



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIES POLIMÉRICAS RICAS EN AMINAS
PRIMARIAS PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS, MEDIANTE RADIACIÓN GAMMA**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. MITZI PAULINA PÉREZ CALIXTO

**DRA. SOFÍA GUILLERMINA BURILLO AMEZCUA
INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES**

Ciudad de México, febrero, 2020



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIES POLIMÉRICAS RICAS EN AMINAS PRIMARIAS PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS, MEDIANTE RADIACIÓN GAMMA

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. MITZI PAULINA PÉREZ CALIXTO

**DRA. SOFÍA GUILLERMINA BURILLO AMEZCUA
INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES**



Ciudad de México, febrero, 2020

JURADO

Presidente: Dra. Alicia Negrón Mendoza
Vocal: Dr. Juan Manuel Navarrete Tejero
Vocal: Dr. Emilio Bucio Carrillo
Vocal: Dr. Francisco Javier Illescas Martínez
Secretario: Dr. Ernesto Rivera García

*A **Dios** el “Shadai”, porque de su plenitud tomamos todos
A mis **padres**, por tanto amor que me dan
A mi hermano y mejor amigo **Daniel**, porque contigo todo es mejor
A mis **amigos**, por hacerme más placentera la vida*

A los que estuvieron, están y llegarán

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a mi asesora, la **Dra. Guillermina Burillo Amezcua**, por confiar en mi para llevar a cabo este proyecto. Su orientación y conocimientos han sido invaluable. Por enseñarme más que solo ciencia.

A los integrantes del comité tutor; **Dr. Emilio Bucio Carrillo** y al **Dr. Francisco Alberto Ruiz Treviño**; por sus valiosos comentarios, sugerencias y aportaciones a lo largo del desarrollo de esta investigación

A los miembros del jurado; a la **Dra. Alicia Negrón Mendoza**, al **Dr. Juan Manuel Navarrete Tejero**, al **Dr. Emilio Bucio Carrillo** y al **Dr. Francisco Javier Illescas Martínez** y al **Dr. Ernesto Rivera García**, por sus comentarios, sugerencias y contribuciones para una mejor presentación de esta tesis.

A **mis compañeros del laboratorio de macromoléculas**, por todos los momentos de aprendizaje y convivencia juntos.

A la **Dra. Carmen Álvarez**, al **Dr. Ángel Concheiro** y a la **Dra. Patricia Díaz**, de la Universidad Santiago de Compostela, por sus ideas, contribuciones y orientación recibida.

A la **Dra. Alejandra Ortega Aramburu**, técnico académico del laboratorio de radiación en macromoléculas II, por su apoyo en la realización de esta tesis. A **María de la Luz Escamilla Moya** y a **Luis Miguel Valdez Pérez** del ICN por su asistencia técnica. Asimismo, al **Fís. Francisco García Flores** y al **M. en C. Benjamín Leal Acevedo** de la unidad de irradiación, por su apoyo en las irradiaciones realizadas. De igual manera, del Instituto de Investigación en Material, al **Fis. Lázaro Huerta Arcos**, por su colaboración en la caracterización por XPS y al **M en C. Eliezer Hernández Mecinas**, por ayuda en la caracterización mecánica. Al **Fis Yasab Ruiz Hernández** del LansBioDyT, por su ayuda en las mediciones de AFM.

Al programa DGAPA UNAM IN200116, por el apoyo financiero para la compra de reactivos.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de doctorado, asociada al Programa de maestría y doctorado en ciencias químicas. No. de becario 29292. De la misma forma, al programa **becas de movilidad**, por la beca otorgada para la realización de una estancia de investigación en la facultad de farmacia de la Universidad Santiago de Compostela, España.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, mi alma mater, y al **Instituto de Ciencias Nucleares (ICN)**, por toda la contribución a mi formación académica. Al **Posgrado en Ciencias Químicas** junto con la unidad de docencia del ICN, a cargo del **Dr. Alberto Güijosa Hidalgo** y la secretaria **Elsa Mora Rivera**, otorgaron apoyo económico para la presentación de este trabajo en congresos internacionales.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

La presente tesis doctoral se realizó en el laboratorio de Macromoléculas del departamento de Química de radiaciones y radioquímica perteneciente al Instituto de Ciencias Nucleares UNAM, junto con el Instituto de Ortopedia y Banco de Tejidos Muscosqueléticos de la Universidad Santiago de Compostela, España.

Parte de este trabajo se presentó en los siguientes congresos:

“International Conference on Applications of Radiation Science and Technology (ICARST) 2017”. Viena, Austria. Abril 24-28, 2017

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF PP FILMS RICH IN PRIMARY AMINES FOR CELL CULTURES, BY GAMMA RADIATION

Mitzi P. Pérez-Calixto^{1,*} & Guillermina Burillo¹

¹Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito exterior, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, México

“The 13th meeting of ionizing radiation & polymers symposium (IRaP) 2018” Moscú, Rusia, Agosto 26-30, 2018

USE OF GAMMA RADIATION FOR SYNTHESIS OF POLYPROPYLENE FILMS GRAFT WITH PRIMARY AMINES FOR CELL CULTURES

Mitzi P. Pérez-Calixto^{1,*} & Guillermina Burillo¹

¹Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito exterior, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, México

“Quimiunam, 2018”. Ciudad Universitaria, agosto, 2018

Síntesis y caracterización de superficies poliméricas ricas en aminas primarias para el cultivo de células, mediante radiación gamma

Mitzi P. Pérez-Calixto & Guillermina Burillo

Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México,
Circuito exterior, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, México

Publicación generada de esta tesis:

Pérez-Calixto, L. Huerta, G. Burillo, Amine modifications of polypropylene films by gamma radiation to be applied in cell cultures, MRS Commun. 9 (2019) 1323–1330. doi:10.1557/mrc.2019.133.



RESUMEN



El funcionamiento de un biomaterial depende en gran medida de varios agentes que determinan su interacción adecuada con el entorno biológico. Factores como la rigidez del sustrato, la topografía y la química de la superficie, influyen en el comportamiento celular. Aunque se ha avanzado mucho en la comprensión de cómo las propiedades de los biomateriales afectan el comportamiento celular, la información disponible sobre las señalizaciones biofísica y bioquímica que un biomaterial puede ejercer sobre las células del sistema inmune, específicamente en los macrófagos, es poco conocida. Algunas investigaciones afirman que cambiar la química de la superficie puede mejorar la adhesión celular.

El objetivo de este trabajo fue la modificación superficial de películas de polipropileno (PP) con grupos amino primarios para promover la adhesión celular, así como el estudio de la influencia de aminas primarias sobre la polarización de macrófagos. Los macrófagos juegan un papel muy importante en el proceso de sanación y se polarizan en dos fenotipos: proinflamatorios (M1) y antiinflamatorios (M2). La prevalencia de uno sobre otro depende de varios factores microambientales.

Actualmente, la modificación superficial puede llevarse a cabo mediante métodos físicos o químicos, estos últimos presentan algunas desventajas debido a la presencia de aditivos o subproductos en el sistema. Para superar este problema, se usó radiación gamma para injertar cloruro de acilo sobre películas de PP por medio del método directo, formando un cloruro de acilo, como primer paso. Posteriormente, las películas injertadas con AC se hicieron reaccionar con etilendiamina en varios disolventes y así obtener películas con 12, 17 y 49% de aminas primarias (NH₂)



RESUMEN



respecto al nitrógeno total. La concentración de aminas en la superficie se determinó por una reacción de derivatización con 4-trifluorometil benzaldehído (TFBA) y se caracterizó por XPS (relaciones N/C). La caracterización de las películas se llevó a cabo mediante análisis elemental, FTIR-ATR, SEM, AFM y el cambio de hidrofobicidad se midió mediante ángulo de contacto, del cual; se encontró que las películas con 6 % de nitrógeno presentaron el ángulo más bajo (57.2). La estabilidad de las aminas se midió hasta 90 días, sin encontrar “envejecimiento” de los grupos funcionales, como se encontró por la modificación de la técnica de plasma.

Las películas funcionalizadas con grupos aminos en la superficie presentaron su módulo de Young más alto, aunado a esto, los ensayos biológicos mostraron mayor adsorción de albúmina sérica (BSA) que fibrinógeno (FB).

Para los ensayos de adhesión celular se usaron células fibroblastos Balb/3T3 y macrófagos humanos THP-1. Los macrófagos mostraron una mejora en la adhesión en películas funcionalizadas después de 2 h de cultivo. La polarización de los macrófagos se controló mediante la secreción de citocinas (IL-6, IL-10, IL-12, IL-1 β , INF- γ , TNF- α y metaloproteinasa-8) para marcadores M1 y M2. Los niveles de citocinas relacionados con la fase inflamatoria aguda, especialmente TNF- α , fueron más bajos en las películas aminadas, aunque la producción de marcadores antiinflamatorios (IL-10) no fue diferente a estos. En general, la funcionalización con grupos aminos disminuyó la secreción de citocinas proinflamatorias, lo cual puede ser útiles para el diseño correcto de materiales de curación en heridas



ABSTRACT



The performance of a biomaterial is strongly dependent on several factors that determine their proper interaction with the biological environment. Substrate stiffness, topography and surface chemistry among others influence cell behavior. Although much progress has been made in understanding how the properties of implantable biomaterials affect cells, the information available on the biophysical and biochemical signaling that a biomaterial may exert on cells of the immune system, specifically in macrophages, is less known. Some researches claimed to change surface chemistry can improve cell adhesion.

The aim of this work was modified surface of polypropylene (PP) films with primary amino groups for cell adhesion as well as the study of influence of amines over macrophage polarization. Macrophages play a very important role in the healing process and they polarize into pro-inflammatory (M1) and anti-inflammatory (M2) phenotypes; the prevalence of one type over another depends on several microenvironmental factors.

Currently, the superficial modification can be carried out by physical or chemical methods which present several disadvantages due to the presence of additives or sub products in the system. To overcome this problem, gamma radiation was applied to graft acryloyl chloride onto PP films by direct method, forming an acyl chloride as a first step. Subsequently, the radiation-grafted films were reacted with ethylenediamine in several solvents to obtain films with 12, 17 and 49 % of primary amines (NH_2) respect to total nitrogen. The surface amine concentration was determined by a derivatization reaction with 4-trifluoromethyl benzaldehyde (TFBA) and characterized by XPS (N/C ratios). Films characterization was carried-



ABSTRACT



out by means of FTIR-ATR, SEM, AFM, elementary analysis and the change of hydrophobicity was measured by means of contact angle which films with 6% of nitrogen presented the lowest angle (57.2°). The stability of the amines was measured up to 90 days, without the occurrence of aging as was found by plasma modification. Amino-functionalized films presented higher Young's Modulus, besides in biological test, they adsorbed more serum albumin (BSA) than fibrinogen (FB).

For cell adhesion assay Balb/3T3 fibroblast cells and THP-1 human macrophages were used. Macrophages showed enhanced adhesion on functionalized films after 2 h of culture. Macrophages polarization was monitored by means of cytokines secretion (IL-6, IL-10, IL-12, IL- 1β , INF- γ , TNF- α and metalloproteinase-8) for both M1 and M2 markers. Cytokine levels related to acute inflammatory phase, especially TNF- α , were lower on amino-functionalized films, although the production of anti-inflammatory markers (IL-10) was not different. Overall, amino-functionalization attenuates the secretion of pro-inflammatory cytokines, which may be useful for the correct design of wound healing materials.



<i>Lista de Figuras</i>	<i>XII</i>
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN	1
Capítulo 2. ANTECEDENTES Y GENERALIDADES	5
2.1 Polímeros con aplicaciones biomédicas	5
2.2 Matrices poliméricas en dispositivos médicos	7
2.2.1 Polipropileno	8
2.3 Modificación superficial de polímeros para aplicaciones biomédicas	9
2.4 Modificación de polímeros por el método de plasma	11
2.5 Modificación de polímeros por la radiación gama	13
2.5.1 Injerto por medio del método directo	15
2.5.2 Injerto por medio del método de pre-irradiación oxidativa	16
2.5.3 Interacción de la Radiación con la Materia	17
2.6 Adhesión celular	20
2.6.1 Grupos funcionales para la adhesión celular	20
2.6.1.1 Grupos aminas para adhesión celular	23
2.7 Cuantificación de aminas primarias	24
2.7.1 Reacciones de derivatización	25
2.8 Espectroscopia fotoelectrónica por rayos X (XPS)	27
2.9 Macrófagos	29
2.9.1 Origen de los macrófagos	32
2.9.2 Polarización de los macrófagos	33
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	40
Justificación	40
Objetivo General	41
Objetivos particulares	41
Capítulo 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	43



ÍNDICE GENERAL



4.1 Modificación de películas de polipropileno	43
4.1.1 <i>Materiales</i>	43
4.1.2 <i>Injerto de AC sobre PP usando método de irradiación directa</i>	44
4.1.3 <i>Reacción de Alcohólisis (esterificación)</i>	45
4.1.4 <i>Reacción de aminólisis</i>	46
4.2 Caracterización	47
4.2.1 <i>Espectroscopia de infrarrojo (FTIR-ATR)</i>	47
4.2.2 <i>Ángulo de contacto</i>	47
4.2.3 <i>Medición de rugosidad por medio de microscopia de fuerza atómica (AFM)</i>	48
4.2.4 <i>Microscopia electrónica de barrido (SEM)</i>	48
4.2.5 <i>Derivatización química con TFBA</i>	48
4.2.5.1 <i>Espectroscopia de fotoelectrones por rayos X (XPS)</i>	49
4.2.6 <i>Análisis elemental</i>	50
4.2.7 <i>Propiedades mecánicas</i>	50
4.3 Adsorción de proteínas	50
4.4 Ensayos de adhesión celular	51
4.4.1 <i>Preparación de las películas</i>	51
4.4.2 <i>Cultivo celular con fibroblastos Balb/3T3</i>	52
4.4.3 <i>Viabilidad celular al sustrato</i>	52
4.4.4 <i>Cultivo y diferenciación de monocitos THP-1</i>	54
4.4.5 <i>Cultivo de macrófagos</i>	54
4.4.6 <i>Cuantificación de ADN</i>	56
4.4.7 <i>Análisis estadístico</i>	56
Capítulo 5. ANÁLISIS DE RESULTADOS	57
5.1 Injerto de AC sobre PP	57
5.2 Reacción de aminólisis	60
5.3 Caracterización	61
5.3.1 <i>FTIR-ATR</i>	61
5.3.2 <i>Ángulo de contacto</i>	62



ÍNDICE GENERAL



5.3.3	<i>Determinación de rugosidad por medio de AFM</i>	63
5.3.4	<i>Análisis por SEM</i>	64
5.3.5	<i>Propiedades mecánicas</i>	66
5.3.6	<i>Análisis superficial por XPS</i>	68
5.4	Estabilidad de las aminas primarias ante condiciones ambientales	73
5.5	Caracterización biológica	74
5.6	Adsorción de proteínas	75
5.6.1	<i>Adhesión celular</i>	77
5.6.2	<i>Polarización de macrófagos</i>	78
6.	CONCLUSIONES	85
7.	REFERENCIAS	87
8.	ANEXOS	98



Lista de Figuras



Figura 1. Reacción de polimerización del propileno.....	8
Figura 2. Injerto por medio del método directo.....	15
Figura 3. Injerto por la radiación ionizante. Método de pre irradiación oxidativa	17
Figura 4. Diferentes grupos funcionales que se han utilizado en superficies para adhesión celular	21
Figura 5. Reacción de derivatización química entre trifluorometil benzaldehido (TFBA) y aminas primarias.....	25
Figura 6. Respuesta del sistema inmune innato ante la implantación biológica inerte de un biomaterial	30
Figura 7. Origen de macrófagos.....	33
Figura 8. Reacción de injerto de cloruro de acrililo en polipropileno mediante radiación gamma.	45
Figura 9. Reacción de esterificación entre PP- <i>g</i> -AC y MeOH.....	46
Figura 10. Reacción de aminólisis del AC con ED.....	47
Figura 11. Reacción de oxidación del tetrazolio a sales de formazán mediante la acción de deshidrogenasas mitocondriales.....	53
Figura 12. Injerto de AC sobre PP en concentración de [AC]:30% v/v y [AC]:50% v/v en tolueno. Intensidad de dosis: 4 kGy/h	59
Figura 13. FTIR de los diferentes sistemas: 1)películas de PP; 2)PP- <i>g</i> -MA; 3)PP- <i>g</i> -AC(ED).....	61
Figura 14. Ángulo de contacto de a)películas de PP; b)PP- <i>g</i> -(AC)ED _{6%} ; c)PP- <i>g</i> -(AC)ED _{14%} d)PP- <i>g</i> -(AC)ED _{24%}	63
Figura 15. Valores de rugosidad promedio en la superficie, medidas por AFM de (a)PP, b)PP- <i>g</i> -AC(ED) _{6%} , (c)PP- <i>g</i> -AC(ED) _{14%} , (d)PP- <i>g</i> -AC(ED) _{24%} , (abajo) perfil 3D de las muestras.....	64
Figura 16. Micrografías SEM de sección transversal de (a)PP, (b)PP- <i>g</i> -AC(ED) _{6%} , y (c)PP- <i>g</i> -AC(ED) _{24%} . (d)PP- <i>g</i> -AC(ED) _{14%}	66
Figura 17. Curvas de esfuerzo vs deformación de películas de polipropileno prístino y funcionalizadas con grupos amino.	67
Figura 18. Espectros de alta resolución deconvolucionados de C1s: (a) película de PP prístino, (b)PP- <i>g</i> -AC(ED)+TFBA, (c)PP- <i>g</i> -AC(ED) y (c1) amplificación de	



Lista de Figuras

PP- <i>g</i> -AC(ED). Espectros de alta resolución de Ns1 de (d)PP- <i>g</i> -AC(ED) y (e) PP- <i>g</i> -AC(ED)+TFBA. Estructuras de (f) PP, (g) PP- <i>g</i> -AC(ED) y (h)PP- <i>g</i> -AC(ED)+TFBA.....	69
Figura 19. Adsorción relativa de albúmina de suero bovino (barras azules) y fibrinógeno (barras verdes) en polipropileno (PP), PP- <i>g</i> -ED _{17%} (ED17%), PP- <i>g</i> -ED _{49%} (ED49%) y PP- <i>g</i> -ED _{12%} (ED12%) en comparación con el control positivo (C+) (membranas de nitrocelulosa). Las diferencias estadísticamente significativas con respecto a las películas prístinas (PP) se muestran con un asterisco (*). P<0.05.	76
Figura 20. Adhesión de células Balb/3T3 en diferentes tiempos de cultivo en películas prístinas y funcionalizadas con amino a) 2 h (barras rosas), 6 h (barras azules) y 24 h (barras moradas). Las diferencias estadísticamente significativas con respecto a las películas prístinas (PP) se muestran con un asterisco encima (*) p <0.05.....	77
Figura 21. Adhesión de células de macrófagos humanos en películas prístinas y funcionalizadas a las 2 h (barras rosas), 6 h (barras azules) y 24 h (barras naranjas). Las diferencias estadísticamente significativas respecto a las películas prístinas (pp) se muestran con un asterisco arriba (*) p<0.05.....	79
Figura 22. Secreción de citocinas de macrófagos humanos después de a)2h) y b)6h cultivadas en PP, PP- <i>g</i> -ED _{17%} (ED17%), PP- <i>g</i> -ED _{49%} (ED49%), PP- <i>g</i> -ED _{12%} (ED12%), control con LPS (C+LPS) y sin tratamiento (-).....	82



Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

Los biomateriales son aquellos materiales, ya sea naturales o sintéticos, que interactúan con los sistemas biológicos por ciertos periodos con la finalidad de completar el tejido o ayudar a mejorar el funcionamiento de este [1]. El papel de un biomaterial depende en gran medida de varios factores que determinan su interacción adecuada con el entorno biológico. La rigidez del sustrato, la topografía y la química de la superficie, entre otros, influyen en el comportamiento celular [2]. Aunque se ha avanzado mucho en la comprensión de cómo las propiedades de los biomateriales afectan las células somáticas [3] y las células madre [4–6], la información disponible sobre el efecto de la señalización biofísica y bioquímica de los biomateriales en las células del sistema inmune, específicamente en los macrófagos, es menos conocida [7].

Los macrófagos pueden polarizarse en dos fenotipos principales, generalmente conocidos como proinflamatorios (M1) y antiinflamatorios (M2). Ambos tienen diferentes roles en el proceso de curación. Los macrófagos M1, son los encargados de fagocitar microorganismos y restos de matriz celular, características que se requieren en las primeras etapas de la curación. Los macrófagos M2 contribuyen a la reparación de tejidos y a la promoción de la angiogénesis [8]. La prevalencia de un fenotipo sobre otro conduce a resultados opuestos en varias enfermedades. En un tumor sólido, los macrófagos M1 pueden matar las células tumorales mientras que, por el contrario, los macrófagos M2 facilitan la progresión e invasión del tumor. De acuerdo con esto, ciertos tipos de tumores (tumores de pulmón y carcinoma de mama) [9,10] se



caracterizan por tener una alta producción de macrófagos M2 que promueven la angiogénesis [11,12]. El estado de polarización de los macrófagos varía en los diferentes tipos de heridas; por ejemplo, en las lesiones activas, los macrófagos expresan marcadores M1 y M2, mientras que en las heridas crónicas los macrófagos expresan principalmente marcadores M1 [8] En las últimas décadas, se ha realizado un gran esfuerzo en la modificación de la superficie de los biomateriales para promover la adhesión celular, la proliferación la migración y la diferenciación [4,5,13,14]. La funcionalización con aminos primarias ha mostrado efectos positivos sobre la adhesión celular debido a interacciones electrostáticas en medios acuosos a valores de pH fisiológicos.

La funcionalización de la superficie de biomateriales con grupos amina puede llevarse a cabo mediante varios métodos físicos y químicos entre los que destacan la polimerización por plasma (inmersión o spray) y la fotopolimerización UV [15,16]. Se ha observado que la modificación superficial por plasmas forma sistemas parcialmente solubles en agua, debido a la creación de oligómeros solubles en disolventes polares y la formación de radicales libres; los cuales intervienen en la incorporación de oxígeno (envejecimiento) al ponerse en contacto con el aire [15,17]. Una técnica menos utilizada es la polimerización por injerto inducida por la radiación gamma, que presenta las ventajas de no requerir aditivos químicos; la reacción puede proceder a temperatura ambiente; y el procedimiento es muy versátil ya que la mayoría de los materiales son propensos a absorber la radiación y ser modificados por esta, por lo tanto, se puede usar para preparar cualquier combinación deseada de polímeros [18–22]. La polimerización por injerto mediante rayos gamma implica la creación de sitios



activos a través de la absorción de energía para producir radicales libres en la matriz polimérica, que posteriormente reaccionan con monómeros de diferente naturaleza química para introducir nuevos grupos funcionales en la superficie del polímero [18]. Entre los diversos métodos que pueden usarse para el injerto inducido por la radiación, el método directo es el más simple y consiste en la irradiación de la matriz polimérica en un disolvente que contiene los monómeros para obtener un polímero de injerto.

En el presente trabajo se planteó el problema de dilucidar si el injerto de aminas libres estables (primarias y secundarias) en películas de polipropileno, componente de dispositivos médicos, puede alterar las características relevantes que modulan el comportamiento de los macrófagos, principalmente la adhesión y la polarización. Dado que las propiedades mecánicas del material también son relevantes para la respuesta celular, se usó como sustrato, polipropileno (PP), polímero bastante hidrofóbico, además de no ser propenso a colonizarse por las células [23]. Para llevar a cabo el trabajo, primero se injertó cloruro de acrililo (AC) en polipropileno (PP) por medio de radiación gamma por el método directo; posteriormente, las películas se hicieron reaccionar con etilendiamina (ED) para obtener aminas libres en la superficie. A los biomateriales obtenidos se les determinó la concentración de aminas primarias en la superficie mediante una reacción de derivatización con 4-trifluorometil benzaldehído (TFBA), para facilitar su caracterización mediante XPS (relación N/C). También se caracterizaron mediante FTIR-ATR, ángulo de contacto, AFM y SEM. Se estudió el efecto del decaimiento con el tiempo de los grupos funcionales amina durante un período de tiempo en condiciones ambientales, para



saber si existía envejecimiento (oxidación). La caracterización biológica se llevó a cabo con respecto a la adsorción de proteínas, la adhesión y la supervivencia de fibroblastos y macrófagos junto con el perfil de citocinas producido por los macrófagos en contacto con el material modificado. La información recopilada puede ser útil para el diseño racional de apósitos para heridas y dispositivos médicos implantables.



Capítulo 2. ANTECEDENTES Y GENERALIDADES

2.1 Polímeros con aplicaciones biomédicas

Los biomateriales son aquellos materiales, ya sea naturales o sintéticos, generalmente hechos de múltiples componentes, que interactúan con los sistemas biológicos. Los biomateriales a menudo se usan en aplicaciones médicas para aumentar o reemplazar una función natural.

Los materiales poliméricos han sido una de las piedras angulares para el desarrollo de biomateriales. Un desafío importante en los últimos años ha sido el diseño de biomateriales que puedan lograr efectos biológicos específicos en las células, y viceversa.

Los biomateriales se pueden clasificar ampliamente en polímeros sintéticos; naturales e híbridos; los polímeros sintéticos, incluyen materiales hidrofóbicos como el polipropileno (PP) polietileno (PE), politetrafluoroetileno (PTFE) e hidrofílicos como el α -hidroxiácido [de la familia que incluye ácido poli(láctico-*co*-glicólico), PLGA], polianhídridos, entre otros. Para los polímeros naturales se encuentran azúcares complejos (hialuronatos, quitosano); e inorgánicos (hidroxiapatita). También se clasifican de acuerdo a su estructura (hidrogeles) [24], o su función como inyectables [25], superficies de películas o catéteres modificada [26] para la liberación de fármacos [26,27] o para alguna aplicación específica.



La existencia de una amplia variedad de materiales con aplicaciones biomédicas ha surgido de las extensas necesidades anatómicas y fisiológicas del cuerpo humano. Por ejemplo, un dispositivo con propiedades mecánicas relativamente fuertes puede ser requerido en situaciones donde el dispositivo puede ser sometido a carga de peso o tensión, o donde es necesario el mantenimiento de una cierta citoarquitectura. En otros, redes más flexibles pueden ser necesarias o incluso preferibles. Todo dependerá de su aplicación (implantación o procedimiento mínimo invasivo), y la naturaleza del material, por lo que surge la necesidad de funcionalización en masa o superficie.

Es importante señalar que la "biocompatibilidad" no es una propiedad intrínseca de un material, y depende del entorno biológico que existe con respecto a la reacción del tejido. Por ejemplo, un material que es biocompatible en tejido subcutáneo podría no serlo en el nervio o en el peritoneo.

Del mismo modo, es importante tener en cuenta la toxicidad del material, no debe presentar citotoxicidad ni ser un sistémico tóxico. Por lo tanto, es importante tener en cuenta la toxicidad potencial de los productos de descomposición de los materiales, así como de los agentes de reticulación residuales (por ejemplo, glutaraldehído), grupos reactivos en polímeros (aldehídos, amidas o hidrazidas).

Un concepto básico para el área de ingeniería de tejidos es que el biomaterial realiza una función de tiempo limitado pero que, siendo ajeno al medio natural, desaparecerá una vez que se ha cumplido esa función. En consecuencia, muchos materiales utilizados en la ingeniería de tejidos son biodegradables. Los materiales biodegradables son particularmente propensos a ser utilizados en el área de liberación



controlada de fármacos; sin embargo, no es necesario que el biomaterial presente esta propiedad, en parte o en su totalidad.

Como se mencionó anteriormente, las propiedades mecánicas de los biomateriales en aplicaciones biomédicas están determinados por el entorno. En general, las propiedades del biomaterial deben coincidir con las del tejido circundante: por ejemplo, relativamente duro en los huesos, más blando en los tejidos flexibles. Las propiedades también estarán definidas por la necesidad de porosidad de las células adherentes.

Las propiedades de adhesión celular son obviamente importantes, ya que las células deben unirse a la matriz. Sin embargo, hay circunstancias, como en “micro-patterning” de construcciones de ingeniería de tejidos [28], donde los materiales con menor adhesión celular pueden estar alternados con materiales de mejor adhesión celular para formar las estructuras deseadas. Por lo que numerosas propiedades de los biomateriales son útiles para su desarrollo y aplicaciones específicas.

2.2 Matrices poliméricas en dispositivos médicos

Los polímeros clásicos como el polipropileno (PP), polietileno (PE), poliestireno (PE) y una amplia gama de poliuretanos, han sido ampliamente usados en el campo de la medicina como componentes de dispositivos médicos. Adicionalmente, con el desarrollo de nuevas técnicas de funcionalización de polímeros, su uso se ha extendido a la producción de materiales más sofisticados para su uso como implantes o dosificadores de fármacos. En general las poliolefinas y los poliuretanos son polímeros



versátiles que pueden ser utilizados en diferentes aplicaciones, especialmente en el área de la medicina.

2.2.1 Polipropileno

El polipropileno es un material termoplástico de bajo costo que es producido por la polimerización de las moléculas de propileno, que son las unidades monoméricas (Figura 1). Existen diversas técnicas para producir el polipropileno comercial; sin embargo, la más usada es por medio de catalizadores (Ziegler-Natta o metallocenos) debido a que con este método puede controlarse la esterioquímica en la etapa del crecimiento, de tal manera que se puede obtener una mayor linealidad en el polímero por la quiralidad del polímero obtenido. Esto da lugar a un polímero que presenta buenas propiedades mecánicas y térmicas y es resistente contra diversos disolventes orgánicos, ácidos y bases inorgánicas. Pertenecen al grupo de las poliolefinas y es utilizado en una amplia gama de aplicaciones, desde empaques para alimentos hasta equipos de laboratorio.

