



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UN COPOLÍMERO DE INJERTO BINARIO CON
POTENCIAL RESPUESTA A LA TEMPERATURA PARA LIBERACIÓN CONTROLADA DE
FÁRMACOS**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. ANGEL CONTRERAS GARCÍA



TUTOR: DR: EMILIO BUCIO CARRILLO

AÑO:2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por la beca otorgada durante mis estudios de doctorado en el Programa de Ciencias Químicas de la UNAM. Número de beca CONACyT: 205069. También quiero agradecer al CONACyT por la "Beca Mixta" para llevar a cabo una estancia de investigación en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela en España durante un año.

A **DGAPA, UNAM** proyecto PAPIIT IN200208 titulado: "Síntesis y Caracterización de Copolímeros de Injerto mediante Radiación Ionizante para Uso Biotecnológico y Biomédico".

Al **Dr. Emilio Bucio Carrillo** por todo el apoyo incondicional recibido en la realización de mis estudios de posgrado.

A la **Dra. Guillermina Burillo** por su simplicidad que demuestra su gran sabiduría.

A la **Dra. Carmen Alvarez Lorenzo** y el **Dr. Angel Concheiro** de la Universidad de Santiago de Compostela, España por sus valiosas aportaciones y sobre todo su hospitalidad.

Al **Fís. Francisco García** y el **M. en C. Benjamín Leal** por el apoyo en la irradiación de muestras.

A **Martín Cruz** y el **Ing. Juan Luciano Díaz** del centro de cómputo del ICN por el apoyo en la realización de la evaluación de Comité Ampliado vía videoconferencia.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y el **Instituto de Ciencias Nucleares** que me brindó todas las oportunidades para lograr mis objetivos.

"Por Mi Raza Hablará El Espíritu"

La presente tesis doctoral se realizó en el Laboratorio de Macromoléculas del Departamento de Química de Radiaciones y Radioquímica del Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM.

Este trabajo se presentó en el siguiente congreso:

-Synthesis of novel stimuli responsive copolymer containing NIPAAm and APMA onto PP films by one step γ -ray irradiation. **A. Contreras-García**, E. Bucio, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro. 26th Miller Conference on Radiation Chemistry, Keszthely, Hungary, 28 August - 2 September, 2009

Los resultados de esta tesis se enviaron y publicaron en:

Surface PP films grafted with N-isopropylacrylamide and N-(3-aminopropyl) methacrylamide by γ radiation: synthesis and characterization. **A. Contreras-García**, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, E. Bucio. *Radiat. Phys. Chem.* 79 (2010) 615-621.

Polypropylene grafted with NIPAAm and APMA for creating hemocompatible surfaces that load/elute nalidixic acid. **A. Contreras-García**, E. Bucio, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo. *React. Funct. Polym.* 70 (2010) 836-842.

Stimuli-responsive networks grafted onto polypropylene for the sustained delivery of NSAIDs. **A. Contreras-García**, C. Alvarez-Lorenzo, Cristina Taboada, A. Concheiro, E. Bucio. *Acta Biomater.* En prensa. doi:10.1016/j.actbio.2010.10.001.

Resumen

Se sintetizó un copolímero injerto de N-isopropilacrilamida (NIPAAm) y N-(3-aminopropil metacrilamida) (APMA) sobre una película de polipropileno (PP) por el método de preirradiación oxidativa, usando radiación γ . Los rendimientos de injerto y proporciones de NIPAAm y APMA en el copolímero dependen de las condiciones en las que se lleva a cabo el proceso de injerto (dosis de irradiación, concentración de monómeros, tiempo de reacción y temperatura de reacción). Las películas obtenidas fueron caracterizadas con FTIR-ATR, XPS, hinchamiento y coeficiente de fricción. Se encontró que la temperatura crítica de solución (LCST) depende de la cantidad relativa de monómeros presentes en el copolímero injertado. Se evaluó la hemocompatibilidad y la citocompatibilidad de las películas obtenidas, obteniendo resultados satisfactorios. Además, las películas fueron capaces de cargar y liberar de manera controlada, fármacos antiinflamatorios y antibióticos (diclofenaco, ibuprofeno y ácido nalidíxico), así como carboximetil dextrano (CM-dextrano). Las películas cargadas con un antibiótico, mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* sobre la superficie de las películas.

Abstract

A graft copolymer of N-isopropylacrylamide (NIPAAm) and N-(3-amino-propyl methacrylamide) (APMA) onto polypropylene films (PP) was synthesized by oxidative pre-irradiation method using γ radiation. Grafting yields and monomers ratio in the copolymers depend on the conditions which, the process of grafting was carried out (irradiation dose, monomers concentration, reaction time, and temperature). The obtained films were characterized with FTIR-ATR, XPS, swelling and friction coefficient. It was found that the lower critical solution temperature (LCST) depends on the relative content of monomers in the graft copolymer. Suitable hemocompatibility and cytocompatibility of the films was observed. In addition, the films were able to load anti-inflammatory and antibiotics drugs (diclofenac, ibuprofen, and nalidixic acid) and carboxymethyl-dextran (CM-dextran) and control their release. The films loaded with an antibiotic, showed their ability to inhibit the growth of *Escherichia coli* onto film surface.

Índice general

1. Introducción	12
2. Generalidades	16
2.1. Que son los polímeros	16
2.1.1. Copolímeros	17
2.2. La radiación	17
2.2.1. Fuentes de radiación	18
2.2.2. Características de la radiacion	18
2.3. Tipos de radiación	19
2.3.1. Rayos γ	19
2.4. Injertos radiolíticos de monómeros sobre películas poliméricas	21
2.4.1. Injertos iniciados por técnicas de radiación	21
2.4.2. Injertos por radicales libres	22
2.5. Temperatura crítica de solución (LCST)	26
2.6. Matriz polimérica y monómeros	27
2.6.1. Polipropileno (PP)	27
2.6.2. N-isopropilacrilamida (NIPAAm)	29
2.6.3. N-(3-aminopropil metacrilamida) · HCl (APMA)	30
2.7. Biomateriales poliméricos como dispositivos médicos	31
2.7.1. Mecanismos de la biocompatibilidad	32
2.7.2. Respuesta inflamatoria	33
2.7.3. Hemocompatibilidad	34
2.7.4. Dispositivos invasivos intravasculares transitorios	35
2.8. Aplicaciones médicas	36
2.8.1. Dispositivos combinados	36
2.8.2. Infecciones relacionadas con dispositivos médicos	37

3. Objetivos	41
3.1. Objetivo general	41
3.2. Objetivos particulares	41
4. Parte experimental	43
4.1. Materiales	43
4.2. Injerto por preirradiación oxidativa	43
4.3. FTIR-ATR y XPS de los copolímeros de injerto	45
4.4. Hinchamiento y temperatura crítica de solución	46
4.5. Microscopia electrónica de barrido (SEM)	47
4.6. Coeficiente de fricción	47
4.7. Citocompatibilidad	48
4.8. Prueba de hemólisis	49
4.9. Prueba de trombogenicidad	50
4.10. Adsorción de seroalbúmina bovina (BSA)	50
4.11. Carga de diclofenaco e ibuprofeno	50
4.12. Liberación de diclofenaco e ibuprofeno	51
4.13. CM-dextrano sobre películas cargadas con diclofenaco	51
4.14. Carga de ácido nalidíxico	52
4.15. CM-dextrano sobre películas cargadas con ácido nalidíxico	52
4.16. Liberación de ácido nalidíxico	52
4.17. Ensayo microbiológico	53
5. Análisis de resultados	54
5.1. Injerto de NIPAAm y APMA sobre PP	54
5.1.1. Mecanismo de injerto de NIPAAm y APMA sobre PP	56
5.1.2. Efecto de la dosis de irradiación	59
5.1.3. Efecto de la concentración de monómeros	60
5.1.4. Efecto de la temperatura de reacción	62
5.1.5. Efecto del tiempo de reacción	62
5.2. Caracterización	65
5.2.1. Espectroscopia de infrarrojo	65
5.2.2. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS)	68
5.2.3. Hinchamiento límite	70
5.2.4. Respuesta a la temperatura (LCST)	71
5.2.5. Análisis térmico	74
5.2.6. Microscopia electrónica de barrido (SEM)	75
5.3. Coeficiente de fricción	77

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	8
5.4. Hemocompatibilidad y citocompatibilidad	78
5.4.1. Adsorción de albúmina	78
5.4.2. Hemólisis	79
5.4.3. Trombogenicidad	80
5.4.4. Viabilidad celular	81
5.4.5. Expresión de citoquinas pro-inflamatorias	83
5.5. Carga de fármacos antiinflamatorios y CM-dextrano	85
5.6. Liberación de fármacos antiinflamatorios	88
5.7. Carga de ácido nalidíxico y CM-dextrano	91
5.8. Liberación de ácido nalidíxico	94
5.9. Ensayo microbiológico	97
6. Conclusiones	99
Bibliografía	101
A. Artículos publicados.	110

Índice de figuras

1.1. Diferentes tipos de respuestas de sistemas poliméricos sensibles a estímulos ambientales.	14
1.2. Métodos de modificación de polímeros.	14
2.1. Esquema de tipos de polímeros.	17
2.2. Representación de homopolímero y copolímeros.	18
2.3. Reacciones de captura para formar cobalto ⁶⁰	19
2.4. Espectro electromagnético.	20
2.5. Tipos de injerto por radiación.	23
2.6. Modelo de hélice de polipropileno isotáctico (a la izquierda) y polipropileno sindiotáctico (a la derecha).	28
2.7. Hidratación y deshidratación de poliNIPAAm por debajo y por encima de su LCST.	30
2.8. Esquema de la formación de biofilm.	39
5.1. Esquema de la reacción para injertar NIPAAm y APMA de manera simultánea mediante preirradiación oxidativa.	55
5.2. Mecanismo de formación de peróxidos sobre PP.	56
5.3. Mecanismo de iniciación de la polimerización de NIPAAm y APMA sobre PP.	57
5.4. Mecanismo de propagación de la polimerización de NIPAAm y APMA sobre PP.	57
5.5. Mecanismos de terminación de la polimerización de NIPAAm y APMA sobre PP.	58
5.6. Porcentaje de injerto de NIPAAm y APMA sobre películas de PP en función de la dosis de preirradiación.	59
5.7. Porcentaje de injerto de NIPAAm y APMA sobre películas de PP en función de la concentración de monómeros.	60

5.8. Por ciento de injerto de NIPAAm y APMA sobre películas de PP en función de la relación entre concentraciones de monómeros NIPAAm:APMA.	61
5.9. Por ciento de injerto de NIPAAm y APMA sobre películas de PP en función del tiempo de reacción.	63
5.10. Esquema de las cadenas injertadas con diferentes concentraciones y soluciones.	64
5.11. Espectros FTIR-ATR de los sistemas estudiados.	66
5.12. Espectros de FTIR-ATR normalizados.	68
5.13. Espectro de XPS de PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA).	69
5.14. Gráfica de hinchamientos límite.	70
5.15. Angulo de contacto para obtener la LCST.	71
5.16. Hinchamiento para obtener la LCST.	72
5.17. DSC para obtener la LCST.	73
5.18. Termogramas de calorimetría diferencial de barrido.	75
5.19. Imágenes de SEM.	76
5.20. Ensayo de hemólisis.	79
5.21. Ensayo de trombogenicidad.	80
5.22. Viabilidad celular.	81
5.23. Viabilidad celular con microscopia de fluorescencia confocal láser.	82
5.24. Expresión de IL-1 α	84
5.25. Expresión de TNF- α	84
5.26. Diclofenaco cargado en función de la cantidad de APMA.	85
5.27. Perfiles de carga de diclofenaco e ibuprofeno.	87
5.28. Recubrimiento con carboximetil dextrano (CM-dextrano).	88
5.29. Perfiles de liberación de diclofenaco e ibuprofeno.	90
5.30. Perfiles de liberación de diclofenaco de películas con diferentes porcentajes de injerto.	91
5.31. Ácido nalidíxico cargado en función de la cantidad de APMA.	93
5.32. Perfiles de carga de ácido nalidíxico.	93
5.33. Recubrimiento con carboximetil dextrano (CM-dextrano).	94
5.34. Perfiles de liberación de ácido nalidíxico de películas con diferentes porcentajes de injerto.	95
5.35. Zonas de inhibición en contra de <i>E. coli</i>	98

Índice de cuadros

1.1. Estímulos ambientales.	12
2.1. Rangos aproximados para radiaciones de 1 MeV.	21
2.2. Principales variables del material que pueden influir en la respuesta del anfitrión y características de la respuesta a los biomateriales.	34
2.3. Instrumentos de cateterización y partes de un catéter.	35
2.4. Ventajas de las estrategias de liberación de fármacos locales sobre las terapias sistémicas.	37
5.1. Asignación de las bandas más representativas de infrarrojo para PP-g-(NIPAAm-r-APMA).	67
5.2. Contenido atómico elemental de las películas de PP, PP-g-NIPAAm y PP-g-(NIPAAm-r-APMA) calculadas por XPS.	69
5.3. Análisis térmico (DSC y TGA).	74
5.4. Coeficiente de fricción.	78
5.5. Absorción de BSA.	78
5.6. Cantidades cargadas de antiinflamatorios.	86
5.7. Porcentajes liberados de antiinflamatorios a diferentes tiempos.	89
5.8. Cantidades cargadas de ácido nalidíxico.	92
5.9. Porcentajes liberados de ácido nalidíxico a diferentes tiempos.	96
5.10. Diámetros de las zonas de inhibición en contra de <i>E. coli</i>	97

Introducción

Polímeros como las proteínas, polisacáridos y ácido nucleicos están presentes en los sistemas vivos como componentes básicos. Polímeros sintéticos, los cuales son diseñados para imitar esos biopolímeros, han sido desarrollados en una variedad de formas y funcionalizaciones para satisfacer las aplicaciones industriales y científicas.^[1] Los polímeros sintéticos se pueden clasificar en diferentes categorías basados en sus propiedades químicas y aplicaciones en varias áreas. Algunos tipos especiales de polímeros han surgido como una clase muy útil de materiales y han sido acuñados con diferentes nombres, basados en sus propiedades físicas y químicas como los polímeros con respuesta a un estímulo^[2], polímeros inteligentes^[3, 4] o polímeros sensibles ambientalmente.^[5] Estos sistemas poliméricos reconocen un estímulo como una señal, reaccionan a la magnitud de ésta señal y después cambian la conformación de su cadena en respuesta directa. Hay muchos diferentes tipos de estímulos para modular la respuesta de los sistemas poliméricos. Estos estímulos pueden clasificarse como estímulos físicos o químicos^[6] (Tabla 1.1).

Químicos	Físicos	Bioquímicos
pH	Temperatura	Sustratos enzimáticos
Iones específicos	Fuerza iónica	Ligantes afines
Agentes químicos	Solventes	Agentes bioquímicos
	Radiación electromagnética	
	Campo eléctrico y magnético	
	Estrés mecánico	
	Radiación sónica	

Tabla 1.1: Estímulos ambientales.

Las aplicaciones biomédicas de hidrogeles con respuesta a la temperatura comenzaron a atraer la atención en la década de los 80's, particularmente basándose en el trabajo del grupo de Hoffman.^[7] Los hidrogeles son comúnmente usados en la clínica práctica y medicina experimental en una amplia variedad de aplicaciones, incluyendo ingeniería de tejidos y medicina regenerativa^[8], diagnóstico^[9], inmovilización celular^[10], separación de biomoléculas o células^[11] y acarreadores de fármacos.^[12] Muchos de estos dispositivos, beneficiarían particularmente las áreas biomédica y biotecnológicas si se logra un control efectivo de las interacciones moleculares y celulares en la superficie del material.^[13] Los sistemas poliméricos de liberación de fármacos pueden ser utilizados para maximizar la actividad terapéutica, minimizando los efectos colaterales a través del control temporal y local de la liberación del fármaco.

Estos polímeros pueden tomar muchas formas; pueden estar disueltos en solución acuosa, adsorbidos o injertados sobre interfaces sólido-líquido o sobre películas, o entrecruzados en forma de hidrogeles. Cuando un polímero es estimulado hasta un valor crítico, éste presentará una respuesta, dependiendo de la forma física en que se encuentre; los polímeros inteligentes en solución muestran un cambio repentino de turbidez como una fase separada; las superficies absorbentes o polímeros inteligentes injertados colapsarán, convirtiendo la superficie de hidrofílica a hidrofóbica. Los polímeros inteligentes entrecruzados en forma de hidrogel muestran un colapso en un rango muy pequeño, en el cual liberan una gran cantidad de la solución que hincha este hidrogel (Fig. 1.1). Este fenómeno de hinchamiento es reversible cuando el estímulo es inverso, aunque la tasa de reversibilidad a menudo es lenta cuando el polímero es redisuuelto o el gel es rehinchado en medio acuoso.

Hay muchas formas para modificar las propiedades de un polímero como mezclado, curado e injertado (Fig. 1.2). El mezclado es la combinación física de dos o más polímeros para obtener las propiedades adecuadas, mientras que el curado es un recubrimiento polimérico. Por otro lado, el injerto es un método donde uno o varios monómeros se polimerizan quedando covalentemente enlazados a otra cadena polimérica.^[14]

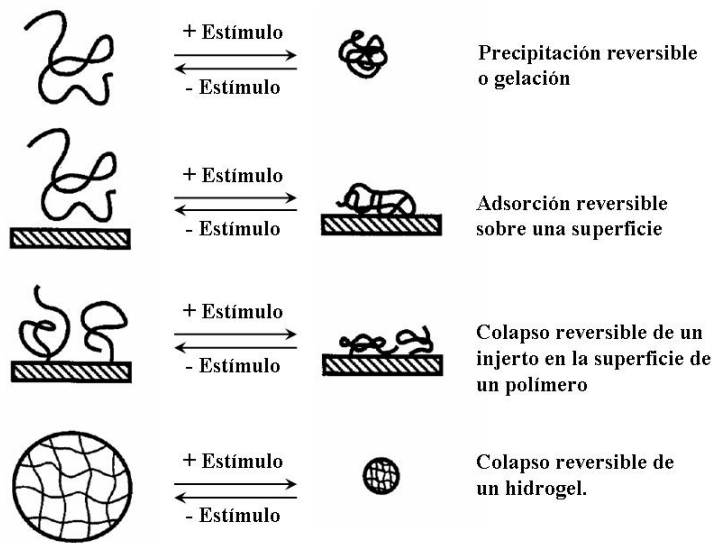


Figura 1.1: Diferentes tipos de respuestas de sistemas poliméricos sensibles a estímulos ambientales.

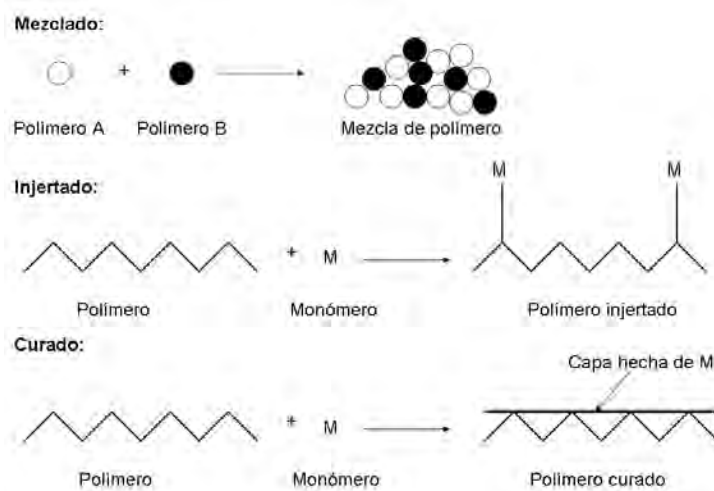


Figura 1.2: Métodos de modificación de polímeros.

La copolimerización de injerto utilizando radiación ionizante es una tecnología establecida hace mas de 50 años. La modificación de superficies poliméricas por copolimerización de injerto, ofrece un gran número de nuevos materiales con propiedades únicas, además de utilizar sistemas de monómeros libres de aditivos, particularmente iniciadores, con lo cual se pueden lograr copolímeros de injerto con alta pureza. Las propiedades superficiales del polímero injertado están frecuentemente en contraste a las propiedades de el polímero original. Muchos de los polímeros industriales son hidrofóbicos, sin embargo a través de la introducción de nuevos grupos funcionales en la superficie, se pueden lograr propiedades como son hidrofiliidad, adhesión, biocompatibilidad, conductividad y repelencia.^[15]

En resumen la modificación de polímeros por medio de radiación es una forma eficaz de obtener materiales, que con la introducción de monómeros con propiedades adecuadas se comporten como sistemas inteligentes, que pueden ser aplicados en amplios campos de la ciencia y la industria.

Generalidades

2.1. Que son los polímeros

Los polímeros son moléculas muy grandes (macromoléculas) que se construyen a partir de unidades pequeñas llamadas monómeros. Los arreglos de éstas unidades, los varios tipos de cadenas en que pueden ser sintetizados y las formas en que éstas cadenas pueden doblarse sobre sí mismas dan como resultado una clase de materiales con propiedades características. Algunos de estos polímeros son únicos y debemos ver que es simplemente una consecuencia del tamaño y estructura de la cadena.^[16]

El tamaño y la forma de los polímeros están íntimamente relacionados con sus propiedades. La forma del polímero está también relacionada con los varios tamaños de las unidades que forman la macromolécula y varias fuerzas de enlace primarias y secundarias que están presentes dentro de la cadena y entre cadenas.

Los polímeros se pueden clasificar como lineales, ramificados y reticulados (Fig. 2.1). Un polímero lineal no tiene ramificaciones, solamente los grupos pendientes asociados al monómero. Los copolímeros de injerto, son polímeros ramificados, sin embargo los polímeros ramificados no son necesariamente copolímeros de injerto. Las redes son polímeros en los que las cadenas principales están unidas por cadenas poliméricas o moléculas entrecruzantes.

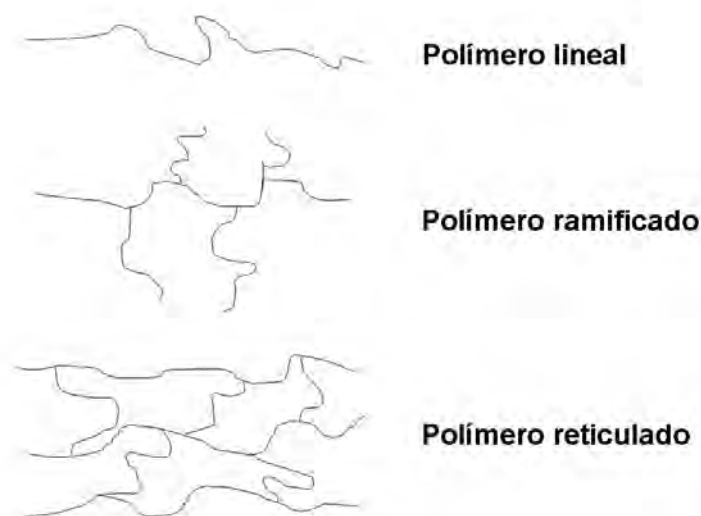


Figura 2.1: Esquema de tipos de polímeros.

2.1.1. Copolímeros

Un polímero preparado con un solo monómero es llamado *homopolímero*. Si se emplean dos monómeros, el producto es un *copolímero*. A los copolímeros en los que las unidades monoméricas están distribuidas aleatoriamente se les llama *copolímeros al azar*, en orden alternado se llaman *copolímero alternado* y ordenados en bloques se les llama *copolímero en bloque*. Un *copolímero de injerto* consiste de una cadena principal de un polímero ramificado con otro (Fig. 2.2).^[17]

2.2. La radiación

Las radiaciones ionizantes de alta energía usadas para iniciar reacciones químicas incluyen radiación de radiosótopos naturales y artificiales (α , β y γ), rayos-X y haces de partículas cargadas; éstas últimas incluyen haces de electrones y haces de partículas cargadas positivamente. De éstas, la radiación γ y los haces de electrones son los más empleados en aplicaciones con procesos de radiación.^[18]

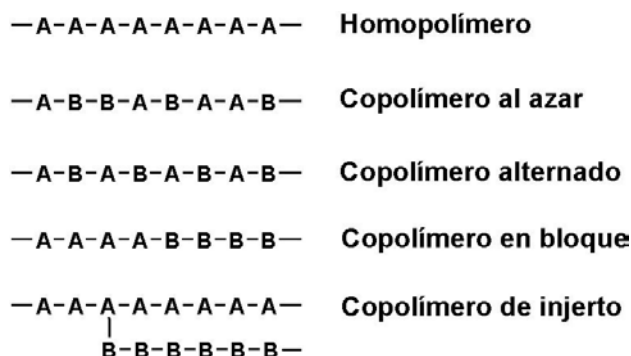


Figura 2.2: Representación de homopolímero y copolímeros.

2.2.1. Fuentes de radiación

Las fuentes de radiación de alta energía pueden ser de tres tipos: isótopos radiactivos naturales y artificiales, aceleradores de partículas y reactores nucleares. Las fuentes de radiación naturales son radio y radón. Los radioisótopos artificiales utilizados son cobalto-60, cesio-137 y estroncio-90/itrio-90. Los aceleradores de partículas incluyen generadores de rayos-X, aceleradores de electrones de varios tipos, aceleradores como el Van der Graaff y ciclotrones usados para generar haces de iones positivos. Los reactores nucleares se usan también como fuentes de radiación. Todos estos tipos de fuentes se han utilizado como fuentes de radiación ionizante con las que se pueden hacer modificaciones a nivel molecular.^[19]

El isótopo más frecuentemente utilizado como fuente de radiación es el cobalto-60 (Co^{60}). Este radioisótopo presenta ventajas como su disponibilidad y en sus propiedades como son: rayos γ de alta energía y una vida media de 5.27 años. La reacción que se utiliza para la formación de Co^{60} es la captura de neutrones por el Co^{59} . Se llevan a cabo dos reacciones de captura (Fig. 2.3).

2.2.2. Características de la radiación

La radiación utilizada en aplicaciones particulares depende de la naturaleza y tamaño de los objetos a ser irradiados, así como de la penetración necesaria, dado que los diferentes tipos de radiación presentan diferentes

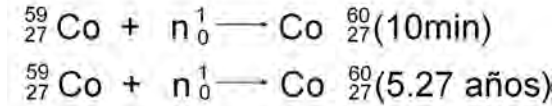


Figura 2.3: Reacciones de captura para formar cobalto⁶⁰.

perfiles de profundidad-dosis. Por ejemplo, sistemas en fase gas pueden ser irradiados uniforme y eficientemente con electrones, mientras que la irradiación uniforme de muestras sólidas y líquidas requieren generalmente radiaciones más penetrantes como γ y X. La radiación menos penetrante (rayos α y β) se utiliza si la reacción se reduce a capas superficiales de una muestra sólida.

2.3. Tipos de radiación

Los principales tipos de radiación ionizante que se utilizan para iniciar reacciones químicas son: rayos α , β , y γ .

2.3.1. Rayos γ

Los rayos X y γ son radiaciones electromagnéticas que se diferencian sólo en la manera en que se producen. Los rayos γ son producidos por reacciones nucleares, mientras que los rayos x son producidos por la excitación o transiciones de electrones en orbitales o por la desaceleración de electrones. Un fotón de ambos tipos de radiación tiene energía:

$$E = \frac{hc}{\lambda} = h\nu$$

donde h es la constante de Plank, c es la velocidad de la luz, y λ y ν son la longitud de onda y la frecuencia de la radiación. Las longitudes de onda para éste rango de radiación van de 3×10^{-9} a 3×10^{-14} cm, y corresponden

a energías de 40 keV a 4 MeV (Fig. 2.4).

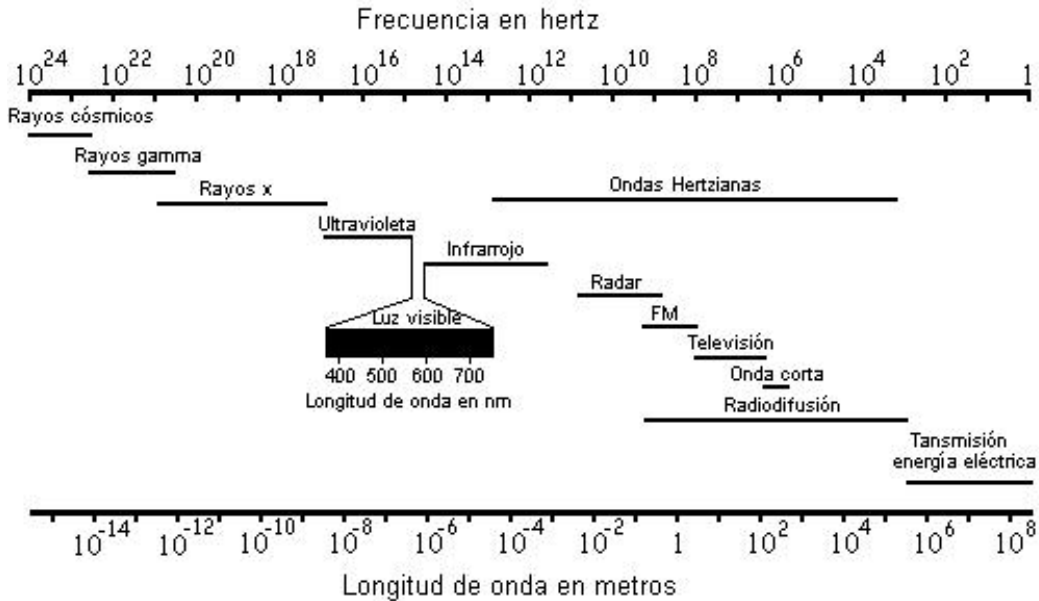


Figura 2.4: Espectro electromagnético.

Mientras las partículas α y β pierden energía gradualmente, cada fotón γ pierde una gran parte de su energía con un simple interacción. Entonces, mientras las partículas monoenergéticas α y β decaen con materiales absorbentes delgados, algunos de los fotones γ incidentes son absorbidos completamente y el resto son transmitidos con su cantidad de energía inicial. La penetración de los rayos γ es mayor que la penetración de los rayos α y β debido a que no son partículas y la interacción con la materia es menos probable (Tabla 2.1).

Tipos de radiación	Alcance de partícula	Penetración	
		En agua (cm)	En aire (cm)
β o electrón	Rango variable	0.5	400
α	Rango variable	0.0005	0.2
rayos γ o x	Capa hemireductora	10	7000

Tabla 2.1: Rangos aproximados para radiaciones de 1 MeV.

2.4. Injertos radiolíticos de monómeros sobre películas poliméricas

Una de las razones por las cuales los copolímeros de injerto son de interés para la química de polímeros es, que una película o fibra puede ser injertada superficialmente con ramificaciones de otro monómero, para incrementar la hidrofiliidad o hidrofobicidad de la superficie, la capacidad de pintarse, la resistencia a los disolventes, la resistencia a la luz, etc. Frecuentemente el injerto de un monómero sobre la superficie de un polímero, o dentro del polímero a cierta profundidad, produce cambios significativos en las propiedades físicas del polímero. La síntesis de copolímeros de injerto se basa en la producción de sitios activos en la cadena principal del polímero original. Las unidades de monómero se adicionan sucesivamente a cada sitio activo, produciendo cadenas largas del monómero injertado por medio de un mecanismo vía radicales libres.

2.4.1. Injertos iniciados por técnicas de radiación

Se han desarrollado muchas técnicas de injerto para copolimerizar diferentes tipos de monómeros sobre cadenas poliméricas. Estas técnicas son: química, por radiación, fotoquímica, inducidas con plasma y enzimática. La cantidad de un monómero que polimeriza sobre un sustrato se expresa en términos del rendimiento de injerto, también nombrado *grado de injerto*. Este valor es simplemente el peso del polímero injertado como un porcentaje del peso del sustrato polimérico original. Por ejemplo, un rendimiento de injerto de 50 % significa que el copolímero injertado es el 50 % en peso del sustrato inicial.^[20]

2.4.2. Injertos por radicales libres

Al irradiar macromoléculas se producen fisiones homolíticas y, entonces, se forman radicales en el polímero. En las técnicas de irradiación no es necesaria la presencia de un iniciador. El medio es muy importante en este caso, por ejemplo si se lleva a cabo en presencia de aire, pueden formarse peróxidos en el polímero. El tiempo de vida de los radicales libres depende de la naturaleza de la matriz polimérica. Existen tres métodos para injertar usando radiación: preirradiación, preirradiación oxidativa e irradiación directa. En la técnica de preirradiación, la matriz polimérica se irradia al vacío o en presencia de un gas inerte para formar radicales libres. Al polímero irradiado se le adiciona el monómero, en estado líquido, como vapor o como una disolución en un disolvente adecuado para obtener el injerto. En el método de preirradiación oxidativa, la matriz polimérica se somete a radiación de alta energía en presencia de oxígeno o aire, para formar hidroperóxidos y alquilperóxidos, dependiendo de la naturaleza de la matriz polimérica y las condiciones de irradiación. Los productos tipo peróxido estables se tratan con el monómero a altas temperaturas para descomponer los grupos peróxido e hidroperóxido a radicales peroxi, los cuales iniciarán el injerto. La ventaja de ésta técnica es que los productos peroxi intermediarios, se pueden almacenar por largos periodos de tiempo antes de llevar a cabo el injerto. En el método directo de injerto, la matriz polimérica y el monómero se irradian al mismo tiempo en un mismo recipiente formando los radicales libres y, a continuación, se adiciona el monómero obteniendo mayores porcentajes de injerto que con el método de preirradiación oxidativa. Dado que en los métodos de preirradiación, los monómeros no se exponen a la radiación, se tiene la ventaja de formar poco homopolímero mientras que en el método directo se favorece la formación de homopolímero. Sin embargo en el método de preirradiación, se puede producir la ruptura de las cadenas de la matriz polimérica a injertar debido a la irradiación directa, lo cual puede llevar a la formación de copolímeros en bloque (Fig. 2.5).

Naturaleza de la matriz polimérica

Como el injerto implica la unión covalente de un monómero a una cadena polimérica ya formada, la naturaleza de la cadena principal (estructura física y composición química) tiene un papel importante en el proceso. Ng et

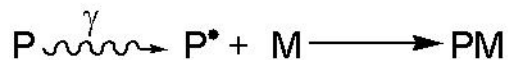
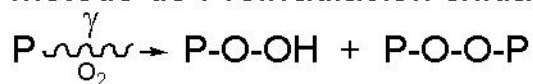
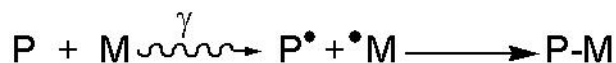
Método de Preirradiación**Método de Preirradiación oxidativa****Método directo**

Figura 2.5: Tipos de injerto por radiación.

al.^[21] concluyeron que mientras la celulosa es resistente a las reacciones de injerto en agua debido a su insolubilidad, en la lana que presenta una mayor absorción de radiación UV, el gran tamaño de las cadenas poliméricas enlazadas entre residuos de aminoácidos, uniones de cisteína y puentes de hidrógeno intramoleculares son responsables de la forma y características de ese material, aún siendo formado por celulosa en su cadena principal. Ibrahem y Nada^[22] reportaron la disminución de la cristalinidad con un incremento en el grado de sustitución, afectando el injerto de acrilamida en pulpa de madera acetilada. Como la cristalinidad disminuye, la estructura es menos ordenada y se facilita la reacción de injerto. Esto ha sido atribuido a la incapacidad del monómero de injerto para penetrar en los cristales y acceder a los radicales formados. Una consecuencia de este comportamiento es la formación de injertos sin uniformidad en la superficie.

Efecto del disolvente y concentración de monómero

En los mecanismos de injerto, el disolvente actúa como transportador de los monómeros hacia la vecindad de la cadena a injertar. La elección del disolvente depende de varios factores, como la solubilidad del monómero en el

disolvente, su capacidad de hinchar la matriz polimérica, la miscibilidad si se utiliza más de un disolvente y la generación de radicales libres en presencia del disolvente. La adición de disolvente a un monómero o combinación de monómeros puede aumentar el rendimiento en el injerto inducido por radiación y determina la naturaleza específica del copolímero de injerto.^[23] La penetración del monómero a injertar dentro de un sustrato es un factor importante cuando se preparan superficies injertadas por química orgánica en estado sólido y depende frecuentemente del disolvente utilizado así como la concentración de monómero. Es común observar el efecto Trommsdorff en injertos de estireno sobre poliolefinas^[24] o de NIPAAm sobre celulosa.^[25] Este fenómeno fue observado por primera vez en la polimerización de metacrilato de metilo usando peróxido de benzoilo, en la cual la velocidad de polimerización aumenta espontáneamente aproximadamente al 20-25 % de conversión.^[26] Esto se explica por la difusión restringida de las cadenas en proceso de crecimiento molecular, que obstaculiza la terminación por combinación con otras cadenas en crecimiento sin perturbar apreciablemente la difusión del monómero. En presencia de agua, los grupos PP-OOH experimentan hinchamiento, lo que facilita el acceso del monómero a los sitios activos en el caso de injertos de acrilonitrilo sobre polipropileno isotáctico.^[27] Como la constante de transferencia de cadena del agua es igual a cero, las reacciones secundarias son mínimas. Entonces el agua es un excelente medio de injerto.

Al igual que la naturaleza de la matriz polimérica, la reactividad de los monómeros también es importante. La reactividad de los monómeros depende de varios factores, como la polaridad, el efecto estérico, la capacidad de hinchar de la matriz polimérica en presencia de los monómeros y la concentración de monómeros. Cuando se varía la concentración de monómero, se encuentra un máximo en el rendimiento de injerto. Este comportamiento se atribuye a un incremento en la difusión del monómero y, por lo tanto, en la región de injerto. Por encima de la concentración máxima hay una formación de homopolímero muy significativa, que resulta en la obstrucción de la difusión del monómero. Si la viscosidad es suficientemente alta para prevenir la difusión del monómero, entonces la terminación también se impedirá debido a la limitada movilidad de las cadenas en crecimiento. Sin embargo, la disminución del rendimiento de injerto al aumentar la viscosidad está relacionado con un incremento en la recombinación de radicales iniciales en la matriz polimérica.^[28]

Efecto de la dosis de irradiación y de la intensidad de dosis

El rendimiento de injerto aumenta con el total de dosis de irradiación, como demostró Chapiro^[29, 30] para el teflón. A bajas dosis los rendimientos de injerto son aproximadamente lineales dependiendo de la dosis para el injerto de DMAAm y NIPAAm sobre PVDF.^[31] Sin embargo, a dosis altas la pendiente de las graficas de rendimiento de injerto en función de la dosis de irradiación puede disminuir.^[32] Las causas más probables de la disminución en la pendiente a altas dosis de irradiación son (1) dosis de saturación en la formación de radicales en el sustrato y (2) incremento en la probabilidad de reacciones de terminación en los radicales monoméricos. El rendimiento de injerto es independiente de la intensidad de dosis a bajas intensidades. Sin embargo, a altas intensidades de dosis la velocidad de injerto disminuye cuando aumenta la intensidad de dosis. Hay varias posibles razones para la disminución de la velocidad de injerto a altas intensidades de dosis, entre ellas, la radiación a altas intensidades de dosis induce cristalización en el sustrato polimérico y aumento en el rendimiento de la reacción de homopolimerización. Además, el rendimiento de radicales depende de la intensidad de dosis en el proceso de injerto.^[20]

Efecto de la temperatura

La temperatura es uno de los factores más importantes que controlan el inicio en la copolimerización de injerto. En general, el rendimiento de injerto es más alto cuando se incrementa la temperatura, hasta un cierto límite, ya que una temperatura muy alta puede provocar un decaimiento muy rápido de los radicales libres. Un factor que se ve afectado por la temperatura es la velocidad de difusión monomérica en la matriz polimérica, que aumenta cuando se incrementa la temperatura facilitando el injerto.^[33] Al aumentar la temperatura se incrementa la rapidez de descomposición térmica del iniciador (peróxidos en el caso de la preirradiación oxidativa), resultando en un incremento en la concentración de macroradicales y la polimerización de injerto. Una observación interesante es que el máximo rendimiento de injerto ocurre a una temperatura cercana a la T_g . Para temperaturas por debajo de la T_g , los radicales formados en las cadenas poliméricas no pueden reaccionar debido a la reducida difusión del monómero, mientras que para temperaturas

superiores a la T_g , el número de radicales disponibles para injertarse disminuye con el aumento de la temperatura.

2.5. Temperatura crítica de solución (LCST)

Entre los polímeros inteligentes, algunos tienen respuesta a la temperatura. Dentro de éste tipo de estímulo, la respuesta más importante es la que se observa en la LCST. La mayoría de las macromoléculas sintéticas se vuelven más solubles cuando se calientan. Otros se separan de la disolución cuando son calentados. Esta inusual propiedad, llamada solubilidad inversa dependiente de la temperatura, es característica de polímeros, que se disuelven cuando son enfriados y se separan de su fase cuando son calentados por encima de una temperatura de transición de fase, conocida como temperatura crítica de solución inferior (LCST). Esta temperatura corresponde a la región en un diagrama de fases donde la contribución entálpica del agua enlazada a la cadena polimérica por puentes de hidrógeno se vuelve menor que la entropía ganada por el sistema en total. La LCST depende en gran medida de la capacidad de las unidades de monómero para formar puentes de hidrógeno. Una explicación simple es que la entalpía de disolución (ΔH), debida a los puentes de hidrógeno de los sitios básicos en el polímero con el disolvente favorece la disolución. En contraste, la organización entrópica (ΔS) del disolvente, requerida para lograr la formación de éstos puentes de hidrógeno es desfavorable. Dado que la energía libre de solución es igual a $\Delta H - T\Delta S$, ésta puede cambiar de un valor negativo (favorable) a un valor positivo (desfavorable) cuando se incrementa la temperatura. Entonces, los polímeros que se sabe, muestran una LCST tienen interacciones muy fuertes con disolventes como el agua. La temperatura, a la cual ocurre la separación de fases de un polímero sintético de la solución, puede ser cambiada por modificaciones en la estructura del polímero. Los polímeros sensibles a la temperatura experimentan cambios conformacionales y de fase en respuesta a pequeñas variaciones de temperatura. Hay un balance de energía libre bastante delicado que implica interacciones hidrofóbicas, hidrofílicas y puentes de hidrógeno, lo cual determina el valor de la LCST de polímeros en agua.^[34]

La LCST, un comportamiento característico de las macromoléculas lineales y de los polímeros entrecruzados hinchados en solución que tienen un gran potencial para aplicaciones. En sistemas acuosos, que son los que tienen

más aplicaciones, la LCST se localiza experimentalmente a temperaturas convenientes sólo por un pequeño número de polímeros, de los cuales la poli N-isopropilacrilamida (PNIPAAm) ha sido la más estudiada.

2.6. Matriz polimérica y monómeros

2.6.1. Polipropileno (PP)

Pertenece al grupo de las poliolefinas y se utilizan en una amplia variedad de aplicaciones que incluyen empaques para alimentos, tejidos, equipo de laboratorio, industria del automóvil y películas transparentes. Tiene gran resistencia a diversos solventes químicos, así como frente a ácidos y bases.

El polipropileno es uno de los plásticos con mayor crecimiento en los últimos años y se prevé que su consumo continúe creciendo más que el de los otros polímeros termoplásticos (PE, PS, PVC, PET). En 2005 la producción y el consumo de PP en la Unión Europea fue de 9 y 8 millones de toneladas, respectivamente, un volumen sólo inferior al del PE.

El polipropileno experimenta entrecruzamiento y ruptura de cadena cuando se irradia y la incidencia relativa de los dos procesos depende del grado de cristalinidad. El polipropileno estereoregular se entrecruza menos que el polietileno, incluso cuando se incorpora un agente entrecruzante.

El procedimiento de síntesis de polímeros estereoregulares fue desarrollado por Natta y col. en 1954. Los análisis de rayos-X permitieron determinar las constantes de red del polipropileno cristalino (Fig. 2.6).

La estructura helicoidal de las cadenas de un polímero permite la repetición de unidades con configuraciones idénticas respecto a un eje por lo que se tienen cadenas con conformaciones equivalentes. El estudio de las conformaciones espaciales de cadenas poliméricas y de la relación entre la organización molecular y las propiedades físicas se inició a partir del descubrimiento de polímeros estereoregulares como el polipropileno isotáctico.^[35]

El polipropileno es uno de los materiales poliméricos termoplásticos más

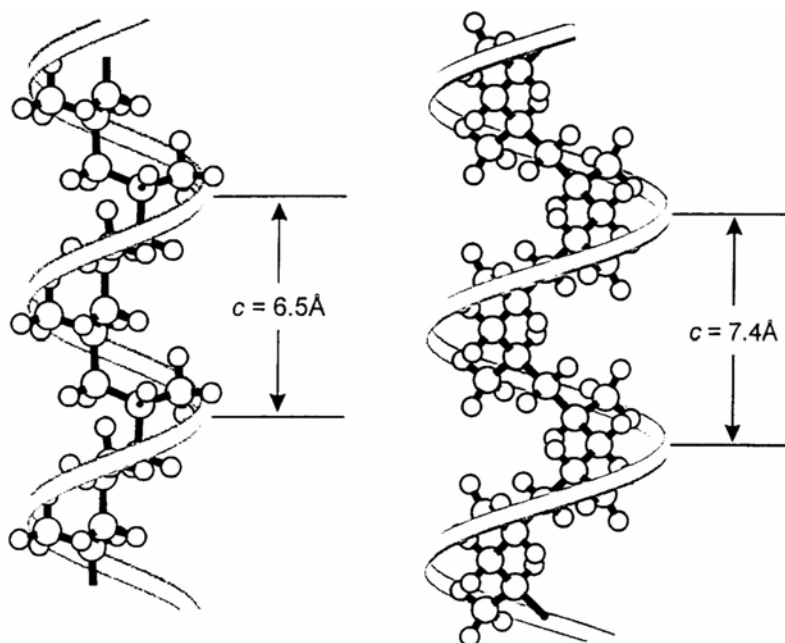


Figura 2.6: Modelo de hélice de polipropileno isotáctico (a la izquierda) y polipropileno sindiotáctico (a la derecha).

importantes por las buenas propiedades mecánicas y su amplio rango de aplicaciones en forma de telas, fibras, películas y plásticos. Sin embargo su baja funcionalidad limita su interés para muchas aplicaciones. Para resolver éste problema se introducen polímeros funcionalizados por copolimerización de injerto, conservando las propiedades físicas del PP.

