (a) Polímero obtenido en el laboratorio; (b) Polímero proporcionado por el CIQA.....	31
Tabla. 4.	Asignación de las señales características de los espectros de IR: (a) γ -PGA _{crudo} ; (b) γ -PGA _{puro}	33
Tabla. 5.	Resultados del análisis por DSC del γ -PGA.....	35
Tabla. 6.	Resultados del análisis por TGA del γ -PGA, Urea, EDC e Hidrogel.....	41
Tabla. 7.	Resultados del análisis por DSC del hidrogel de γ -PGA.....	41
Tabla. 8.	Clasificación de los mecanismos de transporte de agua en el hinchamiento de los hidrogeles.....	46
Tabla. 9.	Parámetros cinéticos del hinchamiento de los hidrogeles a diferentes condiciones de pH y temperatura.....	47

RESUMEN

Los materiales poliméricos presentan una gran importancia en la actualidad debido a la gran versatilidad de propiedades y comportamientos que presentan, lo que les confiere la posibilidad de ser empleados para diferentes fines. Específicamente en el campo de la Biomedicina, los hidrogeles son materiales muy apropiados y de gran interés, dada su buena interacción con los tejidos vivos. Su biocompatibilidad está atribuida principalmente a su consistencia blanda, elástica y al alto contenido de agua que pueden absorber. En la actualidad las investigaciones están cada día más enfocadas hacia la obtención de materiales a partir de biopolímeros para favorecer las propiedades bioactivas. El Poli (ácido- γ -glutámico) [γ -PGA] es un biopolímero de origen microbiano, y ha sido uno de los más estudiados debido a que es biodegradable, biocompatible, comestible y no resulta tóxico ni para el ser humano ni para el ambiente.

En el presente trabajo se llevó a cabo la biosíntesis del γ -PGA por fermentación utilizando la bacteria *Bacillus licheniformis*. El γ -PGA utilizado fue caracterizado por espectroscopía de infrarrojo y análisis térmico. Se sintetizaron hidrogeles de γ -PGA utilizando Urea como entrecruzante. Se llevó a cabo la caracterización de los hidrogeles mediante espectroscopía de infrarrojo, microscopía electrónica de barrido, análisis térmico y el estudio del efecto del pH y la temperatura sobre la cinética de hinchamiento.

El γ -PGA se obtuvo con un rendimiento promedio de 7.17 ± 1.67 g/L. El rendimiento obtenido en el proceso de diálisis fue de 85.5%. El peso molecular promedio del γ -PGA dializado fue de $M_w=180000$ g/mol. Mediante espectroscopía de infrarrojo, se identificaron las señales correspondientes a los grupos funcionales presentes en la estructura química del polímero. A partir del análisis térmico (TGA y DSC) realizado al γ -PGA se analizó su estabilidad térmica y se identificaron las transiciones térmicas relacionadas con los cambios de temperaturas.

Se sintetizaron hidrogeles de γ -PGA y Urea como entrecruzante, los cuales fueron caracterizados por espectroscopía de infrarrojo, evidenciándose la formación de la red por entrecruzamiento químico, debido a cambios en las intensidades de las bandas correspondientes a los grupos funcionales, con respecto al espectro de polímero. La morfología de los hidrogeles fue analizada por SEM, mediante las micrografías se corroboró la estructura porosa del material. El análisis térmico por DSC y TGA arrojó como resultado que el material tiene una $T_g=144.5^\circ\text{C}$ y $T_d=219^\circ\text{C}$. El estudio de la cinética de hinchamiento de los hidrogeles de γ -PGA bajo diferentes condiciones mostró un aumento en los valores de la razón de hinchamiento a mayor tiempo de contacto en el medio, así como al aumentar el pH, observándose poca influencia de la temperatura. El hinchamiento de los hidrogeles en las soluciones buffer ocurre mediante mecanismos tipo Fickiano inferior y Fickiano, determinados por la difusión de la solución. Mientras que en agua desionizada predomina un mecanismo anómalo, donde hay una contribución de ambos procesos (difusión del agua y de relajación de las cadenas).

ABSTRACT

Polymeric materials are of great importance today due to the great versatility of properties and behaviors they present, which gives them the possibility of being used for different purposes. Specifically, in the field of Biomedicine, hydrogels are very appropriate materials and of great interest, for its good interaction with living tissues. Its biocompatibility is mainly attributed to its soft and elastic consistency, and the high water content they can absorb. Currently, research is increasingly focused on obtaining materials from biopolymers to promote bioactive properties. Poly (γ -glutamic acid) [γ -PGA] is a biopolymer of microbial origin and has been one of the most studied because it is biodegradable, biocompatible, edible and is not toxic to humans or environment.

In the present work, biosynthesis of γ -PGA was carried out by fermentation using the *Bacillus licheniformis* bacterium. The γ -PGA used was characterized by infrared spectroscopy and thermal analysis. γ -PGA hydrogels were synthesized using Urea as a crosslinker. The characterization of the hydrogels was carried out by means of infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, thermal analysis, and the study of the effect of pH and temperature on the swelling kinetics.

γ -PGA was obtained with an average yield of 7.17 ± 1.67 g / L. The yield obtained in the dialysis process was 85.5%. The average molecular weight of the dialyzed γ -PGA was $M_w = 180000$ g / mol. Using infrared spectroscopy, the signals corresponding to the functional groups present in its chemical structure of the polymer were identified. From the thermal analysis (TGA and DSC) carried out on the γ -PGA, its thermal stability was analyzed, and the thermal transitions related to temperature changes were identified.

The γ -PGA hydrogels were synthesized using Urea as crosslinker, which were characterized by infrared spectroscopy, showing the formation of the network by chemical crosslinking, due to changes in the intensities of the bands corresponding to the functional groups, with respect to the polymer spectrum. The morphology of the hydrogels was analyzed by SEM, through micrographs the porous structure of the material was confirmed. Thermal analysis by DSC and TGA showed that the material has a $T_g = 144.5$ ° C and $T_d = 219$ ° C. The study of the swelling kinetics of the γ -PGA hydrogels under different conditions showed an increase in the swelling ratio values with longer contact time in the medium, as well as with increasing pH, while little influence of temperature was observed. The swelling of the hydrogels in the buffer solutions occurs through lower Fickian and Fickian mechanisms, determined by the diffusion of the solution. While in deionized water, an anomalous mechanism predominates, where there is a contribution of both processes (water diffusion and relaxation of the chains).

1. INTRODUCCION

Los materiales poliméricos presentan una gran importancia en la actualidad debido a la gran versatilidad de propiedades y comportamientos que presentan, lo que les confiere la posibilidad de ser empleados para diferentes fines. Su uso se ha extendido considerablemente en diversas aplicaciones, tales como, la industria automotriz, de alimentos, textil, electrónica, farmacéutica, en la medicina, entre otras. La tendencia en el desarrollo de materiales apunta hacia la obtención de sistemas inteligentes, los cuales sean capaces de responder a estímulos del ambiente y realicen una función determinada. Específicamente en el campo de la Biomedicina, se han empleado una gran diversidad de estos materiales poliméricos entre los que se destacan películas, membranas e hidrogeles. Presentando estos últimos un interés especial debido sus múltiples propiedades.

Un hidrogel es una red tridimensional conformada de cadenas flexibles de polímeros que absorben cantidades considerables de agua.¹⁻³ Se caracterizan por ser hidrófilos, blandos, elásticos e insolubles en agua; además de que se hinchan en presencia de ella, aumentando considerablemente su volumen. El carácter hidrófilo se debe a la presencia de grupos funcionales hidrofílicos como son: OH, COOH, CONH, entre otros.²⁻⁶ Los hidrogeles son materiales muy apropiados para aplicaciones en Medicina dada su buena interacción con los tejidos vivos,^{7,8} pues muestran buenas propiedades de biocompatibilidad, debido principalmente a su consistencia blanda, elástica y alto contenido de agua.⁹⁻¹¹ Además, su característica de hinchamiento en medio líquido les aporta la propiedad de absorber, retener y liberar bajo condiciones controladas, algunas sustancias orgánicas. Debido a esta última característica, una de las aplicaciones fundamentales de los hidrogeles es la obtención de sistemas de liberación controlada de fármacos como respuesta a un cierto estímulo como pH, temperatura, campos electromagnéticos, fuerza iónica, entre otros.¹

Este tipo de materiales se puede preparar a partir de polímeros sintéticos o biopolímeros, sin embargo, como la investigación está encaminada a la obtención de materiales que funcionen como sistemas para la liberación controlada de fármacos, por lo que el material va a estar en contacto con determinadas regiones del organismo, de esta manera una excelente alternativa es el empleo de biopolímeros, puesto que los hidrogeles sintéticos no tienen propiedades bioactivas.

Los hidrogeles obtenidos a partir de biopolímeros aportan propiedades muy importantes como son biocompatibilidad, biodegradabilidad y residuos biológicamente reconocibles que apoyan las actividades celulares.¹²

Actualmente, entre los biopolímeros más estudiados e investigados en la preparación de hidrogeles con aplicaciones en el área de la Biomedicina se encuentra el Poli (ácido- γ -glutámico), debido a las excelentes propiedades que presenta.

El Poli (ácido- γ -glutámico) [γ -PGA] es un polímero de origen microbiano, biodegradable, biocompatible, comestible y que no resulta tóxico ni para el ser humano ni para el medio ambiente. La síntesis del polímero se da como producto de excreción del metabolismo de una variedad de bacterias, generalmente del género *Bacillus* como *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a, *Bacillus subtilis* 3335, *Bacillus subtilis* TAM-4. Este biopolímero está formado

por unidades repetitivas de ácido glutámico que son enlazadas mediante el grupo α -amino y el grupo funcional γ -carboxilo.¹³

La Urea o también conocida como carbamida o carbonildiamida, se forma a partir del amoníaco en el riñón e hígado, que se produce por la descomposición de las proteínas durante el metabolismo. Esta no es una sustancia tóxica y puede estar en altos niveles sin causar alteraciones, siendo sus principales medios de excreción el sudor y la orina.^{14,15} Entre sus cualidades destacan el efecto humectante, queratolítico, descamativo, antipruriginoso, antimicrobiano y antimicótico.¹⁵

Debido a las características y propiedades antes mencionadas de la Urea, ésta fue seleccionada para ser empleada como entrecruzante, debido a nuestro interés de utilizar un reactivo que fuese lo más inocuo posible al organismo. De esta forma fue posible la preparación de los hidrogeles mediante una reacción de amidación.

En el presente trabajo se determinaron las condiciones para la síntesis de hidrogeles de Poli(ácido- γ -glutámico) utilizando Urea como entrecruzante. Se llevó a cabo la caracterización de los hidrogeles mediante espectroscopía de infrarrojo, microscopía electrónica de barrido, análisis térmico y el estudio del efecto del pH y la temperatura sobre la cinética de hinchamiento.

1.1. Hipótesis

Es posible sintetizar hidrogeles de Poli (ácido- γ -glutámico) entrecruzados con Urea, que presenten buenas propiedades fisicoquímicas y de hinchamiento para su aplicación potencial en sistemas de liberación controlada.

1.2. Objetivo general:

- Determinar las condiciones para la síntesis de hidrogeles de Poli (ácido- γ -glutámico) utilizando Urea como entrecruzante, así como su caracterización físico-química.

1.3. Objetivos específicos:

- Obtener el polímero Poli (ácido- γ -glutámico) a partir de la bacteria *Bacillus licheniformis*.
- Sintetizar hidrogeles de Poli(ácido- γ -glutámico) utilizando Urea como entrecruzante.
- Analizar el comportamiento físico-químico de los hidrogeles sintetizados.
- Estudiar el efecto del pH sobre las cinéticas de hinchamiento de los hidrogeles.
- Estudiar el efecto de la temperatura sobre las cinéticas de hinchamiento de los hidrogeles.
- Determinar el mecanismo de hinchamiento de los hidrogeles, usando modelos matemáticos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Materiales Poliméricos. Generalidades.

Los materiales poliméricos han sido ampliamente utilizados durante décadas y en la actualidad, su demanda se ha incrementado considerablemente debido a que presentan diversas propiedades que resultan útiles en diferentes aplicaciones¹⁶ por lo que constituyen el principal componente en muchos objetos de uso cotidiano, considerándose que se han convertido en materiales insustituibles.¹⁷

Cada día son más los objetos constituidos por materiales plásticos que rodean nuestra vida, que conforman innumerables objetos creados por el hombre para nuestro mayor confort. Son constituyentes importantes de equipos electrónicos, de los medios de transporte en la sociedad actual, del instrumental utilizado en la ciencia médica, de los tejidos con que se conforman las ropas, de los embalajes que permiten el mejor almacenamiento de mercancías, de infinidad de pequeños y grandes objetos que forman el día a día en cualquiera de las sociedades actuales.¹⁸

La versatilidad de los polímeros y sus métodos de síntesis permite no solo el control de su naturaleza química y propiedades fisicoquímicas, sino que además permiten la fácil modificación de estos, durante o después de su síntesis lo cual proporciona un mayor rango de posibilidades para múltiples usos.¹⁹

Actualmente, las aplicaciones médicas y farmacéuticas de los polímeros constituyen uno de los campos de mayor interés, por su utilización como dispositivos terapéuticos cardiovasculares, ortopédicos, oftalmológicos y dentales, ingeniería de tejidos, sistemas de liberación de fármacos y sensores para propósitos de diagnóstico.²⁰

El uso de estos materiales en el campo biomédico y en sistemas terapéuticos farmacéuticos conlleva a la formación de una interfase con el sistema biológico, que por lo general requiere de una serie de propiedades tales como, biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad, bio-adherencia, entre otros.^{20, 21}

Por lo tanto, el uso de biopolímeros constituye una excelente alternativa en el desarrollo y preparación de dichos materiales, puesto que, le brindan al material las propiedades bioactivas requeridas para la aplicación en cuestión.

Dentro de los materiales poliméricos más empleados en este campo de la Biomédica, se encuentran los hidrogeles, debido a las importantes propiedades y características que presentan.

2.2. Hidrogeles. Generalidades.

2.2.1. Definición, propiedades y características.

Los hidrogeles son redes poliméricas hidrofílicas reticuladas tridimensionalmente, capaces de hincharse en agua, buffers o fluidos biológicos sin disolverse o perder su integridad estructural.²² Estos materiales se caracterizan por ser hidrofílicos, blandos, elásticos e insolubles en agua.²³ Son capaces de absorber y retener grandes cantidades de líquido,²⁴ aumentando apreciablemente su volumen. Debido a las características mencionadas, presentan buenas propiedades de biocompatibilidad y una buena interacción con los

tejidos vivos.²³ La naturaleza hidrofílica de los hidrogeles se debe a la presencia de grupos funcionales en su estructura química, tales como: hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH), amida (-CONH₂) y sulfonilo (-SO₃H), los cuales están ubicados a lo largo de las cadenas poliméricas.²⁵

2.2.2. Mecanismo de hinchamiento y deshidratación de hidrogel.

Los hidrogeles pueden absorber grandes cantidades de agua y fluidos biológicos a través de los grupos hidrófilos existentes en la estructura. Estas estructuras poliméricas reticuladas tridimensionales pueden hincharse hasta cientos o incluso miles de veces su peso. Varios parámetros importantes como carga, concentración, pKa de grupos ionizables, equilibrio hidrofílico-hidrofóbico, densidad de reticulación, grado de ionización, interacción con el contraíón en el medio y cinética de control del pH, influyen en el grado de hinchamiento del hidrogel.²⁶

Cuando el hidrogel se encuentra en presencia de agua, se expande hasta alcanzar el equilibrio de hinchamiento. El estado de equilibrio resulta de un balance entre las fuerzas osmóticas que causan que el agua penetre entre las cadenas del polímero hidrófilo y las fuerzas cohesivas existentes entre estas cadenas que oponen resistencia a la expansión. Durante el hinchamiento, las cadenas que conforman la red se estiran. Simultáneamente aparece una fuerza retráctil en oposición al proceso de hinchamiento, ejercida por las cadenas de la red sobre el disolvente contenido en ella. El hinchamiento alcanza su valor máximo, o de equilibrio, cuando se obtiene un balance entre ambas fuerzas.

Cuando un hidrogel se somete a secado, el agua se evapora causando el colapso de la estructura. El gel pasa de un estado expandido, de máximo hinchamiento, a un estado colapsado con la consiguiente expulsión del disolvente. Este proceso es reversible (Figura 1). En el estado seco, denominado xerogel, el gel es un material sólido.²⁵

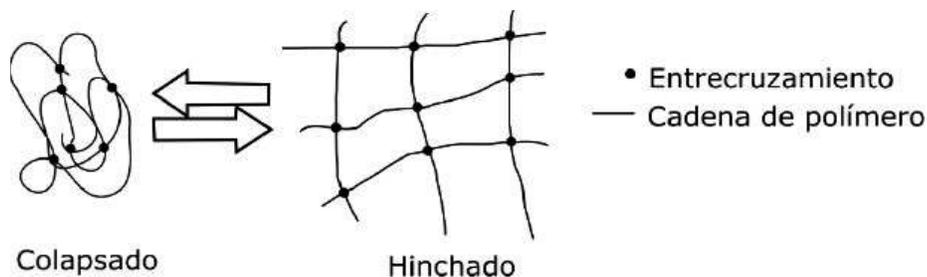


Fig. 1. Estados colapsado e hinchado de un hidrogel.

El proceso de obtención del hidrogel determina la capacidad de hinchamiento que este tendrá, dado que los espacios que se establezcan entre las redes poliméricas flexibles que se formen en dicho proceso determinará la cantidad de agua que el hidrogel pueda albergar. Esta flexibilidad a su vez se ha mostrado que es función de: el peso molecular, el grado de pureza del polímero y de su concentración en solución acuosa, además de factores propios del método físico o químico de síntesis. Para el método físico de congelamiento/descongelamiento (c/d) estos factores son: la temperatura y el tiempo de congelamiento, la tasa de descongelamiento y el número de ciclos c/d y para el método químico: el entrecruzante y la fuerza de los enlaces que se generan, entre otros.²³

La razón de hinchamiento se puede determinar mediante la siguiente expresión (ecuación 1):

$$\text{Razón de Hinchamiento (RH)} = \frac{(M_{\text{hidratado}} - M_{\text{deshidratado}})}{M_{\text{deshidratado}}} \quad \text{Ec. 1.}$$

donde M representa la masa de hidrogel.²⁷

2.2.3. Clasificación de los hidrogeles.

- De acuerdo con la ruta de síntesis se clasifican en:
-homopolímeros, copolímeros y multipolímeros. Los hidrogeles de homopolímero se preparan a partir de un solo tipo de monómero hidrófilo; los hidrogeles de copolímero comprenden dos tipos de monómeros; y los hidrogeles multipolímeros se preparan a partir de tres o más monómeros.
- En base a las estructuras físicas de las redes se clasifican en:
-amorfos, semicristalinos, hidrogeles con estructura de enlace de hidrógeno, supermoléculas y agregados hidrocoloides.
- En términos de cargas iónicas presentes en red polimérica se clasifican en:
-hidrogeles aniónicos, catiónicos, neutros y anfóteros. Los hidrogeles aniónicos típicamente contienen iones negativos unidos a la red polimérica, mientras que los hidrogeles catiónicos incluyen iones positivos fijos. Lógicamente, los hidrogeles neutros deben tener el mismo número de iones positivos y negativos. En general, se supone que un hidrogel neutro tiene una distribución de concentración bastante uniforme de iones fijos en toda la matriz polimérica.
- Según los tipos de enlaces que existen entre las cadenas de polímeros se clasifican en:
-geles físicos y químicos. En geles físicos, las cadenas poliméricas se mantienen una al lado de la otra mediante el enredo de la cadena polimérica o enlaces no covalentes, como las fuerzas de atracción inducidas por enlaces de hidrógeno o fuerzas hidrófobas. En geles químicos, las cadenas de polímeros están conectadas entre sí a través de enlaces covalentes.
- En cuanto al tamaño se clasifican en:
-geles macroscópicos, microgeles y nanogeles. Los microgeles y nanogeles son hidrogeles en partículas con dimensiones del orden de micrómetros y nanómetros, respectivamente. Los hidrogeles macroscópicos son típicamente del tamaño de milímetros a centímetros. Estos geles generalmente se implantan quirúrgicamente dentro del cuerpo o en contacto con el cuerpo para administrar un fármaco. El uso de hidrogel es una solución alternativa para un suministro menos invasivo del medicamento. Los nanogeles y microgeles tienen ventajas sobre los hidrogeles macroscópicos. Primero, su tamaño es mucho más pequeño que el diámetro interno de las agujas (aproximadamente 1 mm). El tamaño pequeño no solo los hace inyectables mediante agujas, sino que también proporciona una gran área de superficie para la bio-conjugación y puede aumentar la penetración en el tejido. Se aplican microgeles de menos de 5 μm en el suministro oral y pulmonar, pero generalmente

no son adecuados para inyección intravascular. Los nanogeles con un tamaño de 10-100 nm son adecuados para la inyección sistemática de fármacos. Los hidrogeles de menos de 10 nm de diámetro pueden eliminarse mediante filtración renal, mientras que los macrófagos pueden fagocitar hidrogeles de tamaños de 0.5-10 μm .²⁶

2.2.4. Síntesis de hidrogeles.

Los hidrogeles se pueden sintetizar mediante diversas técnicas. Tradicionalmente, la reticulación física, la reticulación química, el injerto de polimerización y la reticulación por radiación se han utilizado para la preparación de hidrogeles.

Las técnicas de polimerización convencionales y controladas por radicales permiten la preparación de hidrogeles con diferentes composiciones, tamaños y morfologías, incluidas las partículas huecas de núcleo y cubierta. El uso de iniciadores funcionales y macroiniciadores permite la contribución de grupos funcionales en el interior o en la superficie de los hidrogeles.

Se ha utilizado una diversidad de técnicas de reticulación para la fabricación de hidrogeles que comprenden reacciones a base de Schiff, reticulación de amida, intercambio de tiol-disulfuro, reticulación foto-inducida, reticulación mediada por enzimas, entre otras.²⁶

2.2.4.1. Reticulación física.

Los geles físicos o reversibles se han convertido en el centro de atención de muchos investigadores debido a su producción relativamente fácil. Este tipo de geles tiene la ventaja de no usar reticuladores, lo que resulta en la integración de materiales atrapados (por ejemplo, medicamentos), así como la necesidad de eliminarlos antes de su uso. La selección exacta de hidrocoloide, concentración y pH puede conducir a la formación de una amplia variedad de tejidos de gel. Varios métodos reportados en la literatura para producir hidrogeles reticulados físicamente incluyen: calentar o enfriar una solución de polímero, interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno, agregación resultado del calor y ciclos de congelación-descongelación.

