

### ***III. Materiales y métodos***



## 1. INSTRUMENTACIÓN

A continuación se enumeran las técnicas instrumentales y los equipos utilizados en la realización del trabajo experimental de la presente tesis.

Las medidas de peso se han realizado en una balanza electrónica Mettler AC 100, en una Mettler XS 105 DU o bien en una balanza Mettler P1210.

Las medidas de pH se han realizado con un pH-metro Crisol GLP 21.

El agua desionizada utilizada en la elaboración de las disoluciones tampón para los ensayos de degradación se ha obtenido mediante un sistema de purificación de agua Mili-Q Millipore.

Los espectros de infrarrojo se han registrado en un espectrofotómetro de transformada de Fourier, Perkin-Elmer de la serie 1600 FT-IR o un espectrofotómetro Jasco de la serie FT/IR-4100. Este último está equipado con un accesorio ATR Specac MKII Golden Gate con cristal de diamante para la medida de la reflectancia total atenuada (ATR) y con un controlador de temperatura automático Specac West 6100+ que permite calentar hasta 200 °C. Se ha trabajado en un rango entre 4000 y 500  $\text{cm}^{-1}$ . La preparación de las muestras se ha llevado a cabo por dispersión del sólido en KBr y posterior prensado al vacío para el equipo Perkin-Elmer. Por otro lado, el espectrofotómetro Jasco permite registrar el espectro de infrarrojo de las muestras en polvo o en aceite sin tratamiento previo.

Los espectros de RMN se han registrado en un espectrómetro Bruker AMX-300 de transformada de Fourier, operando a 300.13 MHz para el de protón y a 75.48 MHz para el de carbono.

El tanto por ciento de encapsulamiento del fármaco en las microesferas sintetizadas se ha determinado mediante espectroscopia UV-visible con un espectrofotómetro Varian Cary 100 Bio.

Las concentraciones de principio activo en los medios de liberación se han determinado mediante un cromatógrafo de líquidos Shimadzu LC-6A con detector de ultravioleta Shimadzu SPD-6A y un programa para tratamiento de datos (Empower computer programs, Waters).

Los puntos de fusión de los compuestos se han determinado con un equipo Mettler FP-90 Central Processor equipado con un horno Mettler FP-82 Hot Stage.

La determinación de la viscosidad intrínseca de los polímeros sintetizados se ha realizado mediante un micro-viscosímetro Cannon-Ubbelohde sumergido en un baño de agua a una temperatura de  $25 \pm 0.1$  °C.

Las curvas de distribución de peso molecular, así como los valores promedio de peso molecular se han determinado con un cromatógrafo de líquidos (Shimadzu, model LC-8A) equipado con un detector de índice de refracción (Shimadzu RID-10A) y un programa para tratamiento de datos Empower (Waters). Se ha utilizado una columna PL HFIPgel 300 x 7.5 mm (Polymer Lab) termostaticada a 37 °C.

Los análisis térmicos se han realizado en un calorímetro diferencial de barrido de potencia compensada Perkin-Elmer DSC-Pyris 1 o en un calorímetro de flujo de calor TA-Instruments DSC Q-100. Este último está dotado con un sistema de refrigeración y control programado para ciclos de ascenso y descenso de temperatura (RCS), que permite alcanzar una temperatura de hasta -90 °C. El calibrado se ha realizado con indio ( $T_f = 429.75$  K,  $\Delta H_f = 3.267$  kJ·mol<sup>-1</sup>).

Los análisis termogravimétricos se han efectuado con una termobalanza Perkin-Elmer TGA 6, acoplada a un sistema de control por microprocesador y una estación de procesamiento de datos.

Para la preparación de películas se ha utilizado una prensa Perkin-Elmer, dotada con placas Specac que pueden calentarse hasta una temperatura máxima de 300 °C mediante un controlador de temperatura automático Specac de la serie P/N 20160. Para lograr el espesor de película deseado, se utilizaron moldes de acero inoxidable de 200 μm.

La evaluación de las películas utilizadas para el estudio de degradación se ha realizado mediante un medidor de espesores de modelo Uno-Check Fe. El aparato se calibró con galgas de 293  $\mu\text{m}$ .

Las fotografías de microscopia electrónica de barrido se han realizado con un equipo JEOL JSM 6400 a 20 kV o con un equipo Electroscan 2020. Las muestras se fijaron en cinta adhesiva de carbono de doble cara y fueron recubiertas con oro utilizando un evaporador Balzers SCD-004.

Los cristales simples de polímero, para el análisis morfológico y estructural mediante microscopia electrónica de transmisión, se han obtenido empleando baños termostáticos Preci-bat. Los cristales fueron separados por centrifugación en una centrífuga Sorvall RC5B plus.

Las muestras cristalizadas se han observado previamente en un microscopio óptico Nikon Labophot equipado con objetivos de contraste de fase.

La preparación de rejillas para microscopia electrónica y el posterior sombreado de las muestras se han realizado en un evaporador Balzers constituido por las unidades de control *gauge control PKG 202*, *evaporation control BSV 080* y *control unit EVM 052a*.

Las fotografías de microscopia electrónica de transmisión se han obtenido en un microscopio Philips Tecnai 10. Las micrografías se han registrado con una cámara digital MegaView II, mientras que para el registro de las difracciones de electrones se ha utilizado una película fotográfica sensible Maco EM-Film EMS. El calibrado de los diagramas de difracción de electrones se realizó con oro ( $d_{111} = 2.35 \text{ \AA}$ ).

La difracción de rayos X se ha realizado utilizando cámaras de tipo Statton (W. H. Warhus, Wilmington, Delaware, USA) con filtro de níquel incorporado que selecciona la radiación  $K_{\alpha}$  del Cu ( $\lambda = 1.542 \text{ \AA}$ ) y un generador Philips modelo PW 1130/90 provisto de un tubo Philips sellado (PW 2113/90 de 1200 W) de foco plano. El calibrado se realizó con calcita  $d_B = 3.305 \text{ \AA}$ .

Antes de realizar los análisis por difracción de rayos X, las fibras de polímero se observaron mediante un microscopio de luz polarizada Carl Zeiss modelo Standard, para determinar si las fibras se hallaban suficientemente orientadas.

Las micrografías para el estudio de cristalización y observación de la morfología esferulítica se han realizado con un microscopio Olympus BX5 equipado con un accesorio Linkam THMS 600 en el que las muestras se cristalizaron isotérmicamente a diferentes temperaturas. También se tomaron micrografías ópticas con un microscopio óptico Axioskop 40 Pol Carl Zeiss equipado con una cámara digital AxioCam MRC5. Para la determinación del signo de la birrefringencia de las esferulitas se empleó un “*first order red tint plate*” (lámina de onda roja de primer orden) bajo polarizadores cruzados.

Los datos de monocristal se han recogido a temperatura ambiente en un difractómetro Enraf-Nonius CAD4, equipado con un generador Enraf-Nonius modelo FR590D. Se ha utilizado la radiación  $\text{CuK}\alpha$  y un monocromador de grafito. Para la resolución de la estructura se ha utilizado el programa SHELXS-97 <sup>[1]</sup> y se ha refinado mediante el programa SHELXL-97 <sup>[1]</sup> que, mediante el método de mínimos cuadrados, ajusta los parámetros (coordenadas, factores de escala, factores de ocupación, factores de temperatura) para obtener una mejor concordancia entre los factores de estructura observados y calculados.

Previamente los monocristales se analizaron en una lupa de luz transmitida y polarizada Carl Zeiss modelo 47 50 52-9901.

Los experimentos simultáneos en resolución temporal de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS) y de difracción (WAXD) con radiación sincrotrón se llevaron a cabo para el Poli[Glc-*alt*-4Hb] en la estación 6.2 del Daresbury Synchrotron Radiation Source. El haz, altamente colimado, fue monocromatizado a una longitud de onda de 0.1542 nm. El capilar que contenía la muestra se colocó en una platina Linkam con control de temperatura. Los perfiles de SAXS y WAXD se recogieron simultáneamente mediante dos detectores: el detector de SAXS fue calibrado con diferentes órdenes de difracción del colágeno de cola de rata ( $L = 65$  nm), mientras que el detector de WAXD se calibró con un estándar de una muestra cristalina de silicio en polvo. Los perfiles de

difracción se normalizaron según la intensidad del rayo y se corrigieron considerando el capilar vacío. La deconvolución de los espectros de WAXD se realizó con el programa Galactic Peak Solve program (versión 1.05).

En el caso del poli[6HH-*alt*-Glc], los experimentos de sincrotrón se llevaron a cabo en la línea BM16 del European Synchrotron Radiation Facility de Grenoble. El haz, altamente colimado, fue monocromatizado a una longitud de onda de 0.098 nm. El capilar que contenía la muestra se colocó en una platina Linkam con control de temperatura. Los perfiles de SAXS y WAXD se recogieron simultáneamente mediante dos detectores <sup>[148]</sup>; el detector de SAXS fue calibrado con diferentes órdenes de difracción del behenato de plata, mientras que el detector de WAXD se calibró con un estándar de alúmina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Los perfiles de difracción se normalizaron según la intensidad del rayo y se corrigieron considerando el capilar vacío. La deconvolución de los espectros de WAXD se realizó con el programa PeakFit v4 (Jandel Scientific Software) utilizando la función matemática conocida como “*Gaussian and Lorentzian area*”. Los cálculos de la función de correlación se han llevado a cabo mediante el programa CORFUNC <sup>[149]</sup> proporcionado por el Collaborative Computacional Project 13 para Difracción de fibras/ Difracción No-Cristalina, CCP13.

## 2. DISOLVENTES Y REACTIVOS.

Los disolventes han sido suministrados por Panreac y Scharlau. Para los procesos de síntesis y purificación se ha utilizado calidad PA-ACS. Para las técnicas cromatográficas de HPLC (High Performance Chromatography), GPC (Gel Permeation Chromatography) y análisis en UV se ha empleado calidad PAI (UV-IR-HPLC). Los disolventes deuterados utilizados en los análisis de RMN han sido suministrados por Merck o Aldrich con un grado de deuteración mínimo de 99.8 %. Todos los disolventes se han utilizado sin purificación previa.

En la preparación de los medios de degradación y de liberación de fármacos se ha empleado agua mQ.

Los reactivos de síntesis han sido suministrados por Sigma-Aldrich-Fluka y Acros con calidad PA-ACS y se han empleado sin purificación previa.

El suero bovino y la mezcla en polvo “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium” utilizados para la preparación del medio celular fueron proporcionados por Sigma y se utilizaron sin purificación previa.

Las enzimas empleadas en los ensayos de biodegradación fueron la proteinasa K de *Tritirachium album*, suministrada por Sigma-Aldrich y la lipasa de *Pseudomonas cepacia*, suministrada por Fluka.

### 3. MÉTODOS SINTÉTICOS.

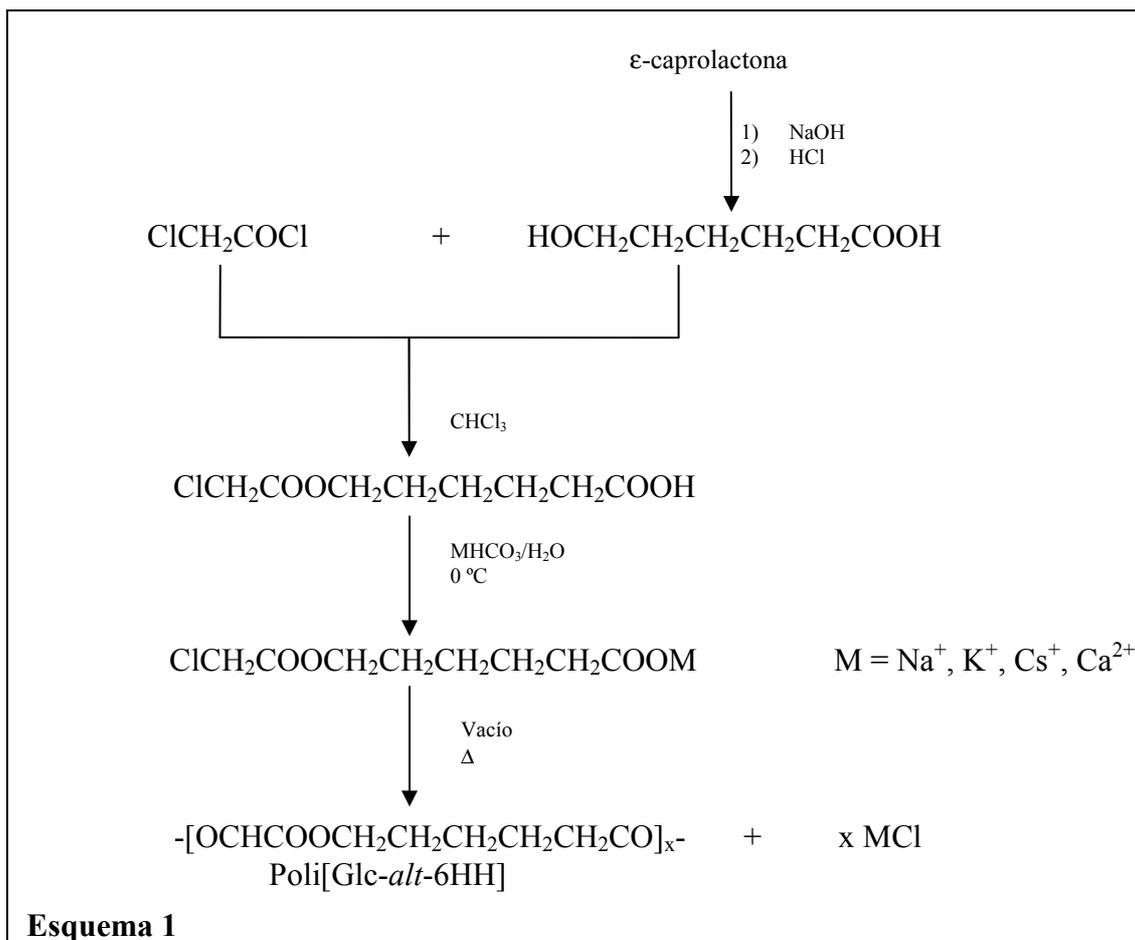
#### 3.1. Síntesis de polímeros.

En el presente trabajo se han obtenido por primera vez *copoliésteres* de ácido glicólico y  $\omega$ -hidroxiácidos con una *distribución alternada* por el **método de policondensación de sales metálicas**.

Los polímeros se han sintetizado adaptando una ruta sintética que se ha revelado efectiva para la obtención de distintas poliesteramidas <sup>[96-98, 100]</sup> y cuyo método se basa en los trabajos realizados por Epple *et al.* <sup>[85, 88, 91]</sup>.

Como comonomeros del ácido glicólico se han elegido la  $\epsilon$ -caprolactona y la butirolactona y se han diseñado dos procedimientos de síntesis para la obtención de éstos poliésteres:

a) El primer procedimiento de síntesis, mostrado en el esquema 1, consta de las siguientes etapas: en la primera se hidroliza el éster de la  $\epsilon$ -caprolactona y se aísla el ácido 6-hidroxihexanoico que, en una segunda etapa, se cloroaceta. Posteriormente, se neutraliza el ácido obtenido con el hidrogenocarbonato de un catión monovalente o divalente a 0 °C para evitar la hidrólisis del éster. En la etapa final, se polimerizan las diferentes sales obtenidas por inducción térmica.

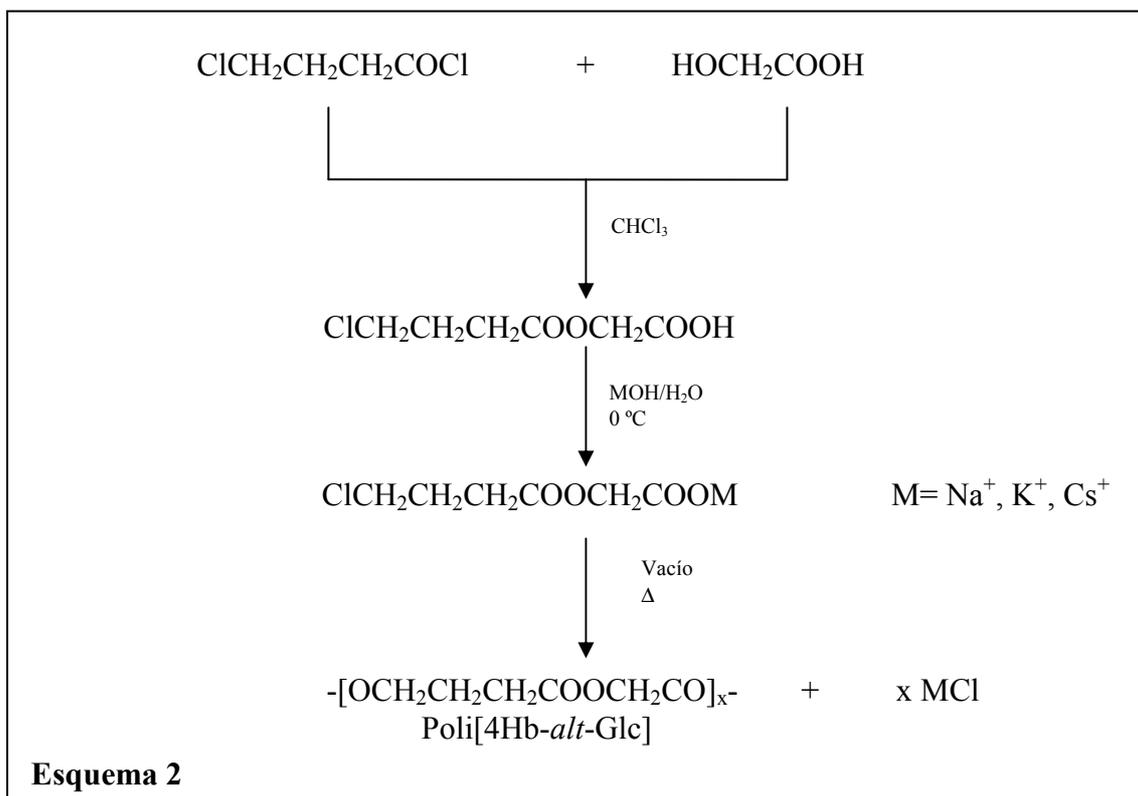


Esta ruta sintética resulta efectiva para la síntesis de copolímeros de ε-caprolactona pero no es aplicable para la obtención de copolímeros de butirolactona. En la primera etapa de reacción, donde se hidroliza el éster de la butirolactona, se observa que al bajar el pH del medio para obtener el compuesto ácido, éste vuelve a ciclar obteniéndose el producto de partida. La imposibilidad de aislar el ácido 4-hidroxibutírico nos condujo al diseño de un segundo proceso de síntesis que se detalla en el siguiente apartado.

b) El esquema 2 muestra la síntesis ideada para la obtención de copolímeros de butirolactona. En primer lugar, se cloroacila el ácido glicólico con cloruro de clorobutirilo y se neutraliza el ácido obtenido a 0 °C, para evitar la hidrólisis del éster formado, con el hidróxido de un catión monovalente. En este procedimiento el grupo éster formado no es tan electrófilo como el éster producido en la primera síntesis descrita, donde hay un átomo electronegativo, el cloro, en posición alfa respecto al grupo carbonilo. Por esta razón, es posible utilizar un hidróxido para la neutralización

del ácido. Finalmente, se obtiene el polímero deseado por condensación térmica de las distintas sales metálicas.

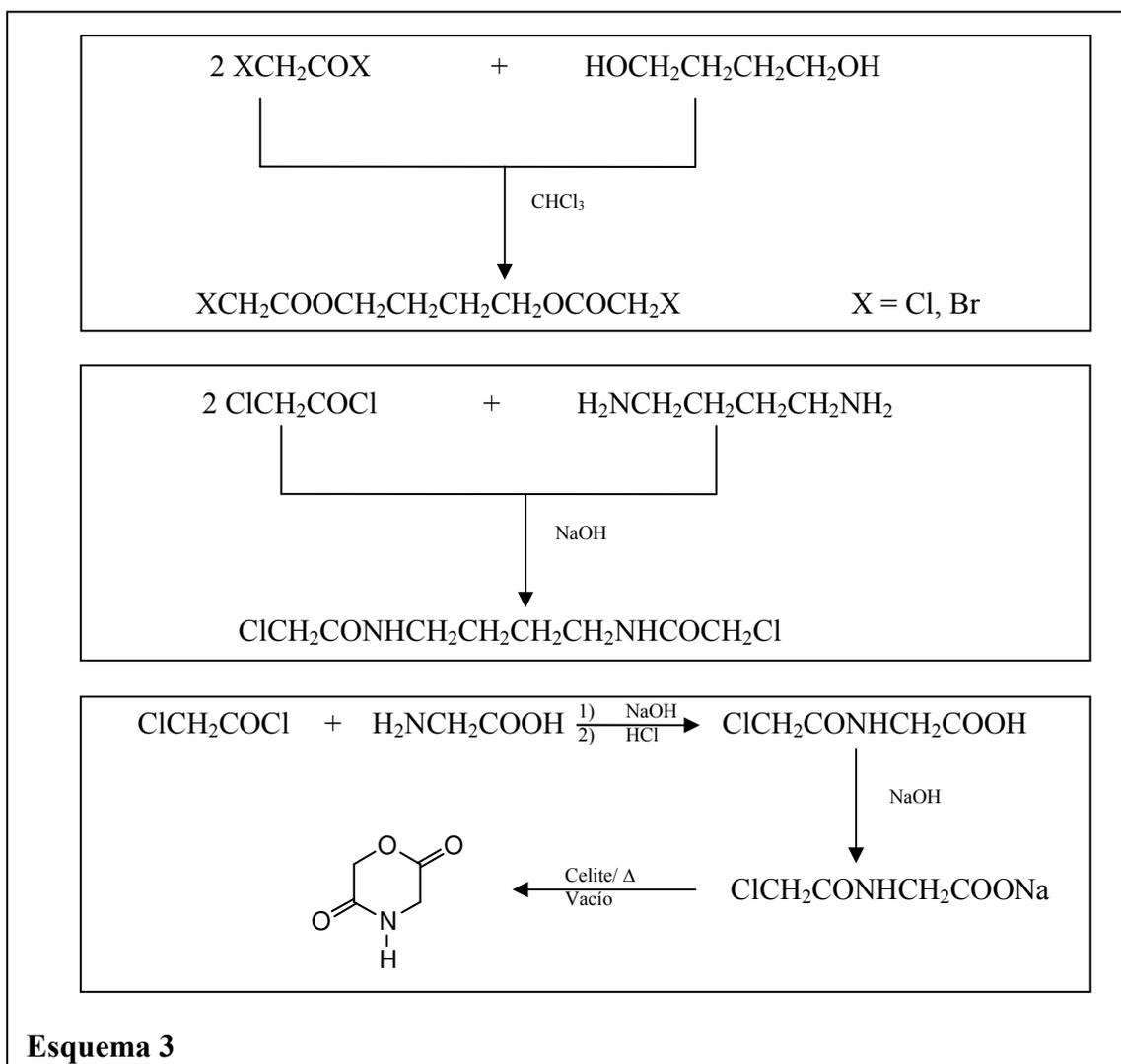
La síntesis se ha estudiado únicamente a partir de sales monovalentes puesto que se ha comprobado que las sales divalentes, descritas en el apartado anterior, no polimerizan térmicamente.