Se han aplicado numerosos métodos para obtener copolímeros de injerto con PP, como iniciación química, radiación UV y radiación de alta energía. La técnica de copolimerización de injertos inducidos con radiación de alta energía se ha utilizado ampliamente para funcionalizar PP y otros polímeros sintéticos.

Las reacciones de copolimerización de injerto iniciadas por radiación γ se llevan a cabo por métodos de preirradiación oxidativa y de irradiación directa. Con el método de preirradiación para injertar 4-vinilpiridina, estireno y acrilonitrilo sobre PP se obtiene un producto final de alta estabilidad térmica. El método de irradiación directa da lugar predominantemente a una reacción

de homopolimerización, a veces dificultando el aislamiento del copolímero de injerto. Para obtener mejores rendimientos de injerto y disminuir el grado de homopolimerización se usa el método de preirradiación oxidativa.

Las excelentes propiedades del PP, propiedades mecánicas, transparencia, bajo costo, durabilidad, resistencia al ambiente y a la fotodegradación, resistencia a ataques biológicos, han contribuido a su gran utilidad en diferentes aplicaciones. En el campo biomédico, este material se utiliza como componente en dispositivos como, jeringas, catéteres, viales, bolsas de transfusión sanguínea o dializadores.^[36, 37]

2.6.2. N-isopropilacrilamida (NIPAAm)

El poli(NIPAAm) es uno de los polímeros sensibles a la temperatura más ampliamente estudiados. El poli(NIPAAm) presenta un comportamiento peculiar en medio acuoso. Cuando el polímero se encuentra en solución, tiene una solubilidad inversa y presenta cambios de hidratación-deshidratación muy marcados en respuesta a cambios de temperatura relativamente pequeños. Presenta una LCST cercana a los 32 °C. Las cadenas hidratadas de poli(NIPAAm) forman estructuras expandidas cuando la temperatura es menor a su LCST, que se convierten en estructuras compactas por la deshidratación cuando se eleva la temperatura por encima de su LCST. Las transiciones fase-volumen producen cambios dramáticos en las propiedades físicas de los geles de poli(NIPAAm), y sus copolímeros han sido investigados como componentes de sistemas de liberación de fármacos, cultivos celulares, membranas, superficies reversibles y en la inmovilización de enzimas^[38] (Fig. 2.7).

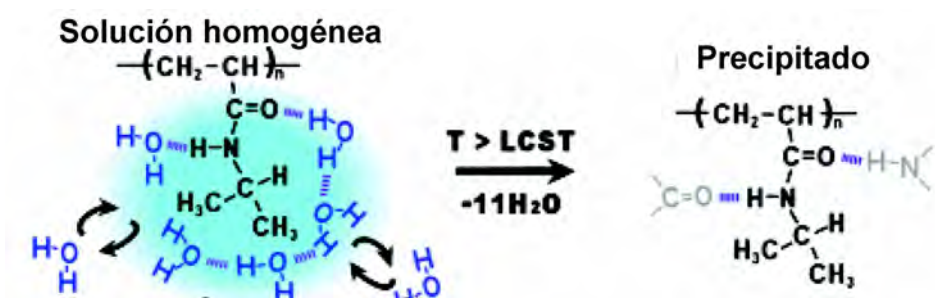


Figura 2.7: Hidratación y deshidratación de poliNIPAAm por debajo y por encima de su LCST.

Las superficies que cambian sus propiedades en respuesta a la temperatura se utilizan para aplicaciones biomédicas^[39], cromatográficas^[40] y como sistemas de fijación en recipientes para cultivos celulares^[41]. El poli(NIPAAm) se ha investigado ampliamente para desarrollar superficies e interfaces inteligentes con respuesta a la temperatura.

Cuando el poli(NIPAAm) se copolimeriza con monómeros hidrofílicos el valor de la LCST se incrementa, e incluso puede desaparecer. En cambio, cuando se copolimeriza con monómeros más hidrofóbicos, el valor de la LCST disminuye como el caso de la *n*-butilacrilamida.

Las transiciones de fase de cadena colapsada y extendida de los polímeros con respuesta a la temperatura no tiene interés solo desde un punto de vista conceptual en física de polímeros y la dinámica de soluciones, sino también por su relevancia para interpretar el comportamiento de muchas moléculas biológicas, como las proteínas plegables^[42] y el ADN.^[43]

2.6.3. N-(3-aminopropil metacrilamida) · HCl (APMA)

El mayor problema en el desarrollo de polímeros biocompatibles es la compatibilidad con la sangre. Varias técnicas se han empleado para mejorar la hemocompatibilidad de los polímeros.^[44, 45] Para prevenir la formación de trombos se suele administrar heparina continuamente. Para evitar la administración sistémica de heparina, se puede incorporar heparina a la superficie polimérica por uniones iónicas y covalentes.^[46] Se ha demostrado

que las poliamido-aminas absorben selectivamente heparina del plasma o de la sangre formando complejos estables sin producir efectos adversos en las proteínas de la sangre ni en las células sanguíneas.^[47, 48] Se han injertado poli(acrilamida y APMA en superficies de filtros y oxigenadores destinados a estar en contacto con la sangre, para mejorar la hemocompatibilidad.^[49] APMA, que contiene un grupo amino protonable, se ha incorporado a hidrogeles de poli(hidroxietil metacrilato) para modular el comportamiento de la carga y la liberación de fármacos antiinflamatorios no esteroideos.^[50]

La acrilamida se ha copolimerizado con APMA para obtener polímeros funcionalizados con grupos amino.^[51] Al copolimerizar NIPAAm con APMA se puede modificar la LCST. La temperatura a la que se produce un cambio de fase es dependiente de la composición de los bloques de copolímero, de manera que los polímeros con bloques de NIPAAm largos tienen temperaturas de transición más bajas. Si la longitud del bloque de NIPAAm se mantiene constante y aumenta la longitud de los bloques de APMA se produce un aumento en la temperatura de transición.^[52]

2.7. Biomateriales poliméricos como dispositivos médicos

Los biomateriales son materiales biológicamente inertes o compatibles, de origen natural o hechos por el hombre, que se usan para controlar, suplir o reemplazar las funciones de tejidos del cuerpo humano.^[53] Hasta principios del siglo XX solo se utilizaron materiales de origen vegetal, mineral y animal para cerrar heridas y reparación dental. Durante más de 50 años, la creciente disponibilidad de materiales sintéticos, los avances en ingeniería de polímeros, las técnicas en cirugía y los tratamientos médicos, así como los métodos de esterilización cada vez más eficaces, han permitido desarrollar biomateriales para ser utilizados como dispositivos médicos.^[54] Los antibióticos y los inmunosupresores han disminuido el riesgo de infección y de rechazo, y las investigaciones sobre la estructura y la función de los biomateriales ha tomado un enfoque de ingeniería. Hoy en día los nuevos materiales duran más y funcionan mejor. Entre todos los biomateriales, los de naturaleza polimérica ofrecen una mayor versatilidad en cuanto a propiedades y procesado. En la

práctica médica de hoy en día se utiliza un gran número de dispositivos (marcapasos, biosensores, corazón artificial, tubos sanguíneos o catéteres) e implantes (suturas, placas óseas, reemplazos de articulaciones, ligamentos, injertos vasculares, válvulas cardíacas, lentes intraoculares o implantes dentales) a base de biomateriales, usados para reemplazar o restaurar la función de tejidos u órganos dañados para asistir en la curación, mejorar su funcionamiento, corregir anomalías y en consecuencia, mejorar la calidad de vida de los pacientes.^[55] En los últimos 30 años se han hecho considerables progresos en el entendimiento de las interacciones entre los tejidos y los materiales. Dado que existen profundas diferencias entre los materiales artificiales y naturales, se han acuñado las palabras “biomaterial” y “biocompatibilidad”^[56] para indicar el funcionamiento biológico de los materiales. Los materiales que son biocompatibles se llaman biomateriales. La biocompatibilidad es un término descriptivo que indica la capacidad de un material para desempeñar una función específica, con una respuesta adecuada del paciente.^[57]

2.7.1. Mecanismos de la biocompatibilidad

La característica más importante que distingue un biomaterial de cualquier otro material es su habilidad para coexistir en contacto con tejidos del cuerpo humano sin causar un daño significativo. Hay muchas vías diferentes por las que los materiales y los tejidos pueden interactuar de manera que esta coexistencia pueda verse comprometida. Los biomateriales se usan en situaciones cada vez más en diversas y complejas, y tienen aplicaciones en ingeniería de tejidos, sensores invasivos, acarreadores de fármacos, sistemas de transfección de genes, nanotecnologías medicamente orientadas y biotecnología en general y dispositivos médicos implantables. Sin embargo, la incertidumbre acerca de los mecanismos y las condiciones para conseguir biocompatibilidad constituye un serio impedimento para el desarrollo de estas nuevas tecnologías.

La biocompatibilidad se ha ocupado tradicionalmente de dispositivos implantables destinados a permanecer dentro de un individuo durante un cierto tiempo. Para los que desarrollaron y utilizaron la primera generación de dispositivos implantables, entre 1940 y 1980, se hizo evidente que el mejor rendimiento biológico se consigue con materiales químicamente poco reactivos.

Los sistemas a base de carbono y de acero de vanadio, susceptibles a la corrosión se sustituyeron por aceros inoxidable, y después por aleaciones de cobalto-cromo más resistentes, aleaciones de titanio y metales del grupo del platino. Entre los polímeros, los más accesibles y versátiles, nylon y poliésteres se sustituyeron por polímeros más resistentes a la degradación como PTFE, PMMA, polietileno, polipropileno y siliconas. Por lo tanto, los criterios de selección de biomateriales implantables ha evolucionado teniendo en cuenta una relación de eventos a evitar, la mayoría de ellos están relacionados con la liberación de productos de la corrosión o degradación, aditivos o contaminantes de los componentes principales del biomaterial y con su actividad biológica, local o sistémica. Los materiales se seleccionaron y se desarrollaron sobre la base de que no serían tóxicos, inmunogénicos, trombogénicos, cancerígenos ni irritantes. Para los dispositivos médicos implantables, las características del individuo en el que se coloca el dispositivo también tiene una considerable importancia, como consecuencia de la amplia variabilidad entre pacientes (edad, sexo, enfermedades concurrentes, movilidad física, estilo de vida y administración de medicamentos).^[58]

En la Tabla 2.2, se enumeran las características más importantes de los materiales que pueden influir en la respuesta del paciente, así como algunas reacciones que se pueden producir cuando el dispositivo entra en contacto con los tejidos.

2.7.2. Respuesta inflamatoria

La implantación de un biomaterial suele dar lugar a una respuesta inflamatoria. En una inflamación local no específica, el primer indicador *in vivo*, de que se sigue una respuesta sistémica aguda caracterizada por los cambios que provoca el estrés en los sistemas neuroendocrino e inmune y acompañado de ajustes metabólicos.^[59] La inflamación involucra una respuesta vascular, neurológica, humoral y celular, que es esencialmente la misma si la provocada un trauma mecánico, una infección microbiana, antígenos externos (proteínas, glicoproteínas, carbohidratos, materiales sintéticos) o electricidad, compuestos químicos o energía radiológica. Otra característica importante de la respuesta inflamatoria es la adhesión de leucocitos a las paredes de los vasos sanguíneos antes de migrar dentro de los tejidos. Esta adhesión altamente específica se controla por tres familias principales de receptores: selectinas, integrinas y miembros de la familia de la inmunoglobina.^[60] La respuesta

Variables del material	Respuestas a los biomateriales
Composición, microestructura y morfología	Absorción de proteínas
Cristalinidad y cristalografía	Citotoxicidad
Constantes elásticas	Activación de macrófagos
Solubilidad	Fibrosis
Hidrofilicidad	Cambios microvasculares
Composición química de la superficie	Respuesta de células específicas
Movilidad molecular de la superficie	Activación de la cascada de coagulación
Topografía	Adhesión plaquetaria
Energía superficial	Activación del complemento
Propiedades eléctricas de la superficie	Producción de anticuerpos
Parámetros de corrosión	Hipersensibilidad
Perfil de degradación	Genotoxicidad
Contaminantes y su toxicidad	Toxicidad reproductiva
	Formación de tumores

Tabla 2.2: Principales variables del material que pueden influir en la respuesta del anfitrión y características de la respuesta a los biomateriales.

en fase aguda y específica del sistema inmune comprende también una red compleja de citosinas y anticitosinas. En particular, participan interferón γ (IFN- γ)^[61], factor de necrosis tumoral (TNF)^[62] e interleuquinas 1 y 6.^[63] Estas linfoquinas (o sus receptores) se pueden detectar en los primeros 2-4 días en el sobrenadante del tejido o en la sangre periférica del lugar de aplicación del material polimérico.^[64]

2.7.3. Hemocompatibilidad

La compatibilidad sanguínea viene determinada por las interacciones en la interface material-sangre que dependen de la estructura química de la superficie del material. Esta afecta a la activación del complemento, el conteo de plaquetas, la absorción de proteínas y la estimulación de la coagulación de plasma. Las células endoteliales producen algunas sustancias con acción antitrombótica. La prostaciclina, inhibe la agregación plaquetaria, activa el tejido plasminógeno (tPA), y transformando plasminógeno en plasmina lo que conduce a la lisis de fibrina y sus antagonistas.^[65]

2.7.4. Dispositivos invasivos intravasculares transitorios

Un gran número de pacientes, entre ellos, los que se tratan con hemodiálisis, están en contacto con biomateriales debido a la inserción de un catéter en su sistema venoso. También se requieren biomateriales para la distribución de sustancias con fines nutricionales, de diagnóstico o terapéuticos, requiriéndose en algunos casos tiempos muy largos. La intervención puede ser central o periférica que no están exentas de riesgos de infección o trombosis. La compatibilidad sanguínea inherente del material del catéter es crítica para la selección de los materiales.^[66] Se sabe que la heparina sistémica es útil en algunas situaciones, lo que ha llevado al uso de catéteres fabricados con materiales recubiertos de heparina. El efecto se puede mejorar usando complejos covalentes de heparina con antitrombina.^[67, 68] Aunque la mayor parte de los estudios sobre los dispositivos invasivos se refieren a catéteres, en la práctica médica se utilizan otros instrumentos para facilitar la colocación de catéteres, con diversos componentes que deben ser seleccionados con criterios de biocompatibilidad. En la Tabla 2.3 se enumeran algunos instrumentos que se utilizan en las técnicas de cateterización, y que también son objeto de estudio en cuanto a su modificación superficial para encontrar los requisitos necesarios de biocompatibilidad.^[69]

Instrumentos de cateterización
Agujas
Guías
Dilatadores
Constantes elásticas
Fundas introductorias de catéteres
Catéter (cuerpo)
Cono (conexión)
Puntas

Tabla 2.3: Instrumentos de cateterización y partes de un catéter.

2.8. Aplicaciones médicas

El uso de hidrogeles como biomateriales ha ganado gran importancia dada su baja toxicidad y la alta biocompatibilidad.^[70] Una de las ventajas de los hidrogeles sensibles a estímulos radica en su capacidad para experimentar transiciones de fase de primer orden con el cambio de algún parámetro externo como pH, temperatura, fuerza iónica y campo eléctrico.^[71] Los polímeros inteligentes son materiales que perciben una modificación del entorno (sensor), experimentando un cambio conformacional proporcional al estímulo y de carácter reversible. Estos polímeros inteligentes tienen gran potencial en aplicaciones farmacéuticas e industria biotecnológica.^[72]

2.8.1. Dispositivos combinados

La combinación de dispositivos médicos con productos farmacéuticos representa una nueva tendencia en la terapéutica implantable. Los dispositivos combinados han atraído la atención de compañías farmacéuticas como una estrategia para superar complicaciones clínicas asociadas con la implantación. La liberación controlada de fármacos a nivel local, combinando productos farmacéuticos y dispositivos médicos ya ha encontrado aplicaciones en varias áreas, como las enfermedades cardiovasculares, la diabetes, la ortopedia y el cáncer.^[73] La combinación de fármacos con dispositivos médicos se puede diseñar como una estrategia coordinada para obtener efectos que se refuerzan mutuamente y proporcionar, en determinadas circunstancias, ventajas significativas sobre la administración de fármacos y dispositivos por separado en sus formas convencionales.^[74]

Los fármacos son clínicamente administrados por diversas vías: tópica (nasal, cutánea, ocular), oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, sublingual o se aplican a nivel local.^[75] Con la liberación local se busca alcanzar concentraciones terapéuticas de los fármacos únicamente en los sitios de interés durante tiempos prolongados, para producir el efecto farmacológico deseado.

Debido a numerosas ventajas (Tabla 2.4), a menudo se aplican estrategias de liberación local de fármacos para tratar la trombosis, osteomielitis, periodontitis, infecciones relacionadas con dispositivos biomédicos y otras pato-

logías microbianas, así como complicaciones inflamatorias refractarias a los métodos convencionales de administración sistémica de fármacos.

1. Se requieren bajas dosis
2. Control sobre la toxicidad y biodisponibilidad de la dosis
3. Menor susceptibilidad a desarrollar resistencia a antibióticos
4. Mayor tiempo de la liberación
5. Posibilidad de combinar fármacos locales y sistémicos con diferentes cinéticas
6. Liberación controlada de la superficies del dispositivo directamente al sitio de interés
7. Evitar la exposición sistémica del fármaco
8. Mitigación directa de posibles infecciones provenientes del dispositivo

Tabla 2.4: Ventajas de las estrategias de liberación de fármacos locales sobre las terapias sistémicas.

Un sistema de liberación de fármacos ideal debe (a) proveer dosis de manera continua en un sitio específico y (b) ofrecer la posibilidad para mantener la liberación durante un tiempo prolongado.^[76] La velocidad y la duración de la liberación del fármaco que se requiere depende del contexto clínico, incluyendo la terapia, enfermedad o patógeno, diseño del dispositivo, sitio del implante y mecanismos de eliminación del fármaco. En el caso de los antimicrobianos, también hay que considerar otros factores, como las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC; por sus siglas en inglés) de fármaco necesarias para prevenir complicaciones en infecciones o favorecer resistencia bacteriana.^[77] Por lo tanto, los perfiles de liberación local de antibióticos deben mostrar una liberación inicial muy rápida para contrarrestar cualquier riesgo de infección inmediatamente después de la implantación del dispositivo, seguido por un largo periodo de liberación lenta para mantener niveles eficaces e impedir una infección latente.^[78]

2.8.2. Infecciones relacionadas con dispositivos médicos

El uso de dispositivos médicos para implantación transitoria, como lentes de contacto, catéteres urinarios y tubos endotraqueales, y de dispositivos permanentes, como válvulas cardíacas, bobinas embólicas, injertos vasculares,

articulaciones, marcapasos, stents coronarios y para cirugía estética implica importantes riesgos de infección.^[79] A menudo se produce la colonización del dispositivo por agentes patógenos, lo que resulta en morbilidad del paciente y obliga a retirar el dispositivo llevando incluso, a provocar la muerte. Las bacterias invaden los dispositivos por dos mecanismos: (a) acceso directo al sitio del implante de patógenos exógenos de la piel, de instrumentación quirúrgica o del ambiente local, durante la colocación del dispositivo, o (b) bacterias oportunistas circulando sistémicamente, que pueden alterar espontáneamente su fenotipo para convertirse en patógenos en el sitio del implante.

Biofilm

Una vez que la bacteria se adhiere a una superficie, prolifera rápidamente y produce células hijas, que eventualmente forman colonias residentes. Muchos organismos patógenos, una vez adheridos, usan mecanismos de detección en grupo para adaptarse^[80, 81]; creando barreras protectoras en forma de películas, compuestas de complejos de mucopolisacáridos, conocidos como biopelículas o biofilms, que mejoran la estabilidad de la colonia y no sufren la respuesta inmune del organismo anfitrión. La formación de biofilm consta generalmente de varios pasos principales: depósito de los microorganismos, fijación por adhesión microbiana y anclaje a la superficie por producción de un exopolímero. Después de este proceso se produce su crecimiento, multiplicación y diseminación (Fig. 2.8).^[82]

Una vez que se forma el biofilm, las bacterias pueden convertirse en organismos satélites que se liberan del biofilm, migrando y adheriéndose a otras superficies no colonizadas. Mediante la señalización en grupo, la estructura del biofilm también facilita la comunicación entre células, promoviendo alteraciones fenotípicas, adaptación en contra de la respuesta del sistema inmune y mestizaje que promueve el intercambio genético, y procesos de resistencia a antibióticos.^[79] Las bacterias de una colonia de biofilm maduro y adherido resultan muy difíciles de eliminar, al ser poco sensibles a los antimicrobianos (resistencia intrínseca y extrínseca) o a los mecanismos del sistema inmunológico. En consecuencia, las bacterias de un biofilm pueden sobrevivir al uso de agentes antibacterianos a concentraciones de 1000-1500 veces más altas que las necesarias para erradicar bacterias planctónicas de la misma especie.^[83] La diseminación sistémica de infecciones inducidas por un

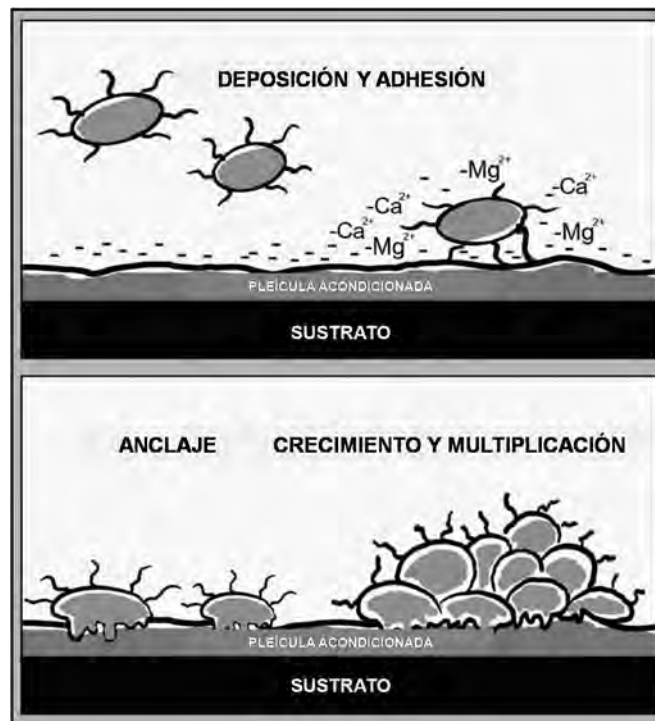


Figura 2.8: Esquema de la formación de biofilm.

implante es una complicación seria (sepsis). Por lo tanto, hay que remover el dispositivo frecuentemente para tratar la infección local y sistémicamente.^[84, 85]

Infecciones urinarias asociadas a catéteres

Las infecciones del tracto urinario son las infecciones bacterianas más comunes en humanos y representa el 40% de las infecciones nosocomiales. La epidemiología de la infección varía con el sexo, la edad y la presencia de patologías genitourinarias. Las infecciones del tracto urinario pueden limitarse a las vías inferiores o la vejiga (cistitis aguda) o implicar el riñón como una infección renal o del tracto superior (pielonefritis aguda). En hombres la próstata es otro lugar potencial de infección. Algunos grupos presentan excepcionalmente altas tasas de infección urinaria. Por ejemplo, las personas con catéteres crónicos son siempre bacteriúricos.^[86] Los pacientes con evacuación controlada por cateterización intermitente tienen una frecuencia de

infección de 30 a 70%.^[87] Las infecciones de tracto urinario asociadas al catéter son las infecciones más frecuente relacionadas con los cuidados de la salud. El uso de catéteres urinarios es muy común, a 1 de cada 5 pacientes admitidos en los hospitales para cuidados agudos se le inserta un catéter permanente. Las infecciones suelen ocurrir después de la colocación del catéter urinario; cada día de uso de catéter se asocia con un 8% de aumento en bacteriuria,^[88] que muchas veces no necesita cuidado especial y un 50% de los pacientes desarrolla bacteriuria después de 10 días de permanecer con el catéter. Sin embargo, hasta un 48% de los pacientes cateterizados adquiere una infección. En muchos casos, los catéteres se colocan por un tiempo corto; más de una tercera parte por menos de un día; la duración media es de 2 a 4 días.^[89] En la cateterización por tiempos cortos, las especies bacteriúricas más comúnmente aisladas son Gram-negativas, como *Escherichia Coli* con 85% de incidencia. Otros organismos patógenos encontrados son *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis*, enterococci y de especie *Candida*.^[90, 91]

Objetivos

3.1. Objetivo general

Sintetizar un material polimérico con capacidad de cargar diferentes fármacos, que presente una alta biocompatibilidad para su potencial aplicación en dispositivos médicos.

3.2. Objetivos particulares

Se preparará un copolímero de injerto binario, compuesto por una matriz polimérica de polipropileno (PP) a la que se le injertará N-isopropilacilamida y N-(3-aminopropil metacrilamida) (APMA) por el método de preirradiación oxidativa, utilizando radiación γ .

Evaluar la dependencia del porcentaje de injerto sobre películas de PP respecto de la dosis de irradiación, el tiempo de reacción, la concentración de monómeros (NIPAAm y APMA) y la temperatura de reacción.

Caracterizar las películas obtenidas, para confirmar la formación del copolímero de injerto deseado, y estudiar las propiedades térmicas por DSC y TGA, su coeficiente de fricción, su morfología superficial y de un corte transversal por microscopía electrónica de barrido (SEM) y su capacidad para responder a cambios en la temperatura (LCST).

Evaluar la capacidad de las películas de PP-g-(NIPAAm-r-APMA) para incorporar y liberar fármacos de forma controlada (diclofenaco, ibuprofeno

y ácido nalidíxico). Las películas se recubrirán con carboximetil-dextrano (CM-dextrano), y se estudiará la repercusión sobre la velocidad de liberación de los fármacos.

Determinar la biocompatibilidad de las películas sintetizadas mediante pruebas de adsorción de proteínas, hemocompatibilidad y citocompatibilidad *in vitro*, y ensayos de expresión de citoquinas pro-inflamatorias.

Estudiar la capacidad de los copolímeros de injerto, cargados con un agente antimicrobiano para inhibir el crecimiento de microorganismos en ensayos *in vitro*.

Parte experimental

4.1. Materiales

Las películas de polipropileno (PP) con una densidad de 0.92 g/cm^3 y espesor de 1.7 mm se adquirieron de Goodfellow (UK). La N-(3-aminopropil) metacrilamida hidrocioruro (98 %) (APMA) de 3B Scientific Corporation (USA) se purificó por recristalización en metanol/ éter etílico (solución 1/10, v/v). La N-isopropilacrilamida (97 %) (NIPAAm) se obtuvo de Aldrich Chemical Co. (USA) y se recristalizó de hexano/tolueno (solución 1/1, v/v). El NaNO_3 99.99 % Suprapur se obtuvo de Merck (México). El diclofenaco sódico fue obtenido de Vorquimia S. L. (España), el ibuprofeno sódico de Sigma Chemical Co. (USA), la sal sódica del ácido nalidíxico de Sigma Aldrich Co. (St. Louis MO, USA) y la sal sódica de carboximetil-dextrano (CM-dextrano) de Fluka (Dinamarca). La seroalbúmina bovina libre de proteasas (BSA) se obtuvo de Acros Organics (USA). El fenol cristalizado de Scharlau (España) y el ácido sulfúrico de Panreac Química S. A. (España). El CaCl_2 y el formaldehído acuoso al 37 % estabilizado con metanol se obtuvieron de Panreac Química S. A. (España). Hexano, tolueno, éter etílico y metanol de grado analítico se obtuvieron de Mallinckrodt Baker (México) y se usaron como se recibieron. El NaOH y el KH_2PO_4 se adquirieron de Scharlau Chemie (España) y se utilizó agua MilliQ[®] (Millipore, España).

4.2. Injerto por preirradiación oxidativa

Películas de PP con tamaño de $1.2 \times 4 \text{ cm}^2$ se lavaron con metanol y se secaron al vacío, a temperatura ambiente antes de ser injertadas. Las películas

de PP se expusieron a una fuente de rayos gamma de ^{60}Co (Gamma beam 651 PT, MDS Nordion USA) en presencia de aire con una intensidad de dosis de aproximadamente 10 kGy/h. Las dosis de preirradiación fueron entre 10 y 100 kGy. Las películas preirradiadas se colocaron en ampollitas de vidrio, las cuales contenían soluciones de NIPAAm/APMA 0.5/0.5, 1/0.5, 1/1 y 1/1 M disueltas en agua o en una solución 1M de NaNO_3 . Las ampollitas se burbujearon con argón para remover el aire, se sellaron y se calentaron en un baño de agua a 60 o 80 °C a diferentes tiempos de reacción, comprendidos entre 1 y 40 horas. Una vez terminado el tiempo de reacción, las ampollitas se abrieron y las películas injertadas se lavaron con agua destilada por 8 horas a 25 °C, para extraer el monómero residual y los homopolímeros que se pudieron haber formado y que quedan atrapados dentro de la red injertada. Después de los lavado, las películas se secaron al vacío. Las películas injertadas se nombraron en base a las concentraciones molares de NIPAAm y APMA en la mezcla de reacción de la síntesis. Por ejemplo, PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) se refiere al copolímero de injerto preparado con soluciones 1M de NIPAAm y 0.5M de APMA. El porcentaje de injerto de NIPAAm/APMA sobre PP fue calculado usando la Ecuación 1:

$$\text{Injerto(\%)} = \left[\frac{W_f - W_o}{W_o} \right] \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde W_f es el peso final y W_o es el peso inicial.

Tanto el NIPAAm como el APMA pueden homopolimerizarse por iniciación térmica bajo las condiciones de injerto. Los homopolímeros formados en el medio de reacción, cuando el injerto se llevó a cabo a 80 °C en presencia de un solo tipo de monómero (en soluciones 1M NIPAAm o 1M APMA) se recolectaron, secando las soluciones al vacío para realizar los ensayos de DSC y TGA que sirvieron como controles. De manera similar, el copolímero de NIPAAm-c-APMA se obtuvieron del medio de reacción cuando el injerto se realizó en soluciones 1M NIPAAm y 1M APMA a 80 °C.

4.3. FTIR-ATR y XPS de los copolímeros de injerto

Los espectros FTIR-ATR se adquirieron de las películas previamente secadas en un espectrómetro Perkin-Elmer Spectrum 100 (Perkin-Elmer Cetus Instruments, Norwalk CT, USA) adaptado con un accesorio Universal ATR (DiComp™ crystal, compuesto de un dispositivo ATR de diamante con un elemento de enfoque de seleniuro de zinc en contacto directo con el diamante). Se realizó la sustracción de la línea base y corrección de ATR para eliminar la dependencia de la profundidad de penetración con el software Spectrum del equipo. Los espectros de los homopolímeros de APMA y NIPAAm fueron normalizados con respecto a la banda de carbonilo a 1625 cm^{-1} o 1636 cm^{-1} , respectivamente. Los espectros FTIR de absorbancia de las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) fueron también normalizados con respecto a la banda de carbonilo a 1636 cm^{-1} . Entonces, las absorbancias relativas de los picos característicos de APMA a 1315 cm^{-1} (por ejemplo, $\text{Abs}_{1315}/\text{Abs}_{1636}$) y de NIPAAm a 1170 cm^{-1} (por ejemplo, $\text{Abs}_{1170}/\text{Abs}_{1636}$) se calcularon para estimar el contenido de cada monómero en el copolímero de injerto. La superficie se caracterizó con respecto a sus composiciones químicas elementales (en at%) por espectroscopia fotoelectrónica de rayos-X (XPS), realizado en un equipo VG ESCALAB 3MkII instrument, usando radiación Mg $K\alpha$ no monocromática (12 kV, 18 mA). Los espectros XPS se adquirieron a un ángulo de emisión de 0° , normal a la superficie de la muestra y posibles cargas se corrigieron por referencia de todos los picos, al del carbono (C1s) con energía de enlace 285 eV. La cuantificación de los elementos presentes se realizó utilizando el espectro de barrido amplio y el software Advantage v4.12 (Thermo Electron Corp., Waltham, MA), por la integración del área bajo la curva de los picos relevantes después de una sustracción de fondo tipo Shirley, usando los factores de sensibilidad de la tabla Wagner. La fracción en peso de APMA (Φ_{APMA}) fue calculada a partir de la ecuación 2. El espesor de las películas se midió antes y después del injerto utilizando un vernier digital (Max-Cal, Japan).

$$\frac{I_{C12p}}{I_{C1s}} = \frac{7\Phi_{APMA}/Mw_{APMA}}{(7\Phi_{APMA}/Mw_{APMA}) + (6(1-\Phi_{APMA})/Mw_{NIPAAm})} \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde I_{Cl2p} e I_{C1s} son las intensidades integradas de los picos correspondientes a los átomos de cloro y carbono, respectivamente. Mw_{APMA} y Mw_{NIPAAm} son los pesos moleculares de los monómeros de APMA y NIPAAm. El número de carbonos en cada unidad repetitiva de APMA y NIPAAm son 7 y 6, respectivamente; mientras que un cloro está contenido en cada unidad de APMA. Los valores de la intensidad integrada de Cl2p (199 eV) y C1s (285 eV) fueron 10776 y 163192 para PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) con 16 % de injerto. La relación APMA:NIPAAm en el copolímero injertado se estimó a partir de la cantidad relativa en peso.

4.4. Hinchamiento y temperatura crítica de solución

Los experimentos de hinchamiento se llevaron a cabo por la inmersión de los copolímeros de injerto en agua bidestilada. Las películas se removieron del agua a varios intervalos de tiempo, quitando el exceso de agua con un papel absorbente, pesadas y se colocaron nuevamente en el medio acuoso. El porcentaje de hinchamiento se determinó gravimétricamente como indica la Ecuación 3:

$$\text{Hinchamiento}(\%) = \left[\frac{W_h - W_o}{W_o} \right] \times 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde W_h y W_o es el peso de la película hinchada y seca respectivamente.

La temperatura crítica de solución (LCST) de las películas injertadas se estimó por los cambios en el hinchamiento límite de las muestras inmersas en agua bidestilada a varias temperaturas, (de 26 a 50 °C) por 2 horas y pH neutro. El ángulo de contacto se midió en un equipo Drop Shape Analyzer Kruss DSA 100 (Matthews NC, USA). Una gota de agua bidestilada fue depositada sobre las películas secas y el ángulo de contacto fue medido un minuto después. La temperatura del agua que circula y de la atmósfera en la cámara de medición se controló en el rango de 26 a 50 °C. La LCST se estimó como el valor de temperatura en que se observa un punto de inflexión en una gráfica de ángulo de contacto vs. temperatura. Las medidas del análisis termogravimétrico (TGA) fueron obtenidas usando un TGA Q50

(TA Instruments, New Castle, DE), con una rampa de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ bajo una atmósfera de nitrógeno (60 mL min^{-1}). La calorimetría diferencial de barrido (DSC) fue realizada en un calorímetro DSC2010 (TA Instruments, New Castle, DE), con una rampa de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ de 30 a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ para obtener la T_g y T_m . Para obtener la LCST por DSC se utilizó una rampa de calentamiento de $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ de 0 a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, todos los termogramas se obtuvieron en atmósfera de nitrógeno (flujo= 60 mL min^{-1}) calibrado con indio.

4.5. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Las películas se hincharon en agua y se liofilizaron en un equipo Cryodos-80 (Telstar, Barcelona, España), después se recubrieron con oro y se observaron en un microscopio electrónico de barrido LEO435VP (Leica, Cambridge, UK). Los aumentos para las vistas superficiales y transversales fueron $1000\times$ y $500\times$, respectivamente.

4.6. Coeficiente de fricción

El coeficiente de fricción de las películas hinchadas con solución tampón de fosfatos pH 7.4, se midió por duplicado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando un reómetro Rheolyst AR1000N (TA Instruments, Crawley, RU), equipado con un analizador de datos AR2500 y una placa Peltier. Las películas se cortaron en piezas cuadradas con una longitud de 10 mm de cada lado. La superficie de las películas fue limpiada e inmediatamente pegada (Loctite[®] Super Glue-3, Henkel, Barcelona, España) a una placa de acero de 4 cm del reómetro. 1 mL de solución tampón pH 7.4 se colocó sobre la superficie de la placa Peltier y la geometría se desplazó hacia la placa de acero con un espacio inicial entre 1.7 y 2.8 mm dependiendo del espesor de la película. El experimento consistió de un paso de acondicionamiento, aplicando $5 \pm 0.01\text{ N}$ de fuerza normal (W) por 15 minutos y un paso con una velocidad angular de 0.05 rad/s por otros 15 minutos.^[92] Dado que la velocidad cambia con la distancia desde el centro del eje, el torque obtenido (T), es el valor total a lo largo de rango de velocidad de 0 a ωR , donde R es el radio de la película (debido a la

dificultad para cortar las películas en forma de círculo, $1/\sqrt{2}$ de la longitud de un lado del cuadrado se usó como R).^[93] Entonces, la fricción total (F) y el coeficiente de fricción (μ) se determinaron a partir de la ecuaciones 4 y 5:

$$F = \frac{4T}{3R} \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$\mu = \frac{F}{W} \quad (\text{Ecuación 5})$$

4.7. Citocompatibilidad

Células RAW 264.7, una línea celular de macrófagos de ratón (ATCC, Manassas, VA), se mantuvieron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-F12 HAM; Biochrom AG, Alemania), complementado con 10% v/v de suero bovino fetal inactivado por calor (Life Technologies, Rockville, MD) y gentamicina (130 mL/100 mL) y mantenido en una incubadora humidificada a 5% CO₂:95% aire y 37 °C. Las células RAW 264.7 se sembraron (1x10⁵ mL) en una placa para cultivo celular de poliestireno con 24 pocillos, a los cuales se les colocó una pieza de 1x1 cm de las películas de copolímero esterilizadas. Previamente, las películas se hincharon en una solución tampón de fosfatos a pH=7.4 por 4 horas y después se autoclavaron (121 °C, 20 min). Alícuotas (1mL) del medio de cultivo se colectaron después de 5 h y 1, 3, 6 y 8 días e inmediatamente se congelaron a -20 °C; el volumen de la alícuota extraído se substituyó con 1 mL de medio fresco. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado para cada película.

Las concentraciones de citoquinas (IL-1 α , TNF- α) en los sobrenadantes de los cultivos celulares se cuantificaron por medio de un ensayo específico inmunoenzimático (ELISA por sus siglas en inglés) (Bender MedSystems GmbH, Austria), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. La absorbancia de las soluciones de la placa donde se llevó a cabo el ensayo se adquirieron en un espectrofotómetro lector de placas (Bio-Rad 680 Microplate

Reader, USA) a 450 nm. Los límites de detección de las citoquinas IL-1 α y TNF- α fueron 7.8 pg/mL y 31.8 pg/mL, respectivamente. Las células cultivadas en presencia de lipopolisacárido LPS (10 ng/mL) y células cultivadas en un medio sin la presencia de la película se utilizaron como controles positivo y negativo, respectivamente.

La supervivencia de la células en presencia de las películas de copolímero se evaluó a las 5 h, 1, 3 y 6 días por medio el kit Citotoxicity Detection kitPLUS (LDH) (Roche, España). A 100 μ L de los sobrenadantes se les realizó el ensayo siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia de las muestras a 490 nm se midió usando un lector de placas (Bio-Rad 680 Microplate Reader, USA). La viabilidad celular se analizó cualitativamente usando microscopia de fluorescencia confocal laser (LCS, Leica Microsystems, Alemania). Las películas fueron cuidadosamente retiradas de las placas de cultivo después de 24 horas. Las células adheridas fueron teñidas con 1 mg/mL de calceína Calcein-AM (Sigma-Aldrich, España) y 1 mg/mL de yoduro de propidio (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Las células teñidas se observaron por microscopia de fluorescencia confocal laser con un aumento de 60x y las imágenes se procesaron con el software Leica LCS.

4.8. Prueba de hemólisis

Sangre de ratas Sprague Dawley y de humanos voluntarios se recolectó en tubos conteniendo citrato de sodio como anticoagulante y se usaron dentro de las primeras 24 horas. Las películas de PP, PP-g-NIPAAm, PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) recubiertas de CM-dextrano y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) se sumergieron en 5 mL de solución tampón de fosfatos (pH=7.4), se les adicionaron 0.25 mL de sangre y se incubaron a 37 °C por 60 minutos. La solución que contiene la sangre se centrifugó (700g por 10 min.), y se determinó la hemoglobina liberada por análisis fotométrico del sobrenadante a 542 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Agilent 8453, Alemania). La hemólisis total se logró usando agua pura como control positivo con valor de 100 %, mientras que sangre disuelta en tampón de fosfatos pH 7.4 se usó como control negativo. Hemólisis menores a 5 % son consideradas como un nivel no tóxico. Los experimentos fueron realizados en duplicado.

4.9. Prueba de trombogenicidad

Los estudios de formación de trombos se realizaron mediante el “método cinético” *in vitro* reportado por Imai y Nose.^[94] Sangre colectada de rata Sprague Dawley se mezcló inmediatamente con una solución de citrato de sodio 3.8 % w/w en una relación 9:1. Antes de la prueba de trombogenicidad, las películas de PP, PP-g-NIPAAm y diferentes porcentajes de injerto de PP-g-(NIPAAm-r-APMA) sin carga y cargadas de diclofenaco se hidrataron al equilibrio en solución tampón pH 7.4 (5 mL) y mantenidas a 37 °C. Después de una hora de incubación, la solución tampón se retiró y las películas se colocaron en cajas Petri. 0.2 mL de sangre se colocó sobre cada película (1x1 cm) y también sobre la superficie una caja Petri vacía, que funcionó como control positivo. El proceso de coagulación de la sangre se inició adicionando 0.02 mL de una solución de CaCl₂ 0.1 M. Después de 30 minutos, se agregaron 5 mL de agua Milli-Q para detener la reacción. Los trombos formados fueron extraídos con una espátula y colocados en 5 mL de solución acuosa de formaldehido (37 %) para fijarlos, se secaron al vacío y finalmente se pesaron. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

4.10. Adsorción de seroalbúmina bovina (BSA)

Películas (1 x 0.5 cm) de PP, PP-g-NIPAAm y PP-g-(NIPAAm-r-APMA) con diferentes porcentajes de injerto se sumergieron en 1.8 mL de una solución acuosa de BSA (25 mg/mL) en tubos Eppendorf Protein LoBin a 37 °C, protegidos de la luz. A ciertos intervalos de tiempo la absorbancia del medio se registró espectrofotométricamente a 279 nm (Agilent 8453, Alemania).

4.11. Carga de diclofenaco e ibuprofeno

Películas de PP sin modificar e injertadas con NIPAAm y APMA con diferentes porcentajes de injerto se sumergieron en 5 mL de una solución acuosa de diclofenaco sódico (0.04 mg/mL) o ibuprofeno sódico (0.4 mg/mL)

y se mantuvieron a 4 °C en ausencia de luz. La concentración de diclofenaco e ibuprofeno se monitoreó espectrofotométricamente (Agilent 8453, Alemania) a 276 y 223 nm, respectivamente, por 30 horas. La cantidad total de fármaco cargado, se calculó como la diferencia entre las cantidades iniciales y finales en la solución. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado cargando las mismas películas tres veces para obtener datos estadísticos.

4.12. Liberación de diclofenaco e ibuprofeno

Las películas cargadas con fármaco se secaron al vacío y después se sumergieron en 5 mL de solución tampón de fosfatos, pH 7.4 a 37 °C. 3 mL de solución se retiraron a intervalos específicos de tiempo, la cantidad de fármaco fue determinada por espectrofotometría UV a 276 y 223 nm para diclofenaco e ibuprofeno, respectivamente, y después la solución fue inmediatamente regresada al vial correspondiente. Los experimentos se realizaron por triplicado y se llevó a cabo tres veces el perfil de liberación para cada película.

4.13. CM-dextrano sobre películas cargadas con diclofenaco

Películas de PP injertado con NIPAAm y APMA (1x1 cm) se lavaron extensivamente con agua, se cargaron con diclofenaco como se describió previamente y después se sumergieron en una solución acuosa de CM-dextrano (2 mg/mL) por 1 hora, después las películas se retiraron de la solución de CM-dextrano, se enjuagaron con agua y se secaron al vacío. Durante la deposición del CM-dextrano, parte del diclofenaco previamente cargado se liberó al medio, el cual se determinó espectrofotométricamente a 276 nm. La cantidad de CM-dextran depositado se cuantificó con el cambio en la concentración del medio utilizando un método colorimétrico.^[95] Brevemente, 1 mL de fenol al 5 % (w/v) y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado se agregaron a 1 mL de solución de CM-dextrano (convenientemente diluido con agua) y se agitó vigorosamente. La mezcla fue incubada a 37 °C por 30 minutos y la absorbancia se registró a 489 nm usando un espectrofotómetro Agilent 8453 (Alemania). El intervalo de cuantificación lineal fue de 14 a 140 mg/mL. La

cantidad de CM-dextrano depositado sobre las películas se determinó como la diferencia de las cantidades iniciales y finales en la solución.

4.14. Carga de ácido nalidíxico

Películas de PP sin modificar e injertadas con NIPAAm y APMA, se sumergieron en 5 mL de solución acuosa de la sal sódica del ácido nalidíxico (0.03 mg/mL) a 4 °C y en ausencia de luz. La concentración de ácido nalidíxico en el medio, se monitoreó espectrofotométricamente a 328 nm (Agilent 8453, Alemania) por 48 horas. Después las películas se secaron al vacío para posteriores estudios. La cantidad total de ácido nalidíxico cargado por las películas se calculó a partir de la diferencia entre las cantidades inicial y final de las soluciones. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

4.15. CM-dextrano sobre películas cargadas con ácido nalidíxico

Las películas injertadas con NIPAAm y APMA (1x1 cm) se cargaron con ácido nalidíxico como se describe arriba. Después se sumergieron en una solución acuosa de CM-dextrano (2 mg/mL) por 10 minutos. Finalmente, las películas se enjuagaron con agua y se secaron al vacío. Durante la deposición del CM-dextrano, parte del fármaco previamente cargado se liberó al medio, el cual fue determinado espectrofotométricamente a 328 nm. La cantidad de CM-dextrano adsorbido en las películas se cuantificó con el cambio en la concentración del medio, utilizando un método colorimétrico.^[95].

