



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

FOTO INJERTO DE ÁCIDO ACRÍLICO SOBRE PELÍCULAS DE
POLI(ÁCIDO LÁCTICO) Y SUS PROPIEDADES
HEMOCOMPATIBLES

Tesis que presenta

I.B Alejandra Isabel Sanguino Herrera

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS
(Materiales Poliméricos)

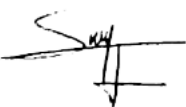
Mérida, Yucatán, México

2022

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Mérida, Yucatán, México; 23 de febrero de 2022

Firma:  Alejandra Isabel
Sanguino Herrera

I.B Alejandra Isabel Sanguino Herrera

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN MATERIALES POLIMÉRICOS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Alejandra Isabel Sanguino Herrera titulado **Foto injerto de ácido acrílico sobre película de poli ácido láctico y sus propiedades hemocompatibles**, fue realizado en la Unidad de Materiales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. José Manuel Cervantes Uc, y de la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes, pertenecientes al Programa de Posgrado en Materiales Poliméricos de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 23 de febrero de 2022

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización de esta investigación, con número de CVU 1007526, y; por el financiamiento recibido a través del proyecto de Ciencia Básica No. 283972.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY), por las facilidades otorgadas para la realización de los experimentos en los laboratorios de la Unidad de Materiales (Biomateriales, y Físicoquímica I).

Dr. José Manuel Cervantes Uc, muchas gracias por darme la oportunidad de crecer y aprender dentro de su equipo de trabajo. Agradezco cada uno de sus comentarios, consejos y conocimientos compartidos. Gracias por confiar en mí en cada una de las etapas de mi desarrollo profesional, y muchas gracias por el tiempo y las atenciones brindadas aún en las situaciones adversas que se tuvieron que afrontar.

Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes, me siento agradecida por el espacio que me confirió para trabajar de manera conjunta con usted y sus demás alumnos. Muchas gracias por la confianza que me brindó, así como también por los conocimientos e innumerables preocupaciones y contribuciones al proyecto.

Al Dr. Alejandro Ávila Ortega, mi gratitud por haber aceptado ser parte del proyecto. Por sus consejos y observaciones durante cada una de las etapas que conllevó la realización del mismo

Al Dr. Manuel Jesús Aguilar Vega, por su constante participación durante las revisiones de esta tesis, al igual que por compartir su conocimiento conmigo, para un mejor entendimiento de algunas partes del proceso.

Este trabajo no habría sido el mismo sin el apoyo técnico de diferentes personas que facilitaron la caracterización de las muestras, destacando al Dr. Wilberth Antonio Herrera Kao, en la parte físicoquímica, así como también por el apoyo brindado durante el manejo de las muestras y la obtención de material de laboratorio; al Dr. Alejandro May Pat por la obtención de las imágenes AFM de las muestras injertadas y su ayuda para el manejo del software para el análisis de las mismas; y al Q.I. Santiago Duarte Aranda, por su disposición para la obtención de las micrografías SEM.

A los maestros Antonio Abreu, Alejandro Viera y Carlos Belman; y a mis compañeros Alexis Sabido, Geovanny Ayora y Noemí Pat, por contribuir con sus conocimientos, apoyo técnico y sobre todo por confiar en mí y apoyarme a lo largo de la maestría.

DEDICATORIA

A mis padres: Lucy Elvira Herrera Canul y Luis Felipe Santiago Sanguino Castro; quienes han luchado día a día por lograr que la familia salga adelante, y quienes siempre han creído en mí y en cada uno de mis proyectos. Por apoyarme e incentivarme a superarme en todos los ámbitos, y por inspirarme a ser la mejor versión de mí misma.

A mi hermana Ileana Guadalupe, por todos sus consejos y apoyo durante toda mi vida, quien ha estado cercana a mí, incluso en la distancia, y quien me hace sentir orgullosa de ser su hermana.

Raúl Márquez Frausto, por tu compañía a lo largo de este camino, tu confianza y por no dejarme caer nunca.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I - MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	3
1.1 Marco Teórico	3
1.1.1 Materiales poliméricos para aplicaciones biomédicas	3
1.1.2 Poli(ácido láctico).....	4
1.1.3 Técnicas de modificación superficial.....	5
1.1.4 Modificación superficial por injerto fotoinducido.	6
1.1.5 Caracterización superficial de materiales.....	12
1.1.6 Hemocompatibilidad	14
1.2 Antecedentes.....	16
1.3 Objetivo General.....	19
1.4 Objetivos Específicos	19
CAPÍTULO II - MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
2.1 Materiales.....	20
2.2 Foto injerto de ácido acrílico	20
2.3 Caracterización fisicoquímica	22
2.3.1 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier, en modo reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)	22
2.3.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	22
2.3.3 Análisis termogravimétrico (TGA)	22
2.3.4 Ángulo de contacto	22
2.3.5 Método colorimétrico de azul de o-toluidina (TBO) para la determinación de la concentración de grupos carboxílicos.....	22
2.3.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	23
2.3.7 Microscopía de fuerza atómica (AFM)	23

2.4 Caracterización biológica	23
2.4.1 Ensayo de hemólisis	23
2.4.2 Agregación plaquetaria	24
CAPÍTULO III - RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
3.1 Foto injerto de ácido acrílico sobre las películas de PLA	25
3.2 Caracterización fisicoquímica	27
3.2.1 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier, en modo de reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).....	27
3.2.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).	29
3.2.3 Análisis termogravimétrico (TGA).	31
3.2.4 Ángulo de contacto.	32
3.2.5 Método colorimétrico de azul de o-toluidina (TBO) para la determinación de la concentración de grupos carboxílicos	34
3.2.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	35
3.2.7 Microscopía de fuerza atómica (AFM)	37
3.3 Caracterización biológica	38
3.3.1 Hemólisis	38
3.3.2 Agregación Plaquetaria.....	39
CONCLUSIONES	43
RECOMENDACIONES	44
REFERENCIAS.....	45

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1 Propiedades Físicas del PLA, en función del contenido de L-láctico	4
Tabla 1.2 Comparación de las propiedades mecánicas del PLA con otros termoplásticos.	5
Tabla 1.3 Principales técnicas de caracterización superficial de los materiales	13
Tabla 3.1 Relaciones de intensidades de las señales (PIR) para el carbonilo en 1750cm^{-1}	29
Tabla 3.2 Transiciones térmicas de las películas de PLA injertadas a diferentes tiempos y sin injertar	30
Tabla 3.3 Cuantificación de los pixeles exhibidos por las micrografías de la Figura 3.16 para estimar cuantitativamente el efecto trombótico de los materiales.	42

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura del PLA.....	4
Figura 1.2 Mecanismo fotoinjerto de la N-Vinilcaprolactama sobre un sustrato de PLA	7
Figura 1.3 Mecanismo de terminación del fotoinjerto de la N-Vinilcaprolactama sobre un sustrato de PLA	8
Figura 1.4 Fotólisis de la Benzofenona.....	9
Figura 1.5 Esquema de reacción de la peroxidación del sustrato polimérico en el fotoinjerto en presencia de aire.....	12
Figura 2.1 Representación esquemática de la reacción del injerto foto inducido del ácido acrílico sobre la superficie del poli(ácido láctico) [54].	21
Figura 3.1 Proceso de activación de la superficie del PLA con benzofenona por irradiación UV.	25
Figura 3.2 Proceso de foto injerto de ácido acrílico sobre PLA, utilizando irradiación UV	26
Figura 3.3 Películas de PLA foto injertadas con AA a diferentes tiempos	26
Figura 3.4 Espectros FTIR de las películas de PLA injertadas a diferentes tiempos.....	27
Figura 3.5 Espectros (FTIR) de la muestra de PLA e injertada 180 minutos.....	28
Figura 3.6 Termogramas de DSC de las películas de PLA injertadas a diferentes tiempos y sin injertar.	30
Figura 3.7 Curvas de TGA del PLA y de las muestras injertadas a los diversos tiempos propuestos	31
Figura 3.8 Curvas de DTGA del PLA y de las muestras injertadas a los diversos tiempos propuestos	32
Figura 3.9 Imágenes de las gotas de agua formadas entre ésta y los diferentes sustratos evaluados. Películas de PLA injertadas a: a) 0 min (control), b) 10 min, c) 20 min. d) 30 min. e) 60 min. f) 180 min.....	33
Figura 3.10 Mediciones de ángulo de contacto del PLA y de las muestras injertadas a los diversos tiempos propuestos	33
Figura 3.11 Densidad de grupos COOH ($\mu\text{mol cm}^{-2}$) en las películas de PLA injertadas a diferentes tiempos.	35
Figura 3.12 Micrografías SEM, del PLA y de las muestras injertadas a los diversos tiempos propuestos	36
Figura 3.13 Imágenes 3D de AFM de las superficies de los sustratos de PLA injertados: a) 0 min (control), b)10 min, c) 20 min. d) 30 min. e) 60 min. f) 180 min.....	37
Figura 3.14 Hemólisis causada por las películas de PLA e injertadas a diferentes tiempos.	39

Figura 3.15 Controles positivos y negativos de agregación plaquetaria.....40

Figura 3.16 Micrografías de la agregación plaquetaria exhibida por las películas de PLA
fotoinjertadas con AA a diferentes tiempos.....41

RESUMEN

En este trabajo se reporta el injerto ácido acrílico (AA) sobre la superficie de películas de poli(ácido láctico), (PLA) mediante un proceso de fotopolimerización inducida por UV, a diferentes tiempos de reacción; posteriormente, las películas fueron caracterizadas fisicoquímica y biológicamente. El objetivo de modificar superficialmente las películas fue para modular el balance hidrofílico/hidrofóbico de la superficie del PLA, y determinar cómo esto afecta las propiedades hemocompatibles (hemólisis y agregación plaquetaria) del mismo.

Los resultados provenientes de la caracterización fisicoquímica de las muestras fotoinjertadas indicaron que el proceso se llevó a cabo exitosamente debido a que los espectros de FTIR mostraron un mayor contenido de grupos carboxílicos, derivados del AA, con un aumento en el tiempo del tratamiento. Estos resultados fueron corroborados mediante el ensayo colorimétrico de azul de o-toluidina (TBO), en donde también se observó un aumento en la densidad de grupos COOH al incrementar el tiempo de tratamiento; lo anterior condujo a una disminución del ángulo de contacto con agua de 80° para la muestra no tratada, hasta 44° para la muestra fotoinjertada por 180 min, lo cual es un indicio de un aumento en el carácter hidrofílico de la superficie. En lo que respecta a las propiedades térmicas de las muestras tratadas, los termogramas por DSC no mostraron un cambio significativo, mientras que en los de TGA se observó un aumento en la estabilidad térmica a medida que aumentó el tiempo de tratamiento. El fotoinjerto también generó cambios en la topografía de las muestras tratadas, los cuales fueron detectados por SEM y AFM.

Por último, en lo referente a las propiedades hemocompatibles, se encontró que las reacciones de fotoinjerto a los diferentes tiempos, no generan hemólisis y que la agregación plaquetaria presentó un máximo para la muestra tratada a 20 min; a pesar de lo anterior, en ningún caso se llegó a los valores de agregación de control positivo.