Es digno de mención decir que los sistemas sintetizados a través de condiciones suaves de los métodos de reticulación física tienden a ser más frágiles en comparación con sus homólogos fabricados mediante el método de reticulación covalente. Estos sistemas (Figura 2) se vuelven estables por interacciones relativamente débiles entre cadenas de polímeros como enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas o iónicas.²⁶

2.2.4.2. Reticulación química.

Los principales métodos químicos para la síntesis de hidrogeles incluyen la reticulación química, el injerto de monómeros o la aplicación de un reticulante para interconectar dos cadenas de polímeros (Figura 2). La reticulación química implica formar enlaces covalentes entre cadenas poliméricas durante la polimerización de monómeros con bajo peso molecular o reticulación de precursores poliméricos. Los métodos más utilizados para la fabricación de hidrogeles reticulados químicamente son emplear reacciones de polimerización heterogéneas en presencia de reticuladores bifuncionales o multifuncionales. La reticulación de polímeros naturales y sintéticos se puede lograr

mediante la reacción de algunos grupos funcionales tales como grupos hidroxilo, carboxílico y amina con reticuladores como los aldehídos. El injerto incluye la polimerización de un monómero. Las cadenas de polímeros son activadas por reactivos químicos u operación de radiación de alta energía. En consecuencia, el injerto se clasifica en dos tipos: químicos y de radiación.²⁶

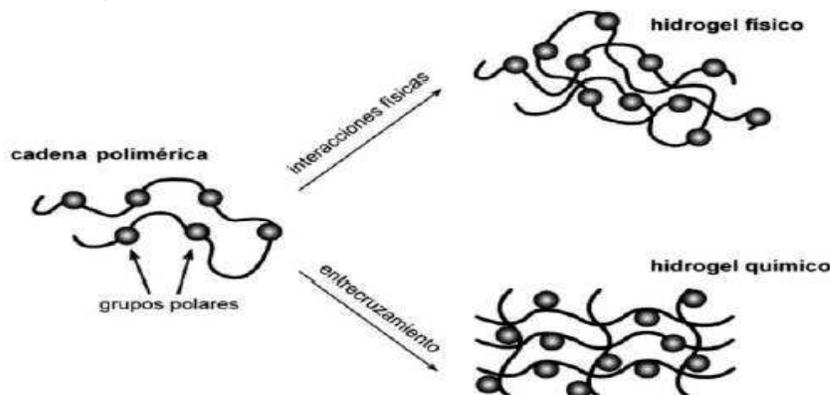


Fig. 2. Esquema general del tipo de hidrogel de acuerdo con la naturaleza de las uniones que forman la red tridimensional.

2.2.5. Hidrogel, materiales inteligentes.

Los hidrogel son considerados materiales inteligentes porque su volumen y propiedades fisicoquímicas cambian como respuesta a una amplia variedad de estímulos externos (figura 3), tales como: luz, temperatura, pH, campos magnéticos o eléctricos, fuerza iónica, entre otros.²⁸⁻³⁰ Los hidrogel inteligentes han encontrado un papel importante en una gran diversidad de aplicaciones, tales como sistemas de administración de fármacos, ingeniería de tejidos, óptica, diagnóstico e imagen, entre otros.²⁶ Actualmente, los hidrogel sensibles al pH y a la temperatura son unos de los más ampliamente estudiados debido a la importancia de ambos factores dentro del cuerpo humano.²⁸

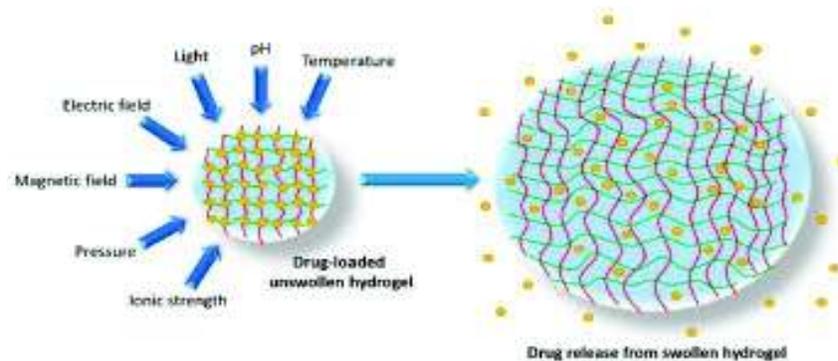


Fig. 3. Esquema representativo del hinchamiento y liberación de fármaco de un hidrogel como respuesta a varios estímulos físicos y químicos.

2.2.5.1. Hidrogel sensibles al pH.

Los hidrogel sensibles al pH están compuestos por polímeros que contienen en su cadena macromolecular, grupos ácidos (ácido carboxílico o sulfónico) o básicos (sales de amonio) capaces a aceptar o liberar protones en presencia de las variaciones del pH del

medio circundante. La ionización de estos grupos deja redes poliméricas cargadas, generándose interacciones electrostáticas que producen un hinchamiento o deshinchamiento en el hidrogel.³¹ Dependiendo del pH de la solución y las constantes de disociación (pK_a o pK_b) de los grupos laterales de polímero, el hidrogel se ioniza y se hincha como resultado de la repulsión electrostática de las cadenas de polímero.²⁷ Por ejemplo, los grupos carboxílicos ($COOH$) aceptan protones a bajos valores de pH y los liberan a altos valores de pH, por lo que con el incremento del pH se producen repulsiones electrostáticas de los grupos aniónicos carboxilatos (COO^-) provocando el hinchamiento del hidrogel. Así a bajos valores de pH los polímeros que contienen este grupo casi no se hinchan, reteniéndose la sustancia bioactiva en su interior, liberándola después a pH básico, producto de la expansión de las cadenas poliméricas por las repulsiones electrostáticas.³¹

El cuerpo humano exhibe cambios sustanciales de pH en diferentes partes del cuerpo cuando funciona normalmente. Además de los valores de pH significativamente diferentes exhibidos en diferentes tejidos, algunos estados de enfermedad también pueden causar cambios de pH en el cuerpo humano. El espectro de pH entre diferentes sitios representa objetivos atractivos para los campos biomédicos y farmacéuticos por los cuales los hidrogeles sensibles al pH podrían responder a un entorno dinámico. Una de las aplicaciones más explotadas de los sistemas sensibles al pH es el desarrollo de materiales como soportes para la administración oral de fármacos, ya que el suministro oral requiere resistencia de los medicamentos a los ataques enzimáticos y al gradiente de pH a lo largo del tracto gastrointestinal.³⁰

2.2.5.2. Hidrogeles sensibles a la temperatura.

Los hidrogeles termosensibles son uno de los sistemas de estímulo más estudiados en la ingeniería de tejidos y la investigación de administración de fármacos, ya que la temperatura media puede fluctuar en condiciones fisiológicas y patológicas. Estos hidrogeles, compuestos principalmente de polímeros naturales y sintéticos con grupos hidrófilos e hidrófobos equilibrados en sus cadenas se caracterizan por su capacidad de sufrir modificaciones reversibles a medida que cambia el volumen. También se hinchan o colapsan en respuesta a una temperatura crítica, lo que provoca un cambio repentino en la solvatación de las moléculas y su estado conformacional.

Los hidrogeles termosensibles se pueden dividir en dos grupos de acuerdo con su comportamiento con las moléculas de disolvente circundantes. Ampliamente estudiados, los hidrogeles de temperatura de solución crítica más baja (LCST) exhiben respuestas no lineales, donde la solubilidad del polímero disminuye a medida que aumenta la temperatura. El segundo tipo, los sistemas de temperatura de solución crítica superior (UCST), por otro lado, se vuelven solubles al calentarse.³⁰

Cuando la temperatura media está por debajo de LCST, los enlaces de hidrógeno se vuelven dominantes entre las moléculas de agua y los segmentos hidrófilos de la cadena del polímero, aumentando las interacciones hidrófilas. Cuando la temperatura aumenta, los enlaces de hidrógeno se debilitan, mientras que la interacción entre los segmentos hidrófobos de la cadena polimérica se fortalece, lo que lleva a una contracción del hidrogel debido a la asociación de la cadena polimérica a través de interacciones

hidrofóbicas. Por lo tanto, la temperatura puede afectar la transición sol-gel del sistema y eventualmente conducir a una conversión rápida entre hinchamiento y contracción. Los hidrogeles sensibles a la temperatura sintetizados a partir de polímeros biodegradables han atraído atenciones especiales, fundamentalmente como sistemas de administración de fármacos.²⁶

2.2.6. Aplicación de los hidrogeles en sistemas de liberación controlada de fármacos.

En el tratamiento de diversas enfermedades, los fármacos generalmente se administran por las vías convencionales (Figura 4) principalmente por vía oral, transdermal o intravenosa. Dicha administración conlleva varios inconvenientes como son el poco control de los niveles necesarios del medicamento en el plasma, lo que hace ineficiente el tratamiento además de los efectos colaterales que se derivan del paso de estos fármacos por regiones ajenas al lugar donde se produce la afección. El estudio de la liberación controlada de sustancias activas en los sistemas vivos se presenta como una alternativa de solución a la anterior situación, por lo que, para muchos investigadores es de gran interés el desarrollo de formas de administración de fármacos de una manera controlada, para hacer los procesos terapéuticos más efectivos y cómodos para el paciente.²³



Fig. 4. Vías convencionales de administración de fármacos.

Desde el punto de vista de los materiales, la tendencia es obtener sistemas inteligentes, cargados con el principio activo del medicamento, que respondan a estímulos del ambiente y puedan liberar su carga en el lugar, el tiempo y a la velocidad deseada.²³

Los hidrogeles son uno de los materiales más prometedores y versátiles con muchas aplicaciones potenciales, especialmente en el desarrollo de sistemas para la liberación controlada de medicamentos.²⁸

Su estructura altamente porosa se puede ajustar controlando la densidad de entrecruzamiento en la matriz y la afinidad de los hidrogeles por el ambiente acuoso en el que están hinchados. Su porosidad también permite la carga de fármacos en la matriz de

gel y la posterior liberación del fármaco a una velocidad que depende del coeficiente de difusión de la molécula pequeña o macromolécula a través de la red. De hecho, los beneficios de los hidrogeles para el suministro de fármacos pueden ser en gran parte farmacocinéticos, específicamente que se crea una formulación de depósito a partir de la cual los fármacos eluyen lentamente, manteniendo una alta concentración local de fármaco en los tejidos circundantes durante un período prolongado, aunque también pueden usarse para entrega sistémica.³²

Los hidrogeles presentan buenas propiedades de biocompatibilidad debido a que sus superficies hidrofílicas tienen poca energía libre interfacial cuando entran en contacto con el fluido corporal, por lo que exhiben un especial interés para su uso como portadores de fármacos y andamios de tejido artificial.³³

En comparación con otros biomateriales, los hidrogeles forman estructuras porosas con alta permeabilidad que facilitan el intercambio de oxígeno, nutrientes y metabolitos. Además, presentan adecuada biocompatibilidad y propiedades similares a los tejidos biológicos debido a su alto contenido de agua y su consistencia suave y elástica. Por todo lo anterior representan una opción potencial para el diseño de nuevos sistemas con propiedades más específicas de aplicación en el campo de la liberación controlada y/o dirigida de sustancias bioactivas.^{31,34,35}

2.3. Poli (ácido- γ -glutámico) [γ -PGA].

2.3.1. Estructura química.

El Poli (ácido- γ -glutámico) [γ -PGA] es una homo-poliámidida que consiste en monómeros de ácido D- y L-glutámico, que están interconectados por los enlaces amida formados entre los grupos α -amino y γ -carboxilos (Figura 5). Es un biopolímero ópticamente activo que tiene un centro quiral en cada unidad de glutamato.

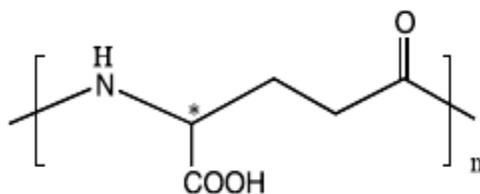


Fig. 5. Estructura química del Poli (ácido- γ -glutámico).

El γ -PGA puede adoptar diversas conformaciones, en dependencia de las condiciones ambientales, como el pH, la concentración de polímero y la fuerza iónica. El γ -PGA-H puede adoptar conformaciones regulares tipo α -hélice u hoja- β , además de las formas globulares tipo ovillo. Las conformaciones helicoidales son exclusivas del γ -PGA-H. El γ -PGA-Na o K se encuentra en forma de ovillo expandido o como hoja β .³⁶

El γ -PGA es un polímero de origen microbiano, biodegradable, biocompatible y que no resulta tóxico ni para el ser humano ni para el medio ambiente.^{24,28,37} Estas propiedades únicas hacen que el γ -PGA tenga amplias posibilidades de aplicación en los campos de la industria farmacéutica, alimentaria, cosmética y agrícola.³⁸

2.3.2. Historia.

El γ -PGA fue descubierto por primera vez en 1973 por Ivanovic y sus colaboradores como componente de la cápsula de la bacteria *Bacillus anthracis*, después que se liberara al medio previamente esterilizado, producto del proceso de envejecimiento y lisis natural de las células. El γ -PGA es el componente principal en el mucílago viscoso del Natto, un alimento saludable en Japón. El Natto, ha estado en uso doméstico y comercial y se ha consumido durante más de mil años, se produce al vapor de pequeñas semillas de soja y se fermentan con cultivo de *Bacillus subtilis*.^{36,39,40}

2.3.3. Obtención del γ -PGA.

2.3.3.1. Cepas que producen γ -PGA.

El γ -PGA es producido predominantemente por bacterias que pertenecen a *Bacillus sp.*, tales como: *B. anthracis*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. pumilis*, *B. mojavensis* y *B. amyloliquefaciens*. También se conoce que puede ser producido por una arqueobacteria halófila, *Natrialba aegyptiaca sp.* Sin embargo, las especies *B. licheniformis* y *B. subtilis* han sido las más estudiadas y utilizadas para la producción fermentativa de γ -PGA.^{41,42}

2.3.3.2. Biosíntesis del γ -PGA.

Las bacterias productoras de γ -PGA se dividen en dos categorías: bacterias dependientes del ácido L-glutámico y bacterias independientes del ácido L-glutámico.³⁸ En las bacterias independientes del ácido L-glutámico, todo el ácido glutámico requerido para producir γ -PGA se genera a partir de una fuente de carbono a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) (Figura 6). Estas cepas producen ácido L-glutámico a partir del ácido cítrico por medio del ácido isocítrico y el ácido 2-oxoglutarico con la ayuda de la glutamato deshidrogenasa (GDH). Parte del ácido L-glutámico se convierte en el isómero D a través de la acción de la glutamato racemasa. También funciona una vía de conversión indirecta a través de L- y D-Alanina. Las unidades de ácido L / D-glutámico en el citoplasma se mueven a la membrana celular donde la γ -PGA sintetasa (Pgs) integrada en la membrana las ensambla en γ -PGA. En las cepas dependientes del ácido L- glutámico, una vez ingerido este, el ácido L-glutámico se convierte parcialmente en ácido D-glutámico. La síntesis de γ -PGA a partir de los monómeros utiliza la misma ruta biosintética que en los productores independientes del ácido L-glutámico.⁴³

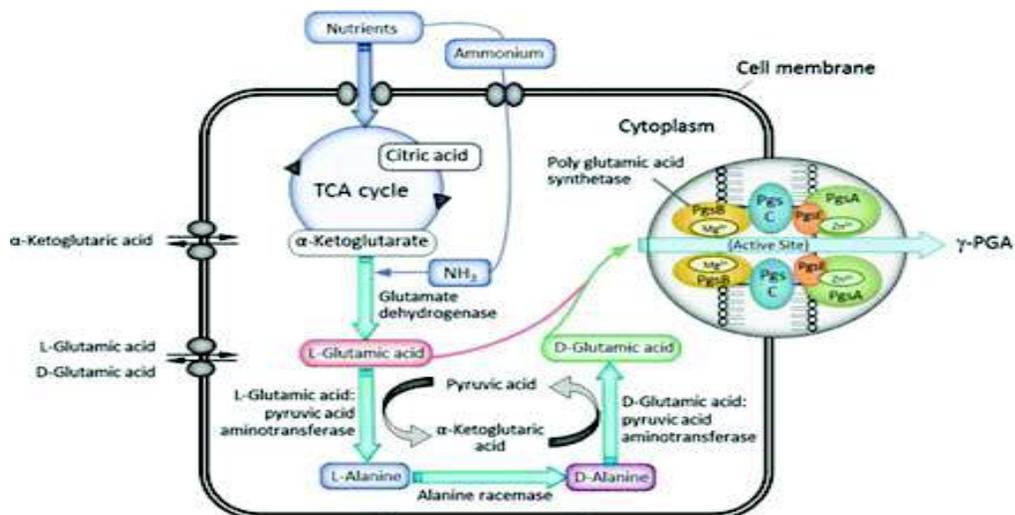


Fig. 6. Ruta biosintética del γ -PGA en especies *Bacillus* dependientes e independientes del ácido L-glutámico, a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA).

2.3.3.3. Influencia de la composición y condiciones del medio de cultivo.

Además del ácido L-glutámico, otros factores como las fuentes de carbono y nitrógeno, la fuerza iónica, la aireación, la agitación y el pH del medio afectan la productividad y la calidad de γ -PGA. El glicerol como fuente de carbono en el medio de fermentación es responsable de la disminución de la longitud de la cadena de γ -PGA, lo que conduce a la disminución de la viscosidad del caldo durante la fermentación y mejora la absorción de sustratos, mejorando eventualmente el crecimiento celular y la producción de γ -PGA. Como fuente de Nitrógeno al medio, es un requerimiento la presencia de iones NH_4^+ libres. Las sales inorgánicas como CaCl_2 y MnSO_4 tienen un efecto significativo sobre el rendimiento, así como en la composición estereoquímica del γ -PGA. El K_2HPO_4 actúa como fuente del fósforo y en su ausencia no hay proliferación celular.⁴¹ Un factor determinante es el pH del medio, el cual debe encontrarse entre 6.5 y 7.³⁸⁻⁴⁴ La agitación controla la transferencia de nutrientes y la distribución de aire y oxígeno, mientras que la aireación determina la oxigenación del cultivo y también contribuye a la mezcla masiva del fluido de fermentación, especialmente donde las tasas de agitación mecánica son bajas. Por ende, tanto la agitación como la oxigenación del cultivo son factores que contribuyen positivamente en el aumento del rendimiento en la producción del γ -PGA.⁴¹

Se ha reportado en la literatura el Medio E (Tabla 1)⁴⁴ como uno de los medios de cultivo más ampliamente utilizados, pues brinda muy buenos rendimientos en el proceso de biosíntesis del γ -PGA.⁴⁵

Tabla 1. Composición del Medio E.

Nutrientes	Cantidad (g/L)	Nutrientes	Cantidad (g/L)
Acido L-glutámico	20	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
Acido cítrico	12	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.04
Glicerol	80	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.15
NH_4Cl	7	$\text{MnSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	0.0057
K_2HPO_4	0.5	H_2O	csp 1L

2.3.4. Propiedades físico-químicas del γ -PGA.

El γ -PGA es un poliácido, debido a que presenta en su estructura grupos carboxilos laterales libres, con un valor de $pK_a = 4-4,8$.²⁹ Es por tanto un polielectrolito, pudiendo encontrarse sin ionizar cuando está como poliácido (γ -PGA-H) o ionizado cuando se encuentra en forma de sal (γ -PGA-Na o γ -PGA -K). El peso molecular de γ -PGA puede variar de 100 KDa a 2500 KDa.³⁶ Se ha reportado un punto de fusión de 210°C y su descomposición ocurre a temperaturas muy cercanas, de forma que a 240°C ha perdido un 10 %.⁴⁶

2.3.5. Aplicaciones del γ -PGA.

γ -PGA y sus derivados han sido de interés en los últimos años en una amplia gama de campos industriales como alimentos, cosméticos, medicina y tratamiento de aguas. γ -PGA y sus derivados ofrecen una amplia gama de aplicaciones únicas que incluyen el uso como espesante, humectante, materiales de liberación sostenida, portador de fármacos, apósitos para heridas, fibras biodegradables, floculantes de biopolímeros, absorbentes de metales pesados e hidrogeles altamente absorbentes de agua.