4.16. Liberación de ácido nalidíxico

Las películas cargadas con ácido nalidíxico y secadas al vacío se sumergieron en 5 mL de solución buffer de fosfato (pH=7.4) a 37 °C. 3 mL de solución se retiró del medio a intervalos específicos de tiempo, la cantidad de ácido nalidíxico se determinó por espectrofotometría UV a 328 nm (Agilent

8453, Alemania), la muestra de solución se regresó inmediatamente a su vial correspondiente. Los experimentos se realizaron por duplicado.

4.17. Ensayo microbiológico

Las pruebas microbiológicas se llevaron a cabo con el método estandarizado de difusión de discos de Kirby-Bauer.^[96] *Escherichia coli* FV9180 fue inoculada en una placa de agar Müller-Hinton (MH agar, Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, France), después de 24 horas de cultivo en solución (3.2×10^9 CFU/mL). Las películas de PP-g-(NIPAAm-r-APMA) (1x1 cm) cargadas previamente con ácido nalidíxico se colocaron en contacto con la placa MH agar que contiene la bacteria inoculada. Después de 24 horas de incubación a 37 °C, la zona circular libre de bacterias (zona de inhibición) se midió. La evolución de la zona de inhibición se monitoreó 5 durante días. Una películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 27 % de injerto sin ácido nalidíxico se utilizó como control positivo. Las pruebas se realizaron por duplicado.

Análisis de resultados

5.1. Injerto de NIPAAm y APMA sobre PP

El injerto de NIPAAm y APMA sobre películas de PP se llevó a cabo mediante el método de preirradiación oxidativa, seguido de puesta en contacto de manera simultánea con ambos monómeros, resultando en una superficie doblemente funcionalizada usando radiación gamma con la menor dosis posible (Fig. 5.1). El injerto de manera simultánea reduce el riesgo de degradación de la matriz polimérica comparada con una síntesis secuencial, la que involucra el injerto de un monómero, seguido de la exposición de la matriz injertada inicialmente a otra dosis de radiación para injertar el otro monómero.^[97] Este procedimiento puede causar degradación principalmente en el primer injerto, que al ser irradiado, puede sufrir la ruptura de las cadenas poliméricas. Las acrilamidas son particularmente sensibles a la radiación ya que contienen grupos funcionales lábiles a la radiación gamma. Por lo tanto, el injerto simultáneo de ambos monómeros en una sola etapa de síntesis es más adecuada para obtener injertos sin daños causados por la interacción de la radiación con las cadenas poliméricas.

Diferentes porcentajes de injerto sobre la superficie de películas de PP fueron obtenidos variando la dosis de irradiación, tiempo de reacción, temperatura y proporción de la concentración de monómeros. Los polímeros injertados, PP-g-(NIPAAm-r-APMA), se designaron por las concentraciones molares de NIPAAm y APMA que se adicionaron a la mezcla de reacción. Por ejemplo, PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) se refiere a un copolímero de injerto preparado con una solución 1M de NIPAAm y 0.5M de APMA. Los injertos llevados a cabo en una solución acuosa 1M de NaNO_3 se nombraron PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA)_{NaNO₃}. A diferencia del NIPAAm, que puede

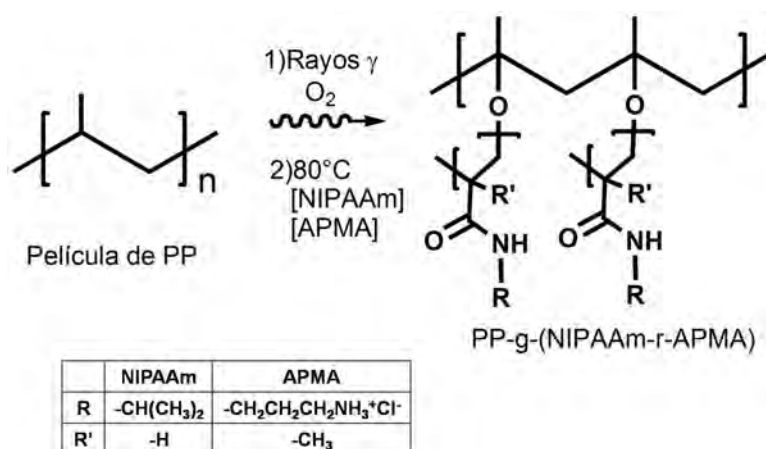


Figura 5.1: Esquema de la reacción para injertar NIPAAm y APMA de manera simultánea mediante preirradiación oxidativa.

ser injertado en matrices poliméricas, el APMA solo no se injerta sobre la película de PP debido a la repulsión electrostática inducida por el nitrógeno cuaternario que presenta carga positiva, inhibiendo el proceso de polimerización. Por el contrario, cuando el proceso se llevó a cabo en una solución de NIPAAm y APMA, las cadenas fueron injertadas con una distribución de monómeros aleatoria. La formación de éste tipo de cadenas se justifica por la relación de los valores de reactividad entre ambos monómeros ($r_{NIPAAm}=0.7$ y $r_{APMA}=0.7-1.2$), que tienen una relación cercana a 1^[98] y al espacio entre unidades de APMA a lo largo de la cadena debido a la intercalación de unidades de NIPAAm. Algunos investigadores han sintetizado polielectrolitos a partir de soluciones de monómeros cargados reduciendo las repulsiones electrostáticas con iones de sales.^[99, 100, 101, 102] Por lo tanto, se compararon los rendimientos de injerto en agua pura y en solución acuosa de NaNO_3 1M. En las siguientes secciones se discutirá el comportamiento del rendimiento de injerto con respecto a todas las variables anteriormente mencionadas.

5.1.1. Mecanismo de injerto de NIPAAm y APMA sobre PP

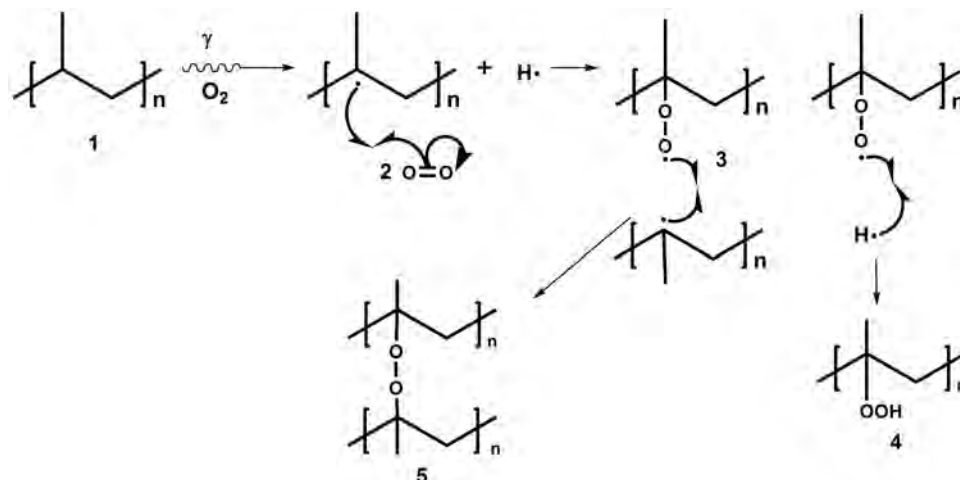


Figura 5.2: Mecanismo de formación de peróxidos sobre PP.

En la primera etapa del mecanismo (Fig. 5.2) el PP (1) se somete a radiación γ en presencia de oxígeno formando un radical estabilizado en el carbono terciario del PP (2). La formación de un radical secundario podría llevarse a cabo por la eliminación de un radical hidrógeno del carbono secundario, con un subsecuente rearreglo, migrando un hidrógeno del carbono terciario, finalizando en un radical terciario más estable. También es posible la eliminación de un radical metilo para formar un radical terciario, este proceso es más inestable debido a que el rendimiento radioquímico del CH_4 es de 0.07 moléculas/100 eV, mientras que la formación de hidrógeno radical, que libera H_2 tiene un rendimiento radioquímico de 2.78 moléculas/100 eV. Otra razón es que el H_2 puede difundir más rápido que el CH_4 por lo tanto el radical $-CH_3$ se puede recombinar. Una vez obtenido el radical libre (2) se recombina con el radical formado de la molécula de O_2 creando un enlace carbono-oxígeno, y produciendo el macroradical peroxi (3). Este macroradical tipo peroxi se puede asociar de dos formas diferentes, (i) dos macroradicales se recombinan para formar un dialquilperoxi (5) y (ii) la unión entre un macroradical peroxi y un radical hidrógeno para obtener un hidroperóxido (4).

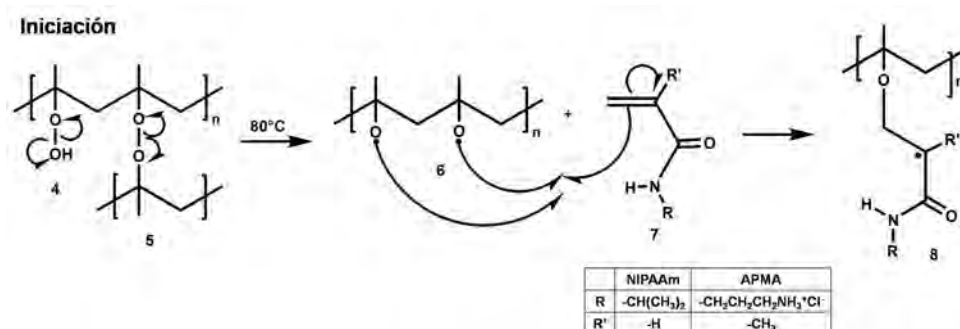


Figura 5.3: Mecanismo de iniciación de la polimerización de NIPAAm y APMA sobre PP.

La siguiente etapa del mecanismo de reacción es el paso de iniciación. (Fig. 5.3) Una vez formados el hidropéroxido (4) y el alquilperóxido (5), se disocian térmicamente para formar radicales alcoxi (6). Los radicales alcoxi (6) se recombinan con un carbono primario del doble en enlace del monómero (7) (NIPAAm o APMA), para formar un enlace oxígeno-carbono tipo éter. El electrón que queda desapareado se localiza en el carbón secundario del monómero (8). Al ser un proceso de injerto simultáneo, cualquiera de los monómeros puede iniciar la polimerización debido a ambos son de tipo vinílico.

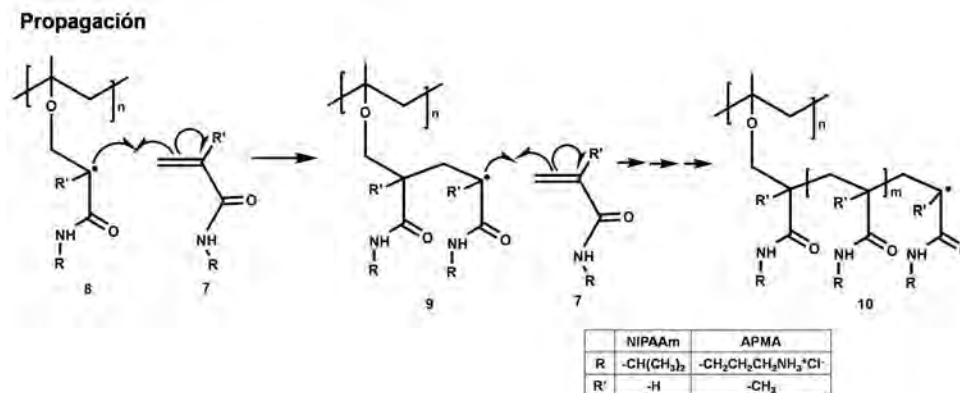


Figura 5.4: Mecanismo de propagación de la polimerización de NIPAAm y APMA sobre PP.

En el paso de propagación (Fig. 5.4), el radical desapareado secundario (8) se enlaza con otra molécula de monómero (7) para formar otro radical secundario (9). Este paso se repite sucesivamente (10) hasta que se produzca una terminación. Este es el paso en que la cadena polimérica crece.

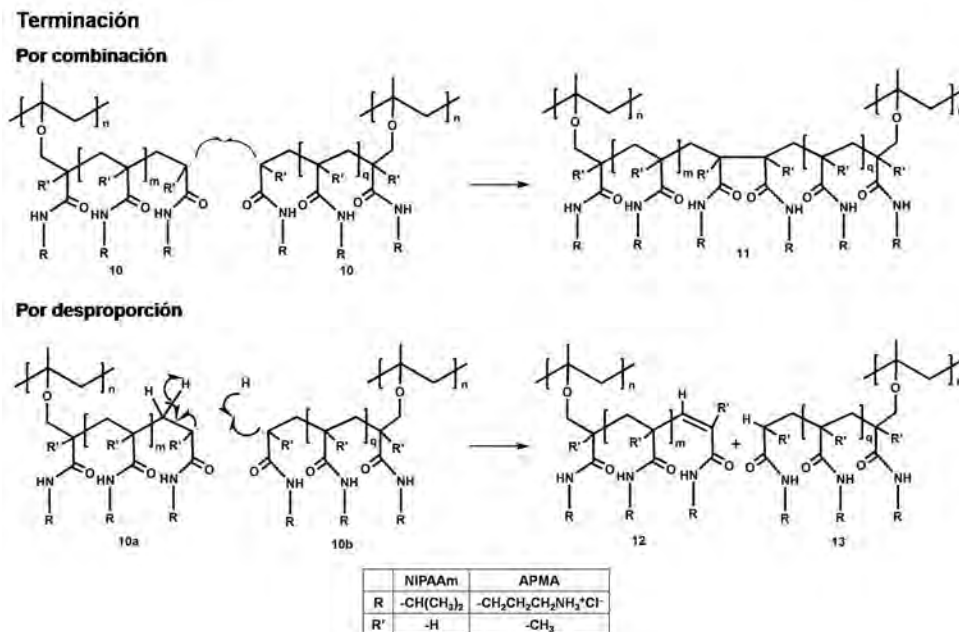


Figura 5.5: Mecanismos de terminación de la polimerización de NIPAAm y APMA sobre PP.

La etapa de terminación (Fig. 5.5) se lleva a cabo por dos vías principalmente. (i) Por combinación, en la que los macroradicales (10) de dos cadenas poliméricas diferentes se enlazan a través de un enlace carbono-carbono (11) que incrementa el peso molecular y produce reticulaciones. (ii) Por desproporción, un macroradical (10a) se recombina intramolecularmente para formar un doble enlace (12), liberando un radical hidrógeno e impidiendo el crecimiento de la cadena polimérica. El radical hidrógeno liberado va a unirse con otro macroradical (10b) para formar un sistema totalmente saturado. Otra vía de terminación es por la asociación de un macroradical y un radical hidroxilo inicialmente formado en la descomposición del hidroperóxido.

5.1.2. Efecto de la dosis de irradiación

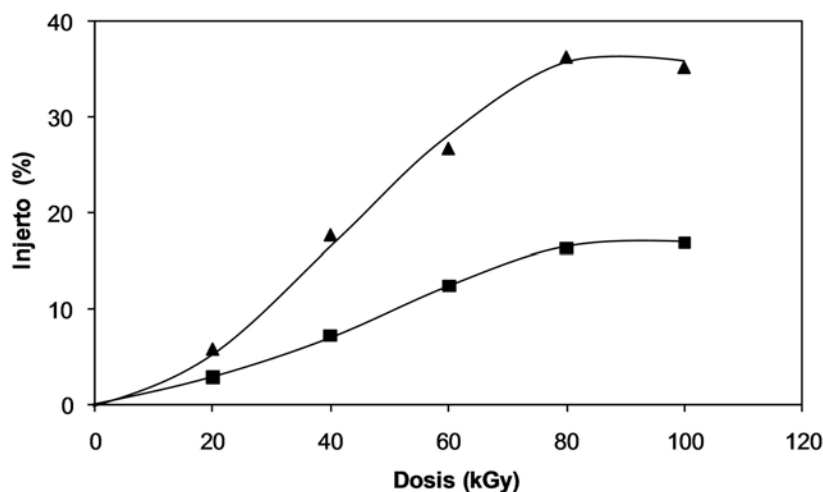


Figura 5.6: Injerto de NIPAAm y APMA sobre películas de PP pre-irradiadas a diferentes dosis y sumergidas en soluciones acuosas 1 M NIPAAm:0.5 M APMA (▲) o 1 M NIPAAm:1 M APMA (■) 80 °C por 20 h.

El porcentaje de injerto de NIPAAm y APMA depende de la dosis de preirradiación a la cual se somete la película de polipropileno, a mayores dosis se formará una mayor cantidad de grupos peroxi que funcionan como iniciadores del proceso de polimerización. Sin embargo, el análisis muestra que una meseta se alcanza a 80 kGy y que, por encima de esta dosis el porcentaje de injerto no se incrementa (Fig. 5.6). En la Fig. 5.6 se muestran dos curvas obtenidas con diferentes concentraciones de monómeros, con ambas concentraciones se observan patrones similares alcanzando un porcentaje de injerto máximo a 80 kGy. Para PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) los porcentajes de injerto son mayores que para PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA). Este hecho se puede explicar por la repulsión entre los grupos catiónicos de APMA, por lo cual a mayores concentraciones de APMA la reacción de propagación es inhibida. La dosis utilizada en los experimentos siguientes será de 80 kGy, ya que la pendiente en el gráfico es mínima, disminuyendo el error.

5.1.3. Efecto de la concentración de monómeros

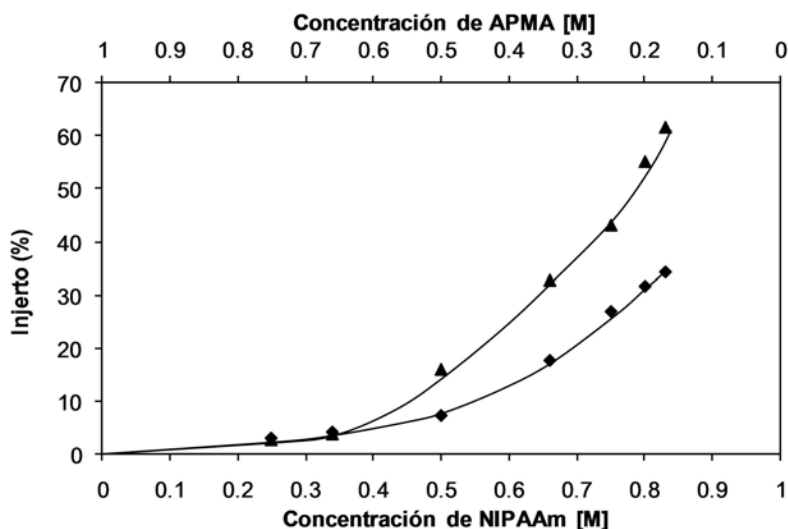


Figura 5.7: Injerto de NIPAAm y APMA sobre películas de PP con diferentes concentraciones de monómeros, la concentración total es 1M de ambos monómeros. Las dosis de preirradiación fueron 80 kGy (▲) y 50 kGy (◆) a 80 °C por 20 h.

La Fig. 5.7 muestra la dependencia del porcentaje de injerto con respecto a la relación de las concentraciones de NIPAAm y APMA; la concentración total de monómeros se mantuvo en un valor constante (1M). Al aumentar la proporción de APMA, el porcentaje de injerto disminuyó, el efecto contrario se observó para NIPAAm. El estudio se realizó con dos dosis diferentes, obteniendo mayores porcentajes de injerto con 80 kGy de irradiación. Con concentraciones altas de APMA y bajas de NIPAAm, la relevancia de la dosis es menor, porque los injertos son muy bajos, sin embargo, a medida que la concentración de NIPAAm aumenta, la dosis de preirradiación tiene mayor influencia en el rendimiento de injerto. Dando lugar a curvas con diferentes pendientes dependiendo de la dosis. Cuando la relación de monómeros NIPAAm:APMA es de 50:50, el porcentaje de injerto fue de 10 y 20 %, dependiendo de la dosis. Con una relación 80:20, los porcentajes de injerto se incrementan considerablemente hasta 35 y 60 % para dosis de 50 y 80 kGy, respectivamente. Este comportamiento se relaciona con el efecto Trommsdorff, que al aumentar la capacidad de polimerización de los monómeros, la viscosidad en el medio aumenta debido a la formación de homopolímero, reduciendo la movilidad del

monómero en solución y disminuyendo la terminación por combinación de dos macrorradicales, permitiendo que el tamaño de las cadenas aumente. La polimerización se inhibe a medida que aumenta la cantidad relativa de APMA en la solución. Este efecto se debe a la repulsión intermolecular entre moléculas de APMA, inducida por la presencia de grupos amino con carga positiva. Para mejorar la polimerización de monómeros iónicos, se aumenta la concentración de los monómeros para favorecer la interacción entre monómeros o se realiza la polimerización en una solución iónica.

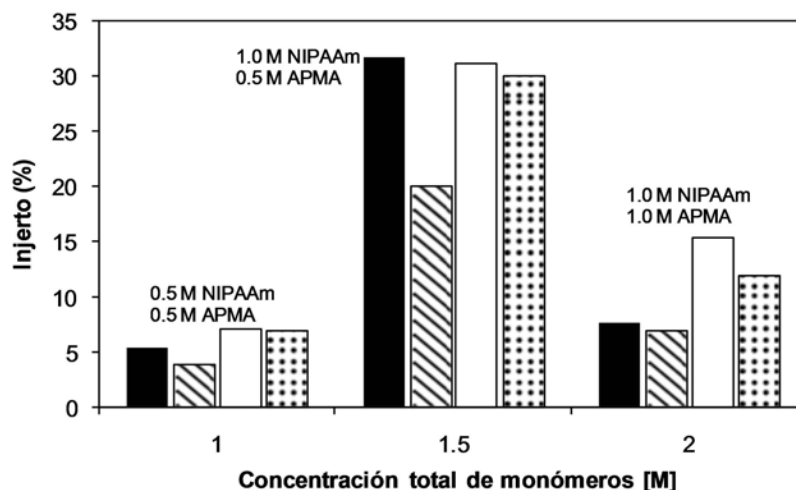


Figura 5.8: Porcentajes de injerto en función de la relación entre concentraciones de monómeros NIPAAm:APMA a 60 °C en agua (líneas inclinadas) y en NaNO₃ 1M (negro) y a 80 °C en agua (puntos) y en NaNO₃ 1M (blanco).

En la Fig. 5.8 se muestran los porcentajes de injerto para diferentes concentraciones de monómero, en agua destilada y en solución 1M de NaNO₃. Los porcentajes de injerto son similares en ambas soluciones, siendo levemente mayores para las polimerizaciones llevadas a cabo en la solución 1M de NaNO₃, pero los porcentajes de injerto varían en función de la relación de monómeros. Cuando se tienen concentraciones iguales de NIPAAm y APMA (1M:1M o 0.5M:0.5M) los porcentajes de injerto fueron bajos. Con una concentración de monómeros NIPAAm:APMA (1M:0.5M) los porcentajes de injerto son mayores por que el NIPAAm, al estar en mayor proporción, tiene la capacidad de polimerizar más fácilmente sin el impedimento del APMA.

5.1.4. Efecto de la temperatura de reacción

En el efecto que produce la temperatura de reacción sobre el porcentaje de injerto, se observa que a 80 °C se obtienen mayores porcentajes de injerto que a 60 °C (Fig. 5.8), a concentraciones 1M:1M y 0.5M:0.5M de NIPAAm:APMA. Además, con concentraciones de 1M:0.5M NIPAAm:APMA en una solución 1M de NaNO₃, se obtienen porcentajes de injerto similares a ambas temperaturas. Este efecto de la temperatura está relacionado con la descomposición de los alquilperóxidos y los hidroperóxidos formados en la matriz polimérica. Los alquilperóxidos requieren una mayor temperatura (~80 °C) que los hidroperóxidos para disociarse y formar los macroradicales que inician el proceso de injerto.^[97] A su vez, la disponibilidad de los monómeros en los sitios de injerto aumenta en función del incremento de la temperatura, llevando a altas velocidades de propagación.

5.1.5. Efecto del tiempo de reacción

Los porcentajes de injerto en función del tiempo de reacción a diferentes concentraciones de monómeros iniciales se muestra en la Fig. 5.9. El máximo porcentaje de injerto para PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA)_{NaNO₃} se alcanzó en 20 horas aproximadamente, mientras los procesos de injerto llevados a cabo en agua destilada fueron más eficientes, incrementando los valores de porcentaje de injerto durante todo el ensayo (>30 h). En la solución 1M de NaNO₃, la polimerización es favorable, incrementando la viscosidad de la solución debido a la formación de una alta cantidad homopolímeros, dificultando el acceso de los monómeros a los macroradicales que se propagan sobre el PP. También la adición de unidades de APMA se ve favorecida en presencia de NaNO₃, pero el efecto de repulsión de los grupos amino cuaternizados del APMA disminuye la capacidad de ambos monómeros para aumentar el tamaño de las cadenas. En las polimerizaciones llevadas a cabo en agua destilada se obtuvieron mayores porcentajes de injerto, alcanzando valores de 25 y 50 % de injerto para PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) y PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), respectivamente. La Fig. 5.10 ejemplifica los injertos obtenidos a diferentes concentraciones, en agua destilada y en solución 1M de NaNO₃. Al incrementar la concentración de APMA, disminuye el porcentaje de injerto.

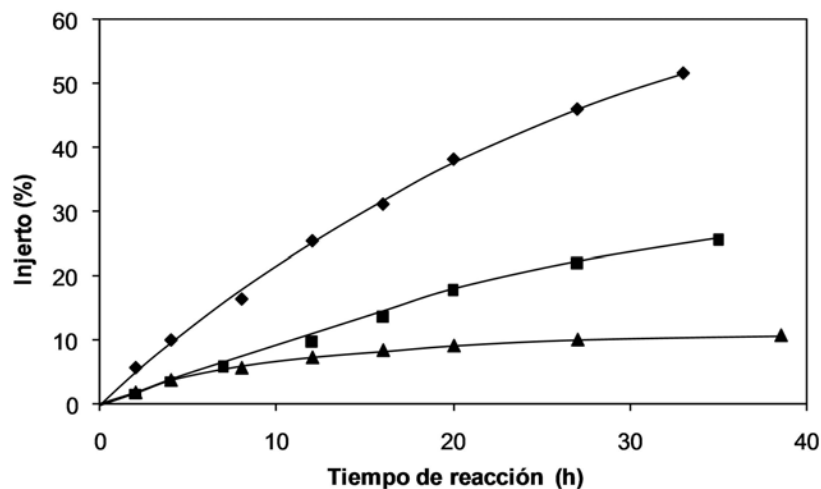


Figura 5.9: Injerto de NIPAAm y APMA sobre películas de PP a diferentes tiempos de reacción, preirradiadas con dosis de 80 kGy y sumergidas en soluciones 1M NIPAAm:0.5 M APMA (◆) y 1M NIPAAm:1M APMA en agua (■) y 1M NIPAAm:1M APMA en una solución 1M de NaNO₃ (▲).

En la solución 1M de NaNO₃ la cantidad de unidades de APMA se incrementa aún más, por lo que los porcentajes en peso de injerto son significativamente menores. El perfil de la curva de porcentaje de injerto en función del tiempo de reacción llevado a cabo en la solución de NaNO₃, alcanza una meseta en 15 horas (Fig. 5.9).

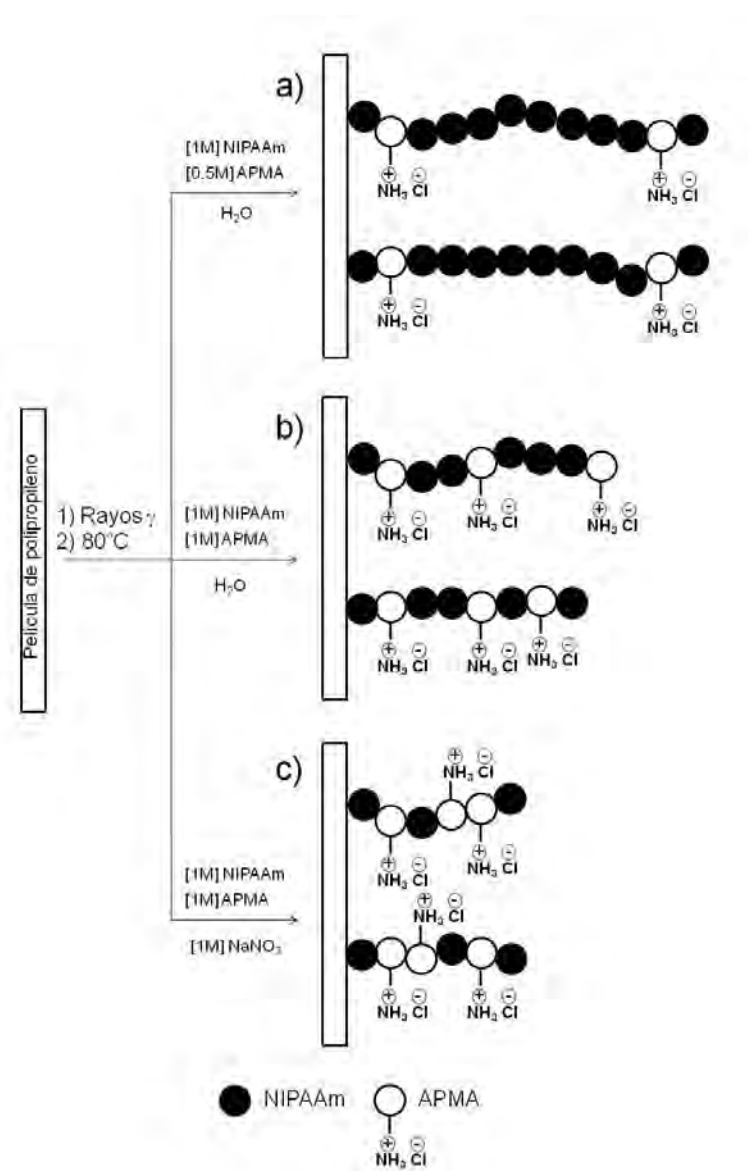


Figura 5.10: Esquema de las cadenas injertadas del copolímero de NIPAAm(●)-APMA(○) en PP en soluciones iniciales de: (a) 1M NIPAAm:0.5M APMA, (b) 1M NIPAAm:1M APMA y (c) 1M NIPAAm:1M APMA en solución 1M de $NaNO_3$.^[103]

5.2. Caracterización

Los copolímeros de injerto obtenidos con diferentes concentraciones de monómeros, PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA)_{NaNO₃}, así como películas de PP inicial, PP-g-NIPAAm y NIPAAm-c-APMA_{hidrogel} que se usaron como referencias fueron caracterizados por espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier equipado con un dispositivo de reflexión total atenuada (FTIR-ATR) y se realizó el análisis de la superficie, por espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS). Se caracterizaron las transiciones térmicas por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y se determinó la estabilidad térmica por análisis termogravimétrico (TGA). Se estudió el comportamiento de hinchamiento en agua de los diferentes copolímeros gravimétricamente para obtener el valor de transición de fase en la solubilidad (LCST). Esta última propiedad también se encontró a través de ángulo de contacto y DSC.

5.2.1. Espectroscopia de infrarrojo

El análisis de los espectros FTIR-ATR de las películas de PP iniciales y las modificadas muestra las bandas de absorción características de PP a 1920 y 1463 cm^{-1} (Fig. 5.11a). El espectro de la película de PP injertada únicamente con NIPAAm (PP-g-NIPAAm) se analizó con el fin de diferenciar las bandas características de NIPAAm (Fig. 5.11b) (-C=O a 1643 cm^{-1} , $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ - a 1170 cm^{-1} , y -NH- a 3311, 3099 y 1543 cm^{-1}) de las bandas que pertenecen a las unidades de APMA. En el espectro de PP-g-(NIPAAm-r-APMA) (Fig. 5.11c) se observa la aparición de sobretonos debido al grupo $-\text{NH}_3^+$ (2858-2610 cm^{-1}), así como los picos de las bandas asociados a los enlaces -C-NH- (1043 y 1315 cm^{-1}) confirmando la presencia de ambos monómeros.

La Tabla 5.1 muestra las bandas más representativas en los espectros obtenidos. Se pueden observar las dos bandas que se utilizaron para obtener los valores de absorbancia relativos, la banda a 1170 cm^{-1} que pertenece al grupo isopropilo del NIPAAm, mientras que la señal a 1315 cm^{-1} pertenece al enlace -C-NH₃⁺ del APMA. Estos resultados se relacionan con los obtenidos en los gráficos de porcentaje de injerto vs. concentración de monómeros, donde a mayor concentración de APMA en relación a la concentración de NIPAAm se obtienen porcentajes de injerto menores. Los espectros de FTIR confirman

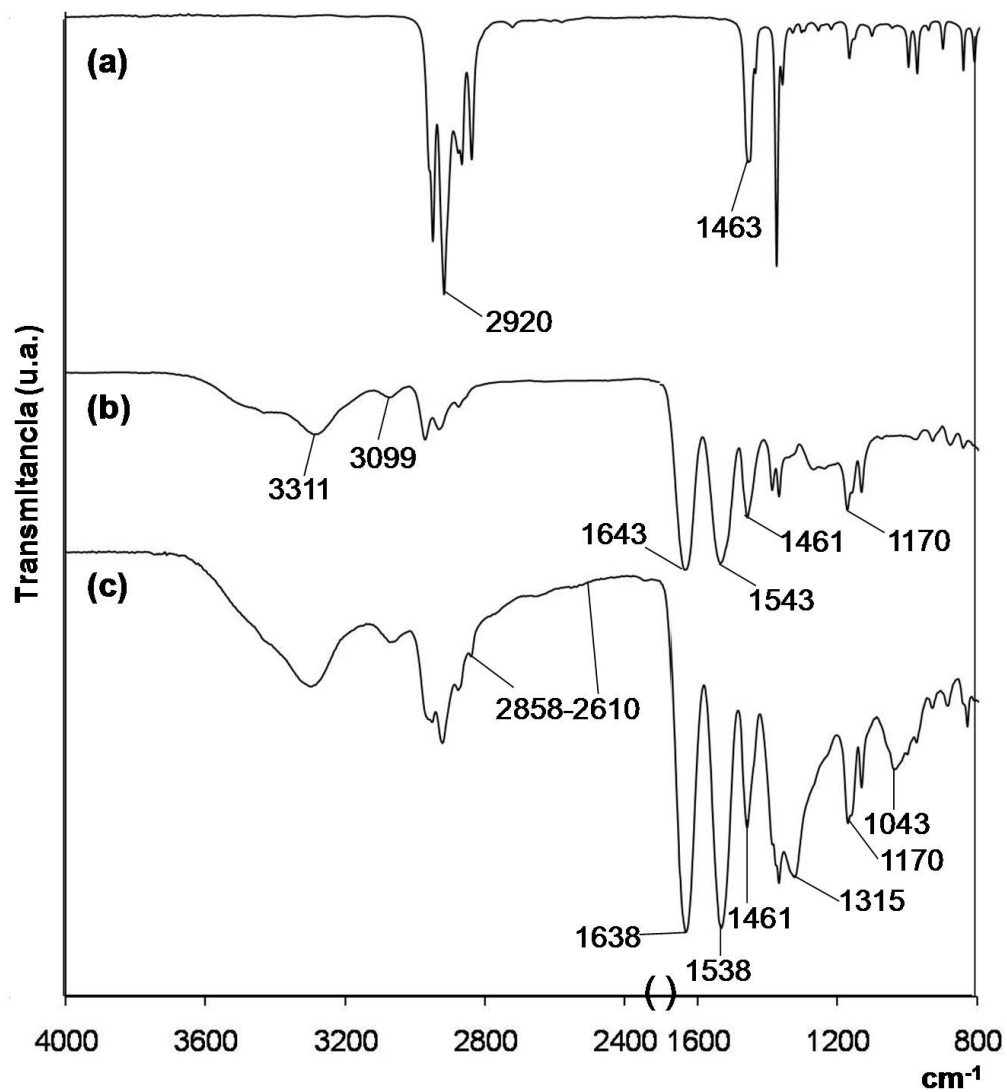


Figura 5.11: Espectros FTIR-ATR de (a)PP, (b)PP-g-NIPAAm, (c)PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA).

que se obtiene un injerto con mayor cantidad relativa de APMA en las polymerizaciones llevadas a cabo con soluciones 1M de APMA, dificultando el proceso de crecimiento de las cadenas poliméricas por repulsión electrostática.

Grupo funcional	No. de onda (cm^{-1})	Vibración asignada
Metilos y metilenos	2951	ν_{as} -CH ₃
	2920	ν_s -CH ₃
	2870	ν_s -CH ₂ -
	2839	ν_s -CH ₂ -
	1461	ν_s -CH ₃
	1170	isopropil
Nitrógeno de amida	3311	ν NH de NIPAAm
	3099	ν NH de NIPAAm
	1543	ν C-N
Carbonilo	1638	ν C=O
Éter	1043	ν_{as} C-O-C
Amina cuaternizada	2858-2610	sobretonos -NH ₃ ⁺
	1315	ν_{as} -C-NH ₃ ⁺

Tabla 5.1: Asignación de las bandas más representativas de infrarrojo para PP-g-(NIPAAm-r-APMA).

Las áreas de absorbancia total de PNIPAAm y PAPMA de los picos de C=O a 1636 and 1625 cm^{-1} (Fig. 5.12b) son 64.7 y 64.2, respectivamente. Los picos característicos de los homopolímeros de PAPMA y PNIPAAm se normalizaron con respecto al pico de carbonilo, dando como resultado $\text{Abs}_{1315}/\text{Abs}_{1625}=1.8$ para PAPMA y $\text{Abs}_{1170}/\text{Abs}_{1636}=0.48$ para PNIPAAm. La relación molar APMA/NIPAAm en las películas injertadas fue estimada a partir de la relación de las absorbancias relativas de los picos característicos de APMA (1315 cm^{-1}) y NIPAAm (1170 cm^{-1}) normalizados con respecto al pico de carbonilo a 1336 cm^{-1} en el espectro de FTIR (Fig. 5.12a). Las relaciones APMA/NIPAAm resultantes fueron 0.21 y 0.81 para PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA), respectivamente. Las relaciones molares NIPAAm:APMA encontradas fueron 83:17 y 55:45 para PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA), respectivamente. Cabe mencionar que la relación de monómeros no depende del tiempo de polimerización ya que la relación NIPAAm:APMA en el copolímero de injerto fue siempre la misma independientemente del grado de injerto.

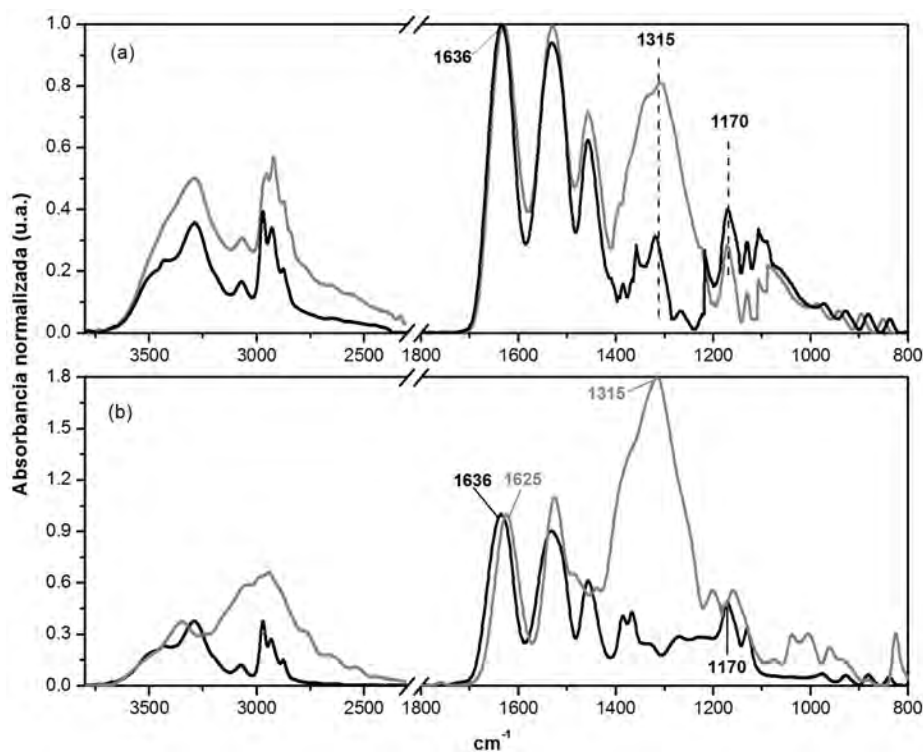


Figura 5.12: Espectro de FTIR-ATR de (a) PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) (línea negra) y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) (línea gris) y (b) homopolímeros de PNIPAAm (línea negra) y PAPMA (línea gris).

5.2.2. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS)

La composición superficial de las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) se analizó por XPS. La Fig. 5.13 muestra el espectro de barrido amplio de PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) con 16 y 26 % de injerto. Las dos películas muestran cuatro picos característicos primarios correspondientes a C_{1s} , O_{1s} , N_{1s} y Cl_{2p} a energías de enlace de 285, 536, 405 y 199 eV, respectivamente. En la Tabla 5.2 se presentan las concentraciones atómicas elementales determinadas. Las concentraciones atómicas elementales varían con el aumento en el porcentaje de injerto. La cantidad de nitrógeno y cloro aumentó al aumentar el porcentaje de injerto, mientras que el oxígeno disminuyó. Las concentraciones atómicas elementales indican que la relación de unidades NIPAAm:APMA en los injertos fueron de 69:31 y 58:42 para las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) injertadas con 16 y 26 %, respectivamente, lo que indica que la proporción

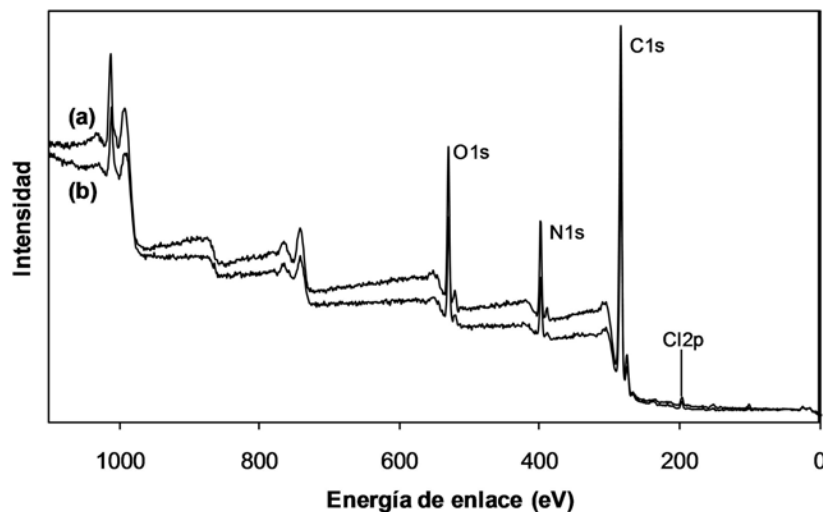


Figura 5.13: Espectro de XPS de películas de PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) con diferentes porcentajes de injerto: (a)16 % y (b)26 %.

de unidades de NIPAAm es mucho mayor que de unidades de APMA. Cabe mencionar que las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) también fueron analizadas por XPS, pero no se detectó el pico correspondiente a Cl_{2p} al tener una menor cantidad de unidades de APMA. En comparación de la película de PP sin modificar, las películas injertadas la cantidad relativa de carbono disminuye, como consecuencia de la adición de unidades monoméricas en la superficie, teniendo 98.3, 77.4 y 74.5 % de carbono para PP inicial, PP-g-NIPAAm y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA), respectivamente.

Polímero	Injerto (%)	NIPAAm:APMA				Relación molar NIPAAm/APMA
		C	O	N	Cl	
PP	-	98.3	1.7	-	-	
PP-g-NIPAAm	18	77.1	13.2	9	-	
PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA)	16	74.5	14	10.7	0.6	69:31
PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA)	26	74.5	12.8	12.1	0.8	58:42

Tabla 5.2: Contenido atómico elemental de las películas de PP, PP-g-NIPAAm y PP-g-(NIPAAm-r-APMA) calculadas por XPS.

5.2.3. Hinchamiento límite

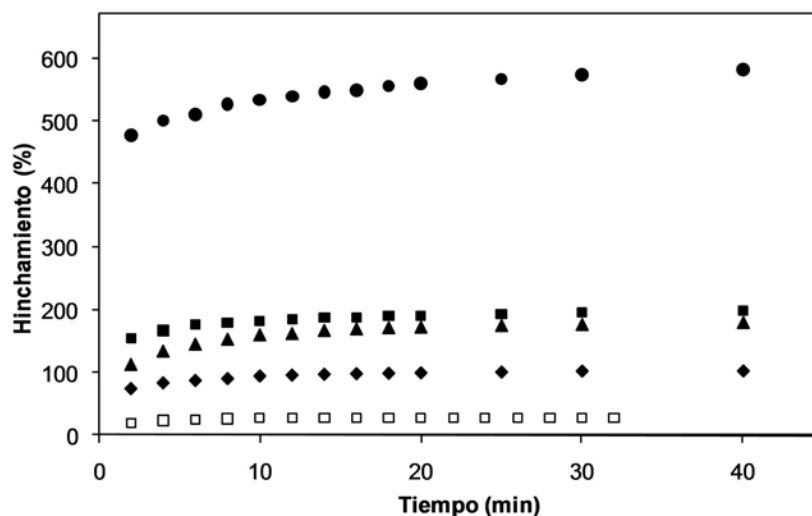


Figura 5.14: Hinchamientos a 25 °C en agua de: (◆)PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA, 10%), (▲)PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA, 25%), (■)PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA, 10%), (●)PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA, 25%) y (□)PP-g-NIPAAm, 25%.

