



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS

**FUNCIONALIZACIÓN DE POLIURETANO TECOFLEX[®] CON
PNIPAAm Y PAAc, MEDIANTE RADIACIÓN GAMMA: APLICACIÓN
EN IMPLANTES ESTIMULO-SENSIBLES PARA LA LIBERACIÓN
LOCAL DE VANCOMICINA.**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA
M. C. FRANKLIN DAVID MUÑOZ MUÑOZ

TUTOR: Dr. EMILIO BUCIO CARRILLO
INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES

MEXICO D.F. DICIEMBRE DEL 2012



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.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. LARISSA ALEXANDROVA

Dr. JUAN MANUEL NAVARRETE

MIEMBROS DEL COMITÉ JURADO DE TESIS

Dra. FLORA ADRIANA GANEM RONDERO

Dra. LARISSA ALEXANDROVA

Dr. RAFAEL HERRERA NÁJERA

Dr. EPIFANIO CRUZ ZARAGOZA

Dr. CARLOS TOMAS QUIRINO BARREDA

Dedicado a:

A mi amada esposa, a mis adorados padres y mis queridos hermanos. Ellos son el tesoro más grande que poseo.

A la memoria de la Dra. Susana Castillo

AGRADECIMIENTOS

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por la beca otorgada durante mis estudios de Doctorado en el Programa de Doctorado y Maestría en Ciencias Químicas de la UNAM. Número de beca CONACyT: 226758. De la misma forma, quiero agradecer al **CONACyT** por la Beca Mixta otorgada para la realización de una estancia de investigación de dos meses en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela, en España.

A las entidades que financiaron el proyecto: **DGAPA, UNAM** proyecto IN202311; **CONACYT-CNPq** proyecto 174378; **MICINN y FEDER (SAF2008-01679)**; **Xunta de Galicia** (PGIDT07CSA002203PR, España); y la "Red iberoamericana de nuevos materiales para el diseño de sistemas avanzados de liberación de fármacos en enfermedades de alto impacto socioeconómico" (**RIMADEL**), CYTED 211RT0423.

A mi tutor, el **Dr. Emilio Bucio Carrillo**, por todo el apoyo incondicional brindado a lo largo de mis estudios de posgrado y la confianza otorgada para la realización de este trabajo.

A la **Dra. Guillermina Burillo** por su apoyo, su disposición para transmitir sus conocimientos y el impulso hacia el desarrollo de una formación profesional integral.

Al **Dr. Juan Carlos Ruiz** por sus valiosas ideas y su contribución en el planteamiento de este proyecto

A la **Dra. Carmen Álvarez Lorenzo** y el **Dr. Ángel Concheiro** de la **Universidad de Santiago de Compostela (USC)**, España, por sus valiosos aportes, la orientación recibida y su hospitalidad.

A la **Dra. Ana Rey Rico** de la **USC**, por su colaboración en el desarrollo experimental de los estudios realizados en la estancia de investigación.

A la tecnóloga **Raquel Antón Segurado** de la **USC**, por su colaboración en los estudios de Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM) y Energía de Dispersión de Rayos X (EDX).

Al **Fis. Francisco García** y al **M. en C. Benjamín Leal** por toda su colaboración en los procesos de irradiación de las muestras.

Al **Sr. Martin Cruz Villafane** por su colaboración y soporte técnico en todos los recursos sistemáticos empleados.

Al **Instituto de Ciencias Nucleares (ICN)** y al **Posgrado en Ciencias Química de la UNAM** por toda la contribución a mi formación académica y por el apoyo económico brindado en la presentación de este trabajo en un congreso internacional.

A los integrantes del comité tutor: **Dra. Larissa Alexandrova** y **Dr. Juan Manuel Navarrette**, por el seguimiento al trabajo realizado.

A los integrantes del comité de evaluación: **Dra. Flora Adriana Ganem Rondero**, **Dr. Rafael Herrera Nájera**, **Dr. Epifanio Cruz Zaragoza** y **Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda** por su disposición para la revisión de la tesis doctoral y por sus consejos.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPIRITU”

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, México; y en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia de la Universidad Santiago de Compostela, España.

Este trabajo se presentó en los siguientes congresos:

Internacionales:

Redes Poliméricas Interpenetrantes Sensibles a la Temperatura y pH Injertadas en Poliuretano por medio de Radiación Gamma: Nuevos Sistemas Biomédicos Implantables para la Liberación de Fármacos. **Franklin Muñoz-Muñoz**, Juan Carlos Ruiz, Carmen Álvarez-Lorenzo, Ángel Concheiro, Emilio Bucio. VI Congreso Internacional de Materiales - CIM 2011. Bogotá – Colombia. 27 – 30 de noviembre. 2011.

Gamma-ray grafting of IPNs of NIPAAm and AAc onto PP films for biomedical applications. **F. Muñoz-Muñoz**, J. C. Ruiz, C. Álvarez-Lorenzo, A. Concheiro, E. Bucio. 239th ACS National Meeting. San Francisco, California. 21 – 25 de marzo. 2010

Nacionales:

Funcionalización de polipropileno y poliuretano por medio de radiación gamma: aplicaciones en sistemas biomédicos implantables. **Franklin Muñoz-Muñoz**, Juan Carlos Ruiz, Carmen Álvarez-Lorenzo, Ángel Concheiro, Emilio Bucio. XXI Congreso Técnico Científico ININ-SUTIN. Toluca – Estado de México. México. 6 – 9 de diciembre 2011.

Carga y liberación de vancomicina en redes poliméricas interpenetrantes sintetizadas por radiación gamma. **Franklin Muñoz-Muñoz**, Juan Carlos Ruiz, Carmen Álvarez-Lorenzo, Ángel Concheiro, Emilio Bucio, 2do. Congreso Nacional de Membranas: Ciencia, Tecnología y Aplicaciones. México D.F. 27 y 28 de junio 2011.

Carga y liberación de vancomicina en redes poliméricas interpenetradas sintetizadas con radiación gamma, para su aplicación en dispositivos implantables. **Franklin Muñoz-Muñoz**, Juan Carlos Ruiz, Carmen Álvarez-Lorenzo, Ángel Concheiro, Emilio Bucio, 1er Congreso de alumnos de posgrado de la UNAM. México D.F. 18 - 20 de mayo 2011.

Eventos organizados por el Posgrado de Ciencias Químicas:

Temperatura and pH sensitive interpenetrating polymer networks grafted on polypropylene and polyurethane by gamma radiation: novel implantable biomedical devices. **Franklin Muñoz-Muñoz**, Emilio Bucio Carrillo, Juan Carlos Ruiz, Carmen Álvarez-Lorenzo, Angel Concheiro. QuimiUNAM 2011. México D.F. UNAM. 16 de noviembre de 2011.

Gamma-ray grafting of IPN of NIPAAm and AAc onto polyurethane Tecoflex[®] for biomedical applications. **Franklin D. Muñoz-Muñoz**, Emilio Bucio Carrillo. QuimiUNAM 2012. México D.F. UNAM. 15 de noviembre de 2012.

Cursos:

Síntesis y caracterización de redes interpenetradas (IPN) para la liberación controlada de fármacos. (2 horas). En el curso: Diseño de productos farmacéuticos a base de biomateriales

y sus aplicaciones terapéuticas. Organizado por Posgrado en Ciencias Químicas. En Instituto de Ciencias Nucleares. México D.F. UNAM. 24 agosto de 2012.

Los resultados de esta tesis se enviaron y se publicaron en:

Temperature- and pH-sensitive interpenetrating polymer networks grafted on PP: Cross-linking irradiation dose as a critical variable for the performance as vancomycin-eluting systems. **Franklin Muñoz-Muñoz**, Juan-Carlos Ruiz, Carmen Álvarez-Lorenzo, Ángel Concheiro, Emilio Bucio. Radiat Phys Chem. 81: 531-40. (2012).

Surface modification and functionalization of polymer materials by γ - irradiation for biomedical applications. **Franklin Muñoz-Muñoz**, Emilio Bucio. Taylor and Francis group. USA. En: Radiation Synthesis of Materials and Compounds. Chapter 10, pp. 265-301. Aceptado desde 2011. Año de publicación: 2013.

Radiación gamma para el diseño de sistemas inteligentes en liberación controlada de fármacos e ingeniería de tejidos. Ángel Contreras-García, **Franklin D. Muñoz-Muñoz**, Guillermina Burillo, Emilio Bucio. Biomateriales Aplicados al Diseño de Sistemas Terapéuticos Avanzados. Capitulo que se publicará en Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) para el año 2013.

Smart polymers for biomedical applications and graft synthesis by γ -rays Emilio Bucio, Ángel Contreras-García, H. Iván Meléndez-Ortiz, **Franklin D. Muñoz-Muñoz**, Carmen Álvarez-Lorenzo, Ángel Concheiro. NOVA Science Publishers, Inc. New York, USA. Smart Polymeric Materials for Biomedical Applications. Chapter 15, pp. 277-306. ISBN 978-1-60876-192-0 (2010). USA.

Modificación superficial de poliuretano con polímeros sensibles a estímulos biocompatibles para carga y cesión de fármacos. Patente. Inventores: **Muñoz-Muñoz Franklin**, Bucio Carrillo Emilio, Álvarez Lorenzo Carmen, Concheiro Nine Ángel. Entidades: Universidad Santiago de Compostela (USC), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Estado a 30 de noviembre de 2012: enviado para primera revisión en oficina de patente española y trámite para acuerdo legal entre las entidades participantes (USC-UNAM).

RESUMEN

En este proyecto se realizó el diseño y síntesis, aplicando radiación gamma (γ) en todas las etapas de preparación, de diferentes sistemas de redes poliméricas interpenetrantes (IPNs) y semi-interpenetrantes (s-IPNs) con capacidad de respuesta a estímulos externos (temperatura y pH), con el propósito de obtener materiales biocompatibles aptos para su aplicación como sistemas de liberación local y controlada de vancomicina, para lograr a su vez, ofrecer una herramienta eficiente y eficaz en la prevención de infecciones frecuentemente asociadas con el uso de dispositivos biomédicos implantables. Los sistemas propuestos partieron de la funcionalización de matrices poliméricas de poliuretano Tecoflex[®] (TFX) y polipropileno (PP), usando componentes termo y pH sensibles como poli(N-isopropilacrilamida), PNIPAAm, y poli(ácido acrílico), PAAc, respectivamente. Para ello, PNIPAAm fue primero injertado (unido covalentemente) sobre la superficie de los sustratos poliméricos (en TFX y PP) por medio del método de preirradiación oxidativa (método P), y sobre la masa de la matriz de TFX por medio del método de irradiación directa (método D). A partir de estos materiales se diseñaron estrategias para la formación de redes de PNIPAAm que permitieran la interpenetración de redes de PAAc en su interior, bajo condiciones de reacción específicas. Al final, 4 sistemas de IPNs (*net*-TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc con PNIPAAm injertado por método P; *net*-TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc con PNIPAAm injertado por método D; TFX-*g*-*net*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc con PNIPAAm injertado y reticulado simultáneamente en un paso de síntesis; y *net*-PP-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc) y 2 de s-IPNs (TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc con PNIPAAm injertado por método P; y TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc con PNIPAAm injertado por método D), conteniendo a su vez

diferentes niveles (%) de PNIPAAm, fueron sintetizados, caracterizados por medio de diferentes técnicas (FTIR-ATR, DSC, TGA, ESEM, EDX, estudios de hinchamiento, ángulo de contacto) y evaluados en su capacidad de carga-liberación del antibiótico vancomicina y efectividad contra la inhibición de crecimiento bacteriano (ensayo microbiológico). Además, los materiales modificados a partir de matrices de TFX fueron evaluados en sus propiedades de biocompatibilidad y citotoxicidad (hemólisis, adsorción de proteínas, trombogenicidad, viabilidad celular, producción de citoquinas y NO), encontrándose resultados satisfactorios que potencian su aplicación como dispositivos biomédicos.

ABSTRACT

Gamma radiation (γ) was used in every step of the synthesis of temperature- and pH-sensitive interpenetrating polymer networks (IPNs) and semi-interpenetrating polymer networks (s-IPNs), in order to obtain biocompatible materials suitable for application as local vancomycin delivery systems and to reduce the likelihood of infections associated with their clinical use such as implantable devices. Therefore, Tecoflex[®] (TFX) and polypropylene (PP) substrates were grafted onto their surface with N-isopropylacrylamide (NIPAAm) by pre-irradiation method (method P) or in the bulk of TFX by direct method (method D). The grafted materials were used to form the first PNIPAAm network and thus facilitate the AAc inclusion and subsequent polymerization/cross-linking inside of it (interpenetration), under specific reaction conditions. Finally, four IPNs (*net*-TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc with PNIPAAm grafted by method P; *net*-TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc with PNIPAAm grafted by method D; TFX-*g-net*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc with PNIPAAm grafted and cross-linked simultaneously in one step synthesis; and *net*-PP-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc) and two s-IPNs systems (TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc with PNIPAAm grafted by method P; and TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc with PNIPAAm grafted by method D) were synthesized and characterized regarding the amount of grafted polymers and their composition (FTIR-ATR, ESEM, EDX), thermal behavior (DSC and TGA), temperature- and pH-responsive (swelling and contact angle) and loading and release of vancomycin (an antibiotic) for preventing in vitro growth of *Staphylococcus aureus*. The antibacterial activity was measured by antimicrobial susceptibility testing and the properties of biocompatibility and cytotoxicity (hemolysis, protein adsorption, thrombogenicity, cell viability, production of cytokines and NO) were also evaluated. The results indicated that the modification of TFX by γ -radiation increases their potential for biomedical applications.

INDICE GENERAL

	Pág
1. Introducción	1
2. Objetivos	4
2.1. Objetivo general	4
2.2. Objetivos particulares	4
3. Generalidades y antecedentes	7
3.1. Polímeros en aplicaciones biomédicas (morfología, estructura y función)	7
3.1.1. Polímeros con respuesta a estímulos externos	8
3.1.1.1. Polímeros termosensibles	11
3.1.1.2. Polímeros pH sensibles	13
3.1.1.3. Hidrogeles	14
3.1.1.4. Redes poliméricas interpenetrantes	17
3.1.1.4.1. IPNs (Reseña histórica)	21
3.1.2. Copolímeros de injerto	22
3.1.2.1. Métodos de injerto inducidos por radiación	24
3.1.2.1.1. Método directo	24
3.1.2.1.2. Irradiación directa en presencia de vapor	26
3.1.2.1.3. Preirradiación oxidativa	26
3.1.2.1.4. Método de preirradiación	28
3.1.2.2. Copolímeros de injerto por uno y dos pasos	29
3.1.3. Matrices poliméricas	29
3.1.3.1. Poliuretano Tecoflex® (TFX)	29
3.1.3.2. Polipropileno (PP)	33
3.1.3.2.1. IPNs de PNIPAAm/PAAc injertadas sobre PP	35
3.2. Radiación gamma (conceptos generales)	37
3.2.1. Unidades de radiación	39
3.2.2. Factores que inciden en los procesos de injerto por radiación	40
3.3. Biomateriales	41
3.3.1. Biocompatibilidad y respuesta inflamatoria	41
3.3.2. Infecciones relacionadas con dispositivos biomédicos	42
4. Parte experimental	45

4.1. Funcionalización de matrices de poliuretano Tecoflex [®] (TFX)	45
4.1.1. Materiales	45
4.1.2. Fuente de irradiación	46
4.1.3. Injerto de PNIPAAm sobre TFXc y TFXp (TFX-g-PNIPAAm)	46
4.1.3.1. Método de preirradiación oxidativa (-P)	46
4.1.3.2. Método directo (-D)	47
4.1.4. Entrecruzamiento de las cadenas de PNIPAAm injertadas en TFXc y TFXp (<i>net</i> -TFX-g-PNIPAAm)	47
4.1.5. Injerto de redes de PNIPAAm (<i>net</i> -PNIPAAm) sobre TFXc (TFXc- <i>g-net</i> -PNIPAAm) por medio de un método de un solo paso	47
4.1.6. Polimerización y entrecruzamiento de AAC en el interior de TFXc (TFXc- <i>inter-net</i> -PAAc)	48
4.1.6.1. Método directo (A)	48
4.1.6.2. Método directo (B)	48
4.1.6.3. Método de preirradiación oxidativa (C)	48
4.1.6.4. Método de preirradiación (D ₂)	49
4.1.7. Síntesis de IPNs y s-IPNs	49
4.1.8. FTIR de los materiales sintetizados	49
4.1.9. Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) y espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDX)	49
4.1.10. Análisis térmico	50
4.1.11. Estudios de hinchamiento	50
4.1.12. Carga de vancomicina	51
4.1.13. Ensayo microbiológico	51
4.1.14. Estudios de liberación de vancomicina	52
4.1.15. Adsorción de proteínas	52
4.1.16. Prueba de hemólisis	53
4.1.17. Prueba de trombogenicidad	53
4.1.18. Citocompatibilidad	54
4.1.18.1. Determinación de la viabilidad celular	54
4.1.18.2. Determinación de óxido nítrico (NO)	55
4.1.18.3. Cuantificación de producción de TNF- α	55

4.2. Síntesis de IPNs de PNIPAAm/PAAc sobre polipropileno (PP) por radiación γ : influencia de la dosis sobre el entrecruzamiento de cadenas de PNIPAAm (trabajo adicional)	55
4.2.1. Materiales	55
4.2.2. Injerto de PNIPAAm sobre PP (PP- <i>g</i> -PNIPAAm)	55
4.2.3. Entrecruzamiento de cadenas de PNIPAAm injertadas sobre PP (<i>net</i> -PP- <i>g</i> -PNIPAAm)	56
4.2.3.1. Método A	56
4.2.3.2. Método B	56
4.2.4. Síntesis de hidrogeles de PAAc	56
4.2.5. Síntesis de redes interpenetradas de AAc en <i>net</i> -PP- <i>g</i> -PNIPAAm	56
4.2.6. Estudios de hinchamiento	56
4.2.7. Ángulo de contacto	57
4.2.8. Análisis térmico	57
4.2.9. Carga de vancomicina	57
4.2.10. Liberación de vancomicina	57
4.2.11. Análisis estadístico	58
5. Análisis de resultados	59
5.1. Funcionalización de matrices de poliuretano Tecoflex [®] (TFX)	59
5.1.1. Preparación de injerto de PNIPAAm sobre TFX (TFX- <i>g</i> -PNIPAAm)	59
5.1.1.1. Método de preirradiación oxidativa (P)	59
5.1.1.2. Método directo (D)	65
5.1.2. Entrecruzamiento de las cadenas de PNIPAAm injertadas sobre TFXc y TFXf (<i>net</i> -TFX- <i>g</i> -PNIPAAm)	68
5.1.3. Injerto de redes de PNIPAAm (<i>net</i> -PNIPAAm) sobre TFXc (TFXc- <i>g</i> - <i>net</i> -PNIPAAm), en un solo paso de síntesis	69
5.1.4. Polimerización y entrecruzamiento de AAc interpenetrado en TFXc	75
5.1.5. Polimerización y entrecruzamiento de AAc interpenetrado en los materiales TFX- <i>g</i> -PNIPAAm, <i>net</i> -TFX- <i>g</i> -PNIPAAm y TFXc- <i>g</i> - <i>net</i> -PNIPAAm	77
5.1.6. Espectroscopía de infrarrojo	79
5.1.7. Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) y espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDX)	82
5.1.8. Análisis térmico (DSC y TGA)	87

5.1.9. Estudios de hinchamiento	92
5.1.9.1. Sensibilidad a la temperatura y pH	95
5.1.10. Carga de vancomicina y ensayo microbiológico	99
5.1.10.1. Carga de vancomicina	99
5.1.10.2. Ensayo microbiológico	102
5.1.11. Liberación de vancomicina	103
5.1.12. Adsorción de proteínas	104
5.1.13. Hemólisis	107
5.1.14. Trombogenicidad	108
5.1.15. Citocompatibilidad	109
5.2. Síntesis de IPNs de PNIPAAm/PAAc sobre polipropileno (PP) por radiación γ : influencia de la dosis sobre el entrecruzamiento de cadenas de PNIPAAm (trabajo adicional)	114
5.2.1. Preparación de PP- <i>g</i> -PNIPAAm y <i>net</i> -PP- <i>g</i> -PNIPAAm (Síntesis, caracterización y propiedades)	115
5.2.2. Preparación de hidrogeles de PAAc y de <i>net</i> -PP- <i>g</i> -PNIPAAm- <i>inter</i> - <i>net</i> -PAAc	119
5.2.2.1. Respuesta a estímulos	122
5.2.3. Carga de vancomicina	122
5.2.4. Liberación de vancomicina	126
Conclusiones	130
Referencias	132
Anexos (artículos publicados)	151

Capítulo 1.

INTRODUCCIÓN

Los materiales poliméricos han generado un considerable interés por su versatilidad y su amplio rango de aplicaciones innovadoras en el campo de los biomateriales. Actualmente existe una gran necesidad por el desarrollo y diseño de polímeros que asocien una mejor interacción con biosistemas que necesitan de una alta compatibilidad con sangre y tejidos, tales como implantes o materiales suplementarios (injertos vasculares, corazones artificiales, suturas, lentes intraoculares y catéteres, entre otros). Esta clase de sistemas precisa el ajuste de ciertos criterios para lograr alcanzar altos rendimientos al ser usados en campos médicos específicos, en procedimientos quirúrgicos y aplicaciones farmacéuticas. Tales criterios están relacionados con el comportamiento mecánico del material, su compatibilidad, hidrofiliidad y las respuestas inmunes y biológicas que puede activar al interaccionar con tejidos vivos (*Gupta y Anjum 2003*). Por otro lado, el uso de implantes y dispositivos médicos también está directamente asociado a la generación de enfermedades provocadas por la proliferación de infecciones a nivel del torrente sanguíneo, cuyos niveles de morbilidad y mortalidad son significativamente altos (*Schierholz y Beuth 2001; Castner y Ratner 2002; Raad y Hanna 2002; Raad et al. 2007*). No obstante, en la mayoría de casos, un material polimérico, en contacto con sangre, también puede experimentar adhesión celular, lo cual subsecuentemente podría conducir a una trombogénesis. Simultáneamente, para polímeros usados como implantes, los tejidos pueden provocar reacciones adversas en forma de inflamación (*Gupta y Anjum 2003*).

En los últimos años, la funcionalización de superficies poliméricas ha sido mostrada como una herramienta útil para prevenir la formación de biopelículas sobre los dispositivos médicos, los cuales, por sí solos, son propensos a ser colonizados por bacterias oportunistas en el momento de su inserción; mientras que la incorporación de agentes antimicrobianos, antiinflamatorios e inmunosupresores sobre la superficie del dispositivo ha sido también una alternativa efectiva para tratamientos profilácticos contra las infecciones y también para la prevención de respuestas inflamatorias e inmunes, evitando así, los efectos colaterales que genera la administración sistémica de altas dosis de medicamentos (*Cosson et al. 2003; Freytag et al. 2003; Schneider et al. 2003; Piozzi et al. 2004; Anjum et al. 2006; Cevher et al. 2006; Raad et al. 2008; Alvarez-Lorenzo et al. 2010; Kowalczyk et al. 2010*). Es así que por medio de diferentes métodos físicos y químicos, los polímeros pueden ser específicamente modificados sobre su superficie o su masa, empleando otros polímeros que contienen ciertos grupos funcionales, tales como amidas, aminas, ácidos carboxílicos o epóxidos (*Friedrich et al. 2004; Siow et al. 2006; Wang et al. 2006; Schmidt y Schmidit-Naake 2007; Truica-Marasescu et al. 2007*). Entre estos materiales, aquellos modificados con polímeros "estímulo sensibles" -aquellos que exhiben un cambio físico o químico relativamente abrupto y extenso en respuesta a un pequeño estímulo- han encontrado interesantes aplicaciones en la liberación controlada de fármacos (*Burillo et al. 2007b; Kumar et al. 2007; Melendez-Ortiz y Bucio 2008; Ruiz et al. 2008*).

La radiación de alta energía, tal como la radiación gamma (γ) y los electrones acelerados, tiene la capacidad de activar cadenas poliméricas, de tal forma que monómeros específicos pueden ser injertados sobre ellas. Los grados de modificación (como los porcentajes de injerto) pueden ser controlados fácilmente por la variación cuidadosa de la exposición del material a la radiación, y por las condiciones de reacción asociadas al proceso. No obstante, las reacciones de injerto producidas por radiación γ son de especial interés por no requerir la participación de iniciadores o precursores químicos (mayor pureza) y por su aplicabilidad a casi todas las combinaciones polímero-monómero, con la enorme posibilidad de generar diferentes características fisicoquímicas en el material de partida (*Clough 2001*). Entre las ventajas de la radiación γ , comparada con los efectos producidos por los electrones acelerados, se resalta su alta penetrabilidad sobre el polímero a modificar (*Gupta et al. 2004*).

Los copolímeros de injerto sobre matrices poliméricas de uso convencional generalmente presentan mejores propiedades mecánicas que otros sistemas como hidrogeles, hidrogeles injertados tipo peine, o hidrogeles con redes interpenetradas (*Kaetsu 1995*). Sumado a estas ventajas, los copolímeros de injerto con segmentos estímulo sensibles pueden experimentar rápidamente cambios en su espesor, grados de humectabilidad o carga a nivel de superficie, en respuesta a pequeños estímulos como son cambios en la temperatura, pH o concentraciones específicas de iones en la disolución en que son depositados dichos

materiales. Estas propiedades pueden ser aprovechadas para el uso de estos materiales en aplicaciones biomédicas como sistemas poliméricos implantables con capacidad de absorber grandes cantidades de fármacos, para posteriormente lograr liberar su contenido de forma controlada y dirigida a sitios específicos del organismo. Cabe resaltar que los copolímeros de injerto sobre sustratos poliméricos inertes permiten también la inclusión de redes interpenetrantes constituidas por otro tipo de polímero, sin afectar drásticamente las propiedades mecánicas del material de partida, lo cual permite el diseño y la síntesis de materiales con respuesta dual o múltiple ante las diferentes variables del medio que los rodea, como temperatura, pH, campo eléctrico, campo magnético, concentración de iones, etc.

En este trabajo se presentan diferentes estrategias para la síntesis de copolímeros de injerto de N-isopropilacrilamida (NIPAAm) sobre una matriz polimérica de poliuretano Tecoflex® (TFX), la cual se encontró disponible comercialmente en forma de catéter (tubos) y películas. Sobre estos materiales se realizó, en una siguiente etapa, la síntesis de redes poliméricas interpenetradas de ácido acrílico (AAc), confiriendo así, sensibilidad a la temperatura y al pH en el material final. Todas las etapas implícitas en la funcionalización de TFX fueron llevadas a cabo empleando radiación γ . Los materiales sintetizados presentaron una alta capacidad para absorber y liberar "*in vitro*" vancomicina, bajo condiciones específicas de pH y temperatura y, por consiguiente, presentaron una alta eficiencia en la erradicación e inhibición del crecimiento bacteriano de *Estafilococo aureus* (*S. aureus*). Además, los materiales seleccionados pasaron con éxito las pruebas de hemólisis, adsorción de proteínas y formación de trombos, exhibieron una alta biocompatibilidad y mostraron una baja toxicidad; lo que los convierte en potenciales candidatos para ser aplicados como implantes con sensibilidad al pH y temperatura, capaces de prevenir el desarrollo de infecciones en el momento de su inserción, las cuales son difícilmente controladas cuando los dispositivos usados en la mayoría de prácticas médicas o quirúrgicas han sido sintetizados con polímeros convencionales. También se presenta la realización de un trabajo adicional sobre la determinación de dosis óptima para la reticulación de redes de PNIPAAm injertadas sobre una matriz hidrofóbica (en forma de películas) constituida de polipropileno (PP). Los parámetros encontrados en este trabajo fueron aplicados para la reticulación de cadenas de PNIPAAm injertadas en TFX.

Capítulo 2.

OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar, por medio de radiación gamma (γ), redes poliméricas interpenetrantes (IPNs) con sensibilidad a la temperatura y al pH, que presenten una alta biocompatibilidad, para su aplicación como sistemas implantables de liberación local de vancomina, con la capacidad de prevenir infecciones provocadas por la colonización bacteriana de dispositivos biomédicos.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

Encontrar las condiciones óptimas para la modificación de películas y catéteres de poliuretano Tecoflex[®] (TFX), usando el método de preirradiación oxidativa para injertar *N-isopropilacrilamida* (NIPAAm) sobre la superficie del polímero; evaluando la dependencia del porcentaje de injerto con respecto a la dosis de irradiación, la concentración, la temperatura y el tiempo de reacción.

Determinar las condiciones óptimas para llevar a cabo el injerto de PNIPAAm sobre la masa de TFX (en películas y catéteres), evaluando la dependencia del porcentaje de injerto con respecto a la dosis, la intensidad de irradiación y la concentración.

Realizar el entrecruzamiento de las cadenas de PNIPAAm previamente injertadas sobre algunos de los polímeros sintetizados con los métodos mencionados anteriormente, usando condiciones de reacción determinadas en una investigación adicional reportada en esta tesis doctoral (método de irradiación directa en medios acuosos a dosis de irradiación fijas de 10 kGy).

Encontrar las condiciones adecuadas para llevar a cabo el injerto de redes de PNIPAAm sobre la superficie de catéteres de TFX, en un solo paso, utilizando el método de preirradiación oxidativa y evaluando la dependencia de las cantidades de injerto obtenidas con respecto a la dosis de irradiación, concentración de NIPAAm y agente entrecruzante *N,N'*-metilenbiacrilamida (MBAAm), temperatura y tiempo de reacción.

Determinar las condiciones adecuadas para sintetizar redes de *poli(ácido acrílico)* (PAAc) en el interior de los sistemas injertados (para formar redes semi-interpenetrantes, s-IPNs) y en los reticulados con PNIPAAm (para formar IPNs), por medio de la evaluación de los diferentes métodos de irradiación disponibles, con el propósito de evitar una alta proporción de uniones covalentes entre el PAAc y la matriz polimérica de TFX.

Caracterizar todos los polímeros obtenidos, para confirmar los grados y formas de modificación realizados, y estudiar las propiedades térmicas por calorimetría de barrido diferencial (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA), su morfología en corte transversal por microscopía electrónica de barrido (SEM), sus propiedades de hinchamiento y su capacidad para responder a cambios de temperatura (LCST, temperatura crítica inferior de disolución) y pH (pH crítico).

Evaluar la capacidad de las IPNs y s-IPNs para cargar y liberar vancomicina de forma controlada. Determinar el estado del fármaco cargado por medio de DSC, evaluar la capacidad de los materiales para inhibir el crecimiento bacteriano mediante ensayos microbiológicos *in vitro* y estudiar la influencia del estado de los polímeros (secos o hinchados) sobre los niveles alcanzados de carga y liberación del fármaco.

Determinar la biocompatibilidad de las IPNs y s-IPNs sintetizadas mediante pruebas de adsorción de proteínas, hemocompatibilidad y citocompatibilidad *in vitro*, y ensayos de expresión de citoquinas pro-inflamatorias y producción de óxido nítrico (NO).

En un trabajo adicional, empleando la síntesis de IPNs con PNIPAAm/PAAc sobre matrices poliméricas de polipropileno (PP), se pretende encontrar las condiciones adecuadas para entrecruzar cadenas de PNIPAAm injertadas sobre la superficie de películas hidrofóbicas, evaluando la dependencia de las dosis de irradiación empleadas y la adición de MBAAm, con respecto a las capacidades de hinchamiento de los materiales, su respuesta a los cambios de temperatura (LCST) y pH (pH crítico), las cantidades de PAAc interpenetrado, los niveles de carga de vancomicina y su velocidad de liberación. Las condiciones de reacción, encontradas como óptimas para este estudio, serán aplicadas para el entrecruzamiento de cadenas de PNIPAAm sobre matrices de poliuretano TFX.

Capítulo 3.

GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

3.1 POLÍMEROS EN APLICACIONES BIOMÉDICAS (MORFOLOGÍA, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN)

En el mundo de los polímeros y copolímeros puede presentar un extenso número de morfologías. Los polímeros pueden ser constituidos por cadenas lineales, ramificadas, tipo peine, en forma de estrella, micelas, macrocíclicos o estructuras reticuladas. Para el caso de los copolímeros, el orden puede ser aleatorio, alternado, en bloque o en forma de injertos, tal como ilustra la Figura 3.1. El orden de la unidad repetitiva en los copolímeros y la morfología del polímero infieren en sus diferentes propiedades.

Los polímeros clásicos como el polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS) y una amplia gama de poliuretanos, entre otros, han sido ampliamente utilizados en el campo de la medicina como componentes de dispositivos biomédicos. Sin embargo, con el desarrollo de nuevas técnicas para funcionalización o modificación, el diseño y producción de materiales más sofisticados para su uso como implantes o dosificadores de fármacos ha sido creciente en los últimos años. Entre dichas técnicas, la modificación estimulada por radiación gamma (γ) para el desarrollo de nuevos materiales y aplicaciones, se ha convertido en una alternativa efectiva para reintegrar algunos polímeros cuyo uso actualmente se ha estado limitando debido a los problemas asociados a su baja biocompatibilidad, alta toxicidad o la vulnerabilidad ante la colonización bacteriana.

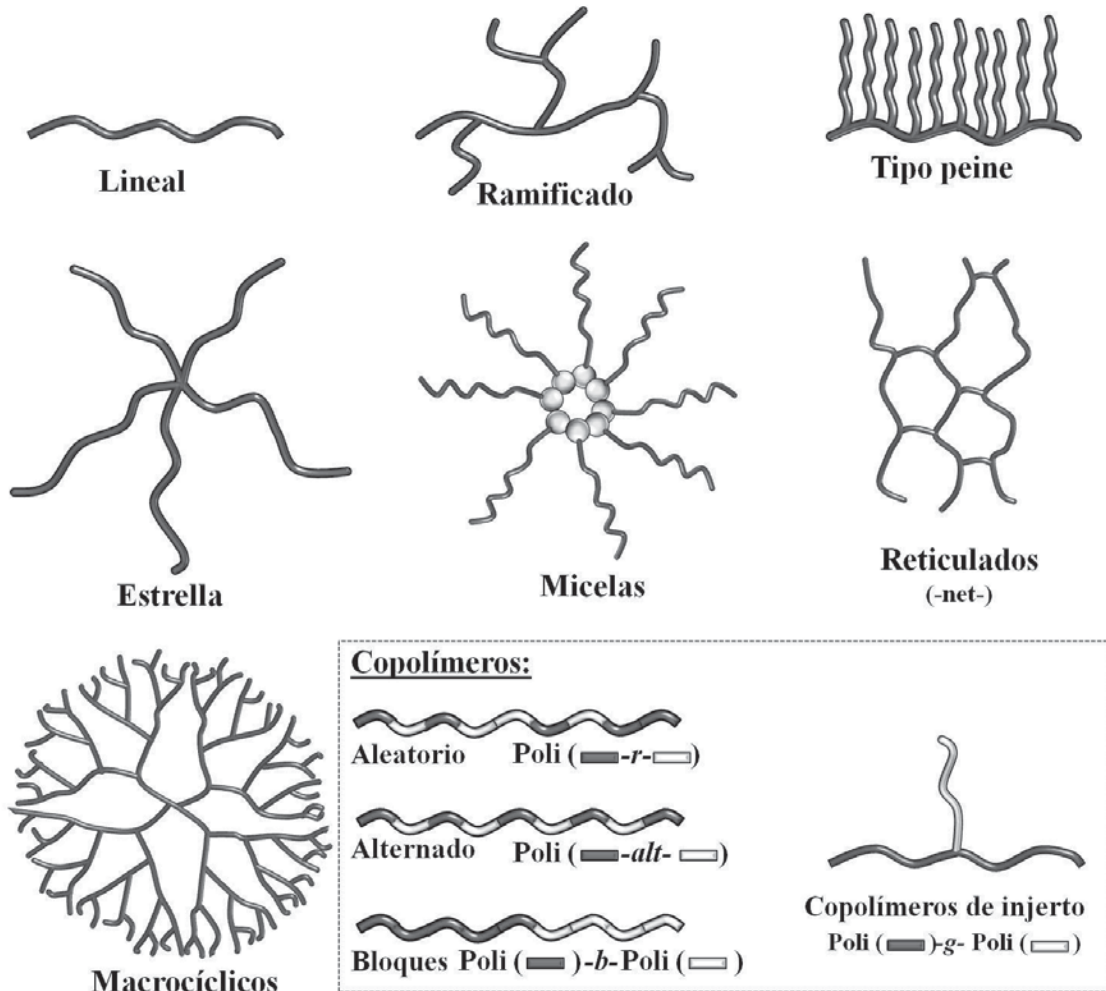


Figura 3.1. Diferentes morfologías de polímeros y copolímeros.

3.1.1. POLÍMEROS CON RESPUESTA A ESTÍMULOS EXTERNOS

Algunos polímeros contienen grupos denominados "estímulo sensibles" o "con respuesta a estímulos" debido a que presentan una transición de fase que puede ser inducida por pequeños cambios en los factores ambientales que rodean al material, tales como: cambios en la temperatura, pH, composición iónica, inducción de campos eléctricos o magnéticos, luz, ultrasonidos, cambio de solvente, etc., (Park y Hoffman 1992; Brazel y Peppas 1995; Hoffman 1995; Hoffman et al. 2000; Kikuchi y Okano 2002; Bucio et al. 2005). En la Figura 3.2 se representa una transición de fase debida a la influencia ejercida por un estímulo externo. La respuesta a estímulos ocurre en condiciones de equilibrio y es atribuida a las asociaciones entre las cadenas del polímero o a las conformaciones que estas adoptan una vez es aplicado el cambio en las variables del medio. Estas asociaciones son conducidas por

enlaces no covalentes e interacciones complementarias: enlaces de hidrógeno, van der Waals, interacciones iónicas e hidrofóbicas. Los enlaces físicos entre las cadenas del polímero influyen en que la respuesta a estímulos sea reversible. Una característica especial en esta clase de polímeros es que sus propiedades macroscópicas (viscoelasticidad, hinchamiento, conductividad, etc.) pueden ser controladas a nivel microscópico por la modificación de la estructura química y la organización de las cadenas poliméricas (Dimitrov et al. 2007). La Figura 3.3 muestra una representación esquemática de las asociaciones que las cadenas de polímeros sensibles a estímulos pueden formar en disolución acuosa.

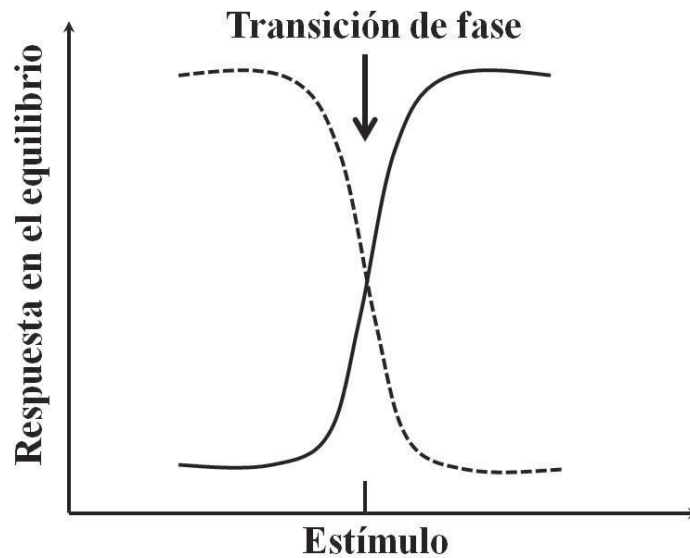


Figura 3.2. Respuesta de polímeros sensibles a estímulos como función de un estímulo externo. Respuesta positiva (---) y negativa (—).

Los polímeros sensibles a estímulos han inducido un marcado interés y están siendo usados en un extenso número de aplicaciones médicas y farmacéuticas, tales como: implantes, dispositivos médicos, sistemas liberadores de fármacos, inmovilizadores de enzimas, herramientas para diagnóstico inmunológico, sensores, suturas, adhesivos, adsorbentes de líquidos, recubrimientos, lentes de contactos, filtros de diálisis renal, extracción o remoción de metales, recuperación de petróleo y otros sistemas especializados (Chen y Hsu 1997; Chen et al. 1997; Wu y Zhou 1997; Yuk et al. 1997; Bayhan y Tuncel 1998; Tuncel 1999; Tuncel y Ozdemir 2000; Hoffman 2002; Şen y Sari 2005; Fong et al. 2009). Algunas de las nuevas aplicaciones se han centrado en la modificación o funcionalización de la superficie o la masa de algunos materiales convencionales empleados en el campo de los biomateriales, utilizando polímeros sensibles a estímulos. Entre estos desarrollos se destacan los polímeros con memoria (dispositivos que pueden adaptar o cambiar su forma para facilitar su inserción en el organismo y luego recuperan su

conformación para realizar una función específica); los dispositivos que presentan la capacidad de atraer o repeler células específicas del organismo para la prevención de respuestas inflamatorias y la inducción de recuperación en los tejidos; y materiales que funcionan como músculos artificiales que son aplicados para el reemplazo total de tejidos dañados (Bucio *et al.* 2010). No obstante, cada vez son más los estudios centrados sobre la modificación de polímeros injertando los monómeros o polímeros apropiados para actuar como dosificadores de fármacos. En estos casos, un fármaco apropiado es adsorbido sobre la superficie (o en la masa) del polímero modificado, que al entrar en contacto con el organismo, se induce su hinchamiento y con ello se promueve la respectiva liberación de la sustancia activa, mejorando así los niveles de la dosis requerida por el paciente y reduciendo los efectos colaterales producidos por el consumo de dosis altas del medicamento (Figura 3.4).

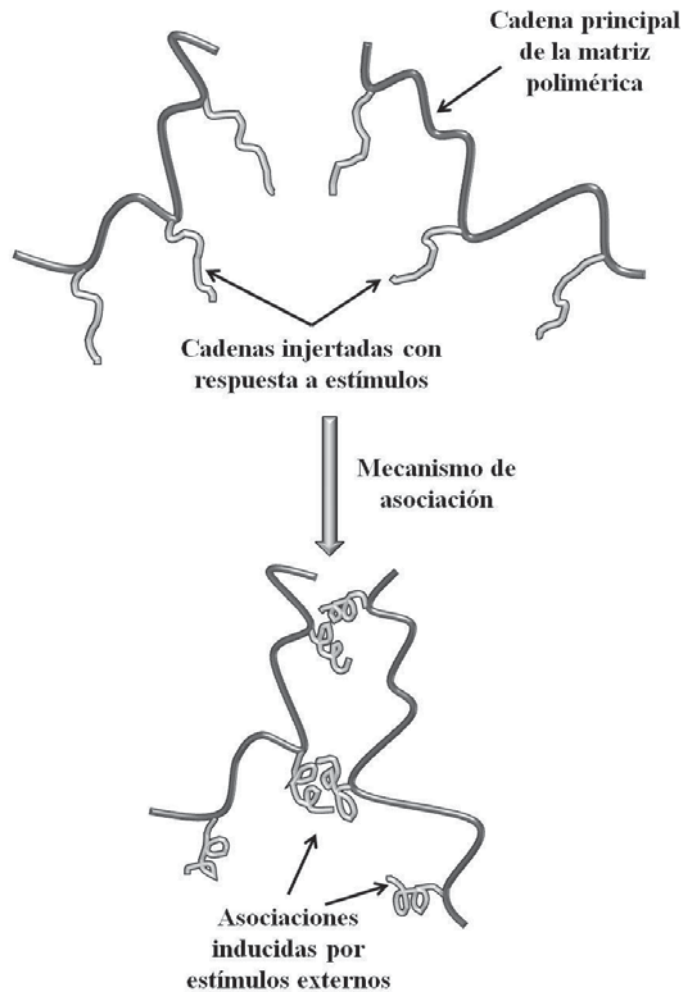


Figura 3.3. Representación esquemática de las asociaciones, en disolución acuosa, entre cadenas de polímeros compuestas con fragmentos sensibles a estímulos.

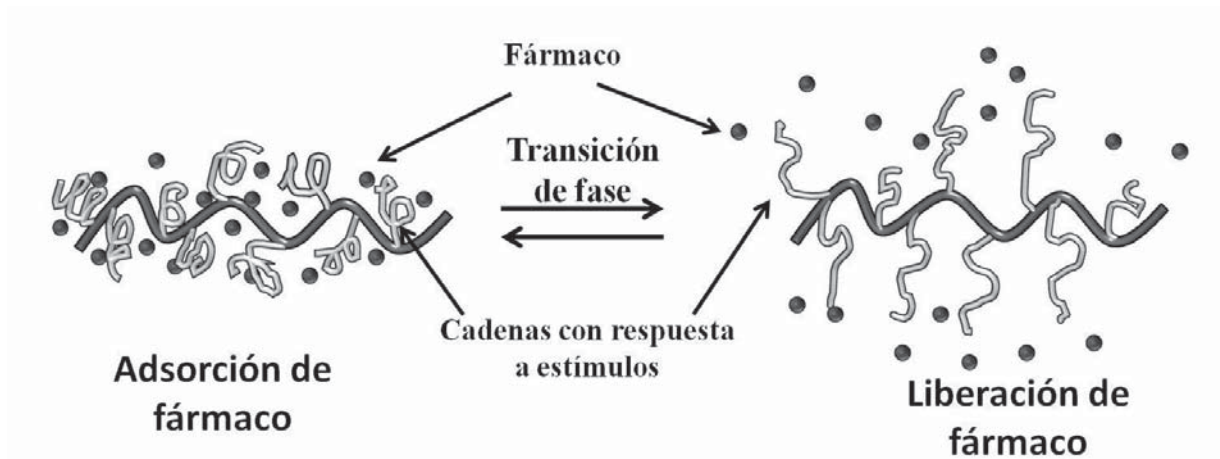


Figura 3.4. Ilustración de los sistemas sensibles a estímulos aplicados a la liberación controlada de fármacos.

3.1.1.1. Polímeros termosensibles

Generalmente los compuestos químicos aumentan su solubilidad cuando son calentados, pero para algunos polímeros solubles en agua se induce su precipitación al ser calentados. Esta propiedad es característica de polímeros que se disuelven cuando son enfriados y exhiben una separación de fases cuando son calentados por encima de una temperatura de transición de fase denominada como “*temperatura crítica inferior de disolución*” (LCST por sus siglas en inglés). Los polímeros termosensibles generalmente contienen segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos en su estructura química. Como ejemplo se encuentra el polímero termosensible poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), el cual exhibe una LCST entre 30 y 35 °C en agua (Hoffman et al. 2000). PNIPAAm es uno de los polímeros sintéticos más estudiados, puesto que sus características lo hacen especial para aplicaciones biomédicas, tales como la liberación controlada de fármacos y la ingeniería de tejidos (Bromberg y Ron 1998; Zhan et al. 2004; Xu et al. 2007). Las propiedades termosensibles de PNIPAAm son presentadas en otros estudios realizados por Schild (1992), Pelton (2000) y por Gil y Hudson (2004). PNIPAAm es altamente soluble en tetrahidrofurano (THF), dimetilformamida (DMF) y dimetilsulfóxido (DMSO); presenta una temperatura de fusión (T_m) a 200°C y una temperatura de transición vítrea (T_g) entre 85 y 130°C (Ruiz et al 2008). El monómero, NIPAAm, presenta un peso molecular de 113.16 g/mol, un punto de fusión a 61°C y de ebullición a 90°C. La estructura química de PNIPAAm es mostrada en la Figura 3.5.

Entre otros polímeros termosensibles figuran el polietilenglicol (PEG), etil hidroxietil celulosa (EHC) o acrilamidas con cadenas alifáticas N-sustituidas (Saeki et al. 1976; Yoo et al. 2000). Por otro lado, existen polímeros que exhiben el efecto opuesto a PNIPAAm: presentan una separación de fase cuando son enfriados e incrementan su disolución cuando son

calentados. Esta temperatura de transición de fase es llamada "*temperatura crítica superior de disolución*" (UCST por sus siglas en inglés) y ha sido observada por Percot et al. (2000) en mezclas de poliestireno (PS)/polimetil meta acrilato (PMMAC), y por Yang (Ougizawa y Walsh 1993) en mezclas de PS/poli(Ps-co-poliacrilonitrilo [PAN]).

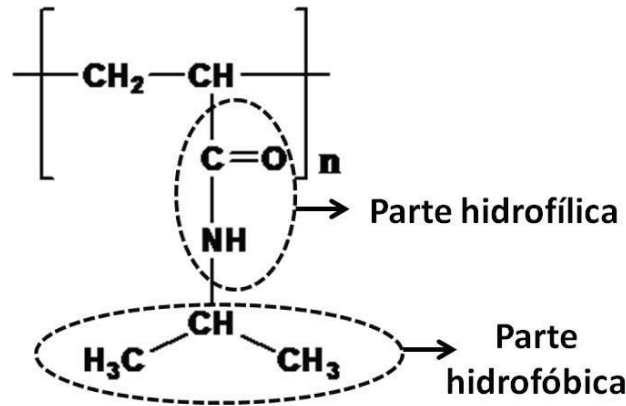


Figura 3.5. Estructura química de PNIPAAm.

Los polímeros sensibles a la temperatura han sido evaluados con éxito en estudios de adhesión de plaquetas (Yamato et al. 2002). La adhesión de plaquetas depende de la temperatura a la cual se encuentra expuesto el polímero. Por consiguiente, para PNIPAAm injertado en superficies, a valores de temperaturas por debajo de su LCST (~ 32 °C), las plaquetas adoptan una forma esférica y presentan movimientos vibratorios y oscilantes (tipo microbrowniano) cuando se acercan a la superficie del material. Este comportamiento es similar para polímeros injertados en su superficie con PEG, en el cual la activación plaquetaria es inhibida. Es usual encontrar que la adhesión celular puede ser facilitada a temperaturas por encima de la LCST (Tamada y Ikada 1994; Okano et al. 1995; Kikuchi y Okano 2005). Así, la adhesión celular en dependencia de la cantidad y del grosor de PNIPAAm injertado sobre superficies también fue investigada detalladamente por Fukumori y colaboradores (2009). Ellos encontraron que el espesor y la cantidad de polímero injertado, así como el hinchamiento de la superficie, aumentaron con la concentración de monómero inicial, mientras que las células fueron preferentemente adheridas a 37 °C, sin presentar una adhesión significativa a 20 °C. Contrariamente, en esa investigación también encontraron que a altas concentraciones de NIPAAm (35 %), la adhesión celular fue repelida a 37 °C. Otros trabajos relacionados con polímeros termosensibles (incluyendo a PNIPAAm) injertados sobre matrices poliméricas mediante el uso de radiación γ , para su aplicación en dispositivos biomédicos, serán discutidos posteriormente.

3.1.1.2. Polímeros pH sensibles

Las cadenas de los polímeros con sensibilidad al pH usualmente contienen grupos ionizables, tales como ácidos carboxílicos o los fragmentos aminoalquilados. Cuando estos grupos son ionizados, una substancial presión osmótica es generada dentro del polímero, causando que su hinchamiento aumente o que el volumen hidrodinámico de las cadenas poliméricas sea alterado (*Siegel 1993; Gil y Hudson 2004; Dimitrov et al. 2007*). Este hinchamiento o alteración es generalmente mayor en estructuras reticuladas, como los hidrogeles. La transición de fase, que usualmente ocurre dentro de intervalos cortos de pH, es denominada pH crítico. Los copolímeros de metacrilato de metilo (MAcM) y ácido metacrílico (AMAc) experimentan un colapso de su hinchamiento a pH menor de 5, mientras que copolímeros de MMAc con N,N-dimetilamino etil metacrilato (DMAEMA) son solubles a bajos valores de pH, pero colapsan bajo condiciones ligeramente alcalinas (*Kumar et al. 2007*). DMAEMA es uno de los pocos polímeros que por sí solos presentan una respuesta dual: exhiben una LCST entre 38 – 40 °C, y un pH crítico a 5.4 (*Burillo et al. 2007b*).

Los polímeros con respuesta a los cambios de pH pueden ser usados en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos dirigidos hacia tejidos tumorales. El pH extracelular de tumores sólidos se encuentra por lo general en 0.2 unidades por debajo del pH del tejido circundante (*Stubbs et al. 1999; Lee et al 2003*). Por lo tanto, para estos sistemas pH sensibles, la respuesta debe ocurrir de forma rápida y en un rango corto de pH. Usando irradiación γ , las propiedades de respuesta rápida pueden ser combinadas con las funciones propias de otros polímeros, mediante el ajuste adecuado para lograr la combinación que resulte clínicamente efectiva en el sistema de liberación. La mayoría de las reacciones de injerto centradas sobre la modificación superficial o sobre la masa de una matriz polimérica, son soportadas en este concepto.

El ácido acrílico (AAc) es uno de los monómeros más empleados en la modificación de substratos poliméricos por medio de reacciones de injerto, con la finalidad de incorporar sensibilidad al pH en los materiales de partida. De esta manera, los grupos carboxílicos de AAc también ofrecen sitios disponibles para el acople con cadenas de polioxido de etileno (POE) que contienen grupos amino terminales, los cuales por medio del método de activación de carbodiimidias, son directamente usados para la interacción con heparina. En general, los grupos carboxílicos tienen la capacidad de producir nuevos grupos funcionales al ser sometidos a reacciones químicas adicionales (*Rogel-Hernández et al. 2003*).

El AAc es un líquido incoloro, altamente hidrofílico, inflamable, con un peso molecular de 72.06 g/mol, punto de fusión de 13 °C y punto de ebullición de 139 °C. La estructura química de AAc es mostrada en la Figura 3.6.

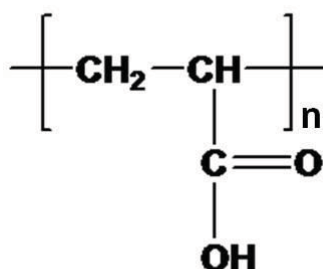


Figura 3.6. Estructura química de AAc.

3.1.1.3. Hidrogeles

Los hidrogeles son redes tridimensionales compuestas de cadenas poliméricas hidrofílicas unidas entre sí (entrecruzadas), que tienen la capacidad de hincharse en agua o fluidos biológicos, sin disolverse y conservando su forma bajo condiciones fisiológicas (*Chen y Hoffman 1995; Yoshida et al. 1995; Holtz y Asher 1997*). Los hidrogeles fueron los primeros materiales diseñados para su uso en el cuerpo humano. Su síntesis, por métodos tradicionales, incluye el entrecruzamiento por copolimerización, el entrecruzamiento por medio de precursores reactivos y el entrecruzamiento por la reacción directa polímero-polímero (*Borzacchiello y Ambrosio 2009*). El entrecruzamiento entre las cadenas poliméricas puede ser inducida por radiación o por reacciones químicas. En el primer caso, la radiación incluye a los electrones acelerados, rayos γ , rayos X, o luz UV (*Ikada et al. 1977; Kaetsu 1993*). En el segundo caso, la unión entre las cadenas puede ocurrir por la adición de agentes entrecruzantes, los cuales son especies de bajo peso molecular que actúan enlazando dos segmentos de cadenas a través de sus grupos di- o multifuncionales (*Andrade 1976; Peppas 1987*). Un agente entrecruzante de uso común es N,N'-metilenbisacrilamida (MBAAm), su estructura química es mostrada en la Figura 3.7. Generalmente, las reacciones también pueden llevarse a cabo en un solo paso, adicionando los monómeros requeridos y el agente entrecruzante en pequeñas cantidades. También es común encontrar la combinación de los dos casos mencionados anteriormente (Figura 3.8).

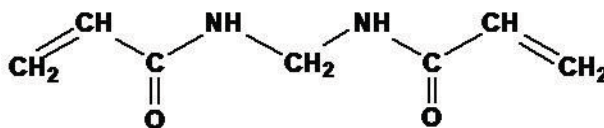


Figura 3.7. Estructura química de MBAAm

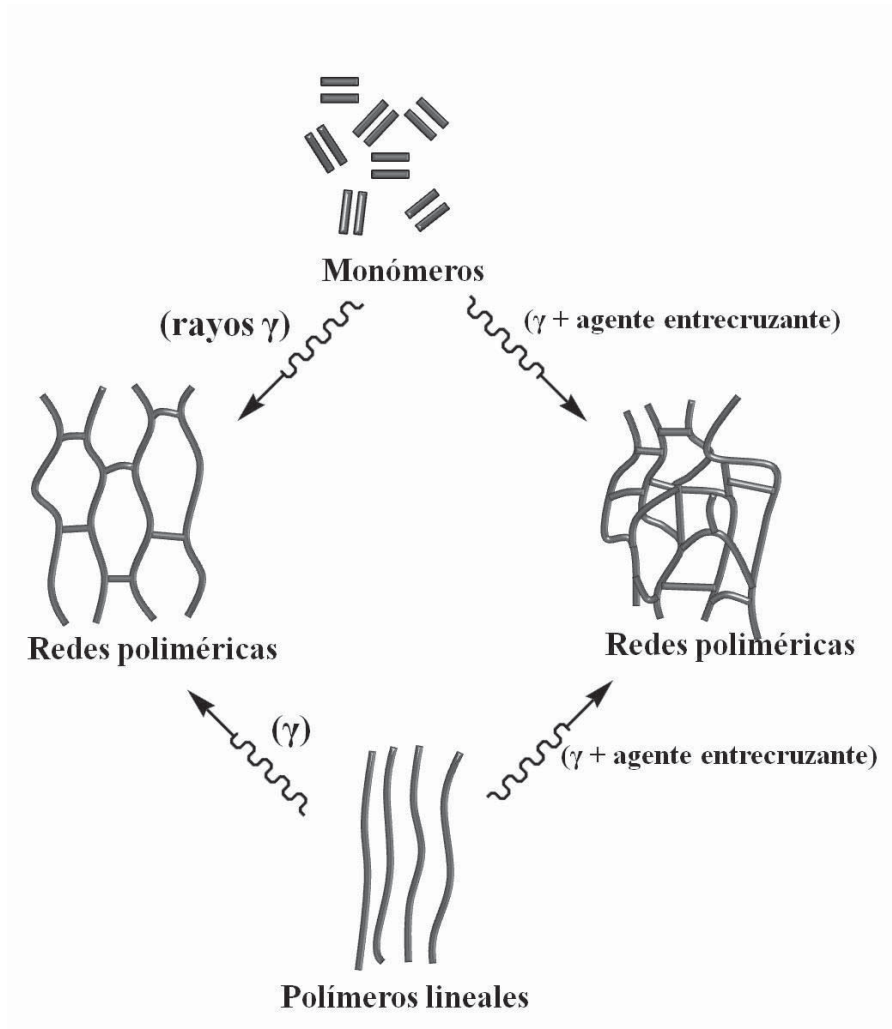


Figura 3.8. Diferentes rutas para el entrecruzamiento de cadenas poliméricas por radiación γ , en presencia y ausencia de agente entrecruzante.

Un polímero usado con frecuencia en medicina y farmacia, en su forma de hidrogel, es poli(N-vinilpirrolidona) (PVP) (Peppas y Klier 1991). Charlesby y Alexander (1955) reportaron sobre el entrecruzamiento, estimulado por irradiación, de PVP y otros polímeros. Nagaoka y colaboradores (1993) también aplicaron radiación γ para inducir, de forma simultánea, la polimerización y el entrecruzamiento en la síntesis de hidrogeles de PNIPAAm, utilizando dosis de irradiación entre 20 y 200 kGy. En esa investigación fue reportada la influencia de la dosis sobre las propiedades mecánicas del material: a dosis bajas los hidrogeles presentaron una máxima sensibilidad a la temperatura, pero sus propiedades mecánicas fueron bajas. Por otro lado, Ortega y colaboradores (2007) estudiaron y compararon las propiedades de geles de PNIPAAm preparadas por tres métodos diferentes, incluyendo a la irradiación γ en cada uno de ellos. En esa investigación, los geles fueron preparados por la irradiación de soluciones acuosas de NIPAAm en presencia y ausencia de MBAAm, y también, por la

irradiación de muestras de NIPAAm sólidas compactadas a diferentes presiones. Ellos encontraron que: (1) los tres métodos usados para la polimerización y el entrecruzamiento de PNIPAAm conducen a geles con diferentes microestructuras; (2) la adición de MBAAm no cambia drásticamente las propiedades de los geles, pero sí causa diferencias en las dosis mínimas para la formación de gel (0.18 kGy para geles preparados con MBAAm y 0.73 kGy para los geles sintetizados sin el agente entrecruzante); y (3) la irradiación de NIPAAm en estado sólido produce hidrogeles con una baja densidad de entrecruzamiento y, por consiguiente, con bajas propiedades mecánicas.

En cuanto al PAAc, Jabbari y Nozari (2000) investigaron el comportamiento en los hinchamientos de hidrogeles de PAAc sintetizados por irradiación, en disolución acuosa, de cadenas de PAAc no entrecruzadas. El PAAc no entrecruzado fue preparado previamente por polimerización-precipitación de AAc en benceno. Ellos encontraron que el equilibrio de hinchamiento de los hidrogeles decrece significativamente cuando la dosis de irradiación es aumentada de 5 a 25 kGy. Los geles de PAAc han sido importantes para el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos a nivel gastrointestinal (Gurny y Junginger 1990; Lenaert y Gurny 1990).

La presencia de un iniciador y un agente entrecruzante en los medios de reacción afectan directamente la fase del polímero hidrofílico en la solución, inciden sobre la estructura macromolecular y también contribuyen a la formación de estructuras reticuladas menos homogéneas (Hoffman 1977). Estructuras entrecruzadas más homogéneas pueden ser sintetizadas empleando radiación γ en ausencia de un agente iniciador o de entrecruzamiento. No obstante, la homogeneidad de una red polimérica afecta directamente el hinchamiento y las propiedades mecánicas en un hidrogel.

Entre las potenciales aplicaciones de todos los tipos de hidrogeles se encuentran: matrices sintéticas extracelulares, ingeniería de tejidos, dispositivos implantables, sistemas de liberación de fármacos, lentes de contactos, biosensores, sistemas de separación, materiales para el control reversible de adhesión celular, materiales para el control de la actividad enzimática, vendajes para heridas, microfluidos inteligentes, entre otros (Peppas y Klier 1991; Bell y Peppas 1996; Peppas y Sahlin 1996). Sin embargo, entre las desventajas asociadas a los hidrogeles convencionales se resaltan: el limitado control para obtener estructuras detalladas durante la síntesis; la respuesta significativamente lenta o retrasada a los estímulos externos; y las bajas propiedades mecánicas, especialmente en su estado hinchado. Por consiguiente, la mejora de las propiedades biomecánicas de los hidrogeles, el injerto de cadenas con respuesta relativamente rápida a estímulos, las mezclas en forma de redes interpenetrantes y la preparación de hidrogeles injertados sobre la superficie de matrices poliméricas hidrofóbicas; son algunos ejemplos de biomateriales y soluciones planteadas con un futuro promisorio.

3.1.1.4. Redes Poliméricas Interpenetrantes (IPNs)

Una red polimérica interpenetrante (IPN por sus siglas en inglés) es formada cuando una segunda red polimérica es sintetizada dentro de otra red pre-polimerizada, sin que se establezcan uniones covalentes entre ellas (*Sperling y Mishra 1997*). Una IPN es básicamente un tipo de mezcla polimérica en donde el material final retiene las propiedades que cada polímero constituyente presenta de forma individual, mejorando así las características deficientes que cada uno de ellos presenta por sí solo, o incluso, adicionando características especiales que sólo son alcanzadas realizando la mezcla. Existen varios tipos de IPNs dependiendo del proceso de síntesis de las redes que la conforman:

a. IPNs secuenciales: para la construcción de estos materiales se sintetiza inicialmente la primera red (Red I). Seguidamente, todos los compuestos necesarios para la síntesis de la segunda red (monómero, agente reticulante e iniciador de la reacción) son absorbidos por hinchamiento en la primera red para generar finalmente la reacción de polimerización "in situ" (*Sperling 1981*; Figura 3.9).

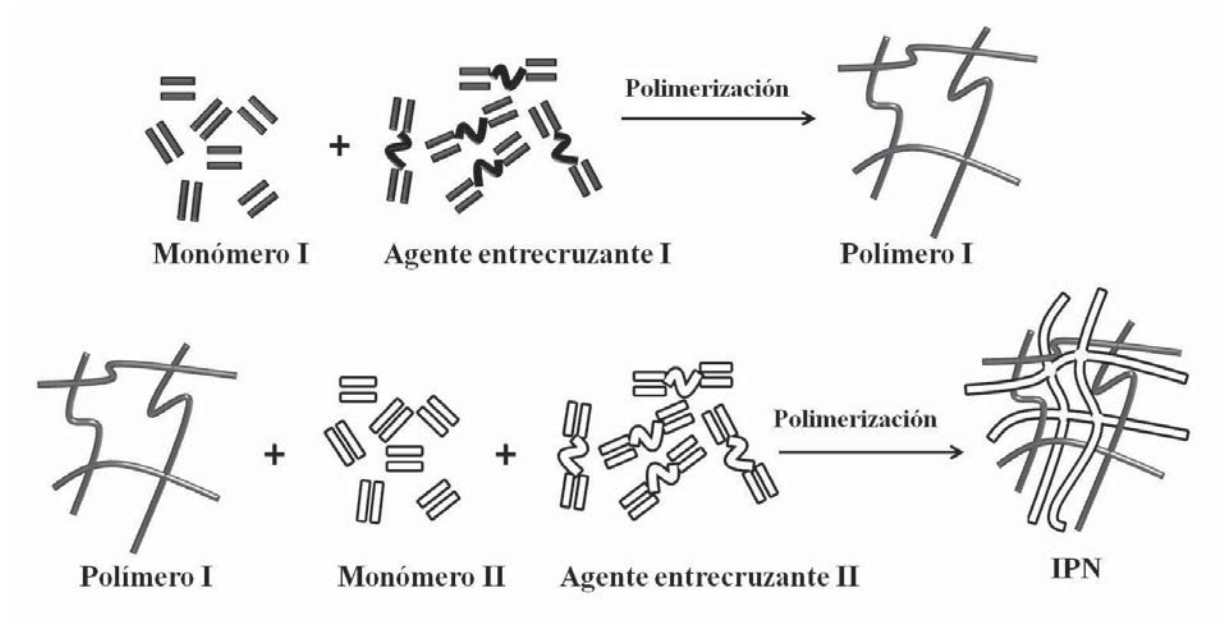


Figura 3.9. Procedimiento para la síntesis de IPNs secuenciales.

b. IPNs simultáneas: se conocen como SIN (*Simultaneous Interpenetrating Network*). Para su síntesis se parte de una mezcla compuesta por todos los compuestos necesarios para llevar a cabo la polimerización de dos o más redes (monómeros, agentes entrecruzantes, iniciadores de reacción, etc.) (Figura 3.10). Las reacciones de interferencia se pueden evitar eligiendo las condiciones para que el proceso de polimerización simultáneo de cada red siga un mecanismo de reacción diferente. A

manera de ejemplo se puede pensar en la síntesis de una IPN simultánea empleando la polimerización por etapas para la construcción de una red, mientras simultáneamente se usa la polimerización en cadena para la construcción de la otra. Estos dos mecanismos de polimerización también difieren cinéticamente, lo que favorece la ausencia de interferencias en las dos reacciones que proceden simultáneamente (Sperling y Mishra 1997).

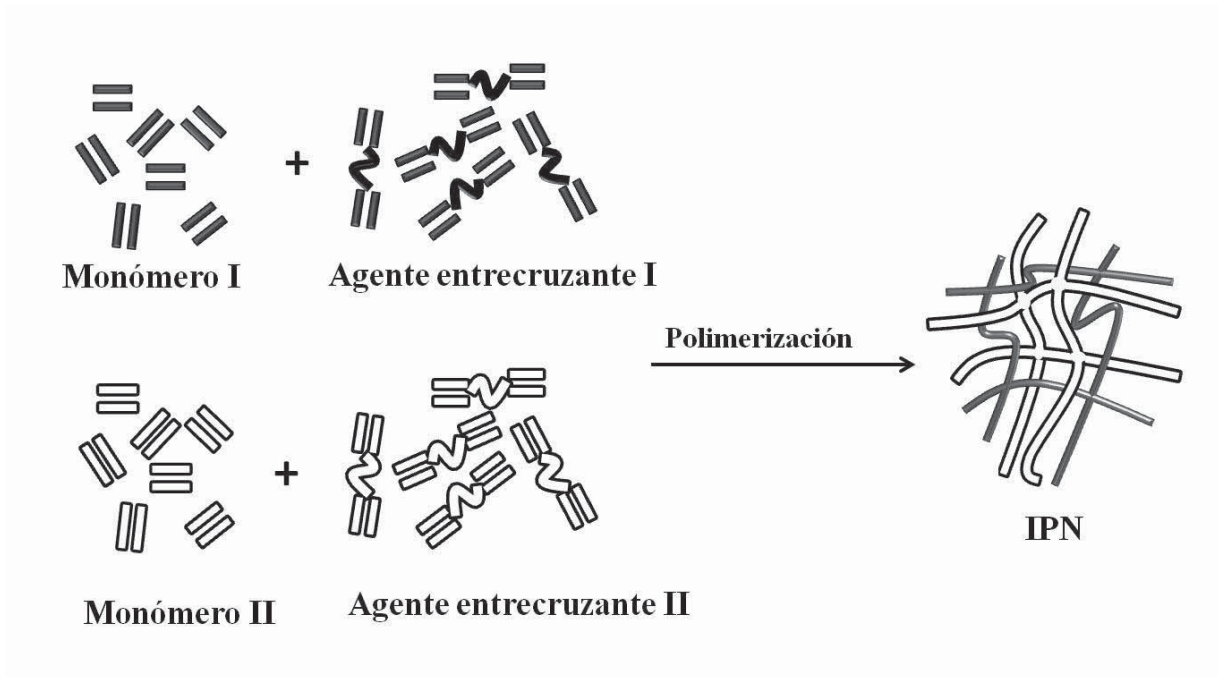


Figura 3.10. Procedimiento para la síntesis de IPNs simultáneas.

c. **Semi-IPNs (s-IPNs):** a diferencia de una IPN, las s-IPNs están conformadas por uno o más polímeros reticulados y uno o más polímeros lineales o ramificados (Figura 3.11).

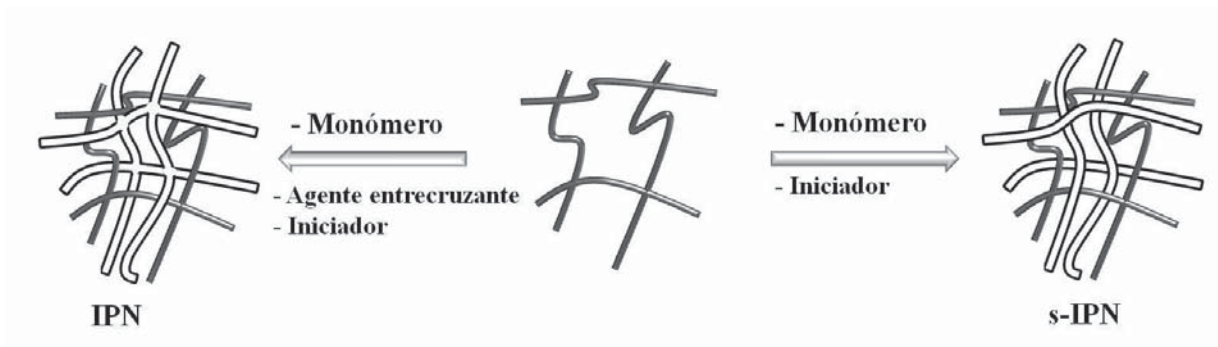


Figura 3.11. Ilustración de la formación de una IPN y una s-IPN.

Generalmente, las redes poliméricas, como los hidrogeles convencionales, pueden ser alteradas como IPNs para mejorar sus propiedades mecánicas y para optimizar la eficiencia de adsorción y liberación de un fármaco. Además, los procesos de síntesis de IPNs dan lugar a que la carga de un fármaco pueda ser llevada a cabo simultáneamente con el proceso de polimerización de la red interpenetrada (*Mohamadnia et al. 2007; Hoare y Kohane 2008*). De acuerdo con la elasticidad (dada por la densidad de entrecruzamiento) de una o ambas fases del gel, las IPNs tienen la habilidad de también restringir el equilibrio de hinchamiento. Como ejemplo se tiene que la formación de una IPN altamente entrecruzada, conformada por redes sensibles al pH y redes hidrolizables, restringe el rápido hinchamiento de la red pH sensible, para facilitar un perfil de hinchamiento lineal, siguiendo un cambio abrupto desde pH 2.0 a 7.4 (*Chivukula et al. 2006*). Estos cambios son indispensables para minimizar la liberación acelerada de fármacos en sistemas de liberación por vía oral. Otro ejemplo a resaltar, relaciona a una IPN de quitosano-PNIPAAm que aumenta significativamente la capacidad de carga de diclofenaco, comparado con los niveles alcanzados por hidrogeles de PNIPAAm puro. Esta IPN presentó la retención de la termosensibilidad proveniente de la red de PNIPAAm, la cual participó en la regulación de la cinética de liberación del soluto (*Alvarez-Lorenzo et al. 2005*). Por su parte, el quitosano contiene grupos reactivos amino e hidroxilo, los cuales pueden ser usados para alterar químicamente sus propiedades bajo condiciones de reacción suaves o moderadas (*Kim et al. 2000*). Este polímero natural y sus derivados se han convertido en polisacáridos muy útiles para el área biomédica, debido a sus numerosas e interesantes propiedades biológicas, tales como alta biocompatibilidad, alta biodegradabilidad y muy baja toxicidad.

Las s-IPNs pueden conservar una cinética rápida de respuesta a los estímulos correspondientes, lo cual es atribuido a la ausencia de la restricción impuesta por la red interpenetrada. No obstante, tanto las IPNs como las s-IPNs pueden presentar múltiples respuestas, lo que ha sido aprovechado para el diseño de sistemas de liberación de fármacos, principalmente para aquellos que responden al pH y la temperatura (*Mukae et al. 1990a,b; Fei et al. 2002; Kim et al. 2003; Zhang et al. 2004; de Moura et al. 2005*).

A pesar de que la información reportada sobre IPNs es abundante, son pocas las investigaciones que hasta la actualidad, utilizan radiación ionizante (como la γ) para la síntesis de IPNs sensibles a estímulos (*Guilherme et al. 2006*). En un ejemplo, IPNs y s-IPNs de Alginato-PNIPAAm, en forma de hidrogeles y con sensibilidad al pH y temperatura, fueron preparadas empleando radiación γ (*Lee et al. 2006*). En esta investigación, las s-IPNs fueron preparadas por la irradiación de una mezcla compuesta de alginato de sodio y NIPAAm, para con ello, inducir la polimerización y reticulación de NIPAAm. Entonces, la preparación de las IPNs fue realizada por la inmersión de las s-IPNs en soluciones acuosas de CaCl_2 . En la Figura 3.12 se esquematiza el proceso de síntesis de las s-IPNs e IPNs de Alginato-PNIPAAm. Todos los materiales sintetizados en esta investigación exhibieron una LCST entre 30 y 40 °C,

mientras que las IPNs mostraron una mayor sensibilidad y reversibilidad que las s-IPNs correspondientes. En un reporte previo, se demostró que el alginato irradiado acelera el crecimiento de diversas plantas, lo cual es causado por el aumento en la actividad biológica debido a las degradaciones producidas por el proceso de irradiación (Nagasawa *et al.* 2000). Teniendo en cuenta estos resultados, los materiales sintetizados por Lee y colaboradores (2006) presentan un mayor potencial para ser evaluados y verificados como biomateriales.

Otro sistema de IPNs secuenciales compuestos de PNIPAAm y poli(N-acriloxi-succinimida) (PNAS) han sido reportados por Ortega y colaboradores (2008). La polimerización y entrecruzamiento de PNIPAAm fue estimulada por radiación γ . Los geles de PNIPAAm fueron posteriormente sumergidos en una disolución acuosa de PNAS-polilisina (PLis), en donde PLis actúa como un agente reticulante de PNAS. Para estos materiales, la LCST de PNIPAAm no fue afectada con la introducción de PNAS, mientras que dicha respuesta fue mayor para las IPNs, comparadas con las redes de los componentes en forma individual. Por otro lado, en un trabajo reciente, García y colaboradores (2012) sintetizaron las IPNs de PNAS-PNIPAAm, pero esta vez en forma de injertos sobre la superficie de PP. La síntesis se dividió en tres etapas: en la primera, PNIPAAm fue injertado usando radiación γ ; en un segundo paso, las cadenas de PNIPAAm fueron entrecruzadas también por incidencia de rayos γ ; y finalmente, la red de PNAS-PLis fue obtenida "*in situ*" dentro del material, por medio de la adsorción de las soluciones correspondientes de PNAS y PLis. Estos sistemas fueron diseñados con el propósito de inmovilizar liposomas a través de los grupos amino en el material. Dicha inmovilización fue de carácter reversible debido a la influencia de PNIPAAm.

IPNs con sensibilidad a la temperatura y el pH, sintetizadas con PNIPAAm y PAAc, han sido reportadas por Burillo y colaboradores (2007a), empleando dos etapas consecutivas. En un primer paso, hidrogeles de AAc fueron sintetizado por dos rutas diferentes: (i) por irradiación γ usando una fuente de Cobalto 60 (^{60}Co); y (ii) por medio de irradiación con electrones acelerados usando un acelerador Van de Graaff. En una siguiente etapa, una segunda red de PNIPAAm fue sintetizada dentro de los hidrogeles de PAAc, usando para ello un iniciador químico y un agente entrecruzante (MBAAm). Entre los resultados encontrados en esa investigación, se resalta que las IPNs sintetizadas por radiación γ presentaron rendimientos de entrecruzamiento mayores que aquellas IPNs polimerizadas por electrones acelerados, debido principalmente a la alta penetrabilidad de los rayos γ en los medios de reacción, lo cual facilita reacciones de entrecruzamiento intramoleculares. Con relación al incremento en la densidad de entrecruzamiento, los porcentajes de hinchamiento de los materiales decrecieron con el aumento en la dosis de irradiación aplicada, debido a que la elasticidad de las redes y su capacidad de absorción o retención de agua se reduce cuando los puntos de entrecruzamientos entre las cadenas del polímero aumentan.

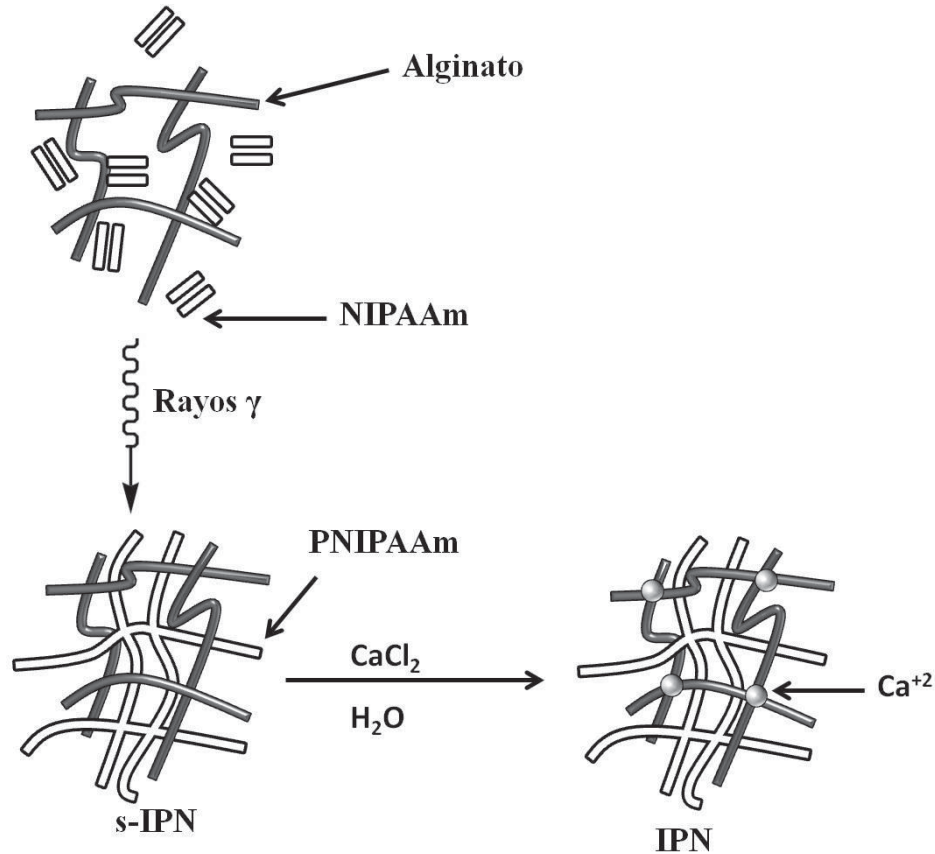


Figura 3.12. Representación esquemática de la preparación de s-IPNs e IPNs con alginato de sodio y PNIPAAm

3.1.1.4.1. IPNs (Reseña histórica)

Las IPNs están entre las clases más antiguas de mezclas poliméricas. El primer trabajo reportado sobre esta clase de materiales fue realizado en 1914 por Jonas Aylsworth, quien mezcló caucho natural, azufre, fenol y formaldehído formando dos redes poliméricas en forma de SIN, una por la vulcanización del caucho con azufre y la otra por la reacción de fenol y formaldehído (Aylsworth 1914). Su intención inicial consistía en mejorar la resistencia del polímero fenol-formaldehído, ya que dicho material era extremadamente quebradizo, pero, con su descubrimiento logró mejorar la resistencia del material y fomentar su uso comercial. No obstante, durante estos años aún no se empleaban términos como polímero, redes, IPNs, etc. Fue entonces para el año de 1940, cuando Millar empezó a incorporar dicha terminología mediante su estudio con materiales de intercambio iónico que contenían poliestireno en su estructura (Millar 1960). Por ello, desconociendo el rumbo y clasificación que finalmente se le dio a los productos de su investigación, Aylsworth, es tal vez, el inventor de la primera IPN en la historia de esta clase de polímeros.

Amos y colaboradores desarrollaron una s-IPN empleando redes del famoso copolímero de injerto estireno-butadieno (SBR, Styrene-Butadien rubber), mezclándolo con PS (*Amos 1974*). El producto se conoce comercialmente como poliestireno de alto impacto (HIPS, High-impact polystyrene). Staudinger y Hutchinson (*1951*) sintetizaron IPNs de PS-PS y de MAcM-MAcM, para usarlas como materiales transparentes en ventanas, recubrimientos o protectores.

La nomenclatura de las IPNs incluye prefijos y conectivos como *-net-* para hacer alusión a la presencia de redes, e *-inter-* para referirse al polímero interpenetrado. Como ejemplo se tienen los sistemas de IPNs sobre los cuales se centra nuestra investigación: *net-TFX-g-PNIPAAm-inter-net-PAAc*, un sistema que consta de cadenas de PNIPAAm injertadas sobre poliuretano TFX (TFX-*g*-PNIPAAm), sobre la cuales se realiza una etapa de entrecruzamiento (*net-TFX-g-PNIPAAm*) y, finalmente, se interpenetra una segunda red de PAAc; y TFX-*g-net-PNIPAAm-inter-net-PAAc*, un sistema que se compone de una primera red de PNIPAAm injertada en un solo paso (TFX-*g-net-PNIPAAm*), sobre la cual se interpenetra una segunda red de PAAc. Para la nomenclatura de s-IPNs, el prefijo *-net-* es eliminado en uno de los componentes.

3.1.2. COPOLÍMEROS DE INJERTO

Desde un punto de vista tecnológico, la copolimerización de injerto resulta una alternativa de gran importancia para la preparación de polímeros con propiedades que no pueden ser obtenidas solamente con homopolímeros. Las reacciones de injerto pueden ser estimuladas por radiación ionizante, luz UV o por medio de iniciadores químicos (*Fujimoto et al. 1993; Kostov y Atanassov 1993; Chaplin et al. 1996*). Las diferentes técnicas de modificación que pueden ser aplicadas para la obtención de copolímeros de injerto o para la modificación de superficies son mostradas en la Tabla 3.1. Por medio de ellas, un extenso número de materiales convencionales han sido modificados, usando especialmente radiación ionizante, tal como la radiación γ (*Hoffman et al. 1972; Ratner y Hoffman 1974; Kabanov et al. 1997*). La polimerización de injerto estimulada por irradiación se ha convertido en una herramienta adecuada para la modificación de propiedades fisicoquímicas de los materiales, y se ha destacado por ser una técnica limpia, al no requerir de iniciadores o precursores químicos para llevar a cabo las reacciones de polimerización (*Satoshi et al. 1995; Nasef y Saidi 2004; Seko et al. 2005*).

Las modificaciones estimuladas por irradiación γ , electrones acelerados o plasma, son algunos de las alternativas para promover la formación de enlaces covalentes y, por consiguiente, generar reacciones de injerto con una arquitectura molecular relativamente controlable. Estas tres técnicas son destacadas por la producción de materiales con altos niveles de pureza y por su selectividad en la funcionalización dirigida específicamente a superficies, con la opción de generar cambios sobre la masa del polímero, aunque para ello, la radiación γ resulta mucho más adecuada, por presentar una alta penetrabilidad. Una de las

mayores ventajas del uso de la radiación γ para procesos de injerto radica en que puede ser aplicada a cualquier temperatura, independientemente del estado físico de las muestras (sólidas, gaseosas o líquidas) (Chapiro 1962). En muchos casos, la radiación γ produce mayores cantidades de injerto que aquellas logradas por irradiación con haces de electrones u otra técnica especializada (Gupta y Chapiro 1989).

Tabla 3.1. Técnicas para la modificación fisicoquímica de la superficie o la masa de un material

- Modificación biológica (inmovilización de biomoléculas)
- Reacciones químicas o modificación de grupo funcional (acetilación, cloración, oxidación, reducción, ozonización + injerto)
- Deposición química de vapor
- Recubrimientos de conversión (fosfatación, anodización)
- Deposición en fase gaseosa
- Grabado por haz de iones (argón, xenón)
- Implantación iónica (nitrógeno)
- Haz de iones por pulverización catódica
- Intercambio de iones
- Oxidación no específica (ozono)
- Fotólisis (fuentes de UV y luz visible)
- Grabado por plasma (nitrógeno, argón, oxígeno, vapor de agua)
- Plasma (descarga de gas) (RF, microondas, acústico)
- Injerto por radiación (electrones acelerados y radiación γ)
- Silanización

La síntesis de copolímeros de injerto estimulados por radiación γ inició con investigaciones de Magat y Chapiro (Chapiro *et al.* 1956). Actualmente, los métodos implícitos en el uso de la radiación ionizante son utilizados para correlacionar las propiedades de los materiales que no poseen las condiciones apropiadas o requeridas para entrar en contacto con sangre y tejidos, bajo una condición fisiológica particular. Por lo tanto, un biomaterial funcional requiere de superficies con parámetros fisicoquímicos adecuados que presenten una buena retención de las características propias de la masa del polímero (Ikada 1994; Kamath y Park 1994; Bures *et al.* 2001). Entonces, como ejemplo, si un polímero tiene un carácter hidrofóbico, se puede proponer su modificación por reacciones de injerto con un monómero polar para facilitar su interacción con moléculas de agua, lo que potencialmente incrementaría su biocompatibilidad. Teniendo en cuenta este concepto, el injerto de polímeros altamente

solubles en agua, tales como PAAc, poliacrilamida (PAAm), poli(N,N'-dimetilacrilamida) (PNDAAm) y PVP, han sido usados regularmente para la funcionalización de matrices de PE de ultra alto peso molecular (UHMWPE por su siglas en inglés) (Kabanov 1989). La funcionalización de matrices poliméricas como PP, PE, politetrafluoroetileno (PTFE) y policarbonatos, usando PDMAEMA, han sido estudiados por Burillo y colaboradores, en el Instituto de Ciencias Nucleares (ICN) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en México (Bucio y Burillo 1997; Burillo et al. 1997, 2006; Bucio et al. 1998). El PDMAEMA se caracteriza por presentar propiedades antimicrobianas (Norh y Macdonald 1994; Rawlinson et al. 2010). Así, en el extenso campo de los biomateriales, otros sistemas de injerto, por ejemplo, se han centrado en la incorporación de propiedades antitrombogénicas sobre diferentes matrices poliméricas (Gupta et al. 1990; Singh y Ray 1994).

3.1.2.1. Métodos de Injerto Inducidos por Radiación.

La polimerización de injerto requiere de procesos en donde diversos sitios químicamente activos son creados sobre una matriz polimérica, los cuales pueden iniciar la polimerización de un monómero, generando así, el arreglo estructural de un copolímero. Para dicho fin, existen varias fuentes de irradiación γ que pueden ser utilizadas, pero la más versátil es la emitida desde el isótopo radiactivo artificial ^{60}Co , el cual tiene una vida media de 5.27 años y emite radiación de 1.17 y 1.33 MeV (valor medio de 1.25 MeV). Las fuentes de ^{137}Cs (de 0.66 MeV) y estroncio-90/itrio-90 son utilizadas con menos frecuencia. En general, el uso de la radiación γ no se limita solamente a la producción de copolímeros de injerto, sino también al entrecruzamiento de polímeros, la esterilización de alimentos, cosméticos y dispositivos biomédicos, entre otras aplicaciones.

Existen cuatro métodos para inducir reacciones de injerto sobre la superficie o la masa de un substrato polimérico: irradiación directa, irradiación directa en presencia de vapor, preirradiación y preirradiación oxidativa (en presencia de aire) (Chapiro 1962).

3.1.2.1.1. Método directo

Este método consiste en irradiar el conjunto integrado por el polímero a injertar y el monómero en estado puro o diluido, bajo condiciones de atmósfera inerte. El disolvente no debe presentar efectos secundarios con la radiación, mientras que el monómero puede estar en estado sólido, líquido, gaseoso o en fase de vapor. A condiciones ambientales, la irradiación produce radicales libres sobre las cadenas poliméricas, los cuales inician la polimerización del monómero, para constituir así las cadenas injertadas (Figura 3.13).

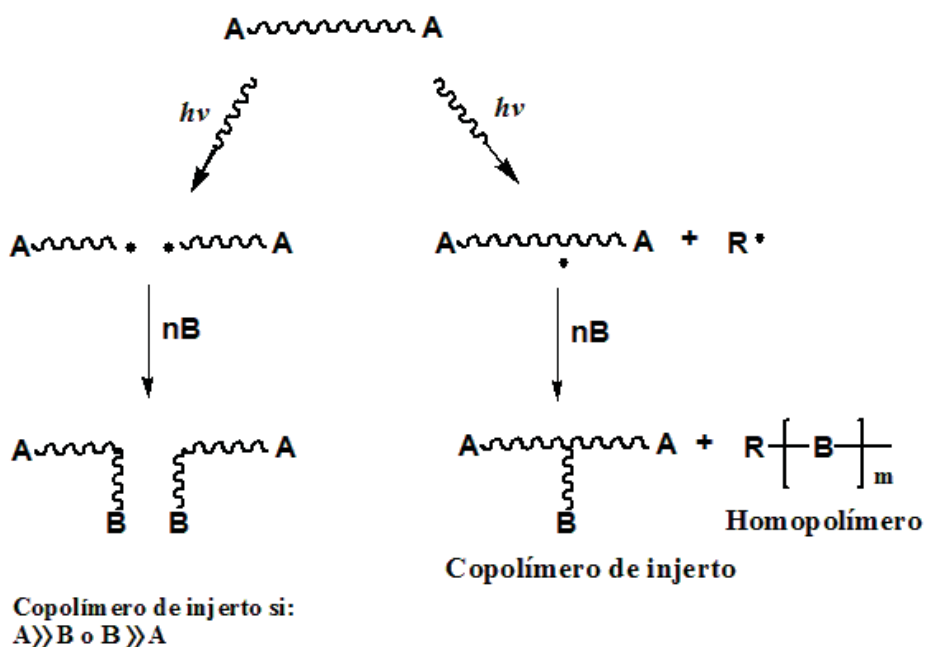


Figura 3.13. Injerto estimulado por radiación γ aplicando un método directo

La desventaja asociada a este método radica en la formación de homopolímero en una alta proporción, lo que además, puede dificultar el aislamiento del copolímero injertado. La homopolimerización puede inducirse por la presencia de las especies activas producidas en el medio o por las generadas en el mismo monómero en su proceso de excitación-relajación, al interactuar directamente con la radiación. En general, la homopolimerización suele contrarrestarse con la adición de un inhibidor, llevando a cabo la reacción a bajas temperatura, o con la disminución de la concentración y/o la intensidad de radiación (*Burillo y Bucio 2008*). Los inhibidores de radicales libres comúnmente utilizados son las especies iónicas Fe^{+2} , Fe^{+3} y Cu^{+2} . Así, la influencia de $CuSO_4$ sobre las cantidades obtenidas de injertos de PNIPAAm sobre membranas porosas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) fue evaluada en una investigación realizada por Liu y colaboradores (*2007*). Ellos encontraron que la adición de Cu^{+2} inhibió de forma efectiva las reacciones de homopolimerización y promovió la generación de mayores porcentajes de injerto, debido a que las reacciones de oxido-reducción entre la especie metálica y las cadenas de homopolímero, actúan desactivando los radicales libres de las cadenas poliméricas en propagación. No obstante, es importante resaltar que, de manera general, cuando la concentración de un inhibidor es alta, las reacciones de injerto también pueden ser contrarrestadas o reducirse a una mínima cantidad. El uso de agentes inhibidores también puede ser aplicado a los otros métodos de injerto estimulados por radiación γ , en los que frecuentemente se producen altas cantidades de homopolímero.

La naturaleza de la estructura del polímero determina la forma de su modificación al ser expuestas a la radiación ionizante. Por lo general, las cadenas que componen determinado polímero pueden ser entrecruzadas o pueden experimentar reacciones de escisión. Así, la formación de injerto es facilitada en polímeros que tienen tendencia a entrecruzarse, mientras que copolímeros en bloque son promovidos cuando las cadenas de un polímero tienen tendencia a la escisión (*Chapiro 1962; Burillo y Bucio 2008*). En la Tabla 3.2 se encuentran resumidas las tendencias de algunos polímeros convencionales. La presencia de átomos de carbono cuaternarios en las cadenas poliméricas favorece la escisión, mientras que los polímeros ausentes de esta cualidad y aquellos con insaturaciones en sus cadenas, sufren reacciones de entrecruzamiento.

Tabla 3.2. Polímeros de uso común y sus tendencias al entrecruzamiento o escisión de cadena cuando son sometidos a radiación γ .

Tendencia a entrecruzamiento	Tendencia a la escisión de cadenas
Poliacrilatos	Celulosa y sus derivados
Poliamidas	ADN
Poliéster	Poliacrilonitrilo (PAN)
Poliétileno (PE)	Poliisobutileno (PIB)
Polipropileno (PP)	Poli(metacrilato de metilo) (PMAcM)
Poliestireno (PS)	Politetrafluoroetileno (PFTE)
Poli(cloruro de vinilo) (PVC)	Poli(fluoruro de vinilo) (PVF)
Elastomeros insaturados	Poli(fluoruro de vinilideno) PVDF

3.1.2.1.2. Irradiación directa en presencia de vapor

En este método se utiliza un dispositivo (ampolleta) diseñado de tal forma que el monómero puro (en estado líquido) o en disolución permanezca separado del polímero a injertar. La parte del dispositivo que contiene el monómero es cubierta con plomo, lo que permite que la radiación ionizante incida solamente sobre el polímero. La copolimerización se llevará a cabo cuando la película y el vapor del monómero entren en contacto. La irradiación se lleva a cabo después de eliminar el oxígeno del sistema. El mecanismo de reacción es igual al presentado en el método de irradiación directa (Figura 3.13).

3.1.2.1.3. Preirradiación oxidativa

En éste método se genera la activación de las cadenas de la matriz polimérica, antes de llevar a cabo las reacciones de injerto. El polímero se somete inicialmente a la irradiación, lo que conlleva a la formación de peróxidos y/o hidroperóxidos sobre sus cadenas. La irradiación se lleva a cabo en presencia de aire. Luego, el polímero irradiado se coloca en

contacto con una disolución monomérica, para que por acción de calentamiento aplicado durante un tiempo determinado de reacción, se produzca la descomposición de los peróxidos y la generación correspondiente de los radicales libres en el polímero, quienes inician la polimerización del monómero sobre estos sitios activos de la matriz. En la Figura 3.14 se presenta el mecanismo de preirradiación oxidativa. Las variables incluidas en este método son: temperatura de reacción de la mezcla polímero irradiado-disolución monomérica (temperatura de injerto), tiempo de reacción, concentración de monómero, dosis de preirradiación e intensidad de radiación.

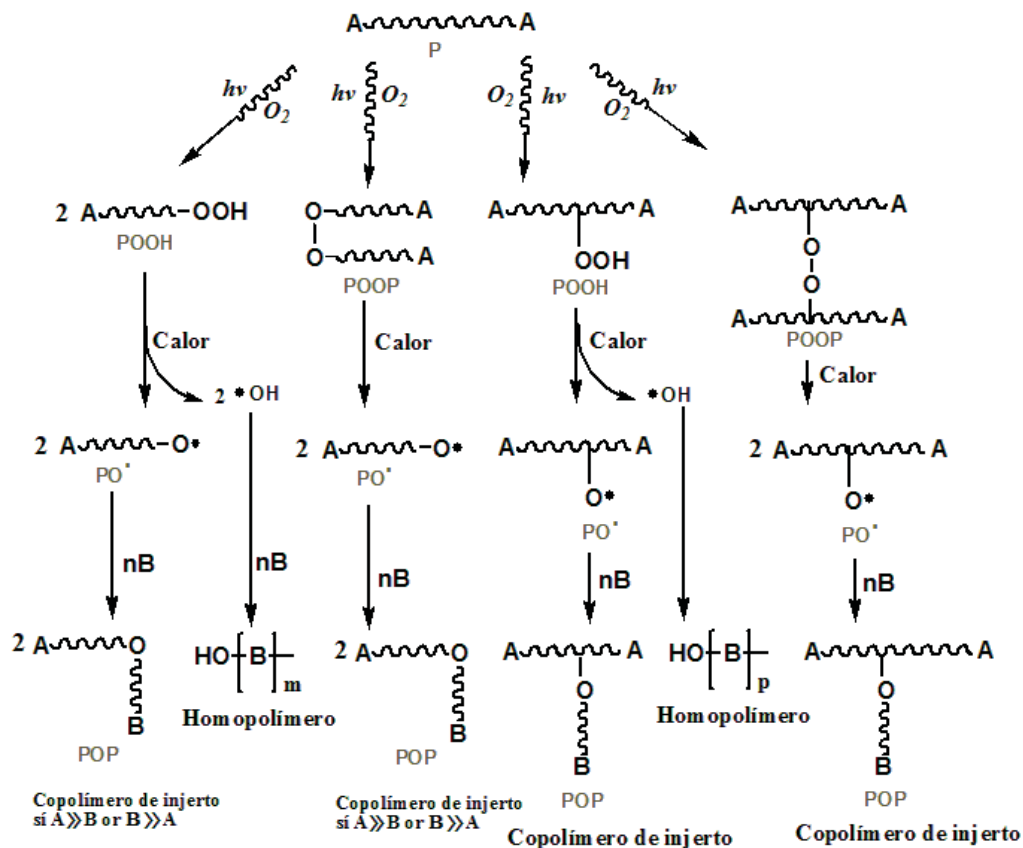


Figura 3.14. Polimerización de injerto estimulada por irradiación γ , aplicando el método de preirradiación oxidativa

Las desventajas más relevantes del método de preirradiación oxidativa son la alta producción de homopolímero y el requerimiento de altas dosis de irradiación, comparado con los rangos que usualmente son manejados aplicando el método directo.

El injerto de AAc sobre policarbonatos, aplicando el método de preirradiación oxidativa, fue estudiado por Aliev y colaboradores (2000). Ellos encontraron valores óptimos para la

dosis de irradiación (150 kGy), temperatura (80 °C) y la concentración de monómeros (50 % w/w). En otros estudios, Sadurni y colaboradores (2005) injertaron AAC sobre películas de politetrafluoroetileno (PTFE), aplicando también el método de preirradiación oxidativa, con el fin de inmovilizar estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano. Por otro lado, el injerto de AAC sobre superficies de PE presenta una naturaleza trombogénica menor, en términos de adhesión y difusión de plaquetas, que la mostrada por las superficies sin modificar (Ko y Cooper 1993). La importancia de injertar cantidades suficientes de grupos carboxílicos sobre las superficies poliméricas se debe a que estos puntos pueden ser aprovechados para la reacción con heparina e insulina. En general, el injerto de AAC y de PNIPAAm sobre diferentes matrices poliméricas, por preirradiación oxidativa, ha sido ampliamente investigado y algunos materiales que contienen estos monómeros ya tienen aplicaciones prácticas (Guimon 1979; Ellingshorst et al. 1983; Gargan et al. 1990; Woods y Pikaev 1994; Yang y Hsiue 1996).

Otros estudios se han centrado en la influencia de los inhibidores de homopolimerización en las reacciones de injerto. Gupta et al. (2008) preparó membranas de intercambio iónico en injertos de redes de AAC sobre materiales compuestos con Teflon y copolímeros PP y PE (previamente fluorados), usando divinilbenceno (DVB), dimetracrilato de tetraetilenglicol (DMATEG) y MBAAm como agentes entrecruzantes. Como agente inhibidor utilizó el sulfato ferroso (FeSO_4). Entre sus resultados se destaca que los porcentajes de injerto alcanzados con DMATEG y MBAAm fueron significativamente mayores que los presentados con DVB, y que una relativamente alta concentración de FeSO_4 reduce drásticamente las cantidades de injerto.

El método de preirradiación oxidativa ofrece muchas alternativas para la modificación o funcionalización de polímeros, ya que las condiciones experimentales, como la dosis e intensidad de radiación, la concentración de los monómeros, el uso de diferentes disolventes, la temperatura y los tiempos de reacción, e incluso el uso de inhibidores de homopolimerización, son factores que pueden ser estudiados detalladamente para cada sistema propuesto.

3.1.2.1.4. Método de preirradiación

Al igual que en el método de preirradiación oxidativa, el polímero es inicialmente irradiado sin entrar en contacto con el monómero. La diferencia radica en que la irradiación debe efectuarse en condiciones de vacío o en atmósfera inerte. Luego, sin perder éstas condiciones, se pone en contacto el polímero con el monómero (en estado líquido o en disolución) para que la reacción se lleve a cabo. La principal desventaja de este método consiste en que los macroradicales presentes en las cadenas adyacentes pueden combinarse entre sí para producir entrecruzamientos o también para promover reacciones de escisión, lo que inminentemente conduce a la degradación de la matriz polimérica. Por consiguiente, en

polímeros altamente cristalinos, como el PE de alta densidad (HDPE por sus siglas en inglés), las reacciones de entrecruzamiento son dominantes debido a la cercanía de sus cadenas, mientras que en polímeros amorfos, como el PE de baja densidad (LDPE por sus siglas en inglés), la cantidad de macrorradicales atrapados es baja y su recombinación es menos probable. Por consiguiente, al ser comparado contra los métodos de irradiación directa y preirradiación oxidativa, se tiene que los rendimientos obtenidos por el método de preirradiación son significativamente más bajos (*Chapiro 1962; Wirsén y Albertsson 1995*).

3.1.2.2. Copolímeros de injerto por uno y dos pasos

Los copolímeros de injerto pueden ser obtenidos en uno o dos pasos, aplicando el método directo o de preirradiación oxidativa. Los copolímeros aleatorios necesariamente son producidos en una sola etapa, adicionando una mezcla de los dos monómeros a la reacción (Figura 3.15a). Esta metodología también es aplicable a los procesos en los que se quiere injertar una red polimérica en un solo paso, pero para dicho caso, la disolución reactante debe contener tanto al monómero como a un agente entrecruzante. Contrariamente, la síntesis de copolímeros en dos etapas conduce a la formación de ramificaciones compuestas con bloques constituidos con una sola unidad repetitiva (Figura 3.15b).

3.1.3. Matrices poliméricas

3.1.3.1. Poliuretano Tecoflex® (TFX)

En general, los poliuretanos son polímeros muy versátiles que pueden ser utilizados en diferentes aplicaciones, especialmente en las de interés biomédico (*Lamba et al. 1998*). Se preparan por reacción de un isocianato, un macroglicol (tipo poliéster o poliéter) y un extensor de cadena (que puede ser un glicol o una amina); adicionalmente también se pueden incluir otros aditivos, tales como cargas y resinas de diferente naturaleza (*Hepburn 1992; Wirpsa 1993*). Estos polímeros poseen una estructura segmentada constituida con fragmentos duros que son formados por la parte del diisocianato y el extensor de cadena, y con segmentos blandos que son compuestos por la parte del polioli, poliéter o poliéster (*Hasirci 1991*).