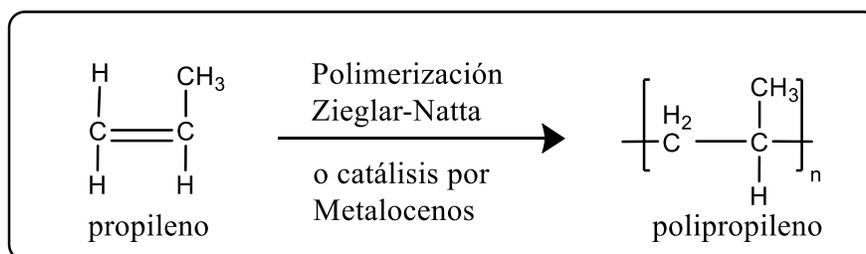


Figura 1. Reacción de polimerización del propileno

El PP al ser un hidrocarburo es inerte a una gran variedad de compuestos químicos a temperatura ambiente, esta característica junto con su alta hidrofobicidad (ángulo de contacto de 90°) limita su uso en otras aplicaciones, por lo que la introducción de



monómeros con ciertos grupos funcionales por medio de un proceso de copolimerización de injerto puede obtener nuevas propiedades y al mismo tiempo le permite conservar sus propiedades mecánicas.

Numerosos métodos se han usado para funcionalizar el PP, entre los que destacan la iniciación química, la radiación UV y la radiación ionizante. Diferentes autores [19,20,29–32] han logrado la modificación superficial de diferentes polímeros, especialmente en superficies de polipropileno por medio del método de irradiación directa y de pre-irradiación oxidativa [20,29,31,33]. Sin embargo, el PP es susceptible a la degradación cuando es expuesto a la radiación cuando las dosis sobrepasan los 100 kGy, especialmente cuando es irradiado en presencia de oxígeno; por otro lado, el PP puede entrecruzarse. El grado de cristalinidad y estereoquímica del PP, la razón de dosis, temperatura y la presencia de oxígeno, determina que un proceso predomine sobre otro [34].

2.3 Modificación superficial de polímeros para aplicaciones biomédicas

Para obtener una respuesta específica de algunos materiales, estos se han modificado en la superficie, agregando macromoléculas por medio de métodos químicos, como por reacciones de radicales libres, este proceso es llamado injerto.

Algunas investigaciones han demostrado la “habilidad” de que superficies de polímeros cargadas se pueden enlazar a proteínas o células *in vitro* [35] o sirven como matrices para cargar y liberar fármacos [20].



Como se ha mencionado anteriormente, el éxito de un implante está determinado por la respuesta de su entorno biológico circundante. Esto se rige en gran medida por las propiedades de la superficie del biomaterial donde ocurre la interacción. En consecuencia, esfuerzos considerables se han centrado en la ingeniería de superficie de biomateriales para darles la capacidad de promover la adhesión celular, la proliferación y mantener las funciones celulares. Por lo tanto, una caracterización clara de las propiedades físicas y químicas de la superficie del biomaterial tiene una gran importancia científica en las interacciones entre células y biomateriales, lo que permite la evaluación de la bioactividad del biomaterial.

Hasta la fecha, se ha establecido una gran cantidad de técnicas en ingeniería de superficie para mejorar la biocompatibilidad. Las investigaciones generalmente contienen tres pasos principales: después de que se realiza la modificación superficial del biomaterial, se realizan caracterizaciones químicas y físicas seguidas de una evaluación de biocompatibilidad a través del cultivo celular *in vitro* [23,27].

En las últimas décadas, el tratamiento de la superficie de biomateriales con plasma ha sido ampliamente estudiado [13,35–37]. La modificación por plasma de los biomateriales permite cambiar las características de la superficie para lograr una mejor biocompatibilidad sin alterar las propiedades del volumen. Los resultados de la modificación del plasma pueden controlarse fácilmente eligiendo gases o monómeros adecuados y las condiciones apropiadas en el plasma [36].



2.4 Modificación de polímeros por el método de plasma

A menudo se afirma que el plasma es el cuarto estado de la materia en la secuencia: sólido, líquido, gaseoso y plasma. El estado de la materia cambia de sólido a líquido a gas a plasma, al aumentar la temperatura del material en consideración.

Cuando los átomos de gas se someten a algún tipo de energía (térmica, eléctrica o luminosa) se convierten en iones al liberar algunos de sus electrones. Las colisiones entre electrones y moléculas y las rupturas de enlaces en las moléculas crean radicales. La energía también creará especies excitadas que generarán fotones. Así es como se crea el plasma con una mezcla única de electrones, iones, radicales, fotones y átomos y moléculas neutras [35,38,39].

Hay diferentes fuentes de plasma disponibles y sus dimensiones están determinadas en gran medida por la aplicación en particular para la que está destinado. Existen diferencias claras no solo en la forma física de varias fuentes de plasma, sino también en el comportamiento temporal de los plasmas que se generan en diferentes fuentes.

La polimerización por plasma de monómeros a base de aminas es una forma no tan eficiente de preparar superficies de polímeros bioactivados. Las superficies funcionalizadas con aminas se han obtenido previamente mediante polimerización en plasma utilizando diferentes monómeros como alilamina [40], etilendiamina [41], n-heptilamina [42], propilamina [16], ciclopropilamina [43], diaminociclohexano [44] y butilamina [45].

Los grupos amino generalmente se incorporan en la superficie utilizando gases no formadores de polímeros (precursor no polimérico) (activación de plasma de amina)



como el amoníaco (NH_3^+) o nitrógeno (N_2), o monómeros de amina (polimerización por plasma de aminas). El primero erosiona la superficie del biomaterial e introduce al nitrógeno; el último deposita una capa de polímero que contiene grupos nitrógeno en la superficie [45].

En el campo biomédico, los medios de plasma utilizados más comúnmente son el amoníaco como precursor no polimérico y la alilamina como precursor polimérico. La polimerización de amina por medio de la técnica de plasma es la más utilizada para la incorporación de aminas primarias [39].

La polimerización por plasma presenta algunas ventajas que incluyen (i) deposición de película ultrafina, (ii) buena adhesión al material del sustrato [46]. Como ya se mencionó, para los tratamientos de modificación de superficie, varias fuentes de plasma están disponibles. Cada uno de ellos tiene sus propias características, tales como densidad, temperatura, composición química, etc., y conduce a resultados diferentes. La elección de la fuente adecuada para la tarea específica requiere el estudio de las características de los diversos plasmas.

No obstante, estas técnicas han demostrado la formación de sistemas parcialmente solubles en agua ya que existe un incremento en la formación de oligómeros debido al número de radicales libres que se forman durante el depósito de las aminas, dando lugar a la formación de otros grupos funcionales como cetonas y aldehído; asimismo, existe un incremento en la formación de radicales libres, los cuales intervienen en la incorporación de oxígeno (envejecimiento) al ponerse en contacto con aire al polímero recién sintetizado [47].



Cuando se realizan estudios de estabilidad (envejecimiento) de las aminas en aire, el oxígeno presente en el medio tiene mayor tiempo para difundir a través del grosor de las películas porque todos los polímeros aunque presenten mayor reticulación, son permeables por pequeñas moléculas como las de oxígeno y agua.

Existen principalmente tres factores, que afectan la estabilidad de los recubrimientos por plasma: (i) ciertos grupos funcionales son inherentemente reactivos y pueden afectar la hidrofiliidad del material; (ii) el peso molecular promedio está dictado por un equilibrio entre los procesos de propagación en cadena y escisión durante la deposición y (iii) la creación de radicales libres y las reacciones de reticulación intermoleculares resultantes [47]. Por esto se recurre a técnicas de modificación alternas que no presentan este tipo de desventajas, como la modificación por radiación gamma, donde la modificación es versátil y no presenta problemas en la purificación del material modificado.

2.5 Modificación de polímeros por la radiación gama

La copolimerización de injerto resulta ser una técnica 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 la radiación ionizante, luz UV o por medio de iniciadores químicos [18,34].

Entre dichas técnicas, una menos utilizada es la polimerización por injerto inducida por radiación (RIGP), la cual 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 precursores químicos para llevar a cabo las reacciones de polimerización [17,47-48]. Mediante esta técnica se promueve la formación de enlaces covalentes, y por lo tanto genera reacciones de injerto con una arquitectura relativamente controlable. Esta técnica se puede dirigir a modificación de superficies únicamente o generar cambios sobre la masa del polímero porque la radiación gamma presenta alta penetrabilidad.

Debido a la versatilidad de la técnica se pueden sintetizar una gran variedad de polímeros con ciertas propiedades que con un homopolímero no se obtendrían ya que puede usarse en cualquier temperatura y estado físico de las muestras [18]. Varios materiales biocompatibles son modificados por medio de injerto de otros monómeros para potencializar su respuesta. El injerto en polímeros consiste en introducir cadenas laterales a una matriz polimérica por medio de formación de enlaces covalentes.

La técnica RIGP involucra la formación de sitios químicamente activos sobre la matriz polimérica, los cuales pueden iniciar la polimerización, adicionalmente se forman intermediarios muy reactivos tales como; radicales libres, iones y moléculas excitadas, llevando a la transformación en la estructura química del polímero por la formación de enlaces covalentes, de manera que se combinan las propiedades de cada polímero. La ventaja respecto a la polimerización por plasma es que, los intermediarios formados mediante la radiación gamma, su vida media es muy corta, por lo que la polimerización se lleva a cabo principalmente por medio de radicales libres.



Existen diferentes formas de injertar un monómero dentro de un polímero mediante radiación ionizante, dentro de los más usados es el método de radiación directo y el método de pre-irradiación oxidativa [50].

2.5.1 Injerto por medio del método directo

Este método consiste en irradiar el polímero en presencia de un monómero bajo atmosfera inerte. El monómero puede estar en fase gas, vapor, o en solución. La irradiación produce radicales libres en la cadena principal del polímero, los cuales inician el injerto, formando ramificaciones en la estructura principal (Figura 2).

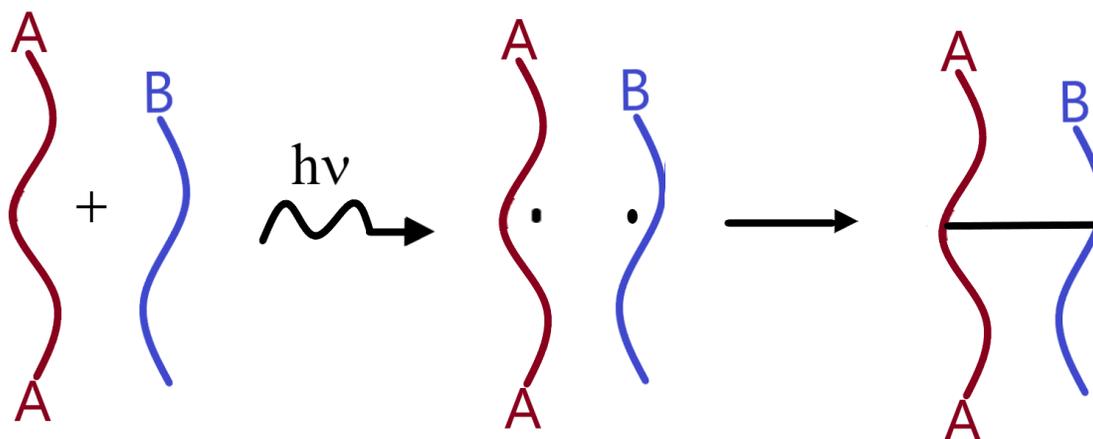


Figura 2. Injerto por medio del método directo

La desventaja que se asocia a este método es la alta formación de polímero, a casusa de que la radiación ionizante no es selectiva, dando también la formación de radicales en el monómero, por consecuencia la formación de homopolímero es alta. por lo que podría dificultar la separación de la matriz polimérica injertada y el homopolímero.



Para reducir la reacción de homopolimerización se puede usar inhibidores de radicales, los más comunes son especies iónicas como Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} o llevar a cabo la reacción en temperaturas más bajas. La reducción de homopolímero se puede dar gracias a que las reacciones de óxido-reducción entre la especie metálica y las cadenas de homopolímero, actúan desactivando los radicales libres de las cadenas poliméricas en propagación. Es importante destacar que, cuando la concentración de un inhibidor es alta, la reacción de injerto también puede verse disminuida. La naturaleza química del polímero determina la forma de su modificación y la tendencia al ser expuesto a la radiación ionizante, es decir, la tendencia a entrecruzarse o sufrir degradación.

2.5.2 Injerto por medio del método de pre-irradiación oxidativa

El injerto también puede obtenerse irradiando la matriz polimérica en presencia de aire, para formar peróxidos e hidroperóxidos, enlaces inestables que se rompen fácilmente con el aumento de la temperatura, con la ruptura de estos se forman radicales libres, lo que lleva a la formación de radicales C-O que comienzan el proceso de injerto (Figura 3) Una de las ventajas de este método es que se pueden almacenar las muestras irradiadas a baja temperatura por determinados períodos de tiempo, al igual que detener la reacción de injerto en cualquier momento. Sus desventajas es que requiere dosis más altas que en el método directo.

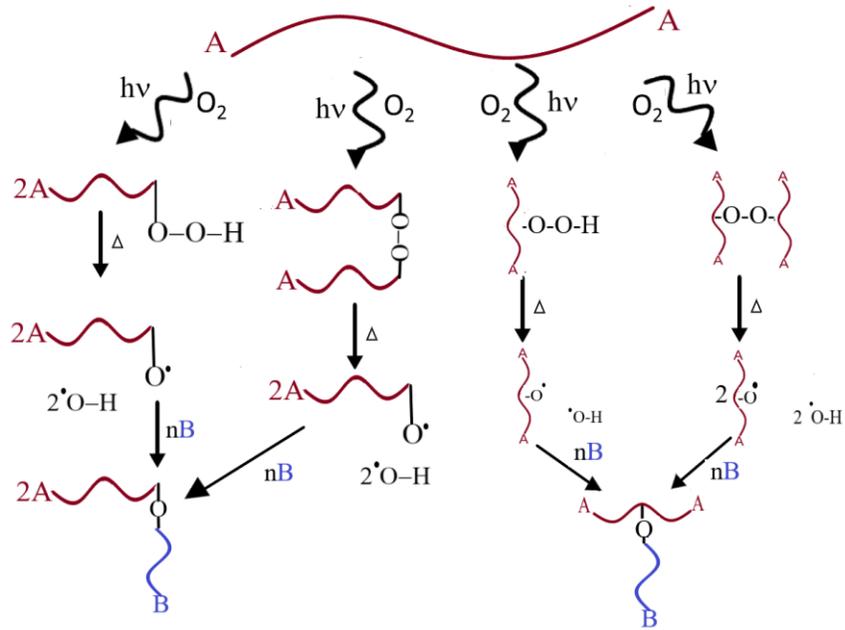


Figura 3. Injerto por la radiación ionizante. Método de pre-irradiación oxidativa

2.5.3 Interacción de la Radiación con la Materia

Los rayos gamma (γ) son emitidos por el núcleo, cuando éste se encuentra en un estado excitado y decae a un nivel inferior de energía. Este tipo de radiación no posee carga eléctrica ni masa, por lo que, la interacción con la materia no es por atracción o repulsión eléctrica. Los principales mecanismos de interacción de la radiación con la materia son [51]:

1. Efecto Comptom
2. Efecto fotoeléctrico
3. Formación de pares



Por medio de estos tres mecanismos, la radiación será capaz de generar la ionización y excitación de la materia. En los materiales poliméricos, esta interacción ocurre mediante el efecto Compton, principalmente

2.5.3.1 Efecto Comptom

En este efecto, el fotón sólo cede una parte de su energía al electrón de las capas más externas. El fotón incidente se dispersa de su trayectoria con cierto ángulo respecto de su dirección incidente disminuyendo su energía y un electrón es desviado de su órbita. En esta interacción se conserva la energía y la cantidad de movimiento. El efecto Compton es una interacción elástica entre el fotón incidente y un electrón libre o ligado fuertemente a su núcleo, que se supone en reposo. Cabe decir que, si el electrón está ligado fuertemente a su núcleo, todo el átomo experimenta retroceso por la interacción con el fotón incidente. La probabilidad que ocurra este efecto es notable a energías “medias”, la prevalencia del efecto Compton puede extenderse, entre aproximadamente, 20 keV y 30 MeV.

2.5.3.2 Efecto fotoeléctrico

En este proceso el fotón incidente pierde totalmente su energía en el choque con un electrón de las capas internas del átomo. Los electrones se encuentran retenidos en sus capas electrónicas con cierta energía. Para que alguno de ellos pueda ser arrancado y suceda el efecto fotoeléctrico, es necesario que la radiación incidente tenga al menos una energía igual a la energía de unión del electrón. El efecto fotoeléctrico no es posible por interacción de un fotón con un electrón libre, ya que



debe de intervenir otra partícula para que se conserve la cantidad de movimiento. El efecto fotoeléctrico es más probable cuando el electrón está más fuertemente unido. La probabilidad de que tenga lugar el efecto fotoeléctrico es notablemente mayor a “bajas” energías y alta sección eficaz como en el caso de un material atenuador como el plomo. A energías bajas, los electrones son emitidos preferentemente formando un ángulo de 90° en relación con la dirección del fotón incidente. A energías más elevadas, la distribución se desplaza hacia adelante.

En esta interacción, la totalidad de la energía del fotón se transfiere a un electrón de las capas L y K del átomo y es expulsado con cierta energía cinética. El fotón desaparece por completo y el exceso de energía en relación con la energía de unión del electrón se convierte en energía cinética del electrón. El fotón no ioniza más que un solo átomo y el electrón desplazado puede excitar o ionizar numerosos átomos y moléculas. La ionización interna causada por el efecto fotoeléctrico termina con la emisión simultánea de rayos X, que también son un tipo de fotón.

2.5.3.3 Producción de pares

En este proceso, el fotón desaparece totalmente y en su lugar aparece el par negatrón-positrón (por lo que se dice que el fotón es absorbido cerca del núcleo); se trata de una transformación de energía en materia. Como la suma de las masas en reposo del negatrón y positrón equivalen a una energía de 1.02 MeV, esta tendrá que ser la energía mínima del fotón incidente para que pueda tener lugar la formación o producción de pares. Entonces la formación del par dependerá de la energía del fotón



y del número atómico, generalmente alto, con el que interacciona. La formación ocurre en el campo colombiano del núcleo atómico. El negatrón y el positrón pierden rápidamente su energía cinética por colisiones con los átomos o partículas circundantes. Una gran cantidad de los positrones formados en esta interacción se transforman en radiación de aniquilación.

2.6 Adhesión celular

Es conocido que la mayoría de las células no se adhieren a superficies de polímeros hidrofóbicos como: polietileno, polipropileno, o poliestireno. Sin embargo, superficies hidrofílicas que son funcionalizadas por plasma o ultravioleta (UV) son conocidas por promover la adhesión celular. Los macrófagos se ha demostrado que se pueden adherir a superficies que contengan un recubrimiento de concentración de grupos amino primarias [35].

2.6.1 Grupos funcionales para la adhesión celular

Las células son sensibles al entorno en el que existen [2,7], respondiendo a señales químicas y aspectos morfológicos de las superficies con las que están en contacto. Aunque los andamios o soportes de polímeros sintéticos tienen grandes ventajas en términos de su proceso de fabricación y otras propiedades, sufren de la falta de señales para que las células puedan realizar sus funciones. Es muy complicado encontrar un material adecuado que cumpla con todos los requerimientos y funcione apropiadamente en un ambiente biológico. Una forma es seleccionar un material que tenga las propiedades de volumen requeridas, como resistencia mecánica y modificar



sus propiedades de superficie mediante un tratamiento de superficie [26,27], ya sea por modificación física o química. En las últimas décadas, el tratamiento de la superficie de biomateriales con diversas técnicas ha sido ampliamente estudiado [13,22,35,36,38,39,52–54]. La modificación superficial de los biomateriales brinda la oportunidad de cambiar las características de la superficie para lograr una mejor biocompatibilidad sin alterar las propiedades en masa. Entre otras técnicas físicas y químicas para mejorar la biocompatibilidad, la modificación de la superficie por plasma se ha utilizado para adaptar las propiedades de la superficie mediante la funcionalización de esta para controlar su respuesta biológica. Se han investigado diferentes grupos funcionales, tales como grupos carboxilo [55], hidroxilo [56], aminas (en especial aminas primarias) [57], metilos y silanos [4].

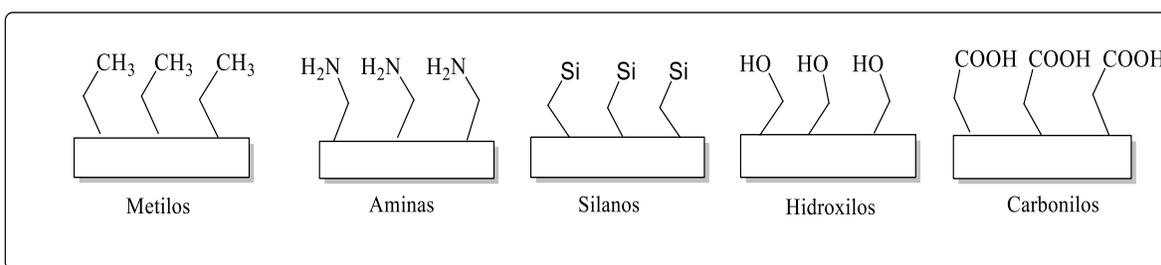


Figura 4. Diferentes grupos funcionales que se han utilizado en superficies para adhesión celular

Actualmente, hay una falta de conocimiento sobre cómo la química de la superficie puede controlar el comportamiento de algunas células (adhesión/morfología y diferenciación). Se ha obtenido información sobre cómo las propiedades del material, específicamente el uso de monocapas autoensambladas para crear una química de superficie bien definida, pueden afectar la adsorción de proteínas y un tipo celular



funcional diferenciado [55,58–61], es decir, la energía superficial puede influir en la adhesión y funcionalidad de algunas líneas celulares como; células mesenquimales (MSC), macrófagos, o células madre.

Se han hecho diferentes investigaciones en las que se ha modificado químicamente algún tipo de superficie con diferentes grupos funcionales como metilo ($-\text{CH}_3$), hidroxilo ($-\text{OH}$), carboxilo ($-\text{COOH}$), amino ($-\text{NH}_2$) y silano ($-\text{SH}$) (Figura 4) especialmente para células mesenquimales [4,5]. Todos estos grupos funcionales se pueden encontrar naturalmente dentro de los sistemas biológicos y la inclusión de estos grupos, proporciona un método que produce sustratos bien definidos y organizados con diferentes químicas y energías superficiales. Si bien se ha investigado la importancia en la unión ósea y otras aplicaciones específicas para células mesenquimales (MSC) no se ha explorado la cuestión básica de cómo se puede utilizar la química de la superficie para controlar la adhesión inicial y la diferenciación celular de otro tipo de células, o si existe una química de superficie óptima para el mantenimiento del fenotipo.

Curran y colaboradores demostraron que los cambios en la química de la superficie dan como resultado diferencias en la energía de la superficie y la posterior adhesión de proteínas y células [4,5]; sin embargo, hasta ahora se tiene poco conocimiento de cómo los cambios en la conformación de proteínas y la adhesión celular influyen en la diferenciación de las MSC. Por ejemplo, el rendimiento de los condrocitos, es decir, la expresión de colágeno II se optimiza cuando los condrocitos se redondean y el



número de adherencias focales se reduce en comparación con los condrocitos bien diseminados que crecen en cajas de cultivo estándar de poliestireno (TCPS) [62,63]. Por lo tanto, controlar el nivel de adhesión celular en una superficie podría proporcionar una forma de controlar o influir en el proceso de diferenciación.

2.6.1.1 Grupos aminos para adhesión celular

Numerosas investigaciones han demostrado que la modificación de superficies con grupos amina en la superficie pueden modular la adhesión celular, así como diferenciación y proliferación celular de ciertas líneas celulares, entre las que destacan los fibroblastos, células mesenquimales [5] y monocitos/macrófagos [52]; mejorar la compatibilidad de los tejidos o modificar la hidrofiliidad del material. Los grupos amino también pueden usarse para unir químicamente moléculas bioactivas [64,65] tales como oligo-sacáridos [66], enzimas [45,67], péptidos [68–70] u otros polímeros; además, existe la posibilidad que algunos grupos amino puedan ser usados como sitios reactivos, para reacciones de inmovilización, directa o indirectamente y así cambiar algunas propiedades biológicas.

La elección de grupos amino ha sido debido a su asociación a cargas positivas que pueden, en solución acuosa y a valores de pH fisiológicos, atraer biomoléculas cargadas negativamente (proteínas como colágeno) y mejorar las interacciones del polímero con las células donde puede ocurrir una interacción con grupos específicos de las biomoléculas, debido a esto, las aminos sirven como un primer anclaje para las células, hasta que estas puedan crear su propia matriz extracelular y comenzar a proliferar. No obstante, se sabe poco sobre cómo las aminos cargadas positivamente



modifican la polarización y la expresión de las proteínas de los macrófagos [13,47]. La falta de comprensión de las respuestas de los macrófagos a los biomateriales se debe a la compleja correlación entre las propiedades inherentes del biomaterial y las que resultan de la interacción con el entorno local [7].

2.7 Cuantificación de aminas primarias

Dado que los materiales modificados, principalmente son polímeros orgánicos, la introducción de grupos amino es a menudo el primer paso de la modificación de la superficie. Sin embargo, las propiedades de la superficie después de la modificación dependen de la densidad del grupo amino, por lo que debe ser cuantificado para controlar la funcionalización del biomaterial.

El contenido de amina primaria puede determinarse por varios métodos [18] entre los cuales ya se han reportado fluorimetría, colorimetría y espectrografía [71,72]. Sin embargo, la mayoría de esos métodos presentan algunos inconvenientes, tales como; la confiabilidad de la técnica es cuestionada (la colorimetría con ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS), debido a la posible adsorción no específica de colorante a la superficie del sustrato), además del tiempo requerido para llevar a cabo el ensayo. Hasta donde sabemos, los contenidos de amina primaria que se determinan con colorantes aniónicos se usan sin ninguna validación.

Una alternativa es usar un método que pueda ser apoyado por técnicas cuantitativas como la espectroscopia de infrarrojo o semicuantitativas tales como la espectroscopia de rayos X (XPS), como la derivatización química selectiva con trifluorometil



benzaldehído (TFBA). En esta reacción, el TFBA es unido covalentemente por medio de un enlace de imina, por lo que la cuantificación de las aminas puede ser deducido por la concentración de flúor en la superficie por medio de (XPS).

2.7.1 Reacciones de derivatización

La derivatización química consiste en usar un marcador molecular que reacciona selectivamente con un grupo funcional específico que a su vez puede ser fácilmente cuantificado por métodos apropiados de superficie.

La reacción de derivatización con TFBA es una reacción química entre un aldehído aromático, con aminas primarias, donde generalmente, ocurre la formación del enlace covalente, quedando el resto de la molécula aromática a la superficie (Figura 5).

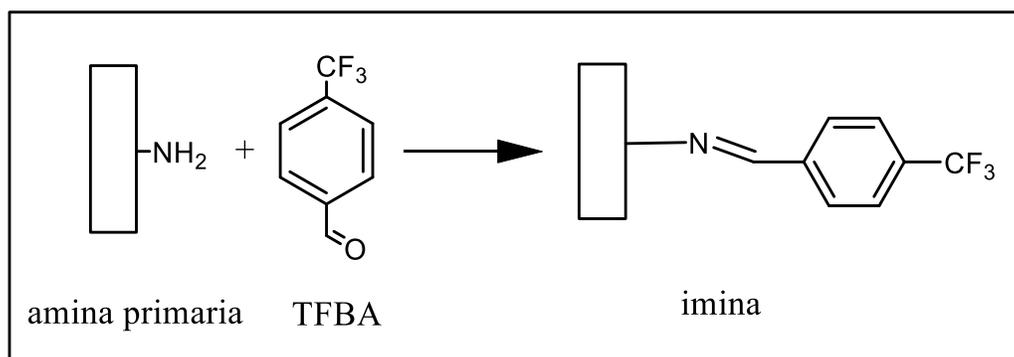


Figura 5. Reacción de derivatización química entre trifluorometil benzaldehído (TFBA) y una amina



En general, se trata de una reacción de formación de una imina, que ocurre entre una amina primaria y un compuesto de carbonilo (aldehído o cetona). el resultado de esta reacción es una aldimina aromática unida a la superficie del polímero. Después de realizar una reacción de acuerdo con la Figura 5, usando una solución de TFBA en un disolvente inerte o vapor de TFBA en la fase gaseosa, la cantidad de grupos de amina primaria se determina normalmente mediante la cuantificación de la concentración o densidad de los grupos flúor (CF_3) La cuantificación generalmente se lleva a cabo utilizando XPS u otros métodos analíticos como la espectroscopía FTIR o EDX. La proporción de aminas en la superficie se puede calcular con las siguientes ecuaciones de acuerdo con Girad-Lauriault [71]. De la ecuación 1 se puede obtener el porcentaje de aminas respecto a los átomos de nitrógeno detectados por XPS en la muestra $[NH_2]_N$; mientras que la ecuación 2 muestra es el porcentaje de aminas respecto a los átomos de carbono $[NH_2]_C$. La ecuación 3 calcula el porcentaje de aminas primarias respecto al total de átomos presentes en la muestra.

$$[NH_2]_N = \frac{I_{F\ 1s,D}/3ASF_{F\ 1s}}{I_{N\ 1s,D}/RSF_{N\ 1s}} \quad (1)$$

$$[NH_2]_C = \left(\frac{I_{F\ 1s,D}/3ASF_{F\ 1s}}{I_{C\ 1s,D}/ASF_{C\ 1s}} \right) \left(\frac{I_{N\ 1s,ND}}{I_{N\ 1s,D}} \right) \quad (2)$$

$$[NH_2]_T = \left(\frac{I_{F\ 1s,D}/3ASF_{F\ 1s}}{I_{C\ 1s,ND}/ASF_{C\ 1s} + I_{N\ 1s,ND}/ASF_{N\ 1s} + I_{O\ 1s,ND}/ASF_{O\ 1s}} \right) \left(\frac{I_{N\ 1s,ND}}{I_{N\ 1s,D}} \right) \quad (3)$$

Donde I son las intensidades o el área de los picos de fotoelectrones de cada elemento químico del orbital molecular 1s detectados por medio de XPS (nitrógeno (N 1s), carbono (C 1s), oxígeno (O 1s) y flúor (F1s)), de los grupos derivatizados, (D); y grupos no derivatizados, (ND). ASF es el factor de sensibilidad de cada elemento.