La cinética de hinchamiento en agua de varias películas injertadas de PP-g-(NIPAAm-r-APMA) muestran una gran contribución del monómero APMA para absorber agua, debido a la alta hidrofiliidad del APMA en comparación con el NIPAAm (Fig. 5.14). Las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) y las de PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) con porcentajes de injerto de 10% y 25% muestran valores de hinchamiento altos, aumentando con mayores porcentajes de injerto. El hinchamiento de PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) comparado con PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con el mismo porcentaje de injerto es mayor, confirmando la mayor cantidad de APMA contenida en el injerto. El equilibrio del hinchamiento se alcanzó en 20 minutos para todos los polímeros estudiados. Los porcentajes de hinchamiento de los polímeros injertados solamente con NIPAAm (PP-g-NIPAAm), fueron significativamente menores que en las películas modificadas con ambos monómeros.

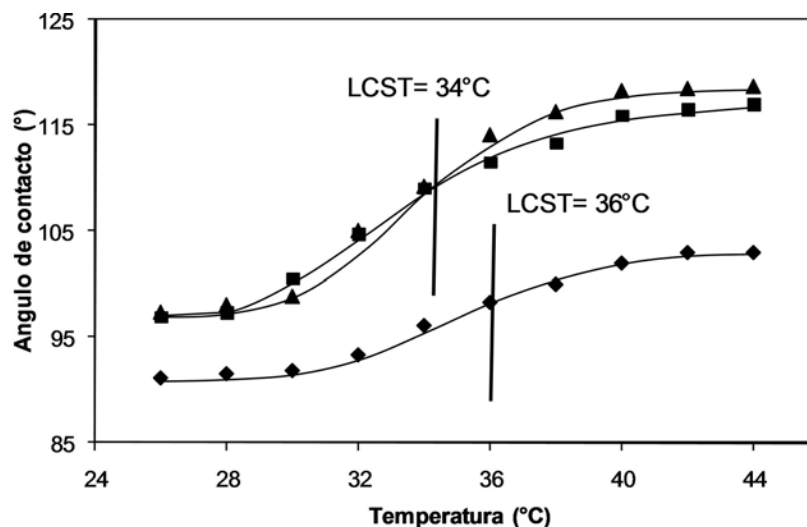


Figura 5.15: Ángulo de contacto de agua en función de la temperatura para copolímeros de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con diferentes porcentajes de injerto: (▲)10%, (■)16% y (◆)31%.

5.2.4. Respuesta a la temperatura (LCST)

La respuesta a la temperatura de los copolímeros depende en gran medida de la relación NIPAAm:APMA utilizada en la mezcla de reacción, ya que modifica el contenido relativo de ambos monómeros en el injerto. El ángulo de contacto para las películas de PP fue de 108° y disminuyó cuando las películas se injertaron, cambiando la superficie altamente hidrofóbica del PP a una más hidrofílica. Películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con injertos entre 10 y 31% muestran un aumento en el ángulo de contacto cuando la temperatura aumenta (Fig. 5.15). El valor de LCST se encontró entre $34\text{--}36^\circ\text{C}$, la cual es cercana al valor de LCST que presenta el poli(NIPAAm). Esta característica distintiva de respuesta a la temperatura en las películas injertadas se atribuye a un rápido cambio entre los estados hidrofílico e hidrofóbico (hinchado y colapsado) del NIPAAm. Además, la LCST desaparece en los copolímeros injertados con una mayor cantidad de APMA, por ejemplo, PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA). Los estudios de hinchamiento muestran que una película de control injertada solamente con NIPAAm (PP-g-NIPAAm) experimenta un colapso drástico a 34°C . Para películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), se observó un desplazamiento en la LCST hacia valores más altos (36°C) debido a que el APMA, que es altamente hidrofílico dificulta las interacciones por

puentes de hidrógeno entre las unidades de NIPAAm. Las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) no presentan cambios en su grado de hinchamiento en el rango de temperaturas del ensayo, permaneciendo en su valor de hinchamiento máximo (Fig. 5.16).

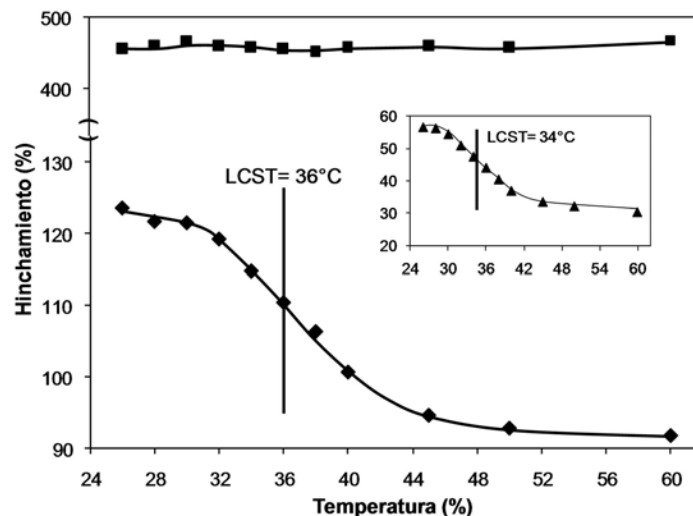


Figura 5.16: Porcentaje de hinchamiento en función de la temperatura en agua, analizado para: (◆)PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), (■)PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) y (▲) PP-g-NIPAAm.

En resumen, las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) poseen cadenas poliméricas con segmentos de poli(NIPAAm) suficientemente largos para presentar su transición de fase característica (LCST).^[98, 104, 105, 106] (Fig. 5.10a). Por el contrario, un alto contenido de APMA en las cadenas de copolímero injertadas en PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) evita que ocurra una contracción de las cadenas poliméricas (Fig. 5.10b y c); las fuertes repulsiones electrostáticas entre los grupos amino cuaternizados y el efecto estérico obstaculizan el colapso conformacional inducido por la temperatura.

Las aplicaciones de los materiales modificados en su superficie con polímeros termosensibles para la elaboración de dispositivos médicos son amplias y van a depender en gran medida de la hidroflicidad de los recubrimientos. El poli(NIPAAm) a temperaturas por debajo de su LCST, tiene la capacidad de absorber agua, facilitando la carga de algún fármaco en su red, mientras

que con temperaturas por encima de su LCST, con el incremento de la hidrofobicidad se contra las cadenas de polímero y se regula la velocidad de liberación del fármaco. Por otro lado, las superficies modificadas con hidrogeles disminuyen drásticamente la adhesión de microorganismos comparado con superficies sin modificar.^[107] En los materiales con recubrimientos a base de polímeros muy hidrofílicos no se adhieren microorganismos, ya que tienen una baja capacidad de adsorción de ciertas proteínas, por ejemplo, la fibronectina o el fibrinógeno, que promueven la adhesión bacterial.^[108] Por otro lado la introducción de cargas en las superficies plásticas, por ejemplo, grupos amino cuaternizados (cargas positivas) aumenta la adhesión pero también inhibe el crecimiento microbiano.^[109] Para lograr un material que combine ambos mecanismos antimicrobianos (anti-adherentes e inhibitorios) las películas de PP se recubrieron con NIPAAm y APMA, con el poli-(NIPAAm) hidrofóbico a la temperatura corporal (37 °C) y la capacidad de inhibir el crecimiento microbiano por parte de las unidades de APMA (contiene grupos amino cargados positivamente) en la red polimérica. Como se discutió antes, las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) conservan su respuesta a la temperatura, proporcionando hidrofobicidad al injerto, mientras que el PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) pierde la sensibilidad a la temperatura por el incremento de la hidrofiliidad.

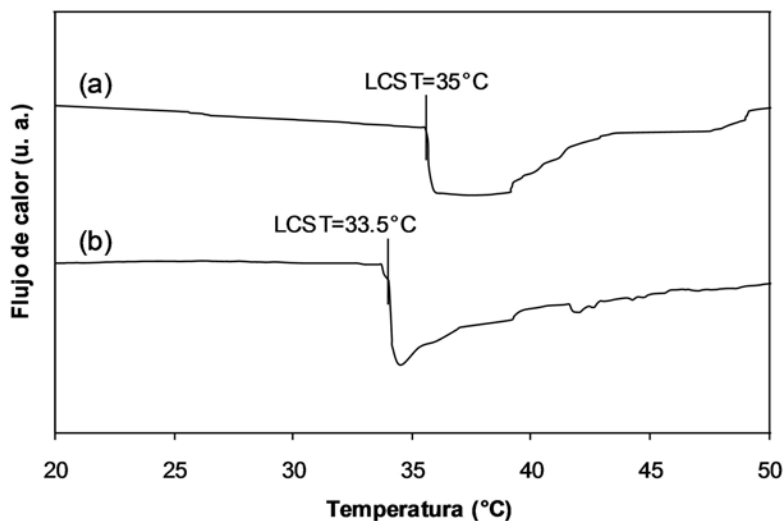


Figura 5.17: DSC por análisis calorimétrico diferencial de barrido para películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA): (a) 31 % y (b) 16 % de injerto

En los termogramas de DSC registrados entre 0 y 50 °C se observa un pico endotérmico en 33.5 °C y 35 °C para los copolímeros de injerto de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 31 y 16 % de injerto, el cual representa la transición hidrofílica-hidrofóbica del NIPAAm, la temperatura asignada a dicha transición está relacionada con el comienzo de la endoterma.

5.2.5. Análisis térmico

Polímero	Pérdida de 10 % en peso	Residuo a 600 °C	T _g (°C)	T _m (°C)
PP	445	1	-	161
poli(NIPAAm)	-	-	115-158 ^a	-
poli(APMA)	304	12	149 ^b	-
NIPAAm-c-APMA	302	33	120 ^b	-
PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 38 %	406	1	130	159
PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 50 %	399	1	134	160

Tabla 5.3: Propiedades térmicas de películas de PP, PNIPAAm y PAPMA, homopolímeros y copolímeros, y PP injertado; ^a[110], ^b[98]

Las propiedades térmicas de los copolímeros de PP-g-(NIPAAm-r-APMA) y NIPAAm-c-APMA, así como de los homopolímeros de poli(NIPAAm) y poli(APMA) se evaluaron por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA). La temperatura de fusión T_m del polipropileno (~160 °C) no se alteró cuando se injertaron los dos monómeros. PP-g-(NIPAAm-r-APMA) también presenta una transición vítrea (T_g) en 130 °C, cercana a la T_g de poli(NIPAAm) y poli(APMA) 115-158 °C y 149 °C, respectivamente (Tabla 5.3). La transición puede ser asignada a la T_g del poli(NIPAAm) ya que el contenido relativo de APMA es bajo, como se indicó en los resultados de infrarrojo y XPS. Además, la T_g del APMA puede quedar enmascarada por el amplio rango de temperatura en la que ocurre la transición vítrea del poli(NIPAAm). Además, las unidades de APMA no forman cadenas de polímero, sino que están separadas por fragmentos de cadenas de NIPAAm. Las películas de PP injertadas tiene una alta estabilidad térmica, similar a la del PP sin modificar, la temperatura de pérdida de 10 % del peso de las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA)

con 38 % y 50 % de injerto se registró a 406 y 399 °C, respectivamente, en atmósfera de nitrógeno. La cantidad de residuo a 600 °C fue de 1 % para las películas doblemente modificadas (Tabla 5.3).

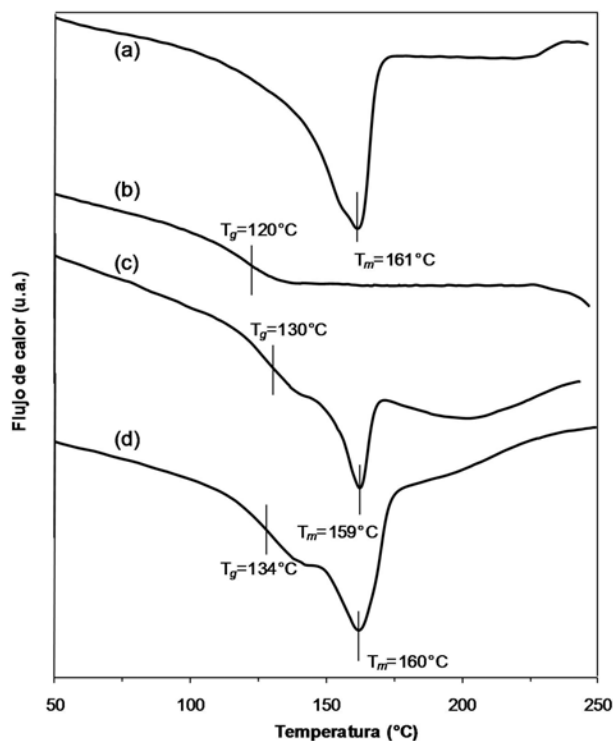


Figura 5.18: Termogramas de DSC de: (a)PP, (b)NIPAAm-c-APMA (28 % graft), (c)PP-g-(1NIPAAm-g-0.5APMA), 38 % y (d)PP-g-(1NIPAAm-g-0.5APMA), 50 %.

5.2.6. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Las vistas superficiales y transversales de las micrografías de SEM de las películas de PP, PP-g-NIPAAm y PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) se muestran en la Fig. 5.19. El PP sin modificar tiene una superficie lisa, en la cual no se observan discontinuidades. Las películas de PP-g-NIPAAm (28 % de injerto) muestran una superficie porosa y la vista transversal permite observar la capa que cubre la película de PP. Las micrografías de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 14 % de injerto muestran una capa injertada con un tamaño

de poro más grande que en la película de PP-g-NIPAAm, y en la vista transversal, se observa una capa densa de copolímero injertado. La superficie de la película de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 29 % de injerto muestra muchas protuberancias y alta rugosidad. Finalmente, la película de PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) con 13 % de injerto tiene una capa injertada más compacta aunque con bastantes poros. El espesor de las capas injertadas en estado hinchado varían entre 0.17 y 0.45 mm. En las vistas transversales se observa que la modificación de la película de polipropileno ocurre solamente en la superficie.

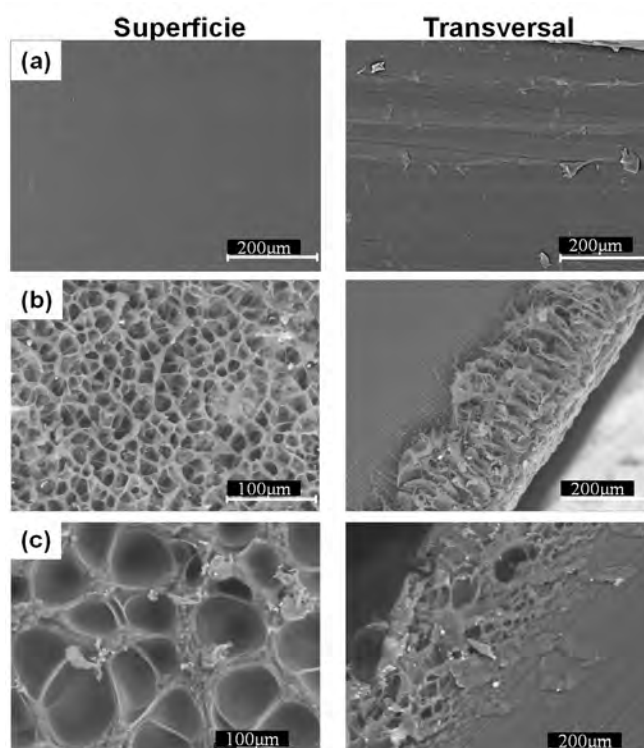
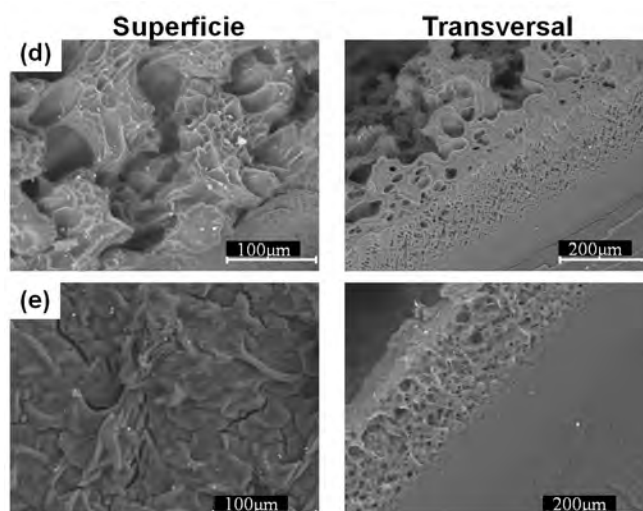


Figura 5.19: Imágenes de SEM de PP (a), PP-g-NIPAAm, 28 % de injerto (b) y PP-g-(1NIPAAm-g-0.5APMA), 14 % de injerto (c).



(Continuación Fig. 5.19). Imágenes de SEM de PP-g-(1NIPAAm-g-0.5APMA), 29% de injerto (d) y PP-g-(1NIPAAm-g-1APMA), 13% de injerto (e).

5.3. Coeficiente de fricción

La facilidad de inserción y remoción sin causar daño a los tejidos se correlaciona estrechamente con el coeficiente de fricción de los materiales con los que se fabrican los dispositivos médicos. Los valores de coeficiente de fricción, μ , contra la placa Peltier (superficie de cobre cromado) del reómetro oscilaron entre 0.19 y 0.27 para películas de PP-g-(NIPAAm-r-APMA). El coeficiente de fricción de las películas de PP sin modificar y PP-g-NIPAAm fueron 0.23 y 0.31, respectivamente (Tabla 5.4). Los valores de coeficientes de fricción obtenidos, están dentro del rango de materiales confortables y deslizables.^[111] A pesar del aumento de la rugosidad en la superficie del injerto (Fig. 5.19), el coeficiente de fricción está dentro de valores adecuados debido principalmente al APMA, que aumenta la habilidad del hidrogel injertado para absorber agua a 37 °C. Se ha reportado previamente que el agua absorbida por el hidrogel es expulsada bajo la aplicación de una carga formando una delgada capa de agua, lo que contribuye a la lubricación entre las películas de copolímero y otra superficie.^[112]

Polímero	Injerto (%)	Coefficiente de fricción (μ)
PP	-	0.23(0.06)
PP-g-NIPAAm	26	0.31(0.02)
PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA)	10	0.27(0.03)
PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA)	14	0.19(0.01)
PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA)	29	0.27(0.04)
PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA)	13	0.25(0.03)

Tabla 5.4: Valores de coeficientes de fricción de las películas injertadas.

5.4. Hemocompatibilidad y citocompatibilidad

5.4.1. Adsorción de albúmina

La adsorción de seroalbúmina bovina (BSA; por sus siglas en inglés) se considera un índice de la biocompatibilidad de un material, dado que la adsorción de ésta proteína sobre la superficie de dispositivos biomédicos previene la adhesión de plaquetas y microorganismos.^[113, 114] Después de 4 horas de inmersión en una solución de albúmina, la cantidad de BSA depositada sobre las películas aumentó en función del contenido de APMA en el injerto (Tabla 5.5).

Polímero	Injerto (%)	Albúmina absorbida (mg/cm ²)	
		30 min	4h
PP	-	0.36(0.02)	0.36(0.02)
PP-g-NIPAAm	26	0.20(0.04)	0.23(0.05)
PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA)	9	0.11(0.05)	0.61(0.06)
PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA)	13	0.12(0.01)	0.94(0.04)
PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA)	29	0.12(0.03)	1.02(0.01)
PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA)	13	0.08(0.02)	0.45(0.02)

Tabla 5.5: Albúmina de suero bovino depositada sobre las películas injertadas.

5.4.2. Hemólisis

El término biocompatibilidad comprende diferentes propiedades de un material, pero principalmente se refiere a la compatibilidad sanguínea y a la citotoxicidad.^[115] En el ensayo de hemólisis que se realizó con sangre de humano y rata, los eritrocitos se incubaron en una solución tampón de pH 7.4 en presencia de PP, PP-g-NIPAAm y PP-g-(NIPAAm-r-APMA) con diferentes porcentajes de injerto, así como también las películas recubiertas con CM-dextrano. Los copolímeros de injerto binario causaron menos de 4 % de hemólisis (Fig. 5.20), indicando que no hay alteraciones significativas de la membrana celular de las células sanguíneas. PP-g-NIPAAm causó 3.4 % y 5.5 % de hemólisis, mientras que las películas de PP sin modificar mostraron 2.0 % y 4.4 % de hemólisis en sangre de rata y humano, respectivamente. Las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) recubiertas de CM-dextrano resultaron ser las menos hemolíticas (<1.7 %). La disminución en la actividad hemolítica observada para los copolímeros que contienen unidades catiónicas de APMA, está relacionada con la habilidad de los grupos amino cuaternizados para absorber heparina^[116] y no colesterol de la membrana, que es una de las principales causas de modificación de la permeabilidad de la membrana.^[117]

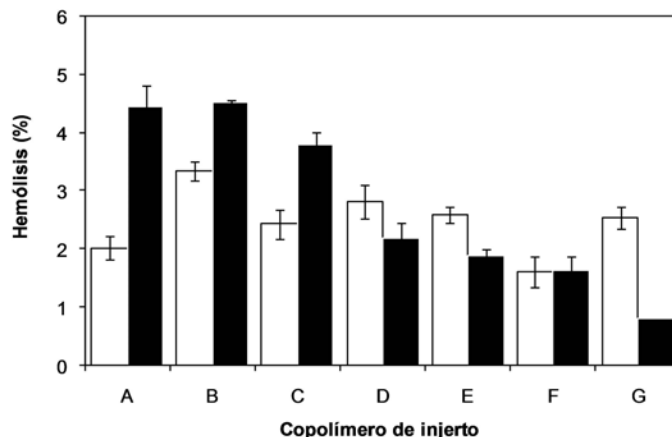


Figura 5.20: Porcentaje de hemólisis causados por: película de PP (A), PP-g-NIPAAm, 27 % (B), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 10 % (C), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 14 % (D), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 29 % (E), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 29 % recubierto de CM-dextrano (1.3 mg/cm²) (F) y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA), 13 % (G). Los bloques blancos corresponden a sangre de rata y los bloques negros corresponden a sangre humana.

5.4.3. Trombogenicidad

La trombogenicidad de los copolímeros de injerto se midió en función del peso del trombo generado en la superficie con sangre de rata Sprague Dawley. Las películas de PP sin modificar fueron tan trombogénicas (peso del trombo 7.4 ± 0.3 mg) como el vidrio de una caja Petri utilizada como control positivo (peso del trombo 7.5 ± 0.2 mg). El peso relativo de los trombos formados sobre la superficie de las películas de PP injertadas con NIPAAm y APMA se normalizaron con respecto a las películas de PP sin modificar (Fig. 5.21). El peso del trombo en la película de PP-g-NIPAAm se reduce solamente 10 %. Por el contrario, las películas injertadas con ambos monómeros (NIPAAm y APMA) resultaron por producir trombos mucho menores; PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) mostró 80 % menos trombogenicidad. Las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 10, 14 y 29 % de injerto mostraron un pequeño aumento en la trombogenicidad en función del aumento en el porcentaje de injerto. El efecto antitrombogénico del APMA puede estar relacionado con la capacidad de los grupos amino de adsorber heparina y albúmina de la sangre, inhibiendo el proceso de coagulación.^[118]

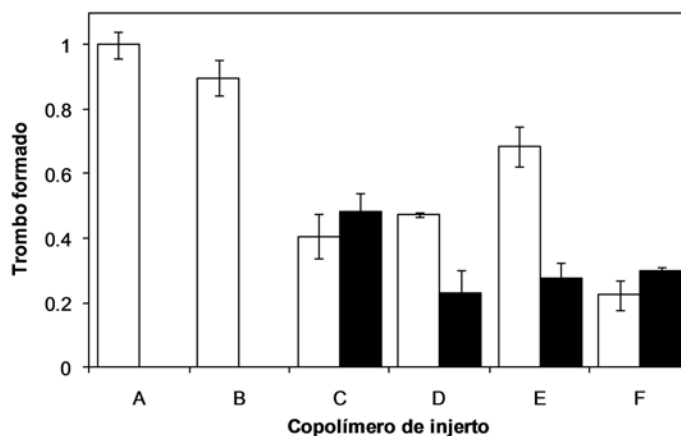


Figura 5.21: Trombo formado después de 30 min de incubación sobre película de PP (A), PP-g-NIPAAm, 27 % de injerto (B), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 10 % de injerto (C), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 14 % de injerto (D), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 29 % de injerto (E) y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA), 13 % de injerto (F). Los bloques blancos corresponden a los datos obtenidos con películas descargadas y los bloques negros corresponden a películas cargadas de diclofenaco.

5.4.4. Viabilidad celular

Los estudios de citocompatibilidad fueron llevados a cabo con macrófagos de ratón RAW 264.7 que presentan una alta sensibilidad a monómeros acrílicos, los cuales puede quedar como residuos del proceso de síntesis de los copolímeros de injerto con NIPAAm y APMA.^[119] Las células RAW 264.7 se cultivaron directamente sobre las películas. Todas las películas mostraron valores de viabilidad celular mayores al 75 % durante 3 días. Después una disminución en la viabilidad fue observada a los 6 días por algunas de las películas injertadas (Fig. 5.22).

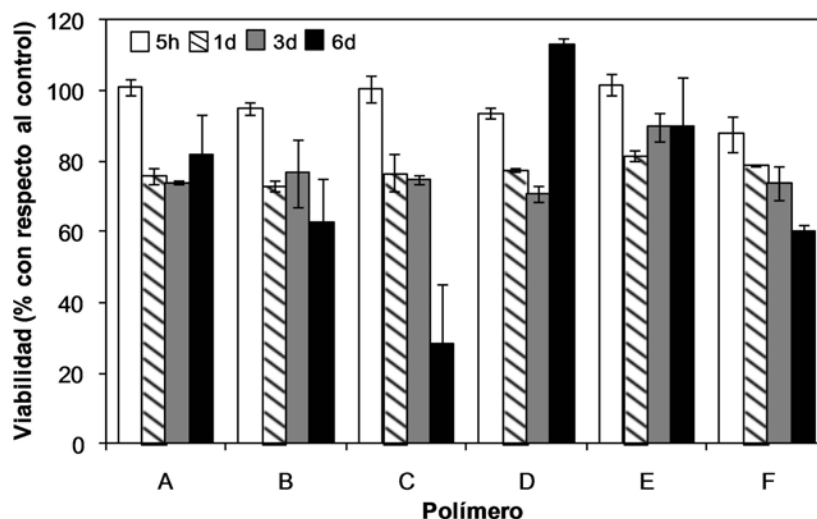


Figura 5.22: Viabilidad de los macrófagos RAW 264.7 a diferentes tiempos cultivados sobre PP (A), PP-g-NIPAAm, 27 % (B), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 10 % (C), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 14 % (D), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 29 % (E) y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA), 13 % (F).

El ensayo para observar células vivas y muertas con microscopia de fluorescencia confocal láser usando previamente una tinción con calceína y yoduro de propidio (Fig. 5.23), muestra a las películas de PP-g-(NIPAAm-r-APMA) cubiertas por células vivas (tinción verde), mientras una cantidad reducida de células crecieron sobre las películas de PP sin modificar, que mostraron una cantidad significativa de células dañadas o muertas (tinción roja). La cantidad de células vivas en las películas de PP-g-(NIPAAm-r-APMA) es notablemente mayor que la de células dañadas o muertas.

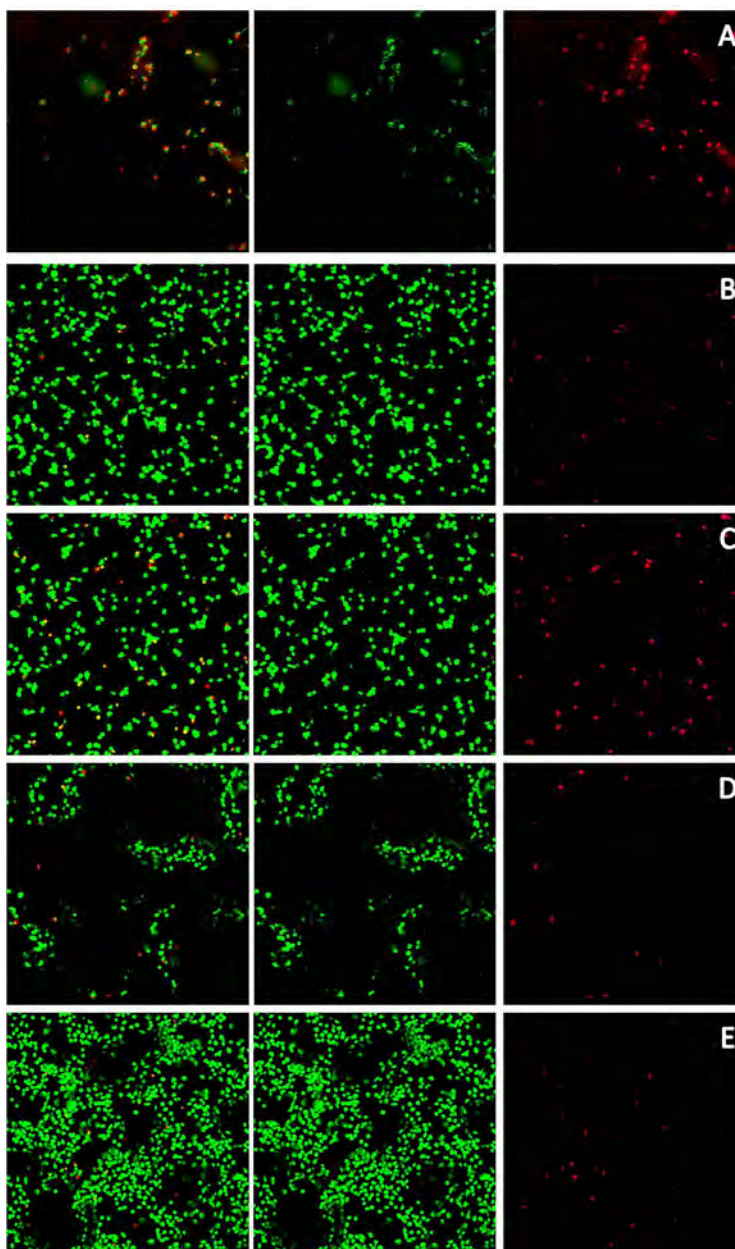


Figura 5.23: Ensayo de viabilidad de células RAW 264.7 cultivadas durante 24 horas sobre PP (A), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 10 % (B), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 14 % (C), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 29 % (D) y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA), 13 % (E).

5.4.5. Expresión de citoquinas pro-inflamatorias

Como referencia de posibles reacciones inflamatorias, se cuantificó la secreción de citoquinas como la interleuquina-1 α (IL-1 α) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) de las células RAW 264.7 cultivadas sobre los copolímeros de injerto. Estas citoquinas primarias estimulan la liberación de otras sustancias y la consecuente cascada inflamatoria resulta en el reclutamiento de otros tipos de células, con la formación de un granuloma en el implante o dispositivo médico.^[120]

Interleuquina-1 α (IL-1 α)

La expresión y liberación de IL-1 α de las células adheridas a las películas de PP sin modificar fue menor que para las películas injertadas (Fig. 5.24), lo cual puede ser debido a la mínima proliferación celular observada en la superficie, dado que los niveles de citoquinas esta positivamente relacionadas con la densidad celular^[121] (Fig. 5.23). Se sabe que los macrófagos se adhieren preferentemente a superficies rugosas en comparación con aquellas lisas (un fenómeno llamado rugofilia) y que la liberación de citoquinas aumenta cuando los macrófagos se adhieren a superficies rugosas.^[122] No obstante, los valores de expresión de IL-1 α de las células cultivadas sobre las películas de PP-g-NIPAAm y PP-g-(NIPAAm-r-APMA) estuvieron por debajo o cerca de los niveles basales de IL-1 α (control negativo) a lo largo de los 8 días de ensayo.

Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)

Las películas de PP sin modificar, PP-g-NIPAAm y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) no provocan la liberación de TNF- α , mientras que los macrófagos cultivados sobre las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con diferentes porcentajes de injerto, secretaron la citoquina a niveles similares de los encontrados en el control negativo (< 80 pg/mL) (Fig. 5.25). El control positivo (macrófagos tratados con lipopolisacárido, LPS) dio lugar a niveles de TNF- α significativamente mayores. En resumen, el injerto no provoca la secreción de las citoquinas y potencialmente no provocaría una respuesta inflamatoria.

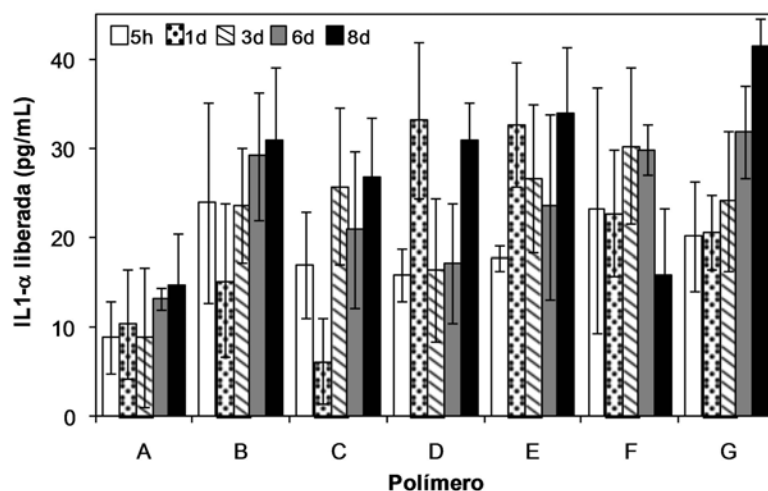


Figura 5.24: IL-1 α liberada por macrófagos RAW 264.7 a diferentes tiempos cultivados sobre PP (A), PP-g-NIPAAm, 27% (B), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 10% (C), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 14% (D), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 29% (E) y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA), 13% (F) y control negativo (G).

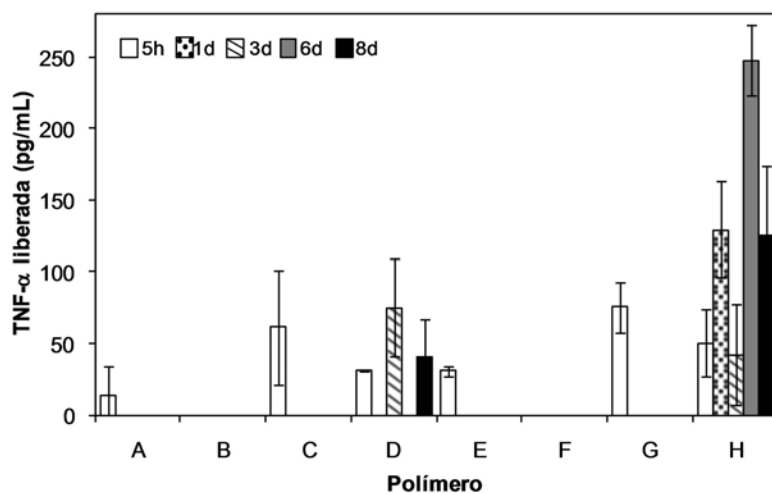


Figura 5.25: TNF- α liberada por macrófagos RAW 264.7 a diferentes tiempos cultivados sobre PP (A), PP-g-NIPAAm, 27% (B), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 10% (C), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 14% (D), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 29% (E) y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA), 13% (F), control negativo (G) y control positivo (células tratadas con LPS).

5.5. Carga de fármacos antiinflamatorios y CM-dextrano

Las películas de PP sin modificar y PP-g-NIPAAm no cargaron cantidades significativas de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs; por sus siglas en inglés). Por otro lado, el injerto con APMA promovió notablemente la carga de diclofenaco e ibuprofeno (Tabla 5.6). La cantidad de diclofenaco cargado por unidad de área superficial es mayor, cuando aumenta el porcentaje de injerto de las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA). Sin embargo, la relación en peso (mg de diclofenaco/ g de polímero injertado) disminuye, cuando se incrementa el porcentaje de injerto. Este comportamiento indica que, aunque la cantidad total de fármaco cargado es alta, menos unidades de APMA pueden interactuar con el fármaco, ya que la capa injertada se vuelve más compacta. El impedimento estérico entre unidades cercanas de APMA, dificulta la difusión y unión de las moléculas de fármaco. La comparación entre las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 14 % y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) con 13 % de injerto nos muestra que altas cantidades de diclofenaco pueden ser cargadas (de 0.053 a 0.064 mg/cm²) cuando el contenido relativo de APMA es mayor. Se observó una correlación lineal ($r^2=0.992$) entre las cantidades de diclofenaco cargado y la cantidad total de unidades de APMA en el copolímero injertado (Fig. 5.26).

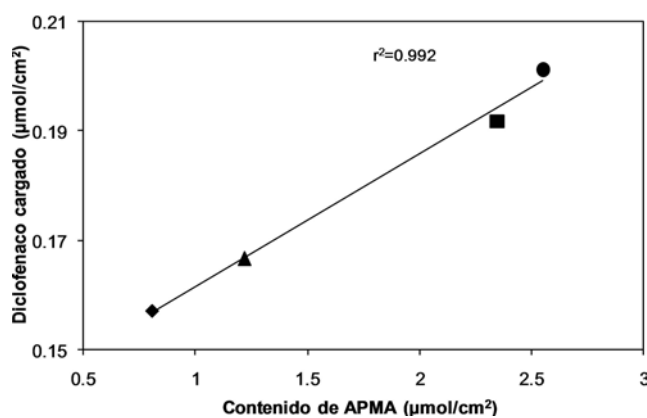


Figura 5.26: Cantidad de diclofenaco cargado en función de la cantidad de APMA. PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con porcentaje de injerto de 10 % (◆), 14 % (▲), 29 % (■) y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) con 14 % (●).

Polímero	Injerto (%)	Carga	
		(mg/cm ²)	(mg/g)
		Diclofenaco	
PP-g-NIPAAm	14	0.009(0.001)	0.36(0.01)
	27	0.010(0.001)	0.47(0.06)
PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA)	10	0.051(0.001)	9.04(0.08)
	10-dex	0.047(0.001)	8.31(0.16)
	14	0.053(0.001)	5.98(0.02)
	14-dex	0.050(0.002)	5.66(0.17)
	27	0.052(0.017)	3.17(0.01)
	29	0.061(0.001)	3.68(0.01)
	29-dex	0.055(0.001)	3.17(0.04)
PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA)	13	0.064(0.001)	7.94(0.03)
	13-dex	0.061(0.001)	7.51(0.12)
		Ibuprofeno	
PP-g-NIPAAm	27	0.080(0.013)	1.21(0.12)
PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA)	27	0.356(0.016)	20.16(1.24)

Tabla 5.6: Carga de diclofenaco e ibuprofeno sobre películas con diferentes porcentajes de injerto; los porcentajes de injerto con la leyenda -dex corresponden a películas recubiertas con CM-dextran.

La cantidad de ibuprofeno cargada fue seis veces mayor que la cantidad de diclofenaco cargado, debido a que se utilizó una solución de ibuprofeno 10 veces más concentrada durante el proceso de carga. La cantidad de ibuprofeno cargado por la película de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 27 % de injerto fue de 0.356 mg/cm². Por lo tanto, cambiando la concentración de fármaco en el medio de carga es posible controlar la cantidad cargada. Las películas injertadas pudieron ser recargadas varias veces después de la liberación del fármaco, manteniendo la capacidad inicial de carga, así como reproduciendo los perfiles de liberación durante 3 ciclos (Fig. 5.27).

Las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) cargadas con diclofenaco fueron menos trombogénicas (Fig. 5.21), debido al efecto inhibitorio sobre la enzima ciclooxigenasa de los antiinflamatorios no esteroideos^[123] y la capacidad de coordinación con los iones Ca²⁺^[124], aunque en menor grado debido a la alta relación de iones Ca²⁺/diclofenaco cargado (>20).

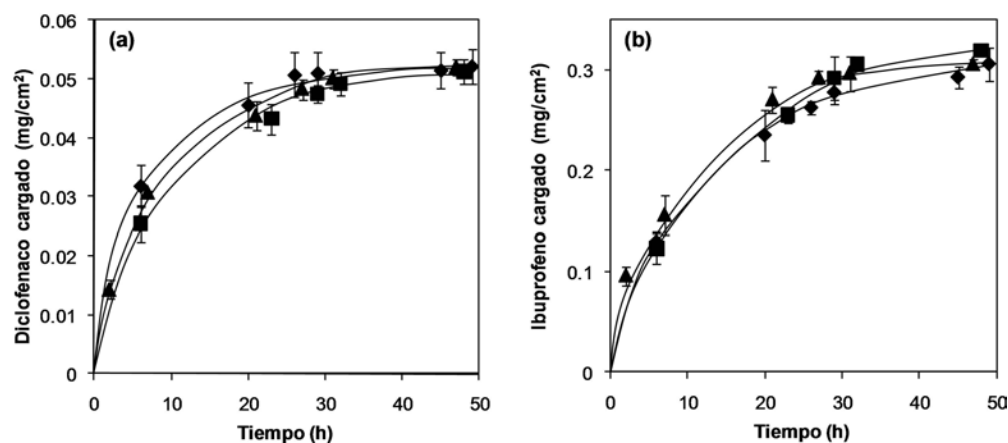


Figura 5.27: Perfiles de carga de diclofenaco (a) e ibuprofeno (b) sobre la misma película PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 27% de injerto (◆) primera, (■) segunda y (▲) tercera vez.

El recubrimiento de las películas cargadas de diclofenaco con el polisacárido CM-dextrano se realizó como una manera de: i) dotar a las películas injertadas con una superficie más biomimética capaz de prevenir, hasta cierto punto, la naturaleza de cuerpo extraño de los materiales sintéticos^[125] y ii) para determinar si el recubrimiento con CM-dextrano puede alterar los perfiles de liberación. La adsorción de CM-dextrano tiene lugar a través de las interacciones entre sus grupos carboxilato y los grupos catiónicos del APMA en el copolímero de injerto. La cantidad de CM-dextrano depositado sobre las películas injertadas fue mayor al incrementarse el porcentaje de injerto y la cantidad relativa de APMA (Fig. 5.28). Cabe mencionar que la carga de CM-dextrano sobre las películas pre-cargadas con diclofenaco, dio lugar a la liberación de una pequeña porción (<10%; entre 0.003 a 0.006 mg/cm²) del fármaco previamente cargado, debido a la competencia entre los grupos carboxilato del CM-dextrano y los del diclofenaco, por la interacción iónica con los grupos catiónicos del APMA.

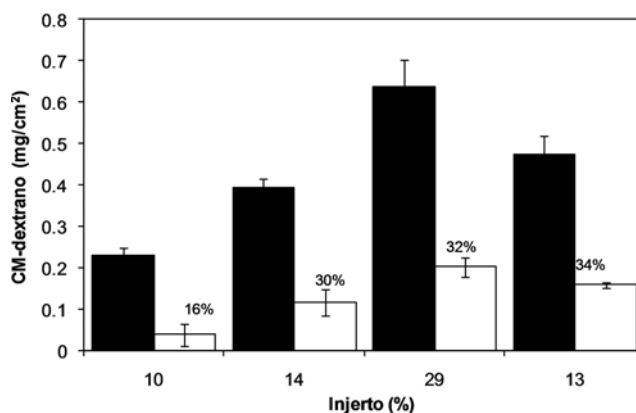


Figura 5.28: CM-dextrano cargado (columnas negras) y CM-dextrano que permanece después de 24 horas en el medio de liberación (columnas blancas). Las películas de PP-g-(NIPAAm-r-APMA) con 10, 14 y 29 % de injerto fueron sintetizadas con soluciones 1M de NIPAAm y 0.5M de APMA, mientras que la película con 13 % de injerto se preparó a partir de una solución 1M de NIPAAm y 1M de APMA.

5.6. Liberación de fármacos antiinflamatorios

Las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 27 % de injerto cargadas de fármaco, dieron lugar a perfiles de liberación sostenida de diclofenaco e ibuprofeno en medio tampón fosfato pH 7.4 a 37 °C (Fig. 5.29). El control en la liberación de los fármacos se atribuye a los efectos simultáneos de: i) el colapso del copolímero injertado a 37 °C, haciendo más lenta la difusión del fármaco^[126] y ii) la fuerza de las interacciones iónicas entre los fármacos y las unidades de APMA en el injerto.^[50] La película de PP-g-NIPAAm tuvo una liberación muy rápida al comienzo, liberando entre 40-50 % en los primeros 30 minutos y sosteniendo la liberación por pocas horas (Tabla 5.7). Por el contrario, las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 27 % de injerto liberaron durante los primeros 30 minutos entre 12-13 % del fármaco. A las 7 horas se liberaron 41 % y 70 % de diclofenaco e ibuprofeno, respectivamente. Por lo tanto, la contribución de las unidades de APMA para controlar la liberación de fármacos es notable. Además, después de 12 horas en el medio, el proceso de liberación se detuvo a pesar de estar bajo condiciones “sink” (la concentración de fármaco en el medio de liberación fue menor a 1/100 de la solubilidad del fármaco). Esta capacidad de liberar una cierta cantidad y detener la cesión, es debido a un estado de equilibrio entre el

fármaco inmovilizado en la capa injertada y el fármaco disuelto en el medio. Este comportamiento muestra la afinidad del ibuprofeno y, en particular, del diclofenaco por el copolímero injertado. Entonces, si el fármaco no es removido del medio de liberación, por ejemplo, si el fármaco no es absorbido cuando el dispositivo médico es insertado, la liberación se detendrá. El medio de liberación se cambió tres veces para lograr el 100 % de liberación. La misma película de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 27 % de injerto fue recargada con diclofenaco e ibuprofeno con una sesión de liberación entre cada carga. Las películas alcanzaron en cada ciclo casi la misma cantidad de fármaco cargado (por ejemplo, ~ 0.052 y ~ 0.356 mg/cm² de diclofenaco e ibuprofeno, respectivamente) (Fig. 5.27), que se liberaron con velocidades similares (Fig. 5.29). Los tres ciclos completos de carga y liberación fueron reproducibles con un mínimo error estadístico.

Polímero	Injerto (%)	Diclofenaco liberado a pH 7.4 (%)			
		(0.5h)	(1h)	(3h)	(7h)
PP-g-NIPAAm	14	42	68	85	96
	27	52	83	100	-
PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA)	10	25	37	61	70
	10-dex	15	28	49	56
	14	18	32	59	67
	14-dex	12	22	45	53
	27	12	19	34	41
	29	10	16	32	40
	29-dex	8	13	28	35
	27	10	16	32	40
PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA)	13	30	52	77	84
	13-dex	30	45	71	77
		Ibuprofeno liberado a pH 7.4 (%)			
		(0.5h)	(1h)	(3h)	(7h)
PP-g-NIPAAm	27	40	75	100	-
PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA)	27	13	28	64	70

Tabla 5.7: Porcentajes liberados de diclofenaco e ibuprofeno desde películas con diferentes porcentajes de injertos a diferentes tiempos; los porcentajes de injerto con la leyenda -dex corresponden a películas recubiertas con CM-dextran.