Por su parte, TFX es un poliuretano alifático y termoplástico de uso médico. Es sintetizado a partir de metilen bis(*p*-ciclohexil isocianato) (H_{12} MDI), 1,4-butanodiol (1,4-BD) y politetrametilenglicol (PTMG) (*Guignot et al 2001; Mohr et al 2006; Reddy et al 2007*). Su estructura química es mostrada en la Figura 3.16. En particular, el TFX es usado comúnmente en la construcción de catéteres o sondas (incluyendo dispositivos urológicos), puesto que tiene una alta hemocompatibilidad y no presenta propiedades trombogénicas (*Khandwekar y Doble 2011*). Este material ha sido ampliamente investigado para ser usado en membranas implantables (*Bélanger et al. 2000; Abel et al 1999; Meijs et al 1995; von Woedtke 2003*). La baja o nula biodegradabilidad del TFX se considera como una cualidad positiva para su aplicación en el remplazo de tejidos, como los vasos sanguíneos, los cuales

requieren de una substancial estabilidad mecánica, ya que un desbalance entre la degradación y la producción de una matriz extracelular, representa un riesgo para la salud del paciente (Detta et al. 2010).

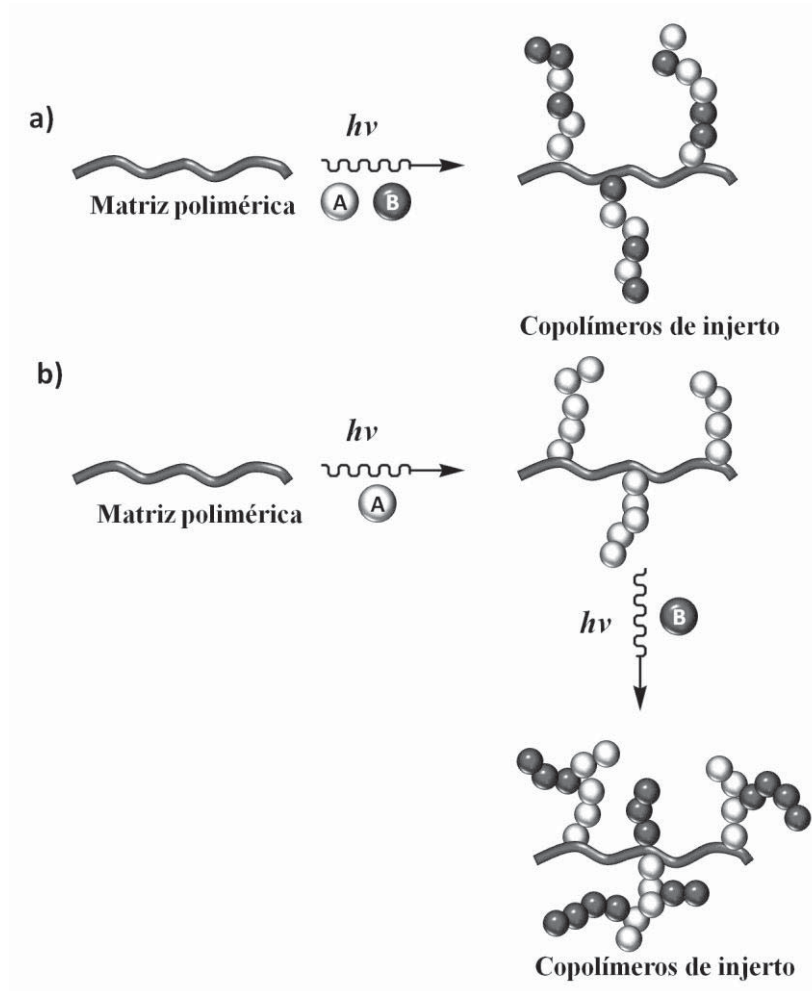


Figura 3.15. Métodos para la preparación de copolímeros de injerto sobre matrices poliméricas usando dos monómeros y aplicando una (a) o dos etapas (b).

En cuanto a los estudios de citocompatibilidad, el TFX muestra una relativamente buena viabilidad celular; su superficie presenta una baja adhesión y proliferación de células endoteliales (Bélanger et al. 2000; von Woedtke 2003; Andrews y Hunt 2008; Thapa et al 2003). Esto es importante para darle a la superficie laminar de un vaso sanguíneo sus propiedades antitrombogénicas (McGuigan y Sefton 2007; Seifalian Alexander et al. 2002).

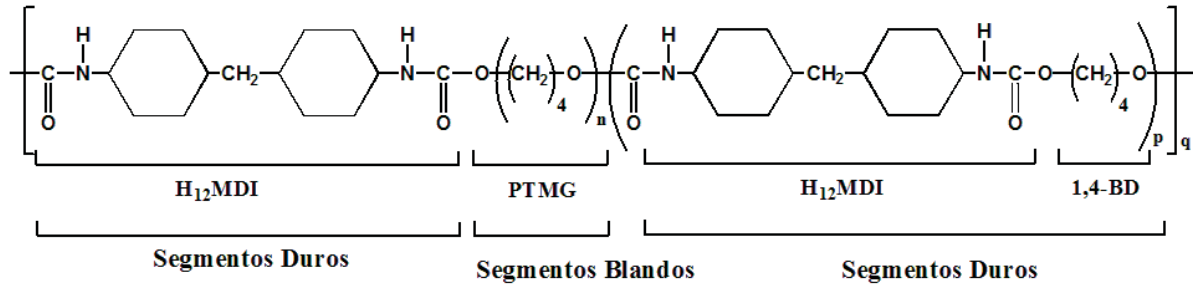


Figura 3.16. Estructura química de TFX.

TFX pertenece a la familia de los poliuretanos que poseen memoria de forma (PMF). Estos materiales han recibido una creciente atención en las últimas décadas en diferentes campos de las ciencias aplicadas, el sector médico, la ingeniería aeroespacial, etc., (Thill et al. 2008; Xie 2010). Los PMF son una clase de materiales que ofrece una respuesta mecánica a un estímulo externo (Lendlein y Kelch 2002). Básicamente, estos materiales presentan la capacidad de deformarse ante un esfuerzo y luego recuperar su forma inicial por la aplicación de calor, luz o exposiciones a disolventes que pueden retornarlo al equilibrio a través de la movilización de sus cadenas poliméricas (Schmidt et al 2011). La recuperación de la forma sigue mecanismos dependientes de la restauración de la entropía conformacional. Estas características de deformación-recuperación, son de considerable importancia, a la hora de insertar un dispositivo médico en alguna cavidad del organismo que represente un difícil acceso.

Guinot y colaboradores (2001) estudiaron la degradación de TFX bajo la influencia de la irradiación con electrones acelerados, con el propósito de evaluar los posibles cambios en esta matriz polimérica durante los procesos de esterilización por medio de este tipo de radiación ionizante. Ellos encontraron que por encima de 100 kGy la degradación aumenta gradualmente, puesto que los pesos moleculares del polímero fueron reducidos significativamente.

En otro trabajo, investigadores de la Universidad de Pisa, en Italia, entremezclaron mallas de TFX con mallas de gelatina de origen natural, cuya preparación final requirió de una técnica llamada "hilado electrónico" (Detta et al. 2010). Como resultado encontraron que la combinación de estos polímeros incrementó tanto las propiedades mecánicas del material, como su biocompatibilidad. Mientras que en otra investigación más reciente, Khandwekar y Doble (2011), con el propósito de desarrollar estrategias para evitar la adherencia e incrustación bacteriana en dispositivos urológicos, modificaron la superficie de TFX con un complejo de PVP-yodo (I). La inclusión de PVP-I se realizó por hinchamiento de TFX en disoluciones con THF. Al final, los polímeros propuestos previnieron y redujeron la adherencia

y la incrustación de bacterias Gram positivas como el *S. aureus*, y de Gram negativas como la *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), lo que demostró la eficiencia de la modificación realizada sobre el material.

La funcionalización de poliuretanos con AAC, utilizando diferentes métodos y técnicas (estimulación por luz UV, plasma y radiación ciclotrónica), ha sido reportada por varios investigadores (*Choi et al. 2004; Vilani et al 2007; Weibel et al. 2006, 2007, 2009; Weibel 2010*). La mayor parte de estas modificaciones fueron llevadas a cabo en presencia de oxígeno y en todas se evidenció la formación de injertos y recubrimientos sobre la superficie del material. Además, los resultados de estas investigaciones dejan abierta la posibilidad para la aplicación de radiación ciclotrónica en la funcionalización selectiva de matrices poliméricas (*Weibel 2010*). Por otra parte, la síntesis de IPNs usando poliuretanos ha sido reportada por Olvera y colaboradores (*2007*), quienes prepararon una IPN secuencial partiendo de una red de poliuretano previamente sintetizada. En el interior de esta red -hinchada en un disolvente apropiado-, llevaron a cabo la polimerización química de una segunda red de PMAcM. La caracterización por técnicas calorimétricas y espectroscópicas confirmó la formación de esta IPN.

Cho y Kim (*2010*) sintetizaron sistemas de IPNs utilizando NIPAAm y cadenas de poliuretano que contenían dobles enlaces en los grupos terminales. La preparación de cada red fue llevada a cabo por polimerización iniciada con radicales libres. La inclusión de PNIPAAm condujo al refuerzo de las propiedades mecánicas y aumento en la capacidad y rapidez de hinchamiento de los materiales. En otro estudio realizado por Hu y colaboradores (*2006*), un poliuretano con ramificaciones conteniendo grupos vinílicos, fue sintetizado y posteriormente injertado con PNIPAAm. La reacción de injerto fue realizada químicamente, con la adición de persulfato de amonio para iniciar la polimerización. De una forma similar, estos mismos investigadores patentaron la invención de un material constituido por redes de poliuretano y PNIPAAm, modificadas con quitosano, con el propósito de emplearlo como mascarillas faciales reutilizables, por su afinidad con la piel y sus características antibacteriales (*Hu et al. 2010*). En ese proyecto, el poliuretano previamente sintetizado con grupos vinílicos y grupos aniónicos a lo largo de sus cadenas, fue nuevamente sometido a polimerización en presencia de PNIPAAm, usando MBAAm como agente entrecruzante y N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED) como iniciador de la polimerización. El quitosano fue incluido por su interacción iónica con las cargas negativas del poliuretano. Este material exhibió una amplia y rápida respuesta al hinchamiento, con una LCST a 33.2 °C. Además, su acción bactericida fue comprobada con éxito ante cepas de *S. aureus* y *Escherichia Coli* (*E. coli*), mientras que la carga y liberación de vitamina C fue evaluada a diferentes condiciones, encontrándose que su liberación a temperatura corporal (37 °C) ocurre a mayor velocidad, comparada con los estudios a temperatura ambiente. En general, el concepto de la modificación de poliuretanos que poseen grupos funcionales (dobles enlaces) en su

estructura, por medio de reacciones de adición con NIPAAm, ha sido aplicado y explorado por otros investigadores, quienes han aportado otras variables, como la estimulación de la polimerización por medio de luz UV (Yang et al. 2007).

Otro tipo de investigaciones apuntan hacia la reducción de la trombogenicidad de poliuretanos biomédicos, pues la formación de trombos es aún altamente probable cuando el uso de un dispositivo implantado se extiende o prolonga (Zhao et al. 2011); por ello, se han desarrollado estrategias para injertar cadenas de PEG y polímeros conteniendo fosforilcolina, sobre la superficie de los poliuretanos (Gao et al. 2012). Por ejemplo, en el método reportado por Yang et al., (2012), primero fueron sintetizadas cadenas de un copolímero de PEG con 2-metacriloil-oxietil fosforilcolina (MPC por su nomenclatura en inglés), utilizando para ello iniciadores ATRP (Atom Transfer Radical Polymerization). En una segunda etapa, dichas cadenas fueron injertadas sobre la superficie del poliuretano, conduciendo a un material con buenas propiedades mecánicas, mayor resistencia a la adhesión de plaquetas, menor trombogenicidad y mayor biocompatibilidad en ensayos "in vitro".

No obstante, la síntesis de IPNs usando matrices poliméricas de poliuretano TFX, más la combinación de monómeros PNIPAAm/PAAc, aún no ha sido reportada bajo ningún método de polimerización conocido hasta el momento. Por consiguiente, la síntesis de IPNs y s-IPNs, utilizando radiación γ en todas las etapas de preparación, empleando además dos diferentes métodos de irradiación para injertar redes termosensibles de PNIPAAm en la masa o direccionadas solamente hacia la superficie de una matriz de TFX (en forma de catéter y películas), para finalmente interpenetrar sobre ellas una segunda red de PAAc; hace de la propuesta reportada en esta investigación doctoral, un proyecto novedoso que parte del reto de lograr la modificación fisicoquímica de un polímero actualmente aplicado como biomaterial, con el objetivo de incorporar propiedades de resistencia a la colonización bacteriana, pero sin alterar de forma negativa sus cualidades de biocompatibilidad, trombogenicidad y baja toxicidad.

3.1.3.2. Polipropileno (PP)

Pertenece al grupo de las poliolefinas y es utilizado en una amplia gama de aplicaciones, tales como empaques para alimentos, tejidos, equipos de laboratorio, componentes automotrices y películas transparentes, entre muchas otras. Es un termoplástico semicristalino que se produce por polimerización de propeno en presencia de un catalizador estereoespecífico (catalizadores Ziegler-Natta o metalocenos). Presenta una gran resistencia contra diversos disolventes orgánicos, ácidos y bases inorgánicas. Su estructura química es mostrada en la Figura 3.17.

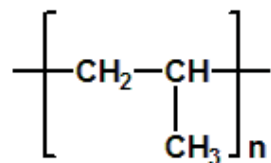


Figura 3.17. Estructura química de PP

El PP es uno de los polímeros con mayor crecimiento en los últimos años y se prevé que su consumo continúe de forma creciente, aún en mayor cantidad que para otros polímeros termoplásticos (PE, PS, PVC y polietilentereftalato (PET)). En 2005, la producción y el consumo de PP en la Unión Europea fueron de 8 y 9 millones de toneladas, respectivamente. Este volumen fue inferior solamente al de PE (*Contreras-García 2010*).

Aunque su baja densidad, alta pureza, buena resistencia al calor y alta rigidez le atribuyen características destacadas para muchas aplicaciones, su baja funcionalidad hace que posea una mala compatibilidad con muchos otros polímeros y sistemas, lo que limita su uso en otras aplicaciones. Por ello, la introducción de monómeros funcionalizados por un proceso de copolimerización de injerto, le conceden nuevas propiedades al PP, conservando a su vez, su resistencia mecánica.

Se han aplicado numerosos métodos para modificar o funcionalizar el PP, entre los cuales se destaca la iniciación química, la radiación UV y la radiación ionizante. En los últimos años, el uso de radiación γ y electrones acelerados se ha venido extendiendo considerablemente. Bucio y colaboradores (*1998; 2005; 2010*) han sintetizado o funcionalizado una amplia gama de polímeros, empleando para ello los métodos de preirradiación oxidativa e irradiación directa. Sus resultados han confirmado que los injertos de 4-vinilpiridina (4-VP) y NIPAAm sobre la superficie de PP, inducen la formación de copolímeros con alta estabilidad térmica. No obstante, el PP experimenta entrecruzamientos y rupturas de cadena cuando es sometido a radiación γ . El predominio de estos dos procesos depende su grado de cristalinidad. El grado de cristalinidad depende a su vez de la configuración o estereoquímica del PP (Figura 3.18).

Las formas isotácticas y sindiotácticas del PP tienden a adquirir una disposición espacial más ordenada en estado sólido, conformando estructuras semicristalinas que le confieren propiedades físicas y mecánicas excepcionales. La forma atáctica no tiene ningún tipo de cristalinidad. El PP estereoregular se entrecruza en menor proporción que el PE, incluso cuando se adiciona algún agente reticulante. A altos grados de cristalinidad, el PP presenta una T_m a 163 °C, mientras que su T_g ha sido reportada a - 6 °C, usando equipos de

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, Differential Scanning Calorimetry) altamente sensibles (Sichina 2000). Esta Tg es atribuida a los segmentos amorfos en el polímero.

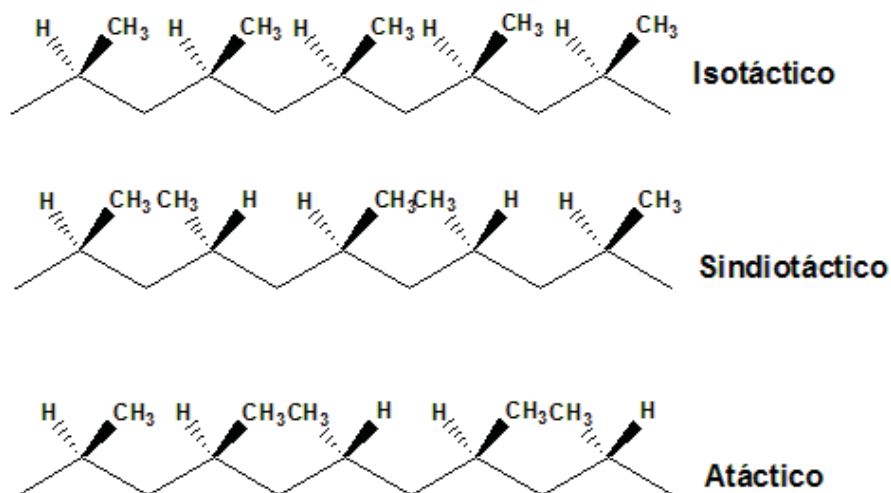


Figura 3.18. Configuraciones posibles para PP.

3.1.3.2.1. IPNs de PNIPAAm/PAAc injertadas sobre PP

La síntesis de IPNs a partir de PNIPAAm/PAAc, con al menos una de las redes unida covalentemente (injertada) a la superficie de PP, inició con los estudios realizados por Ruiz y colaboradores (2007a; b), en el ICN-UNAM, México. El destino de estos materiales consistía en su aplicación como sistemas de liberación local de fármacos, cuya respuesta dependiera de los niveles de pH y valores de temperatura del sitio de inserción, para evitar con ello la colonización de microorganismos patógenos (como *S. aureus*) sobre los materiales de carácter implantable que estuviesen construidos con PP. Así, la síntesis de IPNs secuenciales se dividió en las siguientes tres etapas (Figura 3.19): (1) injerto de PAAc sobre películas de PP usando el método de preirradiación oxidativa, a una dosis de irradiación de 10 kGy, por medio de una fuente de ⁶⁰Co, para formar así los sistemas PP-*g*-PAAc; (2) entrecruzamiento de las cadenas de PAAc injertadas en la primera etapa, usando para ello el método directo de irradiación, a 30 kGy, en presencia y ausencia de MBAAm, para formar así los sistemas *net*-PP-*g*-PAAc; y (3) la interpenetración de redes de PNIPAAm por medio de polimerización redox, conformando de esta forma los sistemas *net*-PP-*g*-PAA-*inter-net*-PNIPAAm. Para estos materiales el contenido de PNIPAAm no superó el 12 %, lo que influyó en la baja termosensibilidad mostrada en las IPNs. Sin embargo, por medio de la técnica de Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC por sus siglas en inglés) se evidenció que el antibiótico utilizado en esta investigación, la vancomicina, interacciona en mayor grado con el AAc en estado ionizado (cuatro veces más que con el AAc no ionizado), mientras que su

interacción con NIPAAm es significativamente despreciable (Ruiz et al. 2008). Esto influyó en el replanteamiento de la modificación del material. Es importante señalar que la técnica ITC ya ha sido empleada con éxito en la determinación de las interacciones favorables entre ciclodextrinas y otros monómeros (Alvarez-Lorenzo et al. 2006; Rodriguez-Perez et al. 2006).

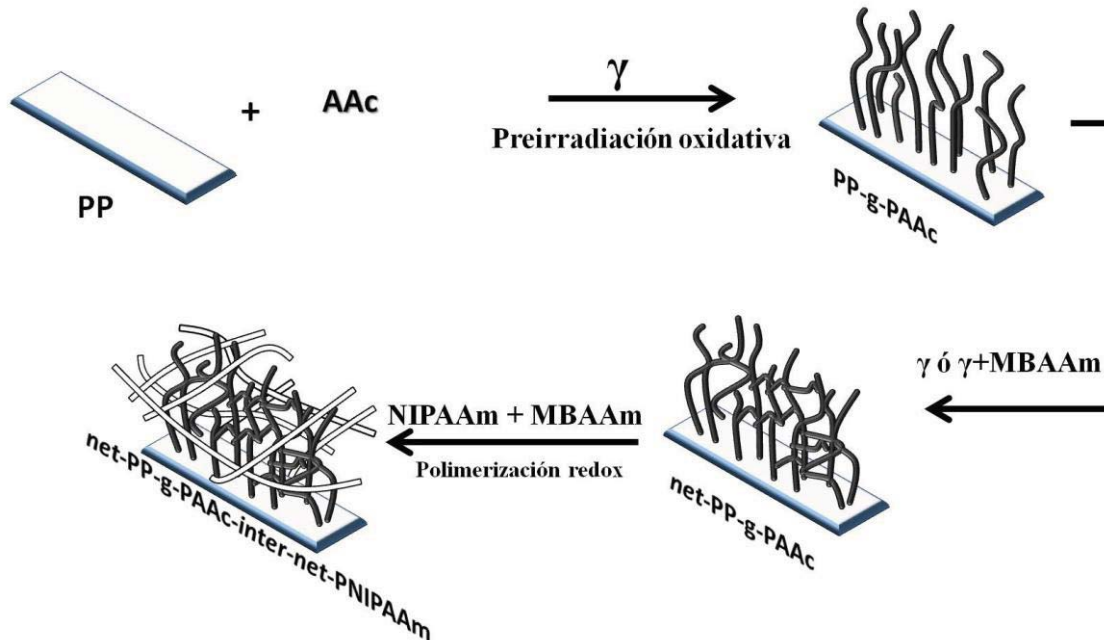


Figura 3.19. Representación esquemática para las etapas de polimerización seguidas en la síntesis de *net-PP-g-PAA-inter-net-PNIPAAm*

La nueva propuesta consistió en invertir el orden de los polímeros dados en la síntesis de las IPNs. Entonces, primero fue injertado PNIPAAm usando el método de preirradiación oxidativa a 30 kGy; luego fueron entrecruzadas las cadenas de PNIPAAm empleando el método de irradiación directa a 40 kGy, en presencia y ausencia de MBAAm; y finalmente, fue interpenetrada una red de PAAc, cuya síntesis fue llevada a cabo por polimerización redox, estimulada a su vez por luz UV (Ruiz et al. 2008). Las IPNs sintetizadas con este método presentaron una mayor capacidad para cargar y liberar vancomicina, así como para inhibir la formación de biopelículas con cepas de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA, Metilicín-resistente *S. aureus*). Sin embargo, la consideración teórica que relaciona el uso de iniciadores químicos con un aumento potencial en la toxicidad del polímero terminado -lo que resulta inapropiado para la aplicación biomédica del material-, hizo que la síntesis de las IPNs fuera replanteada, de modo que la radiación γ estuviera implicada en todas las etapas de preparación. Así, en el desarrollo de esa nueva metodología, durante la etapa final, las redes de PAAc fueron sintetizadas usando el método directo de irradiación a 2.5 kGy, en presencia de MBAAm, e hinchando la primer red en DMF para lograr una mayor adsorción de PAAc (valores y condiciones determinadas experimentalmente como óptimas) (Muñoz-Muñoz et al.

2009). De esta forma se logró aumentar considerablemente la concentración de PAAc en las IPNs, lo que sumado a un pretratamiento de lavado de los materiales en soluciones alcalinas para lograr promover la ionización de los grupos carboxílicos, hizo que la respuesta de los materiales a los cambios de temperatura y pH fuera más amplia, y que la cantidad de vancomicina cargada fuera 3 veces mayor a las reportadas en los estudios previos.

Para finalizar el estudio de estos materiales, en este trabajo de investigación doctoral también se presenta una propuesta adicional en la cual se sintetizan las IPNs *net-PP-g-PAA-inter-net-PNIPAAm* en función de la dosis de irradiación usada en la etapa de entrecruzamiento de PNIPAAm. La evaluación de esta variable en un rango comprendido desde 0 a 100 kGy, ofrece información importante sobre las condiciones óptimas para la formación de redes de PNIPAAm previamente injertadas sobre una matriz polimérica, en donde el uso o descarte del agente entrecruzante MBAAm sería determinado por las propiedades del material en cuanto a su sensibilidad al pH y temperatura del medio, y su capacidad para cargar o adsorber vancomicina. La descripción del procedimiento experimental, la correlación y discusión de los resultados obtenidos en este trabajo adicional, será desarrollada en los capítulos correspondientes. Se resalta que las condiciones óptimas encontradas para el entrecruzamiento de cadenas de PNIPAAm, fueron también aplicadas a la síntesis de IPNs sobre matrices de poliuretano TFX que se describe en esta tesis.

3.2. RADIACIÓN GAMMA (CONCEPTOS GENERALES)

Los radioisótopos naturales y artificiales (emisión de partículas alfa (α), partículas beta (β), radiación γ , rayos X y haces de partículas cargadas), hacen parte de los diferentes tipos de radiaciones ionizantes de alta energía que son usadas para iniciar reacciones químicas. Las más usadas para este fin son la radiación γ y los haces de electrones.

Los rayos γ son radiaciones electromagnéticas de la misma naturaleza que los rayos X, pero de menor longitud de onda. Su poder de penetración es muy elevado comparado con el de las partículas alfa o beta. La radiación γ se manifiesta en los procesos radiactivos como consecuencia de la relajación de un núcleo, que previamente haya sido excitado. Por lo tanto, los procesos donde se produce emisión de partículas alfa o beta, van acompañados de emisión de radiación electromagnética en forma de fotones (rayos γ). La desintegración del ^{60}Co es mostrada en la Figura 3.20. La formación del ^{60}Co proviene del proceso de captura de neutrones del ^{59}Co (estado natural) cuando es expuesto a un flujo de neutrones térmicos.

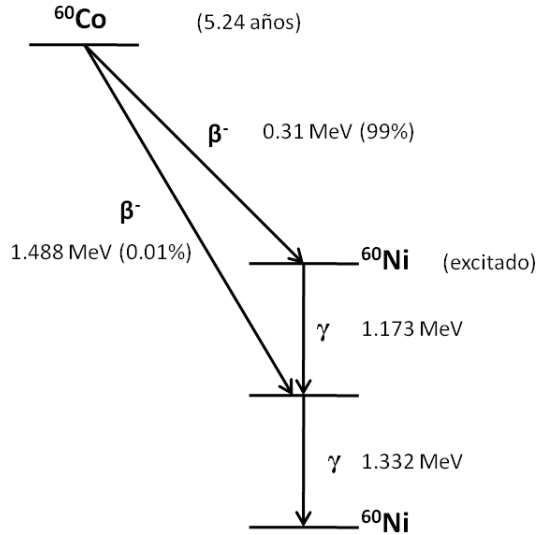


Figura 3.20. Decaimiento radiactivo del ^{60}Co .

La principal diferencia entre los rayos γ y los rayos X radica en que los primeros son producidos por reacciones nucleares, mientras que los rayos X son producidos por la desaceleración de electrones o por la excitación o transiciones de los electrones en los orbitales. La energía de un fotón de ambos tipos de radiación se relaciona con la siguiente ecuación:

$$E = \frac{hc}{\lambda} = h\nu \quad (3.1)$$

donde h es la constante de Planck, c es la velocidad de la luz, λ y ν son la longitud de onda y la frecuencia, respectivamente. Las longitudes de onda para este rango de radiación van desde 3×10^{-9} a 3×10^{-14} cm, lo que corresponde a energías de 40 keV a 4 MeV.

Las partículas α y β pierden energía gradualmente a través de una serie de pequeñas pérdidas de energía cuando interacciona con la materia. Por su lado, la radiación γ se compone de fotones, no consta de partículas, por lo que puede absorberse completamente con una probabilidad menor de interaccionar con la materia. Los rayos γ no presentan carga eléctrica, por ésta razón no sufren desviación en su trayectoria bajo la acción de campos eléctricos. Por consiguiente, la radiación γ tiene la capacidad de atravesar grandes espesores de material y causar la ionización de las moléculas en la materia. Este tipo de radiación puede expulsar un electrón de su trayectoria atómica y, a su vez, estos electrones pueden producir la ionización de nuevos átomos contenidos en el material. Dicho proceso se repetirá continuamente hasta que la energía de la radiación cese o se consuma.

Los tres mecanismos de interacción de la radiación γ con la materia son: el efecto fotoeléctrico, el efecto Compton y la producción de pares. El predominio de cada uno de estos mecanismos depende de la energía del fotón incidente y del número de protones del material de interacción. La importancia relativa de estos tres procesos de interacción, conforme al número atómico del absorbente (Z) y a la energía de la radiación γ incidente (E_γ), se muestra en la Figura 3.21. Tanto el efecto fotoeléctrico como el Compton, involucran interacciones con electrones orbitales de los átomos del material absorbente. La producción de pares se manifiesta para energías superiores a 1.02 MeV, que es la energía equivalente a la masa en reposo dos electrones.

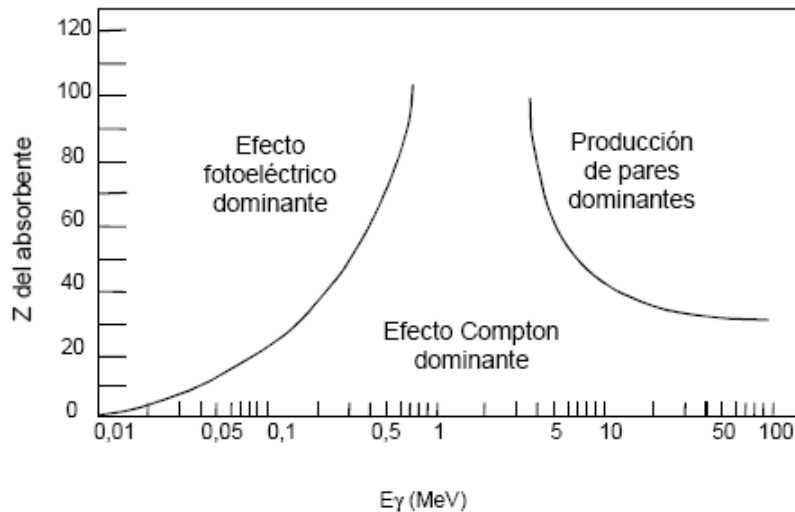


Figura 3.21. Importancia relativa de los tres tipos de interacciones principales de la radiación electromagnética con la materia. Dependencia del número atómico del absorbente (Z) con la energía de la radiación γ incidente (E_γ). (*Draganic y Draganic 1971*)

3.2.1. Unidades de irradiación

La unidad más empleada para medir la energía ionizante es el mega electrón volt (MeV), que es definido como un millón de veces la energía adquirida por un electrón cuando es acelerado por una diferencia de potencial de 1 volt. Una unidad de MeV equivale a 1.6×10^{-6} erg y a 3.827×10^{-14} calorías. Las unidades más empleadas en la irradiación nuclear de materiales son (*Navarrete 1993*):

- a. **Actividad (A):** se define como el número de núcleos decayendo (desintegración) por unidad de tiempo. Sus unidades son des/s o Becquerel (Bq), y Curie (Ci). $1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{ des/s}^{-1} = 3.7 \times 10^{10} \text{ Bq}$
- b. **Dosis Absorbida:** es la cantidad de energía depositada por unidad de masa. La dosis absorbida D se define como el cociente dE/dm , donde dE es la energía promedio depositada por la radiación ionizante en una porción de materia con masa dm ($D =$

dE/dm). La unidad empleada es el J/Kg, que se denomina Gray (Gy). El rad, nombrado así por sus siglas en inglés (Radiation Absorbed Dose), se define como la cantidad de radiación que deposita 10^{-2} J de energía en 1 Kg de material absorbente. Su equivalencia en Gray es la siguiente:

$$1 \text{ rad} = 0.01 \text{ Gy} \quad \text{ó} \quad 10\text{kGy} = 1\text{Mrad}$$

- c. **Intensidad (I):** representa la dosis absorbida por unidad de tiempo. Las unidades comúnmente utilizadas son $\text{J Kg}^{-1}\text{s}^{-1}$ ó rad/s
- d. **Dosis equivalente (H):** describe el efecto relativo de los distintos tipos de radiaciones ionizantes sobre los tejidos vivos. Sus unidades son Sievert (Sv) ó rem.
- e. **Rendimiento radioquímico (G(X)):** Este parámetro permite evaluar el número de transformaciones que se generan mediante la radiación por cada 100 eV. El número de transformaciones se refiere al número de iones, radicales, monómeros, moléculas, etc., formados durante el proceso de radiación. Otras unidades empleadas son mol/J ó $\mu\text{mol/J}$.

3.2.2. Factores que inciden en los procesos de injertos por radiación

- a. **Velocidad de polimerización:** este factor depende de la naturaleza del monómero. Generalmente, para que el proceso de injerto se lleve a cabo por radiación, el rendimiento radioquímico de asociación de radicales en el polímero ($G_{R*(P)}$) debe ser mayor que en el monómero ($G_{R*(M)}$). Esto significa que se requiere un mayor rendimiento de polimerización sobre las cadenas que se están injertando, de lo contrario, el proceso no se llevará a cabo o se obtendrán rendimientos bajos.
- b. **Intensidad de radiación (I):** la razón de dosis influye sobre la cinética de polimerización. A altas intensidades la polimerización vía radicales decrece debido que se facilita la recombinación de los macroradicales en reacción. La velocidad de injerto en muchos casos es proporcional a la raíz cuadrada de la intensidad de radiación ($V \sim I^{0.5}$).
- c. **Dosis (D):** A altas dosis la velocidad de polimerización aumenta debido al proceso de autoaceleración (efecto gel). Este es causado por un aumento en la viscosidad del sistema, lo que ocasiona un incremento en la velocidad de terminación, sin afectar la velocidad de propagación de las cadenas. Este proceso también depende de la naturaleza del monómero y de la intensidad de radiación.
- d. **Temperatura y concentración:** la velocidad de polimerización incrementa con la temperatura. Otras variables como la difusión del monómero, concentración, dosis, etc.,

combinadas con la temperatura pueden facilitar la formación de homopolímeros. Existe un valor límite considerado temperatura óptima, en ella se obtienen los mayores porcentajes de injerto y no se presenta la disolución del copolímero o la matriz polimérica. La velocidad de polimerización depende de la concentración de monómero empleado. No obstante, la concentración óptima depende también del método de irradiación elegido.

- e. **Disolvente:** tanto para el caso del método directo de irradiación como para el de preirradiación, se requiere una disolución completa del monómero. Para ello, tanto el monómero como el disolvente deben tener una estructura química similar. Los disolventes más empleados para este fin son el agua, metanol, etanol, acetona, hexano, tolueno y DMF. Las características que debe tener el disolvente son: disolver el monómero sin disolver el copolímero de injerto o la matriz polimérica a injertar y facilitar la difusión del monómero sobre la superficie a injertar.
- f. **Espesor:** el proceso de difusión del monómero depende del espesor de la material a injertar. Se ha encontrado que la velocidad de injerto es superior en polímeros en forma de películas delgadas, que en aquellos formando láminas más gruesas.

3.3. BIOMATERIALES

3.3.1. Biocompatibilidad y respuesta inflamatoria

Los biomateriales son materiales biológicamente inertes o compatibles, de origen natural o sintético, que se usan para controlar, suplir o reemplazar las funciones de tejidos del cuerpo humano (*Black 1992*). La biocompatibilidad de un material puede definirse como su capacidad para resistir cambios adversos en sus propiedades físicas, químicas, mecánicas y de superficie al entrar en contacto con fluidos corporales y tejidos vivos. Además, este material no debe dañar los tejidos próximos al lugar de implante, ni reducir los electrolitos o interferir en su metabolismo, no debe causar reacciones tóxicas, alérgicas y tumorales, ni debe destruir enzimas, proteínas plasmáticas o elementos de la sangre (*Katime 1995*). Este material debe soportar el proceso de esterilización sin deteriorarse en forma considerable.

Cuando la superficie de un biomaterial entra en contacto con los tejidos vivos, la respuesta del organismo depende de las características del mismo. Por lo tanto, el diseño propio y/o la modificación de una superficie son de considerable importancia para aumentar la compatibilidad de un biomaterial. Para el caso de compatibilidad con tejidos, dos clases de reacciones pueden llevarse a cabo: la inflamación y la inmunogenicidad. Mientras que para la compatibilidad con sangre, una reacción rápidamente generada puede ser la trombogenicidad (*Pendyala et al 2009*). Entonces, en la interacción con tejidos, una inevitable inflamación

puede surgir alrededor del material implantado, cuya función radica en facilitar la eliminación de restos de células muertas y la reparación tisular. Por consiguiente, un material con una óptima biocompatibilidad no debería aumentar la intensidad y la duración de la respuesta básica, ni prevenir a su vez la reparación del tejido (*Laurencin y Elgandy 1994*).

Otra característica a resaltar de la respuesta inflamatoria es la adhesión de leucocitos a las paredes de los vasos sanguíneos antes de migrar hacia el interior de los tejidos. Esta adhesión altamente específica se controla por tres familias principales de receptores: las selectinas, las integrinas y los miembros de la familia de la inmunoglobulina (*Jones et al. 1996*). La respuesta en fase aguda y específica del sistema inmune comprende también una red compleja de citocinas y anticitocinas. En particular, participan interferón γ (IFN- γ) (*Morimoto et al. 1987*), factor de necrosis tumoral (TNF) (*Dinarelli et al. 1986; Nagai et al. 1988*) e interleuquinas 1 y 6 (*Oppenheim et al. 1986*). Estas linfocinas o sus receptores, se pueden detectar en el rango de los primeros 2 a 4 días, en el sobrenadante del tejido o en la sangre circundante del lugar de aplicación del material (*Rihova 1996*).

La interacción entre un polímero y la sangre depende de varios parámetros que son determinados por la estructura (como cristalinidad, conformación molecular, rugosidad, rigidez y degradación), composición (como los grupos químicos asociados con el balance hidrofílico/hidrofóbico, cargas eléctricas, grupos ionizables y microdominios), dimensiones (como el área de superficie y medida) del material (*Tang y Eaton 1995; Babensee et al. 1998; Rihova 2000; Sieminski y Gooch 2000; Anderson et al. 2008*). No obstante, para los polímeros adaptados para su uso como dispositivos implantables, las características del individuo en el que se inserta el material también tiene una importancia relevante, como consecuencia de la amplia variabilidad entre pacientes (edad, sexo, enfermedades concurrentes, movilidad física, estilo de vida e historial de administración de medicamentos) (*Williams 2008*).

3.3.2. Infecciones relacionadas con dispositivos biomédicos

PE, PP y PS son algunos de los polímeros más populares en la industria manufacturera. Estos materiales presentan alta transparencia, buenas propiedades mecánicas, bajo costo y resistencia química, comparados con otros polímeros. Sin embargo, la alta hidrofobicidad en sus superficies hace que el crecimiento celular sea completamente inhibido. En consecuencia, a lo largo de los últimos años, muchas investigaciones se han centrado en la modificación de estas superficies para incrementar su hidrofiliidad y hacer que el crecimiento celular a niveles normales sea posible. Sin embargo, inmediatamente un dispositivo médico es insertado o implantado, se da inicio a una competencia por la colonización de su superficie. En este proceso, las proteínas son adsorbidas en el material, mientras las células huésped (plaquetas, células endoteliales, fibroblastos y macrófagos) y los microorganismos también

participan y en su intento también interaccionan con la proteína adsorbida. Las células que llegan primero dificultan o impiden la adherencia de aquellas que quedan atrás (Dwyer 2008; Alvarez-Lorenzo et al. 2010). Si la adhesión de macrófagos y de cuerpos extraños se presenta de manera predominante, la capacidad bactericida de estas células se reduce y su apoptosis es inducida, lo que contribuye a la persistencia de las infecciones causadas por microorganismos (por ejemplo bacterias) que permanecen en el dispositivo médico (incluso después de su esterilización) y/o son contaminados por contacto con la piel o mucosas del paciente en el momento de su inserción (infecciones nosocomiales) (Donlan y Costerton 2002). Las bacterias pueden colonizar en forma de biopelículas si los inóculos exceden los niveles umbrales o si las defensas están deterioradas (Snorraddottir et al. 2009). La naturaleza de la estructura de la biopelícula y su fisiología le confieren a los microorganismos que la componen, una inherente resistencia a los agentes antimicrobianos, independientemente si son antibióticos, desinfectantes o germicidas (Donlan y Costerton 2002). Esto implica que si los mecanismos de defensa y el tratamiento antibacterial suministrado sistémicamente no son capaces de detener la infección, se requerirá la remoción o reemplazo inmediato del material, lo que aumenta los costos del tratamiento (Schierholz y Beuth 2001; Raad y Hanna 2002). Uno de los mecanismos responsable de la resistencia está relacionado a la baja penetración del agente antimicrobiano a través de la matriz de la biopelícula y a la susceptibilidad de varios materiales a la adhesión bacteriana y a la formación de biopelículas, especialmente en matrices con carácter hidrofóbico. Por lo tanto, los polímeros comerciales como PE, PP, PS, PTFE y PET pueden ser funcionalizados con radiación γ para controlar su afinidad con compuestos bioactivos o para incluir agentes antisépticos, antibióticos o antiinflamatorios en el interior de la masa o sobre la superficie del dispositivo, con el propósito de liberar suficientes cantidades del compuesto activo, en una manera sostenida y en un ambiente local (Ruiz et al. 2007b). Tanto el PP y el PE han sido modificados con componentes sensibles a la temperatura y al pH, con el fin de cargar y liberar vancomicina desde su superficie (Williams et al. 1997; Burillo et al. 2007b; Ruiz et al. 2008).

Vancomicina es uno de los antibióticos usados con más frecuencia en el tratamiento contra infecciones producidas por estafilococos resistentes a penicilinas y meticilinas como el *S. aureus*, principalmente en el uso de catéteres. Es un antibiótico utilizado para infecciones ocasionadas por bacterias grampositivas y gramnegativas susceptibles. La vancomicina está indicada para el tratamiento de las infecciones graves causadas por cepas susceptibles de microorganismos. Su forma farmacéutica comercial es el clorhidrato de vancomicina y se administra por vía intravenosa, pues no se presenta absorción si se administra por vía oral. (Trissel 1994).

La vancomicina presenta un peso molecular de 1449.3 g/mol, lo que la clasifica como una molécula grande. Presenta seis valores de pKa, correspondientes a un grupo amino primario, uno secundario, un grupo carboxílico y tres grupos fenoles. En la Figura 3.22 se presenta la estructura química de la vancomicina.

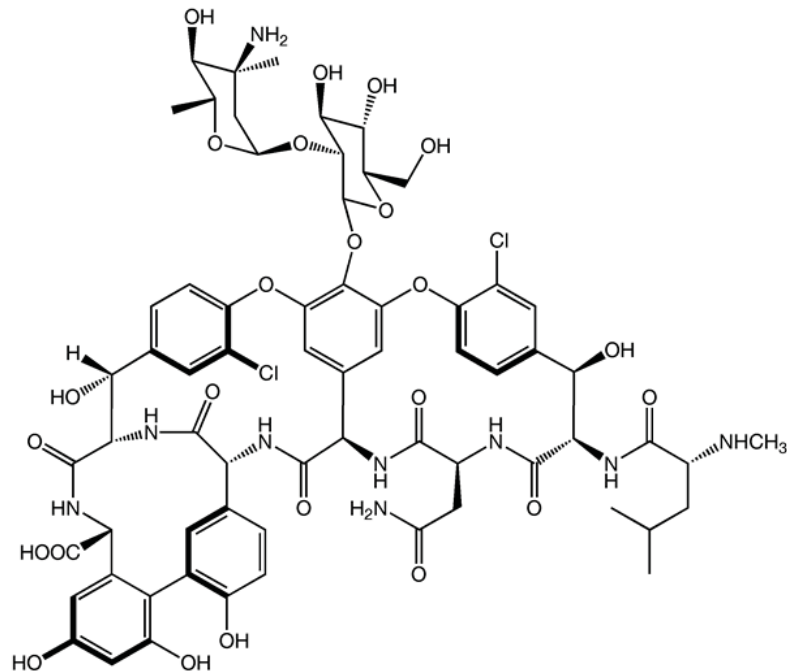


Figura 3.22. Estructura química de la vancomicina

En cuanto al espectro de actividad de este glucopéptido tricíclico, se requieren niveles de 100 $\mu\text{g/ml}$ o mayores para ejercer un efecto bactericida frente a *Enterococos faecium* y *Enterococos faecalis*, mientras que se necesitan niveles de 2 $\mu\text{g/ml}$ para tener acción bactericida frente a cepas de estafilococos. En adultos con función renal normal la dosis es de un 1g cada 12 horas (30 mg/kg). En pacientes graves la dosis puede ser aumentada a 1g cada 8 horas, los primeros días. Cada dosis debe administrarse en no menos de 60 minutos para minimizar los efectos adversos. Los niveles de fármaco deben ser controlados periódicamente mediante un monitoreo de su concentración sérica. En caso de insuficiencia renal la dosis tiene que ser modificada; iniciando con una dosis de 15 mg/kg para alcanzar niveles terapéuticos, y posteriormente, se ajusta según la función renal, siguiendo protocolos médicos determinados (Thomson 2005).

Capítulo 4.

PARTE EXPERIMENTAL

4.1. FUNCIONALIZACIÓN DE MATRICES DE POLIURETANO TECOFLEX[®] (TFX)

4.1.1. Materiales

Los catéteres umbilicales de la marca UMBILI-CATH[™], de un solo lumen, con propiedades radiopacas y fabricados con poliuretano Tecoflex[®] (TFX); se adquirieron de UTAH MEDICAL PRODUCTS., USA. Estos catéteres de TFX (TFXc), con 1.67 mm (5 Fr) de diámetro, se cortaron en piezas de 2.5 cm de longitud, luego fueron sometidos a dos ciclos de lavados con metanol, tolueno y etanol, por 24 horas en cada medio, y finalmente fueron secados a presión reducida, a una temperatura máxima de 40 °C. Las películas de poliuretano TFX (EG-93A) con 0.5 mm de espesor se adquirieron de Lubrizol Advanced Materials, Inc. Thermedics Polymer Products., USA. Estas películas de TFX (TFXp) se cortaron en piezas de 1.0 cm x 4.0 cm y fueron lavadas y secadas de la misma forma que TFXc. El compuesto N-isopropilacrilamida (97 %) (NIPAAm) y el ácido acrílico (AAc) se obtuvieron de Aldrich, Co., USA. NIPAAm fue purificado por recristalización en hexano/tolueno (1/1 v/v) y el AAc fue destilado al vacío. La N,N'-metilenbisacrilamida (MBAAm) se obtuvo de Sigma-Aldrich Co., USA, y fue usada como se recibió. El ácido bórico, ácido cítrico, etanol, hexano, metanol,

ortofosfato trisódico y tolueno fueron obtenidos de JT Baker., México; la seroalbúmina bovina (BSA) de Acros Organics., Bélgica; el ácido acético glacial, citrato de sodio, fibrinógeno y el hidróxido de sodio (NaOH) fueron obtenidos de Panreac Química S.A., España; el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el naftol azul-negro y el tampón de fosfatos a pH fisiológico (PBS pH 7.4, Physiological Buffer Solution) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co., España; el formaldehído de Scharlab S.L., España; el fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) de Merck., Alemania, y el clorohidrato de vancomicina de Roig Farma., España. Todos estos compuestos fueron usados como se recibieron. Los filtros de membrana de nitrocelulosa con tamaño de poro de 8.0 μm y 160 μm de espesor fueron obtenidos de Merck Millipore. El kit de detección de citotoxicidad de lactato deshidrogenasa (LDH) fue obtenido de Roche, España; el lipopolisacárido (LPS) fue obtenido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Para todos los experimentos relacionados con la síntesis de los polímeros, los estudios de hinchamiento y la carga-liberación de fármacos, se utilizó agua destilada; mientras que para todos los estudios de biocompatibilidad y citotoxicidad se usó agua milli-Q con una resistividad mínima de 18.2 $\text{M}\Omega\text{ cm}$, obtenida desde la máquina Millipore Iberica, España. La solución de tampón fosfato pH 7.4, adicional al PBS utilizado también en los experimentos de biocompatibilidad y citotoxicidad, fue preparada con soluciones 0.2 M de NaOH y 0.2 M de KH_2PO_4 .

4.1.2. Fuente de irradiación

La irradiación de los materiales fue realizada en el irradiador Gammabeam 651 PT de la Unidad de Irradiación y Seguridad Radiológica del Instituto de Ciencias Nucleares (ICN) de la UNAM. El irradiador contiene hasta 18 fuentes de ^{60}Co , emitiendo radiación γ en razones de dosis variables que son muy útiles para la irradiación de muestras poliméricas.

4.1.3. Injerto de PNIPAAm sobre TFXc y TFXp (TFX-*g*-PNIPAAm)

4.1.3.1. Método de preirradiación oxidativa (-P)

Los materiales TFX fueron injertados con PNIPAAm, aplicando el método de preirradiación oxidativa (método P). Para ello, los materiales fueron irradiados a temperatura ambiente, en presencia de aire, y en un rango de dosis de irradiación de 2.5 a 50 kGy, utilizando razones de dosis de 7.4 kGy/h. Cada muestra irradiada, previamente secada, fue depositada en una ampollita de vidrio que contenía 8 mL de solución acuosa de NIPAAm, a una concentración de 0.5 o 1.0 M. Cada ampollita fue saturada con argón durante 20 min y luego sellada, para inmediatamente someterla a calentamiento en baños termostáticos con temperaturas de 60 o 70 °C, a diferentes tiempos de reacción (45 a 20 min). Posteriormente, los polímeros injertados fueron lavados con agua durante 5 días (reemplazando constantemente el medio de lavado) y luego fueron secados a 40 °C, a presión reducida, durante 48 horas. Los porcentajes de injerto fueron calculados con la siguiente ecuación:

$$\text{Injerto (\%)} = [(W_f - W_i)/W_i] * 100 \quad (4.1)$$

en donde W_f es el peso final y W_i es el peso inicial.

En experimentos adicionales, los materiales TFXc fueron irradiados y sometidos a reacción en agua, sin la adición de NIPAAm, con el propósito de determinar posibles reacciones de degradación del material a las dosis de irradiación empleadas.

4.1.3.2. Método directo (-D)

Cada material TFX fue pesado y luego colocado en una ampolleta de vidrio que contenía 9 mL de solución de NIPAAm en tolueno (0.5 o 1.0 M). Cada ampolleta fue burbujeada con argón durante 20 minutos, luego fue sellada y posteriormente irradiada a diferentes dosis (de 2.5 a 50 kGy), usando intensidades de irradiación de 2.9, 7.4 o 9.2 kGy/h. Una vez terminado el proceso de irradiación, todas las muestras fueron lavadas con tolueno por 3 días (cambiando periódicamente el medio de lavado) y luego fueron lavadas con agua durante 7 días para lograr la eliminación total de monómero residual, homopolímero y disolvente. Los materiales injertados fueron secados a presión reducida, a temperaturas máximas entre 40-50 °C. Los porcentajes de injerto de NIPAAm fueron calculados empleando la ecuación 4.1.

4.1.4. Entrecruzamiento de las cadenas de PNIPAAm injertadas en TFXc y TFXp (*net*-TFX-*g*-PNIPAAm)

Cada material TFX-*g*-PNIPAAm seleccionado para este experimento, preparado con los métodos descritos en las secciones 4.1.3.1 y 4.1.3.2, fue colocado en una ampolleta de vidrio que contenía 8 mL de agua destilada. Cada ampolleta fue burbujeada con argón durante 20 minutos, luego fue sellada y posteriormente irradiada a dosis de 10 kGy e intensidades de irradiación entre 7.4 y 9.0 kGy/h. Todas las muestras sometidas a este proceso fueron lavadas en agua por 3 días y luego fueron secadas a presión reducida, a temperaturas máximas de 40 °C. Un exceso de gel formado en los procesos de lavado sobre la superficie de algunos materiales fue removido manualmente y de manera gradual en cada cambio del medio de lavado.

4.1.5. Injerto de redes de PNIPAAm (*net*-PNIPAAm) sobre TFXc (TFXc-*g*-*net*-PNIPAAm) por medio de un método de un solo paso.

Una red de PNIPAAm fue injertada sobre los tubos TFXc, en una única etapa de síntesis, aplicando el método de preirradiación oxidativa. La síntesis de TFXc-*g*-*net*-PNIPAAm fue llevada a cabo de una manera similar a la que se describe en la sección 4.1.3.1., en donde cada muestra es primero irradiada y luego sometida a reacción en una disolución acuosa de NIPAAm (0.25, 0.5 o 1.0 M), conteniendo además, diferentes concentraciones de MBAAm (de 0.05 a 2.0 % w/w). Para este proceso se aplicaron dosis entre 10 y 50 kGy, a razones de

irradiación entre 8.0 y 8.6 kGy/h. Las muestras injertadas con redes de PNIPAAm fueron lavadas con agua durante 5 días y luego secadas a presión reducida. La influencia de inhibidores de homopolimerización tales como FeSO_4 y $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (sal de Mohr), fue evaluada adicionando diferentes cantidades (desde 0.1 a 1.0 % w/w) de estos compuestos a la disolución de NIPAAm/MBAAm. La cantidad de injerto fue determinada con la ecuación 4.1.

4.1.6. Polimerización y entrecruzamiento de AAc en el interior de TFXc (TFXc-*inter-net*-PAAc)

La polimerización y entrecruzamiento simultaneo de PAAc por medio de irradiación γ fue llevado a cabo usando diferentes métodos, con el propósito de encontrar las condiciones adecuadas para la síntesis de redes poliméricas interpenetrantes (IPNs) en el interior de TFXc, sin que se promueva la formación de enlaces covalentes entre PAAc y la matriz polimérica, en una alta proporción. Para ello se utilizó una disolución acuosa de AAc (25 % v/v) con MBAAm (1% w/w). Las dosis empleadas estuvieron en el rango entre 0.5 y 3.0 kGy, a intensidades de 5.0 kGy/h. Una vez terminada la reacción, todos los productos obtenidos se sometieron a lavados con agua durante 5 días (removiendo manualmente el exceso de gel) y luego fueron secados al vacío, a 40 °C. La cantidad de PAAc incorporado fue medido por la diferencia de pesos de los polímeros antes y después de las correspondientes reacciones. Los métodos aplicados se describen a continuación:

4.1.6.1. Método directo (A)

Los tubos de TFXc, previamente pesados, fueron colocados en ampollas de vidrio que contenían 7 mL de la disolución de AAc/MBAAm. Después de 6 horas, la disolución fue removida, y los catéteres hinchados fueron inmediatamente congelados mientras eran desgasificados al vacío por 15 minutos. Luego las ampollas fueron selladas e inmediatamente irradiadas.

4.1.6.2. Método directo (B)

Para este experimento el procedimiento fue similar al descrito en el Método A (Sección 4.1.6.1), pero sin remover la disolución de AAc/MBAAm. Entonces, las ampollas que contenían al polímero, al monómero y al agente entrecruzante, fueron burbujeadas con argón por 20 min, luego fueron selladas, y finalmente irradiadas.

4.1.6.3. Método de preirradiación oxidativa (C)

Las muestras fueron irradiadas a temperatura ambiente, en presencia de aire. Luego fueron pesadas y colocadas en ampollas que contenían 7mL de disolución acuosa de AAc (25 % v/v), sin MBAAm. Cada ampollita fue burbujeada con argón por 20 min, sellada y luego calentada a 50 °C, durante los valores de tiempo correspondientes a los usados para

llevar a cabo la irradiación de las muestras en el método A y B (relacionados con la dosis e intensidad de irradiación usados), los cuales fueron 6, 12, 18, 24, 30 y 36 min.

4.1.6.4. Método de preirradiación (D_2)

Los materiales TFXc, previamente pesados, fueron colocados en tubos de ensayo, los cuales luego fueron sellados con septos de precisión (Precision Seal Septa, Aldrich Co., USA). Una vez impedida la entrada de aire al sistema, los tubos con la muestra fueron saturados con argón durante 20 minutos usando agujas de acero inoxidable para el transporte del gas. La solución de AAc/MBAAm, previamente burbujeada con argón en un sistema sellado, fue inyectada (7 mL) lentamente sobre cada tubo con muestra, de manera que se previniera la entrada de aire al sistema. Finalmente, la reacción fue llevada a cabo a temperatura ambiente, a los mismos tiempos de reacción reportados en el método C (Sección 4.1.6.3.).

4.1.7. Síntesis de IPNs y s-IPNs

Para la obtención de s-IPNs (TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc) o IPNs (*net*-TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc ó TFXc-*g-net*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc), las redes de PAAc fueron sintetizadas en el interior de los materiales previamente sintetizados con el procedimiento descrito en las secciones 4.1.3, 4.1.4 y 4.1.5., empleando el método A (Sección 4.1.6.1.) para estimular la polimerización y entrecruzamiento simultáneo del AAc, utilizando una dosis de irradiación de 1.5 kGy y una intensidad de 5 kGy/h. Los materiales obtenidos fueron lavados con agua durante 7 días (removiendo manualmente el exceso de gel) y luego fueron secados a presión reducida, a 40 °C. La cantidad de PAAc en las s-IPNs o IPNs fue evaluado por la diferencia de pesos obtenidos antes y después de la inclusión de PAAc.

4.1.8. FTIR de los materiales sintetizados

Los análisis de FTIR fueron realizados en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Spectrum 100 (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk CT), equipado 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. Las superficies de cada material (tubo y película) fueron analizadas y a los espectros obtenidos se le realizó una corrección de línea base, por medio del software Spectrum instalado en el equipo.

4.1.9. Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) y espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDX).

Los materiales TFXc modificados y no modificados fueron observados en un microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM, por sus siglas en inglés) EVO LS₁₅ (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Alemania). Para su análisis, las muestras fueron previamente hinchadas en tampón fosfato pH 7.4, durante 12 horas. Luego fueron sumergidos en nitrógeno líquido para ser fracturados criogénicamente en dirección transversal. La

observación fue realizada a temperatura y presión variable (de 7 °C; 650 Pa hasta 35 °C; 10 Pa), usando un detector de electrones retrodispersados (BSE, por sus siglas en inglés). Los aumentos para las vistas transversales fueron 500x.

Un análisis cualitativo y semicuantitativo de la composición química elemental de los materiales TFX (catéter y película) fue determinado por espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDX, Energy-dispersive X ray spectroscopy) en EVO LS₁₅, a una resolución de 129 ev y WD 8.5. La porción radiopaca de los catéteres TFX también fue analizada por esta técnica. El análisis EDX se realizó para obtener información con respecto a la cuantificación elemental de la superficie y la distribución de los componentes en el material. Para fines comparativos, la distribución individual de cada elemento fue convertida en imágenes diferenciadas por color. Los colores de cada elemento fueron asignados aleatoriamente.

4.1.10. Análisis térmico

Los termogramas de DSC (Calorimetría Diferencial de Barrido) fueron obtenidos en un equipo DSC 2010 TA Instruments (New Castle DE, USA) a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, en un rango de 30 a 300 °C, en atmósfera de nitrógeno (60 mL/min), calibrado con indio. La estabilidad térmica fue determinada en un equipo análisis termogravimétrico, TGA Q50 (TA Instruments, New Castle, DE, USA), usando un programa de calentamiento de 10 °C/min, desde 25 hasta 600 °C.

4.1.11. Estudios de hinchamiento

Los estudios de hinchamiento se llevaron a cabo por la inmersión de los materiales en una disolución tampón pH 7.0, a 25 °C, registrando su peso a diferentes intervalos de tiempo. Cuando los polímeros fueron retirados temporalmente de la disolución, se removió cuidadosamente el exceso de líquido con un papel adsorbente. Los porcentajes de hinchamiento fueron calculados con la siguiente ecuación:

$$\text{Hinchamiento (\%)} = \left[\frac{W_t - W_i}{W_i} \right] * 100 \quad (4.2)$$

donde W_t y W_i son el peso del material en hinchamiento y seco, respectivamente. Los hinchamientos límites (W_∞) fueron determinados después de alcanzar el equilibrio. La relación entre el grado de hinchamiento de las muestras a 10 y 50 ° C, se utilizó para cuantificar la capacidad de respuesta de la temperatura, de la siguiente manera:

$$\text{Termosensibilidad} = S_T = S_{EH}/S_{EC} \quad (4.3)$$

donde S_{EH} es el mayor porcentaje de hinchamiento (estado hinchado) y S_{EC} es el menor porcentaje de hinchamiento alcanzado (estado colapsado), para el rango de temperatura estudiado. La temperatura crítica de solución (LCST) de los materiales fue asignada como el punto medio de inflexión de las tendencias mostradas en las gráficas de Hinchamiento (%) vs. temperatura. Estos puntos fueron calculados usando el software OriginPro[®], mediante la función sigmoïdal de Boltzman.

La sensibilidad al pH fue estimada a 25 °C, usando la relación entre el mayor grado de hinchamiento ($S_{H\ pH}$) y el porcentaje de hinchamiento en el estado colapsado ($S_{C\ pH}$), de la siguiente manera:

$$\text{Sensibilidad al pH} = S_{pH} = S_{H\ pH}/S_{C\ pH} \quad (4.4)$$

El pH crítico fue calculado de las graficas de Hinchamiento (%) vs. pH, de la misma manera en que se determinó la LCST. Para todos los estudios de hinchamiento se utilizó un sistema universal de disoluciones tampón en un rango de pH 2 a 11. Estos sistemas fueron preparados a partir de una disolución compuesta de ácido bórico (0.2 M) y ácido cítrico (0.05 M), y de una segunda disolución de ortofosfato trisódico (0.1 M) (*Perrin 1994*). Cantidades fijas de cada disolución fueron mezcladas para producir las soluciones tampón con el valor de pH deseado. Los valores de pH fueron determinados en un potenciómetro HI 4212 (Hanna Instruments, CA. USA).

4.1.12. Carga de vancomicina

Las s-IPNs e IPNs sintetizadas fueron inmersas en un medio alcalino (pH 8.0) a 5 °C, por un periodo de tiempo de 24 horas. Posteriormente, algunos materiales fueron secados a 40 °C (a presión reducida), mientras que otros fueron usados en su estado de máximo hinchamiento a 25 °C. Las muestras fueron sumergidas en 5 mL de disolución acuosa de vancomicina (0.4 mg/mL), a 5 °C, durante 4 días, y protegidas de la luz. Las concentraciones de vancomicina fueron determinadas en un espectrofotómetro UV-vis (Varian Cary 100 UV-vis, Palo Alto, CA, USA) a 280 nm, y la cantidad cargada en cada polímero fue calculada de la diferencia entre su concentración inicial y final. Las concentraciones del fármaco fueron evaluadas a diferentes tiempos hasta alcanzar el equilibrio de absorción (70 horas para la carga en polímeros hinchados y 100 horas para la carga en materiales secos). Finalmente, algunos polímeros sometidos al proceso de carga con vancomicina fueron inmediatamente secados a 40 °C (a presión reducida), mientras que otros fueron conservados en la disolución de vancomicina para realizar estudios de liberación desde los materiales hinchados.

4.1.13. Ensayo microbiológico

Las pruebas microbiológicas se llevaron a cabo con el método estandarizado de difusión de discos de Kirby-Bauer (*Scott y Higham 2003*). Para ello, piezas de IPNs y s-IPNs, en

estado hinchado, fueron cortadas en discos de 9 mm (para películas) y en tubos con 1 cm de longitud (para catéteres). Posteriormente, las muestras fueron sumergidas en tampón fosfato pH 7.4, por 24 horas, para luego realizar la carga de vancomicina desde los materiales hinchados, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.1.12. La cantidad de vancomicina fue cuantificada después de las 70 horas del proceso de carga, mientras que los polímeros cargados con el fármaco fueron colocados en placas de agar Mueller-Hinton (MH agar médium, OXOID, England) que habían sido inoculada con *Estafilococos aureus* (ATCC 25923). Las muestras en los medios de cultivo fueron incubadas a 37 °C, durante 24 horas. Este procedimiento también fue aplicado a los polímeros sin fármaco. La prueba se realizó colocando dos muestras por placa (una cargada con fármaco y otra sin carga). Después de la incubación, se examinó las zonas de inhibición alrededor de los materiales TFX. La zona de inhibición fue delimitada como el diámetro del disco formado por la ausencia de crecimiento bacteriano. El ensayo microbiológico fue repetido usando polímeros que habían sido sometidos a esterilización por autoclave (121 °C, 20 min). Estos polímeros fueron autoclavados estando sumergidos en tampón fosfato pH 7.4. Para estos materiales, la carga de vancomicina fue realizada bajo condiciones estériles, usando disoluciones de vancomicina filtradas a través de membranas con tamaño de poro de 0.22 µm.

4.1.14. Estudios de liberación de vancomicina

Las s-IPNs e IPNs cargadas con vancomicina, en estado seco e hinchado, fueron transferidas a tubos de ensayo que contenían 5 mL de tampón fosfato pH 7.4 (fuerza iónica de 0.27), los cuales fueron mantenidos durante todo el estudio a una temperatura constante de 37 °C, con la ayuda de un baño térmico. La concentración de vancomicina liberada con el tiempo fue medida espectrofotométricamente a 280 nm, dentro de las primeras 48 horas de estudio.

4.1.15. Adsorción de proteínas

La adsorción de seroalbúmina bovina (BSA) y fibrinógeno fue llevada a cabo mediante la aplicación del "ensayo amido-black" (*Dieckman-Schuppert y Schnittler 1997; Zha et al. 2009*). Para ello, TFXp y sus materiales derivados fueron lavados durante tres días con agua milli-Q, (cambiando continuamente el medio) y por otro tiempo similar con tampón fosfato pH 7.4. Posteriormente, cada material, en su estado hinchado (sin carga de vancomicina), fue cortado en discos de 9 mm de diámetro con una pinza sacabocados, y luego depositado en un tubo Eppendorf (con baja adsorción proteica) de 2 mL. De manera similar, discos de Nitrocelulosa (de 9 mm de diámetro) fueron depositados en tubos Eppendorf, para usarse como controles positivos, mientras que los tubos vacíos funcionaron como controles negativos. Luego, a cada tubo se le adicionó 600 µL de disolución acuosa de fibrinógeno (3 mg/mL) o de BSA (30 mg/mL), dependiendo de la proteína a identificar. Una vez adicionada la disolución de proteína, las muestras fueron incubadas por 1h, a 37 °C. Finalizado el proceso de incubación, cada muestra fue lavada, en dos ciclos, adicionando 1 mL de agua

desionizada a cada tubo; subsecuentemente, a cada muestra se le adicionó una disolución de tinción, la cual contenía 45 mL de metanol, 45 mL de agua, 10 mL de ácido acético glacial y 100 mg de naftol. Después de tres minutos de iniciada la tinción, las muestras fueron lavados, en dos ciclos, usando una "disolución de lavado" compuesta de metanol (90 %), agua (8 %) y ácido acético glacial (2 %); luego fueron lavadas dos veces más con agua. Una disolución eluyente, preparada previamente con 50 % de etanol y 50 % de una disolución acuosa con 50 mM de NaOH y con 0.1 mM de EDTA, fue adicionada en todos los tubos, en una cantidad de 600 μ L; luego, fueron sometidos a agitación (300 rpm, 37 °C, 30 min) y a centrifugación (3000g, 3 min, 25 °C) para lograr remover el colorante enlazado a la superficie. Finalmente, las disoluciones resultantes en cada tubo fueron transferidas a una placa de 96 pocillos para determinar las concentraciones de proteína por medio de la absorción medida fotométricamente a 595 nm en un lector de placas (FLUOstar OPTIMA Multidetecction Microplate Reader de BMG Labtech, Offenburg, Alemania). Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado para cada material analizado. La cantidad de proteína enlazada fue calculada a partir de una curva de calibración trazada con concentraciones conocidas de disoluciones de proteína. Los controles positivos de nitrocelulosa fueron medidos por triplicado.

4.1.16. Prueba de hemólisis

Sangre de ratas Sprague-Dawley se recolectó en tubos de ensayo, a los cuales se les adicionó citrato de sodio (3.8 % w/w) en una relación 9:1, para impedir su coagulación. Se tomó la precaución de utilizar la sangre dentro de las primeras 24 horas, después de su recolección. Para el experimento, TFXc modificado y sin modificar, fueron cortados en piezas de 1 cm de longitud, fueron hinchados en tampón fosfato pH 7.4 por 24 h, y luego fueron colocados en tubos plásticos que contenían 5 mL de PBS. Posteriormente, 0.25 mL de sangre fue adicionada a cada tubo y luego fueron sometidos a incubación durante 60 minutos a 37 °C. Después de este tiempo, los tubos con las muestras y la sangre fueron centrifugados a 700g por 10 minutos. El porcentaje de hemólisis fue determinado por la absorbancia del plasma sobrenadante, medida en un espectrofotómetro UV-vis (Agilent 8453, Alemania), a 542 nm. Los controles positivos fueron obtenidos por la adición de 0.25 mL de sangre diluida a 5 mL de agua, mientras que los controles negativos fueron obtenidos por la adición de la misma cantidad de sangre a 5 mL de PBS. Un porcentaje de hemólisis menor a 5 % es considerado como un nivel permisible para un material. La prueba fue realizada por duplicado en cada material estudiado.

4.1.17. Prueba de trombogenicidad

Los estudios de formación de trombos se realizaron mediante el "método cinético" *in vitro* reportado por Imai y Nose (Imai y Nose 1972). Para ello, la sangre recolectada de ratas Sprague-Dawley fue preparada con citrato de sodio, como se describe en la prueba de hemólisis (sección 4.1.16). Los materiales TFXp modificados y no modificados fueron

cortados en piezas de 1 x 1 cm, y luego fueron hinchados en tampón fosfato pH 7.4, a 37 °C, por 2h. Posteriormente, las películas fueron removidas del medio de hinchamiento y fueron colocadas inmediatamente sobre cajas Petri. Luego, 0.1 mL de sangre fue adicionada lentamente sobre cada película, de tal forma que no fuera derramada sobre la caja Petri. Para iniciar el proceso de coagulación, se adicionó 0.01 mL de disolución de CaCl₂ (0.1 M) sobre la superficie del polímero cubierta previamente con la sangre. Después de 30 minutos, la reacción fue detenida por la adición de agua (2.5 mL). El coagulo formado fue removido cuidadosamente desde la película con la ayuda de una espátula, y fue fijado con 5 mL de una disolución acuosa de formaldehído (37 % v/v). Finalmente, el coagulo fue secado a vacío (a temperatura ambiente) y pesado. Los controles positivos fueron llevados a cabo de manera similar, pero adicionando la sangre directamente sobre la caja Petri. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

4.1.18. Citocompatibilidad

Células RAW 264.7, una línea celular de macrófagos de ratón (ATCC, Manassas, VA), se mantuvieron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DEMEM-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). El medio fue mantenido en una incubadora humidificada a 5 % CO₂:95 % aire y 37 °C. Las células fueron sembradas (1×10^5 , 2mL) sobre una placa para cultivo celular de poliestireno de 24 pocillos, a los cuales se le colocó las piezas (1 x 1 cm) de TFXp modificado (IPNs). Estos polímeros fueron previamente hinchados en PBS por 24 horas y luego algunos fueron esterilizados por autoclave (121 °C, 20 min), mientras que otros fueron esterilizados por exposición a radiación UV durante 2 horas. Entre los polímeros autoclavados, una parte fue de ellos fue cargado con vancomicina, bajo condiciones estériles, preparando la disolución del fármaco con agua milli-Q también esterilizada con el proceso de autoclave, para luego filtrarla con membranas 0.22 µm. Los procesos de carga fueron llevados a cabo en campanas de flujo laminar, para evitar cualquier tipo de contaminación externa. Alícuotas de 500 µL del medio de cultivo fueron colectadas a las 24 y 72 horas (1 y 3 días) e inmediatamente congeladas a -20 °C; cada alícuota fue reemplazada con 500 µL del medio fresco. Los experimentos fueron llevados a cabo por duplicado para cada material. Los controles negativos (medio celular sin muestra de polímero) y positivos (células en medio de cultivo con 1µg/mL de LPS) fueron procesados de forma paralela. Las células fueron fotografiadas en un microscopio a una magnificación de 200x.

4.1.18.1. Determinación de la viabilidad celular

La supervivencia de células cultivadas en presencia de las IPNs fue evaluada a 1 y 3 días, usando un Kit^{PLUS} de detección de citotoxicidad. La absorbancia del sistema a 490 nm fue medida usando un lector de placas (Bio-Rad 680 Microplate Reader, USA).

4.1.18.2. Determinación de producción de óxido nítrico (NO)

La producción de NO fue determinada por medición del nitrato producido en el sobrenadante del cultivo celular conteniendo los polímeros, a 24 y 72 horas. Alícuotas de 80 μL del sobrenadante fueron mezcladas con 100 μL de reactivo de Griess (Saad *et al.* 1997; Ding *et al.* 1998) y después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, las absorbancias fueron medidas a 550 nm en un lector de placas. La concentración de NO fue cuantificada por medio de una curva de calibración trazada con concentraciones conocidas (0 – 15 μM) de nitrato de sodio.

4.1.18.3. Cuantificación de producción de TNF- α

Los niveles de TNF- α en el sobrenadante de las células cultivadas sobre los polímeros fueron cuantificados por el ensayo específico inmunoenzimático (ELISA por sus siglas en inglés) (Bender MedSystems GmbH, Austria), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. La absorbancia fue medida a 450 nm en un lector de placas. La producción de TNF- α en el sobrenadante las células cultivadas en presencia de LPS (10 ng/mL) y las células cultivadas en un medio sin la presencia de las películas IPNs, se utilizaron como controles positivo y negativo, respectivamente.

4.2. SÍNTESIS DE IPNs DE PNIPAAm/PAAC SOBRE POLIPROPILENO (PP) POR RADIACIÓN γ : INFLUENCIA DE LA DOSIS SOBRE EL ENTRECRUZAMIENTO DE CADENAS DE PNIPAAm (TRABAJO ADICIONAL)

4.2.1. Materiales

Películas de PP con 71 % de cristalinidad y 60 μm fueron obtenidas de PEMEX, México. La descripción de los demás materiales empleados se encuentra en la Sección 4.1.1.

4.2.2. Injerto de PNIPAAm sobre PP (PP-*g*-PNIPAAm)

Las películas de PP fueron irradiadas en aire con radiación γ de ^{60}Co en el irradiador Gammabeam 651 PT, a razones de dosis entre 7.9 – 9.2 kGy/h y a una dosis de 30 kGy. Las muestras irradiadas fueron colocadas en ampollitas de vidrio conteniendo disolución acuosa de NIPAAm (0.5 M), las cuales fueron saturadas con argón por 20 min, luego fueron selladas y finalmente calentadas a 70 °C durante 50 – 75 minutos para obtener el porcentaje de injerto deseado. Los polímeros injertados fueron lavados con agua durante 24 horas (reemplazando constantemente el medio) y luego fueron secados a 40 °C por 35 horas. Los porcentajes de injerto fueron calculados como la ecuación 4.1.

4.2.3. Entrecruzamiento de cadenas de PNIPAAm injertadas sobre PP (*net-PP-g-PNIPAAm*)

Cada PP-*g*-PNIPAAm fue colocado en una ampollita de vidrio con agua destilada (7 mL) y fue entrecruzada por uno de los siguientes métodos:

4.2.3.1. Método A

Las ampollitas conteniendo PP-*g*-PNIPAAm fueron saturadas con argón (20 min), selladas e irradiadas a una intensidad de 10.8 kGy/h, usando dosis de 10, 40, 70 y 100 kGy.

4.2.3.2. Método B

Los materiales PP-*g*-PNIPAAm fueron entrecruzados como se describe en el método A (4.2.3.1.), pero con la adición del agente entrecruzante MBAAm (0.05 M). Los sistemas entrecruzados fueron inmersos en agua por 24 horas y luego fueron secados al vacío, a 40 °C.

4.2.4. Síntesis de hidrogeles de PAAc

Hidrogeles de PAAc fueron sintetizados por irradiación directa, en atmósfera inerte, de soluciones de AAc (25 % v/v) con MBAAm (1 % w/w) en agua o en DMF, usando tubos de vidrio de 5 mm de diámetro. Estas ampollitas fueron irradiadas a dosis de 2.5, 5 o 10 kGy, usando razones de dosis de 5.0 kGy/h para estimular la polimerización y el entrecruzamiento de AAc. Los hidrogeles fueron lavados con agua (durante 7 días), cortados en discos de 3mm aproximadamente, removiendo irregularidades en el polímero con la ayuda de un papel lija.

4.2.5. Síntesis de redes interpenetradas de AAc en *net-PP-g-PNIPAAm*

Para obtener IPNs *net-PP-g-PNIPAAm-inter-net-PAAc*, las redes de PAAc fueron sintetizadas en el interior de las cadenas de PNIPAAm entrecruzadas. Para ello, las películas entrecruzadas *net-PP-g-PNIPAAm* fueron colocadas en ampollitas conteniendo disolución de AAc:MBAAm (25 % v/v: 1 % w/w) en DMF, durante 12 horas para asegurar el hinchamiento de los materiales. Después de este periodo de tiempo, la disolución fue removida, las películas hinchadas fueron colocadas en tubos en forma de L (para mantener una posición horizontal) e inmediatamente fueron congeladas en nitrógeno líquido mientras simultáneamente eran desgasificadas. Luego de que las ampollitas fueran selladas, fueron irradiadas a dosis de 2.5 kGy, usando intensidades de dosis de 5.0 kGy/h. Posteriormente, los productos fueron lavados con agua por 72 h, y secados a 40 °C (a presión reducida). La cantidad de PAAc en la IPN fue calculada con la diferencia de pesos del material antes y después de la reacción.

4.2.6. Estudios de hinchamiento

Los polímeros secos de PP-*g*-PNIPAAm, *net-PP-g-PNIPAAm* y *net-PP-g-PNIPAAm-inter-net-PAAc* fueron inmersos en agua y pesados a diferentes tiempos. Los hinchamientos límites obtenidos a diferentes temperaturas fue calculado con la ecuación 4.2. La termosensibilidad a

a 20 y 50 °C fue calculada con la ecuación 4.3. La sensibilidad al pH, estudiada entre un rango de pH 2.2 y 9.0, a 25 °C, fue calculada con la ecuación 4.4, usando disoluciones tampón de Na₂HPO₄/ácido cítrico. La LCST y el pH crítico fueron estimados como se describe en la Sección 4.1.11.

4.2.7. Ángulo de contacto

Las mediciones de ángulo de contacto fueron llevadas a cabo por triplicado, en un rango de temperatura entre 24 y 38 °C, usando un aparato KRUSS DSA 100 (Matthews NC, USA), equipado con una cámara para el control de temperatura. Pequeñas gotas de agua fueron depositadas a diferentes temperaturas sobre los materiales PP-*g*-PNIPAAm, *net*-PP-*g*-PNIPAAm y *net*-PP-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc, y el ángulo fue medido después de 1 min. La LCST fue estimada como el punto medio de inflexión en las graficas de ángulo de contacto vs., temperatura.

4.2.8. Análisis térmico

Los termogramas DSC fueron obtenidos como se describe en la Sección 4.1.10.

4.2.9. Carga de vancomicina

Las piezas de *net*-PP-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc (entre 8 y 12 mg) fueron inmersas en tampón fosfato pH 8.0 por 5 h (tiempo determinado en estudios previos) y secadas a 40 °C durante 24 horas. Luego, cada pieza del material fue colocada en 5 mL de disolución acuosa de vancomicina (0.4 mg/mL), a 20 °C, por 72 horas, protegiendo los sistemas de luz. La cantidad de vancomicina cargada fue determinada espectrofotométricamente, como se describe en la Sección 4.1.12. Posteriormente, todos los polímeros cargados fueron secados a 40 °C y almacenados a temperatura ambiente en contenedores de plástico sellados.

4.2.10. Liberación de vancomicina

Los experimentos de cesión de vancomicina desde los polímeros modificados de PP fueron llevados a cabo por triplicado, siguiendo el procedimiento descrito en la Sección 4.1.14. Los perfiles de liberación del fármaco hasta una fracción liberada de 0.6 fueron ajustados a la ecuación de Higuchi:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_H t^{1/2} \quad (4.5)$$

donde M_t y M_∞ representan la cantidad de vancomicina liberada al tiempo t y al final de los estudios de liberación, respectivamente. La constante de velocidad de liberación K_H fue estimada por regresión lineal.

La cantidad de vancomicina liberada por unidad de área de superficie (teniendo en cuenta los dos lados de la película) durante intervalos de tiempo cortos, fue determinada con la siguiente ecuación (Ruiz et al, 2008):

$$ARR = \frac{\Delta M_t / \Delta t}{A} \quad (4.6)$$

donde ΔM_t representa la variación de la cantidad de vancomicina acumulada durante los intervalos de tiempo Δt , y A es el área del polímero. El flujo mínimo requerido de vancomicina que se debe liberar para generar la muerte bacteriana, también conocido como velocidad de liberación mínima bactericida (N_{kill}) requerida sobre la interface local, fue estimada usando la siguiente ecuación (Kwok et al. 1999):

$$\frac{C_s}{N_{kill} r_0 / D} = G \left[\frac{x/r_0}{Re Sc} \right]^{1/3} \quad (4.7)$$

donde C_s es la concentración de la superficie (0.5 $\mu\text{g/mL}$); r_0 es el radio hidráulico efectivo (0.3 cm); x es la distancia axial desde la entrada ($x/r_0 = 0.1$); D es la difusividad de la vancomicina en el fluido ($2.73 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$); $G (= 1.22)$ es una constante para la geometría de liberación en tubos; Re es el número de Reynolds, con valor de 200 para flujos laminares; Sc es el número de Schmidt (viscosidad cinemática/difusividad = 4.0×10^5).

4.2.11. Análisis estadístico

El efecto de el injerto de PNIPAAm, de la dosis de entrecruzamiento de cadenas de PNIPAAm injertadas, y la adición de agente entrecruzante, sobre la cantidad de vancomicina cargada, (mg/g PP) fue analizada a través de regresión lineal múltiple (Statgraphics Plus para Windows 5.1, Statistical Graphics Corporation, Warrenton, VA., USA). Los niveles de entrecruzamiento introducidos en el análisis estadístico fue 0 (sin MBAAm) o 1 (MBAAm 0.5 M). Los efectos lineales y cuadráticos (cuando fue posible) y las interacciones lineales de las variables independientes, fueron considerados para el análisis estadístico. ANOVA fue usada para identificar los términos significativos ($\alpha < 0.05$). Las ecuaciones de regresión fueron usadas para trazar las graficas de superficies usando el software Statgraphics Plus 5.1.

Capítulo 5.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1. FUNCIONALIZACIÓN DE MATRICES DE POLIURETANO TECOFLEX[®] (TFX)

5.1.1. Preparación de injerto de PNIPAAm sobre TFX (TFX-*g*-PNIPAAm)

5.1.1.1. Método de preirradiación oxidativa (P)

Los materiales TFXc (catéter) y TFXp (películas) fueron modificados con PNIPAAm usando el método de preirradiación oxidativa (método P). Las muestras de TFX exhibieron un incremento gradual en su espesor después de la reacción de injerto. Los cambios dimensionales provocados por el injerto sobre los catéteres y películas, afectó principalmente su diámetro o su espesor. Esto indica que la modificación por medio del método P, ocurrió principalmente sobre la superficie del material. Los mecanismos de injerto estimulados por radiación que sugieren la modificación preferencial de los segmentos amorfos una matriz polimérica, ya han sido estudiados en detalle (*Chapiro 1962; Woods y Pikaev 1994*).

Los porcentajes de injerto obtenidos usando disoluciones acuosas de NIPAAm (0.5 y 1 M), a tiempos de reacción fijos de 3h y a 70 °C, en función de la dosis de irradiación, son

mostrados en la Figura 5.1. Los grados de injerto aumentan progresivamente y alcanzan un máximo a 15 kGy, cuando la concentración de NIPAAm es 0.5 M. Luego, estos niveles decrecen significativamente con el incremento de la dosis. Cuando la concentración de NIPAAm es 1 M, el máximo porcentaje de injerto es desplazado a 10 kGy. La modificación por este método, en función de la dosis de irradiación, fue llevada a cabo por triplicado.

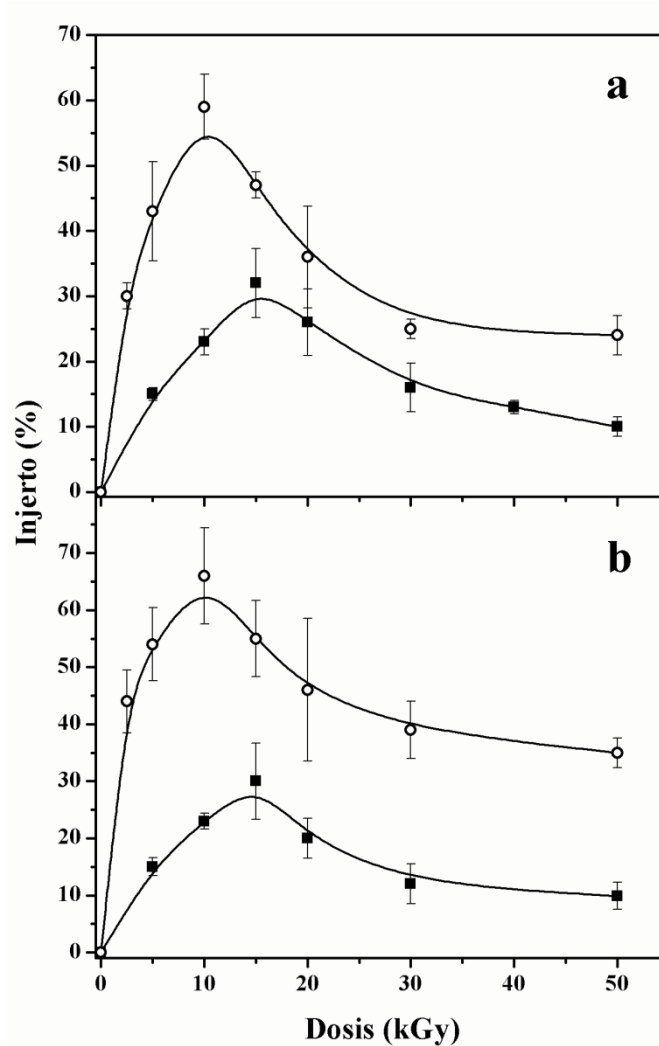


Figura 5.1. Injerto de PNIPAAm sobre TFXc (a) y TFXp (b), usando el método P, como función de la dosis de irradiación, para dos disoluciones acuosas de NIPAAm: 0.5 M (■) y 1 M (○). Razón de dosis = 7.4 kGy/h; temperatura = 70 °C; y tiempo de reacción = 3 h.

Los cambios de peso como función de la dosis de irradiación aplicada sobre las matrices poliméricas de TFXc sin modificar, fueron estudiados con el propósito de descartar posibles pérdidas de fragmentos del material debidas a los procesos de degradación estimulados por la radiación γ , los cuales podrían afectar directamente el proceso de injerto. La escisión de cadenas poliméricas provocada por el proceso de irradiación, puede producir el

desprendimiento, a bajas temperaturas, de pequeños fragmentos de cadena, lo que reduce el peso del material, dificultando así la cuantificación exacta de los grados de modificación. Entonces, en un intento por comprender los fenómenos ocurridos en el proceso de injerto de PNIPAAm sobre TFX (Fig. 5.1), se llevó a cabo la irradiación de TFXc, bajo condiciones de reacción similares a las usadas en el método P, pero sin incluir al monómero NIPAAm. Los resultados son mostrados en la Figura 5.2, en ella se observa que la pérdida de peso en la matriz polimérica no es significativa ($0.1 \pm 0.05 - 0.35\% \pm 0.05$) en el rango de dosis usadas para las reacciones de injerto (< 50 kGy), mientras que a valores de dosis por encima de 60 kGy, la pérdida empieza a ser considerable. La pérdida de peso fue medida después de los procesos de lavados. Los experimentos fueron realizados por duplicado.

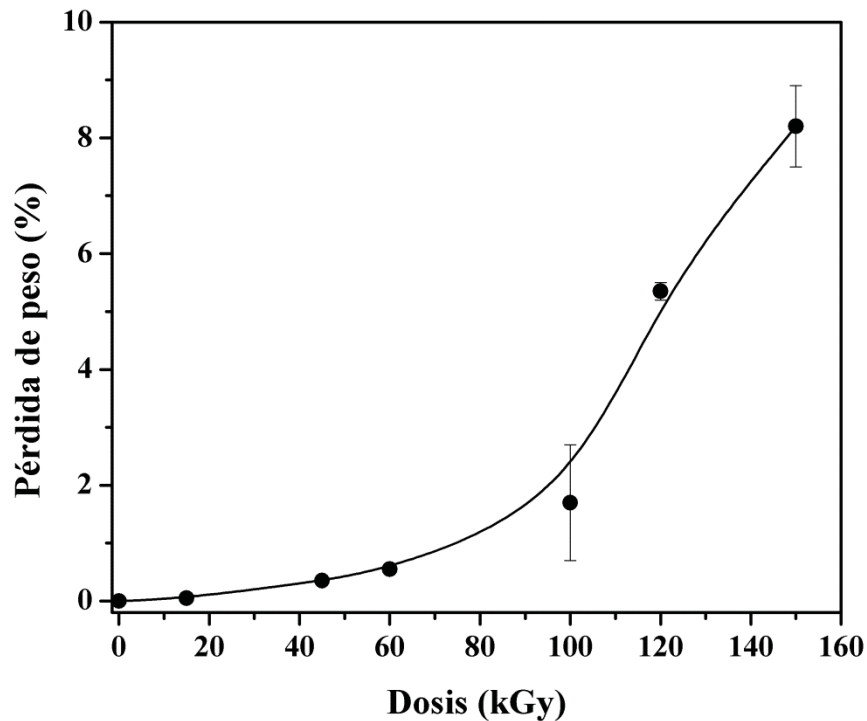


Figura 5.2. Pérdida de peso para los catéteres TFX, como función de la dosis de irradiación (método de P). Razón de irradiación = 7.4 kGy/h; temperatura de reacción en agua = 70°C; tiempo de reacción = 3 h.

Guignot y colaboradores (Guignot *et al.* 2001) estudiaron la influencia de la irradiación con haces de electrones acelerados sobre películas TFX, con el propósito de evaluar la resistencia de estos materiales a procesos de esterilización, a escala industrial, con este tipo de radiación ionizante. Para ello usaron una razón de dosis de 5 MGy/h y dosis de irradiación en un rango de 25 a 1000 kGy, aplicadas en presencia de oxígeno. Ellos reportaron una significativa reducción en los pesos moleculares (M_n y M_w) del polímero cuando las dosis de irradiación

superaban los 100 kGy, y concluyeron que la irradiación con haces de electrones acelerados puede inducir simultáneamente la escisión y el entrecruzamiento de las cadenas de TFX.

Las evidencias experimentales mostradas en la Figura 5.2 concuerdan, en cierta medida, con los estudios realizados por Guignot. Por lo tanto, al correlacionar estos resultados con los mostrados en la Figura 5.1, se concluye que los niveles de degradación o pérdida de peso encontrados a dosis superiores a los 60 kGy, no afecta directamente el proceso de injerto de PNIPAAm sobre TFX en los rangos de dosis evaluados por aplicación del método P. En su lugar, el decrecimiento presentado en los porcentajes de injerto se atribuye a la dificultad de difusión del monómero sobre la superficie de la matriz polimérica activada por la radiación y/o a la recombinación de radicales libres entre las cadenas del polímero. Es por ello que el proceso de injerto resulta controlado por la concentración de monómero inicial y por la concentración de radicales libres producidos en el polímero y el monómero al momento de iniciar la reacción por aplicación de calor (ver mecanismo de método de preirradiación oxidativa en Figura 3.14). En consecuencia, la fracción creciente y el máximo porcentaje de injerto alcanzado en la tendencia (Fig. 5.1), pueden ser explicados considerando que una mayor cantidad de radicales libres son producidos sobre la superficie del polímero con el aumento de la dosis, y que ellos pueden participar masivamente en la reacción cuando la concentración de monómero está sobre niveles que aseguren su difusión sobre la matriz (concentraciones altas), antes de que se produzca la recombinación de radicales (o su desactivación por reacciones secundarias) entre las cadenas que la componen. Esto quiere decir que una mayor concentración de monómero se relaciona a la obtención de mayores cantidades de injerto. Sin embargo, la homopolimerización resulta predominante cuando la cantidad de radicales formados es demasiado alta. Esto genera un incremento en la viscosidad del medio de reacción y hace que, para nuestro caso, la difusión de NIPAAm sobre la superficie de TFX se dificulte, causando entonces que la recombinación de radicales entre las cadenas de la matriz sea más favorable, y en consecuencia, se produzca un decrecimiento en el proceso de injerto. Entonces, bajo las condiciones de reacción empleadas, a dosis superiores a los 10 (para NIPAAm 1 M) o 15 kGy (para NIPAAm 0.5 M), es muy probable que las reacciones de recombinación entre los radicales producidos en el substrato polimérico sean promovidas y que la producción de injerto se vea reducida.

Una alta concentración de monómero incrementa los gradientes de difusión sobre la superficie del polímero, lo que resulta en un alto grado de injerto a bajas dosis. Sin embargo, y tal como ocurre cuando una alta concentración de radicales libres es generada en el medio de reacción, una concentración muy alta de monómero hace que la homopolimerización también sea predominante, pues la reacción de recombinación de cadenas de homopolímero en crecimiento se vuelve más probable que su respectiva reacción con los radicales libres generados en la matriz polimérica para poder producir el injerto. Es por eso que las concentraciones de NIPAAm superiores a 1 M fueron descartadas en este estudio, debido a

los altos contenidos de hopolímero que generan, lo que dificulta la extracción del polímero al final de la reacción, convirtiéndolo en un proceso tedioso y económicamente no viable por el consumo excesivo del monómero. Concentraciones inferiores a 0.5 M condujo a porcentajes de injerto muy bajos (~ 10 % a 20 kGy), los cuales no resultaron de interés para los objetivos de este trabajo. El valor de dosis de irradiación y la concentración de monómero a la cual se presentó el mayor porcentaje de injerto (10 kGy y 1M), fue la combinación elegida para continuar con el estudio.

La temperatura y el tiempo de reacción son variables de influencia sobre el proceso de injerto. En la Figura 5.3 se muestra la relación entre los porcentajes de injerto a diferentes temperaturas, como función del tiempo de reacción, usando intensidades de dosis de 7.4 kGy/h, y las condiciones preestablecidas de dosis (10 kGy) y concentración de NIPAAm (1 M, en disolución acuosa). La cantidad de PNIPAAm injertado aumentó con el incremento de la temperatura y del tiempo de reacción. Un aumento de la temperatura produce una mayor descomposición de los peróxidos e hidroperóxidos generados en el proceso de preirradiación en aire, los cuales a su vez cumplen la función de iniciar la polimerización del monómero; además, también acelera la recombinación entre las especies radicalarias formadas. Una temperatura muy alta puede conducir a bajos porcentajes de injerto, por el incremento en las reacciones de terminación por combinación, propias de un mecanismo de polimerización por radicales libres. Este efecto también puede ser obtenido usando temperatura demasiado baja, ya que puede generar una baja concentración de radicales en el medio, conduciendo a injertos significativamente bajos (*Chapiro 1962*).

Las modificaciones realizadas en los catéteres y películas, aplicando el método P, mostraron resultados muy similares. La comparación de estos dos materiales fue planteada considerando lo siguiente: (1) que dado el hecho de que existe una amplia gama de poliuretanos Tecoflex® (TFX) en el mercado, y de que las especificaciones técnicas de los catéteres usados no son plenamente conocidas, por tratarse de un secreto comercial, se propuso utilizar también las películas como patrón de referencia, puesto que de forma certificada, estas se encuentran fabricadas específicamente de un poliuretano TFX con grado EG-93A, del cual se tiene mayor conocimiento; (2) que una fracción de los catéteres usados contiene propiedades radiopacas, característica que puede tener influencia sobre las reacciones de modificación propuestas, por lo que comparación con un material de referencia (sin propiedades radiopacas) resultaría de vital importancia; y (3) que es conveniente demostrar que un determinado polímero, adaptado como dispositivo biomédico, puede ser funcionalizado independientemente de sus forma o distribuciones espaciales, siempre y cuando presente una misma o similar composición en todas sus presentaciones comerciales.

Tres niveles de injerto fueron elegidos para los estudios posteriores: 40, 60 y 80 %. Los materiales con porcentajes menores a 40 % presentaron una baja sensibilidad a la

temperatura, mientras que aquellos modificados con niveles superiores a 80 % mostraron un incremento considerable en el grosor a nivel de su superficie, incorporando así una alta irregularidad y rigidez en el polímero, cualidad que no resulta favorable para la aplicación de estos materiales como dispositivos implantables. Por lo tanto, los polímeros modificados con estos grados de injerto fueron descartados para realizar estudios posteriores.

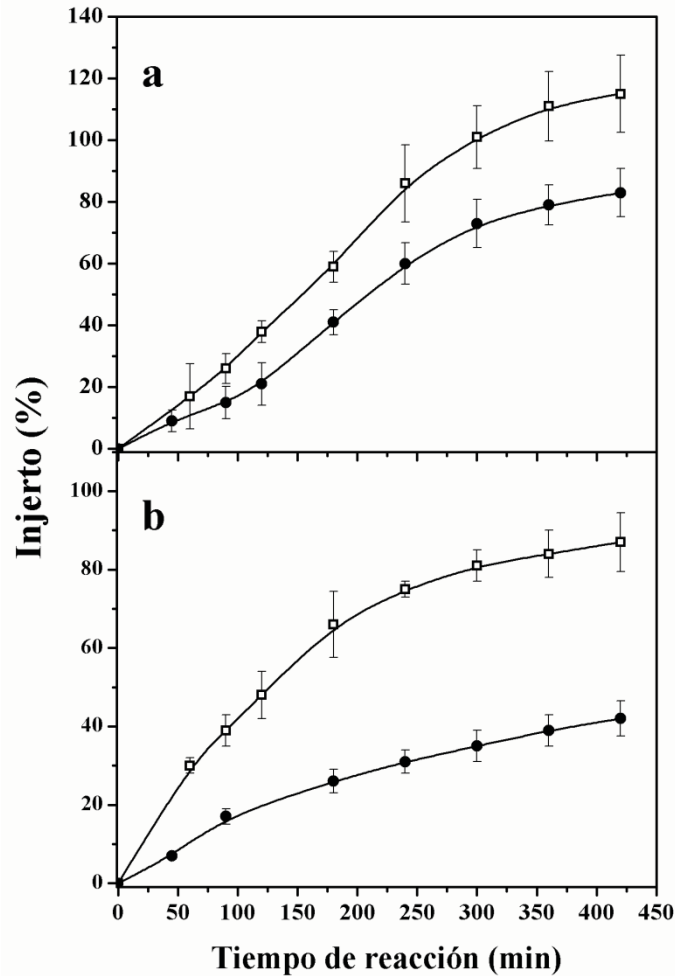


Figura 5.3. Injerto de PNIPAAm sobre TFX (TFX-*g*-PNIPAAm) en catéteres (a) y películas (b), como función del tiempo de reacción, para dos temperaturas: 60 °C (●) and 70 °C (□). Método P; Dosis = 10 kGy; Razón de dosis = 7.4 kGy/h; y NIPAAm_{ac} = 1M.

La síntesis de los materiales con los porcentajes de injerto elegidos fue altamente reproducible a las condiciones de reacción escogidas como óptimas para la dosis, intensidad, concentración de NIPAAm, temperatura y tiempos de reacción: 10 kGy, 7.3 kGy/h, 1 M, 70 °C y de 100 a 250 min, respectivamente. En la Tabla 5.1 se muestran los porcentajes de injerto de los sistemas sintetizados y sus respectivas composiciones, incluyendo los

materiales cuyo procedimiento de modificación será discutido posteriormente (entrecruzados, s-IPNs e IPNs). Por ahora se resalta que cada nivel de injerto conduce a tres tipos adicionales de funcionalización: (i) TFX-*g*-PNIPAAm, que será designado como "**I_xP**", donde **I** indica "injertado", **x** es el porcentaje de PNIPAAm injertado y **P** indica que el proceso de injerto fue llevado a cabo por el método P; (ii) *net*-TFX-*g*-PNIPAAm, designado como "**E_xP**", donde **E** indica "entrecruzado"; (iii) TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc, designado como "**s-IPN_xP**"; y (iv) *net*-TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc, designado como "**IPN_xP**", donde **x** y **P** tienen el mismo significado que en (i). **-c** y **-p** indican que la modificación fue realizada sobre el catéter o sobre la película, respectivamente. Para cada nivel de injerto se sintetizaron en promedio de 4 a 6 materiales; la variación estadística de cada conjunto se encuentra reportada en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Composición de polímeros TFXc y TFXp modificados con PNIPAAm/PAAc aplicando el método de preirradiación oxidativa (**P**) para las reacciones de injerto. **I** indica injerto (TFX-*g*-PNIPAAm), **E** entrecruzado (*net*-TFX-*g*-PNIPAAm), **IPN** hace referencia a los materiales con PAAc interpenetrado en los sistemas entrecruzados (*net*-TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc) y **s-IPN** a las redes de PAAc interpenetradas en los sistemas injertados (TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc).

Catéter Código	PNIPAAm injertado (%)	<i>net</i> -PAAc interpenetrado		Película Código	PNIPAAm injertado (%)	<i>net</i> -PAAc interpenetrado	
		PNIPAAm/PAAc (% mol/ % mol)	TFXc- <i>g</i> -IPN (%)			PNIPAAm/PAAc (% mol/ % mol)	TFXp- <i>g</i> -IPN (%)
<i>I40P-c</i>	40 (±1.4)	-	-	<i>I40P-p</i>	41 (±2.0)	-	-
<i>E40P-c</i>	38 (±2.0)	-	-	<i>E40P-p</i>	37 (±3.4)	-	-
<i>IPN40P-c</i>	43 (±1.0)	32/68 (±1.1)	96 (±3.2)	<i>IPN40P-p</i>	43 (±3.6)	26/74 (±1.5)	119 (±1.1)
<i>s-IPN40P-c</i>	40 (±1.4)	28/72 (±1.3)	106 (±3.4)	<i>s-IPN40P-p</i>	42 (±4.0)	25/75 (±1.1)	123 (±6.4)
<i>I60P-c</i>	63 (±1.6)	-	-	<i>I60P-p</i>	61 (±1.6)	-	-
<i>E60P-c</i>	58 (±0.5)	-	-	<i>E60P-p</i>	62 (±2.4)	-	-
<i>IPN60P-c</i>	63 (±1.3)	35/65 (±1.0)	131 (±4.7)	<i>IPN60P-p</i>	62 (±2.2)	33/67 (±3.0)	147 (±3.8)
<i>s-IPN60P-c</i>	59 (±3.8)	30/70 (±1.3)	139 (±6.1)	<i>s-IPN60P-p</i>	61 (±3.2)	30/70 (±1.2)	158 (±9.1)
<i>I80P-c</i>	82 (±2.4)	-	-	<i>I80P-p</i>	81 (±1.3)	-	-
<i>E80P-c</i>	79 (±5.0)	-	-	<i>E80P-p</i>	82 (±1.4)	-	-
<i>IPN80P-c</i>	82 (±5.5)	34/66 (±4.4)	183 (±6.1)	<i>IPN80P-p</i>	82 (±2.0)	34/66 (±3.7)	175 (±8.4)
<i>s-IPN80P-c</i>	77 (±6.0)	37/63 (±4.0)	162 (±2.2)	<i>s-IPN80P-p</i>	79 (±1.2)	36/64 (±2.9)	162 (±6.5)

5.1.1.2. Método directo (D)

Como otra alternativa de funcionalización, PNIPAAm fue injertado sobre TFX aplicando un método de irradiación directa (método D). Para ello, los materiales fueron irradiados en ausencia de oxígeno, mientras se encontraban inmersos en una disolución de NIPAAm, usando tolueno como disolvente, el cual se caracteriza por producir altos hinchamientos en las matrices de poliuretano (desde 400 a 500 %). Después de llevar a cabo la reacción de

injerto por este método, los materiales exhibieron un incremento gradual de su grosor y una expansión en todas sus dimensiones (longitud y diámetro en catéteres; largo y ancho en películas), lo cual confirmó que el injerto ocurrió en la masa de la matriz polimérica. La relación entre la cantidad de PNIPAAm injertada y la dosis de irradiación aplicada, para concentraciones de NIPAAm de 0.5 y 1 M, a intensidades de irradiación de 7.4 kGy/h, es mostrada en la Figura 5.4. Los porcentajes de injerto fueron más altos cuando los polímeros fueron irradiados en NIPAAm 1 M. Esto significa que la difusión y reactividad de NIPAAm en la matriz polimérica aumenta con el incremento de su concentración. Por lo tanto, la eficiencia de injerto a altas concentraciones de monómero también está relacionada con la habilidad de los materiales TFX para absorber el disolvente.