La mayoría de los γ -PGA comerciales se producen actualmente mediante fermentación microbiana a partir de biomasa. En comparación con otros métodos, la fermentación microbiana es la más rentable y tiene numerosas ventajas, incluidas las materias primas de bajo costo, las condiciones suaves de reacción, la contaminación ambiental mínima, así como la alta pureza y propiedades fisicoquímicas constantes del polímero.⁴⁷ La producción de γ -PGA ya se ha establecido a escala industrial porque puede producirse a partir de recursos sostenibles. Por lo tanto, el desarrollo de este ecomaterial es tanto económico como ambientalmente valioso.⁴⁸

Debido a las importantes propiedades que presenta el γ -PGA, hoy en día muchos investigadores se han interesado no solo en su producción, sino también en su modificación química con el propósito de sintetizar nuevos derivados que pudiesen ser aplicados en diferentes campos de la ciencia. Se han prepararon geles de γ -PGA reticulados mediante el uso de reactivos de irradiación y o entrecruzantes, tales como dihalogenoalcanos y alquildiaminas. Algunos de estos geles pueden absorber una gran cantidad de agua y sus aplicaciones son principalmente para fines médicos o área ambiental, como sistemas de liberación de fármacos y reactivos para el tratamiento del agua. Sin embargo, los agentes entrecruzantes utilizados en la mayoría de los estudios son compuestos derivados del petróleo. Teniendo en cuenta que los geles biodegradables se degradarán en el medio ambiente o en los cuerpos humanos después del uso, es importante no solo que las cadenas principales del gel sean biopolímeros, sino también que los entrecruzantes sean compuestos naturales.⁴⁹

2.4. Entrecruzantes. Generalidades.

Los agentes entrecruzantes son moléculas con al menos dos grupos funcionales, permitiendo la formación de puentes entre cadenas poliméricas. La reticulación covalente conduce a la formación de una red permanente que permite la difusión libre del líquido y mejora las propiedades mecánicas del gel. En los hidrogeles el fenómeno de difusión depende principalmente de la densidad de reticulación, que está determinada por los parámetros de reacción. Las cadenas poliméricas forman una red que contiene muchos poros llenos de pequeñas moléculas como el agua, que pueden estar libres o unidas a los grupos hidrofílicos de la red. La difusión también está influenciada por la naturaleza del agente de entrecruzamiento. La naturaleza química y la longitud de las unidades del puente del entrecruzante influyen en la porosidad, la absorción de agua y el hinchamiento.⁵⁰

El entrecruzamiento que tiene lugar en la estructura tridimensional de los hidrogeles es el responsable de evitar la disolución de las cadenas poliméricas hidrófilas en un entorno acuoso. De hecho, se ha utilizado una gran variedad de métodos para establecer la reticulación en la preparación de hidrogeles. Para múltiples aplicaciones se pretende la síntesis de hidrogeles biodegradables, donde la reticulación estará dada por la formación de enlaces químicos lábiles que puedan romperse en condiciones fisiológicas, ya sea enzimática o químicamente, en la mayoría de los casos por hidrólisis. Una vez que se implantan los hidrogeles, es de suma importancia que estos presenten una buena biocompatibilidad y que los productos de degradación formados tengan una nula toxicidad. Esto significa que los compuestos formados pueden metabolizarse en productos inofensivos o pueden excretarse mediante el proceso de filtración renal.⁵¹

Los polímeros solubles en agua deben sus propiedades de solubilidad a la presencia de grupos funcionales (principalmente OH, COOH, NH₂) que pueden usarse para la formación de hidrogeles. Los enlaces covalentes entre cadenas poliméricas se pueden establecer mediante la reacción de grupos funcionales con reactividad complementaria, como una amina-ácido carboxílico o una reacción isocianato-OH / NH₂, o mediante la formación de bases de Schiff. Las reacciones de condensación entre grupos hidroxilo o aminas con ácidos carboxílicos o derivados de las mismas se aplican con frecuencia para la síntesis de polímeros para producir poliésteres y poliamidas, respectivamente.⁵¹

Los hidrogeles preparados a partir de polímeros sintéticos o un agente de reticulación tóxico presentan limitaciones en aplicaciones biomédicas y de ingeniería de tejidos. Por lo tanto, es importante diseñar y producir un tipo de hidrogel no tóxico.⁵²

2.4.1. Urea como entrecruzante.

La Urea es conocida como carbamida o carbonildiamida, el nombre según la IUPAC es diaminocetona. Es un compuesto orgánico cuya fórmula química es CO(NH₂)₂ (Figura 7), con un peso molecular de 60,06 g/mol. Comercialmente se encuentra como un sólido cristalino, blanco y presenta un ligero olor a amoníaco.⁵³ Tiene un punto de fusión de 132.7°C. Es soluble en agua y en alcohol, y ligeramente soluble en éter. Posee propiedades higroscópicas. Se obtiene mediante la síntesis de Wöhler, que fue diseñada en 1828 por el químico alemán Friedrich Wöhler, y fue la primera sustancia orgánica obtenida artificialmente.⁵⁴

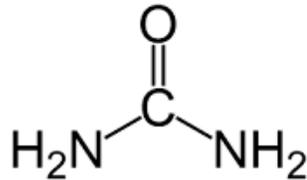


Fig. 7. Estructura química de la Urea.

La Urea es el principal producto terminal del metabolismo proteico en el hombre y en los mamíferos. Se produce a partir del amoníaco en el riñón e hígado. No es una sustancia tóxica y puede estar en altos niveles sin causar alteraciones, siendo sus principales medios de excreción el sudor y la orina. ⁵⁴

Tiene múltiples aplicaciones industriales, entre las que figuran como fertilizante de plantas, cosméticos, en la industria farmacéutica, en la industria de plásticos como componente de adhesivos y en la producción de resinas, como suplemento alimenticio para ganados, entre otras. ⁵³

2.4.1.1. Aplicaciones fundamentales de la Urea.

-La urea es uno de los fertilizantes más usados en la actualidad debido a su alto contenido en nitrógeno (46 % de nitrógeno). Además de su utilización directa como fertilizante nitrogenado simple, se emplea frecuentemente como materia prima para la elaboración de abonos de mezcla. Tiene una gran facilidad de aplicación, debido a que puede aplicarse directamente en el suelo o se puede preparar una solución y aplicarse de forma foliar. La urea se utiliza también como estabilizador en explosivos de nitrocelulosa. ⁵⁴

-La urea aplicada tópicamente, tiene efectos beneficiosos sobre la estructura y fisiología de la piel. Se ha utilizado durante décadas para mejorar la hidratación, así como un agente queratolítico en la psoriasis, la ictiosis y la dermatofitosis. La urea mejora la función de barrera después del uso tópico, y es beneficiosa para enfermedades infecciosas cutáneas, como como onicomiosis. Estos estudios indican que las aplicaciones tópicas de urea al 20% mejoran la función de barrera cutánea y la expresión de la defensa antimicrobiana en la piel humana normal. ^{55,56}

Los efectos secundarios de la urea son leves y pueden incluir erupciones cutáneas, picazón, irritación y dermatitis alérgica de contacto. ⁵⁷

Debido a las características y propiedades antes mencionadas de la Urea, ésta fue seleccionada para ser empleada como agente entrecruzante, puesto que presenta grupos funcionales susceptibles a ser modificados químicamente para la formación de los hidrogeles, además es de nuestro interés utilizar un reactivo que sea lo más inocuo posible al organismo y así evitar los riesgos de efectos toxicológicos en la aplicación del material.

2.5. Técnicas de caracterización.

2.5.1. Espectroscopía de Infrarrojo (IR). Aspectos fundamentales.

La espectroscopia de infrarrojo es una técnica analítica no destructiva que se emplea para determinar cualitativa y cuantitativamente los compuestos moleculares de muestras sólidas, líquidas e incluso gases.⁵⁸

La espectroscopía molecular se basa en la interacción entre la radiación electromagnética y las moléculas. Dependiendo de la región del espectro en la que se trabaje y por tanto de la energía de la radiación utilizada (caracterizada por su longitud o número de onda), esta interacción será de diferente naturaleza: excitación de electrones, vibraciones y rotaciones moleculares. La molécula, al absorber la radiación infrarroja, cambia su estado de energía vibracional y rotacional. Las transiciones entre dos estados rotacionales requieren muy poca energía, por lo que solo es posible observarlas específicamente en el caso de muestras gaseosas. En el caso del estudio del espectro infrarrojo (IR) de muestras sólidas y líquidas sólo se tienen en cuenta los cambios entre estados de energía vibracional.

Utilizando la mecánica cuántica y el modelo del oscilador armónico para representar los enlaces, se demuestra que las bandas en el infrarrojo se producen como consecuencia de transiciones entre niveles de energía en los que el número cuántico vibracional (ν) cambia en una unidad ($\Delta \nu = \pm 1$), denominada banda fundamental, o en más de una unidad ($\Delta \nu = \pm 2, \pm 3, \dots$), que se denominan sobretonos. Aunque teóricamente son posibles $\Delta \nu$ superiores, en la práctica sólo se observan estas tres transiciones.

Una molécula poliatómica (n átomos) tiene $3n-6$ modos de vibración diferentes y $3n-5$ si la molécula es lineal. Cada uno de estos modos de vibración viene representado por una curva de energía potencial diferente y da lugar a una banda fundamental y sus correspondientes sobretonos en el infrarrojo. Las bandas de absorción aparecen aproximadamente a frecuencias: ν (la banda fundamental), 2ν y 3ν (los sobretonos). Estos últimos tienen una menor intensidad que la banda fundamental.⁵⁹

Los movimientos vibracionales se distinguen por el tipo de desplazamiento generado en los enlaces, conociéndose como vibraciones de tensión o flexión. Las tensiones provocan un estiramiento o estrechamiento del enlace y las flexiones generan una deformación del enlace (Figura 8).⁶⁰

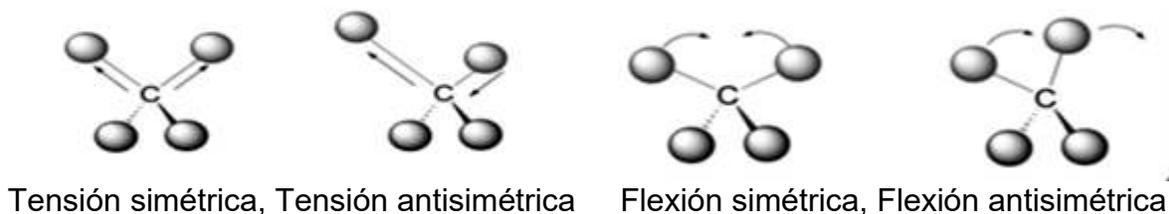


Fig. 8. Tipos de movimientos vibracionales en una molécula poliatómica.

Regiones espectrales

Aunque el espectro infrarrojo se extiende desde 10 a 12500 cm^{-1} , desde el punto de vista funcional se divide en tres zonas (Tabla 2): IR lejano, donde se producen las absorciones debidas a cambios rotacionales, el IR medio (MIR), donde tiene lugar las vibraciones fundamentales y el IR cercano (NIR), donde se producen absorciones debidas a sobretonos y combinaciones de las bandas fundamentales.^{59,61}

Tabla 2. Regiones del espectro IR.

Infrarrojo	cm^{-1}
Lejano	10 a 650
Medio (IR)	650 a 4000
Próximo	4000 a 12500

El análisis de una muestra por FTIR provee como resultado un espectro de absorción de infrarrojo el cual proporciona información acerca del tipo de enlace, grupos funcionales y la estructura química en general de la muestra analizada. Todas las moléculas pueden manifestar una serie de bandas de absorción, cada banda corresponde con un movimiento de vibración de un enlace específico dentro de la molécula, a este conjunto de señales se les conoce como la “huella dactilar” del compuesto.^{60,62}

Tipos de medidas en el infrarrojo

Cuando la radiación incide en la muestra, ésta puede sufrir diferentes fenómenos: absorción, transmisión y reflexión. La medida más común en el infrarrojo es la que se basa en la absorción (o la intensidad transmitida), aunque también se han desarrollado espectroscopías basadas en el fenómeno de la reflexión como son la reflectancia total atenuada y la reflectancia difusa.⁵⁹

Reflectancia Total Atenuada (ATR)

La reflexión interna se produce cuando una radiación infrarroja entra en un cristal ATR transmisor y de alto índice de refracción. El cristal está diseñado para permitir una reflexión interna total que crea una onda evanescente sobre la superficie del cristal. Esta onda se extiende a la muestra que se mantiene en contacto íntimo con el cristal, registrándose el espectro de infrarrojo del analito. La profundidad de penetración de la onda evanescente dentro de la muestra es función del material del cristal y del ángulo de incidencia del haz (Figura 9). A menor índice de refracción y menor ángulo de incidencia, mayor penetración se consigue. La profundidad de penetración también se incrementa con la longitud de onda. Su principal ventaja práctica es la nula preparación de la muestra, lo que hace el uso de este instrumento versátil y eficiente para la medición rápida de líquidos, geles y pastas.⁵⁸

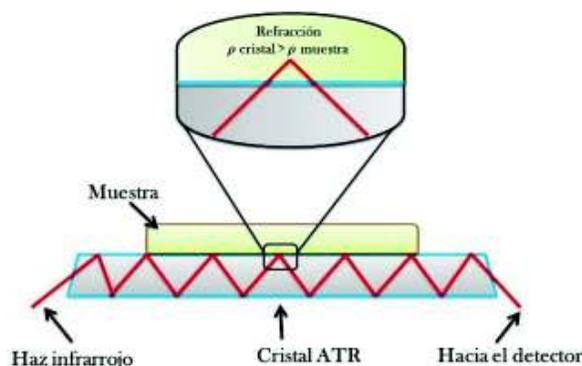


Fig. 9. Esquema de la técnica de reflectancia total atenuada.

Aplicaciones

La espectroscopia infrarroja es una de las técnicas espectroscópicas más versátiles y de mayor aplicación. A continuación, se citan algunas de las aplicaciones más importantes:⁶²

- Caracterización e identificación de materiales:
 - . Polímeros y plásticos
 - . Sólidos inorgánicos (minerales, catalizadores, materiales compuestos)
- Análisis de productos farmacéuticos y de síntesis.
- Análisis de contaminantes
- Ciencia Forense (identificación)
- Biomedicina (análisis de tejidos)
- Conservación artística (análisis de pigmentos, materiales utilizados)
- Industria del reciclaje (identificación de materiales poliméricos)
- Agricultura y alimentación (IR cercano)
- Seguimiento de procesos químicos
 - . Polimerizaciones, reticulaciones
 - . Reacciones catalíticas

2.5.2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Aspectos fundamentales.

La Microscopía Electrónica de Barrido es una técnica analítica que permite la observación y caracterización superficial de cualquier material, sea éste orgánico o inorgánico. Por medio de este procedimiento, se puede analizar la morfología de la superficie de un espécimen, así como su composición química. Tiene gran profundidad de campo. Produce imágenes de alta resolución. La preparación de las muestras es relativamente fácil. Es posible determinar cualitativamente ciertas propiedades físicas, como la conductividad eléctrica, la estructura cristalina, presencia de fases, entre otras.⁶³

El principio del sistema SEM consiste en que si se hace incidir sobre la muestra un haz de electrones finamente enfocado, emite una señal que puede registrarse en una pantalla mediante un tubo de rayos catódicos. El intercambio de energía que se lleva a cabo entre el haz de electrones y la muestra resulta en una emisión de electrones y radiación electromagnética que puede ser detectada para generar una imagen.⁶⁴

El número de electrones emitidos en el proceso de interacción del haz de electrones incidentes en la muestra depende tanto del material (cuanto mayor es el número atómico mayor es la emisión: contraste por diferente elemento químico) como de su forma (la

emisión sobre una zona rugosa, borde o arista es mayor debido entre otras cosas a la mayor concentración de carga en esos puntos: contraste topográfico). Al desplazar el haz a través la muestra, mediante las lentes deflectoras, se genera una línea y, superponiendo líneas, se forma una imagen.

Entre las ventajas de la utilización de los equipos de SEM cabe mencionar su fácil manejo y buena resolución en el análisis de las muestras, además posee amplia profundidad de campo (hasta 3 nm a 30kV, es decir 1000000X de aumento) y es posible combinar el equipo con otros componentes. Y entre las limitaciones se encuentran el alto costo de los equipos y la necesidad de que las muestras deben ser conductoras, de no ser así las muestras deben ser recubiertas con Oro/Paladio. Es necesario trabajar bajo vacío, debido a que el aire contiene muchas moléculas que interferirían con los electrones emitidos por el microscopio electrónico de barrido, y no se obtendría una lectura fiable.⁶⁵ En la figura 10 se muestra el esquema de un Microscopio Electrónico de Barrido.

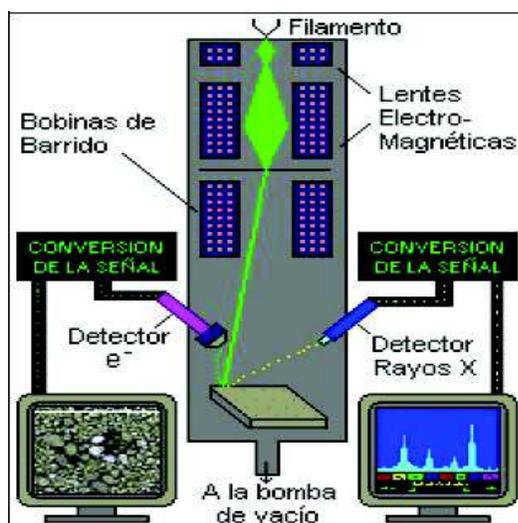


Fig. 10. Esquema de un Microscopio Electrónico de Barrido.⁶⁶

La microscopía electrónica de barrido contribuye al desarrollo de nuevos campos de investigación, al ser capaz de ver estructuras invisibles al ojo humano, y la identificación de elementos por medio de espectrometría de dispersión de rayos X. Es aplicable en diversas áreas de investigación, como geología, estudio de materiales, metalurgia, odontología, paleontología y arqueología, control de calidad, fibras textiles, medicina forense, botánica, entre otros.⁶⁵

2.5.3. Análisis Térmico.

El análisis térmico se utiliza para el estudio de la variación de alguna propiedad física de una sustancia y/o de sus productos de reacción en función de la temperatura (o en función del tiempo a temperatura constante), mientras la sustancia se somete a un programa de temperatura controlada. Estas técnicas encuentran una amplia aplicación tanto en el control de calidad como en investigación de productos industriales, tales como: polímeros, productos Inorgánicos, arcillas y minerales. De entre las diversas técnicas que se engloban en este campo analítico, las más ampliamente utilizadas son: Termogravimetría (TG), Análisis térmico diferencial (DTA) y Calorimetría diferencial de barrido (DSC).⁶⁷

2.5.3.1. Análisis Termogravimétrico (TGA)

Esta técnica se emplea para determinar las propiedades de estabilidad térmica de los polímeros. El análisis por Termogravimetría se basa en la pérdida de masa de una muestra colocada en una balanza de ultraprecisión (termobalanza), capaz de detectar pérdidas del orden de microgramo, mientras se calienta progresivamente o a temperatura constante en atmósfera inerte o aire. Se puede operar tanto en modo dinámico como isotérmico. En el modo dinámico, la temperatura de la muestra va aumentando de forma controlada (normalmente de forma lineal con el tiempo) mientras que en el modo isotérmico la temperatura se mantiene constante durante todo el tiempo que dure el experimento. La balanza analítica es el elemento crucial de esta técnica. Un cambio de la masa de la muestra produce una desviación en el brazo de la balanza, que se traduce en información sobre la masa. Las muestras se colocan en el horno dentro de un portamuestras o cápsula hecho de aluminio, platino o alúmina. La representación de la masa o del porcentaje de masa en función del tiempo o temperatura se denomina termograma. La pérdida gradual de masa se debe a diferentes causas: la primera pérdida importante generalmente es consecuencia de la evaporación de disolvente residual o de humedad. A más altas temperaturas comienza la descomposición del polímero que, además de dar información de su estabilidad térmica, puede servir para correlacionar la estructura y composición con la pérdida de determinados fragmentos conocidos.^{68,69} En la figura 11 se muestran el esquema de un Analizador Termogravimétrico.

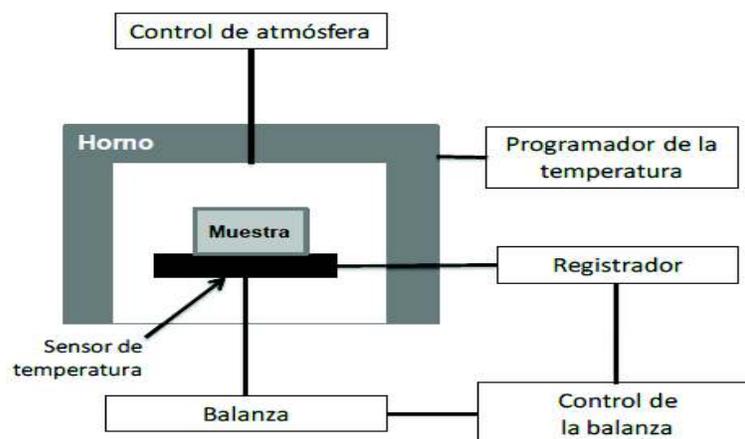


Fig. 11. Esquema de un Analizador Termogravimétrico.⁷⁰

2.5.3.2. Análisis térmico diferencial (DTA)

Es una técnica con la que se mide la diferencia de temperatura entre una sustancia y un material de referencia en función de la temperatura cuando la sustancia y el material de referencia se someten a un ciclo de temperatura controlado. Con esta técnica se detectan los fenómenos que se producen en una sustancia a una temperatura determinada, como pueden ser la fusión y solidificación, descomposición térmica, oxidación, etc. Normalmente, el ciclo de temperatura implica el calentamiento de la muestra y del material de referencia, de tal manera que la temperatura de la muestra aumenta linealmente con el tiempo. La diferencia de temperatura T entre la temperatura de la muestra y la temperatura del material de referencia se controla y se representa en el eje de ordenadas, dando lugar a un termograma diferencial.^{67,71} En la figura 12 se muestra el esquema de un Analizador Térmico Diferencial.

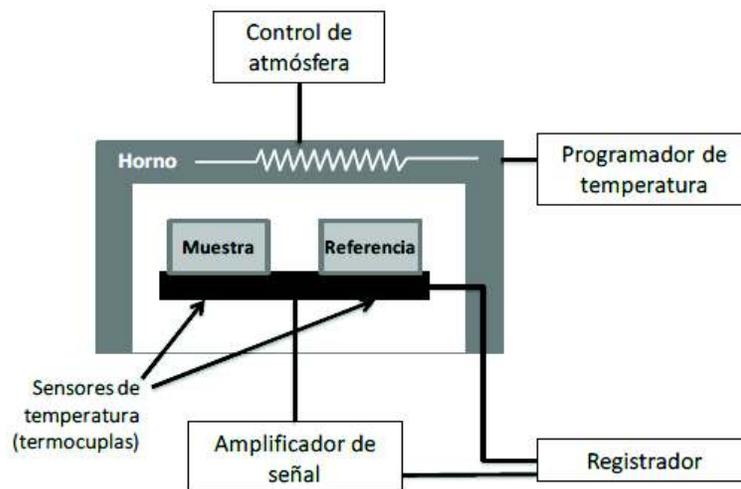


Fig. 12. Esquema de un Analizador Térmico Diferencial.⁷⁰

2.5.3.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

El fundamento de la técnica de calorimetría diferencial de barrido, (DSC por sus siglas en inglés), radica en el registro de las variaciones de flujo de calor o de la temperatura, entre la muestra a estudio y una referencia. La muestra se coloca en una cápsula igual a otra vacía que actúa como referencia y se someten al mismo programa de temperatura. Durante el experimento se aplica el principio de balance nulo, es decir, que cualquier cambio en el valor de la entalpía que experimente la muestra, implica una adición energética, bien sea al crisol de referencia o a la muestra, con el objetivo de mantenerlos a la misma temperatura. Como la energía térmica es exactamente igual en magnitud a la energía absorbida o liberada en la transición, el balance de energía proporcionará una medida calorimétrica directa de la energía de transición. Por lo tanto, la técnica de DSC mide la energía suministrada necesaria para mantener muestra y referencia a la misma temperatura. Generalmente el material de referencia es un material inerte que no experimenta ninguna transición o transformación en el intervalo de temperaturas a estudio.⁶⁹⁻⁷² En la figura 13 se muestra el esquema de un Calorímetro Diferencial de Barrido.