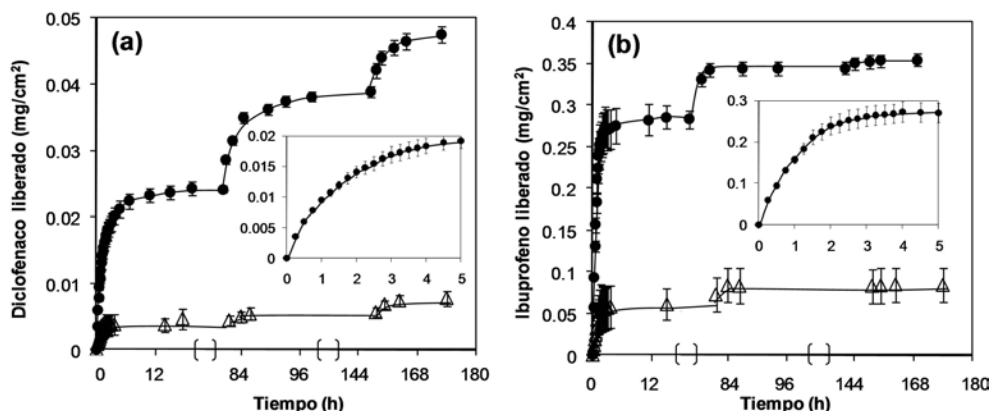


Figura 5.29: Perfiles de liberación de diclofenaco (a) e ibuprofeno (b) a pH 7.4 de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 27 % de injerto (●), el recuadro muestra las primeras 5 horas) y PP-g-NIPAAm con 27 % de injerto (△)

Los perfiles de liberación de diclofenaco de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con diferentes porcentajes de injerto se muestran en la Fig. 5.30. Independientemente del porcentaje de injerto y del recubrimiento de CM-dextrano, las películas tuvieron una liberación rápida durante las primeras 3 horas, seguida por un periodo de liberación más sostenida. Aunque todas las películas mostraron perfiles de liberación similares, las velocidades y cantidades en la liberación fueron diferentes. La liberación acumulada de diclofenaco a las 7 horas fue de 0.036 mg/cm² para PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 10 % de injerto, 0.037 mg/cm² para PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 14 % de injerto y 0.025 mg/cm² para PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 29 % de injerto. La película de PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) con 13 % de injerto liberó 0.054 mg/cm² en las primeras 7 horas, mientras que la película de PP-g-NIPAAm con 14 % de injerto solo libera 0.005 mg/cm² (Fig. 5.30).

Con respecto a las velocidades de liberación, a mayor porcentaje de injerto, la liberación fue más lenta. La cantidad liberada a las 7 horas de las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 10, 14 y 29 % de injerto fue 10, 67 y 40 % del total de diclofenaco cargado, respectivamente. Este hecho se explica por la alta densidad de las redes poliméricas cuando el porcentaje de injerto aumenta, lo cual hace que la difusión del fármaco se dificulte. El recubrimiento con CM-dextrano no modificó significativamente la liberación de diclofenaco de las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA),

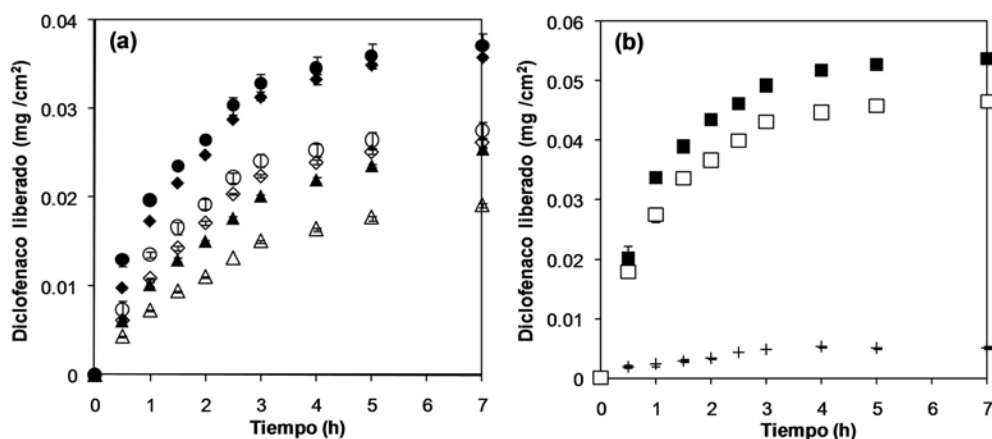


Figura 5.30: Perfiles de liberación de diclofenaco a pH 7.4 de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) (a) y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) o PP-g-PNIPAAm (b). PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 10 % (●) y recubierto con CM-dextrano (○), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 14 % de (◆) y recubierto con CM-dextrano (◇), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 29 % (▲) y recubierto con CM-dextrano (△), PP-g-NIPAAm con 14 % de injerto (+) y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) con 13 % (■) y recubierto con dextrano (□).

aunque la cantidad de fármaco liberada acumulada fue menor debido a la pérdida de fármaco durante el proceso de recubrimiento. Las películas recubiertas perdieron entre 65 % y 80 % del polisacárido después de 7 horas en el medio de liberación; las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con un alto porcentaje de injerto fueron capaces de retener mejor el recubrimiento (Fig. 5.28).

5.7. Carga de ácido nalidíxico y CM-dextrano

Las películas de PP sin modificar no absorben ácido nalidíxico una vez sumergidas en la solución de fármaco. La capacidad de la película de PP-g-NIPAAm para cargar el fármaco antimicrobiano fue muy baja, solamente $0.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Por otro lado, el injerto del copolímero de NIPAAm y APMA sobre PP aumenta dos órdenes de magnitud la capacidad de cargar el ácido nalidíxico (Tabla 5.8). Este comportamiento sugiere que el ácido nalidíxico no interactúa con los grupos funcionales del NIPAAm, sin embargo, interactúa electrostáticamente con los grupos de amina cuaternizada del APMA. La

cantidad de ácido nalidíxico cargado por unidad de área superficial aumenta, con el incremento en el porcentaje de injerto de las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA). La relación en peso (mg de diclofenaco/ g de polímero injertado), disminuye cuando se incrementa el porcentaje de injerto. La comparación entre las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA), ambas con 13 % de injerto nos muestra que altas cantidades de ácido nalidíxico pueden ser cargadas (de 0.024 a 0.036 mg/cm²), cuando el contenido relativo de APMA se vuelve mayor. Existe una correlación lineal entre la cantidad de ácido nalidíxico cargado y la cantidad de unidades de APMA en el copolímero injertado (Fig. 5.31). Entonces, una aumento en la relación APMA:NIPAAm, de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) a PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA), ambas con un injerto de 13 %, aumenta la carga de diclofenaco un 50 % (Tabla 5.8). Con respecto al perfil de carga, una rápida adsorción fue observada durante las primeras 6 horas, alcanzando el equilibrio en 24 horas (Fig. 5.32). Un mayor tiempo sumergido en la solución de carga lleva a un incremento pequeño en las cantidades cargadas.

Polímero	Injerto (%)	Carga de ácido nalidíxico	
		(mg/cm ²)	(mg/g)
PP-g-NIPAAm	14	0.0004(0.0001)	0.26(0.01)
PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA)	9	0.020(0.001)	4.03(0.19)
	9-dex	0.015(0.002)	3.18(0.06)
	13	0.024(0.001)	2.65(0.10)
	13-dex	0.017(0.001)	2.01(0.13)
	29	0.035(0.001)	0.93(0.08)
	29-dex	0.028(0.001)	0.71(0.06)
PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA)	13	0.036(0.001)	4.10(0.14)
	13-dex	0.030(0.001)	3.91(0.04)

Tabla 5.8: Carga de ácido nalidíxico sobre diferentes porcentajes de injerto; los % de injerto con la leyenda -dex muestran a películas recubiertas con CM-dextran.

Las películas cargadas de ácido nalidíxico se recubrieron con CM-dextrano con los propósitos mencionados anteriormente: i) mimetizar la superficie y ii) verificar la influencia del polisacárido en el perfil de liberación. El recubrimiento se llevó a cabo con CM-dextrano por medio de las interacciones electrostáticas entre los grupos carboxilato del CM-dextrano con las

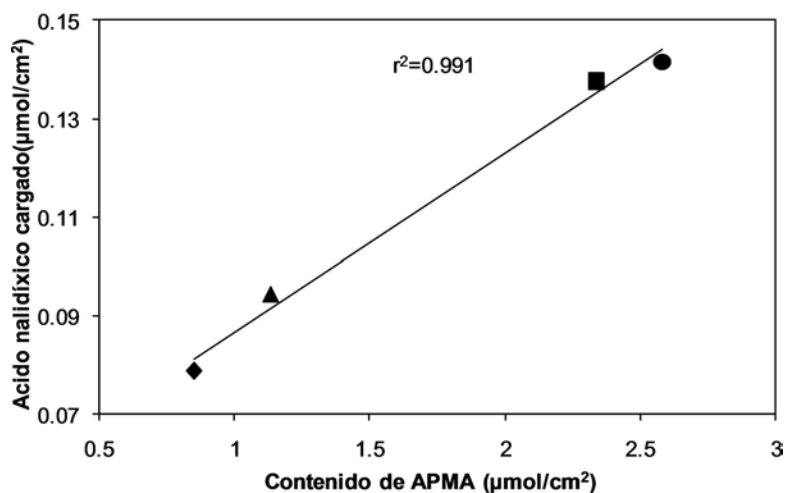


Figura 5.31: Cantidad de ácido nalidíxico cargado en función de la cantidad de APMA. PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con porcentajes de injerto de 10 % (◆), 14 % (▲), 29 % (■) y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) con 14 % (●).

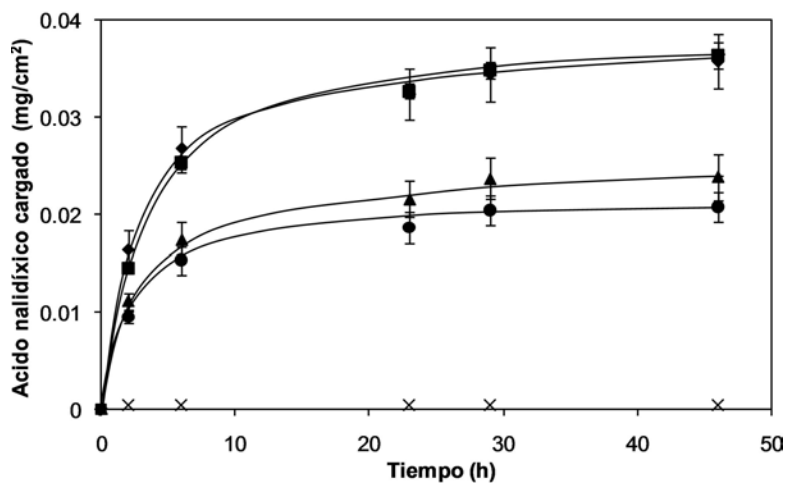


Figura 5.32: Perfiles de carga de ácido nalidíxico en PP-g-NIPAAm (×), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 9 % (●), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 13 % (▲), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 29 % (◆) y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA), 13 % (■).

unidades de APMA, compitiendo con el fármaco previamente cargado, por lo que el tiempo en el que la película permaneció sumergida en la solución de CM-dextrano se limitó a 10 minutos. Durante este tiempo, 20-25 % de ácido

nalidíxico fue liberado al medio. La cantidad de CM-dextrano depositada sobre las películas se incrementó, cuando el porcentaje de injerto de las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) aumentó, siendo mayor para PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) (Fig. 5.33). La masa de CM-dextrano depositado sobre las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) fue de 28 a 40 veces mas grande que la masa de ácido nalidíxico desplazado. En el caso de las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) la masa del recubrimiento de CM-dextrano fue 83 veces más grande que del fármaco liberado. Este comportamiento se debe a la naturaleza polimérica del CM-dextrano, el cual puede enlazarse a la red de NIPAAm/APMA por alguno de sus grupos carboxilo, entonces un punto de enlace puede permitir el anclaje de una gran cantidad de CM-dextrano en comparación con el ácido nalidíxico.

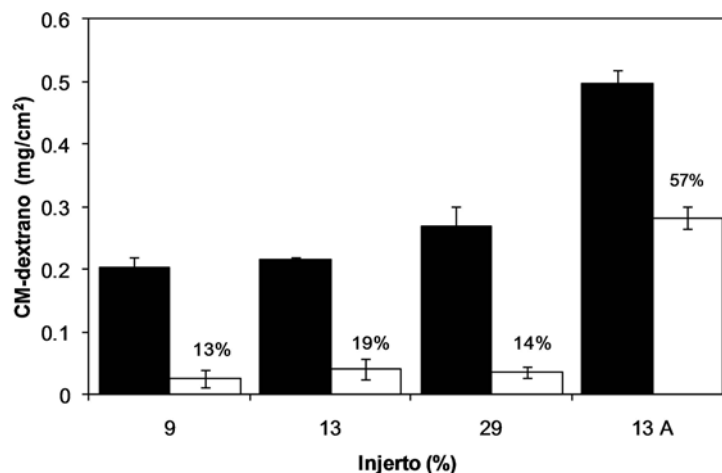


Figura 5.33: CM-dextrano cargado (columnas negras) y CM-dextrano que permanece después de 24 horas en el medio de liberación (columnas blancas). Las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 10, 13 y 29 % y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) con 13A %. Los valores sobre las barras blancas indica el porcentaje de CM-dextrano que permanece sobre las películas después de 24 horas.

5.8. Liberación de ácido nalidíxico

La película de PP-g-NIPAAm con 14 % de injerto cargó únicamente $0.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de ácido nalidíxico, liberando el 75 % durante los primeros 30 minutos (Tabla 5.9), esto indica que el colapso del poli(NIPAAm) no retiene eficientemente el fármaco en ausencia de otro mecanismo de retención. Los

perfiles de liberación de ácido nalidíxico, mostraron que las películas de PP-g-(NIPAAm-r-APMA) sostienen por mayor tiempo la liberación (Fig. 5.34). Cuando el porcentaje de injerto aumenta en las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), disminuye la velocidad de liberación, sin mostrar una liberación muy rápida al inicio (efecto “burst”). La película de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 29 % de injerto liberó 0.016 mg/cm² después de 24 horas en el medio de liberación, a pesar de haber cargado 0.035 mg/cm². Dado que los experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones “sink” y en un medio con bastantes iones (buffer de fosfatos pH 7.4, fuerza iónica 0.088), la interrupción de la liberación puede estar relacionada con un estado de equilibrio que se alcanza entre el fármaco libre en solución y el fármaco que interactúa con las unidades de APMA, lo cual indica una gran afinidad del ácido nalidíxico por el copolímero injertado.

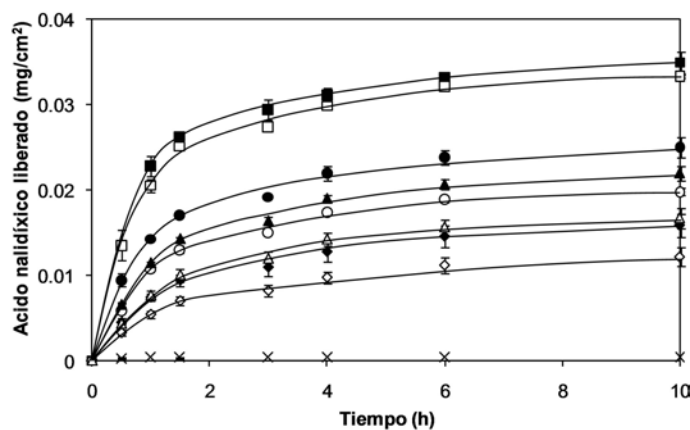


Figura 5.34: Perfiles de liberación de ácido nalidíxico a pH 7.4 de PP-g-NIPAAm con 14 % de injerto (+), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 9 % (●) y recubierto con CM-dextrano (○), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 13 % de (▲) y recubierto con CM-dextrano (△), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 29 % (◆) y recubierto con CM-dextrano (◇), y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) con 13 % (■) y recubierto con dextrano (□).

Las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA), liberaron el ácido nalidíxico más rápido que las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con el mismo porcentaje de injerto (13 %), a pesar de tener una mayor cantidad de APMA (2.58 contra 1.14 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$). Debido a que la estructura del copolímero en las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) adopta una estructura mas

contraída a 37 °C provocada por su LCST, se regula la velocidad de liberación del fármaco.

Polímero	Injerto (%)	Acido nalidíxico liberado a pH 7.4 (%)			
		(0.5h)	(1h)	(3h)	(6h)
PP-g-NIPAAm	14	75(1)	90(2)	100(2)	-
PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA)	9	43(1)	65(3)	87(4)	100(2)
	9-dex	30(4)	55(1)	78(1)	98(2)
	13	26(1)	46(1)	66(1)	83(1)
	13-dex	28(2)	50(3)	77(5)	100(2)
	29	12(1)	20(1)	29(1)	39(2)
	29-dex	11(1)	19(1)	29(1)	40(1)
PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA)	13	38(5)	62(1)	79(4)	90(2)
	13-dex	35(1)	59(1)	84(4)	96(3)

Tabla 5.9: Porcentajes liberados de ácido nalidíxico desde películas con diferentes porcentajes de injertos a diferentes tiempos; los porcentajes de injerto con la leyenda -dex muestran a películas recubiertas con CM-dextran.

El recubrimiento de las películas injertadas con CM-dextrano no provocó modificaciones relevantes en la velocidad de liberación del fármaco (Fig. 5.34 y (Tabla 5.9)). Durante el ensayo de liberación, la cantidad de CM-dextrano liberado de la películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 9, 13 y 29% de injerto fue alta, permaneciendo después de 24 horas solamente 13, 19 y 14% de las cantidades iniciales de CM-dextrano, respectivamente (Fig. 5.33). La película de PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) con 13% de injerto mantuvo el 57% del CM-dextrano inicialmente depositado, lo cual indica que la fuerza de las interacciones de APMA con el CM-dextrano es más fuerte que con el ácido nalidíxico.

5.9. Ensayo microbiológico

La eficiencia antibacterial de las películas cargadas con ácido nalidíxico se puso a prueba en un ensayo *in vitro* en contra de la bacteria *Escherichia coli*, que es uno de los microorganismos más frecuentemente encontrados en infecciones relacionadas con catéteres urinarios.^[127] La concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) del ácido nalidíxico para *E. coli* está reportada en 4-6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.^[128, 129] El ácido nalidíxico es conocido por ser efectivo en contra de microorganismos sensibles a indoles, como las especies *Proteus* y otros microorganismo involucrados en infecciones urinarias, por ejemplo, bacterias coliformes como las *Klebsiella* y *Enterobacter aeruginosa*. La especie *Brucella* y algunas cepas de *Salmonella* y *Shigella* también son sensibles al ácido nalidíxico.^[130] El ensayo de difusión en placas de agar Müller-Hinton por 24 horas reveló diferentes tamaños en las áreas de inhibición contra la cepa de *E. coli* (Fig. 5.35). El ensayo se llevó a cabo utilizando una película sin carga de fármaco de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 27 % de injerto como control, la cual muestra que la bacteria crece alrededor de la película sin mostrar zonas de inhibición. En contraste, las películas cargadas con ácido nalidíxico formaron evidentes zonas de inhibición (Tabla 5.10).

Polímero	Injerto (%)	Ac. nalidíxico cargado (mg/cm^2)	Zona de inhibición a las 24 h (mm)
PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA)	27	Sin carga	-
	9	0.018(0.001)	22.0(0.5)
	13	0.019(0.001)	23.0(0.5)
	29	0.031(0.001)	25.0(0.5)
PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA)	13	0.030(0.001)	24.0(0.5)

Tabla 5.10: Diámetros de las zonas de inhibición contra *E. coli* en placas de agar Müller-Hinton obtenidos con películas de PP-g-(NIPAAm-r-APMA) cargadas con ácido nalidíxico.

Las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 29 % de injerto y cargadas con la mayor cantidad de ácido nalidíxico mostraron una zona de inhibición de 25 mm de diámetro. Las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 9 y 13 % de injerto causaron zonas de inhibición de 22 y

23 mm, respectivamente. Las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) con 13% que cargaron una cantidad similar a las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) con 29% de injerto fueron igualmente eficientes. Las zonas de inhibición formadas por las películas cargadas de fármaco se mantuvieron por al menos 144 horas.

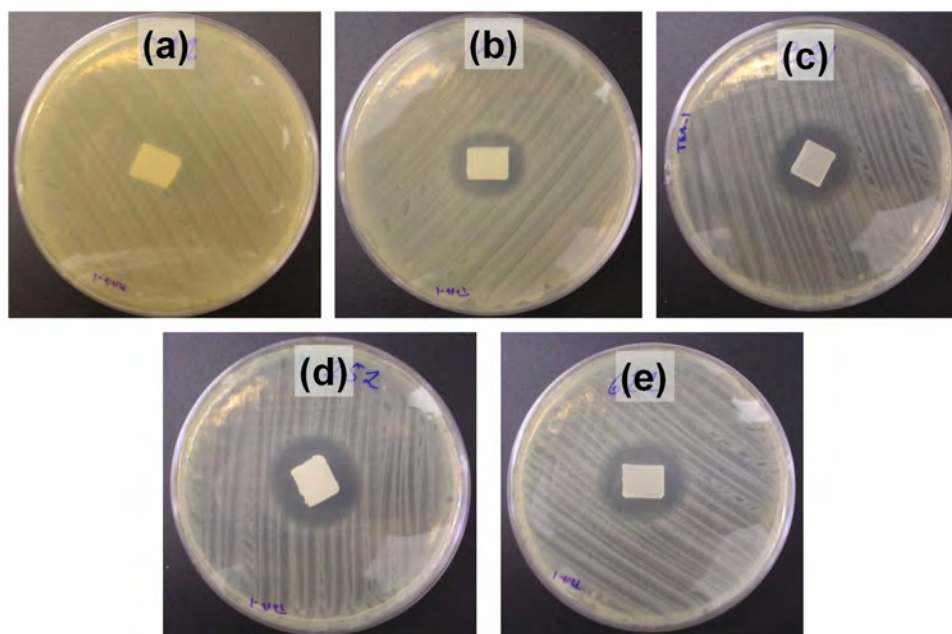


Figura 5.35: Zonas de inhibición en contra de *E. coli* con películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) 27% sin ácido nalidíxico (a), y las películas cargadas de ácido nalidíxico: PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) 9% (b), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) 13% (c), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) 29% (d) y PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) 13% (e).

Conclusiones

Se sintetizó el copolímero de injerto binario PP-g-(NIPAAm-r-APMA) con porcentajes de injerto entre 9 y 29 %, con diferentes proporciones de los monómeros NIPAAm:APMA (55:45 y 83:17) por el método de preirradiación oxidativa, en un solo paso usando radiación γ . Se caracterizaron las películas obtenidas por FTIR-ATR y XPS para confirmar la presencia de los grupos funcionales injertados en el copolímero. Las micrografías de SEM muestran una superficie rugosa altamente porosa en las películas injertadas, las cuales tienen una gran capacidad de absorber disolvente, aumentando el porcentaje de hinchamiento cuando incrementan las unidades de APMA en las cadenas poliméricas. Las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) presentaron sensibilidad a la temperatura, mostrando una LCST a 34-36 °C, mientras que las películas de PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) no mostraron transiciones hidrofílicas-hidrofóbicas debido a la gran cantidad de unidades de APMA en la cadena principal.

Las películas tienen la capacidad de cargar fármacos del tipo aniónico, como diclofenaco, ibuprofeno y ácido nalidíxico, manteniendo una liberación sostenida durante varias horas de los fármacos en solución buffer de fosfatos pH 7.4 a 37 °C. Además, en el caso de diclofenaco e ibuprofeno se observó que la liberación puede ser interrumpida por el equilibrio alcanzado entre el fármaco que se encuentra en la solución y el inmovilizado en el copolímero injertado. Las películas tienen coeficientes de fricción dentro del intervalo de materiales confortables. Las películas se recubrieron con CM-dextrano para mimetizarse con sistemas biológicos, sin modificar los perfiles de liberación de los fármacos.

Todas las películas tuvieron una alta hemocompatibilidad, con valores menores del 4% en hemólisis y un carácter trombogénico de las películas injertadas, 4 veces menor que del PP sin modificar. La expresión de citosinas pro-inflamatorias provocada por películas injertadas fue cercana a los niveles basales. Las células RAW 264.7 cultivadas sobre las películas tuvieron porcentajes de más de 75% de viabilidad, que se confirmaron por microscopia de fluorescencia confocal láser, observando una gran cantidad de células vivas después de 24 horas. La capacidad de inhibir el crecimiento microbiano de las películas de PP-g-(NIPAAm-r-APMA) cargadas con ácido nalidíxico se comprobó en un ensayo en contra de *E. coli*, confirmando que la cantidad de antibiótico cargado puede reducir el riesgo de que la película sea colonizada por este microorganismo. En resumen las películas de PP-g-(NIPAAm-r-APMA) mostraron un comportamiento altamente biocompatible y con la capacidad de cargar fármacos y liberarlos de forma controlada, siendo un material con potenciales aplicaciones en dispositivos médicos.

Bibliografía

- [1] Kumara, A., Srivastava, A., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. *Prog. Polym. Sci.* 2007, 32, 1205-1237.
- [2] Jeong, B., Gutowska, A. *Trends Biotechnol.* 2002, 20, 305-311.
- [3] Hoffman, A. S., Stayton, P. S., Bulmus, V., Chen, G., Jinping, C., Chueng C, *J. Biomed. Mater. Res.* 2000, 52, 577-586.
- [4] Galaev, I. Y., Mattiasson, B. *Trends Biotechnol.* 2000, 17, 335-340.
- [5] Qiu, Y., Park, K. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2001, 53, 321-339.
- [6] Gil, E. S., Hudson, S. M. *Prog. Polym. Sci.* 2004, 29, 1173-1222.
- [7] Hoffman, A. S. *J. Control. Release* 1987, 6, 297-305.
- [8] Lee, K. Y., Mooney, D. J. *Chem. Rev.* 2001, 101, 1869-1880.
- [9] van der Linden, H. J., Herber, S., Olthuis, W., Bergveld, P. *Analyst* 2003, 128, 325-331.
- [10] Jen, A. C., Wake, M. C., Mikos, A. G. *Biotechnol. Bioeng.* 1996, 50, 357-364.
- [11] Wang, K., Burban, J., Cussler, E. Hydrogels as separation agents. *Responsive gels: volume transitions II*, 1993, 67-79.
- [12] Hoare, T. R., Kohane, D. S. *Polymer.* 2008, 49, 1993-2007.
- [13] Cole, M. A., Voelcker, N. H., Thissen, H., Griesser, H. J. *Biomaterials* 2009, 30, 1827-1850.
- [14] Bhattacharyya, A., Misra, B. *Prog. Polym. Sci.* 2004, 29, 767-814.

- [15] Dargavillea, T. R., Georgeb, G. A., Hilla, D. J. T., Whittaker, A. K. *Prog. Polym. Sci.* 2003, 28, 1355-1376.
- [16] Painter, P. C. *Fundamentals in polymer science*. Segunda edición. CRC Press. 1997.
- [17] Stevens M. P. *Polymer Chemistry*. Tercera edición. Oxford University Press, 1999.
- [18] Woods, R. J. *Applied radiation chemistry: Radiation processing*. John Wiley & Sons, Inc.
- [19] Wlison J. E. *Radiation Chemistry of Monomers, Polymers and Plastics*. Marcel Dekker, Inc., 1974.
- [20] Dargavillea, T. R., Georgeb, G. A., Hilla, D. J. T., Whittakerc, A. K. *Prog. Polym. Sci.* 2003, 28, 1355-1376.
- [21] Ng, L-T., Garnett, J. L., Zilic, E., Nguyen, D. *Radiat. Phys. Chem.* 2001, 62, 89-98.
- [22] Ibrahim, A. A., Nada, A. M. A. *Acta. Polym.* 1985, 36, 320-322.
- [23] Chapiro A. In: Mark H, Marwell CS, Melville HW, editors. *High polymers*, vol. XV. New York: Interscience; 1962. p. 679.
- [24] Garnett, J. L., Yen, N. T. *Polym. Lett.* 1974, 12, 225-229.
- [25] Jun, L., Jun, L., Min, Y., Hongfei, H. *Radiat. Phys. Chem.* 2001, 60, 625-628.
- [26] Trommsdorff, E., Kohle, H., Lagally, P. *Makromol. Chem.* 1948, 1, 169-198.
- [27] Misra, B. N., Sood, D. S., Mehta, I. K. *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* 1985, 23, 1749-1756.
- [28] Nasef, M. M., Saidi, H., Nor, H. M., Dahlan, K. Z. M., Hashim, K. *J. Appl. Polym. Sci.* 1999, 73, 2095-2102.
- [29] Chapiro, A. *J. Polym. Sci.* 1959, 34, 481-501.
- [30] Chapiro, A., Matsumoto, A. *J. Polym. Sci.* 1962, 57, 743-761.

- [31] Baker L. Thermotropic hydrogels as novel membranes in industrial processes. PhD Thesis. University of Queensland, Brisbane; 1999.
- [32] Cardona, F., George, G. A., Hill, D. J. T., Rasoul, F., Maeji, J. *Macromolecules* 2002, 35, 355-364.
- [33] Sun, T., Xu, P., Liu, Q., Xue, J., Xie, W. *Eur. Polym. J.* 2003, 39, 189-192.
- [34] Dimitrov, I., Trzebicka, B. *Prog. Polym. Sci.* 2007, 32, 1275-1343.
- [35] Corradini, P. *J. Polym. Sci. Part A* 2004, 42, 391-395.
- [36] Alariqi, S. A. S., Kumar, A. P., Rao, B. S. M., Singh, R. P. *Polym. Degrad. Stabil.* 2007, 92, 299-309.
- [37] Bowen R. A. R., Hortin G. L., Csako, G., Otañez, O. H., Remaley, A. T. *Clin. Biochem.* 2010, 43, 4-25.
- [38] Liang, L., Xiangdong, F., Loni, P., Vish, V. *J. Memb. Sci.* 1999, 162, 235-246.
- [39] Choi, Y., Yamaguchi, T., Nakao, S. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2000, 39, 2491-2495.
- [40] Hosoya, K., Kubo, T., Tanaka, N., Haginaka, J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 30, 1919-1922.
- [41] Magoshi, T., Ziani-Cherif, H., Ohya, S., Nakayama, Y., Matsuda, T. *Langmuir* 2000, 18, 4862-4872.
- [42] Chan, H. S., Dill, K. A. *Phys. Today* 1993, 46, 24-30.
- [43] Post, C. B., Zimm, B. H. *Biopolymers* 1982, 21, 2139-2160.
- [44] Kelly, A. M., Mark, H. S., Joseph, E. S., Larry, K. K., Mark, E. M. *Biomaterials* 2000, 21, 9-21.
- [45] Qiu, Y. X., Yu, X. J., Feng, L. X. *Macromol. Chem.* 1992, 193, 1377-1386.
- [46] Young, J. K., Inn-Kyu, K., Man, W. H., Sung-Chul, Y. *Biomaterials* 2000, 21, 121-130.

- [47] Ferruti, P., Domini, I., Barbucci, R., Beni, M. C., Dispensa, E., Sancasciani, S., Marchisio, M. A., Tanzi, M. C. *Biomaterials* 1983, 4, 218-221.
- [48] Tanzi, M. C., Tieghi, G., Botto, P., Barozzi, C. *Biomaterials* 1984, 5, 357-361.
- [49] Bamford, C. H., Al-Lamee, K. G. *Polymer* 1996, 37, 4885-4889.
- [50] Andrade-Vivero, P., Fernandez-Gabriel, E., Álvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A. *J. Pharm. Sci-US* 2007, 96, 802-813.
- [51] Seiffert, S., Oppermann, W. *Macromol. Chem. Phys.* 2007, 208, 1744-1752.
- [52] Li, Y., Lokitz, B. S., McCormick, C. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 5792-5795.
- [53] Black, J. Biological performance of materials: Fundamentals of biocompatibility. New York. Mercel Dekker, Inc., 1992.
- [54] Park, J. B. Biomaterials science and engineering. New York. Plenum Press, 1984.
- [55] Moukwa, M. *J. Min. Metal. Material. Soc.* 1997, 49, 46-50.
- [56] Williams, D. F. Consensus and definitions in biomaterials. Advances in biomaterials. Elsevier Science, Amsterdam, 1988.
- [57] Ramakrishna, S., Mayer, J., Wintermantel, E. Leong, K. W. *Compos. Sci. Technol.* 2001, 61, 1189-1224.
- [58] Williams, D. F. *Biomaterials* 2008, 29, 2941-2953.
- [59] Khansari, D. N., Murgó, A. J., Faith, R. E. *Immunol. Today* 1990, 11, 170-175.
- [60] Jones, D. A., Smith, C. W., McIntire, L.V. *Biomaterials* 1996, 17, 337-347.
- [61] Morimoto, A., Murakami, N., Takada, M., Teshirogi, S., Watanabe, T. *J. Physiol.* 1987, 391, 209-218.

- [62] Dinarello, C. A., Cannon, J. G., Wolff, S. M., Bernheim, H. A., Beutler, B., Cerami, A., Figari, I. S., Palladino, M. A, O'SConnor, J. V. *J. Exp. Med.* 1986, 163, 1433-1450.
- [63] Oppenheim, J. J., Kovacs, E. J., Matsushima, K., Durum, S. K. *Immunol. Today* 1986, 7, 45-56.
- [64] Blanka, R. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1996, 21, 157-176.
- [65] Cenni, E., Ciapetti, G., Cavedagna, D., Di Leo, A., Pizzoferrato, A. *J. Biomcd. Mater. Rcs.* 1993, 27, 1161-1164.
- [66] Brash, J.L. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2000, 11, 1135-1146.
- [67] Long, D.A., Coulthard, M.G. *Anaesth. Intensive. Care.* 2006, 34, 481-484.
- [68] Klement, P., Du, Y.J., Berry, L.R., Tressel, P., Chan, A.K. *Biomaterials* 2006, 27, 5107-5117.
- [69] Carreira Villamor, J. M. Diagnóstico y terapéutica endoluminal. Barcelona. MASSON S. A., 2002.
- [70] Dinarvand, R., D'SEmanuele, A. *J. Control. Release* 1995, 36, 221-227.
- [71] Kayaman, N., Kazan, D., Erarslan, A., Okay, O., Baysal, B. M. *J. Appl. Polym. Sci.* 1998, 67, 805-814.
- [72] Sokker, H. H., Ghaffar, A. M. A., Gad, Y. H., Aly, A. S. *Carbohydr. Polym.* 2009, 75, 222-229.
- [73] Dubin, C. H. *Drug. Deliv. Technol.* 2004, 4, 298-303.
- [74] Wu, P., Grainger, D. W. *Biomaterials* 2006, 27, 2450-2467.
- [75] Ansel, H. C., Popovich N. G., Loyd, V., Allen, J. Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems, 6a. edición, Williams & Wikins, 1995.
- [76] Liu, S. J., Ueng, S. W., Lin, S. S., Chan, E. C. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002, 63, 807-813.
- [77] Gransden, W. R. *J. Med. Microbiol.* 1997, 46, 436-439.

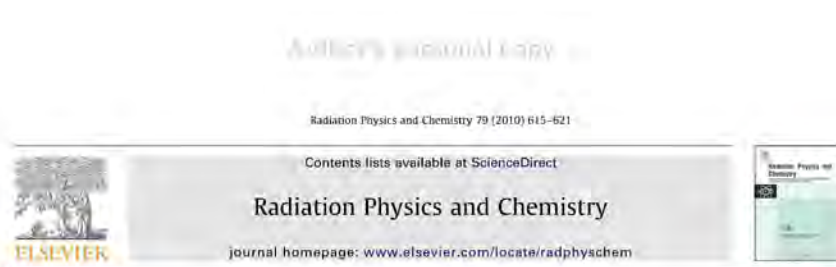
- [78] Zhang, X., Wyss, U. P., Pichora, D., Goosen, M. F. A. *J. Pharm. Pharmacol.* 1994, 46, 718-724.
- [79] Khardori, N., Yassien, M. *J. Ind. Microbiol.* 1995, 15, 141-147.
- [80] Finch, R. G., Pritchard, D. I., Bycroft, B. W., Williams, P., Stewart, G. S. A. B. *J. Antimicrob. Chemother.* 1998, 42, 569-571.
- [81] March, J. C., Bentley, W. E. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2004, 15, 495-502.
- [82] Biering-Sorensen, F. *Curr. Opin. Urol.* 2002, 12, 45-49.
- [83] Liedl, B. *Curr. Opin. Urol.* 2001, 11, 75-79.
- [84] Barton, A. J., Sagers, R. D., Pitt, W. G. *J. Biomed. Mater. Res.* 1996, 30, 4903-410.
- [85] Tenke, P., Riedl, C. R., Jones, G. L., Williams, G. J., Stickler, D., Nagy, E. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 2004, 23S1, S67-S74.
- [86] Nicolle, L.E. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2001, 22, 316-321.
- [87] Kuhn, W., Rist, M., Zaech, G. A. *Paraplegia* 1991, 29, 222-232.
- [88] Saint, S., Meddings, J. A., Calfee, D., Kowalski, C. P., Krein, S. L. *Ann. Intern. Med.* 2009, 150, 877-884.
- [89] Billote-Domingo, K., Mendoza, M. T., Torres, T. T. *Phil. J. Microbiol. Infect. Dis.* 1999, 28, 133-138.
- [90] Warren, J. W. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 1991, 29, 299-30.
- [91] Nicolle, L. E. *Clinical Microbiology Newsletter* 2002, 24, 135-140.
- [92] Yañez, F., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008, 69, 1094-1103.
- [93] Gong, J. P., Kagata, G., Osada, Y. *J. Phys. Chem. B* 1999, 103, 6007-6014.
- [94] Imai, Y., Nose, Y. *J. Biomed. Mater. Res.* 1972, 6, 165-172.
- [95] Halliwell, G., Sakajoh, M., Dunn, T. *Anzyme. Microb. Technol.* 1983, 5, 37-40.

- [96] Scott, C. P., Higham, P. A. *J. Biomed. Mater. Res. B* 2003, 64, 94-98.
- [97] Gupta, B., Anjum, N. *Adv. Polym. Sci.* 2003, 162, 35-618.
- [98] Mai-ngam, K., Boonkitpattarakul, K., Sakulsombat, M., Chumningan, P., Mai-ngam, B. *Eur. Polym. J.* 2009, 45, 1260-1269.
- [99] Ali, M. M., Perzanowski, H. P., Ali, S. A. *Polymer* 2000, 41, 5591-5600.
- [100] Dobrynina, A. V., Rubinstein, M. *Prog. Polym. Sci.* 2005, 30, 1049-1118.
- [101] Manghi, M., Netz, R. R. *Eur. Phys. J. E* 2004, 14, 67-77.
- [102] Netz, R. R., Orland, H. *Eur. Phys. J. B* 1999, 8, 81-98.
- [103] Contreras-García, A., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., Bucio, E. *Radiat. Phys. Chem.* 2010, 79, 615-621.
- [104] Shah, S. S., Wertheim, J., Wang, C. T., Pitt, C. G. *J. Controll. Release* 1997, 45, 95-101.
- [105] Dimitrov, I., Trzebicka, B., Müller, A. H. E., Dworak, A., Tsvetanov, C. B. *Prog. Polym. Sci.* 2007, 32, 1275-1343.
- [106] Goncalves da Silva, A. M. P. S., Lopes, S. I. C., Brogueira, P., Prazeres, T. J. V., Beija, M., Martinho, J. M. G. *J. Colloid. Interf. Sci.* 2008, 327, 129-137.
- [107] Cook, A. D., Sagers, R. D., Pitt, W. G. *J. Biomed. Mater. Res.* 1993, 27, 119-126.
- [108] Kuusela, P., Vartio, T., Vuento, M., Myhre, E. B. *Infect. Immun.* 1985, 77, 50-54.
- [109] Gottenbos, B. D., Grijpma, W., van der Mei, H. C., Feijen, J., Busscher, H. J. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001, 48, 7-13.
- [110] Nuopponen, M. Organized nanostructures of thermoresponsive poly(N-isopropylacrylamide) block copolymers obtained through controlled RAFT polymerization. Finland: Department of Chemistry, University of Helsinki; 2008.

- [111] Takashima, K., Shimomura, R., Kitou, T., Terada, H., Yoshinaka, K., Ikeuchi, K. *Tribol. Int.* 2007, 40, 319-328.
- [112] Gong, J., Iwasaki, Y., Osada, Y. *J. Phys. Chem. B* 1999, 103, 6001-6006.
- [113] Anderson, J. M., Rodriguez, A., Chang, D. T. *Semin. Immunol.* 2008, 20, 86-94.
- [114] von Eiff, C., Jansen, B., Kohnene, W., Becker, K. *Drugs* 2005, 65, 179-191.
- [115] Fischera, D., Lib, Y., Ahlemeyerc, B., Krieglsteinc, J., Kissel, T. *Biomaterials* 2003, 24, 1121-1131.
- [116] Dey, R. K., Ray, A. R. *Biomaterials* 2003, 24, 2985-2993.
- [117] Li, J., Xiao, H., Li, J., Zhong, Y. *Int. J. Pharm.* 2004, 278, 329-342.
- [118] Kottkemarchant, K., Anderson, J. M., Umemura, Y., Marchant, R. E. *Biomaterials* 1989, 10, 147-155.
- [119] Lin, N. J., Bailey, L. O., Becker, M. L., Washburn, N. R., Henderson, L. A. *Acta Biomater.* 2007, 3, 163-173.
- [120] Ingham, E., Fisher, J. *Biomaterials* 2005, 26, 1271-1286.
- [121] Chensue, S. W., Shmyr-Forsch, C., Weng, A., Otterness, I. G., Kunkel, S. L. *J. Leukocyte. Biol.* 1989, 46, 529-537.
- [122] Refai, A. K., Textor, M., Brunette, D. M., Waterfield, J. D. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2004, 70, 194-205.
- [123] White, W. B., Faich, G., Borer, J. S., Makuch, R. W. *Am. J. Cardiol.* 2003, 92, 411-418.
- [124] Kenawi, IM. *J. Mol. Struct.* 2005, 754, 61-70.
- [125] Gupta, A. S., Wang, S., Link, E., Anderson, E. H., Hofmann, C., Lewandowski, J., Kottke-Marchant, K., Marchant, R. E. *Biomaterials* 2006, 27, 3084-3095.

- [126] Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A. *J. Control. Release* 2002, 80, 247-257.
- [127] Trautner, W. B., Hull, R. A., Darouiche, R. O. *Urology* 2003, 61, 1059-1062.
- [128] Martínez-Martínez, L., Pascual, A., Jacoby, G. A. *Lancet* 1998, 351, 797-799.
- [129] Ito, A., Hirai, K., Inoue, M., Koga, H., Suzue, S., Irikura, T., Mitsuhashi, S. *Antimicrob. Agents Ch.* 1980, 17, 103-108.
- [130] Grover, G., Kini, S. G. *Eur. J. Med. Chem.* 2006, 41, 256-262.

Artículos publicados.



PP films grafted with *N*-isopropylacrylamide and *N*-(3-aminopropyl) methacrylamide by γ radiation: synthesis and characterization

Angel Contreras-García^a, Carmen Alvarez-Lorenzo^b, Angel Concheiro^b, Emilio Bucio^{a,*}

^a Departamento de Química de Radiaciones y Radioquímica, Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México, DF 04510, México

^b Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 3 November 2009
Accepted 7 December 2009

Keywords:
Graft copolymers
Polypropylene
N-isopropylacrylamide
N-(3-aminopropyl) methacrylamide
Stimuli-sensitive polymers.

ABSTRACT

Simultaneous grafting of *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm) and *N*-(3-aminopropyl) methacrylamide hydrochloride (APMA) on polypropylene (PP) was investigated for obtaining interfaces that are stimuli-responsive under physiological conditions. A pre-irradiation method was optimized tuning the γ -irradiation dose, reaction time, temperature, and monomers concentrations. FT-IR, ATR and XPS analysis of the grafted copolymers evidenced a greater content in NIPAAm than in APMA; the APMA/NIPAAm ratio increasing with the concentration of APMA in the reaction medium and when the grafting was carried out in 1 M NaNO₂. The grafted films were characterized regarding their thermal properties (DSC and TGA) swelling behavior and contact angle. Immersion of the pre-irradiated films in 1 M NIPAAm/0.5 M APMA aqueous solution rendered PP-g-(1NIPAAm-*r*-0.5APMA) which exhibited rapid and reversible transitions showing a LCST around the physiological temperature. By contrast, a greater content in APMA enhanced the hydrophilicity and prevented the shrinking of PP-g-(1NIPAAm-*r*-1APMA).

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Surface-functionalized medical devices are attracting raising interest owing to the possibility of improving their dealing with the host environment, while keeping the bulk features responsible for their therapeutic performance (Ikada, 1994). Enhanced biocompatibility and prophylaxis against infections are the most pursued aims of altering the surface structure/composition (Mao et al., 2004; Raad et al., 2007; Anderson et al., 2008; Subramanyam and Kennedy, 2009). Functionalization of substrates with stimuli-responsive polymers or networks enables the obtaining of solid-liquid interfaces highly responsive to minute changes in the environmental conditions (Jeong and Gutowska, 2002; Galaev and Mattiasson, 2000; Qiu and Park, 2001). An adequate design of the components to be grafted leads to dynamic on-off surfaces that alter their hydrophilic/hydrophobic character as a function of the pH, temperature, ionic strength or so on (Dimitrov et al., 2007). Variations in contact angle or swelling are reflected in the modification of another features, such as capability to adsorb or release substances (proteins, drugs), lubricity or cell/microorganism adhesion (Kumar et al., 2007; Peng and Cheng, 2001; Nakayama et al., 2002; Magoshi et al.,

2002). In such a way the smart surface can act as sensor and actuator (Jeong and Gutowska, 2002; Galaev and Mattiasson, 2000; Qiu and Park, 2001).