La obtención de los copolímeros de caprolactona mediante esta segunda ruta es factible. Sin embargo, teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos mediante el primer método y el elevado coste del cloruro de clorohexanoilo, se ha considerado innecesario explorar su síntesis mediante esta vía.

### 3.2. Síntesis de compuestos modelo.

En muchos casos las policondensaciones tienen lugar en estado sólido por lo que es interesante conocer la estructura de los monómeros. Para ello, se han sintetizado pequeñas moléculas con la finalidad de determinar su estructura cristalina mediante difracción de rayos X. En el esquema 3 se muestra la síntesis de los compuestos modelo estudiados en la presente tesis.



#### 4. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA.

Los polímeros obtenidos se han caracterizado mediante espectroscopia de infrarrojo (IR), espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) y de carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN), viscosimetría, cromatografía de permeación en gel (GPC), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y termogravimetría (TGA). Además, se han realizado estudios de degradación de los mismos.

Los monómeros así como los compuestos modelo se han caracterizado por espectroscopia de infrarrojo (IR), espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) y de carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN). También se han determinado los puntos de fusión.

Para la cuantificación de los principios activos encapsulados en las microesferas y la determinación de concentraciones en los medios de liberación se han utilizado las técnicas instrumentales de UV-visible y cromatografía líquida de alta resolución.

#### 4.1. Espectroscopia de infrarrojo.

La espectroscopia de infrarrojo se ha empleado para la caracterización de los compuestos sintetizados. Además, esta técnica espectroscópica ha permitido seguir la evolución de las reacciones de polimerización constatándose la desaparición de los grupos carboxilo de los monómeros, así como la intensificación de los grupos éster del polímero que se forman durante la reacción.

Cuando la luz infrarroja pasa a través de una muestra, algunas de las frecuencias son absorbidas y otras transmitidas. La espectroscopia de infrarrojo se fundamenta en las vibraciones moleculares que tienen lugar mediante la absorción de la radiación infrarroja. En la zona del espectro electromagnético, con longitudes de onda del infrarrojo medio (entre 4000 y 400  $\text{cm}^{-1}$ ), se suelen observar una serie de bandas de absorción provocadas por las vibraciones entre átomos de la molécula.

Durante la excitación es necesaria una variación del momento dipolar de la molécula para que se produzca una absorción en el IR que pueda asociarse a vibraciones de tensión (simétrica o asimétrica) o de deformación. Así, los grupos polares muestran absorciones intensas mientras que los grupos apolares dan lugar a absorciones débiles.

La detección de los grupos funcionales presentes es la principal aplicación de la técnica. A continuación se detallan el número de onda de las absorciones más importantes en los compuestos estudiados y el tipo de vibración que se produce:

- Vibración de tensión del  $-\text{COOH}$ : 3500-2400  $\text{cm}^{-1}$ .
- Vibración de tensión asimétrica del  $\text{CH}_2$ : 2940  $\text{cm}^{-1}$ .
- Vibración de tensión simétrica del  $\text{CH}_2$ : 2860  $\text{cm}^{-1}$ .
- Vibración de tensión del  $\text{C}=\text{O}$  de ácido: 1770-1750  $\text{cm}^{-1}$ .
- Vibración de tensión del  $\text{C}=\text{O}$  de éster: 1745-1725  $\text{cm}^{-1}$ .
- Vibración de tensión asimétrica del  $\text{CO}_2^-$  (sal de ácido): 1610-1550  $\text{cm}^{-1}$ .

- Vibración de deformación de tijera del CH<sub>2</sub>: 1460 cm<sup>-1</sup>.
- Vibraciones de tensión simétrica del CO<sub>2</sub><sup>-</sup> (sal de ácido): 1400 cm<sup>-1</sup>.
- Vibraciones de tensión asimétrica y simétrica del C-O (éster, ácido y sal): 1320-1000 cm<sup>-1</sup>.

Cabe comentar que los desplazamientos que se indican son aproximados ya que el valor experimental obtenido es variable dependiendo de la conformación propia de cada compuesto.

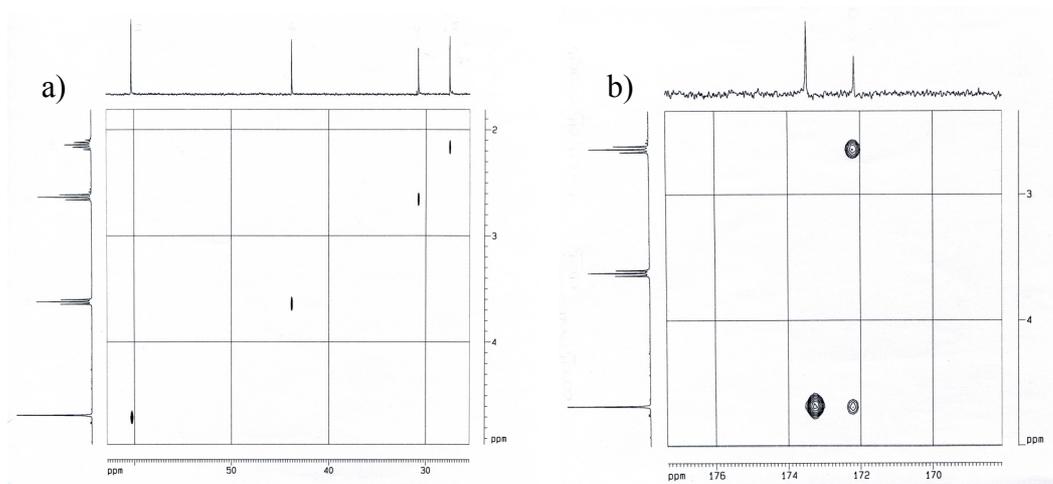
#### 4.2. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), que representa una de las técnicas más importantes en la determinación estructural de compuestos orgánicos, ha permitido identificar y comprobar la pureza de los compuestos sintetizados.

La técnica espectroscópica de RMN se basa en la medida de absorción de radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias aproximadamente de 4 a 600 MHz. En contraste con la espectroscopia de infrarrojo, en el proceso de absorción están implicados los núcleos de los átomos. La técnica se basa en las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos y la interacción del momento magnético nuclear con un campo magnético externo B<sub>0</sub> que conduce a la generación de un diagrama formado por diferentes niveles energéticos. La transición entre estos niveles puede ser detectada, amplificada y registrada en lo que sería una línea espectral o señal de resonancia. De esta forma, se generan los espectros de RMN para compuestos con núcleos de momento magnético distinto de cero, entre los que se encuentran el protón (<sup>1</sup>H) y el carbono 13 (<sup>13</sup>C). Es importante saber que para un mismo tipo de núcleo, las frecuencias de resonancia son distintas ya que los entornos químicos son diferentes. La posición, que está asociada a la identidad de los diferentes grupos vecinos, se expresa como desplazamiento químico en ppm respecto a la señal de un grupo de referencia.

Para la asignación de las señales en los espectros de <sup>13</sup>C se han realizado experimentos bidimensionales de correlación heteronuclear HETCOR (correlación <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C) (figura 4.1a). Ocasionalmente, también se han realizado otros experimentos bidimensionales, por ejemplo, para identificar los carbonilos de éster, de la sal carboxílica o del ácido

carboxílico se han realizado experimentos COLOC (figura 4.1b) que detectan los acoplamientos  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a distancias superiores a un enlace.



**Figura 4.1. Espectros bidimensionales HETCOR (a) y COLOC (b).**

Se ha utilizado la espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN para confirmar la distribución alternante de los polímeros sintetizados, así como para evaluar el peso molecular ( $M_n$ ) de las muestras de reducido tamaño molecular. En este sentido, la técnica resulta útil para el seguimiento de la degradación de polímeros. Además, la aparición de nuevas señales o la disminución de la intensidad de otras existentes en el espectro inicial del polímero sirven para conocer el avance de la degradación.

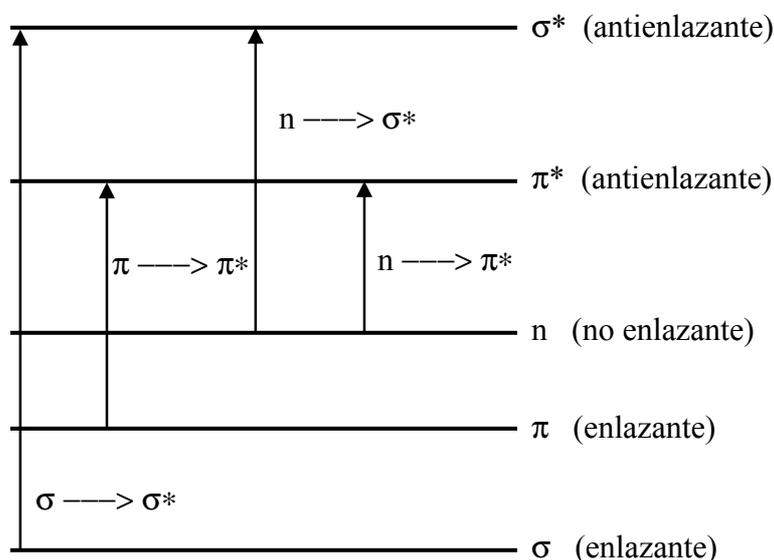
La preparación de las muestras se ha realizado utilizando un disolvente deuterado adecuado y añadiendo una gota de una sustancia de referencia (TMS). La disolución resultante se introduce en un tubo de vidrio especial de 5 mm de diámetro.

#### 4.3. Espectroscopia ultravioleta visible.

La espectroscopia visible es una de las técnicas más amplia y frecuentemente empleada en el análisis químico, tanto cuantitativo como cualitativo, de muestras sólidas, líquidas o gaseosas. El rango visible se considera de los 380 a los 750 nm mientras que el rango del ultravioleta cercano es de 190 a 380 nm.

El espectro ultravioleta-visible de las moléculas está asociado a transiciones electrónicas entre los diferentes niveles energéticos de ciertos grupos o átomos de la molécula. Por tanto, no caracteriza a la molécula como entidad.

Los grupos de átomos que dan origen a la absorción en el ultravioleta, se conocen como grupos cromóforos. La mayoría de los grupos insaturados y heteroatómicos que tienen pares de electrones no compartidos, son cromóforos potenciales. Éstos son la base para la elucidación de grupos estructurales en las moléculas activas en el UV cercano. En la figura 4.2 se representan las transiciones posibles en una molécula.



**Figura 4.2.** Diagrama de niveles energéticos para diferentes orbitales moleculares y las transiciones posibles entre éstos.

El espectro ultravioleta de una molécula se obtiene generalmente para complementar al espectro infrarrojo de la misma especie que sirve como dato confirmativo de la ausencia o presencia de ciertos grupos funcionales. Desde el punto de vista del estudio estereoquímico y de grupos funcionales en una molécula orgánica, la espectroscopia UV no rivaliza con otras técnicas que tienen el mismo propósito, especialmente con la espectroscopia IR por las razones mencionadas anteriormente, sin embargo su aplicación en la cuantificación de sustancias que absorben radiación UV la hacen una técnica insustituible.

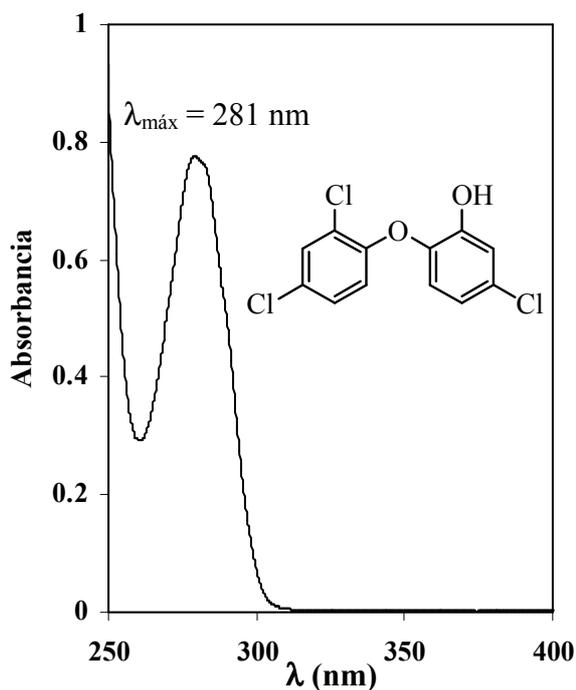


Figura 4.3. Espectro ultravioleta del triclosán.

El espectro que se obtiene es un gráfico de intensidad de absorción (absorbancia o transmitancia) frente a frecuencia o longitud de onda ( $\lambda$ ) (figura 4.3). La base de la espectroscopia UV-visible consiste en medir la intensidad de la absorbancia a una longitud de onda específica comparándola con la de otras soluciones de concentración conocida (soluciones estándar) que contengan la misma especie absorbente. Esta relación viene definida por la Ley de Lambert-Beer,

$$A = -\log(I / I_0) = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (4.1)$$

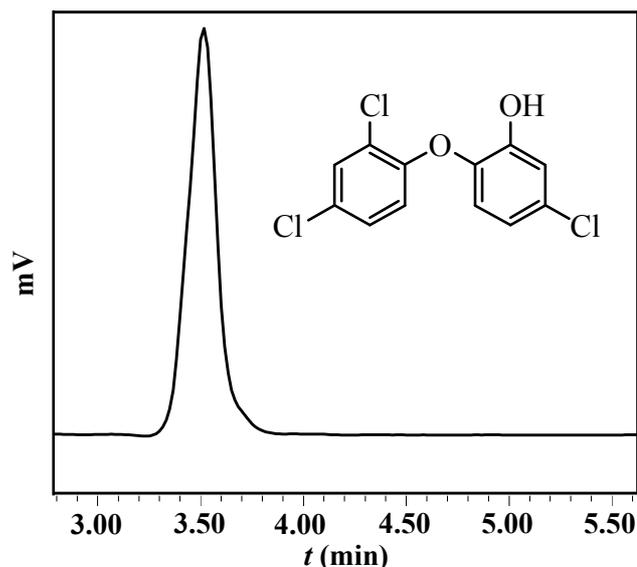
donde  $I_0$  es la intensidad de luz incidente a una determinada longitud de onda  $\lambda$ ;  $I$  es la intensidad de luz transmitida a dicha longitud de onda;  $\varepsilon$  es el coeficiente de absortividad molar;  $b$  es el camino óptico de la cubeta que contiene la muestra y  $c$  es la concentración de la disolución. La preparación de las muestras se detalla en la sección 7.

#### 4.4. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Esta técnica se ha empleado para la cuantificación del triclosán (2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenil éter) en los dos medios de liberación ensayados, el medio Sørensen y el medio celular.

La cromatografía líquida de alta resolución es la técnica de separación más ampliamente utilizada dada su sensibilidad así como su exactitud en las determinaciones cuantitativas. Es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

En la cromatografía líquida de alta resolución, los componentes de la muestra, previamente disueltos en un disolvente adecuado (fase móvil), son forzados a atravesar la columna cromatográfica gracias a la aplicación de altas presiones. El material interno de la columna, fase estacionaria, está constituido por un relleno capaz de retener de forma selectiva los componentes de la mezcla. La resolución de esta separación depende de la interacción entre la fase estacionaria y la fase móvil, pudiendo ser manipulada a través de la elección de diferentes mezclas de disolventes y distintos tipo de relleno. Como resultado final los componentes de la mezcla salen de la columna separados en función de sus tiempos de retención en lo que constituye el cromatograma (figura 4.4). Éste permite realizar la identificación cualitativa y cuantitativa de las especies separadas dado que el área de cada pico es directamente proporcional a su concentración.



**Figura 4.4.** Ejemplo de cromatograma obtenido mediante HPLC del triclosán.

Existen cuatro tipos de cromatografía en los que la fase móvil es un líquido que se diferencian según la naturaleza de los mecanismos de retención que controlan la separación:

1. Cromatografía de reparto o líquido-líquido, separa los solutos basándose en la solubilidad. Cada soluto presenta un coeficiente de partición entre las dos fases según su mayor o menor grado de hidrofobicidad o hidrofiliidad.
2. Cromatografía de adsorción o líquido-sólido, se basa en la afinidad de adsorción.
3. Cromatografía iónica, separa los solutos según su carga iónica.
4. Cromatografía de exclusión por tamaños o en gel, separa los solutos según su peso molecular.

Por otra parte, existen dos tipos de cromatografía de reparto:

1. Cromatografía de fase reversa.
2. Cromatografía de fase normal.

En la cromatografía de fase reversa la fase estacionaria es apolar mientras que la fase móvil es relativamente polar. La retención se produce en una especie de capa líquida

depositada químicamente en la fase estacionaria como consecuencia de la distinta solubilidad relativa entre la fase estacionaria y la fase móvil. La fase móvil más comúnmente empleada es una mezcla de agua y un solvente orgánico miscible como el metanol o el acetonitrilo.

En la cromatografía de fase normal, a diferencia de la anterior, la fase estacionaria es polar y la móvil apolar. La retención, como en el caso de fase reversa, tiene lugar en la capa líquida depositada químicamente, como consecuencia de la distinta solubilidad relativa en la fase estacionaria y la fase móvil. El analito menos polar será el primero que se eluye y el más polar el último en eluir.

En la presente tesis se ha empleado la modalidad de fase reversa. Concretamente, se ha utilizado una columna Tracer Extrasil ODS1 3  $\mu\text{m}$  de espesor de fase y unas dimensiones  $10 \times 0.4$  cm (Teknokroma). Las condiciones cromatográficas se describen con detalle en la sección 7.

#### **4.5. Medidas de puntos de fusión.**

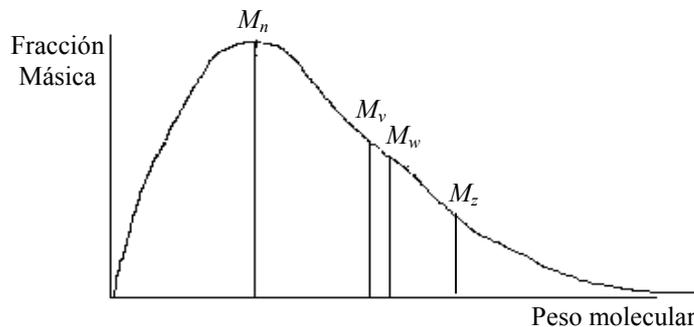
El punto de fusión es la temperatura a la cual el estado sólido y el estado líquido de una sustancia coexisten, en equilibrio térmico, a una presión de una atmósfera. Dicha temperatura depende de las fuerzas intermoleculares que son propias de cada sólido en particular.

La temperatura de fusión es la constante más utilizada para conocer el grado de pureza de una sustancia. Habitualmente se expresa como un rango de temperaturas desde que el material empieza a fundir hasta que ha fundido completamente y que no ha de superar los 2 °C. Cuanto más impuro sea un compuesto, más bajo será su punto de fusión. Un efecto similar se produce cuando el sólido está húmedo, por lo que debe procederse a un secado cuidadoso antes de determinar el punto de fusión. La impurificación de un sólido orgánico con un producto inerte, como por ejemplo sales inorgánicas, partículas de polvo, etc., no produce un descenso del punto de fusión de la sustancia.

#### 4.6. Evaluación del peso molecular.

El peso molecular de los polímeros obtenidos se ha evaluado mediante viscosimetría y mediante cromatografía de permeación en gel (GPC).

En un polímero, la variable fundamental que controla sus características y propiedades es el peso molecular. Sin embargo, debido a que los métodos de síntesis son procesos aleatorios y estadísticos en los que el crecimiento de la cadena que polimeriza está influenciado por multitud de variables, el resultado final corresponde a la obtención de un producto formado por cadenas macromoleculares de distinta longitud. Es decir, no se consigue un peso molecular único sino una distribución de pesos moleculares, más o menos estrecha, dependiendo del proceso de síntesis. Por ello, los métodos experimentales de determinación del peso molecular proporcionan un valor medio, que vendrá definido según la técnica empleada.



**Figura 4.5.** Ejemplo de curva de distribución de pesos moleculares, indicando la posición relativa de los pesos moleculares promedio.

En la figura 4.5 se muestra una curva típica de distribución de pesos moleculares para un polímero sintético. Se puede observar que existen cantidades apreciables de distinto tamaño, desde los oligómeros hasta las especies de muy elevado peso molecular. A continuación se definen los diferentes promedios de peso molecular:

- i) Peso molecular promedio en número,  $M_n$  o  $\langle M_n \rangle$ , se define como:

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} = \sum x_i M_i \quad (4.2)$$

donde  $N_i$  es el número de especies de peso molecular  $M_i$ ;  $N = \sum N_i$  es el número total de especies y  $x_i = N_i/N$  es la fracción en número de la especie de peso molecular  $M_i$ . Se determina experimentalmente a partir de propiedades coligativas como la presión osmótica, ya que éstas dependen del número de moléculas presentes.

ii) Peso molecular promedio en peso,  $M_w$  o  $\langle M_w \rangle$ , se define como:

$$M_w = \frac{\sum W_i M_i}{\sum W_i} = \sum w_i M_i \quad (4.3)$$

donde  $W_i$  es el peso de las especies de peso molecular  $M_i$ ;  $W = \sum W_i$  es el peso total de la muestra y  $w_i = W_i/W$  es la fracción en peso de la especie de peso molecular  $M_i$ . Se determina experimentalmente a partir de técnicas de dispersión de luz de soluciones macromoleculares y técnicas de ultracentrifugación.

iii) Pesos moleculares promedio,  $M_z$  y  $M_{z+1}$ , se definen como:

$$M_z = \frac{\sum N_i M_i^3}{\sum N_i M_i^2} \quad (4.4)$$

$$M_{z+1} = \frac{\sum N_i M_i^4}{\sum N_i M_i^3} \quad (4.5)$$

Se determinan experimentalmente a partir de técnicas de ultracentrifugación.

iv) Peso molecular viscosimétrico,  $M_v$ , se define como:

$$M_v = \left( \frac{\sum N_i M_i^{a+1}}{\sum N_i M_i} \right)^{1/a} \quad (4.6)$$

donde  $a$  es un parámetro comprendido entre 0.5 y 1. Se determina experimentalmente a partir de medidas de viscosidad de disoluciones del polímero.

Para un polímero polidisperso el valor relativo de cada uno de los promedios es:

$$M_n < M_v < M_w < M_z < M_{z+1}$$

Teniendo en cuenta que  $M_i = n_i M_0$ , donde  $n_i$  es el grado de polimerización de la especie  $i$  y  $M_0$  el peso molecular de la unidad repetitiva, se define el **grado de polimerización promedio** en número,  $X_n$ , y en peso  $X_w$ , como:

$$X_n = \sum x_i X_i \quad (4.7)$$

$$X_w = \sum w_i X_i \quad (4.8)$$

El **índice de polidispersidad**  $D$ , nos indica la anchura de la distribución de tamaños moleculares y corresponde a la relación entre el promedio en peso y en número:

$$D = \frac{M_w}{M_n} = \frac{X_w}{X_n} \quad (4.9)$$

Cuando el índice de polidispersidad es igual a la unidad se dispone de una muestra monodispersa, mientras que cuanto más alejado de la unidad sea su valor, más polidispersa será la muestra y más ancha la distribución. El índice de polidispersidad da sólo una idea de la variabilidad de pesos moleculares en la muestra, pero no nos permite conocer como es la distribución completa de los pesos moleculares.