ABSTRACT

In this work, acrylic acid (AA) was grafted onto PLA film surfaces using a UV-induced photopolymerization process at different reaction times; subsequently, the films were characterized in terms of physicochemical and biological properties. The propose of surface modification lies in the fact that the degree of protein adsorption can be controlled by modifying the hydrophilic / hydrophobic character of the polymeric surfaces and to determine how this affects its hemocompatibility properties (hemolysis and platelet aggregation).

Results from the physicochemical characterization of the photografted samples indicated that the process was carried out successfully, as the FTIR spectra showed a higher content of carboxylic groups derived from AA, which was increased with the treatment time. These results were corroborated by the TBO assay, where an increase in the density of COOH groups was also observed as the treatment time increased. This led to a decrease in the contact angle with water from 80° for the untreated sample, to 44° for the photografted sample at 180 min, which suggests an increase in the hydrophilic character of the PLA surface.

Regarding thermal properties of the treated samples, the DSC thermograms did not show a significant change, while the TGA results showed an increase in thermal stability as the treatment time increased. The photografting also yields changes in the topography of the treated samples, which were detected by SEM and AFM.

Finally, in terms of hemocompatibility, treated films exhibited a non-hemolytic behavior regardless the reaction times proposed; a maximum platelet aggregation was obtained for the sample treated for 20 min, despite the above, in neither case the aggregation value for the positive control was reached.

INTRODUCCIÓN

Es un hecho conocido que el balance hidrofílico/hidrofóbico de las superficies poliméricas puede determinar el grado de adsorción de proteínas y, por ende, mediar la adhesión e interacción de las células sobre un material [1,3]. Sin embargo, el efecto que tiene el carácter hidrofílico o hidrofóbico de una superficie sobre la adsorción de proteínas es muy controversial debido a que muchos de los resultados experimentales reportados no son concluyentes. Por ejemplo, se ha reportado que las superficies hidrofóbicas favorecen la adsorción de proteínas de soluciones acuosas mediante mecanismos termodinámicos, pero pueden inducir una adsorción fuertemente irreversible y desnaturalizar la conformación de las proteínas nativas reduciendo de esta manera su bioactividad. En contraste, una superficie altamente hidrofílica puede repeler cualquier molécula proteínica e inhibir la adsorción de estos compuestos [4].

Por lo antes mencionado, se puede inferir que los sustratos con una moderada hidrofilia serían capaces de adsorber una cantidad adecuada de proteínas y, al mismo tiempo, preservar su conformación natural dando como resultado una respuesta celular positiva: adhesión y proliferación celular [5].

Por otra parte, en los últimos años se han desarrollado rápidamente muchos tipos de dispositivos biomédicos hechos de materiales poliméricos debido al progreso de la ingeniería biomédica y los constantes avances en dichos materiales; entre los dispositivos que más auge han tenido se pueden mencionar aquellos utilizados en la terapia de enfermedades del sistema sanguíneo, como vasos sanguíneos artificiales, válvulas cardíacas, *stents*, etc. Sin embargo, los resultados clínicos a largo plazo no han sido del todo satisfactorios debido a la formación de trombos, por lo que, el uso de estos dispositivos se ha restringido en aplicaciones en las que están en contacto directo con el torrente sanguíneo. Además, esta pobre hemocompatibilidad afecta también la funcionalidad y eficacia de la activación de la coagulación sanguínea y del sistema inmunológico [6].

Las propiedades hemocompatibles de los biomateriales se ven afectadas principalmente por las características físicas y químicas de la superficie. Una estrategia rápida y eficaz para controlar dichas propiedades consiste en modificar la superficie de los biomateriales, pero manteniendo las propiedades volumétricas del material; dos de los métodos más eficaces para realizar dicha modificación son la inmovilización fotoquímica y la polimerización por foto injerto [7].

Por lo antes expuesto, el presente proyecto plantea la modificación superficial del poli(ácido láctico), PLA, mediante foto injerto de ácido acrílico, con la idea de modular el balance hidrofílico/hidrofóbico de este material y estudiar cómo este balance afecta las propiedades hemocompatibles de este polímero. Se espera obtener un material con una hemocompatibilidad adecuada, es decir, que no genere hemólisis ni altere el proceso de agregación plaquetaria.

El presente trabajo está organizado de la siguiente manera; en el primer capítulo se describen los conceptos teóricos necesarios para el entendimiento del proyecto, al igual que los resultados de investigaciones previas relacionadas con la modificación del PLA y su efecto en la compatibilidad biológica del mismo; así mismo, se presentan la hipótesis y objetivos del trabajo. En el capítulo 2 se menciona la metodología utilizada para el foto injerto del ácido acrílico sobre las películas de PLA y las técnicas de caracterización fisicoquímicas y biológicas necesarias para evaluar el efecto de dicha modificación en las propiedades de interés. Por último, en el capítulo 3 se presentan los resultados obtenidos de las caracterizaciones previamente mencionadas, analizando y discutiendo los mismos, para correlacionar el efecto de la modificación, y los tiempos propuestos, con el comportamiento del material ante la hemólisis y la agregación plaquetaria.

CAPÍTULO I - MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

1.1 Marco Teórico.

1.1.1 Materiales poliméricos para aplicaciones biomédicas.

Los materiales poliméricos son macromoléculas formadas por la unión de moléculas más pequeñas denominadas monómeros, versátiles en estructura, constitución y propiedades fisicoquímicas, lo cual conlleva a que diversas estructuras poliméricas se les atribuya distintas aplicaciones en función a sus propiedades fisicoquímicas, interfaciales y biomiméticas para cumplir un propósito específico [8, 9]. Además, los materiales poliméricos tienen una amplia gama de aplicaciones en diversos campos como la biofísica, medicina, electrónica y otras ramas de la ciencia y la tecnología.

Entre este tipo de materiales, los biomateriales poliméricos son especialmente utilizados debido a su reducida toxicidad *in vivo*, propiedades adecuadas para aplicaciones biomédicas; estos pueden ser clasificados en dos categorías: sintéticos y naturales. En el primer caso se pueden incluir a los materiales acrílicos, poliamidas, poliésteres, polietileno, polisiloxanos, poliuretano, etc.; mientras que entre los biopolímeros naturales se puede encontrar a la colágena, celulosa, quitosano, polihidroxitirato, entre otros [10].

Los biomateriales poliméricos se han utilizado en diversos dispositivos biomédicos, como válvulas cardíacas, corazones artificiales, injertos vasculares, prótesis mamarias, materiales dentales [11], lentes de contacto e intraoculares [12], accesorios de oxigenadores extracorpóreos, sistemas de diálisis y plasmaféresis, materiales de recubrimiento para productos médicos, materiales quirúrgicos, adhesivos de tejidos, etc. [13].

Por último, algunas de las ventajas que tienen los biomateriales poliméricos sobre otras clases de materiales son:

- (i) Facilidad de fabricación
- (ii) Facilidad de procesabilidad
- (iii) Propiedades mecánicas y físicas deseadas
- (iv) Costo razonable.

1.1.2 Poli(ácido láctico).

El poli(ácido láctico) (PLA, Figura 1.1), es un termoplástico perteneciente a la familia de los poliésteres alifáticos, se caracteriza por ser biodegradable y es producto de fuentes renovables. Además, el PLA es considerado un material versátil debido a., que pueden obtenerse una gran diversidad de productos con propiedades específicas para el campo de la medicina o empaque de alimentos.

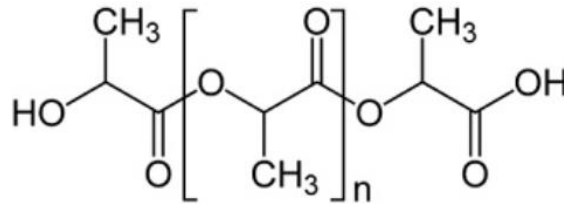


Figura 1.1 Estructura del PLA.

El PLA se obtiene a partir del ácido láctico, el cual puede encontrarse como una mezcla de sus isómeros D(-) y L(+), y tiene propiedades físicas similares al Polipropileno (PP) y Poliestireno (PS), lo que lo hace útil para diversas aplicaciones que incluyen la fabricación de fibras, películas y materiales de empaque para alimentos, con el atractivo de hacerlo en equipos utilizados para la transformación de otros termoplásticos [14].

La Tabla 1.1 muestra las principales propiedades físicas del PLA con diferentes porcentajes del isómero L, Poli(ácido L-lactico) (PLLA), y la Tabla 1.2 compara algunas de las propiedades mecánicas del PLA con otros termoplásticos [15].

Tabla 1.1 Propiedades Físicas del PLA, en función del contenido de L-láctico.

% PLLA	T _g °C DSC	T _m °C DSC	ΔH _f , J/g	Densidad, g/cm ³
100	60	184		
98	61.5	176.2	56.4	1.2577
92.2	60.3	158.5	35.8	1.2601
87.5	58	NA	NA	
80	57.5	NA	NA	1.2614
45	49.2	NA	NA	1.2651
NA: Amorfo				

Tabla 1.2 Comparación de las propiedades mecánicas del PLA con otros termoplásticos.

	Módulo de tensión (MPa)	Impacto Izod (J/m)	Módulo de Flexión (MPa)	Elongación a la ruptura (%)
PLA	3834	24.6	3689	4
PS	3400	27.8	3303	2
iPP	1400	80.1	1503	400

PS: Poliestireno
iPP: Polipropileno Isotáctico

El PLA puede degradarse fácilmente mediante hidrólisis enzimática o hidrólisis alcalina en composta; cuando es implantado en organismos vivos, incluyendo el cuerpo humano, éste se hidroliza hasta α -hidroxiácido, el cuál es eliminado entonces por mecanismos metabólicos [16]. La velocidad de degradación depende del tamaño y forma del artículo, temperatura del medio, y cristalinidad del material [17], pudiendo alcanzar meses o años, para el PLA cristalino, mientras que el PLA amorfo se degrada en semanas.

El PLA, es un biopolímero sintético con variadas aplicaciones debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad, propiedades termo-mecánicas y su facilidad de procesamiento. Entre sus aplicaciones en el campo biomédico se encuentran: las suturas bioabsorbibles, sustitutos de materiales óseos, almohadillas desechables y sistemas de liberación de fármacos [18]. Al tratarse de un poliéster, el PLA tiene baja hidrofilia y poca capacidad de funcionalización, lo cual podría limitar su uso en aplicaciones futuras. Para solucionar esta problemática, se han utilizado distintos métodos físicos y químicos para modificar su superficial y con esto, mejorar la hidrofilia del PLA [19].

1.1.3 Técnicas de modificación superficial.

La modificación superficial de materiales es una estrategia empleada frecuentemente para la adaptación de un material para una aplicación específica. Este proceso también se denomina funcionalización superficial y puede llevarse a cabo mediante una gran diversidad de métodos como procesos térmicos, fotoquímicos, mecánicos, tecnologías de plasma, etc. En consecuencia, la elección del método de funcionalización está condicionada por la naturaleza del material de partida, limitando la aplicación de ciertos tipos de técnicas [20].

El proceso de funcionalización superficial de polímeros se lleva a cabo mediante la transformación de las especies químicas presentes en la superficie por reacciones de oxidación/reducción, la adición de nuevas especies a la misma, cambios de la rugosidad o, la deposición de una película delgada de un material con las propiedades requeridas, entre otras. Con esto, se logra modificar las características químicas superficiales del material, así como sus propiedades de adsorción, rugosidad, bioactividad, toxicidad, etc., pudiéndose obtener polímeros con diversas aplicaciones [21].