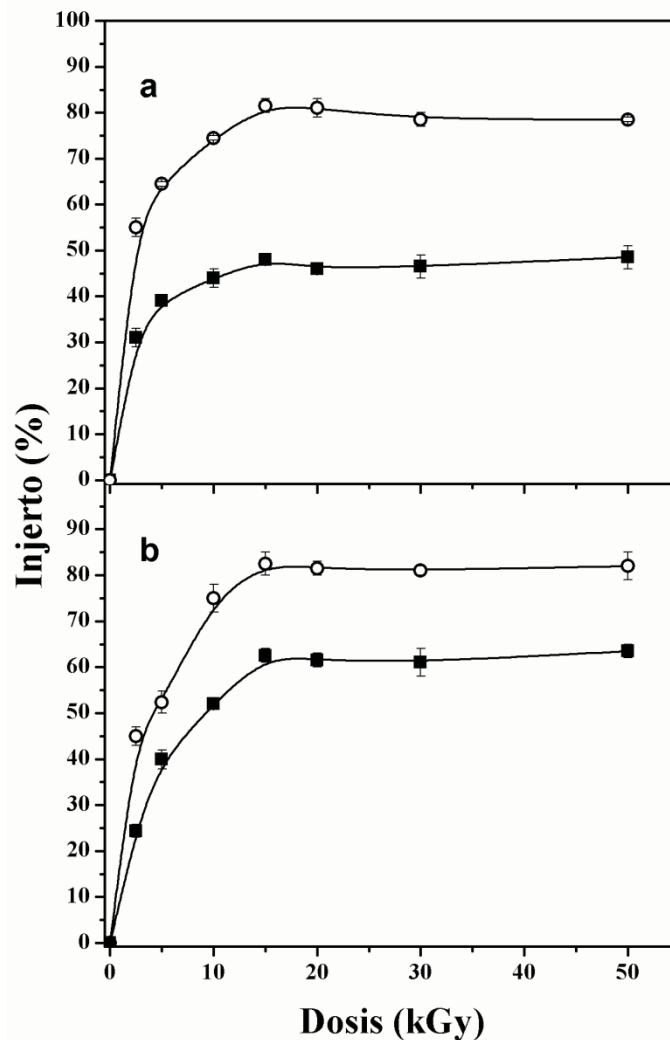


Figura 5.4. Injerto de PNIPAAm en TFXc (a) y TFXp (b) como función de la dosis de irradiación, aplicando el método D, para dos concentraciones de NIPAAm en tolueno: 0.5 M (■) y 1 M (○). Razón de dosis = 7.4 kGy/h.

Para ambos materiales, TFXc y TFXp, niveles constantes de injerto fueron alcanzados a 15 kGy. La alta absorción del monómero en TFX, previo al proceso de irradiación, hace que los niveles de injerto permanezcan constantes, incluso a altas dosis, pues la proporción de reacciones entre monómero-polímero permanecerá relativamente invariable. Para efectos comparativos, los porcentajes de injerto seleccionados para estudios posteriores fueron los mismos que en el método P: 40, 60 y 80 % (obtenidos a 5 kGy-0.5 M; 5 kGy-1 M; y 15 kGy-1 M, respectivamente). La síntesis de estos materiales a las concentraciones monoméricas y los valores de dosis elegidos, fue altamente reproducible, es decir, con valores de porcentajes de injerto con desviaciones estándar no significativas para cada sistema. Todos los materiales funcionalizados por este método de irradiación fueron nombrados de manera similar los obtenidos con el método de preirradiación, pero cambiando la "**P**" por "**D**". Los códigos asignados y la composición de todos los polímeros modificados por el método D se encuentran en la Tabla 2, en donde también se incluyen los materiales entrecruzados, s-IPNs e IPNs, cuyo procedimiento de síntesis será discutido más adelante.

Tabla 5.2. Composición de polímeros TFXc y TFXp modificados con PNIPAAm/PAAc aplicando el método de irradiación directa (**D**) para las reacciones de injerto. **I** indica injerto (TFX-*g*-PNIPAAm), **E** entrecruzado (*net*-TFX-*g*-PNIPAAm), **IPN** hace referencia a los materiales con PAAc interpenetrado en los sistemas entrecruzados (*net*-TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc) y **s-IPN** a las redes de PAAc interpenetradas en los sistemas injertados (TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc).

Catéter Código	PNIPAAm injertado (%)	<i>net</i> -PAAc interpenetrado		Película Código	PNIPAAm injertado (%)	<i>net</i> -PAAc interpenetrado	
		PNIPAAm/PAAc (% mol/ % mol)	TFXc- <i>g</i> -IPN (%)			PNIPAAm/PAAc (% mol/ % mol)	TFXp- <i>g</i> -IPN (%)
<i>I40D-c</i>	41 (±0.9)	-	-	<i>I40D-p</i>	41 (±3.3)	-	-
<i>E40D-c</i>	40 (±1.6)	-	-	<i>E40D-p</i>	37 (±4.0)	-	-
<i>IPN40D-c</i>	40 (±0.9)	24/76 (±0.6)	111 (±3.7)	<i>IPN40D-p</i>	38 (±1.7)	22/78 (±1.8)	102 (±1.8)
<i>s-IPN40D-c</i>	40 (±2.2)	24/76 (±0.2)	115 (±4.3)	<i>s-IPN40D-p</i>	37 (±1.2)	21/79 (±0.1)	103 (±3.0)
<i>I60D-c</i>	59 (±0.7)	-	-	<i>I60D-p</i>	63 (±1.3)	-	-
<i>E60D-c</i>	60 (±1.1)	-	-	<i>E60D-p</i>	65 (±0.7)	-	-
<i>IPN60D-c</i>	62 (±2.7)	30/70 (±0.5)	148 (±2.3)	<i>IPN60D-p</i>	65 (±0.2)	31/69 (±1.1)	156 (±5.7)
<i>s-IPN60D-c</i>	59 (±1.0)	29/71 (±0.2)	149 (±2.8)	<i>s-IPN60D-p</i>	64 (±1.6)	30/70 (±2.9)	160 (±1.4)
<i>I80D-c</i>	79 (±1.1)	-	-	<i>I80D-p</i>	77 (±1.6)	-	-
<i>E80D-c</i>	79 (±1.4)	-	-	<i>E80D-p</i>	80 (±1.9)	-	-
<i>IPN80D-c</i>	81 (±2.1)	33/67 (±0.6)	170 (±4.1)	<i>IPN80D-p</i>	79 (±3.1)	35/65 (±1.3)	164 (±6.8)
<i>s-IPN80D-c</i>	80 (±1.5)	32/68 (±1.2)	180 (±0.1)	<i>s-IPN80D-p</i>	75 (±2.2)	35/65 (±2.2)	169 (±6.5)

El efecto de la razón de dosis sobre la cantidad de PNIPAAm injertado se muestra en la Figura 5.5. La influencia sobre los porcentajes de injerto no es significativa para los tres valores de razón de dosis estudiados. 9.2 y 2.9 kGy/h fueron los niveles máximos e inferiores

de intensidad disponibles para nuestros estudios, usando la fuente de ^{60}Co en el Gammabeam 651 PT. Estas posiciones dependen de un estudio completo de dosimetría para conocer la cantidad de energía que llega a determinada distancia de la fuente de irradiación.

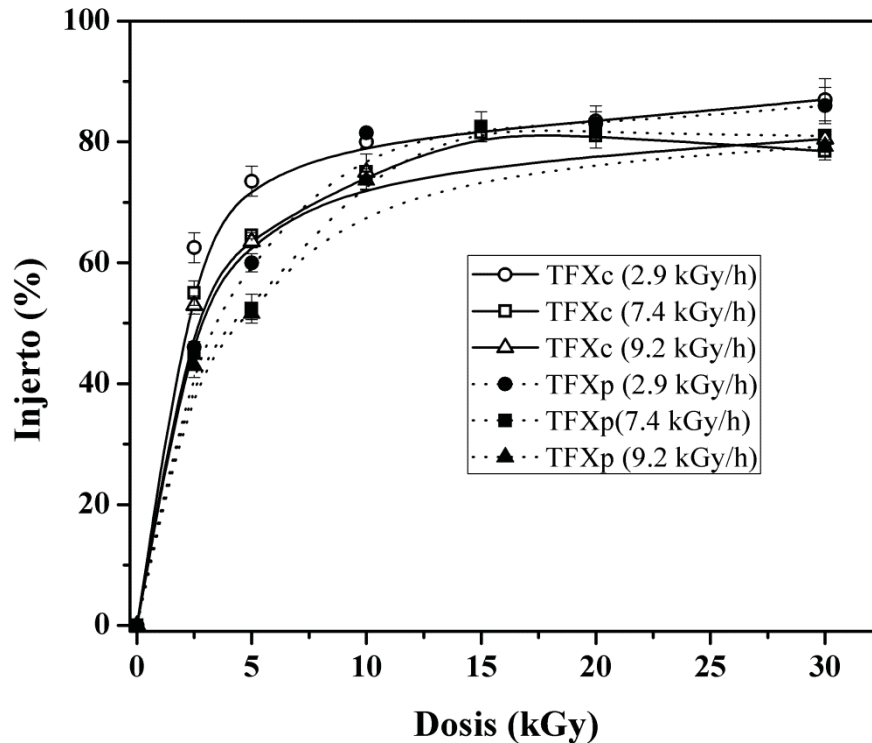


Figura 5.5. Injerto de PNIPAAm en TFX catéter y película, aplicando el método D, como función de la dosis, para NIPAAm 1 M en tolueno y a tres diferentes intensidades de dosis: 2.9, 7.4 y 9.2 kGy/h.

5.1.2. Entrecruzamiento de las cadenas de PNIPAAm injertadas sobre TFXc y TFXf (*net*-TFX-*g*-PNIPAAm)

El entrecruzamiento de todos los sistemas TFX-*g*-PNIPAAm, aplicando irradiación directa, fue llevado a cabo en agua, a 10 kGy. Todos los polímeros sometidos a la reacción de entrecruzamiento son denotados con "E" y sus composiciones se encuentran consignadas en la Tabla 5.1 (para el entrecruzamiento de cadenas de PNIPAAm injertadas con el método P) y en la Tabla 5.2 (para el entrecruzamiento de los sistemas injertados por método D). La dosis de entrecruzamiento (10 kGy) adecuada para unir cadenas de PNIPAAm previamente injertadas fue determinada en un trabajo adicional descrito en la Sección 5.2, el cual fue reportado en una revista de arbitraje internacional (*Muñoz-Muñoz et al. 2012*). En esa investigación, dos métodos de entrecruzamiento fueron comparados usando diferentes dosis de irradiación (de 0 a 100 kGy): un método consistió en la aplicación de radiación γ para producir el entrecruzamiento, mientras que en otro se usó el efecto combinado de la radiación y la adición de un agente entrecruzante (MBAAm). Al final se concluyó que el agente entrecruzante solo causa un decrecimiento en los niveles de hinchamiento de los

materiales estudiados, mientras que los polímeros obtenidos en ausencia de MBAAm, a 10 kGy, presentaron una mayor capacidad para cargar vancomicina, y liberarla de forma sostenida. Los materiales irradiados a dosis superiores a 40 kGy presentaron rupturas durante su manipulación. Por esta razón, MBAAm y el uso de dosis de entrecruzamiento mayores a 10 kGy fueron descartados para los estudios con matrices de TFX. En la Sección 5.2 se discuten los resultados encontrados en la investigación relacionada con el entrecruzamiento de cadenas de PNIPAAm previamente injertadas en matrices hidrofóbicas.

El entrecruzamiento de PNIPAAm injertado por el método P condujo a la formación de gel sobre la superficie de los materiales, especialmente en aquellos modificados con altos niveles de injerto (superiores a 60 %), cuando estos fueron sometidos a los procesos de lavado en agua. El exceso de gel fue manualmente removido durante los lavados. Dicha remoción causó la reducción en los porcentajes de injerto de algunos materiales, en un rango de 1 a 5 %. Este efecto se atribuye a que las reacciones de injerto direccionadas sobre la superficie producen, en la mayoría de casos y dependiendo de la matriz polimérica a modificar, una alta concentración de cadenas injertadas por unidad de área, con una menor distancia de separación entre ellas, comparadas con aquellos materiales que presentan una alta dispersión de injerto sobre todo el material (modificación direccionada sobre la masa); esto hace que la subsecuente unión de las cadenas, estimuladas por radiación, incrementen su capacidad de retención de agua, dependiendo de la elasticidad y de la densidad de entrecruzamiento de la red. De forma contraria, los materiales modificados con el método D no presentaron formación de gel en su superficie después de ser sometidos a las reacciones de entrecruzamiento.

5.1.3. Injerto de redes de PNIPAAm (*net*-PNIPAAm) sobre TFXc (TFXc-*g-net*-PNIPAAm), en un solo paso de síntesis.

Con el propósito de sintetizar redes de PNIPAAm en una sola etapa, las reacciones fueron llevadas a cabo aplicando el método de preirradiación oxidativa, adicionando MBAAm como agente entrecruzante, junto a los demás elementos necesarios para este tipo de reacción (monómero, temperatura, tiempo de reacción, ajuste de dosis e intensidad de irradiación, etc.). Este procedimiento podría ser aplicado para realizar la carga de fármacos simultáneamente con el proceso de síntesis del polímero.

El uso del método directo de irradiación para injertar redes en un solo paso no es recomendado, puesto que a estas condiciones el efecto de la radiación ionizante es menos selectivo, conduciendo no solo a la formación de radicales en la matriz polimérica, sino también en el monómero. Como resultado, la formación de homopolímero (en forma de gel) sería predominante, especialmente cuando se usa agua como disolvente. Además, para nuestro caso, el MBAAm presentó alta insolubilidad en el disolvente adecuado para llevar a cabo las reacciones de injerto en la masa del poliuretano (tolueno). Esto hace que el injerto

de redes en una etapa de síntesis sea dificultoso al considerar el método directo de irradiación como una opción.

En la Figura 5.6 se muestran los porcentajes de injerto de *net*-PNIPAAm obtenidos como función de la dosis de irradiación, a una razón de dosis de 8.3 kGy/h, en un tiempo fijo de 3 h, y a 70 °C, usando tres concentraciones de monómero: NIPAAm_{ac} 0.25, 0.5 y 1 M. La cantidad de MBAAm elegida fue 0.7 % (0.05 M). La elección de esta concentración de agente entrecruzante se relaciona con las cantidades usadas en los estudios reportados de reticulación de cadenas de PNIPAAm previamente injertadas (Ruiz *et al.* 2008; Muñoz-Muñoz *et al.* 2009; Muñoz *et al.* 2012). El proceso de injerto de las redes exhibió una tendencia similar a la observada para el método de injerto de cadenas de PNIPAAm por el método P (Fig. 5.1): los grados de injerto aumentan progresivamente hasta alcanzar un valor máximo y luego decrecen. El porcentaje de injerto máximo fue obtenido a 20, 30 y 40 kGy para concentraciones monoméricas de 1.0, 0.5 y 0.25 M, respectivamente. Estos resultados pueden ser explicados considerando que en presencia de una cantidad fija de MBAAm, la viscosidad del medio aumenta debido a que la homopolimerización de NIPAAm (en forma de gel) se hace predominante, especialmente cuando la proporción de NIPAAm es baja (por ejemplo en NIPAAm/MBAAm 0.25M/0.05M). Entonces, por efecto del fenómeno de difusión, una proporción alta de monómero (por ejemplo en NIPAAm/MBAAm 1M/0.05M) favorece la interacción entre las especies de NIPAAm aún sin reaccionar y la cantidad de radicales formados sobre el polímero a bajas dosis, mientras que a proporciones bajas de PNIPAAm, la probabilidad de formar redes con alta densidad de entrecruzamiento al interaccionar con MBAAm es alta, lo que provoca un aumento significativo en la viscosidad del medio y/o la precipitación del homopolímero, e impide a su vez la difusión o llegada masiva de las moléculas de monómero sin reaccionar, a los sitios activos de la superficie.

Todos los materiales funcionalizados con NIPAAm 1 M mostraron una alta rugosidad sobre la superficie y una considerable rigidez sobre todo el material, mientras que los polímeros injertados con 0.25 M presentaron una baja modificación sobre la superficie. Estos dos niveles de injerto no exhibieron sensibilidad a la temperatura debido a la baja penetrabilidad del agua sobre las redes con alta densidad de entrecruzamiento en el primer caso, y a la baja cantidad de *net*-PNIPAAm injertado en el segundo caso. Los polímeros obtenidos a 30 kGy, con NIPAAm 0.5 M, fueron físicamente estables, su síntesis fue altamente reproducible y presentaron menos rugosidad y rigidez.

Los grados de injerto de *net*-PNIPAAm en un paso fueron ajustados variando la concentración de MBAAm desde 0.05 a 2 %, conservando constantes las demás variables durante el experimento: dosis de irradiación, concentración de monómero, tiempo de reacción y temperatura (Fig. 5.7). La superficie de los materiales TFXc-*g-net*-PNIPAAm, obtenidos usando concentraciones de MBAAm inferiores a 0.7 %, mostraron una alta

rugosidad, baja flexibilidad y alta formación de irregularidades a lo largo de su superficie. Con concentraciones superiores a 0.7 %, la cantidad de *net*-PNIPAAm injertado fue baja, y la respuesta a los cambios de temperatura no fue detectable en estos materiales. Por consiguiente, la concentración de 0.7 % fue elegida como valor óptimo, para las necesidades de nuestro estudio. En la Figura 5.7 se observa que la reacción de injerto se redujo y la homopolimerización fue aumentada con el incremento de la concentración de MBAAm por encima del 1 %. El efecto de la temperatura sobre la cantidad de injerto también fue evaluado, encontrándose que los porcentajes de injerto de *net*-PNIPAAm son mayores a 70 °C (Fig. 5.8). A 80 °C la cantidad de injerto se reduce debido a las reacciones de recombinación de los radicales en crecimiento (reacciones de terminación de polimerización) son promovidas bajo estas condiciones.

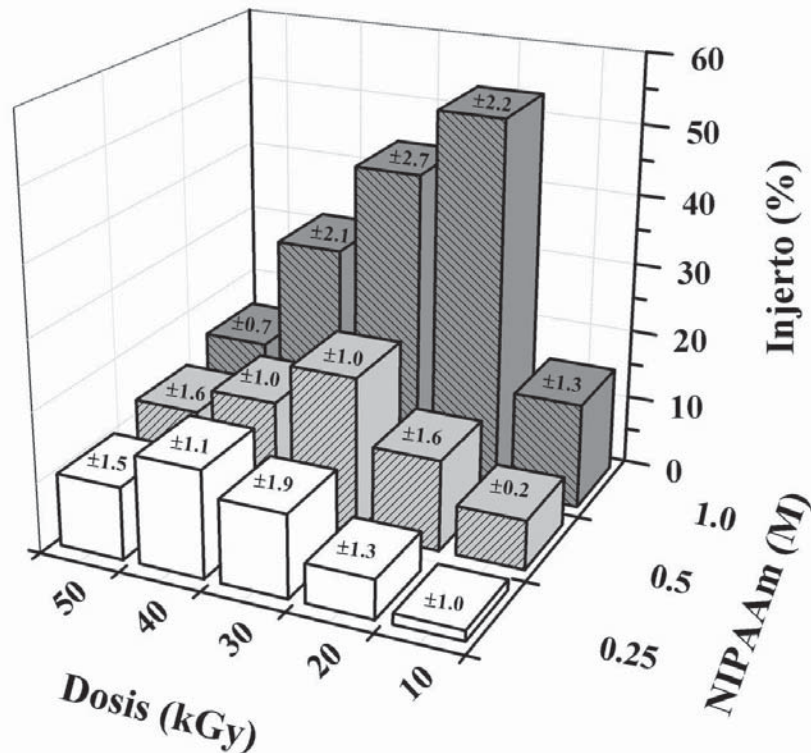


Figura 5.6. Injerto de *net*-PNIPAAm sobre TFXc en un paso, por aplicación del método de preirradiación oxidativa, como función de la dosis de irradiación, para tres concentraciones de de disoluciones acuosas de NIPAAm: 0.25, 0.5 y 1 M. Razón de dosis = 8.3 kGy/h; temperatura = 70 °C, tiempo de reacción = 3 h; [MBAAm] = 0.7 % w/w. (Con desviaciones estándar).

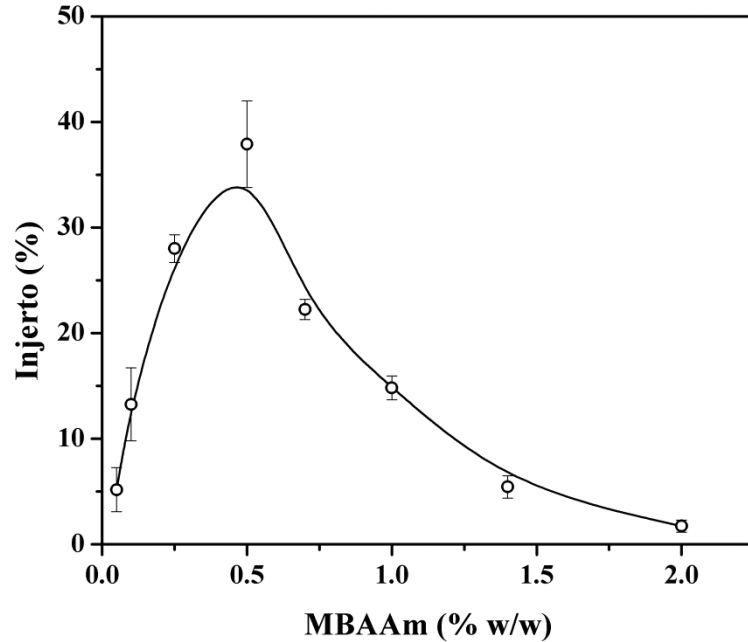


Figura 5.7. Injerto de *net*-PNIPAAm sobre TFXc en un paso, como función de la concentración de agente entrecruzante MBAAm. Método de preirradiación oxidativa; dosis de irradiación = 30 kGy; razón de dosis = 8.3 kGy/h; temperatura = 70 °C, tiempo de reacción = 3 h; $[NIPAAm]_{ac} = 0.5$ M.

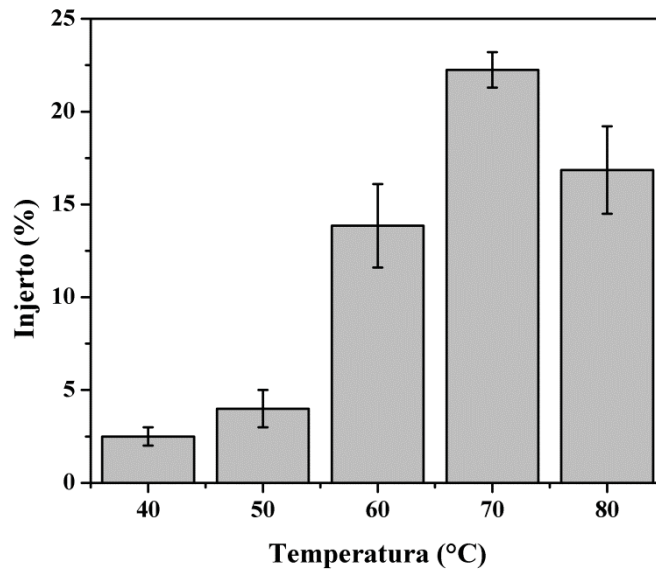


Figura 5.8. Porcentajes de injerto de *net*-PNIPAAm sobre TFXc en un paso de síntesis, como función de la temperatura, aplicando el método de preirradiación oxidativa a una dosis de 30 kGy, a una razón de dosis de 8.3 kGy/h, con tiempos de 3 h y una concentración de $NIPAAm_{ac}$ 0.5 M.

La formación de homopolímero puede ser reducida o prevenida usando un inhibidor de radicales libres, tales como Fe^{+2} , Fe^{+3} o Cu^{+2} . La homopolimerización es predominante cuando la energía de activación para esta reacción es más baja que la requerida para las reacciones de injerto (Burillo y Bucio 2008). A una cantidad muy alta de inhibidor, las reacciones de injerto también podrían ser inhibidas. Algunos estudios se han centrado en la influencia de los inhibidores sobre la homopolimerización en reacciones de injerto (Gupta et al. 2008). En esta investigación, se estudió la influencia de FeSO_4 y $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (sal de Mohr) sobre los porcentajes de injerto de *net*-PNIPAAm, conservando constantes las variables ajustadas previamente en otros experimentos: dosis de irradiación, concentración de NIPAAm, temperatura y tiempo de reacción (Fig 5.9). Para todas las concentraciones usadas para este estudio (de 0.1 a 1 % w/w), los porcentajes de injerto fueron menores que los obtenidos en ausencia de inhibidor. Entonces, el uso de estos compuestos fue descartado para posteriores estudios.

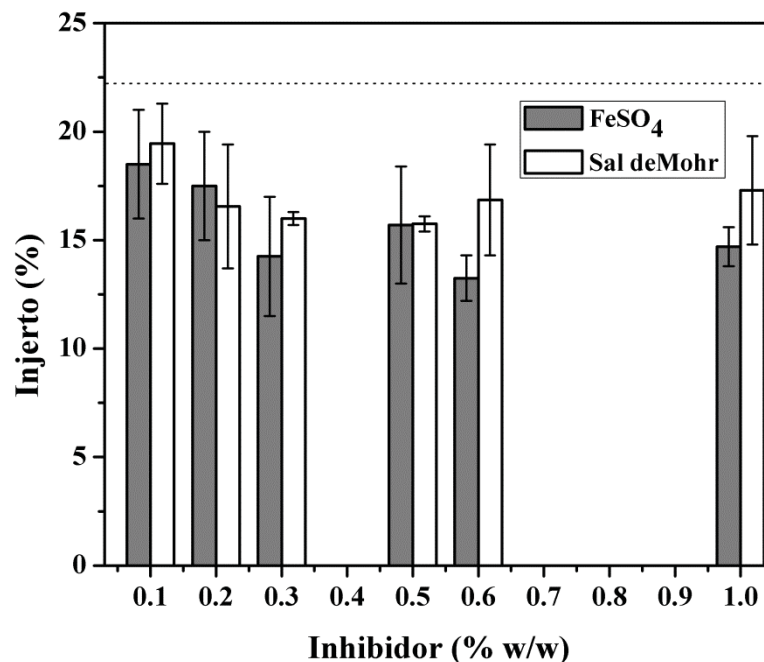


Figura 5.9. Influencia de la concentración de inhibidor de homopolimerización sobre la cantidad de injerto en la síntesis de TFXc-*g-net*-PNIPAAm, a una dosis de irradiación de 30 kGy, razón de dosis de 8.3 kGy/h, temperatura de 70 °C, tiempo de reacción de 3 h, y a una concentración de NIPAAm/MBAAm_{ac} 0.5/0.05 M. La línea punteada corresponde al porcentaje de injerto obtenido en ausencia de inhibidores, bajo condiciones de reacción similares a las utilizadas en este experimento.

En la Figura 5.10 se muestra la relación entre la cantidad de injerto de *net*-PNIPAAm y los tiempos de reacción aplicados. Un nivel de injerto fue elegido para futuros estudios: ~ 20 %

(Tabla 5.3). Los polímeros con porcentajes de injerto por encima de 25 % presentaron alta rigidez y rugosidad, por lo cual fueron descartados para estudios posteriores. El material TFXc-*g-net*-PNIPAAm sintetizado fue nombrado como *IEc-1paso*, donde *IE* indica que tanto el injerto como el entrecruzamiento fueron llevados a cabo de forma simultánea (*-1paso*), usando matrices TFX en forma de catéter. La Tabla 5.3 resume la composición de estos polímeros y su correspondiente IPN (*IPNc-2pasos*). La síntesis de esta IPN será comentada más adelante.

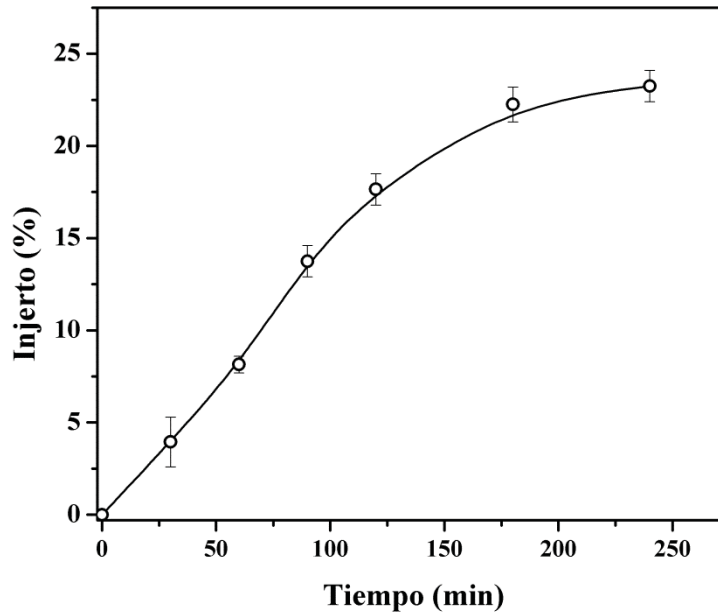


Figura 5.10. Injerto de *net*-PNIPAAm sobre TFXc como función del tiempo de reacción. Método de preirradiación oxidativa; dosis de irradiación = 30 kGy; razón de radiación = 8.3 kGy/h; temperatura = 70 °C; y concentración NIPAAm/MBAAm_{ac} = 0.5/0.05 M.

Tabla 5.3. Composición de polímeros TFXc modificados con PNIPAAm/PAAc en uno (para injerto) y dos (para formación de IPN) pasos, aplicando el método de preirradiación oxidativa para las reacciones de injerto. *IE* (TFXc-*g-net*-PNIPAAm) indica que el injerto y entrecruzamiento fueron promovidos en una sola reacción (1-paso). *IPNc* (TFXc-*g-net*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc) hace referencia al sistema *IE* interpenetrado con PAAc, en un procedimiento de dos etapas

Catéter Código	<i>net</i> -PNIPAAm injertado (%)	<i>net</i> -PAAc interpenetrado	
		PNIPAAm/PAAc (% mol/ % mol)	TFXc- <i>g</i> -IPN (%)
<i>IEc-1paso</i>	19 (±0.7)	-	-
<i>IPNc-2pasos</i>	20 (±0.8)	17/83 (±0.5)	66.7 (±0.5)

5.1.4. Polimerización y entrecruzamiento de AAc interpenetrado en TFXc

Con el propósito de encontrar las condiciones adecuadas para estimular la polimerización y entrecruzamiento de AAc en forma interpenetrada sobre las cadenas poliméricas de TFXc, se aplicaron diferentes métodos de irradiación con rayos γ . En la Figura 5.11 se muestra la cantidad de PAAc que fue formado en el interior de TFXc, o que fue injertado sobre la superficie del mismo, como función de la dosis de irradiación, usando los métodos descritos en el Capítulo 4 (Sección 4.1.6). La irradiación directa de TFXc en presencia de disoluciones acuosas de AAc, en un rango de dosis de 0.5 a 3.0 kGy, fue llevada a cabo con la finalidad de identificar una dosis de irradiación relativamente baja que fuera capaz de estimular la interpenetración de las redes de PAAc, sin producir reacciones de injerto (enlaces covalentes) entre el PAAc y el TFX. En otra investigación, descrita en la Sección 5.2., se llevó a cabo la síntesis de redes interpenetradas de AAc en el interior de películas de PP injertadas con PNIPAAm (*net-PP-g-PNIPAAm*), a una dosis de 2.5 kGy, usando DMF como disolvente; los polímeros sintetizados en DMF tienen una menor densidad de entrecruzamiento y presentan mayores hinchamientos que aquellos que son preparados en agua (Muñoz-Muñoz *et al.* 2009; Muñoz-Muñoz *et al.* 2012). Pero, para el caso que incluye la modificación de materiales TFX, el disolvente DMF no pudo ser utilizado, debido a la alta solubilidad que presenta el poliuretano en este medio. En su lugar, los esfuerzos fueron centrados en la determinación de una dosis menor a 2.5 kGy, que lograra formar las redes de PAAc en disolución acuosa, minimizando a su vez la posibilidad de promover reacciones no deseadas entre la matriz polimérica y el monómero. A raíz de que el agua también promueve el hinchamiento de TFX –en menores grados que los logrados en tolueno-, actúa en favor de facilitar la difusión de PAA y su subsecuente polimerización en el interior de TFX (en su masa). Como resultado, para los dos métodos de irradiación directa aplicados (método A y B; descritos en las Secciones 4.1.6.1 y 4.1.6.2), la máxima cantidad de PAAc fue alcanzada a 1.5 kGy, pero entre las diferencias resaltables, se encontró que la irradiación del polímero sumergido en disolución de AAc (método B), produjo una alta cantidad de homopolímero en el medio, lo que dificultó la extracción del material y redujo la cantidad de AAc polimerizada en el interior del poliuretano. El homopolímero, en forma de gel, fue removido manualmente en los procesos de lavado. Por su parte, los materiales obtenidos aplicando el método A presentaron una modificación homogénea a lo largo de su textura (no presentaron modificaciones visibles en su superficie) y mostraron una expansión en sus dimensiones (diámetro y longitud) al ser sumergidos en agua, lo que indica que la modificación fue orientada a su masa. La cantidad de homopolímero generada con este método fue muy mínima y fue encontrada principalmente sobre las paredes del tubo donde fue llevada a cabo la reacción.

La adición de un agente entrecruzante conduce a estructuras con mayor densidad de unión entre sus cadenas o con tamaños de poro más pequeños en las redes (Ortega *et al.* 2007). Sin embargo, con el uso de esta sustancia, también se logra reducir la cantidad de

dosis de irradiación necesaria para formar redes de PAAc (hidrogeles), lo que puede actuar a favor de la reducción de reacciones de injerto entre el monómero y la matriz polimérica.

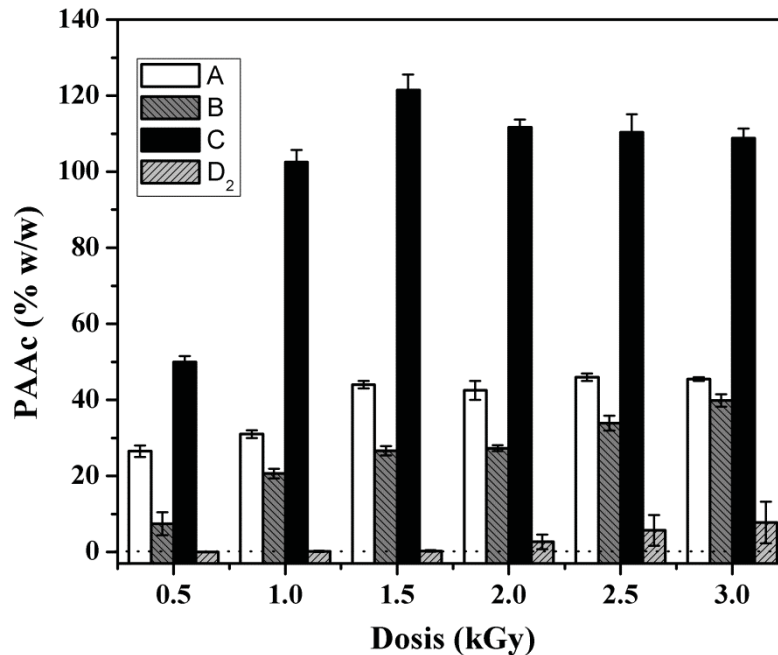


Figura 5.11. Cantidad de AAc polimerizado sobre TFXc como función de la dosis de irradiación, usando diferentes métodos y variaciones. La irradiación fue aplicada en: TFXc previamente hinchado en disolución de monómero y luego congelado (Método A); TFXc sumergido en disolución de monómero (Método B); TFXc, por el método de preirradiación oxidativa, con reacciones usando disolución de monómero, a 50 °C y a tiempos específicos (Método C); TFXc, por el método de preirradiación, con reacciones usando disolución de monómero, en condiciones inertes, a temperatura ambiente y a tiempos específicos (Método D₂). Para todos los experimentos la concentración de disolución AAc:MBAAm fue 25 % v/v: 1 % w/w (excepto para Método C y D que utilizó solo AAc al 25 %) y la razón de dosis fue de 5.0 kGy/h.

Se resalta que el método de preirradiación oxidativa (Método C; Sección 4.1.6.3) fue usado para propósitos comparativos. Este método se caracteriza por conducir a la formación de peróxidos e hidroperóxidos que estimulan la formación de reacciones de injerto cuando el polímero irradiado es calentado en presencia del monómero, bajo atmosfera inerte. Una alta cantidad de PAAc fue injertada sobre la superficie de TFXc cuando se aplicó el método C (Fig. 5.11). Una temperatura de 50 °C fue suficiente para activar la superficie del polímero (por la descomposición de peróxidos e hidroperóxidos) y también para estimular la polimerización térmica y el entrecruzamiento de AAc en presencia de ausencia de aire, lo cual consecuentemente incrementa la viscosidad de la disolución, reduciendo la difusión del monómero y su correspondiente injerto en la masa del polímero. Los materiales TFXc

mostraron un incremento significativo de su espesor después de la modificación con el método C, mientras que sus propiedades fisicoquímicas fueron muy diferentes a los obtenidos con los métodos de irradiación directa. La caracterización de estos polímeros no fue considerada para estos estudios, pero la aplicación de los diferentes métodos ayudó a la diferenciación cualitativa entre los materiales con PAAc injertado en la superficie de TFXc y aquellos en los que se presume que el PAAc se encuentra reticulado e interpenetrado sobre la matriz del poliuretano.

El método de preirradiación (Método D₂), es siempre llevado a cabo en ausencia de aire (en vacío o bajo atmósfera inerte). Como resultado, los macroradicales son atrapados a través de las cadenas poliméricas, para posteriormente facilitar las reacciones de injerto al entrar en contacto con las moléculas del monómero. Por lo tanto, ambos métodos, el de preirradiación y el de preirradiación oxidativa, son generalmente usados para estimular la producción de enlaces covalentes entre el monómero y la matriz polimérica (reacciones de injerto), entonces, su comparación con los métodos de irradiación directa, puede proveer una descripción aproximada de la forma en la cual el AAc polimerizó, al estar en contacto con TFXc. La cantidad de PAAc incorporada por el método D₂ no fue significativa a las dosis evaluadas, lo que indica que la concentración de radicales formados en la irradiación de TFX, no es muy alta (Fig. 5.11). Un análisis de todos los resultados mostrados en la Figura 5.11, indica que la polimerización y entrecruzamiento de AAc, de forma interpenetrada en TFX, ocurre preferiblemente bajo las condiciones de reacción usadas en el método A, en donde la formación de injerto no es totalmente descartada, pero sí relacionada con un índice de ocurrencia y niveles de cantidad muy mínimos.

Basados en las evidencias experimentales, la irradiación de los materiales congelados, previamente hinchados con disolución acuosa de AAc/MBAAm por 6 h, a dosis de 1.5 kGy e intensidades de 5.0 kGy/h, fueron elegidas como las condiciones adecuadas para llevar a cabo la síntesis y reproducción de s-IPNs e IPNs, partiendo de los sistemas sintetizados con los métodos descritos anteriormente: TFX-*g*-PNIPAAm, *net*-TFX-*g*-PNIPAAm y TFX-*g-net*-PNIPAAm.

5.1.5. Polimerización y entrecruzamiento de AAc interpenetrado en los materiales TFX-*g*-PNIPAAm, *net*-TFX-*g*-PNIPAAm y TFXc-*g-net*-PNIPAAm.

Todas las etapas involucradas en la síntesis de los materiales injertados con PNIPAAm por medio de dos métodos de irradiación diferentes (*IxP* o *IxD*), en el proceso de entrecruzamiento por radiación (*Ex*), en la preparación del sistema injertado y reticulado en un paso (*IEc-1paso*), y en la subsecuente interpenetración de redes de PAAc, son ilustradas en la Figura 5.12. Las composiciones de todos los materiales sintetizados se encuentran consignados en las Tablas 5.1, 5.2 y 5.3 (Secciones 5.1.1.1, 5.1.1.2 y 5.1.3). Generalmente,

a medida que aumentan las cantidades de PNIPAAm injertado, más altas son las cantidades de IPN injertado sobre TFX, debido a que más PAAc fue interpenetrado.

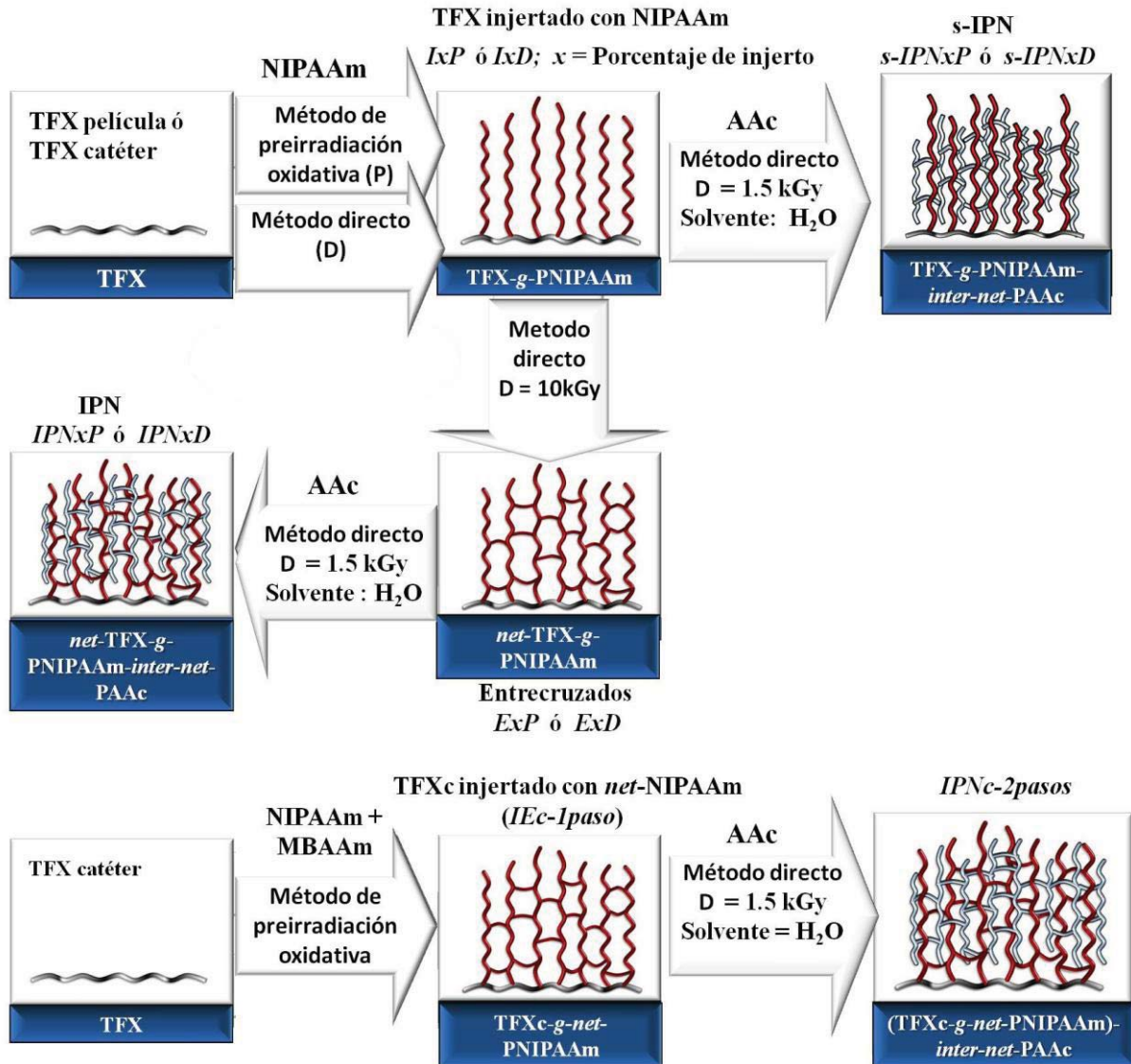


Figura 5.12. Etapas de polimerización para la síntesis de injertos y redes de PNIPAAm, e IPNs y s-IPNs de NIPAAm/AAC en TFX catéteres y películas.

Las IPNs con 40 % de PNIPAAm injertado, sintetizadas por el método D (Tabla 5.2), presentaron una relación molar PNIPAAm:PAAc cercana a 20:80, mientras que en los demás sistemas la proporción fue cercana a 30:70. Esto se atribuye a que las cadenas cortas (con menores porcentaje de injerto) injertadas en la masa del polímero, también actúan como espaciadores de cadena, favoreciendo así la entrada o difusión de más AAC, antes de estimular su polimerización en el interior de la matriz.

La versatilidad de los materiales propuestos y las diferencias en sus propiedades, dependiendo de los métodos usados para la funcionalización de TFX, son ilustradas en la Figura 5.13, tomando como ejemplo los materiales en forma de catéteres, vistos en una dirección transversal. Para cada sistema de IPNs y s-IPNs se prepararon entre 4 y 6 materiales.

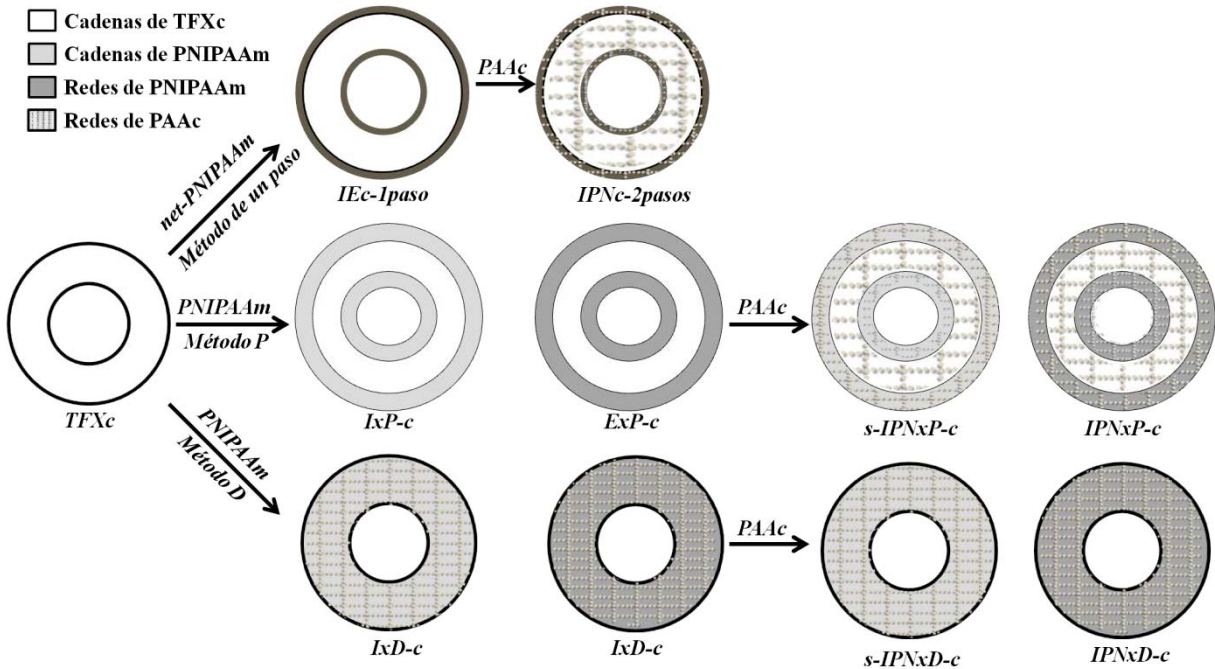


Figura 5.13. Ilustración de la modificación de la superficie o la masa de los catéteres TFX, producida por la aplicación de los métodos de irradiación usados. Vista transversal.

5.1.6. Espectroscopía de infrarrojo

En la Figura 5.14 se muestran los espectros FTIR-ATR de los materiales TFXc y TFXp, antes y después de su funcionalización. Las modificaciones realizadas sobre las matrices de TFX fueron confirmadas por la aparición de nuevas bandas atribuidas a los grupos carboxílicos, amida e isopropilo. Los materiales TFX, sin modificar, presentan bandas características a 3316 (estiramiento N-H), 2920 – 2796 (estiramiento asimétrico y simétrico de CH₂ de los segmentos polieter y grupo ciclohexano), 1714 – 1693 (estiramiento de grupo carbonilo en amida I), 1525 (estiramiento C-N + flexión N-H en amida II), 1228 (estiramiento C-N de amida III), 1097 (estiramiento asimétrico de C-O-C de los fragmentos polieter), 1044 (estiramiento asimétrico C-O-C de la región urethano), 980 (estiramiento asimétrico del anillo de ciclohexano) y 780 cm⁻¹ (vibraciones en el plano del anillo de ciclohexano) (Guignot *et al.* 2001; Anand y Muskesh 2011; Schmidt *et al.* 2011).

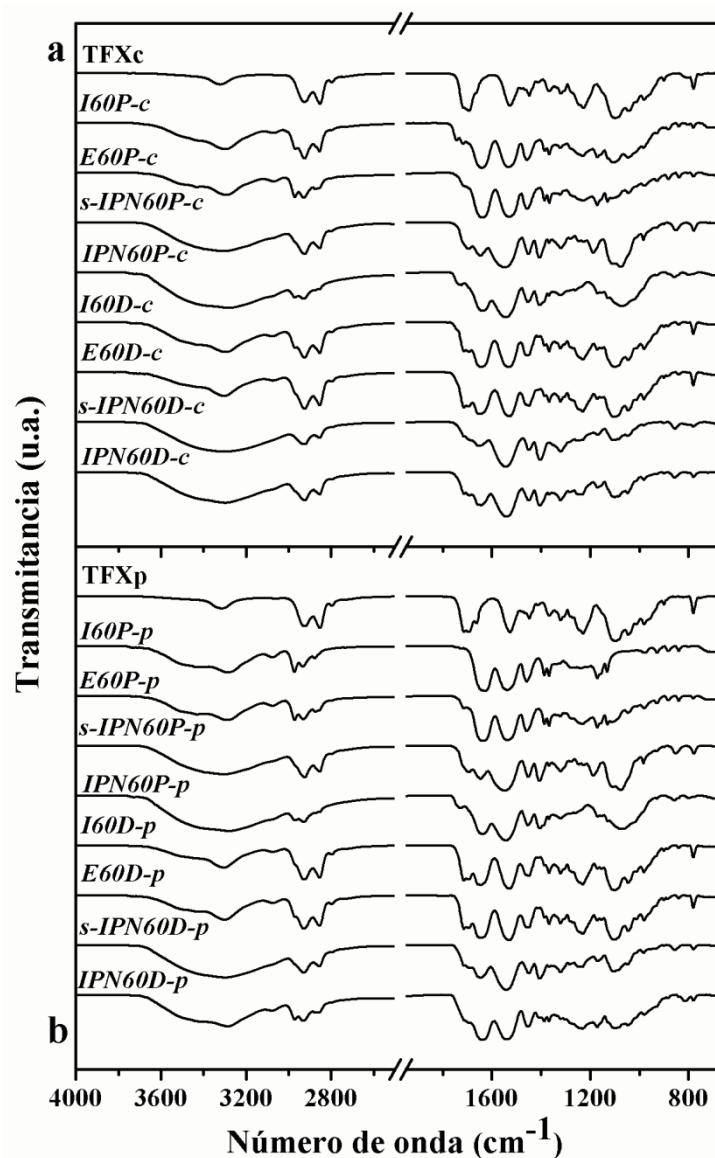


Figura 5.14. Espectros FTIR-ATR de los materiales TFX modificados y sin modificar, en forma de catéteres (a) y de películas (b). Códigos como en Tablas 5.1 y 5.2.

En los materiales injertados con PNIPAAm por el método P (*I60P*), fue evidenciada la aparición de bandas a 3289, 1635 y 1537 cm^{-1} , las cuales confirman la presencia de grupos amida, y un doblete a 1389 y 1367 cm^{-1} que son asignados a los grupos isopropilo de PNIPAAm (*Tu et al. 2004*); La reducción o desaparición de las bandas características de TFX (1714, 1693, 1228 y 780 cm^{-1}) evidencian que PNIPAAm fue injertado principalmente sobre la superficie polimérica. En los materiales injertados por el método D (*I60D*), fue evidenciada la aparición de bandas características de PNIPAAm, pero conservando algunas bandas características de TFX; esto indica que el método de irradiación directa conduce a la

modificación en la masa de la matriz. No se encontraron diferencias significativas entre los polímeros injertados (*I*) y entrecruzados (*E*), lo cual confirma que el entrecruzamiento sucedió a nivel intramolecular, sin afectar los demás grupos funcionales (*Muñoz-Muñoz et al. 2009*). Las IPNs y s-IPNs mostraron un aumento en la intensidad de las bandas de grupos carboxílicos (1715 cm^{-1}) e hidroxilo (3300 cm^{-1}), provenientes de PAAc. No se observaron diferencias significativas entre los materiales modificados en forma de catéter (Fig. 5.14.a) y película (Fig. 5.14.b), lo que confirma que los dos materiales no presentan diferencias en sus grupos funcionales, y que la funcionalización ocurre por la misma vía, independientemente de la forma y las características de manufactura de las matrices poliméricas.

Generalmente, un catéter está formado por la extrusión de un termoplástico adecuado, con una porción de banda integral que es simultáneamente formada por extrusión del mismo material, o de otro producto plástico que sea compatible con la pared del tubo en formación. Esta porción de banda integral contiene de forma dispersada una sal opaca ante los rayos X, las cuales pueden ser sales de bromuro, bario o bismuto, entre otras (*Slingluff 1977*). Los segmentos radiopacos son preferiblemente posicionados en diámetros opuestos, espaciadas entre sí, alrededor de la circunferencia del catéter, ocupando un total de 50 a 270° de su circunferencia. Para los catéteres UMBILI-CATH[®] (TFXc) usados en este trabajo, la banda radiopaca ocupa un 50% (180°) de la circunferencia, mientras que en las películas TFX, esa cualidad no estuvo presente. En la Figura 5.15 se muestran los espectros FTIR-ATR de las porciones radiopacas en TFXc. Un aumento en la intensidad de las bandas traslapadas observadas a $1099 - 1040\text{ cm}^{-1}$ y la aparición de un doblete a 1129 y 1187 cm^{-1} , fueron algunas de las pocas diferencias encontradas para los segmentos radiopacos de TFXc, comparados con los espectros FTIR-ATR obtenidos de la parte transparente de este polímero (Fig 14.a). Generalmente, las frecuencias vibracionales de los grupos sulfato (SO_4) aparecen entre 1200 y 1080 cm^{-1} , lo que se atribuye a los modos de vibracionales de estiramiento asimétrico de este grupo (*Povarenykh 1978; Ramaswamy et al. 2010*). Se puede asumir que la región radiopaca de TFXc se encuentra compuesta de sulfato de bario (BaSO_4), el cual es comúnmente asociado con la construcción de catéteres o dispositivos biomédicos (*Lewis 1997; Aldenhoff et al. 2002*). Los grupos sulfato también se caracterizan por presentar dos bandas a 639 y 604 cm^{-1} en los espectros FTIR, las cuales son asignadas a modos vibracionales de flexión fuera del plano (*Shen et al. 2007*). Sin embargo, la región comprendida entre 700 y 600 no fue determinada en nuestros estudios FTIR-ATR. No obstante, la determinación de los componentes de la región radiopaca en TFXc fue determinada por otra técnica de caracterización, la cual se describe en la Sección 5.1.7. Adicionalmente, se resalta que la funcionalización de los polímeros TFXc con NIPAAm/AAC, no fue afectada negativamente por la región radiopaca del catéter, y mostró además una modificación similar que la experimentada en las regiones transparentes, lo que se evidenció con la aparición de bandas características de los grupos funcionales de PNIPAAm y PAAc. De

igual forma, no se presentaron diferencias entre los espectros de los segmentos radiopacos modificados y sus equivalente segmentos transparentes (resultados no mostrados).

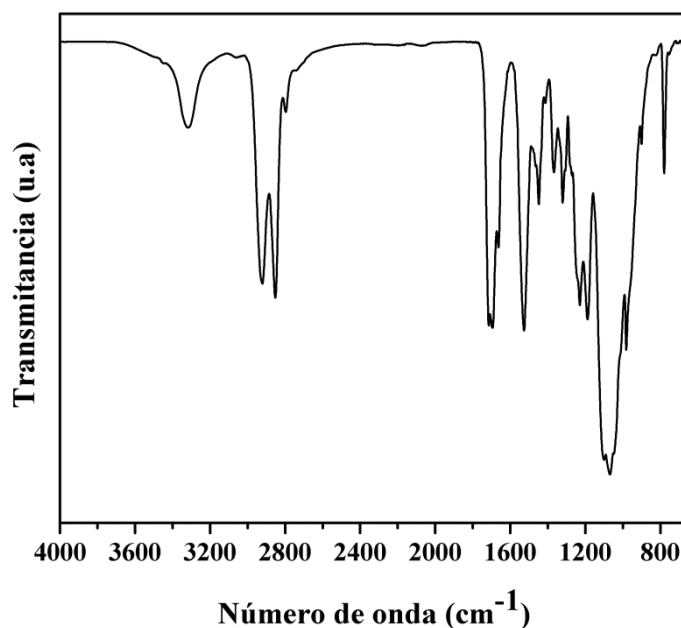


Figura 5.15. Espectro FTIR-ATR de las fracciones radiopacas en TFXc

Los espectros FTIR-ATR de *IEc-1paso* e *IPNc-2pasos* es mostrado en la Figura 5.16. La modificación por el método de injerto en un paso de *net*-PNIPAAm sobre TFX y la formación de su correspondiente IPN, es evidenciada por la aparición de nuevas bandas asignadas a los grupos amida (3299 , 1635 y 1538 cm^{-1}) e isopropilo (1389 y 1367 cm^{-1}) de PNIPAAm y a los grupos carboxílicos (3350 - 3250 y 1715 cm^{-1}) de PAAc, tal como sucedió los materiales modificados por el método P. La reducción o desaparición de las bandas características de TFXc, después de su funcionalización, indican que la modificación por este método fue orientada hacia la superficie del material.

5.1.7. Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) y espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDX).

Las imágenes ESEM de las vistas transversales de los tubos TFXc sin modificar y aquellos funcionalizados con los diferentes métodos de injerto, son mostradas en la Figura 5.17. Una capa delgada de PNIPAAm recubriendo la superficie de TFXc es observada en todos los polímeros funcionalizados por el método P (preirradiación oxidativa): *IEc-1paso*, *I60P-c* y *E60P-c*. En la superficie de *IEc-1paso* se observaron protuberancias y apariencia de rugosidad. Las reacciones de injerto inducidas por el método D, por lo general ofrecen como ventaja el diseño de experimentos que orientan la modificación en la masa de una matriz

polimérica. Es por ello que los materiales injertados con este método de irradiación directa, no mostraron modificaciones en su superficie, pero los cambios en el interior de la matriz sí fueron evidentes. La interpenetración de una segunda red de PAAc en el interior de las redes compuestas por PNIPAAm (*IEc-1-paso*, *E60P-c* y *E60D-c*) o en el interior de cadenas injertadas de PNIPAAm (*I60P-c* ó *I60D-c*), afectó las características tanto de la superficie (en los polímeros P y de un paso) como de la masa del material (en los polímeros D). Sobre los polímeros injertados con el método D, la incorporación de PAAc produjo un aumento en la porosidad de *s-IPN60D-c*, más que en la de *IPN60D-c*, lo que se debe a que las cadenas no entrecruzadas de PNIPAAm permiten una mejor interpenetración del PAAc. Los segmentos radiopacos fueron afectados en la misma forma que las áreas transparentes de TFXc (Fig. 5.18)

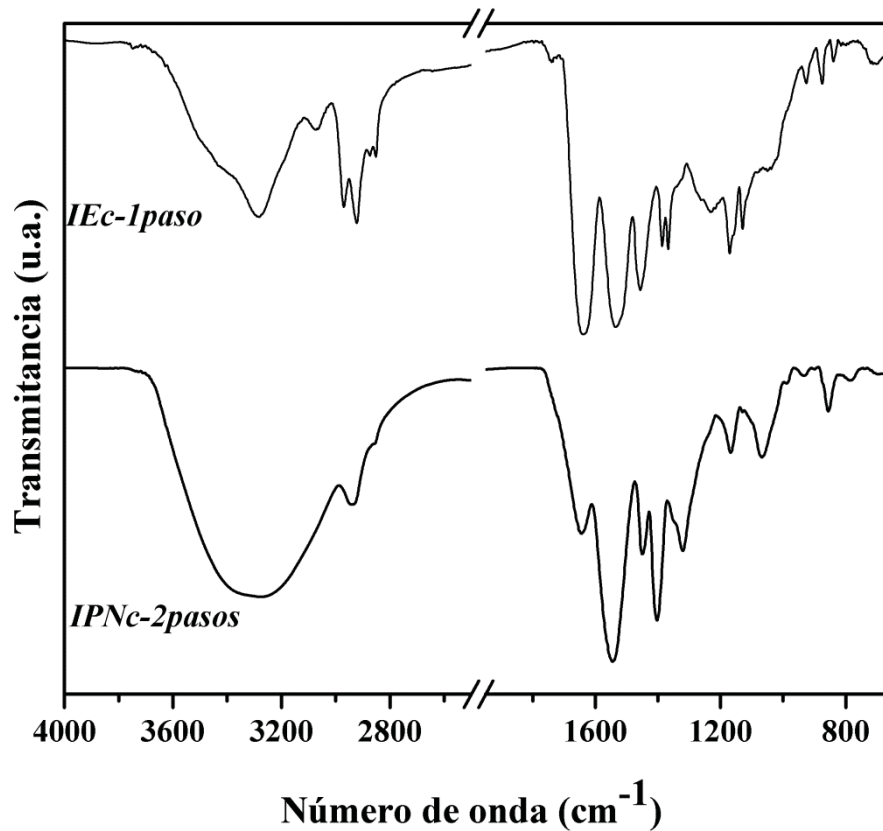


Figura 5.16. Espectro FTIR-ATR de TFXc-*g-net*-PNIPAAm (*IEc-1-paso*) and (TFXc-*g-net*-PNIPAAm)-*inter-net*-PAAc (*IPNc-2pasos*)

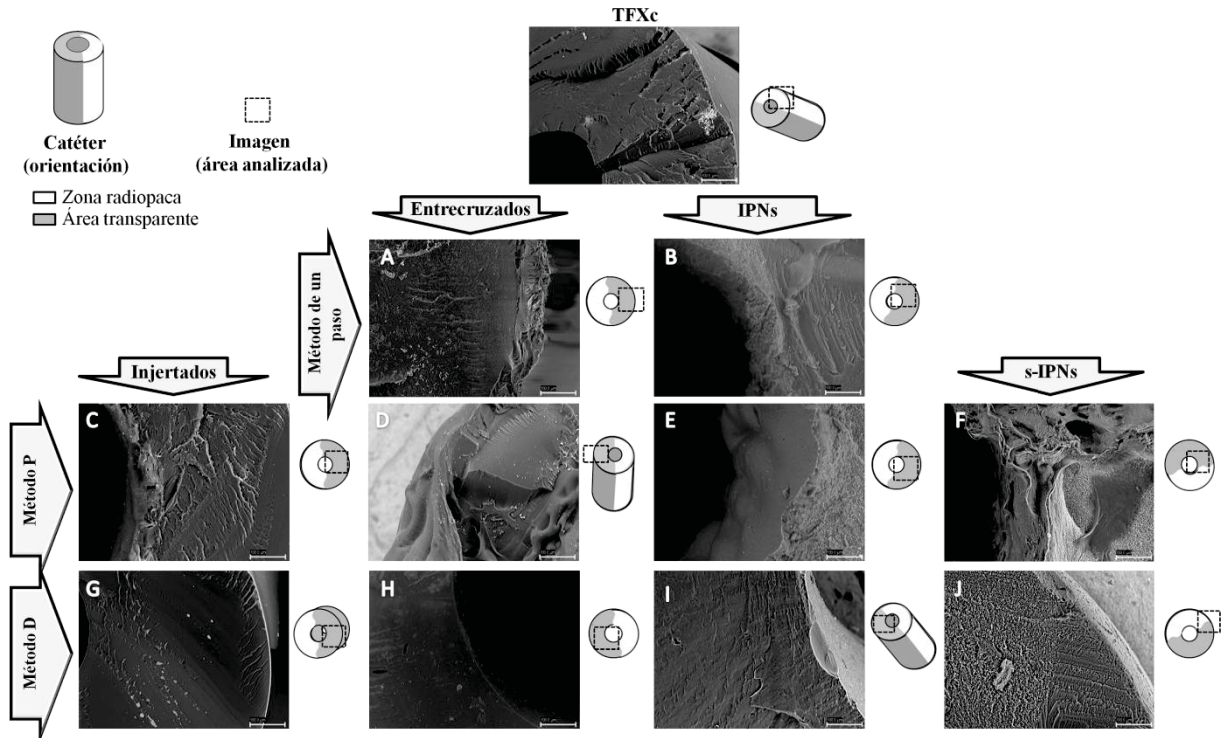


Figura 5.17. Imágenes ESEM para la vista transversal de TFXc, *IEc-1paso* (A), *IPNc-2pasos* (B), *I60P-c* (C), *E60P-c* (D), *IPN60P-c* (E), *s-IPN60P-c* (F), *I60D-c* (G), *E60D-c* (H), *IPN60D-c* (I) y *s-IPN60D-c* (J). Magnificación: 500x

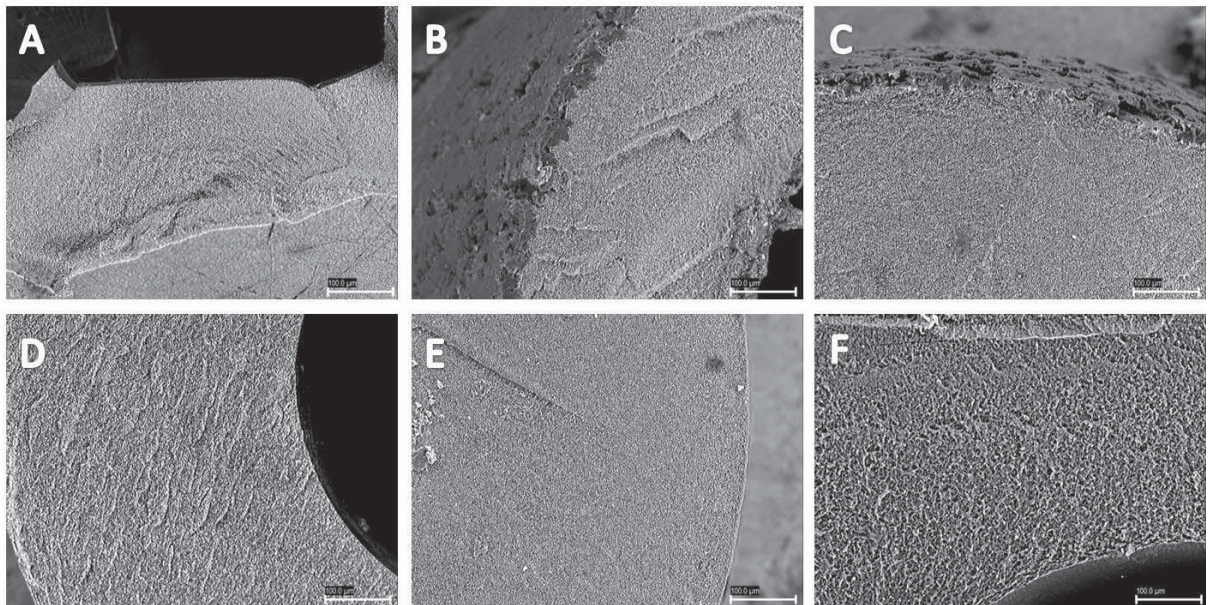


Figura 5.18. Imágenes ESEM para la vista transversal de segmentos radiopacos de TFXc (A), *IEc-1paso* (B), *IPNc-2pasos* (C), *I60D-c* (D), *E60D-c* (E) y *s-IPN60D-c* (F). Magnificación: 500x

Con el objetivo de analizar y determinar la composición de la porción radiopaca en TFXc, un análisis cuantitativo fue realizado con la técnica EDX. En la Figura 5.19 se observan las señales claramente resueltas para bario (Ba), carbono (C), oxígeno (O), aluminio (Al) y azufre (S). También fueron observadas las señales provenientes de los elementos contenidos en la disolución tampón de fosfato pH 7.4, que fue utilizada para hinchar los polímeros antes de sus estudios EDX: sodio (Na), fósforo (P) y potasio (K). Los espectros de TFXp y los segmentos transparentes de TFXc no evidenciaron la presencia de los elementos Ba y S (Fig. 5.19. A y D). Estos resultados confirman que la fracción radiopaca de los catéteres contiene BaSO₄ en su superficie.

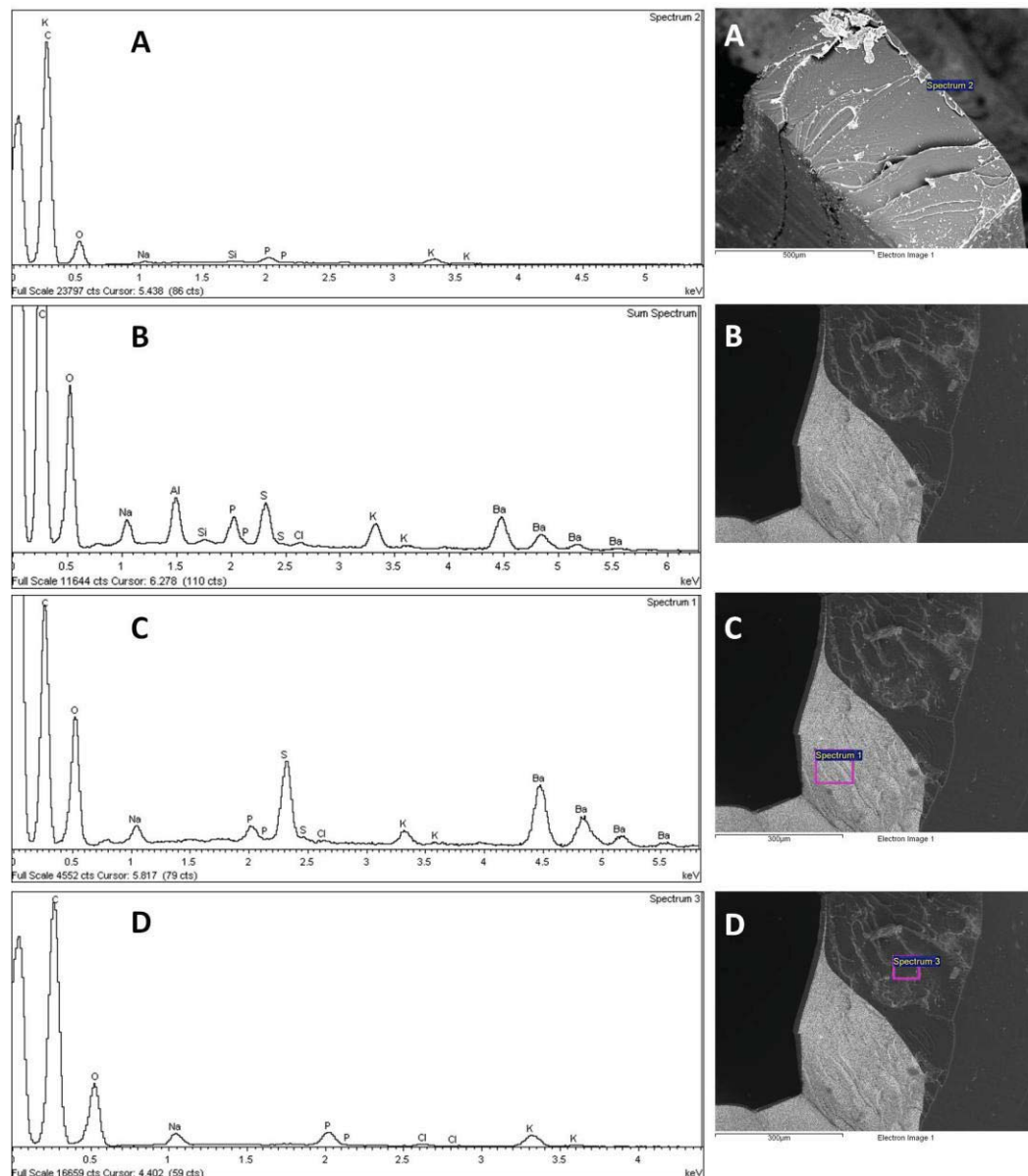


Figura 5.19. Espectros EDX e imágenes para la vista transversal de TFXp (A), TFXc (B), fracción radiopaca (C) y fracción transparente de TFXc (D).

Una comparación de la distribución individual de cada uno de los elementos constituyentes es observada en el mapeo EDX mostrado en la Figura 5.20. Este mapeo muestra que los segmentos transparentes de TFXc se encuentran constituidos principalmente de C y O, mientras que las zonas radiopacas se encuentran cubiertas de Ba y S. El elemento Al aparece solo sobre la superficie exterior del tubo. La absorción de Na, P y K desde la disolución tampón se posicionó principalmente sobre fracción trasversal del material y no sobre su superficie. La composición elemental de la superficie de TFXp y TFXc (fracción transparente y zona radiopaca), determinada por ESEM-EDX, es mostrada en la Tabla 5.4.

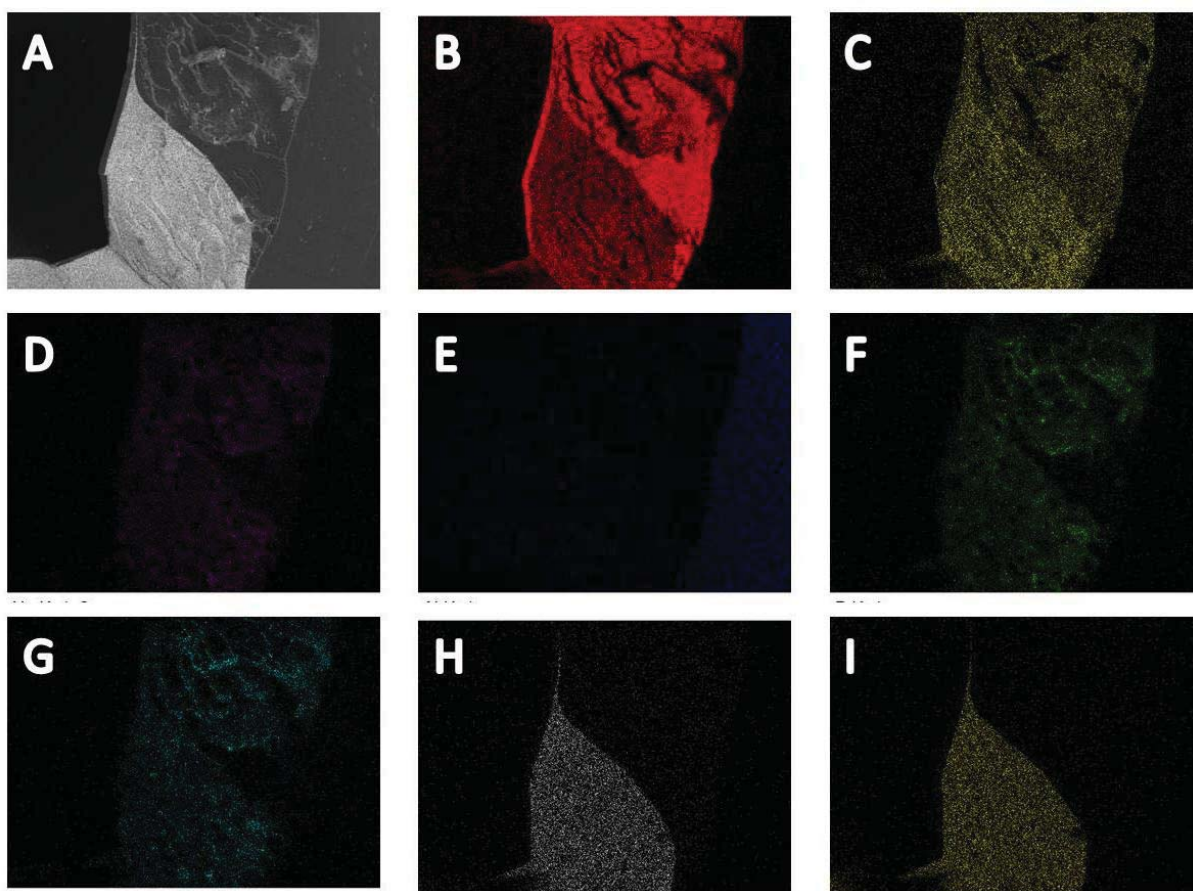


Figura 5.20. Mapeo EDX de los componentes sobre TFXc: área total analizada con todos los componentes (A), carbono (B), oxígeno (C), sodio (D), aluminio (E), fósforo (F), potasio (G), azufre (H) y bario (I).

Tabla 5.4. Composición elemental de la superficie de los materiales TFX (catéteres y películas), determinada por EDX.

Muestra	Elementos (% w/w)								
	C	O	Na	P	K	Si	Cl	S	Ba
<i>TFXp</i>	68.7	29.1	0.4	0.8	0.9	0.1	---	---	---
<i>TFXc</i>	57.1	38.5	1.5	1.3	1.4	---	0.2	---	---
<i>TFXc (radiopaco)</i>	43.3	32.5	1.2	0.8	0.9	---	0.2	4.1	17.0

5.1.8. Análisis térmico (DSC y TGA)

Los termogramas DSC de los materiales TFX son mostrados en la Figura 5.21, en donde las temperaturas de transición vítrea (T_g) y los puntos de fusión (T_m) de TFXc y TFXp, fueron evidenciados a 88:134 °C y 102:126 °C, respectivamente. Esto sugiere que las diferencias entre los dos tipos de poliuretano TFX usados, consisten principalmente en el arreglo de sus fases. Los factores que controlan los grados de separación de fases incluyen la composición del copolímero, la longitud de los bloques (peso molecular), la cristalinidad de los segmentos, las condiciones de síntesis o fabricación (incorporación de aditivos) y el historial térmico del material (calentamientos o refrigeraciones previas) (*Chen y Kenney 1991; Heintz et al. 2003; Pereira y Oréface 2010; Pretsch 2010*). Para el material utilizado en este trabajo, dos tipos básicos de poliuretanos de grado médico son manufacturados bajo la marca Tecoflex[®]. Ambos tipos de polímeros son fabricados usando el mismo diisocianato (HMDI), el mismo extensor de cadena (BDO) y los mismos aditivos (catalizadores, antioxidantes y lubricantes). La diferencia está en que TFX 80A y EG-85A utilizan un componente polioliol PTMEG-2000 (con peso molecular de 2000), mientras que TFX EG-93A, EG-100A, EG-60D, EG-65D, EG-68D y EG-72D usan un PTMEG-1000. A diferencia de los tipos de resina empleada (PTMEG-1000 ó PTMEG-2000), todos los reactivos químicos para preparar TFX son los mismos. Sólo las proporciones de las materias primas son cambiadas para variar la dureza o flexibilidad de este poliuretano, pero los fabricantes garantizan que no existen diferencias de biocompatibilidad entre EG-93A, EG-100A, EG-60D, EG-65D, EG-68D y EG-72D. Todo lo anterior confirma que las diferencias mostradas en los termogramas DSC entre TFXc y TFXc son atribuidas a las diferencias en pesos moleculares y el efecto que eso produce sobre el arreglo de los segmentos duros y blandos en las fases del polímero.

La transición endotérmica observada entre 80-90 °C para TFXc, fue asignada a la alteración, de corto alcance, en el orden de los microdominios compuestos por los segmentos duros, mientras que la transición observada a 134 °C, fue asignada a la alteración, de largo alcance, de los segmentos duros en los dominios microcristalinos. Estas asignaciones son consistentes con las publicadas por Schmidt y colaboradores (*2009*), quienes investigaron las propiedades de memoria de forma en un poliuretano Tecoflex[®], comercializado por la empresa Lubrizol; ellos investigaron sus propiedades por análisis dinámico mecánico (DMA,

por sus siglas en inglés), encontrando la Tg de una mezcla de fases a 74 °C y una temperatura de reblandecimiento de los dominios duros a 120 °C.

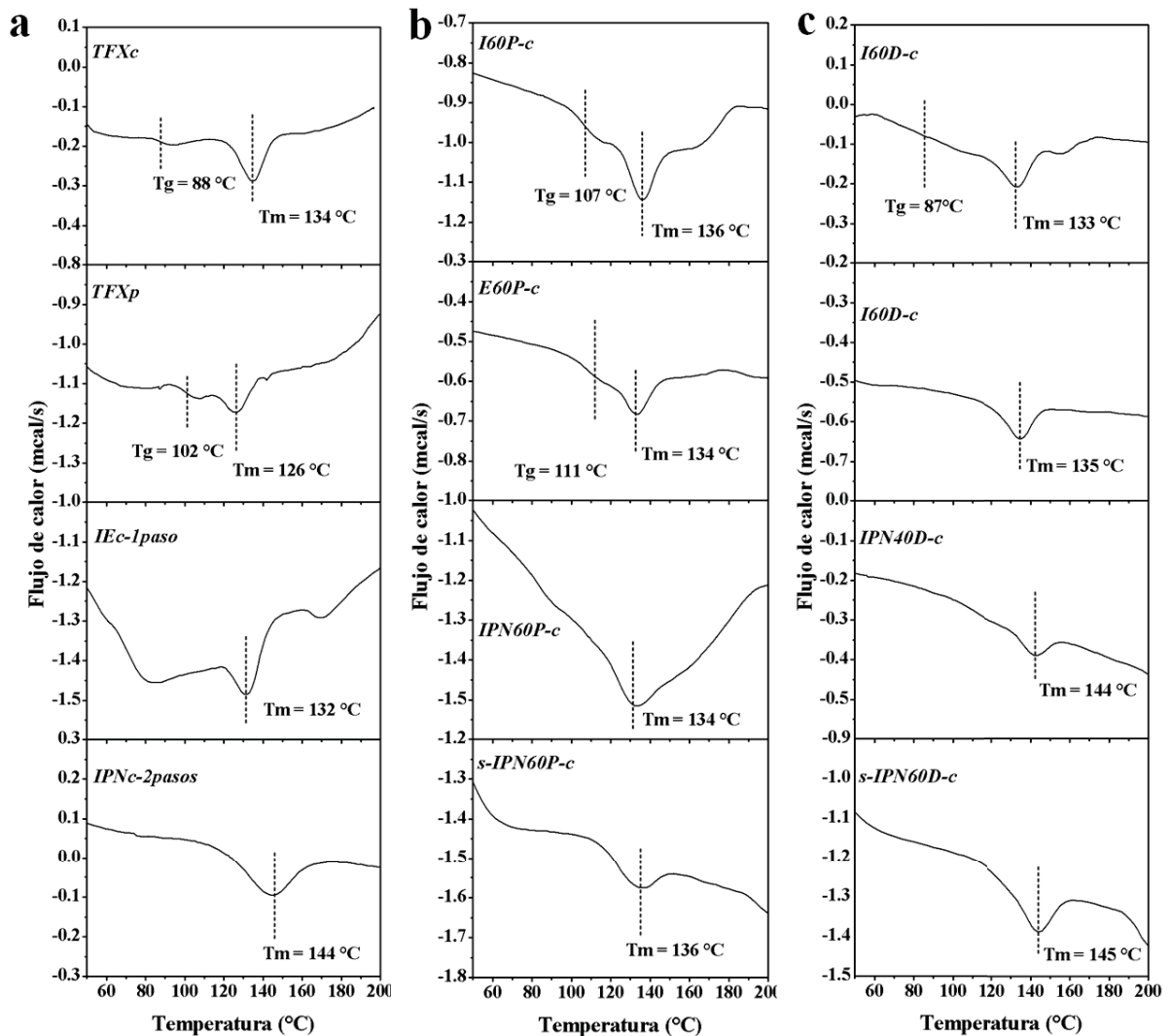


Figura 5.21. Termogramas DSC de TFXp y TFXc sin modificar, y los materiales funcionalizados sobre TFXc.

En los termogramas DSC de *IGc-1paso*, la Tg de TFXc no fue claramente observada, mientras que su Tm fue conservada a 132 °C (Fig. 5.21.a). La transición de primer orden (Tg) de PNIPAAm no fue observada. La presencia de una Tg depende de la movilidad de las cadenas poliméricas (Koberstein y Leung 1992). Entonces, el injerto de *net*-PNIPAAm por el método de un paso, conduce a una alta densidad de entrecruzamiento, lo cual dificulta o

impide el movimiento libre y rotacional de las cadenas de PNIPAAm. De forma similar, la Tg característica de TFXc aparentemente podría determinarse en el rango de 70-90 °C, aunque de una forma no muy clara. La Tg característica de cadenas de PNIPAAm injertadas no fue observada en *IPNc-2pasos*, pero su Tm fue desplazada a temperaturas mayores (144 °C), indicando que las unidades de PAAc tienen la capacidad de incorporarse sobre los dominios semicristalinos de TFXc.

Para los materiales TFXc-*g*-PNIPAAm (*I60P-c*) y *net*-TFXc-*g*-PNIPAAm (*E60P-c*), sintetizados por el método P, la Tg característica de PNIPAAm fue observada a 107 y 111 °C, respectivamente (Fig. 5.21.b). Estos valores son consistentes con los reportados para cadenas de PNIPAAm injertadas sobre superficies poliméricas, empleando este método de irradiación (85 -130 °C) (*Ruiz et al. 2008*). Por lo general, la Tg se desplaza a temperaturas más altas cuando se incrementa la densidad de entrecruzamiento de un polímero, ya que la movilidad de sus segmentos decrece (*Menczel y Prime 2009*). Entonces, la diferencia observada entre los productos injertados y reticulados, indica que el entrecruzamiento estimulado por radiación genera cambios importantes a nivel molecular. Por otro lado, La transición de Tm no fue desplazada significativamente hacia altas temperaturas para los materiales *IPN60P-c* y *s-IPN60P-c*, lo que demuestra que el PAAc fue incorporado preferentemente en las cadenas de PNIPAAm (sobre la superficie del material) y en menor grado, sobre los arreglos semicristalinos (en la masa) de la matriz polimérica.

Para los materiales modificados por el método D, la Tg fue observada solo en los sistemas injertados (*I60D-c*) (Fig. 5.21c). Los rangos de temperatura en que se manifiesta una Tg son ampliados cuando la rigidez de las cadenas aumenta en rangos moderados, de tal forma que las interacciones y la existencia de una interface entre los dominios también sea promovida (*Bonar 1979; Petrovic y Ferguso 1991*). El entrecruzamiento de cadenas de PNIPAAm reduce su movilidad y algunas veces su Tg no puede ser detectada por la restricción de los movimientos de las cadenas cerca de los sitios de reticulación (como sucedió con *E60D-c* en Fig. 5.21.c). El valor de Tm no fue desplazado significativamente en los procesos de injerto (133 °C) y entrecruzamiento (135 °C), mientras que esta transición fue observada a 144 y 145 °C en los materiales *IPN60D-c* y *s-IPN60D-c*, respectivamente. Esto indica que la inclusión de PAAc ocurre por una vía distinta cuando PNIPAAm es injertado por el método directo. Para los materiales modificados por este procedimiento, tanto el injerto de PNIPAAm como la interpenetración de PAAc, son direccionados sobre la masa de TFX, lo que resulta consistente con la ilustración mostrada en la Figura 5.13.

Generalmente, la modificación con copolímeros de injerto hace que se presente una Tm sobre un rango amplio de temperaturas y además causan la reducción de la cristalinidad y del punto de fusión de la matriz polimérica. Las transiciones térmicas de las redes de PAAc no fueron observadas, debido a que las interacciones moleculares entre sus cadenas son

interrumpidas con los arreglos forzados o adoptados en la interpenetración. La Tg de PAAc ha sido reportada entre 75 y 106 °C (Mercier 1965; Chu y Berner 1993).

Por otro lado, los estudios con DSC pueden ser utilizados para determinar cualitativamente el estado físico de la vancomicina absorbida o cargada sobre un polímero funcionalizado (Chiappetta et al. 2005). Entonces, se recurrió a esta técnica de caracterización para determinar el estado físico de la vancomicina cargada en dos de los sistemas propuestos (en *IPN40P-c* e *IPN40D-c*; Fig. 5.22). En términos generales, el fármaco puede ser encontrado en diferentes estados, dependiendo de su solubilidad en el polímero y la cantidad cargada. Así, en ensayos "in vivo" e "in vitro", la liberación puede ser afectada por el estado físico del fármaco (Dahs 1997). Por lo tanto, algún cambio significativo en el comportamiento térmico del principio activo o el polímero, puede informar sobre los niveles de interacción entre polímero-fármaco (Jelvehgari 2010). En la Figura 5.22.a dos transiciones endotérmicas fueron observadas, una a 84 °C (T_{m1}) y la otra a 158 °C (T_{m2}), las cuales corresponden a las transiciones de punto de fusión del glicopeptido vancomicina (Loveymi et al. 2012). El sistema *IPN40D-c* previamente cargado con vancomicina, también mostró un pico endotérmico a 84 °C y una transición ancha a 132 °C, la cual corresponde al punto de fusión de los dominios semicristalinos del polímero (T_{m_p} ; Fig. 5.22.b). Contrariamente, el sistema *IPN40P-c*, también cargado con vancomicina, mostró una transición endotérmica a 84 °C, pero también una transición amplia con dos valores mínimos a 128 y 147 °C, que fueron denotados como $T_{m_{fp}}$ y $T_{m_{fp2}}$, respectivamente, en donde fp indica que la transición se debe a una interacción fármaco-polímero. Estas dos transiciones indican que se efectivamente se presentaron cambios en la fase semicristalina del polímero (Fig. 5.22.c). Los resultados encontrados sugieren que la vancomicina podría estar preferentemente en un estado cristalino cuando es cargada en el sistema *IPN40D-c*, mientras que este fármaco podría estar en un estado amorfo (disperso sobre el polímero) cuando es absorbido en el sistema *IPN40P-c*. El traslape de los picos en los termogramas DSC de *IPN40D-c*, indican que los dos estados (cristalino y amorfo) puede ser favorecido para la cantidad de vancomicina cargada, pero con una mayor inclinación hacia la formación de estructuras cristalinas. Entonces, se puede concluir que una interacción fisicoquímica entre el fármaco y el polímero es favorecido cuando la funcionalización del polímero se enfoca en su superficie. Los detalles sobre los procedimientos de carga y liberación de vancomicina son discutidos en las Secciones 5.1.10 y 5.1.11.

En los estudios por análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés), la temperatura de descomposición (10 % de pérdida en peso) de los materiales TFXc es desplazada a temperaturas menores cuando PNIPAAm es injertado, e incrementa cuando el injerto es llevado a cabo con redes de PNIPAAm (*net*-PNIPAAm) por el método de un solo paso (Fig. 5.23). La temperatura de descomposición fue reducida cuando el injerto de PNIPAAm se llevó a cabo por el método D, lo que indica que la modificación en la masa de

TFXc incrementa levemente su estabilidad térmica. La descomposición de IPNs y s-IPNs ocurrió a bajas temperaturas, debido a la inclusión de grupos carboxílicos en la estructura del polímero. Los materiales TFXp mostraron las mismas tendencias, a pesar de que la descomposición térmica de las películas ocurrió a temperaturas más altas (340 °C) que las de los catéteres (323 °C). Esta discrepancia puede ser atribuida a la diferencia del peso molecular entre los materiales TFXp y TFXc. Los resultados de TGA se encuentran resumidos en la Tabla 5.5. Estos valores indican que los cambios en la estructura de TFX, depende de los métodos elegidos para su funcionalización. En general, los polímeros propuestos presentan una buena estabilidad térmica en aire, y en condiciones secas.

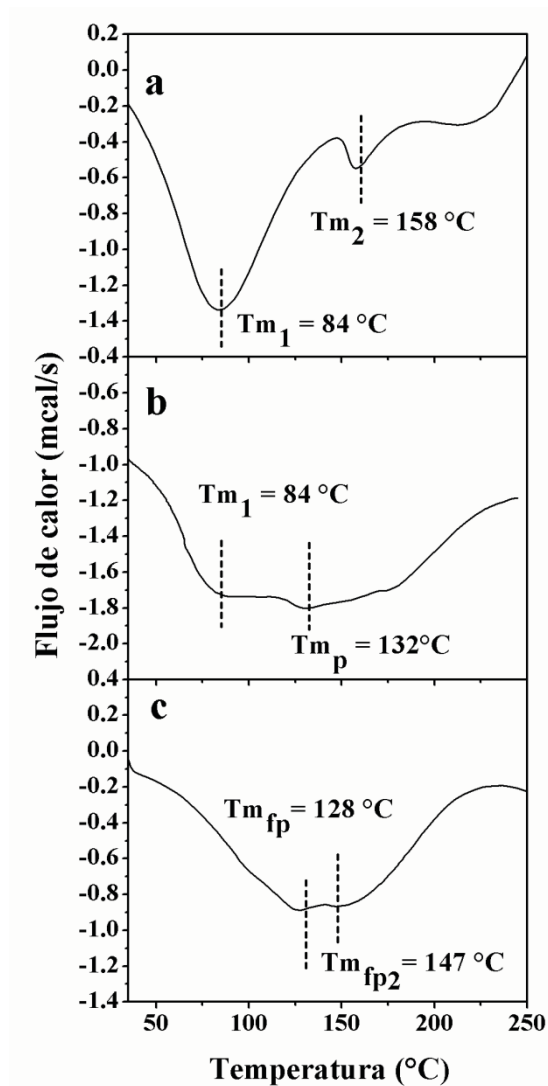


Figura 5.22. Termogramas DSC de clorhidrato de vancomicina (a); *IPN40D-c* (b) e *IPN40P-c* (c) cargados previamente con vancomicina·HCl. T_{m_p} = temperatura de fusión del polímero; $T_{m_{fp}}$ = temperatura de fusión de polímero-fármaco.

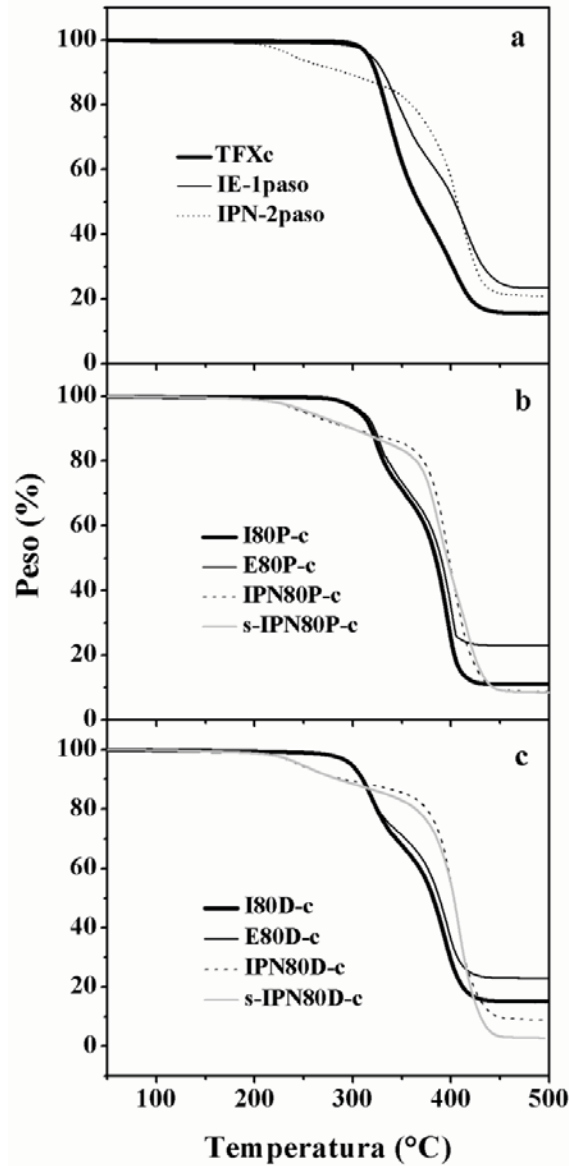


Figura 5.23. TGA de materiales TFXc modificados

5.1.9. Estudios de hinchamiento

Los hinchamientos en disolución tampón pH 7.0, a 25 °C, como función del tiempo, para los polímeros de TFX modificados con PNIPAAm/PAAc, usando diferentes métodos para el injerto de PNIPAAm, son mostrados en la Figuras 5.24 y 5.25. Los materiales TFX, sin modificar, presentan una capacidad de hinchamiento de 8 a 9 % en estos medios acuosos, debido a las propiedades hidrofílicas que le confiere su estructura química y componentes. Para todos los sistemas injertados y entrecruzados, el hinchamiento límite (W_{∞}) fue alcanzado a aproximadamente 3 h, mientras que para las IPNs y s-IPNs, estos valores fueron alcanzados después de 24 h. *IEc-1paso* alcanzó su W_{∞} después de una hora, mientras que su correspondiente IPN (*IPNc-2pasos*) lo obtuvo a las 24 h (Fig 5.25).

Tabla 5.5. Temperatura de descomposición térmica de los materiales estudiados por TGA

Muestras	TGA (°C)	Muestras	TGA (°C)
Catéter	(10 % pérdida peso)	Películas	(10 % pérdida peso)
<i>TFXc</i>	323	<i>TFXp</i>	340
<i>ISOP-c</i>	318	<i>I60P-p</i>	322
<i>ESOP-c</i>	322	<i>E60P-p</i>	325
<i>IPNSOP-c</i>	299	<i>IPN60P-p</i>	290
<i>s-IPNSOP-c</i>	299	<i>s-IPN60P-p</i>	290
<i>I60D-c</i>	310	<i>I40D-p</i>	314
<i>E60D-c</i>	310	<i>E40D-p</i>	313
<i>IPN60D-c</i>	290	<i>IPN40D-p</i>	280
<i>s-IPN60D-c</i>	285	<i>s-IPN40D-p</i>	285
<i>IEc-1pasos</i>	331		
<i>IPNc-2pasos</i>	292		

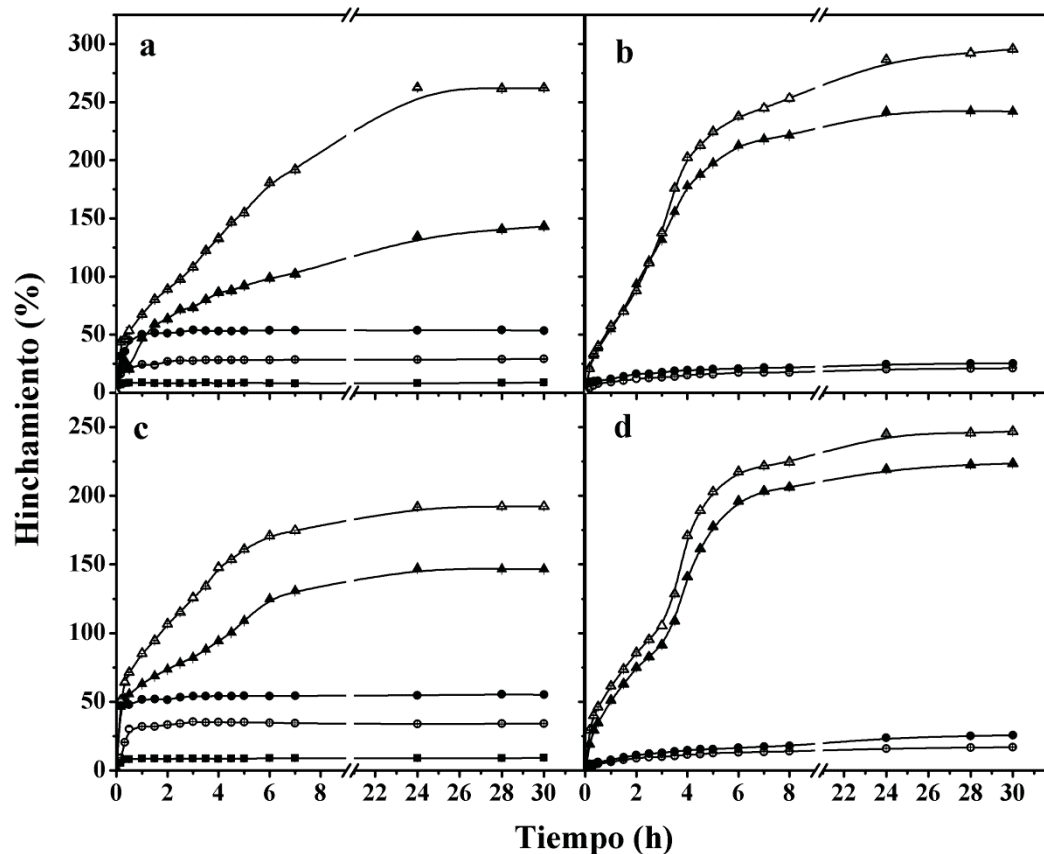


Figura 5.24. Porcentajes de hinchamiento en disolución tampón pH 7.0, a 25 °C, como función del tiempo, para materiales TFX funcionalizados con PNIPAAm/PAAc, con PNIPAAm injertado por el método P sobre catéteres (a) y películas (c); con PNIPAAm injertado por el método D sobre catéteres (b) y películas (d), para: TFX (no modificado) (■), *I60* (○), *E60* (●), *IPN60* (▲), y *s-IPN60* (△).

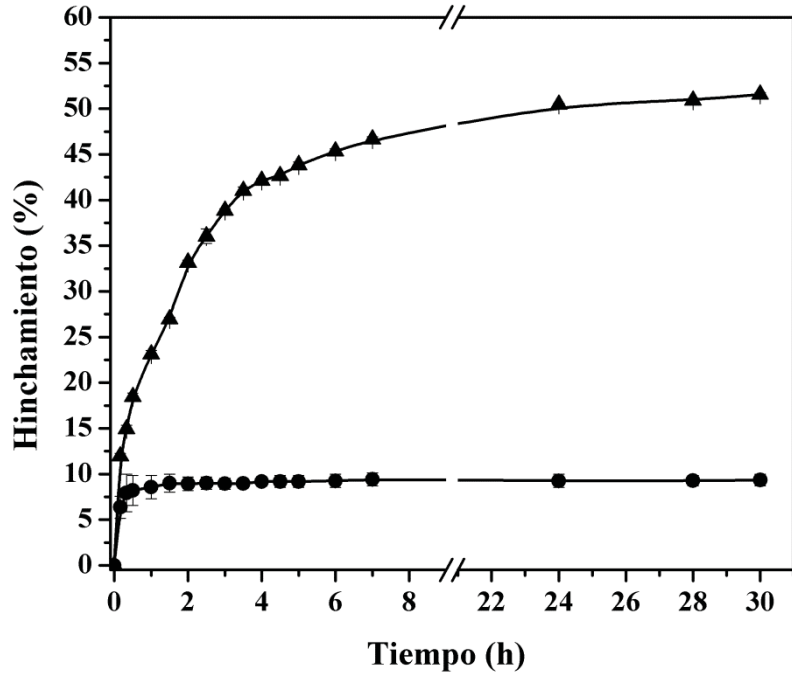


Figura 5.25. Porcentajes de hinchamiento como función del tiempo, en disolución tampón pH 7.0, a 25 °C, de *IEc-1paso* (●) e *IPNC-2pasos* (▲).

Generalmente, los valores de W_{∞} aumentan en el siguiente orden: TFX-g-PNIPAAm < *net*-TFX-g-PNIPAAm < *net*-TFX-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc < TFX-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc, excepto para los sistemas *s-IPN80P*, los cuales, por presentar un alto contenido de gel removible bajo las condiciones usadas para el hinchamiento, pierden peso a medida que se realiza el estudio. La mayoría de sistemas *s-IPNxP* fueron hinchados dos veces en la disolución tampón pH 7.0, con el propósito de remover manualmente el exceso de gel y lograr hinchamientos constantes después de las 3 horas de estudio, sin pérdida del material durante el estudio. Todos los valores de W_{∞} , a 25 °C, son resumidos en la Tabla 5.6. En ellos se refleja que la capacidad de hinchamiento es favorecida por el injerto de PNIPAAm y por el entrecruzamiento de sus cadenas a una dosis de 10 kGy. El entrecruzamiento de polímeros, a dosis relativamente bajas, puede ser empleado para la síntesis de hidrogeles con altas capacidades de absorción de agua. En otros reportes, los porcentajes de hinchamiento de algunos polímeros disminuyen con el aumento de la dosis de entrecruzamiento (*Rosiak y Olejniczak 1993; Ražem and Katushin-Ražem 2008*), mientras que para otros, un máximo nivel de hinchamiento es presentado a dosis relativamente bajas, pero luego esos niveles decrecen al aumentar la dosis de irradiación (*Veronese et al. 1991*).

Tabla 5.6. Valores de hinchamiento límite (W_{∞}), de LCST, pH crítico y sensibilidades a la temperatura y pH, para los materiales TFX funcionalizados con PNIPAAm/PAAc.