#### 4.6.1. Viscosimetría.

Una de las técnicas más utilizadas para la determinación del peso molecular medio de un polímero es la **viscosimetría** ya que es una técnica fácil y rápida. Cuando el polímero presenta un índice de polidispersidad reducido, el promedio viscosimétrico se aproxima al promedio en peso.

La viscosidad es la propiedad de todo fluido que caracteriza su comportamiento de flujo. A escala microscópica, la mayor o menor viscosidad de un fluido es consecuencia de la facilidad con que las partículas que lo constituyen se deslizan unas respecto a otras, ya que la viscosidad está relacionada con el rozamiento interno del fluido.

La viscosidad de un polímero en disolución depende de la naturaleza del polímero y del disolvente, de la distribución de pesos moleculares, de la concentración y de la temperatura. La viscosidad de disoluciones poliméricas es bastante elevada ya que, debido al elevado tamaño (volumen hidrodinámico) de las partículas disueltas, éstas experimentan gran resistencia al movimiento.

La viscosidad de un fluido se puede relacionar con el tiempo de flujo  $t$ , requerido para que un volumen determinado de disolución pase a través de un capilar por efecto de la gravedad. Esta relación puede obtenerse a partir de la ecuación de Hagen-Poiseuille:

$$v = \frac{\pi \cdot \Delta P \cdot r^4}{8 \cdot \eta \cdot l} \quad (4.10)$$

donde  $v$  es el flujo volumétrico del fluido,  $\Delta P$  es la diferencia de presión que mantiene el flujo,  $r$  es el radio del capilar,  $\eta$  es la viscosidad y  $l$  es la longitud del capilar.

La expresión anterior puede reordenarse para obtener una relación de la viscosidad con el tiempo:

$$\eta = \frac{\pi \cdot \Delta P \cdot r^4 \cdot t}{8 \cdot V \cdot l} \quad (4.11)$$

donde  $V$  representa el volumen de fluido desplazado en el tiempo  $t$ .

En el caso de disoluciones, es frecuente medir la viscosidad por comparación de la viscosidad de la disolución con la del disolvente puro. Los parámetros resultantes son la viscosidad relativa ( $\eta_r$ ) y la viscosidad específica ( $\eta_{sp}$ ), definidas mediante las siguientes expresiones:

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} \approx \frac{t}{t_0} \quad (4.12)$$

$$\eta_{sp} = \frac{(\eta - \eta_0)}{\eta_0} = \frac{(t - t_0)}{t_0} \quad (4.13)$$

donde  $\eta$  y  $\eta_0$  son, respectivamente, las viscosidades de la disolución y la del disolvente puro,  $t$  y  $t_0$  son respectivamente los tiempos necesarios para que la disolución y el disolvente fluyan a través de las marcas de un capilar.

Cuando se quiere tener en cuenta el efecto de la concentración ( $c$ ) en la viscosidad, se pueden utilizar otros dos parámetros, conocidos como viscosidad reducida ( $\eta_{red}$ ) y viscosidad inherente ( $\eta_{inh}$ ):

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} = \frac{(t - t_0) \cdot 1}{t_0 \cdot c} \quad (4.14)$$

$$\eta_{inh} = \frac{(\ln \eta_{sp})}{c} \quad (4.15)$$

La relación entre la viscosidad y la concentración fue demostrada empíricamente por Huggins y Kramer y puede ser descrita mediante las expresiones:

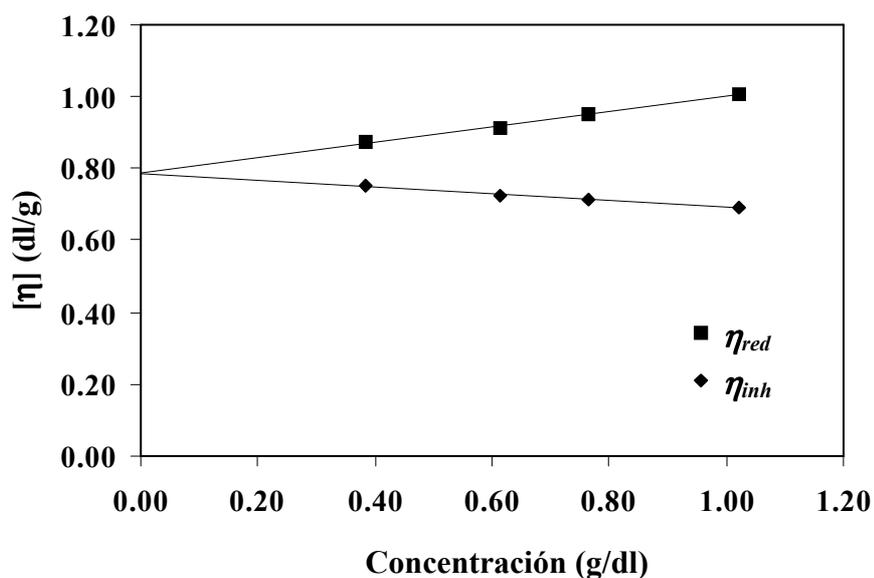
$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_H [\eta]^2 c \quad (4.16)$$

$$\frac{\ln \eta_{red}}{c} = [\eta] + k_k [\eta]^2 c \quad (4.17)$$

Para disoluciones diluidas, las formas de estas curvas se aproximan a dos líneas rectas que, extrapoladas a concentración nula, coinciden en el parámetro correspondiente a la viscosidad intrínseca  $[\eta]$  (figura 4.6). Este parámetro puede relacionarse directamente con el peso molecular del polímero a través de la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada:

$$[\eta] = K \cdot M_v^a \quad (4.18)$$

Los parámetros  $K$  y  $a$  son las llamadas constantes de Mark-Houwink-Sakurada y dependen del polímero, del disolvente y de la temperatura. Estos parámetros se pueden encontrar tabulados en la bibliografía para algunos polímeros.



**Figura 4.6.** Ejemplo ilustrativo de la determinación de la viscosidad intrínseca mediante la extrapolación de las viscosidades reducida e inherente.

Para determinar el valor de los parámetros  $K$  y  $a$ , se requiere un calibrado con muestras de peso molecular conocido. En ausencia de patrones, se utiliza la correlación existente para un polímero de naturaleza similar en el mismo solvente y temperatura. No obstante, de este modo se ignoran interacciones específicas del polímero en estudio por lo que el valor que se obtiene únicamente es orientativo. Por este motivo, a efectos de comparación se ha utilizado simplemente la viscosidad intrínseca como parámetro indicador del peso molecular.

Experimentalmente la determinación de la viscosidad intrínseca se ha realizado midiendo el tiempo de flujo, a través del capilar de un micro-viscosímetro del disolvente puro y de distintas disoluciones diluidas del polímero. En todos los casos se ha utilizado el ácido dicloroacético como disolvente, el rango de concentraciones se ha mantenido entre  $1 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1}$  y  $0.35 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1}$ , y la temperatura se ha fijado a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4.6.2. Cromatografía de permeación en gel.

Actualmente, la cromatografía de permeación en gel (GPC), también conocida como Cromatografía de Exclusión (SEC), constituye la técnica de separación más utilizada

para la separación de las moléculas de una muestra polimérica en función del tamaño molecular.

Las macromoléculas disueltas se separan según sus dimensiones y no por su afinidad con la fase estacionaria, eluyente o solvente. En GPC las moléculas eluyen en orden de mayor a menor tamaño. Esta separación se produce como consecuencia de la diferente penetración de las macromoléculas a través de los poros de un gel dispuesto en el interior de una columna cromatográfica. Los materiales de relleno de la columna son principalmente poliestireno poroso (entrecruzado e hinchado) y vidrio poroso.

Cuando una disolución polimérica, con diferentes tamaños moleculares, es introducida en el interior de una columna cromatográfica tiene lugar un fraccionamiento en función de su tamaño molecular y de la distribución de tamaño de poro del gel polimérico. Las moléculas de mayor tamaño se arrastran con el disolvente, tardan menos tiempo en atravesar la columna y son las primeras en abandonarla, mientras que las de menor tamaño son retenidas durante un tiempo superior. A la salida de la columna se registra la variación entre el índice de refracción del disolvente puro y de la fracción eluida. Para conocer los valores de los pesos moleculares se requiere un calibrado con patrones.

Los pesos moleculares medios se han determinado utilizando estándares de polimetilmetacrilato de baja dispersidad. Los polímeros fueron disueltos en hexafluoroisopropanol y eluidos en hexafluoroisopropanol conteniendo  $\text{CF}_3\text{COONa}$  (0.05 M) a una velocidad de flujo de  $0.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . El volumen inyectado fue de  $100 \mu\text{L}$  y la concentración de las muestras de  $2.5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

#### **4.7. Análisis térmico.**

El análisis térmico comprende un conjunto de técnicas cuyo objetivo es el estudio de los cambios físicos o químicos que ocurren en una sustancia o material en función de la temperatura cuando la muestra se calienta con un programa de temperaturas, o en función del tiempo cuando la muestra se mantiene a una temperatura dada (isoterma).

La determinación de propiedades térmicas de los polímeros, concretamente la temperatura de fusión ( $T_f$ ), transición vítrea ( $T_g$ ) y cristalización ( $T_c$ ) así como los

valores de entalpía asociados ( $\Delta H_f$ ,  $\Delta H_c$ ), se han llevado a cabo mediante **calorimetría diferencial de barrido (DSC)**. Además, mediante esta técnica, también se ha estudiado la cinética de polimerización de las sales así como la cinética de cristalización de los polímeros obtenidos tal y como se detalla más adelante en la sección 6. La estabilidad térmica de los polímeros y de las sales se ha estudiado mediante **termogravimetría (TGA)**.

#### 4.7.1. Calorimetría diferencial de barrido.

Existen en el mercado dos clases de calorímetros, los que funcionan por compensación de potencia y los que funcionan por flujo de calor. En el presente trabajo se han utilizado calorímetros de ambos tipos. En el primer caso, se mide la potencia que hay que aportar o retirar del sistema para que la muestra y una referencia se mantengan a la misma temperatura cuando se someten a un programa de calentamiento. En el segundo caso, se mide la diferencia de temperatura que se establece entre la muestra y la referencia cuando son calentadas en un horno único.

En la Calorimetría Diferencial de Barrido de potencia compensada, el calorímetro consta de dos celdas gemelas dotadas de calefacción. En una de ellas se coloca la cápsula que contiene la muestra a analizar, mientras que en la otra se sitúa una cápsula vacía. Las celdas que contienen la muestra y la referencia están equipadas con un sensor, para la medida de la temperatura, y una resistencia de calentamiento. Puesto que las capacidades caloríficas de la muestra y la referencia van a ser diferentes, se necesitará comunicar potencia térmica a través de la resistencia a la celda más fría para mantener ambas celdas a la misma temperatura. Dicha potencia es proporcional a la diferencia entre las capacidades caloríficas de las dos celdas siempre y cuando se calienten simultáneamente y a la misma velocidad. La energía suministrada (potencia) se mide como una función de la temperatura y del tiempo, teniendo como requerimiento el hecho de mantener en todo momento la igualdad de temperatura entre las dos celdas. De esta manera, el termograma obtenido muestra el flujo de calor frente al tiempo o a la temperatura.

El calorímetro de flujo de calor, por el contrario, consta de una única celda que dispone de dos plataformas, una para la muestra a analizar y otra para la referencia. Entre las dos

plataformas se encuentra situado un sensor, para la medida de temperatura, y una resistencia de calentamiento que mantiene el equilibrio térmico entre muestra y referencia. El flujo de calor entre la muestra y la referencia queda registrado y se representa en el termograma frente al tiempo o la temperatura.

En los materiales poliméricos, las transiciones térmicas más importantes que pueden observarse en DSC son la temperatura de **transición vítrea** ( $T_g$ ) y la **temperatura de fusión** ( $T_f$ ). En los polímeros amorfos la  $T_g$  es la única transición que se registra y aparece como un cambio abrupto de la línea base. La fusión se manifiesta en un pico endotérmico con subida más o menos gradual y regular según la naturaleza e historia térmica de la muestra, y bajada brusca hasta recobrar la línea base. Cuando tras la fusión, la línea base se mantiene puede considerarse que el material es térmicamente estable respecto al proceso de fusión. Lo contrario es indicio de descomposición y debe estudiarse con más detalle mediante análisis termogravimétrico.

La cristalinidad se evalúa usando como referencia el calor de fusión de un material 100% cristalino que puede estimarse a partir de las contribuciones de grupo y los datos tabulados por diferentes autores. Los valores utilizados fueron  $4.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  para el grupo metilénico, mientras que para el grupo éster los valores tabulados son  $-2.5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  [91] y  $5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  [151].

En la determinación de las propiedades térmicas de los polímeros se ha seguido un protocolo consistente en cuatro barridos. El primero corresponde a un calentamiento, generalmente realizado a  $20 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , en el que se obtiene información de la fusión de la muestra obtenida del proceso de síntesis y, por lo tanto, del grado de cristalinidad inicial. Después de la fusión, se efectúa un segundo barrido en el que la muestra se enfría, normalmente a  $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , para observar la cristalización a partir del fundido. El tercer barrido consiste en un calentamiento para verificar la fusión de la muestra anteriormente cristalizada y comprobar la reproducibilidad del proceso de fusión. Por último, se somete la muestra a un enfriamiento rápido desde el estado fundido con la finalidad de llevarla al estado amorfo, registrándose posteriormente un tercer calentamiento (cuarto barrido) en el que se determina la temperatura de transición vítrea del polímero junto con las posibles cristalizaciones en frío y en caliente, así como la fusión.

Las medidas se realizaron con muestras en polvo (5-10 mg) depositadas en cápsulas de aluminio y bajo una corriente de nitrógeno anhidro.

#### **4.7.2. Análisis termogravimétrico.**

El análisis termogravimétrico (TGA) es una técnica que mide la variación de masa en un compuesto sometido a un determinado tratamiento térmico. Las variaciones de temperatura no siempre implican un cambio en la masa de la muestra; existen, sin embargo, cambios térmicos que sí se acompañan de una modificación en la masa del compuesto, como la descomposición, la sublimación, la reducción, la desorción, la absorción y la vaporización. Estos cambios pueden ser medidos con el analizador termogravimétrico.

El análisis de TGA representa una forma fácil y rápida para analizar la estabilidad térmica de los polímeros. Esta información resulta relevante al evaluar las posibilidades de transformación de un material por encima de su temperatura de fusión. Además, mediante esta técnica se puede determinar si la temperatura de polimerización del monómero se encuentra próxima o lejana a la temperatura de descomposición del polímero.

Con esta técnica básicamente se realizan dos tipos de ensayo, el análisis dinámico o no isotérmico y el isotérmico o estático. En el primero, la temperatura se aumenta a velocidad constante, mientras que en el segundo se mantiene constante la temperatura midiéndose las variaciones de masa a lo largo del tiempo. Del análisis dinámico se obtiene la temperatura de descomposición inicial ( $T_{d,0}$ ) y la temperatura a la que la muestra pierde la mitad de su masa inicial ( $T_{d,1/2}$ ). Mediante el análisis estático se puede observar el efecto del tiempo sobre la estabilidad térmica de la muestra a una temperatura determinada.

La muestra se coloca sobre una balanza electrónica situada en el interior de un horno. Un programador de temperaturas permite realizar gradientes térmicos controlados así como mantener una temperatura fija. De este modo, se registran la temperatura a la que está sometida la muestra y las variaciones de peso que experimenta.

En el presente trabajo los ensayos se realizaron en régimen dinámico a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  a partir de muestras en polvo (10-20 mg), bajo atmósfera de nitrógeno y en el rango de 50 a  $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.8. Estudios de solubilidad.

La disolución de un polímero es un proceso lento que tiene lugar en dos etapas. En la primera, las moléculas de disolvente difunden lentamente hacia el interior del polímero hinchándolo, hasta lograr la separación de las cadenas y su incorporación en la disolución. El proceso de disolución puede detenerse en esta fase, si las fuerzas intermoleculares polímero-polímero, relacionadas con aspectos de reticulación o de cristalinidad, son lo suficientemente grandes como para impedir la completa disolución. En caso de que estas fuerzas puedan superarse por la formación de interacciones intensas polímero-disolvente, tendrá lugar la segunda etapa de la disolución. En ésta, el polímero hinchado se desintegra gradualmente originando una verdadera disolución. Al añadir más polímero no se observa saturación, sino que el material se disuelve. Por este motivo la solubilidad suele expresarse de forma cualitativa con términos como insoluble, soluble a temperatura ambiente y soluble a alta temperatura.

Una de las principales aplicaciones de los poliésteres diseñados en este trabajo corresponde a su aplicación como dispositivo liberador de fármacos. Existen diferentes métodos para la preparación de microesferas, en este trabajo se ha utilizado el método de evaporación del solvente tal y como se explicará en la sección 7. Por esta razón, es importante determinar la solubilidad de los poliésteres obtenidos en disolventes orgánicos volátiles, por lo que se han realizado estudios de solubilidad.

El protocolo seguido ha consistido en depositar una pequeña cantidad de polímero ( $\sim 1$  mg) en un tubo de ensayo al que se añade alrededor de 0.5 ml de disolvente. Se agita durante unos minutos y se examina para ver si se logra la disolución o cambia el aspecto del polímero. Cuando no se aprecian cambios a temperatura ambiente, se repite el ensayo calentando el tubo de ensayo a una temperatura que no exceda la temperatura de ebullición del disolvente y se realizan las mismas observaciones. Cuando se aprecian cambios pero no se llega a una completa disolución se considera que el polímero se ha disuelto parcialmente.

#### 4.9. Estudios de degradación.

Se han realizado ensayos de degradación hidrolítica y enzimática *in vitro* de los polímeros obtenidos. La degradación hidrolítica es lenta y requiere tiempos de incubación largos. Por ello, la hidrólisis se ha estudiado en tampón fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, pH 7.4) en condiciones aceleradas por efecto de la temperatura. En concreto los ensayos se han efectuado a 50 °C para el poli[Glc -*alt*-6HH] y a 70 °C para el poli[4Hb-*alt*-Glc].

La biodegradación suele ser más rápida y tiene lugar en la superficie del material debido a la imposibilidad de las enzimas de penetrar en el interior del material <sup>[152]</sup>. La degradación enzimática de los poliésteres sintetizados se ha estudiado también en condiciones fisiológicas ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, pH 7.4) con dos enzimas distintas y a una concentración de 1 mg·ml<sup>-1</sup>: la proteinasa K de *Tritirachium Album*, que es una enzima tipo proteasa y la lipasa de *Pseudomonas Cepacia*, que es de tipo estearasa.

Para todos los medios acuosos se ha utilizado agua desionizada Millipore y se ha añadido un 0.03 % (p/v) de azida sódica para evitar la proliferación de microorganismos. Los medios de degradación se han renovado cada tres días para asegurar una actividad, más o menos, continua y estable.

El seguimiento del proceso se ha efectuado en base a la pérdida de masa que experimenta la muestra, mediante pesada con balanza analítica, y a la evaluación de pérdida de peso molecular determinada mediante GPC. Por otro lado, los cambios en la estructura química se han estudiado mediante espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN. Además, la degradación enzimática de los poliésteres se ha evaluado mediante microscopia electrónica de barrido y mediante microscopia de transmisión electrónica de cristales simples de polímero. Estas técnicas se explicarán con detalle en el apartado de caracterización morfológica y estructural (apartado 5).

Los ensayos de degradación se han llevado a cabo a partir de placas de polímero. Éstas se han obtenido mediante prensado de las muestras en estado fundido (a 5 °C por encima de su temperatura de fusión) y empleando moldes metálicos. La presión

alcanzada fue de 5 toneladas. Inicialmente, a partir de aproximadamente 300 mg de polímero, se obtuvieron placas de 3 cm x 3 cm y 0.2 mm de espesor. Mediante cortes con cuchilla, cada placa se dividió en otras de 1.5 cm x 1.5 cm. En los ensayos de degradación hidrolítica las muestras se incubaron en 30 ml de medio y en los enzimáticos en 10 ml. Las muestras se extrajeron cuidadosamente tras decantar el medio de degradación y se dejaron secar al aire sobre un papel de filtro. Cuando las mismas provienen de medio enzimático, el procedimiento incluye la desactivación de la enzima mediante lavados con una disolución de HCl a pH 2 y posteriores lavados con agua desionizada Millipore.

#### **4.10. Determinación de la densidad por el método de flotación.**

Para determinar la densidad de los polímeros obtenidos se utilizó el método de flotación en disoluciones de 2-metil-2,4-pentanodiol y tetracloruro de carbono a 27 °C y a 0 °C. Pequeñas películas de polímero cristalizado en frío o en caliente se sumergieron en una probeta con 5 ml de 2-metil-2,4-pentanodiol y 5 ml de tetracloruro de carbono. Se fue añadiendo tetracloruro de carbono hasta que la muestra se elevó del fondo y se mantuvo suspendida en el interior del líquido. En este momento, se determinó la densidad del mismo con un picnómetro y se promedió con la obtenida por el mismo método, pero empezando con una disolución de 1 ml de 2-metil-2,4-pentanodiol y 9 ml de tetracloruro de carbono. En este caso la mezcla presenta una mayor densidad que la muestra, por lo que debe añadirse posteriormente 2-metil-2,4-pentanodiol para equilibrar la densidad.

### **5. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y ESTRUCTURAL.**

La estructura y morfología de los polímeros se ha estudiado mediante técnicas de difracción de rayos X y difracción de electrones (microscopía electrónica de transmisión). El estudio estructural de los polímeros se ha completado con experimentos simultáneos en **resolución temporal de dispersión de rayos X a bajo ángulo** (SAXS) y de **difracción** (WAXD) con radiación sincrotrón.

Mediante **microscopia electrónica de barrido** (SEM) se ha observado la morfología de la superficie de las placas de polímero sometidas a un proceso de degradación, así como la forma y textura de las microesferas sintetizadas.

Por otro lado, se ha estudiado la estructura cristalina de pequeñas moléculas, compuestos modelo, mediante difracción de rayos X.

### 5.1. Difracción de rayos X.

Los rayos X son una radiación electromagnética cuya longitud de onda se encuentra comprendida entre la radiación UV y los rayos  $\gamma$ . Las propiedades más importantes de esta radiación fueron descritas por Röntgen en 1896, pero no fue hasta principios del siglo pasado que von Laue (1912) y Bragg (1913) demostraron que los cristales, debido a su ordenación regular, podían difractar los rayos X dispersados por todos los átomos que los constituyen, según unas direcciones determinadas. Este descubrimiento resultó muy útil para la determinación de la estructura tridimensional de numerosas moléculas biológicas<sup>[153]</sup>, pero también en el caso de los polímeros sintéticos<sup>[154]</sup>.