Several *N*-substituted poly(acrylamide)s undergo an entropic driven transition from a well-solvated coil to a globule when the temperature raises above the lower critical solution temperature (LCST) (Gonçalves et al. 2008), which is close to the physiological value (de Moura et al., 2006; Maeda et al., 2004). Poly (*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) exhibits a sharp phase transition at 32–34 °C; the LCST being modified by comonomers (Feil et al., 1993; Jones, 1999; Chen and Hoffman, 1995) or addition of salts (Eeckman et al., 2001; Huang and Wu, 1999) or surfactants (Kokufuta et al., 1993) to the polymer solution. H-bonding between amide-water (hydration) and amide-amide (dehydration) determines the phase transition behavior (Rzae et al., 2007). Copolymerization with hydrophilic or ionizable monomers would make the LCST to increase and, if a threshold proportion is overcome, the temperature-sensitiveness may even disappear (Shibayama and Tanaka, 1993; Gil and Hudson, 2004; Mal-ngam et al., 2009).

Monomers possessing primary amines, such as *N*-(3-aminopropyl) methacrylamide, (APMA), may endow the smart networks with attractive features such as pH-responsiveness (Alvarez-Lorenzo and Concheiro, 2002) or affinity for anionic drugs (that represents more than 75% of drugs currently in the market) (Andrade-Vivero et al., 2007). Additionally, amino groups

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

are particularly useful for conjugation with a variety of chemical structures, including peptides, polysaccharides or radionuclide (Seiffert and Oppermann, 2007; Yuan et al., 2007). It has been shown that polyamido-amines possess the ability to selectively adsorb heparin from plasma or blood giving stable complexes without any adverse effect on plasma proteins and blood cells (Singhal and Raya, 2002; Bamford and Al-Lamee, 1996). Polyacrylamide (PAAm) and poly(3-aminopropyl methacrylamide) (PAPMA) have been grafted to the blood-contacting surfaces of arterial blood filters and oxygenators, showing improved hemocompatibility (Bamford and Al-Lamee, 1996). PNIPAAm-based polymers and networks have been successfully grafted to preformed medical devices applying γ -radiation procedures in order to modulate the capability to load drugs and to release them in a controlled way (Hiroki et al., 1999; Ruiz et al., 2008; Muñoz-Muñoz et al., 2009). However, to the best of our knowledge, simultaneous grafting with APMA has not been tried yet.

The aim of the present work was to develop a procedure for the effective grafting of NIPAAm and APMA onto PP surface in order to endow the material with the features of both components, namely (a) temperature-sensitive swelling for enabling drugs to diffuse into the network when swollen (room temperature) and to hinder the release at 37 °C, and (b) ability to ionically interact with anionic drugs, enhancing the loading and regulating the release rate. These functionalities are pursued without causing a deleterious effect on the mechanical properties of the PP substrate. Nevertheless, since we observed that APMA solely can be hardly grafted to PP, the conditions of γ -ray irradiation regarding irradiation dose, reaction time, temperature and monomers concentrations were finely tuned to set up an efficient pre-irradiation method in order to simultaneously graft both NIPAAm and APMA. The intensity and reversibility of the responsiveness to temperature of the novel grafted materials were characterized in detail.

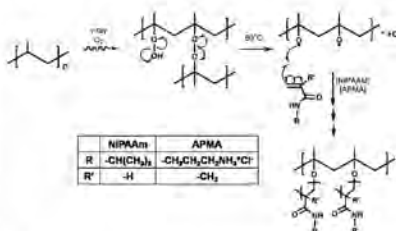
2. Experimental Part

2.1. Materials

Polypropylene (PP) films of density 0.92 g mL⁻¹ and thickness 1.7 mm were purchased from Goodfellow (UK). N-(3-aminopropyl) methacrylamide hydrochloride (98%) (APMA) was obtained from 3B Scientific Corporation (USA) and purified by recrystallization in methanol/ethyl ether 1/10 v/v mixture before use. N-isopropylacrylamide (97%) (NIPAAm) was obtained from Aldrich Chemical Co. (USA) and recrystallized from hexane/toluene (1/1, v/v) solution. NaNO₂ 99.99% Suprapur was from Merck (Mexico). Bidistilled water was used in all experiments. Hexane, toluene, ethyl ether, and methanol of analytical grade were obtained from Mallinckrodt Baker (Mexico) and used as received.

2.2. Grafting by pre-irradiation

PP films of 1.2 × 4 cm² size were washed with methanol and then dried at room temperature under vacuum before grafting. The PP was exposed to ⁶⁰Co γ -source (Gamma beam 651 PT, MDS Nordion USA) in the presence of air, at room temperature, at a dose rate of 10 kGy/h and pre-irradiation doses between 10 and 100 kGy. The irradiated films were placed in glass ampoules which contained NIPAAm/APMA 0.5/0.5, 1/0.5 and 1/1 M dissolved in water or 1 M NaNO₂. The ampoules were bubbled with argon to remove air, sealed, and heated at 60 or 80 °C for different



Scheme 1. Scheme of the mechanism of simultaneous grafting of NIPAAm and APMA on PP by an oxidative pre-irradiation method at 80 °C.

reaction time. The samples were washed with water for 8 h at 25 °C in order to extract the residual monomer and homopolymer that could be formed and occluded in the films during the grafting. Grafting percentage of NIPAAm/APMA onto PP (Scheme 1) was calculated using Eq. 1:

$$G(\%) = 100 \frac{(W_g - W_0)}{W_0} \quad (1)$$

where W_g and W_0 are the weights of the grafted and initial films, respectively.

NIPAAm and APMA may undergo homopolymerization by thermal initiation under the grafting conditions. The homopolymers formed in the reaction medium when the grafting was carried out at 80 °C in the presence of one type of monomer, i.e., in 1 M NIPAAm or 1 M APMA solution, were collected (drying the solution under vacuum) to serve as controls for the DSC and TGA assays. Similarly, the NIPAAm-c-APMA copolymer was obtained from the reaction medium when the grafting was carried out in 1 M NIPAAm and 1 M APMA solution at 80 °C.

2.3. Characterization of grafted PP films

FTIR-ATR spectra were recorded on previously dried films using a Perkin-Elmer Spectrum 100 (Perkin-Elmer Cetus Instruments, Norwalk CT, USA) fitted with Universal ATR sampling accessory (DComp™ crystal, which is composed of a diamond ATR with a zinc selenide focusing element in direct contact with the diamond). The surfaces were characterized with regard to their elemental chemical compositions (in at%, survey spectra) by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), performed in a VG ESCALAB 3MkII instrument, using non-monochromatic Mg K α radiation (12 kV, 18 mA). XPS spectra were acquired at 0° emission angle, normal to the samples surface, and possible charging was corrected by referencing all peaks to carbon (C_{1s}) peak at binding energy 285 eV. Quantification of the constituent elements was performed using the broad-scan spectra and Advantage v4.12 software (Thermo Electron Corp., Waltham, MA) by integrating the areas under relevant peaks after a Shirley-type background subtraction, using sensitivity factors from the Wagner table.

Swelling experiments were carried out by immersion of the graft copolymers into bidistilled water. The films were removed from the liquid at various time intervals, their surface blotted with a piece of paper, weighed and placed again in the aqueous medium. The swelling percentage was determined gravimetrically as follows:

$$S(\%) = 100 \frac{(W_s - W_0)}{W_0} \quad (2)$$

where W_0 and W_1 are weights of the dry and the swollen grafted films, respectively.

The lower critical solution temperature (LCST) of the grafted films was determined, in triplicate, by changes in the limited swelling of the samples immersed in bidistilled water at various temperatures (from 26 to 50 °C) for 2 h and neutral pH, as well as by contact angle measurements. Contact angles were recorded at different temperatures using a drop shape analyzer Kruss DSA 100 apparatus (Matthews NC, USA). Small drops of bidistilled water were deposited onto dry films and the contact angle was measured 1 min after. The temperature of circulating water and of the atmosphere in the measurement chamber was well-controlled, ranging from 26 to 50 °C. LCST was estimated as the temperature value at which an inflection point in the contact angle vs. temperature plot occurred. Thermogravimetric measurements were obtained using a TGA Q50 (TA Instruments, New Castle, DE) at a heating rate of 10 °C min⁻¹ under a nitrogen atmosphere. Differential scanning calorimetry runs were recorded using a DSC2010 calorimeter (TA Instruments, New Castle, DE, USA), at a heating rate of 10 °C min⁻¹, from 30 to 250 °C under nitrogen atmosphere (60 ml min⁻¹), after calibration with indium.

3. Results and discussion

3.1. Grafting yield

The oxidative pre-irradiation method implemented for the simultaneous grafting of two different monomers rendered doubly functionalized surfaces using low ionizing radiation doses (Scheme 1). Such an approach reduces the likelihood of degradation of the polymeric matrix compared to the sequential synthesis, which involves the grafting of the polymeric matrix with one monomer followed by the exposition of the firstly grafted matrix to radiation for the grafting of the another monomer (Gupta and Anjum, 2003). This may cause chain scission mainly at the grafts. In this regard, acrylamides are particularly sensitive since they contain moieties labile to gamma ray. Therefore, the simultaneous grafting of both NIPAAm and APMA is the most suitable approach.

Different grafting percentages on PP surface were achieved tuning irradiation dose, reaction time, temperature, and concentration ratio of monomers. The grafted polymers, PP-g-(NIPAAm-*r*-APMA), are thereafter designated by the molar concentrations of NIPAAm and APMA in the reaction mixture upon synthesis. For example, PP-g-(1NIPAAm-*r*-0.5APMA) refers to a grafted copolymer prepared by immersion in a 1 M NIPAAm and 0.5 M APMA solution. Grafting carried out in 1 M NaNO₃ aqueous solution leads to polymers named PP-g-(1NIPAAm-*r*-0.5APMA)NaNO₃.

When APMA was tried to be grafted alone, the charged quaternary nitrogen induced electrostatic repulsion during the propagation step and inhibited the polymerization. By contrast, when the process was carried out in a solution of NIPAAm and APMA, chains of randomly distributed monomers were grafted. The reasons behind this finding are related to the reactivity ratios of both monomers ($r_{NIPAAm}=0.7$ and $r_{APMA}=0.7-1.2$) which are close to 1 (Mai-ngam et al., 2009) and to the space among APMA units along the chain owing to intercalation of NIPAAm units. Some researchers have synthesized polyelectrolytes starting from solutions of charged monomers by shielding the electrostatic repulsions with salt ions (Ali et al., 2000; Dobrynina and Rubinstein, 2005; Mai-ngam et al., 2009; Manghi and Netz, 2004; Netz and Orland, 1999). Therefore, the yields of grafting in water and in 1 M NaNO₃ were compared. Slightly higher yields were achieved in the ionic solution both at 60 and 80 °C (Fig. 1).

The greatest grafting percentage (~30%) was obtained starting from 1 M NIPAAm and 0.5 M APMA solutions. The closer values of grafting percentage attained in water and in 1 M NaNO₃ at 80 °C are related to the effect of temperature on the decomposition of the peroxides and hydroperoxides formed on the polymer when irradiated in the presence of air. The peroxides require higher temperature (~80 °C) than hydroperoxides for dissociation, leading to macroradicals that initiate the grafting (Gupta and Anjum, 2003). The grafting percentage in a salt solution with 1.5 M total monomers was the same as at 80 °C.

The analysis of the dependence of NIPAAm and APMA grafting on the pre-irradiation dose evidenced that a plateau is reached at 80 kGy and that beyond this dose no additional increases occurred (Fig. 2). On the other hand, although similar dependence patterns were recorded for PP-g-(1NIPAAm-*r*-0.5APMA) and PP-g-(1NIPAAm-*r*-1APMA), the grafting percentages were lower when the APMA concentration was 1 M. This fact can be explained by the repulsion among the cationic groups of APMA at such high concentration, which makes the propagation reaction difficult.

The grafting rates as a function of reaction time at different initial monomer concentrations are shown in Fig. 3. The maximum grafting percentage of PP-g-(1NIPAAm-*r*-1APMA) NaNO₃ was reached at 20 h approximately, while grafting carried out in pure water was more efficient showing increasing values during the assay time. In the NaNO₃ solution, polymerization of the monomers in the solution may be favored. This leads to an increase in the solution viscosity,

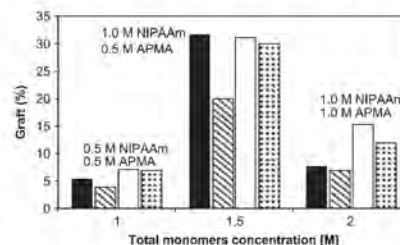


Fig. 1. Grafting percentage as a function of NIPAAm/APMA concentration ratios at 80 °C in water (filled lines columns) and 1 M NaNO₃ solution (blaze columns) and at 80 °C in water (points columns) and 1 M NaNO₃ solution (white columns).

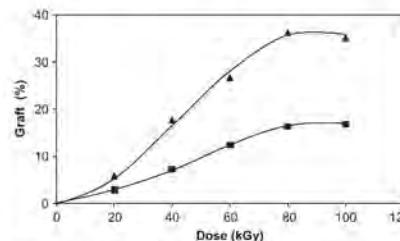


Fig. 2. NIPAAm/APMA grafting onto PP films pre-irradiated with different doses after immersion in 1 M NIPAAm/0.5 M APMA (▲) or 1 M NIPAAm/1 M APMA (■) aqueous solution at 80 °C for 20 h.

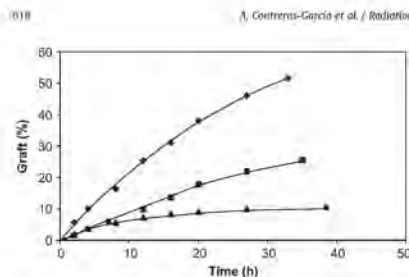


Fig. 3. NIPAAm/APMA grafting onto PP films pre-irradiated with a 80 kGy dose and immersed at 80 °C for different times in 1 M NIPAAm/0.5 M APMA (●), and 1 M NIPAAm/1 M APMA in water (■), and 1 M NIPAAm/1 M APMA in 1 M NaNO₃ (▲).

which may make the access of the monomers to the growing polymer radicals on PP films difficult.

FT-IR analysis of the starting and the modified PP evidenced the absorption bands characteristic of PP at 2920 and 1463 cm⁻¹ (Fig. 4). The spectra of NIPAAm grafted alone onto PP (PP-g-NIPAAm) was recorded in order to distinguish the characteristic bands of NIPAAm (-C=O at 1643 cm⁻¹, (CH₂)₂Cl- at 1174 cm⁻¹, and -NH- at 3311, 3099, and 1543 cm⁻¹) from those of APMA. The appearance in the spectra of PP-g-(NIPAAm-r-APMA) of overtones due to -NH₂ (2858-2610 cm⁻¹) as well as the peaks associated to -C-NH- groups (1043 and 1336 cm⁻¹) confirmed the presence of both components. The relative absorbance of the FTIR peaks at 1336 and 1174 cm⁻¹, which are characteristic of APMA and NIPAAm, respectively, resulted to be 0.91, 1.18, and 1.31 for PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) and PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA)/NaNO₃, respectively. Therefore, when the graft copolymerization was conducted in 1 M NaNO₃, the APMA/NIPAAm ratio in the graft was greater than when the process was carried out in water.

XPS analysis of PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) films with different grafting percentages showed four primary peaks corresponding to C_{1s}, O_{1s}, N_{1s}, and Cl_{2p} at binding energies of 292.1, 536.1, 405, and 204 eV, respectively (Fig. 5). The atomic concentrations of C, O, N, and Cl (Table 2) indicated that the NIPAAm/APMA ratio in the grafts were 87/13 (=6.7) and 78/22 (=3.5) for films with 16% and 26% of grafting, respectively.

3.2. Characterization of PP-g-(NIPAAm-r-APMA) films

The thermal properties of the PP-g-(NIPAAm-r-APMA) and the corresponding PNIPAAm and PAPMA homopolymers were evaluated by DSC and TGA. The melting temperature *T_m* of PP was not altered when doubly grafted. PP-g-(NIPAAm-r-APMA) also exhibited a single glass-transition at temperature close to that of PNIPAAm and PAPMA (Table 1). The transition may be assigned to the *T_g* of PNIPAAm because the relative content in APMA is lower, as indicated by FTIR and XPS results. Furthermore, the *T_g* of APMA may be masked by the wide glass-transition step of PNIPAAm. The grafted PP films have high thermal stability. The 10% weight-loss temperatures of PP-g-(NIPAAm-r-APMA) with 38% and 50% grafting percentage were recorded at 406 and 399 °C, respectively, in nitrogen atmosphere. The amount of residue (char yield) was 1% at 600 °C (see Table 2).

The swelling kinetics of various PP-g-(NIPAAm-r-APMA) grafted films in pure water (Fig. 6) evidenced a strong contri-

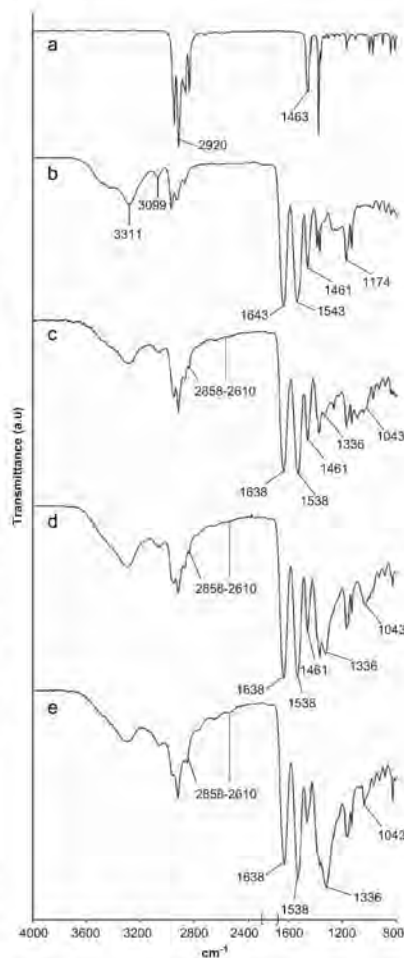


Fig. 4. FTIR-ATR spectra of PP (a), PP-g-NIPAAm (b), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) (c), PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) (d), and PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA)/NaNO₃ (e). After a pre-irradiation dose of 80 kGy, grafting was carried out at 80 °C for 20 h.

buton of APMA. Both PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) and PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) showed higher swelling when the grafting percentage rose from 10% to 25%. The greater swelling of PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) compared to PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA)

confirmed that the former contains more APMA. The equilibrium swelling was reached in 20 min for all grafted films.

The temperature-responsiveness of the grafted copolymers strongly depended on the NIPAAm:APMA ratio in the reaction mixture. Contact angle of PP film was 108° and decreased when grafted. PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) with grafting percentages of 10–31% exhibited an increase in the contact angle as the temperature raised (Fig. 7). The LCST was found to be 34–36 °C, which is close to PNIPAAm LCST. This distinctive characteristic of the temperature-responsive grafted films is attributed to a rapid alternation between the hydrophilic and the hydrophobic states. Nevertheless, the LCST disappeared in the grafted copolymers prepared with the highest content in APMA, i.e., PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA). The swelling studies showed that control PP-g-NIPAAm undergoes a drastic deswelling at 34 °C. For PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) a shift in the LCST towards higher values (36 °C) was observed, because the highly hydrophilic APMA makes the hydrophobic interactions between NIPAAm units

more difficult to occur. PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) did not change the degree of swelling in the range of temperature tested, remaining fully swollen (Fig. 8). In sum, the PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) film

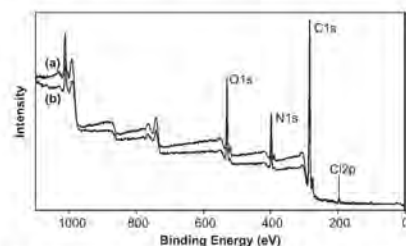


Fig. 5. XPS wide scan spectra of PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) films having different degrees of grafting: (a) 16% and (b) 26%.

Table 1
Thermal properties of PP, PNIPAAm and PAPMA homopolymers and copolymers, and PP grafted films (T_g : glass temperature; T_m : melting temperature).

Polymer	10% weight loss (°C)	Char yield at 600 °C (%)	T_g (°C)	T_m (°C)
PP	445	1	-	161
PNIPAAm	-	-	115–158	-
PAPMA	304	12	149	-
NIPAAm-r-APMA	302	33	120	-
PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 38%	406	1	130	159
PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 50%	399	1	134	160

Table 2
Content in different elements of PP-g-(NIPAAm-r-APMA) films, estimated from XPS analysis.

Polymer	Grafting (%)	Relative atomic content (%)			
		C	O	N	Cl
PP	-	98.3	1.7	-	-
PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA)	16	74.5	12.8	12.1	0.6
PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA)	26	74.5	14	10.7	0.8

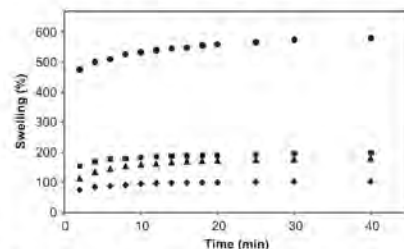


Fig. 6. Swelling at 25 °C of PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA, 16%) (●), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA, 25%) (▲), PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA, 16%) (■) and PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA, 25%) (◆). All the samples were obtained using a pre-irradiation dose of 80 kGy and a temperature of 80 °C.

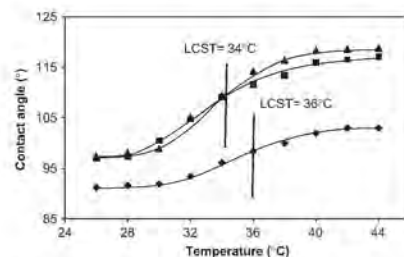


Fig. 7. Dependence of the water contact angle on temperature observed for PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) copolymers with different grafting percentages: 16% (▲), 18% (■) and 31% (●). All the samples were obtained using a pre-irradiation dose of 80 kGy and a temperature of 80 °C.

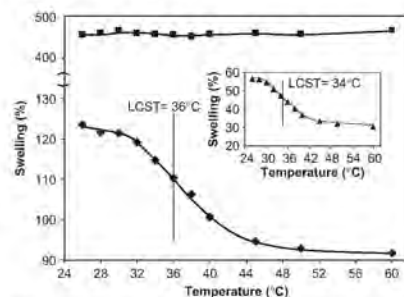
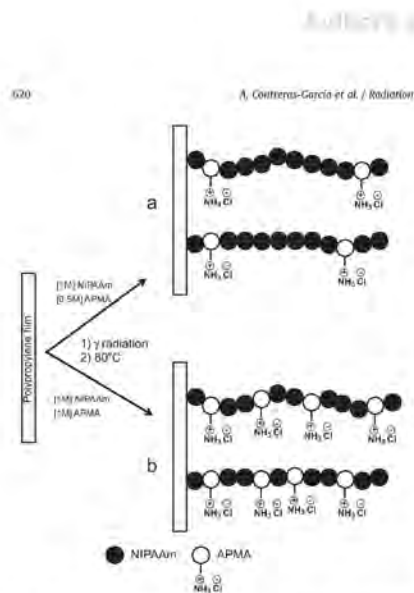


Fig. 8. Temperature dependence of the swelling ratio in water observed for PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) (●), PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) (■) and PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) (▲).



Scheme 2. Scheme of NIPAAm (●)-r-APMA(○) copolymer chains grafted to PP: (a) grafting occurring in 1 M NIPAAm and 0.5 M APMA feeding solutions, and (b) grafting occurring in 1 M NIPAAm and 1 M APMA feeding solutions.

possesses copolymer chains with PNIPAAm segments long enough to exhibit its characteristic phase transition (Shah et al., 1997; Dimitrov et al., 2007; Gonçalves da Silva et al., 2008; He et al., 2008; Mai-ngam et al., 2009) (Scheme 2a). By contrast, the higher content in APMA of the copolymer chains grafted on PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) prevents the shrinking to occur (Scheme 2b); the strong electrostatic repulsions among the cationic amine groups hindering the temperature-induced conformational collapse.

4. Conclusion

An approach suitable for the simultaneous grafting of NIPAAm and APMA was developed applying a preirradiation method, which renders the greatest yield when the irradiated PP films are immersed in 1 M NIPAAm and 0.5 M APMA aqueous solution at 80 °C. At 60 °C the presence of NaNO₂ favors the grafting owing to the ionic shielding of the positive charges of APMA. The NIPAAm:APMA ratio in the reaction solution determines the composition of the grafted copolymer chains and the temperature-sensitiveness. PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) shows a LCST close to the physiological temperature and features of pristine PP such as high thermal stability. Thus, the grafted copolymers developed in the present work may be of interest as biomedical devices endowed with temperature-responsive surfaces containing functional amine groups.

Acknowledgements

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

supported by DGAPA-UNAM Grant IN200208 (Mexico) and by MICINN [SAF2008-01679], FEDER and Xunta de Galicia [PGDIT07CSA002203/PR] (Spain).

References

Alk, M.M., Ptasnowski, H.P., Ali, S.A., 2000. Polymerization of functionalized diallyl quaternary ammonium salt to poly(ampholyte-electrolyte). *Polymer* 41, 5591–5600.

Alvarez-lorenzo, C., Concheiro, A., 2002. Reversible adsorption by a pH- and temperature-sensitive acrylic hydrogel. *J. Controlled Release* 80, 247–257.

Anderson, J.M., Rodriguez, A., Chang, D.T., 2008. Macropore fusion, giant cell formation, and the foreign body response require matrix metalloproteinase. *Semin. Immunol.* 20, 86–100.

Antrade-Vivero, P., Fernandez-Gabriel, E., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., 2007. Improving the loading and release of NSAIDs from pHEMA hydrogels by copolymerization with functionalized monomers. *J. Pharm. Sci.* 96, 802–813.

Bamford, C.H., Al-Lamee, K.C., 1996. Studies in polymer surface modification and grafting for biomedical uses: 2. application to arterial blood filters and oxygenators. *Polymer* 37, 4885–4889.

Chen, G., Hoffman, A.S., 1995. Graft copolymers that exhibit temperature-induced phase transition over a wide range of pH. *Nature* 373, 49–52.

de Moura, M.R., Anada, F.A., Guilherme, M.R., Radovanovic, E., Rubira, A.F., Muniz, E.C., 2006. Thermo-sensitive IPN hydrogels composed of PNIPAAm gels supported on alginate-Ca²⁺ with LCST tailored close to human body temperature. *Polym. Test.* 25, 961–969.

Dimitrov, I., Třebická, B., Müller, A.H.E., Dvorak, A., Tsvetanov, C.B., 2007. Thermosensitive water-soluble copolymers with doubly responsive reversibly interacting entities. *Prog. Polym. Sci.* 32, 1275–1343.

Dobrynina, A.V., Rubinstein, M., 2005. Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces. *Prog. Polym. Sci.* 30, 1049–1118.

Eeckman, F., Amighi, K., Müsser, A.J., 2001. Effect of some physiological and non-physiological compounds on the phase transition temperature of thermoresponsive polymers intended for oral controlled-drug delivery. *Int. J. Pharm.* 222, 259–270.

Feil, H., Bae, Y.H., Jan, J.J., Kim, S.W., 1993. Effect of comonomer hydrophilicity and ionization on the lower critical solution temperature of *N*-isopropylacrylamide copolymers. *Macromolecules* 26, 2495–2500.

Galaev, I.V., Mattiasson, B., 2000. “Smart” polymers and what they could do in biotechnology and medicine. *Trends Biotechnol.* 17, 335–340.

Gil, E.S., Hudson, S.M., 2004. Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates. *Prog. Polym. Sci.* 29, 1173–1222.

Gonçalves da Silva, A.M.F.S., Lopes, S.L.C., Braguelma, P., Prazeres, T.J.V., Beija, M., Martins, J.M.G., 2008. Thermo-responsiveness of poly(*N,N*-diethylacrylamide) polymers at the air-water interface: the effect of a hydrophobic block. *J. Colloid. Interf. Sci.* 327, 129–137.

Gupta, B., Anjum, N., 2003. Plasma and Radiation-induced Graft Modification of Polymers for Biomedical Applications. *Adv. Polym. Sci.* 162, 35–61.

He, C., Kim, S.W., Lee, D.S., 2008. *In situ* gelling stimuli-sensitive block copolymer hydrogels for drug delivery. *J. Controlled Release* 127, 189–207.

Hiroki, A., Yoshida, M., Nagaoka, N., Asano, M., Rehsi, N., Spohr, R., Kubawa, H., Katakai, R., 1999. Permeation of *p*-nitrophenol through *N*-isopropylacrylamide-grafted etched-track membrane close to theta-point temperature. *Radiat. Eff. Defects* 147, 165–175.

Huang, J., Wu, X.Y., 1999. Effects of pH, salt, surfactant and composition on phase transition of poly(NIPAAm/MMA) nanoparticles. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 37, 2657–2670.

Ikada, Y., 1994. Surface modification of polymers for medical applications. *Biomaterials* 15, 725–736.

Jeong, B., Gutowska, A., 2002. Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications. *Trends Biotechnol.* 20, 305–311.

Jones, M.S., 1999. Effect of pH on the lower critical solution temperatures of random copolymers of *N*-isopropylacrylamide and acrylic acid. *Eur. Polym. J.* 35, 795–801.

Kokufuta, E., Zhang, Y.G., Tanaka, T., Mamada, A., 1993. Effects of surfactants on the phase transition of poly(*N*-isopropylacrylamide) gels. *Macromolecules* 26, 1033–1039.

Kumar, A., Sivasubava, A., Gabev, Y., Mattiasson, B., 2007. Smart polymers: physical forms and bioengineering applications. *Prog. Polym. Sci.* 32, 1205–1217.

Maeda, Y., Yamamoto, H., Ikeda, I., 2004. Effects of ionization on the phase behavior of poly(*N*-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) and poly(*N,N*-diethylacrylamide-co-acrylic acid) in water. *Colloid. Polym. Sci.* 282, 1268–1273.

Magoshi, T., Ziani-Cherif, H., Ohyai, S., Nakayama, Y., Matsuda, T., 2002. Thermoresponsive heparin coating: heparin conjugated with poly(*N*-isopropylacrylamide) at one terminus. *Langmuir* 18, 4862–4872.

Mai-ngam, K., Boonkitpattarakul, K., Sakulsombath, M., Chemsingam, P., Mai-ngam, B., 2005. Synthesis and phase separation of amine-functional temperature responsive copolymers based on poly(*N*-isopropylacrylamide). *Eur. Polym. J.* 45, 1260–1269.

Manghi, M., Netz, R.R., 2004. Variational theory for a single polyelectrolyte chain revisited. *Eur. Phys. J. E* 14, 67–77.

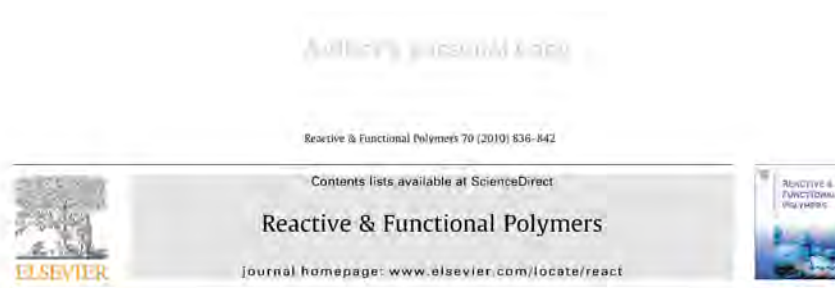
Mao, C., Qu, Y., Sang, H., Meta, H., Zhou, A., Shen, J., Lin, S., 2004. Various approaches to modify biomaterial surfaces for improving biocompatibility. *Adv. Colloid Interface Sci.* 110, 5–17.

Author's personal copy

A. Contreras-García et al. / Radiation Physics and Chemistry 79 (2010) 615–621

621

- Muñoz-Muñoz, F., Ruiz, J.C., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., Bucio, E., 2009. Novel interpenetrating smart polymer networks grafted onto polypropylene by gamma radiation for loading and delivery of vancomycin. *Eur. Polym. J.* 45, 1859–1867.
- Nakayama, H., Kaetsu, I., Uchida, K., Sakata, S., Tougou, K., Hara, T., Matsubara, Y., 2002. Radiation curing of intelligent coating for controlled release and permeation. *Radiat. Phys. Chem.* 63, 521–523.
- Netz, R.R., Orland, H., 1999. Variational theory for a single polyelectrolyte chain. *Eur. Phys. J. B.* 8, 81–98.
- Peng, T., Cheng, Y.L., 2001. PNIPAAm and PMAA co-grafted porous PE membranes: living radical co-grafting mechanism and multi-stimuli responsive permeability. *Polymer* 41, 2091–2100.
- Qiu, Y., Park, K., 2001. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* 53, 321–339.
- Raad, I., Hanna, H., Maki, D., 2007. Intravascular catheter-related infections: advances in diagnosis, prevention, and management. *Lancet Infect. Dis.* 7, 645–657.
- Ruiz, J.C., Alvarez-Lorenzo, C., Taboada, P., Burillo, G., Bucio, E., De Frijck, K., Nelis, H.J., Coenye, T., Concheiro, A., 2008. Polypropylene grafted with smart polymers (PNIPAAm/PAAc) for loading and controlled release of vancomycin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70, 467–477.
- Rzae, Z.M.O., Dincer, S., Piskin, E., 2007. Functional copolymers of *N*-isopropylacrylamide for bioengineering applications. *Prog. Polym. Sci.* 32, 534–595.
- Seiffert, S., Oppermann, W., 2007. Amine-functionalized polyacrylamide for labeling and crosslinking purposes. *Macromol. Chem. Phys.* 208, 1744–1752.
- Shah, S.S., Wertheim, J., Wang, C.T., Pitt, C.G., 1997. Polymer-drug conjugates: manipulating drug delivery kinetics using model LCST systems. *J. Controlled Release* 45, 95–101.
- Shibayama, M., Tanaka, T., 1993. Volume phase transition and related phenomena of polymer gels. *Adv. Polym. Sci.* 109, 1–62.
- Singhal, J.P., Raya, A.R., 2002. Synthesis of blood compatible polyamide block copolymers. *Biomaterials* 23, 1139–1145.
- Subramanyam, U., Kennedy, J.P., 2009. PVA networks grafted with PDMS branches. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* 47, 5272–5277.
- Yuan, J.C., You, Y.Z., Lu, X., Muzik, O., Oupicky, D., Peng, F.Y., 2007. Synthesis of poly[APMA]-DOTA-⁶⁴Cu conjugates for interventional radionuclide therapy of prostate cancer: assessment of intratumoral retention by micro-positron emission tomography. *Mol. Imaging* 6, 10–17.



Polypropylene grafted with NIPAAm and APMA for creating hemocompatible surfaces that load/elute nalidixic acid

Angel Contreras-García^{a,b}, Emilio Bucio^a, Angel Concheiro^b, Carmen Alvarez-Lorenzo^{b,*}

^aDepartamento de Química de Radiaciones y Radioquímica, Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México DF 04510, México

^bDepartamento de Farmacia y Tecnología farmacéutica, Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 April 2010
Received in revised form 14 June 2010
Accepted 22 July 2010
Available online 27 July 2010

Keywords:

Polypropylene
Nalidixic acid
N-isopropylacrylamide
N-(3-aminopropyl) methacrylamide
Controlled release
 γ -Ray irradiation
Antimicrobial surface
Temperature-responsive swelling
Medicated medical device

ABSTRACT

Polypropylene (PP) films grafted with N-isopropylacrylamide (NIPAAm) and N-(3-aminopropyl) methacrylamide hydrochloride (APMA) were tested as components of medical devices able to load and to sustain the release of the antimicrobial agent nalidixic acid. A pre-irradiation method was applied for grafting PP films with two NIPAAm:APMA weight ratios and to various extents. The grafting composition was analyzed recording FTIR-ATR spectra. PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) exhibited the temperature-responsiveness of PNIPAAm, while the grafting with a greater content in APMA led to that PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) remained highly swollen at 37 °C. The greater the content in APMA on the PP surface, the higher the amount of nalidixic acid loaded (up to 0.036 mg/cm²) and the slower the release rate in phosphate buffer pH 7.4. Coating with carboxymethyl-dextran (CM-dextran) of some drug-loaded films led to minor drug unloading while remarkably high amounts of dextran were deposited (up to 0.50 mg/cm²). This coating did not significantly modify the drug release rate neither the hemocompatibility of the PP-g-(NIPAAm-r-APMA) films, which was per se very good. Drug-loaded films remarkably inhibited the growth of *Escherichia coli* in *in vitro* microbiological tests.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Polymeric medical devices occupy a prominent position in the current medical care, playing a very important role in common diagnostic, therapeutic procedures, and in the management of critically ill patients [1]. However, morbidity and mortality associated to device-related infections have become a relevant source of sanitary and economic worries [2,3]. The surfaces of medical devices are not exempt of being colonized by microorganisms, resulting in infection foci that are hardly accessible to antimicrobial drugs. Prophylaxis involves extreme precautions at the moment of insertion to avoid contact with the microbial sources, such as the skin of the patient or the sanitary personal, but also during all time of implantation to avoid microbial migration through the insertion site into the cutaneous tract or the colonization of the catheter tip by the potential pathogen [4,5]. Bacteria adhered to the medical device may generate a biofilm that creates a microenvironment protective against host defense mechanisms and systemic antibacterial chemotherapy [6–8]. Bacterial biofilm formation on urinary catheters is related to multi-drug resistant bacteria [9]. *Escherichia coli*, a Gram-negative bacterium, is com-

monly found in the biofilm of urinary catheters [4,10]. Other microorganisms such as *Enterococci*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida* species are also chief causes of nosocomial catheter-associated urinary tract infections [11]. In most cases, the removal/replacement of the implanted device is required to manage the infection, although this practice is associated with significant economical and quality-of-life costs [5]. Therefore, prophylactic strategies are being sought in order to reduce the number and/or the impact of device-related infections [12,13]. Inhibition of specific and nonspecific interactions with microorganisms and release of antimicrobial substances from the bulk or the surface of the medical device are considered the most promising preventive strategies [14–19].

The aim of this work was to functionalize the surface of polypropylene (PP), which is a component of a wide range of medical devices (e.g., catheters, hernia meshes, sutures), with a hydrogel layer able to interact with an antimicrobial agent and to sustain its delivery without detriment of the hemocompatibility of PP. Surface functionalization with ions, grafted antibacterial polymers or immobilized enzymes has been previously tested to overcome microbial colonization of PP [20–22]. Recently, γ -irradiation of PP for the grafting of acrylic acid and N-isopropylacrylamide (NIPAAm), forming single or interpenetrating networks, has notably enhanced the ability to load and to control the delivery of vacuo-

* Corresponding author. Tel.: +34 981563100; Fax: +34 981547148.
E-mail address: carmen.alvarez.lorenz@usc.es (C. Alvarez-Lorenzo).

mycin and to effectively prevent the development of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms [23,24]. The present study pursues to create a stimuli-responsive network on the surface of PP with affinity for nalidixic acid and that can effectively protect PP-based medical devices from colonization with *E. coli* or other susceptible microorganisms [25]. Nalidixic acid (a 1,8-naphthyridine derivative) is orally administered for the management of the urinary tract infections and, in spite that it does not achieve adequate concentration in plasma or tissues following an oral administration, nalidixic acid is concentrated in the urine [26]. We have chosen *N*-(3-aminopropyl) methacrylamide hydrochloride (APMA) as a suitable monomer able to electrostatically interact with anionic drugs, such as nalidixic acid. Since APMA is highly charged and hardly to graft to PP [27], mixtures of APMA and NIPAAm were used for creating a temperature-responsive hydrogel layer. The temperature-dependent phase volume transition of PNIPAAm may contribute to facilitate the uptake of the drug by immersion in aqueous solutions at room temperature and to control drug release once inserted in the body [28,29]. To gain insight into their role as nalidixic-eluting devices, the functionalized PP materials were also characterized regarding their hemocompatibility and antimicrobial efficiency against *E. coli*.

2. Experimental part

2.1. Materials

Polypropylene (PP) films of density 0.92 g ml^{-1} and thickness 1.7 mm were from Goodfellow (UK). *N*-(3-aminopropyl) methacrylamide hydrochloride (APMA, 98%) was from 3B Scientific Corporation (USA) and used after purification by recrystallization in methanol/ethyl ether 1/10 v/v mixture. *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm, 97%) was obtained from Aldrich Chemical Co. (USA) and recrystallized from hexane/toluene 1/1 v/v solution. Nalidixic acid sodium salt was from Sigma Aldrich Co. (St. Louis MO, USA) and carboxymethyl-dextran sodium salt (CM-dextran) from Fluka (Denmark). Bovine serum albumin, protease free (BSA) was obtained from Acros Organics (USA). Phenol reagent grade was from Scharlau (Spain) and sulfuric acid from Panreac Química S.A. (Spain). Hexane, toluene, ethyl ether, and methanol of analytical grade were purchased to Mallinckrodt Baker (Mexico) and used as received. Analytical grade NaOH and KH_2PO_4 were from Scharlau Chemie (Spain), MilliQ[®] water (Millipore, Spain) was used in all experiments.

2.2. Preparation of PP-g-NIPAAm and PP-g-(NIPAAm-*r*-APMA)

Pieces of PP films of $1.2 \times 4 \text{ cm}$ were washed with methanol and dried at room temperature under vacuum before grafting. The films were exposed to ^{60}Co γ -source (Gamma beam 651 PT, MDS Nordton, USA) in the presence of air, at room temperature.

Dose rate of 10 kGy/h and pre-irradiation dose of 50 or 80 kGy were applied. The pre-irradiated films were placed in glass ampoules which contained aqueous solutions of NIPAAm/APMA 1/0.5 or 1/1 M for obtaining PP-g-(NIPAAm-*r*-APMA), or 1 M NIPAAm solution in order to prepare PP-g-NIPAAm. The ampoules were bubbled with argon to remove air, sealed, and heated at 80 °C for different times (Table 1). Grafted films were washed with water for 24 h at 25 °C in order to extract the residual monomer and homopolymer that could be formed and occluded in the films during the grafting. The grafted films were designated as PP-g-(*x*NIPAAm-*r*-*y*APMA), where *x* and *y* represent, respectively, the molar concentrations of NIPAAm and APMA in the reaction mixture upon synthesis. Grafting percentage of NIPAAm/APMA onto PP was calculated as follows:

$$G(\%) = 100 \frac{(W_g - W_0)}{W_0} \quad (1)$$

W_g and W_0 being the weights of the grafted and initial films, respectively.

NIPAAm and APMA may undergo homopolymerization by thermal initiation under the grafting conditions. The homopolymers formed in the reaction medium when the grafting was carried out at 80 °C in the presence of one type of monomer, i.e., 1 M NIPAAm or 1 M APMA solution, were collected by vacuum drying the solution to form films (~0.35 mm of thickness), which were used as reference for FTIR analysis.

2.3. Characterization of grafted PP films

FTIR-ATR spectra were recorded using a Perkin-Elmer Spectrum 100 (Perkin-Elmer Cetus Instruments, Norwalk CT, USA) fitted with Universal ATR sampling accessory (DiComp[™] crystal, which is composed of a diamond ATR with a zinc selenide focusing element in direct contact with the diamond). Baseline subtraction and ATR correction for eliminating the dependence of the penetration depth were done with the Spectrum software of the equipment. The spectra of PAPMA and PNIPAAm homopolymers were normalized with respect to the carbonyl band at 1625 cm^{-1} or 1636 cm^{-1} , respectively (Fig. 1b). The FTIR absorbance spectra of PP-g-(1NIPAAm-*r*-0.5APMA) and PP-g-(1NIPAAm-*r*-1APMA) films were also normalized with respect to the carbonyl band at 1636 cm^{-1} . Then, the relative absorbances of the characteristic peaks of APMA at 1315 cm^{-1} (i.e., $\text{Abs}_{1315}/\text{Abs}_{1636}$) and of NIPAAm at 1170 cm^{-1} (i.e., $\text{Abs}_{1170}/\text{Abs}_{1636}$) were calculated to estimate the content of the graft copolymers in each component.

Swelling experiments were carried out in triplicate by immersion of the grafted films into water at 4 and 37 °C for 2 h. The films were removed from the liquid at various time intervals, weighed after blotting the surface with a piece of paper, and placed again in the aqueous medium. The swelling percentage was determined gravimetrically as follows:

Table 1
Pre-irradiation dose and reaction time used for grafting PP films with NIPAAm or NIPAAm and APMA, thickness, degree of swelling in water of the grafted films at 4 °C and 37 °C, and amount of BSA deposited at 37 °C.

Film	Pre-irradiation dose (kGy)	Reaction time (h)	Graft (%)	Thickness of the grafted layer (mm)		Water uptake (%)		BSA deposited (mg/cm ²)	
				Dried	Swollen	4 °C	37 °C	30 min	4 h
PP-g-NIPAAm	50	6	18	0.17	0.20	60	41	0.20 (0.04)	0.23 (0.05)
PP-g-(1NIPAAm- <i>r</i> -0.5APMA)	80	4	9	0.18	0.22	135	100	0.11 (0.05)	0.61 (0.06)
		8	13	0.19	0.23	170	144	0.12 (0.01)	0.94 (0.04)
PP-g-(1NIPAAm- <i>r</i> -1APMA)	80	12	29	0.45	0.69	265	240	0.12 (0.03)	1.02 (0.01)
		16	13	0.23	0.32	220	227	0.08 (0.02)	0.45 (0.02)

^a Pristine PP films adsorbed 0.36 (0.02) mg/cm² after 30 min or 4 h of immersion in BSA solution (25 mg/ml⁻¹).