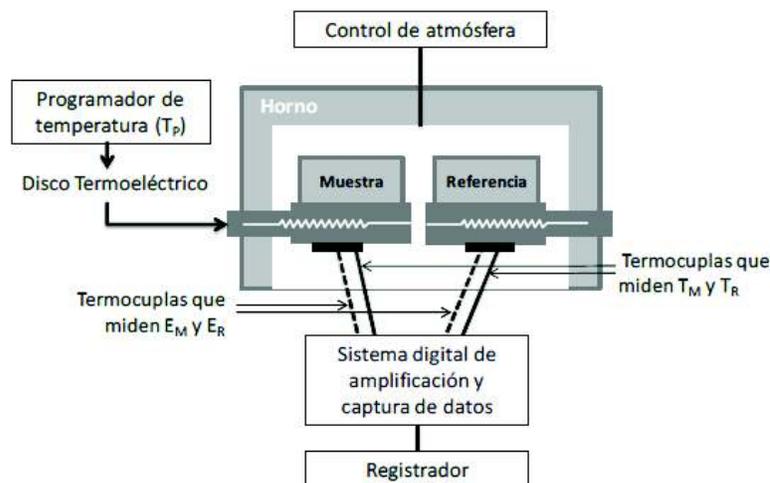


Fig. 13. Esquema de un Calorímetro Diferencial de Barrido.⁷⁰

2.5.4. Cinética de Hinchamiento.

El hinchamiento de los hidrogeles implica movimientos segmentales de gran escala, que generan como respuesta una separación entre las cadenas de los hidrogeles que se va incrementando cada vez más con el hinchamiento. En estos sistemas a medida que se difunde el disolvente dentro del hidrogel, la respuesta de las cadenas no es inmediata. De manera que la penetración de pequeñas moléculas depende de las propiedades físicas de la red de polímero y las interacciones entre los segmentos de polímero y las moléculas pequeñas. En una estructura rígida con una alta densidad de entrecruzamientos disminuyen los espacios entre las cadenas del hidrogel y la misma no podrá ser expandida ni mantener una gran cantidad de agua. En este sentido, el análisis de los mecanismos de difusión del agua en los hidrogeles ha recibido considerable atención en los últimos años debido a la importante aplicación de estos polímeros en el campo de la biomedicina, en el área farmacéutica y ambiental, así como en la ingeniería agroindustrial. El estudio de la difusión es importante también en el ámbito de la liberación de fluidos, donde se ha reportado que la velocidad de liberación de un fármaco u otra sustancia, desde la matriz de un hidrogel va a estar controlada por el volumen de los poros presentes, y de su cantidad e interconexiones, así como del tamaño macromolecular de la sustancia a liberar y de las composiciones químicas del hidrogel y de la sustancia.⁷³⁻⁷⁶

Cuando un xerogel se sumerge en una solución acuosa, el agua se difunde en su interior y la red macromolecular se expande, lo que resulta en un hinchamiento del sistema. El mecanismo de penetración del agua en los hidrogeles puede estudiarse utilizando diversos enfoques. La ecuación empírica simple, llamada ecuación de la ley de potencia (ecuación 2), propuesta inicialmente por Buckley para describir el hinchamiento del sistema de polímeros en solventes, generalmente es la primera opción para este propósito:

$$F = k * t^n \quad \text{Ec. 2.}$$

donde F generalmente se expresa como una fracción relacionada con la cantidad de agua obtenida por el hidrogel en un momento dado y se ha definido de varias maneras (más adelante se presentan dos de las definiciones más empleadas); k es una constante relacionada con el sistema de red macromolecular y el medio de hinchamiento y n es el exponente de difusión, que es indicativo del mecanismo de transporte.

Bajo esta perspectiva, se analiza el hinchamiento del sistema para establecer qué factores físicos determinan el mecanismo de penetración del agua en el hidrogel. Los valores de n cercanos a 0.50 son indicativos de un mecanismo de transporte controlado por una difusión fickiana (caso I), en el que el agua penetra en la red a través de espacios libres entre las cadenas del polímero. Por otro lado, los valores de n de 0.50-1.00 implican que el mecanismo de transporte exhibe un comportamiento anómalo, que surge de la contribución de dos procesos concomitantes al mecanismo general de transporte: la difusión de agua fickiana y la relajación del polímero (definida como la movilidad de las cadenas de polímero que resulta en la difusión del agua en la red). En el caso especial cuando n = 1, el mecanismo de transporte está controlado por una difusión no fickiana (caso II) que surge de los procesos de relajación de las cadenas de polímeros. La ecuación 2 se aplica generalmente a las etapas iniciales de hinchamiento y los gráficos de ln F

versus $\ln t$ producen líneas rectas hasta casi un 60% del valor de equilibrio ($W_t / W_{eq} < 0,60$; donde W_t representa el peso alcanzado por el hidrogel en el tiempo t y W_{eq} el peso máximo (en equilibrio)).^{76,77}

Hay varias definiciones reportadas para F , entre las cuales las más usuales incluyen aquellas definidas por Crank (F_C , ecuación 3a) y Karadag et al. (F_K , ecuación 3b):⁷⁷

$$F_C = \frac{W_t}{W_{eq}} \quad \text{Ec. 3 a.}$$

Por lo tanto, F_C es una medida fraccionaria del hinchamiento del hidrogel en un momento dado respecto al hinchamiento máximo que puede alcanzar en el equilibrio.

$$F_K = \frac{(W_t - W_0)}{W_0} \quad \text{Ec. 3 b.}$$

Según esta definición, F_K representa la relación $W_{agua} / W_{xerogel}$ en un momento dado t , indicando directamente cuántas veces el xerogel ha absorbido su propio peso en agua.

Es común que los procesos de sorción para sistemas de polímero-solvente con frecuencia no se ajusten al comportamiento esperado de la teoría clásica de la difusión. La lenta reorientación de las moléculas de polímero puede conducir a una variedad de efectos.⁷⁸

En un esfuerzo por cuantificar la contribución de los procesos de difusión y relajación en el mecanismo de penetración de agua en el hidrogel, los datos que se obtienen del hinchamiento se pueden analizar mediante la ecuación 4:

$$F = k_1 * t^{1/2} + k_2 * t \quad \text{Ec. 4.}$$

donde k_1 es una constante de proporcionalidad relacionada con la contribución del proceso de difusión ($n = 1/2$) y k_2 es una constante de proporcionalidad relacionada con la contribución del proceso de relajación ($n = 1$). Esta ecuación fue propuesta inicialmente por Peppas y Sahlin para evaluar la contribución proveniente de los procesos de difusión y relajación al mecanismo global de liberación de un sistema de drogas / hidrogel. Al transformar la ecuación 4 (dividiéndola entre t) se llega a la siguiente expresión:

$$\frac{F}{t} = \frac{k_1}{t^{1/2}} + k_2 \quad \text{Ec. 4 a.}$$

A través de la cual se puede evaluar gráficamente la contribución de ambos procesos al representar F / t vs. $1 / t^{1/2}$.⁷⁷

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos.

Ácido-L-glutámico (99.7%, J. T. Baker)

Ácido cítrico ($\geq 99.5\%$, Sigma-Aldrich)

Glicerol anhidro (99.8%, J. T. Baker)

NH_4Cl ($\geq 99.5\%$, Meyer)

K_2HPO_4 (98%, FAGA LAB.)

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (98-102%, FAGA LAB.)

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (99.5%, FAGA LAB.)

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (99-105%, Meyer)

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($\geq 98\%$, Meyer)

NaOH (lentejas, 97%, Sigma-Aldrich)

HCl (ac.) (37.20%, FAGA LAB)

Cepa de la bacteria *Bacillus licheniformis* ATCC-9945a

γ -PGA crudo (sintetizado en el Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA))

Membranas de celulosa de 35 cm de longitud (tamaño de poro de 10000 Da, Sigma-Aldrich).

EDTA disódico dihidratado ($\geq 99\%$, Aldrich)

NaHCO_3 (99.7-100.5%, FAGA LAB.)

NaCl ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich)

Acetonitrilo anhidro (99.8%, Sigma-Aldrich)

Urea (99.4%, FAGA LAB.)

N-(3-Dimetilminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorohidrato [EDC] ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich)

Alcohol etílico absoluto (99.91%, FAGA LAB.)

Agua (calidad MiliQ)

Ácido acético glacial (99.5%, FAGA LAB.)

Acetato de sodio (99%, Sigma-Aldrich)

Na_2CO_3 anhidro (99%, FAGA LAB.)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (99.8%, J. T. Baker)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (98-102%, FAGA LAB.)

3.2. Metodologías

3.2.1. Obtención del γ -PGA.

3.2.1.1. Biosíntesis del γ -PGA.

En primer lugar, se realizó la propagación del inóculo de la cepa (figura 14), para lo cual, 50 mL del medio E (cuya composición se describe en la tabla 1) se adicionaron a un matraz Erlenmeyer y se esterilizó a 121 °C/15 min en una Autoclave marca All American. Posteriormente se inoculó con 2 mL de la bacteria conservada en Glicerol. El matraz se incubó a 37°C, a una velocidad de 250 rpm, durante 48 h en un Sheaker marca Barnstead Lab. Line, modelo Max Q 4000. Luego de transcurrido el tiempo de propagación, se colocaron 0.375 mL de la suspensión celular en viales esterilizados y se conservaron en 0.125 mL de una solución acuosa de Glicerol al 80% previamente esterilizada, manteniéndolos en congelación.



Fig. 14. Imágenes del proceso de propagación de la cepa de la bacteria *B. licheniformis*.

Posteriormente se procedió a la producción del polímero (figura 15), para lo cual se añadieron 700 mL del medio en matraces Erlenmeyer. Se esterilizó e inoculó con 0.5 mL del cultivo bacteriano conservado en Glicerol. Se incubó el matraz con el medio inoculado a 37°C, a una velocidad de 250 rpm durante 96 h. Una vez concluido el período de incubación, el contenido del matraz fue ajustado a pH = 3 para disminuir la viscosidad del medio y favorecer la separación de la fase acuosa (conteniendo el polímero) y el paquete bacteriano. Luego se centrifugó a 10000 rpm por 30 minutos en una Ultracentrífuga marca Hermle, modelo Z 36 HK; con el objetivo de separar la biomasa del medio de cultivo, quedando el γ -PGA disuelto en el sobrenadante. El líquido sobrenadante se precipitó en el mismo volumen de acetona. El polímero se aglomeró y fue retirado. El polímero que quedó disperso se recuperó por filtración. El polímero obtenido en forma de una masa viscosa se redisolvió en agua, se congeló y se secó por liofilización en un Liofilizador marca Labconco, FreeZone 4.5.

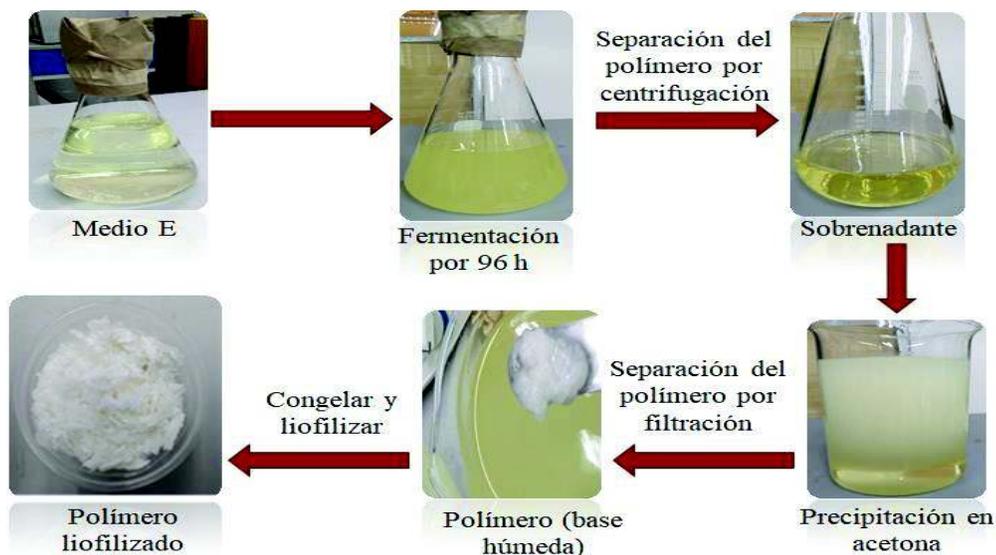


Fig. 15. Imágenes del proceso de producción del γ -PGA.

3.2.1.2. Purificación del γ -PGA mediante diálisis.

La purificación del γ -PGA se realizó mediante diálisis (figura 16). Se emplearon tubos para diálisis de acetato de celulosa de aproximadamente 35 cm de longitud, con capacidad de purificación de moléculas con masa molecular mayor a 10000 g/mol. Los tubos de diálisis se cargaron con una solución acuosa de γ -PGA al 2 % p/v. Una vez cargados los tubos con la disolución de polímero se sumergen en un recipiente con agua desionizada (pH=3). La diálisis se realizó durante 16 horas, realizando los cambios de agua cada 4 horas. Finalmente, se recuperó la solución de polímero, se congeló y liofilizó.

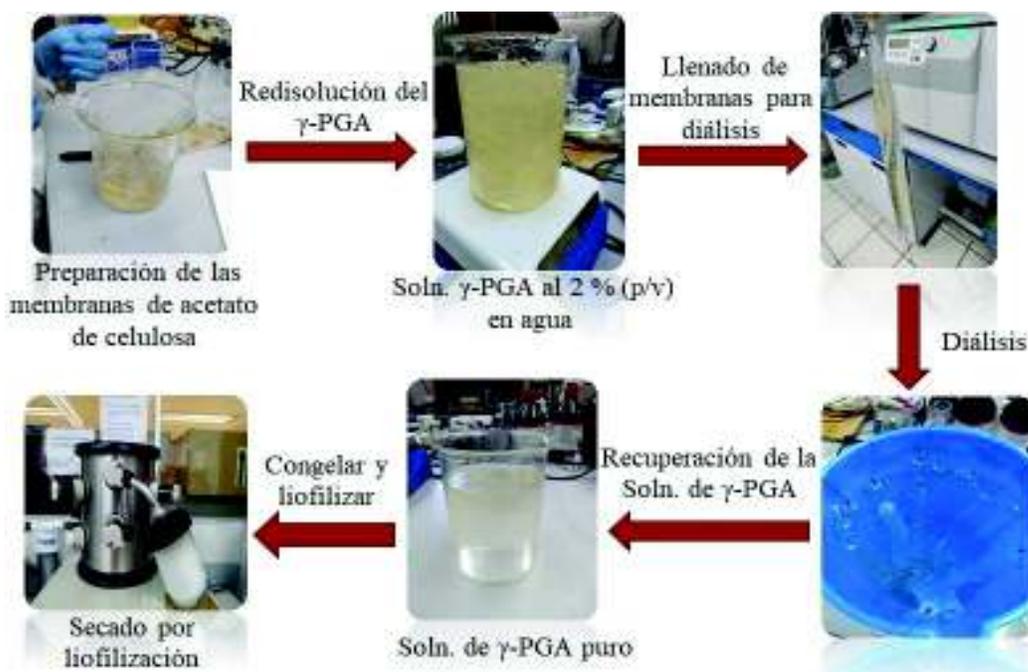


Fig. 16. Imágenes del proceso de diálisis del γ -PGA.

3.2.1.3. Determinación del peso molecular del γ -PGA.

Se preparó una solución de γ -PGA al 0.7% en una mezcla de NaCl 50mM/Acetonitrilo (4:1) (v/v). La solución del polímero se introdujo en un viscosímetro capilar Ubbelohde y se mantuvo a una temperatura de $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (figura 17). Se realizaron 10 mediciones del tiempo de flujo a la mezcla de solventes (t_0) y a la solución del polímero (t). A partir del valor promedio para t_0 y t , se determinó la viscosidad relativa (η_{rel}), según la ecuación 5:

$$\eta_{rel} = t / t_0$$

Ec. 5.



Fig. 17. Determinación de la viscosidad relativa de la solución de γ -PGA.

Luego se halló el logaritmo natural del valor de η_{rel} obtenido y se interpoló en una curva de calibración de $\ln \eta$ vs Masa Molecular (M_w) (obtenido por Cromatografía de Permeación de Gel (GPC)), y de esta forma se determinó el peso molecular del polímero. La curva de calibración fue realizada en una investigación anterior, donde se utilizaron soluciones de γ -PGA de diferente M_w y las mediciones se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones.

3.2.2. Síntesis de hidrogel de γ -PGA.

Se pesaron 0,2 g de γ -PGA y se añadió 1 mL de H_2O desionizada. Se agitó a 300 rpm por 15 min a temperatura ambiente. La solución del polímero se congeló y liofilizó, y se obtuvo el polímero seco en forma de esponja. Luego, a la esponja de γ -PGA se le añadió 0,06 g Urea y 0,1 g EDC, disueltos en 0,5 mL de H_2O desionizada. Posteriormente, se dejó reposar por 24 hrs para que ocurriera la reacción de entrecruzamiento. Transcurrido dicho tiempo, al hidrogel formado se le realizaron sucesivos lavados: Etanol (100%), Etanol- H_2O (70:30), Etanol- H_2O (50:50), H_2O (100%). Finalmente, el hidrogel se congeló y liofilizó (figura 18).



Fig. 18. Imágenes del proceso de obtención de los hidrogeles de γ -PGA y Urea.

3.3. Técnicas de caracterización.

3.3.1. Espectroscopía de infrarrojo (IR).

Se realizó la caracterización del γ -PGA y de los hidrogeles obtenidos, por la técnica de FTIR utilizando un espectrofotómetro marca Perkin Elmer, modelo Frontier. El análisis de las muestras se realizó mediante la técnica de Reflectancia Total Atenuada (ATR), con un barrido del espectro desde 4000 a 400 cm^{-1} . Este estudio se hizo con la finalidad de identificar los grupos funcionales en el polímero, así como para verificar si se llevó a cabo la reacción de entrecruzamiento entre los grupos amino de la Urea y los grupos carboxilos laterales del γ -PGA a partir de una reacción de amidación.

3.3.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Se realizó la caracterización morfológica de los hidrogeles mediante un microscopio electrónico de barrido, marca JEOL 5410LV. Las muestras se recubrieron con oro para conferirles propiedades conductoras y se utilizó un haz de electrones de 20 kV de intensidad.

3.3.3. Análisis térmico.

3.3.3.1. Análisis Termogravimétrico (TGA).

Se llevó a cabo el análisis termogravimétrico del γ -PGA y los hidrogeles sintetizados. Se utilizó un equipo Thermogravimetric Analyzer, marca Perkin Elmer, modelo Pyris 1. Se pesaron muestras de aproximadamente 2.5 mg, y fueron sometidas a calentamiento de 25°C a 900°C, con una velocidad de calentamiento de 10°C/min bajo atmósfera de Nitrógeno.

3.3.3.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

El polímero (γ -PGA) y los hidrogeles sintetizados fueron analizados por DSC, en un equipo Differential Scanning Calorimeter, marca Perkin Elmer, modelo 8500. Se pesaron muestras de aproximadamente 5 mg, y fueron sometidas a calentamiento de 25°C a 300°C, con una velocidad de calentamiento de 10°C/min bajo atmósfera de Nitrógeno.

3.3.4. Cinética de hinchamiento.

En el estudio del hinchamiento, se cortaron los hidrogeles secos con dimensiones de 10 mm de diámetro y 1.5 mm de espesor. Las muestras de hidrogeles se sumergieron en recipientes con 20 ml de agua desionizada y se evaluó el efecto de la temperatura a 25 y 37°C. Los hidrogeles se sumergieron en 20 mL de soluciones buffer de pH=3.6, 7.4 y 10.0 a 25°C para evaluar el efecto del pH. Se analizó la combinación de ambos efectos en el hinchamiento de los hidrogeles a pH=7.4 a 25 y 37°C. Se monitoreó el peso de los hidrogeles a intervalos de tiempo de 10 minutos. Los hidrogeles se pesaron en una balanza analítica marca Sartorius (sensibilidad 0.0001 g) y previamente se secaron con papel filtro para eliminar el agua acumulada en la superficie de la muestra. Este procedimiento se realizó hasta que no hubo más ganancia de agua por parte del hidrogel, es decir, hasta que se alcanzó el equilibrio de hinchamiento. El estudio se realizó por triplicado y los valores que se reportan son los valores promedio de las tres mediciones en cada condición.

La razón de hinchamiento en cada intervalo de tiempo fue calculada mediante la ecuación 1:

$$\text{Razón de Hinchamiento (RH)} = \frac{(M_{\text{hidratado}} - M_{\text{deshidratado}})}{M_{\text{deshidratado}}}$$

La cinética de hinchamiento se evaluó a través de la Ley de Potencia, Ec. 2. ($F = k \cdot t^n$), a la cual se le aplicó ln y se realizaron los gráficos de ln F versus ln t, a partir de los valores de hinchamiento obtenidos. De esta manera se determinó el valor del coeficiente difusional (n) y se analizaron los mecanismos a partir de los cuales ocurre la absorción del disolvente en el hidrogel.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención del γ -PGA

4.1.1. Biosíntesis del γ -PGA.

La obtención del polímero se realizó según se describió en la sección 3.2.1.1. Primeramente, se realizó la propagación de la cepa de la bacteria *B. licheniformis* ATCC 9945a para garantizar el crecimiento celular y posteriormente se llevó a cabo la producción del γ -PGA. Se obtuvo un rendimiento promedio del biopolímero de 7.17 ± 1.67 g/L (base seca). En la literatura se ha reportado la producción de γ -PGA utilizando fermentaciones con la bacteria *B. licheniformis* ATCC 9945a en un medio de sales (Medio E), empleando condiciones similares a la metodología utilizada, con valores de rendimiento de 15 g/L.^{79,80} La diferencia en cuanto al rendimiento del metabolito obtenido se puede atribuir a que la cepa de la bacteria conservada en Glicerol que utilizamos pudo dañarse durante su transporte, debido a que fue enviada desde el CIQA en Saltillo. Sin embargo, se recomienda continuar trabajando en la técnica para determinar los factores que pudieron afectar la óptima producción del polímero y lograr obtener el rendimiento reportado en la literatura. En la figura 19 se muestra una imagen del γ -PGA obtenido en el laboratorio.



Fig. 19. Imagen del γ -PGA obtenido en el laboratorio.

Además del γ -PGA obtenido en el laboratorio, contamos con γ -PGA_{crudo} proporcionado del CIQA, éste último fue el que utilizamos en el desarrollo de nuestra investigación.

4.1.2. Purificación del γ -PGA mediante diálisis.

Se realizó la purificación mediante diálisis del γ -PGA_{crudo} según el procedimiento descrito en la sección 3.2.1.2. Se obtuvo un rendimiento de 85.5% del polímero puro con respecto al γ -PGA crudo que fue sometido a diálisis.

4.1.3. Determinación del peso molecular del γ -PGA.

De acuerdo con las mediciones realizadas, obtuvimos valores promedio de tiempo de flujo de la solución del polímero y del disolvente de $t = 410$ s y $t_0 = 193$ s respectivamente. Según la ecuación 5, la viscosidad relativa (η_{rel}) de la solución del γ -PGA es de 2.124 y el $\ln(\eta_{rel}) = 0.753$. Al interpolar en la curva de calibración (figura 20)⁸⁰, el valor arrojado de masa molecular promedio para el polímero fue de 180000 g/mol.