La hidrofobia y la hidrofilia de la superficie de un polímero pueden ejercer una gran influencia en la aplicación de éste en campos como la biomedicina. Por ejemplo, se requieren materiales con diferentes características para la fabricación de vasos sanguíneos artificiales, que para membranas de regeneración ósea, o para la obtención de superficies antibacterianas. Con esto se pone de manifiesto que el balance hidrofóbico/hidrofílico de una superficie es un factor que debe controlarse correctamente en el diseño un material [22].

1.1.4 Modificación superficial por injerto fotoinducido.

La polimerización por fotoinjerto de monómeros, o injerto fotoinducido sobre la superficie de polímeros, es uno de los procesos más útiles para la modificación de superficies debido a sus ventajas significativas como: bajo costo de operación, condiciones de reacción poco severas, y alteración permanente de la superficie del material [23].

La modificación superficial de polímeros por fotoinjerto se inicia con el empleo de radiaciones de alta energía (rayos γ o haz electrones) y las de baja energía (luz UV) [24]. No obstante, la radiación de alta energía puede causar efectos químicos adicionales en el polímero expuesto [25]. Por ejemplo, si los radicales libres formados se recombinan dentro del sustrato puede ocurrir entrecruzamiento. Por otro lado, si las cadenas se rompen se índice la degradación del polímero. Estos procesos pueden ocurrir simultáneamente, y dependiendo de la estructura del polímero, alguno predominará sobre el otro.

Por lo anterior, la radiación de alta energía no es una ruta viable para la modificación superficial de muchos materiales biodegradables, especialmente los poliácidos, debido a su inestabilidad y susceptibilidad a degradarse por rompimiento de cadenas como resultados de la irradiación, incluso a bajas dosis [27, 27, 28]. En el caso de la radiación UV, la energía irradiada es mucho menos intensa que la de radiaciones gamma o haz de electrones, debido a la poca penetración que tiene en el sustrato [29], por lo que es más utilizada para la modificación superficial de este tipo de materiales.

En este proceso, se emplea una solución reactiva que contiene al monómero a injertar y al fotoiniciador capaz de inducir el injerto; la polimerización por injerto inicia en la superficie del sustrato e involucra una transición de fases, de una solución líquida reactiva a una fase sólida.

1.3.1 Mecanismo de fotoinjerto en masa inducido por luz UV.

La Figura 1.2 ilustra el mecanismo de reacción del injerto de un monómero vinílico (N-vinilcaprolactama, VCL), sobre una película de PLA.

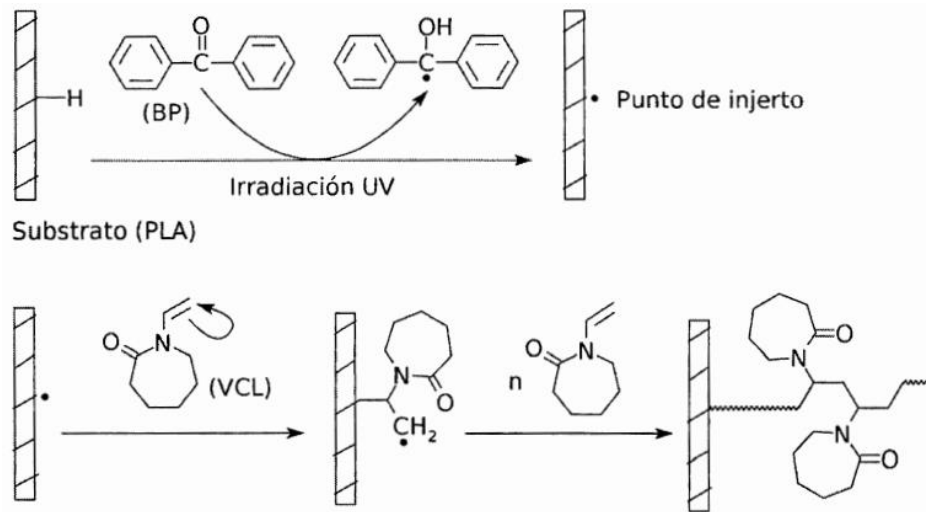


Figura 1.2 Mecanismo de fotoinjerto de la N-Vinilcaprolactama sobre un sustrato de PLA.

Primeramente, la benzofenona (BP), que se encuentra excitada hasta su estado triplete ($[BP]^T$), extrae el hidrógeno terciario del PLA y, esto produce un macroradical activo y el radical semipinacol. El macroradical activo será un radical libre el cual iniciará la polimerización por un mecanismo de radicales libres, y el radical semipinacol iniciará la homopolimerización del monómero y eventualmente podrá participar en reacciones de terminación por combinación [30].

La adición del monómero de VCL sobre el macroradical iniciará el centro reactivo, y mientras se sigan adhiriendo más moléculas de monómero, se propagará continuamente la cadena polimérica [31].

La terminación de la cadena se dará por un número de reacciones las cuales se esquematizan en la Figura 1.3 [32]. Es importante señalar que debido a que se lleva a cabo la abstracción de un H es posible que exista una oxidación del sustrato, la probabilidad de que ocurra aumenta con el tiempo de irradiación [28].

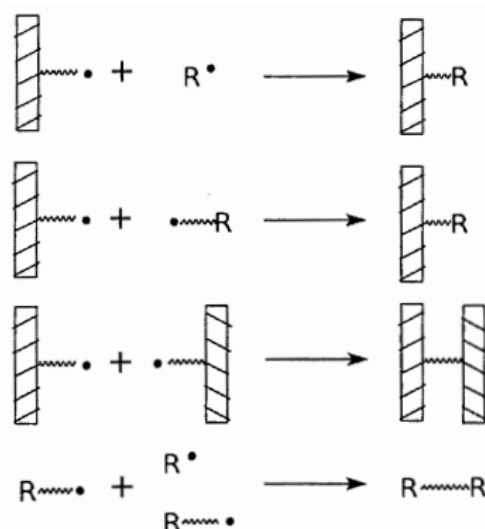


Figura 1.3 Mecanismo de terminación del fotoinjerto de la N-Vinilcaprolactama sobre un sustrato de PLA.

La Benzofenona es un fotoiniciador sensible a la luz UV que favorece la polimerización por fotoinjerto [24], mientras que otros favorecen la homopolimerización, como es el caso de la dimetóxifenil-acetofenona (DMPA).

Inicialmente, cuando la BP absorbe la luz UV en un intervalo entre 300-400 nm de longitud de onda, los electrones del grupo carbonilo llevan a cabo una serie de transiciones electrónicas. Por reglas de selección y energía, se considera que las transiciones más probables para este proceso son la transición $n \rightarrow \pi^*$ y la transición $\pi \rightarrow \pi^*$, donde n son aquellos electrones libres o de no-enlace, π son los electrones que forman insaturaciones, y π^* son electrones denominados π anti-enlace. De ambas transiciones, la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ es aparentemente la más probable que ocurra por condiciones de simetría. Sin embargo, no sucede así, esto debido a un mayor requerimiento energético para su transición (159 - 143 kcal/mol) en comparación con la energía necesaria para llevar a cabo una transición $n \rightarrow \pi^*$ (102 - 95 kcal/mol) [33].

Después de llevarse a cabo la transición electrónica, la BP se encuentra en un estado singlete en el cual sus electrones se encuentran excitados. Mediante un proceso fotofísico que implica el giro de spin del electrón excitado, conocido como cruce entre sistemas (ISC, de sus siglas en inglés), la BP pasa a un estado reactivo conocido como triplete el cual es capaz de abstraer un átomo de hidrógeno del sustrato polimérico y así crear un macroradical activo sobre el sustrato y un radical de la BP conocido como semipinacol [30].

La ruta detallada que sigue la BP después de absorber luz UV se esquematiza en la Figura 1.4.

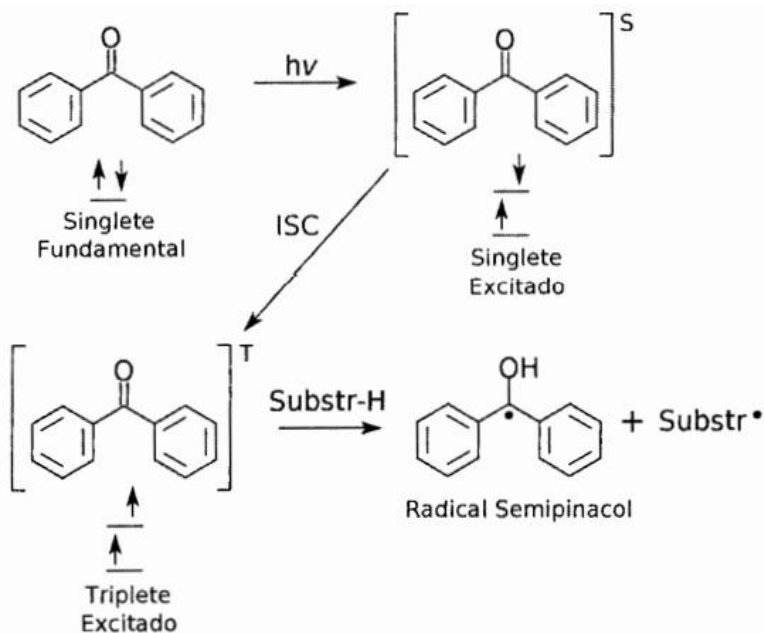


Figura 1.4 Fotólisis de la Benzofenona.

Los estados excitados en las moléculas en general son de vida corta. Por el fenómeno de emisión, la molécula excitada regresa a su estado singlete fundamental y se manifiesta a través de fluorescencia, energía térmica o reacciones fotoquímicas.

1.3.2 Factores que afectan el fotoinjerto en masa con luz UV.

Características del sustrato.

La estructura química del sustrato define la facilidad de abstracción del hidrógeno (H), por lo tanto, la eficiencia de injerto decrece en el siguiente orden, en materiales que contienen H adyacentes a los siguientes átomos o grupos funcionales que los contienen: N > O > C terciario > C secundario > C primario > anillo aromático [34, 35].

Es probable que la morfología del sustrato polimérico afecte la reactividad del sistema. Morfologías con baja densidad o estado amorfo como el Polipropileno (PP) y el Polietileno de Baja Densidad (LDPE) deben favorecer el proceso de fotoinjerto, mientras que una alta cristalinidad y buena orientación deberían retardar este proceso como el Polipropileno Orientado Biaxialmente (BOPP) y el Polietileno de Alta Densidad (HDPE) [34]. Lo anterior puede ser efecto del movimiento que existe entre las cadenas. Mientras mayor libertad de movimiento exista, podrá haber una mayor probabilidad de reacción; en su ausencia, este proceso puede ser nulo.

Debido a que la radiación UV incidente tiene que penetrar la capa superior de la película polimérica, antes que alcance la solución de monómero e iniciador, al menos una de las dos caras del sustrato debe ser transparente a la radiación UV.

Concentración de fotoiniciador y monómero.

El efecto directo de aumentar la concentración de fotoiniciador, es incrementar la absorción de luz UV por parte del fotoiniciador, aunque se disminuye la intensidad de luz UV en la interface de la solución de fotoiniciador y la superficie del sustrato [35].