Catéter Código	W_{∞} (%)	LCST (°C)	S_T	pH crítico	S_{pH}	Película Código	W_{∞} (%)	LCST (°C)	S_T	pH crítico	S_{pH}
<i>IEc-1paso</i>	9	28	1.9	-	-						
<i>IPNc-2pasos</i>	50	32	1.1	5.8	7.3						
<i>I40P-c</i>	20	22	2.9	-	-	<i>I40P-p</i>	23	21	2.9	-	-
<i>E40P-c</i>	40	23	5.0	-	-	<i>E40P-p</i>	32	23	4.3	-	-
<i>IPN40P-c</i>	146	31	1.3	5.5	9.0	<i>IPN40P-p</i>	146	31	1.3	5.7	12.4
<i>s-IPN40P-c</i>	232	25	1.2	5.2	6.6	<i>s-IPN40P-p</i>	219	30	1.2	5.7	10.2
<i>I60P-c</i>	29	22	3.5	-	-	<i>I60P-p</i>	34	23	4.1	-	-
<i>E60P-c</i>	53	25	4.6	-	-	<i>E60P-p</i>	56	24	5.1	-	-
<i>IPN60P-c</i>	150	29	1.3	5.1	16.6	<i>IPN60P-p</i>	147	31	1.3	5.7	6.9
<i>s-IPN60P-c</i>	262	28	1.2	5.3	13.2	<i>s-IPN60P-p</i>	192	26	1.1	5.6	8.8
<i>I80P-c</i>	65	26	6.8	-	-	<i>I80P-p</i>	70	25	8.2	-	-
<i>E80P-c</i>	68	26	7.2	-	-	<i>E80P-p</i>	52	23	9.2	-	-
<i>IPN80P-c</i>	324	29	1.3	5.1	18.2	<i>IPN80P-p</i>	202	29	1.4	5.3	5.9
<i>s-IPN80P-c</i>	115	31	1.4	5.2	9.7	<i>s-IPN80P-p</i>	121	31	1.2	5.3	4.5
<i>I40D-c</i>	16	23	1.9	-	-	<i>I40D-p</i>	15	23	2.6	-	-
<i>E40D-c</i>	25	24	2.1	-	-	<i>E40D-p</i>	18	24	2.9	-	-
<i>IPN40D-c</i>	241	32	1.3	6.3	3.7	<i>IPN40D-p</i>	208	31	1.2	6.6	4.1
<i>s-IPN40D-c</i>	282	28	1.1	6.5	5.8	<i>s-IPN40D-p</i>	224	25	1.1	6.3	7.6
<i>I60D-c</i>	21	22	4.0	-	-	<i>I60D-p</i>	21	23	3.3	-	-
<i>E60D-c</i>	26	22	3.5	-	-	<i>E60D-p</i>	26	21	2.8	-	-
<i>IPN60D-c</i>	243	28	1.2	6.3	5.2	<i>IPN60D-p</i>	224	27	1.2	6.5	8.7
<i>s-IPN60D-c</i>	299	26	1.1	6.3	6.1	<i>s-IPN60D-p</i>	248	25	1.1	6.4	7.3
<i>I80D-c</i>	41	21	5.6	-	-	<i>I80D-p</i>	32	21	3.4	-	-
<i>E80D-c</i>	50	21	3.7	-	-	<i>E80D-p</i>	34	21	4.5	-	-
<i>IPN80D-c</i>	287	26	1.1	6.2	7.3	<i>IPN80D-p</i>	225	25	1.2	6.3	8.9
<i>s-IPN80D-c</i>	315	25	1.1	6.2	6.6	<i>s-IPN80D-p</i>	240	24	1.1	6.4	7.2

5.1.9.1. Sensibilidad a la temperatura y pH.

En la Figura 5.26 se muestra la dependencia de los porcentajes de hinchamiento con la temperatura. Para los materiales TFX-*g*-PNIPAAm y *net*-TFX-*g*-PNIPAAm, la LCST fue observada entre 21 y 26 °C. Otros estudios sobre copolímeros de PNIPAAm han demostrado que la presencia de cargas o componentes hidrofílicos en las cadenas del polímero tienden a incrementar la LCST, mientras que residuos con carácter hidrofóbico reducen este valor (Andrade-Vivero et al. 2007). Entonces, el desplazamiento de la LCST a temperaturas más

bajas que las reportadas para cadenas de PNIPAAm injertadas (entre 29-36 °C) (Hirokawa y Tanaka 1984; Schild 1992; Hoffman et al. 2000), es causado por la asociación del PNIPAAm con los segmentos alifáticos presentes en TFX. La LCST se desplazó a rangos de temperatura superiores (26 – 32 °C) con la interpenetración de PAAc, debido a la formación de complejos intermoleculares entre los grupos carboxílicos y los grupos amida que componen las cadenas del polímero (Aoki et al. 1994) (Figura 5.27; Tabla 5.6). Los valores de LCST y S_T fueron generalmente altos en los polímeros entrecruzados y sus correspondientes IPNs, comparados contra los materiales injertados y sus respectivas s-IPNs. El entrecruzamiento por radiación γ extendió la diferencia entre el estado hinchado y colapsado del material.

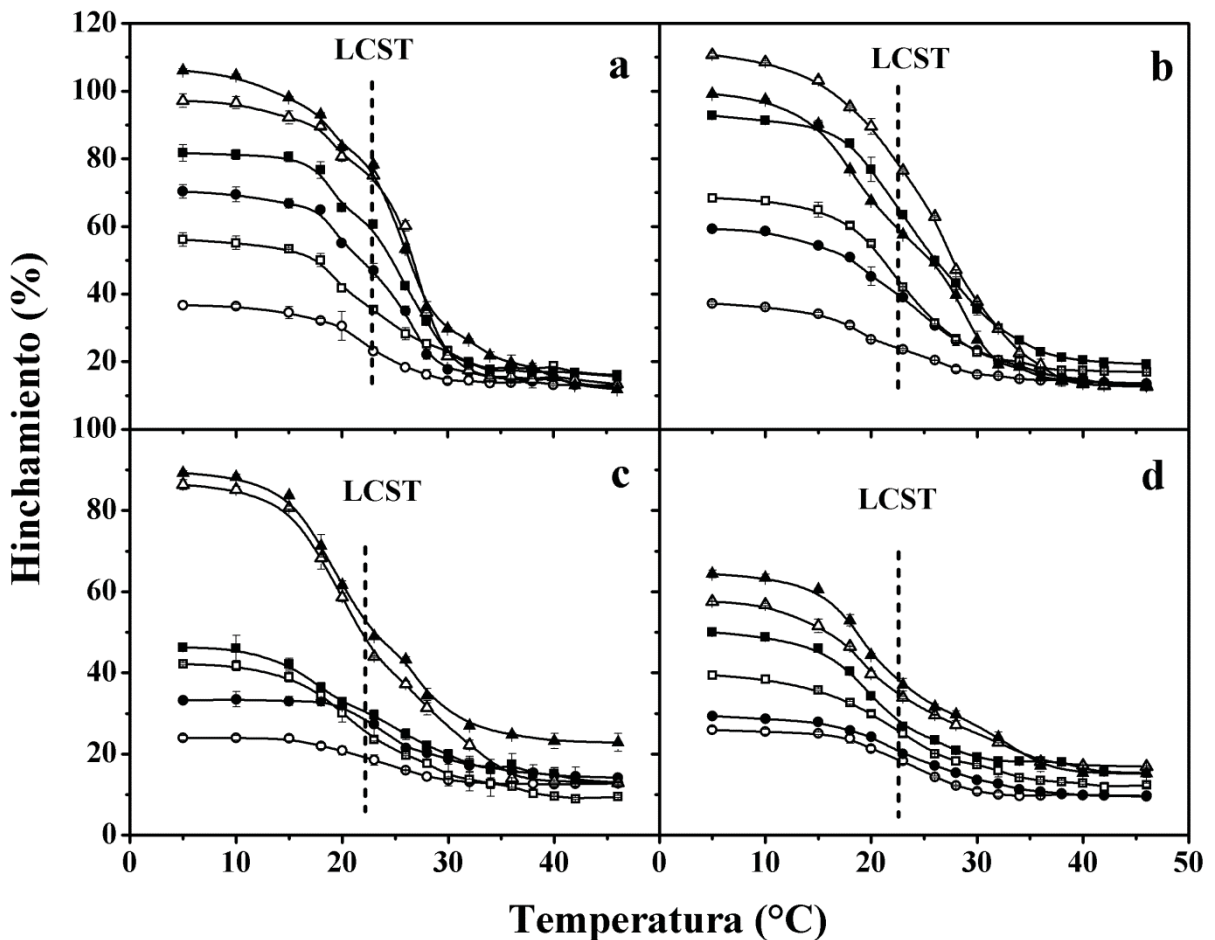


Figura 5.26. Porcentajes de hinchamiento en disolución tampón pH 7.0, como función de la temperatura, para materiales TFX-*g*-PNIPAAm y *net*-TFX-*g*-PNIPAAm, con PNIPAAm injertado por el método P sobre catéteres (a) y películas (c); con PNIPAAm injertado por el método D sobre catéteres (b) y películas (d), para: I40 (○), E40 (●), I60 (□), E60 (■), I80 (△) y E80 (▲). Las líneas discontinuas representan el valor del punto crítico (LCST)

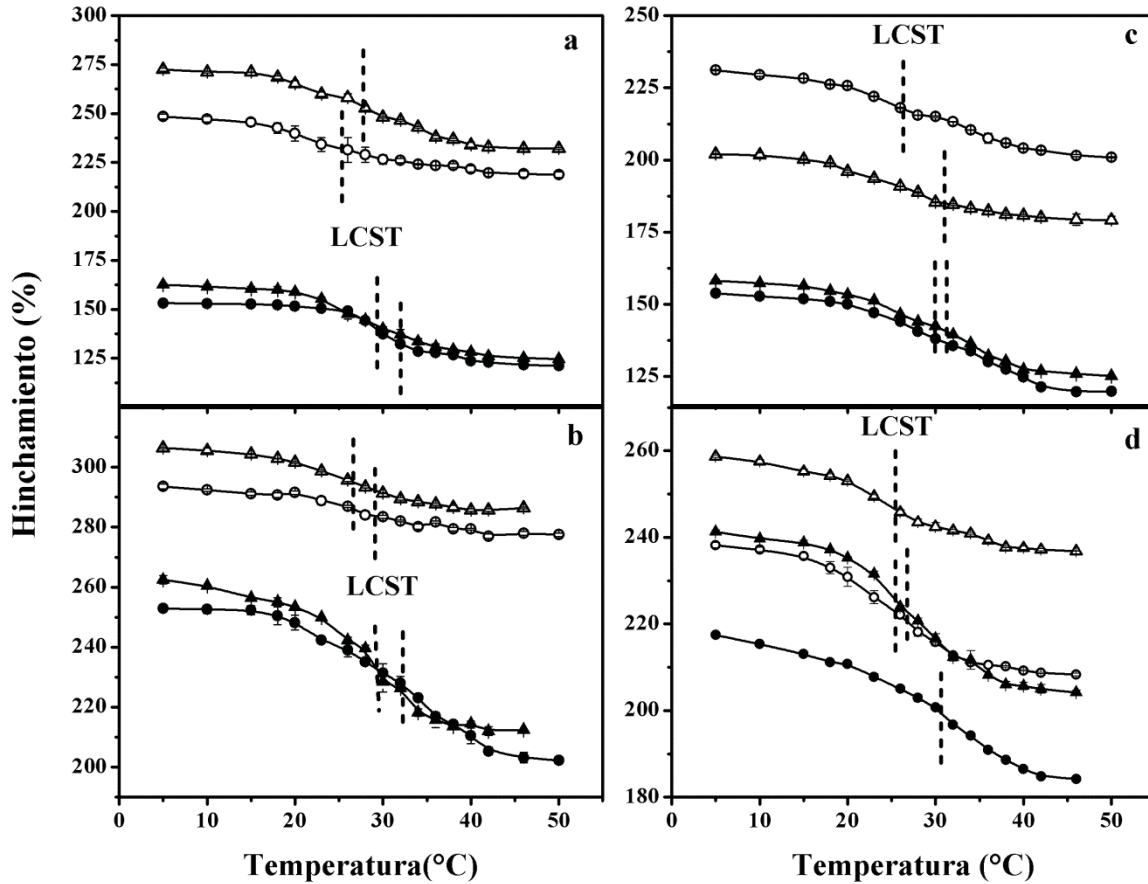


Figura 5.27. Porcentajes de hinchamiento en disolución tampón pH 7.0, como función de la temperatura, para materiales TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc y *net*-TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc, con PNIPAAm injertado por el método P sobre catéteres (a) y películas (c); con PNIPAAm injertado por el método D sobre catéteres (b) y películas (d), para: *IPN40* (●), *s-IPN40* (○), *IPN60* (▲) y *s-IPN60* (△). Las líneas discontinuas representan el valor del punto crítico (LCST)

Los materiales *IPNxP* y *s-IPNxP* exhibieron un pH crítico en el rango de 5.1-5.7, mientras que los sistemas *IPNxD* y *s-IPNxD* presentaron estos valores entre 6.2 y 6.6 (Fig. 5.28; Tabla 5.6). Las redes de PAAc dispersas en la masa de la matriz polimérica están menos expuestas a la ionización de sus grupos carboxílicos, por la acción de un cambio externo de pH, comparadas con las redes interpenetradas entre las cadenas de PNIPAAm injertadas sobre la superficie. Una mayor formación de enlaces de hidrógeno y la corta distancia entre los grupos carboxílicos, son la causa de que el pH crítico haya sido desplazado de 5.1 a 6.6 (Ruiz et al. 2008; Muñoz-Muñoz et al. 2012). Los valores de S_{pH} aumentan con la cantidad de PNIPAAm/PAAc injertada sobre TFX.

El material *IEc-1paso* presentó una LCST a 29 °C y su correspondiente IPN presentó una respuesta dual a la temperatura y pH, hinchándose a bajas temperaturas o a pHs alcalinos, y colapsando por encima de 32 °C o a valores inferiores de pH 5.8 (Fig. 5.29; Tabla 5.6). Los valores de LCST para estos materiales estuvo en el rango entre 29 y 36 °C, y el valor de pH crítico estuvo en los rangos observados para las redes de PAAc interpenetradas en los sistemas con PNIPAAm injertado en la superficie de TFX (por método P). Sin embargo, *IEc-1paso* e *IPNc-2pasos*, exhibieron hinchamientos más bajos que los otros sistemas, debido a la alta densidad de entrecruzamiento en la red de PNIPAAm injertada. Todos los estudios de hinchamiento fueron realizados por duplicado, encontrándose variaciones estadísticas mínimas entre cada medición.

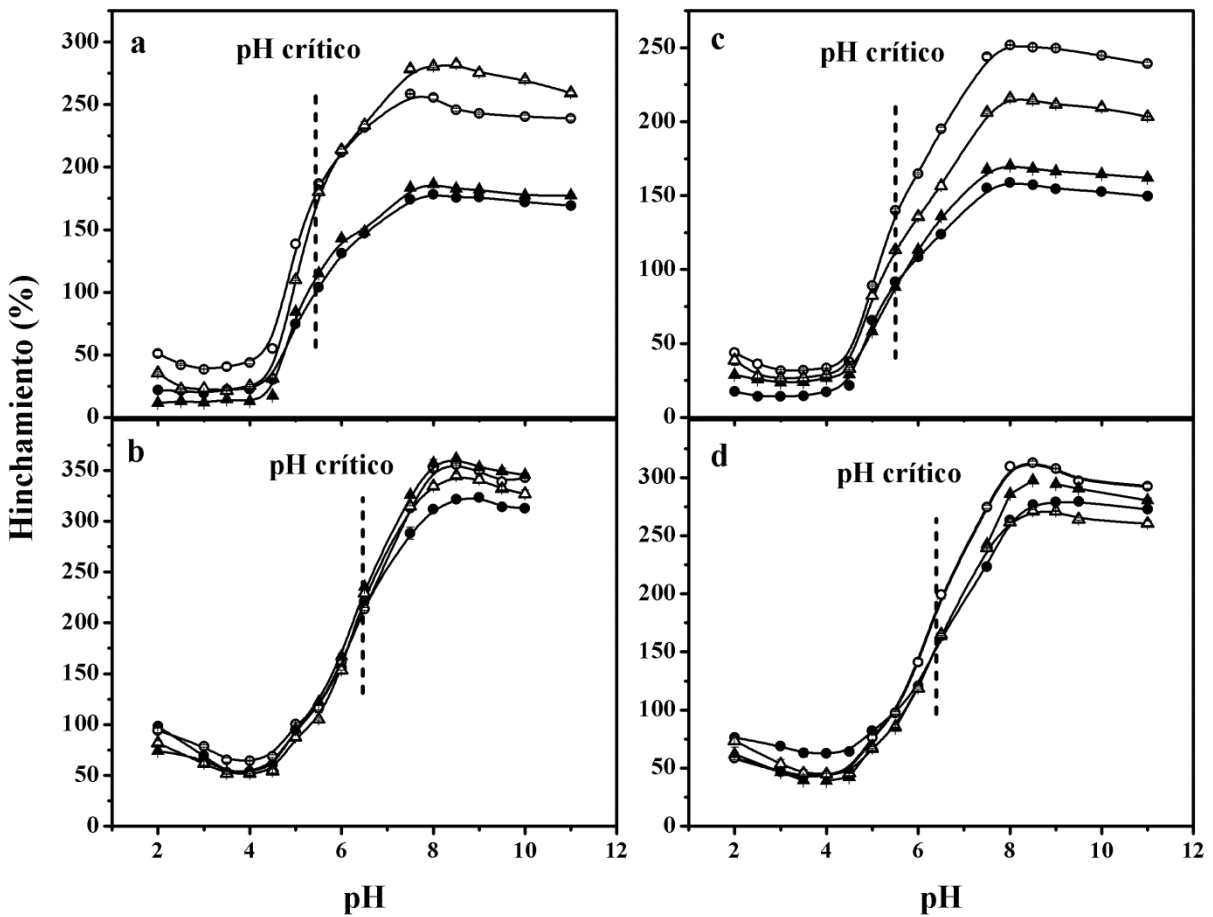


Figura 5.28. Porcentajes de hinchamiento como función del pH, en disoluciones tampón, a 25 °C, para materiales TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc y *net*-TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc, con PNIPAAm injertado por el método P sobre catéteres (a) y películas (c); con PNIPAAm injertado por el método D sobre catéteres (b) y películas (d), para: *IPN40* (●), *s-IPN40* (○), *IPN60* (▲) y *s-IPN60* (△). Las líneas discontinuas representan el valor del punto crítico (pH crítico)

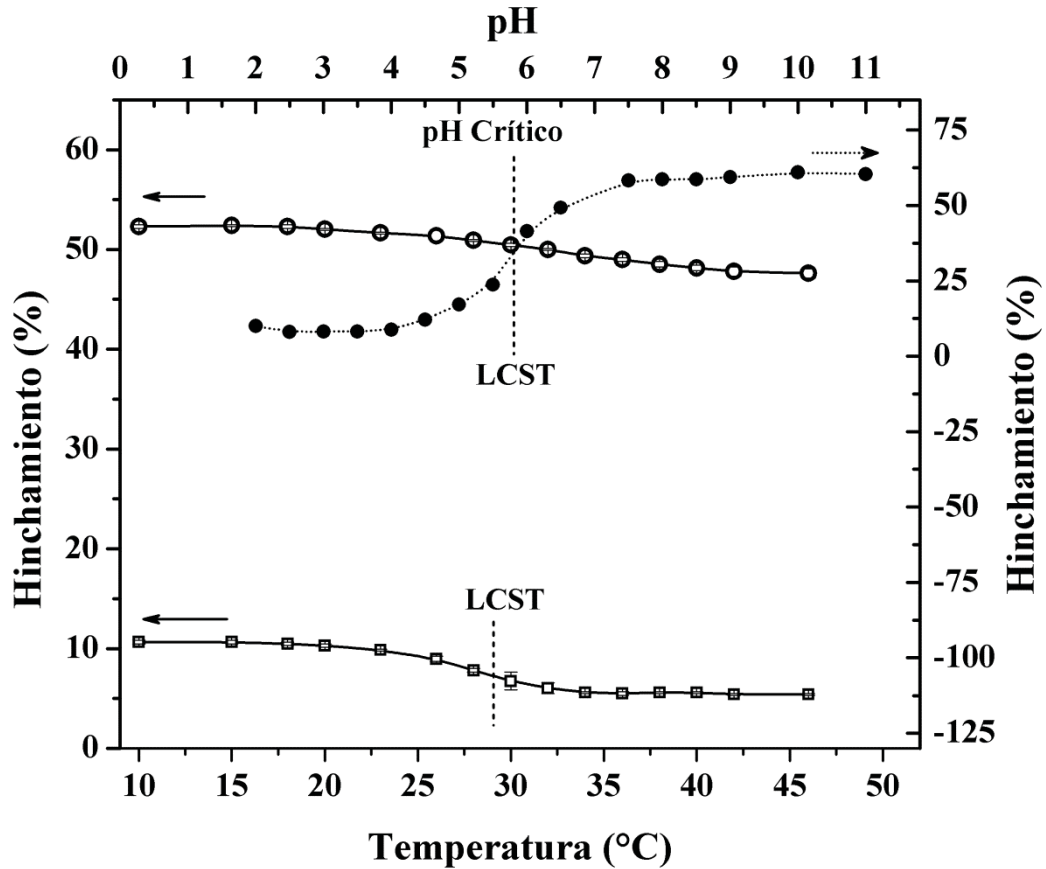


Figura 5.29. Porcentajes de hinchamiento como función de la temperatura en disolución tampón pH 7.0 (líneas continuas y símbolos abiertos), y del pH, a 25 °C, en disoluciones tampón (líneas punteadas y símbolos cerrados), para: *IEc-1paso* (cuadros) e *IPNc-2pasos* (círculos). Las líneas discontinuas representan los valores de los puntos críticos (LCST y pH crítico)

5.1.10. Carga de vancomicina y ensayo microbiológico

5.1.10.1. Carga de vancomicina

Las IPNs y s-IPNs, sintetizadas sobre los catéteres y las películas, presentaron una alta capacidad para cargar cantidades significativas del fármaco. Los resultados de carga se encuentran resumidos en la Tabla 5.7. La cantidad de vancomicina cargada aumentó con el contenido de PNIPAAm/PAAc. Sin embargo, la cantidad total de carga fue mayor y más rápida (en los rangos de tiempo estudiados), cuando los polímeros fueron hinchados antes de ser inmersos en la disolución del fármaco. Para estos materiales, un equilibrio de carga fue alcanzado a las 70 h, mientras que los polímeros que fueron cargados desde su estado seco, presentaron dicho equilibrio a aproximadamente las 100 h, pero alcanzando concentraciones del fármaco (mg/g de IPN) inferiores a los mostrados por los polímeros hinchados en un tiempo más corto. Esto indica que la carga de vancomicina en estos materiales podría

presentar un incremento a tiempos superiores a las 100 horas de estudio, hasta alcanzar otro equilibrio de carga, lo que sería determinado por la capacidad máxima de hinchamiento del material y la disposición de los grupos carboxílicos (en estado ionizado) para interactuar con el fármaco. La Figura 5.30 muestra los perfiles de carga de vancomicina en los materiales TFXc modificados. El sistema *IPNc-2pasos* y los TFXp modificados mostraron la misma tendencia (resultados no mostrados en gráfica), con una alta capacidad de absorción del principio activo (Tabla 5.7).

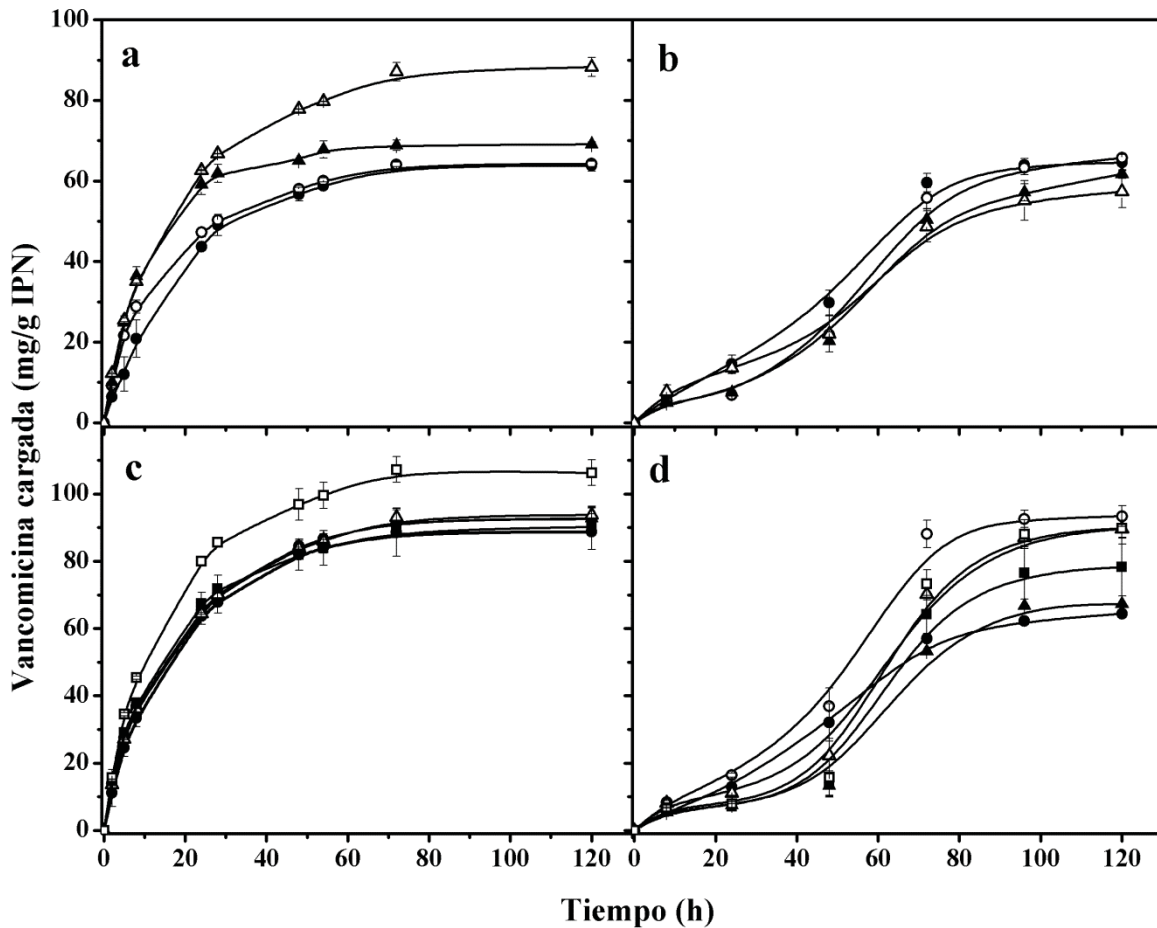


Figura 5.30. Perfiles de carga de vancomicina como función del tiempo, en agua, a 5 °C, sobre los materiales TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc y *net*-TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc, con PNIPAAm injertado por el método P (a; b), o por el método D (c; d); usando los materiales previamente hinchados en disolución tampón pH 8.0, a temperatura ambiente (a; c), o desde su estado seco (b;d), para: *IPN40* (●), *s-IPN40* (○), *IPN60* (▲), *s-IPN60* (△), *IPN80* (■) y *s-IPN80* (□).

Tabla 5.7. Resultados de carga de vancomicina sobre los polímeros TFX modificados con PNIPAAm/PAAc.

Catéter Código	Vancomicina cargada		Película Código	Vancomicina cargada	
	(% absorbido)	(mg / g IPN)		(% absorbido)	(mg / g IPN)
Carga desde polímero en estado seco					
IPNc-1paso	61.2 (1.2)	50.1 (5.2)	IPN40P-p	75.6 (0.5)	58.7 (0.1)
IPN40P-c	80.5 (0.7)	64.6 (2.3)	s-IPN40P-p	66.6 (1.4)	67.6 (0.8)
s-IPN40P-c	65.2 (0.3)	65.7 (1.4)	IPN60P-p	67.8 (0.1)	63.7 (1.6)
IPN60P-c	70.6 (0.8)	61.7 (1.0)	s-IPN60P-p	63.5 (1.8)	65.3 (0.4)
s-IPN60P-c	60.0 (0.6)	57.4 (4.0)	IPN40D-p	67.8 (2.6)	64.7 (1.0)
IPN40D-c	72.6 (2.0)	64.4 (1.0)	s-IPN40D-p	66.1 (3.8)	59.7 (5.5)
s-IPN40D-c	84.6 (0.6)	93.4 (3.1)	IPN60D-p	77.0 (1.1)	61.7 (7.0)
IPN60D-c	69.3 (0.1)	67.3 (0.2)	s-IPN60D-p	79.7 (1.0)	73.4 (0.5)
s-IPN60D-c	76.5 (1.0)	89.6 (2.5)	IPN80D-p	81.8 (4.7)	72.1 (2.6)
IPN80D-c	77.8 (0.7)	78.3 (8.5)	s-IPN80D-p	71.0(3.4)	83.8 (3.2)
s-IPN80D-c	72.7(0.7)	89.8 (4.7)			
Carga desde polímero en estado hinchado					
IPNc-1paso	65.2 (0.6)	54.3 (3.1)	IPN40P-p	78.1 (0.1)	63.4 (0.6)
IPN40P-c	66.0 (2.5)	63.7 (1.2)	s-IPN40P-p	69.4 (1.5)	65.2 (0.6)
s-IPN40P-c	63.2 (0.9)	64.1 (0.5)	IPN60P-p	80.3 (1.7)	71.5 (1.9)
IPN60P-c	82.2 (1.7)	68.9 (1.3)	s-IPN60P-p	78.9 (0.3)	75.5 (0.8)
s-IPN60P-c	77.2 (0.1)	87.2 (2.3)	IPN40D-p	75.6 (3.4)	70.7 (3.9)
IPN40D-c	71.7 (2.8)	88.6 (5.1)	s-IPN40D-p	77.8 (2.7)	72.5 (0.9)
s-IPN40D-c	73.3 (0.9)	92.3 (3.4)	IPN60D-p	79.5 (0.9)	83.9 (1.4)
IPN60D-c	77.5 (0.9)	87.2 (0.5)	s-IPN60D-p	72.8 (3.8)	88.4 (3.8)
s-IPN60D-c	74.0 (5.0)	93.2 (2.1)	IPN80D-p	71.5 (0.9)	84.5 (1.9)
IPN80D-c	70.7 (1.2)	89.1 (0.8)	s-IPN80D-p	84.2(3.3)	97.4 (5.1)
s-IPN80D-c	78.1(1.2)	107.2 (3.8)			

El pretratamiento de los polímeros, sumergiéndolos en medios con pH 8.0, antes de realizar la carga del fármaco, fue reportada en estudios previos para investigaciones relacionadas con la síntesis IPNs sobre matrices de PP (Muñoz-Muñoz *et al.* 2009; Muñoz-Muñoz *et al.* 2012). Este proceso es fundamental para facilitar el acceso de la vancomicina a los grupos carboxílicos ionizados del PAAc presentes en la red interpenetrada. La ionización de PAAc también incrementa los hinchamientos del material en la disolución de carga. Por otro lado, a 5 °C (valor inferior a la LCST), las IPNs y s-IPNs sintetizadas exhibieron altos niveles de hinchamiento. Entonces, los polímeros fueron sometidos a esta temperatura, con el propósito de facilitar la difusión del fármaco a través de los materiales funcionalizados con PNIPAAm/PAAc.

5.1.10.2. Ensayo microbiológico

Las zonas de inhibición (mm) de *S. aureus* formadas alrededor de los polímeros TFX funcionalizados, cargados con el antibiótico vancomicina, fueron medidas y consignadas en la Tabla 5.8. Los diámetros medidos estuvieron en los rangos de 20 a 30 mm. La Figura 5.31 muestra una pequeña distribución bimodal sobre las zonas de inhibición, debido a la presencia de alguna cepa moderadamente susceptible sobre los materiales. La zona borrosa o fantasma es el resultado de una parcial inhibición y no debe ser incluida en las mediciones de la región inhibida (Acar y Goldstein 1991). Esta colonización sobre los polímeros cargados con vancomicina puede ser atribuida a *Pseudomonas aeruginosa* u otra cepa que predominan en las condiciones de lavados. Sin embargo, las pruebas realizadas sobre los polímeros previamente esterilizados por autoclave y cargados bajo condiciones inertes, evidenciaron la formación de una zona de inhibición completa (Fig. 5.32). Por lo tanto, los procesos de carga de fármaco y manipulación de los polímeros, deben ser realizados bajo condiciones estériles. La inhibición de *S. aureus* usando los polímeros TFX modificados fue alta, comparada con la inhibición presentada por el catéter, no modificado, que fue cargado con vancomicina usando las mismas condiciones que para los demás polímeros. La actividad antibacteriana mostrada indica que la cantidad cargada y liberada de vancomicina, se encuentra por encima de las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC, por sus siglas en inglés), y que en conjunto con las propiedades del fármaco, los polímeros sintetizados (IPNs y s-IPNs) resultan adecuados para la inhibición de *S. aureus*.

Tabla 5.8. Patrones de susceptibilidad de *S. aureus* a materiales TFX funcionalizados con PNIPAAm/PAAC, cargados con vancomicina. Evaluación desde muestras no esterilizadas y materiales esterilizados por autoclave.

Catéter	Vancomicina cargada (mg/g polymer)	Zona de inhibición (mm)	Film	Vancomicina cargada (mg/g polymer)	Zona de inhibición (mm)
<i>No esterilizados</i>			<i>No esterilizados</i>		
IPN40P-c	64.9	25	IPN40P-p	65.8	30
s-IPN40P-c	64.3	25	s-IPN40P-p	66.7	28
IPN60P-c	70.1	25	IPN60P-p	64.9	25
s-IPN60P-c	82.5	25	s-IPN60P-p	70.4	25
IPN40D-c	83.2	26	IPN40D-p	80.5	28
s-IPN40D-c	94.6	20	s-IPN40D-p	87.8	30
IPN60D-c	84.8	22	IPN60D-p	88.6	30
s-IPN60D-c	89.7	23	s-IPN60D-p	89.4	27
<i>Esterilizados</i>					
TFX-c	12.7	10			
IPN40P-c	66.6	28			
IPN40D-c	65.7	30			

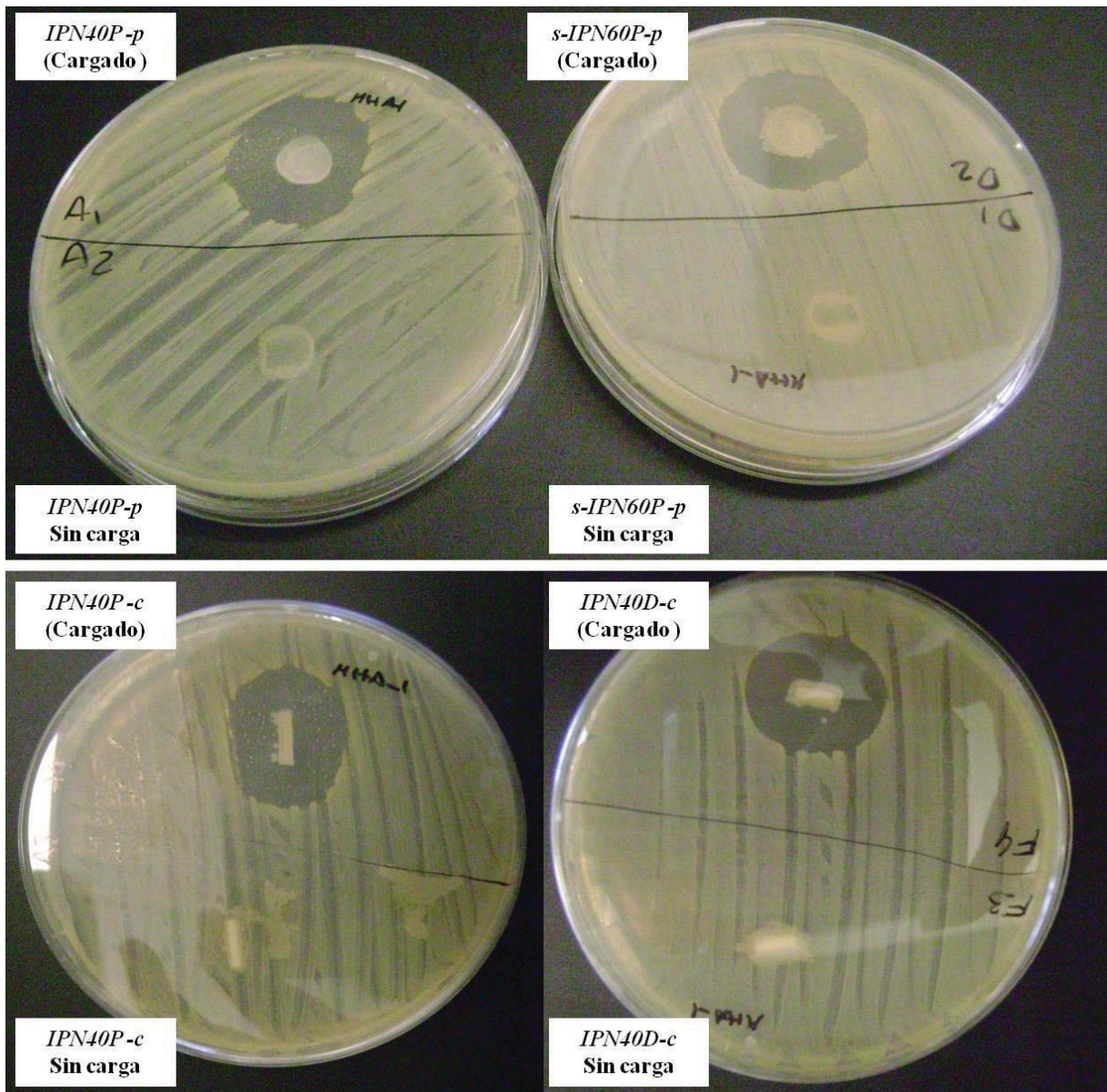


Figura 5.31. Zona de inhibición de *S. aureus* para IPNs con y sin carga de vancomicina. (Materiales no esterilizados)

5.1.11. Liberación de vancomicina

Los perfiles de liberación de vancomicina de los polímeros propuestos en esta investigación, desde su estado seco e hinchado, son mostrados en la Figura 5.33. Los materiales TFXc-g-PNIPAAm-inter-net-PAAC y net-TFXc-g-PNIPAAm-inter-net-PAAC presentaron una alta capacidad para liberar el fármaco de forma sostenida, alcanzado concentraciones máximas después de las 10 h de estudio para los materiales utilizados en estado hinchado, y a las 24 horas para los materiales en estado seco. Los sistemas *IPN80p* y *s-IPN80P* no fueron utilizados en estos estudios, debido a la poca resistencia a la

fragmentación que presentan al ser manipulados en estado hinchado, cualidad que no resulta conveniente para la aplicación que se le quiere dar a estos materiales. El sistema *IPNc-2pasos* y los sistemas TFXp funcionalizados con PNIPAAm/PAAc presentaron las mismas tendencias mostradas por los materiales TFXc. La liberación desde los polímeros secos e hinchados ofrece la versatilidad para emplear estos materiales como sistemas de implante, adaptables a las necesidades o requerimientos de los diferentes tratamiento médicos o procedimientos quirúrgicos existentes.



Figura 5.32. Zona de inhibición de *S. aureus* para IPNs con y sin carga de vancomicina. (Materiales esterilizados con autoclave y proceso de carga realizado bajo condiciones estériles)

5.1.12. Adsorción de proteínas

La adsorción de proteínas es la primera etapa que resulta cuando la sangre entra en contacto con la superficie del material. La absorción de fibrinógeno puede ser influenciada por adhesión plaquetaria y endotelial, dependiendo de la conformación de la proteína adsorbida (*Lindon et al. 1986*). Los protocolos convencionales para la determinación de proteínas, como el de Lowry (*Lowry et al. 1951*) o Biuret (*Weichselbaum 1946*) y todas sus modificaciones, han sido ampliamente usados y aplicados en soluciones. La limitación de estos métodos es atribuida a que no son compatibles con ciertos sistemas tampón (o amortiguadores), detergentes o con presencia de sales. Estas dificultades pueden ser evitadas incluyendo una etapa de precipitación, la cual puede, sin embargo, no siempre resultar determinada cuantitativamente y de forma reproducible para soluciones diluidas. Las restricciones aumentan cuando la proteína se presenta en forma de agregados, células enteras, o están unidas a superficies sólidas (*Dieckmann-Schuppert y Schnittler 1997*). Bajo estas condiciones, la determinación de proteínas es extremadamente complicada y la cantidad estimada puede ser una medida aproximada. El ensayo "Amido-Black" que fue introducido en los años 30 (*Heinzel et al. 1965*) y consiste principalmente en la cuantificación fotométrica de un colorante, aunque fue un procedimiento que no se difundió ampliamente, ha despertado un

mayor interés, después de las publicaciones de Schaffner (*Schaffner y Weissman 1973*), Sportsman (*Sportsman y Elder 1984*) y Henkel (*Henkel y Bieger 1994*).

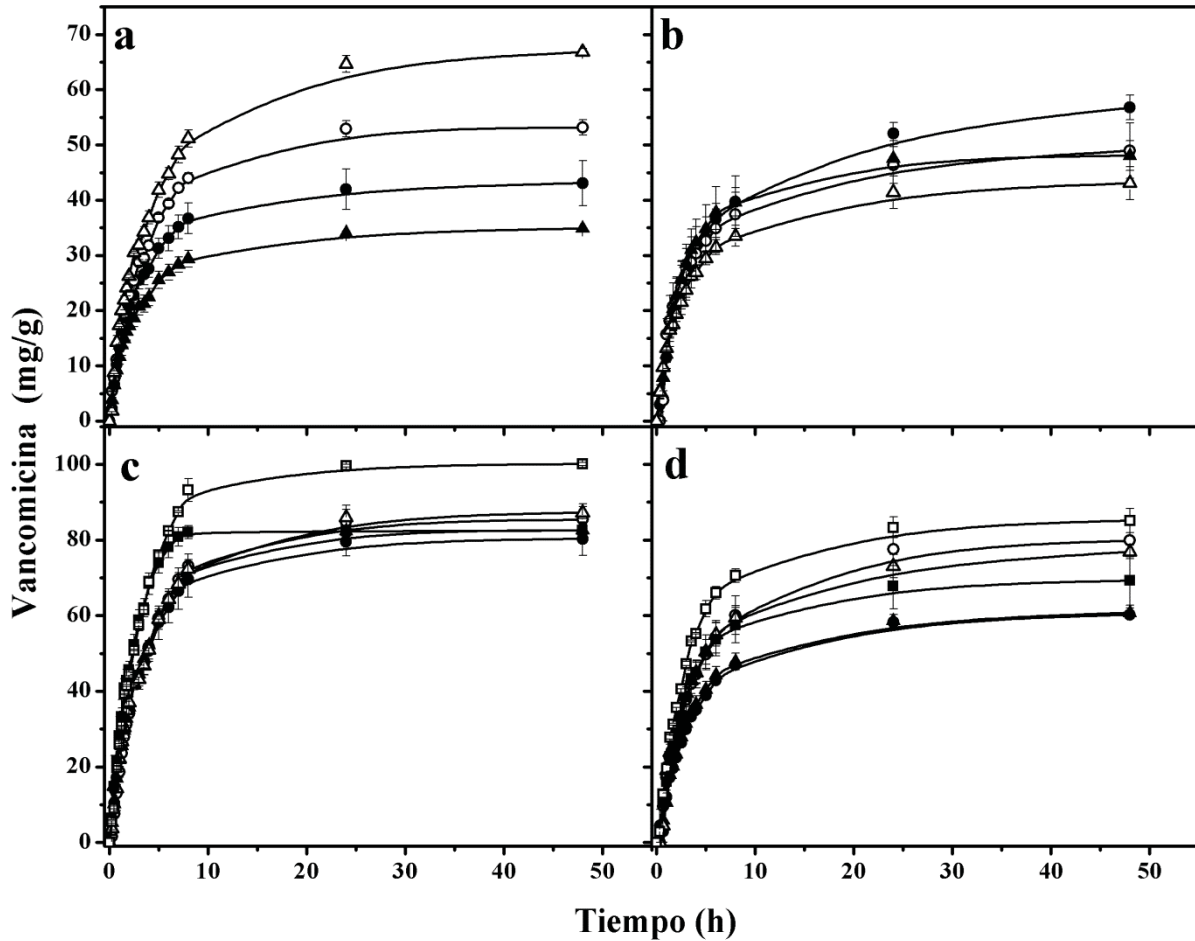


Figura 5.33. Perfiles de liberación de vancomicina obtenidos a diferentes tiempos, en disolución tampón de fosfato pH 7.4, a 37 °C, desde: *IPN40* (●), *s-IPN40* (○), *IPN60* (▲), *s-IPN60* (△), *IPN80* (■) y *s-IPN80* (□); para los materiales TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc y *net*-TFX-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc, con PNIPAAm injertado por el método P (a; b), o por el método D (c; d); usando los materiales hinchados en la disolución acuosa del fármaco (a; c), o desde su estado seco (b; d).

En esta investigación, se usó un método Amido-Black modificado para la cuantificación de fibrinógeno y albúmina. Este método es altamente sensible y apropiado para la cuantificación de proteínas en cultivos celulares, células y tejidos homogeneizados, y proteínas inmovilizadas sobre superficies sólidas (*Dieckmann-Schuppert y Schnittler 1997*).

Las cantidades de proteínas adsorbidas, incluyendo albúmina (BSA) y fibrinógeno sobre las superficies de los materiales TFXp modificados, son mostradas en la Figura 5.34. Estos niveles fueron investigados usando concentraciones fisiológicas, en las cuales la concentración de BSA (30 mg/mL) estuvo un orden de magnitud por encima que la de fibrinógeno (3 mg/mL) (Zha et al. 2009). Los resultados de adsorción están dados en relación de la absorbancia de la solución eluyente, tras la eliminación del colorante unido, el cual es proporcional a la cantidad de proteína enlazada a la superficie de los materiales (Niimi et al. 1997; Zha et al. 2009). La cantidad de fibrinógeno adsorbida sobre la superficie de TFXp (no modificado) fue más alta que en los polímeros funcionalizados, lo que indica que una superficie menos hidrofílica es sensible a la adsorción de proteínas. Las muestras adsorbieron predominantemente albúmina, aunque la cantidad total de proteínas adsorbidas fue significativamente menor que la presentada en los discos de nitrocelulosa, la cual fue utilizada como control positivo. La nitrocelulosa tiene altos niveles de adsorción de fibrinógeno y BSA ($1.4 \text{ mg/cm}^2 \pm 0.06$ y $0.4 \text{ mg/cm}^2 \pm 0.09$, respectivamente), con relación a otros materiales. Los valores de adsorción en nitrocelulosa no fueron incluidos en la Figura 5.34. Aunque los resultados obtenidos deben correlacionarse con otras pruebas de biocompatibilidad, la relación de proteína adsorbida refleja un comportamiento positivo para su aplicación como implantes.

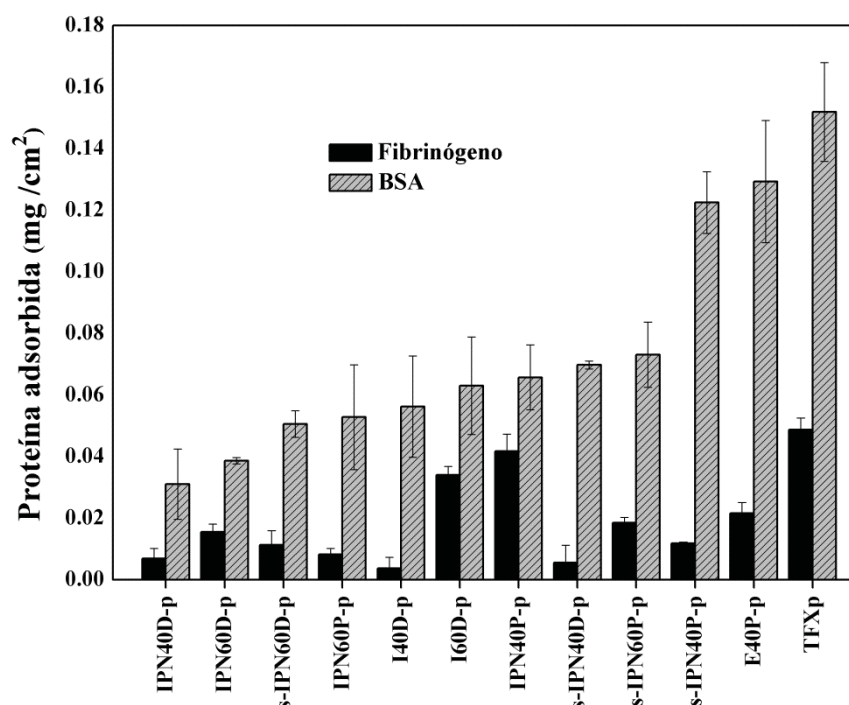


Figura 5.34. Adsorción de seroalbúmina bovina (BSA) y fibrinógeno desde los materiales TFXp y TFXp modificados. Los valores están dados como los porcentajes de adsorción sobre la superficie polimérica.

5.1.13. Hémolisis

La hemólisis juega un rol importante, en términos de la compatibilidad en sangre y correlaciona con los estudios de crecimiento celular (Wennber y Hensten-Pettersen 1981; Motlagh et al. 2007). Los eritrocitos fueron incubados en tampón fisiológico (PBS) pH 7.4, en presencia de los materiales TFXc funcionalizados con PNIPAAm (*I40P-c*, *I40D-c*, *E40P-c* y *E40D-c*) o con PNIPAAm/PAAc (*IPN40P-c*, *s-IPN40P-c*, *IPN60P-c*, *s-IPN60P-c*, *IPN40D-c*, *s-IPN40D-c*, *IPN60D-c*, *s-IPN60D-c* e *IPNc-2pasos*). La actividad hemolítica de los materiales fue menor que 5 %, excepto para el material *net*-TFXc-*g*-PNIPAAm sintetizado por el método P (*E40P*) y para el sistema derivado de la preparación de injerto por el método de un paso (*IPNc-2pasos*). El material *IPNc-2pasos* fue descartado para estudios posteriores relacionados con la biocompatibilidad, debido al alto nivel de hemólisis obtenido, comparado con los obtenidos para los demás polímeros. La rugosidad asociada del proceso de modificación, puede estar relacionada con los resultados negativos de *IPNc-2pasos*. El sistema *net*-TFXc-*g*-PNIPAAm (*E40D-c*) estudiado, obtenido del método de injerto dirigido a la modificación de la masa de TFX, causó un nivel de hemólisis de 4.8 %, mientras que las IPNs y s-IPNs derivadas de ese mismo método, mostraron niveles entre 1.1 y 3.2 % (Fig. 5.35). Los tubos sin modificar (TFXc), no causaron efectos hemolíticos significativos (3.1 %). Generalizando, el entrecruzamiento de cadenas de PNIPAAm por irradiación γ , causó un aumento en los niveles de hemólisis sobre los materiales analizados, mientras que la incorporación de PAAc en la masa de la matriz polimérica no promueve este efecto. Estos resultados confirman que las IPNs y s-IPNs sintetizadas no pueden ser consideradas como hemolíticas.

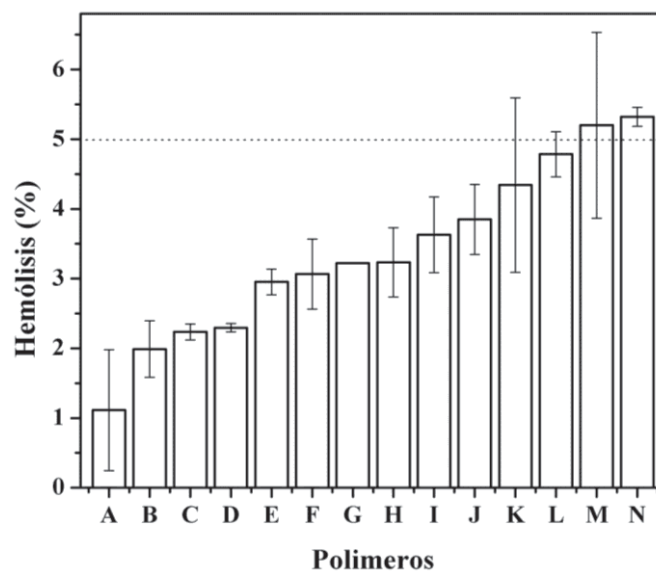


Figura 5.35. Porcentajes de hemólisis de sangre de rata, causados por los materiales TFXc modificados: *s-IPN60D-c* (A), *IPN40D-c* (B), *I40D-c* (C), *s-IPN40P-c* (D), *s-IPN60P-c* (E) TFXc (sin modificar) (F), *IPN60P-c* (G), *IPN40P-c* (H), *s-IPN40D-c* (I), *IPN60D-c* (J), *I40P-c* (K), *E40D-c* (L), *IPNc-2steps* (M) y *E40P-c* (N). La línea discontinua corresponde a los niveles permisibles de hemólisis (5 %).

5.1.14. Trombogenicidad

Los ensayos de trombogenicidad fueron realizados sobre los polímeros TFXp y TFXp funcionalizados, con el propósito de facilitar la extracción y cuantificación de los trombos formados. La inducción de formación de trombos sobre la superficie de las películas fue evaluada gravimétricamente, después de un contacto de 30 minutos con la sangre. Las cajas Petri fueron usadas como controles positivos fueron altamente trombogénicas ($0.044 \text{ g} \pm 0.008$), mientras que TFX no modificado, comúnmente usado como materia prima para la fabricación de dispositivos médicos, fue menos trombogénico ($0.022 \text{ g} \pm 0.008$). Los pesos relativos de los coágulos formados sobre la superficie de las películas modificadas, fueron normalizados con respecto a la cantidad formada en los controles positivos (Fig. 5.36). Todas las IPNs y s-IPNs fueron menos trombogénicas que TFXp. Estas mediciones permiten confirmar que la modificación de la superficie o la masa, en el proceso de funcionalización de TFX con PNIPAAm/PAAc, estimula una actividad antitrombogénica y afecta el comportamiento de interacción material-sangre. Esta capacidad antitrombogénica puede ser relacionada a la energía de superficie, composición, morfología o topología adoptada por el poliuretano al ser modificado con polímeros hidrofílicos.

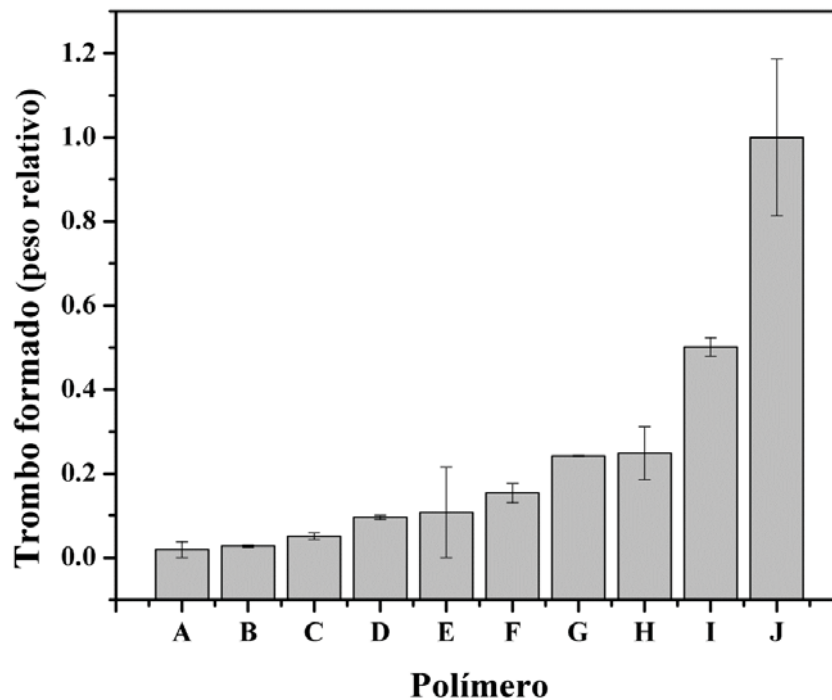


Figura 5.36. Trombo formado después de 30 min de incubación sobre *s-IPN40P-p* (A), *IPN60P-p* (B), *s-IPN60D-p* (C), *IPN60D-p* (D), *s-IPN60P-p* (E), *s-IPN40D-p* (F), *IPN40D-p* (G), *IPN40P-p* (H), TFXf (sin modificar) (I), y controles positivos (J). Los pesos de los trombos formados sobre las superficies funcionalizadas están normalizados con respecto a los controles positivos.

5.1.15. Citocompatibilidad

Para confirmar la potencial utilidad de las IPNs para un futuro uso como sistemas de liberación de fármacos aplicados "in vivo", los estudios de citocompatibilidad fueron llevados a cabo con macrófagos de ratón RAW 264.7; estas células son altamente sensibles a monómeros residuales de acrilatos y metacrilatos (Lin et al. 2007). Los sistemas s-IPN fueron descartados para este estudio, puesto que bajo las condiciones de hinchamiento límite, se presenta desprendimiento de pequeñas partículas de gel cuando los materiales son inmersos en disolución tampón de fosfatos pH 7.4, por 24h. Se conoce que el desprendimiento de partículas en un polímero conduce a un efecto negativo sobre la viabilidad celular, por ello, estos sistemas fueron excluidos del ensayo. La viabilidad celular de cada IPN sometida a esterilización por autoclave, es mostrada en la Figura 5.37 y 5.38.

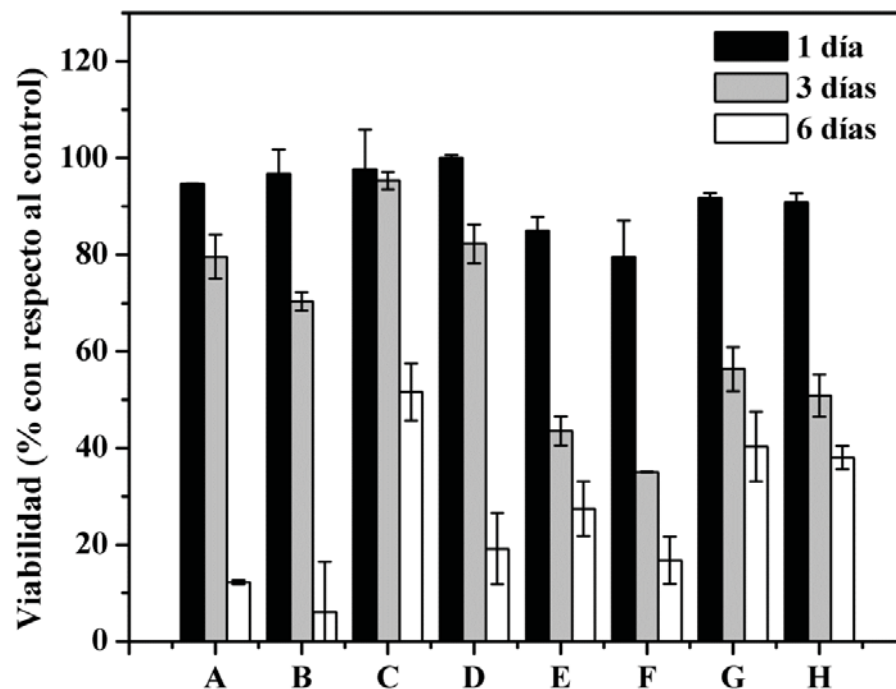


Figura 5.37. Viabilidad de los macrófagos RAW 264.7 a diferentes tiempos cultivados sobre IPNs esterilizados por autoclave: *IPN40P-p* cargado con vancomicina (A), *IPN40P-p* (B), *IPN60P-p* cargado con vancomicina (C), *IPN60P-p* (D), *IPN40D-p* cargado con vancomicina (E), *IPN40D-p* (F), *IPN60D-p* cargado con vancomicina (G), e *IPN60D-p* (H).

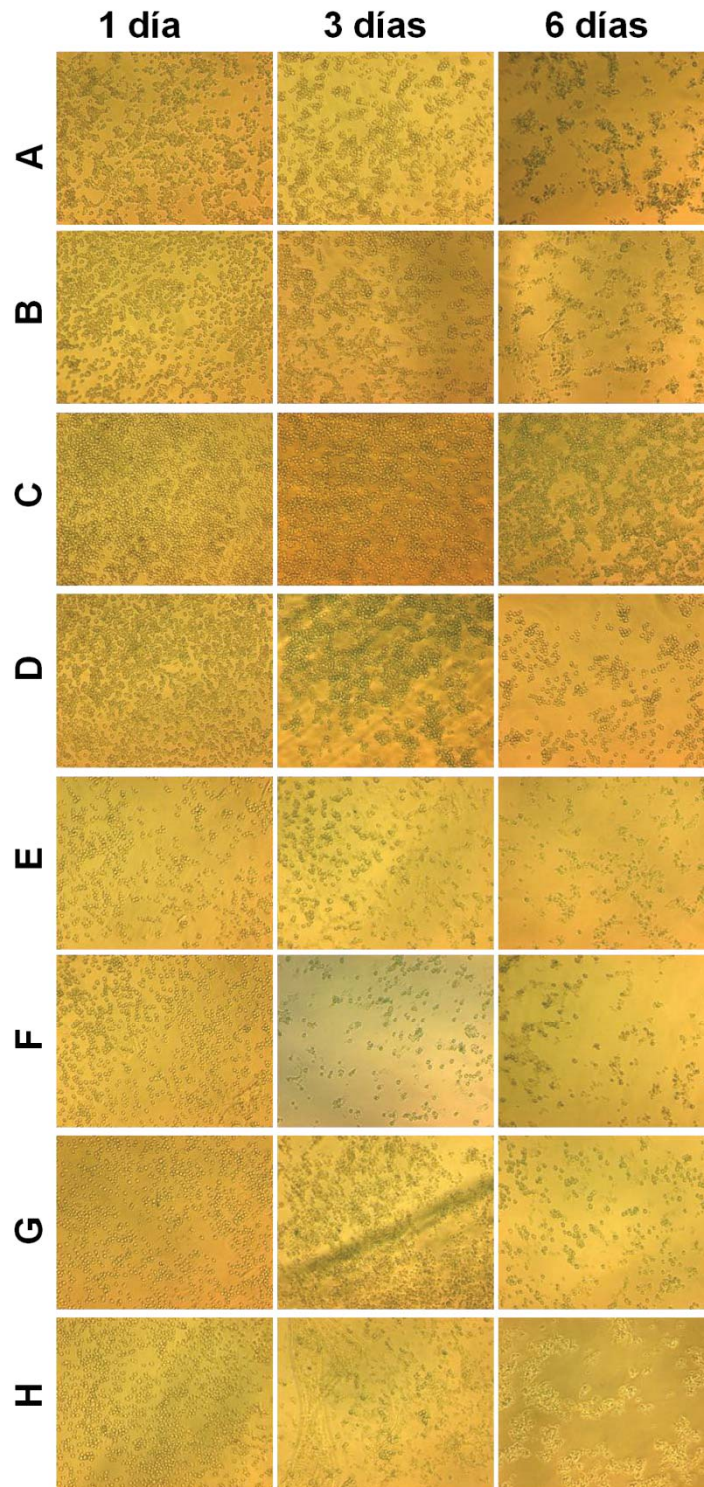


Figura 5.38. Macrófagos RAW 264.7 cultivados a diferentes tiempos sobre IPNs esterilizadas por autoclave: *IPN40P-p* cargado con vancomicina (A), *IPN40P-p* (B), *IPN60P-p* cargado con vancomicina (C), *IPN60P-p* (D), *IPN40D-p* cargado con vancomicina (E), *IPN40D-p* (F), *IPN60D-p* cargado con vancomicina (G), e *IPN60D-p* (H).

Algunas células fueron cultivadas sobre los polímeros cargados con vancomicina, para observar la influencia del fármaco sobre la viabilidad celular, encontrándose que no se generaron efectos altamente tóxicos con la presencia de este antibiótico. Las películas mostraron valores de viabilidad celular mayores al 50 % a los tres días, excepto en aquellas en que la modificación con PNIPAAm fue realizada en masa (*IPN40D-p*), puesto que la esterilización por autoclave causó una notable degradación en estos polímeros, la cual fue evidenciada con la observación de desprendimiento de partículas del polímero o con la fragmentación total del material. En general, el deterioro de las propiedades de manipulación se presentó en todos las películas esterilizadas con este método, pero en los materiales con modificación orientada en la masa, la degradación fue superior. Por ello, los macrófagos también fueron cultivados sobre IPNs esterilizadas por 2 horas con radiación UV. Bajo estas condiciones, la viabilidad celular no fue reducida al tercer día (como sí sucedió con los polímeros autoclavados), excepto para el material *IPN60P-p*, el cual presentó formación de gel extractable en su superficie durante los ensayos (Fig 5.39 y 5.40). Este factor afectó negativamente la viabilidad celular. Por lo que es probable que con un proceso de lavado más intenso de este material, se induzca una mejora en los resultados de citocompatibilidad. No obstante, los resultados de este estudio sugieren que la esterilización por radiación produce menos citotoxicidad y mejora la viabilidad celular de las IPNs, puesto que el proceso de esterilización por autoclave afecta significativamente las propiedades de los materiales.

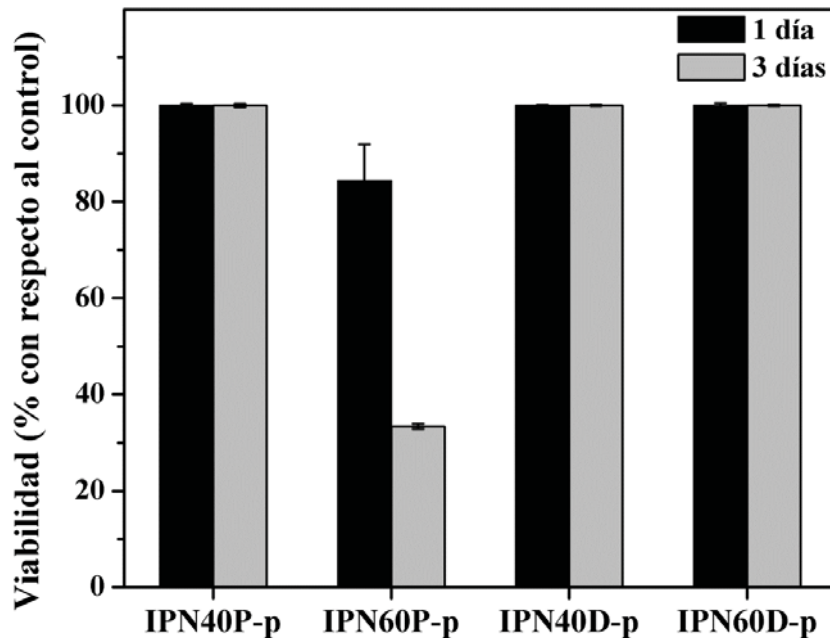


Figura 5.39. Viabilidad de macrófagos RAW 264.7 a tres días, cultivados sobre materiales esterilizados por radiación UV.

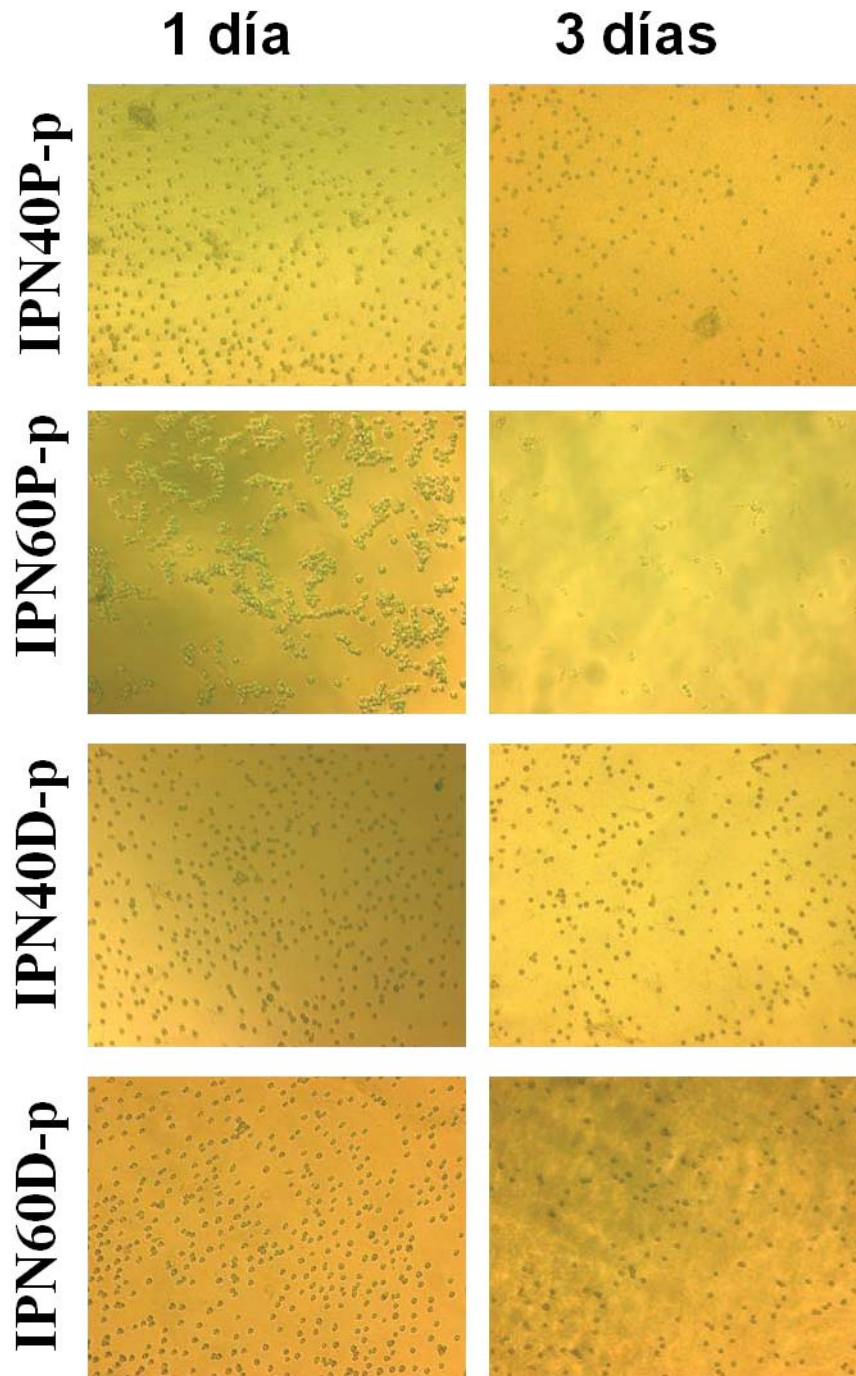


Figura 5.40. Macrófagos RAW 264.7 a tres días, cultivados sobre materiales esterilizados por radiación UV.

Durante los procesos inflamatorios, macrófagos activados producen NO y diferentes citoquinas, entre ellas TNF- α . Estas citoquinas son mediadores primarios en la respuesta inflamatoria y desempeñan un rol importante en los estados patológicos (Saad *et al.* 1997; Ingham y Fisher 2005). Ninguno de los sistemas de IPNs analizados causaron la activación de los macrófagos, parámetro que fue medido con la reacción de Griess (para producción de NO; Fig. 5.41) y por medio de un bioensayo (para la producción de TNF- α ; Fig 5.42). Los controles positivos (macrófagos tratados con LPS) exhibieron una producción significativa de TNF- α . Estos valores resaltan la biocompatibilidad de los polímeros sintetizados en este trabajo de investigación.

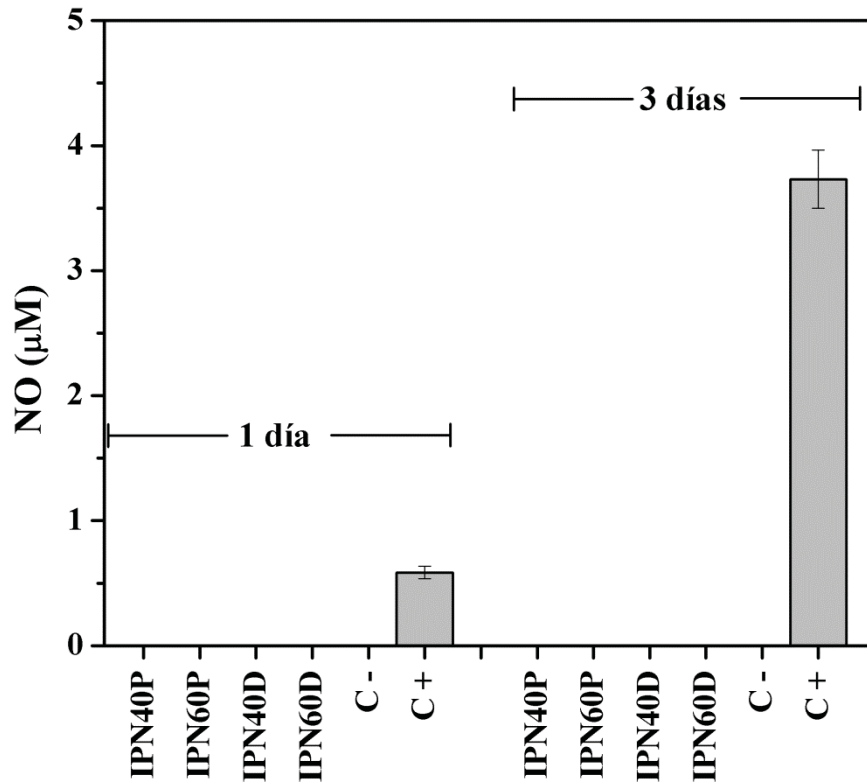


Figura 5.41. NO liberado por macrófagos RAW 264.7 a tres días de cultivo sobre IPNs esterilizadas por radiación UV. C- y C+ son los controles negativos y positivos, respectivamente.

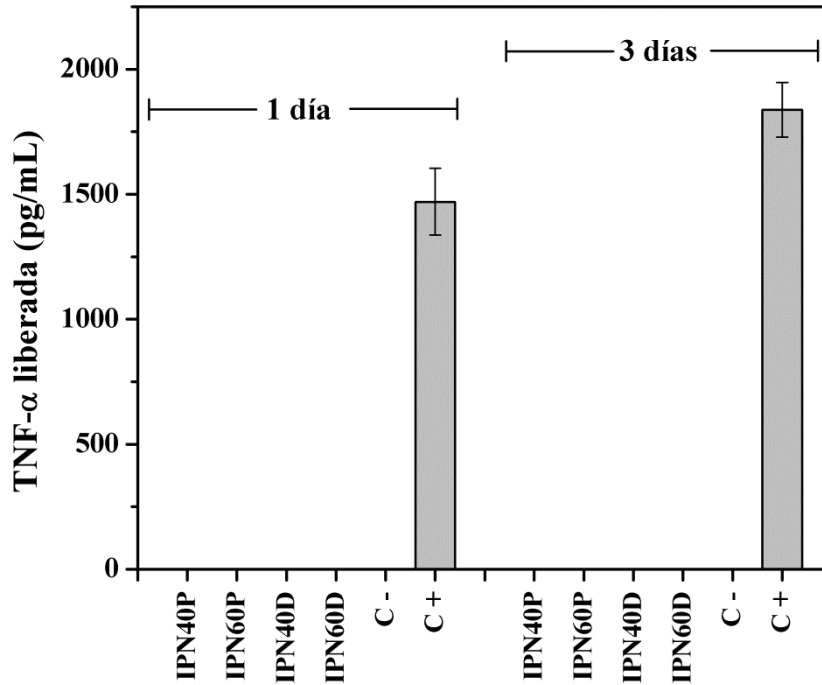


Figura 5.42. TNF- α liberada por macrófagos RAW 264.7 a tres días de cultivo sobre IPNs esterilizadas por radiación UV. C- y C+ son los controles negativos y positivos, respectivamente.

5.2. SÍNTESIS DE IPNs DE PNIPAAm/PAAC SOBRE POLIPROPILENO (PP) POR RADIACIÓN γ : INFLUENCIA DE LA DOSIS SOBRE EL ENTRECruzAMIENTO DE CADENAS DE PNIPAAm (TRABAJO ADICIONAL)

Este trabajo fue realizado con el propósito de identificar un intervalo de dosis de irradiación óptimo para llevar a cabo el entrecruzamiento de cadenas de PNIPAAm injertadas sobre una superficie polimérica. Puesto que en una investigación anterior se optimizó la síntesis de IPNs de PNIPAAm/PAAC sobre películas de PP, utilizando radiación γ en todas las etapas de preparación, se diseñó esta vez un procedimiento experimental para estudiar la influencia de la dosis de irradiación en una de las etapas primordiales para la producción de estos materiales: la etapa de entrecruzamiento. Así, la dosis de entrecruzamiento fue optimizada dependiendo principalmente de la capacidad de estos materiales para adsorber

vancomicina y liberarla de forma controlada, y de todos los parámetros incluidos en este comportamiento, como son la sensibilidad a la temperatura y pH.

Las etapas seguidas para el injerto de PNIPAAm sobre películas de PP (PP-*g*-PNIPAAm), su entrecruzamiento (*net*-PP-*g*-PNIPAAm) y su subsecuente interpenetración de redes de PAAc (*net*-PP-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc) son ilustradas en la Figura 5.43. Las películas de PP, de 60 μm de grosor, exhibieron un incremento gradual de su espesor cuando fueron sometidas a la modificación, lo que indica que la funcionalización fue llevada a cabo sobre la superficie de la matriz polimérica.

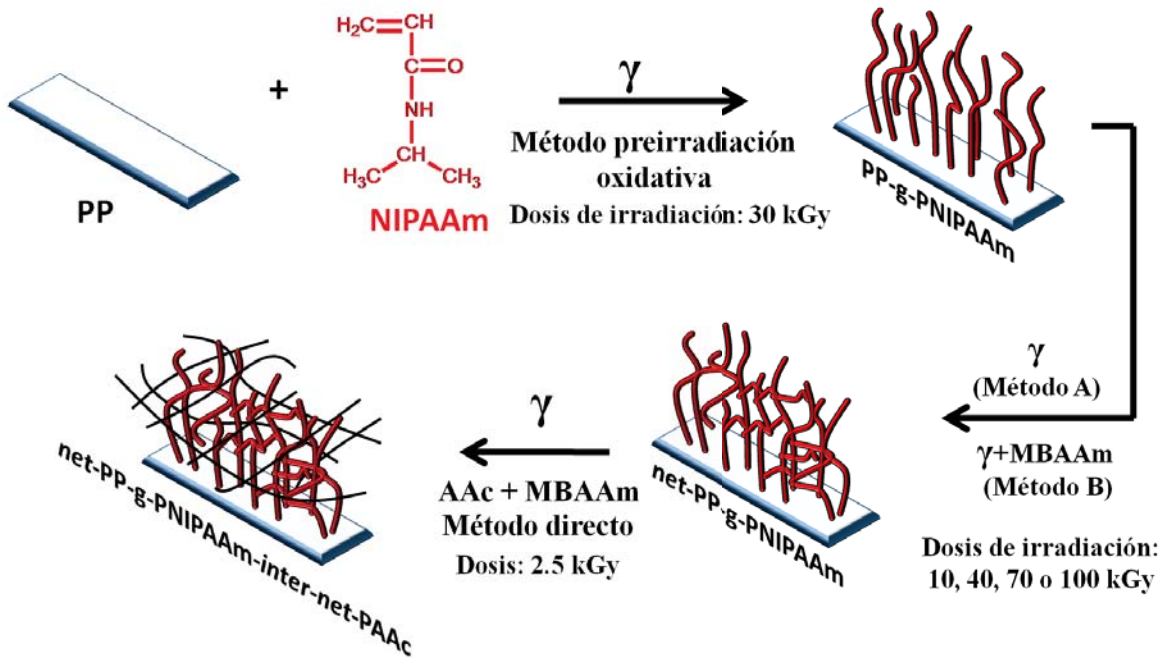


Figura 5.43. Representación esquemática de las etapas de polimerización seguidas para la preparación de *net*-PP-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc.

5.2.1. Preparación de PP-*g*-PNIPAAm y *net*-PP-*g*-PNIPAAm (Síntesis, caracterización y propiedades)

El injerto de PNIPAAm sobre las películas de PP fue estimado con los incrementos en los pesos del material, después de llevar a cabo la reacción. La síntesis de PP-*g*-PNIPAAm, usando el método de preirradiación oxidativa, ya ha sido reportado en otros estudios (*Ma et al., 2009; Muñoz-Muñoz et al. 2009*). Teniendo en cuenta las condiciones reportadas como óptimas en esas investigaciones, se sintetizaron materiales con tres niveles de injerto: 80, 125 y 145 %. Cada porcentaje de injerto condujo 9 o 15 tipos de materiales funcionalizados: (i) PP-*g*-PNIPAAm, designado como "**Gx**", en donde "**G**" es injerto (por su inicial en inglés, grafting) y **x** es el porcentaje de injerto; (ii) *net*-PP-*g*-PNIPAAm, designado como "**Cxy-z**" en donde "**C**" es entrecruzado (por su inicial en inglés, cross-linked), **y** indica si el método de

entrecruzamiento fue llevado a cabo en ausencia de MBAAm (Método A) o en presencia de dicho agente entrecruzante (Método B), y z indica el total de dosis de irradiación aplicada en el proceso; y (iii) *net*-PP-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc, designada como *IPN_{xy-z}*, en donde x , y y z tienen el mismo significado anteriormente descrito. Todos los materiales sintetizados y sus composiciones se encuentran consignados en la Tabla 5.9.

El entrecruzamiento de PP-*g*-PNIPAAm fue llevado a cabo en disolución acuosa, a diferentes dosis de irradiación. Mientras que DMF fue usado para la polimerización e interpenetración de AAc, ya que este disolvente incrementa la capacidad de hinchamiento de las cadenas de PNIPAAm reticuladas, facilitando la difusión de AAc y su posibilidad de interpenetración. Una dosis de irradiación de 5 kGy fue aplicada para estimular el entrecruzamiento de PNIPAAm, pero bajo esas condiciones, se presentó la formación de gel en la superficie del polímero cuando fue inmerso en DMF. La remoción manual de este gel, causó pérdidas considerables sobre la cantidad de injerto determinado inicialmente, por lo que se consideró que 5 kGy no es una dosis suficiente para lograr el entrecruzamiento efectivo de las cadenas de PNIPAAm, y en consecuencia, su uso fue descartado. Se eligió entonces la aplicación de dosis de 10 kGy, como el valor más bajo para realizar los estudios correspondientes. Por otro lado, los materiales injertados con 80 % de PNIPAAm y entrecruzados aplicando dosis por encima de 40 kGy (por ejemplo 70 kGy) presentaron rupturas durante su manipulación y formación de IPN, las cuales fueron ocasionadas por la rigidez que ganó el material en el proceso de entrecruzamiento. Entre mayor fue la cantidad de PNIPAAm injertado, más estable fue el material después de ser sometido al proceso de entrecruzamiento. Por ejemplo, PP-*g*-PNIPAAm con 145 % de PNIPAAm injertado, fue físicamente estable al ser reticulado con 70 kGy, pero a 100 kGy sufrió una degradación física (rompimientos y fragmentaciones) cuando la red de PAAc fue interpenetrada. Entonces, la dosis de entrecruzamiento máxima aplicada para este material fue de 70 kGy (Tabla 5.9). La razón por la que una cantidad mayor de PNIPAAm conduce a mejor tolerancia en el aumento de la dosis de entrecruzamiento se puede explicar considerando lo siguiente: un porcentaje alto de injerto se relaciona, por lo general, con cadenas más largas de PNIPAAm, lo que consecuentemente, confiere una menor densidad de entrecruzamiento y mayor flexibilidad cuando son unidas por influencia de la radiación. Esto hace que dichos polímeros se deformen bajo diferentes esfuerzos mecánicos, sin romperse.

En cuanto a la sensibilidad a la temperatura, la LCST de los polímeros injertados y entrecruzados a diferentes dosis coincide con los valores reportados para homopolímeros de PNIPAAm (*Hirokawa y Tanaka 1984*) (Fig 5.44.a; Tabla 5.9). Para estos materiales, el hinchamiento máximo en agua, a 25 °C, fue alcanzado a aproximadamente 15 min. La dosis empleada en los procesos de entrecruzamiento, influyó notablemente sobre las propiedades de hinchamiento de los materiales, confirmando que la aplicación de altas dosis de radiación γ , causa una reducción en el tamaño de poro de la red compuesta por PNIPAAm (Fig. 5.44.a).

Tabla 5.9. Composición de materiales de polipropileno (PP) modificados con PNIPAm/PAAc. Los sistemas PP-g-PNIPAAm son representados por **Gx**, en donde **x** es el porcentaje de injerto de PNIPAAm. **Cxy-z** se refiere a *net*-PP-g-PNIPAAm, en donde **y** es el método de entrecruzamiento aplicado: en ausencia de MBAAm (método A) o con la inclusión de MBAAm (Método B); y **z** es la dosis de irradiación usada para el entrecruzamiento. IPN representa a *net*-PP-g-*inter-net*-PAAc y sus complementos tienen el mismo significado que en **G** y **C**. También se muestra la LCST de los polímeros.

Código	PP-g-PNIPAAm (%)	<i>net</i> -PP-g-PNIPAAm Método entrecruzamiento	<i>net</i> -PP-g-PNIPAAm- <i>inter-net</i> -PAAc		LCST	
			PNIPAAm/PAAc (% mol/ % mol)	PP-g-IPN (%)	H ⁺ (°C)	Angulo de contacto** (°C)
G80	78	-	-	-	31	33
C80A-10	78	10 kGy	-	-	32	30
C80B-10	82	10 kGy + MBAAm	-	-	33	31
C80A-40	85	40 kGy	-	-	31	31
C80B-40	85	40 kGy + MBAAm	-	-	31	30
IPN80A-10	83	10 kGy	67/33	110	31	31
IPN80B-10	80	10 kGy + MBAAm	67/33	106	34	31
IPN80A-40	84	40 kGy	77/23	89	30	31
IPN80B-40	80	40 kGy + MBAAm	71/29	89	32	32
G125	126	-	-	-	32	30
C125A-10	123	10 kGy	-	-	31	30
C125B-10	124	10 kGy + MBAAm	-	-	32	30
C125A-40	125	40 kGy	-	-	34	30
C125B-40	123	40 kGy + MBAAm	-	-	34	31
C125A-70	121	70 kGy	-	-	32	33
C125B-70	120	70 kGy + MBAAm	-	-	32	31
IPN125A-10	128	10 kGy	69/31	167	32	32
IPN125B-10	129	10 kGy + MBAAm	76/24	157	32	32
IPN125A-40	121	40 kGy	62/38	166	34	32
IPN125B-40	125	40 kGy + MBAAm	64/36	160	35	32
G145	146	-	-	-	33	33
C145A-10	145	10 kGy	-	-	31	33
C145B-10	149	10 kGy + MBAAm	-	-	34	31
C145A-40	144	40 kGy	-	-	33	33
C145B-40	146	40 kGy + MBAAm	-	-	33	32
C145A-70	146	70 kGy	-	-	32	31
C145B-70	146	70 kGy + MBAAm	-	-	32	31
C145A-100	145	100 kGy	-	-	31	30
C145B-100	148	100 kGy + MBAAm	-	-	32	30
IPN145A-10	149	10 kGy	68/32	192	30	31
IPN145B-10	142	10 kGy + MBAAm	72/28	175	31	32
IPN145A-40	149	40 kGy	71/29	190	32	33
IPN145B-40	145	40 kGy + MBAAm	74/26	180	31	30
IPN145A-70	142	70 kGy	81/19	160	31	30
IPN145B-70	141	70 kGy + MBAAm	86/14	157	32	30

* LCST determinada por estudios de hinchamiento (H)

** LCST determinada por ángulo de contacto

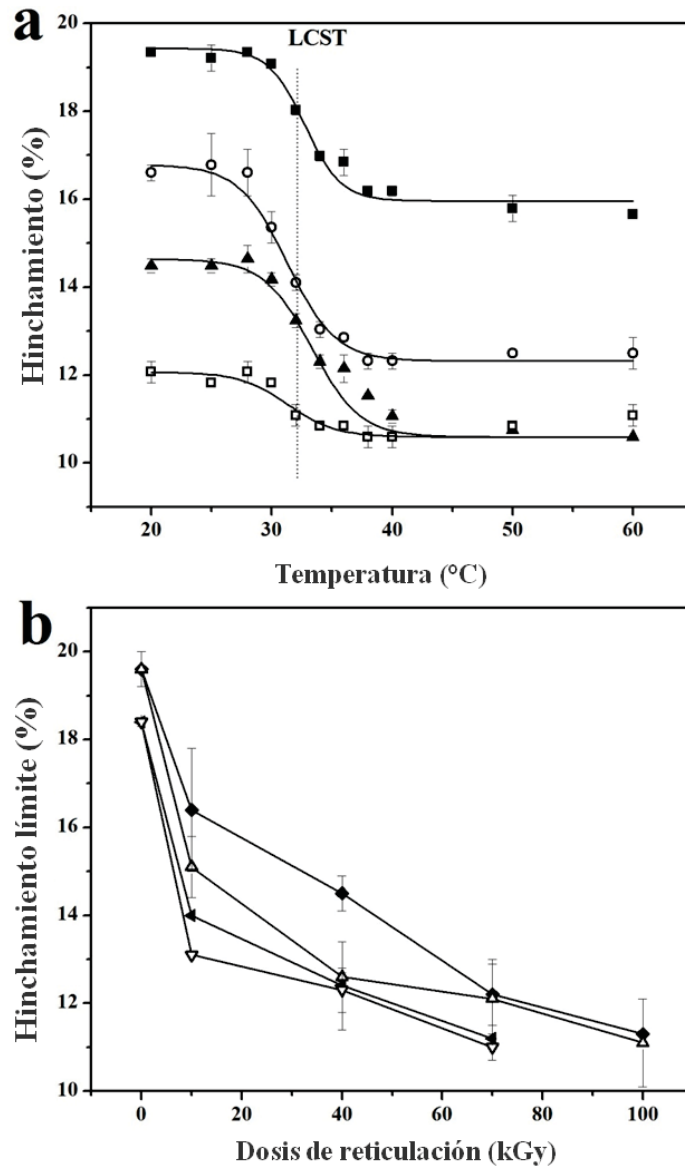


Figura 5.44. Porcentajes de hinchamiento de (a) PP-g-PNIPAAm (G145 (■)) y *net*-PP-g-PNIPAAm: C145A-10 (○), C145A-40 (▼) y C145A-100 (□), como función de la temperatura. Las líneas punteadas representan el valor crítico (LCST). (b) Influencia de dosis de entrecruzamiento sobre el hinchamiento límite en agua, a 25 °C, de *net*-PP-g-PNIPAAm (125 y 145 % de injerto) sintetizados por método A o B: C125A (◄), C125B (▽), C145A (◆) y C145B (△).

En la Figura 5.45 se muestran los termogramas obtenidos por DSC para todos los polímeros sintetizados, usando una matriz polimérica de PP. En ellos se evidencia una Tg a 125 °C, la cual es atribuida a las cadenas de PNIPAAm, mientras que a 170 °C se muestra la transición característica del punto de fusión de PP. La Tg se hace menos visible en el proceso

de entrecruzamiento y desaparece completamente con la incorporación de AAc, esto se atribuye a la rigidez que gana el material a medida que se van aplicando los procesos de modificación. La T_m no es alterada en forma significativa, lo que indica que las modificaciones sobre los segmentos cristalinos de PP no fueron apreciables.

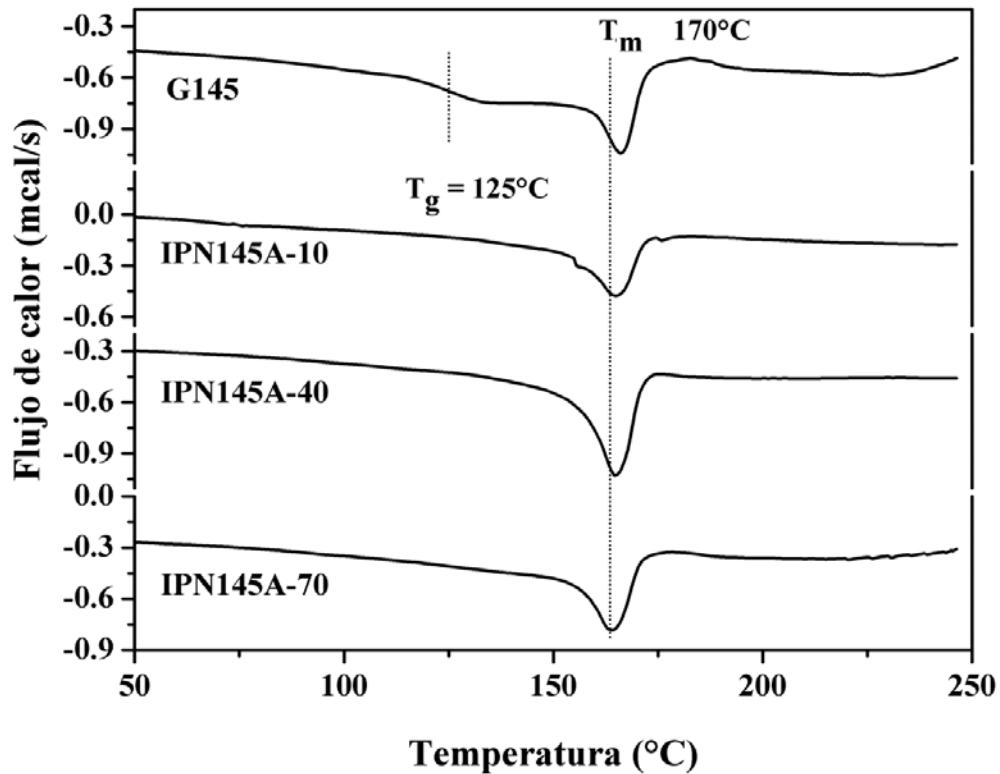


Figura 5.45. Termogramas obtenidos por DSC de los materiales de polipropileno (PP) modificados con PNIPAAm/PAAc

5.2.2. Preparación de hidrogeles de PAAc y de *net*-PP-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc.

La irradiación directa de soluciones de AAc a 2.5, 5 o 10 kGy, fue llevada a cabo con el propósito de identificar una dosis relativamente baja, capaz de producir redes de PAAc (hidrogeles), sin estimular reacciones de injerto entre el PAAc-PP ó PAAc-PNIPAAm. La influencia del disolvente fue determinada sobre los dos disolventes que inducen altos hinchamientos sobre las redes de PNIPAAm: agua y DMF. Al final, los estudios de hinchamiento revelaron que los hidrogeles sintetizados en DMF, aplicando una dosis de 2.5 kGy ($H_{2.5-DMF}$) presentaron una menor densidad de entrecruzamiento y, por consiguiente, se hincharon en mayor grado que aquellos hidrogeles obtenidos en agua, bajo las mismas condiciones de reacción (Fig 5.46). Los hidrogeles de PAAc preparados a altas dosis exhibieron un pH crítico más alto, lo cual es atribuido al desplazamiento del pKa los grupos

carboxílicos a altos valores por la mayor interacción entre las cadenas, inducida en redes más entrecruzadas (Tabla 5.10). De la misma manera, el desplazamiento del pH crítico a valores más altos en los hidrogeles sintetizados en agua, comparados con aquellos obtenidos en DMF, son explicados por la corta distancia entre los grupos carboxílicos contenidos en cadenas altamente reticuladas.

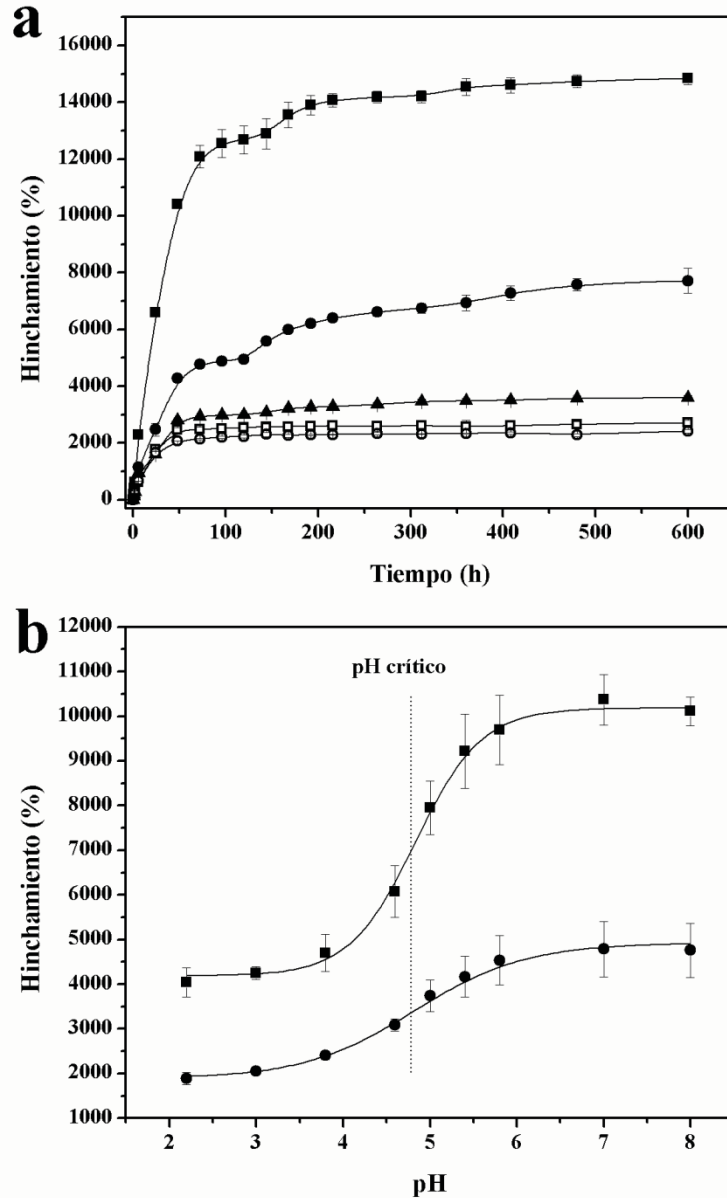


Figura 5.46. Porcentajes de hinchamiento (a) en agua, a 25 °C, como función del tiempo para hidrogeles PAAc sintetizadas a diferentes dosis de irradiación, usando DMF como disolvente: H_{2.5-DMF} (■), H_{5-DMF} (●) y H_{10-DMF} (▲); y usando agua como disolvente H_{2.5-H₂O} (□), H_{5-H₂O} (○). Porcentajes de hinchamiento (b) de hidrogeles PAAc como función del pH, a 25 °C, en disolución tampón, para: H_{2.5-DMF} (■), H_{5-DMF} (●)

Tabla 5.10. Hidrogeles sintetizados, usando DMF y agua como disolventes, a 2.5, 5.0 y 10 kGy. pH crítico y sensibilidad al pH (S_{pH}) en disoluciones tampón fosfato.

Código	[AAc] % (v/v)	[MBAAm] % (w/w)	Solvente	Dosis de irra. (kGy)	pH crítico	S_{pH}
H _{2.5} -DMF	25	1.0	DMF	2.5	4.8	2.5
H ₅ -DMF	25	1.0	DMF	5.0	4.8	2.5
H ₁₀ -DMF	25	1.0	DMF	10.0	4.9	2.0
H _{2.5} -H ₂ O	25	1.0	H ₂ O	2.5	5.0	1.8
H ₅ -H ₂ O	25	1.0	H ₂ O	5.0	5.3	1.6
H ₁₀ -H ₂ O	25	1.0	H ₂ O	10.0	5.2	1.7

Los grados de hinchamientos de redes de PNIPAAm, sin exhibir una LCST, son altos en DMF, lo que facilita la síntesis de redes de PAAc de forma interpenetrada. DMF fue usado con el propósito de facilitar la difusión de AAc sobre el interior de las redes de PNIPAAm y obtener así mayores rendimientos en la inclusión de este monómero. Con base a los resultados obtenidos en la síntesis de hidrogeles de PAAc, se eligió una dosis de irradiación de 2.5 kGy, como la adecuada para obtener una máxima respuesta al pH en los polímeros propuestos, sin inducir reacciones de injerto de PAAc sobre el sustrato de PP.

La cantidad de PAAc incluido (determinado por la diferencia de pesos de los materiales, antes y después de llevar a cabo la reacción) en los materiales *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc, presentó una dependencia de la cantidad de PNIPAAm injertada y entrecruzada previamente sobre PP, y de la dosis empleada para la reticulación (Fig. 5.45). La cantidad de PAAc aumenta a mayores porcentajes de injerto de PNIPAAm, pero hasta cierto límite, pues la formación de redes muy densas con altos contenidos de PNIPAAm, impiden la difusión de AAc. El mismo efecto es producido con el uso de dosis de irradiación por encima de 70 kGy, en la etapa de entrecruzamiento, pues al reducir el tamaño de poro de la primera red, la interpenetración de PAAc se dificulta.

Las relaciones molares de PNIPAAm:PAAc en las IPNs estuvieron en los rangos de 62:38 a 86:14. La composición molar fue similar (68:32) para todas las IPNs en las cuales el PNIPAAm fue entrecruzado a 10 kGy (Tabla 5.9). Como se mencionó anteriormente, el entrecruzamiento promovido a 100 kGy, condujo a materiales físicamente inestables (con tendencia a la ruptura), lo que dificultó la determinación de la cantidad de PAAc interpenetrada por métodos gravimétricos. No se realizó la interpenetración de PAAc sobre los sistemas PP-g-PNIPAAm (no entrecruzados), puesto que este polímero presentó pérdidas en forma de gel cuando fue inmerso en la disolución de DMF, debido a su alta capacidad de hinchamiento en este disolvente.

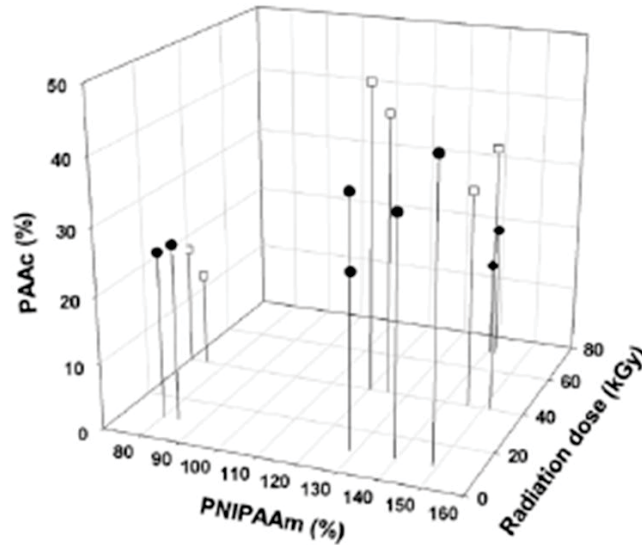


Figura 5.45. Dependencia de la cantidad de PAAc interpenetrado (porcentajes referidos al peso del sustrato PP) con la cantidad de PNIPAAm previamente injertada en PP (porcentajes referidos al peso del sustrato PP) y con la dosis de entrecruzamiento: 10 kGy (●), 40 kGy (□) y 70 kGy (◆).

5.2.2.1. Respuesta a estímulos

Los materiales *net-PP-g-PNIPAAm-inter-net-PAAc* alcanzaron el equilibrio de hinchamiento en agua a aproximadamente 20 min, a las temperaturas evaluadas (Fig. 5.46.a); la aplicación de altas dosis de irradiación en la etapa de entrecruzamiento causó una reducción en la capacidad de hinchamiento en todos los materiales. Al final, las películas sintetizadas presentaron una respuesta dual, pues presentaron sensibilidad a la temperatura y al pH. Los valores críticos de LCST y pH, fueron presentados entre 30-34 °C y 5.2-6.3, respectivamente (Fig. 5.46.b; Tabla 5.9 y 5.11). Los grados de hinchamiento en agua, a 25 °C, incrementaron notablemente con la cantidad de PNIPAAm injertado, y decrecieron cuando MBAAm fue adicionado a la etapa de entrecruzamiento (Fig. 5.47).

5.2.3. Carga de vancomicina

El PP no absorbe o interacciona con fármacos hidrofílicos, como la vancomicina. Sin embargo, al funcionalizarlo con PNIPAAm/PAAc sus capacidades para cargar este principio activo incrementan considerablemente. La vancomicina interacciona preferentemente con los grupos carboxílicos de PAAc, por lo que toda acción que promueva una mayor inclusión de este polímero en el sistema favorece esta función. En general, la vancomicina se caracteriza por ser un antibiótico glicopeptido que contiene una gran variedad de grupos funcionales (como amina, amida, hidroxilos, ácidos carboxílicos, etc), lo que hace que en disolución acuosa, se promueva la ionización de sus grupos amino para adoptar cargas positivas en su estructura. En un estudio previo realizado por Ruiz y colaboradores (2008), se demostró,

usando la calorimetría de titulación isotérmica (ITC, por sus siglas en inglés), que la vancomicina tiene una alta afinidad por los grupos carboxílicos, preferentemente en su estado ionizado (el cual es inducido por un pretratamiento con disolución tampón pH 8). Esto indica que el fármaco interacciona por vía iónica con las cadenas de PAAc.