Cuando los electrones emitidos por un filamento calentado a temperatura elevada se hacen incidir sobre un ánodo metálico, de forma que se produzcan excitaciones de los electrones situados en las capas más internas de los átomos, se generan rayos X cuya longitud de onda se sitúa entre  $10^{-7}$  y  $10^{-11}$  m. Normalmente se utiliza un ánodo de cobre y se obtiene un espectro de rayos X formado por una banda ancha responsable de la radiación blanca y unas líneas características ( $\text{CuK}_\alpha$  y  $\text{CuK}_\beta$ ) que se pueden separar mediante filtros adecuados. Para el estudio de polímeros se ha empleado la línea  $\text{CuK}_\alpha$  caracterizada por una longitud de onda,  $\lambda$ , de 0.154 nm.

Esta radiación debe separarse tanto de la radiación  $\text{CuK}_\beta$  como de la radiación continua, existiendo dos procedimientos:

a) Utilización de un filtro de níquel que se sitúa en la trayectoria del haz, en algún punto entre la fuente de rayos X y el sistema de detección. Este filtro absorbe selectivamente la línea espectral  $\text{K}_\beta$ , aunque disminuye la intensidad del doblete  $\text{K}_\alpha$ . La ventaja

principal del filtro de níquel es su simplicidad y bajo coste, mientras que su principal inconveniente es la presencia de un continuo de radiación blanca en el haz filtrado, que se pone de manifiesto en forma de manchas radiales alargadas en las fotografías de difracción de muestras orientadas.

b) Utilización de un monocromador consistente en un monocristal con una de sus caras cortada paralelamente a un conjunto de planos cristalinos característico. El uso de monocromadores tiene la ventaja de producir fotografías de difracción exentas también de la radiación blanca, pero conlleva una disminución apreciable de la intensidad del haz.

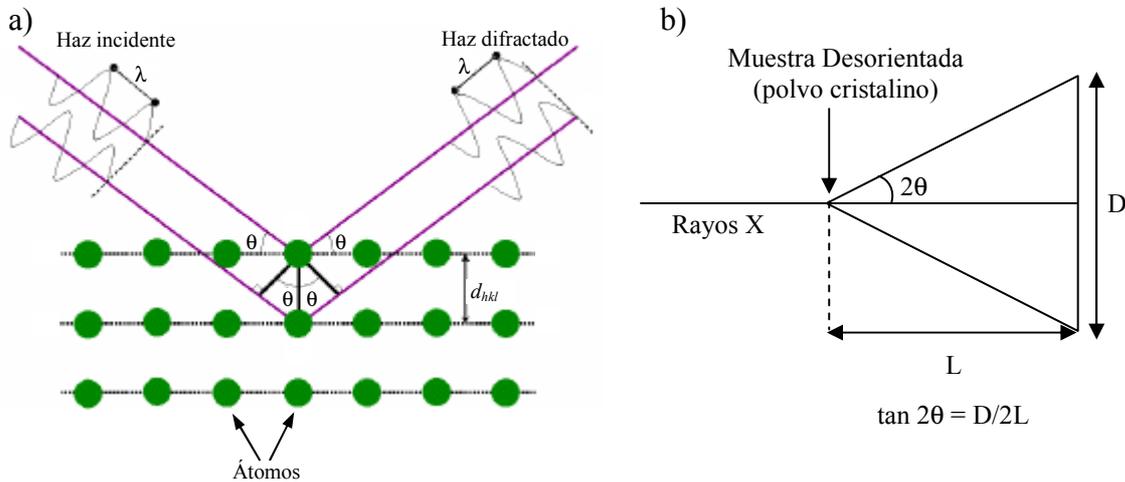
Cuando un haz de rayos X monocromático incide sobre una muestra pueden tener lugar dos procesos. Si la muestra tiene una estructura periódica (regiones cristalinas), los rayos X inciden coherentemente, sin producir cambios en la longitud de onda y sin pérdida de relaciones de fase entre los rayos incidentes y los dispersados. Cuando la muestra está compuesta de regiones amorfas y cristalinas que dan lugar a una cierta periodicidad, pueden observarse también efectos de dispersión que corresponden a espaciados elevados. El primer proceso se mide por difracción de rayos X a ángulo alto (WAXD, *Wide Angle X-ray Diffraction*) y el segundo por dispersión de bajo ángulo (SAXS, *Small Angle X-ray Scattering*).

Una red cristalina está compuesta por una familia de planos paralelos que se extienden a través de los átomos que la forman y que se define por un triplete de números enteros llamados *índices de Miller*. La difracción de rayos X sigue el principio de Huygens, donde cada rendija actúa como foco emisor de ondas que interfieren constructiva o destructivamente para producir la difracción. Únicamente se produce interferencia constructiva cuando se cumple la ley de Bragg:

$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta \quad (5.1)$$

donde  $d_{hkl}$  es el espaciado de los planos de Miller,  $\theta$  el ángulo de incidencia o reflexión,  $n$  el número de orden y  $\lambda$  la longitud de onda de la radiación utilizada. La geometría de la difracción de rayos X se muestra en la figura 5.1. El conjunto de espaciados

crystallográficos permite determinar la celdilla unitaria. Ésta se halla definida mediante los parámetros  $a$ ,  $b$ ,  $c$  y los ángulos existentes entre ellos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Esta celdilla representa la unidad más pequeña a partir de la cual puede generarse el cristal por simples movimientos de traslación.



**Figura 5.1. a) Geometría de difracción de rayos X, b) Relación entre el diámetro del anillo de difracción ( $D$ ) y el ángulo de difracción ( $\theta$ ) asociado.**

El diagrama de difracción de una fibra puede reflejar un elevado grado de orientación y proporcionar una información más precisa que un diagrama de difracción de polvo (muestra totalmente desorientada), en cuanto a la asignación de los índices de Miller correspondientes a los planos difractados y a la determinación de la simetría cristalina. Las propiedades térmicas y el peso molecular del polímero son condicionantes para poder preparar fibras orientadas. Debido a que el polímero es estirado según el propio eje molecular, las cadenas poliméricas se orientan según la dirección del estirado. Los diagramas de difracción correspondientes se caracterizan por la aparición de manchas relacionadas con la repetitividad de cadena con orientación meridional (M) o fuera del meridiano (oM) según el sistema cristalino y manchas ecuatoriales (E), relacionadas con el empaquetamiento cristalino.

La orientación de la muestra se consigue a partir del estirado de la masa polimérica fundida. El grado de orientación de la fibra se estima cualitativamente, observando la birrefringencia de la muestra con un microscopio de luz polarizada.

Por otro lado, en la presente tesis se realizaron experimentos simultáneos en **resolución temporal de dispersión de rayos X a bajo ángulo** (SAXS) y de **difracción** (WAXD) con radiación sincrotrón en la línea BM16 (ESRF, Grenoble) y también en la línea 6.2 (Daresbury). La radiación sincrotrón es una radiación electromagnética de alta intensidad, emitida por electrones o positrones de alta energía y con una distribución espectral continua. La radiación sincrotrón es producida cuando partículas cargadas y de muy alta energía ( $E \gg mc^2$ ) son desviadas por un campo magnético intenso.

Las propiedades de la radiación sincrotrón de mayor interés para los experimentos de dispersión son:

- Poder originar un espectro continuo que abarca la región del infrarrojo ( $\lambda \sim 10^{-2}$  mm) hasta la región de los rayos X duros ( $\lambda \sim 10^{-2}$  nm).
- Presentar una intensidad que es de varios órdenes de magnitud mayor a la de las fuentes convencionales.
- Originar un haz altamente colimado (0.14 mrad en la región de los rayos X).
- Producir una radiación altamente polarizada, con el vector del campo eléctrico en el plano orbital.

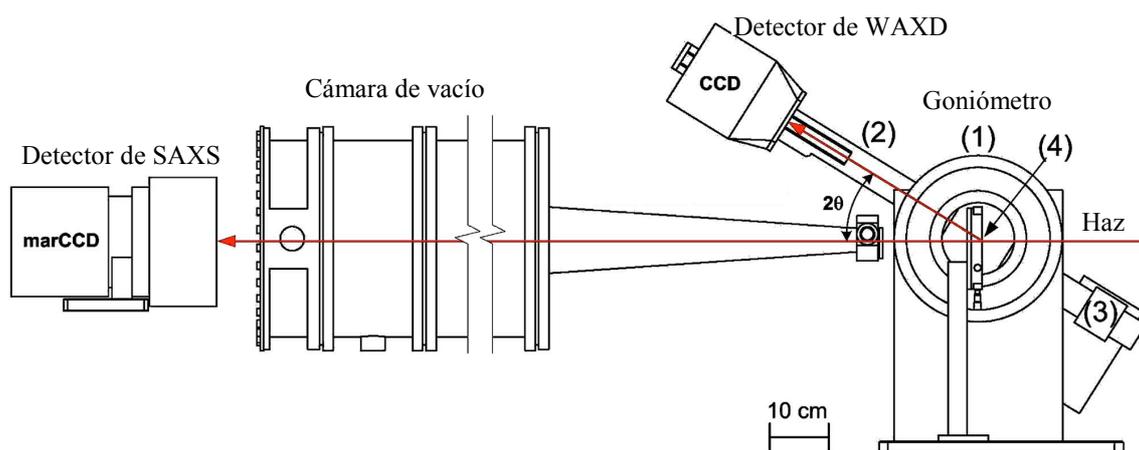
Un sincrotrón consiste básicamente en un anillo cuyo diámetro puede ir desde unos pocos metros hasta algunos centenares de metros. En el anillo se mantiene un vacío de unos  $10^{-7}$  mbar y en él se pueden aplicar campos eléctricos y magnéticos intensos.

Previamente se acelera un paquete de electrones o positrones en un acelerador lineal, hasta obtener energías de entre 40 y 360 MeV. Estas partículas son inyectadas en el sincrotrón, donde son aceleradas de nuevo hasta conseguir una energía de varios GeV. Esto se consigue gracias a una serie de imanes que focalizan y giran el haz de electrones o positrones a lo largo de su trayectoria. Entre los campos magnéticos existen zonas del anillo con camino recto, donde la energía del haz se incrementa mediante campos eléctricos. Cuando las partículas han alcanzado la elevada energía requerida (típicamente unos 3 GeV), son inyectadas en un anillo de almacenamiento. En este anillo, que es similar al sincrotrón, los electrones y positrones orbitan por caminos paralelos y en direcciones opuestas. Tanto los electrones como los positrones tienen las mismas propiedades en lo que se refiere a la radiación sincrotrón. El tiempo de vida de

este paquete de partículas en el anillo de almacenamiento varía entre 2 y 20 horas. Durante este tiempo, la corriente inicial de unos 300 mA decrece hasta unos 100 mA.

Una de las características más atractivas de la radiación sincrotrón para los experimentos en materiales poliméricos es su elevada intensidad. Gracias a ella es posible obtener diagramas de difracción en unos tiempos muy cortos, lo que permite el estudio de procesos dinámicos como son por ejemplo los de cristalización. En las secciones 5.1.1 y 5.1.2 se detalla el estudio de la cinética de cristalización mediante experimentos simultáneos en resolución temporal de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS) y de difracción (WAXD) de radiación sincrotrón.

En la figura 5.2 se muestra un esquema del montaje de la línea BM16 (ESRF, Grenoble) para experimentos simultáneos en resolución temporal. El detector de WAXD es una cámara CCD PI SCX90-1300 de Roper Scientific con una superficie activa de 65 x 65 mm<sup>2</sup> y 1242 x 1152 píxeles. El detector de SAXS es una cámara marCCD de X-Ray Research, GmbH, Norderstedt, Alemania, con una superficie activa de 165 mm de diámetro y 2048 x 2048 píxeles. El goniómetro está montado con su eje de rotación perpendicular a la dirección del haz. La muestra se coloca en la intersección entre el eje del goniómetro y el haz.



**Figura 5.2.** Esquema de la línea de polímeros BM16 (ESRF, Grenoble) para experimentos simultáneos de SAXS y WAXD <sup>[148]</sup>.

Los datos de difracción pueden darse también en función del vector de dispersión,  $\vec{q}$ , que se define como:

$$\vec{q} = \vec{k}_f - \vec{k}_i \quad (5.2)$$

donde  $\vec{k}_i$  y  $\vec{k}_f$  son los vectores de onda de las ondas planas incidente y dispersada respectivamente. En los experimentos de dispersión elástica, la frecuencia de la radiación incidente y dispersada permanece fija,

$$|\vec{k}_f| = |\vec{k}_i| = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (5.3)$$

El vector de dispersión ( $\vec{q}$ ) está relacionado con el ángulo de dispersión mediante:

$$|\vec{q}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta \quad (5.4)$$

Se observa una interferencia constructiva si existe algún tipo de periodicidad en los elementos constitutivos de la muestra y se cumple que el vector de dispersión coincide con un vector de la red recíproca cristalina<sup>[155]</sup>.

Dependiendo del ángulo  $\theta$ , la escala de longitudes exploradas es diferente. Para ángulos  $2\theta$  mayores de  $2.5^\circ$  se habla de dispersión de rayos X de ángulo altos (WAXD) y para ángulos  $2\theta$  menores de  $1^\circ$ , se habla de dispersión de bajo ángulo (SAXS).

En ángulos altos, la ley de Bragg<sup>[156]</sup>, predice que hay máximos de difracción cuando:

$$|\vec{q}| = \frac{2\pi}{d_{hkl}} \quad (5.5)$$

donde  $d_{hkl}$  es la distancia entre planos cristalográficos consecutivos con índices de Miller  $hkl$ .

Para ángulos bajos, el vector de onda  $\vec{q}$  permite explorar distancias del orden de las centenas de Å. En esta escala, la información obtenida proviene de las lamelas cristalizadas cumpliéndose la relación:

$$|\vec{q}| = \frac{2\pi}{L} \quad (5.6)$$

donde  $L$  es el valor correspondiente al espaciado interlamelar.

### 5.1.1. Dispersión de rayos X a ángulos bajos (SAXS).

Las muestras isotrópicas de polímeros cristalinos pueden considerarse como el resultado de un apilamiento de lamelas cristalinicas dispuestas paralelamente (figura 5.3). Si las dimensiones de los apilamientos en las direcciones paralela y perpendicular a la superficie lamelar son superiores a las distancias interlamelares, la dispersión de Rayos X puede relacionarse con una función de densidad electrónica  $\rho_e(z)$  medida según la dirección ( $z$ ) perpendicular a las superficies lamelares<sup>[157]</sup>. En esta dirección la densidad pasa a través de regiones amorfas con densidad electrónica  $\rho_{e,a}$  y regiones cristalinicas con densidad  $\rho_{e,c}$ . La función de correlación corresponde a la transformada de Fourier de la función de densidad electrónica y permite obtener información relativa a las dimensiones de las zonas cristalinicas de las lamelas, las zonas amorfas y el espaciado interlamelar.

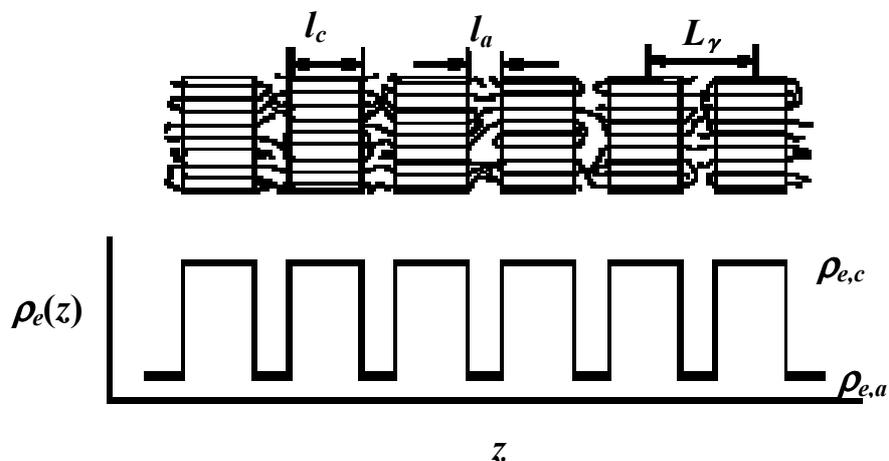


Figura 5.3. Representación esquemática del modelo bifásico.

Así, el análisis mediante dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS) permite analizar la distribución de los tamaños del cristal en las muestras. Como se ha comentado anteriormente, la periodicidad media del espaciado interlamelar puede calcularse a partir de la posición angular del máximo en el espectro de SAXS mediante la ecuación 5.6.

Experimentalmente, los perfiles de SAXS se analizan considerando la **función de correlación unidimensional normalizada** <sup>[158]</sup>,  $\gamma(r)$ , que corresponde a la transformada de Fourier del perfil de SAXS aplicando la corrección de Lorentz ( $Iq^2$  vs  $q$ ):

$$\gamma(r) = \frac{\int_0^{\infty} q^2 I(q) \cos(qr) dq}{Q} / \int_0^{\infty} q^2 I(q) dq \quad (5.7)$$

Las integraciones deben calcularse en el rango entre 0 y  $\infty$ , por lo que es necesario extrapolar la intensidad de dispersión a valores altos y bajos de  $q$ . La extrapolación a valores bajos de  $q$  se ha llevado a cabo empleando el modelo de Vonk <sup>[159]</sup> mediante el programa CORFUNC <sup>[149]</sup> que asume que el perfil de la intensidad de dispersión está definido por la siguiente ecuación:

$$I(q) = H_1 - H_2 q^2 \quad (5.8)$$

donde  $H_1$  y  $H_2$  son constantes.

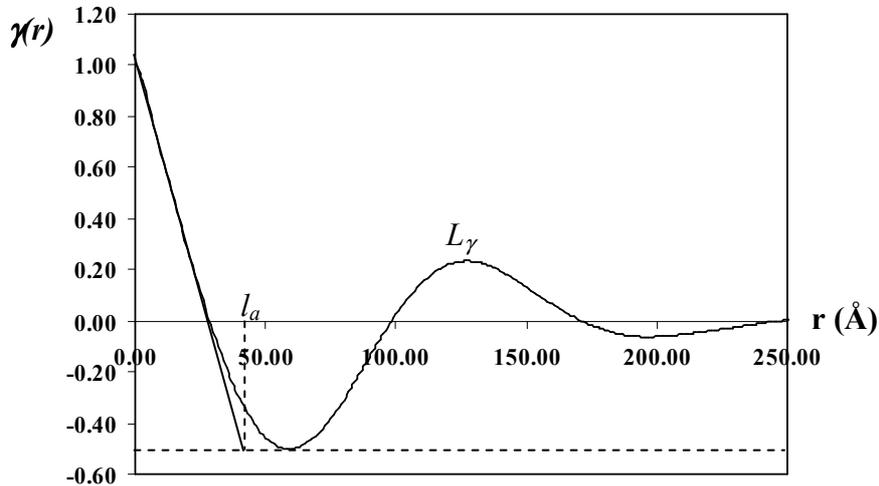
Por otro lado, la extrapolación a valores elevados de  $q$  se ha llevado a cabo considerando la ley de Porod <sup>[156]</sup>:

$$I(q) = I_b(q) + K / q^4 \quad (5.9)$$

donde  $I_b$  es la intensidad de “background” y  $K$  es la constante de Porod.

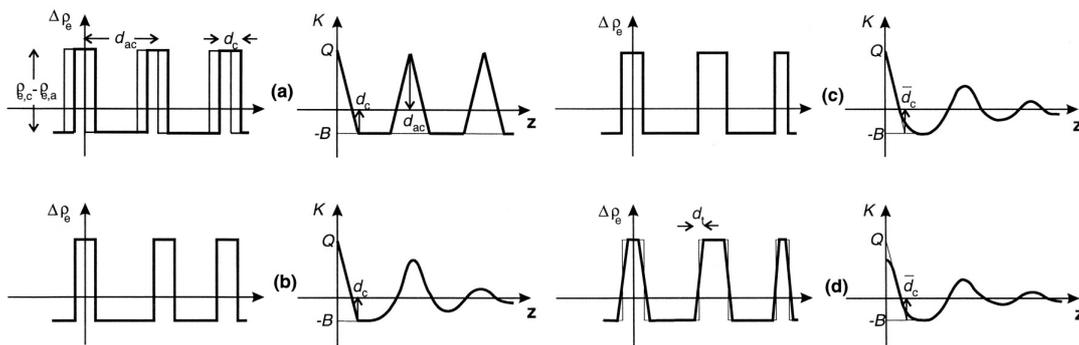
El análisis de la función de correlación conduce a la determinación de: (1) el espaciado interlamelar (*long period*),  $L_\gamma$ ; (2) la cristalinidad de la lamela  $X_c^{SAXS}$ ; (3) el espesor lamelar,  $l_c$ , y el espesor amorfo,  $l_a$ , y (4) la invariante,  $Q$ . La figura 5.4 muestra como se determinan estos parámetros:  $L_\gamma$  corresponde al valor de  $r$  para el primer máximo de la

función de correlación;  $l_a$  corresponde al valor de  $r$  en la intersección de la regresión lineal del triángulo de autocorrelación (RLTA) con la ordenada correspondiente al primer mínimo de la función de correlación;  $l_c$  corresponde a  $L_\gamma - l_a$  y  $X_c^{SAXS}$  se calcula como  $l_c/L_\gamma$ .



**Figura 5.4.** Función de correlación calculada a partir de un perfil de SAXS utilizando el programa CORFUNC <sup>[149]</sup>.

La forma concreta que se observa en la función de correlación evidencia tal y como se muestra en la figura 5.5 distribuciones no homogéneas en el espaciado interlamelar, en el espesor lamelar y también la existencia de interfaces no perfectamente delimitadas.



**Figura 5.5.** Distribución de densidad electrónica y función de correlación para un sistema perfectamente ordenado (a). Efectos en la función de correlación ocasionados por la variación de las distancias interlamelares (b), por la variación del espesor lamelar (c) y por las interfaces difusas (d).

La invariante ( $Q$ ) corresponde al denominador de la función de correlación:

$$Q = \int_0^{\infty} q^2 I(q) dq \quad (5.10)$$

De esta manera, es posible analizar la evolución de los parámetros morfológicos con el tiempo en los procesos de cristalización tanto isotérmicos como no isotérmicos.

### 5.1.2. Difracción de rayos X a ángulos altos (WAXD).

Mediante difracción de rayos X a ángulos altos, es posible realizar un cálculo de la fracción cristalina en peso,  $X_c$ , dividiendo la suma de las intensidades de las reflexiones cristalinas  $I_c$  entre la intensidad total  $I$  [160]. La deconvolución de los perfiles obtenidos se realizó con el programa PeakFit v4, ajustando tanto el halo amorfo como las reflexiones cristalinas a curvas Gaussianas-Lorentzianas. De esta manera, puede analizarse también la evolución de la cristalinidad con el tiempo.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos de SAXS y WAXD se pueden combinar para verificar la asignación de  $l_a$  y  $l_c$ . Así, el cociente entre  $X_c^{WAXD}$  y  $X_c^{SAXS}$  es una estimación de la fracción de volumen ocupado por las lamelas,  $X_S$ . Este cociente debe tener valor inferior a la unidad puesto que la cristalinidad está sobrevalorada en los experimentos de SAXS al existir fracciones amorfas entre las regiones cristalinas. Cuando los parámetros  $l_a$  y  $l_c$  se intercambian este cociente tiene un valor superior a la unidad, lo cual carece de sentido físico y es indicativo de una asignación errónea de dichos parámetros.