A grandes concentraciones de fotoiniciador, el efecto de apantallamiento y dispersión de luz UV hacia la cara inferior del sustrato aumenta, provocando que exista menor cantidad de polímero injertado sobre la superficie del sustrato inferior. Además, se ha demostrado que, para cada tiempo de irradiación existe un óptimo en la concentración de BP que favorece la velocidad de reacción debido al mismo efecto de transmitancia de luz UV hacia la cara inferior del sustrato [23, 34].

El porcentaje de injerto obtenido aumenta con el incremento en la concentración de monómero. A bajas concentraciones de monómero, las velocidades de iniciación y propagación se incrementan con el incremento en la concentración de monómero y, la velocidad de terminación es baja porque la movilidad de los radicales poliméricos es muy pequeña en la matriz menos adsorbida. Mientras que, altas concentraciones de monómero tienden a incrementar la velocidad de propagación de la reacción, pero este efecto es sobrepasado por el gran incremento en la velocidad de terminación de cadenas más libres adsorbidas en la matriz [36].

Disolvente.

Se ha reportado que los disolventes con hidrógenos capaces de ser abstraídos por la $[BP]^T$ entorpecen la reacción de fotoinjerto [34]. Lo anterior se debe a que existe una competencia entre la abstracción del hidrógeno del sustrato y del disolvente. Además, el disolvente es un factor importante en la difusión del polímero formado. Si el disolvente es capaz de disolver a la cadena en propagación, la polimerización será favorecida.

Viscosidad de la solución.

La homopolimerización y el injerto disminuyen cuando la viscosidad de la solución se incrementan debido a que a mayor viscosidad de la solución, la intensidad de luz UV sobre la cara inferior disminuye producto del apantallamiento y dispersión de la solución; (2) la polimerización por fotoinjerto en las dos superficies del sustrato ocurren con dos tipos de radicales

en crecimiento: uno es el radical de la cadena de polímero injertada al cual está unida a la superficie del sustrato y la otra es el radical de la cadena de homopolímero [34].

Temperatura.

Para las fotopolimerizaciones en general, el efecto de la temperatura no es demasiado debido a la baja energía de activación; sin embargo, para el foto injerto, el efecto es diferente.

La energía de activación de la BP (6.8 kcal/mol) es mucho más grande que las de las reacciones de fotoreducción comunes (2.2 - 4.4 kcal/mol). Las diferencias pueden ser atribuidas a las propiedades del sistema de reacción: la entalpía de la superficie del material polimérico; y que la polimerización en masa sobre la superficie causa una transformación de fases del sistema durante la polimerización: líquido - estado viscoso - sólido. Estos factores tienden a reducir la reactividad de los átomos de hidrógeno y disminuir la velocidad de difusión de la BP, la cual incrementa su sensibilidad de fotoreducción con la temperatura de reacción [37].

Por ejemplo, Xing *et al.* [32] demostraron que al aumentar la temperatura en la que se lleva a cabo el fotoinjerto de Anhídrido Maleico (MAH)/n-butilviniléter (BVE) sobre la superficie de PP se reduce la homopolimerización, por lo que el injerto sobre la superficie del material aumenta, debido a las diferencias de energías de activación involucradas, y donde la energía de activación del fotoinjerto (29.3 kJ/mol) es mayor a la de la homopolimerización (5.9 kJ/mol). Es así que, la influencia de la temperatura en el sistema afecta más al fenómeno de fotoinjerto que a la homopolimerización.

Efecto del oxígeno.

Es bien conocido que el oxígeno molecular (O₂) inhibe fuertemente la fotopolimerización por radicales libres, mediante la terminación de éstos, a partir de la formación de grupos hidroperóxidos. Como se muestra en la figura 1.5, cada macroradical, polímero activo, puede producir diversos grupos hidroperóxidos los cuales, por termólisis, generarán radicales alcoxi e hidroxil; ambas especies son conocidas por reaccionar con grupos vinílicos e inducir así polimerizaciones adicionales (ver la ecuación 1.1) [38].

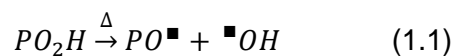


Tabla 1.3 Principales técnicas de caracterización superficial de los materiales.

Método	Principio	Profundidad de análisis	Resolución espacial	Sensibilidad analítica
SEM	Utiliza un haz de electrones para producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra	0.5 nm	Típicamente 4 nm	Es alta, pero no es cuantitativa
AFM	Es capaz de registrar continuamente la topografía de una muestra	0.01 nm hasta unos pocos μm	Escala nanométrica	Sensibilidad de fuerza de 10^{-13} N a 10^{-5} N
FTIR-ATR	La radiación IR es absorbida por un enlace cuando la frecuencia vibracional usada es la misma que la del propio enlace, facilitando la asignación de picos de absorción a grupos funcionales específicos	1 – 5 μm	10 μm	1 % mol
XPS	Los rayos X causan la emisión de electrones de una energía característica	1 – 25 nm	10 – 150 μm	0.1 % atómico
Colorimetría (Densidad de grupos COOH)	Mediante el mecanismo de intercambio iónico, se asume que un mol de TBO reacciona con un mol de grupos COOH	Dependiendo de los grupos funcionales presentes	Sujeto a la concentración de los grupos funcionales	Alta, cuando hay gran cantidad de grupos funcionales
Ángulo de contacto	El ángulo de contacto es utilizado para estimar la energía libre superficial	0.3 – 2 nm	1 mm	Baja o alta dependiendo de la química superficial

La microscopía de fuerza atómica (AFM) posee una alta resolución, lo que permite detectar superficies con picos y valles, cuya altura o profundidad sea del orden de nanómetros, por lo que se ha convertido en una herramienta ampliamente utilizada para estudiar la topografía de los materiales a este nivel [40].

Por otro lado, entre las técnicas espectroscópicas más utilizadas para revelar la estructura química superficial de los materiales poliméricos, así como los cambios generados por distintos tratamientos, se encuentran: la espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier en modo reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) y la espectroscopia foto electrónica de rayos-X (XPS). La profundidad de análisis es diferente en cada técnica, por lo que la sensibilidad y la información obtenida es distinta en cada técnica, pero complementaria entre sí.

Un método adicional para la determinación de grupos funcionales en un biomaterial involucra el uso de técnicas colorimétricas. Para esto, se han desarrollado varios métodos que miden eficazmente la densidad superficial de ciertos grupos como los grupos carboxilo y los grupos amino, basándose en un mecanismo de intercambio iónico. Sin embargo, su principal desventaja es que son técnicas menos sensibles que los análisis de XPS y, por lo tanto, sólo son útiles cuando hay una gran cantidad de estos grupos funcionales en la superficie [3].

Por otro lado, las superficies sólidas se pueden clasificar en dos grupos: hidrofílicas, cuando son humectables con agua y poseen una alta energía superficial; e hidrofóbicas, en el caso de no ser humectables con agua y contar con una baja energía superficial.

La medición del ángulo de contacto es un método que permite evaluar el carácter hidrofílico de un material, ya que muestra la afinidad de la superficie a ciertos líquidos (polares o no polares). Existen varios parámetros que pueden influir considerablemente en la medición, tales como el volumen de la gota, la densidad del líquido, la presión de vapor del líquido, el tipo de superficie (rugosa o lisa), el tiempo de equilibrio y la temperatura del laboratorio. A partir de los datos del ángulo de contacto se puede determinar los valores de la energía libre superficial del sólido, junto con sus componentes polar y dispersiva [41].

1.1.6 Hemocompatibilidad.

El contacto de un material extraño con la sangre implica un tipo particular de respuesta por parte del cuerpo. Esta respuesta es de considerable importancia dado que la mayoría de los dispositivos biomédicos implantados en el cuerpo humano entran en contacto directo con la sangre; en consecuencia, los materiales utilizados deben poseer características específicas de biocompatibilidad definida genéricamente como hemocompatibilidad [42].

Al ponerse en contacto con sangre, los materiales con poca o nula compatibilidad sanguínea pueden causar daños al cuerpo a nivel local o a nivel sistémico. El principal daño que se produce en estos casos es la coagulación de la sangre, la cual consiste en la solidificación parcial o total de este líquido. Los coágulos formados se dividen en trombos y émbolos; los primeros son coágulos que permanecen adheridos al área de origen, mientras que los segundos son coágulos que son transportados por el torrente sanguíneo. El émbolo, que se origina en una pared arterial, puede migrar hacia vasos de menor calibre, ocluyéndolos y bloqueando el flujo de sangre a las áreas periféricas; lo anterior puede conducir a la necrosis de los tejidos que ya no reciben sangre [43].

Otros daños resultantes de una mala compatibilidad sanguínea son aquellos que pueden afectar las proteínas, las enzimas y la parte corpuscular de la sangre. Los ejemplos típicos de esto son la hemólisis, es decir, la descomposición de los glóbulos rojos y su inducción para la liberación de plaquetas [44].

La reacción fundamental que conduce a la coagulación de la sangre es la conversión de fibrinógeno, una proteína contenida en la sangre, en fibrina, por una enzima denominada trombina. La fibrina es una proteína que forma una red densa de filamentos insolubles en la que quedan atrapados los glóbulos rojos, las plaquetas y el plasma.

Existen dos mecanismos diferentes de coagulación de la sangre, llamados vía extrínseca y vía intrínseca. La vía extrínseca se activa directamente por daño tisular, lo que provoca la liberación de tromboplastina; en contraste, la vía intrínseca es causada por el contacto de la sangre con una superficie que lleva una carga negativa. La vía intrínseca también puede tener lugar fuera del cuerpo, por ejemplo, cuando la sangre entra en contacto con una superficie cargada negativamente como el vidrio. Tanto la tromboplastina como las superficies cargadas negativamente activan el proceso de coagulación al convertir la protrombina en trombina, que es la fase común de los dos mecanismos [45].

Hay varias características de la superficie de un material que afectan su compatibilidad con la sangre como la rugosidad, la humectabilidad y la carga superficial. De hecho, se ha observado que la sangre se coagula más fácilmente en superficies rugosas que en superficies lisas y, en superficies hidrófobas en lugar de hidrófilas. El efecto trombótico causado por las superficies rugosas probablemente se deba a la mayor área superficial, que exponen a la sangre en comparación con una superficie lisa. Por tanto, las superficies de los materiales que se utilizan en contacto con la sangre deben ser de preferencia lisas. Esto, además de prevenir la coagulación, puede facilitar que los coágulos se desprendan inmediatamente después de su formación, cuando aún son microscópicos, evitando así, que alcancen dimensiones peligrosas.

Un caso muy especial es el que implica el uso de materiales trombogénicos de superficie rugosa para favorecer la coagulación de la sangre en los intersticios porosos. Los tejidos de fibra polimérica utilizados en la construcción de prótesis vasculares son un ejemplo de estos materiales. Su uso evita la salida inicial de sangre de la prótesis y permite el posterior crecimiento de tejido endotelial dentro de la prótesis. Los metales y las cerámicas no tienen carga superficial intrínseca, mientras que los polímeros tienen cargas superficiales que dependen del tipo de grupos funcionales presentes, por lo que se han desarrollado varios métodos para obtener nuevos materiales no trombogénicos o para mejorar la trombogénicidad de los conocidos [46].