838

A. Cantremos-García et al. / *Reactive & Functional Polymers* 70 (2010) 836–842

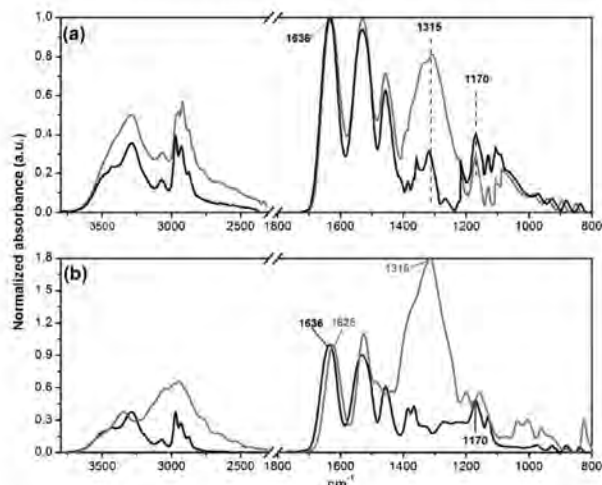


Fig. 1. FTIR-ATR spectra of (a) grafted films PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA) (black line) and PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) (gray line) and (b) PNIPAAm (black line) and APMA (gray line) homopolymers. Total absorbance areas of PNIPAAm and PAPMA C=O peaks at 1636 and 1625 cm^{-1} in (b) spectra are 64.7 and 64.2, respectively. Characteristic peaks of PAPMA and PNIPAAm normalized by the C–D peak rendered $A_{1636}/A_{1170} = 1.8$ for PAPMA homopolymer and $A_{1316}/A_{1170} = 0.48$ for PNIPAAm homopolymer.

$$S(\%) = 100 \cdot \frac{(W_{gr} - W_{gr0})}{W_{gr}} \quad (2)$$

W_{gr} and W_{gr0} being weights of the copolymer grafted to the film when dry and when swollen, respectively. The thickness of the films before and after swelling in phosphate buffer pH 7.4 (0.038 M NaOH and 0.05 M KH_2PO_4 , ionic strength 0.088) was measured using an electronic digital caliper (Max-Cal, Japan).

2.4. Hemocompatibility

Blood from Sprague Dawley rats and voluntary human beings was collected in tubes containing sodium citrate and EDTA respectively and used within 24 h. PP, PP-g-NIPAAm and PP-g-(NIPAAm-r-APMA) films of various grafting percentages, previously swollen in phosphate buffer pH 7.4 for two hours, were transferred to test tubes with 5 ml of phosphate buffer pH 7.4 containing 0.25 ml of whole rat blood and were incubated for 60 min at 37 °C. The release of hemoglobin was determined after centrifugation (700g for 10 min) by recording the absorbance of the supernatant at 542 nm in a UV-vis spectrophotometer (Agilent 8453, Germany). Complete hemolysis was achieved using pure water, while PBS buffer was used as negative control. The experiments were run in duplicate.

2.5. Protein adsorption

Films (1 × 0.5 cm) of pristine PP, PP-g-NIPAAm, and PP-g-(NIPAAm-r-APMA) with different graft percentages were immersed in 1.6 ml of freshly prepared aqueous solutions of BSA (25 mg ml^{-1}) in Eppendorf Protein LoBin tubes at 37 °C and kept protected from

light. At certain time intervals the absorbance of the medium was recorded at 279 nm (Agilent 8453, Germany).

2.6. Nalidixic acid loading

Pristine and grafted PP films were immersed in 5 ml of nalidixic acid sodium salt (0.03 mg ml^{-1}) aqueous solution at 4 °C and kept in the dark. The concentration of nalidixic acid in the medium was spectrophotometrically monitored at 328 nm (Agilent 8453, Germany) for 48 h. The total amount of drug taken up by the films was calculated as the difference between initial and final amounts in the solution. The experiments were carried out in duplicated. The drug-loaded films were dried under vacuum and used for the subsequent studies.

2.7. CM-dextran deposition on PP-g-(NIPAAm-r-APMA) films

Pieces of pristine and grafted PP films (1 × 1 cm) were loaded with nalidixic acid as described above and then immersed in an aqueous solution of CM-dextran (2 mg ml^{-1}) for 10 min. Finally, they were rinsed with water and dried under vacuum. Drug released to the CM-dextran solution was spectrophotometrically determined at 328 nm. Changes in the concentration of CM-dextran in the solution were also quantified using a colorimetric method [30]. 1 ml of CM-dextran solution (conveniently diluted with water) was mixed with 1 ml of 5% (w/v) phenol solution and 5 ml concentrated sulfuric acid. The mixture was incubated at 37 °C for 30 min and the absorbance recorded at 489 nm (Agilent 8453, Germany). Linear quantification interval was from 14 to 140 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The amount of CM-dextran deposited on the films was determined as the difference between the initial and final amounts in the solution.

2.8. Nalidixic acid release

Drug-loaded films were dried under vacuum and then immersed in 5 ml of phosphate buffer pH 7.4 at 37 °C. Samples of the medium were withdrawn at specific time intervals, the drug content was determined by UV spectrophotometry at 328 nm and the samples were immediately returned to the corresponding vial. Experiments were performed in duplicate.

2.9. Microbiological test

The microbiological tests were carried out according to the standardized Kirby-Bauer disk diffusion method [31]. *E. coli* FV9180 was inoculated on a Müller-Hinton agar plate (MH agar, Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, France) after 24 h of culture in solution (3.2×10^9 CFU/ml). Drug-loaded PP-g-(NIPAAm-r-APMA) films (1 × 1 cm) were then placed into contact with the bacteria-inoculated MH agar plate. After 24 h of incubation at 37 °C, the circular bacteria-free zone (inhibition zone) was measured. The evolution of the inhibition zone was monitored for 5 days more. PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA) 27% of grafting without nalidixic acid was used as control. The tests were carried out in duplicate.

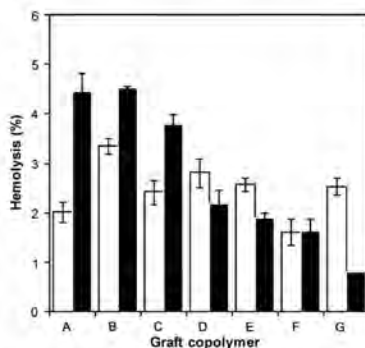


Fig. 2. Percentage of hemolysis caused by PP film (A), PP-g-NIPAAm, 27% grafting (B), PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA), 10% grafting (C), PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA), 14% grafting (D), PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA), 29% grafting (E), CM-dextran-coated (1.3 mg/cm²) PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA), 29% grafting (F), and PP-g-(NIPAAm-r-1APMA), 13% grafting (G). White blocks correspond to data obtained with human blood and black blocks correspond to data obtained with rat blood.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis and characterization of the grafted films

PP films were firstly pre-irradiated with γ -rays to generate radicals that could initiate the grafting and the polymerization of NIPAAm and APMA once immersed in the monomers solutions [27]. The grafting percentage of the copolymers was tuned varying the time of permanence of the pre-irradiated PP films in the monomers solution from 4 to 16 h while keeping constant the irradiation dose and the reaction temperature. The proportion of the monomers (NIPAAm/APMA) in the graft was modified varying their molar ratio in the monomers solution (Table 1). The grafted films (initially of 1.7 mm thickness) were covered each side by 0.17–0.45 mm of copolymer layer, which increased its thickness to a small extent once swollen (Table 1).

The APMA/NIPAAm molar ratio in the grafted films was calculated from the ratio of the relative absorbance of the peaks characteristic of APMA (1315 cm⁻¹) and NIPAAm (1170 cm⁻¹) normalized with respect to carbonyl peak at 1336 cm⁻¹ in FTIR spectra (Fig. 1). The ratios resulted to be 0.21 and 0.81 for PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA) and PP-g-(NIPAAm-r-1APMA), respectively. This means that the NIPAAm/APMA molar ratios were 83:17 and 55:45 for PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA) and PP-g-(NIPAAm-r-1APMA), respectively. For a given solution of starting monomers, the APMA/NIPAAm ratio in the grafted copolymer was the same independently of the overall degree of grafting, which means that the ratio does not depend on the polymerization time.

The degrees of swelling of the grafted layer on PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA) and PP-g-(NIPAAm-r-1APMA) films at 4 °C and 37 °C are shown in Table 1. The degree of swelling is referred only to the weight of grafted copolymer, not to the whole mass of the substrate plus the grafted copolymer. PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA) films exhibited certain temperature-responsiveness due to the high amount of PNIPAAm units (83%). The ionic moieties of APMA enhanced the hydrophilicity of the copolymer [32] and led to a remarkable swelling of the grafted hydrogel compared to the NIPAAm-solely graft. The greater the graft percentage of PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA), the higher the degree of swelling. Furthermore, PP-g-(NIPAAm-r-1APMA) films did not show temperature sensitiveness in the 4–37 °C range due to the shift that an increase in the APMA/NIPAAm molar ratio [55:45] causes in the collapse temperature of NIPAAm [27].

3.2. Hemocompatibility and protein adsorption

PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA) and PP-g-(NIPAAm-r-1APMA) films showed good hemocompatibility (Fig. 2). They performed particularly better than PP and PP-g-NIPAAm when tested against human blood. Rat blood resulted to be less sensitive to the compo-

Table 2. Nalidixic acid loaded at 4 °C after 48 h in drug solution (0.03 mg/ml²) and percentage released at different times in phosphate buffer pH 7.4 at 37 °C. The “dex” suffix denotes films coated with CM-dextran.

Film	Graft (%)	Loading (mg/cm ²)	Nalidixic acid released (%)			
			0.5 h	1 h	3 h	6 h
PP-g-NIPAAm	14	0.0004 ± 0.0001	75(1)	90(2)	100(2)	–
PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA)	9	0.020 ± 0.001	42(1)	55(3)	87(4)	100(2)
	9-dex	0.015 ± 0.002	40(4)	55(3)	78(3)	98(2)
	13	0.024 ± 0.001	26(1)	46(3)	62(1)	83(1)
	13-dex	0.017 ± 0.001	28(2)	50(3)	77(5)	100(2)
	29	0.035 ± 0.001	42(1)	20(1)	26(1)	38(2)
	29-dex	0.028 ± 0.001	41(1)	19(1)	26(1)	40(1)
PP-g-(NIPAAm-r-1APMA)	13	0.036 ± 0.001	38(5)	62(1)	79(4)	90(2)
	13-dex	0.030 ± 0.001	35(1)	59(1)	84(4)	96(3)

840

A. Contreras-García et al. / *Reactive & Functional Polymers* 70 (2010) 836–842

sition of the grafted surface and hemolysis below 3.5% was recorded for all films. As a general trend, those films with a greater content in APMA were the ones that caused less hemolysis, confirming the role of APMA in the creation of biocompatible surfaces [33].

BSA adsorption is also considered as an index of the biocompatibility of a material since deposition of this protein on the surface of biomedical devices prevent the adhesion of platelets and microorganisms [5,34]. After 4 h of immersion in the protein solution, the amount of BSA deposited on the films increased with the content in APMA of the grafted PP (Table 1).

3.3. Nalidixic acid loading and CM-dextran coating

Pristine PP films did not adsorb nalidixic acid once immersed in the drug solution (Table 2). The capability of PP-g-NIPAAm to load the antimicrobial agent was also minor, just $0.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. By contrast, the copolymerization of NIPAAm with APMA increased two orders of magnitude the ability of the grafted PP to take nalidixic acid up (Table 2). These findings suggest that the drug does not interact with the NIPAAm moieties but electrostatically with the quaternized amine groups of the APMA. In fact, a linear correlation was observed between the amount of nalidixic acid loaded and the amount of APMA in the grafted copolymer (Fig. 3). Thus, an increase in the APMA:NIPAAm ratio, from PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) to PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA), fixing the grafting at 13%, increased the loading by 50% (Table 2). Regarding the rate of loading, a rapid uptake was observed in the first 6 h, reaching the equilibrium in 24 h (Fig. 4). Further time in the loading solutions led to minor increases in the amounts loaded. Such a rapid uptake is related to the swollen state of the grafted hydrogel layer on the PP film (Table 1).

Some drug-loaded films were coated with CM-dextran with two main purposes: (i) to make the surface of the grafts to be more biomimetic, resembling the extracellular matrix and preventing biomaterial-induced thrombotic events [35], and (ii) to elucidate the influence of the carbohydrate on drug release rate. The coating was carried out with CM-dextran taking benefit of electrostatic interactions between the carboxymethyl groups of CM-dextran

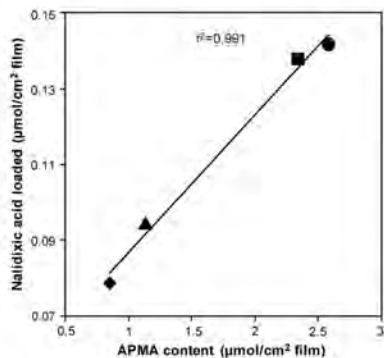


Fig. 3. Dependence of the amount of nalidixic acid loaded on the APMA content, PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) with 5% graft (\blacklozenge), 13% graft (\blacktriangle) or 25% graft (\blacksquare), and PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) with 13% graft (\bullet).

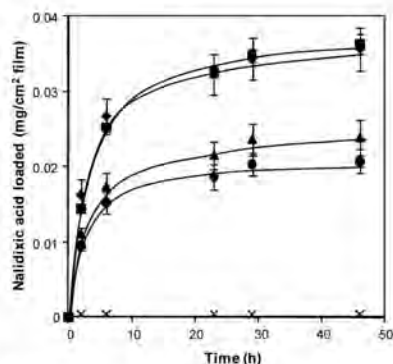


Fig. 4. Nalidixic acid loaded by PP-g-NIPAAm 14% graft (\times), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) 5% graft (\bullet), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) 13% graft (\blacktriangle), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) 25% graft (\blacksquare), and PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) 13% graft (\bullet) films immersed in drug aqueous solutions ($0.03 \text{ mg}/\text{ml}$).

with APMA moieties that may remain free after drug loading. Competitive events between the loaded drug molecules and the CM-dextran cannot be discarded. Thus, the immersion of the drug-loaded films in the CM-dextran was limited to 10 min. During that time 20–25% of nalidixic acid was released to the medium (Table 2). The amount of CM-dextran deposited on the films increased as the grafting percentage on PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) increased and was greater for PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) (Fig. 5). The mass of CM-dextran deposited on PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) was 28–40 times greater than that of nalidixic acid displaced. In the case of PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) the mass of the CM-dextran layer was 83 times greater than the drug released. These findings are related to the polymeric nature of CM-dextran, which can be fixed to

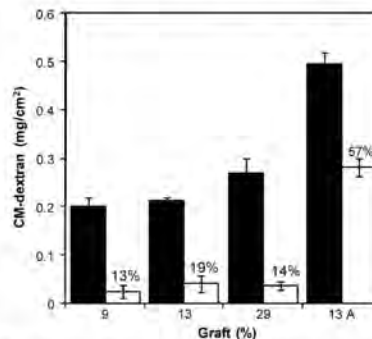


Fig. 5. CM-dextran deposited (black columns) on PP-g-(NIPAAm-r-APMA) films immersed in 2 mg/ml solution at 4°C and CM-dextran remaining (white columns) on the films after 24 h in phosphate buffer pH 7.4 at 37°C . The values in the white bars indicate the percentage of CM-dextran that remains on the films.

Author's personal copy

Á Contreras-García et al. / *Reactive & Functional Polymers* 70 (2010) 836–842

841

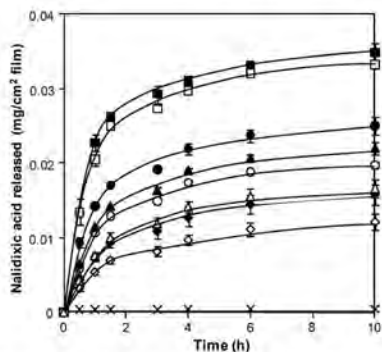


Fig. 6. Nalidixic acid release profiles in pH 7.4 phosphate buffer from PP-g-NIPAAm 14% graft (x), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) 9% graft (●), CM-dextran-coated PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) 9% graft (○), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) 13% graft (▲), CM-dextran-coated PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) 13% graft (△), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) 29% graft (●), CM-dextran-coated PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) 29% graft (○), PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) 13% graft (■), and CM-dextran-coated PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) 13% graft (□).

the grafted NIPAAm/APMA network by some of their CM groups working in a cooperative way. Thus, a single binding point may enable to anchor a greater amount of CM-dextran than of nalidixic acid.

3.4. Release of nalidixic acid and CM-dextran

The PP-g-NIPAAm film (14% graft) that loaded only 0.0004 mg/cm² of nalidixic acid released 75% in the first 30 min (Table 2), which indicates that the collapsed PNIPAm layer does not efficiently retain the drug in the absence of other retention mechanisms. Nalidixic acid release profiles from PP-g-(NIPAAm-r-

APMA) were more sustained (Fig. 6). The greater the graft percentage of PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) film was, the smaller the burst and the slower the release were. Thus, the APMA sustains the drug delivery. PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) film with 29% graft released 0.016 mg of drug per cm² after 24 h in the release medium, despite having loaded 0.035 mg/cm². Since the experiments were carried out under sink conditions and in a medium plenty of ions (phosphate buffer pH 7.4, ionic strength 0.088), the stop in the release may be related to the achievement of an equilibrium between the free drug and the drug interacting with the APMA mers and indicates a high affinity of the drug for the grafted polymer.

It should be noticed that the PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) film released the drug faster than its counterpart PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) with the same graft percentage (13%), despite of having much more APMA (2.58 vs. 1.14 μmol/cm²). This behavior can be due to the more contracted structure adopted by PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) at 37 °C (see degree of swelling in Table 1) which helps to regulate the drug release rate.

The CM-dextran layer did not cause a relevant decrease in the drug release rate (Fig. 6 and Table 2). During the release test, the CM-dextran desorbed from the film up to a large extent in the case of PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) with 9%, 13% and 29% graft, remaining only 13%, 19% and 14% of initial amount of CM-dextran after 24 h, respectively (Fig. 6). The PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) retained 57% of the CM-dextran initially deposited, which indicates that the strength of the interactions of APMA with CM-dextran is stronger than with nalidixic acid.

3.5. Microbiological test

The antibacterial efficiency of the nalidixic acid loaded films was tested *in vitro* against an *E. coli* strain, which is a relevant microorganism involved in urinary catheter-related infections [36]. The minimum inhibitory concentration (MIC) of nalidixic acid for this microorganism has been reported to be 4–6.25 μg ml⁻¹ [37,38]. Also nalidixic acid is known to be effective against indole positive *Proteus* and other microorganisms in urinary tract infections; for example, coliform bacteria such as *Klebsiella* and *Enterobacter aerogenosa*. *Brucella* species and some strains of *Salmonella* and *Shigella* are also sensitive [26]. Diffusion test in Müller-Hinton

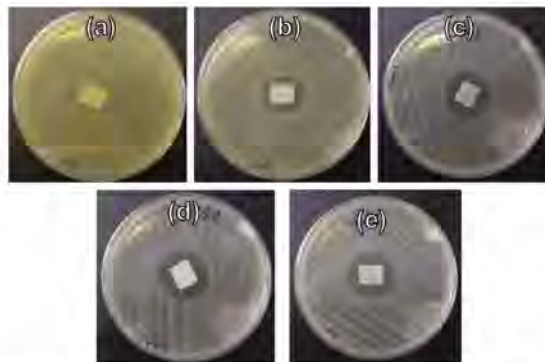


Fig. 7. Zones of inhibition against *E. coli* on Müller-Hinton agar plates with unloaded PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) 29% graft control film (a), nalidixic acid loaded PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) 9% graft (b), nalidixic acid loaded PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) 13% graft (c), nalidixic acid loaded PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) 29% graft (d), and nalidixic acid loaded PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) 13% graft (e).

842

A. Contreras-García et al. / *Reactive & Functional Polymers* 70 (2010) 836–842

Table 3
Diameter of the inhibition zones against *Escherichia coli* on Müller–Hinton agar plates obtained with nalidixic acid loaded PP-g-(NIPAAm-r-APMA) films.

Film	Grafting percentage (%)	Nalidixic acid loaded (mg/cm ²)	Inhibition zone of 24 h (mm)
PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA)	27	Non-loaded	Not inhibition
	9	0.018 ± 0.001	22.0 ± 0.5
	13	0.018 ± 0.001	23.0 ± 0.5
PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA)	29	0.031 ± 0.001	25.0 ± 0.5
	13	0.029 ± 0.002	24.0 ± 0.5

agar plates for 24 h revealed different sizes of inhibition areas against the *E. coli* strain. Control experiments carried out with unloaded PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) with 27% graft evidenced the growing of the strain around the film and no inhibited zones were observed (Fig. 7). By contrast, the films loaded with nalidixic acid led to clear zones of inhibition (Table 3). The PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) with 29% graft and loaded with the highest amount of nalidixic acid displayed an inhibition zone of 25 mm in diameter. Drug-loaded PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) with 9% and 13% graft caused inhibition zones of 22 and 23 mm, respectively. As expected from the amount of drug-loaded, PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) with 13% graft was as efficient as PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) with 29% graft. This last film maintained the inhibition zone for at least 144 h.

4. Conclusions

The grafting of NIPAAm and APMA enables PP films to uptake and to sustain the release of an antimicrobial agent, nalidixic acid, able to prevent the growth of *E. coli*. Tuning the NIPAAm/APMA ratio and the total degree of grafting, it is possible to regulate the swelling and the temperature-responsiveness of the grafted hydrogel layer and the affinity of the drug for the grafted polymer and, consequently, the amount of drug-loaded and the drug release rate at 37 °C. Coating with CM-dextran does not change drug release rate although causes certain unloading. Furthermore, the grafting slightly improved the hemocompatibility of PP, per se quite high. Therefore this surface modification of PP may be useful for preparing medical devices resistant against bacterial colonization.

Acknowledgements

Work supported by DGAPA-UNAM Grant IN200208 (Mexico), MICINN (SAF2008-01679) and FEDER (Spain), Dr. C. Taboada and Dr. B. Magariños from USC are acknowledged for help with the

hemolysis and the microbiological tests, respectively. Dr. S. Castillo from ICN-UNAM is acknowledged for FTIR assistance. A.C.G. thanks CONACYT (Mexico) for the scholarship 205069.

References

- [1] J. Jęgrz-Groździńska, *React. Funct. Polym.* 39 (1999) 99.
- [2] M. Habashi, G. Riud, J. Clin. Pharmacol. 30 (1990) 837.
- [3] S. Neimark, W. Dunmil, M. Wilson, L.S. Parkin, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 3433.
- [4] D. Maki, P. Tamitsyo, *Emerg. Infect. Dis.* 7 (2001) 342.
- [5] C. von Elft, B. Jansen, W. Kohnene, K. Becker, *Drugs* 65 (2005) 179.
- [6] A.W. Smith, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 5 (2005) 1539.
- [7] K.F. Padra, *Cardiovasc. Pathol.* 15 (2006) 264.
- [8] K. Chateb, K. Mahdoui, A. Bakhrad, *J. Hos. Infect.* 61 (2005) 225.
- [9] J.C. Nickel, J.W. Costerton, R.J.C. McLean, M. Olson, *J. Antimicrob. Chemother.* 33A (1994) 31.
- [10] J. Keven, D. Shah, A. Sporing, N. Kaldala, K. Lewis, *J. Bacteriol.* 186 (2004) 8172.
- [11] W.R. Jarvis, W.J. Mariano, *J. Antimicrob. Chemother.* 29A (1992) 19.
- [12] I. Raad, H.A. Hanna, *Arch. Intern. Med.* 162 (2002) 871.
- [13] J.M. Schierholz, J. Beutli, *J. Hos. Infect.* 49 (2001) 87.
- [14] Y. El Ghoul, N. Blüthmann, T. Lavrent, C. Campagne, A. El Achari, S. Koudeti, M. Morellet, B. Mariel, H.F. Hildebrand, *Acta Biomater.* 4 (2008) 1392.
- [15] C. Alvarez-Lorenzo, E. Bucio, G. Barillo, A. Concheiro, *Expert Opin. Drug Deliv.* 7 (2010) 173.
- [16] V. Kugger, J. Francolini, C. Donelli, A. Pinzi, *J. Biomed. Mater. Res. A* 81 (2007) 287.
- [17] L.A. Mermel, B.M. Farr, R.J. Sherytz, L.I. Raad, N. O'Grady, J.S. Hamis, D.E. Claven, *Clin. Infect. Dis.* 32 (2001) 1249.
- [18] S. Özmal, S.F. Kalyon, F.N. Kaya, H. Akalin, C. Öztürk, E. Yılmaz, O. Kutlay, *J. Hos. Infect.* 52 (2006) 136.
- [19] P. Emans, M. Schreinemacher, M. Cijbels, G. Berts, J.W. Groot, L. Kooze, N. Bouvy, *Ann. Biomed. Eng.* 37 (2009) 410.
- [20] C.M. Xing, J.P. Deng, W.T. Yang, *J. Appl. Polym. Sci.* 97 (2005) 2026.
- [21] N. Anjani, S.R.H. Gurezi, H. Singh, B. Gupta, *J. Appl. Polym. Sci.* 101 (2006) 3885.
- [22] M.R. Badrossamay, C. Sun, *React. Funct. Polym.* 68 (2008) 1636.
- [23] J.C. Ruiz, C. Alvarez-Lorenzo, P. Taboada, G. Barillo, E. Bucio, K. De Prick, H.S. Neils, T. Coenye, A. Concheiro, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 (2008) 467.
- [24] E. Muñoz-Muñoz, J.C. Ruiz, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, E. Bucio, *Eur. Polym. J.* 45 (2009) 1829.
- [25] I. Katsarolis, G. Poulakou, S. Athanasa, J. Kourea-Kremastinou, N. Lambri, E. Karatsos, P. Panagopoulos, F.V. Kontopidou, D. Voutzinas, G. Koratzanis, M. Kanellopoulou, G. Adams, H. Vagiakou, P. Perdikaki, H. Giannariou, K. Kanellopoulou, *Int. J. Antimicrob. Ag.* 35 (2010) 62.
- [26] G. Grover, S.G. Kishi, *Eur. J. Med. Chem.* 41 (2006) 256.
- [27] A. Contreras-García, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, E. Bucio, *Radiat. Phys. Chem.* 79 (2010) 615.
- [28] Z.M.D. Rzaev, S. Dinçer, E. Pigkin, *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 534.
- [29] A. Chilkoti, M.R. Dreher, D.E. Meyer, D. Raucher, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 54 (2002) 613.
- [30] G. Halliwell, M. Sakajoh, T. Dunn, *Enzyme. Microb. Technol.* 5 (1983) 17.
- [31] C.P. Scott, P.A. Higham, *J. Biomed. Mater. Res. B* 64 (2003) 94.
- [32] A. Kumara, A. Srivastava, I.Y. Galiev, B. Mattiasson, *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 1208.
- [33] C.H. Bamford, K.G. Al-Jamec, *Polymer* 37 (1996) 4885.
- [34] J.M. Anderson, A. Rodriguez, D.T. Chang, *Semin. Immunol.* 20 (2008) 86.
- [35] N.B. Holland, Y. Qiu, M. Ruesegger, R.E. Marchant, *Nature* 392 (1998) 799.
- [36] W.R. Traumer, K.A. Hull, R.D. Darvasich, *Immunology* 61 (2003) 1059.
- [37] J. Martínez-Martínez, A. Pascual, G.A. Jacoby, *Lancet* 351 (1998) 797.
- [38] A. Ito, K. Hirai, M. Inoue, H. Koga, S. Suzuki, T. Ishizawa, S. Mitsushima, *Antimicrob. Ag. Ch.* 17 (1980) 103.

ACTBIO 1502
20 October 2010

ARTICLE IN PRESS

No. of Pages 13, Model 5G

Acta Biomaterialia xxx (2010) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Acta Biomaterialia

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/actbiomat

Stimuli-responsive networks grafted onto polypropylene for the sustained delivery of NSAIDs

Angel Contreras-García^{a,b}, Carmen Alvarez-Lorenzo^{b,*}, Cristina Taboada^c, Angel Concheiro^b, Emilio Bucio^a

^aDepartamento de Química de Radiaciones y Radioquímica, Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México DF 04510, México

^bDepartamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain

^cDepartamento de Fisiología, Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 6 July 2010
Received in revised form 3 September 2010
Accepted 4 October 2010
Available online xxxxx

Keywords:
Polypropylene
Diclofenac
Drug release
N-isopropyl acrylamide
N-(3-aminopropyl) methacrylamide

ABSTRACT

Co-polymers of N-isopropyl acrylamide (NIPAAm) and N-(3-aminopropyl) methacrylamide hydrochloride (APMA) were grafted on polypropylene (PP) films by means of a γ -ray pre-irradiation method, with the aim of developing medical devices able to load non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and to control their release under physiological conditions. The NIPAAm/APMA molar ratios in the grafts, estimated by Fourier transform infrared attenuated total reflection spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy analysis, were 4.76 and 1.23 for PP-g-(1 M NIPAAm-r-0.5 M APMA) and PP-g-(1 M NIPAAm-r-1 M APMA), respectively. By varying the reaction time, different degrees of grafting were achieved, while the monomer ratio was kept constant. PP-g-(NIPAAm-r-APMA) films showed temperature-responsive swelling, smaller friction coefficients, hemolysis and thrombogenicity and higher cell compatibility, did not elicit secretion of cytokines, and took up remarkable amounts of diclofenac and ibuprofen and sustained delivery for several hours in phosphate buffer, pH 7.4. Coating with carboxymethyl dextran of diclofenac-loaded PP-g-(NIPAAm-r-APMA) films caused a minor discharge of the drug but did not alter the drug release rate.

© 2010 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Intense research is being carried out to design medical devices with improved features regarding biocompatibility and therapeutic performance, for example combination products that play the specific role of medical device and that also act as delivery systems for the local release of drugs for curative or prophylactic purposes [1–3]. It should be noted that the implantation of a foreign body, such as a catheter or implant, usually causes injury, inflammation and a wound healing response, resulting in swelling and pain at the insertion site and discomfort for the patient [4,5]. Once a medical device is inserted, a race to colonize the surface begins, in which proteins, host cells and microorganisms compete for adsorption onto the material [6,7]. Adherent inflammatory cells not only lose their bactericidal capability but may also induce degradation and clinical failure of the medical device [8,9]. The dimensions and the surface properties of the medical device and the release of leachable substances determine the intensity and duration of inflammation and the healing process [8].

Surface functionalization based on radiation techniques enables inert particles, fibers, films and molded devices to be endowed with chemical groups or macrostructures able to modify relevant features, such as wettability, adhesion to biological components and microorganisms, or affinity for drugs [10–14]. γ -Ray irradiation enables the grafting onto medical devices of polymers with functional groups capable of interacting with drug molecules [15]. Depending on the chemical structure of the substrate and the monomers to be grafted, different levels of performance can be achieved. Most research has focused on the grafting of acrylic polymers to silk, polypropylene (PP) or polyethylene (PE) with the aim of enhancing the adsorption of antimicrobial agents and inhibiting the growth of bacteria [16–18]. Grafting of cyclodextrins has also been explored for the uptake of drugs possessing hydrophobic moieties suitable for forming inclusion complexes [19–20]. Surface functionalization with stimulus-responsiveness is being evaluated for the preparation of drug eluting medical devices, with promising results. The bioactive compounds can chemically interact through reversible bonds with the modified surfaces, becoming trapped in a three-dimensional polymer network from which they can be released in a controlled way by certain physiological variables, such temperature or pH [21,22].

* Corresponding author. Tel.: +34 981563100; fax: +34 981547148.
E-mail address: carmen.alvarez.lorenzo@usc.es (C. Alvarez-Lorenzo).

1742-7061/\$ - see front matter © 2010 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.actbio.2010.10.001

Please cite this article in press as: Contreras-García A et al. Stimuli-responsive networks grafted onto polypropylene for the sustained delivery of NSAIDs. Acta Biomater (2010). doi:10.1016/j.actbio.2010.10.001

We have previously reported that PP films grafted with poly(*N*-isopropyl acrylamide) (poly(NIPAAm)) and poly(*N*-(3-aminopropyl) methacrylamide hydrochloride) (poly(APMA)) can efficiently load nalidixic acid and prevent *in vitro* growth of *Escherichia coli* [23]. The grafted surface behaved as a temperature-responsive network, due to poly(NIPAAm), which swells at room temperature, enabling fast loading of the drug, but shrinks at body temperature, sustaining drug release [24,25]. Furthermore, polyAPMA can electrostatically interact with anionic drugs, driving uptake, as well as improving the hemocompatibility of the films [26–29]. The aim of this work was to gain an insight into the blood compatibility, cytocompatibility and frictional properties of grafted PP materials, which are very relevant to the reaction of the host to the foreign body material and to evaluate their ability to load therapeutic doses of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and sustain their release for prolonged periods. The combination of apolar and polar regions in the surface network is expected to provide a favorable environment for both the hydrophobic and the ionic moieties of NSAIDs such as diclofenac and ibuprofen [30]. We have previously reported on the difficulties of grafting APMA onto PP and the effect of NIPAAm/APMA ratio on the lower critical solution temperature (LCST) of the grafted networks [23,31]. Suitable combinations were chosen for the present work. The effect of co-polymer grafting on the degree of swelling, hemolysis, thrombogenicity and cytocompatibility was firstly analyzed. Then, sodium diclofenac and sodium ibuprofen loading and release were evaluated. The effect of coating with carboxymethyl dextran, a highly biocompatible polysaccharide [32], on hemocompatibility and drug release was also tested.

2. Experimental procedures

2.1. Materials

PP films with a density of 0.92 g ml⁻¹ and a thickness of 1.7 mm were from Goodfellow (Huntingdon, UK). *N*-(3-Aminopropyl) methacrylamide hydrochloride (APMA, 98%) was from 2B Scientific Corp. (Libertyville, IL) and used after purification by recrystallization in methanol/ethyl ether 1/10 v/v mixture. *N*-Isopropylacrylamide (NIPAAm, 97%) was obtained from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) and recrystallized from 50/50 vol.% hexane/toluene solution. Sodium diclofenac was from Vorquímica S.L. (Spain), sodium ibuprofen from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO), and carboxymethyl dextran sodium salt (CM-dextran) from Fluka Chemie AG (Copenhagen, Denmark). Crystallized, reagent grade phenol was obtained from Scharlau (Spain) and sulfuric acid from Panreac Química S.A. (Barcelona, Spain). Hexane, toluene, ethyl ether, and methanol of analytical grade were obtained from Mallinckrodt Baker (Fcatepec de Morelos, Mexico) and used as received. MilliQ water (Millipore Iberica, Madrid, Spain) was used in all experiments.

2.2. Grafting by the pre-irradiation method

PP films 1.2 × 4 cm were washed with methanol and then dried at room temperature under vacuum before grafting. The films were

exposed to a ⁶⁰Co γ-source (Gamma beam 651 PT, MDS Nordion USA) in the presence of air, at room temperature. A dose rate of 10 kGy h⁻¹ and pre-irradiation doses of 50 or 80 kGy were used. The pre-irradiated films were placed in glass ampoules with aqueous solutions of 1 M NIPAAm and 0.5 or 1 M APMA to obtain PP-g-(NIPAAm-r-APMA) or 1 M NIPAAm solution to prepare PP-g-NIPAAm. The ampoules were bubbled with argon to remove the air, sealed, and heated for different reaction times at 60 °C in the case of PP-g-NIPAAm or 80 °C in the case of PP-g-(NIPAAm-r-APMA) (Table 1). Grafted films were washed with water for 8 h at 25 °C in order to extract the residual monomer and homopolymer that formed and was occluded in the films during grafting. The grafted films were designated by the molar concentrations of NIPAAm and APMA in the reaction mixture upon synthesis. For example, PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) refers to a grafted co-polymer prepared by immersion in a 1 M NIPAAm and 0.5 M APMA solution. The percentage grafting of NIPAAm/APMA onto PP was calculated as follows:

$$G(\%) = 100 \cdot \frac{(W_g - W_0)}{W_0}$$

where W_g and W_0 are the weights of the grafted and initial films, respectively. The homopolymers formed in the reaction medium when grafting was carried out at 80 °C in the presence of one type of monomer, i.e. 1 M NIPAAm or 1 M APMA solution, were collected by vacuum drying the solution to form films (~0.35 mm thick), which were used as references for the Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic analysis.

2.3. Characterization of grafted PP films

The thickness of the films before and after grafting was measured using an electronic digital caliper (Max-Cal, Japan). FTIR attenuated total reflection (ATR) spectra were recorded using a Perkin-Elmer Spectrum 100 (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT) fitted with a Universal ATR sampling accessory (DiComp™ crystal, which is composed of a diamond ATR with a zinc selenide focusing element in direct contact with the diamond). Baseline subtraction and ATR correction to eliminate the dependence on penetration depth were carried out using the Spectrum software supplied with the equipment. The spectra of the PAFMA and PNIPAAm homopolymers were normalized with respect to the carbonyl bands at 1625 and 1636 cm⁻¹, respectively. The FTIR absorbance spectra of the PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) and PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) films were also normalized with respect to the carbonyl band at 1636 cm⁻¹. Then the relative absorbances of the characteristic peaks of APMA at 1315 cm⁻¹ (i.e. Abs₁₃₁₅/Abs₁₆₃₆) and of NIPAAm at 1170 cm⁻¹ (i.e. Abs₁₁₇₀/Abs₁₆₃₆) were calculated to estimate the content in each component in the graft co-polymers.

The elemental chemical composition of the grafted surfaces was determined by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), performed in a VG ESCALAB 3MKII instrument, using non-monochromatic MgK_α radiation (12 kV, 18 mA). XPS spectra were acquired at a 01 emission angle, normal to the samples surface, and possible charging was corrected by referencing all peaks to the carbon

Table 1
Pre-irradiation dose and reaction time used to synthesize films with various grafting percentages, degree of swelling of the grafted films at 25 °C for 1 h in water, and friction coefficient values of swollen grafted films.

Film	Dose (kGy)	Reaction time (h)	Graft (%)	Water uptake (%)	Friction coefficient
PP-g-NIPAAm	50	6	26	85	0.21 (0.03)
PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA)	80	4	10	108	0.27 (0.03)
PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA)	80	8	14	121	0.19 (0.01)
PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA)	80	12	26	245	0.27 (0.04)
PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA)	80	16	13	240	0.25 (0.03)

Please cite this article in press as: Contreras-García et al. Stimuli-responsive networks grafted onto polypropylene for the sustained delivery of NSAIDs. Acta Biomater (2010), doi:10.1016/j.actbio.2010.10.007

<p>185 186 187 188 189 190 191 192</p> <p>193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220</p> <p>221</p> <p>222 223 224 225</p> <p>226</p> <p>227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245</p>	<p>(Cl_s) peak at a binding energy of 285 eV. Quantification of the constituent elements was performed using the broad scan spectra and Advantage v.4.12 software (Thermo Electron Corp., Waltham, MA) by integrating the areas under the relevant peaks after a Shirley-type background subtraction, using sensitivity factors from the Wagner table [33]. Then, the APMA weight fraction (Φ_{APMA}) was calculated on the basis of the equation [34]:</p> $\frac{I_{Cl_{2p}}}{I_{Cl_{1s}}} = \frac{7\Phi_{APMA}/MW_{APMA}}{(7\Phi_{APMA}/MW_{APMA}) + (6(1 - \Phi_{APMA})/MW_{NIPAAm})}$ <p>where $I_{Cl_{2p}}$ and $I_{Cl_{1s}}$ are the integrated intensities of peaks assignable to chloride and carbon atoms, respectively, and MW_{APMA} and MW_{NIPAAm} are the molecular weights of each repeating unit for APMA and NIPAAm. The numbers of carbon atoms included in each repeating unit of APMA and NIPAAm are 7 and 6, respectively. Similarly, one chloride is included in each repeating unit of APMA. The integrated intensity values of the peaks for Cl_{1s} (199 eV) and carbons C_{1s} (285 eV) were 10,776 and 163,192 for PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) with 16% grafting. The APMA/NIPAAm ratio in the co-polymer film was calculated from the weight ratio.</p> <p>Swelling experiments were carried out by immersion of the grafted films in water. The films were removed from the liquid at various time intervals, weighed after blotting the surface with a piece of paper, and again placed in the aqueous medium. The percentage swelling was determined gravimetrically as follows:</p> $S(\%) = 100 \frac{(W_s - W_d)}{W_d}$ <p>where W_d and W_s are weights of the dry and the swollen grafted co-polymer, respectively, i.e. the degree of swelling is referenced only to the weight of grafted co-polymer, not to the whole mass of the substrate plus the grafted co-polymer. The LCST of the grafted films was determined, in triplicate, as changes in the limited swelling of the samples immersed in water at various temperatures (from 26 to 50 °C) for 2 h.</p> <p>2.4. SEM of grafted PP films</p> <p>Swollen films were freeze dried in a Genesis 25ES pilot lyophilizer (VirTis, UK), sputter-coated with gold and then observed using a LEQ435VP scanning electron microscope (Leica, Cambridge, UK) at various magnifications.</p> <p>2.5. Friction coefficient</p> <p>The friction coefficient of films swollen in phosphate buffer, pH 7.4, was measured, in duplicate, at 37 °C using a Rheolyt AR1000N rheometer (TA Instruments, Crawley, UK) equipped with an AR2500 data analyzer and a Peltier plate. The films were cut to squares with 10 mm sides. The surface of the film was blotted with filter paper and immediately glued (Locite® Super Glue-3, Henkel, Barcelona, Spain) to a 4 cm steel plate assembly. One milliliter of buffer was placed on the surface of the Peltier plate and the assembly was moved towards the plate to give an initial gap of between 1.7 and 2.8 mm, depending on the film. The experiment consisted of a conditioning step applying a 5 ± 0.01 N normal force (W) for 15 min and a peak hold step with an angular velocity of 0.05 rad s^{-1} for another 15 min [35]. Since the velocity changes with distance from the center of a circle, the torque obtained T is the total value over the velocity range 0 to ωR, where R is the radius. Due to the difficulty of cutting circles from the film $1/\sqrt{2}$ of the length of the side of the square was used as R [36]. Thus, the total friction F and the coefficient of friction μ were determined as follows:</p> $F = \frac{4T}{3R}$ $\mu = \frac{F}{W}$	<p>246 248 249 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305</p>
---	--	--

306 USA) at 450 nm. The limits of detection of mouse IL-1 α and TNF- α
307 were 7.8 and 31.8 pg ml⁻¹, respectively. Cells cultured in the presence
308 of lipopolysaccharide (LPS) (10 ng ml⁻¹) [38] and cells cultured
309 in medium without films were utilized as positive and
310 negative controls, respectively.
311 Cell survival in the presence of co-polymer films was evaluated
312 at 5 h and 1, 3, and 6 days using a Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS}
313 (LDH) (Roche, Spain). Hundred microliters of the supernatants
314 were assayed following the manufacturer's instructions. Absorbance
315 of the samples at 490 nm was measured using a plate reader
316 (Bio-Rad 680 Microplate Reader, USA). Cell viability was also qualitatively
317 analyzed by laser confocal fluorescence microscopy
318 (LCSM) (Leica Microsystems, Germany). The films were carefully
319 removed from the culture plates. Subsequently, adherent cells
320 were stained with 1 mg ml⁻¹ calcein-AM (Sigma-Aldrich, Spain)
321 and 1 mg ml⁻¹ propidium iodide (Molecular Probes, Eugene, OR).

322 The strained cells were observed under LCSM and the images
323 obtained were processed with Leica LCSM software.

2.9. Diclofenac and ibuprofen loading

324 Pristine and grafted PP films were immersed, in duplicate, in
325 5 ml of sodium diclofenac (0.04 mg ml⁻¹) or sodium ibuprofen
326 (0.4 mg ml⁻¹) aqueous solution at 4 °C and kept in the dark. The
327 concentration of diclofenac and ibuprofen was spectrophotometri-
328 cally monitored (Agilent 8453, Germany) at 276 and 273 nm,
329 respectively, for 30 h. The total amount of drug taken up by the
330 films was calculated as the difference between the initial and final
331 amounts in solution.

2.10. Release of diclofenac and ibuprofen

332 Drug-loaded films were dried under vacuum and then immersed
333 in 5 ml of phosphate buffer, pH 7.4, at 37 °C. Three millili-
334 ters of solution was withdrawn at specific time intervals, the drug
335 content determined by UV spectrophotometry at 276 and 273 nm
336 for diclofenac and ibuprofen, respectively, and then the solution
337 immediately returned to the corresponding vial. The experiments
338 were repeated three times with each film in order to evaluate the
339 intrafilm repeatability of the loading/release behavior.

2.11. CM-dextran deposition on PP-g-(NIPAAm-r-APMA) films

340 Pieces of pristine and grafted PP films (1 × 1 cm) were washed
341 extensively with water, loaded with diclofenac as described above,
342 and then immersed in an aqueous solution of CM-dextran
343 (2 mg ml⁻¹) for 1 h, after which they were rinsed with water and
344 dried under vacuum. Drug released to the CM-dextran solution
345 was spectrophotometrically determined as described above.
346 Changes in the concentration of CM-dextran in the solution were
347 quantified using a colorimetric method [39]. Briefly, 1 ml of 5%
348 (w/v) phenol and 5 ml of concentrated sulfuric acid were added,
349 under stirring, to 1 ml of CM-dextran solution. The mixture was
350 incubated at 37 °C for 30 min and the absorbance recorded at
351 489 nm using an Agilent 8453 spectrophotometer (Germany).
352 The linear quantification interval was 14–140 mg ml⁻¹. The
353 amount of CM-dextran deposited on the films was determined as
354 the difference between the initial and final amounts in solution.

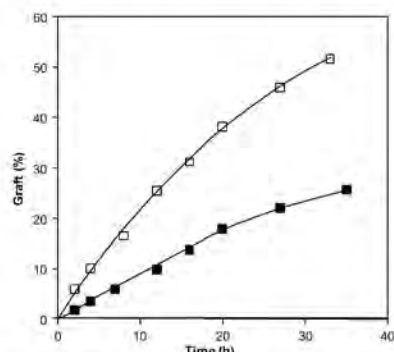


Fig. 1. NIPAAm/APMA grafting onto PP films pre-irradiated with a 80 kGy dose and immersed at 80 °C for different times in 1 M NIPAAm/0.5 M APMA (□) and 1 M NIPAAm/1 M APMA (■) solutions in water.