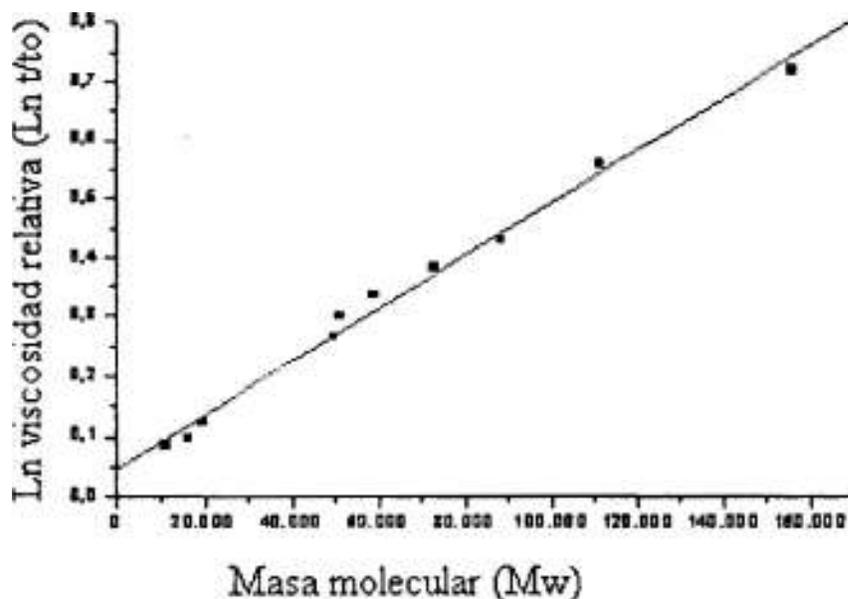


Fig. 20. Curva de calibración Peso Molecular (M_w) versus $\ln \eta_{rel}$.⁸⁰

4.2. Caracterización del γ -PGA por Espectroscopía de Infrarrojo (IR).

El γ -PGA crudo obtenido en el laboratorio y el γ -PGA crudo proporcionado por el CIQA, fueron caracterizados por Espectroscopía de Infrarrojo (IR) (Figura 21) para la identificación de los grupos funcionales que deben estar presentes en su estructura. Este polímero (figura 5) es una poliamida que tiene grupos carboxilos laterales libres. En la tabla 3 se muestran las asignaciones de las señales características de ambos espectros.

Tabla 3. Asignación de las señales características de los espectros de IR del γ -PGA crudo : (a) Polímero obtenido en el laboratorio; (b) Polímero proporcionado por el CIQA.

Bandas de absorción	(a)	(b)
Grupos: -CH₂- (cadena alifática)		
V Est C-H	3065 cm ⁻¹ , 2918 cm ⁻¹	3065 cm ⁻¹ , 2918 cm ⁻¹
Grupo: carboxilo		
V Est O-H	banda ancha: 3500-2500 cm ⁻¹	banda ancha 3500-2500 cm ⁻¹
V Est C=O	1713 cm ⁻¹	1713 cm ⁻¹
Grupo: amida		
V Est C=O	1639 cm ⁻¹	1631 cm ⁻¹
V Est N-H	3270 cm ⁻¹	3270 cm ⁻¹
δ Torsión N-H	1541 cm ⁻¹	1533 cm ⁻¹

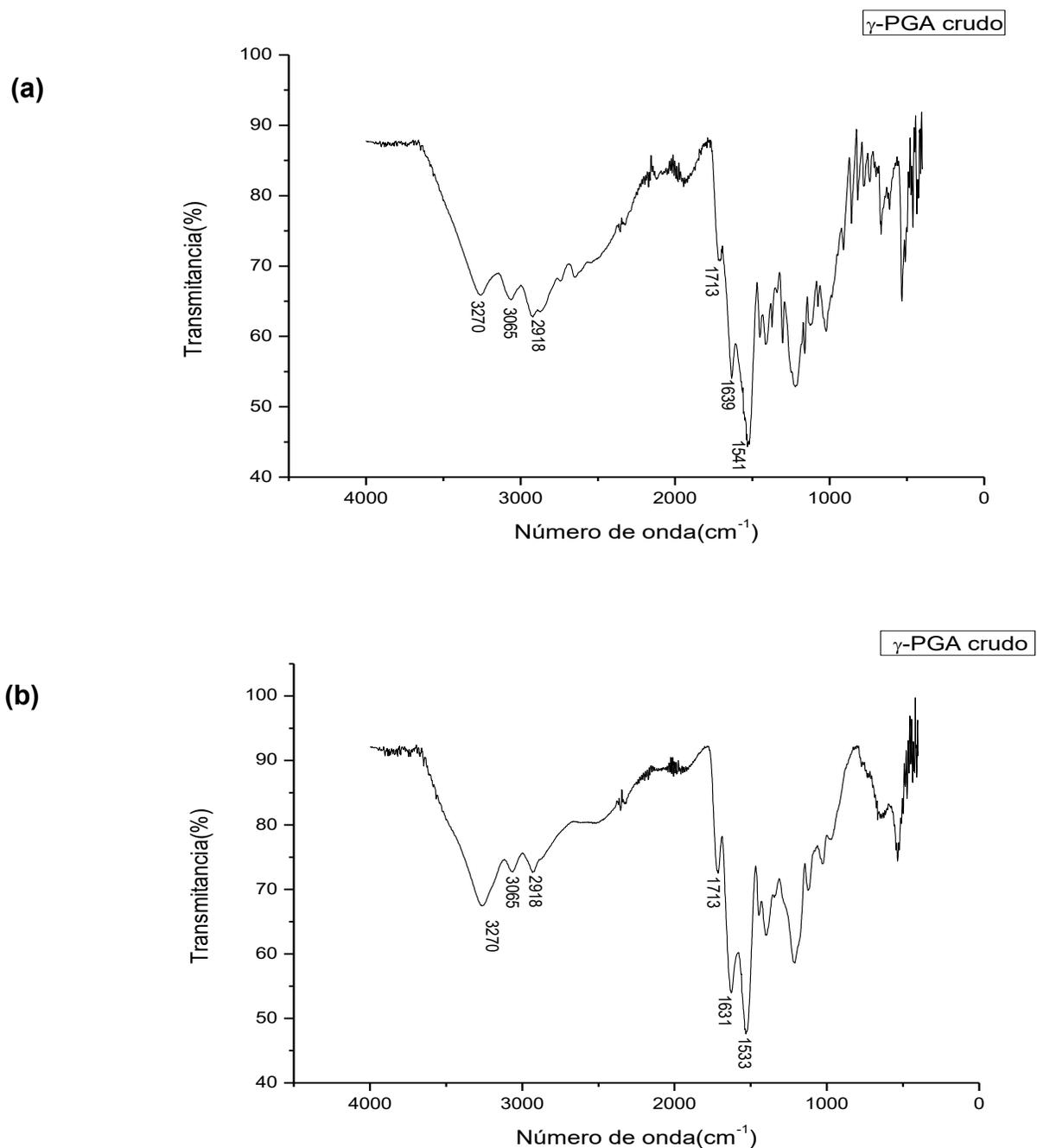


Fig. 21. Espectros de IR del γ -PGA *crudo*: **(a)** Polímero obtenido en el laboratorio; **(b)** Polímero proporcionado por el CIQA.

Teniendo en cuenta las señales identificadas en los espectros de IR, se puede corroborar la obtención del γ -PGA, debido a que están presentes las señales características correspondientes a los grupos funcionales amida y carboxilo libre.^{52,81-84}

En la figura 22 se muestra el espectro de IR del γ -PGA dializado. En la tabla 4 se presenta las asignaciones de las señales características que aparecen en el espectro.

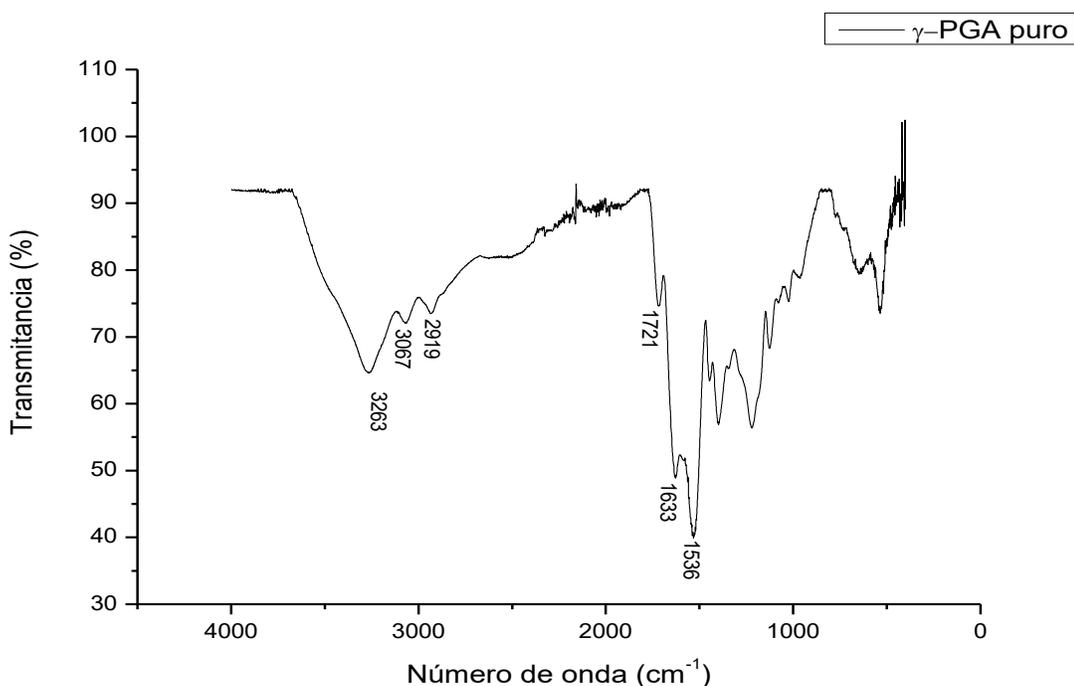


Fig. 22. Espectro de IR del γ -PGA purificado por diálisis.

Tabla 4. Asignación de las señales características de los espectros de IR: (a) γ -PGA crudo; (b) γ -PGA puro.

Bandas de absorción	(a)	(b)
Grupos: -CH₂- (cadena alifática)		
V Est C-H	3065 cm ⁻¹ , 2918 cm ⁻¹	3067 cm ⁻¹ , 2919 cm ⁻¹
Grupo: carboxilo		
V Est O-H	banda ancha: 3500-2500 cm ⁻¹	banda ancha 3500-2500 cm ⁻¹
V Est C=O	1713 cm ⁻¹	1721cm ⁻¹
Grupo: amida		
V Est C=O	1631 cm ⁻¹	1633 cm ⁻¹
V Est N-H	3270 cm ⁻¹	3263 cm ⁻¹
δ Torsión N-H	1533 cm ⁻¹	1536 cm ⁻¹

De acuerdo con los espectros obtenidos para el γ -PGA crudo y el γ -PGA puro, se observa la presencia de las señales características, por lo tanto, se puede corroborar que no hubo ningún cambio en la estructura química del polímero durante el proceso de diálisis.

4.3. Análisis térmico del γ -PGA.

4.3.1. Análisis Termogravimétrico (TGA).

En la figura 23 se observa el termograma correspondiente al análisis termogravimétrico y su derivada realizados al γ -PGA. Según los resultados obtenidos, se puede apreciar una primera caída en la curva a los 44.8 °C correspondiente a una pérdida de masa del 2.0%, asociada a la pérdida de agua, puesto que este es un polímero de naturaleza hidrofílica, su alta afinidad por el agua se debe fundamentalmente a la presencia de los grupos carboxilos libres. En el termograma se identifica que la descomposición térmica del γ -PGA comienza a los 260.3 °C con una pérdida de masa de 18.1 %. También aparecen los pasos sucesivos de descomposición del polímero a las respectivas temperaturas y el porcentaje de pérdida de masa que representan: 290.2 °C (26.2 %), 355.9 °C (45.1 %), y 646.1 °C (74.3 %).

Portilla y colaboradores⁸⁵, realizaron un estudio de la descomposición térmica del γ -PGA y algunos derivados. De los resultados obtenidos plantearon que, en un primer paso, el γ -PGA se despolimeriza por encima de 200 °C, según un mecanismo de descompresión al final de la cadena, generando el ácido piroglutámico. Este mecanismo es producto de una reacción de ciclodepolimerización que conlleva a la liberación de la γ -lactama y la disminución gradual de la longitud de la cadena del polímero, como se muestra en la figura 24. En el segundo paso la descomposición tiene lugar por encima de los 300 °C, en este caso los investigadores basados en estudios anteriores asumen que esta etapa se deba a la descarboxilación de fragmentos de la cadena.

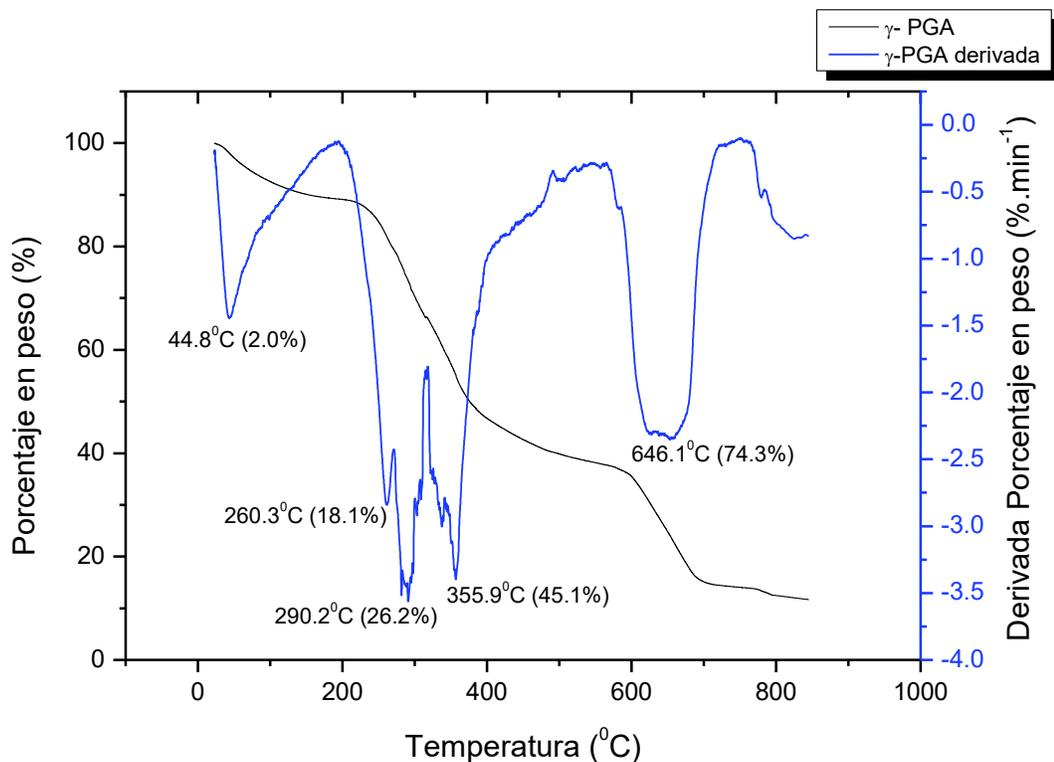


Fig. 23. Termograma de TGA del γ -PGA.

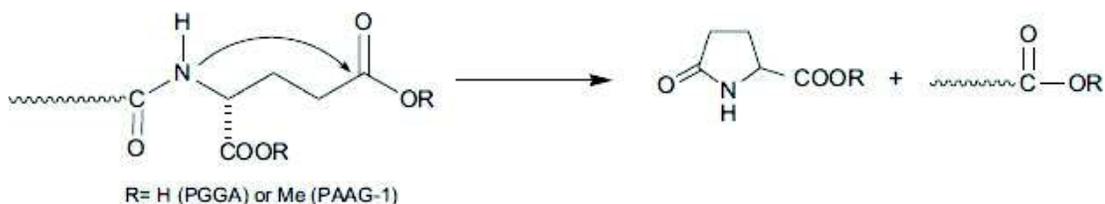


Fig. 24. Esquema del mecanismo de descomposición térmica del γ -PGA.

4.3.2. Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos del análisis térmico por DSC realizado al γ -PGA. Según las transiciones térmicas observadas por DSC, la temperatura de transición vítrea (T_g) del polímero es de 75.0 °C y su temperatura de fusión (T_f) de 240.7 °C. Mientras que a los 260.5 °C comienza la degradación térmica del polímero. La temperatura de descomposición obtenida del análisis por DSC coincide con el valor reportado del análisis por TGA.

Tabla 5. Resultados del análisis por DSC del γ -PGA.

Transiciones térmicas	Temperatura (°C)
T_g (transición vítrea)	75.0
T_f (fusión)	240.7
T_d (descomposición)	260.5

Pereira y colaboradores⁸⁶, realizaron un análisis térmico del γ -PGA mediante las técnicas de TGA y DSC, donde reportan valores muy cercanos a los obtenidos en nuestro estudio. Según los termogramas obtenidos por estos investigadores reportan del análisis por DSC dos picos endotérmicos correspondientes a transiciones de fase a las temperaturas de 74.1 y 240° C. Teniendo en cuenta el análisis por TGA plantean que la descomposición térmica del polímero tiene lugar a partir de los 253 °C con una pérdida de masa del 19%.

4.4. Síntesis de hidrogeles de γ -PGA y Urea.

Se logró sintetizar hidrogeles de γ -PGA y Urea, mediante reticulación química por formación de enlaces amida, donde se empleó el EDC como activador de los grupos carboxilos libres del polímero. En la figura 25 se representa la reacción química de entrecruzamiento.

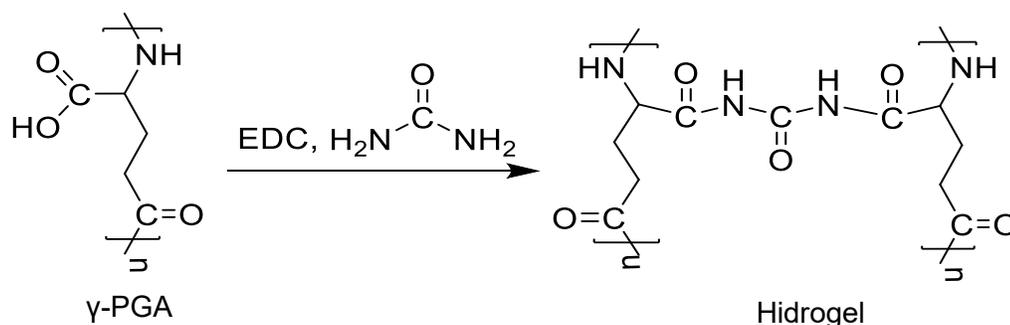


Fig. 25. Reacción química de entrecruzamiento entre las cadenas poliméricas de γ -PGA con Urea.

La obtención de los hidrogeles fue posible luego de realizar una gran variedad de experimentos, hasta lograr las condiciones de síntesis, variando parámetros tales como: cantidades de cada uno de los reactivos, volumen de disolvente, tiempo y velocidad de agitación, temperatura, condiciones de lavado, entre otros. En la sección 3.2.2., se describe el procedimiento donde se alcanzaron las mejores condiciones de síntesis, puesto que los hidrogeles obtenidos de este modo presentaban la mejor consistencia y estabilidad. De nuestras observaciones comprendimos que al utilizar menores cantidades de entrecruzante y activador; al disolver el polímero en un mayor volumen de agua; así como no dejar en reposo la reacción por el tiempo especificado, provocaba la eventual disolución del hidrogel. Otro aspecto fundamental a tener en cuenta es el proceso de lavado, donde llegamos a la conclusión de que era necesario lavar los hidrogeles primeramente con Etanol y luego con agua, debido a que el solvente orgánico que le confiere estabilidad a los mismos. En la figura 26 se muestran imágenes de los hidrogeles sintetizados.



Fig. 26. Imágenes de los hidrogeles de γ -PGA y Urea.

4.5. Caracterización de los hidrogeles por Espectroscopía de Infrarrojo (IR).

El Poli (ácido- γ -glutámico) es una poliamida que tiene grupos carboxilos libres, a través del cual se pueden realizar modificaciones químicas. Por otra parte, el entrecruzamiento que tiene lugar entre las cadenas poliméricas se lleva a cabo a través de reacciones de amidación. Por lo tanto, en el polímero y en los hidrogeles formados, van a estar presentes los mismos grupos funcionales, por ende, deben observarse en ambos espectros de IR la presencia de las señales características, y una posible variación de las intensidades de absorción en dependencia de la existencia de una mayor o menor proporción de un tipo de enlace específico en el polímero o los hidrogeles. En la figura 27 se muestra el espectro de infrarrojo del hidrogel sintetizado en comparación con el espectro del polímero.