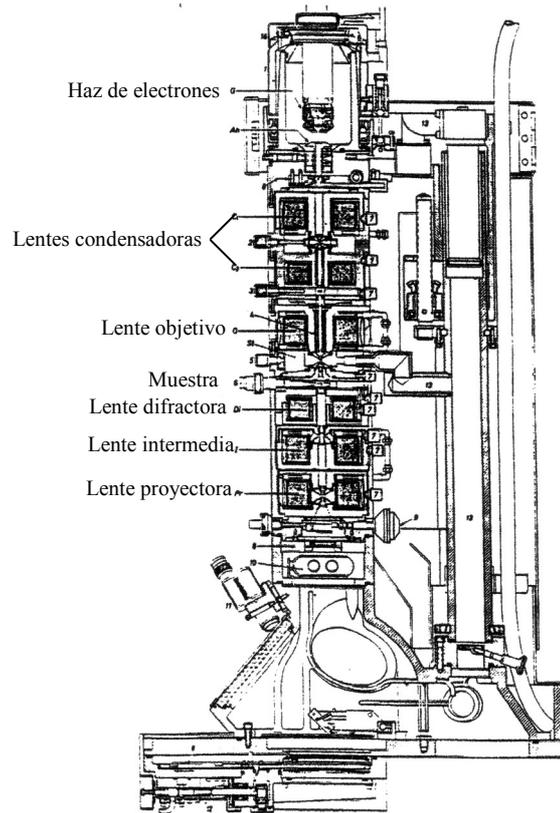
### 5.2. Microscopia electrónica de transmisión.

En la ciencia de los polímeros, generalmente el término morfología se refiere a la organización a un nivel superior al orden atomístico y el término estructura se refiere a los detalles de la disposición atomística y molecular.

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) permite tanto resolver estructuras a nivel atómico y molecular como efectuar un análisis a nivel morfológico. Su principal limitación es el efecto destructivo que ejercen los electrones sobre los polímeros y las muestras orgánicas en general. Aunque morfológicamente la muestra parece inalterada, se manifiesta un deterioro de la estructura cristalina mediante la extinción progresiva del diagrama de difracción. No sólo se destruyen las interacciones moleculares de tipo secundario, sino también los propios enlaces covalentes. Por ello es conveniente controlar rigurosamente la dosis de radiación y emplear sistemas de registro extraordinariamente sensibles para obtener buenos diagramas de difracción de electrones.

El carácter ondulatorio de los electrones es el responsable del fenómeno de difracción. Cuando un haz electrónico coherente incide sobre una muestra, los electrones pueden no desviarse de la trayectoria inicial o ser desviados elásticamente o inelásticamente dependiendo, respectivamente, de que la interacción sea con el núcleo o con algún orbital electrónico de alguno de los átomos que forman el material. Los electrones desviados de forma inelástica experimentan un cambio en su velocidad como consecuencia de la energía perdida en la colisión, mientras que los desviados elásticamente mantienen su velocidad y son los responsables de los fenómenos de difracción. Los electrones no desviados y los desviados elásticamente, son los únicos que contribuyen de forma constructiva a la formación de la imagen. Los electrones desviados inelásticamente son los responsables del ruido de fondo presente en toda imagen de microscopía electrónica. La proporción de electrones dispersados elásticamente se maximiza cuando su energía aumenta. Los experimentos de difracción se realizan a un voltaje de 100 kV para tener una mayor resolución y los de análisis morfológico a 80 kV para incrementar el contraste.

El microscopio electrónico de transmisión (figura 5.6) consta de un cañón electrónico (fuente de electrones), un sistema de iluminación formado por dos lentes condensadoras, un sistema de imagen con una lente objetivo, una difractora, una intermedia y una proyectora, y un portamuestras.



**Figura 5.6. Esquema del microscopio electrónico de transmisión.**

La fuente de electrones generalmente es un filamento de wolframio. En el cañón electrónico los electrones son acelerados por la elevada diferencia de potencial a la que son sometidos. Las lentes condensadoras determinan la intensidad y la talla del haz electrónico. Estas lentes enfocan el haz hacia la muestra disponiéndolo en una dirección casi perpendicular a la superficie de la misma. La muestra es atravesada por este haz coherente y la imagen es ampliada por la lente objetivo para obtener una imagen  $I_1$ . Esta es posteriormente aumentada por la lente intermedia para formar una imagen  $I_2$ , siendo ésta aumentada de nuevo y proyectada en la pantalla por las lentes proyectoras.

La imagen final puede ser registrada en material fotográfico o bien mediante una cámara digital. El diagrama de difracción de electrones correspondiente a la zona iluminada, se obtiene al insertar una apertura en el plano donde se forma la primera imagen y cambiar la configuración de las lentes.

La capacidad para formar una imagen es una ventaja importante de esta técnica frente a la de difracción de rayos X. La imagen se obtiene con una resolución ( $d$ ) que depende de la longitud de onda del haz de electrones ( $\lambda$ ) según la ecuación:

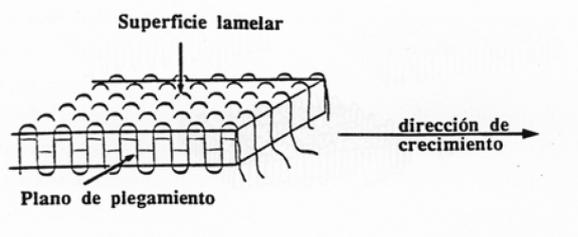
$$d = \frac{\lambda}{n \cdot \sin \theta} \quad (5.11)$$

siendo  $n$  el índice de refracción y  $\theta$  el ángulo de apertura de las lentes del microscopio.

La longitud de onda del haz de electrones depende del voltaje ( $V$ ) según la fórmula  $\lambda = (1.5/V)^{1/2}$ . Así, para voltajes de 80 kV y 100 kV las longitudes de onda de los electrones son 0.00418 nm y 0.00370 nm, respectivamente <sup>[161]</sup>. Se obtiene mayor resolución con longitudes de onda más cortas, es decir, con diferencias de potencial más elevadas y lentes de gran apertura. Generalmente, para una sustancia estable en un microscopio operando correctamente, la resolución práctica viene determinada por la aberración cromática causada por la presencia de electrones inelásticos. Dado que su proporción aumenta de forma exponencial con la cantidad de materia con la que éstos colisionan, el espesor de la muestra es decisivo para la obtención de buenas imágenes

### 5.2.1. Morfología cristalina.

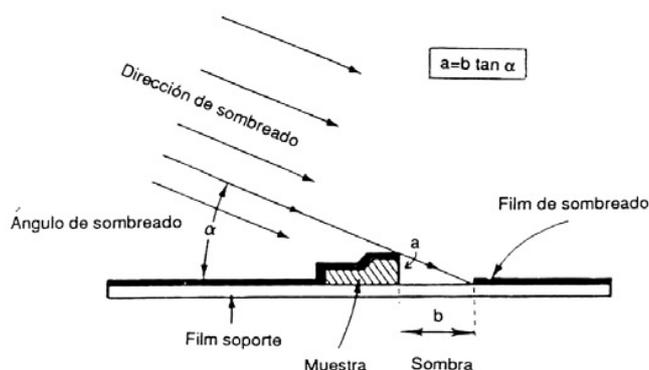
Los niveles de organización supramolecular de un polímero cristalino se identifican con dos tipos de morfologías: las lamelas y las esferulitas. Así pues, un fenómeno peculiar en la organización molecular de los polímeros cristalinos es el plegamiento molecular con la consiguiente formación de la estructura lamelar (figura 5.7). Las **lamelas** son monocristales de espesor muy pequeño (< 25 nm) y dimensiones basales que pueden llegar a ser de decenas de micrómetros. En estos cristales, la cadena molecular se dispone más o menos perpendicularmente a las bases y se pliega sobre sí misma con una cierta periodicidad que determina el grosor de los mismos.



**Figura 5.7. Modelo de la formación de lamelas cristalinas en polímeros con una única dirección de puentes de hidrógeno que determina la dirección de crecimiento preferente.**

Monocristales de tamaño adecuado para su estudio mediante microscopía electrónica se pueden obtener por cristalización a partir de disoluciones diluidas. Existen diversos métodos de cristalización, aunque en este trabajo se ha empleado únicamente la **cristalización isotérmica**. Ésta se realiza a partir de disoluciones muy diluidas alrededor de 1 mg de polímero en 1ml de disolvente. El polímero se solubiliza en un disolvente a temperatura elevada y se deja cristalizar isotérmicamente en un baño a temperatura inferior. Estos ensayos, se efectuaron a diversas temperaturas y concentraciones, empleando los siguientes disolventes: 1,4-butanodiol, 2-metil-2,4-pentanodiol, 1,6-hexanodiol y glicerina. El seguimiento del proceso de cristalización y la selección de las preparaciones más idóneas se efectúa mediante microscopía óptica. En el caso de haber empleado un disolvente no volátil, los cristales obtenidos se separan por centrifugación y se lavan con un no-solvente volátil dejándolos en suspensión.

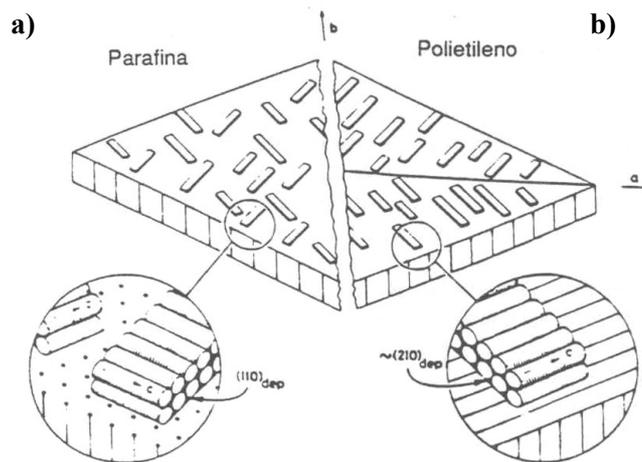
En general, los monocristales están constituidos por pequeñas lamelas de 50-100 Å de grosor, que dan lugar a imágenes de bajo contraste. Las imágenes de TEM corresponden a los electrones que atraviesan toda la muestra por lo que no dan información del relieve de su superficie. Estos inconvenientes se solucionan sombreando las muestras con una fina capa de un metal pesado (Cr, Pt, Pd, U, etc.). El metal es evaporado a alto vacío ( $10^{-4} - 10^{-5}$  torr) sobre las rejillas a un ángulo de 15 °. Conociendo el ángulo de sombreado y midiendo la longitud de las sombras resultantes se puede conocer el grosor aproximado de las lamelas cristalinas (figura 5.8).



**Figura 5.8.** Esquema del proceso de sombreado que se realiza para la observación de la superficie y la determinación del grosor lamelar.

La **decoración con polietileno** permite determinar la dirección de plegamiento local de las cadenas moleculares en las superficies de las lamelas y la sectorización asociada a una orientación privilegiada de plegamientos en diferentes zonas de crecimiento. Esta técnica fue desarrollada por Wittmann y Lotz en 1985 <sup>[162]</sup> y, fundamentalmente, consiste en depositar una sustancia de estructura cristalina conocida (polietileno) sobre monocristales de polímero. El polietileno cristaliza epitaxialmente si la superficie del cristal está ordenada. La observación detallada de los cristales poliméricos sugiere que debe existir un cierto plegamiento regular, por ejemplo se acepta que éste debe ser paralelo a la dirección de crecimiento del cristal <sup>[163]</sup> cuando se establecen puentes de hidrógeno.

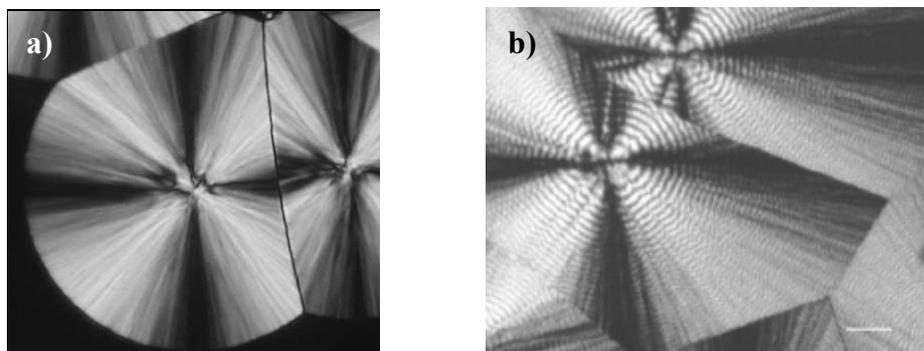
En la práctica se evaporan lentamente bajo vacío ( $10^{-4} - 10^{-5}$  torr) aproximadamente 2 mg de polietileno ( $M_w=20000$ ,  $M_w/M_n=1.1$ ) en un filamento de tungsteno. Durante este proceso se produce la escisión parcial de las cadenas moleculares de polietileno que cristalizan epitaxialmente en forma de pequeñas barritas alargadas sobre las lamelas del polímero a decorar (figura 5.9). Todas las muestras son sombreadas con Pt/C después de la decoración para su observación microscópica.



**Figura 5.9.** Representación esquemática de la decoración de cristales con polietileno. Disposición de las lamelas: parafina exenta de plegamiento, que da lugar a una disposición al azar del polietileno (a) y polietileno con planos de plegamiento (110,) que origina una decoración sectorizada (b)

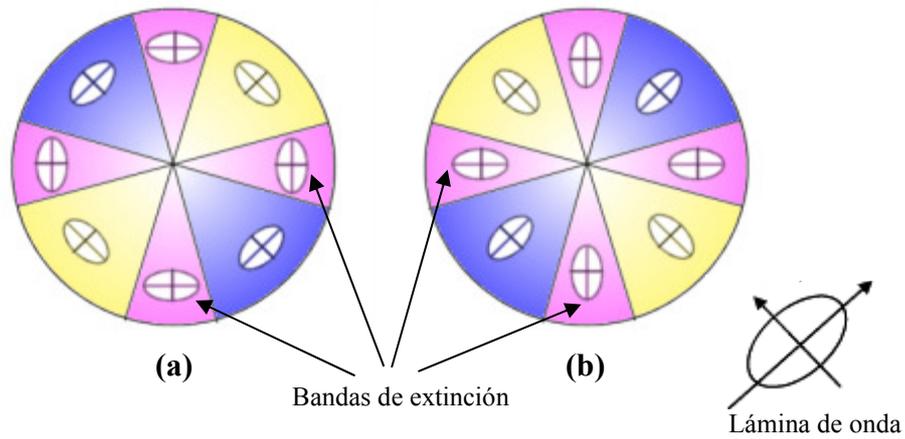
La morfología de los cristales es un buen indicador, aunque no infalible, de la simetría presente en la estructura cristalina. En general las celdillas tetragonales proporcionan cristales de base cuadrada, las hexagonales y trigonales proporcionan cristales de forma hexagonal y las rómbicas cristales en forma de rombo.

La **esferulita** consiste en un agregado esférico con un tamaño que puede oscilar entre décimas de micrómetros y varios milímetros por lo que puede observarse claramente en el microscopio óptico. Una morfología esferulítica se obtiene por cristalización del polímero a partir del estado fundido o por la cristalización del polímero a partir de disoluciones muy concentradas y evaporación lenta del disolvente. En el microscopio óptico de luz polarizada son fácilmente reconocibles como círculos fuertemente birrefringentes que exhiben una cruz de malta característica (figura 5.10a) debido al diferente índice de refracción de la luz polarizada cuando atraviesa un cristal con diferentes direcciones ópticas. Existen dos direcciones perpendiculares entre sí, denominadas eje óptico mayor y menor, en las cuales el índice de refracción adquiere valores máximo y mínimo respectivamente. El grado de birrefringencia depende de la estructura molecular y es la suma de dos contribuciones, la correspondiente a la polarizabilidad paralela a la cadena polimérica y la perpendicular a ella.



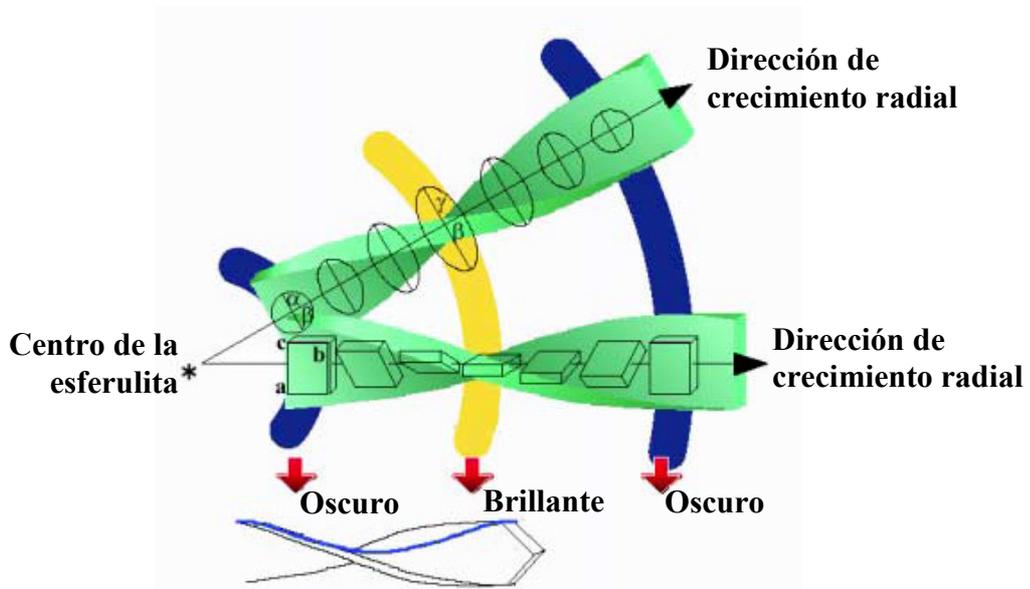
**Figura 5.10.** Esferulitas observadas en el microscopio de luz polarizada: a) caracterizada por la extinción en forma de cruz de malta y b) anillada.

La birrefringencia se observa intercalando la muestra entre el polarizador y el analizador del microscopio. Si además se inserta un “*first order red tint plate*” (lámina de onda roja de primer orden) entre la muestra y el analizador, puede determinarse el signo de la birrefringencia. Observando si el radio de la esferulita corresponde al eje óptico mayor o menor, se determina si se trata de esferulitas positivas o negativas, respectivamente. La lámina de onda se orienta entre el polarizador y el analizador de forma que únicamente la fracción roja del espectro de luz es rotada  $90^\circ$ , por tanto, el fondo observado a través del objetivo resulta de color rojo al ser ésta la única radiación que atraviesa el analizador. Si la esferulita es positiva los cuadrantes paralelos al eje óptico de la lámina de onda aparecen de color azul, mientras que los cuadrantes alternados resultan amarillos (figura 5.11). En el caso contrario la esferulita es negativa. La mayoría de los polímeros presenta una birrefringencia negativa al corresponder el eje óptico mayor con la dirección de las cadenas moleculares y, por tanto, perpendicular al radio de las esferulitas.



**Figura 5.11.** Determinación del signo de la esferulita empleando una lámina de onda: (a) esferulita negativa y (b) esferulita positiva.

Las esferulitas están constituidas internamente por lamelas que irradian del centro. En muchos casos las lamelas se retuercen sobre sí mismas, de forma que la orientación del eje molecular gira alrededor del radio esferulítico (figura 5.12). Este fenómeno se refleja en la esferulita como una serie de bandas de extinción concéntricas que muestran una periodicidad dependiente de las condiciones en que ha cristalizado (figura 5.10b).



**Figura 5.12.** Representación esquemática del retorcimiento lamelar y de las extinciones observadas en el microscopio.

### 5.2.2. Difracción de electrones.

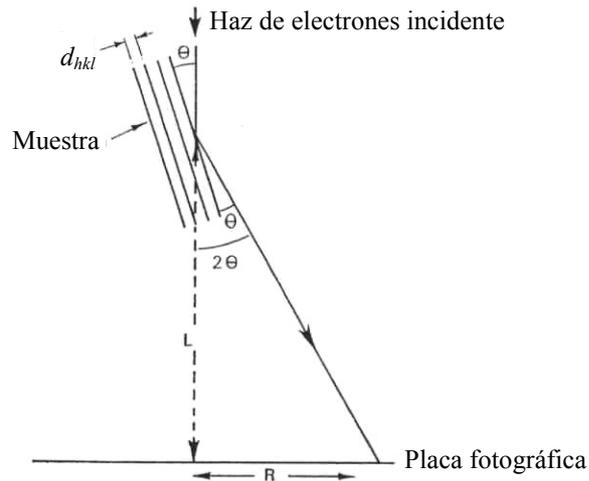
Los **diagramas de difracción de electrones** obtenidos a partir de monocristales consisten en retículos puntuales que representan la proyección de la red cristalina sobre el plano perpendicular al haz electrónico. Las manchas de difracción, se indexan como  $hk0$  suponiendo que la radiación electrónica es paralela al eje cristalográfico  $c$ , aunque en ocasiones pueden observarse reflexiones  $hkl$  con  $l$  distinto de  $0$  debido a una inclinación parcial de los cristales o bien a una disposición no ortogonal de la celdilla unitaria.

El diagrama de difracción de una muestra refleja su organización estructural a escala atómica y molecular. Para muestras amorfas consiste en un halo difuso que rodea a una mancha central correspondiente a la radiación no desviada, mientras que para las muestras cristalinas se observan diagramas con máximos y mínimos, cuya disposición en el espacio viene determinada por el tipo de estructura presente. La información extraída responde por una parte a la distribución espacial de las reflexiones, que viene determinada por el tipo de estructura presente, y por otra parte a las intensidades, que dependen de la organización de las moléculas en el interior de la celdilla cristalina.

Las posiciones de las reflexiones definen los espaciados de los planos cristalográficos, aplicando la ley de Bragg. Dado que los ángulos  $\theta$  con que son difractados los electrones son muy pequeños (del orden de  $1^\circ$ ) se puede admitir la igualdad entre  $\text{tag}(2\theta)$  y  $2 \cdot \text{sen } \theta$ , que permite simplificar la ley de Bragg:

$$\begin{array}{ccc} \text{tg}(2\theta_{hkl}) = \frac{R}{L} & \longrightarrow & R \cdot d_{hkl} = \lambda \cdot L \\ 2 \cdot d_{hkl} \cdot \text{sen } \theta_{hkl} = n \cdot \lambda & & \end{array}$$

donde  $R$  es el radio de la reflexión,  $d_{hkl}$  es el espaciado interplanar, característico de la reflexión,  $\lambda$  es la longitud de onda y  $L$  la longitud de cámara del microscopio (distancia entre la muestra y la placa de registro). El producto  $\lambda L$  se denomina constante de cámara (figura 5.13).