Para evaluar la hemocompatibilidad de los dispositivos o materiales médicos, sobre sangre y/o los componentes sanguíneos, se han considerado 5 categorías de pruebas indicadas en la norma ISO 10993-4 para la evaluación de la hemocompatibilidad, las cuales abarcan la agregación plaquetaria, hemólisis, coagulación, hematología e inmunología (complemento y leucocitos) [47].

1.2 Antecedentes.

El foto injerto es un método para la modificación de la superficie de biomateriales que se destaca por su simpleza, eficiencia y rentabilidad; además, el foto injerto puede mejorar muchas propiedades de los materiales biomédicos como la hemocompatibilidad, la hidrofiliidad, la humectabilidad y la citocompatibilidad, entre otros, mediante el injerto de una variedad de grupos funcionales en la superficie del material.

Anteriormente, el PLA se ha copolimerizado con el polietilenglicol (PEG) para preparar copolímeros en bloques PLA-b-PEG con diferentes contenidos de PEG, resultando en la disminución del ángulo de contacto con el agua de 79.0° a 33.5° cuando el contenido de PEG aumentó [48]. También se ha sintetizado un copolímero por injerto anfifílico PLA-g-PAA mediante la combinación de polimerización por adición-fragmentación y transferencia de cadena reversible (RAFT), polimerización por apertura de anillo (ROP) y copolimerización por injerto. El copolímero mostró un comportamiento de micelización sensible al pH y capacidad de auto ensamblarse en microesferas bajo ciertas condiciones, abriendo posibilidad a la liberación controlada de fármacos [49].

Por otra parte, tratándose del injerto de grupos funcionales a las superficies poliméricas, Janorkar et al. [50] estudiaron la introducción de grupos amina en la superficie de una película de PLA mediante injerto foto inducido, utilizando la 4,4'-diaminobenzofenona, para crear arquitecturas ramificadas que contenga grupos amino en las capas injertadas. Estas arquitecturas

fueron creadas mediante reacciones posteriores mediadas por carbodiimida con ácido succínico y tris (2-aminoetil) amina. Se midió la adhesión y la viabilidad de fibroblastos MC3T3 y se observó que ambos parámetros mejoraron con el injerto de los grupos amino.

Edlund *et al.* [25] utilizaron foto injerto para unir covalentemente poliacrilamida, poli anhídrido maléico o poli N-vinil pirrolidona a superficies de películas de poli(ácido láctico). En cada caso, la película de PLA se expuso a la mezcla del monómero a injertar y benzofenona, en fase de vapor, con irradiación UV a 50°C. El grado de injerto y la humectabilidad de cada película aumentaron con el tiempo de irradiación UV. Los valores del ángulo de contacto cambiaron de 80° a 50° para el injerto de poli (anhídrido maléico), hasta 3° para el injerto de poliacrilamida y a 25° para el injerto de poli (N-vinil pirrolidona) con 30 min de irradiación. De igual manera, Källrot *et al.* [51] observaron que las películas de PLA foto injertadas con poli (N-vinil pirrolidona), en fase de vapor, proporcionaron un buen sustrato para que se adhirieran y proliferaran dos tipos de células humanas de piel: queratinocitos y fibroblastos.

Por otra parte, Zhu *et al.* [52] estudiaron la adhesión de condrocitos sobre sustratos de poliácido láctico injertado con poli (ácido metacrílico) (PLA-g-PMAA). Ellos encontraron que el ángulo de contacto en agua óptimo, es decir en donde se tuvo mayor proliferación de condrocitos, fue de 76° (con una densidad de grupos carboxilo de 3.8×10^7 mol/cm²). Cuando la densidad de grupos carboxílicos (COOH) en la superficie de este material se incrementó hasta 12.6×10^7 mol/cm², el ángulo de contacto en agua disminuyó a 65° (es decir, se hizo más hidrofílico), pero el PLA-g-PMMA exhibió una muy pobre adhesión y proliferación de condrocitos. Interesantemente, cuando la copolimerización por injerto fue iniciada por otro método (Fe²⁺ en lugar de UV, utilizado en el caso anterior), el PLA-g-PMMA obtenido mostró una mejor adhesión y proliferación de condrocitos a pesar de exhibir un ángulo de contacto en agua de 52° (o sea, más hidrofílico) y una densidad de grupos carboxílicos de 1.8×10^7 mol/cm² (menor que el reportado previamente como óptimo, de 3.8×10^7 mol/cm²).

Zhu, *et al.* [53] sintetizaron un complejo de gelatina (gel) con acil quitosano N-maléico (NMCS) mediante interacción hidrófoba, y posteriormente foto injertaron este complejo (gel/NMCS) sobre la superficie del PLA para mejorar su biocompatibilidad con células endoteliales. El PLA modificado con gel/NMCS mostró un ángulo de contacto de $52 \pm 1.2^\circ$ y mejoró la propagación y aplanamiento de células endoteliales obtenidas de vena umbilical humana (HUVEC) promoviéndose la expresión de la CD31 (molécula de adhesión de células endoteliales de plaquetas) y el Vwf (factor de Von Willebrand: glucoproteína de la sangre que interviene en el momento inicial de la hemostasia), de manera más estructurada que en superficies de PLA sin modificar. Al mismo tiempo, la retención celular fue 1.6 veces mayor en la

superficie del PLA-gel/NMCS, comparado con el PLA sin modificar, lo que demostró una mejor hemocompatibilidad.

Como se puede apreciar de la revisión previa, aunque la modificación superficial del PLA con injerto de diversos grupos funcionales se ha estudiado, los parámetros de reacción del PLA-g-AA que mantienen hemocompatibilidad no han sido ampliamente abordados, por lo que se ha encontrado en esto un nicho de oportunidad muy interesante.

En este trabajo, se plantea realizar el foto injerto de ácido acrílico sobre películas de PLA, con la intención de mejorar el balance hidrofílico/hidrofóbico de la superficie del material, manteniendo su naturaleza no hemolítica, y agregación plaquetaria no trombótica, lo cual podría conducir a ampliar sus posibilidades de aplicación en dispositivos biomédicos implantables.

HIPÓTESIS

La modificación superficial de películas de poli (ácido láctico), PLA, mediante el foto injerto de ácido acrílico mejora el balance hidrofóbico/hidrofílico de los sustratos, manteniendo una hemocompatibilidad adecuada, tomando como referente la hemólisis y agregación plaquetaria.

OBJETIVOS

1.3 Objetivo General.

Estudiar el efecto que tiene el foto injerto de ácido acrílico (AA) sobre la superficie de películas de poli (ácido láctico) (PLA), e investigar la relación que esto guarda con las propiedades fisicoquímicas y hemocompatibles de este polímero.

1.4 Objetivos Específicos.

1. Foto injertar ácido acrílico (AA) sobre películas de poliácido láctico (PLA).
2. Caracterizar los sustratos injertados, y sin modificar, mediante técnicas analíticas como FTIR-ATR, DSC, TGA, AFM, SEM, TBO y ángulo de contacto.
3. Estudiar las propiedades hemocompatibles de los sustratos obtenidos mediante hemólisis y agregación plaquetaria.
4. Correlacionar las propiedades superficiales de los distintos sustratos obtenidos (composición, balance hidrofílico/hidrofóbico) con sus propiedades hemocompatibles.

CAPÍTULO II - MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales.

En este estudio se utilizó poli (ácido láctico) PLA 2002D de NatureWorks LLC (Minnetonka, MN, USA) en forma de pellets, para la obtención de las películas. Para las reacciones de fotoinjerto se utilizó benzofenona al 99% como activador y ácido acrílico al 99% como monómero. Los disolventes utilizados fueron etanol (C_2H_5OH) grado reactivo con una pureza de 99.5% y diclorometano al 99.8% (Cl_2CH_2). Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron obtenidos de Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

Preparación del material.

Para la obtención de las películas de PLA se utilizaron cajas de Petri de 90 mm de diámetro x 15 mm de alto, las cuales fueron sometidas a un proceso de limpieza con metanol y posteriormente lavadas con abundante agua destilada, secadas a temperatura ambiente y finalmente en una estufa de convección a 100°C.

Por otro lado, se disolvieron 0.5 g de PLA en 10 mL de diclorometano durante 15 minutos a 300 rpm, para después verterse en la caja de Petri seca, manteniendo todo el sistema durante 24 h, en un ambiente cerrado, para permitir la evaporación adecuada del disolvente.

2.2 Foto injerto de ácido acrílico.

Se cortaron muestras (3 cm x 1 cm) de las películas obtenidas; para la modificación superficial del sustrato se realizó un proceso de 2 pasos:

En el primer paso, las películas fueron colocadas en 12.6 mL de solución etanólica de benzofenona (BP) al 5% w/w, permitiendo que dicha solución cubriera totalmente a la película durante 5 minutos. Seguidamente, y bajo atmósfera inerte para evitar que los sitios de activación generados por la BP reaccionaran con el oxígeno, las muestras fueron transferidas a distintos viales sin etanol, los cuales se sellaron usando Parafilm.

Las muestras se expusieron a irradiación UV durante 10 minutos utilizando una lámpara 12-LED/UV Lamp Z17, de 36 W con un intervalo de longitudes de onda de 365-405 nm. Posteriormente, cada muestra se agitó en etanol durante 10 min a 120 rpm para eliminar la benzofenona sin reaccionar y se dejaron secar a temperatura ambiente.

De forma general, en este paso, durante la excitación alcanzada por la irradiación UV, el fotoiniciador al absorber luz es promovido al estado excitado singlete (S), el cual por un rápido proceso de cruce intersistema pasa al estado triplete (T), el cual es capaz de abstraer un átomo

de hidrógeno del sustrato polimérico y crear un macroradical activo sobre el sustrato y un radical de la BP conocido como semipinacol durante la fase de foto reducción.

A partir de este estado electrónicamente excitado, de mayor tiempo de vida, se producen los radicales primarios (R) capaces de reaccionar con la molécula de monómero (M) e iniciar la polimerización

En el segundo paso, las películas activadas con BP se colocaron en distintos tubos de ensayo con una solución etanólica de ácido acrílico (AA) al 10% v/v. Cada tubo de ensayo se purgó con nitrógeno y se expuso a radiación UV durante 10, 20, 30, 60 y 180 minutos [54].

En esta etapa, el macro radical activo, obtenido de la foto reducción anterior, iniciará la polimerización por un mecanismo de radicales libres y, el radical semipinacol iniciará la homopolimerización del monómero durante la fase de iniciación. Para la fase de propagación, la adición del monómero de AA sobre el macro radical iniciará el centro reactivo, y mientras se sigan adhiriendo más moléculas de monómero, se propagará continuamente la cadena polimérica.

Por último, la terminación de la cadena se dará por distintas reacciones entre el extremo de la cadena en crecimiento con un radical libre o por la unión de los extremos de dos cadenas en crecimiento simultaneo.

En la Figura 2.1 se muestra un esquema del procedimiento de reacción.