2.8 Espectroscopia fotoelectrónica por rayos X (XPS)

La Espectroscopia Fotoelectrónica por rayos X (XPS, por sus siglas en inglés: X-Ray Photoelectron Spectroscopy) o también llamada ESCA (Espectroscopia Electrónica para Análisis Químico), es el método de caracterización de superficies más utilizado actualmente. La popularidad de esta técnica deriva del alto contenido de información que suministra y la flexibilidad para ser utilizada en una gran variedad de muestras. La técnica XPS se cataloga dentro de las técnicas analíticas de espectroscopias electrónicas, denominadas de este modo porque se miden electrones. El análisis más básico de XPS en una superficie, puede proporcionar información cualitativa y cuantitativa de todos los elementos presentes, excepto H y He; además, se puede obtener información detallada de la química, organización y morfología de la superficie. La potencia de esta técnica se observa en sus aplicaciones, realizadas en los primeros 20 nm de la superficie y puede medir concentraciones elementales mayores al 0.1% y determinación semicuantitativa de la composición química de la superficie (con error < 8%). Además, da información acerca del entorno molecular: estado de oxidación, átomos enlazados, orbitales moleculares, etc.

La información sobre estructuras aromáticas o insaturadas se da a partir de las transiciones $\pi^* \rightarrow \pi$, y la información de grupos orgánicos, utilizando reacciones de derivatización (estados de enlace similares), también perfiles de profundidad de 5 a 20 nm no-destructivos (variando el ángulo de detección) y destructivos, de profundidades de inclusive varias micras.

Su principio físico es muy similar al efecto fotoeléctrico y de fotoemisión: Cuando un fotón se encuentra con un átomo puede ocurrir: i) que pueda atravesarlo sin



interacción alguna, ii) que sea dispersado por un electrón de un orbital atómico con lo que ocurre una pérdida de energía y, iii) que el fotón interactúe con el electrón de un orbital atómico, con una transferencia total de la energía del fotón hacia el electrón, ocurriendo la emisión del electrón del átomo. El segundo proceso es conocido como Compton scattering y puede ser importante en procesos de alta energía, mientras que el tercer proceso resulta ser básico para la técnica XPS.

La energía de enlace que se mide por XPS se asocia siempre a enlaces de tipo iónico o covalente entre átomos. Por ejemplo, para los gases, la energía de enlace de un electrón es igual a su energía de ionización; en cambio, en los sólidos existe una influencia por parte de la superficie, y una energía adicional es necesaria para remover un electrón de esta, la energía extra es denominada función de trabajo. Cuando un sólido es irradiado por rayos X, también puede ocurrir la emisión de electrones Auger. Estos electrones se diferencian de los fotoelectrones, y se caracterizan porque su energía es independiente de la energía de irradiación.

Decir que la técnica XPS es sensible a la superficie se debe a que los electrones poseen menos habilidad para atravesar sólidos que los rayos X. Así, una radiación X de 1 KeV puede penetrar más de 1 μm en un sólido, mientras que electrones de esta energía sólo penetran unos 20 nm. Por tanto, los electrones que son emitidos por los rayos X que han penetrado más allá de las primeras capas de la superficie, no pueden escapar de la muestra y alcanzar el detector.

La fuente de rayos X más utilizadas son las que emplean ánodos de Al (1486.6eV) o Mg (1253.6eV). La radiación X se monocromatiza antes de llegar a la muestra



mediante el uso de un cristal de cuarzo o un filtro de aluminio. Esto permite aprovechar el rango de energía en que la intensidad de la radiación X es máxima (normalmente un ancho de 1 – 2 eV), evitar los picos satélites de fluorescencia de rayos X, e impedir que electrones de alta energía provoquen radiación de calor a la muestra y la degraden. El área de muestra que puede ser irradiada por los rayos X varía entre zonas circulares de unos pocos centímetros de diámetro hasta unas 100 micras. Esta focalización depende de la geometría de la fuente y del tipo de cañón de electrones utilizado para estimular la emisión de rayos X. Actualmente, también se puede reducir la zona de medición con los lentes electrónicos del medidor de electrones.

2.9 Macrófagos

Tradicionalmente, los macrófagos (en griego: Macro-"grande"; phage-"comer") se consideran la primera línea de defensa contra los microorganismos infecciosos a través de sus actividades fagocíticas. No obstante, en las últimas dos décadas, su papel en la homeostasis, la reparación de tejidos y la remodelación se ha vuelto cada vez más evidente [1]. Junto con las células dendríticas, los mastocitos, los granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), células *NK* y los macrófagos constituyen el sistema inmune innato, estas son responsables de reclutar otras células inmunes al sitio de la infección, eliminando patógenos extraños por fagocitosis y activando el sistema inmune complementario y adaptativo [2]. Mientras que múltiples tipos de células están involucrados en la sanación de tejidos después de una lesión, los macrófagos juegan un papel fundamental en la mediación de la remodelación de



tejidos al secretar quimiocinas y citocinas que impactan directamente en la reparación de tejidos [3]. Por lo tanto, comprender el papel exacto de los macrófagos en los procesos de sanación de tejidos, especialmente en los eventos que siguen a la implantación de biomateriales, ayudará en el diseño de materiales "inmunoinformados" que generen una respuesta inmune favorable tras la implantación.

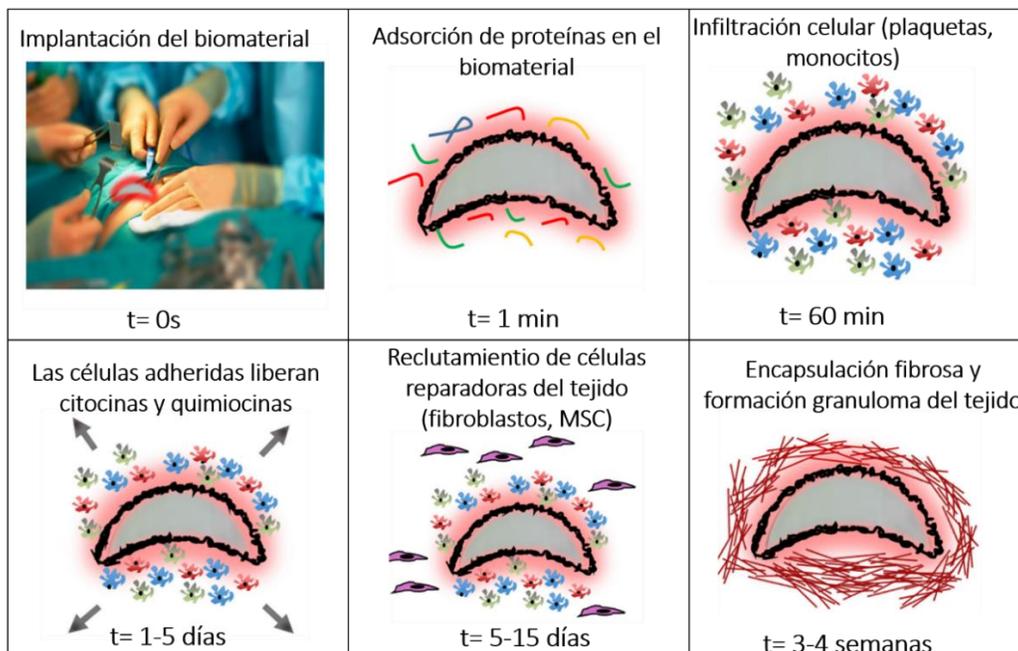


Figura 6. Respuesta del Sistema inmune innato seguida de la implantación biológica inerte de un biomaterial [7]

Las células del sistema inmune innato son las primeras en responder a la implantación de un biomaterial en el tejido vascular (Figura 6). Después del contacto del biomaterial con la sangre, una capa de proteína se adsorbe inmediatamente en la superficie del biomaterial, lo que resulta en la formación de un coágulo de sangre



(matriz provisional) que es rico en factores de crecimiento, citocinas y quimio atrayentes capaces de reclutar células del sistema inmune innato para el sitio de la lesión [5]. Después del reclutamiento de las células reparadoras del tejido, se lleva a cabo el proceso de inflamación, donde la gravedad del proceso estará determinada por el grado de formación de la matriz provisional y el tipo de biomaterial implantado. Si no existe la provisión de señales que indican un proceso inflamatorio (casos que involucran biomateriales biológicamente inertes), estos eventos resultan en la formación de tejido granuloso, que da paso a la formación de tejido fibroso y cicatrización de heridas.

Es bien conocido que las señales microambientales presentadas por los biomateriales juegan un papel crucial en la modulación de la respuesta de las células [7]. Propiedades físicas como rigidez del sustrato, topografía, tamaño de poro; propiedades químicas tales como química de superficie, presentación de ligandos, liberación de factores de crecimiento; degradación, influyen en el comportamiento de las células [8,9]. Si bien se ha avanzado mucho en la comprensión de estos efectos tanto en las células somáticas [10] como en las células madre [10,11], el efecto de tales señales biofísicas y bioquímicas en las células inmunes, específicamente los macrófagos, es menos conocido. Este déficit en la comprensión de las respuestas de los macrófagos se agrava por la compleja interacción entre las propiedades inherentes del biomaterial y aquellas que resultan de las interacciones con el medio ambiente local como consecuencia de la interacción con el biomaterial.



Para cumplir con su gran cantidad de funciones, los macrófagos exhiben un espectro de estados de polarización transitorios que están influenciados por diferentes señales microambientales, algunas de las cuales pueden estar basadas en el biomaterial.

2.9.1 Origen de los macrófagos

Los macrófagos pueden residir en los tejidos o circular en la sangre periférica; en consecuencia, se originan a partir de dos fuentes distintas. Hasta hace poco, se creía que los macrófagos se derivaban únicamente de monocitos circulantes, que surgen de precursores en la médula ósea como subconjuntos primarios del sistema de fagocitos mononucleares; a pesar de ello, algunos macrófagos pueden residir dentro de los tejidos (cerebro, hígado, corazón) y pueden generarse en el útero durante el desarrollo embriológico [12] (Figura. 7). Por el contrario, los monocitos que se encuentran circulando en la sangre periférica, duran en ese estado unos días después de abandonar el entorno de la médula ósea, y se diferencian en macrófagos (macrófagos derivados de monocitos, MDM) mediante la extracción a través del endotelio para la renovación del estado estacionario (la homeostasis del tejido) o para mediar eventos inflamatorios en respuesta a quimioatrayentes. Mientras diferentes subconjuntos de los monocitos se han descrito, generalmente se acepta que el $CD14^{++} CD16^{-}$ la subpoblación representa una proporción significativa de monocitos circulantes en humanos [12].

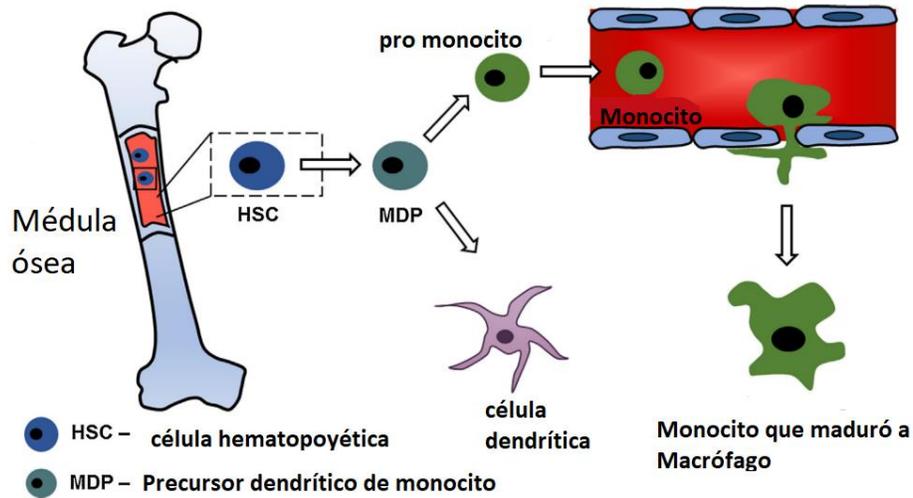


Figura 7. Origen de macrófagos. Los monocitos se derivan principalmente de células progenitoras comprometidas en la médula ósea (derivadas de HSC), que migran a la sangre periférica. Los monocitos se extravasados a través de los vasos sanguíneos cuando se reclutan como parte de la homeostasis del tejido o eventos de lesiones, donde posteriormente se diferencian en macrófagos derivados de monocitos [7]

2.9.2 Polarización de los macrófagos

Los macrófagos se activan después de la migración al tejido inflamado, donde exhiben un espectro de estados de polarización relacionados con su diversidad funcional. En un extremo del espectro está el estado proinflamatorio M1 y en el otro extremo el estado antiinflamatorio M2 (Tabla 1).

El fenotipo "activado clásicamente" o M1 surge como resultado de la interacción de los macrófagos con señales proinflamatorias como el interferón- γ (IFN- γ) y productos microbianos como el lipopolisacárido (LPS) [17]. Los macrófagos M1 son capaces de alta presentación de antígenos, así como de promover la diferenciación de linfocitos Th1 que producen citocinas proinflamatorias (como IFN- γ e IL-2) en



respuesta a los patógenos intracelulares. Estas células muestran un alto nivel de retención de hierro y una baja exportación de este para restringir la disponibilidad de hierro microambiental, debido a que este elemento es capaz de ayudar a la expansión bacteriana, evitando así el crecimiento de infecciones [18]. No obstante, también dañan las células vecinas en el microambiente al producir especies intermediarias de oxígeno tóxicos; por lo tanto, aumenta la respuesta proinflamatoria [14]. En el contexto de la implantación de biomateriales, mientras que la presencia inicial de macrófagos M1 promueve una respuesta inflamatoria necesaria, una presencia prolongada de M1 conduce a una severa FBR, granuloma y encapsulación fibrosa que resulta en eventos inflamatorios crónicos y falla de en la integración del biomaterial. Esto es especialmente perjudicial para los biomateriales regenerativos donde el objetivo es reemplazar el tejido perdido y evitar la formación de tejido cicatricial. El fenotipo M2 de los macrófagos, al que se hace referencia como "activado alternativamente", es el resultado de la activación por señales (IL-4, IL-13) de basófilos, mastocitos y otros granulocitos [2] Los macrófagos M2 constantemente expresan captadores y receptores de manosa (CD206), liberando citocinas antiinflamatorias como la IL-10 [19], muestran un alto nivel de exportación de hierro que ayuda a la reparación de tejidos [18] y abarcan una gama de diferentes subconjuntos (es decir, M2a, M2b, M2c) incluyendo "curación de heridas" y "macrófagos reguladores" [20]. Dentro del subconjunto M2, el tipo M2a (inducido por IL-4 e IL-13) y M2b (inducido por complejos inmunes) realizan funciones inmunorreguladoras al iniciar respuestas antiinflamatorias de linfocitos Th2 (a través de la secreción de IL-10, IL-1ra e IL-6) [21,22].



Tabla 1. Inductores e indicadores de la polarización de macrófagos

	Inductor	Secreción de citocinas y quimiocinas	Funciones
M1	IFN- γ LPS	IL-1 β , 6, 12, 15, 18, 23; TNF- α ; CCL-15, 20; CXCL-9, 10, 11, 13	Proinflamatorio, eliminación de patógenos intracelulares por restricción de hierro, fagocitosis.
M2a	IL-4 IL-13	IL-10, 1ra; CCL-13, 14, 17, 18, 22, 23, 24, 26; IGF-1; PDGF; TGF- β	Antiinflamatorio, inmunidad parasitaria, respuestas alérgicas
M2b	LPS, ICs, IL-1 β	IL-10, 1 β , 6; TNF- α ; CCL-1, 20; CXCL-1, 2, 3	Inmuno-regulación, puede expresar proinflamatorio como antiinflamatorio
M2c	IL-10 TGF- β GCs	CCL-16, 18; CXCL13; TGF- β	Eliminación de desechos de matriz, remoción de tejido y sanación

IFN- γ - interferón-gamma; LPS - lipopolisacárido; IL - interleucina; TGF- β - factor de crecimiento transformante beta; IC - complejos inmunes; GC - glucocorticoides; TNF- α - factor de necrosis tumoral alfa; CCL - ligando de quimiocina; CXCL - ligandos de quimiocina- α ; IGF - factor de crecimiento similar a la insulina; PDGF - factor de crecimiento derivado de plaquetas.



Alternativamente, el subconjunto M2c es inducido por IL-10 y juega un papel importante en la reparación de tejidos y la supresión de reacciones inmunes inflamatorias mediante la secreción del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) e IL-10 [1,23]. La presencia de tales citocinas antiinflamatorias y la respuesta para la reparación del tejido pueden ayudar en la vascularización de los biomateriales regenerativos al inhibir la formación de tejido fibroso, lo que mejora en gran medida la integración del biomaterial y le permite cumplir su función prevista. A diferencia de las células diferenciadas terminalmente, los macrófagos cambian los estados de polarización en respuesta a su microambiente. Esto se enfatiza por la expresión de genes contrastantes durante las etapas tempranas y tardías de la FBR [24], así como su capacidad de adaptar la funcionalidad en respuesta a la presentación temporal de estímulos [25]. La naturaleza transitoria de los macrófagos también está relacionada con sus mecanismos de señalización; por ejemplo, la inducción de la producción de TNF- α e IL-12 por citocinas proinflamatorias (polarización M1), la producción de LPS, puede decaer significativamente en presencia de IL-4; una citocina polarizadora a M2 producida por macrófagos, basófilos y mastocitos M2 cercanos [26]. Esto sugiere que la presencia de macrófagos en diferentes estados de polarización en el mismo microambiente puede aprovecharse para inducir mecanismos constructivos de remodelación que minimicen la reacción inflamatoria.

Las células reciben una amplia gama de señales de su entorno a través de señales bioquímicas, como interacciones con otras células [27] e interacciones con componentes de la matriz extracelular [28], así como señales biofísicas como de fuerzas aplicadas externamente [29] y propiedades inherentes del material [11,30-31].



El efecto integral de estas señales en el estado actual de la célula dirige su comportamiento a futuro. Aunque se ha sugerido que una alta relación M2:M1 en la vecindad de los biomateriales implantados conduce a mejores resultados en la reparación de tejidos [32], la presencia prolongada de macrófagos M2 puede conducir a la formación de células gigantes perjudiciales de cuerpos extraños (FBGC) [5]. Por lo tanto, comprender el control de esta relación M2:M1 a través de la modulación de las señales microambientales del biomaterial será un paso clave en el diseño de biomateriales inmunoinformados de próxima generación para mejorar la remodelación, integración y regeneración de tejidos positivos.

2.9.2.1 Citocinas producidas por macrófagos como factor clave en la inflamación crónica

La inflamación crónica generalmente se define como un proceso inflamatorio persistente, y es el resultado de la incapacidad para resolver un proceso inflamatorio agudo o el resultado de una respuesta inadecuada a un agente nocivo. Los principales componentes celulares en un sitio inflamatorio crónico son los macrófagos y linfocitos derivados de monocitos. La inflamación en estos sitios se mantiene como resultado de un equilibrio inadecuado de secreción de citocinas antiinflamatorias y proinflamatorias.

Las citocinas se pueden agrupar ampliamente según su función como pro-(TNF- α , IL-1b, IL-6, etc.) y antiinflamatorias (IL-1Ra, IL-10 y TGF- β). Los macrófagos, dependiendo de sus inductores de activación, pueden secretar ambos tipos de



citocinas. Además, los macrófagos segregan una gran variedad de quimiocinas para atraer otras células inmunes al sitio de inflamación (CXCL1, CXCL2, CCL5, IL-8, CXCL9, CXCL10, CXCL11) [17] o para promover la fibrosis (CCL2, CCL3, CCL4, CCL11, CCL20, CCL22) [18]

Un papel central en el desarrollo de un sitio inflamatorio se atribuye a TNF- α , IL-1 β e IL-6. Estas citocinas generalmente se secretan en la fase aguda de la inflamación y juegan un papel en la respuesta a los patógenos, el reclutamiento de neutrófilos y la diferenciación y activación de las células B y T [17] Por otra parte, numerosos estudios también muestran su participación en la inflamación crónica, como en enfermedades inflamatorias en el intestino, artritis reumatoide, psoriasis, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar crónica obstructiva, Alzheimer, lupus eritematoso sistémico y cáncer [21–23]. Por el contrario, se demostró que CCL18, más fuertemente regulado por IL-4, está involucrado en la inflamación crónica, así como en la fibrosis [16,24].

Una serie de otras citocinas secretadas por macrófagos también han sido asociadas con inflamación crónica. Por ejemplo, IL-1 α , IL-8, IL-18 e IL-32 se han relacionado con artritis reumatoide y dermatitis atópica; IL-3, IL-7 e IL-10 a enfermedades alérgicas y cáncer; IL-7, IL-8, IL-18, IL-19, IL-20 e IL-24 para psoriasis [19,21].

La fibrosis es una consecuencia común de la inflamación crónica, que se desarrolla como resultado de la cicatrización fallida de la herida. Varios estudios sugieren que los macrófagos M2 juegan un papel clave en la reparación de heridas [25,26]. Secretan TGF- β 1, PDGF, MMP, CCL7 y CCL8 para estimular la proliferación, la migración



y la activación, por lo que aumenta la síntesis de colágeno en miofibroblastos, lo que promueve la fibrosis [27].

Dependiendo del estímulo, los macrófagos pueden adoptar un fenotipo distinto con un perfil de secreción de citocinas diferente. A pesar de numerosas observaciones que implantaron biomateriales reclutan macrófagos proinflamatorios, en algunos casos, el fenotipo de macrófagos asociados a implantes no se puede caracterizar estrictamente como M1 o M2, pero combina características M1 y M2, lo que indica que se necesita un amplio panel de marcadores para definir el fenotipo de macrófago específico del implante. Además, en biomateriales porosos, la polarización de los macrófagos depende de su distribución espacial. Por ejemplo, en un estudio *in vivo* con ratones, los macrófagos ubicados en los poros de hidrogeles basados en poli(hidroxietilmetacrilato) revelaron un fenotipo similar a M1, mientras que se encontraron macrófagos similares a M2 en la superficie del implante [57].

La polarización de los macrófagos durante las reacciones inducidas por el implante implica el reconocimiento de materiales extraños por los receptores de superficie. Sin embargo, los receptores específicos de macrófagos y la señalización intracelular al reconocer los biomateriales está poco caracterizada. Las proteínas adsorbidas en la superficie de los biomateriales (fibrinógeno, albúmina, fibronectina, vitronectina, componente del complemento C3b, etc.) juegan un papel importante en el reconocimiento del implante y el inicio de la FBR [48].



3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Justificación

Algunos tipos de células son de especial importancia para campos como biotecnología e ingeniería de tejidos. Existe un gran interés en modificar algunos tipos de superficies en las que las células se puedan adherir y así estudiar alguna característica relevante. Se ha encontrado que las superficies con altas concentraciones de nitrógeno, especialmente aminas primarias ($-NH_2$), son importantes para obtener mayor adhesión en el crecimiento de células; sin embargo, no se conoce su influencia sobre células del sistema inmune.

La modificación de superficies se ha llevado a cabo tradicionalmente por plasmas y fotoquímica. No obstante, se ha visto que el uso de estas técnicas presenta el problema inherente de la formación de oligómeros, los cuales son compuestos parcialmente solubles en agua. Aunado a ello, se forma una gran cantidad de radicales libres, los cuales intervienen en la incorporación de oxígeno (envejecimiento) al ponerse en contacto con aire. Dadas estas circunstancias, resulta más conveniente hacer la síntesis del injerto del monómero cloruro de acrililo en una matriz de polipropileno (PP) por medio de la radiación gamma. Este monómero puede reaccionar con diferentes diaminas, como la hidracina o etilendiamina para obtener grupos amino libres que son los responsables de la adherencia celular.



Objetivo General

Modificar matrices poliméricas de polipropileno superficialmente que contengan grupos amino libres (primarios) y secundarios mediante la radiación gamma, para facilitar la adhesión en el cultivo de células y estudiar su influencia en la polarización de macrófagos humanos.

Objetivos particulares

- Injertar cloruro de acrililo (AC) en películas de polipropileno mediante la radiación gamma por el método directo.
- Determinar el porcentaje de injerto de AC en las películas de PP mediante una reacción de alcoholisis (esterificación) con metanol (MeOH).
- Realizar la reacción de aminólisis entre el cloruro de acrililo injertado con una diamina alifática como la etilendiamina (ED).
- Cuantificar los grupos amino primarios en la superficie del polipropileno por medio de derivatización química con 4-trifluoro-metilbenzaldehido (TFBA) y posteriormente realizar su caracterización por espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS).
- Caracterizar las películas modificadas mediante las técnicas de espectroscopia de infrarrojo (FTIR-ATR), microscopía de fuerza atómica (AFM), ángulo de contacto y microscopía electrónica de superficie (SEM).
- Realizar estudios de estabilidad de las aminas injertadas en la superficie de las películas de PP ante las condiciones ambientales, respecto al tiempo.



3. Justificación y objetivos



- Realizar pruebas de viabilidad y adhesión celular con fibroblastos Balb/3T3, sobre las películas modificadas
- Estudiar la influencia de las aminas primarias en la superficie del polipropileno en la polarización de macrófagos humanos.



Capítulo 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Modificación de películas de polipropileno

4.1.1 Materiales

Películas de polipropileno (Goodfellow) de 0.1 mm de espesor fueron cortados en piezas de 1 x 5 cm. Estas fueron lavados en dos ciclos con metanol (grado analítico) por 2 h para la eliminación de grasa o alguna otra impureza adherida durante el almacenamiento. Finalmente, se secaron a presión reducida a una temperatura de 40 °C durante 4 h. El cloruro de acrililo (AC, 97%) suministrado por Sigma Aldrich Co., fue destilado a presión reducida. Metanol anhidro (99.8%), Trifluoro metil benzaldehído (TFBA), etilendiamina (ED, 96%) y trietilamina se adquirieron de Sigma-Aldrich, EE. UU., y se usaron como se recibieron. Tetrahidrofurano (THF) y N,N-dimetilformamida (DMF) (JT Baker, México) se destilaron antes de su uso, el diclorometano (CH_2Cl_2) se destiló y almacenó en un recipiente que contenía CaCl_2 .

Los reactivos; azul de naftol, ácido acético glacial, etanol (EtOH), hidróxido de sodio (NaOH) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) fueron de grado analítico. El fibrinógeno humano tipo I de plasma humano 50-70% de proteína ($\geq 80\%$ de proteína coagulable) y la albúmina del suero bovino fueron de Sigma Aldrich, Co. (EE. UU.).

Los filtros de membrana de nitrocelulosa con tamaño de poro de 160 μm de espesor fueron adquiridos de Merck Millipore. Para los experimentos relacionados con la síntesis del material se usó agua destilada, mientras que para los estudios biológicos se usó agua milli-Q con una resistividad mínima de 18.2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$, obtenida de la



maquina Millipore Ibérica, España. La solución amortiguadora de fosfatos pH=7.4 fue preparada con soluciones 0.2 M de NaOH y 0.2 M de KH_2PO_4 .

4.1.2 Injerto de AC sobre PP usando método de irradiación directa

Dos películas de PP previamente pesadas, fueron introducidas en ampollitas de vidrio separadas; una solución de AC (30 o 50% v/v en tolueno) fue agregada a cada ampollita hasta cubrir completamente la película (6 mL). Posteriormente, se realizó la desgasificación de las muestras con ciclos de congelamiento/descongelamiento con nitrógeno líquido, enseguida se sellaron e irradiaron en un intervalo de dosis de 1 a 10 kGy a temperatura ambiente, usando una fuente de cobalto-60 (^{60}Co , Gammabeam 651 PT, MDS Nordion, Canadá). Después de ser irradiadas, las películas injertadas se lavaron con diclorometano seco durante 24 h (cambiando el disolvente cada 12 h) para remover el homopolímero formado durante la irradiación. La reacción que se llevó a cabo se observa en la Figura 8.

Finalmente, una de las películas se hizo reaccionar con metanol (película de referencia), para determinar el porcentaje de injerto, mientras que la otra se hizo reaccionar con etilendiamina.