**Figura 5.13. Geometría de la cámara de difracción del microscopio electrónico.**

El análisis de la difracción de electrones requiere un calibrado previo del aparato para poder correlacionar las manchas de difracción obtenidas en el diagrama con las distancias reales de la red cristalina. Los valores de  $\lambda$  y  $L$  pueden variar de un registro a otro debido a inestabilidades del circuito eléctrico, pequeños desajustes del alto voltaje utilizado o de la corriente en las lentes objetivas y proyectoras. Por esta razón, se debe determinar de forma precisa la constante de cámara para cada conjunto de lentes utilizadas. El calibrado de la constante de cámara se realiza evaporando una fina capa de un material policristalino sobre las rejillas con la muestra problema. Sustancias cristalinas que presenten espaciados próximos a los del problema como (Au, Al, TiCl<sub>3</sub>, etc.) son adecuadas como patrones. En el campo de los polímeros se utiliza normalmente oro (reflexiones características a 0.408, 0.235, 0.204, 0.144, 0.123, 0.118 y 0.102 nm) como sustancia patrón para calibrar la constante de cámara. Su evaporación sobre las rejillas se realiza a partir de 1 cm de un filamento de 0.25 mm de diámetro cuidadosamente enrollado alrededor de otro filamento, en este caso de tungsteno.

### 5.3. Microscopía electrónica de barrido.

El microscopio electrónico de barrido (SEM) forma la imagen con los electrones secundarios que se generan en la interacción de la radiación electrónica con una capa

depositada en la superficie del material y de un reducido espesor, efectuándose un proceso de rastreo.

El microscopio electrónico de barrido y el microscopio electrónico de transmisión tienen ciertas características comunes tales como un cañón de electrones donde se genera el haz, lentes condensadoras y objetivo, y un sistema de vacío. La diferencia principal entre ellos es la manera en que forman y magnifican la imagen. Mientras el TEM permite el estudio de la morfología a partir de muestras delgadas, el SEM posibilita conocer la morfología de la superficie de muestras gruesas, por ejemplo, en nuestro caso de microesferas de polímero.

La preparación de las muestras consiste sencillamente en su metalización que, además de hacer conductiva la superficie, permite eliminar la electricidad estática, minimizar el daño por radiación y aumentar la reflectividad electrónica. Normalmente, el metal utilizado suele ser oro en presencia de una atmósfera ionizante de argón. En la presente tesis, se ha estudiado la morfología de microesferas de polímero y de placas de polímero sometidas a diferentes condiciones de degradación tal y como se ha detallado en la sección 4.9.

#### **5.4. Estudio de oligómeros modelo.**

##### **5.4.1. Obtención de monocristales.**

El crecimiento de un cristal en disolución debe ser lento para que las moléculas o iones formen una disposición regular interna altamente ordenada que conducen a la obtención de un monocristal con dimensiones adecuadas para su análisis por difracción de rayos X. El estado de saturación de una disolución del compuesto promueve la formación de algunos núcleos cristalinos que posteriormente llegarán a formar cristales de tamaños mayores. Cuando se inicia la cristalización, el sistema evoluciona hacia un equilibrio entre las partículas de la fase sólida y la fase líquida, lo suficientemente lento como para que las moléculas puedan ordenarse en una red cristalina. El proceso depende de factores tales como la solubilidad, la temperatura, la fuerza iónica, la nucleación y el crecimiento del cristal. El posterior crecimiento depende de la naturaleza de las fuerzas

en la superficie del cristal, de la concentración de la muestra y del medio de cristalización.

La cristalización de una sustancia conlleva la determinación de las condiciones óptimas. Entre las diferentes técnicas utilizadas para la obtención de monocristales se destacan las dos empleadas en este trabajo:

a) La **evaporación lenta del disolvente** es un método para la obtención de cristales de alta calidad que puede aplicarse para moléculas orgánicas de reducidas dimensiones. La velocidad de crecimiento se regula por el ajuste de condiciones (concentración inicial, temperatura, velocidad de evaporación) tal que los cristales se obtienen en pocos días. La velocidad de evaporación se ajusta cubriendo la solución con un vidrio de reloj. La solución se deja en reposo evitando cualquier tipo de perturbación posible.

Experimentalmente, se disuelve el compuesto y el producto cristaliza al dejar evaporar lentamente el disolvente.

b) El **enfriamiento lento de una disolución saturada**. La cristalización tiene lugar cuando se produce una disminución en la solubilidad de la sustancia al disminuir la temperatura. El tamaño de los cristales resultantes depende de la velocidad de enfriamiento de la disolución. Así, un enfriamiento rápido producirá cristales pequeños, mientras que un enfriamiento lento producirá cristales grandes.

Experimentalmente, se disuelve en caliente la muestra, se aísla el recipiente y se deja enfriar lentamente.

Los cristales obtenidos deben ser analizados previamente en una lupa binocular de luz polarizada. Los criterios para su selección son los siguientes:

- que posean una estructura interna uniforme y, por lo tanto, que no correspondan a maclas cristalinas o diversos dominios cristalinos. Los cristales tampoco pueden estar fracturados ni tensionados. En la realidad, sin embargo, los cristales son imperfectos ya que están compuestos de pequeñas regiones algo desorientadas que dan lugar al término denominado mosaicidad.

- que tengan un tamaño y una forma apropiados, siendo la dimensión lateral óptima del orden de 0,2-0,4 mm. En todo caso el grosor óptimo debe situarse alrededor de  $2/\mu$ , donde  $\mu$  es el coeficiente de absorción lineal.

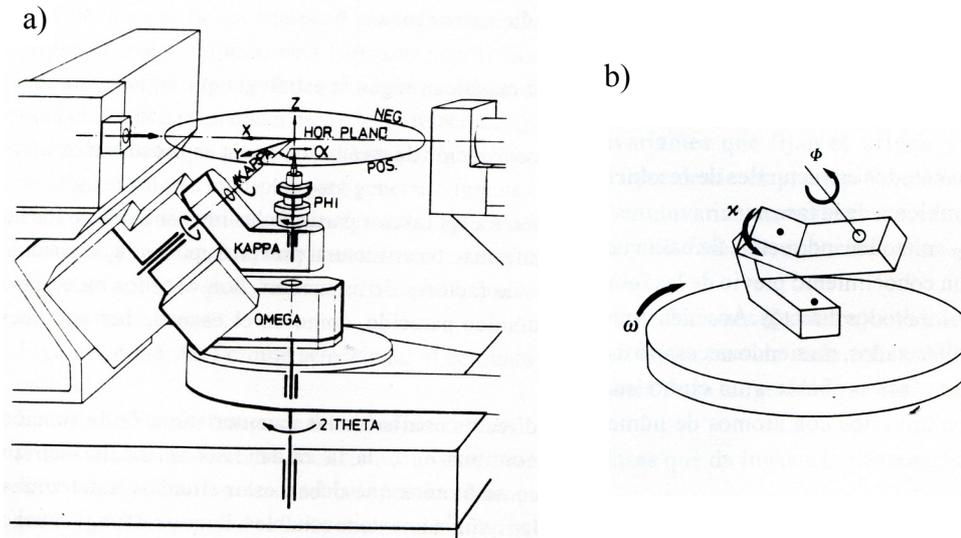
Una vez obtenido el monocristal y después de haber comprobado su calidad, se fija en el extremo de un capilar por medio de un adhesivo amorfo para no interferir en la difracción. El soporte consiste de una base de metal (pieza de latón) a la cual se pega con cera al capilar (vidrio) (figura 5.14). El cristal, una vez montado, se coloca en la cabeza goniométrica del difractómetro.



**Figura 5.14.** El cristal se fija a la punta de un capilar.

#### 5.4.2. Recogida de datos.

Los difractómetros utilizan una geometría ecuatorial en la que el haz difractado se mide siempre en un plano horizontal definido por el haz incidente y la rotación del detector alrededor de un eje que atraviesa el cristal. El detector sólo se mueve en este plano y forma un ángulo de  $2\theta$  (entre 0-160°, dentro del rango del instrumento) con el haz incidente. El goniostato más utilizado es el de geometría euleriana que da lugar al difractómetro de cuatro círculos con tres rotaciones para el cristal ( $\omega$ ,  $\chi$  y  $\phi$ ) y una para el detector ( $2\theta$ ) (figura 5.15). Dependiendo de si  $\chi$  es perpendicular o no a  $\omega$ , el goniómetro se denomina de geometría Euler o Kappa, respectivamente.



**Figura 5.15.** Esquema del difractómetro CAD4 (a) y esquema de las rotaciones que mueven el cristal (b)

El goniómetro gira y orienta el cristal de forma que cada familia de planos cumpla la condición de difracción de Bragg. La cabeza goniométrica, que produce la rotación  $\varphi$  (tipo *spin*) en el cristal, descansa sobre el bloque  $\kappa$  soportado por el bloque  $\omega$  que a su vez es colineal con  $2\theta$ . El centro del sistema (donde se coloca el cristal) y el detector están en un plano perpendicular al eje  $\omega/2\theta$ . Para evitar la pérdida de intensidad por la absorción del aire hay un túnel de helio en el camino del haz difractado.

La recogida de un espectro consta de las siguientes etapas:

- 1) Selección, montaje y centrado del cristal.
- 2) Determinación de la celda unidad. A partir de la rotación del ángulo  $\varphi$  y registrando las difracciones sobre un film Polaroid® o buscándolas aleatoriamente en un rango de  $\theta$ , se encuentran 25 reflexiones a partir de las cuales se selecciona automáticamente una celda compatible con el espacio recíproco estudiado. Se definen dos matrices: la matriz de orientación, que relaciona las dimensiones de la celda y su orientación respecto al sistema de coordenadas del difractómetro, y la matriz métrica recíproca que informa de las dimensiones y simetría de la celda recíproca.

3) Estudio de la calidad del cristal a partir del diagrama  $\omega/\theta$ . Se determinan los parámetros de recogida del espectro de difracción que dependen del tamaño, dimensiones de la celda y calidad del cristal.

4) Recogida del espectro. La medida de las intensidades difractadas se realiza hasta un valor máximo de  $2\theta$ , habiendo determinado previamente la zona del espacio recíproco a investigar a partir de la celda hallada. Durante el proceso de recogida se mide periódicamente la intensidad de tres reflexiones para controlar que el cristal no se ha descentrado ni ha sido dañado por la radiación.

5) Reducción de datos. Con las intensidades obtenidas se procede al cálculo de los factores de estructura observados,  $|F(hkl)|_0$ . Se aplican las correcciones de Lorentz y polarización y, si fuera necesario, las de absorción o decaimiento.

#### 5.4.3. Resolución y refinamiento de la estructura. <sup>[164]</sup>

Los métodos estructurales de resolución se pueden dividir en dos tipos según la estrategia que siguen para resolver el problema de la fase, así tenemos los **métodos directos e indirectos**. Los métodos indirectos se basan en la localización de un átomo pesado en la estructura sin tener un conocimiento previo de las fases. Por otro lado, los métodos directos acceden directamente a las fases a partir de las intensidades de los haces difractados, no siendo necesario tener información estructural previa. Éstos métodos suponen la asignación de una fase probable a un cierto número de factores de estructura y son óptimos en el caso de compuestos con átomos de número atómico parecido, como es el caso de los compuestos orgánicos.

La base del desarrollo de los métodos directos estriba en las características de la función de densidad electrónica: real, positiva y continua en toda la celda. Esta se localiza en zonas aproximadamente esféricas conocidas como átomos que deben estar situados a determinadas distancias y ángulos para formar moléculas químicamente razonables, lo que restringe mucho las posibilidades. El problema estructural se plantea desde un punto de vista más práctico admitiendo el principio de aditividad de la densidad

electrónica. El objetivo no es una descripción exhaustiva de la densidad electrónica,  $\rho(x, y, z)$ , sino la localización de sus máximos.

Como hay muchos más datos que parámetros, no todos los factores de estructura son independientes por lo que deben existir relaciones de algún tipo en las que estén implicadas sus amplitudes y fases. En primer lugar, la resolución por métodos directos implica la formulación de relaciones de fases en las que participen varios factores de estructura. Éstas deben ser independientes a la elección del origen. Las relaciones expresan la probabilidad de que una fase tenga un determinado valor, calculado a partir de los valores de la amplitud escogidos. Posteriormente, hay que fijar el origen de la celda para eliminar la indeterminación de las fases a él ligadas, y así pasar de relaciones de fases a conjuntos probables de fases. La elección del origen no es totalmente arbitraria, intentándose que coincida con uno o más elementos de simetría presentes en la celda.

Existen diferentes estrategias para abordar el problema de la asignación de las fases a los factores de estructura. Los métodos de multisolución son los más utilizados en la aplicación de los métodos directos, pues en ellos se basa el programa SHELXS-97 <sup>[1]</sup> con el que se ha trabajado. El programa trata de obtener una solución estructural múltiple, mediante varios conjuntos de fases, uno de los cuales debe corresponder a la solución correcta.

Una vez resuelto el problema de fases, se dispone de un conjunto de parámetros que especifican la situación de cada átomo dentro de la celda unidad. Como las fases obtenidas en la resolución son aproximadas, dado que ésta se efectúa con un número selecto de reflexiones, es necesario realizar un proceso de refinamiento de los valores obtenidos. Los métodos de refinamiento son dos: series de Fourier sucesivas y mínimos cuadrados. En el primero, se realiza una síntesis de Fourier con los  $|F(hkl)|_0$  a los que se les asigna la fase que se deduce de los  $F(hkl)_c$ , calculados a partir de las coordenadas de que se dispone. En el segundo caso, se minimiza por mínimos cuadrados la diferencia entre el factor de estructura observado y el calculado a partir de las coordenadas y los coeficientes de agitación térmica que se disponen de la estructura. La función es del tipo  $R_w = \sum w_{hkl} [F(hkl)_0 - F(hkl)_c]^2$  en la que el coeficiente  $w_{hkl}$  expresa el peso que se

atribuye a  $F(hkl)_0$  y corresponde al inverso del cuadrado de la desviación estándar de su correspondiente medida ( $w_{hkl} = 1/\sigma_{hkl}^2$ ). De esta forma se da más importancia a las reflexiones de menor desviación estándar.

Con el método de mínimos cuadrados, el programa SHELXL-97 ajusta los parámetros (coordenadas, factores de escala, factores de ocupación, factores de temperatura) para obtener una mejor concordancia entre los  $F(hkl)$  observados y los calculados que se cuantifica mediante el índice de acuerdo,  $R$ . Este método permite calcular las desviaciones estándar de los parámetros atómicos, que se emplean para determinar las incertidumbres en las longitudes y ángulos de enlace. Todo proceso de afinamiento se acompaña con una síntesis de diferencias, cuya finalidad es determinar la posición de los átomos que no se afinan y de aquellos que no se han localizado (átomos de bajo número atómico, como el hidrógeno).

## 6. ESTUDIO CINÉTICO DE POLIMERIZACIÓN Y CRISTALIZACIÓN.

### 6.1. Cinética de polimerización.

El estudio de la cinética de polimerización se puede realizar mediante calorimetría diferencial de barrido utilizando dos metodologías de trabajo. Pueden emplearse métodos dinámicos o bien isotérmicos. En el análisis dinámico se realizan barridos a distintas velocidades de calentamiento o enfriamiento, mientras que en el análisis isotérmico se realizan barridos a temperatura constante, estudiándose los cambios que tienen lugar en función del tiempo de reacción. Para los experimentos isotérmicos, el grado de conversión se calcula como:

$$\alpha = \frac{\int_0^t (dH / dt) dt}{\int_0^{\infty} (dH / dt) dt} = \frac{\Delta H_t}{\Delta H_{tot}} \quad (6.1)$$

donde  $\Delta H_t$  es el calor liberado a tiempo  $t$ , obtenido a partir de la integral parcial de la señal calorimétrica, y  $\Delta H_{tot}$  es el calor total de reacción.

De la misma manera, para procesos dinámicos, el grado de conversión se calcula como:

$$\alpha = \frac{\int_{T_0}^{T_i} (dH / dT) dT}{\int_{T_0}^{T_{\infty}} (dH / dT) dT} = \frac{\Delta H_T}{\Delta H_{tot}} \quad (6.2)$$

donde  $\Delta H_T$  es el calor liberado a temperatura  $T$ , obtenido a partir de la integral parcial de la señal calorimétrica, y  $\Delta H_{tot}$  es el valor medio del calor total de reacción calculado a partir del calor de polimerización obtenido dinámicamente a diferentes velocidades.

La cinética de polimerización se ha estudiado mediante un análisis isoconversional que permite determinar la *energía de activación* en función del grado de conversión. Este método isoconversional se basa en la suposición de que a una conversión constante la velocidad de reacción sólo es función de la temperatura <sup>[165-167]</sup>.

Asumiendo que la variación de la constante de velocidad con la temperatura sigue la ecuación de Arrhenius, la cinética de reacción se describe mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{d\alpha}{dt} = k(T)f(\alpha) = A \exp\left(-\frac{E}{RT}\right) f(\alpha) \quad (6.3)$$

donde  $t$  es el tiempo,  $T$  es la temperatura absoluta,  $d\alpha/dt$  es la velocidad de reacción que depende de la temperatura y  $f(\alpha)$  es la función diferencial de conversión. Los parámetros de energía de activación y factor frecuencia de la ecuación de Arrhenius son  $E$  y  $A$ , respectivamente.

### 6.1.1. Cinética de polimerización isotérmica.

Integrando la ecuación 6.3 en condiciones isotérmicas se obtiene la siguiente expresión:

$$\ln t = \ln \left[ \frac{g(\alpha)}{A} \right] + \frac{E}{RT} \quad (6.4)$$

donde la forma integrada del modelo de reacción,  $g(\alpha)$ , es la siguiente función del grado de conversión:

$$g(\alpha) = \int_0^\alpha \frac{d\alpha}{f(\alpha)} \quad (6.5)$$

El modelo de reacción viene dado por diferentes ecuaciones <sup>[168, 169]</sup>, tal y como se recoge en la tabla 6.1, según sea el mecanismo de reacción. Para cada grado de conversión, la ecuación 6.4 muestra una relación lineal entre el logaritmo del tiempo necesario para alcanzar dicha conversión y la inversa de la temperatura. Así, representando el  $\ln t$  frente a  $1/T$  para cada grado de conversión, se obtienen las líneas isoconversionales a partir de las cuáles se determina la energía de activación,  $E$ , y la constante  $\ln[g(\alpha)/A]$  a partir de la pendiente y de la ordenada en el origen, respectivamente.

**Tabla 6.1. Expresiones algebraicas de  $f(\alpha)$  y  $g(\alpha)$  de los modelos cinéticos considerados.**

Símbolo	Modelo de reacción	$f(\alpha)$	$g(\alpha)$
$A_{3/2}$	Nucleación y crecimiento. Ecuación de Avrami (n=1.5)	$2(1-\alpha)[- \ln(1-\alpha)]^{1/3}$	$[- \ln(1-\alpha)]^{2/3}$
$A_2$	Nucleación y crecimiento. Ecuación de Avrami (n=2)	$2(1-\alpha)[- \ln(1-\alpha)]^{1/2}$	$[- \ln(1-\alpha)]^{1/2}$
$A_3$	Nucleación y crecimiento. Ecuación de Avrami (n=3)	$3(1-\alpha)[- \ln(1-\alpha)]^{2/3}$	$[- \ln(1-\alpha)]^{1/3}$
$A_4$	Nucleación y crecimiento. Ecuación de Avrami (n=4)	$4(1-\alpha)[- \ln(1-\alpha)]^{3/4}$	$[- \ln(1-\alpha)]^{1/4}$
$D_1$	Difusión unidimensional	$1/2(1-\alpha)^{-1}$	$\alpha^2$
$D_2$	Difusión bidimensional (ecuación de Valensi)	$-\ln(1-\alpha)$	$(1-\alpha)\ln(1-\alpha) + \alpha$
$D_3$	Difusión tridimensional (ecuación de Jander)	$3/2(1-\alpha)^{2/3}[1 - (1-\alpha)]^{-1/3}$	$[1 - (1-\alpha)^{1/3}]^2$
$D_4$	Difusión tridimensional (ecuación de Ginstling-Brounshtein)	$3/2(1-\alpha)^{1/3}[1 - (1-\alpha)]^{-1/3}$	$(1 - 2/3\alpha)(1 - \alpha)^{2/3}$
$F_1$	Nucleación con un único núcleo en cada partícula	$(1-\alpha)$	$-\ln(1-\alpha)$
n+m=2; n=1.9		$(\alpha)^{0.1}(1-\alpha)^{1.9}$	$[(1-\alpha)\alpha^{-1}]^{0.9}(0.9)^{-1}$
n+m=2; n=1.5		$(\alpha)^{0.5}(1-\alpha)^{1.5}$	$[(1-\alpha)\alpha^{-1}]^{0.5}(0.5)^{-1}$
n=2	Segundo orden	$(1-\alpha)^2$	$-1 + (1-\alpha)^{-1}$
n=3		$(1-\alpha)^3$	$2^{-1}[-1 + (1-\alpha)^{-2}]$
Power	Power law	$2(\alpha)^{1/2}$	$(\alpha)^{1/2}$
$R_2$	Contracción del área (simetría cilíndrica)	$2(1-\alpha)^{1/2}$	$1 - (1-\alpha)^{1/2}$
$R_3$	Contracción del volumen (simetría esférica)	$3(1-\alpha)^{2/3}$	$1 - (1-\alpha)^{1/3}$

### 6.1.2. Cinética de polimerización no isotérmica.

Integrando la ecuación de velocidad (ecuación 6.3) en condiciones no isotérmicas se obtiene la siguiente expresión:

$$g(\alpha) = \int_0^\infty \frac{d\alpha}{f(\alpha)} = \frac{A}{\beta} \int_0^T \exp\left(-\frac{E}{RT}\right) dT \quad (6.6)$$

donde  $\beta = dT/dt$  es la velocidad de calentamiento.

Existen numerosas relaciones que permiten determinar los parámetros de Arrhenius para los experimentos dinámicos. Cada uno de ellos se basa en una forma aproximada de la integral en función de la temperatura y de la reordenación e integración de la ecuación 6.6. Una de estas aproximaciones es la ecuación de Coats-Redfern <sup>[170]</sup>:

$$\ln \frac{g(\alpha)}{T^2} = \ln \left[ \frac{AR}{\beta E} \right] \left( 1 - \frac{2R\bar{T}}{E} \right) - \frac{E}{RT} \quad (6.7)$$

donde  $\bar{T}$  es la temperatura experimental media.

Teniendo en cuenta la aproximación de Coats-Redfern, es decir,  $2R\bar{T}/E \ll 1$ , la ecuación 6.7 se puede escribir de la siguiente manera:

$$\ln \frac{g(\alpha)}{T^2} = \ln \left[ \frac{AR}{\beta E} \right] - \frac{E}{RT} \quad (6.8)$$

Para un modelo cinético dado, la representación lineal de  $\ln[g(\alpha)/T^2]$  frente a  $1/T$  permite determinar los parámetros  $E$  y  $A$  a partir de la pendiente y de la ordenada en el origen, respectivamente.

Además, la ecuación 6.8 se puede reordenar obteniéndose:

$$\ln \frac{\beta}{T^2} = \ln \left[ \frac{AR}{g(\alpha)E} \right] - \frac{E}{RT} \quad (6.9)$$

De esta manera, la representación lineal de  $\ln(\beta/T^2)$  frente a  $1/T$  permite determinar  $E$  y el parámetro cinético  $\ln[AR/g(\alpha)E]$  para cada grado de conversión.

La constante  $\ln[AR/g(\alpha)E]$  está directamente relacionada con  $R/E$  y con el valor de  $\ln[A/g(\alpha)]$ , que se deduce del ajuste isotérmico, (ecuación 6.4). Los métodos isoconversionales permiten obtener la energía de activación en función del grado de conversión. Esta dependencia se determina sin suponer el modelo de reacción ( $g(\alpha)$ ), por lo que los resultados cinéticos obtenidos de los ajustes isotérmicos y no isotérmicos han de concordar entre sí.