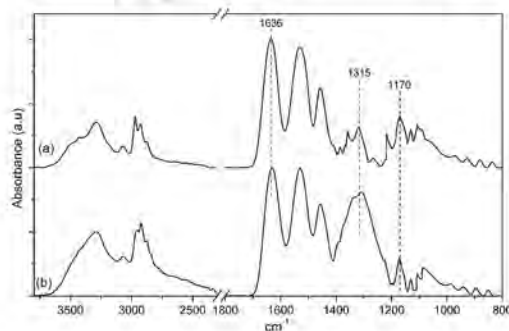


Fig. 2. FTIR-ATR spectra of PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA) (a) and PP-g-(NIPAAm-r-1APMA) (b) prepared at a pre-irradiation dose of 80 kGy and reaction temperature of 80 °C. Please cite this article in press as: Contreras-García A et al. Stimuli-responsive networks grafted onto polypropylene for the sustained delivery of NSAIDs. Acta Biomater (2010), doi:10.1016/j.actbio.2010.10.001

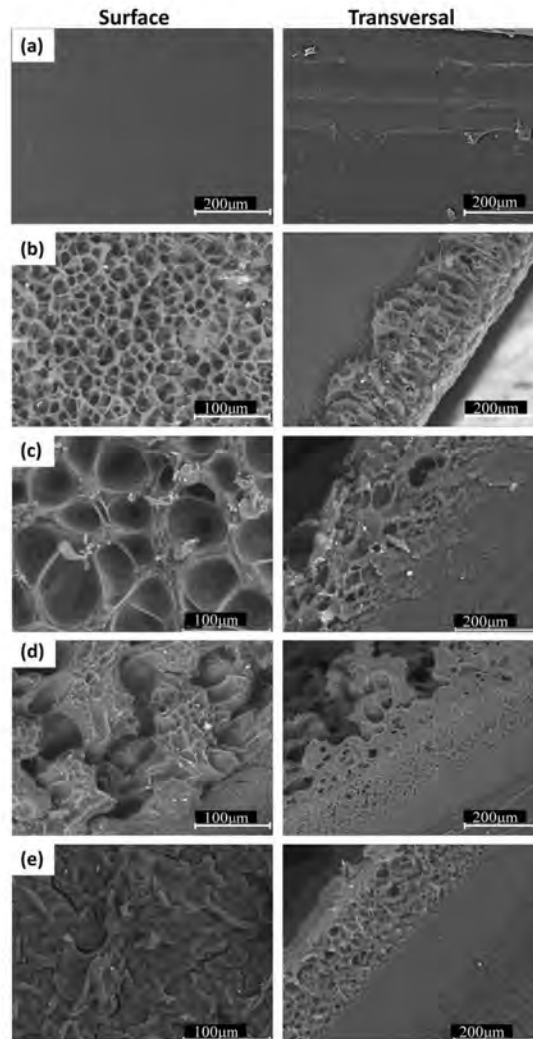


Fig. 3. SEM images of PP (a), PP-g-NIPAAm, 28% grafting (b), PP-g-(1NIPAAm-g-0.5APMA), 14% grafting (c), PP-g-(1NIPAAm-g-0.5APMA), 29% grafting (d), and PP-g-(1NIPAAm-g-1APMA), 13% grafting (e). The magnifications for the surface and transverse views are 1000 \times and 500 \times , respectively.

Please cite this article in press as: Contreras-García A et al. Stimuli-responsive networks grafted onto polypropylene for the sustained delivery of NSAIDs, Acta Biomater (2010), doi:10.1016/j.actbio.2010.10.001

5

A. Contreras-García et al. / Acta Biomaterialia xxx (2010) xxx–xxx

358 2.12. Statistical analysis:

359 Hémolysis, thrombogenicity, and drug loading and release data
360 obtained for different grafted materials were compared using AN-
361 OVA and Fisher's least significant differences (LSD) multiple range
362 test (Statgraphics Plus for Windows 5.1, Statistical Graphics Corp.).

363 3. Results and discussion

364 3.1. Grafting process

365 The grafting of NIPAAm and APMA onto PP films was carried out
366 by applying a pre-irradiation method, which consisted of (i) expo-
367 sition of the PP films to a ⁶⁰Co γ -ray source in order to generate free
368 radicals, followed by (ii) immersion in solutions containing NIP-
369 AA or NIPAAm and APMA to initiate grafting polymerization.
370 The grafting of APMA alone was not possible, probably due to ionic
371 repulsion between the monomers [31]. Total percentage grafting of
372 the co-polymer was tuned varying the reaction time from 2 to 35 h
373 while keeping the irradiation dose and the reaction temperature
374 constant (Fig. 1). The ratio between NIPAAm and APMA in the
375 grafted film was estimated from the relative absorbance of the FTIR
376 peaks at 1170 and 1315 cm^{-1} (Fig. 2) normalized with respect to
377 the carbonyl peak at 1636 cm^{-1} . The resulting NIPAAm/APMA molar
378 ratios were 4.76 and 1.23 for PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA) and
379 PP-g-(NIPAAm-r-1APMA), respectively, disregarding the overall
380 degree of grafting. These results were confirmed by XPS analysis,
381 which gave a NIPAAm/APMA molar ratio of 1.38 for PP-g-(NIP-
382 AA-m-r-1APMA). No precise results were obtained by XPS for PP-
383 g-(NIPAAm-r-0.5APMA) due to the low proportion of chloride
384 atoms.

385 SEM micrographs of surface and transverse views of PP, PP-g-
386 NIPAAm, and PP-g-(NIPAAm-r-APMA) films with different grafting
387 percentages are shown in Fig. 3. The pristine PP film has a smooth
388 surface with no observable discontinuities. The PP-g-NIPAAm film
389 (28% grafting) showed a spongy surface and the transverse image
390 showed a thin PNIPAAm layer covering the PP film. The SEM micrographs
391 of PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA) with 14% grafting showed a
392 grafted layer with a higher mesh size than in PP-g-NIPAAm, and

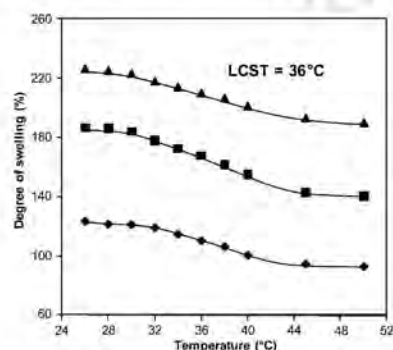


Fig. 4. Dependence of the degree of swelling on temperature observed for PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA) co-polymers with different grafting percentages: 17% (●), 31% (■), and 52% (▲). All samples were obtained using a pre-irradiation dose of 80 kGy and a temperature of 80 °C.

Please cite this article in press as: Contreras-García A et al. Stimuli-responsive networks grafted onto polypropylene for the sustained delivery of NSAIDs. Acta Biomater (2010), doi:10.1016/j.actbio.2010.10.001

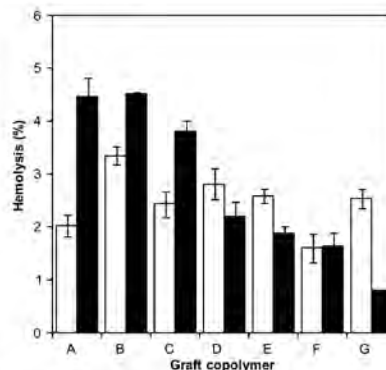


Fig. 5. Percentage of hemolysis caused by PP film (A), PP-g-NIPAAm, 27% grafting (B), PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA), 10% grafting (C), PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA), 14% grafting (D), PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA), 29% grafting (E), CM-dextran-coated (1.3 mg cm^{-2}) PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA), 29% grafting (F), and PP-g-(NIPAAm-r-1APMA), 13% grafting (G). White blocks correspond to data obtained with rat blood and black blocks correspond to data obtained with human blood.

393 in transverse view a dense layer of grafted co-polymer. The sur-
394 face of the PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA) film with 29% grafting
395 showed many protuberances and greater roughness. Finally, the
396 PP-g-(NIPAAm-r-1APMA) film with 13% grafting had a more
397 compact grafted layer, although still quite porous. The thickness
398 of the grafted layer in the swollen state ranged between 0.17
399 and 0.45 mm.

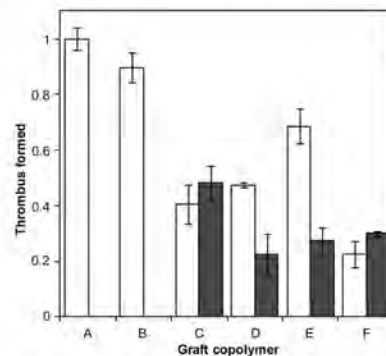


Fig. 6. Thrombus formed after 30 min incubation on pristine PP (A), PP-g-NIPAAm, 27% grafting (B), PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA), 10% grafting (C), PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA), 14% grafting (D), PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA), 29% grafting (E), and PP-g-(NIPAAm-r-1APMA), 13% grafting (F). The weight of thrombus formed on the surface-modified PP is normalized to that formed on pristine PP. White blocks correspond to data obtained with non-loaded films and gray blocks correspond to data obtained with diclofenac-loaded films.

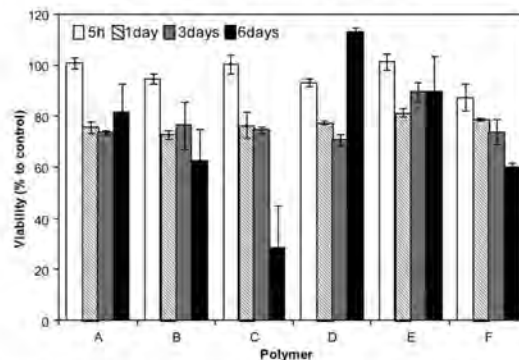


Fig. 7. Viability of RAW 264.7 macrophages after different times cultured over pristine PP (A), PP-g-NIPAAm, 27% grafting (B), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 10% grafting (C), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 14% grafting (D), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 29% grafting (E) and PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA), 13% grafting (F).

400 3.2. Swelling behavior

401 The temperature responsiveness of PP-g-(1NIPAAm-r-
402 0.5APMA) was evident as a decrease in the degree of swelling at
403 36 °C (Fig. 4), which is close to the LCST of the poly(NIPAAm)
404 chains. At this temperature, which is close to body temperature,
405 the water molecules trapped in the network are released into the
406 medium, since water-polymer hydrogen bonds are broken and
407 polymer-polymer interaction is promoted [40,41]. The incorpora-
408 tion of APMA, a cationic monomer, increased the hydrophilicity
409 and, therefore, the ability to absorb more solvent. Differences in
410 the grafted percentage and in the monomer ratios led to different
411 swelling percentages. For example, the degree of swelling at
412 25 °C of PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) with 14% of grafting was
413 121%, while PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) with 13% grafting swelled
414 by 240% (Table 1).

415 3.3. Friction coefficient

416 The ease of insertion and removal, without causing damage to
417 the adjacent tissues, closely correlates with the coefficient of friction
418 of medical devices. The coefficient of friction values μ against
419 the Peltier plate (with a surface of chrome-plated copper) of a rheo-
420 meter ranged between 0.19 and 0.27 for PP-g-(NIPAAm-r-APMA)
421 films. The coefficients of friction of pristine PP and PP-g-NIPAAm
422 films were 0.23 and 0.31, respectively (Table 1). The coefficient
423 of friction values obtained are in the range of slippery and comfort-
424 able materials [42]. Despite that, surface roughness increased with
425 the content of grafted polymer (Fig. 3), the coefficient of friction
426 remained within the range of appropriate values, mainly because
427 APMA enhances the ability of the hydrogel layer to take up water
428 at 37 °C, compared with NIPAAm. It has previously been reported
429 that the water squeezed out of a hydrogel under a certain load
430 forms a thin layer, leading to lubrication between the co-polymer
431 films and other surfaces [43].

432 3.4. Hemolysis, thrombogenicity and cytocompatibility

433 The term "biocompatibility" encompasses many different prop-
434 erties of a material, but mainly refers to blood compatibility and
435 cytotoxicity [44]. Erythrocytes were incubated in physiological

436 buffer, pH 7.4, in the presence of PP, PP-g-NIPAAm with 26% graft-
437 ing, PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) with 29% grafting, and CM-dex-
438 tran-coated PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) with 29% grafting. The
439 binary graft co-polymers caused less than 4% hemolysis (Fig. 5),
440 indicating no significant disturbance of red blood cell membranes.
441 PP-g-NIPAAm grafting caused 3.4% and 5.5% hemolysis, while pris-
442 tine PP films showed 2.0% and 4.4% hemolysis in rat and human
443 blood, respectively. No significant differences ($\alpha < 0.05$) were
444 found among the materials when assayed against rat blood. In con-
445 trast, ANOVA test of the human blood results revealed significant
446 differences ($F_{6,701} = 21.55$, $\alpha < 0.001$) and LSD tests indicated that
447 PP-g-NIPAAm is significantly more hemolytic than the others,
448 except PP, PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), coated or not with CM-
449 dextran, and PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) with 13% grafting were
450 found to be the least membrane damaging polymers (<1.9% hemol-
451 ysis). No statistical differences were found among these three
452 grafted materials. The decrease in hemolysis observed for the
453 co-polymer containing cationic APMA units may be related to the
454 ability of quaternized ammonium groups to adsorb heparin [45]
455 but not membrane cholesterol, which is one of the main causes
456 of the modification of membrane permeability [46].

457 Pristine PP was as thrombogenic (clot weight 7.4 ± 0.3 mg) as
458 the glass Petri dish used as a positive control (clot weight
459 7.5 ± 0.2 mg). The relative weights of the clots formed on the sur-
460 faces of the modified PP films were normalized to that formed on
461 pristine PP (Fig. 6). ANOVA indicated statistically significant differ-
462 ences when all systems were compared ($F_{9,1047} = 56.98$, $\alpha < 0.001$).
463 PP-g-NIPAAm reduced the weight of the clot by only 10%; an LSD
464 test revealed no significant differences from PP. In contrast, graft-
465 ing with the co-polymer resulted in much smaller clots (LSD tests
466 indicating in all cases significant differences with respect to PP and
467 PP-g-NIPAAm). PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) was 80% less thrombo-
468 genic than PP film. PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) films with 10%,
469 14%, and 29% grafting showed a small increase in thrombogenicity
470 as the grafting percentage increased. The anti-thrombogenic effect
471 of APMA can be also related to the ability of amine groups to ad-
472 sorb heparin and albumin from blood, thus inhibiting the clotting
473 process [47].

474 Cytocompatibility studies were carried out with RAW 264.7
475 murine macrophages because of their sensitivity to residual meth-
476 acrylate monomers [48]. The cells were directly cultured on the

8

A. Contreras-García et al./Acta Biomaterialia xxx (2010) xxx-xxx

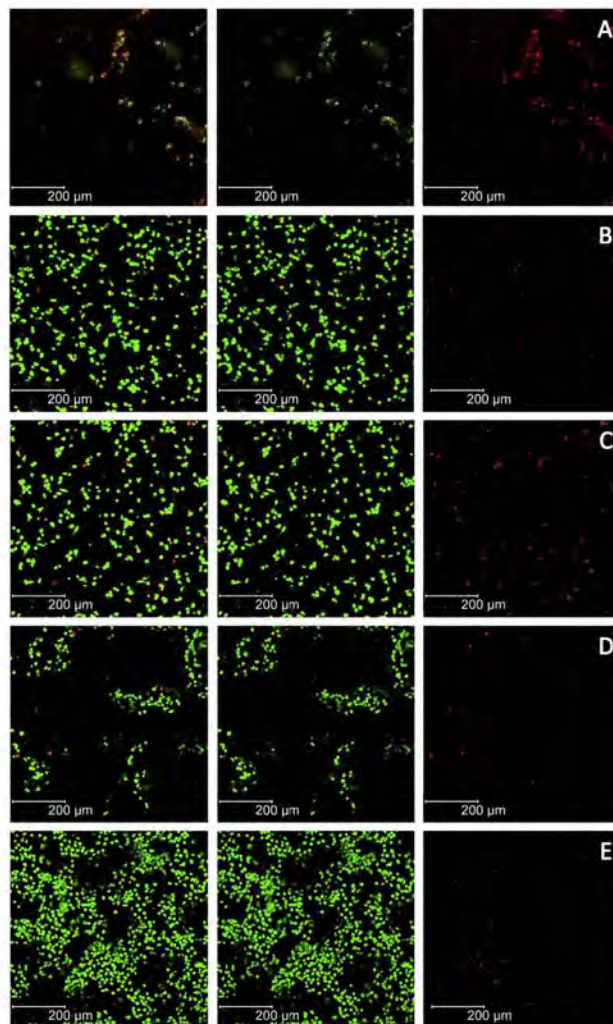


Fig. 8. Live/dead assay of RAW 264.7 cells cultured for 24 h on: pristine PP (A), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 10% grafting (B), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 14% grafting (C), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 29% grafting (D), and PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA), 13% (E). The live cells stained with calcein AM appear green (middle panel) and the dead cells stained with propidium iodide appear red (right panel). Simultaneous staining appears in the left panel.

Please cite this article in press as: Contreras-García A et al. Stimuli-responsive networks grafted onto polypropylene for the sustained delivery of NSAIDs. *Acta Biomater* (2010), doi:10.1016/j.actbio.2010.10.001

A. Contreras-García et al. / Acta Biomaterialia xxx (2010) xxx–xxx

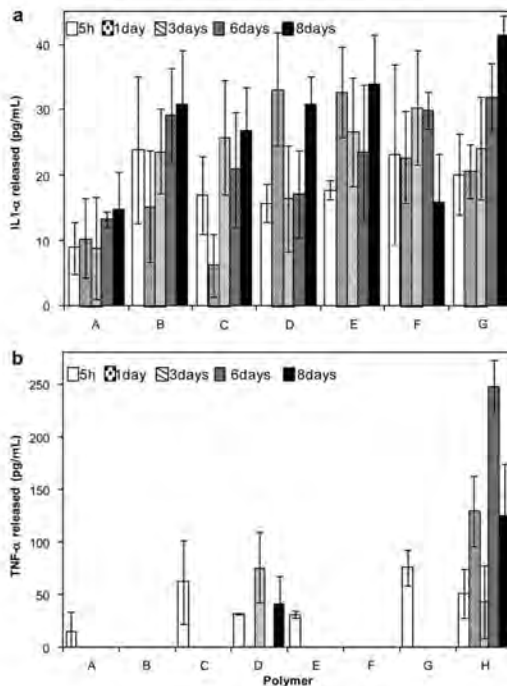


Fig. 9. IL-1 α (a) and TNF- α (b) released by RAW 264.7 macrophages after different times cultured over pristine PP (A), PP-g-NIPAAm, 27% grafting (B), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 10% grafting (C), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 14% grafting (D), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA), 25% grafting (E), PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA), 15% grafting (F), negative controls (G) and a positive control only for LPS in the TNF- α assay (H).

Table 2
Effect of percentage of dicalcium and ibuprofen loading on release rate at different times and pH 7.4

Film	Graft (%)	Loading (mg/cm ²)	Loading (mg g ⁻¹)	Drug release at pH 7.4 (%)			
				0.5 h	1 h	3 h	7 h
<i>Diclofenac</i>							
PP-g-NIPAAm	34	0.029 ± 0.001	0.36 ± 0.01	42	68	85	96
	27	0.010 ± 0.001	0.47 ± 0.05	52	83	100	—
PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA)	10	0.051 ± 0.001	9.04 ± 0.08	25	37	51	70
	19-dex	0.047 ± 0.001	8.31 ± 0.16	15	28	49	56
	14	0.053 ± 0.001	5.98 ± 0.02	18	32	59	67
	14-dex	0.050 ± 0.002	5.66 ± 0.17	12	22	45	53
	27	0.052 ± 0.017	3.17 ± 0.10	12	19	34	41
	29	0.061 ± 0.001	3.68 ± 0.01	10	16	32	40
PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA)	29-dex	0.052 ± 0.001	3.17 ± 0.04	8	13	28	35
	13	0.064 ± 0.001	7.94 ± 0.03	30	52	77	84
	13-dex	0.061 ± 0.001	7.51 ± 0.12	30	45	71	77
<i>Ibuprofen</i>							
PP-g-NIPAAm	27	0.080 ± 0.013	4.46 ± 0.27	40	75	100	—
PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA)	27	0.356 ± 0.016	20.16 ± 1.24	13	28	64	70

Graft percentage with legend “-dex” indicates films coated with CM-dextran.

Please cite this article in press as: Contreras-García A et al. Stimuli-responsive networks grafted onto polypropylene for the sustained delivery of NSAIDs. Acta Biomater (2010). doi:10.1016/j.actbio.2010.10.011

477 films. All films showed cell viability values >75% a 3 days. A decrease
478 was observed at 6 days for some grafted films (Fig. 7). The
479 live/dead assay using calcein/ethidium staining (Fig. 8) showed
480 PP-g-(NIPAAm-r-APMA) covered by live cells (green stained), while
481 only a small number of cells grew on pristine PP films. PP-g-(NIP-
482 AAm-r-APMA) had a significantly greater ratio of living to dead
483 cells.

484 To gain an insight into possible inflammatory reactions, secretion
485 of the cytokines IL-1 α and TNF- α was quantified. These primary
486 cytokines stimulate the release of other mediators and the ensuing
487 inflammatory cascade results in the recruitment of other cell types
488 and the formation of a peri-implant granuloma [49]. IL-1 α release
489 from cells adherent on pristine PP was lower than that from cells
490 on other films (Fig. 9a), which may be due to the minimal cell
491 proliferation observed on the surface, since the levels of cytokines
492 are positively correlated with cell density [50] (Fig. 8). It is known
493 that macrophages preferentially adhere to rough surfaces compared
494 with smooth ones (a phenomenon called rugophilia) and that the
495 release of cytokines increases when macrophages are attached to
496 rougher surfaces [51]. Nevertheless, the PP-g-NIPAAm and PP-g-
497 (NIPAAm-r-APMA) co-polymer films resulted in IL-1 α values
498 below or close to the basal levels of IL-1 α negative control
499 throughout the 8 days of assay.

500 The pristine PP, PP-g-NIPAAm and PP-g-(NIPAAm-r-APMA) films
501 did not induce the release of TNF- α , while macrophages on PP-g-
502 (NIPAAm-r-0.5APMA) films with different grafting percentages
503 secreted the cytokine at similar levels to those found for the
504 negative control (≈ 80 pg ml $^{-1}$) (Fig. 9b). The positive control
505 (macrophages treated with LPS) exhibited significantly greater TNF- α
506 values. In sum, grafting did not elicit an inflammatory response.

507 3.5. Drug loading and CM-dextran coating

508 The PP and PP-g-PNIPAAm films were unable to load significant
509 amounts of NSAIDs. In contrast, grafted APMA greatly promoted
510 drug uptake (Table 2). The amount of diclofenac loaded per unit
511 surface area increased as the grafting percentage of PP-g-(NIP-
512 AAm-r-0.5APMA) increased. However, the diclofenac/grafted poly-
513 mer weight ratio decreased as the grafting percentage rose. This
514 indicates that, although the total amount loaded is higher, fewer
515 APMAmers can interact with the drug as the grafted layer becomes
516 denser. Steric hindrance between adjacent APMAmers for diffusion
517 and binding of the drug may occur. A comparison between PP-g-
518 (NIPAAm-r-0.5APMA) with 14% grafting and PP-g-(NIPAAm-r-
519 APMA) with 13% grafting reveals that large amounts of diclofenac
520 can be loaded (from 0.053 to 0.064 mg cm $^{-2}$) when the relative
521 content of APMA is increased. A linear correlation ($r^2 = 0.992$) is
522 apparent between the amount of diclofenac loaded and the total
523 content of APMA units in the grafted co-polymer.

524 The amount of ibuprofen loaded was six times greater than that
525 of diclofenac, because a more concentrated (10-fold) ibuprofen
526 solution was used for loading. The ibuprofen loaded by PP-g-(NIP-
527 AAm-r-0.5APMA) with 27% grafting reached 0.356 mg cm $^{-2}$. Thus,
528 by changing the drug concentration in the loading medium it is
529 possible to modulate the amount loaded. Of more relevance, the
530 grafted films could be reloaded several times after drug release,
531 maintaining the initial loading ability and leading to reproducible
532 release profiles for at least three cycles, as shown below (Fig. 10).
533 It should also be noted that loading with diclofenac made the PP-
534 g-(NIPAAm-r-0.5APMA) films less thrombogenic (Fig. 6). This
535 can be explained by an inhibitory effect on the enzyme cyclo-ox-
536 ygenase [52] and the sequestration of Ca $^{2+}$ [53], although this last
537 effect should be minimal, due to the large calcium to diclofenac
538 molar ratio (>20).

539 Coating of the drug-loaded films with a dextran-based polysac-
540 charide was explored as a way to (i) endow the grafted films with a

541 biomimetic surface able to shield, to a certain extent, the foreign
542 body nature of the synthetic materials [54], but mainly to (ii) elu-
543 cidate whether the coating could alter the drug release profile. Coating
544 with CM-dextran was mainly driven by interaction between the CM-
545 dextran carboxylic acid group and the cationic groups of APMA in
546 the binary graft. The amount of CM-dextran deposited on the grafted
547 film increased with the degree of grafting and the relative content
548 in APMA in the grafted co-polymer (Fig. 11). It should be noted
549 that the deposition of CM-dextran on drug-loaded films resulted
550 in the release of a small proportion (<10%, i.e. 0.003–0.006 mg cm $^{-2}$)
551 of the previously loaded drug, which may be due to competition
552 between carboxylic groups of

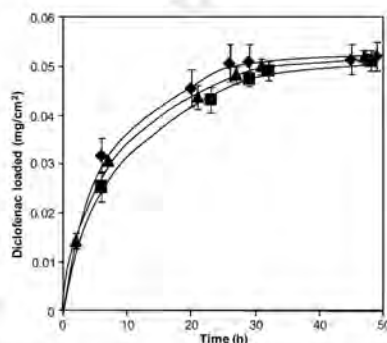


Fig. 10. Profiles of diclofenac loaded on the same PP-g-(NIPAAm-r-0.5APMA) film with 27% grafting the (●) first, (■) second, and (▲) third time.

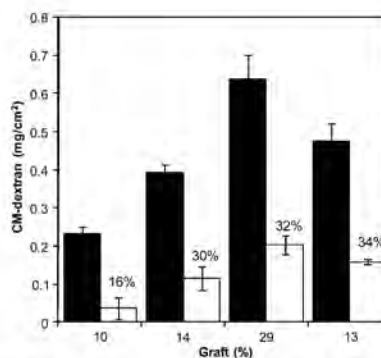


Fig. 11. CM-dextran-loaded (black column) from a 2 mg ml $^{-1}$ solution in pure water at 4 °C and the CM-dextran that remained after 24 h in drug release medium (white column). The PP-g-(NIPAAm-r-APMA) films with 10%, 14% and 29% grafting were synthesized from 1 M NIPAAm and 0.5 M APMA solution, while that with 13% grafting was synthesized from 1 M NIPAAm and 1 M APMA solution.

553 CM-dextran and those of NSAIDs for ionic interaction with APMA
554 groups.

555 3.6. Drug release

556 Drug-loaded PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) films with 29% grafting
557 sustained the release of both diclofenac and ibuprofen
558 (Fig. 12) when immersed in phosphate buffer, pH 7.4, at 37 °C.
559 The control of release can be attributed to the concomitant effects
560 of: (i) shrinkage of the grafted co-polymer at 37 °C, making drug
561 diffusion slow [55]; (ii) the strength of the ionic interactions between
562 the drug and the APMAmers [26]. Drug-loaded PP-g-NIPAAm
563 showed an important burst effect, releasing 40–50% in the
564 first 30 min, and then sustained release for a few hours (Table 2).
565 In contrast, PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) films with 27% grafting
566 delivered only 12–13% of drug dose after 30 min and 41% diclofenac
567 and 70% ibuprofen after 7 h. After 12 h in medium the release
568 process almost ceased, despite being under sink conditions (i.e. the
569 drug concentration in the release medium was less than one-hundredth
570 the drug solubility). An equilibrium state between drug
571 immobilized in the grafted co-polymer layer and drug dissolved

in the medium is established. This highlights the affinity of ibuprofen
and, particularly, diclofenac for the grafted co-polymer. Thus, if
the drug is not removed from the release medium (e.g. if it is not
absorbed when the medical device is inserted), release stops. The
release medium had to be replaced three times to achieve 100%
release.

The same PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) film with 27% grafting
was reloaded three times with diclofenac and ibuprofen with a
release session between each loading. The films loaded almost
the same amount of drug in every cycle (e.g. ~0.052 mg cm⁻² diclofenac)
(Fig. 10), which was then released at a similar rate (Fig. 12).
Thus, within minimal statistical error, the three complete load-re-
lease cycles were reproducible.

Diclofenac release profiles from PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA)
films prepared with various grafting percentages are shown in

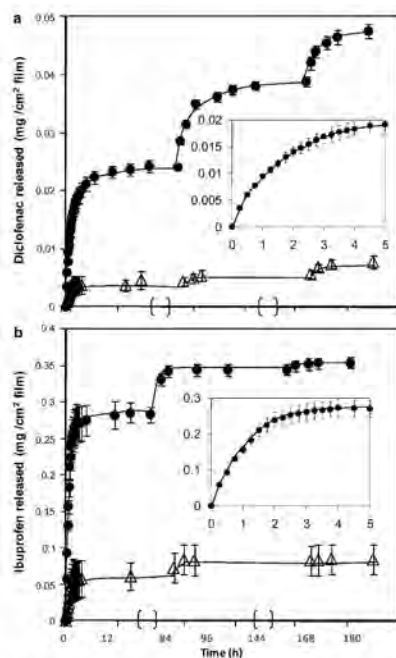


Fig. 12. Diclofenac (a) and ibuprofen (b) release profiles in phosphate buffer, pH 7.4 from PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) with 29% grafting (●) (the inset shows the first 5 h) and PP-g-NIPAAm with 27% grafting (▲).

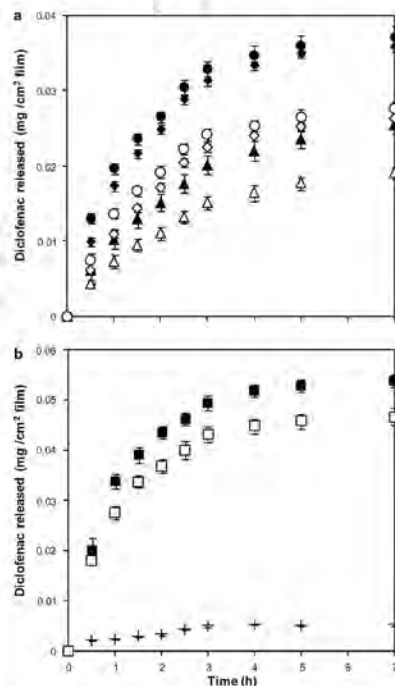


Fig. 13. Diclofenac release profiles in phosphate buffer, pH 7.4 from PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) (a) and PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) or PP-g-PNIPAAm (b) PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) with 10% grafting (●), CM-dextran-coated PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) with 10% grafting (○), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) with 14% grafting (▲), CM-dextran-coated PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) with 14% grafting (○), PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) with 29% grafting (▲), CM-dextran-coated PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) with 29% grafting (○), PP-g-NIPAAm with 14% grafting (★), PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) with 13% grafting (■), and CM-dextran-coated PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) with 13% grafting (□).

Please cite this article in press as: Contreras-García A et al. Stimuli-responsive networks grafted onto polypropylene for the sustained delivery of NSAIDs. Acta Biomater (2010), doi:10.1016/j.actbio.2010.10.001

Fig. 13. Regardless of the grafting percentage and CM-dextran coating, the films showed faster release during the first 3 h, followed by a more sustained period. Although all the hydrogels exhibited very similar release profiles, their release rates and extents were different. ANOVA tests on percentage diclofenac release at 3 h (Table 2) indicated statistically significant differences ($F_{10,11,0.05} = 718.52$, $\alpha < 0.001$). LSD tests revealed that all systems behaved differently, except PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) grafted with 27% and 29%. Therefore, the relative proportion and total content of APMAmers determine the drug release rate. The cumulative diclofenac release up to 7 h was 0.036 mg cm^{-2} for PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) with 10% grafting, 0.037 mg cm^{-2} for PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) with 14% grafting, and 0.025 mg cm^{-2} for PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) with 29% grafting. PP-g-(1NIPAAm-r-1APMA) with 13% grafting released 0.054 mg cm^{-2} in the first 7 h, while PP-g-NIPAAm with 14% grafting only released 0.005 mg cm^{-2} (Fig. 13). Since the therapeutic concentration of non-selective NSAIDs at the site of action is around 10^{-5} M [56], the amounts of diclofenac loaded and released seem to be sufficient to be effective in the area surrounding the device. A 1 cm^2 piece of material containing 0.050 mg of drug may be immersed in as much as 16.5 ml of fluid and still provide therapeutic concentrations. This volume is large compared with that in the implantation site of most medical devices.

With regard to the release rate, the higher the grafting percentage, the slower the delivery. The amounts released at 7 h from PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) with 10%, 14%, and 29% grafting were 70%, 67% and 40% of the total diclofenac loaded. This finding can be explained by the higher density of the polymer network as the grafting percentage increases, which should make drug diffusion more difficult. Coating with CM-dextran did not significantly modify diclofenac release from PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) films, although the cumulative amount released was less, owing to drug loss during the coating. The coated films lost between 65% and 80% of the polysaccharide after 7 h in the release medium; those PP-g-(1NIPAAm-r-0.5APMA) films with a higher grafting percentage were better able to retain the coating (Fig. 11).

4. Conclusion

PP was surface modified with NIPAAm and APMA by applying a pre-irradiation method that involves γ -ray irradiation of PP and subsequent immersion in an aqueous solution of the monomers. Varying the molar ratio of the monomers enables regulation of the relative content of each component in the grafted co-polymer, while the time for which the pre-irradiated PP was in the monomer solution was used to tune the total amount of grafted co-polymer. Compared with pristine PP or PP-g-PNIPAAm, the co-polymer endows PP with superior features for use in the human body (particularly regarding hemocompatibility and cytocompatibility) and for loading NSAIDs and regulating the drug release rate under physiological conditions. Therefore, the approach implemented to graft NIPAAm and APMA on PP may be suitable for developing combination products suitable for use as medical devices that can release drugs at a controlled rate.

Acknowledgements

This work was supported by DGAPA-UNAM Grant IN200208 (Mexico) and by MICINN (SAF2008-01679), FEDER and the Xunta de Galicia (PGIDIT07CSA002203PR) (Spain). The authors are grateful to J.C. Ruiz-Bucio and A. Rey-Rico for help with the XPS and the cytocompatibility studies, respectively, and CONACYT (Mexico) for financial support to the Ph.D. studies of A.C.-G. (Scholarship Registration No. 205069).

Appendix A. Figures with essential colour discrimination

Certain figure in this article, particularly Figure 8, is difficult to interpret in black and white. The full colour images can be found in the on-line version, at doi:10.1016/j.actbio.2010.10.001.

References

- [1] H. Ghoul, Y. et al. Chemical, biological and microbiological evaluation of cyclodextrin finished polyamide inguinal meshes. *Acta Biomater* 2008;4:1392–400.
- [2] Hupcey MAZ, Ekins S. Improving the drug selection and development process for combination devices. *Drug Discov Today* 2007;12:844–52.
- [3] Zilberman M, Elner J. Antibiotic-eluting medical devices for various applications. *J Control Release* 2008;130:202–15.
- [4] Anderson JM. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res* 2001;31:81–110.
- [5] Neuberger M, Bittner J, Blumenthal S, Brenbarth J, Borgeat A. Inflammation and infection complications of 2285 perineural catheters: a prospective study. *Acta Anaesth Scand* 2007;51:108–14.
- [6] Tang L, Eaton JW. Inflammatory responses to biomaterials. *Am J Clin Pathol* 1995;103:466–71.
- [7] Pavithra D, Deble M. Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants: issues and prevention. *Biomater* 2008;29:334–48.
- [8] Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 2008;20:86–100.
- [9] Brodbeck WG et al. Biomaterial adherent macrophage apoptosis is increased by hydrophobic and anionic substrates in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10287–91.
- [10] Gupta H, Anjum N. Plasma and radiation-induced graft modification of polymers for biomedical applications. *Adv Polym Sci* 2003;162:35–61.
- [11] Goddard JM, Hoichlass JH. Polymer surface modification for the anchoring of bioactive compounds. *Prog Polym Sci* 2007;32:698–725.
- [12] Le Thuaud F, Martel B, Crini G, Maschke C, Couvreur X, Munzel M. Grafting of cyclodextrin onto polypropylene nanosieve fabrics for the manufacture of reactive filters. I. Synthesis parameters. *J Appl Polym Sci* 2000;77:2118–25.
- [13] Acaogluhal A et al. An in vitro bacterial adhesion assessment of surface-modified medical grade PVC. *Colloid Surface B* 2010;77:246–56.
- [14] Cole MA, Veebker NH, Thissen H, Gieseler HJ. Stimuli-responsive interfaces and systems for the control of protein-surface and cell-surface interactions. *Biomaterials* 2009;30:1827–50.
- [15] Alvarez-Lorenzo C, Bucio E, Burillo G, Concheiro A. Medical devices at the surface by γ -ray grafting for drug loading and delivery. *Expert Opin Drug Del* 2009;7:1–13.
- [16] Singh H, Duggal PK. Radiation induced grafting of methacrylic acid onto silk for the immobilization of antimicrobial drug for sustained delivery. *Angew Makromol Chem* 1989;172:87–102.
- [17] Anjum N, Guirre SKH, Singh H, Gupta B. Development of antimicrobial polypropylene sutures by graft polymerization. I. Influence of grafting conditions and characterization. *J Appl Polym Sci* 2006;101:3895–901.
- [18] Gupta B, Jain R, Singh H. Preparation of antimicrobial sutures by preirradiation grafting onto polypropylene monofilament. *Polym Adv Technol* 2006;19:1698–703.
- [19] Nava-Ortiz CAB, Alvarez-Lorenzo C, Bucio E, Concheiro A, Burillo G. Cyclodextrin-functionalized polyethylene and polypropylene as biocompatible materials for diclofenac delivery. *Int J Pharm* 2009;382:183–91.
- [20] Nava-Ortiz CAB et al. Cyclodextrin-functionalized biomaterials loaded with miconazole prevent *Candida albicans* biofilm formation in vitro. *Acta Biomater* 2010;6:1308–404.
- [21] Ruiz JC. Polypropylene grafted with smart polymers (PNIPAAm/PAAc) for loading and controlled release of vancomycin. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;70:467–77.
- [22] Muñoz-Muñoz F, Ruiz JC, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Bucio E. Novel interpenetrating smart polymer networks grafted onto polypropylene by gamma radiation for loading and delivery of vancomycin. *Eur Polym J* 2009;45:1859–67.
- [23] Contreras-García A, Bucio E, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C. Polypropylene grafted with NIPAAm and APMA for creating hemocompatible surfaces that load poly(itaconic acid). *React Funct Polym* 2010;70:836–42.
- [24] Rzaev ZMO, Dincer S, Piskin E. Functional copolymers of N-isopropylacrylamide by bioengineering applications. *Prog Polym Sci* 2007;32:534–95.
- [25] Contreras-García A, Burillo G, Aliev R, Bucio E. Radiation grafting of N,N'-dimethylacrylamide and N-isopropylacrylamide onto polypropylene fibers by two-step method. *Radical Phys Chem* 2008;77:936–40.
- [26] Andrade-Vivero P, Fernández-Gabriel E, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A. Improving the loading and release of NSAIDs from pHEMA hydrogels by copolymerization with functionalized monomers. *J Pharm Sci* 2007;96:802–13.
- [27] Bamford C, H, Al-Lamee K G. Studies in polymer surface modification and grafting for biomedical uses: 2. Application to arterial blood filters and oxygenators. *Polymer* 1996;37:4885–9.
- [28] Váñez F, Chiarella L, Piletsky SA, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C. Computational modeling and molecular imprinting for the development of

ACTBIO 1502
20 October 2010

ARTICLE IN PRESS

No. of Pages 13, Model 5G

A. Contreras-García et al. / Acta Biomaterialia xxx (2010) xxx–xxx

13

728 acrylic polymers with high affinity for bile salts. *Anal. Chim. Acta* 2010;659:178–85.

729

730 [29] Saragai JP, Raya AR. Synthesis of blood compatible polyamide block copolymers. *Biomaterials* 2002;23:1139–45.

731

732 [30] Rodríguez R, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A. Interactions of ibuprofen with cationic polyacrylamides in aqueous dispersions and hydrogels: rheological and diffusional implications. *Eur J Pharm Sci* 2003;20:429–38.

733

734 [31] Contreras-García A, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Bucio E. PP films grafted with N-isopropylacrylamide and N-(3-aminopropyl) methacrylamide by γ radiation: synthesis and characterization. *Radiat Phys Chem* 2010;79:615–21.

735

736 [32] Yun-Xia S, Xiao-Zheng Z, Han C, Si-Xue C, Wei-Xi Z. A low-toxic and efficient gene vector: carboxymethyl dextran-graft-polyethyleneimine. *J Biomed Mater Res A* 2008;84:1102–10.

737

738 [33] Wagner CD, Riggs WM, Davis LE, Moulder JF. *Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy*. Eden Prairie, MN: Perkin-Elmer Corp.; 1990.

739

740 [34] Tanaka K, Satake N, Hikota M, Nakamura T, Kajiyama T, Takahara A. Surface depth analysis for fluorinated block copolymer films by X-ray photoelectron spectroscopy using C_{60} cluster ion beam. *Appl Surf Sci* 2008;254:5435–8.

741

742 [35] Yañez E, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C. Macromolecule release and smoothness of semi-impregnating PVP-PHEMA networks for comfortable soft contact lenses. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;69:1094–103.

743

744 [36] Gong JP, Kagata G, Otada Y. Friction of gels. 4. Friction on charged gels. *J Phys Chem B* 1999;103:6007–14.

745

746 [37] Imai Y, Mose Y. A new method for evaluation of acetylcholinesterase activity of materials. *J Biomed Mater Res* 1972;6:165–72.

747

748 [38] Tweedie D et al. A cellular model of inflammation for identifying TNF- α synthesis inhibitors. *J Neurosci Meth* 2009;183:182–7.

749

750 [39] Halliwell G, Sakajoh M, Dunn T. Microcolorimetric determination of soluble carbohydrates. *Enzyme Microb Tech* 1983;5:37–40.

751

752 [40] Iimain F, Takaka T, Kojikawa E. Volume transition in a gel driven by hydrogen-bonding. *Nature* 1991;349:400–1.

753

754 [41] Zhuravpeyev DE, Mun GA, Holé P, Khayrystany VV. Solvent effects on the formation of nanoparticles and multilayered coatings based on hydrogen-bonded interpolymer complexes of poly(acrylic acid) with homo- and copolymers of N-vinyl pyrrolidone. *Largomol* 2008;24:13742–7.

755

756 [42] Takashima K, Shimomura K, Kitou T, Terada H, Yoshitaka K, Ikesuchi K. Contact and friction between catheter and blood vessel. *Tribol Int* 2007;40:319–28.

757

758 [43] Gong J, Iwasaki Y, Otada Y. Friction of gels. 3. Friction on solid surfaces. *J Phys Chem B* 1999;103:6001–6.

759

760 [44] Fischera D, Lü Y, Ahlemeyer B, Knechtel J, Kiesel T. In vitro cytotoxicity testing of polyacrylates: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 2003;24:1123–31.

761

762 [45] Dey BK, Ray AK. Synthesis, characterization, and blood compatibility of polyamidoamines copolymers. *Biomaterials* 2003;24:2985–93.

763

764 [46] Li J, Xiao H, Li J, Zhong Y. Drug carrier systems based on water-soluble cationic β -cyclodextrin polymers. *Int J Pharm* 2004;278:329–42.

765

766 [47] Kozdemirhan K, Anderson JM, Cimemita Y, Marchant RE. Effect of albumin coating on the in vitro blood compatibility of Duran[®] arterial prostheses. *Biomaterials* 1989;10:147–55.

767

768 [48] Lin NJ, Bailey IO, Becker ML, Washburn NR, Henderson LA. Macrophage response to methacrylate conversion using a gradient approach. *Acta Biomater* 2007;3:163–73.

769

770 [49] Ingham E, Fisher J. The role of macrophages in osteolysis of total joint replacement. *Biomaterials* 2005;26:1271–86.

771

772 [50] Chenue SW, Shmyr-Forsch C, Wong A, Ozerens IG, Kunkel SL. Biologic and immunohistochemical analysis of macrophage markers: α -1,3-galactosyltransferase, tumor necrosis factor production during the peritoneal exudative response. *J Leukocyte Biol* 1989;46:329–37.

773

774 [51] Refai AK, Textor M, Brunette DM, Waterfield JD. Effect of titanium surface topography on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Biomed Mater Res A* 2004;70:184–205.

775

776 [52] White WB, Faich C, Rowe B, Malach RW. Cardiovascular thrombotic events in arthritis trials of the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib. *Am J Cardiol* 2003;92:411–8.

777

778 [53] Kenawi IM. Density functional theory assessment of the thermal degradation of diclofenac and its calcium and iron complexes. *J Mol Struct* 2005;754:61–70.

779

780 [54] Gupta AS et al. Glycoalkyl-mimetic dextran-modified poly(vinyl amine) surfactant coating reduces platelet adhesion on medical-grade polycarbonate surface. *Biomaterials* 2006;27:3084–95.

781

782 [55] Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A. Reversible adsorption by a pH-/temperature-sensitive acrylic hydrogel. *J Control Release* 2002;80:247–57.

783

784 [56] Chang JK, Wu SC, Wang CJ, Cho MH, Ho ML. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cell proliferation and death in cultured epiphyseal-articular chondrocytes of fetal rats. *Toxicology* 2006;228:111–23.

785

786

787

788

789

790

791

792

793

794

795

796

797

798

799

800

801

802

803

804

Please cite this article in press as: Contreras-García A et al. Stimuli-responsive networks grafted onto polypropylene for the sustained delivery of NSAIDs. *Acta Biomater* (2010). doi:10.1016/j.actbio.2010.10.001