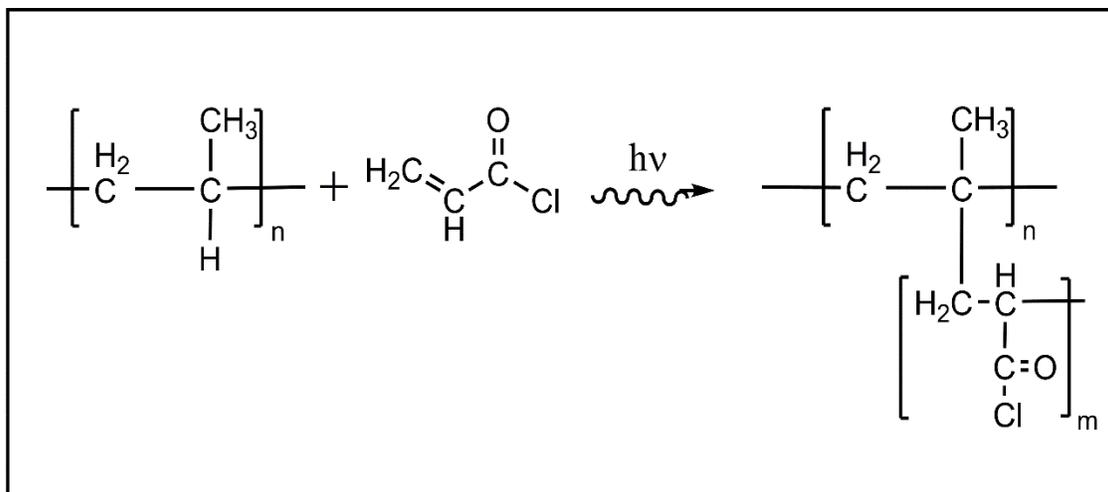


Figura 8. Reacción de injerto de cloruro de acrilóilo en polipropileno mediante radiación gamma.

4.1.3 Reacción de Alcohólisis (esterificación)

Para determinar el porcentaje de injerto del cloruro de acrilóilo en las películas de polipropileno, se realizó una esterificación con metanol. Este cálculo no puede hacerse comparando directamente los pesos de PP-*g*-AC y la matriz polimérica, debido a que el compuesto AC es inestable ante la humedad del medio, llevándose a cabo una hidrólisis para formar ácidos carboxílicos. La película de referencia se colocó en un frasco de vidrio que previamente contenía 4 mL de trietilamina e inmediatamente se puso en agitación durante 15 min. Pasado este tiempo, se agregaron 10 mL de metanol anhidro, y se dejó que reaccionara durante 12 h con agitación constante.



El porcentaje de injerto se calculó por la Ecuación 4. El peso del grupo metoxi (CH_3O^-) (31 g/mol) es cercano al del grupo cloruro (Cl^-) (35.5 g/mol) por lo que es posible obtener un cálculo aproximado del porcentaje de injerto.

$$G(\%) = \frac{W_g - W_0}{W_0} * 100 \quad (4)$$

Donde W_0 y W_g es el peso de la película antes y después de ser injertada, respectivamente. La reacción de esterificación se muestra en la Figura 9.

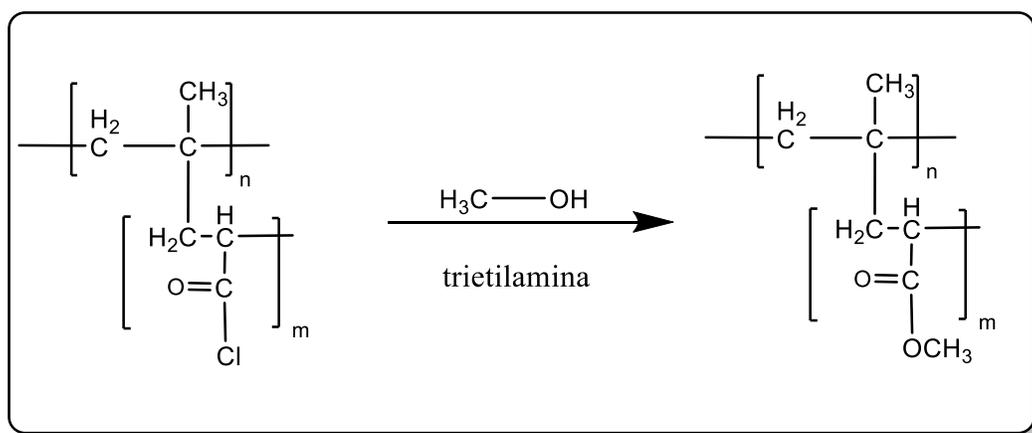


Figura 9. Reacción de esterificación entre PP-g-AC y MeOH.

4.1.4 Reacción de aminólisis

Para llevar a cabo la reacción de aminólisis, se preparó una de solución de etilendiamina 2 M en diferentes disolventes, tales como diclorometano (DCM), DMF y THF. La reacción se llevó a cabo en un matraz de dos bocas en argón, que contenía trietilamina para evitar la reversibilidad de la reacción, la cual se mantuvo bajo agitación constante durante 0.5, 1, 2, 6, 18 y 24 h a temperatura ambiente. La



película aminada se lavó con agua destilada y luego se secó en una estufa de vacío a 50 °C durante 6 h. La película fue nombrada PP-*g*-AC (ED), la reacción de aminación se puede ver en la Figura 10.

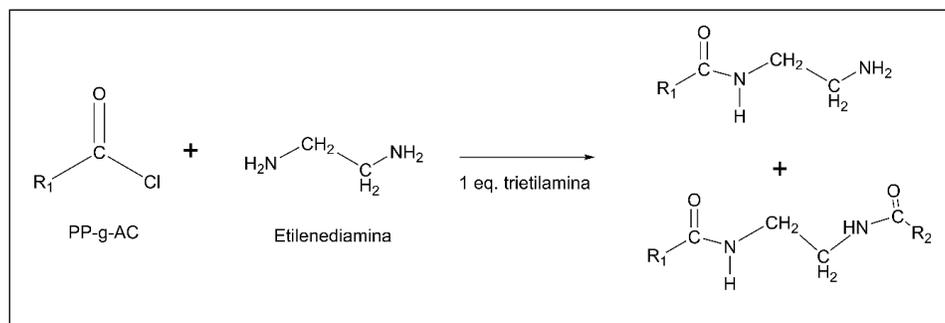


Figura 10. Reacción de aminólisis del AC con ED.

4.2 CARACTERIZACIÓN

4.2.1 Espectroscopia de infrarrojo (FTIR-ATR)

Los espectros infrarrojos se obtuvieron usando un espectrofotómetro Perkin-Elmer Spectrum 100 (Perkin-Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT (EE. UU.) equipado con un accesorio universal ATR (DiComp™ cristal), con punta de diamante. Se realizó una corrección de línea base a todos los espectros obtenidos

4.2.2 Ángulo de contacto

Las mediciones del ángulo de contacto se realizaron por triplicado, a temperatura ambiente (23 °C), utilizando un aparato KRÜSS DSA 100 (Matthews NC, EE. UU.). Se depositaron pequeñas gotas de agua sobre la superficie del material prístino (PP)



y de las películas funcionalizadas (PP-*g*-AC (ED)). El ángulo de contacto se midió inmediatamente después de depositar la gota de agua.

4.2.3 Medición de rugosidad por medio de microscopia de fuerza atómica (AFM)

La rugosidad de la superficie se midió mediante AFM. Se realizó en un equipo modelo Nanosurf Naio AFM. Se midió, en una escala de 10 μm , en dos regiones diferentes por muestra, en modo de contacto. La punta utilizada fue una punta ContAl-G de Budget Sensors.

4.2.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La superficie y la morfología transversal de las películas se observaron en un Tescan Mira 3 LMU a diferentes escalas. Las muestras secas se revistieron con oro (Au) a vacío durante 10 s, usando un recubrimiento por pulverización catódica del módulo SPI.

4.2.5 Derivatización química con TFBA

Para conocer la cantidad de aminas primarias en la superficie y determinar si hay envejecimiento (oxidación) con el tiempo, se realizó una derivatización química. Un método que se usa normalmente para la derivatización química es una reacción selectiva de una amina primaria con trifluorometil benzaldehído (TFBA). El esquema de reacción se observa en la Figura 5 [60,71,73].



El porcentaje de aminas primarias se dedujo del grupo CF_3 en la molécula formada en la superficie, mediante el uso de la técnica XPS y por medio de las ecuaciones 1,2 y 3. La reacción se realizó en fase gaseosa a 40°C durante 4 h; para ello, se colgaron películas funcionalizadas dentro de un frasco sobre una cama de perlas de vidrio de 1 cm de espesor, inmediatamente se añadieron 0.5 mL de TFBA a las perlas de vidrio, evitando el contacto directo con la muestra, se cerró el matraz y se dejó reaccionar.

4.2.5.1 Espectroscopia de fotoelectrones por rayos X (XPS)

Para el análisis de XPS, se utilizó un sistema de ultra alto vacío (UHV) de Physical Electronics, Scanning XPS microprobe PHI 5000 VersaProbe II, con un detector MCD de 16 canal de electrones. Se utilizó una fuente de rayos X monocromática de Al K_α ($h\nu = 1486.6\text{eV}$) con $100\ \mu\text{m}$ de diámetro. El espectro XPS se obtuvo a 45° respecto de la normal a la superficie con un paso de energía constante (CAE) $E_0 = 117.40\ \text{eV}$ para el espectro de barrido completo y $E_0 = 11.75\ \text{eV}$ para espectros de alta resolución. Las muestras no fueron erosionadas.

La presión se mantuvo, durante la medición en $7 \times 10^{-8}\ \text{Pa}$. La posición en energía se calibró con el orbital de $\text{Ag } 3d_{5/2}$ en la posición de $368.20\ \text{eV}$ con una resolución (FWHM) de $0.56\ \text{eV}$, $\text{Au } 4f_{7/2}$ en $84.00\ \text{eV}$ y $\text{C } 1s$ en $285.00\ \text{eV}$.

La composición elemental y los análisis de deconvolución se hicieron con el software PHI Multipak v. 9.6 (PHI Multipak v. 9 code, ULVAC-PHI, INc. 2012). Se usaron factores relativos de intensidad (RSF), para $\text{C } 1s$ (0.314), $\text{O } 1s$ (0.733), $\text{N } 1s$ (0.499) y $\text{F } 1s$ (1.000) y se corrigió la función de transmisión.



4.2.6 Análisis elemental

Se realizó el análisis elemental (EA) para determinar su porcentaje de carbono, hidrógeno y nitrógeno de toda la muestra.

4.2.7 Propiedades mecánicas

Se cortaron películas prístinas y funcionalizadas con aminas en piezas de 3 x 1 cm y se colocaron en un analizador de textura TA-TX Plus controlado por computadora (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, Reino Unido) equipado con una celda de carga de 30 kg. Las películas se fijaron en dos mordazas con un espacio de 10 mm entre ellas. Luego, se registró la curva de tensión-deformación (alargamiento) de la película mientras se sometía a tensión uniaxial a una velocidad de 0.1 mm/s hasta una deformación o falla de 200 mm.

4.3 Adsorción de proteínas

La adsorción de seroalbúmina bovina (BSA) y fibrinógeno (FB) fue llevada a cabo mediante la aplicación del “ensayo amido-black” [74]. Las películas prístinas y funcionalizadas se cortaron en discos de 6 mm de diámetro y se lavaron durante 3 días en agua Milli-Q, (cambiando continuamente el medio) y por otro tiempo similar con una solución amortiguadora de fosfatos (pH= 7.4). Los discos de 6 mm de diámetro se transfirieron inmediatamente a tubos eppendorf de 1.5 mL que contenían una solución acuosa (600 μ L) de FB (3 mg/mL) o BSA (30 mg/mL). Los discos de nitrocelulosa se usaron como control positivo. Todas las muestras se mantuvieron en reposo durante la incubación durante 1 h a 37 °C. Después de la incubación, se



eliminó la solución de proteína y cada muestra fue lavada, en dos ciclos con 1 mL de agua desionizada. Se preparó una solución tinción con 45 mL de metanol, 45 mL de agua, 10 mL de ácido acético glacial y 100 mg de azul naftol. Se añadió una alícuota (600 μ L) de solución de tinción a cada tubo. Después de 3 min de tinción, la solución se aspiró y las películas se lavaron dos veces con 600 μ L de “solución de lavado” (90% de metanol, 8% de agua y 2% de ácido acético glacial) seguido de dos lavados con 1 mL de agua destilada. Finalmente, se añadieron 600 μ L de una solución de eluyente (50% etanol/agua con 50 mM NaOH y 0.1 mM de EDTA), se agitaron (300 rpm, 37 °C durante 30 min) y se centrifugaron (3000 rpm, 3 min, 25 °C) para remover el colorante enlazado a la superficie. La solución obtenida se transfirió a una placa de 96 pocillos para determinar la concentración de la proteína por medio de absorción fotométrica a 595 nm en un lector de placa (lector de microplacas multidetección FLUOstar OPTIMA de BMG Labtech, Offenbur, Alemania). Los ensayos se llevaron a cabo por lo menos en cuadruplicado a cada material analizado y se hicieron correcciones por área de adsorción.

4.4 Ensayos de adhesión celular

4.4.1 Preparación de las películas

Las películas prístinas y amino funcionalizadas se cortaron como discos de 6 mm y se fijaron en el fondo de una placa de cultivo de poliestireno (PS) de 96 pocillos con un pegamento comercial a base de acrilatos. Para la esterilización de las películas se añadió una solución de etanol al 70% (150 μ L) a cada pocillo. La esterilización por



medio de radiación UV fue descartada, debido a que los polímeros de PP y PS sufren degradación por exposición a UV [75]. Después de 15 min de contacto, se eliminó el etanol y las películas se dejaron secar en la campana de flujo laminar hasta su evaporación. Inmediatamente se realizaron dos ciclos de lavado de 100 μ L de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) + 1% de penicilina/estreptomicina/anfotericina (PSA). Para los ensayos biológicos se probaron películas de PP prístino y 3 porcentajes diferentes de aminos en superficie respecto al nitrógeno total (12, 17 y 49%). Todos los experimentos se realizaron, al menos, por cuadruplicado

4.4.2 Cultivo celular con fibroblastos Balb/3T3

Las células de fibroblastos Balb/3T3 (ATCC[™] CCL-163) se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco, alta glucosa (DMEM) (Sigma-Aldrich) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%, en una incubadora con humedad controlada a 37 °C y 5% de CO₂. El medio se cambió cada dos días y las células se dividieron cuando se alcanzó el 70% de confluencia.

4.4.3 Viabilidad celular al sustrato

La viabilidad celular fue evaluada mediante un ensayo colorimétrico de cuantificación espectrofotométrica con el reactivo WST (sales de tetrazolio/formazán) el cual permite analizar de una forma directa la viabilidad celular. Se basa en la degradación de las sales de tetrazolium WST-1 [2-(4-Yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfonil)-2H-tetrazolio] a sales de formazán (Figura 11), mediante la acción de



las deshidrogenasas mitocondriales, que se producen de forma natural cuando las células son viables.

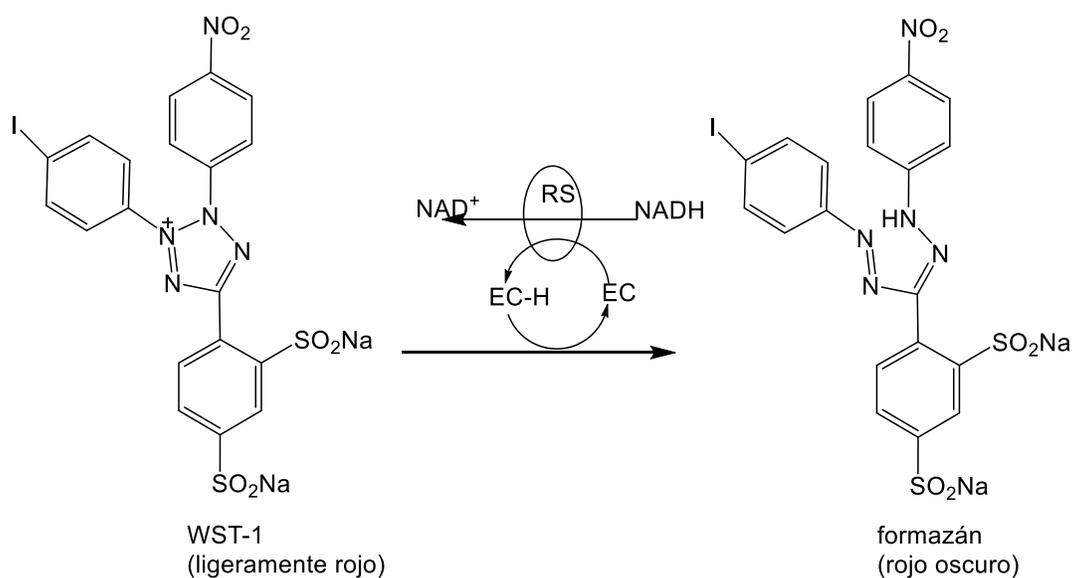


Figura 11. Reacción de oxidación de tetrazolio a sales de formazán por mediante la acción de deshidrogenasas mitocondriales.

Para el experimento células Balb/3T3 (2.5×10^4 células/pocillo) se sembraron en placas de 96 pocillos que contenían las películas esterilizadas y luego se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂. Después de 2, 6 y 24 h de siembra, se recogieron medios para asegurar la eliminación de las células no adheridas. Inmediatamente 100 µL de DMEM sin rojo fenol (Sigma-Aldrich) y 10 µL de reactivo de WST-1 de Roche™ se añadieron a cada pocillo y se incubaron durante 2 h a 37 °C y 5% de CO₂. Después de la incubación, los sobrenadantes se transfirieron a otra placa de 96 pocillos para medir la absorbancia en un lector de placas (Bio-Rad 680 Microplate Reader, EU).



a 450 nm. Todos los experimentos se llevaron a cabo por cuadruplicado. Los resultados se expresaron como la media de adhesión celular \pm error estándar de la media (SEM).

4.4.4 Cultivo y diferenciación de monocitos THP-1

Monocitos THP-1 (ATCC® TIB-201™) se cultivaron en un matraz para cultivo celular de 20 mL con medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco™) suplementado con suero fetal bovino al 10%, estreptomicina/penicilina al 1% y 0.05 mM de 2-mercaptoetanol. Los monocitos se diferenciaron en macrófagos a una densidad de 2×10^5 células/mL añadiendo 200 ng/mL de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) durante 72 h a 37 °C y 5% de CO₂ [76].

4.4.5 Cultivo de macrófagos

Los macrófagos M0 se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos que contenían discos de películas prístinas y amino funcionalizadas previamente fijadas y esterilizadas (como se explica en la sección de preparación de películas). El ensayo se realizó durante los mismos períodos de tiempo (2, 6 y 24 h) que el ensayo de viabilidad celular con fibroblastos. El sobrenadante se recogió en todos los puntos de tiempo y se almacenó para analizar la producción de citocinas. La adhesión celular se cuantificó usando el reactivo WST-1 como se describió previamente para la evaluación de la unión de fibroblastos.



4.4.5.1 Producción de citocinas

La secreción de interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interlucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), interleucina-12 (IL-12), interleucina-1beta (IL-1 β) y la metaloproteinasa-8 (MMP-8) se cuantificaron en los sobrenadantes de cultivo celular por medio de kits de inmunoensayo a base de perlas magnéticas (R&D systems, Minneapolis USA), usando un analizador de sistema MILLIPIX® MAGPIX® (Luminex, Austin, TX, EE. UU.). La expresión de citocinas de macrófagos se midió para macrófagos cultivados en películas prístinas y funcionalizadas con grupos amino, así como para macrófagos de fenotipo M1 activados por lipopolisacárido (C + LPS) y para macrófagos no activados cultivados en medio sin tratamiento (C-). Todas las mediciones se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente se describe el método, se añadieron 50 μ L de sobrenadante o estándar al pocillo de una placa de 96 pocillos, seguido de la adición de 50 μ L del cóctel de micropartículas. Luego, la placa se incubó 2 h a temperatura ambiente en un agitador a 800 rpm. El líquido se retiró de cada pocillo y luego los pocillos se lavaron tres veces con 100 μ L de solución amortiguadora de lavado mientras se fijaban las perlas al fondo del pozo usando un imán. Posteriormente, se añadieron 50 μ L de cóctel de anticuerpos a cada pocillo y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en un agitador a 800 rpm. Después de la incubación, la placa se lavó nuevamente siguiendo el protocolo de lavado descrito anteriormente. Más tarde, se añadieron 50 μ L de estreptavidina-PE a cada pocillo y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente en un agitador a 800 rpm. Finalmente, la placa se lavó como se describió anteriormente y se añadieron 100 μ L de tampón de lavado a cada pocillo seguido de la resuspensión de las perlas magnéticas durante 2 min a 800 rpm.



La intensidad de fluorescencia se midió usando un analizador de sistema MAGPIX® (Luminex, Austin, TX, EE. UU.). La cuantificación de proteínas se realizó utilizando las curvas estándar para cada analito seleccionado. Los resultados se normalizaron por la cantidad de ADN y se expresaron como la concentración media por pg de ADN \pm SEM.

4.4.6 Cuantificación de ADN

El ADN total de las células adheridas (fibroblastos o macrófagos) a las superficies de la película se cuantificó después de retirar el medio de cultivo celular y cada pocillo se lavó dos veces con PBS. Los lisados celulares se obtuvieron mediante la adición de 50 μ L de tampón de lisis (SDS al 1%, EDTA 1 mM y tris-HCl 10 mM) a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. El contenido de ADN en los lisados celulares se cuantificó después de la dilución adecuada, usando el ensayo de ADN PicoGreen (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.4.7 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm error estándar de la media (SEM, por sus siglas en inglés: estándar error of the mean) La evaluación estadística se realizó mediante ANOVA de una vía con la prueba de Bonferroni. Los valores de $p < 0.05$ se definieron como estadísticamente significativos.

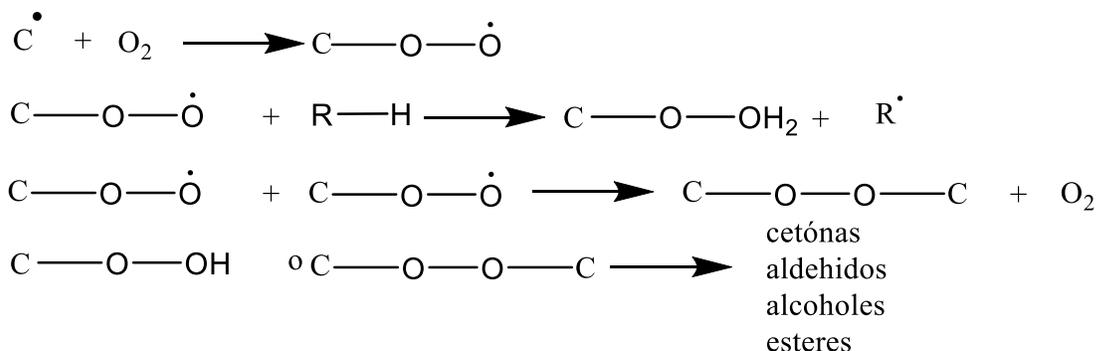


Capítulo 5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

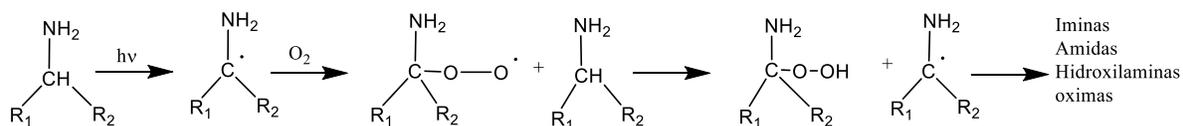
5.1 Injerto de AC sobre PP

Las películas de polipropileno (PP) fueron modificadas químicamente mediante radiación gamma injertando cloruro de acrililo (AC), y posteriormente una reacción química de conversión de grupos cloro en grupos funcionales amino.

El AC se injertó en PP utilizando el método directo porque por medio de este método se produce mayor rendimiento de injerto [30,32]. Además, estudios previos han demostrado que el injerto que se lleva a cabo por medio del método de pre-irradiación oxidativa, donde se crean enlaces peróxidos e hidroperóxidos que son inestables ante el aumento de la temperatura, guían a la formación de radicales C-O. La literatura muestra que los radicales peróxidos son más estables que los hidroperóxidos, los primeros pueden persistir durante largos períodos a temperatura ambiente [47]; además, estos radicales son los sitios reactivos donde ocurre la incorporación de oxígeno. El radical C• da lugar al proceso de autooxidación cuando los materiales se exponen al aire [17,47,52] o al agua [47], formando diferentes especies oxidadas, ocurriendo el mismo fenómeno de envejecimiento que sucede por la técnica de polimerización por plasma [47,77]. Por ejemplo: en una cadena polimérica (sin tomar en cuenta las aminas), ocurriría de la siguiente manera:



Pero si una cadena polimérica contiene aminas, las reacciones de autooxidación ocurrirían como se muestra en las siguientes reacciones.



El porcentaje de injerto de AC sobre PP se midió gravimétricamente (ecuación 1) mediante un método indirecto por la esterificación con metanol debido a la alta reactividad y la fácil descomposición del grupo cloruro de acilo [22]. La Figura 12(a) muestra el porcentaje de injerto de AC al 30% v/v; en donde se observa un aumento del injerto en función de la dosis. Las dosis de hasta 6 kGy conducen a la formación de una gran cantidad de homopolímero, por lo tanto, la viscosidad de la solución aumenta, disminuyendo la difusión del monómero y la movilidad de los macro radicales el sistema, por lo que disminuyó la cantidad de AC injertado.

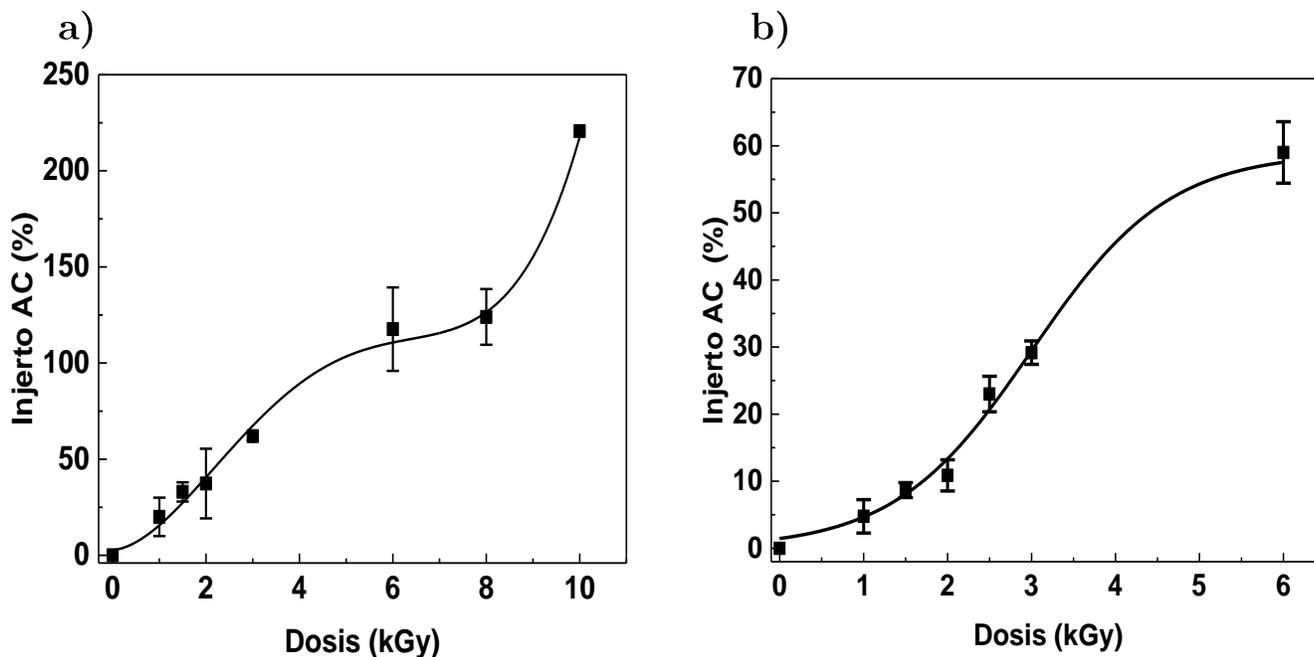


Figura 12. Injerto de AC sobre PP (a) [AC]: 30% v/v (b) [AC]: 50% v/v en tolueno. Intensidad de dosis: 4 kGy/h

Mientras que la Figura 12(b) representa el porcentaje de injerto del AC a una concentración del 50% v/v. El porcentaje de injerto es mayor a la misma dosis, comparado con la Figura 12(a), esto es porque existe una mayor disponibilidad de las moléculas para reaccionar con los macroradicales y formar nuevos enlaces, además de mayor formación de homopolímero.

La irradiación de películas de polipropileno en medio acuoso de AC genera, simultáneamente radicales del monómero, y radicales del polímero en el sustrato sólido. El injerto puede ser el resultado de reacciones de propagación de radicales del



PP por adición de un monómero, y en menor medida, reacciones de combinación de radicales del polímero y el monómero.