La ecuación 6.3 se puede reordenar, obteniéndose la relación isocinética que refleja la existencia de un efecto compensatorio entre la energía de activación y el factor frecuencia cuando el grado de conversión cambia:

$$\ln A_\alpha = aE_\alpha + b = E_\alpha / RT_{iso} + \ln[(d\alpha/dt)_\alpha / f(\alpha)] \quad (6.10)$$

donde  $a$  y  $b$  son constantes y el sufijo  $\alpha$  se refiere al grado de conversión.

La existencia de una relación isocinética implica que sólo existe un mecanismo de reacción, mientras que hay múltiples mecanismos cuando no existe una relación lineal entre  $\ln A_\alpha$  y  $E_\alpha$ . La pendiente ( $a = 1/RT_{iso}$ ) y la ordenada en el origen ( $b = \ln k_{iso}$ ) de la relación lineal están relacionados con la temperatura isocinética ( $T_{iso}$ ) y con la constante isocinética ( $k_{iso}$ ), respectivamente. Se ha demostrado <sup>[171]</sup> que el modelo cinético describe el proceso de reacción cuando el valor determinado para  $T_{iso}$  está dentro del rango de temperaturas experimentales.

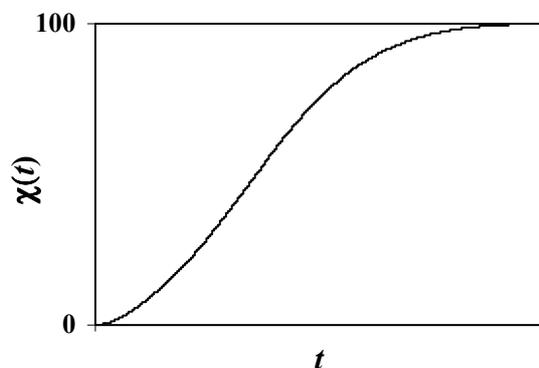
## 6.2. Cinética de cristalización.

La cristalización de un polímero puede llevarse a cabo, bien desde el estado fundido o bien desde el estado amorfo que corresponden a la cristalización en caliente y en frío, respectivamente. Este proceso da lugar de manera ideal a una estructura bifásica con una disposición periódica de cristales e interfases amorfas. Además, puede hacerse de forma isotérmica, es decir, con una temperatura de cristalización constante o bien de forma no isotérmica. En este último caso, la temperatura del pico de cristalización varía con una velocidad de calentamiento o de enfriamiento constante. El tratamiento de los datos experimentales en cada uno de estos casos es distinto.

En condiciones isotérmicas, a partir de los resultados experimentales, puede determinarse la evolución de la cristalinidad de una muestra con el tiempo. El avance de la cristalinidad viene representado por  $\chi(t)$ . La cristalinidad total que se alcanza en unas condiciones determinadas corresponde al valor de  $\chi(t) = 1$  y es proporcional a la energía implicada en el proceso, es decir, a la integral de todo el pico de cristalización,  $\Delta H_{\infty}$ . Para un tiempo  $t$ , se tendrá una fracción de dicha cristalinidad total,  $\chi(t)$ , que se corresponde con la integral parcial del pico en ese tiempo concreto,  $\Delta H_t$ , y se calcula como:

$$\chi(t) = \frac{\int_0^t (dH / dt) dt}{\int_0^{\infty} (dH / dt) dt} = \frac{\Delta H_t}{\Delta H_{\infty}} \quad (6.12)$$

En general, la representación gráfica de  $\chi(t)$  en función del tiempo tiene forma sigmoïdal, tal como se muestra en la Figura 6.1.



**Figura 6.1.** Curva típica del avance de la cristalinidad en función del tiempo.

De manera similar, para los procesos dinámicos el avance de la cristalinidad a cada temperatura se determina a partir de la siguiente expresión:

$$\chi(T) = \frac{\int_{T_0}^{T_i} (dH / dT) dT}{\int_{T_0}^{T_\infty} (dH / dT) dT} = \frac{\Delta H_T}{\Delta H_\infty} \quad (6.13)$$

Se puede tener una relación entre el grado de cristalinidad y el tiempo teniendo en cuenta que el tiempo y la temperatura están relacionados mediante la velocidad:

$$(t - t_0) = (T_0 - T) / \phi = (T - T_0) / \beta \quad (6.14)$$

donde  $T_0$  es la temperatura a la que empieza la cristalización ( $t = t_0$ ) y  $\phi$  y  $\beta$  son los valores de las velocidades de enfriamiento y calentamiento, respectivamente.

### 1.1. 6.2.1. Cristalización isotérmica y regímenes de cristalización.

La cristalización desde el estado fundido por subenfriamiento, se describe convenientemente mediante el modelo clásico de nucleación y posterior crecimiento esferulítico. Es decir, la aparición inicial de núcleos cristalinos, de manera homogénea o heterogénea, y después el crecimiento de las lamelas cristalinas. La nucleación heterogénea es debida a las impurezas existentes en el polímero, ya sean residuos existentes en el polímero que no han fundido por completo o agentes nucleantes. La nucleación homogénea, también llamada “nucleación esporádica”, ocurre por medio de fluctuaciones térmicas en el fundido que originan la formación y desaparición continua de cristalitos. La nucleación homogénea tiene lugar de forma rápida a un alto grado de subenfriamiento. Según las teorías de cristalización <sup>[172,173]</sup>, grupos de segmentos moleculares pueden llegar a comportarse como núcleos primarios. El estudio de cristalización isotérmica se ha llevado a cabo mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y microscopía óptica (OM).

Para el primer caso el análisis de la cinética de cristalización isotérmica se ha realizado utilizando el modelo Avrami, el cual nos da información acerca de la variación del contenido cristalino con el tiempo a una temperatura de cristalización constante [174-176].

$$1 - \chi(t) = \exp[-Z(t - t_0)^n] \quad (6.15)$$

donde  $\chi(t)$  es el grado de cristalinidad y  $n$  es el exponente de Avrami, que refleja el modo de nucleación y el crecimiento. La ecuación de Avrami permite en primer lugar, calcular la constante de velocidad normalizada,  $k = Z^{1/n}$ , a partir del valor de la constante  $Z$  y el exponente de Avrami  $n$  y, en segundo lugar, determinar el tipo de nucleación existente y la geometría de crecimiento según el valor que adopte el exponente, tal como se recoge en la Tabla 6.2.

**Tabla 6.2. Valores del exponente de Avrami según el tipo de nucleación y geometría de crecimiento.**

<b>n</b>	<b>Tipo de nucleación</b>	<b>Geometría</b>
1	Heterogénea	Varillas (1D)
2	Homogénea	Varillas (1D)
2	Heterogénea	Discos (2D)
3	Homogénea	Discos (2D)
3	Heterogénea	Esferulitas (3D)
4	Homogénea	Esferulitas (3D)

El estudio calorimétrico puede realizarse tanto para la cristalización en caliente (a partir de una muestra fundida), como en frío (a partir de una muestra en estado vítreo).

Los resultados obtenidos mediante microscopía óptica con control de temperatura permiten determinar la velocidad de crecimiento radial de la esferulita,  $G$ , a cada temperatura de cristalización. A partir de estos datos, aplicando la ecuación de

Lauritzen-Hoffman <sup>[172]</sup> (Ecuación 6.16) se pueden determinar los regímenes cinéticos de la cristalización, es decir, que tipo de proceso de cristalización se produce, así como sus constantes de nucleación  $K_g$  asociadas a cada régimen.

$$G = dR/dt = G_0 \exp \left[ \underbrace{-U^*/R(T_c - T_\infty)}_{\text{Factor de transporte}} \right] \exp \left[ \underbrace{-K_g/T_c (\Delta T) f}_{\text{Factor de nucleación}} \right] \quad (6.16)$$

donde  $G_0$  es el factor preexponencial que incluye a aquellos factores independientes de la temperatura,  $R$  es la constante de los gases,  $K_g$  es el parámetro de nucleación,  $T_c$  es la temperatura de cristalización,  $U^*$  representa la energía de activación del transporte,  $T_\infty$  es una temperatura hipotética por debajo de la cual cesaría cualquier flujo viscoso ( $T_\infty = T_g - C_1$ , donde  $C_1$  es una constante que generalmente toma valores de 30 K <sup>[177]</sup> y 51,6 K <sup>[178]</sup> y  $T_g$  es la temperatura de transición vítrea),  $\Delta T$  es el grado de subenfriamiento medido como  $T_m^0 - T_c$  (donde  $T_m^0$  es la temperatura de fusión en el equilibrio) y  $f$  es un factor de corrección empírico que tiene en cuenta la variación de la entalpía de fusión con la temperatura ( $f = 2T_c / (T_c + T_m^0)$ ).

$K_g$  se define mediante la siguiente expresión:

$$K_g = \frac{nb_0 \sigma \sigma_e T_m}{\Delta H^0 k} \quad (6.17)$$

donde  $\sigma$  y  $\sigma_e$  son las energías libres interfaciales lateral y basal respectivamente,  $n$  es un parámetro cuyo valor depende del régimen de cristalización (4 para los regímenes I y III y 2 para el régimen II),  $\Delta H^0$  es el calor de fusión,  $b_0$  es el espesor de la capa en crecimiento y  $k$  es la constante de Boltzman.

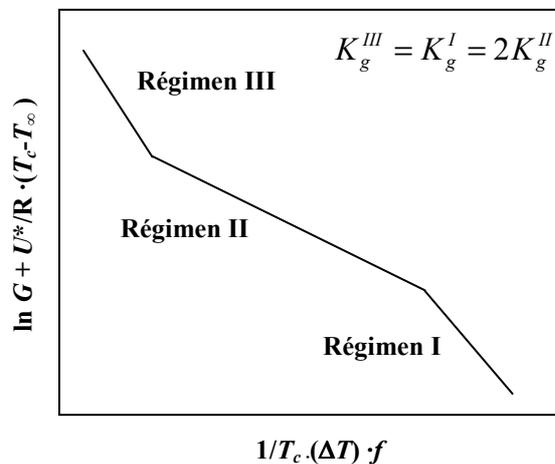
La existencia de un máximo en la velocidad de cristalización se puede discutir en términos de la ecuación 6.16, al existir un término referido a la energía de nucleación y un término de transporte. A muy bajas temperaturas de cristalización, si bien la energía necesaria para la nucleación es grande, el término de transporte es el predominante y la velocidad de cristalización es pequeña. A medida que la temperatura aumenta, el

término de transporte va haciéndose menos importante, por lo que la velocidad de cristalización aumenta hasta un valor máximo, pasado el cual, si sigue aumentando la temperatura de cristalización el sistema va alcanzando las condiciones de equilibrio termodinámico, por lo que se hace preponderante el término de energía de nucleación, disminuyendo de nuevo la velocidad del proceso.

Reordenando la ecuación 6.16 y aplicando logaritmos se obtiene la siguiente expresión:

$$\ln G + \left[ \frac{U^*}{R} \cdot (T_c - T_\infty) \right] = \ln G_0 - \left[ \frac{K_g}{T_c} \cdot (\Delta T) \cdot f \right] \quad (6.18)$$

Al representar  $\ln G + U^*/R \cdot (T_c - T_\infty)$  frente  $1/T_c \cdot (\Delta T) \cdot f$  se puede observar que en general no se obtiene una representación lineal con una única pendiente ( $K_g$ ) sino que pueden distinguirse zonas asociadas a regímenes de cristalización definidos por distintas constantes de nucleación (figura 6.2). Las constantes de nucleación asociadas a los regímenes I y III son el doble de la constante asociada al régimen II como se ha mencionado anteriormente.



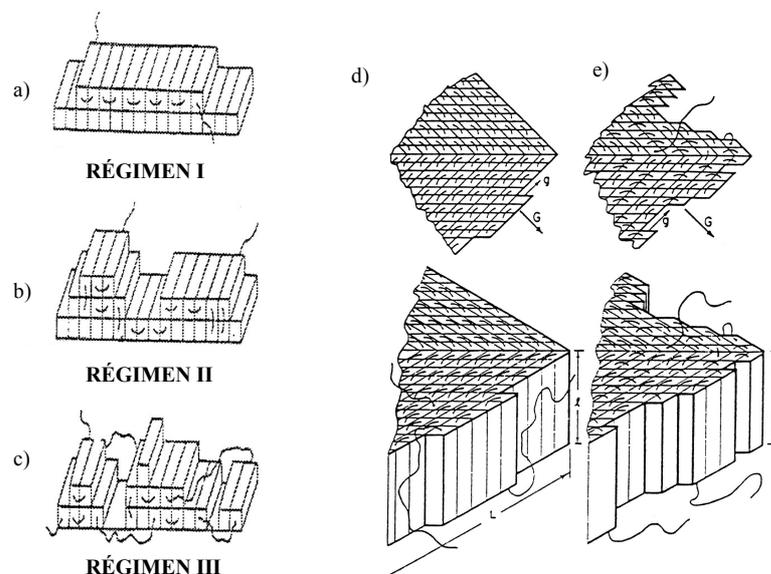
**Figura 6.2. Regímenes de cristalización y relación entre las constantes asociadas.**

La teoría de Lauritzen-Hoffman indica que la cristalización puede tener lugar bajo tres diferentes regímenes (Figura 6.3), los cuales dependen de la temperatura de cristalización:

**Régimen I:** A elevadas temperaturas, es decir, pequeños subenfriamientos, la cristalización de una capa evoluciona completamente antes de que aparezca la nucleación de la siguiente y, por lo tanto, la velocidad de crecimiento lateral es mucho más rápida que la de crecimiento radial.

**Régimen II:** A subenfriamientos moderados, se forman varios núcleos en la capa en crecimiento y permiten el crecimiento simultáneo de nuevas capas que se extienden lentamente. La velocidad de crecimiento lateral es similar a la del crecimiento radial.

**Régimen III:** A temperaturas inferiores a las del régimen II, la separación entre los núcleos alcanza su valor mínimo, produciéndose una nucleación múltiple sobre una misma capa.



**Figura 6.3.** Representación esquemática de los regímenes de cristalización I (a, d), II (b, e) y III (c).

La cristalización que tiene lugar en las distintas regiones se asocia a veces con el desarrollo de distintas morfologías. De esta forma, el régimen I se asocia a axialitas, el régimen II a esferulitas anilladas y el régimen III a esferulitas fibrilares.

Este análisis también se puede llevar a cabo mediante calorimetría utilizando la constante de velocidad normalizada. Asumiendo un proceso de nucleación atérmica, es

decir, una cristalización en el cuál los núcleos primarios permanecen constantes con el tiempo, la ecuación de *Lauritzen-Hoffman* se puede reformular sustituyendo la velocidad de crecimiento radial por el inverso del tiempo requerido para la cristalización del 50 %<sup>[179-181]</sup>, 25 %<sup>[182]</sup> o 5 %<sup>[183]</sup>. También se ha aceptado la utilización de la constante cinética normalizada ( $k$ )<sup>[184-187]</sup>:

$$k = k_0 \exp[-U^* / R(T_c - T_\infty)] \exp[-K_g / T_c (\Delta T) f] \quad (6.19)$$

La desviación de los resultados experimentales respecto al modelo de Avrami cuando el grado de cristalinidad alcanza valores elevados ha llevado a plantear la posibilidad de una cristalización en dos etapas: una cristalización primaria y una secundaria. Se han propuesto varios modelos para incluir en el análisis la cristalización secundaria, uno de los más aceptados es el modelo de Hiller<sup>[188]</sup>, según el cual, la cristalización primaria corresponde al crecimiento de las esferulitas, mientras que la secundaria tiene lugar en el interior de éstas.

Debido a que el mecanismo de este fenómeno no está claro, se han desarrollado varias aproximaciones. Verhoyen *et al.*<sup>[189]</sup> consideran que la cristalización secundaria ocurre después de que termine la primaria, transcurriendo un tiempo entre ambas. Una simplificación que puede por tanto hacerse, considera que la cristalización secundaria empieza inmediatamente después que la primaria. El proceso primario se puede modelar mediante una ecuación de Avrami ligeramente modificada:

$$\chi(t) = \chi_{p,\infty} \left\{ 1 - \exp \left[ -Z_1 (t - t_{0,1})^{n_1} \right] \right\} \quad (6.20)$$

donde  $\chi_{p,\infty}$  es la cristalinidad fraccional al final de la cristalización primaria, y  $t_{0,1}$  el tiempo en que ésta se inicia.

Para la cristalización secundaria, y considerando  $t_{0,2}$  como el tiempo en el que empieza este proceso, la ecuación se modifica según la siguiente ecuación:

$$\chi(t) = \chi_{p,\infty} + (1 - \chi_{p,\infty}) \left\{ 1 - \exp \left[ -Z_2 (t - t_{0,2})^{n_2} \right] \right\} \quad (6.21)$$

De esta manera, pueden hacerse dos análisis análogos al anterior, uno para la zona de cristalización primaria y otro para la de la secundaria.

Cuando la cristalización isotérmica se estudia a temperaturas muy por encima de la temperatura de transición vítrea los valores exactos de  $U^*$  y  $T_\infty$  no tienen una gran influencia y pueden utilizarse valores *standard*. Así, los valores que comúnmente se emplean son los propuestos por autores como Williams-Landel-Ferry (WLF) <sup>[178]</sup> ( $U^*=4120 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}$  y  $T_\infty = T_g-51,6 \text{ K}$ ) o los estimados por Suzuki y Kovacs <sup>[177]</sup> ( $U^*=1500 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}$  y  $T_\infty = T_g-30 \text{ K}$ ).

### 6.2.2. Cristalización no isotérmica.

1.2. En la cristalización no isotérmica, es posible seguir nuevamente los procesos de cristalización en frío y en caliente. Para ello se realizan experimentos con distintas velocidades de calentamiento a partir de una muestra en un estado completamente vítreo, es decir, por debajo de la temperatura de transición vítrea, o bien con distintas velocidades de enfriamiento a partir de muestras fundidas. Para analizar el comportamiento no-isotérmico se han aplicado los modelos descritos por Avrami, Ozawa y Cazé que se detallan a continuación.

#### 6.2.2.1. Modelos cinéticos para el análisis del comportamiento no isotérmico.

##### 6.2.2.1.1. Modelo de Avrami.

En experimentos no isotérmicos obtenemos la evolución del grado de cristalinidad con la temperatura a una velocidad de calentamiento o de enfriamiento constante. El hecho de que este grado de cristalinidad también se pueda expresar en función del tiempo (ecuación 6.14) permite que el modelo de Avrami descrito para experimentos isotérmicos (sección 6.2.1) sea aplicable a este tipo de experimentos.

#### 6.2.2.1.2. Modelos de Ozawa.

Ozawa <sup>[190]</sup> propuso una ecuación modificada en la que se considera el efecto de la velocidad de enfriamiento:

$$1 - \chi(T) = \exp(-R(T)/\phi^m) \quad (6.22)$$

donde  $R(T)$  es la llamada función de enfriamiento que sólo varía con la temperatura del proceso y  $m$  es el exponente de Ozawa. Éste depende de la geometría cristalina y del proceso de nucleación y tiene un significado físico similar al exponente de Avrami. Se obtiene a partir de la representación lineal de  $\log\{-\ln[1 - \chi(T)]\}$  frente a  $\log\phi$ .

Desafortunadamente, este método está limitado por las desviaciones significativas de la linealidad que se producen debido al distinto grado de subenfriamiento que se da en la muestra a diferentes velocidades de enfriamiento. Además se generan errores con la superposición de los distintos procesos de cristalización, primario y secundario, cuando los valores de cristalinidad a una temperatura dada corresponden a procesos primarios para algunas velocidades de enfriamiento y a procesos secundarios para velocidades de enfriamiento mas bajas.

De forma similar, se puede aplicar la ecuación anterior a los experimentos de cristalización en frío, sustituyendo la velocidad de enfriamiento por la de calentamiento.

#### 6.2.2.1.3. Modelo de Mo.

Mo *et al.* <sup>[191]</sup> han abordado recientemente el estudio no isotérmico, empleando una nueva ecuación cinética, que combina las expresiones de Avrami y Ozawa:

$$\log\phi = \log F(T) - a \log(t - t_0) \quad (6.23)$$

donde  $F(T)$  es un parámetro relacionado con la velocidad de enfriamiento y  $a$  es la relación entre los exponentes de Avrami y Ozawa ( $a = n/m$ ).

#### 6.2.2.1.4. Modelo de Cazé.

Cazé *et al.* proponen otro método para determinar los exponentes de Ozawa <sup>[192]</sup>, asumiendo que las exotermas de cristalización tienen forma gaussiana. El método permite calcular una temperatura teórica del pico exotérmico,  $T_p'$ , y una nueva constante,  $a'$ :

$$\ln\{-\ln[1-\chi(T)]\} = a'(T - T_p') \quad (6.24)$$

La temperatura del pico de cristalización está relacionada con la velocidad de enfriamiento según la siguiente ecuación:

$$T_p' = (m/a') \cdot \ln \phi - b'/a' \quad (6.25)$$

donde  $b'$  es una nueva constante. La representación de  $T_p'$  frente a  $(\ln \phi)/a'$  es una línea recta cuya pendiente corresponde al exponente de Ozawa,  $m$ .

Para la cristalización en frío se puede aplicar un tratamiento similar utilizando la velocidad de calentamiento ( $\beta$ ) en lugar de la velocidad de enfriamiento ( $\phi$ ), y teniendo en cuenta las siguientes ecuaciones:

$$\ln\{-\ln[1-\chi(T)]\} = a'(T_p' - T) \quad (6.26)$$

$$T_p' = (m/a') \ln \beta - b'/a' \quad (6.27)$$

La principal restricción de este método es el hecho de que únicamente se puede aplicar a la cristalización primaria.

#### 6.2.2.2. Determinación de la energía de activación.

##### 6.2.2.2.1. Modelo de Kissinger.

El método de Kissinger permite evaluar la energía de activación para procesos de cristalización en condiciones no isotérmicas. Teniendo en cuenta la variación de la temperatura,  $T_p$ , con la velocidad de calentamiento,  $\beta$ , la energía de activación en un proceso no isotérmico, de cristalización en frío, se puede evaluar según la expresión [193].

$$\frac{d[\ln(\beta/T_p^2)]}{d(1/T_p)} = -E/R \quad (6.28)$$

donde  $E$  es la energía de activación del proceso y  $R$  es la constante universal de los gases.

El método de Kissinger se basa en que en el máximo del pico de cristalización, es decir cuando  $(d^2\alpha/dt^2)_{T_p}$  es igual a 0, existe una relación entre  $T_p$  y la velocidad de calentamiento ( $\beta$ ). Integrando y aplicando logaritmos a la ecuación 6.28, se obtiene la siguiente expresión:

$$\ln \frac{\beta}{T_p^2} = -\frac{E}{RT_p} + A \quad (6.29)$$

donde  $A$  es una constante.