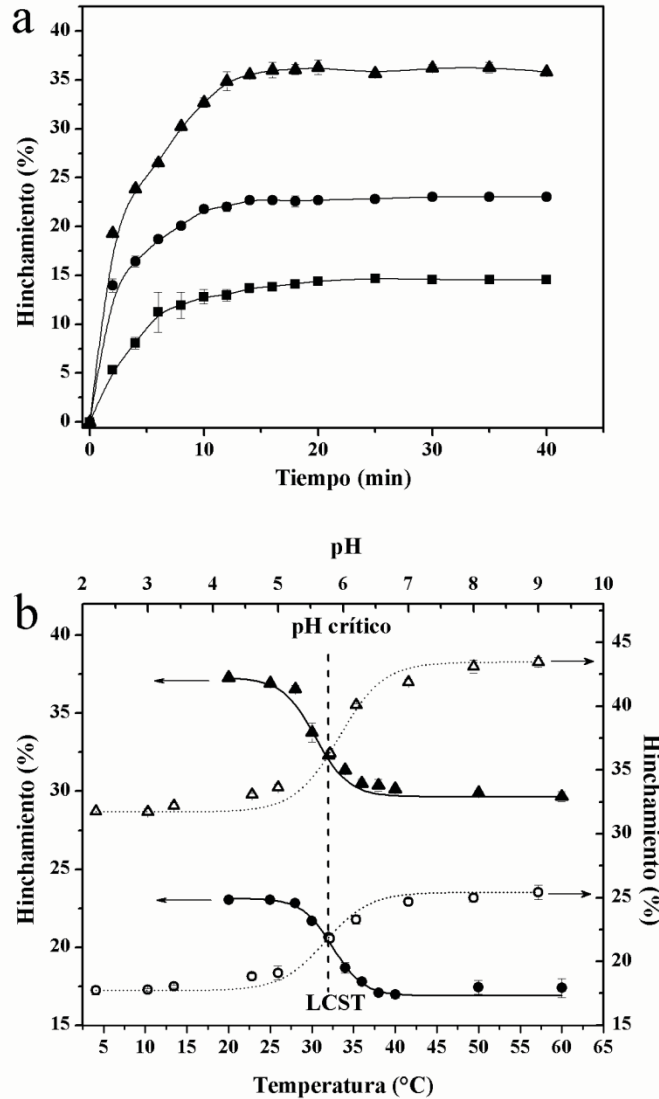


Figura 5.46. Porcentajes de hinchamiento (a) de *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc, en agua, a 25 °C, como función del tiempo para: IPN145A-10 (▲), IPN145A-40 (●) e IPN145A-70 (■); porcentajes de hinchamiento (b) de *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc, como función de la temperatura en agua (líneas continuas y símbolos cerrados), y del pH, a 25 °C, en disoluciones tampón fosfato (líneas punteadas y símbolos abiertos), para: IPN145A-10 (triángulos) e IPN145A-40 (círculos). Las líneas discontinuas representan los puntos críticos (LCST y pH crítico).

Tabla 5.11. Sensibilidad al pH y la temperatura de los materiales *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc sintetizados, sus capacidades de carga de vancomicina y sus constantes de velocidad de liberación obtenidas de la ecuación de Higuchi. Códigos como en la Tabla 5.9.

Códigos	S_T	pH crítico	S_{pH}	Vancomicina cargada			K_H (h ^{1/2})
				(% absorbido)	(mg / g IPN)	(mg / g PAAc)	
IPN80A-10	1.4	5.8	1.6	14.8 (0.6)	30.1 (2.4)	125.5 (9.9)	42.3 (2.1)
IPN80B-10	1.6	5.5	1.5	13.8 (1.2)	26.0 (2.3)	109.8 (9.5)	44.1 (7.9)
IPN80A-40	1.3	5.9	1.2	17.1 (0.5)	31.2 (1.0)	195.9 (6.2)	40.3 (7.5)
IPN80B-40	1.5	5.2	1.3	15.2 (1.5)	29.5 (2.4)	145.5 (12.0)	23.2 (1.3)
IPN125A-10	1.3	5.2	1.3	21.3 (1.3)	50.7 (1.9)	226.2 (8.7)	34.3 (5.3)
IPN125B-10	1.3	6.2	1.2	17.3 (2.8)	52.1 (1.9)	312.0 (11.3)	24.6 (1.9)
IPN125A-40	1.3	5.9	1.6	24.4 (4.7)	55.5 (9.3)	197.2 (33.2)	52.9 (1.3)
IPN125B-40	1.5	6.1	1.7	27.4 (3.6)	52.8 (4.1)	198.3 (15.6)	63.5 (11.6)
IPN145A-10	1.3	5.8	1.4	65.1 (1.0)	139.2 (2.6)	608.8 (11.2)	22.7 (6.9)
IPN145B-10	1.3	5.7	1.5	60.8 (0.9)	134.5 (0.6)	667.2 (3.2)	33.3 (1.7)
IPN145A-40	1.3	5.7	1.4	45.8 (7.1)	103.8 (4.3)	504.2 (20.8)	26.4 (9.3)
IPN145B-40	1.3	6.1	1.5	47.5 (4.6)	102.7 (2.5)	564.1 (14.0)	63.5 (6.9)
IPN145A-70	1.1	6.3	1.3	19.8 (4.3)	38.8 (4.9)	306.1 (38.9)	57.6 (10.7)
IPN145B-70	1.2	5.6	1.2	18.2 (1.2)	33.0 (1.3)	359.2 (14.0)	49.6 (3.5)

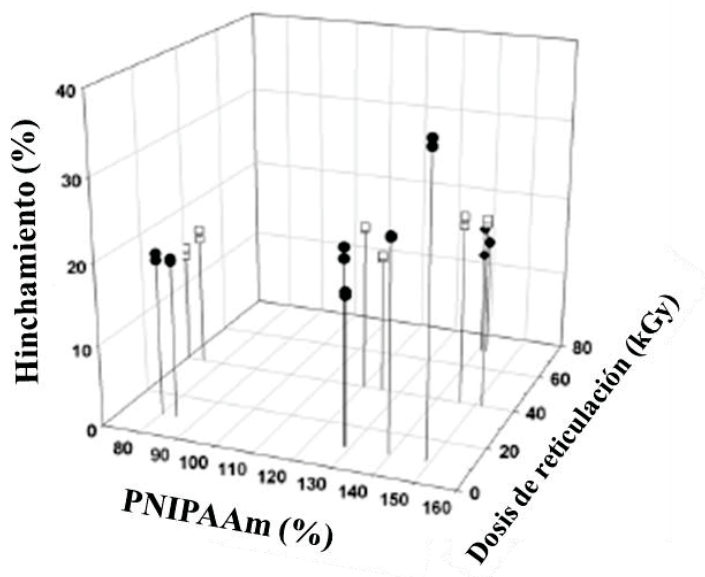


Figura 5.47. Dependencia del grado de hinchamiento en agua (a 25 °C) de *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc (preparado con o sin agente entrecruzante MBAAm), con la cantidad de PNIPAAm previamente injertado sobre PP (porcentaje referido al peso del sustrato PP), y con la dosis de entrecruzamiento: 10 kGy (●), 40 kGy (□) y 70 kGy (◆).

Puesto que la cantidad de PAAc se reduce al entrecruzar las cadenas de PNIPAAm injertadas con altas dosis de irradiación, también disminuye la cantidad de vancomicina cargada en aquellos materiales. El efecto de la inclusión de MBAAm no fue estadísticamente significativo. La capacidad de carga de vancomicina en los materiales depende más del porcentaje de PNIPAAm injertado y de la dosis de entrecruzamiento (Fig. 5.48), tal como lo indica la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \text{Vancomicina} \left(\frac{\text{mg}}{\text{gPP}} \right) &= 574.86(184.47) - 13.363(3.286)PNIPAAm(\%) + 4.910(2.049)Dosis \\ &- 0.0591(0.0154)PNIPAAm(\%)Dosis + 0.0836(0.0144)PNIPAAm(\%)^2 \end{aligned} \quad (5.1)$$

$$[R^2 = 0.866; \quad F_{4,37} = 59.66; \quad \alpha < 0.01]$$

Los valores en paréntesis indican los errores estándar. A pesar de que el ajuste no resulta muy alto, los puntos experimentales coinciden bastante bien con los valores previstos (Fig. 5.48) y la superficie de respuesta puede ser empleada para explicar y predecir nuevas respuestas en la región de las variables consideradas en el estudio (*Myers et al. 2009*). La extrapolación podría no ser fiable en algún caso. Por ejemplo, en la predicción para la carga de vancomicina en materiales con porcentajes de PNIPAAm de cero, no sería correcto, pues el valor no está incluido en el modelo.

Los efectos del porcentaje de PNIPAAm y la dosis de entrecruzamiento sobre la carga de vancomicina fueron similares a los observados sobre la interpenetración de PAAc. Esto puede ser explicado considerando que (i) la carga principalmente ocurre a través de las interacciones iónicas entre vancomicina y PAAc, y (ii) la red promueve un ambiente adecuado para la interacción probable entre la vancomicina y el PNIPAAm, por medio de interacciones hidrofóbicas. Esto concuerda con el hecho de que la capacidad para cargar vancomicina ha sido más eficiente en sistemas como los propuestos en esta investigación (*net-PP-g-PNIPAAm-inter-net-PAAc*), que en aquellos compuestos solamente por PAAc (por ejemplo *PP-g-PAAc*) (*Ruiz et al. 2007; 2008*), y de alguna forma explica también el porqué la cantidad de vancomicina cargada no aumenta constantemente con la cantidad de PAAc incluido en el material (mg/g PAAc en la Tabla 5.11), pero sí incrementa con el contenido de PNIPAAm. Sin embargo, cuando las redes que componen la IPN presentan una alta densidad de entrecruzamiento (físicos o químicos), la cantidad de PAAc decrece y la difusión del fármaco en el interior de la IPN es estéricamente impedido.

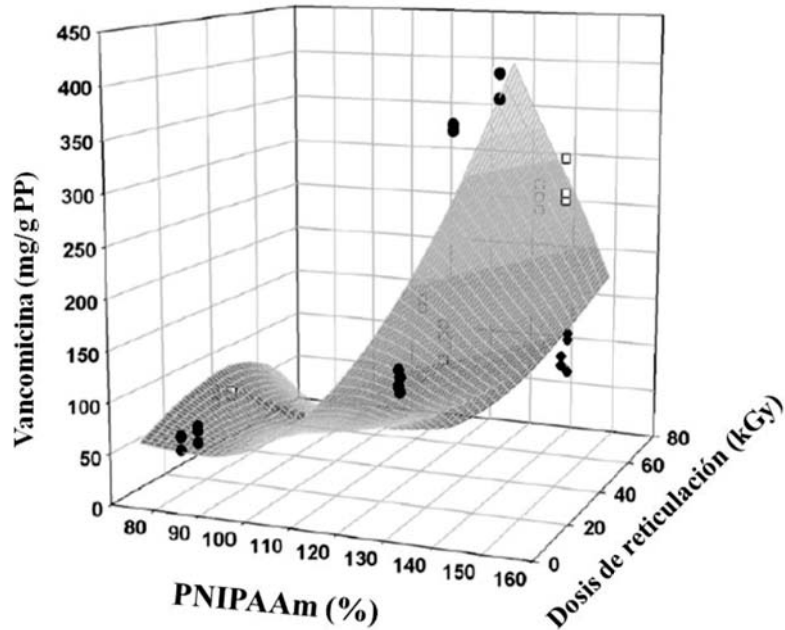


Figura 5.48. Dependencia de la cantidad de vancomicina cargada por *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc, con la cantidad de PNIPAAm injertado y la dosis de entrecruzamiento: 10 kGy (●), 40 kGy (□) y 70 kGy (◆). La superficie de respuesta representa los valores predichos ($R^2 = 0.866$; $F_{4,37} = 59.66$; $\alpha < 0.01$)

5.2.4. Liberación de vancomicina

Los perfiles de liberación de vancomicina son mostrados en la Figura 5.49. Los materiales *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc presentaron una alta capacidad para sostener la liberación por más de 8 h. Los perfiles ajustados a la ecuación de Higuchi ($R^2 > 0.98$), indicaron que la liberación ocurre principalmente por difusión a través de la sinergia en las cadenas de la IPN. La velocidad de liberación (K_H) fue dependiente de la cantidad de PNIPAAm injertado y de las dosis de entrecruzamiento (Fig. 5.50). Como tendencia general, un incremento en la dosis de irradiación usada para entrecruzar las cadenas de PNIPAAm (como en el caso de IPN125-40 e IPN145-70), resulta en una liberación más rápida del fármaco, debido a la mala retención de la vancomicina en el interior de las redes. En general, un bajo número de enlaces que pueda establecer la vancomicina con la IPN, conduce inevitablemente a una liberación más acelerada.

La velocidad de liberación instantánea por área de superficie (ARR) fue estimada con el propósito de elucidar si la cantidad de vancomicina cargada y su velocidad de liberación son adecuadas para inhibir crecimientos bacterianos que pueden ser adheridos para el desarrollo de biopelículas (Kwok *et al.* 1999). Los valores teóricos de N_{kill} fueron calculados a ser $3.5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{s}$, usando la Ecuación 4.7 (Capítulo 4). Todos los materiales *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc mostraron una alta velocidad de liberación en las primeras horas, seguido por un decrecimiento en la tendencia, que es esperado para un proceso dependiente de los

fenómenos de difusión (Fig 5.51). Las películas en las cuales PNIPAAm fue entrecruzado usando bajas dosis de irradiación, fueron capaces de mantener por más tiempo los valores de ARR por encima de N_{kill} . Se ha reportado que la erradicación de la bacteria durante las primeras horas de ser implantado un dispositivo biomédico, es esencial para evitar el desarrollo de biopelículas (Jones et al. 2001; Montanaro et al. 2007). Entonces, la aplicación de radiación γ para el injerto y reticulación de PNIPAAm, puede permitir la optimización de los gradientes de concentración liberados desde la superficie de los sistemas *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc, con el propósito de adaptar estos materiales a la producción de dispositivos implantables, con resistencia a la contaminación y colonización bacteriana.

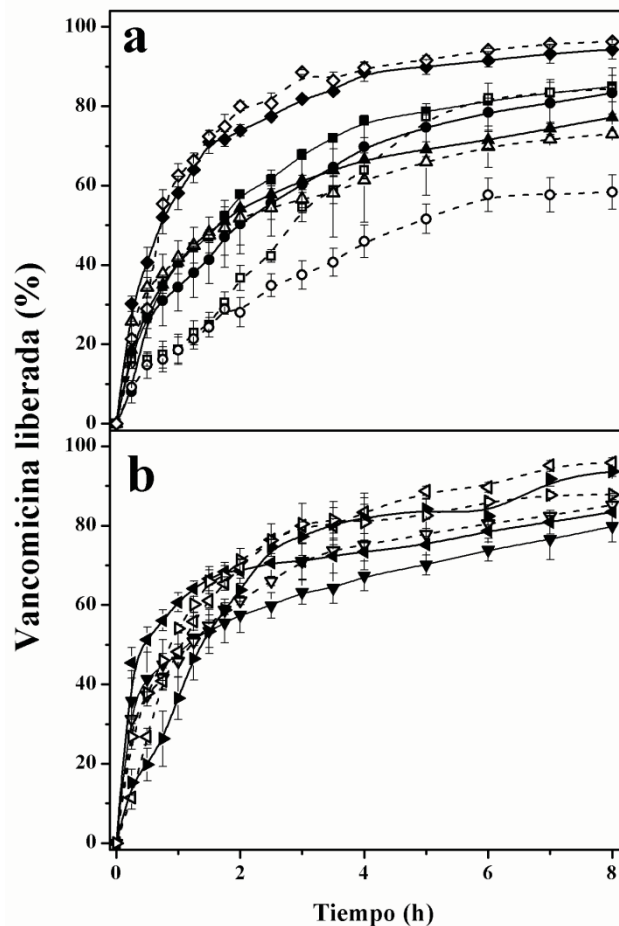


Figura 5.49. Perfiles de liberación de vancomicina en disolución tampón fosfato pH 7.4 para (a) materiales *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc con 80 y 125 % de PNIPAAm injertado: IPN80A-10 (■,—), IPN80B-10 (□,—), IPN80A-40 (●,—), IPN80B-40 (○,—), IPN125A-10 (▲,—), IPN125B-10 (△,—), IPN125A-40 (◆,—) and IPN125B-40 (◇,—) y (b) materiales *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc with 145% PNIPAAm: IPN145A-10 (▼,—), IPN145B-10 (▽,—), IPN145A-40 (◄,—), IPN145B-40 (◁,—), IPN145A-70 (▶,—), IPN145B-70 (▷,—). Códigos como en Tabla 5.11.

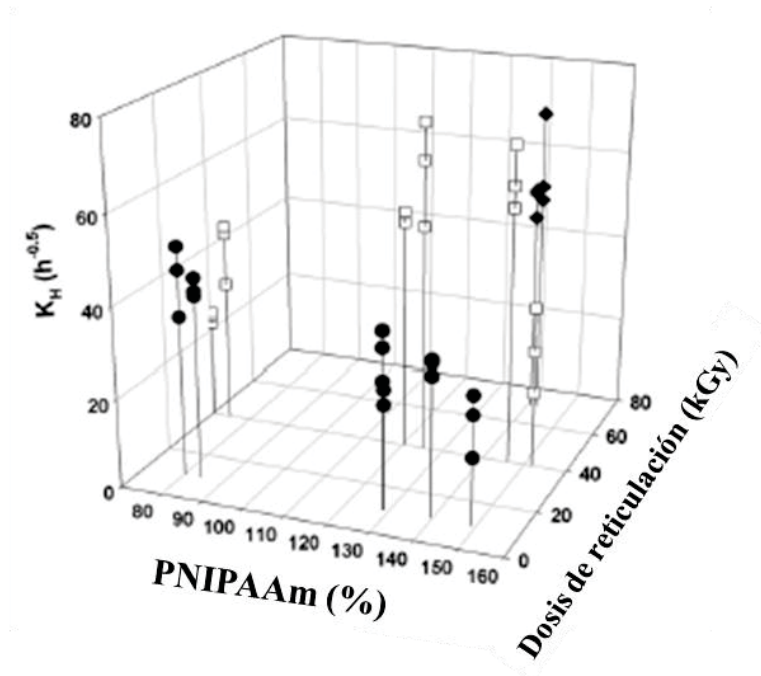


Figura 5.50. Dependencia de la constante de velocidad de liberación de vancomicina (K_H) para materiales *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc, con la cantidad (%) de PNIPAAm injertado sobre PP, y con la dosis de entrecruzamiento [10 kGy (●), 40 kGy (□) y 70 kGy (◆)]

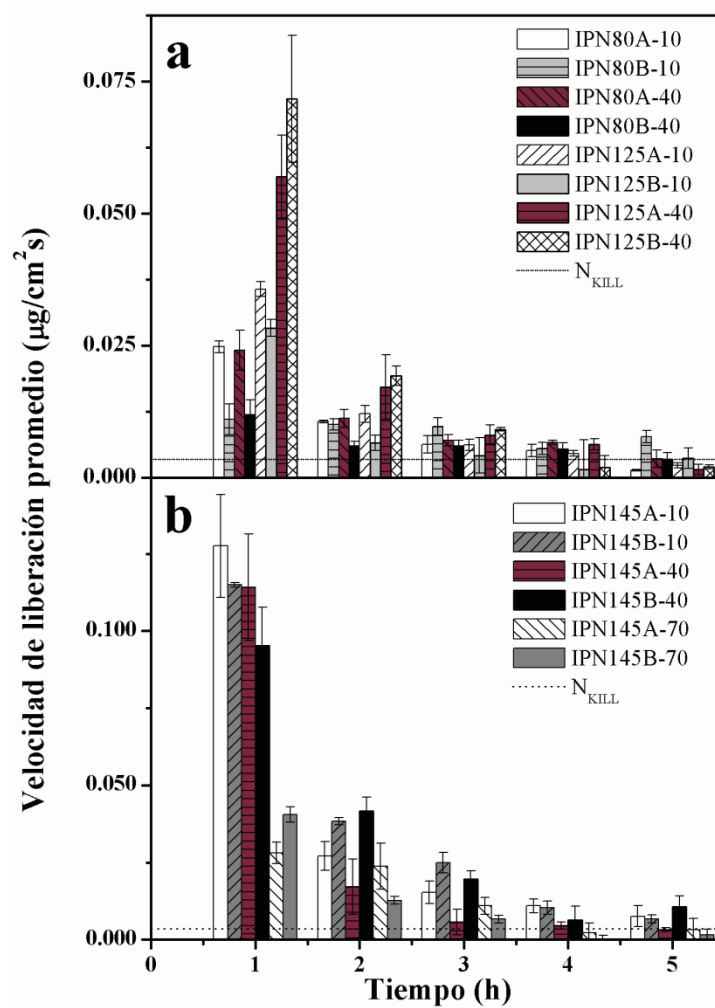


Figura 5.51. Velocidad de liberación promedio de vancomicina en disolución tampón pH 7.4 para *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc (códigos como en Tabla 5.11). El valor de N_{kill} es mostrado con las líneas punteadas.

CONCLUSIONES

1. Por medio de dos métodos de irradiación, el de preirradiación oxidativa (método P) e irradiación directa (método D), se logró la síntesis de diferentes sistemas de redes poliméricas interpenetradas (IPNs) y semi-interpenetradas (s-IPNs), usando matrices poliméricas de Tecoflex[®] (TFX) e injertando, en un primer paso, cadenas poliméricas de PNIPAAm.
2. Los porcentajes de PNIPAAm injertado en superficie por el método P, o en masa por el método D (40, 60 y 80 %), favorecieron una sensibilidad a la temperatura (LCST entre 21-26 °C), permitieron su entrecruzamiento por medio de radiación gamma (γ) en una segunda etapa, y favorecieron la inclusión de una red de PAAc de forma interpenetrada, lo que le confirió a los sistemas una sensibilidad al pH (pH crítico 5.1-6.6) y una alta capacidad para cargar y liberar vancomicina, e inhibir el crecimiento bacteriano sobre su superficie.
3. Se sintetizó un sistema de IPN usando un método de un paso para injertar y entrecruzar, en forma simultánea, redes de PNIPAAm sobre matrices de TFX. Estos materiales presentaron respuesta a la temperatura (LCST = 32 °C) y al pH de medio (pH crítico = 5.8), y mostraron una alta capacidad para cargar vancomicina. Sin embargo, este sistema mostró altos niveles de hemólisis (> 5 %), lo que limita sus posibilidades de ser aplicado como dispositivo implantable.

4. Los métodos de injerto de PNIPAAm condujeron a materiales completamente diferentes, que al ser sometidos a etapas siguientes de funcionalización (formación de s-IPNs e IPNs), presentaron respuestas distintas frente a las técnicas de caracterización empleadas, tales como FTIR-ATR, DSC, ESEM, EDX y estudios de hinchamiento. Los materiales propuestos, en especial los sistemas IPN, presentaron una alta biocompatibilidad y mostraron una baja toxicidad, lo que los convierte en sistemas potencialmente aplicables como biomateriales o dispositivos biomédicos implantables.
5. La modificación del poliuretano TFX en dos formas físicas diferentes (catéteres y películas), mostró resultados similares en cuanto a los porcentajes de PNIPAAm injertados, la cantidad de PAAc interpenetrado y demás propiedades, lo que indica que con los métodos de modificación aplicados, la funcionalización de diferentes materiales puede llevarse a cabo por la misma vía, independiente de la forma o geometría dada en su proceso previo de fabricación.
6. Se sintetizó un sistema de IPNs usando PNIPAAm/PAAc y Polipropileno (PP) como soporte polimérico, con la finalidad de determinar las dosis de irradiación adecuadas para entrecruzar cadenas de PNIPAAm previamente injertadas. Las condiciones óptimas para estas reacciones se presentaron a 10 kGy, dosis a la cual se asegura una incorporación de mayores cantidades de PAAc y, a su vez, se favorece la interacción con vancomicina, para llevar a cabo los procesos de carga y liberación de dicho fármaco. Estos sistemas presentaron sensibilidad a la temperatura (LCST entre 30-33 °C) y al pH (pH crítico entre 5.2 -6.2). Las condiciones de reacción optimizadas fueron aplicadas en el entrecruzamiento de redes de PNIPAAm injertadas en poliuretano TFX.

REFERENCIAS

- Abel, P.U., von Woedtke, T., Schulz, B. et al. 1999. Stability of immobilized enzymes as biosensors for continuous application in vitro and in vivo. *J Mol Catal B: Enzym.* 7: 93–100.
- Acar, J.F., Goldstein F.W. 1991. Disk susceptibility test. In: Lorian V, editor. Antibiotics in laboratory medicine (3rd ed.). Baltimore: Williams & Wilkins; 17–52.
- Aldenhoff, Y.B.J., Kruft, M.A.B., Pijpers, A.P., et al. 2002. Stability of radiopaque iodine-containing biomaterials. *Biomaterials.* 23: 881-886.
- Aliev, R., Garcia, P., Burillo, G., 2000. Graft polymerization of acrylic acid onto polycarbonate by the preirradiation method. *Radiat Phys Chem.* 58: 299-304.
- Alvarez-Lorenzo, C., Bucio, E., Burillo, G. et al. 2010. Medical devices modified at the surface by gamma-ray grafting for drug loading and delivery. *Expert Opin Drug Del.* 7: 173-183.
- Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., Dubovik, A.S. 2005. Temperature-sensitive chitosan-poly(N-isopropylacrylamide) interpenetrated networks with enhanced loading capacity and controlled release properties. *J Control Release.* 102: 629-641.
- Alvarez-Lorenzo, C., Yañez, F., Barreiro-Iglesias, R. et al. 2006. Imprinted soft contact lenses as norfloxacin delivery systems. *J Control Release.* 113: 236–244.
- Amos, J. L. 1974. The development of impact polystyrene. *Polym. Eng. Sci.*14: 1-11.

- Anand, P. K., Mukesh, D. 2011. Physicochemical characterisation and biological evaluation of polyvinylpyrrolidone-iodine engineered polyurethane (Tecoflex). *J Mater Sci- Mater M.* 22: 1231–1246.
- Anderson, J.M., Rodriguez, A., Chang, D.T. 2008. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 20: 86-100.
- Andrade, J.D. 1976. Hydrogels for medical and related applications. *ACS Symposium. American Chemical Society.* 31: 1-37.
- Andrade-Vivero, P., Fernández-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.
- Andrews, K., Hunt, J. 2008. Upregulation of matrix and adhesion molecules induced by controlled topography. *J Mater Sci Mater Med.* 19: 1601–1608.
- Anjum, N., Gulrez, S.K.H., Singh, H. et al. 2006. Development of antimicrobial polypropylene sutures by graft polymerization. I. Influence of grafting conditions and characterization. *J Appl Polym Sci.* 101: 3895-3901.
- Aoki, T., Kawashima, M., Kanoto, H., Sanui, K., et al. 1994. Temperature-responsive interpenetrating polymer networks constructed with poly(acrylic acid) and poly(N,N-dimethylacrylamide). *Macromolecules.* 27: 947–952.
- Aylsworth, J. W, Us Patent 1; 1914; 111, 284.
- Babensee, J.E., Anderson, J.M., McIntire, L.V. et al. 1998. Host response to tissue engineered devices. *Adv Drug Delivery Rev.* 33: 111–139.
- Bayhan, M., Tuncel, A. 1998. Uniform poly(isopropylacrylamide) gel beads for immobilization of α -chymotrypsin. *J Appl Polym Sci.* 67: 1127-1139.
- Bélanger, M.C., Marois, Y., Roy, R. et al. 2000. Selection of a polyurethane membrane for the manufacture of ventricles for a totally implantable artificial heart: blood compatibility and biocompatibility studies. *Artif Organs.* 24: 879–888.
- Bell, C.L., Peppas, N.A. 1996. Water, solute and protein diffusion in physiologically responsive hydrogels of poly(methacrylic acid-g-ethylene glycol). *Biomaterials.* 17: 1203-1218.
- Black, J. Biological performance of materials: Fundamentals of biocompatibility. New York. Mercel Dekker. Inc. 1992.
- Bonart, R. 1979. Thermoplastic elastomers. *Polymer.* 20: 1389-1403.

- Borzacchiello, A., Ambrosio, L. 2009. Structure-property relationships in Hydrogels. In *Hydrogels: Biological properties and applications*, ed. R. Barbucci. 9-20. Springer-Verlag. Milan. Italia.
- Brazel, C.S., Peppas, N.A. 1995. Thermo- and chemo- mechanically responsive poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) hydrogels. *Macromolecules*. 28: 8016-8020.
- Bromberg, L.E., Ron, E.S. 1998. Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 31: 197–221.
- Bucio, E., Aliev, R., Burillo, G. 1998. Radiation grafting of dimethylamino ethylmethacrylate onto polypropylene. *Radiat Phys Chem*. 52: 193-196.
- Bucio, E., Burillo, G. 1997. Radiation Grafting of N,N-dimethylaminoethylmethacrylate onto polyethylene film by preirradiation method. *Polym Bull*. 38, 587-594.
- Bucio, E., Burillo, G., Adem, E. et al. 2005 Temperature sensitive behavior of poly (N-isopropylacrylamide) grafted onto electron beam-irradiated poly (propylene). *Macromol Mater Eng*. 290: 745-752.
- Bucio, E., Contreras-García, A., Meléndez-Ortiz, H. I. **Muñoz-Muñoz, F.D.**, et al. 2010. Smart polymers for biomedical applications and graft synthesis by γ -rays. In: *Smart polymer materials for biomedical applications*, ed. S. Li, A. Tiwari, M. Prabaharan. et al. 227-36. NOVA Science Publishers, Inc. New York, USA.
- Bures, P., Huang, Y., Oral, E. et al. 2001. Surface modifications and molecular imprinting of polymers in medical and pharmaceutical applications. *J Control Release*. 72: 25-33.
- Burillo, G., Briones, M., Adem, E. 2007a. IPN's of acrylic acid and N-isopropylacrylamide by gamma and electron beam irradiation. *Nucl Instrum Meth B*. 265: 104–108.
- Burillo, G., Bucio E. 2008. Responsive copolymer films obtained by ionizing radiation. In *Gamma radiation effects on polymeric materials and its applications*. ed. C.E. Barrera, and G. Martínez-Barrera. India: Transworld Research Network.
- Burillo, G., Bucio, E., Arenas, E. et al. 2007b. Temperature and pH-sensitive swelling behaviour of binary DMAEMA/4VP grafts on poly(propylene) films. *Macromol Mater Eng*. 292: 214–219.
- Burillo, G., Díaz, A., Bucio, E., 2006. Characterization of thermo and pH sensitivity of binary graft copolymers onto tetrafluoroethylene. *J Mex Chem Soc*. 50: 1-4.
- Burillo, G., Oseguera, M.A., Vazquez, C., 1997. Radiation grafting of dimethylaminopropylmethacrylamide onto PE. *Radiat Phys Chem*. 50: 511-517.
- Castner, D.G., Ratner, B.D. 2002. Biomedical surface science: foundations to frontiers. *Surf Sci*. 500: 28–60.

- Cevher, E., Orhan, Z., Mülazımoğlu, L. et al. 2006. Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillinresistant *Staphylococcus aureus* with prepared microspheres. *Int J Pharm.* 317: 127-135.
- Chapiro, A. 1962. Radiation chemistry of polymeric systems. New York. Interscience Div. John Wiley and Sons.
- Chapiro, A., Magat, M., Sebban, J. 1956. French Pat. No 1,130,099 to Centre National de la recherche Scientifique.
- Chaplin, R.P., Dworjany, P.A., Gamage, N.J.W. et al. 1996. The role of partitioning of reagents in grafting and curing reactions initiated by ionizing radiation and UV. *Radiat Phys Chem.* 47: 435-437.
- Charlesby, A., Alexander, P. 1955. Reticulation of polymers in aqueous solution by γ -rays. *J Chim Phys. PCB.* 52: 699-709.
- Chen, G., Hoffman, A.S. 1995. Graft copolymers that exhibit temperature-induced phase transitions over a wide range of pH. *Nature.* 373: 49-52.
- Chen, G., Ito, Y., Imanishi, Y. 1997. Micropattern immobilization of a pH-sensitive polymer. *Macromolecules.* 30: 7001-7003.
- Chen, J.P., Hsu, M.S. 1997. Preparations and properties of temperature-sensitive poly(N-isopropylacrylamide)-chymotrypsin conjugates. *J Mol Catal B: Enzym.* 2: 233-241.
- Chen, W.P., Kenney, D.J. 1991. Study of phase separation in polyurethane using paramagnetic labels: effect of soft segment molecular weight, structure, and thermal history. *J. Polym. Sci. B Polym.Phys.* 29: 1513-1524.
- Chiappetta, D., Legaspi, M.J., Niselman, V., Pasquali, R. et al. 2005. Biodegradable microspheres of poly(D,L-lactide) containing progesterone. *Ars Pharm.* 46: 383-398.
- Chivukula, P., Dusek, K., Wang, D. et al. 2006. Synthesis and characterization of novel aromatic azo bond-containing pH-sensitive and hydrolytically cleavable IPN hydrogels. *Biomaterials.* 27: 1140-1151.
- Cho, S.M., Kim, B.K. 2010. Thermo-Sensitive Hydrogels Based on Interpenetrating Polymer Networks Made of Poly(N-isopropylacrylamide) and Polyurethane. *J. Biomat Sci-Polym E.* 21: 1051-1068.
- Choi, H.S., Kim, Y.S., Zhang, Y. et al. 2004. Plasma-induced graft co-polymerization of acrylic acid onto the polyurethane surface. *Surf Coat Technol.* 182: 55-64.
- Chu, C.H., Berner, B. Thermal analysis of poly(acrylic acid)/poly(oxyethylene) blends. *J Appl Polym Sci.* 47: 1883-1087.

Clough, R.L. 2001. High-energy radiation and polymers: a review of commercial processes and emerging applications. *Nucl Instrum Methods B*. 185: 8–33.

Contreras-García, A. Síntesis y caracterización de un copolímero de injerto binario con potencial respuesta a la temperatura para la liberación controlada de fármacos. Tesis Doctorado. ICN. UNAM. 2010.

Cosson, M., Debodinance, P., Boukerrou, M. et al. 2003. Mechanical properties of synthetic implants used in the repair of prolapsed and urinary incontinency in women: which is the ideal material? *Int Urogynecol J*. 14: 169-178.

Dash, A.K. 1997. Determination of the physical state of drug in microcapsule and microsphere formulations. *J Microencapsulation*. 14: 101-112.

De Gennes, P. G. "Scaling Concepts in Polymer Physics". Cornell University Press, Ithaca, New York. 1979.

de Moura, M.R., Guilherme, M.R., Campese, G.M. et al. 2005. Porous alginate-Ca²⁺ hydrogels interpenetrated with PNIPAAm networks: Interrelationship between compressive stress and pore morphology. *Eur Polym J*. 41: 2845-2852.

Detta, N., Errico, C., Dinucci, D. et al. 2010. Novel electrospun polyurethane/gelatin composite meshes for vascular grafts. *J Mater Sci: Mater Med*. 21:1761–1769.

Dieckmann-Schuppert, A., Schnittler, H.J. 1997. A simple assay for quantification of protein in tissue sections, cell cultures, and cell homogenates, and of protein immobilized on solid surfaces. *Cell Tissue Res*. 288: 119-126.

Dimitrov, I., Trzebicka, B., Müller, A.H.E. et al. 2007. Thermosensitive water-soluble copolymers with doubly responsive reversibly interacting entities. *Prog Polym Sci*. 32: 1275-1343.

Dinarello, C.A., Cannon, J.G., Wolff, S.M. et al. 1986. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med*. 163: 1433-1450.

Ding, A.H., Nathan, C. F., Stuehr, D.J. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol*. 141: 2407-2414.

Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganism. *Clin Microbiol Rev*. 15: 167-193.

Dwyer, A. 2008. Surface-treated catheters- a review. *Semin Dial*. 21: 542-546.

Ellinghorst, G., Niemöller, A., Vierkotten, D. 1983. Radiation initiated grafting of polymer films -an alternative technique to prepare membranes for various separation problems. *Radiat Phys Chem*. 22: 635-642.

- Fei, J., Zhang, Z., Gu, L. 2002. Bending behaviour of electroresponsive poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid) semi-interpenetrating network hydrogel fibres under an electric stimulus. *Polym Int.* 51: 502-509.
- Fong, W.K., Hanley, T., Boyd, B.J. 2009. Stimuli responsive liquid crystals provide "on-demand" drug delivery in vitro and in vivo. *J Control Release.* 135: 218-226.
- Freytag, C.C., Thies, F.L., Konig, W. et al. 2003. Prolonged application of closed inline suction catheters increases microbial colonization of the lower respiratory tract and bacterial growth on catheter surface. *Infection.* 31: 31-37.
- Friedrich, J., Kühn, G., Mix, R. et al. 2004. Formation of plasma polymer layers with functional groups of different type and density at polymer surfaces and their interaction with Al atoms. *Plasma Process Polym.* 1: 28-50.
- Fujimoto, K., Takebayashi, Y., Inoue, H. et al. 1993. Ozone induced graft polymerization onto polymer surface. *J Polym Sci Pol chem.* 31: 1035-1043.
- Fukumori, K., Akiyama, Y., Yamato, M. et al. 2009. Temperature-responsive glass coverslips with an ultrathin poly(N-isopropylacrylamide) layer. *Acta Biomater.* 5: 470-476.
- Gao, W., Feng, Y., Lu, J., Guo, J. 2012. Surface modification of polycarbonateurethane by grafting phosphorylcholine glyceraldehydes for improving hemocompatibility. *MRS Proceedings.* 1403, mrsf11-1403-v01-04.
- García-Uriostegui, L., Burillo, G., Bucio, E., 2012. Synthesis and characterization of thermosensitive interpenetrating polymer networks based on N-isopropylacrylamide/N-acryloxysuccinimide, crosslinked with polylysine, grafted onto polypropylene. *Radiat Phys Chem.* 81: 295-300.
- Gargan, K., Kronfli, E., Lovell, K.V. 1990. Pre-irradiation grafting of hydrophilic monomers onto polyethylene. I. The influence of homopolymerization inhibitors. *Radiat Phys Chem.* 36: 757-762.
- Gil, E.S., Hudson, S.M. 2004. Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates. *Prog Polym Sci.* 29, 1173-1222.
- Guignot, C., Betz, N., Legendre, B., Le Moel, A. Yagoubi, N. 2001. Degradation of segmented poly(etherurethane) Tecoflex[•] induced by electron beam irradiation: Characterization and evaluation. *Nucl Instrum Methods Phys Res B.* 185: 100-107.
- Guilherme, M.R., Campese, G.M., Radovanovic, E. et al. 2006. Thermo-responsive sandwiched-like membranes of IPN-PNIPAAm/PAAm hydrogels. *J Membrane Sci.* 275: 187-194.

- Guimon, C. 1979. Radiation grafting of high density poly-ethylene and polypropylene. *Radiat Phys Chem.* 14: 841-846.
- Gupta, B., Anjum, N. 2003. Plasma and radiation-induced graft modification of polymers for biomedical applications. *Adv Polym Sci.* 162: 35-61.
- Gupta, B., Anjum, N., Jain, R. et al. 2004. Development of membranes by radiation-induced graft polymerization of monomers onto polyethylene films. *Polym Rev.* 44: 275-309.
- Gupta, B., Muzyyan, N., Saxena, S. et al. 2008. Preparation of ion exchange membranes by radiation grafting of acrylic acid on FEP films. *Radiat Phys Chem.* 77: 42-48.
- Gupta, B., Tyagi, P.K., Ray, A.R. et al. 1990. Radiation induced grafting of 2-hydroxyethylmethacrylate onto polypropylene for biomedical application: I. Effect of synthesis conditions. *J Macromol Sci Chem.* 27: 831-41.
- Gupta, B.D., Chapiro, A. 1989. Preparation of ion-exchange membranes by grafting acrylic acid into preirradiated polymer film. *Eur Polym J.* 25: 1137-1145.
- Gurny, R. Junginger, H.E. Bioadhesion: possibilities and future trends. Stuttgart: Wissen Schaftliche Verlagsgesellschaft. 1990.
- Hasirci, N. in: Szycher, M (Ed.). High performance biomaterials: A comprehensive guide to medical y pharmaceutical applications. Technomic Inc, Lancaster. 1991. p. 71.
- Heintz, A.M., Duffy, D.J., Hsu, S.L., Suen, W. et al. 2003. Effects of reaction temperature on the formation of polyurethane prepolymer structures. *Macromolecules.* 36: 695-2704.
- Heinzel, W., Vogt, A., Kallee, E., Faller, W. 1965. A new method for the quantitative determination of antibody and antigen protein, with a sensitivity of five micrograms. *J Lab Clin Med.* 66: 334-343.
- Henkel, A.W., Bieger, S.C. 1994. Quantification of proteins in an electrophoresis buffer. *Anal Biochem.* 223: 329-331.
- Hepburn, C. Polyurethane Elastomers. Elsevier Science. Londres 1992.
- Hirokawa, Y., Tanaka, T. 1984. Volume phase transition in anionic gel. *J Chem Phys.* 181: 6379-6380.
- Hoare, T.R., Kohane, A.D. 2008. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer.* 49: 1993-2007.
- Hoffman, A.S. 1977. Applications of radiation processing in biomedical engineering -A review of the preparation and properties of novel biomaterials. *Radiat Phys Chem.* 9: 207-219.

- Hoffman, A.S. 1995. Intelligent polymers in medicine and biotechnology. *Macromol Symp.* 98: 645-664.
- Hoffman, A.S. 2002. Hydrogels in biomedical applications. *Adv Drug Delivery Rev.* 43: 3-12.
- Hoffman, A.S., Achmer, G., Harris, C. et al. 1972. Covalent binding of biomolecules to radiation grafted hydrogels on inert polymer surface. *T Am Soc Art Int Org.* 18: 10-17.
- Hoffman, A.S., Stayton, P.S., Bulmus, V. et al. 2000. Really smart bioconjugates of smart polymers and receptor proteins. *J Biomed Mater Res.* 52: 577-586.
- Holtz, J.H., Asher, S.A. 1997. Polymerized colloidal crystal hydrogel films as intelligent chemical sensing materials. *Nature.* 389: 829-832.
- Hu, J., Liu, B., Liu, W. 2010. Fabric-supported chitosan and modified temperature responsive PNIPAAm/PU hidrogel and the use thereof in preparation of facial mask. United States Patent N° 7 770 979 B2.
- Hu, J.L., Liu, B.H., Liu, W.G. 2006. Temperature/pH dual sensitive N-isopropylacrylamide/polyurethane copolymer hydrogel-grafted fabrics. *Text Res J.* 78: 853-860.
- Ikada, Y. 1994. Surface modification of polymers for medical applications. *Biomaterials.* 13: 725-736.
- Ikada, Y., Mita, T., Horii, F. et al. 1977. Preparation of hydrogels by radiation technique. *Radiat Phys Chem.* 9: 633-645.
- Imai, Y., Nose, Y. 1972. A new method for evaluation of antithrombogenicity of materials. *J Biomed Mater Res.* 6: 165-172.
- Ingham, E., Fisher, J. 2005. The role of macrophages in osteolysis of total joint replacement. *Biomaterials.* 26: 1271-1286.
- Jabbari, E., Nozari, S. 2000. Swelling behavior of acrylic acid hydrogels prepared by γ -radiation crosslinking of polyacrylic acid in aqueous solution. *Eur Polym J.* 36: 2685-2692.
- Jelvehgari, M., Valizadeh, H., Rezapour, M., Nokhodchi, A. 2010. Control of encapsulation efficiency in polymeric microparticle system of tolmetin. *Pharm Dev Technol.* 15: 71-79.
- Jones, D.A., Smith, C.W., McIntire, L.V. 1996. Leukocyte adhesion under flow conditions: principles important in tissue engineering. *Biomaterials.* 17:337-347.
- Jones, M.S., Morgan, M., Humphrey, T.J., Lapin-Scott, H. 2001. Effect of vancomycin and rifampicin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lancet.* 357, 40-41.

- Kabanov, V.Y. 1989. Radiation induced graft polymerization in the U.S.S.R. *Radiat Phys Chem.* 33: 51-60.
- Kabanov, V.Y., Kudryavtsev, V.N., Degtyareva, T.V. et al. 1997. Modification of polyethylene and poly(vinyltrimethylsilane) by radiation-induced graft polymerization. *Nucl Instrum Meth B.* 131: 291–294.
- Kaetsu, I. 1993. Radiation synthesis of polymeric materials for biomedical and biochemical applications. *Advances in polymer science.* Berlin: Springer. 105: 81-97.
- Kaetsu, I. 1995. Biocompatible and biofunctional membrane by means of radiation techniques. *Nucl Instrum Methods B.* 105: 294-301.
- Kamath, K.R., Park, K. 1994. Surface modification of polymeric biomaterials by albumin grafting using gamma-irradiation. *J Appl Biomater.* 5: 163-173.
- Katime, Y. "Documento CYTED-Subprograma de tecnología de materiales", Universidad del País Vasco-grupo de materiales; Bilbao, 1995.
- Khandwekar, A., Doble, M. 2011. Physicochemical characterisation and biological evaluation of polyvinylpyrrolidone-iodine engineered polyurethane (Tecoflex®). *J Mater Sci-Mater M.* 22: 1231-1246.
- Kikuchi, A., Okano, T. 2002. Intelligent thermoresponsive polymeric stationary phases for aqueous chromatography of biological compounds. *Prog Polym Sci.* 27: 1165-1193.
- Kikuchi, A., Okano, T. 2005. Nanostructured designs of biomedical materials: applications of cell sheet engineering to functional regenerative tissues and organs. *J Control Release.* 101: 69-84.
- Kim, S.J., Park, S.J., Kim, I.Y. et al. 2003. Thermal characteristics of interpenetrating polymer networks composed of poly(vinyl alcohol) and poly(N-isopropylacrylamide). *J Appl Polym Sci.* 90: 881-885.
- Kim, S.Y., Cho, S.M., Lee, Y.M. et al. 2000. Thermo- and pH-responsive behaviors of graft copolymer and blend based on chitosan and N-Isopropylacrylamide. *J Appl Polym Sci.* 78: 1381–1391.
- Ko, T., Cooper, S.L. 1993. Surface properties and platelet adhesion characteristics of acrylic acid and allylamine plasma-treated polyethylene. *J Appl Polym Sci.* 47: 1601-1619.
- Koberstein, J., Leung, L. 1992. Compression-molded polyurethane block copolymers. II. Evaluation of microphase compositions. *Macromolecules.* 23: 6205-6213.
- Kostov, G.K., Atanassov, A.N., 1993. Radiation initiated grafting of acrylic acid onto tetrafluoroethylene-ethylene copolymers. *J Appl Polym Sci.* 47: 361–366.

- Kowalczyk, D., Ginalska, G., Golus, J. 2010. Characterization of the developed antimicrobial urological catheters. *Int J Pharm.* 402: 175-183.
- Kumar, A., Srivastava, A., Galaev, I.Y. et al. 2007. Smart polymers: physical forms and bioengineering applications. *Prog Polym Sci.* 32: 1205–1237.
- Kwok, C.S., Wan, C.X., Hendricks, S. et al. 1999. Design of infection-resistant antibiotic-releasing polymers: I. Fabrication and formulation. *J Controlled Release.* 62. 289-299.
- Lamba, N.M., Woodhouse, K., Cooper, S. *Polyurethanes in Biomedical Applications*, CRC Press, Boca Raton. 1998.
- Laurencin, C.T., Elgendy, H. 1994. The biocompatibility and toxicity of degradable polymeric materials: implications for drug delivery. In *Polymeric site-specific pharmacotherapy*. ed. A.J. Domb. New York: John Wiley & Sons Ltd.
- Lee, E.S., Na, K., Bae, Y.H. 2003. Polymeric micelle for tumor pH- and folate-mediated targeting. *J Control Rel.* 91: 103–113.
- Lee, S.B., Park, E.K., Lim, Y.M. et al. 2006. Preparation of alginate/Poly(N-isopropylacrylamide) semi-interpenetrating and fully interpenetrating polymer network hydrogels with γ -ray irradiation and their swelling behaviors. *J Appl Polym Sci.* 100: 4439-4446.
- Lenaert, V., Gurny, R. 1990. *Bioadhesive drug delivery systems*. Boca Raton: CRC Press.
- Lendlein, A., Kelch, S. 2002. Shape memory polymers. *Angew. Chem.* 114: 2138-2162.
- Lewis G. 1997. Properties of acrylic bone cement: state of the art review. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater).* 38:155–82.
- Lin, N.J., Bailey, L.O., Becker, M.L., Washburn, N.R. Henderson, L.A. 2007. Macrophage response to methacrylate conversion using a gradient approach. *Acta Biomater.* 3: 163–73.
- Lindon, J.N., McManama, G., Kushner, L. et al. 1986. Does the conformation of adsorbed fibrinogen dictate platelet interactions with artificial surfaces?. *Blood.* 68: 355-362.
- Liu, Q., Zhu, Z., Yang, X. et al. 2007. Temperature-sensitive porous membrane production through radiation co-grafting of NIPAAm on/in PVDF porous membrane. *Radiat Phys Chem.* 76: 707–713.
- Lowry, O.H., Rosebrough N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.
- Ma, D., Chen, H., Shi, D., Li, Z., Wang, J. 2009. Preparation and characterization of thermo-responsive PDMS surfaces grafted with poly(N-isopropylacrylamide) by benzophenone-initiated photopolymerization. *J. Colloid Interf. Sci.* 332, 85-90.

- McGuigan, A.P., Sefton, M.V. 2007. The influence of biomaterials on endothelial cell thrombogenicity. *Biomaterials*. 28:2547–71.
- Meijs, G.F., Rizzardo, E., Brandwood, A. et al. Polyurethane or polyurethane-urea elastomeric compositions. Patent US 5393858, 1995.
- Melendez-Ortiz, H.I., Bucio, E. 2008. Radiation synthesis of a thermo-pH responsive binary graft copolymer (PP-g-DMAEMA)-g-NIPAAm by a two step method. *Polym Bull*. 61: 619–629.
- Mercier, J.P. 1965. Physics and transitions in high polymers. *Ind Chim Belge*. 30: 813-819.
- Millar, J. R. 1960. Interpenetrating polymer networks. Styrene–divinylbenzene copolymers with two and three interpenetrating networks, and their sulphonates. *J Chem Soc*. 1311-1317.
- Mohamadnia, Z., Zohuriaan-Mehr, A.J., Kabiri, K. et al. 2007. pH-sensitive IPN hydrogel beads of carrageenan-alginate controlled drug delivery. *J Bioact Compat Pol*. 22: 342-356.
- Mohr, R., Kratz, K., Weigel, T., et al. 2006. Initiation of shape-memory effect by inductive heating of magnetic nanoparticles in thermoplastic polymers. *Proc Natl Acad Sci*. 103: 3540-3545.
- Montanaro, L., Campoccia, D., Arciola, C.R. 2007. Advancements in molecular epidemiology of implant infections and future perspectives. *Biomaterials*. 28, 5155-5168.
- Morimoto, A., Murukami, N., Takada, M. et al. 1987. Effects of physical training on febrile and acute-phase responses induced in rats by bacterial endotoxin or interleukin-1. *J Physiol*. 391: 209-218.
- Motlagh, D., Allen, J., Hoshi, R. et al. 2007. Hemocompatibility evaluation of poly(diols citrate) in vitro for vascular tissue engineering. *J Biomed Mater Res*. 82A: 907-916.
- Mukae, K., Bae, Y.H., Okano, T. et al. 1990.a. A new thermosensitive hydrogel: Poly(ethylene oxide-dimethylsiloxane-ethylene oxide)/poly(N-isopropylacrylamide) interpenetrating polymer networks.II. On-off regulation of solute release. *Polym. J*. 22: 250-265.
- Mukae, K., Bae, Y.H., Okano, T. et al. 1990.b. New thermosensitive hydrogel: Poly(ethylene oxide-dimethylsiloxane-ethylene oxide)/poly(N-isopropylacrylamide) interpenetrating polymer networks. I. Synthesis and Characterization. *Polym J*. 22: 206-217.
- Muñoz-Muñoz, F.**, Ruiz, J.C., Alvarez-Lorenzo, C. et al. 2009. Novel interpenetrating smart polymer networks grafted onto polypropylene by gamma radiation for loading and delivery of vancomycin. *Eur Polym J*. 45: 1859-1867.
- Muñoz-Muñoz, F.**, Ruiz, J.C., Alvarez-Lorenzo, C. Concheiro, A. Bucio, E. 2012. Temperature- and pH-sensitive interpenetrating polymer networks grafted on PP: Cross-

linking irradiation dose as a critical variable for the performance as vancomycin-eluting systems. *Radiat Phys Chem.* 81: 531–540.

Myers, R.H., Montgomery, D.C., Anderson-Cook, C.M. 2009. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments (Wiley Series in Probability and Statistics), 3rd ed. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ. pp. 13–72.

Nagai, M., Saigusa, T., Shimada, Y., Inagawa, H. et al. 1988. Antibody to tumor necrosis factor (TNF) reduces endotoxin fever. *Experientia.* 15. 44(7): 606–607.

Nagaoka, N., Safranji, A., Yoshida, M. et al. 1993 Synthesis of poly-N-isopropylacrylamide hydrogels by radiation polymerization and crosslinking. *Macromolecules* 26: 7386-7388.

Nagasawa, N., Mitomo, H., Yoshii, F. et al. 2000. Radiation-induced degradation of sodium alginate. *Polym Degrad Stabil.* 69: 279-285.

Nasef, M.M., Saidi, H. 2004. Structure of polyethylene-graft-polystyrene sulfonic acid membranes prepared by radiation-induced grafting. *Int J Polym Mater.* 53: 1027-1043.

Navarrete, M. "Introducción al estudio de los Radioisotopos". 2da Ed. UNAM. 1993.

Niimi, Y., Yamane, S., Yamaji, K., Tayama, E. et al. 1997. Protein adsorption and platelet adhesion on the surface of an oxygenator membrane. *ASAIO J.* 43: M706 – M710.

Nohr, R.S., Macdonald, J.G. 1994. New biomaterials through surface segregation phenomenon: new quaternary ammonium compounds as antibacterial agents. *J Biomater. Sci Polym Ed.* 5: 607-619.

Okano, T., Yamada, N., Okuhara, M. et al. 1995. Mechanism of cell detachment from temperature modulated hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials.* 16: 297-303.

Olvera, V., Rivera, J.L., Cruz, R.C., Mendoza, A.M. 2007. Comportamiento térmico de IPN's de poliuretano/poli(metacrilato de metilo) modificados con cargas inorgánicas. *Revista Iberoamericana de Polímeros.* 8: 313-322.

Oppenheim J.J., Kovacs, E.J., Matsushima, K., Durum, S.K. 1986. There is more than one interleukin 1. *Immunol Today.* 7: 45-56.

Ortega, A., Bucio, E., Burillo, G. 2007. Radiation polymerization and crosslinking of (N-isopropylacrilamide) in solution and in solid state. *Polym Bull.* 58: 565-573.

Ortega, A., Bucio, E., Burillo, G. 2008. New interpenetrating polymer networks of N-isopropylacrylamide/ N-acryloxysuccinimide: synthesis and characterization. *Polym Bull.* 60: 515-524.

Ougizawa, T., Walsh, D.J. 1993. Upper Critical Solution Temperature Behavior in Polystyrene/Poly(methyl methacrylate) Mixture. *Polym J.* 25 : 1315-1318.

- Park, T.G., Hoffman, A.S. 1992. Synthesis and characterization of pH- and/or temperature-sensitive hydrogels. *J Appl Polymer Sci.* 46: 659-671.
- Pelton, R. 2000. Temperature-sensitive aqueous microgels. *Adv Colloid Interface Sci* 85: 1–33.
- Pendyala, L., Jabara, R., Robinson, K. et al. 2009. Passive and active polymer coatings for intracoronary stents: novel devices to promote arterial healing. *J Interv Cardiol.* 22: 37-48.
- Peppas, N.A. 1987. *Hydrogels in Medicine and Pharmacy, Vol. I.* Boca Raton: CRC Press.
- Peppas, N.A., Klier, J. 1991. Controlled release by using poly(methacrylic acid-g-ethylene glycol) hydrogels. *J Control Release.* 16: 203-214.
- Peppas, N.A., Sahlin J.F. 1996. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review. *Biomaterials.* 17: 1553-1561.
- Percot, A., Zhu, X.X., Lafleur, M. 2000. A simple FTIR spectroscopic method for the determination of the lower critical solution temperature of N-isopropylacrylamide copolymers and related hydrogels. *J Polym Sci Polym Phys.*38: 907-915.
- Pereira, I.M., Oréface, R.L. 2010. The morphology and phase mixing studies on poly(ester-urethane) during shape memory cycle. *J. Mater. Sci.* 45: 511-522.
- Perrin, D.D. *Buffers for pH and metal ion control.* Chapman and Hall. London. 1994. pp.228-35.
- Petrović, Z.S., Ferguson, J. 1991. Polyurethane Elastomers. *Prog Polym Sci.* 16: 695-836.
- Piozzi, A., Francolini, I., Occhiaperti, L. et al. 2004. Antimicrobial activity of polyurethanes coated with antibiotics: a new approach to the realization of medical devices exempt from microbial colonization. *Int J Pharm.* 280: 173-183.
- Povarennykh, A.S. 1978. Use of infrared-spectra for determination of minerals. *Am Mineral.* 63: 956-959.
- Pretsch, T. 2010. Review on the functional determinants and durability of shape memory polymers. *Polymer.* 2: 120-158.
- Raad, I., Hanna, H., Maki, D. 2007. Intravascular catheter-related infections: advances in diagnosis, prevention, and management. *Lancet Infect. Dis.* 7: 645–657.
- Raad, I., Reitzel, R., Jiang, Y. et al. 2008. Antiadherence activity and antimicrobial durability of anti-infective-coated catheters against multidrug-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 62: 746-750.

- Raad, I.I., Hanna, H.A. 2002. Intravascular catheter-related infections. New horizons and recent advances. *Arch Intern Med.* 162: 871–878.
- Ramaswamy, V., Vimalathithan, R.M., Ponnusamy, V. 2010. Synthesis of well dispersed, elliptical shaped barium sulphate nanoparticles via water – Chloroform mixed solvent. *Arch Phys Res* 1: 217-226
- Ratner, B.D., Hoffman, A.S. 1974. Effect of Cupric ion on the radiation grafting of N-vinyl-2-pyrrolidone and other hydrophilic monomers onto silicone rubber *J Appl Polym Sci.* 18: 3183-3204.
- Rawlinson, L.A.B., Ryan, S.M., Mantovani, G. et al. 2010. Antibacterial effects of poly(2-(dimethylamino ethyl)methacrylate) against selected gram-positive and gram-negative bacteria. *Biomacromolecules.* 11: 443-453.
- Ražem, D., Katušin-Ražem, B., 2008. The effects of irradiation on controlled drug delivery/controlled drug release systems. *Radiat Phys Chem.* 77. 288-344
- Reddy, A., Arzt, E., del Campo, A. 2007. Bioinspired surfaces with switchable adhesion. *Adv Mater.* 19: 3833-3887.
- Rihova, B. 1996. Biocompatibility of biomaterials: haematocompatibility, immunocompatibility, and biocompatibility of solid polymeric materials and soluble targetable polymeric carriers. *Adv Drug Del Rev.* 21: 157–176.
- Rihova, B. 2000. Immunocompatibility and biocompatibility of cell delivery systems. *Adv Drug Delivery Rev.* 42: 65–80.
- Rodriguez-Perez, A.I., Rodriguez-Tenreiro, C., Alvarez-Lorenzo, C. et al. 2006. Sertaconazole/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complexation: isothermal titration calorimetry and solubility approaches. *J Pharm Sci.* 95: 1751–1762.
- Rogel-Hernández, E., Licea-Claverie, A., Cornejo-Bravo, J.M. et al. 2003. Preparación de hidrogeles anfífilicos sensibles a diferentes valores de pH utilizando monómeros ácidos con espaciadores hidrofóbicos. *Rev Soc Quim Mex.* 47: 251-257
- Rosiak, J.M., Olejniczak, J. 1993. Medical applications of radiation formed hydrogels. *Radiat Phys Chem.* 42, 903–906.
- Ruiz, J.C. 2007a. Formación de redes interpenetrantes del copolímero de injerto PP-g-PAAC con PNIPAAm, y estudio de su respuesta a la temperatura y pH. Tesis Doctorado. ICN, UNAM.
- Ruiz, J.C., Alvarez-Lorenzo, C., Taboada, P. et al. 2008. Polypropylene grafted with smart polymers (PNIPAAm/PAAC) for loading and controlled release of vancomycin. *Eur J Pharm Biopharm.* 70: 467–477.

- Ruiz, J.C., Burillo, G., Bucio, E. 2007b. Interpenetrating thermo and pH stimuli-responsive polymer networks of PAAc/PNIPAAm grafted onto PP. *Macromol Mater Eng.* 292: 1176-1188
- Saad, B., Keiser, O.M., Uhlschmid, G.K., et al. 1997. Multiblock copolyesters as biomaterials: in vitro biocompatibility testing. *J Mat Sci Mater Med.* 8: 497-505.
- Sadurni, P., Alagon, A., Aliev, R. et al. 2005. Immobilization of streptavidin-horseradish peroxidase onto a biotinylated poly(acrylic acid) backbone that had been radiation-grafted to a PTFE film. *J Biomat Sci-Polym E.* 16: 181-87.
- Saeki, S., Kuwahara, N., Nakata, M. et al. 1976. Upper and lower critical solution temperatures in poly (ethylene glycol) solutions. *Polymer.* 17: 685-689.
- Satoshi, T.S., Saito, K., Mitsuhashi, H. et al. 1995. Novel ion exchange membranes for electro dialysis is prepared by radiation induced graft polymerization. *J Electrochem Soc.* 142: 3659-3663.
- Schaffner, W., Weissman, C. 1973. A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal Biochem.* 56: 502-514.
- Schierholz, J.M., Beuth, J. 2001. Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *J Hosp Infect.* 49: 87-93.
- Schierholz, J.M., Beuth, J. 2001. Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *J Hosp Infect.* 49: 87-93.
- Schild, H.G. 1992. Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. *Prog Polym Sci.* 17: 163-249.
- Schmidt, C., Neuking, K., Eggeler, G. 2009. Functional fatigue of shape-memory polymers. *Mater Res Soc Symp Proc.* 1190: 43-48.
- Schmidt, C., Sarwaruddin-Chowdhury, A.M., Neuking, K., Eggeler, G. 2011. Thermo-mechanical behavior of Shape Memory Polymers, e.g., Tecoflex[®] by 1WE method: SEM and IR analysis. *J Polym Res.* 18: 1807-1812.
- Schmidt, C., Schmidt-Naake, G. 2007. Grafting of 1-vinylimidazole onto preirradiated ETFE films. *Macromol Mater Eng.* 292: 1067-1074.
- Schneider, B.L., Schwenter, F., Pralong, W.F. et al. 2003. Prevention of the initial host immuno-inflammatory response determines the long-term survival of encapsulated myoblasts genetically engineered for erythropoietin delivery. *Mol Ther.* 7: 506-514.
- Scott, C.P., Higham, P.A.J. 2003. Antibiotic bone cement for the treatment of pseudomonas aeruginosa in joint arthroplasty: comparison of tobramycin and Gentamicin-loaded cements. *J Biomed Mater Res B.* 64: 94-98.

- Seko, N., Tamada, M., Yoshii, F. 2005. Current status of adsorbent for metal ions with radiation grafting and crosslinking technique. *Nucl Instrum Meth B*. 236: 21–29.
- Şen, M., Sarı, M. 2005. Radiation synthesis and characterization of poly (N,N dimethylaminoethyl methacrylate-co-N-vinyl 2-pyrrolidone) hydrogels. *Eur Polym J*. 41: 1304-1314.
- Shen, Y., Li, C., Zhu, X., Xie, A. et al. 2007. Study on the preparation and formation mechanism of barium sulphate nanoparticles modified by different organic acids. *J Chem Sci*. 119: 319-324.
- Sichina, W.J. 2000. Measurement of Tg of polypropylene using the PYRIS power compensation DSC. Thermal Analysis application note. PerkinElmer Instruments. Norwalk. (www.perkinelmer.com)
- Siegel. R. A. 1993. Hydrophobic weak polyelectrolyte gels: studies of swelling equilibrium and Kinetics. *Adv Polym Sci*. 109: 233-267.
- Sieminski, A.L., Gooch, K.J. 2000. Biomaterial–microvasculature interactions. *Biomaterials*. 21: 2233–2241.
- Singh, D.K., Ray, A.R. 1994. Graft copolymerization of-2 hydroxyethylmethacrylate onto chitosan films and their blood compatibility. *J Appl Polym Sci*. 53:1115-1121
- Siow, K.S., Britcher, L., Kumar, S. et al. 2006. Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization. *Plasma Process Polym*. 3: 392–418.
- Sperling, L.H. 1981. Interpenetrating polymer Networks. Plenum Press. New York.
- Sperling, L.H., Mishra, V. 1997. The current status of interpenetrating polymer Networks. In IPNs Around the World Science and Engineering. ed. S. C Kim, and L. H. Sperling. 1-25. J. Wiley and Sons. New York.
- Sportsman, J.R., Elder, J.H. 1984. A micro-analytical protein assay using laser densitometry. *Anal Biochem*. 139: 298-300.
- Staudinger, J. J., Hutchinson, H. M. Us Patent 2; 1951; 539, 377.
- Stubbs, M., McSheehy, P.M.J., Griffiths, J.R. 1999. Causes and consequences of acidic pH in tumors: a magnetic resonance study. *Adv Enzyme Reg*. 39: 13–30.
- Tamada, Y., Ikada, Y. 1994. Fibroblast growth on polymer surfaces and biosynthesis of collagen. *J Biomed Mater Res*. 28: 783-789.
- Tang, I., Eaton, J.W. 1995. Inflammatory responses to biomaterials. *Am J clin Pathol*. 103: 466-471.

- Thapa, A., Miller, D.C., Webster, T.J. et al. 2003. Nano-structured polymers enhance bladder smooth muscle cell function. *Biomaterials*. 24: 2915–2926.
- Thill, C., Etches, J., Bond, I. et al. 2008. Morphing skins. *Aeronaut. J.* 112: 117–139.
- Thomson, P.L.M., Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. Ed 51. Intersistemas Editores. México. 2005.
- Trissel, L.A. Vancomycin HCl. In: ASHP handbook on injectable drugs. 8th ed. Bethesda, MD: American Society of Hospital Pharmacists; 1994. p. 1031-1038
- Truica-Marasescu, F., Pham, S., Wertheimer, M.R. 2007. Vuv processing of polymers: Surface modification and deposition of organic thin films. *Nucl Instrum Methods B*. 265: 31–36.
- Tu, H., Heitzman, C.E., Braun, P.V. 2004. Patterned poly(N-isopropylacrylamide) brushes on silica surfaces by microcontact printing followed by surfaceinitiated polymerization. *Langmuir*. 20: 8313-8320.
- Tuncel, A. 1999. A diffusion-reaction model for α -chymotrypsin carrying uniform thermosensitive gel beads. *J Appl Polym Sci*. 74: 1025-1034.
- Tuncel, A., Ozdemir, A. 2000. Thermally reversible VPBA–NIPAM copolymer gels for nucleotide adsorption. *J Biomater Sci Polym*. 11: 817-831.
- Veronese, F.M., Ceriotti, G., Caliceti, P., et al. 1991. Slow release of narciclasine from matrices obtained by radiation induced polymerization. *J Control Release*. 16: 291–298.
- Vilani, C., Weibel, D. E., Zamora, R. R. M. et al. 2007. Study of the influence of the acrylic acid plasma parameters on silicon and polyurethane substrates using XPS and AFM. *Appl Surf Sci*. 254: 131–134.
- von Woedtke, T., Schlosser, M., Urban, G. et al. 2003. The influence of antimicrobial treatments on the cytocompatibility of polyurethane biosensor membranes. *Biosens Bioelectron*. 19: 269–276.
- Wang, W., Wang, L., Chen, X. et al. 2006. Study on the graft reaction of poly(propylene) fiber with acrylic acid. *Macromol Mater Eng*. 291: 173-180.
- Weibel, D. E., Michels, A. F., Horowitz, F. et al. 2009. Ultraviolet induced surface modification of polyurethane films in the presence of oxygen or acrylic acid vapours. *Thin Solid Films*. 517: 5489–5495.
- Weibel, D. E., Vilani, C., Habert A.C., Achete, C. A. 2006. Surface modification of polyurethane membranes using RF-plasma treatment with polymerizable and non-polymerizable gases. *Surf Coat Technol*. 201: 4190–4194.

- Weibel, D.E., Vilani, C., Habert A.C., Achete, C.A. 2007. Surface modification of polyurethane membranes using low-powered gas plasmas. Influence on the pervaporation processes. *J. Membr. Sci.* 293: 124–132.
- Weibel, D.E. 2010. Polymer surface functionalization using plasma, ultraviolet and synchrotron radiation. *Composite interfaces.* 17: 127-136.
- Weichselbaum, T.E. 1946. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *Am J Clin Pathol.* 10: 40-49.
- Wennberg, A., Hensten-Pettersen, A. 1981. Sensitivity of erythrocytes from various species to in vitro hemolysis. *J Biomed Mater Res.* 15: 433-435.
- Williams, D.F. 2008. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials.* 29: 2941-2953.
- Williams, I.W.A., Venables, D., Lloyd, F. et al. 1997. The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology.* 143: 2407–2413.
- Wirpsa, Z. Polyurethanes: Chemistry, Technology and Applications. Ellis Horwood. Nueva York. 1993.
- Wirsen, A., Albertsson, A.C. 1995. Graft polymerization of acrylamide onto LLDPE film by electron beam pre-irradiation in air or argon. I. Influence of dose, grafting temperature, and monomer concentration *J Polym Sci Polym Chem.* 33: 2039-2048.
- Woods, R.J., Pikaev, A.K. 1994. Applied Radiation Chemistry: Radiation Processing. New York: Wiley.
- Wu, C., Zhou, S. 1997. Volume phase transition of swollen gels: discontinuous or continuous?. *Macromolecules.* 30: 574-576.
- Xie T. 2010. Tunable polymer multi-shape memory effect. *Nature.* 464: 267-270.
- Xu, X.D., Wei, H., Zhang, X.Z. et al. 2007. Fabrication and characterization of a novel composite PNIPAAm hydrogel for controlled drug release. *J Biomed Mater Res. A.* 81: 418–426.
- Yamato, M., Konno, C., Utsumi, M. et al. 2002. Thermally responsive polymer-grafted cell seeding and co-culture. *Biomaterials.* 23: 561-567.
- Yang, D., Feng, Y., Behl, M. et al. 2012. Biomimetic hemo-compatible surfaces of polyurethane by grafting copolymer brushes of poly(ethylene glycol) and poly(phosphorylcholine methacrylate). *MRS Proceedings.* 1403, mrsf11-1403-v12-46.
- Yang, J., Hsiue, G. 1996. Synthesis of acrylic acid grafted silicone rubber via preirradiation graft copolymerization and its physical and dielectric properties. *J Appl Polym Sci.* 61: 221-229.

- Yang, J.M., Yang, S.J., Lin, H.T., Chen, J.K. 2007. Modification of HTPB-based polyurethane with temperature-sensitive poly(N-isopropyl acrylamide) for biomaterial usage. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 80:43-51.
- Yoo, M.K., Sung, Y.K., Lee, Y.M. et al. 2000. Effect of polyelectrolyte on the lower critical solution temperature of poly(N-isopropyl acrylamide) in the poly(NIPAAm-co-acrylic acid) hydrogel. *Polymer.* 41: 5713-5719.
- Yoshida, R., Ucida, K., Kaneko, Y. et al. 1995. Comb-type grafted hydrogels with rapid de swelling response to temperature changes. *Nature.* 374: 240-242.
- Yuk, S.H., Cho, S.H., Lee, S.H. 1997. pH/Temperature-responsive polymer composed of poly (N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate-co-ethylacrylamide. *Macromolecules.* 30: 6856-6859.
- Zha, Z., Ma, Y., Yue, X. et al. 2009. Self-assembled hemocompatible coating on poly (vinyl chloride) surface. *Appl Surf Sci.* 256: 805-814.
- Zhang, X.Z., Wu, D.Q., Chu, C.C. 2004. Synthesis, characterization and controlled drug release of thermosensitive IPN-PNIPAAm hydrogels. *Biomaterials.* 25: 3793-3805.
- Zhao, H.Y., Feng, Y.K., Guo, J.T. 2011. Grafting of poly(ethylene glycol) monoacrylate onto polycarbonateurethane surfaces by ultraviolet radiation grafting polymerization to control hydrophilicity. *J Appl Pol Sci.* 119: 3717-3727.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Radiation Physics and Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/radphyschem

Temperature- and pH-sensitive interpenetrating polymer networks grafted on PP: Cross-linking irradiation dose as a critical variable for the performance as vancomycin-eluting systems

Franklin Muñoz-Muñoz^a, Juan-Carlos Ruiz^b, Carmen Alvarez-Lorenzo^c,
Angel Concheiro^c, Emilio Bucio^{a,*}

^a Departamento de Química de Radiaciones y Radioquímica, Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F. México

^b Groupe de Physique et Technologie des Couches Minces (GCM) and Department of Engineering Physics, École Polytechnique, Montreal, Canada QC H3C 3A7

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 September 2011

Accepted 2 January 2012

Available online 11 January 2012

Keywords:

IPN

Gamma irradiation grafting

Stimuli-responsive drug release

Drug/device combination product

Surface functionalization

ABSTRACT

This work focuses on the effect of gamma-ray radiation conditions on the stimuli-responsiveness and drug-eluting performance of polypropylene (PP) substrates grafted with interpenetrating networks of N-isopropylacrylamide (NIPAAm) and acrylic acid (AAc). PNIPAAm was cross-linked applying 10–100 kGy doses in the presence and absence of the chemical cross-linker N,N'-methylenebisacrylamide (MBAAm). Then, the *net*-PP-g-PNIPAAm was interpenetrated with PAAc synthesized under a 2.5 kGy dose to obtain *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc films. The amount of grafted PNIPAAm (80%, 125% and 145% levels) and the cross-linking radiation dose (10, 40 and 70 kGy levels) strongly determine the interpenetration of PAAc, the swelling degree, the amount of vancomycin loaded and its release rate. The chemical cross-linker only caused a minor decrease in the degree of swelling. The higher the PNIPAAm grafted on PP and the lower the cross-linking radiation dose, the more the PAAc in the IPN and, consequently, the higher the vancomycin loaded through specific interactions and the more sustained the release (> 8 h). The films possessing these features exhibited vancomycin release rate per surface unit suitable to prevent bacterial growth. Thus, adequate tuning of the radiation doses during grafting and cross-linking of the PNIPAAm networks may enable to achieve surface-modified materials for medical devices with an antibiofilm performance.

Crown Copyright © 2012 Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Grafting of “smart” polymers, which exhibit relatively abrupt and large physical or physico-chemical changes in response to low-intensity stimuli (Bucio et al., 2005; Burillo et al., 2007; Kumar et al., 2007; Saxena et al., 2011), endows polymeric substrates with improved surface features, which have found interesting applications as pore-size tunable filtration membranes (Wandera et al., 2010) and, in the biomedical field, as supports for cell culture and delivery in tissue engineering (Low et al., 2010) and, more recently as drug–device combination products (Alvarez-Lorenzo et al., 2010). Particularly, surface functionalization is being shown as a tool for preventing biofilm formation on medical devices (e.g. catheter, prosthesis, sutures or implants), which are prone to be colonized by opportunistic bacteria such as

Staphylococcus spp at the moment of insertion (Freytag et al., 2003; Cosson et al., 2003; Anjum et al., 2006; Cevher et al., 2006; Alvarez-Lorenzo et al., 2010). The incorporation of antimicrobial agents at the surface of the device is an effective way for prophylaxis/treatment of device-related infections, avoiding the collateral effects of systemic administration of high doses of antibiotics (Piozzi et al., 2004; Raad et al., 2008; Kowalczyk et al., 2010).

Among the various suitable techniques for grafting of polymers, gamma radiation is a simple method that does not require chemical initiators (Clough, 2001). Gamma radiation has successfully been used for grafting of polymers onto polymeric materials; the technique enables surface and bulk functionalization with groups such as amide, amine, carboxylic acid or epoxy (Friedrich et al., 2004; Siow et al., 2006; Wang et al., 2006; Truica-Marasescu et al., 2007; Schmidt and Schmidt-Naake, 2007; Nava-Ortiz et al., 2009). Stimuli-responsive polymers can be grafted solely on the surface or can form part of interpenetrating networks (IPNs) with at least one network previously covalent attached to the polymer

* Corresponding author. Fax: +52 55 56224707.

E-mail address: ebucio@nucleares.unam.mx (E. Bucio).

substrate (Ruiz et al., 2007; Contreras-García et al., 2008; Ruiz et al., 2008). In a sequential IPN, the first polymer network is grafted on the substrate, then, swollen within a monomer/cross-linker/activator solution, which is polymerized in situ. Thus, two or more cross-linked networks are physically entangled. In a previous work, an IPN containing poly(acrylic acid) (PAAc) and poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) was grafted onto polypropylene (PP) in order to render *net*-PP-g-PAAc-*inter-net*-PNIPAAm. Gamma irradiation (30 kGy dose) was applied for creating the first PAAc network, followed by redox polymerization for obtaining the second PNIPAAm network (Ruiz et al., 2007). In this way, a maximum PNIPAAm content of 12% per weight of the whole IPN was obtained. Greater content in PNIPAAm was achieved by applying 40 kGy dose of gamma irradiation for grafting first the PNIPAAm network, while the second PAAc network was obtained by UV-triggered redox polymerization (Ruiz et al., 2008). Such *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc systems were found to be capable of loading vancomycin and to sustain its release, showing that interpenetration synergistically improves the ability of grafted PNIPAAm and PAAc to host vancomycin (Ruiz et al., 2008). This drug is one of the most frequently chosen antibiotics for the treatment of infections associated with the use of medical devices, particularly catheters (Raad et al., 2007). Vancomycin-loaded *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc was capable of inhibiting the formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms, despite the fact that the drug loading capability was limited (Ruiz et al., 2008). The preparation of the interpenetrated network applying only gamma radiation in all steps using doses of 40 kGy and 2.5 kGy for the grafting of PNIPAAm and polymerization/cross-linking of PAAc, respectively, rendered temperature- and pH-responsive surfaces with greater vancomycin loading and more sustained release (Muñoz-Muñoz et al., 2009). The aim of the present work was to gain an insight into the effect of the cross-linking conditions of the first polymer network (*net*-PP-g-PNIPAAm, evaluated at three levels of grafting), namely irradiation doses from 0 to 100 kGy and presence of a cross-linker agent, on the stimuli-responsiveness and vancomycin loading/eluting performance of the resultant grafted system (*net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc). The information obtained may be useful for the design of more efficient smart drug/medical device combination products.

2. Experimental

2.1. Materials

Isotactic PP films (PEMEX, México), with 71% of crystallinity and 60 μm of thickness, were cut into 1.2 cm \times 4.0 cm pieces. *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm), supplied by Aldrich Co, USA, was further purified by recrystallization in hexane/toluene (50/50 vol%). Acrylic acid (AAc), supplied by Aldrich Co, USA, was vacuum distilled for purification. *N,N'*-methylenebisacrylamide (MBAAm) from Sigma-Aldrich Co, USA and hexane, toluene and dimethylformamide (DMF) from JT Baker (México) were used as received. Vancomycin-HCl was from Roig Farma (Spain). Distilled water was used for all experiments.

2.2. Grafting of PNIPAAm onto PP films (PP-g-PNIPAAm)

The following preirradiation method was applied. PP films were irradiated in air with a ^{60}Co gamma source (Gammabeam 651 PT, Nordion Co., Canada) at a dose rate of 7.9–9.2 kGy/h and a total radiation dose of 30 kGy. The irradiated samples were placed in glass ampoules containing aqueous solutions of NIPAAm 0.5 M,

which were saturated with argon for 20 min, sealed and heated at 70 °C during 50–75 min for the desired grafting percentages. The grafted films were washed with water for 24 h (replacing the medium several times) and then dried at 40 °C for 35 h. The weight percentage of the grafted material was calculated as follows:

$$g(\%) = [(W_f - W_i)/W_i]100 \quad (1)$$

where W_f and W_i are the weights of PP film after and before grafting, respectively.

2.3. Cross-linking of the PNIPAAm grafted onto PP (*net*-PP-g-PNIPAAm)

Each PP-g-PNIPAAm film was placed in a glass ampoule with distilled water (7 ml) and cross-linked by either one of the two following methods. In the first approach (method A), the ampoules containing PP-g-PNIPAAm films were saturated with argon (20 min), sealed and irradiated at a dose rate of 10.8 kGy/h with total radiation doses of 10, 40, 70 and 100 kGy. In the second approach (method B), the PP-g-PNIPAAm films were cross-linked as in method A but with the addition of the cross-linking agent MBAAm (0.05 M). The cross-linked films were then immersed in water for 24 h and dried under vacuum at 40 °C.

2.4. Polymerization and cross-linking of AAc hydrogels

PAAc hydrogels were synthesized by irradiating solutions of AAc 25% v/v with MBAAm 1% w/w in water or DMF under argon atmosphere in 5 mm-diameter glass tubes at room temperature. The ampoules were irradiated at 2.5, 5 or 10 kGy doses using a dose rate of 5.0 kGy/h for the polymerization and cross-linking of AAc. The hydrogels were then washed with water (seven days), cut to approximately 3 mm length, dried under vacuum at 50 °C and sanded to remove irregularities in the polymer surface.

2.5. Polymerization and cross-linking of AAc interpenetrated within *net*-PP-g-PNIPAAm

To obtain *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc, the PAAc network was synthesized inside the cross-linked PP-g-PNIPAAm. In a typical experiment, the cross-linked *net*-PP-g-PNIPAAm films were placed in ampoules and subjected to swelling for 12 h with AAc (25% v/v) and MBAAm (1% w/w) in DMF. A lower critical temperature (LCST) did not appear when DMF was used as a solvent, and a higher swelling of PNIPAAm was achieved. After 12 h the monomer solution was removed, and the swollen films were frozen in liquid nitrogen and placed in L-shaped ampoules in order to maintain the films in horizontal position. The ampoules were degassed by vacuum for 15 min, sealed and irradiated at 2.5 kGy dose using a dose rate of 5.0 kGy/h. The films were then washed with water for 72 h and dried at 40 °C under vacuum. The amount of PAAc into the IPN was evaluated by weighing the films before and after IPN formation.

2.6. Degree of swelling

Dried *net*-PP-g-PNIPAAm and *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc films were immersed in water and weighed at different times (after careful wiping of the surface with a soft tissue). The swelling at temperatures ranging from 20 to 50 °C was calculated as

$$S_w(\%) = 100[(W_t - W_i)/W_i] \quad (2)$$

where W_t and W_i are the weights of the swollen film at time t , and of the dry film, respectively. The ratio of the swelling percentage of samples at 20 and 50 °C was used to quantify the

temperature-responsiveness, as follows:

$$S_T = S_{ST}/S_{CT} \quad (3)$$

where S_{ST} is the highest swelling (swollen state) and S_{CT} is the lowest swelling (collapsed state) in the temperature range studied. The LCST was estimated as the inflection point of S_w (%) vs. temperature plot.

The sensitivity to pH was evaluated in Na_2HPO_4 /citric acid buffer solutions of pH ranging between 2.2 and 9.0 (HI 4212 potentiometer, Hanna Instruments CA, USA) at 25 °C, using the ratio of the highest (S_{SpH}) to the lowest swelling (S_{CpH}) values:

$$SpH = S_{SpH}/S_{CpH} \quad (4)$$

The critical pH was defined as the inflection point of the S_w (%) vs. pH plot.

2.7. Water contact angle

Water contact angle measurements were carried out in triplicate at temperatures ranging from 24 to 38 °C using a KRUSS DSA 100 apparatus (Matthews NC, USA) fitted with a temperature-controlled chamber (Takei et al., 1994; Balamurugan et al., 2003; Arenas et al., 2007). Small drops of water were deposited onto *net-PP-g-PNIPAAm* and *net-PP-g-PNIPAm-inter-net-PAAc* films at different temperatures, and the contact angle was measured after 1 min. LCST was estimated as the inflection point in the contact angle vs. temperature plot.

2.8. Glass transition temperature and melting point

Differential scanning calorimetry runs of *net-PP-g-PNIPAAm* and *net-PP-g-PNIPAm-inter-net-PAAc* films were recorded in a DSC2010 (TA Instruments, New Castle DE, USA), at a heating rate of 10 °C/min, from 30 to 250 °C under nitrogen atmosphere (60 ml/min), after calibration with indium.

2.9. Vancomycin loading

Pieces of *net-PP-g-PNIPAm-inter-net-PAAc* films (8–12 mg) were immersed in phosphate buffer pH 8.0 for 5 h and dried at 40 °C for 24 h before loading. Then, each piece was placed in 5 ml of vancomycin aqueous solution (0.4 mg/ml) and the vials stored at 20 °C protected from light for 72 h. The amount of vancomycin loaded at different times was calculated from the difference between the initial drug concentration and the concentration at time t , as determined by UV spectrophotometry (280 nm, Varian Cary 100 UV-vis spectrophotometer, Palo Alto CA, USA). Finally, the films were dried at 40 °C and stored in a close chamber at room temperature.

2.10. Vancomycin release

Dried drug-loaded *net-PP-g-PNIPAm-inter-net-PAAc* films (8–12 mg) were transferred to test tubes containing 5 ml of USP phosphate buffer pH 7.4 (ionic strength 0.27) thermostated at 37 °C. The experiments were carried out in triplicate under *sink* conditions and without stirring. Samples of the release medium (1 ml) were withdrawn at regular intervals after being gently hand-shaken to ensure homogeneity; the drug concentration was measured spectrophotometrically at 280 nm and then the samples returned to the vial. Vancomycin release profiles up to a fraction released of 0.6 were fitted to the Higuchi equation:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_H t^{1/2} \quad (5)$$

where M_t and M_∞ represent the amount of vancomycin released at time t and at the end of the release test, respectively. The release rate constant K_H was estimated by linear regression.

The average vancomycin release rate per unit of surface area (both top and bottom surfaces) during a short time interval was determined as follows (Ruiz et al., 2008):

$$ARR = \frac{\Delta M_t / \Delta t}{A} \quad (6)$$

where ΔM_t represents the cumulative mass change in vancomycin during the time interval Δt , and A is the PP film surface area. The minimum required flux of vancomycin that must be delivered to the surface-near region of PP films to kill bacteria, also known as minimum killing release rate (N_{kill}) required at the local interface, was estimated using the equation (Kwok et al., 1999):

$$\frac{C_s}{N_{kill} r_0 / D} = G \left[\frac{x/r_0}{ReSc} \right]^{1/3} \quad (7)$$

where C_s is the concentration at the wall surface (0.5 µg/ml); r_0 is the effective hydraulic radius (0.3 cm); x is the axial distance from the entrance ($x/r_0=0.1$); D is the diffusivity of vancomycin in the fluid ($2.73 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$); G ($=1.22$) is a constant for tube geometry; Re is the Reynolds number, typically 200 for laminar flow; Sc is the Schmidt number (kinematic viscosity/diffusivity $=4.0 \times 10^5$).

2.11. Statistical analysis

The effect of the PNIPAAm grafting percentage, the radiation dose during its cross-linking and the addition of the cross-linker agent on the amount of vancomycin loaded (mg/g PP) was analyzed through multiple linear regression (Statgraphics Plus for Windows 5.1, Statistical Graphics Corporation, Warrenton, VA). The cross-linker level was introduced in the statistical analysis as 0 (no cross-linker) or 1 (0.05 M MBAAm). Linear and quadratic (when possible) effects and linear interactions of the independent variables were considered for the backward-stepwise statistical analysis. ANOVA was used to identify the significant terms ($\alpha < 0.05$). Regression equations were used to plot the response surfaces using Statgraphics Plus 5.1 software (Statistical Graphics Corp., Warrenton, VA, USA).

3. Results and discussion

The steps followed for the grafting of PNIPAAm on PP (*PP-g-PNIPAAm*), cross-linking of PNIPAAm chains (*net-PP-g-PNIPAAm*) and subsequent interpenetration of the PAAc network (*net-PP-g-PNIPAAm-inter-net-PAAc*) are depicted in Fig. 1. The pieces of 60 µm-thick PP film exhibited a gradual increase of their thickness on grafting. The dimensional changes of the uni-axially oriented PP films upon grafting essentially affected the film thickness, whereas there was no significant difference in the relative expansion between the two in-plane dimensions, which confirmed that grafting occurred at the surface. Nevertheless, the material as a whole could be also described as a mechanically resistant PP support sheet bearing each side a swellable layer of cross-linked hydrogel immobilized by covalent links.

3.1. Preparation of *PP-g-PNIPAAm* and *net-PP-g-PNIPAAm*

The gain in PNIPAAm of PP films was estimated as the relative increase in weight after grafting. Kinetics of grafting to render *PP-g-PNIPAAm* by the oxidative pre-irradiation method has been previously studied (Ma et al., 2009; Muñoz-Muñoz et al., 2009). The amount of grafted PNIPAAm was tuned as a function of the reaction time of the preirradiated PP films in the monomer solution. Three grafting levels were chosen for further studies, roughly 80%, 125% and 145% (Table 1 see SEM micrographs of some grafted materials in Fig. S1). Each PNIPAAm graft level led

to nine to fifteen types of functionalized materials (Table 1): (i) *PP-g-PNIPAAm*, designed as “Gx” where x is the grafting percentage; (ii) cross-linked *net-PP-g-PNIPAAm*, designed as “Cxy-z” where x is the PNIPAAm grafting percentage, y indicates if MBAAm was (method B) or not (method A) added during cross-

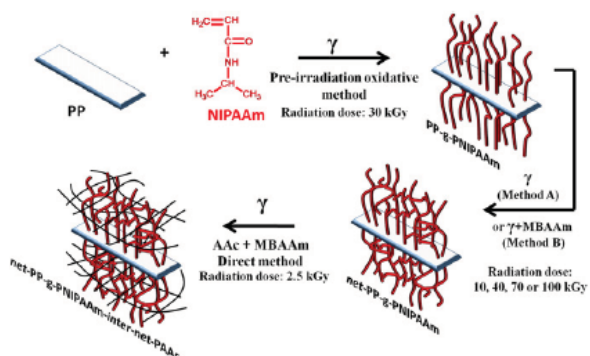


Fig. 1. Schematic view of the polymerization steps followed to prepare *net-PP-g-PNIPAAm-inter-net-PAAC*.

linking; and z indicates the total irradiation dose during cross linking; (iii) *net-PP-g-PNIPAAm-inter-net-PAAC*, designed as “IPNxy-z” where x, y and z have the same meaning as above.

Cross-linking of *PP-g-PNIPAAm* films was carried out in aqueous medium at different irradiation doses. In the subsequent step, DMF was used for the polymerization/interpenetration of AAc, since this good solvent for PNIPAAm chains prompted the swelling of the PNIPAAm grafted network and thus made the formation of the IPN easier. The lowest radiation dose used for the cross-linking of PNIPAAm was 5 kGy. Under these conditions a g layer of PNIPAAm onto PP was obtained when the *net-PP-g-PNIPAAm* were immersed in DMF, but the layer eroded indicating that 5 kGy were not sufficient for the cross-linking of PNIPAAm. Therefore, this cross-linking dose was discarded; the low suitable dose for the synthesis of *net-PP-g-PNIPAAm* being 10 kGy. On the other hand, the *PP-g-PNIPAAm* film grafted with 80% PNIPAAm and cross-linked applying doses above 40 kGy (e.g. 70 kGy) broke during IPN formation and manipulation (i.e., the grafted layer was too rigid). The greater the grafting percentage of PNIPAAm, the more stable the cross-linked layer was. For example, *PP-g-PNIPAAm* films grafted with 145% PNIPAAm and cross-linked at 70 kGy were physically stable, but those irradiated at 100 kGy suffered physical degradation (breaking apart) when

Table 1

Composition of PP films grafted with PNIPAAm and/or PAAC. *PP-g-PNIPAAm* is represented by Gx with “x” being the grafting percentage; Cxy-z refers to *net-PP-g-PNIPAAm* and “x” to grafting percentage, and “y” to cross-linking treatment either with gamma radiation (A) or “A”+MBAAm (B); “z” to the irradiation dose used for cross-linking of PNIPAAm. IPN represents *net-PP-g-inter-net-PAAC* and their complements refer to the corresponding first polymer network. The LCST of the films is also shown.

Code	PP-g-PNIPAAm (%)	<i>net-PP-g-PNIPAAm-inter-net-PAAC</i> Crosslinking method	<i>net-PP-g-PNIPAAm</i>		LCST	
			PNIPAAm/PAAC (%mol/mol)	PP-g-IPN (%)	Swelling (°C)	Contact angle (°C)
G80	78	–	–	–	31	33
C80A-10	78	10 kGy	–	–	32	30
C80B-10	82	10 kGy + MBAAm	–	–	33	31
C80A-40	85	40 kGy	–	–	31	31
C80B-40	85	40 kGy + MBAAm	–	–	31	30
IPN80A-10	83	10 kGy	67/33	110	31	31
IPN80B-10	80	10 kGy + MBAAm	67/33	106	34	31
IPN80A-40	84	40 kGy	77/23	89	30	31
IPN80B-40	80	40 kGy + MBAAm	71/29	89	32	32
G125	126	–	–	–	32	30
C125A-10	123	10 kGy	–	–	31	30
C125B-10	124	10 kGy + MBAAm	–	–	32	30
C125A-40	125	40 kGy	–	–	34	30
C125B-40	123	40 kGy + MBAAm	–	–	34	31
C125A-70	121	70 kGy	–	–	32	33
C125B-70	120	70 kGy + MBAAm	–	–	32	31
IPN125A-10	128	10 kGy	69/31	167	32	32
IPN125B-10	129	10 kGy + MBAAm	76/24	157	32	32
IPN125A-40	121	40 kGy	62/38	166	34	32
IPN125B-40	125	40 kGy + MBAAm	64/36	160	35	32
G145	146	–	–	–	33	33
C145A-10	145	10 kGy	–	–	31	33
C145B-10	149	10 kGy + MBAAm	–	–	34	31
C145A-40	144	40 kGy	–	–	33	33
C145B-40	146	40 kGy + MBAAm	–	–	33	32
C145A-70	146	70 kGy	–	–	32	31
C145B-70	146	70 kGy + MBAAm	–	–	32	31
C145A-100	145	100 kGy	–	–	31	30
C145B-100	148	100 kGy + MBAAm	–	–	32	30
IPN145A-10	149	10 kGy	68/32	192	30	31
IPN145B-10	142	10 kGy + MBAAm	72/28	175	31	32
IPN145A-40	149	40 kGy	71/29	190	32	33
IPN145B-40	145	40 kGy + MBAAm	74/26	180	31	30
IPN145A-70	142	70 kGy	81/19	160	31	30
IPN145B-70	141	70 kGy + MBAAm	86/14	157	32	30

the second network was interpenetrated. Therefore, the highest radiation dose suitable for cross-linking was 70 kGy (Table 1). The finding that an increase in the content of PNIPAAm enables the PP-g-PNIPAAm films to withstand better the cross-linking dose may be explained as follows. Higher grafting means longer PNIPAAm chains and, consequently, lower cross-linking density and greater flexibility after cross-linking irradiation. This enables the films to deform under mechanical stress without breaking.

LCST of PNIPAAm grafted and cross-linked at different doses (Fig. 2a, Table 1) was coincident with that of the homopolymer (Hirokawa and Tanaka, 1984). Once immersed in water at 25 °C, the grafted films swelled reaching the equilibrium in 15 min. The swelling degree resulted to be strongly dependent on the cross-linking dose (Fig. 2b), which clearly confirms that irradiation makes the mesh size to decrease. DSC scans (data not shown) evidenced a T_g at 125 °C due to the PNIPAAm chains and the characteristic melting point of PP at 170 °C.

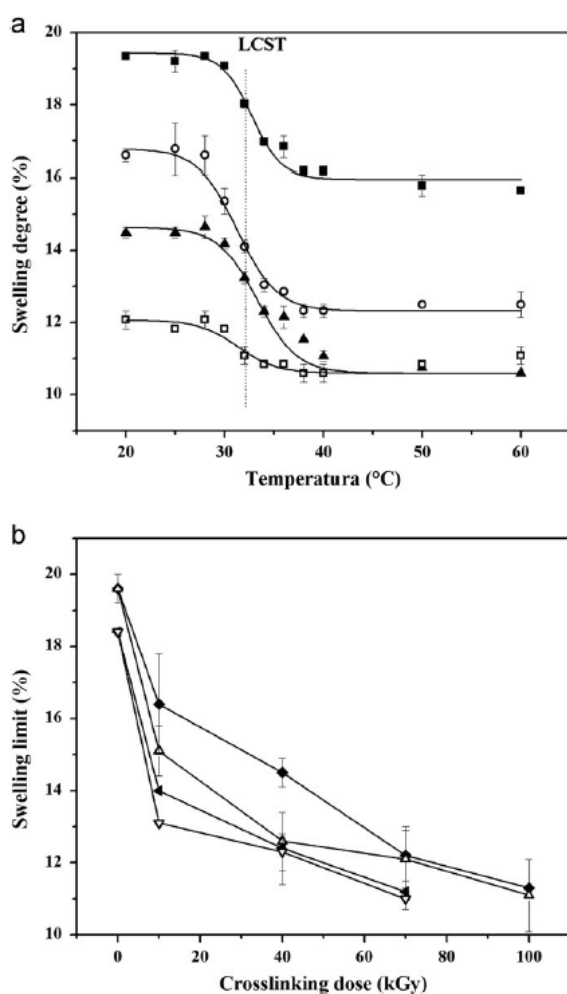


Fig. 2. Swelling degree of (a) PP-g-PNIPAAm (G145 (■)) and cross-linked PP-g-PNIPAAm: C145A-10 (○), C145A-40 (▼) and C145A-100 (□) as a function of temperature (mean values and standard deviations). The dotted line represents the LCST due to PNIPAAm. Codes as in Table 1. (b) Influence of cross-linking irradiation dose on swelling limit, in water at 25 °C, of net-PP-g-PNIPAAm (125% and 145% grafts) synthesized by cross-linking method A or B: C125A (◄), C125B (▼), C145A (◆) and C145B (△).

3.2. Preparation of PAAC hydrogels and net-PP-g-PNIPAAm-inter-net-PAAC

Direct irradiation of AAc solutions at 2.5, 5 or 10 kGy was carried out in order to identify a relatively low dose capable of rendering PAAC networks (hydrogels) without leading to graft reactions between PAAC and PP or PNIPAAm chains. PAAC irradiation in water or DMF enabled to elucidate to what extent the cross-linking density and the water absorption capacity of hydrogels depended on the solvent used during polymerization. Swelling studies showed that the hydrogels synthesized in DMF applying 2.5 kGy ($H_{2.5-DMF}$) had a lower cross-linking density and could swell more than those prepared in water (Fig. 3). PAAC hydrogels prepared at high radiation doses exhibited slightly greater critical pH values, which can be attributed to a shift in the pK_a of the carboxylic acids groups to higher values when they become closer (Table 2). Similarly, the higher critical pH exhibited by PAAC hydrogels synthesized in water compared to those prepared in DMF is explained by the shorter distance among the

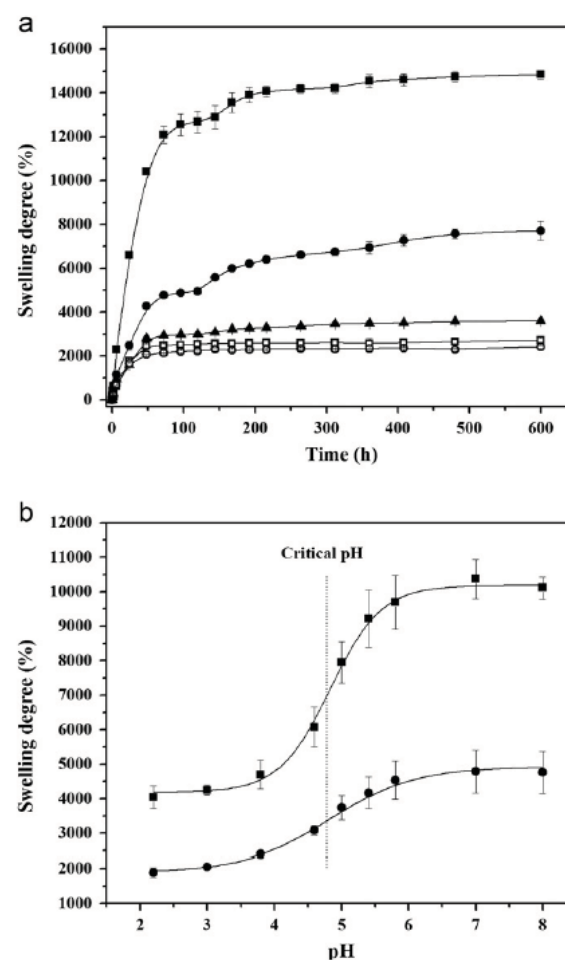


Fig. 3. Swelling degree (a) in water at 25 °C as a function of time of PAAC hydrogels synthesized at different irradiation doses using DMF as a solvent: $H_{2.5-DMF}$ (■), H_{5-DMF} (●) and H_{10-DMF} (▲), and using water as a solvent: $H_{2.5-H2O}$ (□) and H_{5-H2O} (○). Swelling degree (b) of PAAC hydrogels as a function of pH, at 25 °C in buffer solutions for the following: $H_{2.5-DMF}$ (■), H_{5-DMF} (●). The dotted line represents the critical pH. Codes as in Table 2.

Table 2
Sample codes of PAAc hydrogels (DMF and water solvents), and their corresponding irradiation dose; pH sensitivity (S_{pH}), and pH critical point in buffer solutions.

Code	[AAc] % (v/v)	[MBAAm] % (w/w)	Solvent	Irradiation dose (kGy)	Critical pH	S_{pH}
H _{2.5} -DMF	25	1.0	DMF	2.5	4.8	2.5
H ₅ -DMF	25	1.0	DMF	5.0	4.8	2.5
H ₁₀ -DMF	25	1.0	DMF	10.0	4.9	2.0
H _{2.5} -H ₂ O	25	1.0	H ₂ O	2.5	5.0	1.8
H ₅ -H ₂ O	25	1.0	H ₂ O	5.0	5.3	1.6
H ₁₀ -H ₂ O	25	1.0	H ₂ O	10.0	5.2	1.7

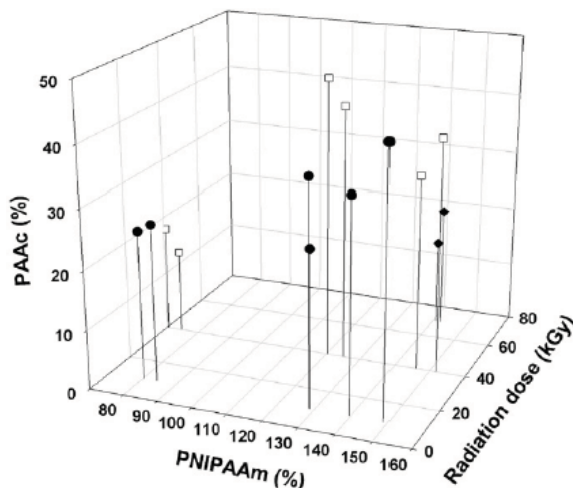


Fig. 4. Dependence of the amount of interpenetrating PAAc network (percentage referred to the weight of PP substrate) on the amount of PNIPAAm previously grafted to PP (percentage referred to the weight of PP substrate) and the cross-linking dose (● 10 kGy, □ 40 kGy and ♦ 70 kGy).

acrylic acid groups (higher cross-linking density) when the network is swollen.

Since the degree of swelling of PNIPAAm mesh is greater in DMF without presenting a LCST, the synthesis of the PAAc network to form the IPN was carried out in DMF in order to facilitate the diffusion of AAc monomers. The irradiation dose used for the synthesis of the second network of PAAc into the *net*-PP-g-PNIPAAm was 2.5 kGy in order to obtain maximum pH-responsiveness and avoid the covalent binding to the PP substrate.

The amount of PAAc network (referred to the weight of PP substrate) that interpenetrated the PNIPAAm network depended on the amount of PNIPAAm previously grafted to PP and on the cross-linking dose (Fig. 4). The amount of PAAc mesh increased as more PNIPAAm had been previously grafted, but up to a certain limit beyond which the PNIPAAm network is too dense, hindering the grafting of PAAc. This hypothesis is also supported by the fact that a high cross-linking density (i.e., 70 kGy radiation dose for cross-linking of PNIPAAm) makes the interpenetration more difficult.

The PNIPAAm:PAAc molar ratios in the IPNs ranged from 62:38 to 86:14. PNIPAAm:PAAc ratios were similar (68:32) for all IPNs in which PNIPAAm was cross-linked under 10 kGy (Table 1). As mentioned above, PP-g-PNIPAAm irradiated with 100 kGy was not physically stable and then it was difficult to analyze the amount of PAAc interpenetrated applying the gravimetric method. Non-crosslinked PP-g-PNIPAAm films (0 kGy irradiation dose) did not render IPNs due to partial loss of PNIPAAm when placed in DMF solution.

3.3. Stimuli-responsiveness

The *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter*-*net*-PAAc films reached the swelling equilibrium in water in less than 20 min at any temperature evaluated (Fig. 5a); the higher the radiation dose during cross-linking, the lower the degree of swelling. The films were dually pH- and temperature-responsive with critical values in the range of 5.2–6.3 and 30–34 °C, respectively (Tables 1 and 3; Fig. 5b). The degree of swelling in water at 25 °C notably increased with the content in grafted PNIPAAm and decreased with the content in the cross-linker MBAAm and the radiation dose (Fig. 6).