5.2 Reacción de aminólisis

Se sabe que en la reacción entre la ED y el AC podría ocurrir una reacción de entrecruzamiento entre grupos funcionales debido a que los dos grupos amino de la ED pueden reaccionar con los cloruros de ácido de las cadenas del polímero injertado, dando como productos con aminas libres y amidas (Figura. 10). Para llevar a cabo esta reacción, es necesario controlar algunos parámetros, tales como el porcentaje de injerto de AC y el tiempo de reacción. Para determinar el porcentaje de injerto adecuado, se eligieron películas que tenían entre un 6 y un 24% de injerto, debido a que se ha demostrado que porcentajes de aminas entre 4% y 35% son adecuados para adhesión celular.[35,53] Se probó el tiempo de reacción y se encontró que 30 min fue suficiente para que reaccionaran los grupos amino y el grupo cloruro; para tiempos más largos, el rendimiento de la reacción fue el mismo. Otro factor de estudio fue la elección de disolvente: DCM, DMF y THF fueron usados. A pesar de la polaridad muy cercana entre el THF y el DCM, los mejores resultados se obtuvieron usando THF, debido a que es un disolvente polar aprótico. Las películas en las que se usó DCM mostraron rendimientos desfavorables cercanos a 1%, independientemente de la cantidad de injerto de monómero. Por otro lado, es bien sabido que la DMF es un buen disolvente para las reacciones de sustitución (S_N2); sin embargo, es difícil de eliminar de las muestras. En consecuencia, la DMF y el DCM no se usaron para llevar a cabo la reacción. La cantidad de aminas primaria demostró tener un cambio relacionado con la hidrofiliidad de las películas. Las películas con un porcentaje de



injerto más alto no experimentaron modificación de su hidrofobicidad (ver sección 5.3.3 “ángulo de contacto”).

5.3 Caracterización

5.3.1 FTIR-ATR

Los espectros de FTIR-ATR (Figura 13) confirmaron el injerto de AC, además de la reacción de esterificación con metanol sobre el PP que se llevó a cabo para la medición del injerto. La película de polipropileno (Figura 13-1) mostró dos bandas a 2922 y 2954 cm^{-1} , correspondientes al estiramiento asimétrico y simétrico del metilo (CH_3) y metileno (CH_2), respectivamente. Dos bandas en 1376 y 1461 cm^{-1} pertenecen a la flexión asimétrica de CH_2 y CH_3 , respectivamente. El sistema PP-*g*-AM mostró una nueva banda a 1738 cm^{-1} , que se atribuye a la vibración del estiramiento del carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) del éster (Figura 13-2).

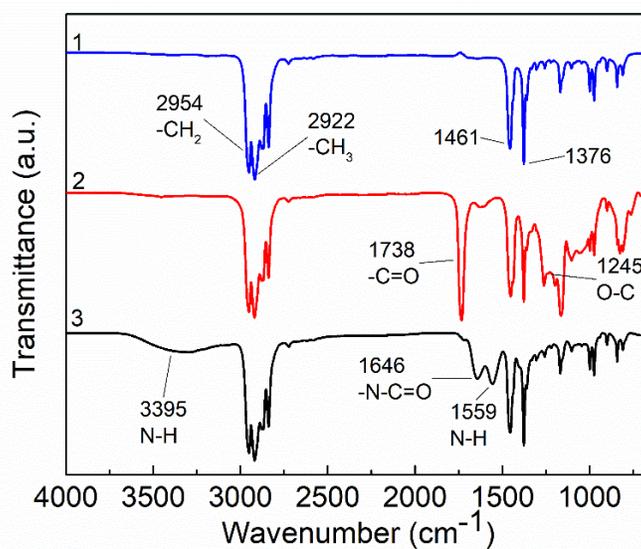


Figura 13. FTIR de los diferentes sistemas: 1) Películas de PP; 2) PP-*g*-MA; 3) PP-*g*-AC(ED)



El sistema modificado con etilendiamina (Figura 13-3), este mostró una sola banda, asociada con el grupo amina a 3395 cm^{-1} ; debido a que solo se observa una sola banda, indica que se asocia a aminas secundarias (y no dobles, que corresponde a aminas primarias); adicionalmente, dos bandas a 1646 y 1559 cm^{-1} que corresponden al estiramiento del carbonilo de amida -NC=O y a la flexión del nitrógeno hidrógeno del grupo amida (N-H), respectivamente.

5.3.2 *Ángulo de contacto*

El ángulo de contacto (θ) del PP prístino se encontró en $90.5^\circ \pm 0.5$, dando como información la de un polímero con características hidrofóbicas. Este valor disminuyó a $75.2^\circ \pm 1.32$ cuando se modificó con películas injertadas únicamente con 3% de AC y modificadas con grupos amino en la superficie, como resultado de la introducción de grupos amino en la estructura. Películas con un porcentaje de injerto más elevado (6%) dieron un valor de ángulo de contacto aun más hidrofílico ($57.2^\circ \pm 1.4$), a causa de la formación de puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua y las amidas. Por otro lado, se observa que al aumentar el rendimiento de injerto hasta un 24%, conduce a un ángulo que se vuelve a elevar a $85^\circ \pm 3.25$, probablemente por un aumento en la densidad (peso) de hidrocarburos en la superficie del PP provenientes de los carbonos del grupo AC y de la cadena alifática de la etilendiamina, o debido a que la dietilamina reaccionó en sus dos extremos y por tanto dio lugar a un entrecruzamiento y disminución de grupos de aminas primarias en la superficie.

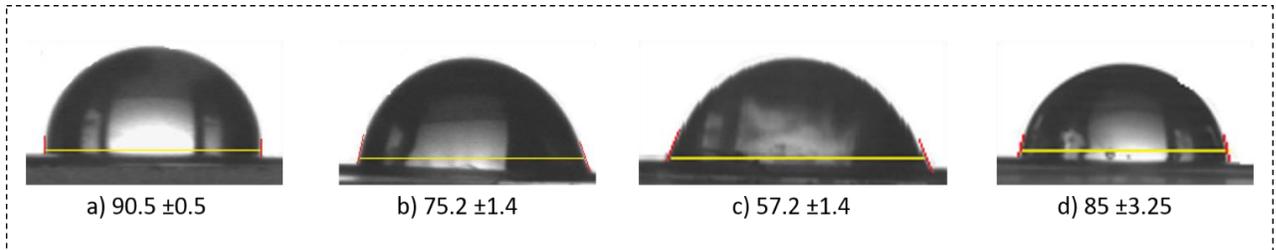


Figura 14. Ángulo de contacto de a) películas de PP; b) PP-g-(AC)ED_{6%}; c) PP-g-(AC)ED_{14%} d) PP-g-(AC)ED_{24%}.

5.3.3 Determinación de rugosidad por medio de AFM

Engler y colaboradores [2] demostraron la relevancia del cambio en la topografía de la superficie para la adhesión celular; mostraron una mejora de la adhesión celular cuando la rugosidad aumenta. Este cambio se puede estudiar por medio de microscopía de fuerza atómica AFM.

La Figura 15 muestra la rugosidad promedio (R_a , μm) de la superficie de las películas de polipropileno y el perfil en 3D en diferentes partes de la superficie de las películas modificadas y no modificadas. Las áreas más oscuras representan depresiones mientras que las áreas más brillantes significan crestas en la superficie. El promedio de rugosidad (R_a) del PP [Figura 15 a)] fue de $13.76 \mu\text{m}$, donde se puede observar una superficie relativamente lisa y plana; mientras que la muestra de PP-g-AC(ED)_{g:24%} exhibió la rugosidad más alta con un valor de $42.59 \mu\text{m}$, esto puede ser a causa de la introducción de un mayor número de cadenas poliméricas en la cadena principal que contribuyen al aumento de la rugosidad. Las muestras con un porcentaje de injerto de 6 y 14 mostraron un aumento leve en la rugosidad en relación con las películas de PP.

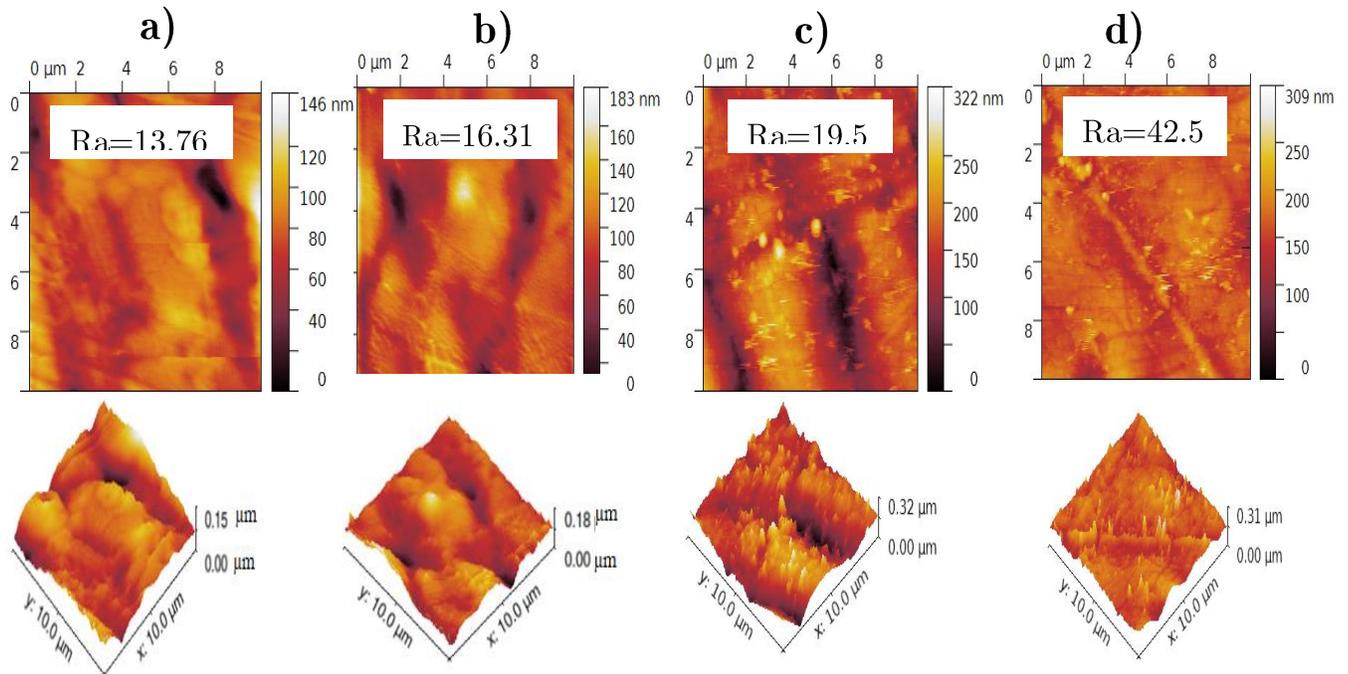


Figura 15. (Arriba) Valores de rugosidad de la superficie calculados por AFM de (a) Película PP, b) PP-g-AC(ED)_{6%}, (c) PP-g-AC(ED)_{14%}, (d) PP-g-AC(ED)_{24%}. (Abajo) Perfil 3D.

5.3.4 Análisis por SEM

Tras la irradiación, el injerto superficial de cloruro de acrililo en las películas de PP se espera que el injerto también trascienda en el interior de la película, junto con el hinchamiento del monómero en la solución, debido a la modificación química que constantemente sufre el sustrato.

Las imágenes SEM de sección transversal se muestran en la Figura 16. Se investigaron las morfologías de sección transversal de PP y PP-g-AC modificadas con etilendiamina (PP-g-AC(ED)) con 6, 14 y 24% de injerto en las películas.



Las películas prístinas de PP [Figura 16 a)] mostraron una superficie compacta y lisa, con un grosor de $76.9 \pm 2.9 \mu\text{m}$. Las Figuras 11b) y 11c) muestran un grosor aumentado de 120.4 ± 3.65 con 14% de injerto y $123.4 \pm 2.77 \mu\text{m}$ con 24% de injerto, respectivamente. La Figura 16c) muestra una superficie rugosa, diferente de la superficie lisa homogénea del PP prístino, como resultado de la adición de los grupos más grandes de etilendiamina en el sistema, y las interacciones entre los grupos amina y carbonilo debido a que el injerto se realizó tanto en masa como en superficie. La Figura 16 b) con 14% de injerto muestra una estructura de rugosidad más baja que las películas injertadas con 24%, debido a una estructura de reticulación de la reacción de los grupos de amina primaria de la etilendiamina con los grupos acilo.

Algunos autores como Dispenza [78] han demostrado que cuando se injerta ácido acrílico en PP y posteriormente se llevan a cabo reacciones para su conversión en un cloruro de ácido y su posterior reacción con aminas, la morfología de modificación de los grupos amino en las películas muestra que es parecida a la morfología del injerto de PP-*g*-AC, ya que no cambia por la reacción de conversión de grupos cloro en aminas primarias, debido a las condiciones suaves de reacción y el bajo injerto de AC en superficie.

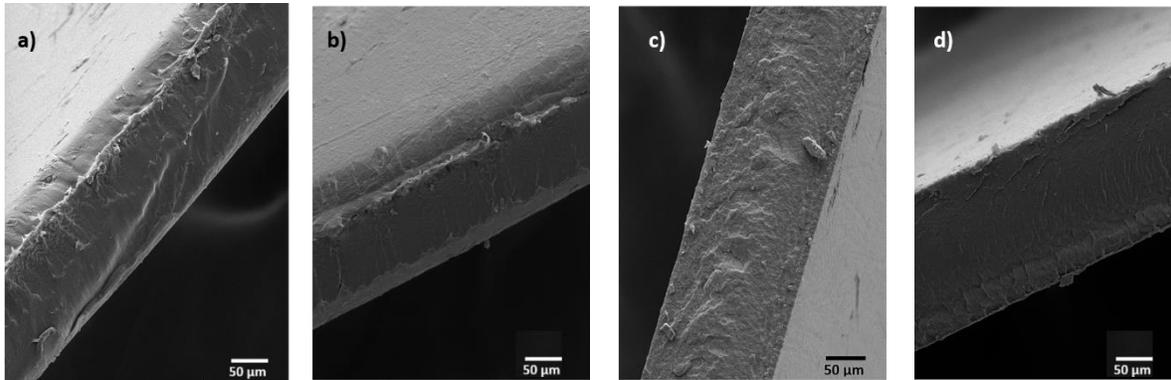


Figura 16. Micrografías SEM de sección transversal de (a)PP, (b) PP-g-AC(ED)_{6%}, y (c)PP-g-AC(ED)_{24%}. (d)PP-g-AC(ED)_{14%}.

5.3.5 Propiedades mecánicas

Aunque la radiación ionizante es una herramienta muy útil para el injerto de polímeros, puede causar efectos colaterales en el sustrato del polímero que varían según su naturaleza química, desde la degradación hasta la reticulación [79]. Los cambios en la estructura pueden estudiarse mediante la evaluación de las propiedades mecánicas. Cabe señalar que, además del contenido de los grupos que interactúan en la superficie de los biomateriales, las propiedades generales, como la rigidez y la resistencia a las fuerzas generadas por la célula pueden determinar notablemente la respuesta celular de la propagación a la diferenciación [2].

Como es típico de los polímeros semicristalinos, las curvas de tensión-deformación (Figura 17) mostraron dos regiones bien definidas: primero apareció una región elástica lineal, que alcanzó un estado estacionario con cierto valor de deformación; posteriormente la deformación adicional se acompaña de una pequeña disminución en la tensión debido a la formación de un cuello [79].

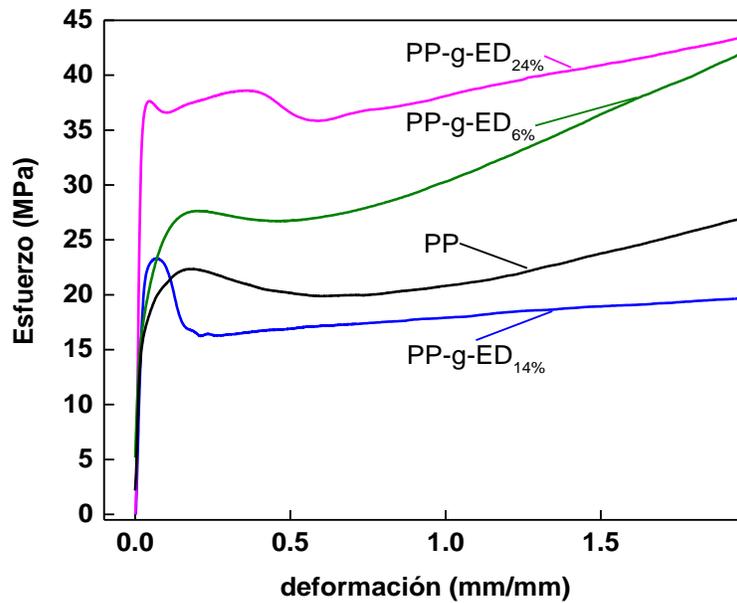


Figura 17. Curvas de esfuerzo vs deformación de películas de polipropileno prístino y funcionalizadas con grupos amino.

El módulo de Young (E) se calculó a partir de la región lineal de las curvas de (Tabla 2).

Tabla 2. Módulo de Young de películas modificadas con aminas en la superficie

Muestra	Injerto de AC (%)	E (MPa)
PP prístino	-	1110±38
PP-g-(AC)ED _{6%}	6	1068±114
PP-g-(AC)ED _{14%}	14	1207±158
PP-g-(AC)ED _{24%}	24	1654±104



El PP puede sufrir una extensa deformación ($>800\%$ de deformación), aunque se observó un aumento en E para la película con el mayor porcentaje de injerto en AC y, por lo tanto, el mayor contenido en N, que puede estar relacionado con la reticulación inducida por radiación, siendo un obstáculo en la movilidad del esqueleto del polímero como consecuencia del injerto de superficie [18,80].

5.3.6 Análisis superficial por XPS

Los sistemas modificados se caracterizaron químicamente por la técnica de XPS. Los espectros de alta resolución se muestran en la Figura 18, mientras que la energía de enlace (BE) de los grupos funcionales en la Tabla 3. La Figura 18(a) muestra el orbital de C 1s de las películas de PP sin funcionalizar; donde se pueden observar dos picos correspondientes a la estructura del PP; el primer pico, correspondiente a los enlaces CH-CH₂ que se muestra en 285.0 eV; entre tanto el segundo pico sufrió un cambio de 0.4 eV, apareciendo en 285.40 eV, este pico pertenece al enlace CH₂-CH-CH₃ [81]. Adicionalmente, se observan la presencia de otras contribuciones al orbital del C 1s, como el pico de C-O en 286.14 eV y C=O a 287.30 eV en la película del sustrato prístino, esto puede ser causado por plastificantes u otros aditivos añadidos durante la producción de la película [82–85].

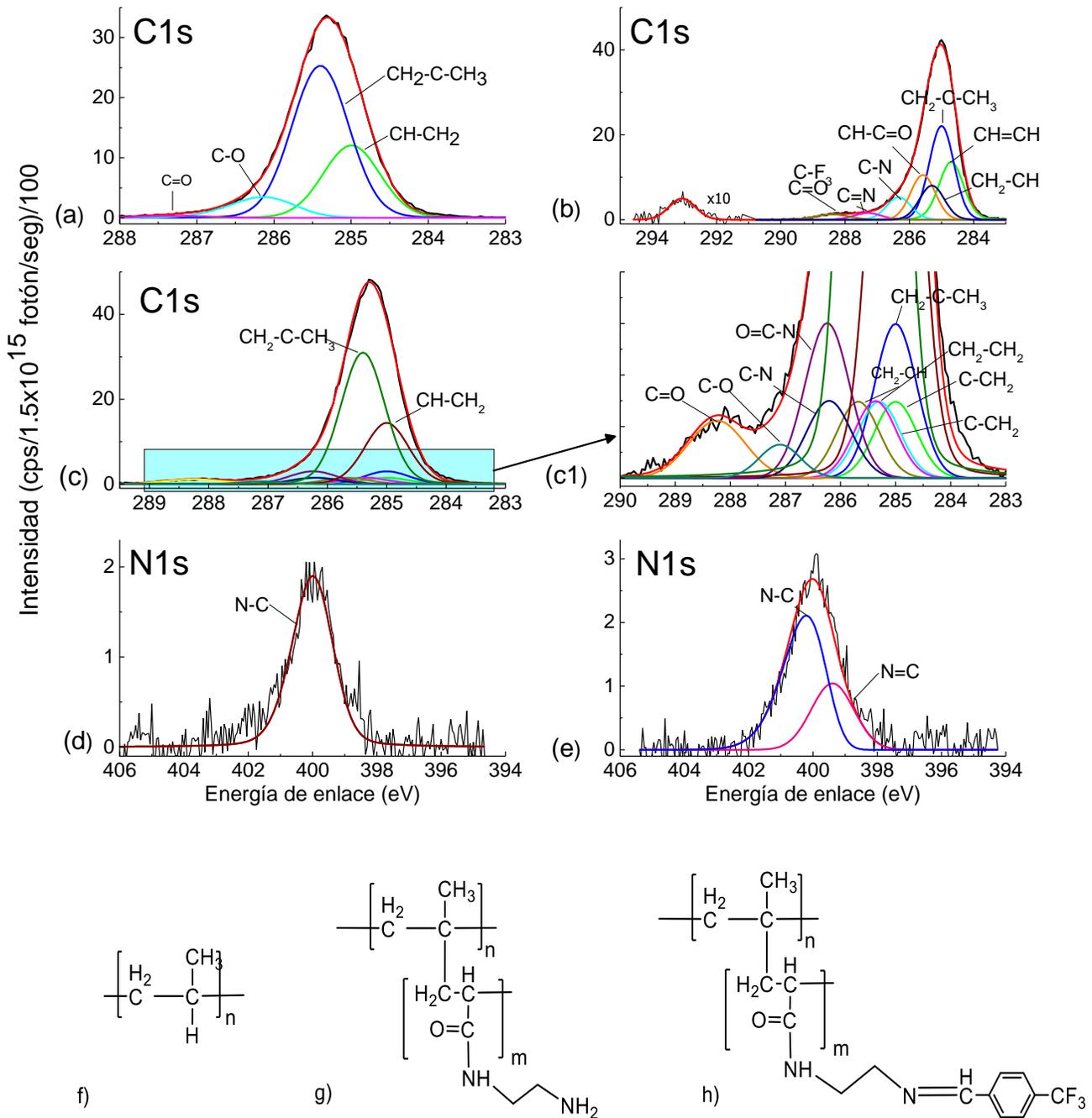


Figura 18. Deconvolución de espectros de alta resolución de C1s de (a) película de PP prístino, (b) PP-g-AC(ED)+TFBA, (c) PP-g-AC(ED) y (c1) amplificación de PP-g-AC(ED). Espectros de alta resolución de N1s de (d) PP-g-AC(ED) y (e) PP-g-AC(ED)+TFBA. Estructuras de (f) PP, (g) PP-g-AC(ED) y (h) PP-g-AC(ED)+TFBA.



Tabla 3. Distribución superficial XPS de especies de carbono y nitrógeno resultantes del ajuste de la curva de los picos de fotoelectrones correspondientes para la muestra PP-g-AC (ED) _{g:24%}.

Muestra	C 1s				N1s			
	enlace	eV	(.%)*	(%at rel.)**	enlace	(at.%)*	(%at rel)**	
PP	CH-CH₂	285.00	28.8	12.1	-	-	-	
	CH₂-CH-CH₃	285.40	60.5	25.5	-	-	-	
	C-O	286.14	9.7	4.1	-	-	-	
	C=O	287.30	1.0	0.4	-	-	-	
PP-g-AC(ED)	C-CH₂	285.00	2.4	1.17	-	-	-	
	CH₂-C-CH₃	285.00	4.8	2.3	-	-	-	
	CH₂-C=O	285.30	2.4	1.2	-	-	-	
	CH₂-CH₂	285.37	2.4	1.2	-	-	-	
	C=O	288.24	2.4	1.2	-	-	-	
	CH₂-CH	285.68	2.4	1.2	N-C	399.95	100	30.6
	C-N	286.24	2.6	1.3	-	-	-	
	N-C=O	285.00	5.1	2.5	-	-	-	
	CH-CH₂	285.40	23.6	11.5	-	-	-	
	CH₂-CH-CH₃	287.10	50.8	24.7	-	-	-	
	C-O	287.10	1.0	0.5	-	-	-	
PP-g-AC(ED) +TFBA	CH=CH	284.70	22.4	9.4	N=C	399.39	32.6	8.7
	CH₂-C-CH₃	285.00	34.7	14.6	N-C	400.21	67.4	17.9
	C-N	286.33	8.3	3.5	-	-	-	
	C=N	287.30	2.7	1.1	-	-	-	
	CH-C=O	285.58	16.6	6.9	-	-	-	
	C=O	288.58	2.6	1.1	-	-	-	
	CH₂-CH	285.30	12.6	5.3	-	-	-	
	C-F₃	293.00	1.0	0.4	-	-	-	

*porcentaje atómico **porcentaje atómico relativo



Después de la modificación de la superficie de PP, se observan nuevos picos debido a la nueva estructura química injertada, ver Figura 18(c). Para mayor claridad, se hizo una ampliación de las curvas de deconvolución de la Figura 18(c), que aparece del lado derecho, Figura 18(c1). Un nuevo pico que se observa en 286.21 eV para el orbital de C 1s, corresponde al enlace C-N. El pico que corresponde a la amida (O=C-N-) se encontró en 286.24 eV. Estos resultados muestran claramente la presencia de nitrógeno en la superficie de la película por la formación del nuevo enlace C-N, correspondiente a la diamina, esto se confirma en el espectro de alta resolución del orbital del N 1s, Figura 18(d), ya que el enlace C-N aparece en 399.95 eV que pertenece al grupo C-NH₂; también se puede observar que el pico de C=O, en la Figura 18(c1), aumentó su proporción con respecto al PP prístino (Tabla 3), debido a la nueva estructura injertada, AC, que contiene un grupo carbonilo, Figura 18(g).

Es importante señalar que además de aminas primarias, otros grupos funcionales que contienen nitrógeno, como amidas u oximas, podrían existir en la superficie. Por lo que se realizó una derivatización química con trifluorometil benzaldehído (TFBA), dado que esta reacción es selectiva y ha sido ampliamente estudiada [73,86].



Tabla 4. Porcentaje de injerto de AC (calculado gravimétricamente) y contenido de N (calculado a partir del análisis XPS) de películas PP y contenido de aminas primarias en superficie calculado a partir de la reacción con TFBA

Muestra	Injerto de AC (%)	Nitrógeno total (at %)	Aminas primarias respecto a nitrógeno total (%)
PP pristine	-	-	---
PP- <i>g</i> -(AC)ED _{6%}	6	3	17.6
PP- <i>g</i> -(AC)ED _{14%}	14	6	49
PP- <i>g</i> -(AC)ED _{24%}	24	15	12.3

La cantidad de aminas se puede conocer midiendo el elemento flúor en la nueva estructura, Figura 18(h). El enlace C-F se observa en la Figura 18(b) (espectro de C1s) en 293.07 eV. Asimismo, otras contribuciones aparecen en 287.30 eV, correspondientes al enlace C-N y al enlace amida (C=N) que se forman por la unión de C=O del TFBA con una amina primaria. La Figura 18(e) muestra nitrógeno, que pertenece a la reacción de la ED con el TFBA, en esta figura destacan dos especies de nitrógeno, una especie enlazada a carbono de manera simple (400.21 eV) y un enlace doble a 399.39 eV. Mediante los cálculos de las ecuaciones 1-3, se determinó el porcentaje total de aminas respecto a nitrógeno, carbono y el total de la muestra. El porcentaje de aminas primarias en superficie, para las películas PP-*g*-AC(ED)_{g:24%} con 15% de nitrógeno (Tabla 2) mostraron un total de aminas de 12.3% respecto al nitrógeno total, mientras que $[\text{NH}_2]_C$ está cerca de 0.8%. Para las películas



PP-*g*-AC(ED)_{g,14%} el porcentaje de aminas primarias respecto al nitrógeno total dio un porcentaje de 49% y $[NH_2]_c=1.6\%$. Esta evidencia indica que las aminas secundarias están presentes con un contenido más alto que las aminas primarias debido a la reacción del grupo carbonilo de AC y una amina libre de etilendiamina para formar grupos amida [80]. La disminución en el porcentaje total de aminas primarias en la superficie de las películas PP-*g*-(AC)ED_{24%}, puede deberse a la modificación que llevó a cabo tanto en masa como en superficie, y la cuantificación de aminas por la técnica de XPS es superficial (20 nm de profundidad); además, un mayor rendimiento de injerto (AC), aumenta las posibles reacciones entre las dos aminas libres de etilendiamina y los grupos acilo de las cadenas de polímeros, como se muestra en la tabla 4, posiblemente porque al aumentar la densidad de cadenas poliméricas AC existe mayor disponibilidad que reaccionen con las moléculas de ED existentes, adicionalmente la ED reacciona por ambas reaccionan.

5.4 Estabilidad de las aminas primarias ante condiciones ambientales

Según algunos autores [13,15,16,47,87], cuando la técnica de plasma se usa para la polimerización, el material recién sintetizado puede incorporar oxígeno cuando entra en contacto con el aire; esto puede conducir a la formación de nuevas especies reactivas que reaccionan con los grupos funcionales presentes en la superficie y causar “envejecimiento”. Para evaluar si las películas funcionalizadas por radiación gamma se produce el mismo fenómeno, se realizó una prueba de estabilidad: las películas funcionalizadas se expusieron a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad durante 90 días. La Tabla 5 muestra la composición elemental por XPS a los 0 y 90



días de los espectros del survey. El porcentaje atómico de la mayoría de los elementos no se modificó después de 90 días. Los cambios no son significativos para su estabilidad ambiental. El oxígeno muestra un pequeño aumento (de 12.6 a 15.6%) después de 90 días, que fue acompañado por una ligera disminución de nitrógeno (11.9 a 10.1%) con la desaparición de 0.4% de Cl. Este cambio puede atribuirse a una pequeña cantidad de grupos amino que se convirtieron en imidas u oximas [15,47] debido al medio ambiente, pero que no son valores significativos.