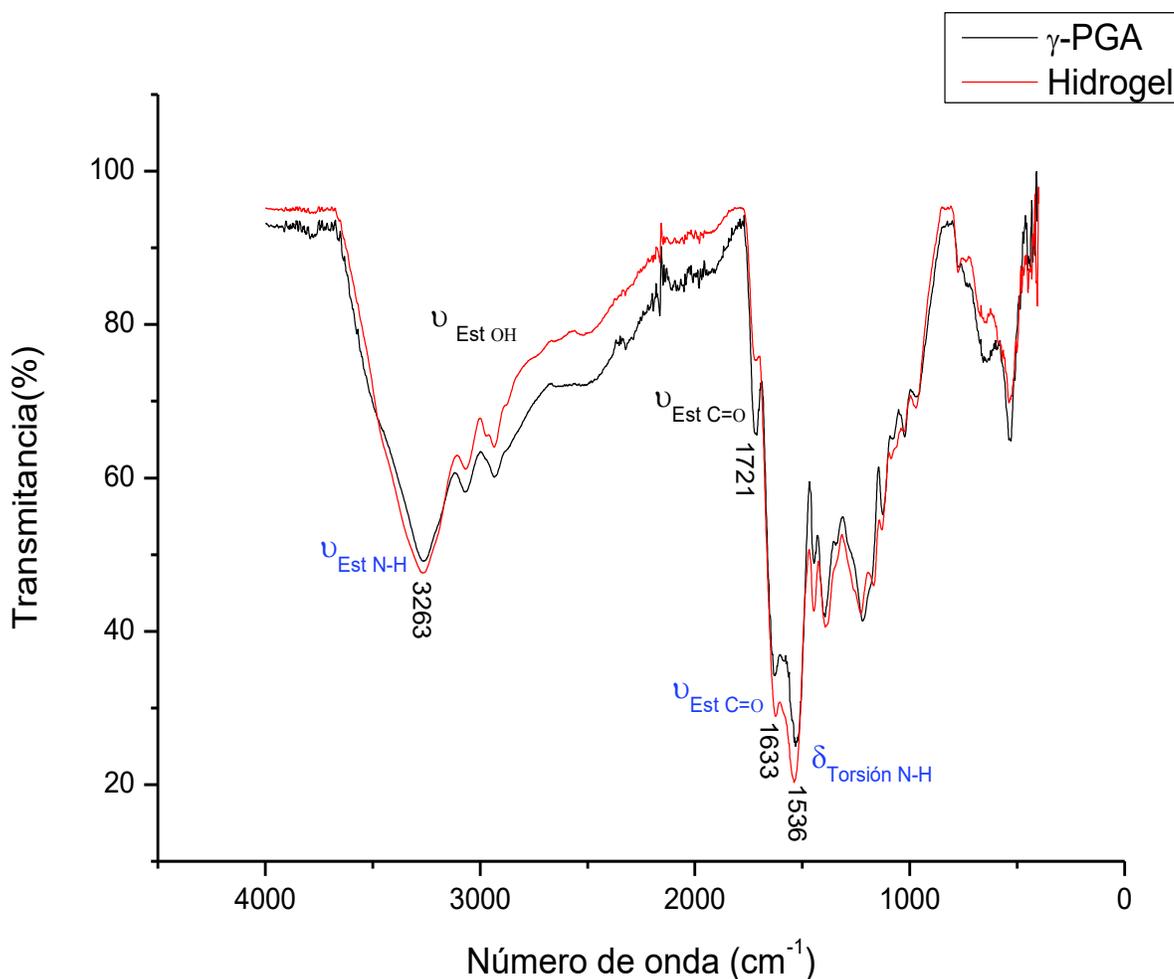


Fig. 27. Espectros de IR del γ -PGA y el Hidrogel.

Analizando los espectros del polímero y el hidrogel en la figura 27, se puede observar en ambos casos la aparición de las mismas señales, sin embargo, entre ellas se observan variaciones.

Con respecto al grupo funcional **carboxilo**, la banda ancha localizada entre los 2500-3500 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de estiramiento O-H, se observa más estrecha en el espectro del hidrogel con respecto al del polímero. La señal que se encuentra en 1721 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de estiramiento del enlace C=O, es más pequeña en el espectro del hidrogel en relación con el del polímero. Este comportamiento puede explicarse teniendo en cuenta que en polímero existe una mayor proporción de grupos carboxilos libre con respecto al hidrogel, donde una gran parte de estos grupos está comprometida en el entrecruzamiento formando enlaces amida.

Con relación al **grupo amida**, las señales correspondientes a la vibración de estiramiento N-H en 3263 cm^{-1} , a la vibración de estiramiento C=O en 1633 cm^{-1} y a la vibración de torsión N-H en 1536 cm^{-1} , se observan que aumentan en el espectro del hidrogel con respecto al del polímero. Estos resultados son un indicativo de que ocurrió favorablemente

la reacción de entrecruzamiento, pues una vez que se forma el hidrogel debe aumentar la proporción de enlaces amida, con respecto a los ya existentes en las cadenas poliméricas, debido a los nuevos enlaces que se forman producto a la reacción de amidación que dar lugar a la reticulación del material.

4.6. Caracterización de los hidrogeles por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Se realizó la caracterización de los hidrogeles mediante un análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM). En la figura 28 se observan las micrograffías de la superficie de los hidrogeles obtenidos con una magnificación de 75 X y 350 X. Según las imágenes obtenidas se puede apreciar la morfología de los hidrogeles, corroborándose que se trata de un material con estructura porosa, con potencial capacidad de almacenar solvente en su interior.

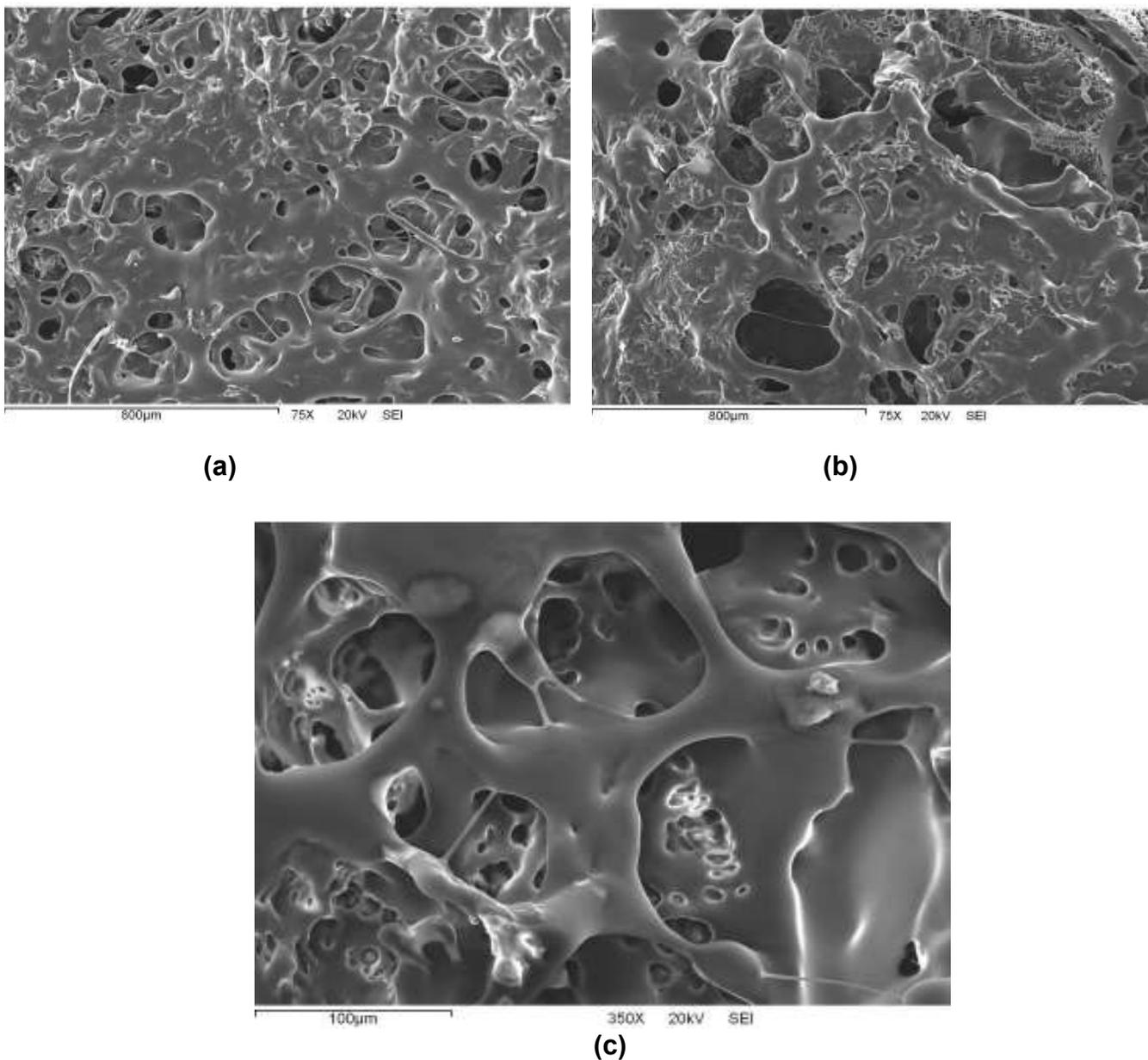


Fig. 28. Imágenes de SEM de los Hidrogeles: a) y b) Magnificación 75 X; c) Magnificación 350 X.

4.7. Análisis térmico de los hidrogeles de γ -PGA.

4.7.1. Caracterización de los hidrogeles por Termogravimetría (TGA).

En las figuras 29, 30 y 31, se presentan los termogramas correspondientes al análisis por TGA y su derivada de la Urea, EDC y el hidrogel respectivamente. El termograma correspondiente al γ -PGA se puede apreciar en la figura 23. En la figura 32 se muestran las curvas termogravimétricas del hidrogel y de cada uno de los componentes individuales. En la tabla 6 se resumen los porcentajes de pérdida de masa y las temperaturas correspondientes para el γ -PGA, Urea, EDC e Hidrogel.

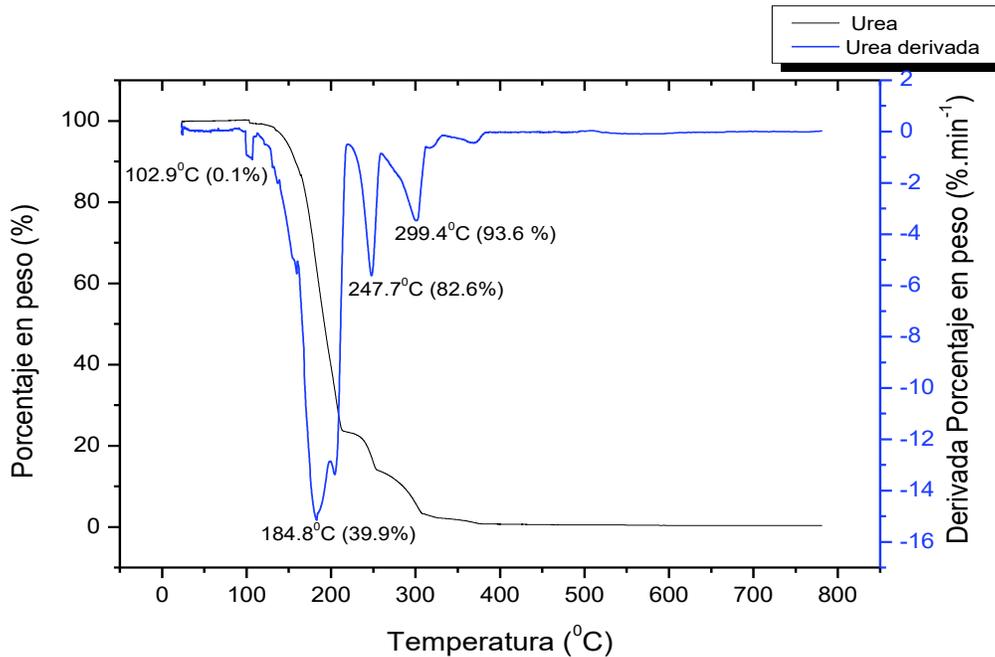


Fig. 29. Termograma de TGA de la Urea.

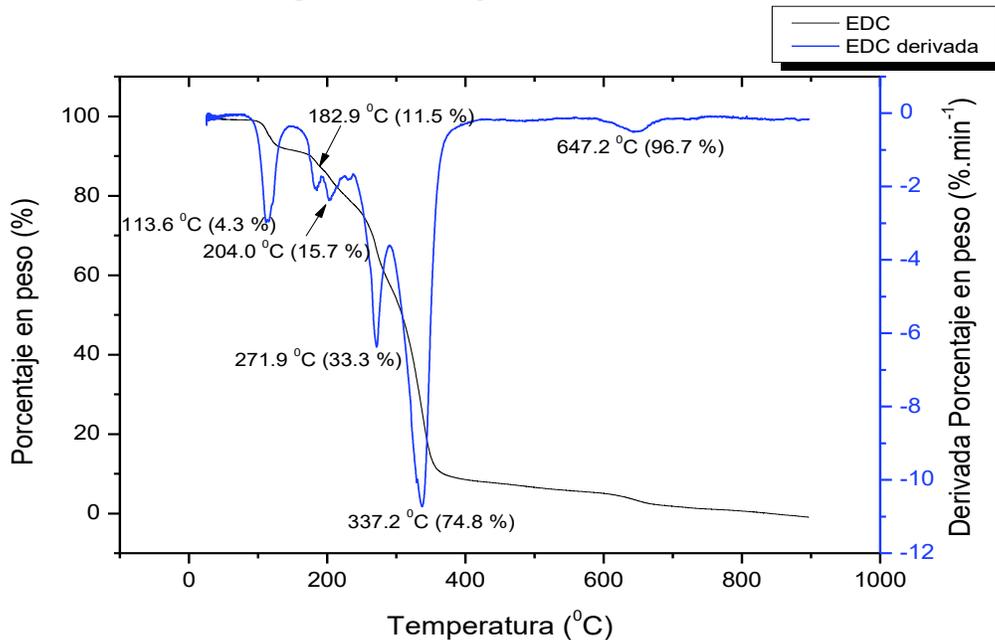


Fig. 30. Termograma de TGA del EDC.

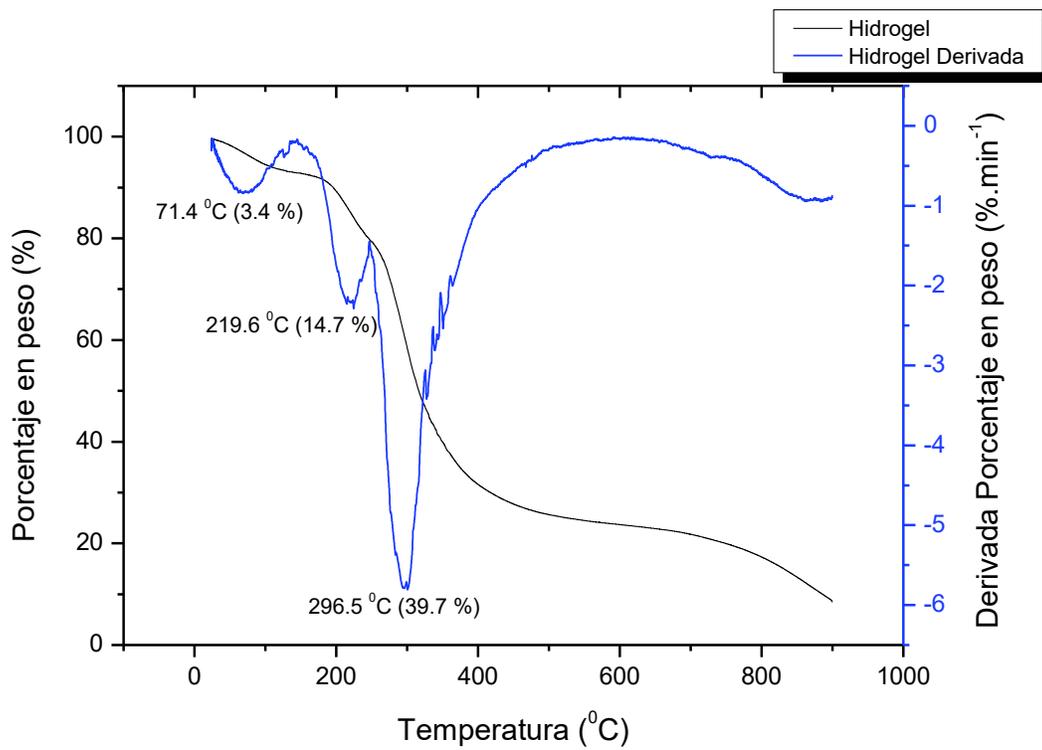


Fig. 31. Termograma de TGA del Hidrogel.

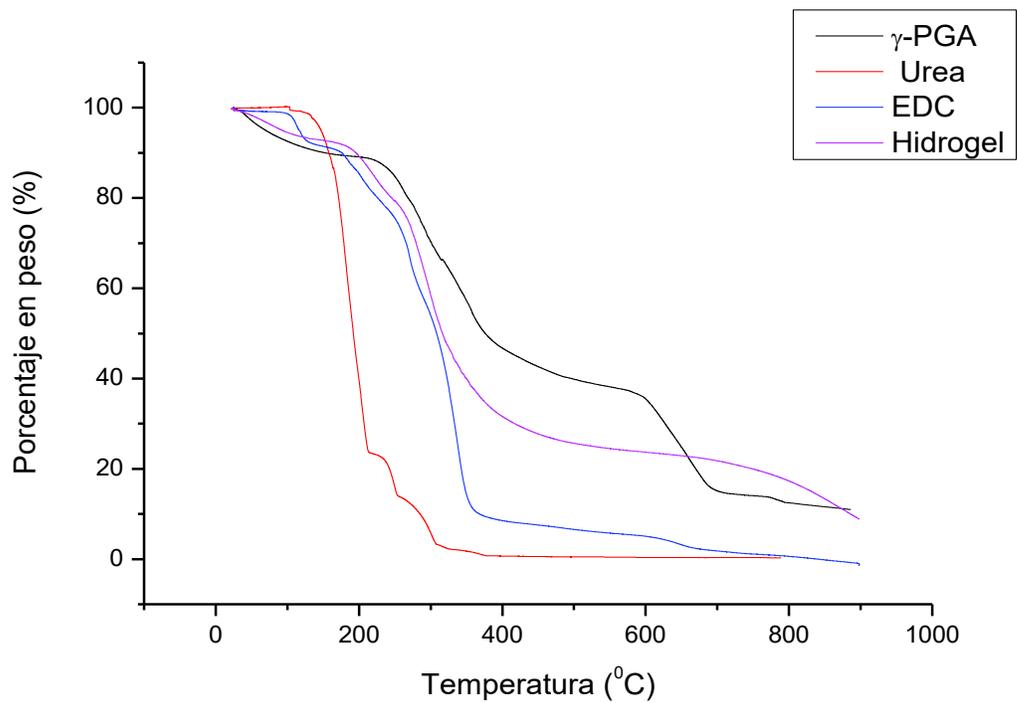


Fig. 32. Curvas termogravimétricas del γ -PGA, Urea, EDC e Hidrogel.

Tabla 6. Resultados del análisis por TGA del γ -PGA, Urea, EDC e Hidrogel.

	Pérdida de agua	Pérdida por degradación térmica
	Temperatura (°C) (Porcentaje en masa (%))	Temperatura (°C) (Porcentaje en masa (%))
γ -PGA	44.8 °C (2.0%)	260.3°C (18.1%); 290.2 °C (26.2%); 355.9 °C (45.1%); 646.1 °C (74.3%)
Urea	102.9 °C (0.1%)	184.8°C (39.9%); 247.7°C (82.6%); 299.4 °C (93.6%)
EDC	113.6 °C (4.3%)	182.9°C (11.5%); 204.0 °C (15.7%); 271.9 °C (33.3%); 337.2 °C (74.8%); 647.2 °C (96.7%)
Hidrogel	71.4 °C (3.4%)	219.6 °C (14.7%); 296.5 °C (39.7%)

Los resultados obtenidos del análisis termogravimétrico mostrados en la tabla 6, reflejan las temperaturas de descomposición térmica del γ -PGA, Urea, EDC e Hidrogel, las cuales inician a 260.3, 184.8, 182.9 y 219.6 °C respectivamente. Como se puede apreciar el hidrogel se descompone a una menor temperatura con respecto al polímero y a una temperatura mayor con respecto al entrecruzante (Urea). El hidrogel presentó una estabilidad térmica intermedia en relación con el polímero y el entrecruzante, lo cual constituye un indicio de que hubo una modificación química respecto a cada uno de los componentes individuales.

4.7.2. Caracterización de los hidrogeles por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

En la tabla 7 se muestran los resultados arrojados del termograma correspondiente al análisis por DSC del Hidrogel de γ -PGA. El hidrogel presenta una T_g de 144.5°C y su descomposición inicia a una temperatura de 220.8°C, valor muy cercano al obtenido en el análisis de TGA.

Tabla 7. Resultados del análisis por DSC del hidrogel de γ -PGA.

Transiciones térmicas	Temperatura (°C)
T_g (transición vítrea)	144.5
T_f (fusión)	-
T_d (descomposición)	220.8

El valor de T_g del hidrogel es mayor en relación con la del polímero. Este comportamiento puede explicarse por la presencia de entrecruzamientos químicos, pues las cadenas del polímero van a estar unidas por enlaces covalentes fuertes y se va a requerir mayor temperatura, o sea, más energía para que ocurra la transición de un estado vítreo a un estado más flexible. En este caso no aparece una señal definida que justifique la existencia de una temperatura de fusión, lo cual corroboraría y ayudaría a complementar la información obtenida en nuestros resultados, acerca de la formación de un hidrogel reticulado tridimensionalmente mediante entrecruzamiento químico entre el γ -PGA y la Urea. Pues en este caso, donde se ha demostrado la formación del hidrogel, las cadenas del polímero están unidas químicamente por el entrecruzante mediante enlaces covalentes muy fuertes, imposibilitando que estas se puedan separar y desplazar libremente bajo la aplicación de temperatura. En cambio, lo que ocurre es que al aplicar una temperatura elevada se va a

llevar a cabo la descomposición del hidrogel cuando la temperatura que se aplique supere la estabilidad térmica del mismo, la cual es dependiente a su vez de la estabilidad térmica de sus componentes.

Rodríguez y colaboradores²⁹, sintetizaron redes interpenetradas de polímeros (IPNs) compuestas de hidrogeles de poliacrilamida y poli (ácido- γ -glutámico). Para la formación de las IPNs, sintetizaron previamente un hidrogel químico de γ -PGA y 1,5-dibromopentano como entrecruzante. En dicha investigación realizaron el análisis térmico tanto de las IPNs como de los hidrogeles individuales. Para el caso de los hidrogeles de γ -PGA reportaron una T_g de 144 °C a partir del análisis por DSC. Según los resultados que obtuvieron mediante el análisis por TGA plantearon que la degradación térmica de las muestras, incluyendo el hidrogel de γ -PGA, se inició entre 250 y 260 °C.

4.8. Estudio de la cinética de hinchamiento de los Hidrogeles de γ -PGA y Urea.

El estudio de la cinética de hinchamiento se realizó teniendo en cuenta dos factores: el efecto de la temperatura y del pH, debido a la importancia de ambos factores dentro del cuerpo humano.²⁸ En cada uno de los casos se determinó la razón de hinchamiento (RH) hasta alcanzar el equilibrio y se evaluó el comportamiento de los hidrogeles con relación al tiempo de contacto en el medio, así como, respecto a las diferentes condiciones de pH y temperatura.

En la figura 33 se muestran los resultados obtenidos del estudio de hinchamiento en agua desionizada con respecto al efecto de la temperatura. Se puede observar que la razón de hinchamiento va aumentando mientras mayor es el tiempo de contacto en el medio, hasta alcanzar la condición de equilibrio en un tiempo promedio de 60 min para ambos casos. Se evidencia que, al aumentar la temperatura del medio, aumenta ligeramente la razón de hinchamiento, alcanzando un valor promedio de RH=35.91 a 25°C y RH=38.47 a 37°C, con una desviación estándar de 1.23 y 1.52 respectivamente.