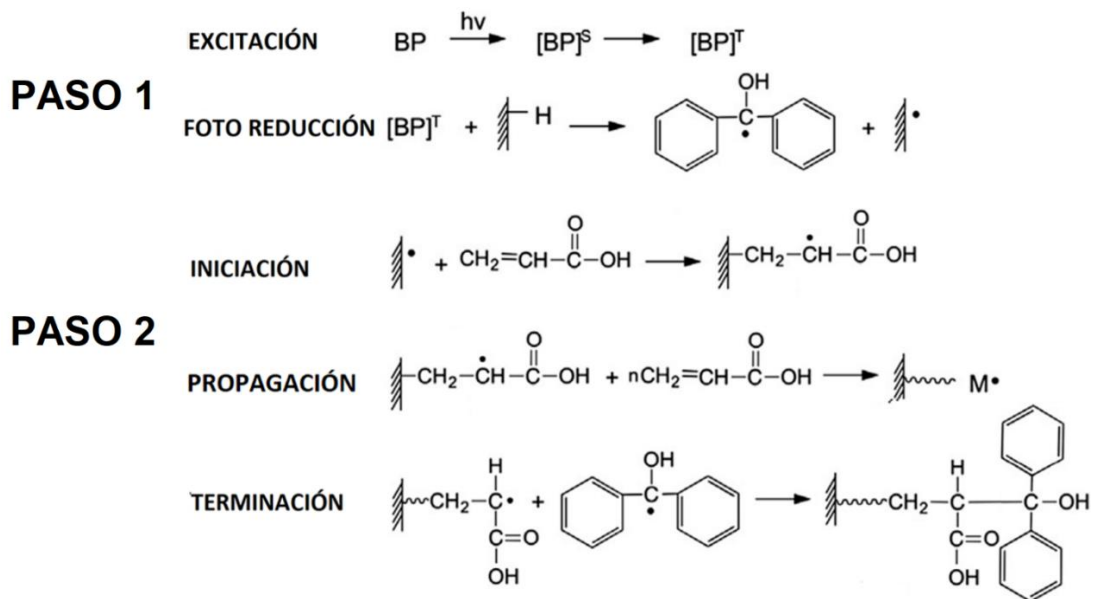


Figura 2.1 Representación esquemática de la reacción del injerto foto inducido del ácido acrílico sobre la superficie del poli(ácido láctico) [54].

Después de la irradiación, el sustrato se agitó en etanol durante 10 minutos a 120 rpm, para eliminar el monómero no injertado. Se preparó una película de control, únicamente de PLA, sin realizar la activación de la BP (primer paso) ni el foto injerto del monómero (segundo paso).

2.3 Caracterización fisicoquímica.

2.3.1 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier, en modo reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).

Los materiales sin modificar y modificados fueron caracterizados mediante análisis de FTIR-ATR, usando un cristal de ZnSe. Los espectros fueron obtenidos en un equipo Nicolet 8700 (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) en el modo de absorbancia, utilizando un promedio de 100 barridos, una resolución de 4 cm^{-1} , en un intervalo de número de onda de $4000\text{ a }650\text{ cm}^{-1}$.

2.3.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

El estudio por DSC se llevó a cabo en un DSC-7 de la marca Perkin Elmer, en un intervalo de temperatura de $50\text{ a }200^{\circ}\text{C}$, a una rapidez de calentamiento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Las muestras se colocaron en charolas de aluminio para su análisis. Esta técnica permitió determinar la temperatura de fusión (T_m), la temperatura de cristalización (T_c) y la temperatura de transición vítrea (T_g) de los materiales.

2.3.3 Análisis termogravimétrico (TGA).

Los análisis de termogravimetría fueron realizados en un analizador termogravimétrico TGA-7 Perkin Elmer, utilizando un intervalo de temperatura de $50\text{ a }650^{\circ}\text{C}$, y una rampa de calentamiento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ en una atmósfera de nitrógeno.

2.3.4 Ángulo de contacto.

El ángulo de contacto de los materiales fue medido por el método de la gota sésil, usando un goniómetro óptico (Ramé-hart 250-U1, USA) y una micropipeta. Una gota de agua destilada de $5\ \mu\text{L}$, fue aplicada sobre las muestras irradiadas y sin irradiar, realizando mediciones en tiempos de 1 a 10 segundos posteriores a la colocación de la gota y obteniendo un promedio entre éstas.

2.3.5 Método colorimétrico de azul de o-toluidina (TBO) para la determinación de la concentración de grupos carboxílicos.

La concentración de los grupos COOH en la superficie de los materiales, de control y sometidos a la modificación, se determinó por el método colorimétrico azul de o-toluidina (TBO).

Para esto, se añadió un mililitro de una solución acuosa de TBO 0.5 mM a muestras de 1cm² y se ajustó a pH 10 con NaOH 0.01 M. Se permitió la formación de complejos iónicos entre los grupos COOH de las cadenas injertadas durante 20 h con agitación constante a temperatura ambiente. Se utilizó NaOH 0.01 M para eliminar las moléculas de TBO no complejadas. El TBO se desorbió incubando cada muestra en 2 mL de una solución de ácido acético al 50% durante 1h. La cantidad de AA injertado en la superficie (expresada en términos de la concentración de los grupos COOH en la superficie del PLA) se calculó a partir de la densidad óptica del tinte desorbido a 633 nm. Previamente se elaboró una curva de calibración para concentraciones conocidas de TBO.

2.3.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Las micrografías de SEM fueron obtenidas mediante un microscopio electrónico de barrido, marca JEOL, modelo JSM 6360LV. Las imágenes fueron tomadas en diferentes zonas del sustrato utilizando una magnificación de 5000x y un potencial de aceleración de 10-20 kV. Para la preparación de la muestra se colocó el sustrato (1 cm²) sobre una cinta de carbono montada en un soporte metálico y se recubrió con una ligera capa de oro/paladio durante 30 s para permitir la obtención de las imágenes.

2.3.7 Microscopía de fuerza atómica (AFM).

Las imágenes de AFM se obtuvieron en un microscopio de fuerza atómica (SPM, Ambios Universal, USA) usando una punta de Si-N en cantiléver en modo no contacto. Las imágenes de cada muestra (1 cm²) fueron tomadas en zonas diferentes con una resolución de 512 x 512 px². La rugosidad promedio (R_a) fue determinada usando 3 diferentes mediciones con el programa WSxM v5.0 develop 9.1 de Nanotec [55].

2.4 Caracterización biológica.

2.4.1 Ensayo de hemólisis.

La interacción entre los eritrocitos y los sustratos, con y sin modificación, se realizó mediante un ensayo de hemólisis de acuerdo a la norma ISO 10993-4. Las muestras de sangre se recolectaron de donadores voluntarios sanos utilizando tubos Vacutainer (7.2 mg K2 EDTA, Becton Dickinson). Los experimentos se realizaron por quintuplicado en sustratos de PLA y PLA-g-AA previamente esterilizados con PBS durante 18 h.

Para cada experimento se utilizó muestras de 1 cm², las cuales se pusieron en contacto con 1 mL de una solución salina de eritrocitos al 5% v/v y se incubaron a 37°C durante 1 h. Posteriormente, las soluciones fueron centrifugadas durante 10 min, a 1500 rpm y 20°C (Scientific Centurion) obteniéndose 12.5 µL del sobrenadante. La hemoglobina liberada de los eritrocitos se cuantificó usando un espectrofotómetro UV-VIS a 415 nm. El porcentaje de hemólisis se calculó usando la ecuación 2.1:

$$\text{Hemólisis (\%)} = \frac{Abs_{exp} - \overline{Abs_{c-}}}{\overline{Abs_{c+}} - \overline{Abs_{c-}}} \times 100 \quad (2.1)$$

Donde Abs_{exp} indica el valor de la absorbancia en cada experimento, $\overline{Abs_{c+}}$ representa el valor promedio del control positivo (agua destilada), mientras que $\overline{Abs_{c-}}$ corresponde al promedio de la absorbancia medida al control negativo (solución salina).

2.4.2 Agregación plaquetaria.

Para evaluar el comportamiento de las plaquetas en los sustratos de PLA injertado con AA a diferentes tiempos, se realizó un ensayo de agregación plaquetaria de acuerdo a la norma ISO 10993-4. Muestras de sangre se recolectaron de donadores voluntarios sanos utilizando tubos BD Vacutainer con citrato de sodio 3.2% (7.2 mg K2 EDTA, Becton Dickinson).

Se utilizaron muestras de 1 cm², las cuales se pusieron en contacto con 100 µL de una solución salina de plasma rico en plaquetas al 20% v/v y se incubaron a 37°C durante 1 h. Como control positivo se utilizó plasma rico en plaquetas (PRP) adicionado con fibrogel colágena y solución salina, mientras que para el control negativo se añadió plasma pobre en plaquetas (PPP). Posteriormente, se extrajeron 20 µL de la solución depositada en cada muestra, para realizar un frotis sobre un portaobjetos y su consecuente tinción de Giemsa.

Utilizando un equipo para tinción de frotis sanguíneo (Wright, HYCEL) se tiñeron cada una de las muestras y, finalmente, se realizó su análisis cualitativo mediante microscopía óptica. La cuantificación de las plaquetas agregadas en cada una de las muestras se realizó mediante el análisis de pixeles utilizando el software ImageJ.

CAPÍTULO III - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Foto injerto de ácido acrílico sobre las películas de PLA.

Primeramente, se obtuvieron películas de PLA mediante la técnica de evaporación de disolvente; para esto se depositó una solución de PLA en diclorometano al 5% w/v, en cajas Petri, manteniendo éstas a 25°C, en un ambiente cerrado, durante 24 h para permitir la lenta evaporación del disolvente. Una vez obtenidas las películas, éstas fueron retiradas del ambiente cerrado y secadas a 60°C, en una estufa de vacío.

Como primer paso del fotoinjerto, muestras de las películas de 3 x 1 cm se colocaron en una solución etanólica de benzofenona al 5% w/w durante 5 minutos. Seguidamente, la muestra se retiró de la solución para transferirse, bajo atmósfera inerte, a un vial el cual fue irradiado por 10 min (Figura 3.1). Por último, la muestra se colocó durante 10 min en 20 mL de etanol, con agitación constante (120 rpm), y después de esto se retiró y se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente.

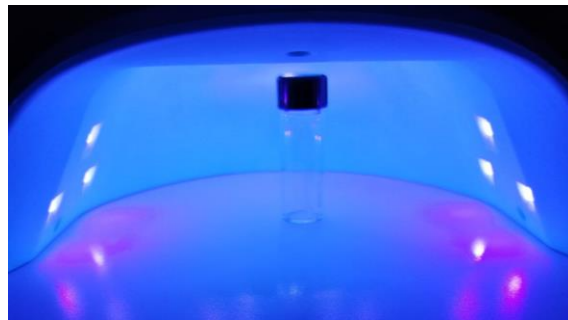


Figura 3.1 Proceso de activación de la superficie del PLA con benzofenona por irradiación UV.

Cabe mencionar que durante este primer paso del fotoinjerto, el fotoiniciador (BP) adquirió la energía necesaria, al absorber luz UV, para ser promovido del estado singlete al estado triplete, por el proceso de cruce intersistema, lo cual creó un macroradical activo sobre el sustrato y un radical de la BP conocido como semipinacol, los cuales son capaces de reaccionar con la molécula del monómero a injertar (AA) e iniciar la polimerización.