Tabla 5. Composición elemental mediante XPS de las superficies con aminas primarias sintetizadas por radiación gamma en 90 días

Composition elemental (% atómico)						
Envejecimiento (días)	Muestra	C 1S	O 1S	N 1S	Cl 1S	Si 2p
0	PP- <i>g</i> -AC(ED) _{g:14%}	70.8	12.6	11.9	0.4	4.3
90	PP- <i>g</i> -AC(ED) _{g:14%}	70.6	15.7	10.1	---	3.6

5.5 Caracterización biológica

En los experimentos de caracterización biológica las películas serán nombradas de manera general, como PP-*g*-ED y específicamente como PP-*g*-ED con el porcentaje de aminas primarias como subíndice como se muestra en la Tabla 6.



Tabla 6. Equivalencia de las películas utilizadas para la funcionalización de películas de PP

Muestra	Injerto de AC (%)	Nitrógeno total (at %)	Aminas primarias respecto a nitrógeno total (%)	equivalencia
PP- <i>g</i> -(AC)ED _{6%}	6	3	17.6	PP- <i>g</i> -ED _{17%}
PP- <i>g</i> -(AC)ED _{14%}	14	6	49	PP- <i>g</i> -ED _{49%}
PP- <i>g</i> -(AC)ED _{24%}	24	15	12.3	PP- <i>g</i> -ED _{12%}

5.6 Adsorción de proteínas

Previo a los experimentos de cultivo celular, se realizó un ensayo de adsorción de proteínas coagulables en sangre, con el fin de conocer si el material modificado presenta características deseables en la adhesión celular.

La albúmina, el fibrinógeno y la inmunoglobulina G son las proteínas más abundantes en el plasma y participan en la formación del coágulo sanguíneo, que tiene capacidades quimioatrayentes que reclutan células del sistema inmune innato. Una vez que se implanta un biomaterial, la albúmina se adhiere a la superficie generando una capa de proteína que luego se reemplaza con proteínas de adhesión que son reconocidas por los receptores de integrina, haciendo que el material sea biológicamente reconocible para la adhesión celular [7]. Se sabe que un material que adsorbe preferentemente albúmina sobre fibrinógeno promueve una respuesta celular deseable [7,88,89] y provoca una baja adhesión y activación plaquetaria [90,91].



En comparación con el PP prístino, las películas con grupos amino mostraron niveles de adsorción de suero albúmino bovino similares (Figura 19), y solo se produjo un ligero aumento en la adsorción de fibrinógeno para 3-6 N. Los grupos amino cambiaron la polaridad en la superficie, ayudando a la formación de puentes de hidrógeno entre el átomo de hidrógeno de los grupos amino o amida de las películas y los electrones de los pares libres de grupos amida o carboxilo de las proteínas. Estas proteínas pueden ser reconocidas por diferentes integrinas de macrófagos para la adhesión de proteínas [92].

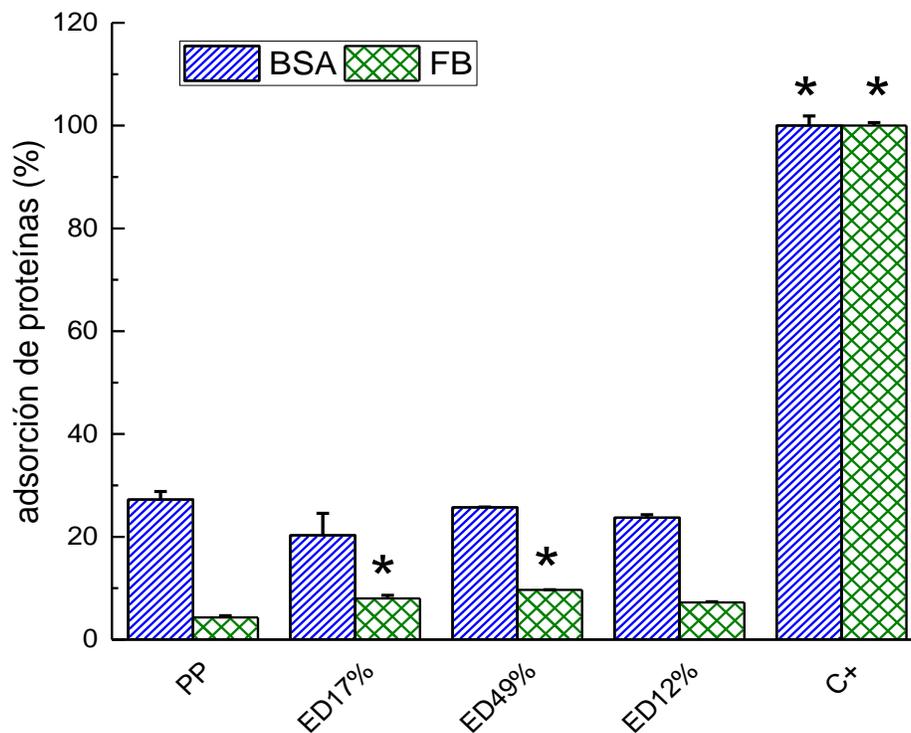


Figura 19. Adsorción relativa de albúmina de suero bovino (barras azules) y fibrinógeno (barras verdes) en polipropileno (PP), PP-g-ED_{17%} (ED17%), PP-g-ED_{49%} (ED49%) y PP-g-ED_{12%} (ED12%) en comparación con el control positivo (C+) (membranas de nitrocelulosa). Las diferencias estadísticamente significativas con respecto a las películas PP se muestran con un asterisco (*). $P < 0.05$.



5.6.1 Adhesión celular

Para determinar la adhesión celular, se cultivaron fibroblastos (Balb/3T3) durante 2, 6 y 24 h en películas funcionalizadas con grupos amino. Los fibroblastos son muy sensibles a cualquier sustancia tóxica y, por lo tanto, se usan ampliamente para evaluar la viabilidad celular de nuevos biomateriales [35]. En comparación con las películas prístinas, se observó una mayor adhesión celular en las películas funcionalizadas alcanzando en algunos casos, después de 2 h de siembra (Figura 20), 2 veces mayor adhesión. A medida que pasa el tiempo, disminuye la adhesión celular, en 24 h de siembra la adhesión celular se atenuó.

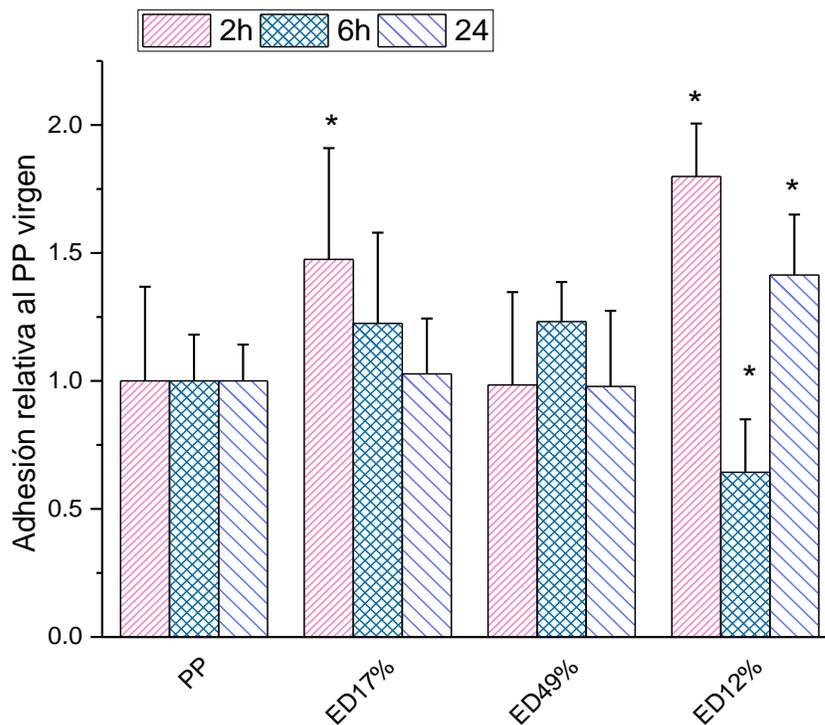


Figura 20. Adhesión de células Balb/3T3 en diferentes tiempos de cultivo en películas prístinas y funcionalizadas con amino a) 2 h (barras rosas), 6 h (barras azules) y 24 h (barras moradas). Las diferencias estadísticamente significativas con respecto a las películas prístinas (PP) se muestran con un asterisco encima (*) $P < 0.05$.



Para las películas con un porcentaje más alto de grupos amino, se esperaba una mejora en la adhesión celular, ya que implicaría más aminas primarias ($-\text{NH}_2$) en la superficie de los biomateriales, pero todas las películas funcionalizadas con grupos amino se comportaron como un soporte deficiente para la adhesión celular a largo plazo. La unión de las células está mediada principalmente por receptores de integrinas [10–14], que se unen a varias proteínas de la matriz extracelular.

La ligera mejora en la adhesión de fibroblastos puede estar relacionada con el hecho de que la funcionalización con grupos amino solo condujo a una mejora menor en la adhesión de proteínas (Figura 20) haciendo la superficie más hidrofílica (Figura 14). En estudios anteriores se ha demostrado que los fibroblastos son más propensos a extenderse en materiales hidrofílicos (ángulo de contacto con el agua de $5\text{--}10^\circ$) que cubre un área más grande y, por lo tanto, la adhesión en términos de células/ cm^2 fue menor que para el PP tratado [23]. Relevantemente, PP-*g*-ED_{49%} que combina un mayor contenido de N y también un mayor ángulo de contacto con el agua fue la película que mantuvo la mayor adhesión celular después de 24 h de cultivo.

5.6.2 Polarización de macrófagos

La adhesión de los macrófagos en las películas funcionalizadas con grupos amino se muestra en la Figura 22. Para mayor claridad, los resultados se normalizaron mediante la adhesión observada en materiales prístinos, como en el estudio anterior (adhesión de fibroblastos). La adhesión celular a las 24 h fue bastante baja, por lo que en ensayos posteriores solo se hizo el cultivo las primeras 6 h.

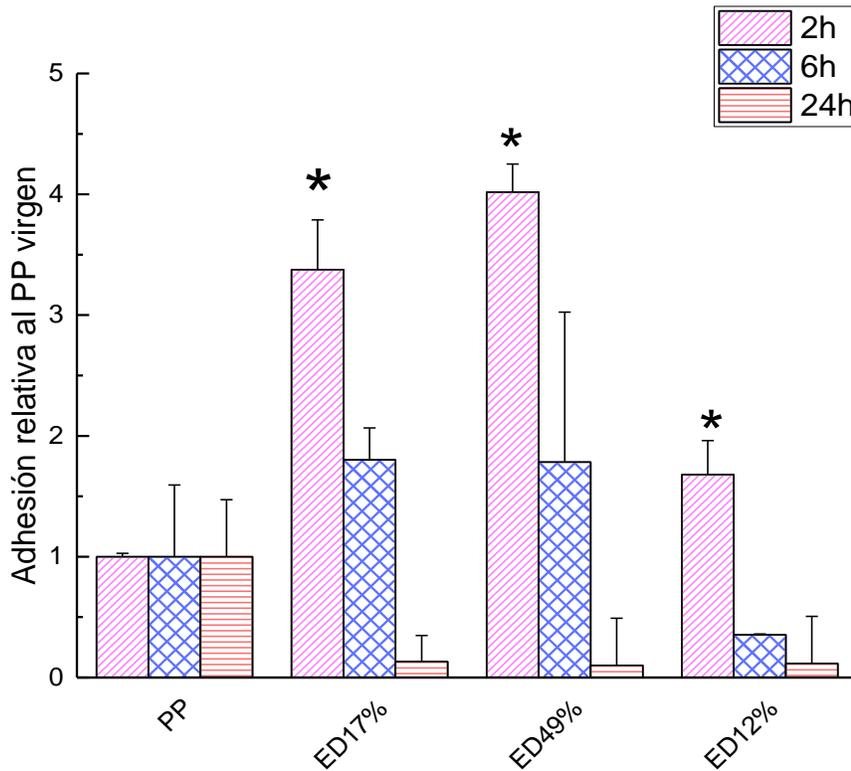


Figura 21. Adhesión de células de macrófagos humanos en películas prístinas y funcionalizadas a las 2 h (barras rosas), 6 h (barras azules) y 24 h (barras naranjas). Las diferencias estadísticamente significativas respecto a las películas prístinas (PP) se muestran con un asterisco arriba (*) $P < 0.05$.

La adhesión de los macrófagos mejoró en las películas con grupos amino. PP-g-ED_{17%} y PP-g-ED_{49%}, los cuales mostraron un aumento de cuatro veces en la unión celular en comparación con las películas no modificadas. La adhesión máxima se alcanzó a las 2 h de la siembra celular en todas las muestras, de acuerdo con informes anteriores que evidenciaron que los macrófagos tienen la máxima adhesión en las primeras horas después de la siembra [13,53,93]. Estos resultados sugirieron que los macrófagos pueden preferir una superficie hidrofílica para adherirse. PP-g-(AC)ED_{49%} presentó la



superficie hidrofílica más alta (ángulo de contacto con agua de 57.2°) y también promovió la fijación más alta de macrófagos. PP-*g*-(AC)ED_{17%} ocupó el segundo lugar en hidrofílicidad (ángulo de contacto con agua de 75.2°) y también en adhesión de macrófagos. A diferencia del caso de los fibroblastos, las películas que presentaron la fijación de macrófagos más baja fueron las que tenían un ángulo de contacto (85°) más cercano al del PP prístino (90°).

Las diferencias de unión entre Balb/3T3 y THP-1 podrían estar asociadas a la naturaleza y funciones de cada célula. Balb/3T3 son células adherentes y, por lo tanto, necesitan adhesión focal para continuar su función de proliferación y migración, por lo que posiblemente necesitan más sitios de anclaje para unirse [94]. De manera diferente, los macrófagos son células semi-adherentes porque necesitan migrar al sitio del daño por medio de las moléculas de adhesión intercelular (ICAM), que están compuestas por múltiples bucles creados por puentes disulfuro dentro de la proteína que tienen una mayor interacción con los grupos amino [91]. Para obtener una mayor comprensión del papel de los grupos amino en la polarización de los macrófagos, se midió la producción de citocinas. Los macrófagos se activan después de la migración y el retorno al tejido inflamado, y pueden polarizarse al estado proinflamatorio (M1) o antiinflamatorio (M2) [7,11,95]. La activación M1 es el resultado de la interacción de los macrófagos con señales proinflamatorias; por ejemplo, el interferón- γ (IFN- γ) y los productos microbianos como el lipopolisacárido (LPS). Por otro lado, los macrófagos M2 también se conocen como macrófagos activados alternativos, resultado de la activación por señales de basófilos, granulocitos, etc. que liberan citocinas antiinflamatorias como IL-10 entre otras [7,8].



Se cuantificó la expresión de IL-12, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 y MMP-8. Estas citocinas se seleccionaron para caracterizar el perfil de los macrófagos adheridos, ya que están asociados con su etapa de polarización; a saber, un aumento en IL-12, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6 y MMP8 es típico de M1, mientras que el aumento en IL-10 es causado por M2. La Figura 22 muestra la secreción de citocinas de macrófagos en contacto con macrófagos activados por LPS (C + LPS), control negativo (-) y películas funcionalizadas con aminos normalizadas por películas prístinas. La secreción de citocinas presentada en la Figura 22 mostraron una tendencia en la disminución de marcadores de macrófagos M1; mayormente en la disminución del factor de necrosis tumoral (TNF- α) sin embargo, no se encontraron diferencias significativas respecto a los marcadores de macrófagos M2 (IL-10).

Las citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 están relacionadas con la fase aguda de los procesos de inflamación. La mayor producción de TNF- α , citocina proinflamatoria, fue inducida por macrófagos en C + LPS. Es importante notar que la producción de TNF- α disminuyó en las películas a las 6 h y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las películas funcionalizadas y las no funcionalizadas. La producción de citocina IL-6 no se observó para ninguna condición. Los niveles de IL-1 β fueron similares en las películas aminadas. Otra citocina relacionada con el proceso de inflamación es la IL-12, que a su vez estimula la producción de INF- γ , cuya función principal es activar los macrófagos para aumentar la capacidad fagocítica[96]. Se observaron niveles de secreción similares de estas citocinas en todas las muestras aminadas, a las 2 y 6 h (Figura 22). También se midió la citocina antiinflamatoria IL-10, pero no se observó un aumento significativo para las películas con funcionalidad amino.



MMP-8 es un marcador controvertido, se ha informado que se activa por citocinas proinflamatorias [97], mientras que Wen y sus colegas [9] han demostrado su capacidad para inducir perfiles antiinflamatorios. Sin embargo, la Figura 22 no mostró ningún aumento estadísticamente significativo en la secreción de MMP-8 sin una asociación clara entre el estado proinflamatorio o antiinflamatorio.

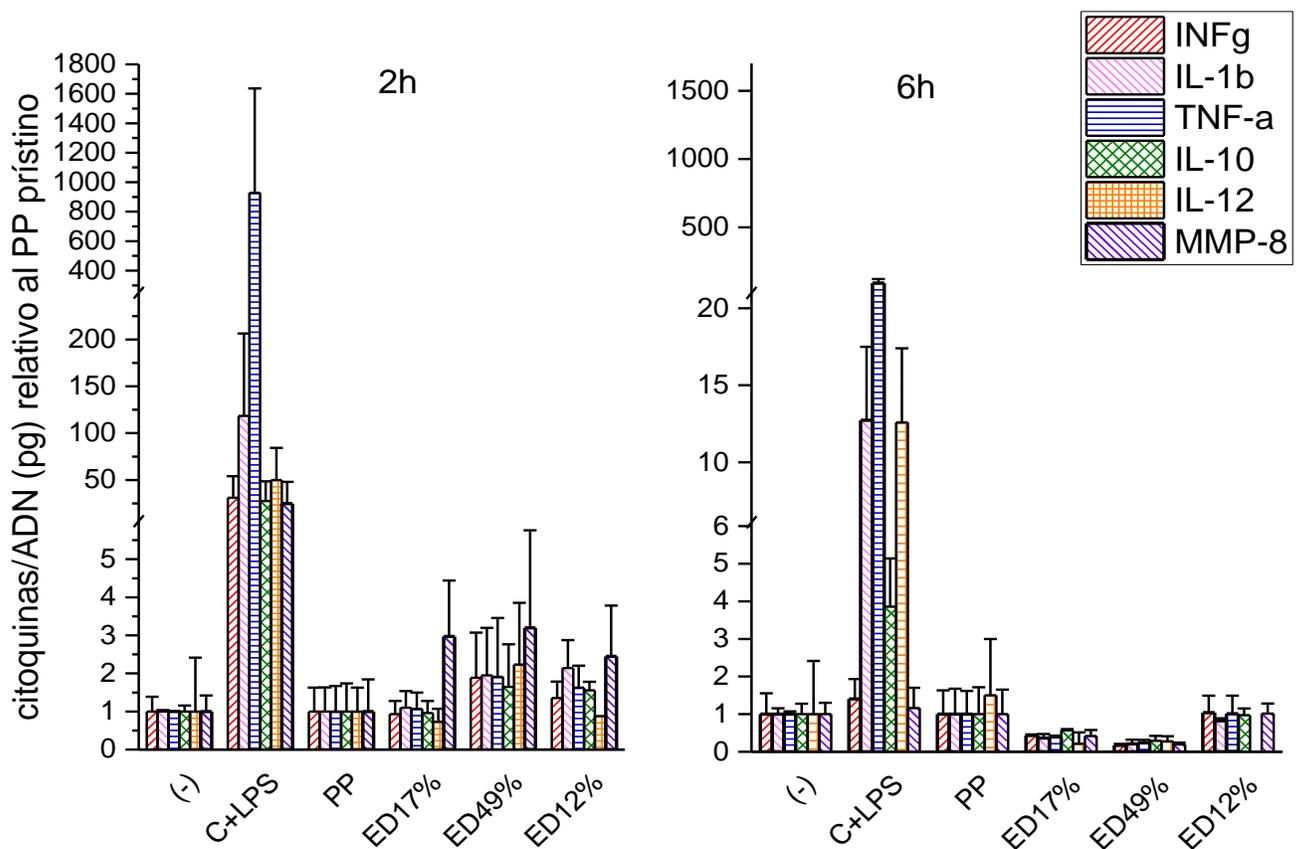


Figura 22. Secreción de citocinas de macrófagos humanos después de a)2h y b)6h cultivadas en PP, PP-g-ED_{17%}(ED17%), PP-g-ED_{49%}(ED49%), PP-g-ED_{12%}(ED12%), control con LPS(C+LPS) y sin tratamiento(-).



Cuando un biomaterial entra en contacto con un órgano o un tejido, después de una secuencia de eventos inmunes, los macrófagos liberan citocinas que pueden mejorar la tolerancia del implante o inducir inflamación aguda. Las respuestas de los macrófagos pueden conducir a un estado inflamatorio crónico y, finalmente, al fracaso del implante correlacionado con la producción de factores inflamatorios como $\text{TNF-}\alpha$, IL-16, IL-1 β [7,8,11,95,97]. Por lo tanto, el control de las respuestas inflamatorias en dispositivos médicos puede mejorar la interacción con el cuerpo humano. Una investigación reportada mostró que los macrófagos cultivados en PP y poli(etilentereftalato) (PET) indujeron una alta producción de citocinas proinflamatorias [97]. En contraste, los resultados obtenidos (Figura 22) sugieren que las películas amino funcionalizadas de PP ayudan a disminuir la producción de citocinas proinflamatorias, especialmente en la producción de la citocina $\text{TNF-}\alpha$, que es una proteína que se secreta en la fase aguda de inflamación.

Es posible observar en la Figura 22 que todas las muestras tuvieron niveles más bajos de producción de citocinas a las 6 h, esto está relacionado con la disminución de la unión de macrófagos en tiempos superiores a 2 h (Figura 21).

A pesar de la reducción en la producción de citocinas proinflamatorias, en todo el material modificado en comparación con el control negativo, no hubo un incremento significativo en la producción de citocinas antiinflamatorias (IL-10). Esto puede sugerir que las aminos podrían influir en el comportamiento proinflamatorio en los biomateriales de los macrófagos, sin alterar la producción de citocinas antiinflamatorias que indican un cambio en el perfil de los macrófagos hacia una etapa no polarizada.



Una observación notable en PP-*g*-ED_{12%} es que la mayor cantidad de nitrógeno en la estructura no presentó diferencia en la cantidad de citocinas secretadas respecto al menor porcentaje de nitrógeno (3 y 6%), probablemente porque algunas aminas libres fueron convertidas a grupos amida menos hidrofílicos, que tienen principalmente cadenas CH-CH en la superficie [80], que podría dar lugar a una interacción pobre entre el sistema modificado y las células en la superficie.



6. CONCLUSIONES

- Utilizando radiación gamma como iniciador de polimerización, se obtuvieron películas de PP funcionalizadas con ED por el método directo, injertando de manera secuencial AC y reacción de aminólisis con ED. Las películas no mostraron envejecimiento que la deposición por plasma presenta comúnmente.
- La estabilidad de los grupos aminos sobre las películas de PP en condiciones ambientales fue de 90 días.
- La derivatización química y el análisis por medio de XPS, indicaron un mayor contenido de aminos secundarias que aminos primarias en los sistemas modificadas, debido a una reacción de entrecruzamiento entre grupos funcionales.
- La concentración de aminos primarias en la superficie, con respecto al nitrógeno total, fue 17.6, 49 y 12.4 % para PP-*g*-AC(ED)_{6%}, PP-*g*-(ED)_{14%} y PP-*g*-(AC)ED_{24%}, respectivamente; presentando una mejora en su hidrofiliidad las películas con 17 y 49 % de aminos primarias, propiedad deseable para la adhesión celular.
- Los macrófagos y fibroblastos Balb/3T3 cultivados en películas aminadas, mostraron una mayor tendencia a la adhesión en tiempos cortos (2 h), lo que concuerda con el hecho de que estas células interactúan más fácilmente con sustratos hidrofílicos.
- Se observó una tendencia en la cual la producción de secreción de citocinas proinflamatorias disminuyó en las películas aminadas; sin embargo, después de la evaluación estadística, estas diferencias entre películas prístinas y aminadas no



fueron significativas. A pesar de esto, una mejora en las propiedades de adhesión indica que esta estrategia puede ser una vía viable para el diseño de nuevos materiales que pueden influir en la polarización de los macrófagos (diferentes opciones de restos injertados, grupos amino libres en la superficie de los sustratos, mayor concentración de aminas, etc.)

- Las propiedades mecánicas de estos materiales no se alteraron significativamente después de la modificación propuesta (de acuerdo con los resultados del Módulo de Young).
- Finalmente, es relevante mencionar que las superficies con grupos amino podrían ser útiles en el diseño de una nueva generación de biomateriales que pueden interactuar con el sistema inmune.



7. REFERENCIAS

- [1] D.F. Williams, On the nature of biomaterials, *Biomaterials*. (2009). doi:10.1016/j.biomaterials.2009.07.027.
- [2] A.J. Engler, L. Richert, J.Y. Wong, C. Picart, D.E. Discher, Surface probe measurements of the elasticity of sectioned tissue, thin gels and polyelectrolyte multilayer films: Correlations between substrate stiffness and cell adhesion, *Surf. Sci.* 570 (2004) 142–154. doi:10.1016/j.susc.2004.06.179.
- [3] D.E. Discher, P. Janmey, Y.L. Wang, Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate, *Science* (80-). 310 (2005) 1139–1143. doi:10.1126/science.1116995.
- [4] J.M. Curran, R. Chen, J.A. Hunt, Controlling the phenotype and function of mesenchymal stem cells in vitro by adhesion to silane-modified clean glass surfaces, *Biomaterials*. 26 (2005) 7057–7067. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.008.
- [5] J.M. Curran, R. Chen, J.A. Hunt, The guidance of human mesenchymal stem cell differentiation in vitro by controlled modifications to the cell substrate, *Biomaterials*. 27 (2006) 4783–4793. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.05.001.
- [6] R.G. Wells, The role of matrix stiffness in regulating cell behavior, *Hepatology*. 47 (2008) 1394–1400. doi:10.1002/hep.22193.
- [7] R. Sridharan, A.R. Cameron, D.J. Kelly, C.J. Kearney, F.J. O'Brien, Biomaterial based modulation of macrophage polarization: A review and suggested design principles, *Mater. Today*. 18 (2015) 313–325. doi:10.1016/j.mattod.2015.01.019.
- [8] D.Y.S. Vogel, J.E. Glim, A.W.D. Stavenuiter, M. Breur, P. Heijnen, S. Amor, C.D. Dijkstra, R.H.J. Beelen, Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared, *Immunobiology*. 219 (2014) 695–703. doi:10.1016/j.imbio.2014.05.002.
- [9] G. Wen, C. Zhang, Q. Chen, L.A. Luong, A. Mustafa, S. Ye, Q. Xiao, A novel role of matrix metalloproteinase-8 in macrophage differentiation and polarization, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 19158–19172. doi:10.1074/jbc.M114.634022.
- [10] C.E. Lewis, J.W. Pollard, Distinct Role of Macrophages in Different Tumor



- Microenvironments Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments, *Cancer Reserch.* 66 (2006) 605–612. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4005.
- [11] P. Allavena, A. Sica, C. Garlanda, A. Mantovani, The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance, *Immunol. Rev.* 222 (2008) 155–161. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00607.x.
- [12] R. Braster, T. O’Toole, M. Van Egmond, Myeloid cells as effector cells for monoclonal antibody therapy of cancer, *Methods.* 65 (2014) 28–37. doi:10.1016/j.ymeth.2013.06.020.
- [13] P.L. Girard-Lauriault, F. Truica-Marasescu, A. Petit, H.T. Wang, P. Desjardins, J. Antoniou, F. Mwale, M.R. Wertheimer, Adhesion of human U937 monocytes to nitrogen-rich organic thin films: Novel insights into the mechanism of cellular adhesion, *Macromol. Biosci.* 9 (2009) 911–921. doi:10.1002/mabi.200800359.
- [14] M.A. Lan, C.A. Gersbach, K.E. Michael, B.G. Keselowsky, A.J. García, Myoblast proliferation and differentiation on fibronectin-coated self assembled monolayers presenting different surface chemistries, *Biomaterials.* 26 (2005) 4523–4531. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.11.028.
- [15] N.A. Bullett, D.P. Bullett, F.E. Truica-Marasescu, S. Lerouge, F. Mwale, M.R. Wertheimer, Polymer surface micropatterning by plasma and VUV-photochemical modification for controlled cell culture, *Appl. Surf. Sci.* 235 (2004) 395–405. doi:10.1016/j.apsusc.2004.02.058.
- [16] A.G. Shard, J.D. Whittle, A.J. Beck, P.N. Brookes, N.A. Bullett, R.A. Talib, A. Mistry, D. Barton, S.L. McArthur, A NEXAFS examination of unsaturation in plasma polymers of allylamine and propylamine, *J. Phys. Chem. B.* 108 (2004) 12472–12480. doi:10.1021/jp048250f.
- [17] P.L. Girard-Lauriault, P.M. Dietrich, T. Gross, T. Wirth, W.E.S. Unger, Chemical characterization of the long-term ageing of nitrogen-rich plasma polymer films under various ambient conditions, *Plasma Process. Polym.* 10 (2013) 388–395. doi:10.1002/ppap.201200118.
- [18] A. Chapiro, *Radiation chemistry of polymeric systems*, Michigan, 1962.
- [19] A. Gelover-Santiago, M.A. Fowler, J. Yip, J. Duhamel, G. Burillo, E. Rivera, Unexpected absorbance enhancement upon clustering dyes in a polymer matrix, *J. Phys. Chem. B.* 116 (2012) 6203–6214. doi:10.1021/jp208646b.