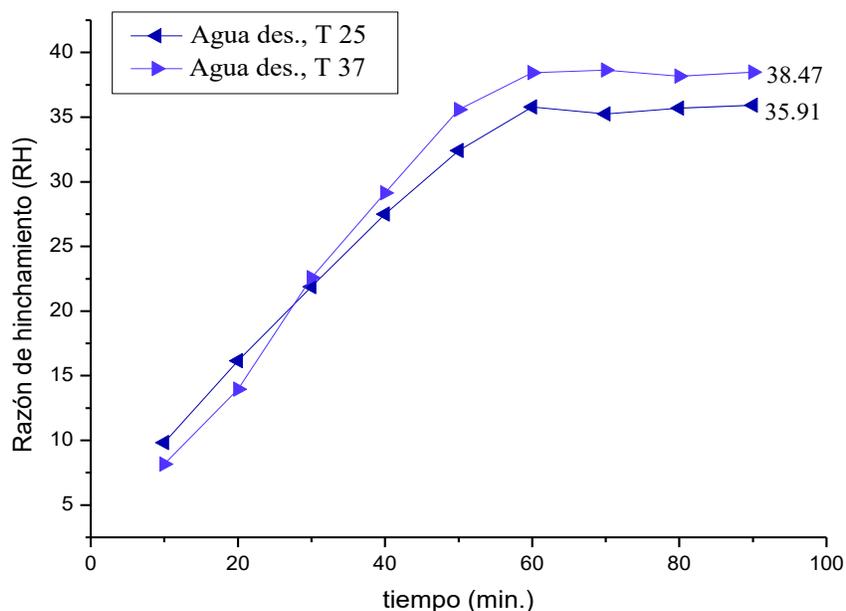


Fig. 33. Gráficos de hinchamiento del hidrogel de γ -PGA en agua desionizada a 25 y 37°C.

El efecto de la temperatura sobre la cinética de hinchamiento de los hidrogeles se puede explicar a partir de la formación y disociación de enlaces por puentes de hidrógeno entre las cadenas poliméricas. Al aumentar la temperatura del medio de hinchamiento, se produce la disociación de los puentes de hidrógeno existentes entre los grupos hidrofílicos presentes en las cadenas poliméricas, lo que provoca la separación entre estas, facilitando la difusión del agua hacia el interior de la matriz. Por otra parte, mediante la disociación de los puentes de hidrógeno se produce un mayor número de sitios libres que interaccionan con el agua, posibilitando que el hidrogel pueda aceptar una mayor cantidad de agua dentro de la red polimérica, lo que trae como consecuencia un incremento en el hinchamiento del hidrogel.⁸⁰

Los hidrogeles de γ -PGA y 1,5-dibromopentano como entrecruzante, sintetizados por Rodríguez y colaboradores²⁹, mostraron un comportamiento de hinchamiento similar con el efecto de la temperatura, alcanzando en agua desionizada una RH de 35,8 y 43,5 a 25 y 37 °C respectivamente.

En la figura 34 se exhiben los resultados arrojados del estudio de hinchamiento de los hidrogeles con respecto al efecto del pH, para esto se utilizaron soluciones buffers con diferentes valores de pH. El estudio se realizó a temperatura constante (25°C). Se observa que la razón de hinchamiento va aumentando paulatinamente con respecto al tiempo de contacto en el medio, hasta alcanzar el equilibrio en un tiempo promedio de 60 min para las soluciones de pH=7.4 y 10.0, mientras que para la de pH=3.6, el equilibrio se alcanzó a los 40 minutos. Se evidencia que, al aumentar el pH del medio de hinchamiento, aumenta la RH, alcanzando valores promedios de RH=6.55 (pH=3.6), RH=13.41 (pH=7.4) y RH=15.33 (pH=10.0), con una desviación estándar de 0.22, 1.84 y 1.03 respectivamente.

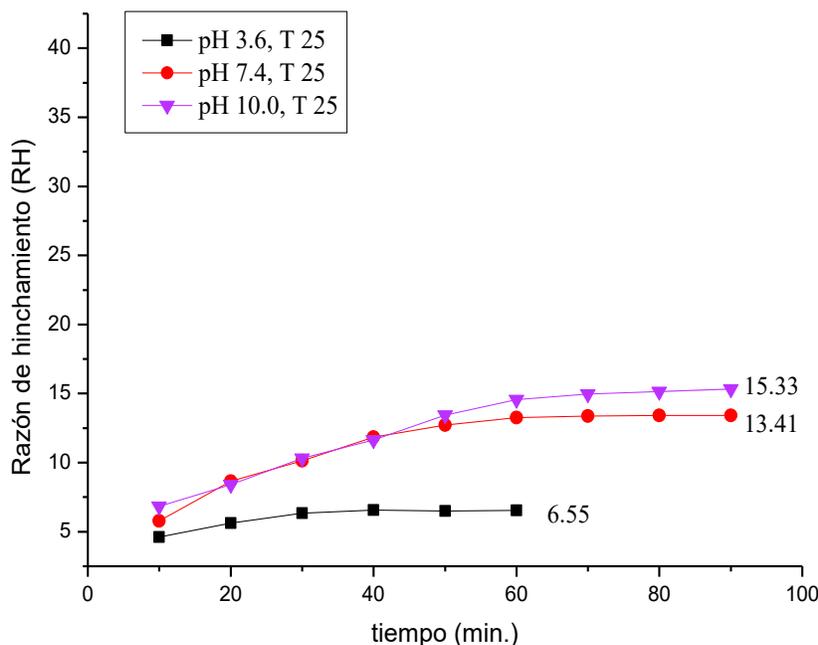


Fig. 34. Gráficos de hinchamiento del hidrogel de γ -PGA en soluciones buffers de pH=3.6, 7.4 y 10.0, a 25°C.

En cuanto al efecto pH, el comportamiento de los hidrogeles se puede explicar por la ionización de los grupos carboxilos laterales libres. El polímero tiene un $pK_a=4-4.8$,^{29,84} por lo tanto a ese valor de pH se van a encontrar ionizados el 50% de los grupos carboxilos, a pH mayores aumenta el número de grupos ionizados y con este aumenta la repulsión electrostática entre los grupos carboxilatos presentes en las cadenas poliméricas, lo que conlleva a una mayor separación de las cadenas, facilitando la difusión del agua al interior de la red tridimensional. Por lo tanto, a pH básico de se van a presentar valores mayores de RH.^{29,52,80,87} En la figura 35 se presenta un esquema que ejemplifica el comportamiento de hinchamiento de hidrogeles por efecto del pH.

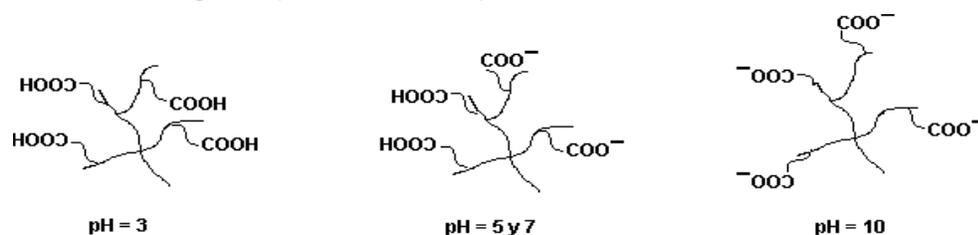


Fig. 35. Esquema del comportamiento de hinchamiento de hidrogeles por efecto del pH.⁸⁷

Hua J. y colaboradores⁵²; Kunioka y colaboradores⁸⁷ sintetizaron hidrogeles de γ -PGA y ϵ -Poli(lisina) [ϵ -PL]. Esos investigadores realizaron el estudio de hinchamiento a diferentes valores de pH a temperatura ambiente. El resultado de sus investigaciones arrojó comportamientos muy parecidos de los hidrogeles, pues reportaron que se obtenían mayores valores de hinchamiento mientras más básico era el pH del medio. Rodríguez y colaboradores²⁹, también reportan el mismo comportamiento en los hidrogeles de γ -PGA.

A modo de evaluar la combinación de ambos efectos (pH y temperatura) sobre el comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles, se realizó el estudio a $pH=7.4$ a las temperaturas de 25 y 37°C, como se muestra en la figura 36.

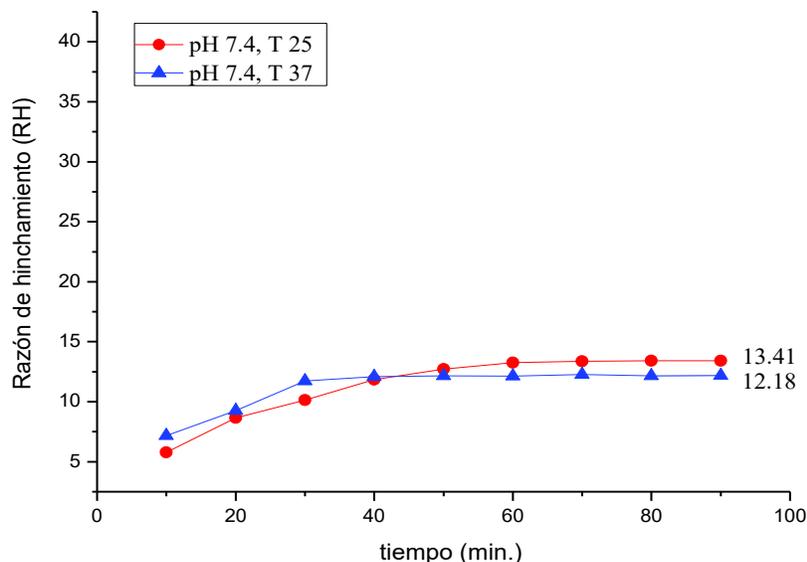


Fig. 36. Gráficos de hinchamiento del hidrogel de γ -PGA en solución buffer de $pH= 7.4$ a 25 y 37 °C.

Teniendo en cuenta los resultados arrojados de los gráficos de hinchamiento de los hidrogeles en soluciones buffer a pH= 7.4 y temperaturas de 25 y 37 °C, se observa que la razón de hinchamiento va aumentando gradualmente con el incremento del tiempo de contacto en el medio. A los 25°C el hidrogel alcanza el equilibrio en un tiempo promedio de 60 min con un valor de RH=13.41 y una desviación estándar de 1.84; mientras que, a los 37°C, alcanza el equilibrio a los 40 minutos con un valor de RH=12.18 y una desviación estándar de 0.97.

En este caso, los valores obtenidos de las razones de hinchamiento para cada temperatura resultaron ser muy cercanos, no se aprecia una gran diferencia entre ambos según las desviaciones estándar reportadas. Los resultados alcanzados evidenciaron que a pH=7.4, el efecto del aumento de la temperatura de 25 a 37°C no provocó cambios significativos en el comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles. Lo que pudiera indicar que, bajo estas condiciones, no existe una gran influencia de la disociación de los puentes de hidrógeno y que el factor principal que está dominando el hinchamiento es el efecto de la carga de los grupos carboxilos.

Se han reportado investigaciones,^{52,88-90} donde se evidencia que el comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles de γ -PGA en soluciones iónicas apenas se ve influenciado por el efecto la temperatura en un intervalo de 15-60°C, sino que argumentan que este comportamiento se encuentra predominantemente asociado con el efecto de las fuerzas repulsivas entre los grupos $-\text{COO}^-$.

Resulta importante destacar que el hinchamiento de los hidrogeles de γ -PGA en agua desionizada es considerablemente mayor respecto al hinchamiento en soluciones buffer. La ausencia de cationes en agua desionizada permite una fuerte repulsión electrostática entre los grupos $-\text{COO}^-$ de las cadenas poliméricas, lo que permite altos valores de razón de hinchamiento. En cambio, en las soluciones buffer los iones presentes cargados positivamente provocan que se debilite dicha repulsión, estableciéndose interacciones electrostáticas de atracción entre los cationes en solución y los grupos carboxilatos de la red polimérica, lo que se conoce como el efecto de protección de los iones móviles.^{88,91}

En la figura 37 se muestra un esquema que ejemplifica el efecto de protección de iones. Este efecto de naturaleza electrostática ocasiona que se produzca un mayor acercamiento y compactación entre las cadenas de la red polimérica, dificultando su movilidad y flexibilidad para expandirse y almacenar un mayor volumen de la solución de hinchamiento; como consecuencia se van a obtener razones de hinchamiento menores respecto a los valores alcanzados cuando el medio de hinchamiento es agua desionizada. El efecto de protección de iones se acentúa mientras mayor es la valencia del catión, así como al aumentar la concentración de este.^{52,89,90}

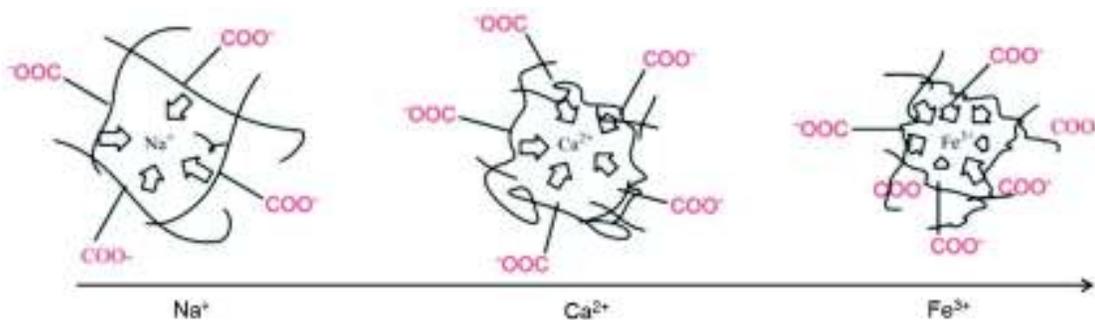


Fig. 37. Representación esquemática del efecto de protección de iones.⁹⁰

4.8.1. Mecanismo de hinchamiento de los Hidrogeles de γ -PGA y Urea.

En el estudio realizado para determinar el mecanismo de hinchamiento, nos apoyamos en la ley de potencia representada en la Ec. 2. ($F = k \cdot t^n$), debido a que es comúnmente usada para describir la cinética de hinchamiento de los hidrogeles. A la ecuación mencionada se le aplicó \ln y se graficó $\ln F$ vs $\ln t$, a partir de los valores de hinchamiento. De esta manera se determinaron los valores de n , cuya interpretación descrita en la sección 2.5.4., se resume en la tabla 8.

Tabla 8. Clasificación de los mecanismos de transporte de agua en el hinchamiento de los hidrogeles.

Mecanismos de transporte	Exponente difusional (n)	Velocidad de los procesos
Difusión Fickiana inferior	$n < 0.5$	$V_{\text{difusión}} \ll V_{\text{relajación}}$
Difusión Fickiana (caso I)	$n = 0.5$	$V_{\text{difusión}} \ll V_{\text{relajación}}$
Difusión anómala o no Fickiana	$0.5 < n < 1$	$V_{\text{difusión}} \approx V_{\text{relajación}}$
Difusión no Fickiana (caso II)	$n = 1$	$V_{\text{difusión}} \gg V_{\text{relajación}}$

En la figura 38 se muestra la región lineal para las curvas de $\ln F$ vs $\ln t$, a las cuales se les realizó la regresión lineal para determinar el valor de la pendiente, que se corresponde con el exponente difusional (n). En la tabla 9 se reportan los parámetros cinéticos obtenidos mediante el uso de la ecuación de la ley de potencia y las definiciones de Crank y Karadag *et al.* para F (F_C y F_K),⁷⁷ a partir de los datos de hinchamiento de los hidrogeles a diferentes condiciones de pH y temperatura.

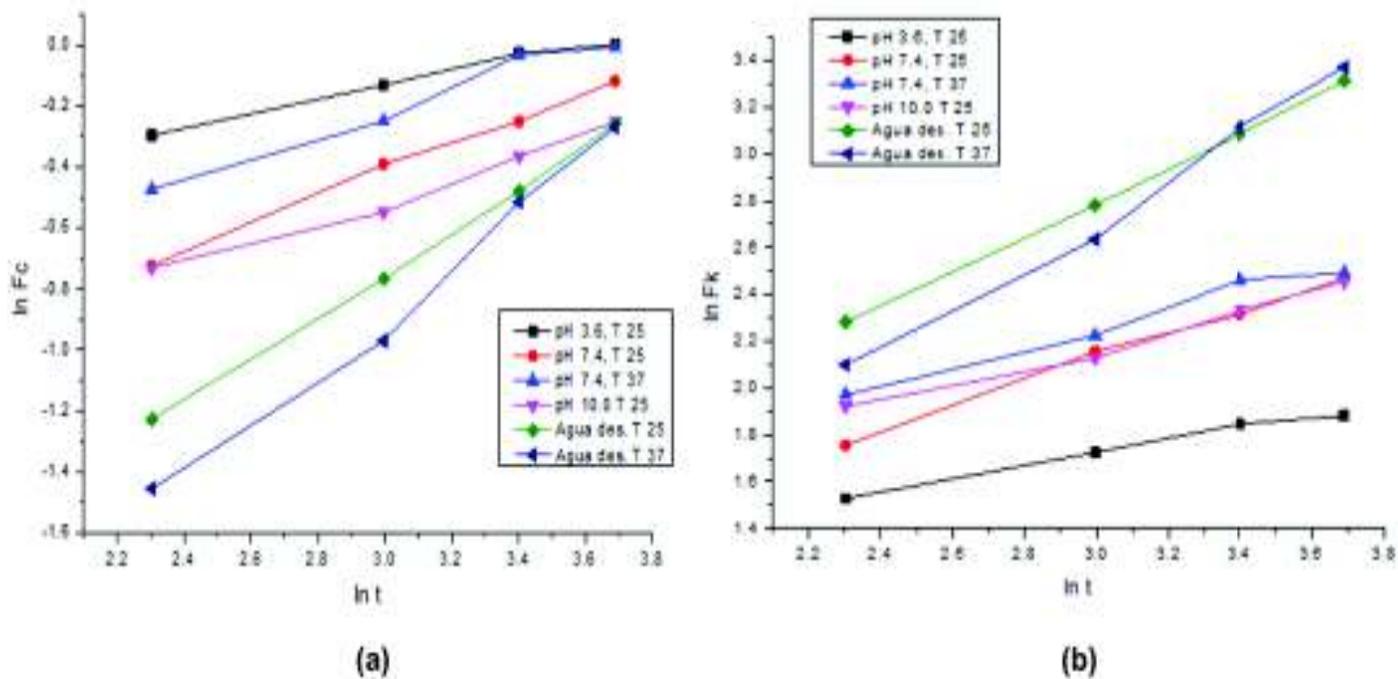


Fig. 38. Región lineal para las curvas de $\ln F$ vs $\ln t$ obtenidas de los datos de hinchamiento de los hidrogeles; (a) Definición de Crank (F_C), (b) Definición de Karadag *et al.* (F_K).

Tabla 9. Parámetros cinéticos del hinchamiento de los hidrogeles a diferentes condiciones de pH y temperatura.

Condición de hinchamiento	F_c (ecuación 3a)				F_k (ecuación 3b)			
	n	$k(\text{min}^{-n})$	R	R^2	n	$k(\text{min}^{-n})$	R	R^2
pH=3.6; T=25°C	0.22328	0.4474	0.99398	0.98199	0.26431	2.5273	0.9938	0.98147
pH=7.4; T=25°C	0.4323	0.181	0.998	0.99401	0.50983	1.8153	0.99701	0.99106
pH=7.4; T=37°C	0.35721	0.2735	0.98646	0.95967	0.39819	2.8707	0.98734	0.96226
pH=10.0; T=25°C	0.34606	0.2132	0.99176	0.97537	0.38657	2.7531	0.99254	0.97771
Agua desionizada; T=25°C	0.69466	0.0588	0.99957	0.99871	0.74056	1.7733	0.99981	0.99942
Agua desionizada; T=37°C	0.86532	0.0307	0.99474	0.98425	0.92895	0.9317	0.9958	0.98744

Para ambas definiciones de F (F_c y F_k), se obtuvieron valores de n menores y muy cercanos a 0.5, para el caso del hinchamiento de los hidrogeles en las soluciones buffer (pH=3.6, 7.4 y 10.0), lo que indica la presencia de un mecanismo de transporte tipo Fickiano inferior y Fickiano respectivamente. Esto quiere decir que la velocidad de difusión de la solución hacia el interior del hidrogel es mucho menor que la velocidad de relajación viscoelástica de las cadenas poliméricas.

En el caso del hinchamiento de los hidrogeles en agua desionizada a 25 y 37°C, se obtuvieron valores de n entre 0.5 y 1; lo que indica que el mecanismo de transporte de agua es de tipo anómalo o no Fickiano. Esto significa que los procesos de difusión del agua y de relajación de las cadenas tienen lugar de manera simultánea, o sea, que ambos procesos tienen una contribución en el hinchamiento de los hidrogeles, de forma tal que el predominio de un proceso sobre el otro está relacionado con la desviación respecto al comportamiento Fickiano.⁷⁴

Se han reportado investigaciones donde el mecanismo de transporte de los hidrogeles, debido a diferentes factores, varía de un mecanismo tipo Fickiano a transporte anómalo o no Fickiano. En estos casos, la variación en la naturaleza de la difusión en hidrogeles hacia mecanismos de difusión anómalo generalmente viene acompañada con incrementos en el grado de hinchamiento.^{73,92,93} En nuestro caso se sigue un comportamiento similar puesto que los hidrogeles hinchados en las soluciones buffer presentan razones de hinchamiento considerablemente menores respecto a los hidrogeles hinchados en agua desionizada según los resultados mencionados en la sección 4.8.

La difusión de las moléculas de agua hacia el interior de un hidrogel depende de la estructura de la red entrecruzada.⁹² Si las cadenas del polímero son muy flexibles, la penetración del disolvente es más fácil, sin embargo, si las cadenas del polímero no son suficientemente móviles, la penetración del disolvente en el hidrogel disminuye.⁷⁴ Teniendo en cuenta el análisis cinético a partir de los modelos matemáticos utilizados, la velocidad

de difusión de las soluciones buffer es menor respecto a la velocidad de difusión del agua desionizada hacia el interior del hidrogel. Este comportamiento debe estar asociado con las interacciones existentes entre la red polimérica y el medio de hinchamiento, lo que pudiera explicarse a partir de la presencia de cationes en las soluciones buffer y consecuentemente del efecto de protección de iones, efecto que no se presenta cuando el hidrogel es hinchado en agua desionizada.

5. CONCLUSIONES

-Se logró la obtención del γ -PGA mediante fermentación de la bacteria *B. licheniformis* ATCC 9945a.

-Se sintetizaron hidrogeles γ -PGA entrecruzados con Urea, cuya estructura química se corroboró mediante espectroscopía de infrarrojo.

-Los hidrogeles mostraron una estructura porosa y presentaron una estabilidad térmica por debajo de los 219°C.