3.4. Vancomycin loading

Pristine PP did not adsorb vancomycin. The grafting of PNIPAAm notably helped the drug uptake; the amount loaded increasing with the content in PNIPAAm on the IPNs (Table 3). This effect cannot be attributed only to PNIPAAm itself, since this

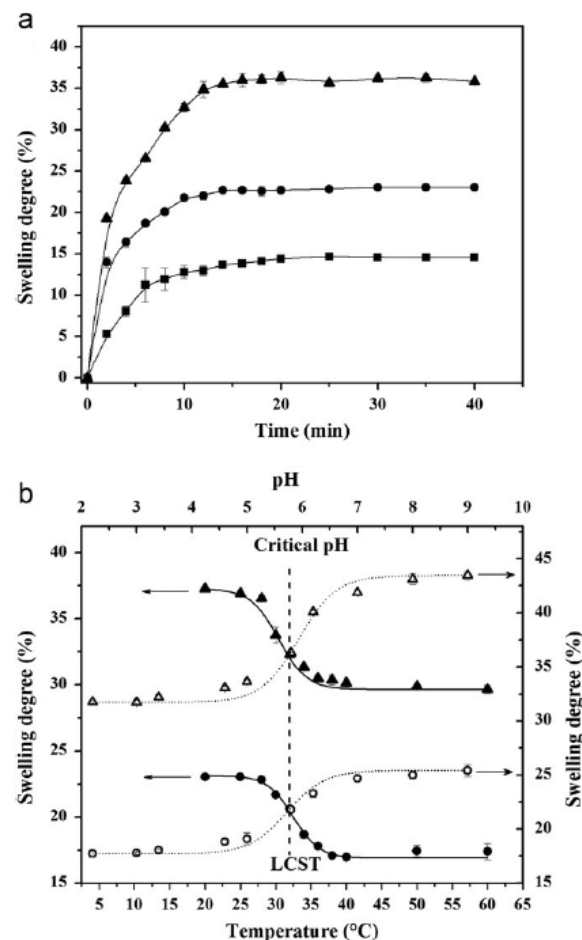


Fig. 5. Swelling degree (a) of *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter*-*net*-PAAc, in water (25 °C), as a function of time for the following: IPN145A-10 (▲), IPN145A-40 (●) and IPN145A-70 (■); swelling degree (b) of *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter*-*net*-PAAc as a function of temperature in water (continuous lines and full symbols), and of pH at 25 °C in buffer solutions (dotted lines and open symbols) for the following: IPN145A-10 (triangles), IPN145A-40 (circles). The dashed line represents the critical points.

Table 3

Temperature- and pH-sensitivity of the grafted films, capability of the IPNs to load vancomycin and release rate constant obtained after fitting to the Higuchi equation (mean values; standard errors in parenthesis). Codes as in Table 1.

Code	S_T	Critical pH	S_{pH}	Vancomycin loaded			K_H ($h^{1/2}$)
				(% absorbed)	(mg/g IPN)	(mg/g PAAc)	
IPN80A-10	1.4	5.8	1.6	14.8 (0.6)	30.1 (2.4)	125.5 (9.9)	42.3 (2.1)
IPN80B-10	1.6	5.5	1.5	13.8 (1.2)	26.0 (2.3)	109.8 (9.5)	44.1 (7.9)
IPN80A-40	1.3	5.9	1.2	17.1 (0.5)	31.2 (1.0)	195.9 (6.2)	40.3 (7.5)
IPN80B-40	1.5	5.2	1.3	15.2 (1.5)	29.5 (2.4)	145.5 (12.0)	23.2 (1.3)
IPN125A-10	1.3	5.2	1.3	21.3 (1.3)	50.7 (1.9)	226.2 (8.7)	34.3 (5.3)
IPN125B-10	1.3	6.2	1.2	17.3 (2.8)	52.1 (1.9)	312.0 (11.3)	24.6 (1.9)
IPN125A-40	1.3	5.9	1.6	24.4 (4.7)	55.5 (9.3)	197.2 (33.2)	52.9 (1.3)
IPN125B-40	1.5	6.1	1.7	27.4 (3.6)	52.8 (4.1)	198.3 (15.6)	63.5 (11.6)
IPN145A-10	1.3	5.8	1.4	65.1 (1.0)	139.2 (2.6)	608.8 (11.2)	22.7 (6.9)
IPN145B-10	1.3	5.7	1.5	60.8 (0.9)	134.5 (0.6)	667.2 (3.2)	33.3 (1.7)
IPN145A-40	1.3	5.7	1.4	45.8 (7.1)	103.8 (4.3)	504.2 (20.8)	26.4 (9.3)
IPN145B-40	1.3	6.1	1.5	47.5 (4.6)	102.7 (2.5)	564.1 (14.0)	63.5 (6.9)
IPN145A-70	1.1	6.3	1.3	19.8 (4.3)	38.8 (4.9)	306.1 (38.9)	57.6 (10.7)
IPN145B-70	1.2	5.6	1.2	18.2 (1.2)	33.0 (1.3)	359.2 (14.0)	49.6 (3.5)

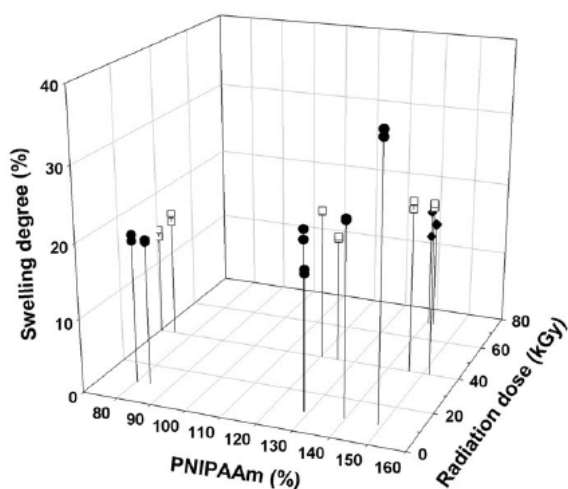


Fig. 6. Dependence of the degree of swelling in water (25 °C) of *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc prepared with or without cross-linker on the amount of PNIPAAm previously grafted to PP (percentage referred to the weight of PP substrate) and the cross-linking dose (● 10 kGy, □ 40 kGy and ◆ 70 kGy).

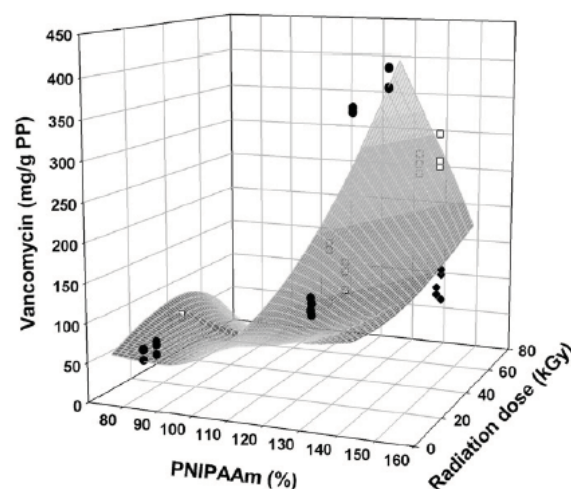


Fig. 7. Dependence of the amount of vancomycin loaded (referred to gram of PP substrate) by *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc on the amount of PNIPAAm grafted to PP (percentage referred to the weight of PP substrate) and the cross-linking dose (● 10 kGy, □ 40 kGy and ◆ 70 kGy). The response surface represents predicted values ($R^2=0.866$; $F_{3,36}=59.66$; $\alpha < 0.01$).

network was previously demonstrated to have limited ability to load vancomycin (Ruiz et al., 2008), but to the enhancement of the amount of PAAc that can be interpenetrated in the *net*-PP-g-PNIPAAm. Vancomycin is a large glycopeptide antibiotic bearing a variety of functional groups (amine, amide, carboxylic acid, hydroxyl, etc.) and, in aqueous solution, it is positively charged at the primary and secondary amine groups. We have previously observed, applying isothermal titration calorimetry (ITC), that vancomycin has a high affinity for the acrylic acid groups, preferentially when they are ionized (as occurs after the treatment with buffer pH 8). Therefore, the main interaction of the drug with the IPN should be driven by ionic bonds with PAAc chains (Ruiz et al., 2008).

As expected from the percentage of PAAc grafted, high radiation doses applied for PNIPAAm cross-linking led to a decrease in the loading. The effect of MBAAm was not statistically significant. The amount of vancomycin loaded (Table 3) depended on the percentage

of PNIPAAm and on the cross-linking dose (Fig. 7), as follows:

$$\begin{aligned} \text{Vancomycin (mg/gPP)} &= 574.86(184.47) - 13.363(3.286)\text{PNIPAAm}(\%) \\ &+ 4.910(2.049)\text{Dose} - 0.0591(0.0154)\text{PNIPAAm}(\%)\text{Dose} \\ &+ 0.0836(0.0144)\text{PNIPAAm}(\%)^2 \\ [R^2 &= 0.866; F_{4,37} = 59.66; \alpha < 0.01] \end{aligned} \quad (8)$$

The values in parenthesis after the coefficient values indicate the standard errors. Although the goodness of the fitting is not very high, the experimental data points match quite well with the predicted values (see Fig. 7) and the response surface may enable to explain and to predict new mean responses in the data region of the variables considered (Myers et al., 2009). Extrapolations would be not reliable in any case. For example, prediction of vancomycin loading for PNIPAAm percentage equals to zero would be not correct, since that value was not considered in the model.

The effects of the PNIPAAm percentage and the cross-linking dose on vancomycin loading were similar to that observed on PAAc interpenetration. These findings can be explained by the fact that (i) the loading mainly takes place through ionic interactions between vancomycin and PAAc, and (ii) the mesh creates an environment suitable for the interaction probably because the concomitance of hydrophobic interactions of vancomycin with the PNIPAAm mesh. This explains why the amount of vancomycin loaded normalized by the amount of PAAc grafted (mg/g PAAc in Table 3) is not constant, but increases as the content in PNIPAAm rises. Nevertheless, when the IPN network is too dense, the amount of PAAc that can be grafted decreases and the drug diffusion into the IPN is also sterically hindered. Consequently, for large PNIPAAm percentages, the higher the cross-linking dose, the lower the amount loaded was.

3.5. Vancomycin release

Vancomycin release profiles are shown in Fig. 8. The *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc films were able to sustain the release for more than 8 h. The profiles fitted quite well to the Higuchi equation ($R^2 > 0.98$), indicating that the release mainly occurs

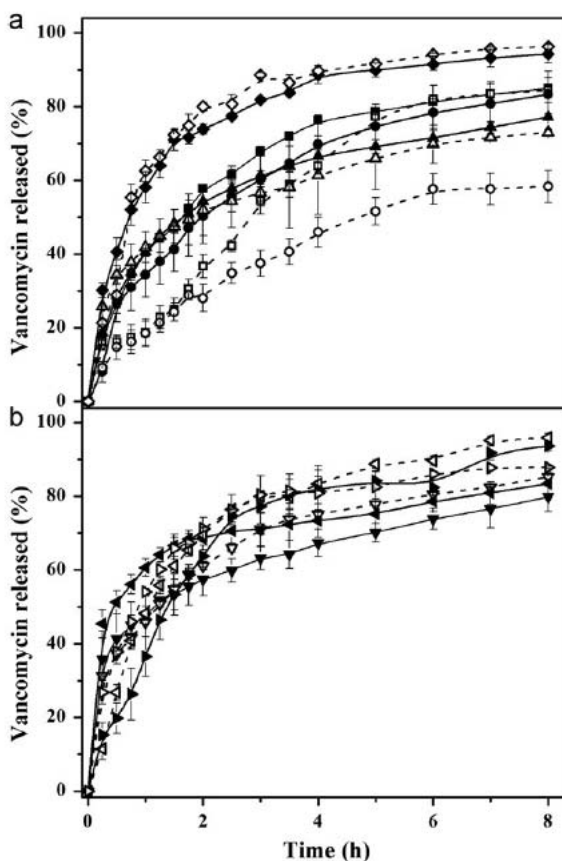


Fig. 8. Vancomycin release profiles from (a) *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc containing 80% or 125% PNIPAAm: IPN80A-10 (■,—), IPN80B-10 (□,—), IPN80A-40 (●,—), IPN80B-40 (○,—), IPN125A-10 (▲,—), IPN125B-10 (△,—), IPN125A-40 (◆,—) and IPN125B-40 (◇,—) and (b) *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc with 145% PNIPAAm: IPN145A-10 (▼,—), IPN145B-10 (▽,—), IPN145A-40 (◄,—), IPN145B-40 (◃,—), IPN145A-70 (►,—), IPN145B-70 (▷,—), in pH 7.4 phosphate buffer (mean values and standard deviations). Codes as in Table 1.

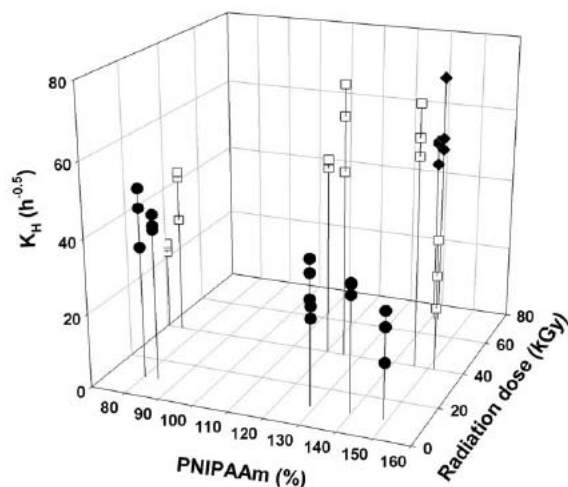


Fig. 9. Dependence of vancomycin release rate constant from *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc on the amount of PNIPAAm grafted to PP (percentage referred to the weight of PP substrate) and the cross-linking dose (● 10 kGy, □ 40 kGy and ◆ 70 kGy).

by diffusion through the shrunk IPN. The release rate (K_H) was dependent on the amount of PNIPAAm grafted and the cross-linking dose (Fig. 9), but statistical analysis did not render a good fitting to regression curves containing these two variables. As a general trend, an increase in the radiation dose used to cross-link PNIPAAm (as it is the case of IPN125-40 and IPN145-70) results in faster release, i.e., a worse retention of the drug in the network. This finding can be related to the decrease in the amount of PAAc network that interpenetrated the PNIPAAm one (see Fig. 4). Therefore, a lower number of specific binding points for vancomycin accelerate the release.

The “instantaneous” release rate per surface area (ARR) was estimated in order to elucidate if the amount of vancomycin loaded and its release rate may be suitable for killing bacteria that attempt to adhere to the developed films (Kwok et al., 1999). The theoretical N_{kill} value was calculated to be $3.5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \text{ s})$ using Eq. (7) as previously reported (Ruiz et al., 2008). All *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc films showed a high release rate in the first hours followed by a decreasing trend, as expected for a diffusion-dependent process (Fig. 10). Films in which PNIPAAm was cross-linked using a lower radiation dose were capable to maintain for more time (at least for 4 h) ARR values above the N_{kill} . It has been reported that the eradication of bacteria during the first hours after implantation of a medical device is essential for avoiding the development of bacterial biofilms (Jones et al., 2001; Montanaro et al., 2007). Therefore, tuning the radiation dose applied for the cross-linking of PNIPAAm may allow achieving vancomycin gradient concentration on the surface of *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc films able to reduce the likelihood of infections.

4. Conclusion

The interpenetration of PAAc, the swelling degree, the amount of vancomycin loaded and its release rate can be regulated through the amount of PNIPAAm directly grafted on PP and the radiation dose used to cross-link the PNIPAAm chains. As a general trend, the higher the radiation dose, the smaller the amount of PAAc that can interpenetrate the PNIPAAm network, the lower the degree of

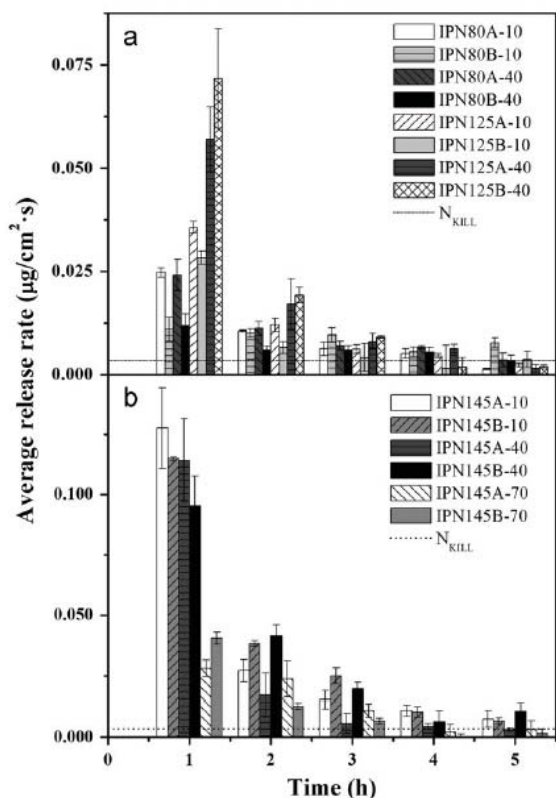


Fig. 10. Average release rates of vancomycin from *net-PP-g-PNIPAAm-inter-net-PAAC* (codes as in Table 1) in pH 7.4 phosphate buffer (mean values and standard deviations). The N_{kill} value of $3.5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ is shown as a dotted line.

swelling, the smaller the amount of vancomycin loaded and the faster the release rate were. Thus, IPN145A-10, a functionalized film obtained applying only low gamma-ray irradiation doses, is pointed out as one with great ability to host vancomycin and to sustain the vancomycin levels above N_{kill} . This information should be useful for optimizing γ -ray irradiation conditions for the grafting/cross-linking of PNIPAAm/PAAC IPNs in order to obtain surface-modified responsive PP-based medical devices able to load/elute vancomycin.

Acknowledgments

This work was supported by DGAPA-UNAM (Grant no. IN202311), Mexico, and by MICINN and FEDER (SAF2011-22771) and the Xunta de Galicia (PGIDT10CSA20301PR), Spain.

Appendix A. Supplementary materials

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.radphyschem.2012.01.007.

References

Alvarez-Lorenzo, C., Bucio, E., Burillo, G., Concheiro, A., 2010. Medical devices modified at the surface by gamma-ray grafting for drug loading and delivery. *Expert Opin. Drug Del.* 7, 173–183.

- Anjum, N., Gulrez, S.K.H., Singh, H., Gupta, B., 2006. Development of antimicrobial polypropylene sutures by graft polymerization. I. Influence of grafting conditions and characterization. *J. Appl. Polym. Sci.* 101, 3895–3901.
- Arenas, E., Bucio, E., Burillo, G., Lopez, G.P., 2007. Radiation grafting of poly(ethylene glycol) methacrylate onto poly(vinyl chloride) tubes. *Des. Monomers Polym.* 10, 459–467.
- Balamurugan, S., Mendez, S., Balamurugan, S.S., O'Brien II, M.J., Lopez, G.P., 2003. Thermal response of poly(N-isopropylacrylamide) brushes probed by surface plasmon resonance. *Langmuir* 19, 2545–2549.
- Bucio, E., Burillo, G., Adem, E., Coqueret, X., 2005. Temperature sensitive behavior of poly(N-isopropylacrylamide) grafted onto electron beam-irradiated poly(propylene). *Macromol. Mater. Eng.* 290, 745–752.
- Burillo, G., Bucio, E., Arenas, E., Lopez, G.P., 2007. Temperature and pH-sensitive swelling behaviour of binary DMAEMA/4VP grafts on poly(propylene) films. *Macromol. Mater. Eng.* 292, 214–219.
- Cevher, E., Orhan, Z., Mülazimoğlu, L., Şensoy, D., Alper, M., Yıldız, A., Özsoy, Y., 2006. Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with prepared microspheres. *Int. J. Pharm.* 317, 127–135.
- Clough, R.L., 2001. High-energy radiation and polymers: a review of commercial processes and emerging applications. *Nucl. Instrum. Methods B* 185, 8–33.
- Contreras-García, A., Burillo, G., Aliev, R., Bucio, E., 2008. Radiation grafting of N,N-dimethylacrylamide and N-isopropylacrylamide onto polypropylene films by two-step method. *Radiat. Phys. Chem.* 77, 936–940.
- Cosson, M., Debodinance, P., Boukerrou, M., Chauvet, M.P., Lobry, P., Crépin, G., Ego, A., 2003. Mechanical properties of synthetic implants used in the repair of prolapse and urinary incontinuity in women: which is the ideal material? *Int. Urogynecol. J.* 14, 169–178.
- Freytag, C.C., Thies, F.L., König, W., Welte, T., 2003. Prolonged application of closed in-line suction catheters increases microbial colonization of the lower respiratory tract and bacterial growth on catheter surface. *Infection* 31, 31–37.
- Friedrich, J., Kühn, G., Mix, R., Unger, W., 2004. Formation of plasma polymer layers with functional groups of different type and density at polymer surfaces and their interaction with Al atoms. *Plasma Processes Polym.* 1, 28–50.
- Hirokawa, Y., Tanaka, T., 1984. Volume phase transition in a nonionic gel. *J. Chem. Phys.* 181, 6379–6380.
- Jones, M.S., Morgan, M., Humphrey, T.J., Lapin-Scott, H., 2001. Effect of vancomycin and rifampicin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lancet* 357, 40–41.
- Kowalczyk, D., Ginalska, G., Golus, J., 2010. Characterization of the developed antimicrobial urological catheters. *Int. J. Pharm.* 402, 175–183.
- Kumar, A., Srivastava, A., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., 2007. Smart polymers: physical forms and bioengineering applications. *Prog. Polym. Sci.* 32, 1205–1237.
- Kwok, C.S., Wan, C.X., Hendricks, S., Bryers, J.D., Horbett, T.A., Ratner, B.D., 1999. Design of infection-resistant antibiotic-releasing polymers. I. Fabrication and formulation. *J. Controlled Release* 62, 289–299.
- Low, S.P., Short, R.D., Steele, D.A., 2010. Plasma polymer surfaces for cell expansion and delivery. *J. Adhes. Sci. Technol.* 24, 2215–2236.
- Ma, D., Chen, H., Shi, D., Li, Z., Wang, J., 2009. Preparation and characterization of thermo-responsive PDMS surfaces grafted with poly(N-isopropylacrylamide) by benzophenone-initiated photopolymerization. *J. Colloid Interface Sci.* 332, 85–90.
- Montanaro, L., Campoccia, D., Arciola, C.R., 2007. Advancements in molecular epidemiology of implant infections and future perspectives. *Biomaterials* 28, 5155–5168.
- 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.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C., Anderson-Cook, C.M., 2009. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments* (Wiley Series in Probability and Statistics), 3rd ed. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ. (pp. 13–72).
- Nava-Ortiz, C.A.B., Alvarez-Lorenzo, C., Bucio, E., Concheiro, A., Burillo, G., 2009. Cyclodextrin-functionalized polyethylene and polypropylene as biocompatible materials for diclofenac delivery. *Int. J. Pharm.* 382, 183–191.
- Piozzi, A., Francolini, I., Occhiperti, L., Venditti, M., Marconi, W., 2004. Antimicrobial activity of polyurethanes coated with antibiotics: a new approach to the realization of medical devices exempt from microbial colonization. *Int. J. Pharm.* 280, 173–183.
- Raad, I., Hanna, H., Maki, D., 2007. Intravascular catheter-related infections: advances in diagnosis, prevention, and management. *Lancet Infect. Dis.* 7, 645–657.
- Raad, I., Reitzel, R., Jiang, Y., Chemaly, R.F., Dvorak, T., Hachem, R., 2008. Adherence activity and antimicrobial durability of anti-infective-coated catheters against multidrug-resistant bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 746–750.
- Ruiz, J.C., Alvarez-Lorenzo, C., Taboada, P., Burillo, G., Bucio, E., Prijk, K., Nefis, 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.
- Ruiz, J.C., Burillo, G., Bucio, E., 2007. Interpenetrating thermo and pH stimuli responsive polymer networks of PAAC/PNIPAAm grafted onto PP. *Macromol. Mater. Eng.* 292, 1176–1188.

- Saxena, S., Ray, A.R., Kapil, A., Pavon-Djavid, G., Letourneur, D., Gupta, B., Meddahi-Pellé, A., 2011. Development of a new polypropylene-based suture: plasma grafting, surface treatment, characterization, and biocompatibility studies. *Macromol. Biosci.* 11, 373–382.
- Schmidt, C., Schmidt-Naake, G., 2007. Grafting of 1-vinylimidazole onto pre-irradiated ETFE films. *Macromol. Mater. Eng.* 292, 1067–1074.
- Siow, K.S., Britcher, L., Kumar, S., Griesser, H.J., 2006. Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization—a review. *Plasma Processes Polym.* 3, 392–418.
- Takei, Y.G., Aoki, T., Sanui, K., Ogata, N., Sakurai, Y., Okano, T., 1994. Dynamic contact angle measurement of temperature-responsive surface properties for poly(N-isopropylacrylamide) grafted surface. *Macromolecules* 27, 6163–6166.
- Truica-Marasescu, F., Pham, S., Wertheimer, M.R., 2007. UV processing of polymers: surface modification and deposition of organic thin films. *Nucl. Instrum. Methods B* 265, 31–36.
- Wandera, D., Wickramasinghe, S.R., Husson, S.M., 2010. Stimuli-responsive membranes. *J. Membr. Sci.* 357, 6–35.
- Wang, W., Wang, L., Chen, X., Yang, Q., Sun, T., Zhou, J., 2006. Study on the graft reaction of poly(propylene) fiber with acrylic acid. *Macromol. Mater. Eng.* 291, 173–180.



Taylor & Francis Books, Inc.

Taylor & Francis Group plc

6000 Broken Sound Parkway, N.W., Suite 300, Boca Raton, Florida 33487

September 13, 2012

Ph. D. student Franklin Muñoz-Muñoz

Nuclear Science Institute, UNAM

México, D.F.

Dear Mr. Muñoz-Muñoz,

We are pleased to inform you that your chapter, "*Surface Modification and Functionalization of Polymer Materials by γ -Irradiation for Biomedical Applications*", has been accepted for publication in the Book "*Radiation Synthesis of Materials & Compounds*" (ISBN 9781466505223, <http://www.crcpress.com/product/isbn/9781466505223>). You will soon receive proofs of your chapter for revision. The Book will be published tentatively in February-March 2013.

Thank you for your excellent contribution to our publication program. We are looking forward in receiving further manuscripts from you and your co-authors.

Best regards,

Dr. Boris Kharisov

Consulting Editor, CRC Press

bkhariss@hotmail.com

10 Surface Modification and Functionalization of Polymer Materials by γ -Irradiation for Biomedical Applications

Franklin Muñoz-Muñoz

Universidad Nacional Autónoma de México

Emilio Bucio

Universidad Nacional Autónoma de México

CONTENTS

10.1 Introduction	265
10.2 Polymers in Biomedical Uses (Morphology, Structure, and Function).....	266
10.2.1 Stimuli-Responsive Polymers	267
10.2.1.1 Thermosensitive Polymers	276
10.2.1.2 pH-Sensitive Polymers	277
10.2.1.3 Hydrogels	277
10.2.1.4 Stimuli-Responsive Interpenetrating Polymer Networks	279
10.2.2 Graft Copolymers	281
10.2.2.1 Methods of Radiation-Induced Grafting	283
10.2.2.2 Graft Copolymer by One- and Two-Step Method	286
10.3 Grafting Approaches	286
10.3.1 PP-g-(PNIPAAm- <i>r</i> -APMA)	288
10.3.2 Stimuli-Responsive IPNs Grafted onto PP	291
10.4 Conclusion	294
References.....	294

10.1 INTRODUCTION

Polymer materials have generated remarkable interest in a number of innovative domains for biomedical applications. Today there is a great need to develop and design polymers for better interaction with biosystem that includes the blood and tissue compatibility such as implants or supplementary materials (vascular grafts, artificial hearts, sutures, intraocular lenses, and catheters). This kind of systems require certain criteria for their performance in specific medical, surgery, and pharmaceutical applications, which take into account the mechanical behavior, compatibility, hydrophilicity, immune and biological response (Gupta and Anjum 2003). The use of implants and medical devices has become a leading cause of health-care-related bloodstream infections, which are associated with considerable morbidity and mortality (Schierholz and Beuth 2001; Castner and Ratner 2002; Raad and Hanna 2002; Raad et al. 2007). In many cases, a polymer material in contact with blood

would experience cell adhesion, which subsequently could lead to thrombogenesis. At the same time, for polymers such as implants, the tissue could provoke an adverse reaction in the form of inflammation (Gupta and Anjum 2003).

The surface functionalization is being shown as a tool for preventing biofilm formation on medical devices which are prone to be colonized by opportunistic bacteria at the moment of insertion, while incorporation of antimicrobial, anti-inflammatory, and immunosuppressive drug at the surface of the device is an effective way for prophylaxis/treatment of device-related infections and for preventing the initial host immune-inflammatory response, avoiding the collateral effects of systemic administration of high doses of drug (Cosson et al. 2003; Freytag et al. 2003; Schneider et al. 2003; Piozzi et al. 2004; Anjum et al. 2006; Cevher et al. 2006; Raad et al. 2008; Alvarez-Lorenzo et al. 2010; Kowalczyk et al. 2010). Polymers can be tailor-modified at the surface or in the bulk matrix with polymers that possess certain functional groups, such as amides, amines, carboxylic acids or epoxy by applying different chemical methods (Friedrich et al. 2004; Siow et al. 2006; Wang et al. 2006; Schmidt and Schmidt-Naake 2007; Truica-Marasescu et al. 2007). Materials modified with “smart” (or stimuli-responsive) polymers, which exhibit relatively abrupt and large physical or chemical changes in response to low-intensity stimuli, have found interesting applications as drug delivery systems (Burillo et al. 2007; Kumar et al. 2007; Melendez-Ortiz and Bucio 2008; Ruiz et al. 2008).

High-energy radiation, such as gamma (γ -) irradiation and electron beam lead to activation of polymers so that specific monomer may be grafted. The extent of modification, i.e., the grafting degree may be easily controlled by the careful variation of the radiation exposure and reaction conditions. The grafting method by γ -irradiation is extremely attractive as the modified biomaterial is obtained in the purest form possible, does not require chemical initiators and is applicable to almost all polymer-monomer combinations with enormous possibilities of physic-chemical and biological characteristics (Clough 2001). The advantage of the γ -irradiation is that it offers much higher penetration into the polymer as compared with the electron beam (Gupta et al. 2004).

Graft copolymers exhibit better mechanical properties than other systems such as hydrogels, comb-type hydrogels or interpenetrating networks (Kaetsu 1995). In addition to these advantages, stimuli-responsive graft copolymers can rapidly change surface material thickness, wettability, or surface charge in response to small changes in stimuli such as solution temperature, pH, or specific ionic concentration. These properties can be exploited for the use of these materials in biomedical applications such as implanted synthetic polymeric drug carriers that sustained its release on specific sites in the body.

This chapter revises some advances in the preparation by γ -irradiation of graft copolymers containing different architectures and mainly focuses on the performance of materials modified with stimuli-responsive components.

10.2 POLYMERS IN BIOMEDICAL USES (MORPHOLOGY, STRUCTURE, AND FUNCTION)

A very large number of morphologies can be found in the world of polymers and copolymers. Polymers can be linear, branched, comb-type, star-like, micelles, macrocyclic or cross-linked, when chains are linked together; for copolymers the order can be random, alternating, in block or graft as illustrated in Figure 10.1. The order of the repeating units has to be specified, as different orders result in different properties.

Classical polymers have become increasingly used in medicine as components of biomedical devices, but with the development of new techniques for functionalization, more sophisticated polymers have been developed, for instance as constituent of implants and drug delivery. In addition, chemical modification applied to polymers by γ -irradiation to create the new materials and applications, is an effective alternative to reintegrate some polymers whose use has been limited due to problems associated with biocompatibility, toxicity, or bacterial colonization. All monomers and synthetic polymers presented in this chapter and their corresponding abbreviations are given in Table 10.1.

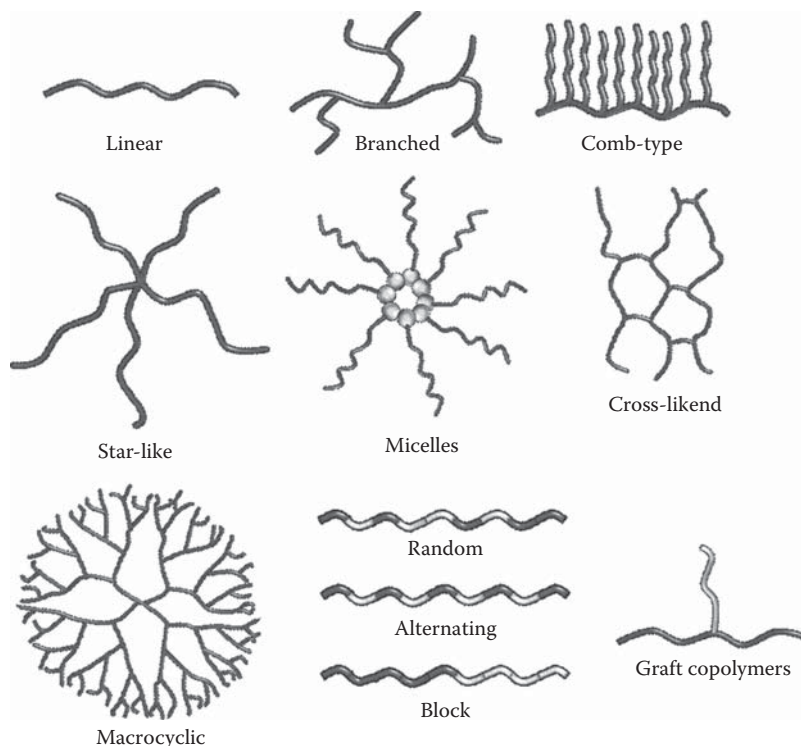


FIGURE 10.1 Different morphologies of stimuli-responsive polymers and types of copolymer.

10.2.1 STIMULI-RESPONSIVE POLYMERS

Some polymers bearing attractive groups are called “smart” or “stimuli-sensitive” since they show critical phenomena as, for example, phase transitions (PTs) that can be induced by reason of very small changes in environmental factors: changes in temperature, pH, solvent, ionic composition, electric or magnetic fields, light, ultrasounds, etc. (Figure 10.2; Park and Hoffman 1992; Brazel and Peppas 1995; Hoffman 1995; Hoffman et al. 2000; Kikuchi and Okano 2002; Bucio et al. 2005). The smart behavior occurs at equilibrium and is attributed to the associations between the polymer chains after applying a stimulus. These associations are driven by noncovalent weak and complementary interactions: coulombic, hydrogen bonding, van der Waals, exchange, repulsive, and hydrophobic interactions. The physical bonds do that smart responses are reversible. The special feature of all these materials is that their macroscopic properties (viscoelasticity, swelling, conductivity, etc.) can be controlled at the microscopic level by modifying the structure and organization of the polymer chains (Dimitrov et al. 2007). A simplified schematic of the stimuli-responsive association concept in aqueous polymer solution is shown in Figure 10.3.

Stimuli-responsive polymers have gained increasing interest and served in a vast number of medical and/or pharmaceutical applications such as implants, medical devices or controlled drug delivery systems, enzyme immobilization, immune-diagnosis, sensors, sutures, adhesives, adsorbents, coatings, contact lenses, renal dialyzers, concentration and extraction of metals, for enhanced oil recovery, and other specialized systems (Chen and Hsu 1997; Chen et al. 1997; Wu and Zhou 1997; Yuk et al. 1997; Bayhan and Tuncel 1998; Tuncel 1999; Tuncel and Ozdemir 2000; Hoffman 2002; Şen and Sarı 2005; Fong et al. 2009). Some novel applications in the biomedical field using materials with stimuli-responsive in bulk or just at the surface are: shape-memory (i.e., devices that can adapt its shape to facilitate the implantation and recover their conformation within the body to

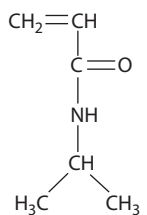
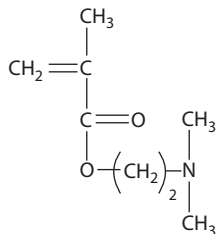
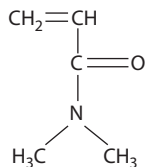
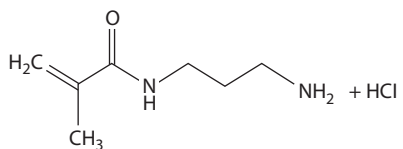
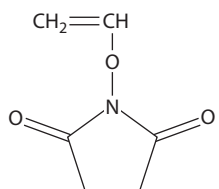
AQ2

**TABLE 10.1**

Chemical Structure of Monomers, Polymer Matrices, Cross-Linker Agents and Natural Polymers Used for Preparing Graft Copolymers or Stimuli-Responsive Polymers by γ -Irradiation for Biomedical Applications

Chemical Structure	Name	Abbreviations
$ \begin{array}{c} \text{CH}_2=\text{CH} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $	Acrylamide	AAm
$ \begin{array}{c} \text{CH}_2=\text{CH} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array} $	Acrylic acid	AAc
$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_2\text{C}=\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	2-Hydroxyethyl methacrylate	HEMA
$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2=\text{C} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array} $	Methacrylic acid	MAAc
$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2=\text{C} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OCH}_3 \end{array} $	Methyl methacrylate	MMAc





N-acryloxysuccinimide

NAS

N-(3-aminopropyl) methacrylamide
hydrochloride

APMA

N,N-dimethylacrylamide

NDAAm

N,N-dimethylaminoethyl methacrylate

DMAEMA

N-isopropylacrylamide

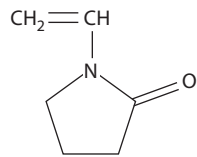
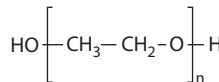
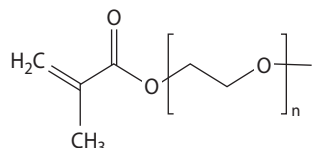
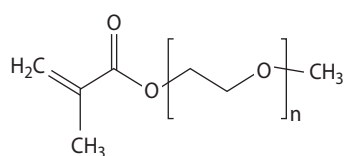
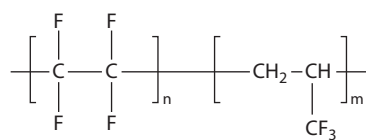
NIPAAm

(continued)

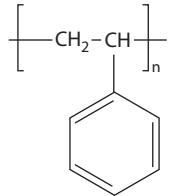
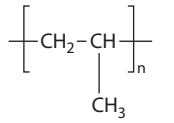
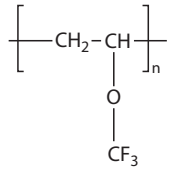
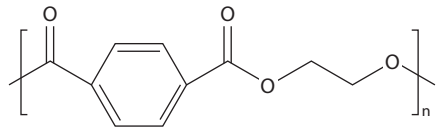
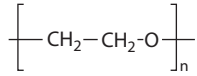
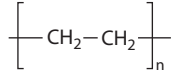
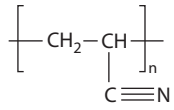


TABLE 10.1 (continued)

Chemical Structure of Monomers, Polymer Matrices, Cross-Linker Agents and Natural Polymers Used for Preparing Graft Copolymers or Stimuli-Responsive Polymers by γ -Irradiation for Biomedical Applications

Chemical Structure	Name	Abbreviations
	<i>N</i> -vinyl pyrrolidone	VP
	Poly(ethylene glycol)	PEG
	Poly(ethylene glycol) methacrylate	PEGMA
	Poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate	PEGMEM
Polymer matrices		
	Fluorinated ethylene propylene copolymer	FEP





Polyacrylonitrile

PAN

Polyethylene

PE (UHMWPE)
(LDPE) (HDPE)

Poly(ethylene oxide)

PEO

Polyethylene terephthalate

PET

Poly(perfluorovinyl ether)

PFVE

Polypropylene

PP

Polystyrene

Ps

(continued)



TABLE 10.1 (continued)

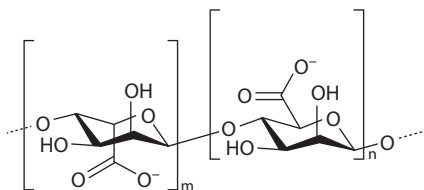
Chemical Structure of Monomers, Polymer Matrices, Cross-Linker Agents and Natural Polymers Used for Preparing Graft Copolymers or Stimuli-Responsive Polymers by γ -Irradiation for Biomedical Applications

Chemical Structure	Name	Abbreviations
	Polytetrafluoroethylene	PTFE or Teflon
	Poly(vinylidene fluoride)	PVDF
Cross-linker agents		
	Divinylbenzene	DVB
	<i>N,N'</i> -methylenebisacrylamide	MBAAm
	Tetraethyleneglycol dimethacrylate	TEGDMA

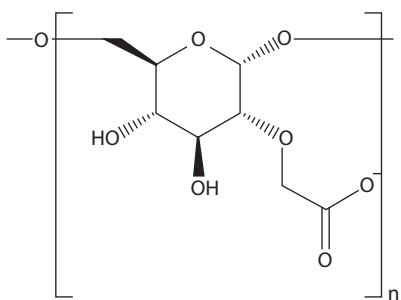


Natural polymers

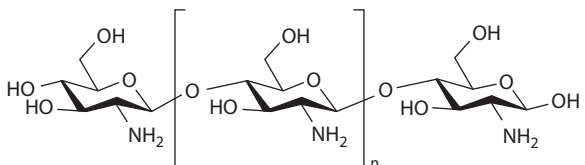
Alginate



Carboxymethyl dextran



Chitosan



(continued)

TABLE 10.1 (continued)

Chemical Structure of Monomers, Polymer Matrices, Cross-Linker Agents and Natural Polymers Used for Preparing Graft Copolymers or Stimuli-Responsive Polymers by γ -Irradiation for Biomedical Applications

Chemical Structure	Name	Abbreviations
	Ethyl (hydroxyethyl) cellulose	EHC
	Polylysine	pLys



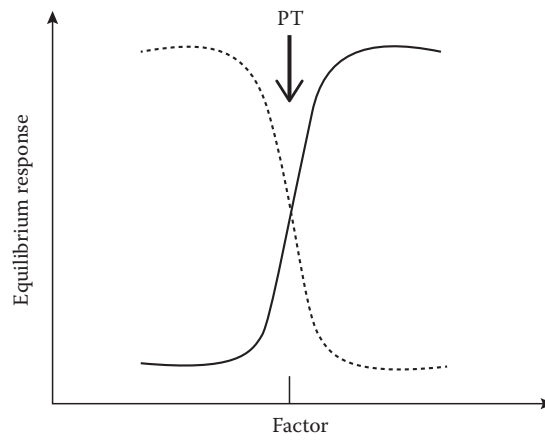


FIGURE 10.2 Responses of smart polymers to changes in environmental factor. Positive (···) and negative responses (—).

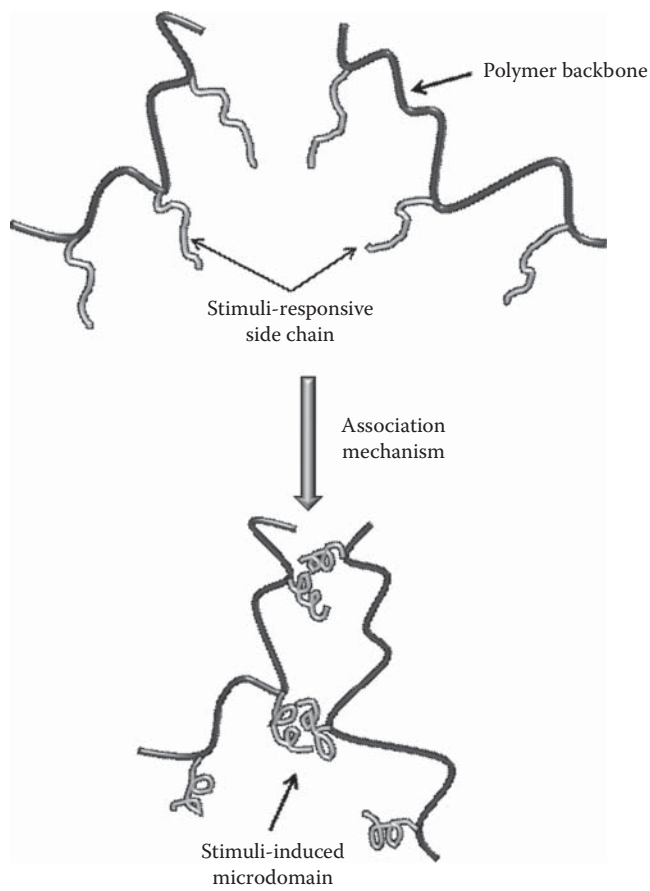


FIGURE 10.3 Schematic view of the stimuli-responsive association of smart polymer chain fragments in aqueous solution.

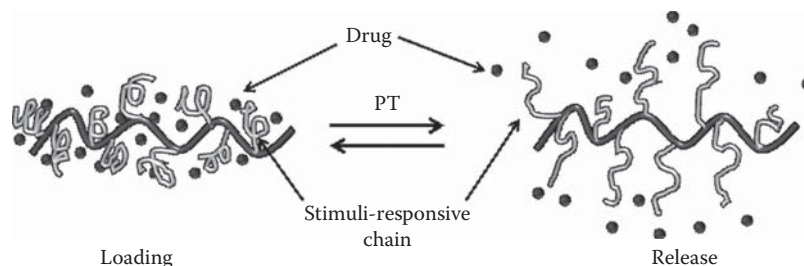


FIGURE 10.4 Illustration of stimuli-responsive behavior applied in the controlled drug delivery systems.

perform a specific function); devices that can attract/repel specific cells of the body for prevention of inflammatory responses and induction of healing; or materials that work as artificial muscles or membranes to replace damaged tissues (Bucio et al. 2010). Different studies are focusing on polymers modified by grafting the appropriate monomers or polymers for controlled release of drugs. In this case, a suitable drug is loaded on the polymer surface (or in polymer bulk) which when comes into contact with the body, the polymer swells and it releases the drug to the external environment and thus improves the required dose (Figure 10.4).

10.2.1.1 Thermosensitive Polymers

Most molecules are more soluble when heated, but some water-soluble polymers separate from solution upon heating. This property is characteristic of polymers which dissolve when cooled and phase separate when heated above the PT temperature, known as a lower critical solution temperature (LCST). The temperature-sensitive polymers are made of one hydrophobic and one hydrophilic group, such as poly(*N*-isopropylacrylamide) (poly(NIPAAm) or PNIPAAm) which exhibits a LCST between 30°C and 35°C in water (Hoffman et al. 2000). PNIPAAm is the most studied synthetic responsive polymer and its characteristics make it especially useful in biomedical applications, such as in the controlled release of drugs and in tissue engineering (Bromberg and Ron 1998; Zhang et al. 2004; Xu et al. 2007). The thermoresponsive properties of PNIPAAm are presented in the excellent reviews by Schild (1992), Pelton (2000), and Gil and Hudson (2004). Other examples of thermosensitive polymers are poly(ethylene glycol) (PEG), ethyl (hydroxyethyl) cellulose (EHC) or polymer chains with *N*-substituted acrylamides groups (Saeki et al. 1976; Yoo et al. 2000). Other polymers exhibit the opposite effect to PNIPAAm, with phase separation on cooling temperature. This PT temperature is called upper critical solution temperature (UCST) which has been observed by Percot et al. (2000) in polystyrene (Ps)/ poly(methyl methacrylate) (PMMAc) mixtures, and by Yang (Ougizawa and Walsh 1993) in Ps/poly(Ps-co-acrylonitrile [AN]) blends.

Thermosensitive polymers have been successfully evaluated for platelet adhesion (Yamato et al. 2002). The platelet behavior depends on the temperature at which the grafted surfaces are exposed. Below the LCST in PNIPAAm grafted surface (32°C), the platelets display a round shape and oscillating vibratory micro-Brownian motion when they are about polymer surface. This behavior is similar to the PEG-grafted surfaces where platelet activation is inhibited. It is usual to find that above the LCST, surfaces facilitate the cell adhesion (Tamada and Ikada 1994; Okano et al. 1995; Kikuchi and Okano 2005). The grafted PNIPAAm thickness-dependency on cell adhesion property was also investigated in detail using PNIPAAm grafted on glass coverslips with different thicknesses and amounts of the grafted PIPAAm (Fukumori et al. 2009). The thickness and amount of the grafted polymer, as well as the surface wettability, increased with the initial monomer concentration, and cells adhered and spread on the surface at 37°C, but detached at 20°C. In contrast, the polymer density and thickness increased when the monomer concentration was high (35 wt%), and the surfaces were cell repellent even at 37°C. Other works associated with thermosensitive polymers (including PNIPAAm) grafted onto polymeric matrices by γ -irradiation for biomedical applications, will be discussed later in more detail.

10.2.1.2 pH-Sensitive Polymers

Chains of pH-sensitive polymers usually have ionizable groups, such as carboxylic acid and basic aminoalkyl moieties. When these groups become ionized, a substantial osmotic swelling pressure is generated inside a polymer, causing the swelling degree to increase or an alteration of the hydrodynamic volume of the polymer chains (Siegel 1993; Gil and Hudson 2004; Dimitrov et al. 2007). This swelling is almost always higher in cross-linked structures as hydrogels. The pH-induced phase transition of pH-sensitive polymer (called critical pH) tends to be quite sharp and usually switches within short ranges of pH. Copolymers of methyl methacrylate (MMAc) and methacrylic acid (MAAc) undergo sharp conformational transition and collapse at low pH around 5, while copolymers of MMAc with *N,N*-dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEMA) are soluble at low pH but collapse and aggregate under slightly alkaline conditions (Kumar et al. 2007). DMAEMA is one of only a few polymers with dual properties; it exhibits a LCST in the range of 38°C–40°C and critical pH at 5.4 (Burillo et al. 2007).

Fast responsive systems can also be used in the development of tumor-targeted drug delivery systems. The extracellular pH of solid tumors is known to be on average 0.2 pH units lower than the pH of surrounding tissues (Stubbs et al. 1999; Lee et al. 2003). For these pH-sensitive systems, the response to changes in stimulus must be fast. Using γ -irradiation or other techniques, the fast responsive property of a polymer can be combined with repetitive function of a different polymer to make the best combination for developing clinically effective controlled drug delivery systems. Most grafting reactions at the surface or in the bulk polymeric matrix are supported by this concept. Acrylic acid (AAc) is one of the most popular monomers that have been grafted onto different polymeric matrices to make materials with pH sensitive response. This way the carboxyl groups offer sites for the coupling with amino groups terminated poly(ethylene oxide) (PEO) where they, by carbodiimide activation method, are directly used for the interaction with heparin. In general, the carboxylic group has the capability to undergo further chemical reaction to produce new functional groups (Rogel-Hernández et al. 2003).

10.2.1.3 Hydrogels

Hydrogels are three-dimensional networks of cross-linked hydrophilic polymers swollen in water or biological fluids, without dissolving under physiological conditions (Chen and Hoffman 1995; Yoshida et al. 1995; Holtz and Asher 1997). They were the first biomaterials designed for use in the human body. Traditional methods of biomaterial synthesis include cross-linking copolymerization, cross-linking of reactive polymer precursors, and cross-linking via polymer–polymer reaction (Borzacchiello and Ambrosio 2009). The cross-linking can be induced by radiation or chemical reaction. In the first case, the radiation reactions include electron beams, γ -rays, x-rays, or UV light (Ikada et al. 1977; Kaetsu 1993). In the second case, the cross-linking reaction can occur by the addition of cross-linker agents, which are low molecular weight species capable of binding two polymer chains through its di- or multifunctional groups (Andrade 1976; Peppas 1987). A chemical cross-linker agent commonly used is *N,N'*-methylenebisacrylamide (MBAAm). The reaction can also occur between the monomers and a multifunctional monomer (cross-linker agent) that is present in small quantities. It is very common to have a combination of the two aforementioned cases (Figure 10.5).

A polymer often applied, also as a hydrogel, in medicine and pharmacy is poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) (Peppas and Klier 1991). Charlesby and Alexander (1955) first reported on the cross-linking of PVP and other polymers by irradiation. Nagaoka et al. (1993) applied γ -irradiation to induce polymerization and cross-linking for the synthesis of PNIPAAm hydrogels, using radiation doses between 20 and 200 kGy. He found gels with insufficient mechanical strength at doses less than 20 kGy and maximum temperature sensitivity at 20 kGy. Ortega et al. (2007) studied and compared the properties of PNIPAAm gel prepared by three different methods, using γ -irradiation in each one of them. The gels were prepared by irradiation aqueous solution of NIPAAm in presence and absence of cross-linking agent (MBAAm) and by compacting NIPAAm at different pressures prior to irradiation. They found that (1) polymerization and cross-linking of PNIPAAm hydrogels

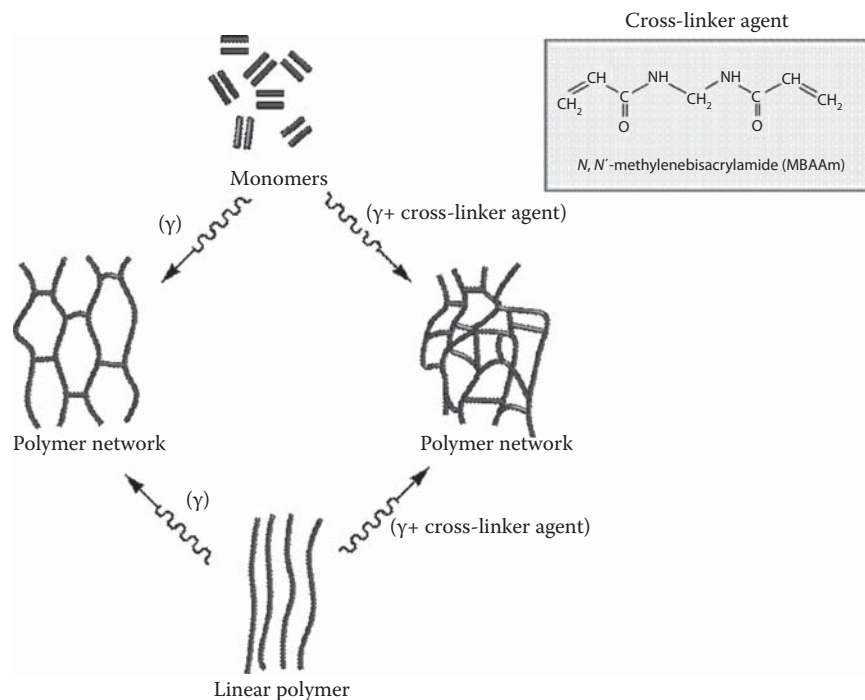


FIGURE 10.5 Routes for cross-linking by γ -irradiation with or without cross-linker agent.

by different methods, results in gels with different microstructures; (2) addition of the MBAAM did not change any properties considerably, only on the dose of incipient gel 0.73 and 0.18 kGy, without and with cross-linking agent, respectively; and (3) the irradiation of NIPAAm in solid state produce hydrogels with lower cross-linking percentages and weak mechanical properties. Jabbari and Nozari (2000) investigated the swelling behavior of PAAc hydrogel synthesized by γ -irradiation cross-linking of uncross-linked PAAc in aqueous solution. Uncross-linked PAAc was prepared by precipitation polymerization of AAc in benzene. They found that the equilibrium swelling decreased significantly when the irradiation dose was increased from 5 to 25 kGy. One of the major applications of PAAc gels is in sustained gastro-intestinal drug delivery systems (Gurny and Junginger 1990; Lenaert and Gurny 1990).

It is well known that the presence of an initiator and a cross-linker agent affects the phase behavior of hydrophilic polymers in solution, the macromolecular structure and also contributes to the inhomogeneity of the network structure (Hoffman 1977). More homogeneous network structures can be synthesized, if cross-linking is accomplished with γ -irradiation in the absence of an initiator and a cross-linking agent. The structural homogeneity of the network affects the swelling behavior and mechanical properties of the hydrogels.

Potential applications of all the types of hydrogels include: synthetic extracellular matrix, tissue engineering, implantable devices, drug delivery systems, contact lenses, biosensors, separation systems, materials controlling reversible cell attachment, materials controlling the activity of enzymes, phospholipid bilayer destabilizing agents, wound dressings, and smart microfluidics (Peppas and Klier 1991; Bell and Peppas 1996; Peppas and Sahlin 1996). However, among the disadvantages of conventional hydrogels are: limited control in their detailed structures during synthesis, slow or delayed response times to external stimuli and poor mechanical properties. Enhanced biomechanical properties of hydrogels, comb-type grafted hydrogels with fast response times, blends in the form of interpenetrating networks and hydrogels grafted on polymer surfaces are just a few examples of biomaterials with a promising future.

10.2.1.4 Stimuli-Responsive Interpenetrating Polymer Networks

An interpenetrating polymer network (IPN) is formed when a second polymer network is polymerized within a pre-polymerized network (Sperling and Mishra 1997). IPN is basically a type of blend at which the final polymer retains the properties of each individual polymer, improving deficient characteristics or even achieving additional features. Sequential IPN is typically done by swelling a network of polymer I in monomer II, to make in situ an intermeshing network of polymer I and polymer II (Sperling 1981; Figure 10.6). In simultaneous interpenetrating network (SIN), the monomers and/or pre-polymers plus cross-linkers and activators of both networks are mixed, followed by simultaneous polymerizations via non-interfering reactions (an example involves chain and step polymerization kinetics) (Sperling and Mishra 1997; Figure 10.7). IPNs can be formed either in the presence of a cross-linker to produce a fully interpenetrating polymer network (full-IPN) or in the absence of a cross-linking mechanism to generate a network of embedded linear polymers entrapped within the original network (semi-IPN), as illustrated in Figure 10.8. The main advantages of IPNs are that polymer networks (or hydrogels) can be produced with better mechanical properties, more widely controllable physical properties, more efficient drug loading and release compared to conventional hydrogels, and drug loading can be performed simultaneously with the polymerization of the interpenetrating networks phase (Mohamadnia et al. 2007; Hoare and Kohane 2008). According to the elasticity (i.e., cross-linking density) of either or both gel phases, IPNs have ability to restrict the equilibrium swelling. For

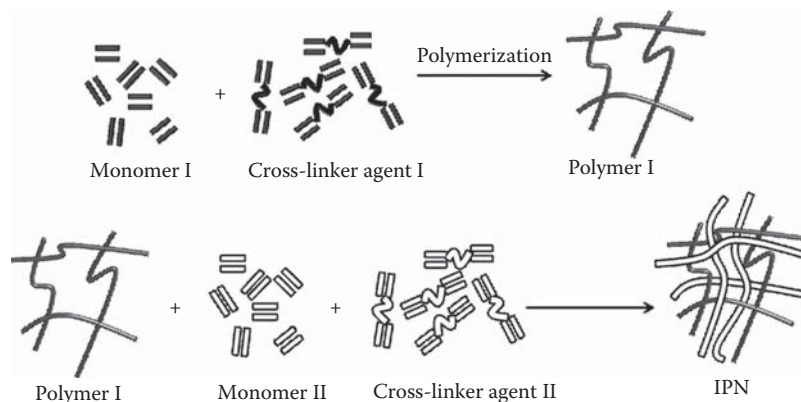


FIGURE 10.6 Preparation procedure of a sequential IPN.

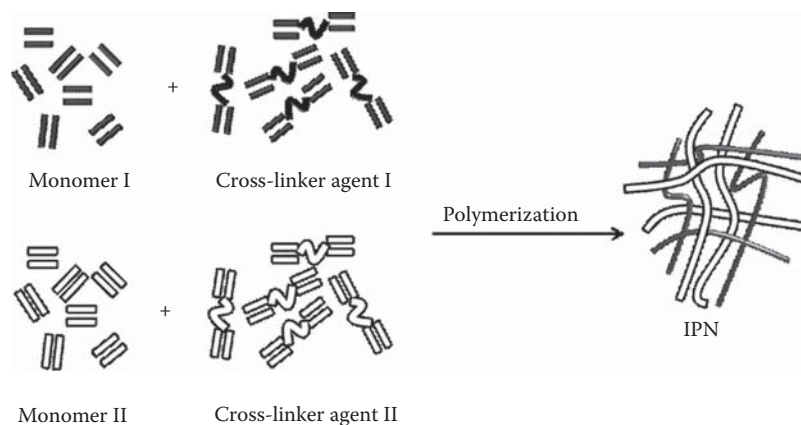


FIGURE 10.7 Preparation procedure of a simultaneous IPN.



FIGURE 10.8 Illustration of formation and structure of semi- and full IPN.

example, a highly cross-linked IPN of a pH-sensitive polymer network and a hydrolysable network restricts the rapid swelling response of a pH-swelling cross-linked polymer to facilitate linear swelling profiles following an abrupt pH change from pH 2.0 to 7.4 (Chivukula et al. 2006). This responsiveness is suitable for minimizing the rapid release of drugs in oral drug (protein/peptide) delivery systems. As another example, an IPN of chitosan-PNIPAAm significantly increased the loading capacity of diclofenac compared to a pure PNIPAAm hydrogel. This polymer retained the thermosensitivity of the PNIPAAm phase which regulated the release kinetics (Alvarez-Lorenzo et al. 2005). Chitosan has both reactive amino and hydroxyl groups that can be used to chemically alter its properties under mild reaction conditions (Kim et al. 2000). This natural polymer and its derivatives have become useful polysaccharides in the biomedical area because of their numerous and interesting biological properties such as biocompatibility, biodegradability, and nontoxic properties. Chitosan exhibits pH-responsive behavior as a weak polybase due to the large quantities of amino groups on its chain (Cerrai et al. 1996; Denuziere et al. 1996). Ramanathan and Block (2001) examined and characterized the use of chitosan gels as matrices for electrically modulated drug delivery.

Semi-IPNs can more effectively preserve rapid kinetic response rates to pH or temperature, due to the absence of a restricting interpenetrating elastic network. Full-IPNs and semi-IPNs can show multi-responsiveness and some of these systems have been designed to drug release as a function of temperature and pH (Mukae et al. 1990a,b; Fei et al. 2002; Kim et al. 2003; Zhang et al. 2004; de Moura et al. 2005). Despite the abundant information about IPNs, few papers report the use of ionizing radiation for preparing smart IPNs (Guilherme et al. 2006). As an example, temperature- and pH-sensitive Alginate-PNIPAAm semi-IPN and full-IPN hydrogels have been prepared with γ -irradiation (Lee et al. 2006). In this research, the semi-IPN hydrogels were prepared through the irradiation of a mixture composed of alginate and NIPAAm monomer to simultaneously achieve the polymerization and cross-linking of NIPAAm, while full-IPN hydrogels were formed by the immersion of the semi-IPNs in calcium-ion solution (Figure 10.9). All the materials exhibited a change in the swelling ratio around 30°C–40°C, and full-IPN showed more sensitive and reversible behavior than semi-IPN under a stepwise stimulus. In a previous chapter, it was reported that alginate degrades by irradiation can accelerate growth of plants caused by the increase of biological activity (Nagasawa et al. 2000).

IPNs composed of PNIPAAm and poly(*N*-acryloxysuccinimide) (PNAS), were prepared by a sequential method (Ortega et al. 2008). PNIPAAm was polymerized and cross-linked by γ -irradiation and then was immersed in a solution of PNAS-polylysine (pLys). The LCST of PNIPAAm was not affected with the introduction of PNAS in the polymer, and the response to external changes of temperature was higher in IPN than PNAS networks. Currently in this field, these IPNs were grafted onto Polypropylene (PP) in three consecutive steps by García et al. (2012). In the first step, NIPAAm was grafted by γ -irradiation to give PP-*g*-PNIPAAm. The cross-linking of grafted side chains of PNIPAAm (*net*-PP-*g*-PNIPAAm) was then obtained with γ -irradiation. The secondary network was obtained in situ by chemical cross-linking between PNAS and pLys. The composition of IPN systems was confirmed by Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy and evaluated by elemental

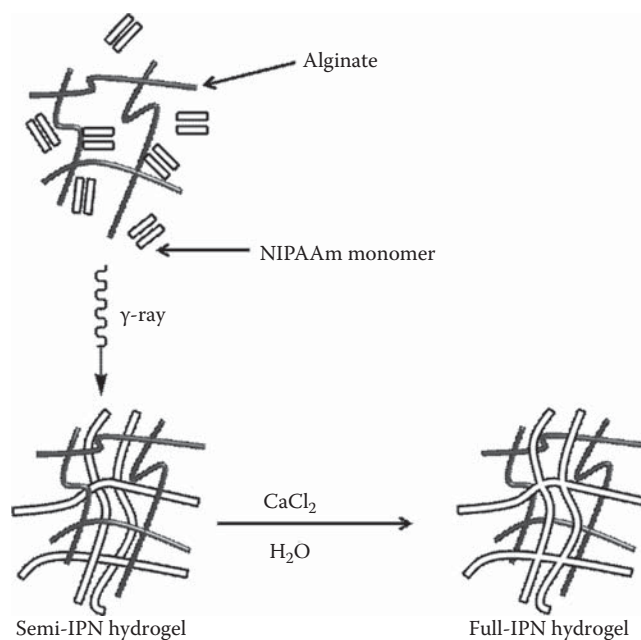


FIGURE 10.9 Schematic structures for preparing semi- and full-IPN hydrogels with alginate and PNIPAAm.

analysis. These systems could be employed to immobilize liposomes through amino groups. The immobilization is reversible due to the thermosensitivity of PNIPAAm.

Temperature- and pH-sensitive IPNs of PNIPAAm and PAAc were prepared in two consecutive steps (Burillo et al. 2007). Hydrogels of AAc were synthesized by either one of the following methods: γ -irradiation (from a Co^{60} γ -source) and an electron beam (from a Van de Graaff accelerator). A second hydrogel of NIPAAm was synthesized within the first PAAc network by polymerization and cross-linking with a chemical initiator and a cross-linking agent (MBAAm). Highest cross-linking yields were found in IPNs synthesized by γ -irradiation compared to systems synthesized via electron beams. The swelling percentage decreases with an increase in radiation dose, due to an increase of cross-linking density.

10.2.2 GRAFT COPOLYMERS

Graft copolymerization is very important from a technological point of view, as it increases the possibility of preparing polymers with properties that cannot be obtained with homopolymers. These reactions can be achieved by ionizing radiation, UV light, or with chemical initiators (Fujimoto et al. 1993; Kostov and Atanassov 1993; Chaplin et al. 1996). Different modification methods are presented in Table 10.2. Many biocompatible materials have been modified by different methods involving these routes, especially those using ionizing radiation such as γ -irradiation (Hoffman et al. 1972; Ratner and Hoffman 1974; Kabanov et al. 1997). Radiation-induced graft polymerization being both economical and environmentally clean technique, is a convenient method for the modification of physical and chemical properties of polymeric materials (Satoshi et al. 1995; Nasef and Saidi 2004; Seko et al. 2005).

The graft modifications by γ -irradiation, electron beams, or plasma are some of such methods that provide covalent modification of materials with the creation of interesting architecture. These three methods provide materials with high level of purity; they are surface-selective or may lead to the bulk modification of the matrix, although γ -rays are preferred for their high

TABLE 10.2
Chemical and Physical Surface or Bulk
Modification Methods

Biological modification (biomolecule immobilization)
Chemical reaction or functional group modifications (e.g., acetylation, chlorination, oxidation, reduction, ozonization + grafting)
Chemical vapor deposition
Conversion coatings (phosphating, anodization)
Corona discharge (in air)
Gas phase deposition
Ion beam etching (e.g., argon, xenon)
Ion beam implantation (e.g., nitrogen)
Ion beam sputtering
Ion exchange
Non-specific oxidation (e.g., ozone)
Photografting (UV and visible sources)
Plasma etching (e.g., nitrogen, argon, oxygen, water vapor)
Plasma (gas discharge) (RF, microwave, acoustic)
Radiation grafting (electron beam and γ -irradiation)
Silanization

penetrability. The major advantages of using γ -irradiation for grafting process are that it can be carried out at any temperature, in solid, gaseous, or liquid state (Chapiro 1962). In many cases, the γ -radiation leads to a much higher grafting as compared with the electron beam irradiation or other methods (Gupta and Chapiro 1989). In this chapter the discussion will be confined to γ -irradiation-induced polymerization or graft modification of polymers to produce materials with specific or pre-designed surfaces and bulk structures.

The synthesis of graft copolymers by γ -irradiation started many years ago with Magat and Chapiro (Chapiro et al. 1956). Now these methods are utilized to correlate the properties of a material in contact with blood, any tissues, or a particular physiological condition, since the common polymers generally do not possess proper surfaces as required for biomedical applications. A functional biomaterial would need its proper surface chemistry with excellent retention of bulk characteristics (Ikada 1994; Kamath and Park 1994; Bures et al. 2001). Then, as an example, if the polymer has hydrophobic character, the grafting of a polar monomer would lead to interaction between the material and water, thereby increasing its biocompatibility. The radiation grafting of water-soluble monomers such as PAAc, polyacrylamide (PAAm), poly *N,N*-dimethylacrylamide (PNDAAm) and PVP have been used for modification of an ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) (Kabanov 1989). Functionalization of matrices such as PP, polyethylene (PE), polytetrafluoroethylene (PTFE) and polycarbonates with PDMAEMA was studied by Burillo (Bucio and Burillo 1997; Burillo et al. 1997, 2006; Bucio et al. 1998). PDMAEMA has been investigated extensively because it is rich in tertiary amino groups which can be converted to positively charge quaternary ammonium groups with antibacterial properties. PDMAEMA grafted onto polymer matrices are considered to be a promising antibacterial agent with broad antimicrobial properties in biomedical applications (Nohr and Macdonald 1994; Rawlinson et al. 2010).

Production of non-fouling polymer surfaces has been achieved by radiation-induced grafting of poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (PEGMEM) and poly(ethylene glycol) methacrylate (PEGMA) with 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) onto silastic films (Sun et al. 1986).

The grafting of monomers such as acrylamide (AAm) and HEMA are widely used to introduce antithrombogenic properties (Gupta et al. 1990; Singh and Ray 1994).

10.2.2.1 Methods of Radiation-Induced Grafting

The graft polymerization involves a process where an active chemical site is created in the polymer matrix, which may initiate the polymerization of a monomer leading to the formation of a copolymer structure. A wide range of γ -irradiations sources are available for use in the grafting process (Heger 1990). The most versatile γ -irradiation source is emitted from the artificial radioactive isotope ^{60}Co which has a long half-life of 5.3 years and emits radiation of 1.17 and 1.33 MeV (mean value of 1.25 MeV). ^{137}Cs sources (0.66 MeV) are used less frequently. This type of radiation can be used for grafting reactions, cross-linking, and sterilization of food, cosmetics and biomedical devices.

There are three distinct ways for the graft polymerization of a monomer onto a polymer surface or into matrix, i.e., direct irradiation, pre-irradiation method, and pre-irradiation in air (Chapiro 1962). These three methods have been carried out to develop membranes by the grafting of acrylic and vinyl monomers into PE films and hollow fibers (Ostler and Rogers 1974; Shkolnik and Behar 1982; Fang et al. 1989; Hegazy et al. 1990, 1999; Mori et al. 1991; Konishi et al. 1992; Tsuneda et al. 1992; Lee et al. 1993; Shing et al. 1994; Kim et al. 1996; Kostov and Turmanova 1997; Kondo et al. 1998; Kim and Saito 1999; Gupta and Anjum 2000a,b; Sanchez-Valdes et al. 2001; Gupta et al. 2004). Membranes have an important role in various applications involving the industrial sector, human health care, and the management of the environment.

AQ3

10.2.2.1.1 Direct Method

The polymer is irradiated in the presence of a monomer under inert atmosphere. The monomer may be at gas, vapor, liquid, or in a solution. Irradiation produces free radicals in the polymer backbone, which are generated during irradiation (Figure 10.10). The grafting is initiated leading to the formation of the branched structure. A low-density polyethylene (LDPE) was grafted with

AQ4

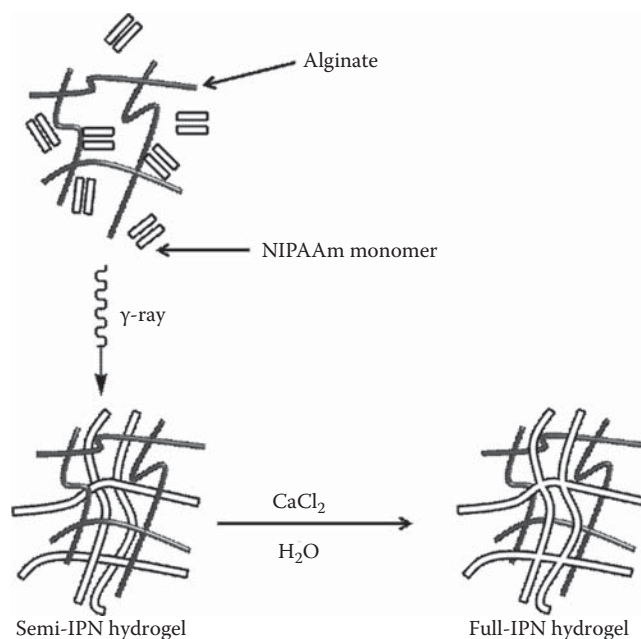


FIGURE 10.10 Grafting by γ -irradiation applying a direct method.

TABLE 10.3
Summary of the Common Polymers Schemes Which
are Susceptible to Either Cross-Linking or Chain
Scission When Subject to γ -Irradiation

Tendency to Cross-Linking	Tendency to Chain Scission
Polyacrylates	Cellulose and derivatives
Polyamides	DNA
Polyesters	Polyacrylonitrile (PAN)
Polyethylene (PE)	Polyisobutylene (PIB)
Polypropylene (PP)	Poly(methyl methacrylate) (PMMAc)
Polystyrene (Ps)	Polytetrafluorethylene (PFTE)
Poly(vinyl chloride) (PVC)	Poly(vinyl fluoride) (PVF)
Unsaturated elastomers	Poly(vinylidene fluoride) PVDF

PAAm by a direct method at room temperature and in argon (Kabanov et al. 1997). This system was used for loading Piyavit, a pharmacological preparation used as an oral antithrombotic drug for clinical use, contains medicinal leech saliva as the main source of biologically active substances that inhibit platelet-vascular and plasmic hemostasis and provide thrombolysis (Baskova et al. 1995, 1997).

In the direct method, the effect of ionizing radiation is nonselective, leading also to the formation of radicals on the monomers. As a result, the extent of homopolymerization is always high in this method. Homopolymer formation can be reduced or prevented using a free radical inhibitor of the monomer such as Fe^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} , or by carrying out the reaction at low temperature, when the activation energy for homopolymerization is higher than for the grafting reaction (Burillo and Bucio 2008). NIPAAm monomer was grafted on and in poly(vinylidene fluoride) (PVDF) micro-pore membrane by γ -irradiation, using CuSO_4 as inhibitors to homopolymerizations (Liu et al. 2007). The addition of Cu^{2+} inhibited the homopolymerization reaction and promoted the grafting. At sufficient high inhibitor concentrations, the degree of grafting would not be promoted by further increase of inhibitor concentration and the final grafting degree is dependent mainly on the total active sites. The use of inhibitory agents also applies to other methods of radiation grafting in which homopolymerizations are also presented.

The nature of the polymer structure determines its modifications (chain scission or cross-linking) upon exposure to ionizing radiation. When polymer has a tendency to cross-linking, a grafted polymer is formed (Chapiro 1962; Burillo and Bucio 2008). Block copolymer can be formed if the polymer has a tendency to chain scission. Table 10.3 provides a summary of the general polymer schemes that are susceptible to either cross-linking or scission. The presence of quaternary carbon atoms in the polymer chains enhances the scission while polymers lacking this feature and with unsaturation in the polymer undergo cross-linking.

10.2.2.1.2 Pre-Irradiation Method

This method involves the activation of polymer matrix prior to the grafting reaction. The irradiation is carried out in the absence of air (in vacuo or under an inert atmosphere). As a result, macroradicals are trapped along the polymer chains and they can initiate the grafting reaction after contact with monomer molecules. The disadvantages of this method are that the macroradical may either combine with another macroradical from the adjacent chain leading to the cross-linking or undergo chain scission, resulting in degradation of the polymer matrix. At highly crystalline polymers (as a high-density PE [HDPE]) cross-linking dominates, while for highly amorphous polymers (as a LDPE) the concentration of trapped macroradicals is lower. As a result, significantly low graft levels

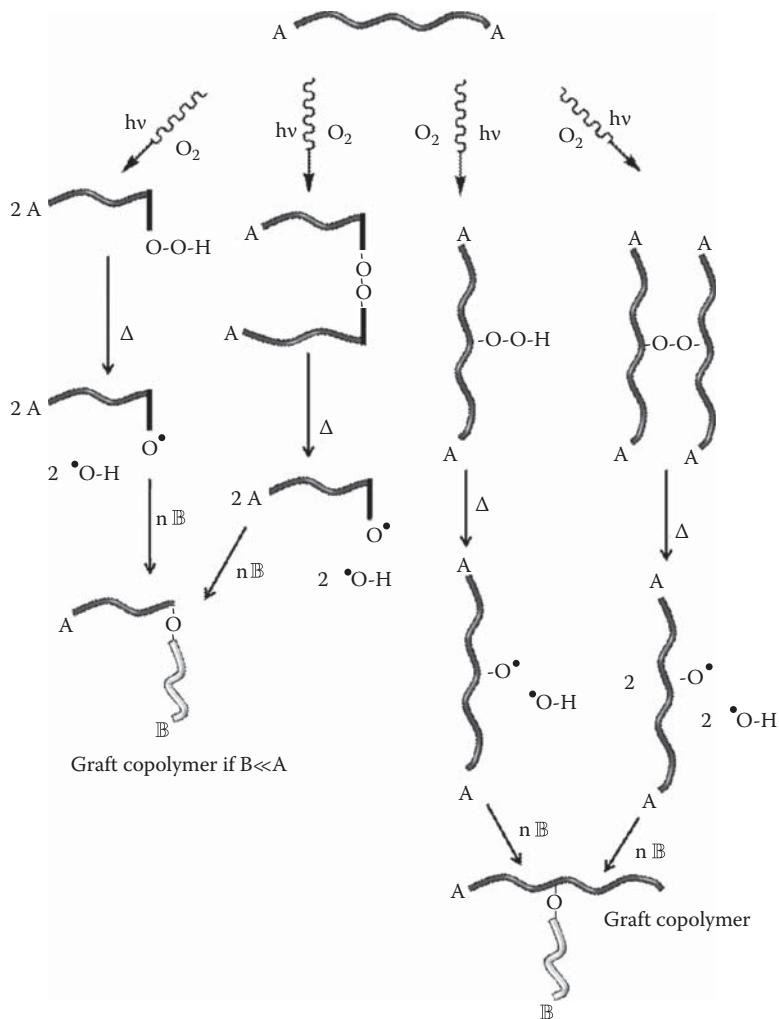


FIGURE 10.11 Grafting by γ -irradiation applying a pre-irradiation method.

are obtained for conventional polymers using this method and yield of grafting is low than in the direct method (Chapiro 1962; Wirsén and Albertsson 1995).

10.2.2.1.3 Pre-Irradiation Oxidative Method

The pre-irradiation in the presence of air or oxygen leads to the formation of peroxides (POOP) and/or hydroperoxides (POOH), which are used to initiate the grafting reaction when the irradiated polymer is heated in the presence of monomer in the absence of air (Figure 10.11). The peroxides decompose at an elevated temperature to give the macroradicals, $P-O\cdot$, that are the active points for graft polymerization. One of the advantages of this method is that the reaction can be stopped at any time and implementation of the process is simple. Some disadvantages are: the high formation of homopolymer, and that this method requires a higher dose of radiation as compared to the direct method.

The irradiation grafting of AAc onto polycarbonates by the pre-irradiation method was studied by Aliev et al. (2000). The optimal values of dose, temperature, and monomer concentration on grafting were 150 kGy, 80°C, and 50% wt, respectively. Sadurni et al. (2005) studied the radiation grafting of AAc onto PTFE films by the pre-irradiation oxidative method in aqueous solution and

their immobilization of streptavidin-horseradish peroxidase. Grafting AAc onto PE surface shows a less thrombogenic nature in terms of platelet adhesion and platelet spreading than the untreated polymer surface (Ko and Cooper 1993). Generally, when a sufficient amount of carboxyl groups is attached at the surface, these groups may be used for the reaction with heparin and insulin. Pre-irradiation grafting of AAc onto different polymer matrices (PE, PP, poly(tetrafluoroethylene-perfluorovinyl ether) copolymer P(TFE-PFVE), silicone rubber, poly(ethylene-tetrafluoroethylene) copolymer P(ET-TFE), and fluorinated ethylene propylene copolymer [FEP]) has been investigated extensively for many years and some graft copolymers containing this monomer have practical applications (Guimon 1979; Ishigaki et al. 1982; Ellinghorst et al. 1983; Hegazy et al. 1984; Gupta and Chapiro 1989; Gargan et al. 1990; Woods and Pikaev 1994; Yang and Hsiue 1996; Zouahri and Elmidaoui 1996; Phadnis et al. 2005). Some studies have focused on the influence of inhibitors to homopolymerization on the grafting reactions. Gupta et al. (2008) prepared ion exchange membranes by pre-irradiation grafting of AAc on Teflon-*FEP*, using divinylbenzene (DVB), tetraethyleneglycol dimethacrylate (TEGDMA), and MBAAm as cross-linker agents, and the influence of the ferrous sulfate (FeSO_4) on the degree of grafting was also investigated. The presence of TEGDMA and MBAAm leads to higher graft level as compared to the DVB cross-linked as well as noncross-linked structure, and at higher FeSO_4 concentration, the degree of grafting decreased significantly. The pre-irradiation method offers many alternatives for modifying polymers, and experimental conditions as the irradiation dose, dose rate, monomer concentration, the use of inhibitors to homopolymerization, temperature, reaction time, etc., should be studied for each system.

10.2.2.2 Graft Copolymer by One- and Two-Step Method

Graft copolymers can be obtained in one or two steps applying the pre-irradiation or direct method. Random copolymer branches are obtained when the grafting is carried out in one step using two monomers (Figure 10.12a). For the two-step method, branches containing only one kind of monomers are formed (Figure 10.12b).

10.3 GRAFTING APPROACHES

The surface of the biomaterial comes in contact with the living tissues, thus the initial response of the body toward a biomaterial depends on its characteristics. Hence, proper designing and/or modification of the surface is of considerable importance for enhanced compatibility of the biomaterial. In the tissue compatibility case, two types of reactions can occur: inflammation and immunogenicity, but in the blood compatibility the fastest reaction is often thrombogenicity (Pendyala et al. 2009). The inevitable inflammation in tissue compatibility occurs around the implanted material, and its function is to allow elimination of dead cell debris and further tissue repair. A material of optimal biocompatibility should not increase the intensity and duration to the basic response, nor prevent the tissue repair (Laurencin and Elgendy 1994).

The interactions between blood and a polymer surface depend on various parameters determined by the structure (e.g., crystallinity, molecular conformation, roughness, rigidity, and degradation), composition (e.g., chemical group associated with the hydrophilic/hydrophobic balance, type of electrical charge, ionizable groups, and micro-domains), and dimensions (e.g., surface area and size) of the material (Tang and Eaton 1995; Babensee et al. 1998; Rihova 2000; Sieminski and Gooch 2000; Anderson et al. 2008). These reactions are generally different for each material, but at the design and synthesis of a polymer for biomedical use, these parameters must be taken into account.

PE, PP, and Ps are some of the most popular polymers in the industrial manufacturing. These materials exhibit high transparency, good mechanical properties, low cost and chemical inertness over others polymers, but cells cannot grow on such a hydrophobic surface. Then, these surfaces can be treated to increase hydrophilicity and make normal cell growth possible. However, as soon as a medical device is inserted or implanted, a competition for colonizing its surface starts. In such race, proteins adsorb onto the material and host cell (platelets, endothelial cells, fibroblasts, and

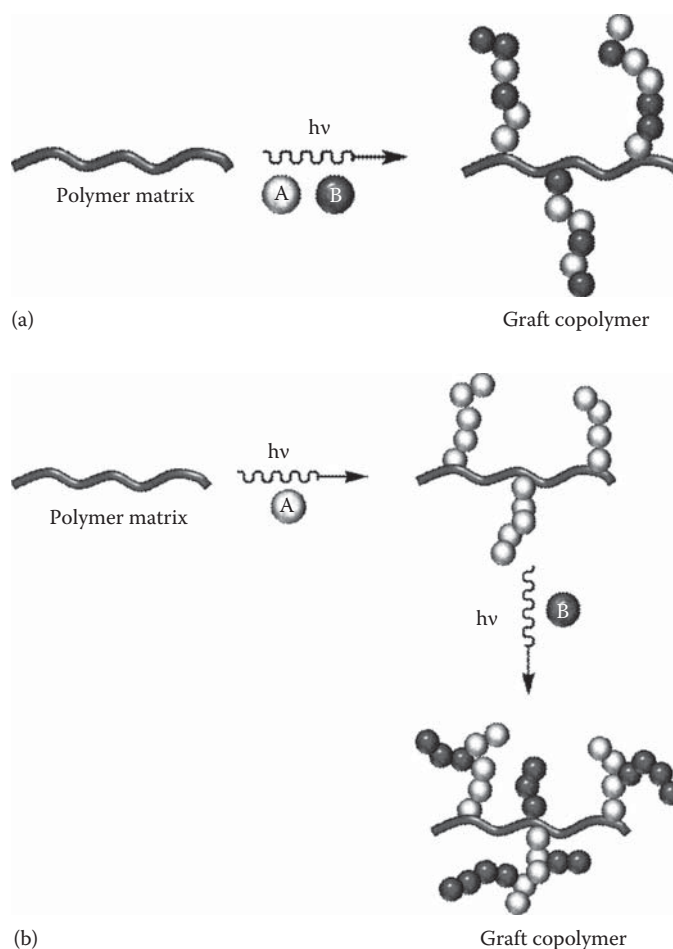


FIGURE 10.12 Grafting of copolymer onto a polymeric matrix using two monomers in: one step method (a) and two step method (b).

macrophages) and microorganism also participate and interact with the adsorbed protein. Winning cells hinder the adhesion of those that come behind (Dwyer 2008; Alvarez-Lorenzo et al. 2010). If the adhesion of macrophages and foreign-body occur predominantly, the bactericidal capability of these cells is reduced and their apoptosis is induced, which contributes to the persistence of infections caused by microorganisms (e.g., bacteria) that remain on the medical device (even after sterilization) and/or come from contact with the skin or mucosa of the patient at the moment of insertion (nosocomial infections) (Donlan and Costerton 2002). Bacteria may colonize in the form of biofilms if the inocula exceed threshold levels or if the host defenses are impaired (Snorraddottir et al. 2009). The nature of biofilm structure and the physiological attributes of biofilm organisms confer an inherent resistance to antimicrobial agents, whether these antimicrobial agents are antibiotics, disinfectants, or germicides (Donlan and Costerton 2002). This implies that if host defense mechanisms and systemic antibacterial chemotherapy are not able to stop infection, the removal or replacement of the device may be required, which raises costs (Schierholz and Beuth 2001; Raad and Hanna 2002). Since one of the mechanisms responsible for resistance is linked to the delayed penetration of the antimicrobial agent through the biofilm matrix, and that the susceptibility of various materials to bacterial adhesion and biofilm formation is high, especially in hydrophobic matrices; commercial polymers used for prostheses, meshes, sutures or catheters, such as PE, PP, Ps, PTFE, and polyethylene terephthalate (PET), can be functionalized by γ -irradiation for controlling

affinity for bioactive compounds or to include antiseptics, antibiotics, or anti-inflammatory agents into the material of the device, with the aim of achieving sustained delivery of sufficient amounts of drug (Ruiz et al. 2007). PP and PE endowed with temperature and pH-responsive swelling by grafting sensitive components have been developed recently for improving vancomycin loading and release behavior (Williams et al. 1997; Burillo et al. 2007; Ruiz et al. 2008). Vancomycin is one of the most frequently chosen antibiotics for the treatment of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) infections associated with the use of catheters (Moad 1999). PP has also been widely studied for functionalizing with various organic groups including maleic anhydride, acrylic, methacrylic, and vinyl species (Huang and Liu 1998; Bettini and Agnelli 1999; Passaglia et al. 2003; Contreras-García et al. 2011).

All the techniques discussed and works cited afore are focused in the production of materials with desired properties depending on the chemical nature of the polymer, using γ -irradiation for its synthesis. In this work we describe some specific work on the synthesis of graft copolymers with potential biomedical use. Much of the progress in adapting polymer materials for use in a biological environment has been obtained through irradiation techniques.

10.3.1 PP-G-(PNIPAA_M-*r*-APMA)

Random (*r-r*) copolymers branches of NIPAAm and *N*-(3-aminopropyl) methacrylamide hydrochloride (APMA) were grafted on PP films by means of a one step pre-irradiation method, with the aim of developing medical devices able to load non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), such as diclofenac and ibuprofen, and to control their release under physiological conditions (Contreras-García et al. 2010). PP films were exposed to a ⁶⁰Co γ -source 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 for grafting process. The pre-irradiated films reacted at 80°C with aqueous solutions of 1 M NIPAAm and 0.5 or 1 M APMA to obtain PP-g-(NIPAAm-*r*-APMA). The grafting degree, the monomer composition, the swelling behavior, and the friction coefficient results are shown in Table 10.4. Grafting degree as a function of time at 80 kGy, and temperature responsiveness, are shown in Figure 10.13. The

TABLE 10.4
Pre-Irradiation Dose and Reaction Time Used to Synthesize the 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	0.31 (0.02)
PP-g-(1NIPAAm- <i>r</i> -0.5APMA)	80	4	10	108	0.27 (0.03)
PP-g-(1NIPAAm- <i>r</i> -0.5APMA)	80	8	14	121	0.19 (0.01)
PP-g-(1NIPAAm- <i>r</i> -0.5APMA)	80	12	29	245	0.27 (0.04)
PP-g-(1NIPAAm- <i>r</i> -1APMA)	80	16	13	240	0.25 (0.03)

Source: Data from Contreras-García, A. et al., *Acta Biomater.*, 7, 996, 2011; Xu, X.D. et al., *J. Biomed. Mater. Res. A.* 81, 418, 2007. With permission.

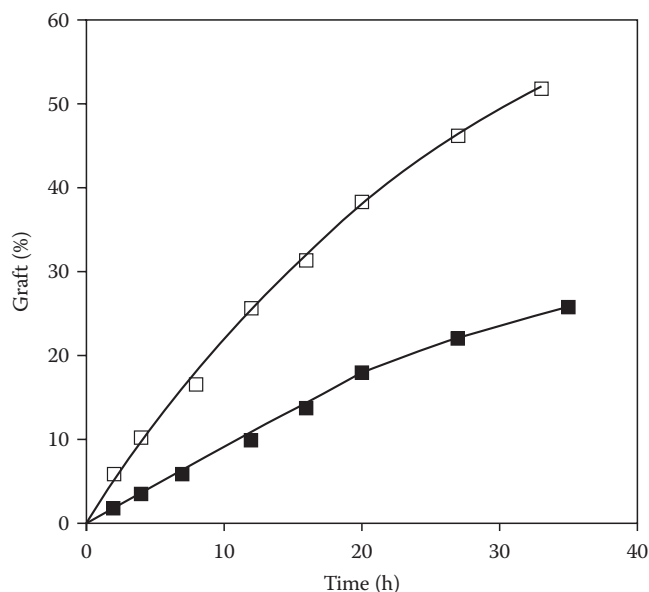


FIGURE 10.13 NIPAAm/APMA grafting onto PP films by pre-irradiated method (80 kGy dose) at 80°C for different times in 1 M NIPAAm:0.5 M APMA (□) and 1 M NIPAAm:1 M APMA (■) in aqueous solutions. (Reprinted from Contreras-García, A. et al., *Acta Biomater.*, 7, 996, 2011. With permission.)

grafting of APMA alone was not possible, probably due to ionic repulsion between the monomers (Rzaev et al. 2007).

PP-*g*-(NIPAAm-*r*-APMA) films showed a LCST at 36°C, which is due to PNIPAAm chains. These chains swell at room temperature, enabling fast loading of the drug, but shrink at body temperature, sustaining drug release (Srivastava et al. 1987). Additional studies on NIPAAm copolymers have demonstrated that the presence of charged units in the polymer chain tends to increase the LCST, whereas hydrophobic residues lower this value (Andrade-Vivero et al. 2007). The incorporation of APMA, a cationic monomer, increased the hydrophilicity and can interact with anionic drugs, driving uptake, as well as improving the hemocompatibility of the films (Bamford and Al-Lamee 1996; Singhal and Raya 2002; Yañez et al. 2010).

The elemental chemical composition of the grafted surfaces (the NIPAAm/APMA molar ratios in the grafts), determined by Fourier transform infrared attenuated total reflection spectroscopy (FTIR-ATR) and x-ray photoelectron spectroscopy (XPS), 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. SEM micrographs of surface and transverse views of PP, PP-*g*-NIPAAm, and PP-*g*-(NIPAAm-*r*-APMA) films with different grafting percentages are shown in Figure 10.14. A morphological investigation on the biomaterial surface shows that, at low graft level, the grafts are confined more to the surface leaving behind the bulk more or less intact.

PP-*g*-(NIPAAm-*r*-APMA) films showed 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 (Contreras-García et al. 2010). These systems were previously reported, and their efficiently loading of nalidixic acid for preventing *in vitro* growth of *Escherichia coli* was commented (Contreras-García et al. 2010b). These polymers are excellent candidates for use as implants and the local drug delivery systems.

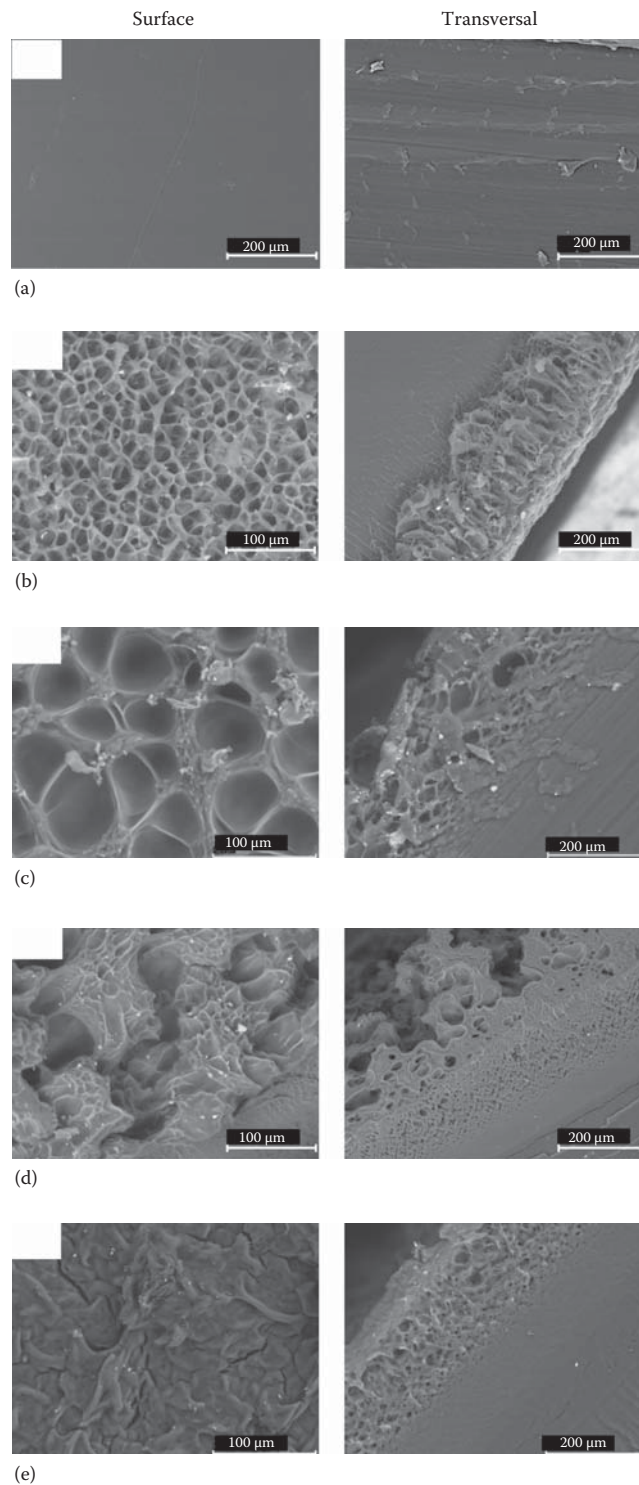


FIGURE 10.14 SEM images of PP (a); PP-g-NIPAAm, 28% grafting (b); PP-g-(1NIPAAm-g-0.5APMA), 14% grafting (c); PP-g-(1NIPAAm-g-0.5APMA); 29% grafting (d); and PP-g-(1NIPAAm-g-1APMA), 13% grafting (e). The magnifications for the surface and transverse views are 1000 \times and 500 \times , respectively. (Reprinted from Contreras-García, A. et al., *Acta Biomater.*, 7, 996, 2011. With permission.)

10.3.2 STIMULI-RESPONSIVE IPNs GRAFTED ONTO PP

Stimuli-responsive polymers can be grafted solely on the surface or can form part of interpenetrating networks (IPNs) with at least one network previously covalently attached to the polymer matrix. Functionalization with networks that are dually responsive (temperature- and pH sensitive) has been recently shown as a tool for improving the vancomycin loading and release in PP device. Sequential IPNs containing PAAc and PNIPAAm were grafted onto PP films in order to render *net-PP-g-PAAc-inter-net-PNIPAAm* (Ruiz et al. 2007; Figure 10.15). A ^{60}Co γ -source (doses of 30 kGy) was used for the synthesis of PP-g-PAAc by pre-irradiation method, and direct method was used to achieve cross-linking of grafted PAAc chains (*net-PP-g-PAAc*). Interpenetration of the second PNIPAAm network (*net-PNIPAAm*) into the first network (*net-PP-g-PAAc*) was carried out by redox polymerization. In this way, a maximum PNIPAAm content of 12% per weight of the whole IPN was obtained, leading to a low thermosensitivity in the polymer. Moreover, the analysis of the ability of monomers to interact with the drug was evaluated using isothermal titration calorimetry (ITC), a very sensitive technique which has been used to quantify weak interactions between drugs and cyclodextrins or monomers (Alvarez-Lorenzo et al. 2006; Rodriguez-Perez et al. 2006). AAc, its sodium salt NaAc, and NIPAAm were evaluated using ITC and its results showed that the interaction with NaAc was four times more energetic than with AAc, which reveals a preferential binding of the drug with the monomer when ionized. The interaction with PNIPAAm was much weaker and practically negligible (Ruiz et al. 2008). Therefore, a *net-PP-g-PNIPAAm-inter-net-PAAc* was also prepared, in order to achieve a greater PNIPAAm content with the help of γ -irradiation, while the second PAAc network was obtained by UV-triggered redox polymerization. The greater content in PNIPAAm was achieved by applying 30 kGy dose. Vancomycin-loaded *net-PP-g-PNIPAAm-inter-net-PAAc* was capable of inhibiting the formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms, despite the fact that the drug loading capability was limited. Then, the preparation of the IPN applying γ -irradiation in all steps using doses of 30, 40, and 2.5 kGy for the grafting/cross-linking of PNIPAAm, and polymerization of *net-PAAc*, respectively, rendered temperature- and pH-responsive surfaces with greater vancomycin loading and more sustained release (Muñoz-Muñoz et al. 2009). The first network was formed by γ -irradiation in the presence or absence of MBAAm. The *net-PP-g-PNIPAAm-inter-net-PAAc* was dually responsive (Figure 10.16).

AQ5

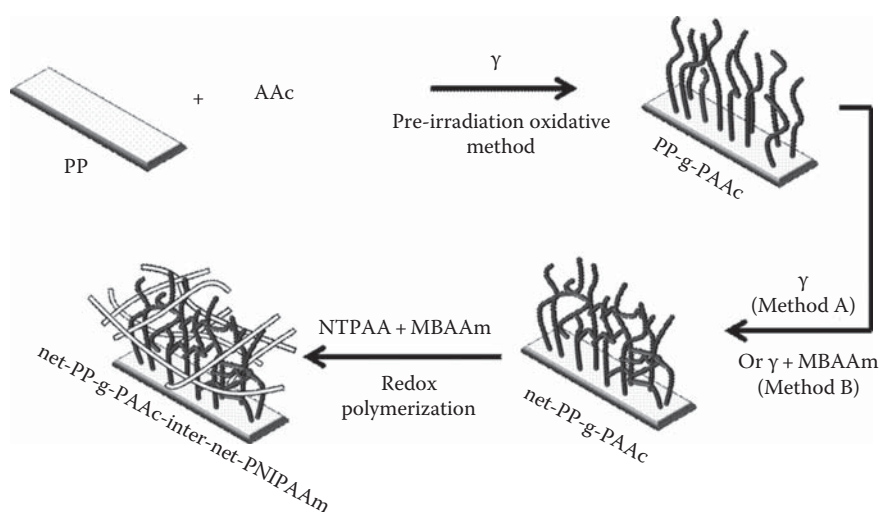


FIGURE 10.15 Schematic view of the polymerization steps followed to prepare *net-PP-g-PAAc-inter-net-PNIPAAm*.

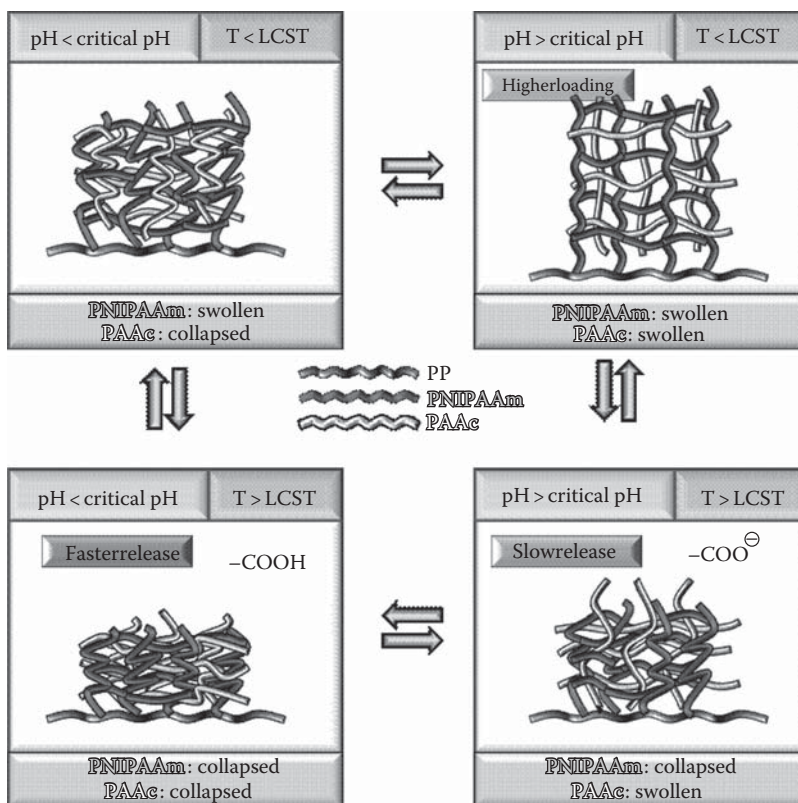


FIGURE 10.16 Scheme of temperature- and pH-sensitivity of an IPN of PAAc within cross-linked PP-g-PNIPAAm (IPN: *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc).

Surface-functionalized PP with cross-linked PNIPAAm leads to 1–2 mg vancomycin loaded per gram of polymer, mainly hosted in the aqueous phase of the network. When PAAc is on surface, the drug loading increases remarkably (ranging from 25 to 75 mg/g). It is important to note that the IPNs *net*-PP-g-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc films were previously swollen in pH 8.0 phosphate buffer to enable the ionization of the AAc groups. These IPNs showed a synergistic loading. At 20°C, below the LCST, the PNIPAAm network is completely swollen and forces the PAAc network to expand. This facilitates the loading by contact of the drug with the ionized PAAc groups and also enhances the volume of aqueous phase entrapped in the polymer matrix. Vancomycin release was sustained for 8 h in pH 7.4 phosphate buffer and it was faster in acid values of pH.

Recently, the effect of γ -irradiation on the cross-linking of PNIPAm was evaluated applying 10–100 kGy doses in the presence and absence of the chemical cross-linker MBAAm (Muñoz-Muñoz et al. 2012). The interpenetration of PAAc, the swelling degree, the amount of vancomycin loaded and its release rate can be regulated through the amount of PNIPAAm directly grafted on PP and the radiation dose used to cross-link the PNIPAAm chains (Figure 10.17). Thus, IPN with 145% of PNIPAAm and cross-linked with 10 kGy in absence of MBAAm, obtained applying only low γ -irradiation doses, is pointed out as one with great ability to host vancomycin and to sustain the vancomycin levels above the minimum required flux of vancomycin that must be delivered to the surface-near region of films to kill bacteria, also known as minimum killing release rate (Nkill) required at the local interface (Kwok et al. 1999). This information should be useful for optimizing conditions for the grafting/cross-linking of PNIPAAm/PAAc IPNs in order to obtain surface-modified responsive PP-based medical devices able to load/elute vancomycin.