- [20] H.I. Meléndez-Ortiz, E. Bucio, G. Burillo, Radiation-grafting of 4-vinylpyridine and N-isopropylacrylamide onto polypropylene to give novel pH and thermo-sensitive films, *Radiat. Phys. Chem.* 78 (2009) 1–7. doi:10.1016/j.radphyschem.2008.08.003.
- [21] E. Zavala-Lagunes, J.C. Ruiz, G.H.C. Varca, E. Bucio, Synthesis and characterization of stimuli-responsive polypropylene containing N-vinylcaprolactam and N-vinylimidazole obtained by ionizing radiation, *Mater. Sci. Eng. C* 67 (2016) 353–361. doi:10.1016/j.msec.2016.05.044.
- [22] A. Martínez-Cocoletzi, J.C. Ruiz, E. Kasperek, A. Ortega, L. Garcia-Uriostegui, P.L. Girard-Lauriault, G. Burillo, Primary-amine surface functionalization of polytetrafluoroethylene films by radiation grafting of aminated polyacryloyl chloride, *Radiat. Phys. Chem.* 149 (2018) 65–72. doi:10.1016/j.radphyschem.2018.03.011.
- [23] H.J. Busscher, I. Stokroos, J.G. Golverdingen, J.M. Shakenraad, Adhesion and Spreading of Human Fibroblasts on Superhydrophobic FEP-Teflon, *Cells Mater.* 1 (1991) 243–249. <http://digitalcommons.usu.edu/cellsandmaterials><http://digitalcommons.usu.edu/cellsandmaterials/vol1/iss3/5>.
- [24] B. Baroli, Hydrogels for Tissue Engineering and Delivery of Tissue-Inducing Substances, 96 (2007) 2197–2223. doi:10.1002/jps.
- [25] J.D. Kretlow, L. Klouda, A.G. Mikos, Injectable matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering ☆, 59 (2007) 263–273. doi:10.1016/j.addr.2007.03.013.
- [26] H.J. Chung, T.G. Park, Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering ☆, 59 (2007) 249–262. doi:10.1016/j.addr.2007.03.015.
- [27] Z. Ma, Z. Mao, C. Gao, Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering, 60 (2007) 137–157. doi:10.1016/j.colsurfb.2007.06.019.
- [28] J. Fukuda, A. Khademhosseini, Y. Yeo, X. Yang, J. Yeh, G. Eng, J. Blumling, C. Wang, D.S. Kohane, R. Langer, Micromolding of photocrosslinkable chitosan hydrogel for spheroid microarray and co-cultures, 27 (2006) 5259–5267. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.05.044.



- [29] E. Zavala-lagunes, J. Ruiz, G.H.C. Varca, E. Bucio, Synthesis and characterization of stimuli-responsive polypropylene containing N -vinylcaprolactam and N -vinylimidazole obtained by ionizing radiation, *Mater. Sci. Eng. C.* 67 (2016) 353–361. doi:10.1016/j.msec.2016.05.044.
- [30] E. Bucio, G. Burillo, M.D.P. Carreón-Castro, T. Ogawa, Functionalization of polypropylene film by radiation grafting of acryloyl chloride and subsequent esterification with Disperse Red 1, *J. Appl. Polym. Sci.* 93 (2004) 172–178. doi:10.1002/app.20446.
- [31] E. Bucio, G. Cedillo, G. Burillo, T. Ogawa, Radiation-induced grafting of functional acrylic monomers onto polyethylene and polypropylene films using acryloyl chloride, *Polym. Bull.* 46 (2001) 115–121. doi:10.1007/s002890170096.
- [32] R. Aliev, M. Del Pilar Carreón-Castro, M. Rivera, G. Burillo, Immobilization of disperse red 1 on to polydiethyleneglycol-bis- allylcarbonate (CR-39) radiation grafted with poly(acryloyl chloride), *Polym. Bull.* 52 (2004) 73–82. doi:10.1007/s00289-004-0250-8.
- [33] C.C. Ferraz, G.H.C. Varca, J.C. Ruiz, P.S. Lopes, M.B. Mathor, A.B. Lugão, E. Bucio, Radiation-grafting of thermo- and pH-responsive poly(N-vinylcaprolactam-co-acrylic acid) onto silicone rubber and polypropylene films for biomedical purposes, *Radiat. Phys. Chem.* 97 (2014) 298–303. doi:10.1016/j.radphyschem.2013.12.027.
- [34] J.E. Wilson, *Radiation Chemistry of Monomers, Polymers and Plastics*, Marcel Dekker, INC., New York, USA., 1974.
- [35] M.R. Wertheimer, A. St-Georges-Robillard, S. Lerouge, F. Mwale, B. Elkin, C. Oehr, W. Wirges, R. Gerhard, Amine-rich organic thin films for cell culture: Possible electrostatic effects in cell-surface interactions, *Jpn. J. Appl. Phys.* 51 (2012) 1–5. doi:10.1143/JJAP.51.11PJ04.
- [36] R. Fèrch, A.N. Chifen, A. Bousquet, H.L. Khor, M. Jungblut, L.Q. Chu, Z. Zhang, I. Osey-Mensah, E.K. Sinner, W. Knoll, Recent and expected roles of plasma-polymerized films for biomedical applications, *Chem. Vap. Depos.* 13 (2007) 280–294. doi:10.1002/cvde.200604035.
- [37] F. Truica-Marasescu, P.L. Girard-Lauriault, A. Lippitz, W.E.S. Unger, M.R. Wertheimer, Nitrogen-rich plasma polymers: Comparison of films deposited in atmospheric- and low-pressure plasmas, *Thin Solid Films.* 516 (2008) 7406–7417.



- doi:10.1016/j.tsf.2008.02.033.
- [38] J.R. Hollahan, B.B. Stafford, R.D. Falb, S.T. Payne, Attachment of amino groups to polymer surfaces by radiofrequency plasmas, *J. Appl. Polym. Sci.* 13 (1969) 807–816. doi:10.1002/app.1969.070130419.
- [39] N.D.G. and R.M. Gaelle Aziz, Incorporation of Primary Amines via Plasma Technology on Biomaterials, *Intech.* 2 (2015) 21–47. doi:10.5772/63266.
- [40] B. Yameen, H.U. Khan, W. Knoll, R. Fo, U. Jonas, Surface Initiated Polymerization on Pulsed Plasma Deposited Polyallylamine: A Polymer Substrate-Independent Strategy to Soft Surfaces with Polymer Brushes, *Macromol. Rapid Commun.* (2011) 1735–1740. doi:10.1002/marc.201100368.
- [41] R. Nakamura, H. Murguruma, K. Ikebukuro, S. Sasaki, R. Nagata, A Plasma-Polymerized Film for Surface Plasmon Resonance Immunosensing, 69 (1997) 4649–4652. doi:10.1021/ac970571i.
- [42] P. Vermette, L. Meagher, Immobilization and Characterization of Poly (acrylic acid) Graft Layers, (2002) 10137–10145. doi:10.1021/la0202834.
- [43] L. Denis, P. Marsal, Y. Olivier, T. Godfroid, R. Lazzaroni, M. Hecq, J. Cornil, R. Snyders, Deposition of functional organic thin films by pulsed plasma polymerization: A joint theoretical and experimental study, *Plasma Process. Polym.* 7 (2010) 172–181. doi:10.1002/ppap.200900131.
- [44] A. Choukourov, H. Biederman, D. Slavinska, M. Trchova, A. Hollander, The influence of pulse parameters on film composition during pulsed plasma polymerization of diaminocyclohexane, *Surf. Coatings Technol.* (2003). doi:10.1016/S0257-8972(03)00575-9.
- [45] G. Irena, B. Jolanta, Z. Karolina, Chemical modification of poly(ethylene terephthalate) and immobilization of the selected enzymes on the modified film, *Appl. Surf. Sci.* (2009). doi:10.1016/j.apsusc.2009.05.126.
- [46] D.A. Puleo, R.A. Kissling, M.S. Sheu, A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), on titanium alloy, *Biomaterials.* (2002). doi:10.1016/S0142-9612(01)00339-8.
- [47] J.C. Ruiz, A. St-Georges-Robillard, C. Thérésy, S. Lerouge, M.R. Wertheimer, Fabrication and characterisation of amine-rich organic thin films: Focus on stability, *Plasma Process. Polym.* 7 (2010) 737–753. doi:10.1002/ppap.201000042.



- [48] R.J.W. and A.K. Pikaev, *Applied Radiation Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., USA, 1994.
- [49] J.G. Drobny, *Ionizing Radiation and Polymers. Principles, Technology and Applications*, Elsevier, MA, USA, 2013.
- [50] A. Chapiro, *Radiation chemistry of polymeric systems*, Interscience Publishers, London, England, 1962.
- [51] N. J, Cabrera L, *Introducción al estudio de los radioisótopos*, UNAM, Distrito Federal, 1993.
- [52] A. St-Georges-Robillard, J.C. Ruiz, A. Petit, H.T. Wang, F. Mwale, B. Elkin, C. Oehr, S. Lerouge, M.R. Wertheimer, Adhesion of U-937 monocytes on different amine-functionalised polymer surfaces, *Plasma Process. Polym.* 9 (2012) 243–252. doi:10.1002/ppap.201100128.
- [53] P.L. Girard-Lauriault, F. Mwale, M. Iordanova, C. Demers, P. Desjardins, M.R. Wertheimer, Atmospheric pressure deposition of micropatterned nitrogen-rich plasma-polymer films for tissue engineering, *Plasma Process. Polym.* 2 (2005) 263–270. doi:10.1002/ppap.200400092.
- [54] P. Hamerli, T. Weigel, T. Groth, D. Paul, Surface properties of and cell adhesion onto allylamine-plasma-coated polyethyleneterephthalat membranes, *Biomaterials.* 24 (2003) 3989–3999. doi:10.1016/S0142-9612(03)00312-0.
- [55] P. Rossini, P. Colpo, G. Ceccone, K.D. Jandt, F. Rossi, Surfaces engineering of polymeric films for biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 23 (2003) 353–358. doi:10.1016/S0928-4931(02)00286-2.
- [56] Jin Ho Lee, Jong Woo Park, Hai Bang Lee, Cell adhesion and growth on polymer surfaces with hydroxyl groups prepared by water vapour plasma treatment, *Biomaterials.* (1991). doi:10.1016/0142-9612(91)90140-6.
- [57] I. Gancarz, G. Poźniak, M. Bryjak, W. Tylus, Modification of polysulfone membranes 5. Effect of n-butylamine and allylamine plasma, *Eur. Polym. J.* 38 (2002) 1937–1946. doi:10.1016/S0014-3057(02)00093-9.
- [58] Z. Zha, Y. Ma, X. Yue, M. Liu, Z. Dai, Self-assembled hemocompatible coating on poly (vinyl chloride) surface, *Appl. Surf. Sci.* 256 (2009) 805–814. doi:10.1016/j.apsusc.2009.08.065.
- [59] C.D. Tidwell, S.I. Ertel, B.D. Ratner, B.J. Tarasevich, S. Atre, D.L. Allara,



- Endothelial cell growth and protein adsorption on terminally functionalized, self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold, *Langmuir*. 13 (1997) 3404–3413. doi:10.1021/la9604341.
- [60] E. Rodríguez-alba, L. Huerta, A. Ortega, G. Burillo, Surface Modification of Polypropylene with Primary Amines by Acrylamide Radiation Grafting and Hofmann’s Transposition Reaction, (2019) 7759–7765. doi:10.1002/slct.201901473.
- [61] C.A. Scotchford, C.P. Gilmore, E. Cooper, G.J. Leggett, S. Downes, Protein adsorption and human osteoblast-like cell attachment and growth on alkylthiol on gold self-assembled monolayers, *J. Biomed. Mater. Res.* 59 (2002) 84–99. doi:10.1002/jbm.1220.
- [62] J. Malda, C.A. Van Blitterswijk, M. Grojec, D.E. Martens, J. Tramper, J. Riesle, Expansion of bovine chondrocytes on microcarriers enhances redifferentiation, *Tissue Eng.* 9 (2003) 939–948. doi:10.1089/107632703322495583.
- [63] J. Malda, E. Kreijveld, J.S. Temenoff, C.A. Van Blitterswijk, J. Riesle, Expansion of human nasal chondrocytes on macroporous microcarriers enhances redifferentiation, *Biomaterials*. 24 (2003) 5153–5161. doi:10.1016/S0142-9612(03)00428-9.
- [64] J.M. Goddard, J.H. Hotchkiss, Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds, *Prog. Polym. Sci.* (2007). doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.04.002.
- [65] Y.P. Jiao, F.Z. Cui, Surface modification of polyester biomaterials for tissue engineering, *Biomed. Mater.* 2 (2007). doi:10.1088/1748-6041/2/4/R02.
- [66] L. Bech, T. Meylheuc, B. Lepoittevin, P. Roger, Chemical surface modification of poly(ethylene terephthalate) fibers by aminolysis and grafting of carbohydrates, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 45 (2007) 2172–2183. doi:10.1002/pola.21983.
- [67] W.D. Dominick, B.T. Berhane, J.S. Mecomber, P.A. Limbach, Covalent immobilization of proteases and nucleases to poly(methylmethacrylate), *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 349–354. doi:10.1007/s00216-003-1923-0.
- [68] C. Boucher, J.C. Ruiz, M. Thibault, M.D. Buschmann, M.R. Wertheimer, M. Jolicoeur, Y. Durocher, G. De Crescenzo, Human corneal epithelial cell response to epidermal growth factor tethered via coiled-coil interactions, *Biomaterials*. 31 (2010) 7021–7031. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.05.072.



- [69] A. Papra, H.G. Hicke, D. Paul, Synthesis of peptides onto the surface of poly(ethylene terephthalate) particle track membranes, *J. Appl. Polym. Sci.* 74 (1999) 1669–1674. doi:10.1002/(SICI)1097-4628(19991114)74:7<1669::AID-APP9>3.0.CO;2-W.
- [70] X.S. Jiang, C. Chai, Y. Zhang, R.X. Zhuo, H.Q. Mao, K.W. Leong, Surface-immobilization of adhesion peptides on substrate for ex vivo expansion of cryopreserved umbilical cord blood CD34+ cells, *Biomaterials.* (2006). doi:10.1016/j.biomaterials.2005.12.001.
- [71] P.L. Girard-Lauriault, P. Dietrich, T. Gross, W.E.S. Unger, Is quantitative chemical derivatization XPS of plasma deposited organic coatings a valid analytical procedure?, *Surf. Interface Anal.* 44 (2012) 1135–1140. doi:10.1002/sia.4947.
- [72] S. Noel, B. Liberelle, L. Robitaille, G. De Crescenzo, Quantification of primary amine groups available for subsequent biofunctionalization of polymer surfaces, *Bioconjug. Chem.* 22 (2011) 1690–1699. doi:10.1021/bc200259c.
- [73] E. Yegen, U. Zimmermann, W.E.S. Unger, T. Braun, C-F bond cleavage during derivatization reactions of amino groups with TFBA and PFB at plasma-processed organic surfaces?, *Plasma Process. Polym.* 6 (2009) 11–16. doi:10.1002/ppap.200800100.
- [74] P. Díaz-Rodríguez, P. González, J. Serra, M. Landin, Key parameters in blood-surface interactions of 3D bioinspired ceramic materials, *Mater. Sci. Eng. C.* 41 (2014) 232–239. doi:10.1016/j.msec.2014.04.058.
- [75] S. Sikandar Shah, I. Ahmad, M. Ishaq, Degradation study of used polystyrene with UV irradiation, *Res. Artic. Adv. Mater. Sci. Adv Mater Sci.* 2 (2017) 1–6. doi:10.15761/AMS.1000130.
- [76] D.P. Gaspar, V. Faria, L.M.D. Gonçalves, P. Taboada, C. Remuñán-López, A.J. Almeida, Rifabutin-loaded solid lipid nanoparticles for inhaled antitubercular therapy: Physicochemical and in vitro studies, *Int. J. Pharm.* 497 (2016) 199–209. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.11.050.
- [77] S. Swaraj, U. Oran, A. Lippitz, J.F. Friedrich, W.E.S. Unger, Aging of plasma-deposited films prepared from organic monomers, *Plasma Process. Polym.* 4 (2007) 784–789. doi:10.1002/ppap.200731905.
- [78] C. Dispenza, M.A. Sabatino, N. Deghiedy, M.P. Casaletto, G. Spadaro, S. Piazza,



- H.A. Abd El-Rehim, In-situ polymerization of polyaniline in radiation functionalized polypropylene films, *Polym. (United Kingdom)*. 67 (2015) 128–138. doi:10.1016/j.polymer.2015.04.038.
- [79] L.C.S. Nunes, F.W.R. Dias, H.S. Da Costa Mattos, Mechanical behavior of polytetrafluoroethylene in tensile loading under different strain rates, *Polym. Test.* 30 (2011) 791–796. doi:10.1016/j.polymertesting.2011.07.004.
- [80] Malcom P. Stevens, *Polymer Chemistry an Introduction*, Third Edit, OXFORD University Press, 1998.
- [81] G.B. and D. Briggs, High resolution XPS of organic polymers: the scienta ESCA300 database, Wiley. 62 (1993) 278. doi:10.1016/0368-2048(93)85006-7.
- [82] Y. Akishev, M. Grushin, N. Dyatko, I. Kochetov, A. Napartovich, N. Trushkin, T. Minh Duc, S. Descours, Studies on cold plasma-polymer surface interaction by example of PP- and PET-films, *J. Phys. D. Appl. Phys.* 41 (2008). doi:10.1088/0022-3727/41/23/235203.
- [83] R. Morent, N. De Geyter, C. Leys, L. Gengembre, E. Payen, Comparison between XPS- And FTIR-analysis of plasma-treated polypropylene film surfaces, *Surf. Interface Anal.* 40 (2008) 597–600. doi:10.1002/sia.2619.
- [84] R. Dorai, M.J. Kushner, A model for plasma modification of polypropylene using atmospheric pressure discharges, *J. Phys. D. Appl. Phys.* 36 (2003) 666–685. doi:10.1088/0022-3727/36/6/309.
- [85] B. Couturaud, A.M. Bondia, C. Faye, L. Garrelly, A. Mas, J.J. Robin, Grafting of poly-L-lysine dendrigrafts onto polypropylene surface using plasma activation for ATP immobilization - Nanomaterial for potential applications in biotechnology, *J. Colloid Interface Sci.* 408 (2013) 242–251. doi:10.1016/j.jcis.2013.06.065.
- [86] C.P. Klages, Z. Khosravi, A. Hinze, Some remarks on chemical derivatization of polymer surfaces after exposure to nitrogen-containing plasmas, *Plasma Process. Polym.* 10 (2013) 307–312. doi:10.1002/ppap.201200142.
- [87] K.S. Siow, L. Britcher, S. Kumar, H.J. Griesser, Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization - A review, *Plasma Process. Polym.* 3 (2006) 392–418. doi:10.1002/ppap.200600021.
- [88] M.I. Jones, I.R. McColl, D.M. Grant, K.G. Parker, T.L. Parker, Protein



- adsorption and platelet attachment and activation, on TiN, TiC, and DLC coatings on titanium for cardiovascular applications, *J. Biomed. Mater. Res.* 52 (2000) 413–421. doi:10.1002/1097-4636(200011)52:2<413::AID-JBM23>3.0.CO;2-U.
- [89] S. Ramakrishna, J. Mayer, E. Wintermantel, K.W. Leong, Biomedical applications of polymer-composite materials: a review, *Compos. Sci. Technol.* 61 (2001) 1189–1224. doi:10.1016/S0266-3538(00)00241-4.
- [90] C.J. Nonckreman, S. Fleith, P.G. Rouxhet, C.C. Dupont-Gillain, Competitive adsorption of fibrinogen and albumin and blood platelet adhesion on surfaces modified with nanoparticles and/or PEO, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 77 (2010) 139–149. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.01.014.
- [91] E.J. Brown, Integrins of Macrophages and Macrophage-Like Cells, in: *Macrophages as Ther. Target*, Springer, San Francisco, CA. USA, 2003: pp. 111–130. doi:10.1007/978-3-642-55742-2_7.
- [92] A. Naji, M. -F Harmand, Study of the effect of the surface state on the cytocompatibility of a Co-Cr alloy using human osteoblasts and fibroblasts, *J. Biomed. Mater. Res.* 24 (1990) 861–871. doi:10.1002/jbm.820240706.
- [93] L.B. Smilenov, A. Mikhailov, R.J. Pelham, E.E. Marcantonio, G.G. Gundersen, Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts, *Science* (80-.). 286 (1999) 1172–1174. doi:10.1126/science.286.5442.1172.
- [94] S. Becker, E.G. Daniel, Antagonistic and additive effects of IL-4 and Interferon- γ on human monocytes and macrophages: Effects on Fc receptors, HLA-D antigens, and superoxide production, *Cell. Immunol.* 129 (1990) 351–362. doi:10.1016/0008-8749(90)90211-9.
- [95] J. Kzhyshkowska, A. Gudima, V. Riabov, C. Dollinger, P. Lavallo, N.E. Vrana, Macrophage responses to implants: prospects for personalized medicine, *J. Leukoc. Biol.* 98 (2015) 953–962. doi:10.1189/jlb.5VMR0415-166R.
- [96] S. Thirkettle, J. Decock, H. Arnold, C.J. Pennington, D.M. Jaworski, D.R. Edwards, Matrix metalloproteinase 8 (collagenase 2) induces the expression of interleukins 6 and 8 in breast cancer cells, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 16282–16294. doi:10.1074/jbc.M113.464230.
- [97] N. Grotenhuis, H.F.E. Vd Toom, N. Kops, Y. Bayon, E.B. Deerenberg, I.M. Mulder, G.J.V.M. Van Osch, J.F. Lange, Y.M. Bastiaansen-Jenniskens, In vitro



model to study the biomaterial-dependent reaction of macrophages in an inflammatory environment, *Br. J. Surg.* 101 (2014) 983–992. doi:10.1002/bjs.9523.



Amine modifications of polypropylene films by gamma radiation to be applied in cell cultures

M. Pérez-Calixto, Departamento de Química de Radiaciones y Radioquímica, Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad, Ciudad de México 04510, México

L. Huerta, Departamento de materiales de baja dimensionalidad, Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-360, Ciudad de México 04510, México

G. Burillo, Departamento de Química de Radiaciones y Radioquímica, Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad, Ciudad de México 04510, México

Address all correspondence to G. Burillo at burillo@nucleares.unam.mx

(Received 29 July 2019; accepted 13 September 2019)

Abstract

Development of biomaterials with primary amine surfaces is very important for the study of some cells of the immune system such as macrophages. Currently, the modification can be carried out by physical or chemical methods with several disadvantages due to the presence of additives or subproducts in the system. To overcome this problem, modified polypropylene (PP) films were synthesized by gamma radiation. In this work, radiation grafting of acryloyl chloride onto PP has been employed to form an acyl chloride. Then, the radiation-grafted films were reacted with ethylenediamine in several solvents to obtain the different concentration of the primary amine. The surface amine concentration was determined by derivatization with 4-trifluoromethyl benzaldehyde and characterized by x-ray photoelectron spectroscopy (N/C ratios), Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflection, contact angle, scanning electron microscopy, atomic force microscopy, and elementary analysis. The stability of the amines was measured up to 90 days, without the occurrence of aging as was found by plasma modification.

Introduction

Even though many of the tissues and organs have the capacity to self-repair, sometimes injuries exceed their capacity. Hence, the field of tissue engineering has emerged in order to repair the damage or replace missing tissues. Some of those materials used for this purpose are named biomaterials due to their ability to interact with biological systems. They are usually employed in medical applications to enhance or replace a natural function.

The success of the biomaterials depends on different factors that affect the response of the surface of the material to the surrounding environment. In recent years, numerous investigations have been performed to modify surfaces for promoting cell adhesion and proliferation to maintain cellular functions, including adhesion, spreading, migration, and differentiation.^[1–5] It is well known that most cells cannot adhere to hydrophobic surfaces; however, modified hydrophobic surfaces facilitate their adhesion, especially those rich in nitrogen.

There has been a substantial research effort regarding the influence of several functional groups on cell functions.^[1,3,5–9] It has been demonstrated that those surfaces rich in nitrogen, especially primary and second amines, compared with those modified with oxygen, facilitated cell adhesion of macrophages, myoblast, and mesenchymal stem cells, allowing the development of their functions.

Amino groups have been associated with positive charges that are able to attract negatively charged biomolecules (proteins, DNA) and thus living cells in aqueous solutions at a physiological pH. The most common method to incorporate functional groups on polymeric materials is by a plasma technique, but these synthesized systems present some disadvantages, such as partial solubility in water and formation of a substantial amount of free radicals, which cause the incorporation of oxygen (aging) when in contact with air. Moreover, the final chemistry of the surfaces is complex and difficult to define and depends on the type of gas and the discharge conditions used.^[10–12] Therefore, the synthesis of the grafting monomers via gamma radiation with functional groups that can react and form primary, secondary amines, or derivatives on the surface is more appropriate.^[13,14]

In this work, the synthesis was realized in two steps: a radiation grafting direct method of acryloyl chloride (AC, Sigma-Aldrich, USA) onto polypropylene (PP) films has been applied to insert acyl functionalities, and then, the radiation-grafted films were reacted with ethylenediamine (ED). Amine concentration was determined immediately after being synthesized and after a period of time. The effect of aging on the amine functional groups was determined by x-ray photoelectron spectroscopy (XPS, VersaProbe II from Japan) after derivatization with 4-trifluoromethyl benzaldehyde (TFBA).



The functional groups present in the samples were studied by XPS, elemental analysis (EA), and Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflection (FTIR-ATR). The change in hydrophobicity was measured by the contact angle, while morphology was measured by atomic force microscopy (AFM, Nanosurf model NaioAFM equipment, Liestal, Switzerland) and scanning electron microscopy (SEM).

Experimental section

Chemicals and reagents

PP films purchased from Goodfellow (Huntington, UK), of 0.1 mm thickness and were cut into pieces measuring 1×5 cm, washed with methanol (analytic grade) for 2 h and dried at reduced pressure during 4 h and 40 °C temperature. AC (97%) supplied by Sigma-Aldrich Co., was distilled at reduced pressure, and anhydrous methanol (99.8%), TFBA, ED (96%), and triethylamine were acquired from Sigma-Aldrich, USA and were used as acquired. Tetrahydrofuran (THF) and *N,N*-dimethylformamide (DMF) (JT Baker, Mexico City, Mexico) were distilled before use, and dichloromethane (DCM, CH_2Cl_2) was distilled and stored over CaCl_2 .

Radiation grafting by the direct method

Films were grafted with AC by the direct method. Briefly, two films were weighed and introduced in separated glass ampoules, and a solution of 30% v/v of AC in toluene were added until the film was completely covered (6 mL). Subsequently, degassing of the ampoules was carried out with freeze/thaw cycles with liquid nitrogen and then sealed and irradiated at dose from 1 to 6 kGy with a doses rate of $I = 5.5$ kGy/h, using a ^{60}Co γ -source (Gammabeam 651 PT, MDS Nordion, Canada), at room temperature. After, grafted films were washed with DCM for 24 h (changing the solvent every 12 h) to remove any homopolymer formed during irradiation.

Reaction grafting of AC by gamma radiation is shown in Fig. 1(a).

Finally, one grafted film was reacted with methanol (reference film), in order to determine the percent yield of grafting, and the other one was reacted with ED.

Alcoholysis reaction (esterification)

The reference film was immediately placed in anhydrous methanol for 24 h under constant stirring to carry out the corresponding esterification and thus obtain the methacrylate compound (PP-g-MA). To avoid the reversibility of the reaction and neutralize the HCl formed, triethylamine was added. The reference film was only used to calculate the percent of AC grafted because AC is an unstable functional group and difficult to handle due to reactivity with humidity of the environment, resulting in hydrolysis of AC. Since the weight of the methoxy group (31 g/mol) is similar to that of the chloride group (35.5 g/mol), it is possible to obtain an approximate calculation of the grafting percent. To determine the percent of

grafting, the following equation was used:

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

where W_o and W_g are the weight of the film before and after being grafted, respectively.

The reaction is shown in Fig. 1(b).

Aminolysis reaction

To carry out the aminolysis reaction, the second film was placed in a solution of 2 M diamine in different solvents such as DCM, DMF, and THF. Triethylamine was added to avoid reaction reversibility. ED was used for this reaction. It was kept under constant stirring for 0.5, 1, 2, 6, 18, and 24 h at room temperature. The aminated film was washed with distilled water and then was dried under in a vacuum oven at 50 °C for 6 h. The film was named with the acronym of the diamine in parentheses, PP-g-AC(ED). The reaction is shown in Fig. 1(c).

Characterization

FTIR-ATR

Physicochemical properties of unmodified and modified films were determined by infrared spectra using an FTIR-ATR equipment. Spectra were recorded with a Perkin-Elmer Spectrum 100 spectrometer (Perkin-Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT, USA).

Contact angle measurements

Contact angle measurements were carried out in triplicate, at room temperature (23 °C), using a KRÜSS DSA 100 apparatus (Mathews, NC, USA). Small drops of water were deposited on the surface of the pristine material (PP) and functionalized films (PP-g-AC(ED)). The contact angle was measured immediately after depositing the drop of water.

Determination of roughness of the films by AFM

Characterization of surface roughness by AFM was performed on a Nanosurf model NaioAFM equipment. It was measured, on a scale of 10 μm , in two different regions per sample, in contact mode. The tip used was a Budget Sensors ContAl-G tip.

Scanning electron microscopy

Surface and cross-sectional morphology of the films were observed in a Tescan Mira 3 LMU at different scales. The dried samples were coated with Au under vacuum for 10 s, using a sputter coating of the SPI module.