Por lo tanto, la representación gráfica del  $\ln(\beta/T_p^2)$  en función de  $1/T_p$  para las distintas temperaturas  $T_p$ , obtenidas a diversas velocidades de calentamiento,  $\beta$ , tiene un comportamiento lineal cuya pendiente es  $(-E/R)$ . Así, este método conduce a la determinación de la energía de activación  $E$  del proceso.

Algunos autores han intentado aplicar el modelo para los procesos de cristalización en caliente, sustituyendo simplemente la velocidad de calentamiento ( $\beta$ ), por la de enfriamiento ( $\phi$ ). Recientemente se ha demostrado que el proceso no es válido ya que no se puede sustituir una velocidad negativa por su valor modular en el cálculo del término logarítmico [194]. Otra crítica que puede hacerse al modelo es que supone un valor constante para la energía de activación.

#### 6.2.2.2.2. Modelo de Ozawa.

El método de Ozawa, junto con el de Kissinger, es uno de los métodos más empleados para calcular de la energía de activación. Está basado en la utilización de múltiples velocidades de calentamiento o enfriamiento para la determinación de la temperatura máxima de cada termograma, de manera similar al modelo de Kissinger.

La energía de activación, según el modelo de Ozawa <sup>[195]</sup>, se determina mediante la ecuación:

$$\frac{d[\log(\beta)]}{d(1/T_p)} = \frac{-(0.4567E)}{R} \quad (6.30)$$

Si integramos la ecuación anterior se obtiene la siguiente expresión:

$$\log \beta = -\frac{0.4567E}{RT_p} + B \quad (6.31)$$

donde  $B$  es una constante.

En este método la energía de activación,  $E$ , se obtiene a partir de la representación gráfica del  $\log \beta$  en función de  $1/T_p$ , que tiene un comportamiento lineal cuya pendiente es  $(-E/R)$ .

Por las mismas razones anteriormente expuestas, el modelo pierde su validez cuando se aplica para la cristalización en caliente.

#### 6.2.2.2.3. Modelo de Friedman.

Dadas las limitaciones de los métodos de Kissinger y Ozawa, los métodos isoconversionales (avanzados <sup>[196, 197]</sup> y de Friedman <sup>[198]</sup>) son los más utilizados para evaluar la *energía de activación efectiva*. Estos métodos se basan en el principio de que, a un grado de conversión constante, la velocidad de cristalización sólo es función de la

temperatura. Así, las energías de activación se pueden evaluar a cada grado de conversión que se indica con el correspondiente subíndice ( $E_x$ ).

El método isoconversional de Friedman considera que la variación de la energía de activación con la cristalinidad para el proceso de cristalización no isotérmico sigue la siguiente ecuación:

$$\left[ \frac{d\chi(T)}{dt} \right]_x = A' \exp\left( \frac{-E_x}{RT} \right) f[\chi(T)] \quad (6.32)$$

donde  $A'$  es un factor preexponencial y  $f[\chi(T)]$  es el modelo de cristalización.

En este método la energía de activación,  $E_x$ , se obtiene a partir de la representación gráfica del  $\ln(d\chi(T)/dt)$  en función de  $1/T$ , que tiene un comportamiento lineal cuya pendiente es  $(-E_x/R)$ . El método asume que la energía de activación es únicamente constante para un determinado grado de conversión y para la estrecha región de temperatura asociada a esta conversión.

El método de Friedman se aplica a diferentes grados de cristalinidad, relacionando el logaritmo de la velocidad de cristalización con la inversa de la temperatura para cada grado de cristalinidad. Como en el método de Ozawa, se precisa conocer las temperaturas, de cada barrido calorimétrico, para un porcentaje de cristalinidad dado. La ventaja del método de Friedman, y aquí está la diferencia con respecto al modelo de Ozawa, es que pueden obtenerse los valores de  $\ln[d\chi(T)/dt]$  a diferentes temperaturas y a diferentes conversiones para los diferentes experimentos no isotérmicos, independientemente de que éstos se realicen con velocidades de enfriamiento o de calentamiento. Es decir, el método de Friedman es adecuado para estimar la energía de activación en procesos no isotérmicos de cristalización tanto en frío como en caliente.

#### 6.2.2.2.4. Modelo de Vyazovkin.

Los parámetros de Lauritzen y Hoffman también se pueden determinar a partir de las cristalizaciones no isotérmicas utilizando una aproximación isoconversional

desarrollada recientemente por Vyazovkin <sup>[194]</sup>. Se han realizado estudios de cristalización desde el estado fundido para diferentes polímeros y éstos concuerdan perfectamente con los realizados en condiciones isotérmicas <sup>[199-203]</sup>. Además, este método también resulta útil para la cristalización desde el estado vítreo <sup>[204]</sup>.

Esta metodología considera que la dependencia de la velocidad con la temperatura no tiene un comportamiento de Arrhenius ya que la ecuación de *Lauritzen-Hoffman* (ecuación 6.16) tiene dos funciones exponenciales implicadas <sup>[205]</sup>. Por esta razón, Vyazovkin y Sbirrazzuoli <sup>[200]</sup> utilizan la ecuación clásica para deducir la dependencia de *energía de activación efectiva* de la cristalización con la temperatura:

$$E(T) = -Rd \ln G / dT^{-1} = U^* [T^2 / (T - T_\infty)^2] + K_g R [(2\Delta T - T_m f) / (\Delta T)^2 f] \quad (6.33)$$

Se puede obtener una expresión similar para la *energía de activación efectiva* de la cristalización teniendo en cuenta la equivalencia entre los derivados logarítmicos de la velocidad del crecimiento microscópico ( $G$ ) y de la velocidad total de cristalización ( $d\chi / dt$ ) <sup>[206, 207]</sup>:

$$d \ln(d\chi / dt) / dT = d \ln G / dT \quad (6.34)$$

que, tras alguna transformación conduce a:

$$-R \cdot d \ln G / dT^{-1} = -R \cdot d \ln(d\chi / dt) / dT^{-1} = E(T) \quad (6.35)$$

La energía de activación esta determinada por los parámetros que representan la barrera de energía del transporte ( $U^*$ ) y de la nucleación ( $K_g$ ). Además, la contribución relativa de estos dos procesos depende de la temperatura. La *energía efectiva* resultante es negativa y aumenta con la extensión de la cristalización desde el estado fundido en la región controlada por la velocidad de nucleación, mientras que es positiva y disminuye con la extensión de la reacción de la cristalización desde el estado amorfo en la región controlada por el transporte.

### **6.2.3. Picos múltiples de fusión en polímeros.**

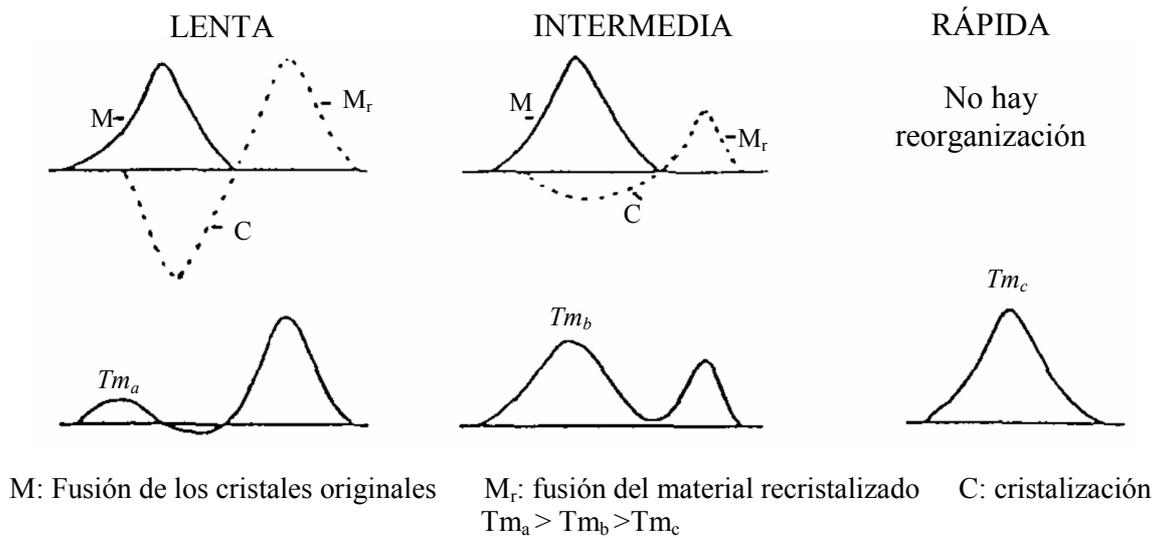
#### **6.2.3.1. Teoría del doble pico de fusión.**

Los polímeros semicristalinos presentan frecuentemente termogramas con múltiples picos de fusión, cuyas magnitudes y temperaturas dependen de las condiciones de cristalización. Este comportamiento queda reflejado en los termogramas correspondientes a la fusión de las muestras después de ser cristalizadas.

El fenómeno de múltiples endotermas en polímeros se ha atribuido a diferentes causas como son el polimorfismo, diferencias en tamaño cristalino y distribución de tamaños o a la existencias de procesos de fusión y recristalización con posterior fusión.

Rim y Runt <sup>[208]</sup> proponen un mecanismo en el que se supone que durante el calentamiento de la muestra en el calorímetro se produce un proceso de reorganización que implica fusión, recristalización de los cristales originales y fusión del material anteriormente recristalizado.

En la Figura 6.4 se representa de manera esquemática este mecanismo; en la parte superior se muestra la fusión de los cristales originales (M), la recristalización de los mismos (C) y la fusión del material recristalizado (M<sub>r</sub>), según distintas velocidades de calentamiento: lenta, intermedia y rápida; en la parte inferior se muestran los termogramas correspondientes que se observarían experimentalmente.

**VELOCIDAD DE CALENTAMIENTO:**

**Figura 6.4. Representación esquemática del mecanismo de fusión múltiple de Rim y Runt.**

Para una velocidad de calentamiento lenta, los cristalitas originales disponen de tiempo suficiente para reorganizarse, por lo que en la fusión global existirá una aportación importante de los procesos de recristalización y fusión del material recristalizado. El termograma correspondiente, será, por lo tanto, la suma de las contribuciones correspondientes a la endoterma de fusión de los cristales originales (M), la exoterma de recristalización (C) y la endoterma de fusión del material recristalizado ( $M_r$ ), observándose dos picos de fusión bien diferenciados. A medida que aumenta la velocidad de calentamiento, los cristales disponen cada vez de menos tiempo para reorganizarse, por lo que la exoterma de recristalización y la posterior endoterma de fusión decrecen en magnitud, siendo por tanto también menor su contribución. Como consecuencia, la resolución de los picos en el termograma es cada vez menos acusada, llegando incluso a observarse un único pico de fusión cuando la velocidad de calentamiento es rápida.

### 6.2.3.2. Temperatura de fusión en el equilibrio.

Un parámetro importante que interviene en los cálculos cinéticos es la temperatura de fusión en el equilibrio,  $T_m^0$ , que se define como la temperatura de fusión que tendría un

crystal de tamaño infinito y que además coincidiría con la temperatura de cristalización de dicho crystal. Un método desarrollado para obtener  $T_m^0$  se basa en el hecho de que el equilibrio termodinámico es totalmente reversible, por lo tanto, los procesos inversos de cristalización y de fusión deben poderse realizar en el punto de equilibrio en el que  $T_m = T_c = T_m^0$  siendo  $T_c$ , la temperatura de cristalización y  $T_m$  la temperatura de fusión experimental. La relación entre  $T_m$ ,  $T_c$  y  $T_m^0$  viene dada por la ecuación de Hoffman-Weeks [209]:

$$T_m = T_m^0 - \varphi(T_m^0 - T_c) \quad (6.36)$$

donde  $\varphi$  es el parámetro de estabilidad, también llamado parámetro morfológico, que depende del espesor y de las energías superficiales de los cristalitas. Si se cristalizan muestras del polímero a diferentes temperaturas de cristalización,  $T_c$ , y se determina la temperatura de fusión de cada una ellas,  $T_m$ , se puede obtener el valor de  $T_m^0$ , tal y como se puede observar en la Figura 6.5. Concretamente la representación gráfica de  $T_m$  frente a  $T_c$  permite determinar la temperatura de equilibrio que corresponde al punto en el cual esta representación corta a la línea de reversibilidad perfecta ( $T_m = T_c$ ).

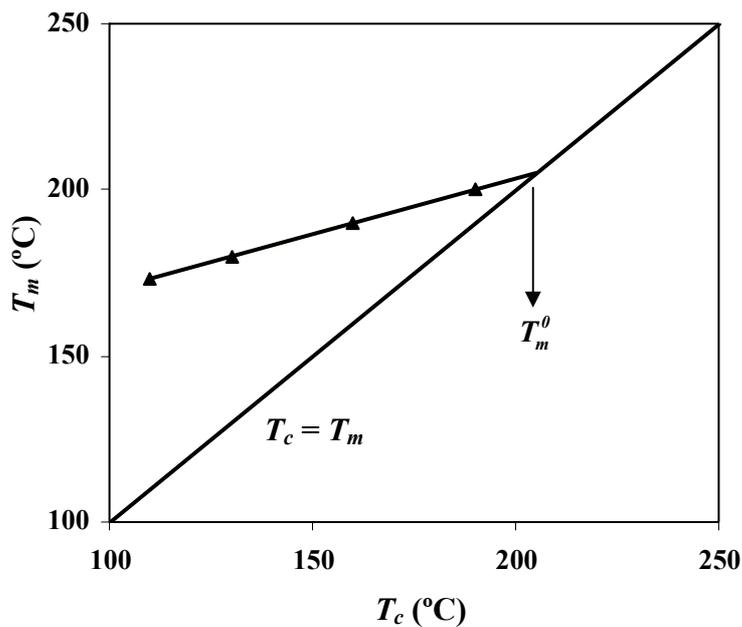


Figura 6.5. Representación de Hoffman-Weeks.

El término  $\varphi$  es un parámetro característico de la estabilidad del cristal que puede adoptar valores comprendidos entre 0 y 1. El valor cero supondría que supondría  $T_m^0 = T_m$ , mientras que el valor unidad implicaría que  $T_m = T_c$ . Los cristales serán más estables si el valor de  $\varphi$  es próximo a 0.

El punto de corte en el diagrama de Hoffman-Weeks cumple tanto el comportamiento experimental como el requisito de igualdad entre  $T_m$  y  $T_c$ , pudiéndose entender como la verdadera temperatura de fusión reversible para el polímero.

## 7. SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS.

La liberación controlada de fármacos emplea dispositivos de encapsulamiento capaces de liberar dichos fármacos a velocidad controlada durante largos periodos de tiempo, que pueden comprender desde días hasta meses. Tales sistemas ofrecen numerosas ventajas respecto a los métodos tradicionales de suministro de fármacos. Entre ellas destacan las siguientes: la posibilidad de mantener una concentración sistémica de fármaco adecuada y constante, evitando los picos de ineffectividad y toxicidad típicos de los métodos convencionales; la protección de fármacos susceptibles a algún tipo de degradación y el incremento en la calidad de vida del paciente que implica el hecho de prescindir de una administración periódica, así como la disminución de la intensidad de los posibles efectos secundarios.

Las microesferas poliméricas son vehículos para numerosas aplicaciones de liberación controlada, debido a su capacidad para encapsular una gran variedad de fármacos, a su biocompatibilidad, elevada disponibilidad y características de liberación sostenida a largo plazo.

### 7.1. Síntesis y caracterización de microesferas.

Existen diferentes métodos empleados en la preparación de microesferas poliméricas. Entre ellos se encuentran los métodos de polimerización interfacial <sup>[210, 211]</sup>, suspensión <sup>[212]</sup>, emulsión <sup>[213]</sup>, dispersión <sup>[214]</sup>, el método de emulsión-extracción/evaporación de

solvente <sup>[215-217]</sup>, la extrusión de polímero <sup>[218]</sup>, el “*spray drying*” <sup>[219]</sup> y la coacervación o precipitación <sup>[220]</sup>. Estos métodos difieren en el tipo de material que puede ser utilizado y el tipo de fármacos que pueden ser encapsulados eficientemente.

En el presente trabajo las microesferas se han preparado mediante el **método de emulsión-extracción/evaporación de solvente**. Éste es uno de los procedimientos más empleados en la preparación de microesferas a partir de polímeros ya sintetizados dada su facilidad de aplicación y su compatibilidad con gran cantidad de polímeros comunes. No obstante, cabe decir que aunque el proceso es conceptualmente simple, muchas variables pueden influir en el producto final, tanto en las propiedades físico-químicas, como en el comportamiento en la liberación del fármaco. La eficiencia de encapsulación, el estado físico del fármaco y el polímero en el sistema, el tamaño y la morfología (forma, porosidad y textura) de las partículas son características físico-químicas. El estado físico <sup>[221]</sup>, el tamaño <sup>[222]</sup> y la morfología <sup>[223]</sup> influyen a su vez en la cinética de liberación.

Las variables que suelen considerarse son: la velocidad de agitación en la emulsificación <sup>[224]</sup>, el tipo y concentración de tensioactivo <sup>[225]</sup>, la relación de volúmenes entre las fases dispersa y continua <sup>[226]</sup>, la concentración del polímero en la fase dispersa <sup>[227]</sup>, el peso molecular del polímero <sup>[228]</sup>, las condiciones de presión y temperatura en las que el solvente es evaporado <sup>[229]</sup> y la naturaleza química tanto del polímero como del fármaco, dado que éstas determinan las interacciones del sistema <sup>[230,231]</sup>.

El método consiste en emulsionar una disolución, que contiene el polímero y el fármaco, en una fase no-solvente, llamada fase continua, que contiene una pequeña cantidad de estabilizador. Los disolventes más comúnmente empleados en la preparación de microesferas son el diclorometano y el acetato de etilo con una fase acuosa continua, que contiene un estabilizador, habitualmente alcohol polivinílico (PVA). En la emulsión, el solvente es extraído por la fase continua, de manera que ésta puede penetrar en las gotas ricas en polímero mientras se produce la evaporación del disolvente. Como consecuencia, la fase dispersada se enriquece progresivamente en polímero hasta que las gotas “se endurecen” para transformarse en partículas, ocluyendo

el fármaco en su interior. Finalmente las microesferas se recogen mediante filtración o centrifugación, se lavan y se dejan secar.

En este trabajo se prepararon microesferas a partir de los poliésteres Poli[4Hb-*alt*-Glc] y Poli[Glc-*alt*-6HH], empleando diclorometano como solvente (50 mg·ml<sup>-1</sup>) y una disolución acuosa al 0.8 % (w/v) de PVA y 1 % (w/v) de cloruro sódico, como fase continua. La emulsión se consiguió mediante agitación mecánica aproximadamente a 1300 rpm. Las microesferas se recogieron por filtración y se lavaron con agua.

La caracterización de las microesferas constituidas por un determinado sistema polímero-fármaco comprende el análisis morfológico mediante microscopía electrónica de barrido, el cálculo de tres parámetros básicos, que son la eficiencia de encapsulación (*EE*), el rendimiento de la preparación (*R*) y la carga farmacológica (% de fármaco en las microesferas) y el estudio de la liberación del fármaco. Dichos parámetros se definen mediante las siguientes expresiones:

$$EE = \frac{m_f}{m_{f_0}} \times 100 \quad (7.1)$$

$$R = \frac{m_{msf}}{m_{f_0} + m_{p_0}} \times 100 \quad (7.2)$$

$$\% \text{ fármaco} = \frac{m_f}{m_{msf}} \times 100 \quad (7.3)$$

donde  $m_f$  es la masa de fármaco contenida en las microesferas obtenidas;  $m_{f_0}$  es la masa de fármaco añadida en la síntesis de microesferas;  $m_{msf}$  es la masa de microesferas obtenida y  $m_{p_0}$  es la masa de polímero añadida en la síntesis de microesferas.

En el presente trabajo se han sintetizado microesferas con triclosán. La cuantificación de dicho fármaco se ha llevado a cabo mediante espectroscopía UV-visible. El procedimiento experimental fue el siguiente: se pesaron exactamente 10 mg de microesferas y se disolvieron en cloroformo en un matraz aforado de 25 ml. Las medidas de absorbancia se realizaron a 281 nm determinando la cantidad de fármaco presente en la muestra por interpolación en una recta de calibrado realizada en las

mismas condiciones y a partir de patrones de concentración conocida. Cada determinación se realizó por triplicado.

## 7.2. Cinéticas de liberación.

En principio el perfil de liberación más deseable sería aquel que es constante con el tiempo. Éste correspondería a una cinética de orden cero. No obstante, en la mayoría de los casos el perfil de liberación es más complicado y presenta dos procesos principales. En una primera fase se produce una liberación brusca del fármaco. En esta fase inicial, conocida como “*burst*”, se libera el fármaco fácilmente accesible, que está adherido a la superficie y en el interior de canales y poros. En una segunda fase se produce una liberación más constante proveniente de la difusión del fármaco a través de la matriz polimérica, de la degradación <sup>[232,233]</sup> de la misma o de una combinación de ambos procesos. También se pueden obtener perfiles más complejos, aunque ajustables a aplicaciones concretas <sup>[234]</sup>.

Dado que la liberación del fármaco puede ser debida a difusión y degradación, para elucidar el mecanismo por el cual tiene lugar se efectúan estudios de degradación del sistema en cuestión. En el presente trabajo se realizaron ensayos de degradación hidrolítica a 37 °C en una solución Sörensen (0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a pH 7.42 con un 0.03 % en peso de azida sódica para evitar la proliferación de microorganismos. Las muestras se prepararon en viales, añadiendo 10 mg de microesferas de entre 45 y 80 µm de diámetro y 20 ml de la solución. A determinados intervalos de tiempo las partículas se recogieron por filtración y se dejaron secar al vacío. El seguimiento de la degradación se realizó mediante medida del peso molecular promedio en peso y en número por GPC. De este modo, puede comprobarse si el proceso de degradación contribuye o no al mecanismo de liberación de fármaco de las matrices de ambos polímeros.

Las cinéticas de liberación se obtuvieron mediante experimentos *in vitro* en un incubador agitador a 37 °C y 60 rpm. Los ensayos se realizaron en dos medios simuladores fisiológicos distintos a un pH de 7.42: la solución Sörensen y un medio celular (constituido por Dubelcco's Modified Eagle's Medium con 7.5 % en peso de hidrogenocarbonato sódico y un 10 % en volumen de suero bovino).

Experimentalmente, se pesaron 10 mg de microesferas de entre 45 y 80  $\mu\text{m}$  de diámetro en viales posteriormente rellenos con 20 ml de medio de liberación. El seguimiento se realizó midiendo la concentración del fármaco en el medio, a intervalos de tiempo adecuados, mediante HPLC con detector UV-visible. Cada medida se realizó por duplicado y se obtuvo el valor por interpolación utilizando una recta de calibrado realizada en las mismas condiciones y empleando patrones de concentración conocida.

El procedimiento experimental para la determinación de la concentración de fármaco en el medio de liberación fue el siguiente: se tomaron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  mediante una jeringa con algodón en la punta de la aguja como filtro y se inyectaron 20  $\mu\text{l}$  de muestra en el sistema cromatográfico. La muestra se eluyó con la siguiente mezcla de disolventes (% vol): acetonitrilo/agua/ácido acético (59/39/2) a un flujo de  $0.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  y tomando las medidas de absorbancia a 281 nm.