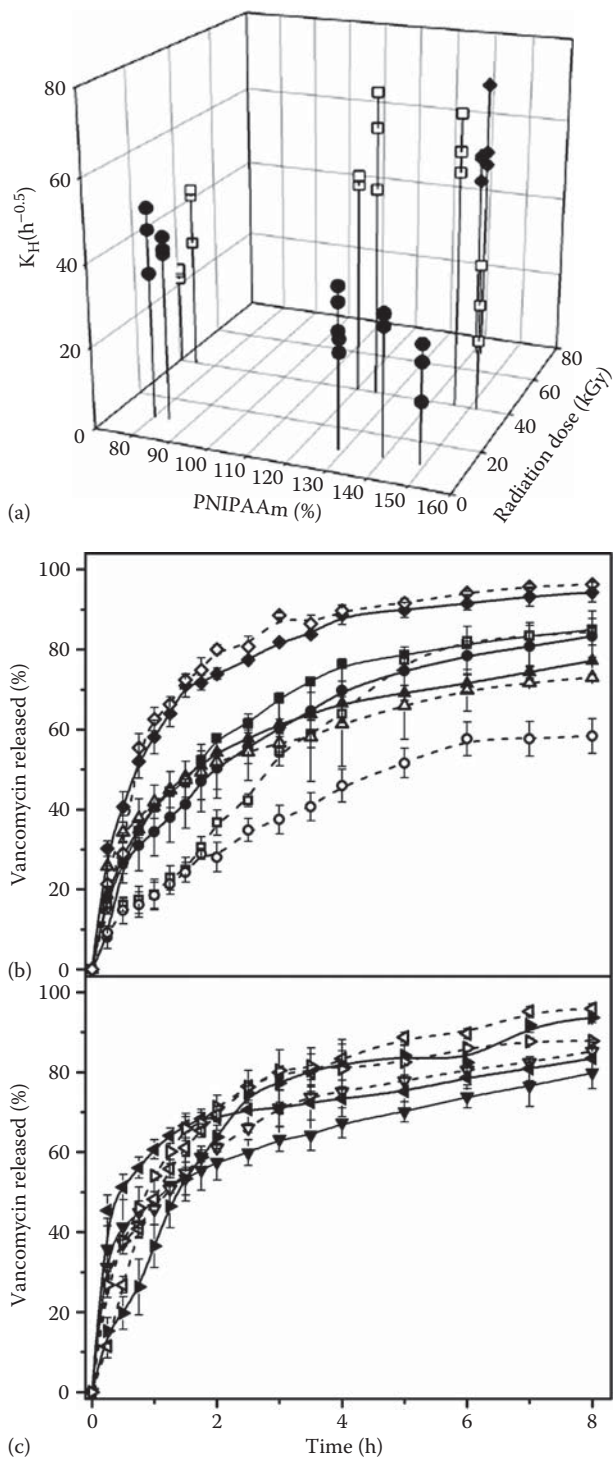


FIGURE 10.17 Dependence of vancomycin release rate constant from IPNs *net*-PP-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc on the amount of PNIPAAm grafted to PP (percentage referred to the weight of PP substrate) and the cross-linking dose (●, 10 kGy; □, 40 kGy; and ◆, 70 kGy) (a); and Vancomycin release profiles from the *net*-PP-*g*-PNIPAAm-*inter-net*-PAAc containing 80% or 125% PNIPAAm (b) and 145% PNIPAAm (c) in pH 7.4 phosphate buffer. (Reprinted from Muñoz-Muñoz, F. et al., *Radiat. Phys. Chem.*, 81, 531, 2012. With permission.)

10.4 CONCLUSION

Polymers have developed a tremendous interest in an unlimited number of biomedical applications where the characteristics of both the surface and bulk need to be tailored to provide a better interaction with the living body or perform a specific function. Graft polymerization of specific monomers, the introduction of stimuli-responsive components and use of γ -irradiation for modification of materials offer an attractive route for providing polymeric medical devices with the capability of acting as implants or drug delivery systems. γ -Irradiation-induced graft polymerization is an advantage in terms of almost complete retention of the mechanical strength of the biomaterial after functionalization, and leads to surface and bulk modification of the polymer matrix. The polymer materials require a proper designing in terms of the functionality in such a way that the compatibility of the biomaterial with the body, its velocity of response, and its physical and chemical properties must remain in constant improvement.

REFERENCES

- Aliev, R., Garcia, P., and Burillo, G. 2000. Graft polymerization of acrylic acid onto polycarbonate by the preirradiation method. *Radiat Phys Chem.* 58: 299–304.
- Alvarez-Lorenzo, C., Bucio, E., Burillo, G. et al. 2010. Medical devices modified at the surface by gamma-ray grafting for drug loading and delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 7: 173–183.
- Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., and Dubovik, A.S. 2005. Temperature-sensitive chitosan-poly(N-isopropylacrylamide) interpenetrated networks with enhanced loading capacity and controlled release properties. *J Control Release.* 102: 629–641.
- Alvarez-Lorenzo, C., Yañez, F., Barreiro-Iglesias, R. et al. 2006. Imprinted soft contact lenses as norfloxacin delivery systems. *J Control Release.* 113: 236–244.
- Anderson, J.M., Rodriguez, A., and Chang, D.T. 2008. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 20: 86–100.
- Andrade, J.D. 1976. Hydrogels for medical and related applications. *ACS Symposium Series. American Chemical Society*, Washington, DC, Vol. 31, pp. 1–37.
- Andrade-Vivero, P., Fernández-Gabriel, E., Alvarez-Lorenzo, C. et al. 2007. Improving the loading and release of NSAIDs from PHEMA hydrogels by copolymerization with functionalized monomers. *J Pharm Sci.* 96: 802–813.
- Anjum, N., Gulrez, S.K.H., Singh, H. et al. 2006. Development of antimicrobial polypropylene sutures by graft polymerization. I. Influence of grafting conditions and characterization. *J Appl Polym Sci.* 101: 3895–3901.
- Babensee, J.E., Anderson, J.M., McIntire, L.V. et al. 1998. Host response to tissue engineered devices. *Adv Drug Deliv Rev.* 33: 111–139.
- Bamford, C.H. and Al-Lamee, K.G. 1996. Studies in polymer surface modification and grafting for biomedical uses: 2. Application to arterial blood filters and oxygenators. *Polymer.* 37: 4885–4889.
- Baskova, I.P., Aguejof, O.M., Azougagh-Oualane, F. et al. 1995. Arterial antithrombotic effect of piyavit, the novel pharmacological preparation from the medicinal leech, and of its components, prostanoids and enzyme destabilase. *Thromb Res.* 77: 483–492.
- Baskova, I.P., Korostelev, A.N., Chirkova, L.D. et al. 1997. Piyavit from the medicinal leech is a new orally active anticoagulating and antithrombotic drug. *Clin Appl Thromb Hemost.* 3: 40–45.
- Bayhan, M. and Tuncel, A. 1998. Uniform poly(isopropylacrylamide) gel beads for immobilization of α -chymotrypsin. *J Appl Polym Sci.* 67: 1127–1139.
- Bell, C.L. and Peppas, N.A. 1996. Water, solute and protein diffusion in physiologically responsive hydrogels of poly(methacrylic acid-g-ethylene glycol). *Biomaterials.* 17: 1203–1218.
- Bettini, S.H.P. and Agnelli, J.A.M. 1999. Grafting of maleic anhydride onto polypropylene by reactive processing. I. Effect of maleic anhydride and peroxide concentrations on the reaction. *J Appl Polym Sci.* 74: 247–255.
- Borzacchiello, A. and Ambrosio, L. 2009. Structure-property relationships in Hydrogels. In *Hydrogels: Biological Properties and Applications*, ed. R. Barbucci. pp. 9–20. Springer-Verlag, Milan, Italia.
- Brazel, C.S. and Peppas, N.A. 1995. Thermo- and chemo- mechanically responsive poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) hydrogels. *Macromolecules.* 28: 8016–8020.
- Bromberg, L.E. and Ron, E.S. 1998. Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 31: 197–221.

- Bucio, E., Aliev, R., and Burillo, G. 1998. Radiation grafting of dimethylamino ethylmethacrylate onto polypropylene. *Radiat Phys Chem.* 52: 193–196.
- Bucio, E. and Burillo, G. 1997. Radiation Grafting of N,N-dimethylaminoethylmethacrylate onto polyethylene film by preirradiation method. *Polym Bull.* 38: 587–594.
- Bucio, E., Burillo, G., Adem, E. et al. 2005. Temperature sensitive behavior of poly (N-isopropylacrylamide) grafted onto electron beam-irradiated poly (propylene). *Macromol Mater Eng.* 290: 745–752.
- Bucio, E., Contreras-García, A., Meléndez-Ortiz, H.I. et al. 2010. Smart polymers for biomedical applications and graft synthesis by γ -rays. In *Smart Polymer Materials for Biomedical Applications*, eds. S. Li, A. Tiwari, M. Prabakaran. et al., pp. 227–36. NOVA Science Publishers, Inc., New York.
- Bures, P., Huang, Y., Oral, E. et al. 2001. Surface modifications and molecular imprinting of polymers in medical and pharmaceutical applications. *J Control Release.* 72: 25–33.
- Burillo, G., Briones, M., and Adem, E. 2007a. IPN's of acrylic acid and N-isopropylacrylamide by gamma and electron beam irradiation. *Nucl Instrum Meth B.* 265: 104–108. AQ6
- Burillo, G. and Bucio, E. 2008. Responsive copolymer films obtained by ionizing radiation. In *Gamma Radiation Effects on Polymeric Materials and its Applications*. eds. C.E. Barrera. and G. Martínez-Barrera, Transworld Research Network, Kerala, India. AQ7
- Burillo, G., Bucio, E., Arenas, E. et al. 2007b. Temperature and pH-sensitive swelling behaviour of binary DMAEMA/4VP grafts on poly(propylene) films. *Macromol Mater Eng.* 292: 214–219.
- Burillo, G., Díaz, A., and Bucio, E. 2006. Characterization of thermo and pH sensitivity of binary graft copolymers onto tetrafluoroethylene. *J Mex Chem Soc.* 50: 1–4.
- Burillo, G., Oseguera, M.A., and Vazquez, C. 1997. Radiation grafting of dimethylaminopropylmethacrylamide onto PE. *Radiat Phys Chem.* 50: 511–517.
- Castner, D.G. and Ratner, B.D. 2002. Biomedical surface science: Foundations to frontiers. *Surf Sci.* 500: 28–60.
- Cerrai, P., Guerra, G.D., and Tricoli, M. 1996. Polyelectrolyte complexes obtained by radical polymerization in the presence of chitosan. *Macromol Chem Phys.* 197: 3567–3579.
- Cevher, E., Orhan, Z., Mülazımođlu, L. et al. 2006. Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillinresistant *Staphylococcus aureus* with prepared microspheres. *Int J Pharm.* 317: 127–135.
- Chapiro, A. 1962. *Radiation Chemistry of Polymeric Systems*. Interscience Division, John Wiley & Sons, New York.
- Chapiro, A., Magat, M., and Sebban, J. 1956. French Pat. No 1,130,099 to Centre National de la recherche Scientifique. AQ8
- Chaplin, R.P., Dworjanyn, P.A., Gamage, N.J.W. et al. 1996. The role of partitioning of reagents in grafting and curing reactions initiated by ionizing radiation and UV. *Radiat Phys Chem.* 47: 435–437.
- Charlesby, A. and Alexander, P. 1955. Reticulation of polymers in aqueous solution by γ -rays. *J Chim Phys Phys Chim Biol.* 52: 699–709.
- Chen, G. and Hoffman, A.S. 1995. Graft copolymers that exhibit temperature-induced phase transitions over a wide range of pH. *Nature.* 373: 49–52.
- Chen, J.P. and Hsu, M.S. 1997. Preparations and properties of temperature-sensitive poly(N-isopropylacrylamide)-chymotrypsin conjugates. *J Mol Catal B Enzymatic.* 2: 233–241.
- Chen, G., Ito, Y., and Imanishi, Y. 1997. Micropattern immobilization of a pH-sensitive polymer. *Macromolecules.* 30: 7001–7003.
- Chivukula, P., Dusek, K., Wang, D. et al. 2006. Synthesis and characterization of novel aromatic azo bond-containing pH-sensitive and hydrolytically cleavable IPN hydrogels. *Biomaterials.* 27: 1140–1151.
- Clough, R.L. 2001. High-energy radiation and polymers: A review of commercial processes and emerging applications. *Nucl Instrum Meth B.* 185: 8–33.
- Contreras-García, A., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A. et al. 2010a. PP films grafted with N-isopropylacrylamide and N-(3-aminopropyl) methacrylamide by γ radiation: Synthesis and characterization. *Radiat Phys Chem.* 79: 615–621. AQ9
- Contreras-García, A., Alvarez-Lorenzo, C., Toboada, C. et al. 2011. Stimuli-responsive networks grafted onto polypropylene for the sustained delivery of NSAIDs. *Acta Biomater.* 7: 996–1008.
- Contreras-García, A., Bucio, E., Concheiro, A. et al. 2010b. Polypropylene grafted with NIPAAm and APMA for creating hemocompatible surfaces that load/elute nalidixic acid. *React Funct Polym.* 70: 836–842.
- Cosson, M., Debodinance, P., Boukerrou, M. et al. 2003. Mechanical properties of synthetic implants used in the repair of prolapsed and urinary incontinency in women: Which is the ideal material? *Int Urogynecol J.* 14: 169–178.

- Denuziere, A., Ferrier, D., and Domard, A. 1996. Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate poly-electrolyte complexes. Physico-chemical aspects. *Carbohydr Polym.* 29: 317–323.
- Dimitrov, I., Trzebicka, B., Müller, A.H.E. et al. 2007. Thermosensitive water-soluble copolymers with doubly responsive reversibly interacting entities. *Prog Polym Sci.* 32: 1275–1343.
- Donlan, R.M. and Costerton, J.W. 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganism. *Clin Microbiol Rev.* 15: 167–193.
- Dwyer, A. 2008. Surface-treated catheters—A review. *Semin Dial.* 21: 542–546.
- Ellinghorst, G., Niemöller, A., and Vierkotten, D. 1983. Radiation initiated grafting of polymer films -an alternative technique to prepare membranes for various separation problems. *Radiat Phys Chem.* 22: 635–642.
- Fang, Y., Shi, T., Wang, W. et al. 1989. Kinetics of radiation-induced graft copolymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate onto polyethylene membranes. *J Appl Polym Sci.* 38: 821–828.
- Fei, J., Zhang, Z., and Gu, L. 2002. Bending behaviour of electroresponsive poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid) semi-interpenetrating network hydrogel fibres under an electric stimulus. *Polym Int.* 51: 502–509.
- Fong, W.K., Hanley, T., and Boyd, B.J. 2009. Stimuli responsive liquid crystals provide “on-demand” drug delivery in vitro and in vivo. *J Control Release.* 135: 218–226.
- Freytag, C.C., Thies, F.L., Konig, W. et al. 2003. Prolonged application of closed inline suction catheters increases microbial colonization of the lower respiratory tract and bacterial growth on catheter surface. *Infection.* 31: 31–37.
- Friedrich, J., Kühn, G., Mix, R. et al. 2004. Formation of plasma polymer layers with functional groups of different type and density at polymer surfaces and their interaction with Al atoms. *Plasma Process Polym.* 1: 28–50.
- Fujimoto, K., Takebayashi, Y., Inoue, H. et al. 1993. Ozone induced graft polymerization onto polymer surface. *J Polym Sci Pol Chem.* 31: 1035–1043.
- Fukumori, K., Akiyama, Y., Yamato, M. et al. 2009. Temperature-responsive glass coverslips with an ultrathin poly(N-isopropylacrylamide) layer. *Acta Biomater.* 5: 470–476.
- García-Uriostegui, L., Burillo, G., and Bucio, E. 2012. Synthesis and characterization of thermosensitive interpenetrating polymer networks based on N-isopropylacrylamide/N-acryloxysuccinimide, crosslinked with polylysine, grafted onto polypropylene. *Radiat Phys Chem.* 81: 295–300.
- Gargan, K., Kronfli, E., and Lovell, K.V. 1990. Pre-irradiation grafting of hydrophilic monomers onto polyethylene. I. The influence of homopolymerization inhibitors. *Radiat Phys Chem.* 36: 757–762.
- Gil, E.S. and Hudson, S.M. 2004. Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates. *Prog Polym Sci.* 29, 1173–1222.
- Guilherme, M.R., Campese, G.M., Radovanovic, E. et al. 2006. Thermo-responsive sandwiched-like membranes of IPN-PNIPAAm/PAAm hydrogels. *J Membr Sci.* 275: 187–194.
- Guimon, C. 1979. Radiation grafting of high density poly-ethylene and polypropylene. *Radiat Phys Chem.* 14: 841–846.
- Gupta, B. and Anjum, N. 2000a. Development of the membranes by radiation grafting of acrylamide into polyethylene films. *J Appl Polym Sci.* 77: 1331–1337.
- Gupta, B. and Anjum, N. 2000b. Influence of solvents on the radiation grafting of acrylamide into polyethylene films. *J Appl Polym Sci.* 77: 1401–1404.
- Gupta, B. and Anjum, N. 2003. Plasma and radiation-induced graft modification of polymers for biomedical applications. *Adv Polym Sci.* 162: 35–61.
- Gupta, B., Anjum, N., Jain, R. et al. 2004. Development of membranes by radiation-induced graft polymerization of monomers onto polyethylene films. *Polym Rev.* 44: 275–309.
- Gupta, B.D. and Chapiro, A. 1989. Preparation of ion-exchange membranes by grafting acrylic acid into preirradiated polymer film. *Eur Polym J.* 25: 1137–1145.
- Gupta, B., Muzyyan, N., Saxena, S. et al. 2008. Preparation of ion exchange membranes by radiation grafting of acrylic acid on FEP films. *Radiat Phys Chem.* 77: 42–48.
- Gupta, B., Tyagi, P.K., Ray, A.R. et al. 1990. Radiation induced grafting of 2-hydroxyethylmethacrylate onto polypropylene for biomedical application: I. Effect of synthesis conditions. *J Macromol Sci Chem.* 27: 831–841.
- Gurny, R. and Junginger, H.E. 1990. *Bioadhesion: Possibilities and Future Trends.* Wissen Schaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Germany.
- Hegazy, E.S.A., El-Assy, N.B., Rabie, A.G.M. et al. 1984. Kinetic study of preirradiation grafting of acrylic acid onto poly(tetrafluoroethylene-perfluorovinyl ether) copolymer. *J Polym Sci Polym Chem.* 22: 597–604.

- Hegazy, E.A., El-Rehim, H.A.A., Khalifa, N.A. et al. 1999. Preparation and characterization of supported hydrogels obtained by radiation grafting of binary monomers. *Radiat Phys Chem.* 55: 219–229.
- Hegazy, E.A., Mokhtar, S.M., Osman, M.B.S. et al. 1990. Study on non-ionic membrane prepared by radiation-induced graft polymerization. *Radiat Phys Chem.* 36: 365–370.
- Heger, A. 1990. *Technologie der Strahlenchemie von Polymeren*. Carl Hanser Verlag, München, Germany.
- Hoare, T.R. and Kohane, A.D. 2008. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer.* 49: 1993–2007.
- Hoffman, A.S. 1977. Applications of radiation processing in biomedical engineering—A review of the preparation and properties of novel biomaterials. *Radiat Phys Chem.* 9: 207–219.
- Hoffman, A.S. 1995. Intelligent polymers in medicine and biotechnology. *Macromol Symp.* 98: 645–664.
- Hoffman, A.S. 2002. Hydrogels in biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 43: 3–12.
- Hoffman, A.S., Achmer, G., Harris, C. et al. 1972. Covalent binding of biomolecules to radiation grafted hydrogels on inert polymer surface. *Trans Am Soc Artif Intern Organs.* 18: 10–17.
- Hoffman, A.S., Stayton, P.S., Bulmus, V. et al. 2000. Really smart bioconjugates of smart polymers and receptor proteins. *J Biomed Mater Res.* 52: 577–586.
- Holtz, J.H. and Asher, S.A. 1997. Polymerized colloidal crystal hydrogel films as intelligent chemical sensing materials. *Nature.* 389: 829–832.
- Huang, H. and Liu, N.C. 1998. Nondegradative melt functionalization of polypropylene with glycidyl methacrylate. *J Appl Polym Sci.* 67: 1957–1963.
- Ikada, Y. 1994. Surface modification of polymers for medical applications. *Biomaterials.* 13: 725–736.
- Ikada, Y., Mita, T., Horii, F. et al. 1977. Preparation of hydrogels by radiation technique. *Radiat Phys Chem.* 9: 633–645.
- Ishigaki, I., Sugo, T., Senoo, K. et al. 1982. Graft polymerization of acrylic acid onto polyethylene film by preirradiation method. *J Appl Polym Sci.* 27: 1033–1051.
- Jabbari, E. and Nozari, S. 2000. Swelling behavior of acrylic acid hydrogels prepared by γ -radiation crosslinking of polyacrylic acid in aqueous solution. *Eur Polym J.* 36: 2685–2692.
- Kabanov, V.Y. 1989. Radiation induced graft polymerization in the U.S.S.R. *Radiat Phys Chem.* 33: 51–60.
- Kabanov, V.Y., Kudryavtsev, V.N., Degtyareva, T.V. et al. 1997. Modification of polyethylene and poly(vinyltrimethylsilane) by radiation-induced graft polymerization. *Nucl Instrum Meth B.* 131: 291–294.
- Kaetsu, I. 1993. Radiation synthesis of polymeric materials for biomedical and biochemical applications. *Adv Polym Sci.* 105: 81–97.
- Kaetsu, I. 1995. Biocompatible and biofunctional membrane by means of radiation techniques. *Nucl Instrum Meth B.* 105: 294–301.
- Kamath, K.R. and Park, K. 1994. Surface modification of polymeric biomaterials by albumin grafting using gamma-irradiation. *J Appl Biomater.* 5: 163–173.
- Kikuchi, A. and Okano, T. 2002. Intelligent thermoresponsive polymeric stationary phases for aqueous chromatography of biological compounds. *Prog Polym Sci.* 27: 1165–1193.
- Kikuchi, A. and Okano, T. 2005. Nanostructured designs of biomedical materials: Applications of cell sheet engineering to functional regenerative tissues and organs. *J Control Release.* 101: 69–84.
- Kim, S.Y., Cho, S.M., Lee, Y.M. et al. 2000. Thermo- and pH-responsive behaviors of graft copolymer and blend based on chitosan and N-isopropylacrylamide. *J Appl Polym Sci.* 78: 1381–1391.
- Kim, M., Kiyohara, S., Konishi, S. et al. 1996. Ring-opening reaction of poly-GMA chain grafted onto a porous membrane. *J Membr Sci.* 117: 33–38.
- Kim, S.J., Park, S.J., Kim, I.Y. et al. 2003. Thermal characteristics of interpenetrating polymer networks composed of poly(vinyl alcohol) and poly(N-isopropylacrylamide). *J Appl Polym Sci.* 90: 881–885.
- Kim, M. and Saito, K. 1999. Preparation of silver-ion-loaded nonwoven fabric by radiation-induced graft polymerization. *React Funct Polym.* 40: 275–279.
- Ko, T. and Cooper, S.L. 1993. Surface properties and platelet adhesion characteristics of acrylic acid and allylamine plasma-treated polyethylene. *J Appl Polym Sci.* 47: 1601–1619.
- Kondo, T., Koyama, M., Kubota, H. et al. 1998. Characteristics of acrylic acid and N-isopropylacrylamide binary monomers-grafted polyethylene film synthesized by photografting. *J Appl Polym Sci.* 67: 2057–2064.
- Konishi, S., Saito, K., Furusaki, S. et al. 1992. Sorption kinetics of cobalt in chelating in chelating porous membrane. *Ind Eng Chem Res.* 31: 2722–2727.
- Kostov, G.K. and Atanassov, A.N., 1993. Radiation initiated grafting of acrylic acid onto tetrafluoroethylene-ethylene copolymers. *J Appl Polym Sci.* 47: 361–366.
- Kostov, G.K. and Turmanova, S.C. 1997. Radiation-initiated graft copolymerization of 4-vinylpyridine onto polyethylene and polytetrafluoroethylene films and anion-exchange membranes therefrom. *J Appl Polym Sci.* 64: 1469–1475.

- Kowalczyk, D., Ginalska, G., and Golus, J. 2010. Characterization of the developed antimicrobial urological catheters. *Int J Pharm.* 402: 175–183.
- Kumar, A., Srivastava, A., Galaev, I.Y. et al. 2007. Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications. *Prog Polym Sci.* 32: 1205–1237.
- Kwok, C.S., Wan, C.X., Hendricks, S. et al. 1999. Design of infection-resistant antibiotic-releasing polymers: I. Fabrication and formulation. *J Control Release.* 62: 289–299.
- Laurencin, C.T. and Elgandy, H. 1994. The biocompatibility and toxicity of degradable polymeric materials: Implications for drug delivery. In *Polymeric Site-Specific Pharmacotherapy*, ed. A.J. Domb. John Wiley & Sons Ltd, New York.
- Lee, E.S., Na, K., and Bae, Y.H. 2003. Polymeric micelle for tumor pH- and folate-mediated targeting. *J Control Release.* 91: 103–113.
- Lee, S.B., Park, E.K., Lim, Y.M. et al. 2006. Preparation of alginate/Poly(N-isopropylacrylamide) semi-interpenetrating and fully interpenetrating polymer network hydrogels with γ -ray irradiation and their swelling behaviors. *J Appl Polym Sci.* 100: 4439–4446.
- Lee, W., Saito, K., Furusaki, S. et al. 1993. Design of urea-permeable anion-exchange membrane by radiation-induced graft polymerization. *J Membr Sci.* 81: 295–305.
- Lenaert, V. and Gurny, R. 1990. *Bioadhesive Drug Delivery Systems*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Liu, Q., Zhu, Z., Yang, X. et al. 2007. Temperature-sensitive porous membrane production through radiation co-grafting of NIPAAm on/in PVDF porous membrane. *Radiat Phys Chem.* 76: 707–713.
- Melendez-Ortiz, H.I. and Bucio, E. 2008. Radiation synthesis of a thermo-pH responsive binary graft copolymer (PP-g-DMAEMA)-g-NIPAAm by a two step method. *Polym Bull.* 61: 619–629.
- Moad, G. 1999. The synthesis of polyolefin graft copolymers by reactive extrusion. *Prog Polym Sci.* 24: 81–142.
- Mohamadnia, Z., Zohuriaan-Mehr, A.J., Kabiri, K. et al. 2007. pH-sensitive IPN hydrogel beads of carrageenan-alginate controlled drug delivery. *J Bioact Compat Polym.* 22: 342–356.
- Mori, K., Koshishi, K., Masuhara, K. 1991. Thermal stability in air of acrylonitrile-grafted polyethylene by electron beam prior irradiation. *J Appl Polym Sci.* 43: 221–225.
- de Moura, M.R., Guilherme, M.R., Campese, G.M. et al. 2005. Porous alginate-Ca²⁺ hydrogels interpenetrated with PNIPAAm networks: Interrelationship between compressive stress and pore morphology. *Eur Polym J.* 41: 2845–2852.
- Mukae, K., Bae, Y.H., Okano, T. et al. 1990a. A new thermosensitive hydrogel: Poly(ethylene oxide-dimethylsiloxane-ethylene oxide)/poly(N-isopropylacrylamide) interpenetrating polymer networks. II. On-off regulation of solute release. *Polym J.* 22: 250–265.
- Mukae, K., Bae, Y.H., Okano, T. et al. 1990b. New thermosensitive hydrogel: Poly(ethylene oxide-dimethylsiloxane-ethylene oxide)/poly(N-isopropylacrylamide) interpenetrating polymer networks. I. synthesis and characterization. *Polym J.* 22: 206–217.
- Muñoz-Muñoz, F., Ruiz, J.C., Alvarez-Lorenzo, C. et al. 2009. Novel interpenetrating smart polymer networks grafted onto polypropylene by gamma radiation for loading and delivery of vancomycin. *Eur Polym J.* 45: 1859–1867.
- Muñoz-Muñoz, F., Ruiz, J.C., Alvarez-Lorenzo, C. et al. 2012. Temperature- and pH-sensitive interpenetrating polymer networks grafted on PP: Cross-linking irradiation dose as a critical variable for the performance as vancomycin-eluting systems. *Radiat Phys Chem.* 81: 531–540.
- Nagaoka, N., Safranji, A., Yoshida, M. et al. 1993. Synthesis of poly-N-isopropylacrylamide hydrogels by radiation polymerization and crosslinking. *Macromolecules* 26: 7386–7388.
- Nagasawa, N., Mitomo, H., Yoshii, F. et al. 2000. Radiation-induced degradation of sodium alginate. *Polym Degrad Stabil.* 69: 279–285.
- Nasef, M.M. and Saidi, H. 2004. Structure of polyethylene-graft-polystyrene sulfonic acid membranes prepared by radiation-induced grafting. *Int J Polym Mater.* 53: 1027–1043.
- Nohr, R.S. and Macdonald, J.G. 1994. New biomaterials through surface segregation phenomenon: New quaternary ammonium compounds as antibacterial agents. *J Biomater Sci Polym Ed.* 5: 607–619.
- Okano, T., Yamada, N., Okuhara, M. et al. 1995. Mechanism of cell detachment from temperature modulated hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials.* 16: 297–303.
- Ortega, A., Bucio, E., and Burillo, G. 2007. Radiation polymerization and crosslinking of (N-isopropylacrylamide) in solution and in solid state. *Polym Bull.* 58: 565–573.
- Ortega, A., Bucio, E., and Burillo, G. 2008. New interpenetrating polymer networks of N-isopropylacrylamide/N-acryloxysuccinimide: Synthesis and characterization. *Polym Bull.* 60: 515–524.
- Ostler, M.I. and Rogers, C.E. 1974. Modification of membrane permselectivity by graft copolymerization. *J Appl Polym Sci.* 18: 1359–1371.

- Ougizawa, T. and Walsh, D.J. 1993. Upper critical solution temperature behavior in Polystyrene/Poly(methyl methacrylate) mixture. *Polym J.* 25: 1315–1318.
- Park, T.G. and Hoffman, A.S. 1992. Synthesis and characterization of pH- and/or temperature-sensitive hydrogels. *J Appl Polym Sci.* 46: 659–671.
- Passaglia, E., Coiai, S., Aglietto, M. et al. 2003. Functionalization of polyolefins by reactive processing: Influence of starting reagents on content and type of grafted groups. *Macromol Symp.* 198: 147–160.
- Pelton, R. 2000. Temperature-sensitive aqueous microgels. *Adv Colloid Interface Sci.* 85: 1–33.
- Pendyala, L., Jabara, R., Robinson, K. et al. 2009. Passive and active polymer coatings for intracoronary stents: Novel devices to promote arterial healing. *J Interv Cardiol.* 22: 37–48.
- Peppas, N.A. 1987. *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, Vol. I. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Peppas, N.A. and Klier, J. 1991. Controlled release by using poly(methacrylic acid-g-ethylene glycol) hydrogels. *J Control Release.* 16: 203–214.
- Peppas, N.A. and Sahlin J.F. 1996. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: A review. *Biomaterials.* 17: 1553–1561.
- Percot, A., Zhu, X.X., and Lafleur, M. 2000. A simple FTIR spectroscopic method for the determination of the lower critical solution temperature of N-isopropylacrylamide copolymers and related hydrogels. *J Polym Sci Polym Phys.* 38: 907–915.
- Phadnis, S., Patri, M., Chandrashekar, L. et al. 2005. Proton exchange membranes via the grafting of styrene and acrylic acid onto fluorinated ethylene propylene copolymer by a pre-irradiation technique. III. Thermal and mechanical properties of the membranes and their sulphonated derivatives. *J Appl Polym Sci.* 97: 1418–1425.
- Piozzi, A., Francolini, I., Occhiaperti, L. et al. 2004. Antimicrobial activity of polyurethanes coated with antibiotics: A new approach to the realization of medical devices exempt from microbial colonization. *Int J Pharm.* 280: 173–183.
- Raad, I.I. and Hanna, H.A. 2002. Intravascular catheter-related infections. New horizons and recent advances. *Arch Intern Med.* 162: 871–878.
- Raad, I., Hanna, H., and Maki, D. 2007. Intravascular catheter-related infections: Advances in diagnosis, prevention, and management. *Lancet Infect Dis.* 7: 645–657.
- Raad, I., Reitzel, R., Jiang, Y. et al. 2008. Antiadherence activity and antimicrobial durability of anti-infective-coated catheters against multidrug-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 62: 746–750.
- Ramanathan, S. and Block, L.H. 2001. The use of chitosan gels as matrices for electrically-modulated drug delivery. *J Control Release.* 70: 109–123.
- Ratner, B.D. and Hoffman, A.S. 1974. Effect of Cupric ion on the radiation grafting of N-vinyl-2-pyrrolidone and other hydrophilic monomers onto silicone rubber *J Appl Polym Sci.* 18: 3183–3204.
- Rawlinson, L.A.B., Ryan, S.M., Mantovani, G. et al. 2010. Antibacterial effects of poly(2-(dimethylamino ethyl)methacrylate) against selected gram-positive and gram-negative bacteria. *Biomacromolecules.* 11: 443–453.
- Rihova, B. 2000. Immunocompatibility and biocompatibility of cell delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 42: 65–80.
- Rodriguez-Perez, A.I., Rodriguez-Tenreiro, C., Alvarez-Lorenzo, C. et al. 2006. Sertaconazole/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complexation: Isothermal titration calorimetry and solubility approaches. *J Pharm Sci.* 95: 1751–1762.
- Rogel-Hernández, E., Licea-Claverie, A., Cornejo-Bravo, J.M. et al. 2003. Preparación de hidrogeles anfífilos sensibles a diferentes valores de pH utilizando monómeros ácidos con espaciadores hidrofóbicos. *Rev Soc Quim Mex.* 47: 251–257.
- Ruiz, J.C., Alvarez-Lorenzo, C., Taboada, P. et al. 2008. Polypropylene grafted with smart polymers (PNIPAAm/PAAc) for loading and controlled release of vancomycin. *Eur J Pharm Biopharm.* 70: 467–477.
- Ruiz, J.C., Burillo, G., and Bucio, E. 2007. Interpenetrating thermo and pH stimuli responsive polymer networks of PAAc/PNIPAAm grafted onto PP. *Macromol Mater Eng.* 292: 1176–1188.
- Rzaev, Z.M.O., Dinçer, S., and Piskin, E. 2007. Functional copolymers of N-isopropylacrylamide for bioengineering applications. *Prog Polym Sci.* 32: 534–595.
- Sadurni, P., Alagon, A., Aliev, R. et al. 2005. Immobilization of streptavidin–horseradish peroxidase onto a biotinylated poly(acrylic acid) backbone that had been radiation—Grafted to a PTFE film. *J Biomat Sci Polym E.* 16: 181–187.
- Saeki, S., Kuwahara, N., Nakata, M. et al. 1976. Upper and lower critical solution temperatures in poly (ethylene glycol) solutions. *Polymer.* 17: 685–689.
- Sanchez-Valdes, S., Picazo-Rada, C.J., and Lopez-Quiintanilla, M.L. 2001. Polyethylene grafted maleic anhydride to improve wettability of liquid on polyethylene films. *J Appl Polym Sci.* 79: 1802–1808.

- Satoshi, T.S., Saito, K., Mitsuhashi, H. et al. 1995. Novel ion exchange membranes for electro dialysis is prepared by radiation induced graft polymerization. *J Electrochem Soc.* 142: 3659–3663.
- Schierholz, J.M. and Beuth, J. 2001. Implant infections: A haven for opportunistic bacteria. *J Hosp Infect.* 49: 87–93.
- Schild, H.G. 1992. Poly(N-isopropylacrylamide): Experiment, theory and application. *Prog Polym Sci.* 17: 163–249.
- Schmidt, C. and Schmidt-Naake, G. 2007. Grafting of 1-vinylimidazole onto preirradiated ETFE films. *Macromol Mater Eng.* 292: 1067–1074.
- Schneider, B.L., Schwenter, F., Pralong, W.F. et al. 2003. Prevention of the initial host immuno-inflammatory response determines the long-term survival of encapsulated myoblasts genetically engineered for erythropoietin delivery. *Mol Ther.* 7: 506–514.
- Seko, N., Tamada, M., and Yoshii, F. 2005. Current status of adsorbent for metal ions with radiation grafting and crosslinking technique. *Nucl Instrum Meth B.* 236: 21–29.
- Şen, M. and Sari, M. 2005. Radiation synthesis and characterization of poly (N,N dimethylaminoethyl methacrylate-co-N-vinyl 2-pyrrolidone) hydrogels. *Eur Polym J.* 41: 1304–1314.
- Shing, J.B.W., Baker, W.E., Russell, K.E. et al. 1994. Effect of reaction conditions on the grafting of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate onto hydrocarbon substrates. *J Polym Sci A Polym Chem.* 32: 1691–1702.
- Shkolnik, S. and Behar, D.J. 1982. Radiation-induced grafting of sulfonates on polyethylene. *J Appl Polym Sci.* 27: 2189–2196.
- Siegel, R.A. 1993. Hydrophobic weak polyelectrolyte gels: Studies of swelling equilibria and kinetics. *Adv Polym Sci.* 109: 233–267.
- Sieminski, A.L. and Gooch, K.J. 2000. Biomaterial–microvasculature interactions. *Biomaterials.* 21: 2233–2241.
- Singh, D.K. and Ray, A.R. 1994. Graft copolymerization of 2-hydroxyethylmethacrylate onto chitosan films and their blood compatibility. *J Appl Polym Sci.* 53: 1115–1121.
- Singhal, J.P. and Raya, A.R. 2002. Synthesis of blood compatible polyamide blocks copolymers. *Biomaterials.* 23: 1139–1145.
- Siow, K.S., Britcher, L., Kumar, S. et al. 2006. Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization. *Plasma Process Polym.* 3: 392–418.
- Snorraddottir, B.S., Gudnason, P.J., Scheving, R. et al. 2009. Release of anti-inflammatory drugs from a silicone elastomer matrix system. *Pharmazie.* 64: 19–25.
- Sperling, L.H. 1981. *Interpenetrating Polymer Networks*. Plenum Press, New York.
- Sperling, L.H. and Mishra, V. 1997. The current status of interpenetrating polymer networks. In *IPNs around the World Science and Engineering*, eds. S.C. Kim. and L.H. Sperling. pp. 1–25. John Wiley & Sons, New York.
- Srivastava, A.K., Nigam, S.K., Shukla, A. et al. 1987. Studies on template polymerization. *Rev Macromol Chem Phys.* 27: 171–180.
- Stubbs, M., McSheehy, P.M.J., and Griffiths, J.R. 1999. Causes and consequences of acidic pH in tumors: A magnetic resonance study. *Adv Enzyme Regul.* 39: 13–30.
- Sun, Y.H., Gombotz, W.R., and Hoffman, A.S. 1986. Synthesis and characterization of non-fouling polymer surfaces: I. Radiation grafting of hydroxyethyl methacrylate and polyethylene glycol methacrylate onto silastic film. *J Bioact Comp Polym.* 1: 317–334.
- Tamada, Y. and Ikada, Y. 1994. Fibroblast growth on polymer surfaces and biosynthesis of collagen. *J Biomed Mater Res.* 28: 783–789.
- Tang, I. and Eaton, J.W. 1995. Inflammatory responses to biomaterials. *Am J Clin Pathol.* 103: 466–471.
- Truica-Marasescu, F., Pham, S., and Wertheimer, M.R. 2007. Vuv processing of polymers: Surface modification and deposition of organic thin films. *Nucl Instrum Meth B.* 265: 31–36.
- Tsunedo, S., Saito, K., Furusaki, S. et al. 1992. Water/acetone permeability of porous hollow-fiber membrane containing diethylamino groups on the grafted polymer branches. *J Membr Sci.* 71: 1–12.
- Tuncel, A. 1999. A diffusion-reaction model for α -chymotrypsin carrying uniform thermosensitive gel beads. *J Appl Polym Sci.* 74: 1025–1034.
- Tuncel, A. and Ozdemir, A. 2000. Thermally reversible VPBA-NIPAM copolymer gels for nucleotide adsorption. *J Biomater Sci Polym.* 11: 817–831.
- Wang, W., Wang, L., Chen, X. et al. 2006. Study on the graft reaction of poly(propylene) fiber with acrylic acid. *Macromol Mater Eng.* 291: 173–180.
- Williams, I.W.A., Venables, D., Lloyd, F. et al. 1997. The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology.* 143: 2407–2413.

- Wirsen, A. and Albertsson, A.C. 1995. Graft polymerization of acrylamide onto LLDPE film by electron beam pre-irradiation in air or argon. I. Influence of dose, grafting temperature, and monomer concentration. *J Polym Sci Polym Chem.* 33: 2039–2048.
- Woods, R.J. and Pikaev, A.K. 1994. *Applied Radiation Chemistry: Radiation Processing.* Wiley, New York.
- Wu, C. and Zhou, S. 1997. Volume phase transition of swollen gels: Discontinuous or continuous?. *Macromolecules.* 30: 574–576.
- Xu, X.D., Wei, H., Zhang, X.Z. et al. 2007. Fabrication and characterization of a novel composite PNIPAAm hydrogel for controlled drug release. *J Biomed Mater Res A.* 81: 418–426.
- Yamato, M., Konno, C., Utsumi, M. et al. 2002. Thermally responsive polymer-grafted cell seeding and co-culture. *Biomaterials.* 23: 561–567.
- Yang, J. and Hsiue, G. 1996. Synthesis of acrylic acid grafted silicone rubber via preirradiation graft copolymerization and its physical and dielectric properties. *J Appl Polym Sci.* 61: 221–229.
- Yañez, F., Chianella, I., Piletsky, S.A. et al. 2010. Computational modeling and molecular imprinting for the development of acrylic polymers with high affinity for bile salts. *Anal Chim Acta.* 659: 178–185.
- Yoo, M.K., Sung, Y.K., Lee, Y.M. et al. 2000. Effect of polyelectrolyte on the lower critical solution temperature of poly(N-isopropyl acrylamide) in the poly(NIPAAm-co-acrylic acid) hydrogel. *Polymer.* 41: 5713–5719.
- Yoshida, R., Ucida, K., Kaneko, Y. et al. 1995. Comb-type grafted hydrogels with rapid de swelling response to temperature changes. *Nature.* 374: 240–242.
- Yuk, S.H., Cho, S.H., and Lee, S.H. 1997. pH/temperature-responsive polymer composed of poly (N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate-co-ethylacrylamide. *Macromolecules.* 30: 6856–6859.
- Zhang, X.Z., Wu, D.Q., and Chu, C.C. 2004. Synthesis, characterization and controlled drug release of thermo-sensitive IPN–PNIPAAm hydrogels. *Biomaterials.* 25: 3793–3805.
- Zouahri, A. and Elmidaoui, A. 1996. Synthesis of perfluorinated cation exchange membranes by preirradiation grafting of acrylic acid onto ethylene-tetrafluoroethylene films. *J Polym Sci.* 34: 1793–1798.

AUTHOR QUERIES

- [AQ1] Please check the running head correctness.
- [AQ2] Please check the sentence starting: “The physical bonds do that smart responses...” for sense.
- [AQ3] Please check the phrase “polymer surface o into matrix” for correctness.
- [AQ4] Please check the sentence starting: “The monomer may be at gas...” for sense.
- [AQ5] Please check if edit to the sentence starting: “Functionalization with networks that...” is ok.
- [AQ6] Please note that Burillo et al., 2007 has been changed Burillo et al., 2007a and b in the list. Please check and update the citations.
- [AQ7] Please provide the page range for Burillo and Bucio 2008.
- [AQ8] Please provide the extra details “if any” for Chapiro et al. 1956.
- [AQ9] Please note that Contreras-García et al. 2010 has been changed to Contreras-García et al. 2010a and 2010b in the list. Please check and update the citation.





Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica

Buenos Aires, September 14th 2012

Dr. Emilio Bucio Carrillo
Instituto de Ciencias Nucleares
Universidad Nacional Autónoma de México
México D.F.

Asunto: Reception of book chapter

Dear Dr. Bucio,

The following is to acknowledge the reception of the book chapter entitled “**Radiación gamma para el diseño de sistemas inteligentes en liberación controlada de fármacos e ingeniería de tejidos**” by Angel Contreras-García , Franklin Muñoz-Muñoz, Guillermina Burillo, Emilio Bucio” that will be published in the book “**BIOMATERIALES APLICADOS AL DISEÑO DE SISTEMAS TERAPÉUTICOS AVANZADOS**” by the Theme Network CYTED “RED IBEROAMERICANA DE NUEVOS MATERIALES PARA EL DISEÑO DE SISTEMAS AVANZADOS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS EN ENFERMEDADES DE ALTO IMPACTO SOCIOECONÓMICO (RIMADEL)” (www.rimadel.org) of the Iberoamerican Program CYTED through the University of Coimbra Press and that will be edited by Dr. Mara Braga and Prof. Herminio Sousa of the University of Coimbra and myself.

Sincerely yours,

Prof. Dr. Alejandro Sosnik
Coordinator RIMADEL-CYTED
Department of Pharmaceutical Technology
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
University of Buenos Aires

RADIACIÓN GAMMA PARA EL DISEÑO DE SISTEMAS INTELIGENTES EN LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS E INGENIERÍA DE TEJIDOS

Angel Contreras-García ¹, Franklin Muñoz-Muñoz ², Guillermina Burillo ²,
Emilio Bucio ^{2,*}

¹Department of Engineering Physics, École Polytechnique, C.P. 6079, Succ. Centre-Ville, Montréal, Canada QC H3C 3A7.

²Departamento de Química de Radiaciones y Radioquímica, Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, D. F. México. ebucio@nucleares.unam.mx

12.1. INTRODUCCIÓN

La definición de sistemas inteligentes abarca, entre una creciente diversidad de materiales, a aquellos sistemas poliméricos que presentan cambios significativos en sus propiedades físicas o químicas en respuesta a pequeñas variaciones sobre las condiciones del medio que los rodea. Este estímulo se puede atribuir a la acción de diferentes agentes externos, tales como temperatura, pH, concentraciones de iones específicos, solventes, campo eléctrico, campo magnético, estrés mecánico, sustratos enzimáticos o agentes bioquímicos; mientras que su magnitud o características, pueden variar considerablemente de un sistema a otro, dependiendo de la estructura, estado, forma, conformación o composición del polímero. Es así como en las últimas décadas, la investigación y desarrollo en el campo de los polímeros inteligentes –o también llamados “estímulo-sensibles”- se ha destacado por sus contribuciones y avances en la producción de múltiples sistemas con la capacidad de adaptarse a las aplicaciones deseadas. Materiales en estado sólido, en solución, en forma de geles, micelas o suspensiones, polímeros con diferentes arquitecturas moleculares (lineales, ramificados, reticulados, en forma de copolímeros injertados, redes poliméricas interpenetrantes (IPNs, por sus siglas en inglés: “*Interpenetrating Polymer Networks*”), sistemas poliméricos sintetizados en forma de capas superficiales, con inclusión de componentes receptores para la interacción con moléculas específicas o la incorporación de grupos que promueven la biodegradación; son algunos de los innumerables aportes que la ciencia de los polímeros inteligentes ha realizado en los últimos años. No obstante, las cualidades y características de una gran parte de los polímeros inteligentes producidos hasta el momento, sumado a la biocompatibilidad, naturaleza inerte, propiedades mecánicas, resistencia química y térmica, han posicionado a esta clase de materiales en un lugar privilegiado, principalmente para el desarrollo de aplicaciones biomédicas, en especial para el campo de los sistemas de liberación controlada de fármacos e ingeniería de tejidos.

Los polímeros usados como biomateriales, que han surgido como resultado del esfuerzo interdisciplinario en campos como la ingeniería, la química de polímeros, bioquímica, medicina y farmacia, encuentran cada día aplicaciones más sofisticadas y complejas en los ámbitos de la biotecnología y la biomedicina. Es así como hoy existe una gran necesidad de desarrollar y diseñar polímeros que interaccionen adecuadamente con biosistemas que incluyen la compatibilidad con sangre y tejidos, tales como los sistemas implantes o materiales

suplementarios (injertos vasculares, corazones artificiales, suturas, lentes intraoculares y catéteres). Esta clase de materiales también requiere de ciertos criterios para su uso en aplicaciones medicas, quirúrgicas y farmacéuticas, los cuales toman en cuenta las propiedades mecánicas, compatibilidad, hidrofílica y la respuesta inmune o biológica que pueda presentar el material en su sitio de acción [1]. Por su parte, el uso de implantes y dispositivos biomédicos está estrechamente asociado a la frecuente aparición de infecciones con considerable morbilidad y mortalidad, o al predominio de reacciones adversas en forma de inflamación, en el momento de interactuar con los tejidos circundantes [2-5]. En muchos casos, un material polimérico en contacto con sangre también puede experimentar la adhesión celular, lo que subsecuentemente podría conducir al desarrollo de una trombogénesis.

La funcionalización de polímeros se ha destacado como una herramienta útil en la prevención de infecciones sobre dispositivos biomédicos, aquellos que por una inadecuada manipulación o por la propia etiopatología del proceso de uso, son fácilmente colonizados por microorganismos oportunistas presentes en el proceso de inserción. Una vez en contacto con el dispositivo invasivo, la posibilidad de que estos microorganismos (como las bacterias y hongos) se adsorban y proliferen sobre sus paredes y formen “biofilms” es significativa, lo que prácticamente imposibilita su erradicación por los procedimientos terapéuticos convencionales. Por consiguiente, la incorporación de agentes antimicrobianos, fármacos antiinflamatorios o de agentes de inmunosupresión sobre la superficie del dispositivo a implantar, es un camino efectivo para tratamientos profilácticos o para la prevención de respuestas inmune e inflamatorias, evitando simultáneamente, el predominio de efectos colaterales provenientes del empleo de altas o inadecuadas dosificaciones en los sistemas convencionales de liberación de fármacos [6-11].

En general, la modificación de un polímero puede ser localizada en su superficie o distribuida en toda su masa, puede ser lograda aplicando diferentes métodos físico-químicos, y requiere el uso de monómeros u otros polímeros que se caracterizan por poseer ciertos grupos funcionales a lo largo de su estructura, que tienen la capacidad de conferir un comportamiento inteligente al sustrato, tales como grupos amidas, aminas, ácidos carboxílicos o epóxidos, entre otros [12-15]. Es aquí donde se resalta la participación de la energía ionizante, como la radiación gamma (γ) y los electrones acelerados, para promover la activación de polímeros, de tal forma que monómeros o moléculas específicas puedan ser unidos covalentemente (injertados) sobre su estructura o cadenas principales, por medio de una reacción química. El grado o nivel de modificación, como son la proporción de material injertado o la variación en sus propiedades mecánicas, pueden ser fácilmente controladas por variación de la exposición a la radiación (dosis de exposición e intensidad de radiación) o demás condiciones de reacción implícitas (concentración de monómeros, atmósfera inerte, temperatura y tiempo de reacción). El estudio y control de la radiación ionizante, en especial de la radiación γ , ha sido de interés creciente durante las últimas décadas, hasta el punto en que su uso en la síntesis o la transformación de materiales para lograr la funcionalidad deseada o requerida en aplicaciones especializadas, es cada vez más frecuente.

Las reacciones de polimerización y formación de copolímeros de injerto, estimuladas por radiación γ , siendo un proceso conocido desde la década de los 60, cobra actualmente una gran importancia y preferencia por no requerir el uso de iniciadores químicos, por la pureza con la que se obtienen los productos finales y por ser aplicables a la mayoría de combinaciones o forma de polímeros o monómeros, tales como fibras o películas, monómeros en fase líquida, vapor o solución [16-17]. Además, la síntesis de copolímeros de injerto usando radiación γ se puede llevar a cabo por diferentes métodos: pre-irradiación e irradiación directa. El método de injerto por irradiación directa también es una vertiente que se suma a las ventajas asociadas al uso de rayos γ al ser comparados con los electrones acelerados, ya que estos últimos, ofrecen un menor grado de penetración sobre los materiales a modificar, lo que limita a la funcionalización del sustrato en su

superficie y no facilita su modificación en su masa [18]. Por su parte, entre las cualidades a resaltar sobre los copolímeros de injerto, figuran la conservación o la mejora de propiedades mecánicas del sustrato y la incorporación de componentes sensibles a estímulos (inteligentes) con respuesta inmediata a su cambio de espesor, cargas en la superficie, humectabilidad o capacidad de hinchamiento [19]. Estas propiedades son de especial interés en aplicaciones biomédicas relacionadas con sistemas implantables de liberación controlada de fármacos, que liberen el principio activo dependiendo de las condiciones del medio y que lo realicen de manera dirigida hacia sitios específicos del organismo. Generalmente, los sistemas de liberación controlada presentan importantes ventajas como son: el incremento de la eficiencia de los tratamientos, reducción de dosis administrada, probabilidad de combinar tratamientos y la reducción de efectos secundarios.

En los últimos años, el Laboratorio de Química de Radiaciones en Macromoléculas del Instituto de Ciencias Nucleares (ICN) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a participado de proyectos multidisciplinarios relacionados directamente con la modificación, por medio de radiación ionizante, de sustratos poliméricos que presentan un uso restringido en aplicaciones como dispositivos biomédicos implantables, debido a que por sus características físico-químicas provocan reacciones adversas e indeseadas al interactuar con sangre o tejidos, o se tornan vulnerables a la colonización con microorganismos patógenos, ampliando así, los factores de riesgo y peligro para el paciente. De igual forma, matrices poliméricas usadas convencionalmente en el área biomédica y que presentan características que los hacen inadecuados para la interacción con biomoléculas y/o productos farmacéuticos, han sido funcionalizados por medio de radiación γ para aumentar su biocompatibilidad, reducir su citotoxicidad y, además de favorecer la interacción del componente bioactivo-polímero, lograr incorporar un comportamiento inteligente que intervenga en el funcionamiento del material a diferentes condiciones fisiológicas de temperatura y pH.

12.2. Polímeros en aplicaciones biomédicas (morfología y función)

Actualmente se puede encontrar un gran número de morfologías que componen el vasto mundo de los polímeros y copolímeros. Los polímeros se pueden representar de manera lineal, ramificada, en forma de peine, estrella, como micelas, macrocíclicos o estructuras reticuladas. Por su parte, los copolímeros se pueden distribuir en orden aleatorio, alternante, en bloques o en forma de injerto (ver Figura 1). El orden de la unidad repetitiva en un copolímero interviene directamente sobre sus propiedades.

En el ámbito de la tecnología farmacéutica, los polímeros clásicos encontraron interesantes aplicaciones como componentes de diversos dispositivos biomédicos comerciales, pero con el constante desarrollo de nuevas técnicas de síntesis de polímeros y su funcionalización, son cada vez más los polímeros sofisticados diseñados y desarrollados principalmente como componentes de sistemas de liberación controlada de fármaco e ingeniería de tejidos. No obstante, la modificación química de polímeros por medio de radiación γ para crear nuevos materiales y aplicaciones, representan una alternativa efectiva para reintegrar a aquellos polímeros, como el propileno (PP), a aplicaciones biomédicas en las que sus usos están siendo limitado debido a los problemas asociados con biocompatibilidad, toxicidad o colonización bacteriana.

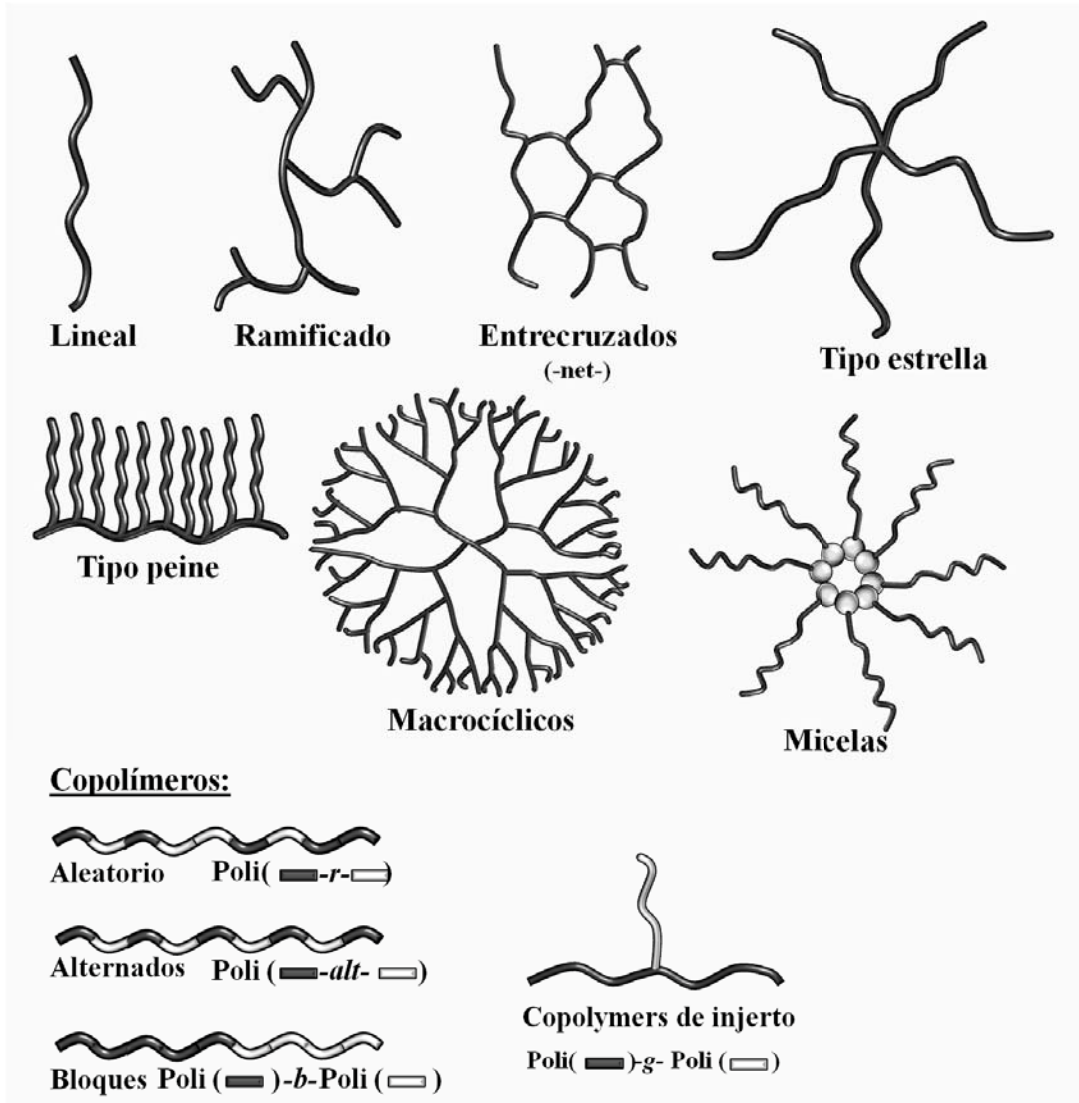


Figura 1. Diferentes morfologías de polímeros sensibles a estímulos y tipos de copolímeros.

12.3. POLÍMEROS INTELIGENTES

La principal característica de este tipo de polímeros es su habilidad para responder a pequeños cambios en las condiciones del medio que lo rodea. Estos materiales pueden experimentar una transición de fase (TF) manifestada con cambios macroscópicos y reversibles en su estructura cuando son alteradas variables del medio como la temperatura, pH, la fuerza iónica, presencia de ciertos metabolitos químicos, adición de polímeros con cargas opuestas, formación de complejos policación-polianión, incidencia de campos magnéticos y eléctricos, luz u otro tipo de radiación electromagnética y composición química del disolvente, entre otros (ver Figura 2) [20-26]. Generalmente, las repuestas son mostradas como cambios reversibles en uno o más de los siguientes aspectos del material: volumen, forma, características de la superficie, solubilidad, transición sol-gel y otros que también se evidencian visualmente.

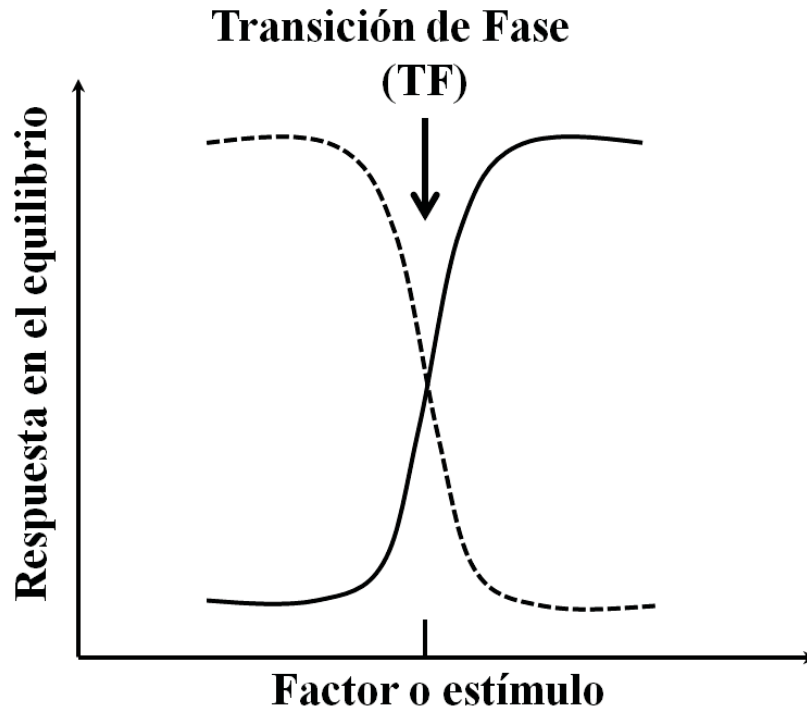


Figura 2. Respuestas de un polímero inteligente a un estímulo en el medio. La línea sólida y la punteada representan una respuesta positiva y negativa, respectivamente.

Concretamente, un estímulo físico aplicado al material afecta sus niveles de energía y altera las interacciones moleculares al atravesar ciertos puntos críticos [27]. Cuando el medio es acuoso, los cambios en la microestructura son producto del paso de un estado hidrofílico a uno hidrofóbico. Por consiguiente, es necesario que la estructura molecular del polímero presente una proporción adecuada de hidrofobicidad e hidrofiliidad para que la TF se produzca en agua [28]. La **Figura 3** muestra esquemáticamente los dos posibles estados de estos polímeros cuando la TF se presenta, el estado colapsado y el hinchado, los cuales dependen de las condiciones del medio.

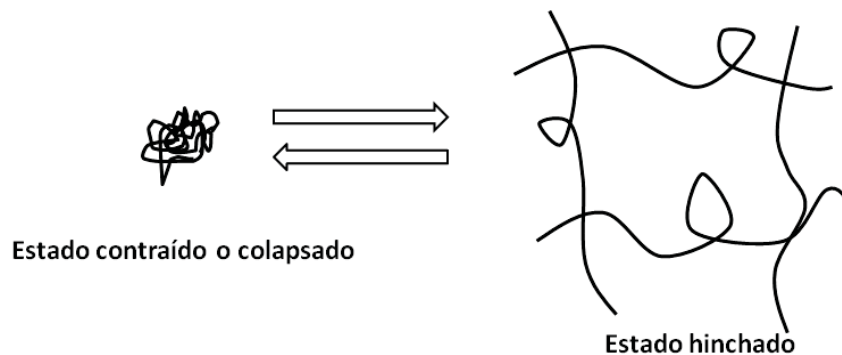


Figura 3. Representación esquemática de un polímero reticulado en su estado contraído e hinchado

El estudio de este fenómeno se inició por la predicción teórica de Dusek y Patterson en 1968 [29]. Sin embargo, la TF en volumen fue experimentalmente demostrada con geles de poliacrilamida (PAm) parcialmente ionizados en una mezcla de acetona/agua por Tanaka en 1978 [30]. Concretamente, esta transición resulta del balance competitivo entre las fuerzas repulsivas y atractivas del sistema. Existen cinco tipos de interacciones a nivel molecular responsables del comportamiento fisicoquímico de sistemas poliméricos: fuerzas de tipo Van der Waals, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas e interacciones originadas por fenómenos de transferencia de carga. En la Figura 4 se representan los cuatro tipos de interacciones más importantes que determinan el comportamiento de fases a nivel molecular, ya sea en un medio homogéneo o heterogéneo, y son las que determinan la aparición de puntos críticos en variables como temperatura y pH.

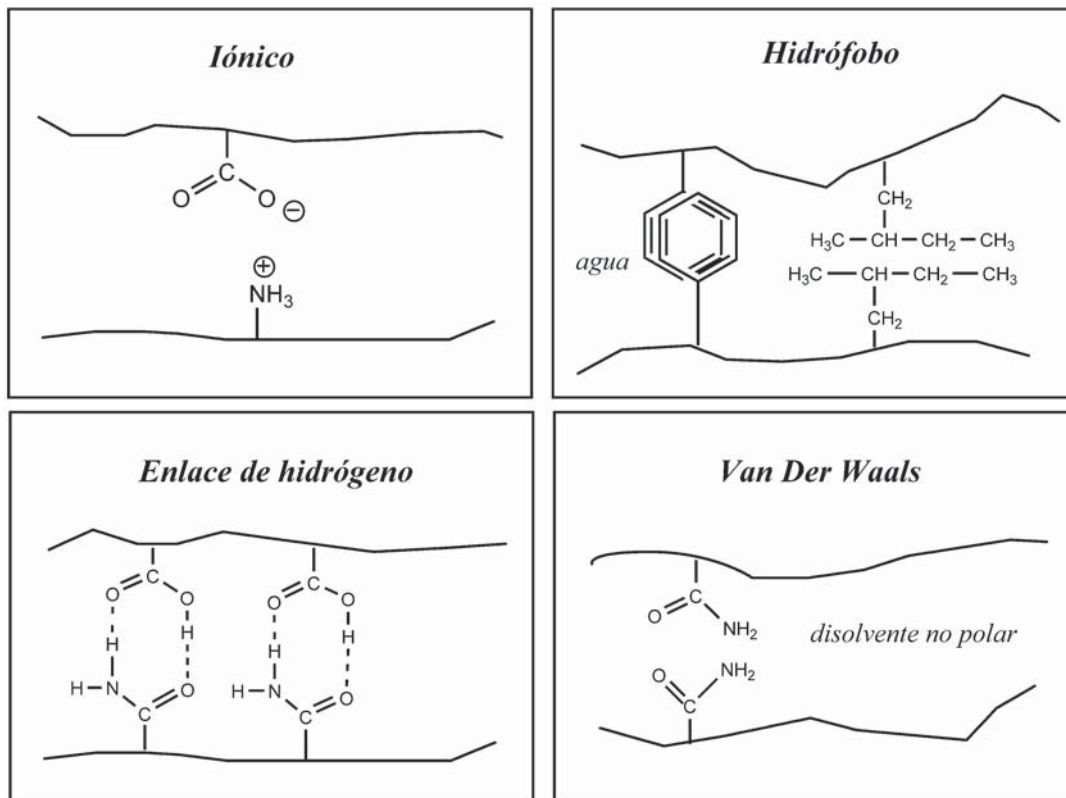


Figura 4. Representación de las cuatro interacciones moleculares fundamentales entre las cadenas de polímeros

El marcado interés sobre los polímeros inteligentes se centra en su capacidad para ser aplicados en un sin número de funciones biomédicas especializadas, entre ellas se destaca la liberación de fármacos, la construcción de membranas de bioseparación, diseño de implantes, ingeniería de tejidos, entre otras. Algunos sistemas han sido desarrollados combinando dos o más mecanismos sensibles en un mismo polímero, como es el caso de los polímeros duales con respuesta simultánea al pH y temperatura. Recientemente, se adelantan investigaciones para el diseño de polímeros inteligentes con respuesta a estímulos bioquímicos como a antígenos, enzimas y agentes bioquímicos.

En casos específicos, la sensibilidad al pH y temperatura en un polímero son aprovechadas para la liberación controlada de fármacos en tejidos tumorales, puesto que éstos presentan un ambiente ácido debido al ácido láctico producido por hipoxia y por organelos intracelulares ácidos [31]. Correspondientemente, el mecanismo de liberación desde el polímero debe facilitarse a los rangos de temperatura en que el cuerpo humano funciona. Teniendo en cuenta estos factores es como varios polímeros inteligentes han sido diseñados para liberar fármacos anticancerígenos en los sitios tumorales, específicamente bajo las condiciones ácidas en las que prevalecen y a temperaturas por encima del nivel normal.

Dependiendo de su forma física, los polímeros inteligentes pueden ser clasificados en tres clases (Figura 5):

- a. **Polímeros con cadenas lineales libres en solución.** En estos las cadenas experimentan un colapso reversible al ser aplicado un estímulo externo.
- b. **Geles reticulados covalentemente o geles físicos.** El hinchamiento o colapso reversible de las redes poliméricas se desencadena por cambios en el medio que los rodea.
- c. **Cadenas injertadas sobre superficies.** Estos polímeros presentan hinchamientos o colapsos reversibles pasando por estados hidrofílicos o hidrofóbicos, según sea su caso, cuando un parámetro externo es modificado.

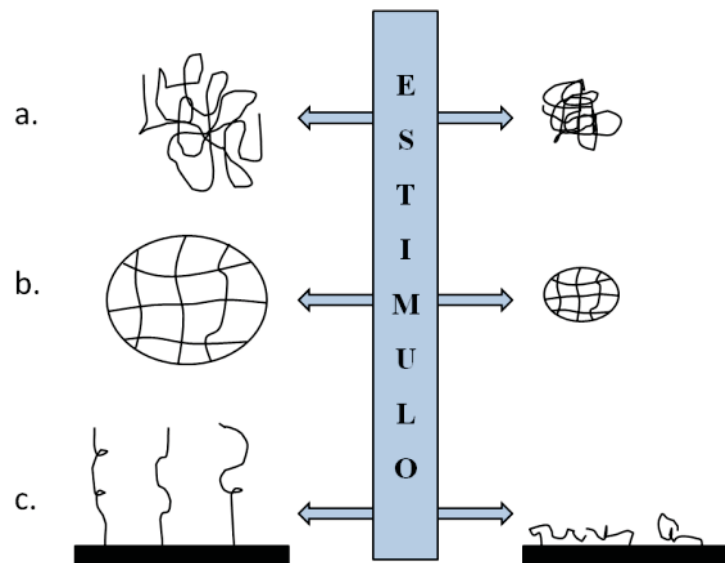


Figura 5. Clasificación de los polímeros inteligentes dependiendo de su forma física.

12.3.1. HIDROGELES

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales, compuestas de polímeros hidrofílicos, con la capacidad de adsorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos, sin disolverse bajo condiciones las fisiológicas [32-34]. Son considerados como los primeros biomateriales diseñados para uso en el cuerpo humano. La clasificación de hidrogeles físicos e hidrogeles químicos depende de la naturaleza de las uniones involucradas en la conformación de la estructura entrecruzada. Por ejemplo, en los hidrogeles físicos la reticulación entre las cadenas del polímero se constituye por uniones débiles que pueden ser originadas por las interacciones entre

los grupos funcionales específicos que conforman la molécula, tales como uniones de tipo Van der Waals o de enlaces de hidrógeno. Por otro lado, los hidrogeles químicos son aquellos en los que la red se encuentra formada a través de enlaces covalentes, por lo que su ruptura implicarían la degradación del material. En materia de hinchamiento una notable diferencia entre los hidrogeles químicos y los hidrogeles físicos reside en que, para los primeros, su estructura entrecruzada químicamente es insoluble en el medio de hinchamiento, mientras que en los segundos, la disolución del polímero es inminente al encontrarse que la entrada del líquido puede separar las cadenas debido a que las fuerzas que las sujetan son sólo de origen físico. No obstante, en cadenas poliméricas entrecruzadas químicamente la entrada del líquido alcanza un límite o grado máximo de hinchamiento, ya que la estructura covalente no puede deformarse indefinidamente. Por el contrario, el hinchamiento de un polímero no entrecruzado (sin entrecruzamiento químico) carece de límite, puesto que la incorporación progresiva del líquido puede conducir a la disolución del polímero y pérdida en la conservación de la forma [35]. . No necesariamente todas las redes poliméricas capaces de absorber disolvente e hincharse en dicho medio adquieren la apariencia de un hidrogel y deben denominarse como tal. Un hidrogel puede estar constituido por IPNs, mientras que una IPN no necesariamente conduce a la formación de un gel o hidrogel, más aún, si alguna de sus redes se compone de polímeros hidrófobos. Así, la diferencia entre estas dos clases de redes radica en la consistencia viscoelástica que adquieren los hidrogeles en su estado hinchado.

El grado de reticulación o entrecruzamiento determina la solubilidad, el porcentaje de hinchamiento, el tamaño de poro del material, el área total superficial y la resistencia mecánica del polímero. Por consiguiente, la elección del agente entrecruzante y de otros monómeros modificadores de propiedades depende del tipo de monómeros base elegido y es fundamental a la hora de optimizar las propiedades de la red polimérica a sintetizar. Existen varios procedimientos para la síntesis de hidrogeles que incluye los siguientes métodos de reticulación: por copolimerización con monómeros polifuncionales, por la presencia de precursores poliméricos, y por la reacción directa o facilitada entre dos cadenas poliméricas (ver Figura 6) [36]. La reticulación puede ser inducida por medio de radiación o reacciones químicas. En el primer caso, la radiación puede estar compuesta por la emisión de electrones acelerados, rayos gamma (γ), rayos X o luz ultravioleta (UV) [37-38]. En el segundo caso, las reacciones químicas para unir cadenas poliméricas pueden promoverse por la adición de agentes de reticulación (moléculas de bajo peso moléculas capaces de enlazar dos cadenas poliméricas o en propagación, a través de sus grupos di- o multifuncionales) [39-40]. Un agente de reticulación comúnmente utilizado es N,N'-methylenebisacrylamide (MBAAm).

Uno de los polímeros ampliamente utilizado en forma de hidrogel para aplicaciones en medicina y farmacia es el poli (N-vinil-2-pirrolidona) (P2VP) [41]. Mientras que la reticulación de este y otros polímeros mediante radiación γ fue reportada Charlesby y Alexander [42]. Nagaoka [43] aplicó radiación γ para inducir la polimerización y reticulación en la síntesis de hidrogeles de poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), un polímero que se caracteriza por su termosensibilidad. Ortega y colaboradores [44] estudiaron y compararon las propiedades de hidrogeles de PNIPAAm preparado por tres métodos diferentes, usando rayos γ en cada uno de ellos. Entre sus resultados encontraron que la irradiación de soluciones acuosas del monómero N-isopropilacrilamida (NIPAAm) en presencia y ausencia de MBAAm conduce a la formación de microestructuras diferentes a las obtenidas por la irradiación de NIPAAm en estado sólido compactado. Otros estudios realizados por Jabbari y Nozari [45] sobre hidrogeles sintetizadas por la irradiación de soluciones acuosas de poli(ácido acrílico) (PAAc), un polímero con sensibilidad al pH del medio, demostraron que la densidad de reticulación aumentaba con la dosis de irradiación (energía) empleadas (de 5 a 25 kGy). Una de las aplicaciones reconocidas de los hidrogeles de PAAc es en sistemas de liberación gastrointestinal [46-47].

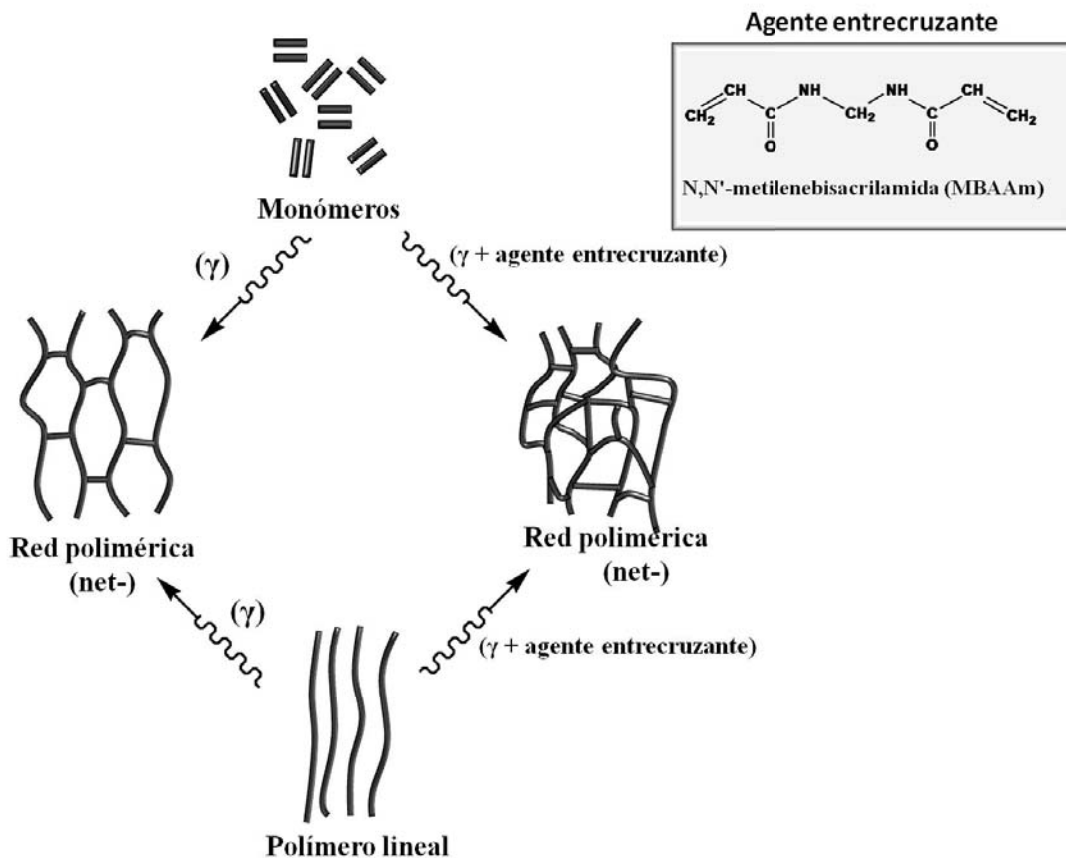


Figura 6. Diferentes métodos para el entrecruzamiento de cadenas poliméricas en presencia o ausencia de agente entrecruzante.

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 los trabajos del grupo de Hoffman [48]. Las diferencias entre los polímeros reticulados por irradiación en presencia y ausencia de un agente reticulante también fueron reveladas por este reconocido investigador. En dichos estudios se estableció que la presencia del agente reticulante afecta el comportamiento del polímero a reticular en la disolución, conduciendo así a estructuras menos homogéneas que las obtenidas sólo por radiación [49].

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 [50], diagnóstico [51], inmovilización celular [52], separación de biomoléculas o células [53] y acarreadores de fármacos [54]. Muchos de estos dispositivos, beneficiarían particularmente las áreas médica y biotecnológicas si se logra un control efectivo de las interacciones moleculares y celulares en la superficie del material [55]. Sin embargo, otras de las desventajas incorporadas al campo de hidrogeles son: que tienen un control limitado de su conformación estructural desde el momento de la síntesis, responden lentamente a estímulos externos y presentan bajas propiedades mecánicas. Pero la mejora de propiedades biomecánicas de los hidrogeles, la síntesis de hidrogeles injertadas con estructuras tipo peine que le garantizan una rápida respuesta a estímulos externos, el desarrollo de mezclas poliméricas para formar IPNs y la preparación de hidrogeles

injertados sobre soportes poliméricos; son algunos de los muchos ejemplos de los biomateriales desarrollados con un futuro promisorio.

12.3.2. CADENAS DE POLÍMEROS INTELIGENTES INJERTADAS SOBRE SUPERFICIES

En similitud a los polímeros reticulados inteligentes, aquellos que se componen de cadenas poliméricas lineales inteligentes injertadas sobre superficies o membranas también poseen la cualidad de absorber agua en su estructura, hasta alcanzar un equilibrio fisicoquímico, aunque su capacidad de retención depende de la estructura general de la macromolécula y de la hidrofiliidad tanto del polímero injertado como de la superficie modificada. La cantidad de agua absorbida en estos polímeros no es considerable si la superficie que los soporta tiene un carácter netamente hidrofóbico. Por otro lado, la absorción de agua puede ser extremadamente elevada cuando las cadenas inteligentes hidrofílicas se injertan sobre matrices o superficies que también poseen un alto carácter hidrofílico e inteligente. Como ejemplo de estos dos casos se tienen los copolímeros de PP injertados con PNIPAAm y los hidrogeles de PAAc a los que se les injertó cadenas tipo peine, unas del mismo polímero PAAc y otras de PNIPAAm [56]. Las reacciones para la síntesis de estos copolímeros de injerto fueron promovidas por electrones acelerados y radiación γ . Estos trabajos fueron realizados por Burillo y Bucio en el Laboratorio de Química de Radiaciones en Macromoléculas en el ICN de la UNAM.

La fuerza conductora de la TF de estos polímeros la brindan las cadenas del polímero injertado sobre una superficie. La conformación de dichas cadenas inducen los cambios de estado en el polímero. Cuando las cadenas injertadas adquieren una conformación que las hace solubles en el medio acuoso, la superficie gana propiedades hidrofílicas; mientras que a las condiciones en que las cadenas injertadas logran colapsar o ser insolubles, la superficie se torna hidrofóbica.

12.3.2.1. POLÍMEROS TERMOSENSIBLES

La mayoría de moléculas son más solubles cuando son calentadas, pero algunos polímeros solubles en agua presentan una separación de fase cuando son sometidos al calor. Aquellos polímeros, sensibles a la temperatura, exhiben un punto crítico o temperatura de solución crítica inferior (LCST, por sus siglas en inglés: *Lower Critical Solution Temperature*) en medios acuosos. En este punto, partes de la macromolécula son solubles en agua a bajas temperaturas, pero son insolubles a temperaturas superiores a la LCST [57]. El valor o posición de la LCST puede experimentar variaciones por modificaciones hechas sobre la estructura química del polímero. La incorporación de grupos hidrofílicos incrementa el valor de temperatura en que la TF ocurre, mientras que la adición de grupos hidrofóbicos disminuye dicho valor [58]. Las diferentes técnicas de copolimerización pueden ser empleadas para la introducción de estos grupos sobre la macromolécula, siendo de gran utilidad las reacciones de injerto inducidas por radiación ionizante.

Desde una perspectiva fisicoquímica, la LCST 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, y por tanto, depende en gran medida de las capacidades de las cadenas para establecer enlaces de hidrógeno entre sí [28].

Generalmente, los polímeros sensibles a la temperatura son sintetizados a partir de monómeros que aportan segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos que intervienen en el

establecimiento de interacciones inter e intramoleculares asociadas a la estructura del sistema. Esto permite clasificarlos en los siguientes grupos:

- a. Poli(acrilamidas N-alquil-sustituidas). Entre estas se destaca el PNIPAAm, que presenta una LCST entre un rango de 30 a 35 °C, dependiendo de la microestructura de la macromolécula [59-60]. PNIPAAm es uno de los polímeros termosensibles más estudiado por sus características que lo hace especial para su uso en aplicaciones biomédicas, tales como la liberación controlada de fármacos y la ingeniería de tejidos [61-63]. Sus aplicaciones van desde la purificación de proteínas, bioseparación de ácidos nucleicos como el ARN, de ADN plasmídico y esteroides, inmovilización de enzimas, biosensores, absorción de iones metálicos y nanopartículas, tejidos artificiales, liberación de fármacos, cromatografía termosensible, renaturalización de proteínas, membranas de microfiltración, entre muchas otras [28, 64-68].
- b. Poli(N-vinilalquilamidas). La poli(N-vinilcaprolactama) (PVCL) con una LCST entre 32-35 °C, que depende del peso molecular del polímero, representa un ejemplo importante de esta clase de materiales.
- c. Algunos polióxidos, poliglicoles o derivados de celulosa. Entre estos se destacan el poli(óxido de etileno) (POE), polietilenglicol (PEG), etilhidroxietil celulosa (EHC) [22]; copolímeros de poli(óxido de propileno-co-óxido de etileno) (POPP-co-PO) y el copolímero tribloque de poli(ácido láctico)/polietilenglicol/poli(ácido láctico) (PAL-PEG-PAL) [28].

Transiciones como la LCST han mostrado un gran potencial para aplicaciones en bioingeniería y biotecnología. Para los dispositivos implantables se requiere que la respuesta de estos sistemas se asocie a los cambios de temperatura del paciente en los que se pretende implantar el dispositivo. Por consiguiente, se quiere diseñar materiales inteligentes que liberen sustancias bioactivas cuando la temperatura corporal rebasa un determinado valor, para que actúe inmediatamente sobre la restauración de la temperatura del paciente. Una vez restablecida la temperatura corporal a valores normales, la salida del fármaco de la matriz polimérica debe disminuir drásticamente o incluso inhibirse completamente debido a la recuperación del volumen inicial del polímero. En definitiva, para estos sistemas, la liberación de un fármaco depende de la temperatura del paciente en donde se implante el módulo.

El estudio sobre los polímeros termosensibles inició en 1978, cuando Tanaka observó la TF en polielectrolitos de derivados de PAm, tales como: NIPAAm, dietilacrilamida (DEAAm) y dimetilacrilamida (DMAAm), entre otros [30]. Por otro lado, existen polímeros termosensibles que exhiben un comportamiento opuesto al presentado en la LCST. Estos materiales se comportan de manera hidrofóbica a temperaturas bajas e hidrofílicamente a temperaturas altas. El punto crítico que demarca esta transición se conoce como Temperatura de Solución Crítica Superior (*Upper Critical Solution Temperature*, USCT por sus siglas en inglés) y ha sido observado en mezclas de poliestireno/polimetilmetacrilato (Ps/PMMAc) [69]. Bucio y colaboradores han sintetizado copolímeros de injerto en forma de películas empleando radiación γ como iniciador de la polimerización. Al final obtuvieron resultados interesantes y novedosos en el comportamiento de estos materiales: presentan una LCST en medios neutros (pH = 7.0), mientras que a valores de pH ácido (pH = 2.0) se evidencia una USCT [70]. Estas transiciones se atribuyen

a la presencia del poli(N,N'-dimetilaminoetilmetacrilato) (PDMAEMA) en las cadenas del polímero. Los sistemas sintetizados en esta investigación son:

- a. PP-g-PDMAEMA: éste material presenta una LCST a 29 °C en medios neutros. Cuando se introduce en soluciones acuosas a pH 2.2 la LCST desaparece y se observa una UCST a alrededor de 38 y 42 °C [71].
- b. PP-g-(DMAEMA/4-vinilpiridina (4VP)): en éste sistema se injertó la mezcla monomérica de DMAEMA/4VP en un solo paso, por efecto de la radiación gamma. En iguales condiciones que el sistema anterior, presenta una LCST a 34 °C y una UCST a 30 °C [72].
- c. (PP-g-PDMAEMA)-g-4VP: su síntesis se realizó secuencialmente. En primera instancia se injertó el monómero DMAEMA sobre la película de PP para formar el sistema PP-g-PDMAEMA. Seguidamente, se injertó el monómero 4VP sobre dicho sistema. La UCST de estos materiales a pH neutro se presentó sobre los 30 °C. Sin embargo, al aumentar el porcentaje de 4VP injertado, se evidencia la aparición simultánea de una segunda UCST alrededor de los 45 °C [72].
- d. (PP-g-PDMAEMA)-g-PNIPAAm: al igual que el sistema anterior, la síntesis de este copolímero se llevó a cabo en dos etapas [73]. Este sistema presenta dos LCST debido al PDMAEMA (29 °C) y al PNIPAAm (32 °C) y una UCST en medios ácidos.

Tal como lo evidencian estos polímeros, contrario a cómo sucede en la LCST, la adición de grupos o monómeros hidrofílicos al sistema disminuye el valor de la UCST de un polímero, mientras que la incorporación de grupos hidrófilos aumenta dicho valor. Tanto la LCST como la UCST son transiciones de vital importancia para el estudio y caracterización de los polímeros sintetizados en la investigación de polímeros para aplicaciones médicas.

12.3.2.1 POLÍMEROS SENSIBLES AL pH

Los polímeros sensibles al pH usualmente contienen grupos ionizables entre su estructura, tales como grupos carboxílicos y amino. Cuando estos grupos son ionizados, una substancial presión osmótica de hinchamiento es generada dentro del polímero, causando una alteración del volumen hidrodinámico de las cadenas del polímero o que su capacidad de adsorción de agua se incremente significativamente (este hinchamiento frecuentemente se presenta en mayor grado en estructuras reticuladas como hidrogeles) [74-76]. La ionización de los grupos funcionales depende de un aparente pK_a en el polímero. En el PAAc, por ejemplo, el establecimiento y preferencia de formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos ionizados (carboxilatos, $-COO^-$) y el agua del medio, hacen que el grado de hinchamiento aumente. Además, la repulsión de cargas entre esos aniones también refuerza el hinchamiento, ya que obliga a que las cadenas del polímero permanezcan lo más separadas posibles, permitiendo el paso de las moléculas de agua hacia el interior de la matriz. Las cadenas poliméricas que contienen grupos carboxilo sin ionizar adoptan arreglos en forma de ovillos (contraído) cuando se encuentran en solución. Cuando la cadena contiene un número considerable de grupos ionizados (grupos carboxilato) prefiere expandirse o estirarse sobre el medio, lo que conduce a la absorción de grandes cantidades de agua. Esta TF experimentada en estos polímeros se denomina “pH crítico”, se presenta en rangos cortos de pH y es una característica que incide en el comportamiento inteligente. En la Figura 7 se observa los arreglos adoptados por las cadenas de un polímero en solución en sus estados neutro e ionizado, dependiendo del ajuste de pH del medio. Cabe resaltar

que este comportamiento es similar para redes poliméricas o cadenas injertadas sobre una superficie.

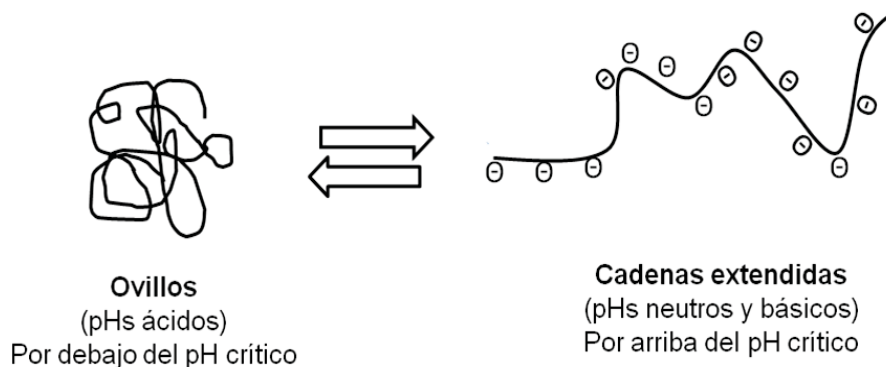


Figura 7. Conformaciones estructurales de las cadenas de un polielectrolito en dependencia del pH de la solución.

El AAc es uno de los monómeros más relevantes a la hora de sintetizar injertos sobre diferentes sustratos poliméricos para obtener sistemas sensibles al pH del medio. Para el PAAc se ha reportado un pH crítico sobre pH 5.0 y 6.0. Su uso se ha evidenciado en la combinación con otros polímeros para la construcción de variados materiales sensibles al pH y la temperatura, entre ellos se destacan: IPNs compuestas de alcohol polivinílico (PAV) y PAAc, sintetizadas por irradiación UV para su aplicación como sensores en áreas biológicas y químicas [77]; hidrogeles de poli(hidroxietilmetacrilato (HEMA)-co-PAAc) preparadas por fotopolimerización para la construcción de válvulas biomiméticas [78]; copolímeros aleatorios de PAAc y ácido poli(vinil sulfónico) para el diseño de músculos artificiales [79], entre muchos otros. Burillo sintetizó copolímeros de injerto de la mezcla monomérica NIPAAm/AAc sobre películas de politetrafluoroetileno (PTFE), generando así el sistema: PTFE-g-(PAAc/PNIPAAm), el cual presenta una sensibilidad dual (temperatura y pH). Las reacciones de injerto se indujeron por radiación γ , empleando el método de pre-irradiación en presencia de aire [80]. Seguidamente, Bucio y Burillo modificaron el sistema anterior injertando NIPAAm y AAc en dos pasos, produciendo así el sistema (PTFE-g-PAAc)-g-PNIPAAm [81]. La incorporación de grupos carboxílicos sobre determinados polímeros ofrecen además una alternativa de actuar como intermediarios en un posterior acople o reacción con otros grupos funcionales presentes en otros materiales, como lo son los grupos terminales aminos de algunos POE, que por medio del método de activación carbodiimida, forman un polímero que puede ser usado directamente para la interacción con heparina. En general, los grupos carboxílicos tienen la capacidad de someterse a futuras reacciones químicas, para producir así nuevos grupos funcionales [82].

Los copolímeros de metacrilato de metilo (MAcM) y ácido metacrílico (AMAc) colapsan a valores de pH alrededor de 5.0, mientras que copolímeros de MAcM con DMAEMA son solubles a pH ácido, pero colapsan en soluciones alcalinas [83]. DMAEMA es uno de los pocos polímeros con respuesta dual: exhibe una LCST entre 38-42 °C y un pH crítico a 5.4 [70].

Los sistemas de rápida respuesta son de amplio requerimiento en el desarrollo de sistemas de liberación de drogas para el tratamiento de tumores. Se conoce que el pH extracelular alrededor del tumor está 0.2 unidades por debajo de los valores representativos para los tejidos sanos [84-

[85]. El uso de radiación γ puede combinar polímeros sensibles al pH que presentan propiedades de rápida respuesta, con diferentes matrices poliméricas utilizadas comercialmente, para con ellos desarrollar sistemas efectivos de liberación controlada de fármacos que actúen sobre sitios específicos del organismo. Muchas reacciones de injerto sobre la superficie o en masa de matrices poliméricas están soportadas en este concepto.

El primer trabajo sobre el hinchamiento dinámico de redes sensibles al pH fue realizado por Katchalsky, quien estableció que el colapso y la expansión de geles de PAMAc ocurren reversiblemente ajustando el pH del medio [86]. Khare y Peppas estudiaron la cinética de hinchamiento del PAAc, encontrando que tal hinchamiento depende directamente del pH y de la fuerza iónica [87]. De esta manera, hasta la fecha se han realizado y publicado un sinnúmero de investigaciones de polímeros sensibles al pH, empleando monómeros o polímeros como los mencionados.

12.3.2. REDES INTELIGENTES INTERPENETRADAS (IPNS)

Las redes poliméricas interpenetradas (IPNs) son una combinación de dos o más polímeros en forma de red, con por lo menos uno de esos polímeros polimerizado y/o reticulado en la inmediata presencia del otro(s). Las IPNs pueden ser principalmente secuenciales o simultáneas. Durante la formación de las IPNs, una primera red polimérica es afectada a nivel molecular con la interpenetración de otro polímero o red polimérica. En la Figura 8 se muestra dos tipos de IPNs: Semi-IPN, compuesta de dos polímeros, uno lineal y uno reticulado; e IPN compuesta de dos polímeros reticulados, estos polímeros son termofijos y no pueden fluir sin el rompimiento de los enlaces químicos.



Figura 8. Esquema de formación de una semi-IPN y una IPN.

Entre las IPNs que incluyen la presencia de un polímero termosensible como el PNIPAAm y un polímero con sensibilidad al pH como el PAAc, se destacan aquellas en forma de microgeles para la liberación controlada de dextrano [54]. El grupo de macromoléculas del ICN ha trabajado en la síntesis de IPNs secuenciales (en etapas) en matrices poliméricas hidrófobas activadas mediante radiación γ e injertando estos dos polímeros inteligentes: PNIPAAm y PAAc. Recientemente, Burillo y colaboradores sintetizaron IPNs de PNIPAAm y PAAc, empleando radiación γ para construir inicialmente la red de PAAc, e iniciadores redox y MBAAm como agente entrecruzante para la polimerización de la segunda red de PNIPAAm [88]. Ruiz [89], sumado al grupo de investigación de Bucio y Burillo, también sintetizó IPNs con estos dos polímeros estímulo-sensibles, incluyendo una matriz de PP como soporte, para su aplicación en la carga y liberación local de vancomicina, un antibiótico eficaz en el tratamiento contra bacterias gram positivas resistentes a la metilicina, como el *Staphylococcus aureus*. La IPN sintetizada fue *net-PP-g-*

PAAC-*inter-net*-PNIPAAm y las etapas de preparación se muestra en la [Figura 9](#). Para dicho proceso fue utilizada una fuente de radiación γ de ^{60}Co , a dosis de 30 kGy, para injertar el PAAC sobre el PP por medio del método de preirradiación oxidativa, mientras que la reticulación de las cadenas de PAAC fue realizada por irradiación directa. La inclusión de la segunda red de PNIPAAm se llevó a cabo por polimerización redox. Al final, el contenido de PNIPAAm fue bajo (12 %), lo que condujo a una baja sensibilidad del polímero a la temperatura.

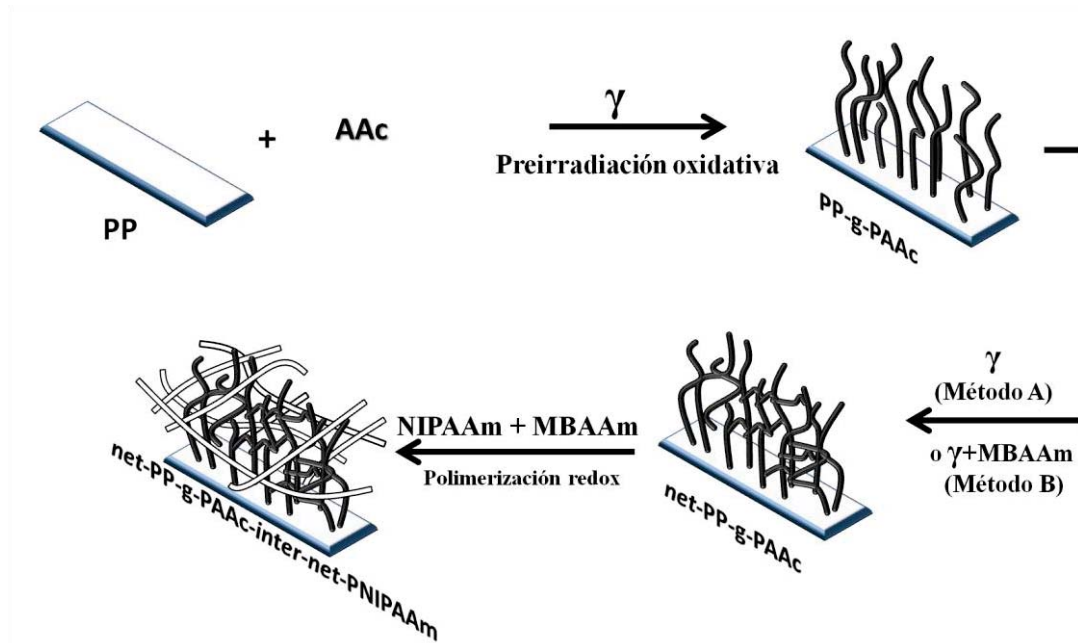


Figura 9. Esquema de síntesis de la IPN *net-PP-g-PAAC-inter-net-PNIPAAm*

La calorimetría de titulación isotérmica (CTI) es una herramienta eficaz y de alta sensibilidad para cuantificar las interacciones entre fármacos y ciclodextrinas o monómeros [\[90-91\]](#). Una cuantificación realizada sobre la interacción de vancomicina con NIPAAm, el AAc y su sal sódica, el acrilato de sodio (NaAc), reveló que la interacción del fármaco con NaAc era cuatro veces mayor a la del AAc, lo que indica su preferencia por monómeros en estado ionizado. Por su lado, la interacción con NIPAAm fue prácticamente despreciable. Teniendo en cuenta estos estudios, se realizó la síntesis del sistema *net-PP-g-PNIPAAm-inter-net-PAAC*, injertando primero PNIPAAm por el método de preirradiación oxidativa, luego reticulando por irradiación directa y finalmente interpenetrando la red de PAAC por polimerización redox estimulada por UV [\[92\]](#). Este polímero presentó una alta sensibilidad a la temperatura y al pH del medio, y presentó altas capacidades de carga de vancomicina. Sin embargo, luego fue realizada la síntesis de estas IPNs, utilizando radiación γ en todas las etapas involucradas en su síntesis, con la finalidad de reducir los riesgos tóxicos de incluir iniciadores redox para la polimerización de AAc [\[93\]](#). En este trabajo, la primera red de PNIPAAm injertada sobre PP fue realizada por irradiación γ en presencia y ausencia de MBAAm. La red de PAAC se realizó a dosis relativamente bajas de irradiación (2.5 kGy). Las IPNs *net-PP-g-PNIPAAm-inter-net-PAAC* obtenidas presentaron respuesta dual al pH y temperatura e incrementaron su capacidad de carga de vancomicina, debido a que la cantidad de PAAC polimerizada por irradiación directa fue mayor a las IPNs obtenidas con otro método [\(ver Figura 10\)](#).

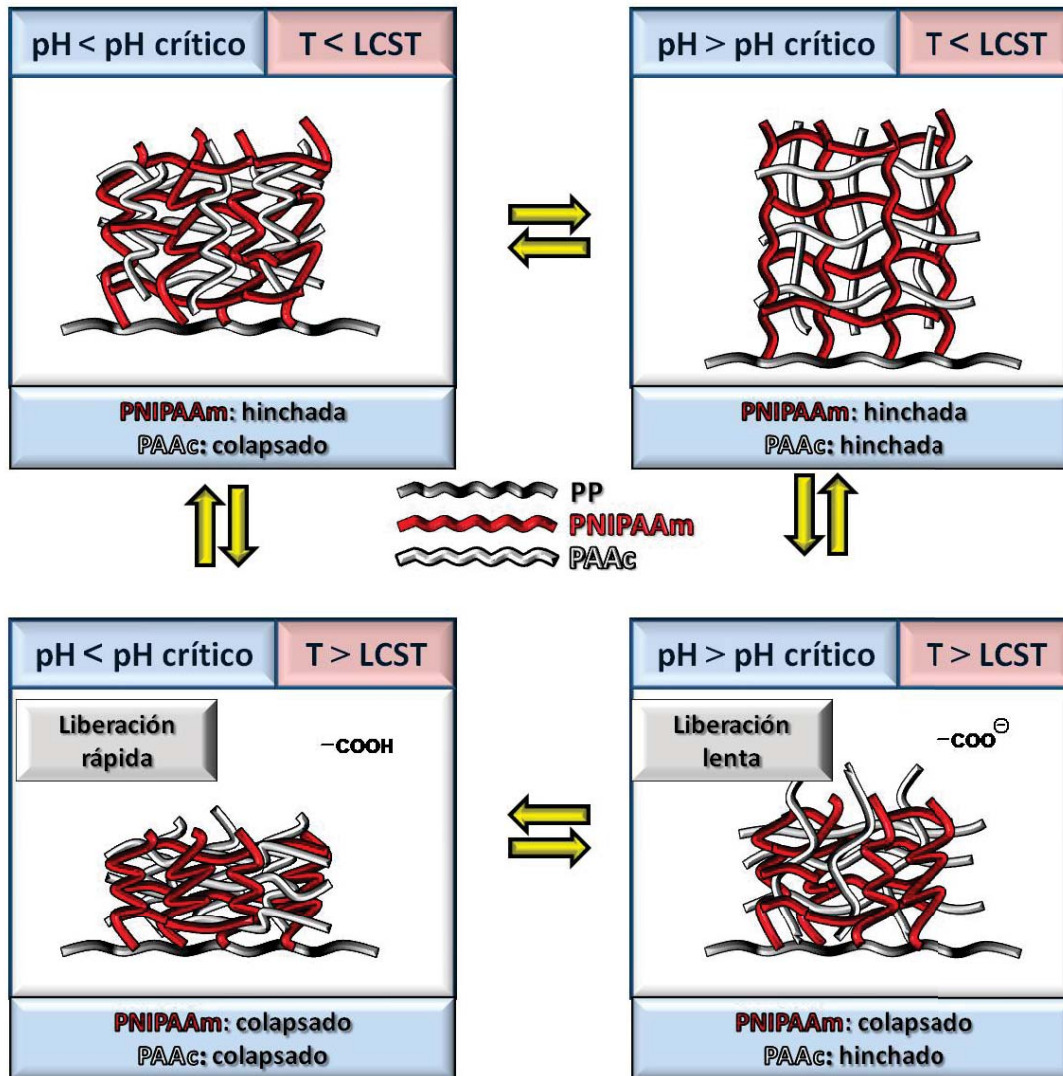


Figura 10. Esquema de respuesta a la temperatura y al pH para las IPNs *net-PP-g-PNIPAAm-inter-net-PAAc*

Recientemente se evaluó el efecto de la dosis y la inclusión de agente reticulante (MBAAm) sobre la síntesis de la primera red (*net-PP-g-PNIPAAm*), encontrándose la irradiación a 10 kGy y en ausencia de MBAAm conduce a IPNs con una mayor respuesta inteligente y una mayor capacidad de carga y liberación de vancomicina [94]. Entre las aplicaciones que se buscan para este polímero se destaca su uso como dispositivo biomédico implantable con la capacidad de inhibir el crecimiento y la colonización bacteriana, que son riesgos presentes desde el momento de su inserción.