X-ray photoelectron spectroscopy

XPS analyses were performed in an ultrahigh vacuum (UHV) system Scanning XPS microprobe PHI 5000 VersaProbe II, with an Al K_{α} x-ray source ($h\nu = 1486.6$ eV) monochromatic with a 100 μm beam diameter, and an MCD analyzer. The surface of the samples was not etched. The XPS spectra were obtained at 45° to the normal surface in the constant pass energy mode (CAE) $E_0 = 117.40$ and 11.75 eV survey surface

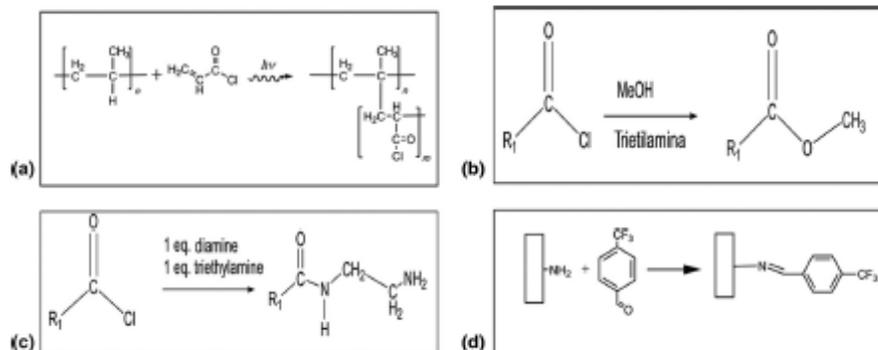


Figure 1. (a) Reaction of AC grafted onto PP; (b) alcoholysis reaction of AC with methanol to obtain a methacrylate; (c) aminolysis reaction with ED; and (d) chemical derivatization with TFBA.

and high-resolution narrow scan. The peak positions were referenced to the background silver $3d_{5/2}$ photopeak at 368.20 eV, having a full width at half maximum of 0.56 eV, and C1s hydrocarbon groups at 285.00 eV.

Chemical derivatization with TFBA. To know the amount of primary amines on the surface and determine if there is oxidation with time, chemical derivatization was carried out. A method, that is, normally used for chemical derivatization, is a selective reaction of a primary amine with TFBA. The scheme of reaction is shown in Fig. 1(d).^[14–16] The percent of primary amines was deduced from the concentration group's fluorine (CF₃) on the surface by using the XPS technique. The reaction was performed as a gas phase at 40 °C for 4 h. Functionalized films were hung up inside a flask over a bed of 1 cm thick glass beads, and then, 0.5 mL of TFBA was added to the glass beads, avoiding direct contact of the sample. The flask was closed and allowed to react. The proportion of amines on the surface can be calculated with the following equations according to Girard-Lauriault:^[15]

$$[\text{NH}_2]_N = \frac{I_{\text{F}1s,\text{D}}/3\text{ASF}_{\text{F}1s}}{I_{\text{N}1s,\text{D}}/\text{RSF}_{\text{N}1s}} \quad (2)$$

$$[\text{NH}_2]_C = \left(\frac{I_{\text{F}1s,\text{D}}/3\text{ASF}_{\text{F}1s}}{I_{\text{C}1s,\text{D}}/\text{ASF}_{\text{C}1s}} \right) \left(\frac{I_{\text{N}1s,\text{ND}}}{I_{\text{N}1s,\text{D}}} \right) \quad (3)$$

$$[\text{NH}_2]_T = \left[\frac{I_{\text{F}1s,\text{D}}/3\text{ASF}_{\text{F}1s}}{I_{\text{C}1s,\text{ND}}/\text{ASF}_{\text{C}1s} + I_{\text{N}1s,\text{ND}}/\text{ASF}_{\text{N}1s} + I_{\text{O}1s,\text{ND}}/\text{ASF}_{\text{O}1s}} \right] \left(\frac{I_{\text{N}1s,\text{ND}}}{I_{\text{N}1s,\text{D}}} \right) \quad (4)$$

where I is the intensities or area of photoelectron peaks of each element, of derivatized groups, D, and nonderivatized groups, ND. ASF is the sensitivity factor of each element.

Elemental analysis

Functionalized films were analyzed by EA to determine their percent of carbon, hydrogen, and nitrogen of the whole sample.

Results and discussion

Grafting of AC onto PP

AC was grafted onto PP using the direct method because it produced better grafting yield.^[17,18] Figure 2(a) shows an increase of grafting as a function of dose. Doses up to 6 kGy lead the formation of a great amount of homopolymer; hence, solution's viscosity increased, decreasing mobility of the macro radicals, diffusion of the monomer in the system and thus diminishing the amount of grafted AC.

The grafting percent of AC onto PP was measured gravimetrically [Eq. (1)] by an indirect method through esterification with methanol because of the high reactivity and easy decomposition of the acyl chloride group.^[19]

Aminolysis reaction

To introduce amine groups on surfaces, films that were 14% and 24% of grafting (3 and 6 kGy) were chosen to determine the suitable grafting percent for this reaction.

The reaction between ED and AC could cause crosslinking because the two amine groups of ED react with the acyl groups of the two polymer chains. To perform this reaction, it is

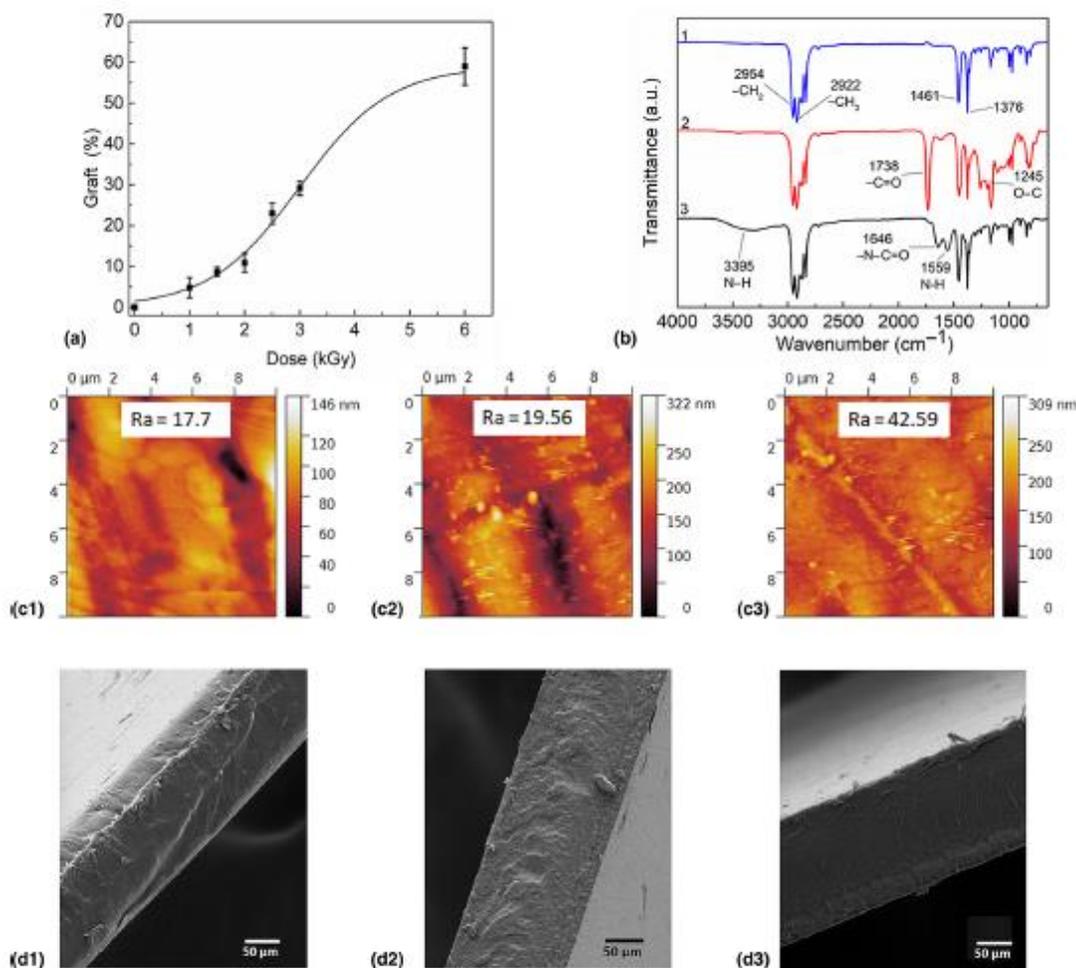


Figure 2. (a) Grafting (%) of AC on PP films as a function of dose. [AC]: 30% v/v in toluene. t : 4.16 kGy/h. (b) FTIR of different systems: (1) PP film, (2) PP-g-AM, and (3) PP-g-AC(ED). (c) AFM surface roughness value by AFM of (c1) PP film, (c2) PP-g-C(ED)_{0.54%}, (c3) PP-g-AC(ED)_{0.24%}, and (d) SEM micrographs of cross section of (d1) PP, (d2) PP-g-AC(ED)_{0.54%}, and (d3) PP-g-AC(ED)_{0.24%}.

necessary to control some factors such as the time of reaction and grafting percent of AC.

The reaction time was tested, and it was found that 30 min was sufficient to react with the amine groups, with the chloride group; for longer times, the reaction yield was the same.

The solvent was another factor that was studied. Three different solvents were chosen to carry out the reaction: DCM, DMF, and THF. The best results were obtained using THF. Films in which DCM was used showed unfavorable yields, regardless of the amount of monomer graft. On the other hand, it is well known that DMF is a good solvent for substitution reactions; however, it is difficult to remove from the samples. Consequently, these two solvents were not used to carry out the reaction.

A low grafting percent was chosen because only a small amount of primary amine demonstrated a change related to hydrophilicity; moreover, it is suitable for cell adhesion.^[19,20] Films with a higher grafting percent did not experience modification of their hydrophobicity (see section “Contact angle measurements” under “Characterization”).

Characterization

FTIR-ATR

FTIR-ATR spectra [Fig. 2(b)] confirmed the grafting of AC and esterification with methanol onto PP. The PP film [Fig. 2(b1)] showed two bands at 2922 and 2954 cm^{-1} , corresponding to asymmetric and symmetric methyl (CH_3) and methylene

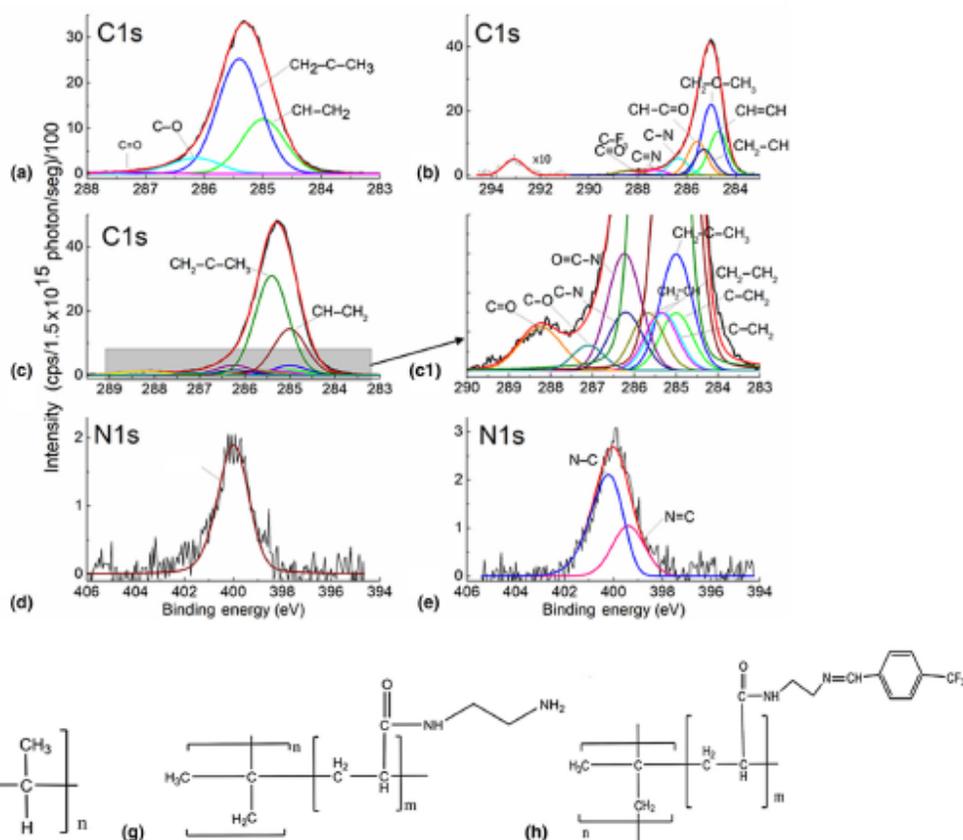


Figure 3. High-resolution XPS core level spectra deconvoluted of C1s: (a) PP film, (b) PP-g-AC(ED)+ TFBA, (c) PP-g-AC(ED), and (c1) amplification of PP-g-AC(ED). N1s contributions of (d) PP-g-AC(ED) and (e) PP-g-AC(ED)+ TFBA. Structures of (f) PP, (g) PP-g-AC(ED), and (h) PP-g-AC(ED)+ TFBA.

(CH₂) stretch, respectively. Two bands at 1376 and 1461 cm⁻¹ belong to asymmetric bending of CH₂ and CH₃, respectively. The system PP-g-AM showed a new band at 1738 cm⁻¹, which is attributed to C=O stretching ester vibration [Fig. 2 (b2)]. The modified system with ED [Fig. 2(b3)] showed a band associated with amine groups at 3395 cm⁻¹, a single band corresponding to secondary amines (instead of double or primary); further, two bands at 1646 and 1559 cm⁻¹ correspond to C=O stretching and N-H bending vibrations of the amide group, respectively.

Contact angle measurements

The contact angle (θ) of pristine PP was $91.1^\circ \pm 0.29$, showing its hydrophobic characteristics. This value decreased to $73.4^\circ \pm 1.32$ when it was modified with 14% grafted films, due to amine groups were introduced to the structure and hydrogen bonds formed between water and amines group. On the other hand, higher grafting yield (24%) leads to an angle rising to

$88.2^\circ \pm 1.37$, likely for an increase in hydrocarbon density (weight) on PP surface.^[21]

Determination of roughness by AFM and SEM analysis of the films

Engler et al.^[22] have demonstrated the importance of changing the topography on the surface for cell adhesion, they showed an improvement of cell adhesion when the roughness increased. This change can be studied by means of AFM.

Figures 2(c1)–2(c3) show the different roughness between modified and unmodified films. Darker areas represent depressions, whilst brighter areas mean ridges on the surface. Roughness average (Ra) of the PP [Fig. 2(c1)] was 17.7 that can be observed a relatively smooth and flatter surface. PP-g-AC(ED)_{g-24%} exhibited the highest Ra. Samples with 14% of grafting showed slightly increased regard to PP films. Introduction of branches on the backbone chain of lead to increment to roughness.



TABLE I. XPS surface distribution of carbon and nitrogen species resulting from the curve-fitting of the corresponding photoelectron peaks for PP-g-AC(ED)_{14/24%}.

System	C1s				N1s			
	Bond	eV	at.% ^a	at rel.% ^b	Bond	eV	at.% ^a	at rel.% ^b
PP	CH-CH₂	285	28.8	12.1	–	–	–	–
	CH ₂ - CH-CH₃	285.4	60.5	25.5				
	C-O	286.14	9.7	4.1				
	C=O	287.3	1	0.4				
PP-g-AC(ED)	C-CH₂	285	2.4	1.167	N-C	399.95	100	30.6
	CH ₂ - C-CH₃	285	4.8	2.3				
	CH ₂ - C=O	285.3	2.4	1.2				
	CH ₂ - CH₂	285.37	2.4	1.2				
	C=O	288.24	2.4	1.2				
	CH ₂ - CH	285.68	2.4	1.2				
	C-N	286.24	2.6	1.3				
	N-C=O	285	5.1	2.5				
	CH-CH₂	285.4	23.6	11.5				
	CH ₂ - CH-CH₃	287.1	50.8	24.7				
	C-O	287.1	1	0.5				
PP-g-AC(ED) + TFBA	CH=CH	284.7	22.4	9.4	N=C	399.39	32.6	8.7
	CH ₂ - C-CH₃	285	34.7	14.6	N-C	400.21	67.4	17.9
	C-N	286.33	8.3	3.5				
	C=N	287.3	2.7	1.1				
	CH-C=O	285.58	16.6	6.9				
	C=O	288.58	2.6	1.1				
	CH₂-CH	285.3	12.6	5.3				
	C-F₃	293	1	0.4				

Bold text is pointing out the main carbon, which the energy bond refers.

^aContribution percents of carbon and nitrogen bonds at core level peak.

^bChemical state percent relative to total concentration, using atomic sensitivity factor (ASF) of C1s= 0.314, N1s=0.499, F1s= 1.000, and O1s= 0.733.

Cross-sectional SEM images are shown in Figs. 2(d1)–2(d3). Cross-sectional morphologies of PP and PP-g-AC modified with ethylenediamines (PP-g-AC(ED)) with 14% and 24% grafted films were investigated.

Pristine films of PP [Fig. 2(d1)] show a compact and smooth surface, with a thickness of $76.9 \pm 2.9 \mu\text{m}$. Figures 2(d2) and 2(d3) show an increased thickness of 120.4 ± 3.65 at 14% graft and $123.4 \pm 2.77 \mu\text{m}$ at 24% graft, respectively. Figure 2(d3) displays a roughness surface, different from the homogeneous smooth surface of pristine PP, as a result of the addition of the larger groups of the ED in the system, and the interactions

between the amine and carbonyl groups, because the grafting was performed in both bulk and surface. Figure 2(d2) with 14% graft shows a lower roughness structure than films grafted at 24% because of a crosslinking structure from the reaction of the primary amine groups of the ED with the acyl groups.

XPS characterization of functionalized PP surfaces

The systems modified were chemically characterized by an XPS technique. The high-resolution spectra are shown in Fig. 3 and the binding energy (BE) of functional groups in



Table I. Figure 3(a) shows C1s core level of PP films without functionalizing, with both peaks corresponding to the structure of PP CH₂-CH₂ (BE=285.0 eV), CH₂-CH-CH₃ (0.4 eV shift, in 285.40 eV).^[23] The presence of other contributions to C1s core level as the peak C-O at 286.14 eV and C=O at 287.30 eV in pristine PP substrate film could be from plasticizers or other additives added during the film production.^[24-27] After the modification of the PP surface, additional peak contributions are observed due to the new chemical structure grafted [Fig. 3(c)]. For the sake of clarity, an enlargement is shown in the right side of Fig. 3(c). The new peak of C1s core level corresponding to C-N is found in BE = 286.21 eV, and the peak of amide (O=C-N) is at 286.24 eV. These results clearly show the presence of nitrogen and the formation of the C-N bond in the new structure, which is confirmed in the high-resolution spectrum of N1s core level [Fig. 3(d)] on 399.95 eV corresponding to the C-NH₂ bond. It can be noted that the peak of C=O [Fig. 3(c)] increased its proportion regarding PP pristine (Table I) because of the new grafted structure [Fig. 3(g)].

Because other functional groups with nitrogen such as amides could exist on the surface, chemical derivatization with TFBA was performed. Since this selective reaction has been widely studied, it will not be explained in detailed equations [Eq. (2)].^[12,14-16] The amount of amines can be known by measuring the fluorine element in the new structure [Fig. 3(h)]. In its C1s spectrum, the C-F bond on 293.07 eV is observed in Fig. 3(b). In the same way, other contributions appear localized in BE = 287.30 eV, corresponding to the C-N bond, and the amide bond (C=N) that are formed by the binding of C=O of TFBA with a primary amine. Figure 3(e) shows nitrogen of the reaction of ED with TFBA. Two species of nitrogen can be observed, a single bond to carbon (400.21 eV) and a double bond at 399.39 eV. Derivatization of primary amines with TFBA yielded for films PP-g-AC(ED)_{g24%} [NH₂]_N=12.3%, while [NH₂]_C is close to 0.8; while PP-g-AC(ED)_{g14%} [NH₂]_N=49% and [NH₂]_C=1.6. This evidence indicates that secondary amines are present in a higher content than primary amines due to the reaction of the carbonyl group of AC and a free amine of ED to form amide groups.^[21] The lessening in the percentage of total primary amines in the highest value of grafting can be due to modification was carried out also in the bulk and cannot be measured by XPS; besides, higher grafting yield (AC), rising the possible reactions between the two free amines of ED and the acyl groups of polymer chains, as it was demonstrated.

Stability in air. According to some authors,^[1,5,10,28] when the plasma technique is used for polymerization, the newly synthesized material can incorporate oxygen when it is coming into contact with air; this can lead to the formation of new reactive species that react with functional groups present on the surface. To evaluate whether functionalized films by gamma radiation occurred by the same phenomenon, a test of stability was performed: functionalized films were exposed at room temperature in darkness condition for 90 days.

Supplementary Table S1 shows elemental compositions by XPS at 0 and 90 days in the survey spectra. The atomic percentage of most elements was not modified after 90 days. Changes are not meant for its environmental stability. An increase of oxygen from 12.6% to 15.6% after 90 days was accompanied by a slight decrease of nitrogen (11.9%–10.1%) and disappearance of 0.4% of Cl; this change can be attributed to a small quantity of amine groups that were converted into imides or oximes^[5,10] due to environment.

Conclusions

It is possible to modify the surfaces of PP films with ED by the technique of gamma radiation (the direct method), by different steps of synthesis, PP irradiation, and AC grafting and further reaction with ED. The modified system was characterized, and it confirmed the grafting reaction. Films with less than 24% grafting improved their hydrophilicity, a desirable property for cell adhesion. XPS chemical derivatization indicated a higher content of secondary amines than primary amines due to a reaction between functional groups. The concentration of primary amines on the surface with regard to total nitrogen was 12.3% and 49% for PP-g-AC(ED)_{24%} and PP-g-AC(ED)_{14%}, respectively. The stability of ED grafted on PP under environmental conditions was 90 days without presenting "aging". The proposed synthetic technique has promising applications for cell adhesion, without presenting the disadvantages of modification by plasma deposition with less stability of primary amines in about 1 week.

Supplementary material

The supplementary material for this article can be found at <https://doi.org/10.1557/mrc.2019.133>.

Acknowledgments

The authors thank A. Ortega, F. Garcia, and B. Leal from ICN UNAM, A. Lopez-Vivas and A. Pompa from IIM-UNAM for technical support, and Yasab Ruiz Hernández from LaNSBioDyT for supporting in measurements of AFM and DGAPA UNAM, Grant No. IN200116 for financial support.

References

1. P.L. Girard-Lauriault, F. Truica-Marasescu, A. Petit, H.T. Wang, P. Desjardins, J. Antoniou, F. Mwale, and M.R. Wertheimer: Adhesion of human U937 monocytes to nitrogen-rich organic thin films: novel insights into the mechanism of cellular adhesion. *Macromol. Biosci.* **9**, 911 (2009).
2. M.A. Lan, C.A. Gersbach, K.E. Michael, B.G. Keselowsky, and A.J. Garcia: Myoblast proliferation and differentiation on fibronectin-coated self assembled monolayers presenting different surface chemistries. *Biomaterials* **26**, 4523 (2005).
3. J.M. Curran, R. Chen, and J.A. Hunt: Controlling the phenotype and function of mesenchymal stem cells in vitro by adhesion to silane-modified clean glass surfaces. *Biomaterials* **26**, 7057 (2005).
4. J.M. Curran, R. Chen, and J.A. Hunt: The guidance of human mesenchymal stem cell differentiation in vitro by controlled modifications to the cell substrate. *Biomaterials* **27**, 4783 (2006).
5. N.A. Bullett, D.P. Bullett, F.E. Truica-Marasescu, S. Lerouge, F. Mwale, and M.R. Wertheimer: Polymer surface micropatterning by plasma and



8. Anexos



- VUV-photochemical modification for controlled cell culture. *Appl. Surf. Sci.* **235**, 395 (2004).
- P.L. Girard-Lauriault, F. Mwale, M. Jordanova, C. Demers, P. Desjardins, and M.R. Wertheimer: Atmospheric pressure deposition of micropatterned nitrogen-rich plasma-polymer films for tissue engineering. *Plasma Process. Polym.* **2**, 263 (2005).
 - L. Štrbková, A. Manakhov, L. Zajíčková, A. Stoica, P. Veselý, and R. Chmelík: The adhesion of normal human dermal fibroblasts to the cyclopropylamine plasma polymers studied by holographic microscopy. *Surf. Coat. Technol.* **295**, 70 (2016).
 - P. Hamerlí, T. Weigel, T. Groth, and D. Paul: Surface properties of and cell adhesion onto allylamine-plasma-coated polyethylene terephthalate membranes. *Biomaterials* **24**, 3989 (2003).
 - R. Sridharan, A.R. Cameron, D.J. Kelly, C.J. Keamey, and F.J. O'Brien: Biomaterial based modulation of macrophage polarization: a review and suggested design principles. *Mater. Today* **18**, 313 (2015).
 - J.C. Ruiz, A. St-Georges-Robillard, C. Thérèse, S. Lerouge, and M.R. Wertheimer: Fabrication and characterisation of amine-rich organic thin films: focus on stability. *Plasma Process. Polym.* **7**, 737 (2010).
 - J.G. Terlingen, L.M. Brenneisen, H.T. Super, A.P. Pijpers, A.S. Hoffman, and J. Feijter: Introduction of amine groups on poly(ethylene) by plasma immobilization of a preadsorbed layer of decylamine hydrochloride. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **4**, 165 (1993).
 - C.P. Klages, Z. Khosravi, and A. Hirze: Some remarks on chemical derivatization of polymer surfaces after exposure to nitrogen-containing plasmas. *Plasma Process. Polym.* **10**, 307 (2013).
 - M. Pérez-Calixto, G. González-Pérez, N. Dionisio, E. Bucio, G. Burillo, and L. García-Uriostegui: Surface functionalization of polypropylene and polyethylene films with allylamine by γ radiation. *MRS Commun.* **9**, 264 (2019).
 - E. Rodríguez-alba, L. Huerta, A. Ortega, and G. Burillo: Surface modification of polypropylene with primary amines by acrylamide radiation grafting and Hofmann's transposition reaction. *ChemistrySelect* **4**, 7759 (2019).
 - P.L. Girard-Lauriault, P. Dietrich, T. Gross, and W.E.S. Unger: Is quantitative chemical derivatization XPS of plasma deposited organic coatings a valid analytical procedure? *Surf. Interface Anal.* **44**, 1135 (2012).
 - E. Yegen, U. Zimmermann, W.E.S. Unger, and T. Braun: C-F bond cleavage during derivatization reactions of amino groups with TFBA and PFB at plasma-processed organic surfaces? *Plasma Process. Polym.* **6**, 11 (2009).
 - E. Bucio, G. Burillo, M.D.P. Carreón-Castro, and T. Ogawa: Functionalization of polypropylene film by radiation grafting of acryloyl chloride and subsequent esterification with Disperse Red 1. *J. Appl. Polym. Sci.* **93**, 172 (2004).
 - R. Aliev, M. Del Pilar Carreón-Castro, M. Rivera, and G. Burillo: Immobilization of disperse red 1 on to polydiethyleneglycol-bis-allylcarbonate (CR-39) radiation grafted with poly(acryloyl chloride). *Polym. Bull.* **52**, 73 (2004).
 - A. Martínez-Cocoletz, J.C. Ruiz, E. Kasperek, A. Ortega, L. García-Uriostegui, P.L. Girard-Lauriault, and G. Burillo: Primary-amine surface functionalization of polytetrafluoroethylene films by radiation grafting of aminated polyacryloyl chloride. *Radiat. Phys. Chem.* **149**, 65 (2018).
 - P.L. Girard-Lauriault, P.M. Dietrich, T. Gross, T. With, and W.E.S. Unger: Chemical characterization of the long-term ageing of nitrogen-rich plasma polymer films under various ambient conditions. *Plasma Process. Polym.* **10**, 388 (2013).
 - M.P. Stevens: *Polymer Chemistry an Introduction*, 3rd ed. (OXFORD University Press, New York, 1998).
 - A.J. Engler, L. Richert, J.Y. Wong, C. Picart, and D.E. Discher: Surface probe measurements of the elasticity of sectioned tissue, thin gels and polyelectrolyte multilayer films: Correlations between substrate stiffness and cell adhesion. *Surf. Sci.* **570**, 142 (2004).
 - G. Beamson and D. Briggs: *High Resolution XPS of Organic Polymers: The Scientia. The Scientia ESCA300 Database* (Wiley & Son, Chichester, UK, 1992), pp. 56.
 - Y. Akishev, M. Grushin, N. Dyatko, I. Kochetov, A. Napartovich, N. Trushkin, T. Minh Duc, and S. Descours: Studies on cold plasma-polymer surface interaction by example of PP- and PET-films. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **41** (2008).
 - R. Morent, N. De Geyter, C. Leys, L. Gengembre, and E. Payen: Comparison between XPS- And FTIR-analysis of plasma-treated polypropylene film surfaces. *Surf. Interface Anal.* **40**, 597 (2008).
 - R. Dorai and M.J. Kushner: A model for plasma modification of polypropylene using atmospheric pressure discharges. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36**, 666 (2003).
 - B. Couturaud, A.M. Bondia, C. Faye, L. Garrelly, A. Mas, and J.J. Robin: Grafting of poly-L-lysine dendrigrafts onto polypropylene surface using plasma activation for ATP immobilization - nanomaterial for potential applications in biotechnology. *J. Colloid Interface Sci.* **408**, 242 (2013).
 - K.S. Siow, L. Britcher, S. Kumar, and H.J. Griesser: Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization - A review. *Plasma Process. Polym.* **3**, 392 (2006).