-La razón de hinchamiento de los hidrogeles aumentó con el incremento del pH; sin embargo, no mostró una sensibilidad apreciable a los cambios de temperatura estudiados.

-El hinchamiento de los hidrogeles en las soluciones buffer ocurre mediante mecanismos tipo Fickiano inferior y Fickiano. Mientras que en agua desionizada predomina un mecanismo anómalo.

-Se lograron sintetizar hidrogeles de γ -PGA, los cuales presentaron adecuadas características fisicoquímicas, con potencial aplicación en la liberación controlada de fármacos.

6. RECOMENDACIONES

-Estudiar las condiciones de fermentación de la bacteria (composición del medio de cultivo, pH, agitación, entre otros) para mejorar el rendimiento de producción del polímero.

-Realizar el estudio microbiológico a los hidrogeles de γ -PGA (viabilidad celular).

-Evaluar las propiedades mecánicas de los hidrogeles de γ -PGA.

-Definir una aplicación específica para el material (afectación a tratar, fármaco a liberar, vía de administración del sistema).

-Posible formación de redes poliméricas interpenetradas (IPNs) para mejorar las propiedades mecánicas y de hinchamiento de los hidrogeles de γ -PGA y de esta manera ampliar su potencial de aplicaciones.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1- Katime D., Katime O., Katime I.A. Los materiales inteligentes de este milenio: los hidrogeles macromoleculares. Síntesis, propiedades y aplicaciones. *Servicio editorial de la Universidad del país Vasco*. Capítulos 1; 7, 15-20, 121-228, 2004.
- 2- Escobar J.L., Zaldivar D., Agüero L., Fernández S., Katime I. Liberación de cefazolina sódica a partir de hidrogeles de copolímeros de poli (acrilamida-co-ácido metacrílico). *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 1-10, 2003.
- 3- Hamidi M., Azadi A., Rafiei P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 60(15), 1638-1649, 2008.
- 4- De Queiroz A., Passos D., De Brito Alves, Sdnei., Silva, Gerard S., Higa, Olga Z., Vítolo, Michele. Alginate-Poly (vinyl alcohol) core-shell microspheres for lipase immobilization. Brasil. *Wiley InterScience*, 2005.
- 5- Lozinski V.I., Plieva F.M. Poly (vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments. *Enzyme and microbial technology*, 23, 227-242, 1998.
- 6- Greenham N.C., Moratti S.C., Bradley D.D.C., Friend R.H., Holmes A.B. Efficient light-emitting diodes based on polymers with high electron affinities. *Nature*, 365(6447), 628-630, 1993.
- 7- Kost J., Lapidot S.A. *Handbook of pharmaceutical controlled release technology*, 2000.
- 8- Hoffman A.S. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews*, 54(1), 173-182, 2002.
- 9- Ratner B.D., Hoffman A.S. Synthetic hydrogels for biomedical applications. *Hydrogels for medical and related applications, ACS Symp.* 31, 1-35, 1976.
- 10- Jeyanthi R., Rao K.P. In vivo biocompatibility of collagenpoly (hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. *Biomaterials*, 11(4), 238-243, 1990.
- 11- Smetana K., Sulc J., Krcova Z. Physicochemical aspects of the giant multinucleate cell formation. *Experimental and Molecular Pathology*, 47, 271, 1987.
- 12- García J. A. Síntesis y caracterización de una red polimérica interpenetrada de Poli (metacrilato de 2-hidroxietilo) y Quitosano como posible matriz de liberación controlada de fármacos. *Trabajo de grado para optar al título de pregrado en Química con énfasis en Bioquímica*. Universidad ICESI. Santiago de Cali, 2015.
- 13- Gross R. A., Birrer G. A., Cromwick A. M., Giannos S. A., and McCarthy S. P., *Biotechnological Polymers: Medical Pharmaceutical and Industrial Applications*, Ed. Technomic Publishing Co., 1993.
- 14- Pardo, O. Efecto de la relación proteína y energía sobre los niveles de amonio ruminal y nitrógeno ureico en sangre y leche de vacas doble propósito del piedemonte llanero. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 387-389, 2008.
- 15- Trullás C., Mirada A., Salomon M. El valor de la urea en el cuidado y tratamiento de la piel. *Dermatología Peruana*, Vol 18(1), 2008.
- 16- Dávila J. L., Rosas N. M., Galeas S., Sotomayor V., Guerrero V. H., Valdivieso C., Pontón P. Libro "Nuevos materiales: aplicaciones estructurales e industriales".

- Imprefepp*, Quito - Ecuador, p 13,14,29; 2011.
- 17- Aguilar M. C. "Síntesis de plásticos bio-basados a partir de monómeros bi-funcionales obtenidos de compuestos derivados de ácidos grasos". *Tesis para obtener el título de ingeniero en plásticos*. Tianguistenco, México, 2017.
 - 18- Galego N., Rozsa Ch. Ciencia de los Polímeros en la Universidad de la Habana. *Rev. Cubana Quím.* Vol. 30, no.1, p 77-89, 2018.
 - 19- Santa C. F., López B. L. Materiales poliméricos en nanomedicina: transporte y liberación controlada de fármacos. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, Vol. 37, no. 142, 2013.
 - 20- Rojas M. G., Vallejo B. M., Perilla J. E. Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico. *Ingeniería e Investigación*, vol. 28, No. 1, pp. 57-71, Colombia, 2008.
 - 21- Rodríguez L. J., Orrego C. E. Aplicaciones de mezclas de biopolímeros y polímeros sintéticos: revisión bibliográfica. *Revista Científica*, No.25, Colombia, 2016.
 - 22- Rodríguez D.E., Romero J., Ramírez E., Ledezma A.S., Arías E. Synthesis and swelling characteristics of semi-interpenetrating polymer network hydrogels composed of poly(acrylamide) and poly (γ -glutamic acid). *Materials Letters*, 60, 1390–1393, 2006.
 - 23- Arredondo A., Londoño M.E. Hidrogeles. Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos. *Revista Ingeniería Biomédica*, Colombia, vol.3, No. 5, p 83-94, 2009.
 - 24- Ting C., Hao C., Yung Y., Fung M., Lin J., Horng T., Lin J., Haung K. Evaluation of chitosan/ γ -poly (glutamic acid) polyelectrolyte complex for wound dressing materials. *Carbohydrate Polymers*, 84, 812–819, 2011.
 - 25- Soto, D., & Oliva, H. Métodos para preparar hidrogeles químicos y físicos basados en almidón: Una revisión. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 32(2), 154-175, 2012.
 - 26- Mahinroosta M., Farsangi Z. J., Allahverdi A., Shakoory Z. Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications. *Materials Today Chemistry*, 8, 42-55, 2018.
 - 27- Holback H., Yeo Y., Park K. Hydrogel swelling behavior and its biomedical applications. *Woodhead Publishing Limited*, 2011.
 - 28- Rodríguez D. E., Pérez C. J., Castillo M. M., Pérez-Tello M., Romero J., Ledezma A. S., Del Castillo T., Rodríguez F. pH- and temperature-sensitive semi-interpenetrating network hydrogels composed of poly(acrylamide) and poly(γ -glutamic acid) as amoxicillin controlled-release system. *Polym. Bull.*, 68:197–207, 2012.
 - 29- Rodríguez D. E., Castillo M. M., Real D., Romero J., Ledezma A. S., Rodríguez F. Synthesis and Swelling Properties of pH- and Temperature-Sensitive Interpenetrating Polymer Networks Composed of Polyacrylamide and Poly (γ -glutamic acid). *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 119, 3531–3537, 2011.
 - 30- Ferreira N.N., Ferreira L.M.B., Cardoso V.M.O., Boni F.I., Souza A.L.R., Gremião M.P.D. Recent advances in smart hydrogels for biomedical applications: From selfassembly to functional approaches. *European Polymer Journal*, 99, 117–133, 2018.
 - 31- Agüero L. Hidrogeles sensibles al pH como alternativa al mejoramiento del tratamiento

- de las enfermedades inflamatorias intestinales. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 35, (3), 284-292, 2016.
- 32- Hoare T. R., Kohane D.S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, 49, 1993-2007, 2008.
- 33- Ting C., Hao C., Yung Y., Fung M., Lin J., Lin J., Huang K. Antibacterial activity and biocompatibility of a chitosan- γ -poly (glutamic acid) polyelectrolyte complex hydrogel. *Carbohydrate Research*, 345, 1774–1780, 2010.
- 34- Longo G. S., Pérez N. A., Szeleifer Igal. How protonation modulates the interaction between proteins and pH-responsive hydrogel films. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 41, 27–39, 2019.
- 35- Wang Y. Programmable hydrogels. *Biomaterials*, 178, 663-680, 2018.
- 36- Najar I. N., Das S. Poly-glutamic acid (PGA) - structure, synthesis, genomic organization, and its application: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, Vol. 6(6): 2258-2280, 2015.
- 37- Wilming A., Begemann J., Kuhne S., Regestein L., Bongaerts J., Evers S., Maurer K. H., Büchs J. Metabolic studies of γ -polyglutamic acid production in *Bacillus licheniformis* by small-scale continuous cultivations. *Biochemical Engineering Journal*, 73, 29– 37, 2013.
- 38- Zhanga C., Wua D., Ren H. Economical production of agricultural γ -polyglutamic acid using industrial wastes by *Bacillus subtilis*. *Biochemical Engineering Journal*, 146, 117– 123, 2019.
- 39- Cascante J. R. Fermentación de bacterias del género *Bacillus* en altas concentraciones de oxígeno. *Tesis de Maestría*. Universidad Politécnica de Catalunya, 2013.
- 40- Kumar R., Pal P. Fermentative production of poly (γ -glutamic acid) from renewable carbon source and downstream purification through a continuous membrane- integrated hybrid process. *Bioresource Technology*, 177, 141–148, 2015.
- 41- Bajaj I., Singhal R. Poly (glutamic acid) – An emerging biopolymer of commercial interest. *Bioresource Technology*, 102, 5551–5561, 2011.
- 42- Yao J., Jing J., Hong X., Liang J., Wu Q., Feng X., Ouyang P. Investigation on enzymatic degradation of γ -polyglutamic acid from *Bacillus subtilis* NX-2. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56, 158–164, 2009.
- 43- Sirisansaneeyakul S., Cao M., Kongklom N., Chuensangjun C, Shi Z., Chisti Y. Microbial production of poly- γ -glutamic acid. *World J Microbiol Biotechnol*, 33, 173, 1- 8, 2017.
- 44- Gonzales, D. Fan, K., Sevoian, M. Synthesis and swelling characterization of poly(γ -glutamic acid) hydrogel. *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.*, Vol. 34, p. 2019-2027, 1996.
- 45- Yoon S.H., Do J.H., Lee S.Y., Chang H.N. Production of poly- γ -glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*. *Biotech. Lett.*, 22, 585, 2000.
- 46- Kubota H., Nambu Y., Endo T. Convenient esterification of poly (γ -glutamic acid) produced by microorganism with alkylhalides and their thermal properties. *J. Polym. Sc. Part A: Polym. Chem.* 33, 85, 1995.
- 47- Luo Z., Guo Y., Liu J., Qiu H., Zhao M., Zou W., Li S. Microbial synthesis of

- poly- γ -glutamic acid: current progress, challenges, and future perspectives. *Biotechnology for Biofuels*, 9, 134, 1-12, 2016.
- 48- Shih I. L., Van Y. T. The production of Poli (γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresource Technology*, 79, 207-225, 2001.
 - 49- Murakami S., Aoki N. Bio-Based Hydrogels Prepared by Cross-Linking of Microbial Poly (γ -glutamic acid) with Various Saccharides. *Biomacromolecules*, 7, 2122-2127, 2006.
 - 50- Berger J., Reist M., Mayer J.M., Felt O., Peppas N.A., Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57, 19–34, 2004.
 - 51- Hennink W.E., van Nostrum C.F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 223–236, 2012.
 - 52- Hua J., Li Z., Xia W., Yang N. Gong J., Zhang J., Qiao C. Preparation and properties of EDC/NHS mediated crosslinking poly (γ -glutamic acid)/epsilon-polylysine hydrogels. *Materials Science and Engineering C*, 61, 879–892, 2016.
 - 53- Ovando L. F. Desarrollo de la fórmula cualitativa y cuantitativa de un tratamiento capilar en 3 etapas, con efecto de alisado permanente a base de sulfito de sodio, aminoácidos de trigo, queratina hidrolizada y urea. *Tesis de Ingeniería Química*. Universidad de San Carlos de Guatemala, 2016.
 - 54- Ramírez C. E. Evaluación técnica y económica para la fabricación de la Urea en México. *Tesis de Ingeniería Química Industrial*. Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas. México, 2017.
 - 55- de Soca J. R., de Atencio A. Urea y extractos naturales para la humectación del pie diabético. *Diabetes Internacional*. Vol. II, No. 3, 2010.
 - 56- Beck S. G., Felsner I., Brenden H., Kohne Z., Majora M., Marini A., Jaenicke T., Rodriguez M., Trullas C., Hupe M., Elias P. M., Krutmann J. Urea Uptake Enhances Barrier Function and Antimicrobial Defense in Humans by Regulating Epidermal Gene Expression. *Journal of Investigative Dermatology*, 132, 1561–1572, 2012.
 - 57- Marini A., Krutmann J., Grether S. Urea and Skin: A Well-Known Molecule Revisited. *Treatment of Dry Skin Syndrome*, 34, 493-501, 2012.
 - 58- Muñoz G. Cuantificación rápida de productos de la fermentación en un biorreactor anaerobio productor de hidrógeno. *Tesis de grado de Maestro en Ingeniería*. Universidad Nacional Autónoma de México, 2013.
 - 59- Macho S. Metodologías analíticas basadas en espectroscopía de infrarrojo y calibración multivariante. Aplicación en la industria petroquímica. *Tesis de grado de Doctor en Química*. Universitat Rovira I Virgili. Tarragona, 2002.
 - 60- Barraza G., de la Rosa L.A., Martínez A., Castillo H., Cotte M., Álvarez E. La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos. *Rev. Latinoamer. Quím.*, 41, 3, 2013.
 - 61- Piqué T.M., Vázquez A.. Uso de espectroscopía infrarroja con transformada de fourier (FTIR) en el estudio de la hidratación del cemento. *Concreto y Cemento. Investigación y desarrollo*. Vol. 3, No. 2, 62-71, 2012.

- 62-Carranza L. Técnicas analíticas en tiempo real para monitorear reacciones de fotopolimerización. *Tesis para obtener el grado de especialización en Química Aplicada*. Centro de Investigación en Química Aplicada. Saltillo, Coahuila, 2006.
- 63-Cortez S. E. Aplicación de la Microscopía Electrónica de Barrido al análisis metalográfico y fractográficos en elementos de motores. *Tesis de grado de Ingeniería Mecánica*. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador, 2010.
- 64-Cabrera R. Obtención y caracterización de recubrimientos de Sialon mediante RF Sputtering. *Tesis de grado de Ingeniería en Ciencia de los Materiales*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 2007.
- 65-Hernández A., Ventura J., Christoph R. Aplicaciones de la Microscopía Electrónica de Barrido y Análisis Elemental de componentes electrónicos y apoyo a la investigación científica en El Salvador. *Nanotecnía*, 2019.
- 66-Prin J.L., Hernández G., Rojas B. Operando el Microscopio Electrónico como herramienta para el estudio de los polímeros y otros materiales. I. El Microscopio Electrónico de Barrido (MEB). *Rev. Iberoam. Polim.*, 11(1), pp. 26-42, 2010.
- 67-Zambrano D. F. Estudio calorimétrico mediante análisis por DSC y TGA de la degradación de recubrimientos de YSZ depositados por Air Plasma Spray. *Tesis de Maestría*, Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia, 2015.
- 68-Cid J. J. Materiales moleculares y polímeros basados en Ftalocianinas para aplicaciones en células solares orgánicas. *Tesis Doctoral*. Facultad de Ciencias Departamento de Química Orgánica, Universidad Autónoma de Madrid, 2008.
- 69-Nagasaki K. Síntesis y caracterización de recubrimiento sol-gel aplicados en aleaciones ferrosas. *Tesis de grado Ingeniería Mecánica*. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, 2012.
- 70-Volonté M.G., Quiroga P. Libro: Análisis farmacéutico. *Editorial de la Universidad de La Plata*. Buenos Aires, Argentina, 2013.
- 71-Lasanta M. I. Estudio de adiciones de Bismuto en aleaciones Zinc-Aluminio. *Tesis Doctoral*. Facultad de Ciencias Químicas, Departamento Ciencia de Materiales e Ingeniería Metalúrgica, Universidad Complutense de Madrid, 2013.
- 72-Rodríguez R. Determinación de interacciones moleculares entre el biopolímero de la Chia (*Salvia Hispánica L.*) y Grenetina mediante Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC). *Tesis de grado en Ingeniería en Ciencia y Tecnología de alimentos*. Departamento de Ciencia y Tecnología de alimentos, Universidad Autónoma Agraria Antonio Navarro, 2015.
- 73-González N., Prin J. L., Benítez J. L., Ramírez A., García A., Ramirez M., Sabino M., de Gáscue B. R. Estudio de la cinética de difusión en hidrogeles sintetizados a partir de acrilamida-co-ácido acrílico con turba y almidón vía calentamiento convencional y bajo radiación microondas. *Rev. LatinAm. Metal. Mat.*, 32 (1), 136-144, 2012.
- 74-Benítez J. L., Lárez C., Rojas B. Cinética de absorción y transporte del agua en hidrogeles sintetizados a partir de acrilamida y anhídrido maleico. *Rev. LatinAm. Metal. Mat.*, 35 (2): 242-253, 2015.
- 75-Karadag E., Saraydin D. Swelling of Superabsorbent Acrylamide/Sodium Acrylate

- Hydrogels Prepared Using Multifunctional Crosslinkers. *Turk J Chem*, 26, 863-875, 2002.
- 76-Karadag E., Saraydin D., Caldiran Y., Güven O. Swelling Studies of Copolymeric Acrylamide/Crotonic Acid Hydrogels as Carriers for Agricultural Uses. *Polym. Adv. Technol*, 11, 59-68, 2000.
- 77-Lárez C., Ramírez M., Millán E., Medina A. Swelling studies and adsorption of safranin T by acrylamide/maleic acid/methylene-bis-acrylamide based hydrogels. *E-Polymers*, No. 26, p 1-15, 2012.
- 78-Ganji F., Vasheghani E. Hydrogels in Controlled Drug Delivery Systems. *Iranian Polymer Journal*, 18 (1), 63-88, 2009.
- 79-Birrer, G. A., Cromwick, A.-M. & Gross, R. A. γ -Poly (glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* 9945a: physiological and biochemical studies. *Int. J. Biol. Macromol*, 16, 265–275, 1994.
- 80-Rodríguez D. E. Síntesis y caracterización de hidrogeles de redes semi-interpenetradas basadas en poli(acrilamida) y poli(ácido- γ -glutámico). *Tesis de Doctorado en Polímeros*. Centro de Investigación en Química Aplicada. Saltillo, Coahuila, 2006.
- 81-Sandoval I. E. Fabricación de membranas de nanofibras electrohiladas de poli (ácido- γ -glutámico) / poli (vinil alcohol) cargadas con ácido clorogénico. *Tesis de Maestría en Tecnología de Polímeros*. Centro de Investigación en Química Aplicada. Saltillo, Coahuila, 2018.
- 82-Fernández L. Estudio comparativo de complejos del ácido poli(γ -glutámico) con tensioactivos de amonio y de fosfonio. *Tesis de Ingeniería Química*. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial de Barcelona-Universidad Politécnica de Cataluña, 2017.
- 83-Álvarez J. A. Compuestos estequiométricos del ácido poli(γ -glutámico) con tensioactivos catiónicos. *Tesis de Ingeniería Química*. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial de Barcelona-Universidad Politécnica de Cataluña, 2004.
- 84-Ho G. H., Ho T. I., Hsieh K. H., Su Y. C., Lin P. Y, Yang J., Yang K. H., Yang S. C. γ -Polyglutamic Acid Produced by *Bacillus subtilis* (natto): Structural Characteristics, Chemical Properties and Biological Functionalities. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 53, 1363-1384, 2006.
- 85-Portilla J. A., García M., Martínez A., Muñoz S. Thermal decomposition of microbial poly (γ -glutamic acid) and poly(γ -glutamate)s. *Polymer Degradation and Stability*, 92, 1916-1924, 2007.
- 86-Pereira A.E.S., Sandoval I.E., Zavala S.A., Oliveira H.C., Ledezma A.S., Romero J., Fraceto L.F. γ -Polyglutamic acid/chitosan nanoparticles for the plant growth regulator gibberellic acid: Characterization and evaluation of biological activity. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1862–1873, 2017.
- 87-Kunioka M., Choi H. J. Preparation Conditions and Swelling Equilibria of Biodegradable Hydrogels Prepared from Microbial Poly(γ -glutamic Acid) and Poly(ϵ - lysine). *Journal of Environmental Polymer Degradation*, vol. 4, No.2, 1996.

- 88-Kwiecien I., Niewolik D., Itohowo A., Gupta A., Radecka I. Synthesis of Hydrogels Made of Poly- γ -Glutamic Acid (γ -PGA) for Potential Applications as Probiotic-Delivery Vehicles. *Appl. Sci.* 10, 2787, 2020.
- 89-Li Z., He G., Hua J., Wu M., Guo W., Gong J., Zhang J., Qiaoc Ch. Preparation of γ -PGA hydrogels and swelling behaviors in salt solutions with different ionic valence numbers. *The Royal Society of Chemistry Advances*, 7, 11085–11093, 2017.
- 90-Y, He G., Li Z., Hua J., Wu M., Gong J., Zhang J., Ban L.T., Huang L. Novel Biological Hydrogel: Swelling Behaviors Study in Salt Solutions with Different Ionic Valence Number. *Polymers*, 10, 112, 2018.
- 91-Zeng W., Hu W.K., Li H., Jing Y.H., Kang H., Jiang Q., Zhang C. Preparation and Characterization of Poly(γ -glutamic acid) Hydrogels as Potential Tissue Engineering Scaffolds. *Chinese Journal of Polymer Science*, Vol. 32, No. 11, 1507-1514, 2014.
- 92-Caykara T. Effect of Maleic Acid Content on Network Structure and Swelling Properties of Poly(*N*-isopropylacrylamide-co-maleic acid) Polyelectrolyte Hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 92, 763–769, 2004.
- 93-Tasdelen B., Kayaman-Apohan N., Guven O., Baysal B.M. pH-thermoreversible hydrogels. I. Synthesis and characterization of poly(*N*-isopropylacrylamide/maleic acid) copolymeric hydrogels. *Radiation Physics and Chemistry*, 69, 303–310, 2004.