Continuando con el segundo paso del fotoinjerto, la muestra se colocó en un tubo de ensayo que contenía una solución etanólica de ácido acrílico al 10% v/v, el cual fue purgado con flujo de nitrógeno por 2 minutos y, después, irradiado durante los tiempos propuestos: 10, 20, 30, 60 y 180 min (Figura 3.2). Por último, la muestra se retiró del tubo de ensayo y fue colocada en 20 mL de etanol, durante 10 min, con agitación constante (120 rpm) para remover el ácido acrílico que no se injertó. Finalmente, la película se dejó reposar 24 h, a temperatura ambiente, para permitir la evaporación del disolvente y luego secada a 60°C en una estufa de vacío.

En este paso, el macro radical activo (obtenido del proceso anterior) inició la polimerización por un mecanismo de radicales libres, mientras que el radical semipinacol comenzó la homopolimerización del monómero durante la fase de iniciación. Para la fase de propagación, la adición del monómero de AA, durante el tiempo de foto injerto establecido, continuó el crecimiento de la cadena polimérica. La terminación de la cadena ocurrió por distintas reacciones entre el extremo de la cadena en crecimiento con un radical libre, o por la unión de los extremos de dos cadenas en crecimiento simultaneo.

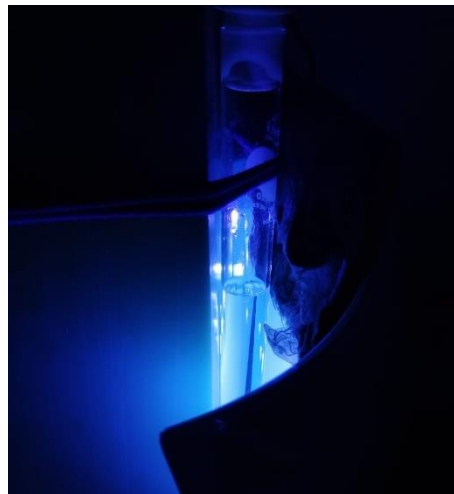


Figura 3.2 Proceso de foto injerto de ácido acrílico sobre PLA, utilizando irradiación UV.

En la Figura 3.3, se presentan las muestras después de los diferentes tiempos de irradiación.

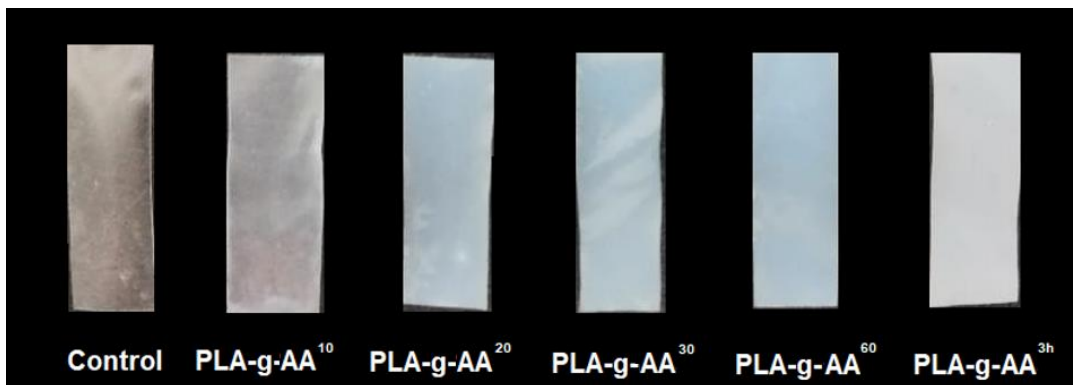


Figura 3.3 Películas de PLA foto injertadas con AA a diferentes tiempos.

3.2 Caracterización fisicoquímica.

3.2.1 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier, en modo de reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).

La Figura 3.4 muestra los espectros de FTIR de las películas de PLA injertadas a diferentes tiempos. De manera general se puede observar que los espectros de las películas fotoinjertadas son muy similares al obtenido de la película sin modificar. En todos los espectros se pueden observar tres bandas de considerable intensidad; la primera de ellas, alrededor de 1750 cm^{-1} , corresponde a la vibración de tensión del enlace carbonilo C=O; la segunda, a 1180 cm^{-1} , está asociada a la vibración de tensión asimétrica del enlace COC y, por último, la banda alrededor de 1080 cm^{-1} muestra la tensión simétrica del enlace COC. Además, se observan 2 bandas de menor intensidad a 2996 cm^{-1} y 2944 cm^{-1} las cuales corresponden a la tensión asimétrica y simétrica de los grupos metilos y metilenos de la estructura del PLA. La banda a 1450 cm^{-1} corresponde a la vibración de flexión y/o deformación del grupo CH_3 . Alrededor de 1383 cm^{-1} se encuentra la banda que representa la deformación (vibración de flexión) de tijera del grupo CH_3 .

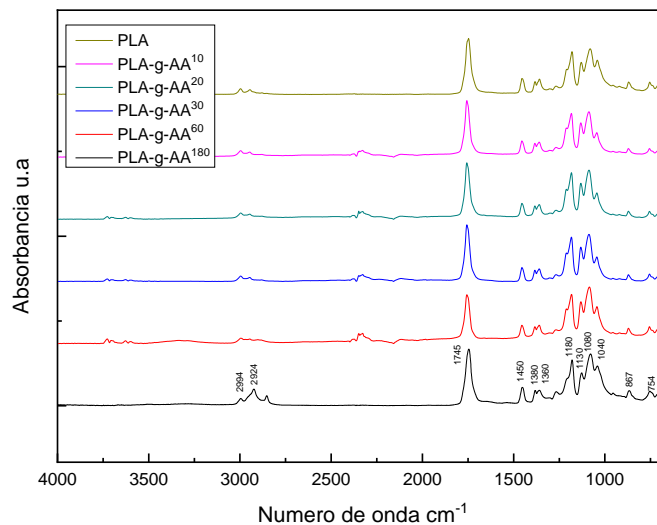


Figura 3.4 Espectros FTIR de las películas de PLA injertadas a diferentes tiempos.

A pesar de no observar cambios significativos entre los espectros de IR de las muestras tratadas y la no tratada, se realizó un análisis más detallado de los espectros, y éste es presentado en la Figura 3.5, en donde se presentan los espectros normalizados de la muestra control (PLA sin irradiar) y la muestra con el mayor tiempo de irradiación (la normalización se realizó tomando como referencia la banda de carbonilos). Al comparar los espectros de FTIR de ambas películas de PLA, se puede observar la reducción en la intensidad de las señales

presentes en la muestra tratada a 1180 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento de C-O-C; a 1079 cm^{-1} , asociado al aumento en la cantidad de enlaces C-O asociados a grupos oxigenados generados durante el injerto y; a 1041 cm^{-1} , relacionada con el estiramiento C-O, en comparación con la película sin tratar. Además de lo anterior, también se puede observar una disminución en las intensidades de las señales entre $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ lo cual puede atribuirse a que, durante el proceso de foto injerto del ácido acrílico, la cadena principal del PLA se rompe para reaccionar con el AA, disminuyendo la cantidad grupos metilos en la superficie de las muestras. De igual manera existe una variación en las intensidades de las bandas entre $1225\text{-}950\text{ cm}^{-1}$, las cuales aumentan en presencia de grupos polares y aparecen en función del número de hidrógenos presentes.

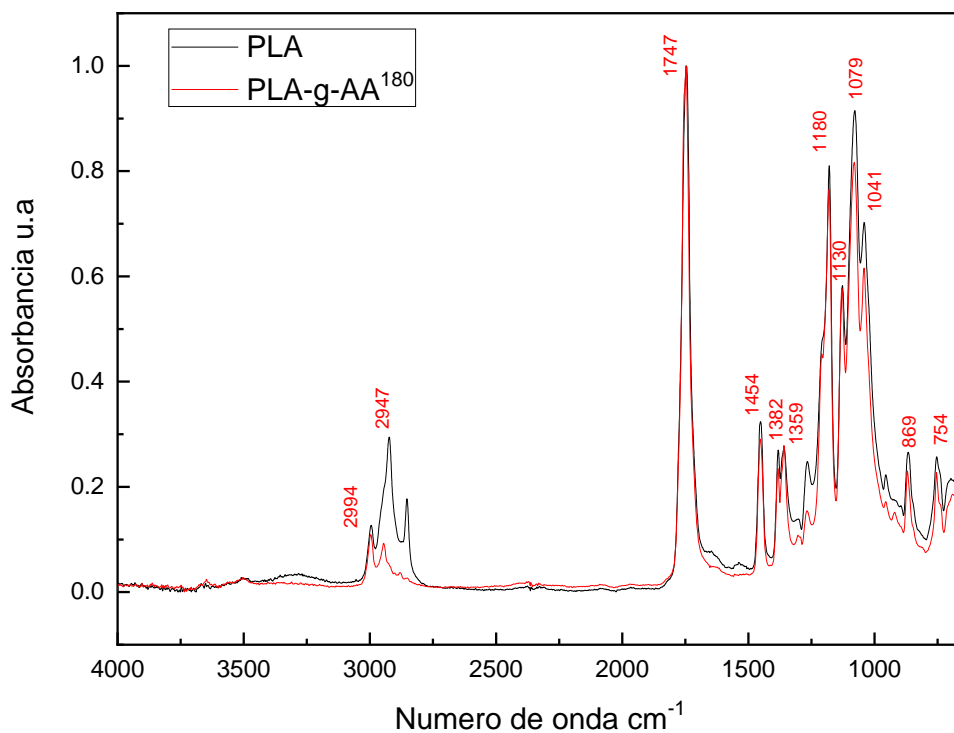


Figura 3.5 Espectros (FTIR) de la muestra de PLA e injertada 180 minutos.

Debido a que el grupo funcional preponderante del AA (monómero utilizado en la reacción de fotoinjerto) es el carbonilo, también se realizó un análisis más detallado de esta banda en los espectros de FTIR de la película sin injertar e injertada a diferentes tiempos. Este análisis mostró que la banda de carbonilos, ubicada originalmente a 1747 cm^{-1} en la muestra no irradiada, se desplaza ligeramente a mayores números de onda ($\sim 1755\text{ cm}^{-1}$) además de presentar un hombro, lo cual es indicativo de que existe una contribución de grupos carbonilo que se traslapa con la original y que no estaba presente en la muestra original (no fotoinjertada).

Interesantemente, la razón de intensidades entre las contribuciones parece cambiar a medida que lo hace el tiempo de fotoinjerto.

Las relaciones de intensidades de las señales (PIR, por sus siglas en inglés) de los carbonilos, es decir, el área de la señal a 1745 cm^{-1} dividida por el área de la señal a 1755 cm^{-1} de la película de PLA de control, así como de las muestras activadas con benzofenona y expuestas a irradiación UV en solución etanólica de ácido acrílico al 10% v/v se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Relaciones de intensidades de las señales (PIR) para el carbonilo en 1750cm^{-1} .