Los resultados de estas investigaciones centradas en la síntesis y caracterización de polímeros inteligentes sensibles a la temperatura y al pH, a partir de PNIPAAm y PAAc, han despertado un gran interés por que su comportamiento reversible en respuesta a la variación de las condiciones del medio, puede ser aplicado a funciones biomédicas como liberadores o dosificadores de fármacos específicos, proteínas y DNA.

12.4. APLICACIONES MÉDICAS

El uso de hidrogeles o materiales injertados como biomateriales ha ganado gran importancia dada su baja toxicidad y la alta biocompatibilidad [95]. Una de las ventajas de los polímeros sensibles a estímulos radica en su capacidad para experimentar TF de primer orden con el cambio de algún parámetro externo como pH, temperatura, fuerza iónica y campo eléctrico [96]. 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 [97].

12.4.1. DISPOSITIVOS COMBINADOS

La combinación de dispositivos médicos con productos farmacéuticos representa una nueva tendencia en 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 [98]. 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 [99]. Los fármacos son clínicamente administrados por diversas vías: tópica (nasal, cutánea, ocular), oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, sublingual o se aplican a nivel local [100]. 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, a menudo se aplican estrategias de liberación local de fármacos para tratar la trombosis, osteomielitis, periodontitis, infecciones relacionadas con dispositivos biomédicos y otras patologías microbianas, así como complicaciones inflamatorias refractarias a los métodos convencionales de administración sistémica de fármacos. 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 [101]. 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 [102]. 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 [103].

12.4.2. 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 embolicas, injertos vasculares, articulaciones, marcapasos, stents coronarios y para cirugía estética implica importantes riesgos de infección [104]. 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.

12.4.2.1. BIOFILM O BIOPELÍCULA

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 [105-106], 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 [107]. Una vez que se forma el biofilm, las bacterias pueden convertirse en organismos satélites que se liberan del biofilm, migrando y adhiriéndose 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 [104]. 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 [108]. La diseminación sistémica de infecciones inducidas por un implante es una complicación seria (sepsis). Por lo tanto, hay que remover el dispositivo frecuentemente para tratar la infección local y sistémicamente [109, 110].

12.4.2.2. 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 bacteriúricas [111]. Los pacientes con evacuación controlada por cateterización intermitente tienen una frecuencia de infección de 30 a 70% [112]. 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 [113], 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 [114]. 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* [115-116].

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la M.L. Escamilla y M. Cruz de ICN-UNAM para la asistencia técnica. Este trabajo fue apoyado por DGAPA-UNAM IN202311, CONACYT-CNPq 174378, y “Red iberoamericana de nuevos materiales para el diseño de sistemas avanzados de liberación de fármacos en enfermedades de alto impacto socioeconómico” (RIMADEL), CYTED 211RT0423.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Gupta, B. Anjum, N. 2003. *Adv Polym Sci.* 162: 35-61.
- [2]. Schierholz, J.M. Beuth, J. 2001. *J Hosp Infect.* 49: 87-93.
- [3]. Castner, D.G. Ratner, B.D. 2002. *Surf Sci.* 500: 28-60.
- [4]. Raad, I.I. Hanna, H.A. 2002. *Arch Intern Med.* 162: 871-878
- [5]. Raad, I. Hanna, H. Maki, D. 2007. *Lancet Infect. Dis.* 7: 645-657.
- [6]. Cosson, M. Debodinance, P. Boukerrou, M. et al. 2003. *Int Urogynecol J.* 14: 169-178.
- [7]. Freytag, C.C. Thies, F.L. Konig, W. et al. 2003. *Infection.* 31: 31-37.
- [8]. Schneider, B.L. Schwenter, F. Pralong, W.F. et al. 2003. *Mol Ther.* 7: 506-514.
- [9]. Piozzi, A. Francolini, I. Occhiaperti, L. et al. 2004. *Int J Pharm.* 280: 173-183.
- [10]. Anjum, N. Gulrez, S.K.H. Singh, H. et al. 2006. *J Appl Polym Sci.* 101: 3895-3901.
- [11]. Raad, I. Reitzel, R. Jiang, Y. et al. 2008. *J Antimicrob Chemother.* 62: 746-750.
- [12]. Friedrich, J. Kühn, G. Mix, R. et al. 2004. *Plasma Process Polym.* 1: 28-50.
- [13]. Siow, K.S. Britcher, L. Kumar, S. et al. 2006. *Plasma Process Polym.* 3: 392-418.
- [14]. Wang, W. Wang, L. Chen, X. et al. 2006. *Macromol Mater Eng.* 291: 173-180.
- [15]. Truica-Marasescu, F. Pham, S. Wertheimer, M.R. 2007. *Nucl Instrum Methods B.* 265: 31-36.
- [16]. Chapiro, A. *Radiation Chemistry of Polymeric Systems*, Wiley and Sons: New York, 1962.
- [17]. Clough, R.L. 2001. *Nucl Instrum Methods B.* 185: 8-33
- [18]. Gupta, B. Anjum, N. Jain, R. et al. 2004. *Polym Rev.* 44: 275-309.
- [19]. Kaetsu, I. 1995. *Nucl Instrum Methods B.* 105: 294-301.
- [20]. Khare, A.R. Peppas, N.A *Polymer News.* 1991. 16, 230.
- [21]. Ayano, E. Suzuki, Y. Kanazawa, M. 2007. *J. Chromatogr. A.* 213: 1156.
- [22]. Yoo, M.K. Sung, Y.K. Lee, Y.M. 2000. *Polymer.* 41: 5713.
- [23]. Bradley, M. Ramos, J. Vincent, B.M. 2005. *Lagmuir.* 21: 1209.
- [24]. Lomadze, N. Schneider, H-J. 2005. *Tetrahedron Lett.* 46: 751.
- [25]. Kabanov, V.A. 1994. *Polym Sci.* 36: 143.
- [26]. Leclercq, L. Boustta, M. Vert, M.. 2003. *J Drug Target.* 11: 129.
- [27]. Galaev, I. Gupta, M.N. Mattiasson, B. 1996. *CHEMTECH.* 26: 19
- [28]. Kumar, A. Galaev, L. Mattiasson, B. 2007. *Prog. Polym. Sci.* 32: 1205
- [29]. Dusek, K. Patterson, D.J. 1968. *Polym. Sci. Part A-2.* 6: 1209.
- [30]. Tanaka, T. 1978. *Phys. Rev. Lett.* 40: 820.
- [31]. Krasia, T. Soula, R. Borner, H.G. 2003. *Chem.* 538.
- [32]. Chen, G. Hoffman, A.S. 1995. *Nature.* 373: 49-52
- [33]. Holtz, J.H. Asher, S.A. 1997. *Nature.* 389: 829-832
- [34]. Yoshida, R. Ucida, K. Kaneko, Y. et al. 1995. *Nature.* 374: 240-242.

- [35]. De Gennes, P.G. *Scaling Concepts in Polymer Physics*. Cornell University Press, Ithaca, New York. 1979.
- [36]. Borzacchiello, A. Ambrosio, L. Structure-property relationships in Hydrogels. In *Hydrogels: Biological properties and applications*, ed. R. Barbucci. 9-20. Springer-Verlag. Milan. Italia. 2009.
- [37]. Ikada, Y. Mita, T. Horii, F. et al. 1977. *Radiat Phys Chem.* 9: 633-645.
- [38]. Kaetsu, I. 1993. *Advances in polymer science*. Berlin: Springer. 105: 81-97.
- [39]. Andrade, J.D. 1976. *ACS Symposium*. American Chemical Society. 31: 1-37.
- [40]. Peppas, N.A. 1987. *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, Vol. I. Boca Raton: CRC Press.
- [41]. Peppas, N.A. Klier, J. 1991. *J Control Release.* 16: 203-214
- [42]. Charlesby, A. Alexander, P. 1955. *Chim Phys. PCB.* 52: 699-709
- [43]. Nagaoka, N. Safranji, A. Yoshida, M. et al. 1993. *Macromolecules* 26: 7386-7388
- [44]. Ortega, A. Bucio, E. Burillo, G. 2007. *Polym Bull.* 58: 565-573
- [45]. Jabbari, E. Nozari, S. 2000. *Eur Polym J.* 36: 2685-2692
- [46]. Gurny, R. Junginger, H.E. 1990. *Bioadhesion: possibilities and future trends*. Stuttgart: Wissen Schaftliche Verlagsgesellschaft.
- [47]. Lenaert, V. Gurny, R. 1990. *Bioadhesive drug delivery systems*. Boca Raton: CRC Press.
- [48]. Hoffman, A. S. J. 1987. *Control. Release.* 6: 297.
- [49]. Hoffman, A.S. 1977. *Radiat Phys Chem.* 9: 207-219
- [50]. Lee, K.Y. Mooney, D.J. 2001. *Chem. Rev.* 101. 1869.
- [51]. Van der Linden, H. J. Herber, S. Olthuis, W. et al. 2003. *Analyst.* 128: 325.
- [52]. Jen, A.C. Wake, M.C. Miko, A.G. 1996. *Biotechnol. Bioeng.* 50: 357.
- [53]. Wang, K. Burban, J. Cussler, E. 1993. *Hydrogels as separation agents. Responsive gels: volume transitions II.* 67.
- [54]. Hoare, T. R. Kohane, D.S. 2008. *Polymer.* 49: 1993.
- [55]. Cole, M. A. Voelcker, N. H. Thissen, H. et al. 2009. *J. Biomaterials* 30: 1827.
- [56]. Bucio, E. Burillo, G. Adem, E. 2005. *Macromol. Mater. Eng.* 290: 745.
- [57]. Yan, L. Zhu, Q.. Kenkare, P.U. 2000. *J. Appl. Polym. Sci.* 78: 1971.
- [58]. Xue, W. Champ, S.. Huglin, M.B. 2004. *Euro. Polym. J.* 40: 703.
- [59]. Heskin, M.. Guillet. J.E. 1968. *J. Macromol. Sci. Chem.* A2. 1441.
- [60]. Hoffman, A.S. Stayton, P.S. Bulmus, V. et al. 2000. *J Biomed Mater Res.*52: 577-586.
- [61]. Bromberg, L.E. Ron, E.S. 1998. *Adv Drug Deliv Rev.* 31: 197-221.
- [62]. Zhang, X.Z. Wu, D.Q. Chu, C.C. 2004.. *Biomaterials.* 25: 3793-3805
- [63]. Xu, X.D. Wei, H. Zhang, X.Z. et al. 2007. *J Biomed Mater Res. A.* 81: 418-426.
- [64]. Liang, L. Shi, M. Viswanathan V.V. 2000. *J. Membrane. Sci.* 177: 97.
- [65]. Arica, M.Y. Oketem, H.A. Oketem, Z. 1999. *Polym Int.* 48: 879.
- [66]. Jeong, B. Gutowska, A. 2002. *Biotechnology.* 20: 305.
- [67]. Balan, S. Murphy, J. Galaev. I. 2003. *Biotechnol. Lett.* 25. 1111.
- [68]. Somnath, S. Dean, C. Webster, J. 2007. *Int. J. Pharmaceut.* 341 : 68.
- [69]. Percot, A. Zhu, X.X. Lafleur, M. 2000. *J. Polym. Sci. Pol. Phys.* 38: 907.
- [70]. Burillo, G. Bucio, E. Arenas. E. 2007. *Macromol. Mater. Eng.* 292: 214
- [71]. Ruiz, J.C. Bucio, E. Burillo, G. 2004. *Rev. Soc. Quim. Mex.* 48: 208
- [72]. Bucio, E. Aliev, R. Burillo, G. 2002. *Polym Bull.* 47: 571.
- [73]. Melendez, H.I. Bucio, E. 2008. *Polym. Bull.* 61: 619.
- [74]. Siegel. R. A. 1993. *Adv Polym Sci.* 109: 233-267.
- [75]. Gil, E.S. Hudson, S.M. 2004. *Prog Polym Sci.* 29, 1173-1222.
- [76]. Dimitrov, I. Trzebicka, B. Müller, A.H.E. et al. 2007. *Prog Polym Sci.* 32: 1275-1343.
- [77]. Lee, Y.M. Kim, S.H. Cho, C.S. 1996. *J. Appl. Polym. Sci.* 62: 301.
- [78]. Liu, R.H. Yu, Q. Beebe, D.J. 2001. *J. Microelectromech. Syst.* 11: 45.
- [79]. Kim, S.J. Park, S.J. Kim, S.I. 2004. *Smart Mater. Struct.* 13: 317.

- [80]. Palacios, O. Aliev, R. Burillo, G. 2003. *Polym. Bull.* 51: 191.
- [81]. Bucio, E. Burillo, G. 2007. *Radiat. Phys. Chem.* 76: 1724.
- [82]. Rogel-Hernández, E. Licea-Claverie, A. Cornejo-Bravo, J.M. et al. 2003. *Rev Soc Quim Mex* 47: 251-257
- [83]. Kumar, A. Srivastava, A. Galaev, I.Y. et al. 2007. *Prog Polym Sci.* 32: 1205–1237.
- [84]. Stubbs, M. McSheehy, P.M.J. Griffiths, J.R. 1999. *Adv Enzyme Reg.* 39: 13–30.
- [85]. Lee, E.S. Na, K. Bae, Y.H. 2003. *J Control Release.* 91: 103–113.
- [86]. Katchalsky, A. Michaeli, I. 1995. *J. Polym.Sci.* 15: 69.
- [87]. Khare, A.R. Peppas, N.A.. *Biomaterials.* 1995, 16, 559
- [88]. Burillo, G. Briones, M. Adem, E. 2007. *Nucl. Instrum. Meth. B.* 265: 104
- [89]. Ruiz, J.C. Burillo, G. Bucio, E. 2007. *Macromol Mater Eng.* 292: 1176-1188
- [90]. Rodriguez-Perez, A.I. Rodriguez-Tenreiro, C. Alvarez-Lorenzo, C. et al. 2006. *J Pharm Sci.* 95: 1751–1762.
- [91]. Alvarez-Lorenzo, C. Yañez, F. Barreiro-Iglesias, R. et al. 2006. *J Control Release.* 113: 236–244.
- [92]. Ruiz, J.C. Alvarez-Lorenzo, C. Taboada, P. et al. 2008. *Eur J Pharm Biopharm.* 70: 467–477.
- [93]. Muñoz-Muñoz, F. Ruiz, J.C. Alvarez-Lorenzo, C. et al. 2009. *Eur Polym J.* 45: 1859-1867
- [94]. Muñoz-Muñoz, F. Ruiz, J.C. Alvarez-Lorenzo, C. et al. 2012. *Radiat Phys Chem.* 81: 531-540
- [95]. Dinarvand, R.. DŠemanuele, A. 1995. *J. Control. Release.* 36: 221.
- [96]. Kayaman, N. Kazan, D. Erarslan, A. et al. 1998. *J. Appl. Polym. Sci.* 67: 805.
- [97]. Sokker, H.H. Ghaffar, A.M.A. Gad, Y.H. et al. 2009. *Carbohydr. Polym.* 75: 222.
- [98]. Dubin, C.H. 2004. *Drug. Deliv. Technol.* 4: 298.
- [99]. Wu, P. Grainger, D.W. 2006. *Biomaterials.* 27: 2450.
- [100]. Ansel, H.C. Popovich, N.G. Loyd, V. et al. 1995. *Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems*, 6a. edición, Williams & Wilkins
- [101]. Liu, S. J. Ueng, S.W. Lin, S.S. et al. 2002. *J. Biomed. Mater. Res.* 63: 807.
- [102]. Gransden, W. R. 1997. *J. Med. Microbiol.* 46: 436.
- [103]. Zhang, X. Wyss, U. P. Pichora, D. et al. 1994. *J. Pharm. Pharmacol.* 46 : 718.
- [104]. Khardori, N. Yassien, M. 1995. *J. Ind. Microbiol.* 15: 141.
- [105]. Finch, R.G. Pritchard, D.I. Bycroft, B.W. et al. 1998. *J. Antimicrob. Chemother.* 42: 569.
- [106]. March, J.C. Bentley, W.E. 2004. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 495.
- [107]. Biering-Sorensen, F. 2002. *Curr. Opin. Urol.* 12: 45.
- [108]. Liedl, B. 2001. *Curr. Opin. Urol.* 11: 75.
- [109]. Barton, A.J. Sagers, R. D. Pitt, W.G. 1996. *J. Biomed. Mater. Res.* 30: 4903.
- [110]. Tenke, P. Riedl, C.R. Jones, G.L. et al. 2004. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 23S1: S67.
- [111]. Nicolle, L.E. 2001. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 22: 316.
- [112]. Kuhn, W. Rist, M. Zaech, G.A. 1991. *Paraplegia.* 29: 222.
- [113]. Saint, S. Meddings, J.A. Calfee, D. et al. 2009. *Ann. Intern. Med.* 150: 877.
- [114]. Billote-Domingo, K. Mendoza, M.T. Torres, T.T. 1999. *J. Phil. J. Microbiol. Infect. Dis.* 28: 133.
- [115]. Warren, J. W. 1991. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 29: 299.
- [116]. Nicolle, L.E. 2002. *Clinical Microbiology Newsletter.* 24: 135.

Chapter 15

**SMART POLYMERS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS
AND GRAFT SYNTHESIS BY γ -RAYS**

***Emilio Bucio^{1*}, Angel Contreras-García¹, H. Iván Meléndez-Ortiz¹,
Franklin D. Muñoz-Muñoz¹, Carmen Alvarez-Lorenzo² and
Angel Concheiro²***

¹Departamento de Química de Radiaciones y Radioquímica,
Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México,
Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México DF 04510.

²Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica,
Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain

ABSTRACT

This chapter discusses the state of the art of smart polymers with potential biomedical applications and focuses on the interest of ionizing radiation, compared to conventional methods, for controlling polymerization during hydrogel formation and for grafting of polymers onto biocompatible substrates. Gamma radiation has been shown particularly useful for functionalizing surfaces with pH- and/or temperature-responsive polymers, in order to tailor the hydrophilicity and the capability to adsorb therapeutic substances and to control the release rate. Methods involving one or two steps and pre-irradiation or direct irradiation have been developed. The absorbed dose, monomer concentration, reaction time and temperature determine the degree of grafting and the structure of the grafted polymer. Examples of smart hydrogels, grafted polymers, grafted hydrogels and grafted IPNs are given and their potential in the biomedical field is outlined.

1. INTRODUCTION

In recent years, there has been a remarkable growth in the research and development of synthetic polymers for biomedical components [1]. Stimuli-responsive polymer networks that

are able to modify their volume and properties in response to the variation of environmental factors have attracted great attention [2]. When the responsiveness is predictable and reversible, the stimuli-responsive systems are termed “smart” or “intelligent”. Smart systems can be designed to respond to a wide range of external variables or physiological/pathological conditions, such as changes in temperature, pH, ionic strength, or the application of light, electric and magnetic fields, or ultrasounds [3-50]. Some stimuli sensitive polymers undergo an abrupt decrease in solubility above a certain temperature; this threshold is named as the lower critical solution temperature (LCST) [51-60]. Networks made with these polymers are hydrophilic and remain swollen below the LCST, while above this temperature, the networks become increasingly hydrophobic and collapse. On the other hand, hydrogels that are hydrophobic below a critical temperature and hydrophilic above it present an upper critical solution temperature (UCST) [61-70]. Stimuli-responsive polymers can be prepared in various architectures, such as micelles, reversible hydrogels, cross-linked (permanent) hydrogels, interpenetrating networks (IPNs), graft copolymers, modified interfaces and comb-type (Figure 1).

The stimuli-sensitive polymers are suitable for a wide variety of applications mainly in chemistry and agriculture. They have also been shown useful as main components of drug and gene delivery systems and in the biotechnological field for enzyme immobilization, thermal affinity separation or immune-diagnosis [71-82]. Although more recently and still incipient, coating medical devices with stimuli-responsive polymers may significantly widen their range of applications [83]. Shape-memory devices (i.e., devices that can possess a shape that facilitates the implantation and that recovers a certain conformation at the body conditions for performing a function), devices with a modified protein-adsorption profile or that can attract/repel certain cells of the body (e.g., for prevention of inflammatory responses, induction of healing or behaving as tissue scaffolds), or devices that should perform as artificial muscles or membranes (e.g., for implementing/replacing damaged tissues) take advantage of materials with stimuli-responsiveness at bulk or just at the surface. Excellent reviews about stimuli-responsive materials and some applications in the biomedical field can be found elsewhere [83-87].

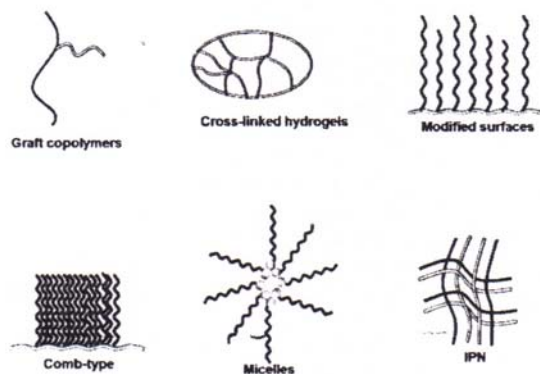


Figure 1. Different structures of stimuli-responsive polymers.

This Chapter revises recent advances in the preparation of stimuli-responsive networks and mainly focuses on the performance of materials modified at the surface with stimuli-responsive components, while maintaining the properties at bulk. Irradiation using an adequate source of energy, such as gamma ray, UV or electron beams [88-104], is one of the most versatile methods for the synthesis of smart hydrogels and for the smart functionalization of preformed materials. This approach has the main advantages of not requiring initiators and catalysts, can make use of unlimited number of monomers or polymers for imparting surface functionalities to fulfill specific requirements, and enables a fine control of the polymerization and degree of cross-linking [105]. Radiation grafting leads to the modification of the surface composition of polymeric biomaterials without changing their mechanical properties [106-111].

2. STIMULI-RESPONSIVE HYDROGELS

Hydrogels are three-dimensional, hydrophilic, polymeric networks capable of imbibing large amounts of water or biological fluids, without dissolving under physiological conditions (Figure 2) [112-114]. The low toxicity and high biocompatibility prompts the use of hydrogels as biomaterials [115-116]. Conventional hydrogels are usually mechanically weak, which compromise their practical applications. The preparation of hydrogels with high mechanical strength has become a hot topic in recent years. Therefore, topological gels [117], nanocomposite gels [118] and double-network (IPNs) gels [119] with extremely high mechanical strengths [120] are under study. Hydrogels that undergo first-order volume phase transition in response to small changes in environmental parameters, such as temperature, pH or ionic strength, are of great interest in drug delivery, cell encapsulation, tissue engineering [121-131], micro-scale sensor/actuators, micro-fluidic flow control and filtration/separation [132-138].

Hydrogels can be prepared from natural or synthetic polymers in various formats and applying different techniques [139-140]. Chemically cross-linked gels have ionic or covalent bonds between polymer chains. Copolymerization [141,142], suspension polymerization [143], polymerization by irradiation [144], chemical reaction of complementary groups [145-147], and cross-linking using enzymes [148] are some common examples. Chemically cross-linking implies the use of a cross-linker capable of induce covalent bonds, but which is often toxic and the excess should be removed from the network after synthesis. On the other hand, some approaches such as ionic interactions [149-152], crystallization [153], hydrogen bonds [154,155], protein interaction [156], and cross-linking by hydrophobic interactions [140] have been explored for obtaining physically cross-linked gels [157-162].

Temperature-sensitive and pH-responsive hydrogels are by far the best-studied ones. Poly(N-substituted acrylamide), in particular, poly(N-isopropylacrylamide), PNIPAAm, is the most prominent representative of the group of temperature-responsive polymers which have a LCST [98,99,102,104]. The pH-responsive networks consist of polymer chains with ionizable groups that can accept and donate protons in response to the environmental change in pH. A rapid change in the net charge of pendant groups causes an alternation of the hydrodynamic volume of the polymer chains [163-165] (Figure 3).

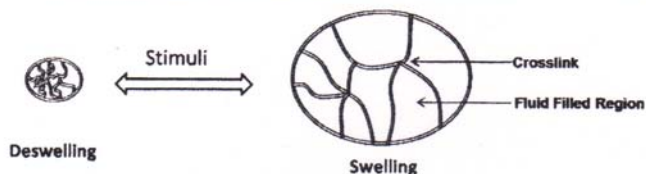


Figure 2. Swelling/deswelling of a stimuli-responsive hydrogel.

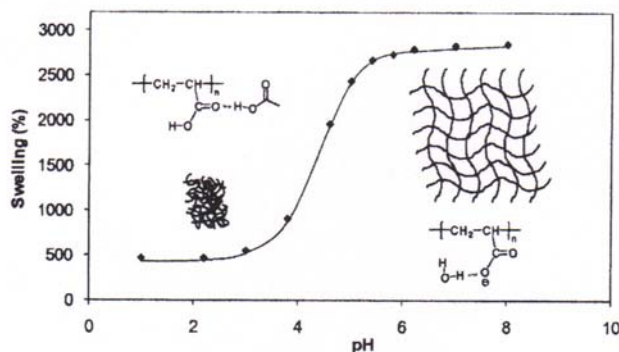


Figure 3. pH-responsive volume phase transition of an acrylic acid hydrogel.

Only a few polymeric systems responsive to both temperature and pH are described in the literature, and temperature-pH sensitive polymers are usually synthesized as copolymers [166-173]. The mechanism of the smart hydrogels responding to electric voltage still remains poorly understood although several experimental and theoretical investigations have been conducted [174-178]. Trans membrane solute flux can be modulated by the action of an applied electric field on the membrane and/or directly on the solute.

3. STIMULI-RESPONSIVE INTERPENETRATING POLYMER NETWORKS (IPNs)

Interpenetrating polymer networks (IPNs) consist of a combination of two or more polymers, with at least one polymerized and/or cross-linked in the immediate presence of the other(s). IPNs belong to a class of polymer blends, in which two different polymers are forced to mix with each other through chemical cross-links within each component [102, 179-182]. Many kinds of IPNs exist, including "Sequential IPN" and "Simultaneous Interpenetrating Network" (SIN). In the first, polymer network I is synthesized and then monomer II, crosslinker agent and activator are swollen into network I and polymerized *in situ* (Figure 4). In SIN, the monomers, cross-linker agent and activators for both networks are polymerized

simultaneous (Figure 5); the polymerization must occur via non-interfering reactions, such as use of chain and step polymerization kinetics. Although both reactions begin at the same time, the rates of polymerization kinetics are not identical [179]. IPNs enable the combination of the performance of each network, improving deficient characteristics or even achieving additional features. In the particular case of stimuli-responsive networks, one can create an IPN with a network that keeps its sensitiveness to a certain variable while the other network provides mechanical strength or can respond to other variable. In this latter case, the IPN can show multi-responsiveness [183]. Some IPN systems have been designed to switch drug release on and off as a function of temperature [184-188]. Despite the abundant information about IPNs, few papers report the use of ionizing radiation for preparing smart IPNs [189].

IPNs based on poly (N-isopropyl acrylamide), PNIPAAm, and poly (N-acryloxysuccinimide), PNAS, were prepared by a sequential method. PNIPAAm, which was polymerized and cross-linked by gamma irradiation, was swelled in a solution of PNAS/polylysine. The phase transition or LCST of PNIPAAm was not affected with the introduction of PNAS in the structure, but compared to PNAS networks the IPN showed a fast response rate to external changes of temperature, improving their potential in field of high performance devices or systems such as rapid actuators and artificial organs [190,191].

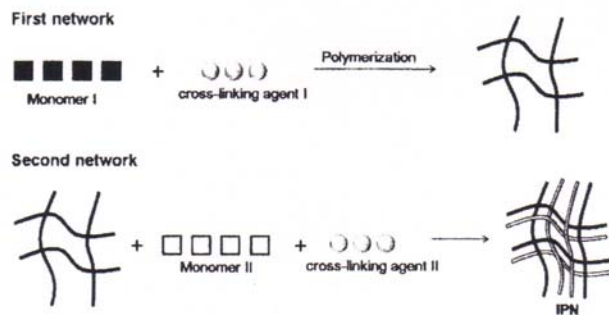


Figure 4. Preparation procedure of a sequential IPN.

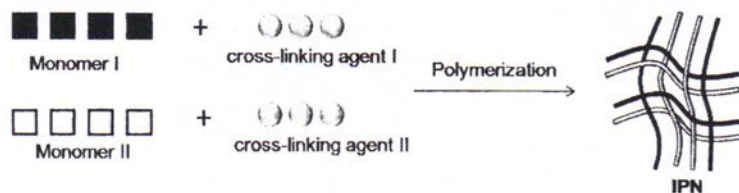


Figure 5. Preparation procedure of a simultaneous IPN.

4. DUALY STIMULI-RESPONSIVE MATERIALS

4.1. Doubly Temperature-Responsive Networks

Copolymers consisting of two or more different temperature-sensitive moieties display intriguing temperature-induced self-assembly behavior in water. The doubly thermoresponsive copolymers comprise block copolymers forming micellar structures [192-201], random copolymers [202-205], core-shell microgels [206-209] and more recently graft copolymers synthesized by using gamma irradiation [108]. Some novel materials that display dual LCSTs have been developed by forming block copolymers, laminate IPNs of cross-linked polymers, and graft copolymers possessing independent temperature sensitivity [210]. These systems are composed of N-alkyl acrylamides and N, N'-dialkylamino methacrylates. In these studies, the polymer structure was found to profoundly influence the thermal sensitivity, as polymer formulation techniques led to materials with varying degrees of temperature sensitivity. These materials can be used in designing drug delivery strategies where release pattern must be finely tuned, and in bioseparations, where a single membrane could be used for molecular separations of four different size ranges, simply on the basis of the temperature surrounding the membrane (Figure 6).

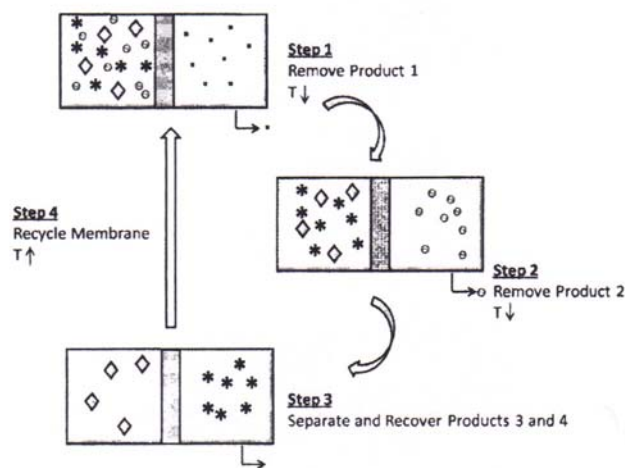


Figure 6. Application of dually temperature-sensitive networks in membrane separation.

4.2. Temperature- and pH-Responsive Networks

The ability to simultaneously respond to both temperature and pH offers an additional control over the polymer phase behavior. In this regard, a highly diverse set of smart materials can be prepared with the purpose of mimicking the behavior of responsive

macromolecules found in nature. Indeed, there is a growing interest in obtaining macromolecules and hydrogels whose aqueous solution and swelling properties can abruptly and reversibly change in response to simultaneous pH and temperature changes in the physiological range (Figure 7). Some temperature and pH-sensitive homopolymers have been reported in the literature [211-213]. Nevertheless, most systems that fulfill *in vivo* requirements are random [214-229], block [230-250] or graft copolymers [104, 251-260] that have been synthesized employing hydrophobic and hydrophilic monomers containing ionizable and temperature-sensitive groups (Table 1 and 2). IPNs composed of PNIPAAm and PMAAc (poly(methacrylic acid)) have been prepared via a sequential UV-induced solution polymerization [261]. These hydrogels exhibit a swelling transition at 31-32 °C and pH 5.5 indicating that the responsiveness of each network is relatively independent. The permeability of the IPN membrane was significantly affected by varying the pH and temperature. Permeation studies indicate significant size exclusion behaviour for model drugs of different molecular weights (theophylline, proxiphyline, oxprenolol, FITC-dextran). This means that for the same degree of swelling, the smaller solutes diffuse faster.

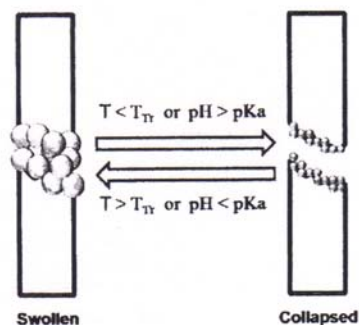
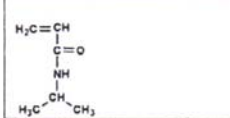
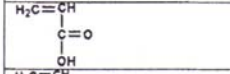
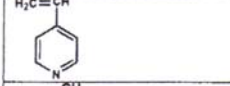
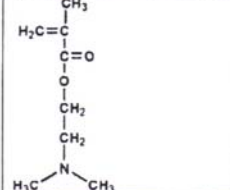
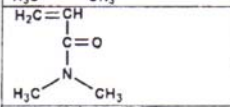
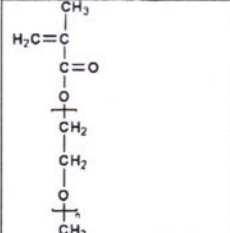
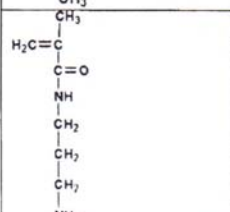


Figure 7. Schematic view of the behaviour of a temperature- and pH-responsive material.

Table 1. Chemical structure of common polymers used as components of biomedical devices

$\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_n\text{-}$	Polyethylene	PE
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{-(CH-CH}_2\text{)}_n\text{-} \end{array}$	Polypropylene	PP
$\begin{array}{c} \text{F} \quad \text{F} \\ \quad \\ \text{-(C-C)}_n\text{-} \\ \quad \\ \text{F} \quad \text{F} \end{array}$	Polytetrafluoroethylene	PTFE
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{-(C-C)}_n\text{-} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{Cl} \end{array}$	Poly(vinyl chloride)	PVC

Table 2. Chemical structure of monomers used for preparing stimuli-responsive copolymers

	N-isopropylacrylamide	NIPAAm
	Acrylic acid	AAc
	4-vinylpyridine	4VP
	2-(dimethylamino) ethyl methacrylate	DMAEMA
	N,N'-dimethylacrylamide	DMAAm
	Poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate	PEGMEMA
	N-(3-aminopropyl) methacrylamide	APMA

4.3. Magnetic Field and Temperature Responsive Polymers

Some hydrogels and nanoparticles have been developed to combine sensitiveness to magnetic field and temperature within a single polymer. Such a system offers the advantage of achieving rapidly responsive materials. Magnetic field and temperature-responsive hydrogels have been used in some applications such as protein concentration and purification (Figure 8) [262-265], immobilized-enzyme reaction control [266-269], and triggered drug release [270-272].

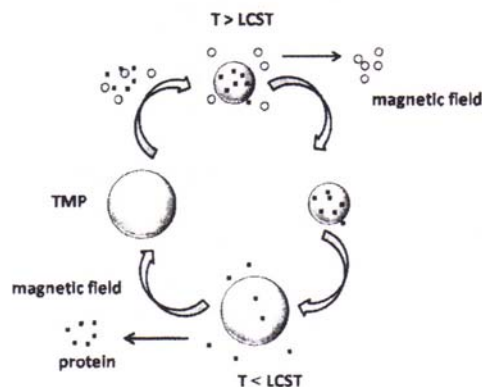


Figure 8. Protein separation using temperature-responsive magnetic particles.

4.4. Temperature- and Light-Responsive Polymers

While temperature and pH are well-known triggering agents, the use of light as external stimuli has received less attention. Light can potentially trigger the phase transition of hydrogels applied on the skin or external surfaces of human body, and may even control the degree of swelling of hydrogels used as depots placed at certain depth below the skin. The combination of temperature and light sensitiveness achieved with PNIPAAm partly modified with azobenzene chromophores has been investigated in detail by Irie and Kungwachankun [273]. Besides, Lee et al. [274] reported the synthesis of well-defined, densely grafted molecular brushes containing trans-methacryloyloxyazobenzene (MOAB) and 2-(dimethylamino) ethyl methacrylate (DMAEMA). The LCST of the copolymer is notably affected by the photoisomerization of the azobenzene units. Cross-linked temperature and pH-sensitive networks have already shown a potential for applications in drug delivery systems [275-277].

5. STIMULI-RESPONSIVE GRAFTED MATERIALS

Modification of preformed materials at the surface with stimuli-responsive polymers can be made by: i) grafting relatively long chains of polymers, behaving each one independently, ii) grafting and cross-linking polymer chains to create a hydrogel-like network; or iii) grafting and cross-linking polymer chains to form a first network that is, in a second step, interpenetrated by a network of the same or other nature, resulting in an IPN-like structure.

5.1. Radiation-Grafting

This method involves the formation of active sites on the polymer backbone by the use of high energy radiation. Monomers react with the active sites and then propagate to form side chain grafts (Figure 9). When two or more monomers of different chemical nature are combined, graft copolymers are obtained. Grafting using high-energy ionizing or non-ionizing radiations can be performed following different approaches [278]: i) direct method; ii) pre-irradiation, iii) pre-irradiation oxidative.

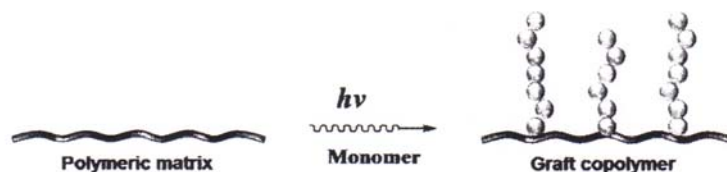


Figure 9. Grafting of a copolymer onto a polymeric matrix.

5.1.1. Direct Method

A polymeric material is irradiated in contact with a monomer, which may be at gas, vapor or liquid state or in solution. Irradiation produces active sites in the polymer matrix (Table 1), mainly macroradicals, which initiate the graft polymerization and homopolymerization (Figure 10).

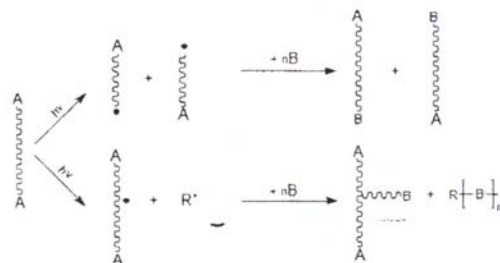


Figure 10. Radiation grafting applying a direct method.

This method has the drawback of that the irradiation also generates radicals on the monomers intended for grafting which results in homopolymerization instead of grafting. Radiation grafting predominates if the yield of radicals from the monomer is considerably less than the yield from the polymer matrix. Homopolymer formation can be reduced or prevented by adding a free radical inhibitor of the monomer such as Fe^{-2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} , or by carrying out the reaction at low temperature. This latter approach is only valid when the activation energy for homopolymerization is higher than for the grafting reaction [278].

5.1.2. Pre-Irradiation

The polymer surface is irradiated *in vacuo* or under an inert atmosphere. Grafting is initiated by macroradicals trapped in the irradiated polymer and homopolymerization does not occur. This method has three main disadvantages: i) the possible degradation of the polymer matrix, because the dose is higher than in the direct method; ii) it is strongly dependent on the reaction temperature and on the crystallinity of the polymer, and iii) the yield of grafting is lower than in the direct method [278].

5.1.3. Pre-Irradiation Oxidative

The polymer is pre-irradiated in the presence of air or oxygen, so that the macroradicals formed are converted to peroxides and/or hydroperoxides, and when the irradiated polymer is heated in the presence of monomer (in the absence of air) the peroxides decompose to give the macroradicals, that are the active sites for graft polymerization (Figure 11). An advantage of the pre-irradiation oxidative method is the possibility of storing the irradiated polymer some time before grafting. Some disadvantages are that the hydroxyl radical induces homopolymerization and that the pre-irradiation method requires a higher dose of radiation than the direct method [278].

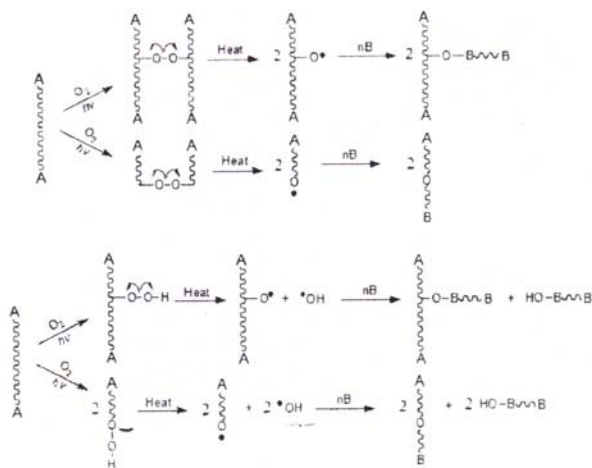


Figure 11. Radiation grafting applying a pre-irradiation method.

5.2. Grafting Approaches

5.2.1. Graft Copolymers

Recently, some surface modification methods by grafting macromolecules have been proposed [279-284]. Surface-initiated grafting is a versatile and effective method for surface modification of polymer membranes [285]. The grafted polymer chains are expected to be crowded and stretched away from the membrane surface or pores wall, serving as a secondary boundary between the membrane and the environment [286]. The introduction of a hydrophilic material onto a hydrophobic thermoplastic elastomer has the potential to create a material with desirable mechanical and thermal properties for use in adhesive or biomedical applications (Table 1) [287]. The "grafting from" process was carried out on cellulose fibers using mainly conventional free radical polymerization of vinyl monomers (Table 2) by generating radicals on the polymer backbone by redox systems, chain transfer processes or irradiation [288-292]. Typically these processes are characterized by low control over molecular weight and polydispersity of grafted chains, chain density on the substrate, and possible degradation of the fibers. Moreover, the homopolymerization of the added monomer frequently predominates with respect to graft copolymerization [293]. Polymer membranes grafted with PNIPAAm that show thermo-responsive behavior have attracted great attention (Figure 12). They can be applied in many areas including drug delivery [294-296], smart separation [297-298], biosensors [299], and tissue engineering [300]. Various techniques have been employed to perform the grafting of PNIPAAm [301].

The modification of polymer chemical structure by grafting new chemical species on the polymer backbone is a very appealing way to give new or improved properties to the resulting materials. This approach has been largely used for making immiscible polymer blends compatible [302-303] and for the preparation of functional polymers [304-305]. Different techniques have been developed, including processes initiated by chemical reactions, irradiation techniques, and photochemical and plasma induced grafting [304].

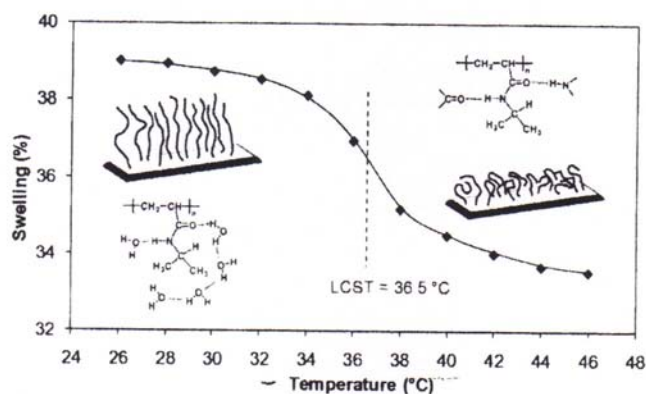


Figure 12. Temperature-responsive volume phase transition of modified NIPAAm grafted onto PP film.

Concerning polypropylene modification, free radical grafting processes have been widely studied for functionalizing with various organic groups including maleic anhydride, acrylic, methacrylic and vinyl species [305-308].

5.2.2. Graft Copolymer by One and Two Step Method

Graft copolymers can be obtained in one or two steps applying the pre-irradiation or the direct method; the way for obtaining the grafted materials depends of the chemical structure of polymer that serve as a substrate and/or the monomers that are going to be grafted (Tables 1 and Table 2). When the grafting is carried out in one step with two monomers, random copolymer branches are formed. By contrast, the two steps method leads to branches containing only one kind of monomers. Most surface grafting polymerizations are carried out through the one-step or simultaneous method, in which the grafting proceeds in the presence of monomer under ionizing irradiation (Figure 13). The two-step or combinatorial technique (Figure 14) first introduces dormant groups on substrates under ionizing radiation and, then, the grafting polymerization is initiated by heating or irradiation [309-318].

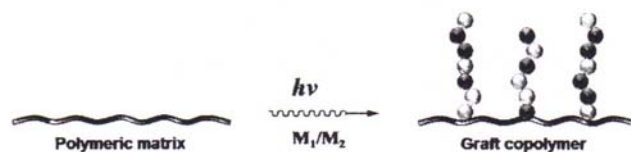


Figure 13. Binary graft polymerization in one step.

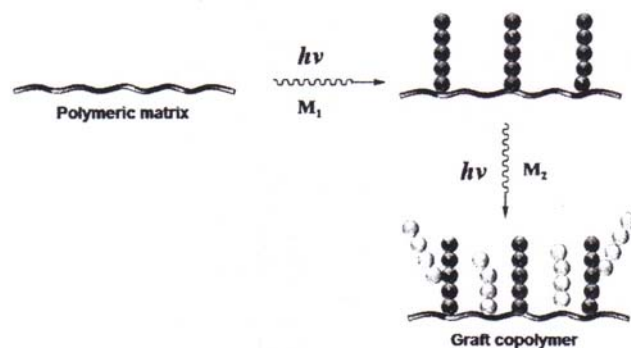


Figure 14. Binary graft polymerization in two steps.

5.3. Materials Grafted-with Stimuli-Responsive Polymers

Relatively inert materials, such as polypropylene (PP) and polyethylene (PE) (Table 1), widely used as components of medical devices can be endowed with temperature or

temperature and pH-responsive swelling by grafting sensitive components at the surface. This approach is gaining an increasing attention in the last years, as supported by the raising number of publications appeared in the last decade about functionalization of surfaces with grafted stimuli-responsive polymer (Figure 15).

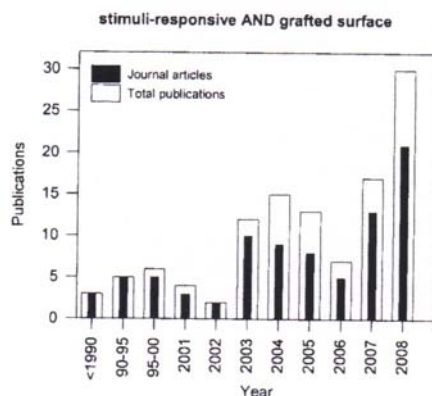


Figure 15. Evolution of the number of publications about stimuli-responsive polymers grafted onto surfaces. No matches were found before 1987. (source: SciFinder Scholar 2007; search: stimuli-responsive and grafted surface).

5.3.1. Temperature-Responsive Grafting onto PP Film by Two Step Method

5.3.1.1. Grafting Mechanism of Acrylamide Monomers onto PP Film

The grafting of an acrylamide type monomer takes place according to a typical polymerization but without using chemical initiators. An example of the procedure where is grafted two acrylic monomers [N,N'-dimethylacrylamide (DMAAm) and N-isopropylacrylamide (NIPAAm)] is as follows. PP film is irradiated by γ -radiation in presence of oxygen (Figure 16, 1) and free radicals are formed in the tertiary carbon (Figure 16, 2).

This is the most stable radical after hydrogen radical elimination. An oxygen molecule is bonded via radical to obtain a peroxy radical (Figure 16, 3) which is linked in two different ways. The first association way is the formation of a hydroperoxide, joining a peroxide radical and hydrogen radical. The second way is the recombination of radical peroxide and an alkyl radical to get a dialkylperoxide (Figure 16, 5). Once formed the alkylperoxides and hydroperoxides, they become unstable to high temperatures to form alkoxy radicals (Figure 17, 6).

This alkoxy radical recombines with a formed radical on the primary carbon in the vinyl part of DMAAm (Figure 17, 7) to obtain a carbon-oxygen bond in the initiation step, at the same time a radical is located in the secondary carbon of initial DMAAm monomer (Figure 17, 8).

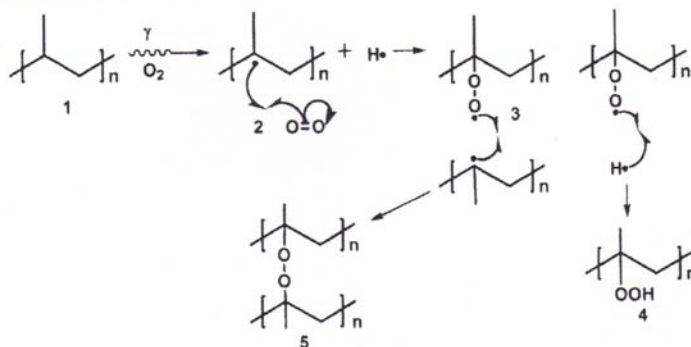


Figure 16. Mechanism of formation of hydro- and dialkyl-peroxides in PP by gamma irradiation in presence of oxygen.

Initiation

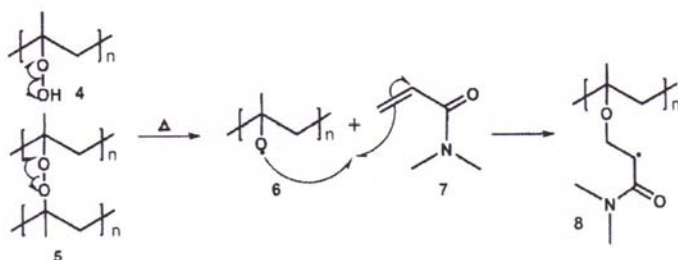


Figure 17. Initiation step during grafting of DMAAm onto PP.

The propagation step is carried out by the secondary radical (Figure 18, 8) formed in the initiation step over other monomer molecule (Figure 18, 7) of DMAAm to form another secondary radical (Figure 18, 9). This process is repeated successively (Figure 18, 10) until termination occurs.

The termination step involves combination to obtain a copolymer with high molecular weight (Figure 19, 11) and disproportionation between an unsaturated (Figure 19, 12) and saturated (Figure 19, 13) end group. Combination is not favorable because steric hindrance of the large macroradicals. When two macroradicals undergo termination by combination, the copolymer is cross-linked. When the termination step occurs by disproportionation, the vinyl end group can continue increasing the molecular weight. The second step of grafting, in this case the graft of NIPAAm onto PP-g-DMAAm film, follows the same mechanism although the second graft could be conducted in the PP matrix as well as in the DMAAm branches grafted in the first step.

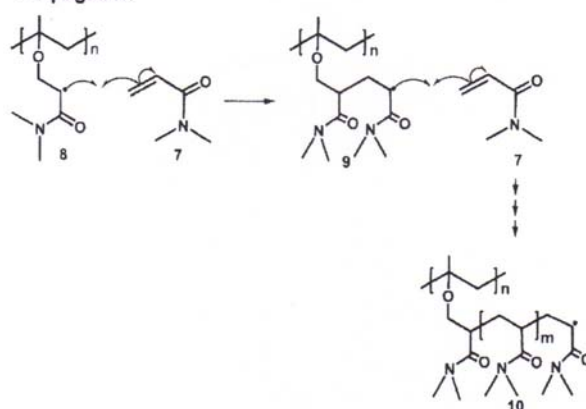
Propagation

Figure 18. Propagation step during grafting of DMAAm onto PP.

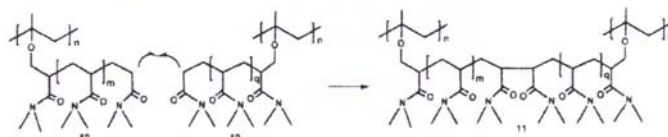
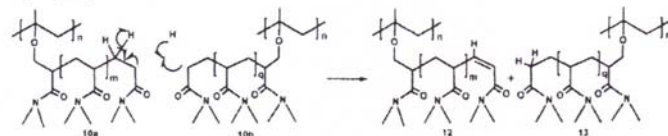
Termination**By combination****By disproportionation**

Figure 19. Combination and disproportionation termination steps for DMAAm onto PP.

5.3.1.2. Synthesis of (PP-g-DMAAm)-g-NIPAAm

Recently, a two-step method to graft DMAAm and NIPAAm onto PP films was developed pre-irradiating the PP films with ^{60}Co γ -source at different doses [109]. The irradiated films were placed in glass ampoules which contained aqueous solution of DMAAm (one step). The ampoules with films in the monomer solutions were filled with argon to remove air, and then they were sealed. The ampoules were heated at 60 °C for several reaction times. The residual monomer and homopolymer that could be formed and occluded

in the films during the grafting were extracted with water. Grafting of NIPAAm onto PP-g-DMAAm (second step) was carried out with the same procedure with different dose. The grafting yield (Y_g) was calculated as follows.

$$Y_g (\%) = 100[(W_g - W_0) / W_0] \quad (\text{Eq.1})$$

where W_g and W_0 are the weights of the grafted and initial films, respectively. The effect of the monomer concentration on the grafting yield after 10 h of reaction at 60 °C was examined (Figure 20). A wide range of graft contents was achieved, the efficiency ranging from 150% for 1M DMAAm, to 8000% (saturation value) for 6M DMAAm solution.

The influence of the pre-irradiation dose on the grafting yield was examined between 10 and 100 kGy, for a reaction time of 4 h at 60 °C. As expected, the number of latent initiating sites increased with increasing radiation dose, and the graft percentage rapidly rose with dose up to 60 kGy and then leveled off (Figure 21).

NIPAAm was then grafted onto PP-g-DMAAm (Figure 22). No significant NIPAAm homopolymerization occurred at monomer concentrations below 1 M. At greater concentration, the grafting efficiency decreased due to NIPAAm homopolymerization. The effect of irradiation dose on the grafting yield of NIPAAm onto PP-g-DMAAm is shown in Figure 23. The grafting yield increased from 75 to 320% when the irradiation dose rose from 10 to 70 kGy. At higher dose there are more number of grafting sites (peroxy and hydroperoxy groups) formed in PP-g-DMAAm films irradiated in presence of air.

The characteristic temperature-dependent swelling ratio of PP-g-DMAAm(60%)-g-NIPAAm(250%) over the temperature range of 30–42 °C in distilled water is shown in Figure 24. As the temperature increased, the swelling ratio decreased, exhibiting a drastic decrease at around the LCST (ca. 36.5 °C) of grafted PNIPAAm. Generally, the main reason for this distinctive characteristic of the thermo responsive films can be attributed to the unique and rapid alternation of the hydrophilic and hydrophobic states, as shown by contact angle measurements (Figure 24).

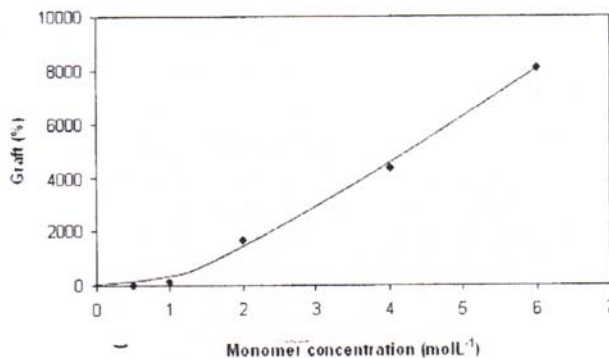


Figure 20. Grafting yield of DMAAm onto pre-irradiated PP films as function of monomer concentration ($D= 100$ kGy, $I= 12.5$ kGy/h, $t= 11$ h, and $T= 60$ °C).

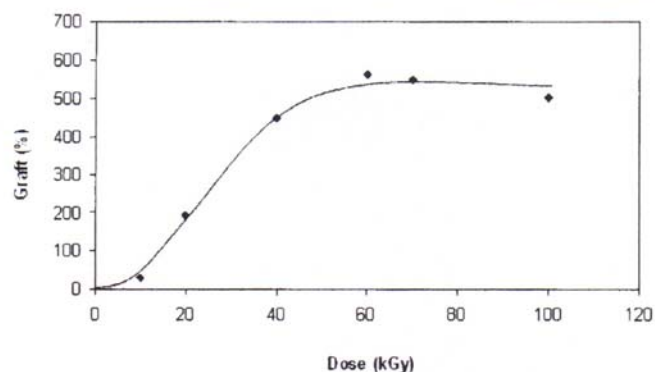


Figure 21. Grafting yield of DMAAm onto pre-irradiated PP films as a function of pre-irradiation dose, monomer concentration 6 M ($I= 12.5$ kGy/h, $t= 4$ h, and $T= 60^{\circ}\text{C}$).

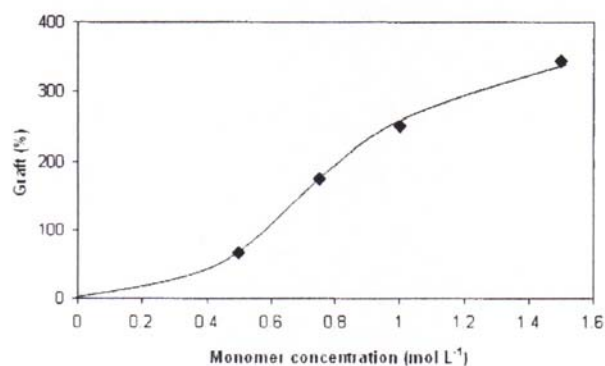


Figure 22. Grafting of NIPAAm onto PP-g-DMAAm (35%) films as function of monomer concentrations ($D= 10$ kGy, $I= 12.5$ kGy/h, $t= 1$ h, and $T= 60^{\circ}\text{C}$).

At temperatures below the LCST, the hydrophilic groups of the copolymer films form hydrogen bonds with water molecules. These bonds act cooperatively to form a stable shell of hydration around the hydrophobic groups, resulting in greater water uptake and producing a larger swelling ratio. When the temperature exceeds the LCST, the hydration shell of PNIPAAm collapses abruptly. The graft copolymer composition can be used to control the swelling ratio. The grafted films showed the thermal properties of the PP, with a similar melting temperature and thermal stability (Figure 25).

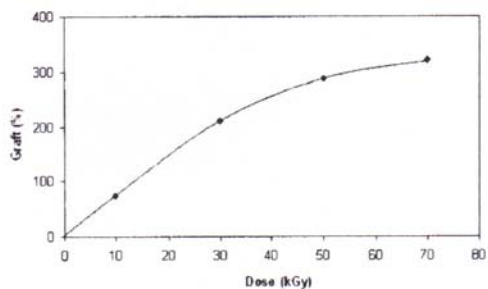


Figure 23. Grafting yield of NIPAAm onto pre-irradiated PP-g-DMAAm (35%) films as a function of pre-irradiation dose, monomer concentration 1 M ($I = 12.5$ kGy/h, $t = 1$ h, and $T = 60^\circ\text{C}$).

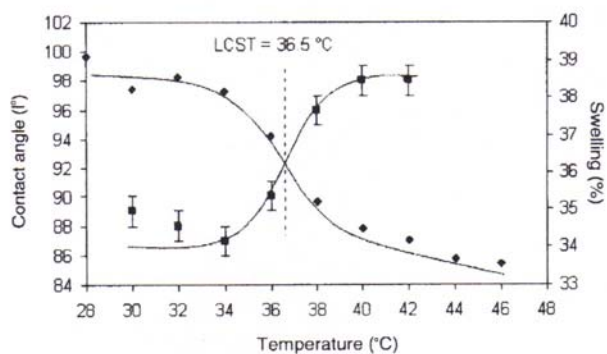


Figure 24. Dependence of the degree of swelling (♦) and of the contact angle (■) on the temperature recorded for PP-g-DMAAm(60%)-g-NIPAAm(250%).

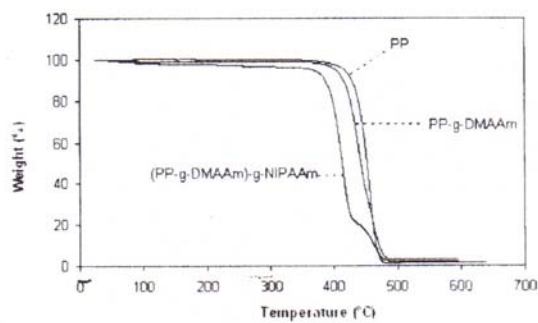


Figure 25. TGA runs of PP-g-DMAAm(30%)-g-NIPAAm(200%) recorded under nitrogen atmosphere.

5.3.2. Temperature and pH-Responsive IPNs Grafted onto PP

Surface functionalization with networks that combine sensitiveness to two stimuli has been recently shown as an interesting approach to improve the drug loading and release performance of PP films [107]. IPNs of PNIPAAm and PAAc (*net-PP-g-PNIPAAm-inter-net-PAAc*) were synthesized by first grafting and cross-linking of NIPAAm onto PP films and then interpenetrating a second network by redox polymerization and cross-linking of AAc. Such a grafted design enabled the loading of vancomycin when the IPN was swollen, i.e. at temperature below LCST and at neutral pH. Diffusion into the aqueous phase of the IPN as well as ionic interactions between the drug and the ionized carboxylic acid groups of PAAc prompted the loading process. *In vitro* at a temperature of 37 °C, the grafted IPN was capable of controlling drug release rate through the collapsed PNIPAAm mesh and the drug affinity to the PAAc network (Figure 26). Microbiological experiments demonstrated that the vancomycin-loaded PP films showed a much reduced likelihood of biofilm formation by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Therefore, the smart surface-modified PP has a great potential to prevent infections associated to the use of biomedical devices.

Latter on, *net-PP-g-PNIPAAm-inter-net-PAAc* was prepared applying gamma radiation in every step of the synthesis: i) graft copolymerization of PNIPAAm onto PP films by gamma preirradiation oxidative method, ii) cross-linking of PP-g-PNIPAAm by gamma irradiation in water to form the first network, with or without N, N'-methylenebis(acrylamide) (MBAAm), and iii) the formation of the second network through the polymerization and cross-linking of AAc inside cross-linked PP-g-PNIPAAm by a low gamma radiation dose of 2.5 kGy [319]. These *net-PP-g-PNIPAAm-inter-net-PAAc* films were capable of loading up to 94 mg/g of IPN or 480 mg/g PAAc; which is 2-3-fold greater than that previously obtained for the *net-PP-g-PNIPAAm-inter-net-PAAc*, in which the PAAc was synthesized by redox polymerization. Drug-loaded films sustained the delivery for several hours at pH 7.4 and provided release rate values adequate for killing bacteria attempting to adhere the surface of the films.

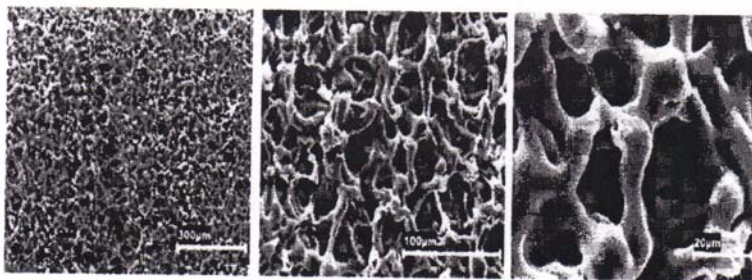


Figure 26. SEM micrographs of *net-PP-g-PNIPAAm-inter-net-PAAc* at various magnifications.

CONCLUSIONS

Stimuli-responsive systems have broadened their scope of application by being prepared with different physical forms such as hydrogels, IPNs and components of grafted surfaces.

However, stimuli responsive systems still remain as the subject of vigorous research, both in academia and in industry, which is expected to result in valuable new applications in a near future. The development of devices based upon stimuli-sensitive polymers calls for a fine-tuning of their properties. The materials have to respond to the external stimuli in a way that precisely fits the need of the applications. In order to achieve this, a better understanding of the relationship between the polymer properties (dependence of behavior at the transition point upon external conditions) and the structure of the macromolecules is necessary. Polymerization/grafting controlled by gamma rays enable the control of both structure and functionality of polymers and have been shown as a powerful technique to obtain stimuli-sensitive polymers. Nevertheless, the large-scale commercial exploitation of this method may still require some years to become a reality.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge to the DGAPA-UNAM (Grant No. IN200208), MICINN and FEDER (SAF2008-01679), and the Xunta de Galicia (PGIDT07CSA002203PR), Spain.

REFERENCES

- [1] Kang, E. T., Zhang, Y. *Adv. Mater.* 2000, 12, 1481.
- [2] Zhou, L., Yuan, W., Yuan, J., Hong, X. *Mater. Lett.* 2008, 62, 1372.
- [3] Zhao, D., Chen, X., Liu, Y., Wu, C., Ma, R., An, Y., Shi, Y. *J. Colloid. Interf. Sci.* 2009, 331, 104.
- [4] Russo, P. S. In *Reversible Polymeric Gels and Related Systems*, ACS Symp. Ser. Vol. 350, American Chemical Society, Washington, DC, 1987.
- [5] Bucio, E., Burillo, G., Adem, E., Coqueret, X. *Macromol. Mater. Eng.* 2005, 290, 745.
- [6] Chearúil, F. N., Corrigan, O.I. *Int. J. Pharm.* 2009, 366, 21.
- [7] Xie, R., Zhang, S. B., Wang, H. D., Yang, M., et al. *J. Membrane Sci.* 2009, 326, 618.
- [8] Alem, H., Duwez, A. S., Lussis, P. P. Lipnik, Jonas, A.-M., Demoustier-Champagne, S. *J. Membr. Sci.* 2008, 308, 75.
- [9] Yang, B., Yang, W. T. *J. Membr. Sci.* 2003, 218, 247.
- [10] Choi, Y. J., Yamaguchi, T., Nakao S. I. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2000, 39, 2491.
- [11] Chu, L. Y., Li, Y., Zhu, J. H., Chen, W. M. *Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 2124.
- [12] Chu, L. Y., Li, Y., Zhu, J. H., Wang, H. D., Liang, Y. J. *J. Control. Rel.* 2004, 97, 43.
- [13] Chu, L. Y., Niitsuma, T., Yamaguchi, T., Nakao, S.I. *AIChE J.* 2003, 49, 896.
- [14] Chu, L. Y., Yamaguchi, T., Nakao S. I. *Adv. Mater.* 2002, 14, 386.
- [15] Chu, L. Y., Park, S. H., Yamaguchi, T., Nakao, S. I. *J. Membr. Sci.* 2001, 192, 27.
- [16] Kidoaki, S., Ohya, S., Nakayama, Y., Matsuda, T. *Langmuir* 2001, 17, 2402.
- [17] Li, Y., Chu, L. Y., Zhu, J. H., Wang, H. D., Xia, S. L., Chen, W. M. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2004, 43, 2643.
- [18] Park, Y. S., Ito, Y., Imanishi, T. *Langmuir* 1998, 14, 910.
- [19] Peng, T., Cheng, Y. L. *J. Appl. Polym. Sci.* 1998, 70, 2133.

- [20] Xie, R., Li, Y., Chu, L. Y. *J. Membr. Sci.* 2007, 289, 76.
- [21] Ozbas, B., Kretsinger, J., Rajagopal, K., Schneider, J. P., Pochan, D. J. *Macromolecules* 2004, 37, 7331.
- [22] Kretsinger J. K., Haines L. A., Ozbas B, Pochan D. J., Schneider J. P. *Biomaterials* 2005, 26, 5177.
- [23] Haines-Butterick, L., Rajagopal, K., Branco, M., Salick, D., Rughani, R., Pilarz, M, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104, 7791.
- [24] Salick, D. A., Kretsinger, J. K., Pochan, D. J., Schneider, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 14793.
- [25] Beltran, S., Baker, J. P., Hooper, H. H., Blanch, H. W., Prausnitz, J. M. *Macromolecules* 1991, 24, 549.
- [26] Park, T. G., Hoffman, A. S. *J. Appl. Polym. Sci.* 1992, 46, 659.
- [27] Feil, H., Bae, Y. H., Feijen, J, Kim, S. W. *Macromolecules* 1992, 25, 5528.
- [28] Brazel, C. S., Peppas, N. A. *Macromolecules* 1995, 28, 8016.
- [29] Bousquet, A., Perrier-Cornet, R., Ibarboure, E., Papon, E., Labrugere, C., Heroguez, V, et al. *Macromolecules* 2007, 40, 9549.
- [30] Lynn, D. M., Amiji, M. M., Langer, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 1707.
- [31] Hu, L., Chu, L. Y., Yang, M., Wang, H. D., Niu, C. H. *J. Colloid Interface Sci.* 2007, 311, 110.
- [32] Debord, J. D., Lyon, L. A. *Langmuir* 2003, 19, 7662.
- [33] Kumar, A., Srivastava, A., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. *Prog Polym Sci* 2007, 32, 1205.
- [34] Ballauff, M., Lu, Y. *Polymer* 2007, 48, 1815.
- [35] Freiberg, S., Zhu, X. *Int. J. Pharm.* 2004, 282, 1.
- [36] Chu, L. Y., Kim, J. W., Shah, R. K., Weitz, D. A. *Adv. Funct. Mater.* 2007, 17, 3499.
- [37] Chen, Y. L., Gautrot, J. E., Zhu, X. X. *Langmuir* 2007, 23, 1047.
- [38] Fu, Q., Rao, G. V. R., Ward, T. L., Lu, Y. F., Lopez, G. P. *Langmuir* 2007, 23, 170.
- [39] Sun, Q. H., Deng, Y. L. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 8274.
- [40] Xiao, X. C., Chu, L. Y., Chen, W. M., Wang, S., Li, Y. *Adv. Funct. Mater.* 2003, 13, 847.
- [41] Chu, L. Y., Park, S. H., Yamaguchi, T., Nakao, S. *Langmuir* 2002, 18, 1856.
- [42] Xiao, X. C., Chu, L. Y., Chen, W. M., Wang, S., Xie, R. *Langmuir* 2004, 20, 5247.
- [43] Xiao, X. C., Chu, L. Y., Chen, W. M., Zhu, J. H. *Polymer* 2005, 46, 3199.
- [44] Cheng, C. J., Chu, L. Y., Ren, P. W., Zhang, H., Hu, L. *J. Colloid. Interface Sci.* 2007, 313, 383.
- [45] Li, G. L., Yang, X. Y., Wang, B., Wang, J. Y., Yang, X. L. *Polymer* 2008, 49, 3436.
- [46] Guo, H. X., Zhao, X. P., Guo, H. L., Zhao, Q. *Langmuir* 2003, 19, 9799.
- [47] Ju, X. J., Liu, L., Xie, R., Niu, C. H., Chu, L. Y. *Polymer* 2009, 50, 922.
- [48] Wu, Y., Guo, J., Yang, W. L., Wang, C. C., Fu, S. K. *Polymer* 2006, 47, 5287.
- [49] Zhang, K. P., Luo, Y. L., Li, Z. Q. *Soft Mater.* 2007, 5, 183.
- [50] Garcia, A., Marquez, M., Cai, T., Rosario, R., Hu, Z. B., Gust, D., et al. *Langmuir* 2007, 23, 224.
- [51] Liu, H. Y., Zhu, X. X. *Polymer* 1999, 40, 6985.
- [52] Shi, X., Li, J., Sun, C., Wu, S. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects* 2000, 175, 41.
- [53] Siu, M., Zhang, G., Wu, C. *Macromolecules* 2002, 35, 2723.

- [54] Kujawa, P., Tanaka, F., Winnik, F.M. *Macromolecules* 2006, 39, 3048.
- [55] Taylor, L. D., Cerankowski, J., *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* 1975, 13, 2551.
- [56] Pelton, R. *Adv. Colloid. Interface Sci.* 2000, 85, 1.
- [57] Duracher, D., Elaissari, A., Pichot, C. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* 1999, 37, 1823.
- [58] Lowe, J.S., Chowdhry, B.Z., Parsonage, J.R., Snowden, M.J., *Polymer* 1998, 39, 1207.
- [59] Ito, S., Ogawa, K., Suzuki, H., Wang, B., Yoshida, R., Kokufuta, E. *Langmuir* 1999, 15, 4289.
- [60] Bucio, E., Burillo G. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 2009, 280, 239.
- [61] Klouda, L., Mikos, A. G. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008, 68, 34.
- [62] Burillo, G., Bucio, E., Arenas, e., Lopez, G. P. *Macromol. Mater. Eng.* 2007, 292, 214.
- [63] Singh, M., Singhal, S. *J. Appl. Polym. Sci.* 2007, 104, 3261.
- [64] Singh, M. *J. Chem. Thermodyn.* 2006, 39, 240.
- [65] Singh, M. *J. Ind. Chem. Soc.* 2001, 78, 397.
- [66] Borghesani, G., Pedriali, R., Pulidori, F., Scaroni, I. *J. Soln. Chem.* 1986, 15, 397.
- [67] Cascella, C., Castronuovo, G., Elia, V., Sartorio, R., Wurzbürger, S. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1990, 86, 85.
- [68] Lagi, M., Nostro, P.L., Fratini, E., Ninham, B.W., Baglioni, P. *J. Phys. Chem. B* 2007, 111, 589.
- [69] Bini, R., Bortolini, O., Chiappe, C., Pieraccini, D., Siciliano, T., *J. Phys. Chem. B* 2007, 111, 598.
- [70] Gouveia, L. M., Grassl, B., Müller, A. *J. Colloid Interf. Sci.* 2009, 333, 152.
- [71] Chen, J. P., Hsu, M. S., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 1997, 2, 233.
- [72] Hoffman, A. S. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2002, 43, 3.
- [73] Fong, W. K., Hanley, T., Boyd, B. J. *J. Control. Release.* 2009, 135, 218.
- [74] Bayhan, M., Tuncel, A. *J. Appl. Polym. Sci.* 1998, 67, 1127.
- [75] Tuncel, A., Ozdemir A. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 2000, 11, 8177.
- [76] Tuncel, A. *J. Appl. Polym. Sci.* 1999, 74, 1025.
- [77] Chen, G., Ito, Y., Imanishi, Y. *Macromolecules* 1997, 30, 7001.
- [78] Yuk, S. H., Cho, S. H., Lee, S. H. *Macromolecules* 1997, 30, 6856.
- [79] Yoshida, R., Takahashi, T., Yamaguchi, T., Ichijo, H. *Adv. Mater.* 1997, 9, 175.
- [80] Wu, C., Zhou, S. *Macromolecules* 1997, 30, 574.
- [81] Sen, M., Sari, M. *Eur. Polym. J.* 2005, 41, 1304.
- [82] Cho, S. H., Jhon, M. S., Yuk, S. H. *Eur. Polym. J.* 1999, 35, 1841.
- [83] Chatterji, S., Kwon, I. K., Park, K. *Prog Polym Sci.* 2007, 32, 1083.
- [84] Jeong, B., Gutowska, A. *Trends Biotechnol.* 2002, 20, 305.
- [85] Lendlein, A., Kelch, S. *Mater Sci Forum* . 2005, 492
- [86] Yoshida, M., Langer, R., Lendlein, A., Lahann, J. *Polym Rev.* 2006, 46, 347.
- [87] Kost, J., Langer, R. *Adv Drug Deliver Rev.* 2001, 46, 125.
- [88] Dennis, G. R., Garnett, J. L. Elvis, Z. *Radiat. Phys. Chem.* 2003, 67, 39.
- [89] Burillo, G., Oseguera, M. A., Vazquez, C. *Rad. Phys. Chem.* 1997, 50, 511.
- [90] Bucio, E., Burillo, G. *Polymer Bull* 1997, 38, 587.
- [91] Bucio, E., Aliev, R., Burillo, G. *Rad. Phys. Chem.* 1998, 52, 193.
- [92] Burillo, G., Díaz, A., Bucio, E. *J. Mex. Chem. Soc.* 2006, 50, 1.
- [93] Carreón, M. P., Aliev, R., Ocampo, R., Burillo, G. *Polymer Bull* 2000, 44, 331.
- [94] Aliev, R., Garcia, P., Burillo, G. *Radiat. Phys. Chem.* 2000, 58, 299.

- [95] Sadurni, P., Alagon, A., Aliev, R., Burillo, G., Hoffman, A. S. *J Biomat Sci-Polym E.* 2005,16, 181.
- [96] Bucio, E., Arenas, E., Burillo, G. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 2006,447, 203.
- [97] Bucio, E., Burillo, G. *Radiat Phys Chem.* 2007, 76, 1724
- [98] Palacios, O., Aliev, R., Burillo, G. *Polymer Bull.* 2003,51, 191.
- [99] Ramírez-Fuentes, Y. S., Bucio, E., Burillo, G. *Polymer Bull.* 2008, 60, 79.
- [100] Bucio, E., Aliev, R., Burillo, G. *Polymer Bull.* 2002, 45, 571.
- [101] Arenas, E., Bucio, E., Burillo, G., Lopez, G.P. *Polymer Bull* 2007,58, 401.
- [102] Ruiz, J. C., Burillo, G., Bucio, E. *Macromol..Mater. Eng.* 2007, 292, 1176.
- [103] Arenas, E., Bucio, E., Burillo, G., Lopez, G. P. *Des Monomers Polym.* 2007, 10, 459.
- [104] Meléndez-Ortiz, H. I., Bucio, E., Burillo G. *Radiat Phys Chem.* 2009, 78, 1.
- [105] Bhattacharya, A. *Prog. Polym. Sci.* 2000, 25, 371.
- [106] Nava-Ortiz, C. A. B., Burillo, G., Bucio, E., Álvarez-Lorenzo, C. *Radiat Phys Chem.* 2009, 78, 19.
- [107] Ruiz, J. C., Álvarez-Lorenzo, C., Taboada, P., Burillo, G., Bucio, E., De Prijck, K., Nelis, H. S., Coenye, T., Concheiro, A. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008, 70, 467-477.
- [108] Meléndez-Ortiz, Bucio E. *Polymer Bull* 2008, 61, 619.
- [109] Contreras-García, A., Burillo, G., Aliev, R., Bucio, E. *Radiat Phys Chem.* 2008, 77, 936.
- [110] Adem, E., Avalos-Borja, M., Bucio, E., Burillo, G., Castillon., F.F., Cota, L. *Nucl Intrum Meth B.* 2005,234, 471.
- [111] Rosiak, J. M., Ulanski, P., Pajewski, L. A., Yoshii, F., Makuuchi, K. *Radiat Phys Chem.* 1995, 46, 161.
- [112] Chen, G., Hoffman, A. S. *Nature.* 1995, 373, 49.
- [113] Holtz, J. H., Asher, S. A. *Nature.* 1997, 389, 829.
- [114] Yoshida, R., Ucida, K., Kaneko, Y., Sakai, K., Kikuchi, A., Sakurai, Y., Okano, T. *Nature.* 1995, 374, 240.
- [115] Dinarvand, R., D'Emanuele, A. *J. Control. Release.* 1995, 36, 221.
- [116] Hoffman, A. S. *J. Control. Release.* 1987, 6, 297.
- [117] Okumura, Y., Ito, K. *Adv. Mater.* 2001, 13, 485
- [118] Haraguchi, K., Takehisa, T. *Adv. Mater.* 2002, 14,1120.
- [119] Gong, J. P., Katsuyama, Y., Kurokawa, T., Osada, Y. *Adv. Mater.* 2003, 15, 1155.
- [120] Wang, Y., Wang, H. *Radiat Phys Chem.* 2009, 78, 234.
- [121] Kayaman, N., Kazan, D., Erarslan, A., Okay, O., Baysal, B. M. *J. Appl. Polym. Sci.* 1998, 67, 805.
- [122] Ozturk, V., Okay, O. *Polymer.* 2002, 43, 5017.
- [123] Sokker, H. H., Ghaffar, A. M. A., Gad Y. H., Aly, A. S. *Carbohydr. Polym.* 2009, 75, 222.
- [124] Peppas, N. A., Huang, Y., Torres-Lugo, M., Ward, J. H., Zhange, J. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2000, 2, 9.
- [125] Lingyun, C., Zhigang, T., Yumin, D. *Biomaterials* 2004, 25, 3725.
- [126] Bajpai, A. K., Shukla, S. K., Bhanu, S., Kankane, S. *Prog. Polym. Sci.* 2008, 33, 1088.
- [127] Plunkett, K. N., Berkowski, K. E., Moore, J.S. *Biomacromolecules* 2005, 6, 632.
- [128] Bhattarai, N., Ramay, H. R., Gunn, J., Matsen, F. A., Zhang, M. *J Control Release* 2005, 103, 609.
- [129] Alarcon, C. D. L., Penndam, S., Alexander, C. *Chem. Soc. Rev.* 2005, 34, 276.

- [130] Schilli, C. M., Zhang, M., Rizzardo, E., Thang, S. H., Chong, Y. K., Edwards, K. *Macromolecules* 2004, 37, 7861.
- [131] Zhang, X. Z., Yang, Y. Y., Chung, T. S., Ma, K. X. *Langmuir* 2001, 17, 6094.
- [132] Galaev, I. Y., Mattiasson, B. *Trends Biotechnol.* 1999, 17, 335.
- [133] Mucalo, M. R., Kato, K., Yokogawa, Y. *Colloid. Surface B.* 2009, 71, 52
- [134] Beebe, D. J., Moore, J., Bauer, J. M., Yu, Q., Liu, R. H., Devadoss, C., Jo, B. H. *Nature* 200, 404, 588.
- [135] Baroli, B. *J. Pharm. Sci.* 2007, 96, 2197.
- [136] Entezami, A. A., Massoumi, B. *Iran. Polym. J.* 2006, 15, 13.
- [137] Ghazizadeh, Y., Mirzadeh, H., Amanpour, S., Ahmadi, H., Rabbani, Sh. *Iran. Polym. J.* 2006, 15, 821.
- [138] Ganji, F., Vasheghani-Farahani, E. *Iran. Polym. J.* 2009, 18, 63.
- [139] Satish, C. S., Satish, K. P., Shivakumar, H. G. *Ind. J. Pharm. Sci.* 2006, 68, 133.
- [140] Hennink, W. E., Van Nostrum, C. F. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2002, 54, 13.
- [141] Wang, Z., Hou, X., Mao, Z., Ye, R., Mo, Y., Finlow, D. E. *Iran. Polym. J.* 2008, 17, 791.
- [142] Bagheri, S., Mohammadi-Rovshandeh, J., Hassan, A., *Iran. Polym. J.* 2007, 16, 489.
- [143] Zhang, Y., Zhu, W., Ding, J. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2005, 75, 342.
- [144] Baroli, B. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2006, 81, 491.
- [145] Lopes, M. A., Felisberti, M.I. *Biomaterials.* 2003, 24, 1279.
- [146] Oh, E. J., Kang, S. W., Kim, B. S., Jiang, G., Cho, I. H., Hahn, S. K., *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2008, 86, 685.
- [147] Coviello, T., Grassi, M., Rambone, G., Alhaique, F., *Biomaterials.* 2001, 22, 1899.
- [148] Garcia, Y., Collighan, R., Griffin, M., Pandit, A., *J. Mater. Sci-Mater. M.* 2007, 18, 1991.
- [149] Ganji, F., Abdekhodaie, M. J., Ramazany-Sadtabadi, A., *J. Sol-Gel Sci. Techn.*, 2007, 42, 47.
- [150] Mohamadnia, Z., Jamshidi, A., Mobedi, H., Ahmadi, E., Zohuriaan-Mehr, M. J. *Iran. Polym. J.* 2007, 16, 711.
- [151] Aalaie, J., Vasheghani-Farahani, E., Rahmatpour, A., Semsarzadeh, M.A. *Eur. Polym. J.* 2008, 44, 2024.
- [152] Aalaie, J., Vasheghani-Farahani, E., Semsarzadeh, M. A., Rahmatpour, A. *J. Macromol. Sci. B.* 2008, 47, 1017.
- [153] Stenekes, R. J., Talsma, H., Hennink, W. E., *Biomaterials.* 2001, 22, 1891.
- [154] Kimura, M., Fukumoto, K., Watanabe, J., Ishihara, K., *J. Biomat. Sci-Polym E.* 2004, 15, 631.
- [155] Oh, K. S., Han, S. K., Choi, Y. W., Lee, J.H., Lee, J. Y., Yuk, S. H. *Biomaterials.* 2004, 25, 2393.
- [156] Cappello, J., Crissman, J. W., Crissman, M., Ferrari, F. A., Textor, G., Wallis, O., Whitledge, J. R., Xia, Z., Burman, D., Aukerman, L., Stedronsky, E. R. *J. Control. Release.* 1998, 53, 105.
- [157] Lowman, A.M., Peppas, N.A. "Hydrogels" in E. Mathiowitz, ed., *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery.* Wiley, New York, 1999, pp. 397-418.
- [158] Cesteros, L. C., González-Teresa, R., Katime, I. *Eur. Polym. J.* 2009, 45, 6.

- [159] Fernández-Barbero, A., Suárez, I. J., Sierra-Martín, B., Fernández-Nieves, A., de las Niervas, F. J., Márquez, M., Rubio-Retama, J., López-Carrasco, E. *Adv. Colloid Interfac.* 2009, 88, 147-148.
- [160] Chaoliang, H., Kim, S. W., Lee, D. S. *J. Control. Rel.* 2008, 127, 189.
- [161] Schmaljohann, D., *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2006, 58, 1655.
- [162] Chen, J., Liu, M., Chen, S. *Mater. Chem. Phys.* 2009, 115, 339.
- [163] Gil, E. S., Hudson, S. M. *Prog. Polym. Sci.* 2004, 29, 1173.
- [164] Siegel, R. A. *Adv. Polym. Sci.* 1993, 109, 233.
- [165] Dimitrov, I., Trzebicka, B., Müller, A. H. E., Dworak, A., Tsvetanov, C. B. *Prog. Polym. Sci.* 2007, 32, 1275.
- [166] Göpferich, A. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008, 68, 1.
- [167] Li, W., Wu, W., Liu, W. *Int J Pharm* 2008, 346, 133.
- [168] Kisselev, A. M., Manias, E. *Fluid Phase Equilib.* 2007, 261, 69.
- [169] Gan, L. H., Roshan, D. G., Loh, X. J., Gan, Y. Y. *Polymer* 2001, 42, 65.
- [170] Gonzalez, N., Elvira, C., Roman, J. S. *Macromolecules* 2005, 38, 9298.
- [171] Cho, S. H., Jhon, M. S., Yuk, S. H., Lee, H. B. *J. Poly. Sci. B Polym. Phys.* 1997, 35, 595.
- [172] Khan, A. *J. Colloid. Interf. Sci.* 2007, 313, 697.
- [173] Wang, B., Xu, X., Wang, Z., Cheng, S., Zhang, X., Zhuo, R. *Colloid Surface B* 2008; 64, 34.
- [174] Li, H. *Inter. J. Solids Struct.* 2009, 46, 1326.
- [175] Mow, V. C., Kuci, S. C., Lai, W. M., Armstrong, C. G. *J. Biomech. Eng.-T ASME* 1980, 102, 73.
- [176] Myers, E. R., Lai, W. M., Mow, V. C. *J. Biomech. Eng.-T ASME* 1984, 106, 151.
- [177] Lanir, Y. *Biorheology* 1987, 23, 173.
- [178] Eisenberg, S. R., Grodzinsky, A. *J. Biomech. Eng.-T ASME* 1987, 109, 79.
- [179] Sperling, L. H., Mishra, V. "The Current Status of Interpenetrating Polymer Networks", in: *IPNs Around the World Science and Engineering*, S. C. Kim, L. H. Sperling, Eds., J. Wiley and Sons, New York 1997.
- [180] Sperling, L. H. *Interpenetrating Polymer Networks, and related Materials*, Plenum, New York, 1981.
- [181] Klempner, D., Sperling, L. H., Utracki, L. A. *Interpenetrating Polymer Networks*. Adv. Chem. Ser. 239, ACS Books, Washington, DC. 1991.
- [182] Miyata, T. *Supramolecular Design for Biological Applications*, CRC Press. 2002.
- [183] Mukae, K., Bae, Y. H., Okano, T., Kim, S. W. *Polym. J.* 1990, 22, 206.
- [184] Mukae, K., Bae, Y. H., Okano, T., Kim, S. W. *Polym. J.* 1990, 22, 250.
- [185] Zhang, X-Zh., Wu, Da-Q., Chu, Ch-Ch. *Biomaterials.* 2004, 25, 3793.
- [186] Moura, M. R., Guilherme, M. R., Campese, G. M., Rodovanovic, E., Rubira, A. F., Muniz, E. C. *Eur. Polym. J.* 2005, 41, 2845.
- [187] Kim, S. J., Park, S. J., Kim, I. Y., Chung, T. D., Kim, H. Ch. *J. Appl. Polym. Sci.* 2003, 90, 881.
- [188] Fei, J., Zhang, Z., Gu, L. *Polym. Int.* 2002, 51, 502.
- [189] Guilherme, M. R., Campese, G. M., Rodovanovic, E., Rubira, A. F., Tambourgi, E. B., Muniz, F. C. *J. Membrane Sci.* 2006, 275, 187.
- [190] Ortega, A., Bucio, A., Burillo, G. *Polymer Bull.* 2007, 58, 565.
- [191] Ortega, A., Bucio, A., Burillo, G. *Polymer Bull.* 2008, 60, 515.

- [192] Hasan, E., Zhang, M., Müller A., Tsvetanov CB. *J. Macromol. Sci. Part A- Pure Appl. Chem.* 2004, *41*, 467.
- [193] Aoshima, S., Sugihara, S. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 2000, *38*, 3962.
- [194] Dimitrov, P., Rangelov, S., Dworak, A., Tsvetanov C. *Macromolecules* 2004, *37*, 1000.
- [195] Sugihara, S., Kanaoka, S., Aoshima, S. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 2004, *42*, 2601.
- [196] Li, C., Buurma, N., Haq, I., Turner, C., Armes, S. *Langmuir.* 2005, *21*, 11026.
- [197] Sugihara, S., Kanaoka, S., Aoshima S. *Macromolecules* 2005, *38*, 1919.
- [198] Chen, X., Ding, X., Zheng, Z., Peng, Y. *Colloid Polym. Sci.* 2005, *283*, 452.
- [199] Hua, F., Jiang, X., Zhao, B. *Macromolecules.* 2006, *39*, 3476.
- [200] Mertoglu, M., Garriera, S., Laschewsky, A., Skrabania, K., Storsberg J. *Polymer* 2005, *46*, 7726.
- [201] Dimitrov, P., Rangelov, S., Dworak, A., Haraguchi, N., Hirao, A., Tsvetanov C., *Macromol. Symp.* 2004, *215*, 127.
- [202] Soga, O., Van Nostrum, C., Hennik, W. *Biomacromolecules.* 2004, *5*, 818.
- [203] Park, J., Kataoka, K. *Macromolecules.* 2006, *39*, 6622.
- [204] Ali, M., Stöver, H. *Macromolecules.* 2004, *37*, 5219.
- [205] Mori, T., Nakashima, M., Fukuda, Y., Minagawa, K., Tanaka, M., Maeda, Y. *Langmuir.* 2006, *22*, 4336.
- [206] Berndt, I., Richtering, W. *Macromolecules.* 2003, *36*, 8780.
- [207] Berndt, I., Pedersen, J., Lindner, P., Richtering, W. *Langmuir.* 2006, *22*, 459.
- [208] Xu, J., Luo, S., Shi, W., Liu, S. *Langmuir.* 2006, *22*, 989.
- [209] Luo, S., Xu, J., Zhu, Z., Wu, C., Liu, S. *J. Phys. Chem. B.* 2006, *110*, 9132.
- [210] Stoltz, M., Brazel, C. *J. Appl. Polym. Sci.* 2003, *88*, 2974.
- [211] Gan, L., Gan, Y., Deen, C. *Macromolecules.* 2000, *33*, 7893.
- [212] Wang, Z. C., Xu, X. D., Chen, C. S., Wang, G. R., Wang, B., Zhang, X. Z., Zhuo, R. X. *Colloid. Surface. B.* 2008, *67*, 245.
- [213] Fundueanu, G., Constantin, M., Ascenzi, P. *Biomaterials.* 2008, *29*, 2767.
- [214] Chen, G., Hoffman, A. *Macromol. Chem. Phys.* 1995, *196*, 1251.
- [215] Feil, H., Bae, Y., Feijen, J., Kim, S. *Macromolecules.* 1993, *26*, 2496.
- [216] Salgado-Rodriguez, R., Licea-Claverie, A., Arndt, K. *Eur. Polym. J.* 2004, *40*, 1931.
- [217] Hahn, M., Goemitz, E., Dautzenberg, H. *Macromolecules.* 1998, *31*, 5616.
- [218] Bulmus, V., Ding, Z., Long, C., Stayton, P., Hoffman, A. *Bioconjugate Chem.* 2000, *11*, 78.
- [219] Bokias, G., Hourdet, D., Iliopoulos, I. *Macromolecules.* 2000, *33*, 2929.
- [220] Kim, Y., Lim, J., Donahue, H., Lowe, T. *Tissue Eng.* 2005, *11*, 30.
- [221] Tuncel, A., Demirgoez, D., Patir, S., Piskin, E. *J. Appl. Polym. Sci.* 2002, *84*, 2060.
- [222] Nonaka, T., Hua, L., Ogata, T., Kurihara, S. *J. Appl. Polym. Sci.* 2003, *87*, 386.
- [223] Bisht, H., Wan, L., Mao, G., Oupicky, D. *Polymer.* 2005, *283*, 662.
- [224] Spafford, M., Polozova, A., Winnik, F. *Macromolecules.* 1998, *102*, 7099.
- [225] Aoyagi, T., Ebara, M., Sakai, K., Sakurai, Y., Okano, T. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* 2000, *11*, 101.
- [226] Bignotti, F., Penc̄o, M., Sartore, L., Peroni, I., Mendichi, R., Casolaro, M. *Polymer.* 2000, *41*, 8247.
- [227] Makhaeva, E., Tenhu, H., Khokhlov, A. *Macromolecules.* 2002, *35*, 1870.

- [228] Jones, J., Novo, N., Flager, K., Pagnucco, C., Carew, S., Cheong, C. J. *Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 2005, *43*, 6095.
- [229] Beltran, S., Hooper, H. H., Blanch, H. W., Prausnitz, J. M. *J. Chem. Phys.* 1990, *92*, 2061.
- [230] Dong, L., Hoffman, A. J. *Control. Release.* 1991, *15*, 141.
- [231] Chourdakis, N., Bokias, G., Staikos, G. *J. Appl. Polym. Sci.* 2004, *92*, 3466.
- [232] Vasile, C., Bumbu, G., Mylonas, Y., Bokias, G., Staikos, G. *Polym. Int.* 2004, *53*, 1176.
- [233] Lui, S., Billingham, N., Armes, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, *40*, 2328.
- [234] Walderhaug, H., Söderman, O. *Curr. Opin. Colloid. In.* 2009, *14*, 171.
- [235] Meyer, M., Schlaad, H. *Macromolecules.* 2006, *39*, 3967.
- [236] Kukula, H., Schlaad, H., Antonietti, M., Foerster, S. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, *124*, 1658.
- [237] Determan, M., Cox, J., Seifert, S., Thiyagarajan, P., Mallapragada, S. *Polymer.* 2005, *46*, 6933.
- [238] Argawal, A., Unfer, R., Mallapragada, S. *J. Control Release.* 2005, *103*, 245.
- [239] Glinel, K., Sukhorukov, G., Moehwald, H., Khrenov, V., Tañer, K. *Macromol. Chem. Phys.* 2003, *204*, 1784.
- [240] Emileh, A., Vasheghani-Farahani, E., Imani M. *Eur. Polym. J.* 2007, *43*, 1986.
- [241] Bokias, G., Staikos, G., Iliopolous, I. *Polymer.* 2000, *41*, 7399.
- [242] Chen, Y., Yi, M. *Radiat. Phys. Chem.* 2001, *61*, 65.
- [243] He, C., Kim, S. W., Lee, D. S. *J. Control. Release.* 2008, *127*, 189.
- [244] Kuckling, D., Adler, H., Arndt, K., Ling, L., Habicher, W. *Macromol. Chem. Phys.* 2000, *201*, 273.
- [245] Xu, Y., Shi, L., Ma, R., Zhang, W., An, Y., Zhu, X. *Polymer.* 2007, *48*, 1711.
- [246] Zhang, Y., Xu, L., Yi, M., Zhai, M., Wang, J., Ha, H. *Eur. Polym. J.* 2006, *42*, 2959.
- [247] Xu, F., Kang, E., Neoh, K. *Biomaterials.* 2006, *27*, 2787.
- [248] Zhang, W., Shi, L., Ma, R., An, Y., Xu, Y., Wu, K. *Macromolecules.* 2005, *38*, 8850.
- [249] Yoo, M., Sung, Y., Lee, Y., Cho, C. *Polymer.* 1998, *16*, 3703.
- [250] Chen, W. X., Fan, X. D., Huang, Y., Liu, Y. Y., Sun, L. *React. Funct. Polym.* 2009, *69*, 97.
- [251] Durand, A., Hourdet, D. *Polymer.* 1999, *49*, 4941.
- [252] Wang, Y., Morawetz, H. *Macromolecules.* 1989, *22*, 164.
- [253] Durand, A., Hourdet, D. *Macromol. Chem. Phys.* 2000, *201*, 858.
- [254] Bokias, G., Mylonas, Y., Staikos, G., Bumbu, G., Vasile, C. *Macromolecules.* 2001, *34*, 4958.
- [255] Vasile, C., Bumbu, G., Dimitriu, R., Staikos, G. *Eur. Polym. J.* 2004, *40*, 1209.
- [256] Gao, C., Moehwald, H., Shen, J. *Polymer.* 2005, *46*, 4088.
- [257] Konak, C., Reschel, T., Oupicky, D., Ulbrich, K. *Langmuir.* 2002, *18*, 8217.
- [258] Choi, H., Yamamoto, K., Ooya, T., Sasaki, S., Yui, N. *Macromolecules.* 2003, *36*, 5342.
- [259] Zhang, M., Liu, L., Zhao, H., Yang, Y., Fu, G., He, B. *J. Colloid Interface Sci.* 2006, *301*, 85.
- [260] El-Hag, A., Said, A. *Biomaterials* 2005, *26*, 2733.
- [261] Zhang, J., Peppas, N. *Macromolecules.* 2000, *33*, 102.
- [262] Elaissari, A., Holt, L., Meunier, F., Voisset, C., Pichot, C., Mandrand, B. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1999, *10*, 403.

- [263] Ding, X., Sun, Z., Wan, G., Jiang, Y. *React. Funct. Polym.* 1998, 38, 11.
- [264] Ding, X., Sun Z., Zhang, W., Peng, Y., Wan, G., Jiang, Y. *J. Appl. Polym. Sci.* 2000, 77, 2915.
- [265] Elaissari, A., Bourrel, V. *J. Magn. Magn. Mater.* 2001, 225, 127.
- [266] Park, T., Hoffman, A. *Enzyme Microb. Technol.* 1993, 15, 467.
- [267] Kato, N., Oishi, A., Takahashi, F. *Mater. Sci. Eng.* 1998, C6, 291.
- [268] Takahashi, F., Sakai, Y., Mizutani, Y. *J. Ferment. Bioeng.* 1997, 83, 152.
- [269] Kondo, A., Fukuda, H. *J. Ferment. Bioeng.* 1997, 84, 337.
- [270] Schmidt, A. *J. Magn. Magn. Mater.* 2005, 289, 5.
- [271] Gelbrich, T., Feyen, M., Schmidt, A. *Macromolecules.* 2006, 39, 3469.
- [272] Mueller-Schulte, D., Schmitz-Rode, T. *J. Magn. Magn. Mater.* 2006, 302, 267.
- [273] Irie, M., Kungwachankun, D. *Macromolecules.* 1986, 19, 2476.
- [274] Lee, H., Pietrasik, J., Matyjazewski, K. *Macromolecules.* 2006, 39, 3914.
- [275] Shersen, S., Westcott, S., Halas, N., West, J. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000, 51, 293.
- [276] Gorelikov, I., Field, L., Kumacheva, E. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 15938.
- [277] Sershen, S., Westcott, S., West, J., Halas, N., *Appl. Phys. B.* 2001, 73, 379.
- [278] Chapiro, A. 1962, *Radiation Chemistry of Polymeric Systems*, New York, Interscience.
- [279] Fang, B., Ling, Q., Zhao, W., Ma, Y., Bai, P., Wei, Q., Li, H., Zhao, C. *J. Membrane Sci.* 2009, 329, 46.
- [280] Pieracci, J., Wood, D. W., Crivello, J. V., Belfort, G. *Chem. Mater.* 2000, 12, 2123.
- [281] Wang, T., Wang, Y. Q., Su, Y. L., Jiang, Z. Y. *Colloid. Surface B.* 2005, 46, 99.
- [282] Wang, Y. Q., Wang, T., Su, Y. L., Peng, F. B., Wu, H., Jiang, Z. Y. *Langmuir.* 2005, 21, 11856.
- [283] Jung, B. *J. Membr. Sci.* 2004, 229, 129.
- [284] Rahimpour, A., Madaeni, S. S., Mehdipour-Ataei, S., *J. Membr. Sci.* 2008, 311, 349.
- [285] Ulbricht, M. *Polymer.* 2006, 47, 2217.
- [286] Zhao, B., Brittain, W. J., *Prog. Polym. Sci.* 2000, 25, 677-710.
- [287] Kennedy, J. E., Devine, D. M., Lyons, J. G., Geever, L. M., Higginbotham, C. L. *J. Mater. Sci.* 2009, 44, 889.
- [288] Kubota, H., Ogiwara, Y. *J. Appl. Polym. Sci.* 1969, 13, 1569.
- [289] Margutti, S., Vicini, S., Proietti, N., Capitani, D., Conio, G., Pedemonte, E. *Polymer.* 2002, 43, 6183.
- [290] Oprea, S., Dumitriu, S., Bulacovski, V. *Cell. Chem. Technol.* 1979, 13, 3.
- [291] Ranby, B. 1978, *New methods for graft copolymerization onto cellulose and starch*. New York: Academic Press.
- [292] Trinci, E., Vicini, S., Proietti, N., Capitani, D. *Eur. Polym. J.* 2005, 41, 1196.
- [293] Zampano, G., Bertoldo, M., Bronco, S. *Carbohydr. Polym.* 2009, 50, 218.
- [294] Vertommen, M. A. M. E., Cornelissen H.-J. L., Dietz, C. H. J. T., Hoogenboom, R., Kemmere, M. F., Keurentjes, J. T. F. *J. Membrane Sci.* 2008, 322, 243.
- [295] Zhang, L., Xu, T. W., Lin, Z. *J. Membrane Sci.* 2006, 281, 491.
- [296] Ying, L., Kang, E. T., Neoh, K.G., Kato, K., Iwata, H., *J. Membrane Sci.* 2004, 243, 253.
- [297] Bayer, C. L., Peppas, N. A. *J. Control Release* 2008, 132, 216.
- [298] Hesampour, M., Huuhilo, T., Makinen, K., Manttari, M., Nystrom, M. *J. Membrane Sci.* 2008, 310, 85.

- [299] Yang, C. C., Tian Y. Q., Jen, A. K. Y., Chen, W. C. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* 2006, *44*, 5495.
- [300] Da Silva, R. M. P., Mano, J. F., Reis, R. L. *Trends Biotechnol.* 2007, *25*, 577.
- [301] Ling-Shu, W., Yun-Feng, Y., Jing, T., Meng-Xin, H., Zhi-Kang, X. *J. Membrane Sci.* 2009, *327*, 174.
- [302] Konig, C., Van Duin, M., Pagnouille, C., Jerome. R. *Prog. Polym. Sci.* 1998, *23*, 707.
- [303] Hu, G. H., Sun, Y. J., Lambla, M. J. *J. Appl. Polym. Sci.* 1996, *61*, 1039.
- [304] Bhattacharya, A., Misra, B. N. *Prog. Polym. Sci.* 2004, *29*, 767.
- [305] Moad, G. *Prog. Polym. Sci.* 1999, *24*, 81.
- [306] Bettini, S. H. P., Agnelli, J. A. M. *J. Appl. Polym. Sci.* 1999, *74*, 247.
- [307] Passaglia, E., Coiai, S., Aglietto, M., Ruggeri, G., Ruberta, M., Ciardelli, F. *Macromol. Symp.* 2003, *198*, 147.
- [308] Huang, H., Liu, N. C. *J. Appl. Polym. Sci.* 1998, *67*, 1957.
- [309] Deng, J., Wang, L., Liu, L., Yang, W. *Prog. Polym. Sci.* 2009, *34*, 156.
- [310] Yang, W. T., Rånby, B. *Macromolecules* 1996, *29*, 3308.
- [311] Ma, H., Davis, R. H., Bowman, C.N. *Macromolecules* 2000, *33*, 331.
- [312] Ma, H., Davis, R. H. *Polymer* 2001, *42*, 8333.
- [313] Loh, F. C., Lau, C. B., Tan, K. L., Kang, E. T. *J. Appl. Polym. Sci.* 1995, *56*, 1707.
- [314] Deng, J. P., Yang, W. T. *J. Appl. Polym. Sci.* 2003, *87*, 2318.
- [315] Deng, J. P., Yang, W. T. *J. Appl. Polym. Sci.* 2001, *80*, 1426.
- [316] Martínez, J. G., Benavides, R., Guerrero, C., Reyes, B. E. *Polym. Degrad. Stabil.* 2004, *86*, 129.
- [317] Kang, E. T., Neoh, K. G., Tan, K. L., Senn, B. C., Pigram, P. J., Liesegang, J. *Polym. Adv. Technol.* 1997, *8*, 683.
- [318] Pun, M. Y., Neoh, K. G., Kang, E. T., Loh, F. C., Tan, K. L. *J. Appl. Polym. Sci.* 1995, *56*, 355.
- [319] Muñoz-Muñoz, F., Ruiz, J. C., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., Bucio, E. *Eur. Polym. J.* 2009, *45*, 1859.