Muestra	Área Carbonilo 1 ~1745cm⁻¹	Área Carbonilo 2 ~1755cm⁻¹	PAR Carbonilo 1 /Carbonilo 2
PLA	0.78	1	0.78
PLA-g-AA¹⁰	0.80	0.86	0.93
PLA-g-AA²⁰	0.93	1	0.93
PLA-g-AA³⁰	0.93	1	0.93
PLA-g-AA⁶⁰	0.93	1	0.93
PLA-g-AA¹⁸⁰	1	0.94	1.06

Estos resultados indican que el injerto de grupos carboxílicos, provenientes del ácido acrílico, sobre las películas de PLA aumenta conforme se incrementa el tiempo del fotoinjerto, exhibiendo una mayor cantidad de grupos carboxílicos para la muestra sometida a 180 min del tratamiento. Cabe señalar que, para confirmar la presencia de estos grupos en la superficie de las muestras tratadas, se utilizó un método colorimétrico específico para la cuantificación de grupos carboxílicos como lo es el TBO, así como la determinación de la humectabilidad de la superficie (la presencia de grupos COOH en la superficie de la película debería aumentar su humectabilidad, debido a éstos son de naturaleza polar).

3.2.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

El análisis por DSC se realizó para determinar el efecto que tiene el fotoinjerto del ácido acrílico sobre la cristalinidad y las transiciones térmicas de los sustratos. En la Figura 3.6, se presentan los termogramas correspondientes al PLA sin modificar y modificados por fotoinjerto, en los cuales se aprecian la transición vítrea, la temperatura de cristalización y la temperatura de fusión de todas las muestras y cuyos valores se resumen en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Transiciones térmicas de las películas de PLA injertadas a diferentes tiempos y sin injertar.

Muestra	Tg (°C)	Tc (°C)	Tm (°C)
PLA (control)	62	126	151
PLA-g-AA ¹⁰	60	124	151
PLA-g-AA ²⁰	57	124	147
PLA-g-AA ³⁰	59	127	151
PLA-g-AA ⁶⁰	62	128	152
PLA-g-AA ^{3h}	60	125	151

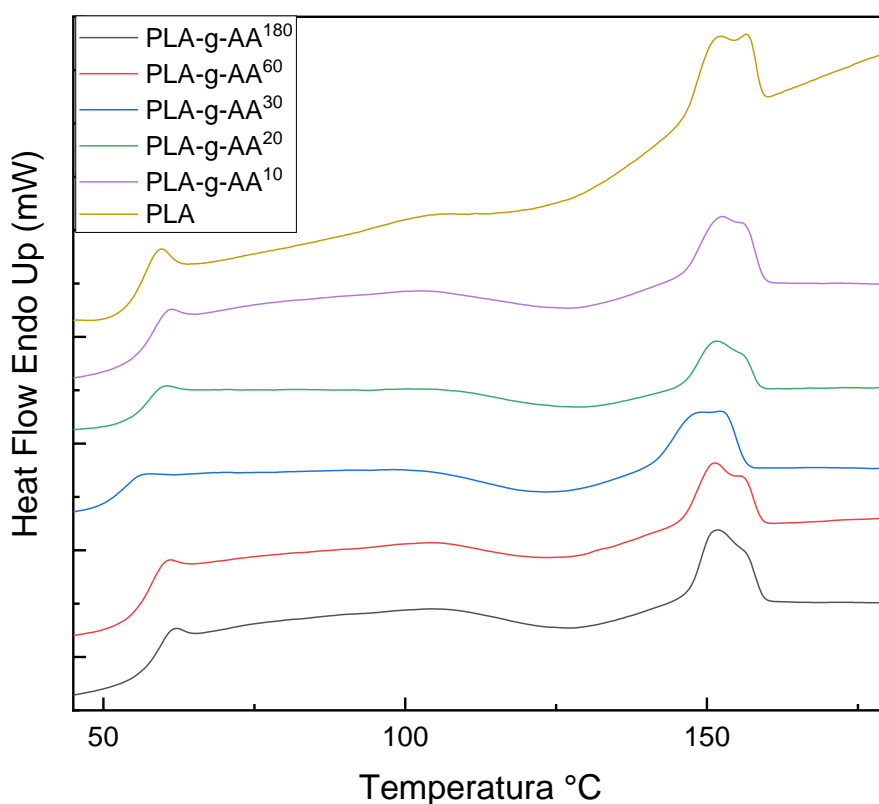


Figura 3.6 Termogramas de DSC de las películas de PLA injertadas a diferentes tiempos y sin injertar.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que el injerto de ácido acrílico no tiene un efecto significativo en las transiciones térmicas del PLA, dado que no se encontró que las diferencias registradas fueran significativas, tomando como referencia la resolución de la técnica analítica utilizada. De igual manera, aunque pudiese esperarse un cambio en dichas transiciones debido a la incorporación de los grupos carboxílicos a la cadena del PLA, también se debe señalar

qué esto podría ser netamente superficial, no afectando de manera drástica las propiedades del volumétricas (“bulk”) del polímero.

3.2.3 Análisis termogravimétrico (TGA).

En la Figura 3.7 se presentan los resultados obtenidos del análisis termogravimétrico de las películas de PLA sin modificar y modificadas a diferentes tiempos de irradiación UV. Esta técnica se utilizó para detectar el efecto que tiene la reacción de fotoinjerto sobre la estabilidad térmica del material.

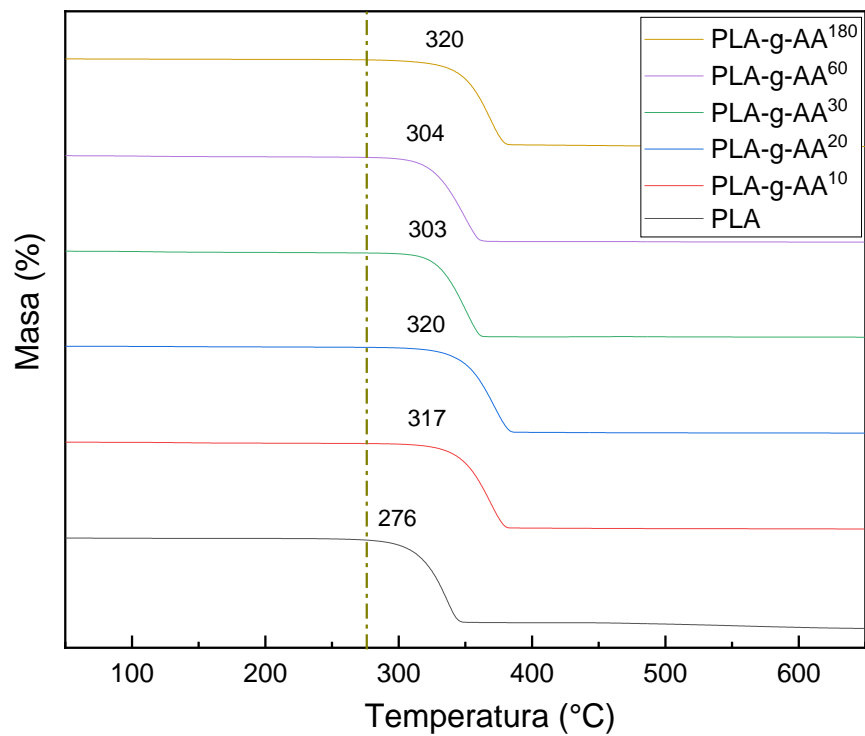


Figura 3.7 Curvas de TGA del PLA y de las muestras injertadas a los diversos tiempos propuestos.

De manera general se puede observar que la estabilidad térmica del material aumenta, al aumentar el tiempo de foto injerto, ya que la temperatura inicial de descomposición (Td onset) aumenta desde los 276°C para el material sin injertar, hasta 320°C para el mayor tiempo de injerto. Esto podría ser debido a que la incorporación del ácido acrílico a la cadena principal del PLA aumenta la estabilidad térmica de los materiales, aunque no puede descartarse la presencia de entrecruzamientos, al haber sido sometidas las muestras a un mayor tiempo de irradiación.

Por otra parte, en las curvas de DTGA (Figura 3.8), también se observó un desplazamiento en los picos de descomposición ($T_d \text{ max}$) a temperaturas más altas con respecto a la muestra de control, cuando se realizó el fotoinjerto, confirmando el aumento en estabilidad térmica discutida anteriormente.

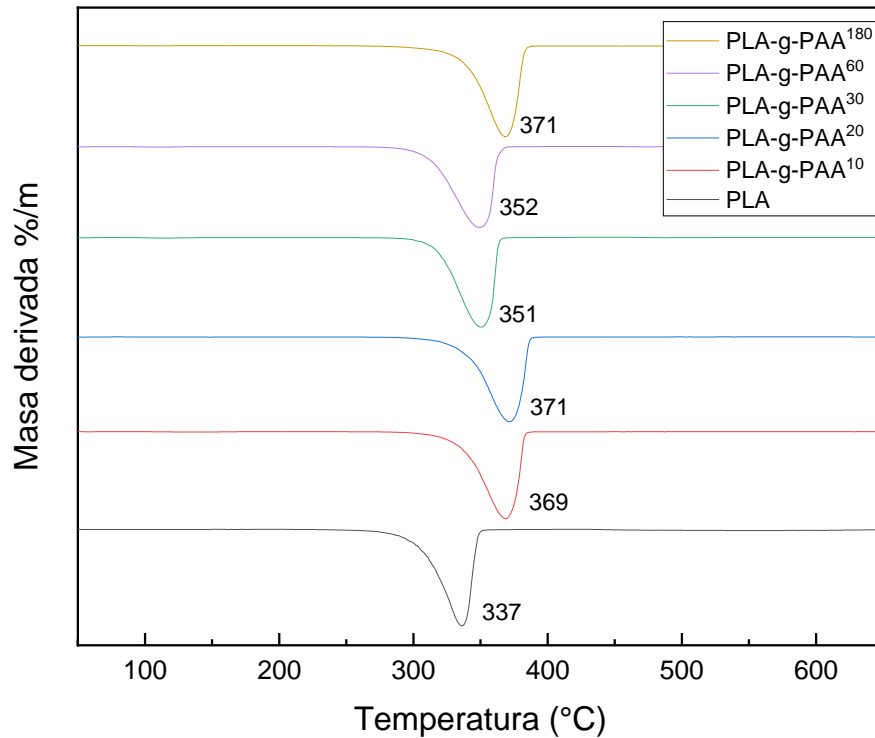


Figura 3.8 Curvas de DTGA del PLA y de las muestras injertadas a los diversos tiempos propuestos.

3.2.4 Ángulo de contacto.

El cambio inducido por las reacciones de fotoinjerto sobre las características superficiales de las películas de PLA fue monitoreada a través de la determinación del ángulo de contacto con agua, como una medida del carácter hidrófilo de las mismas. La película de PLA sin modificación exhibió un ángulo de contacto de $79.8^\circ \pm 1.7$, lo cual confirma su carácter predominantemente hidrófobo, tal y como es reportado en la literatura [54].

Interesantemente se pudo observar que el ángulo de contacto formado entre los sustratos fotoinjertados y el agua destilada disminuyó a medida que aumentó el tiempo de fotoinjerto. Esto puede observarse tanto en las imágenes mostradas en la Figura 3.9, como en los valores graficados en la Figura 3.10, en donde el valor del ángulo disminuye de 79.8° hasta 43.5° para la muestra tratada por 180 minutos (3 horas). Esta tendencia indica claramente un aumento en el carácter hidrófilo de los sustratos que han sido sometidos a la modificación superficial y era en

cierta medida esperada en virtud de que el AA injertado sobre el PLA tiene grupos carboxílicos los cuales son de naturaleza polar.

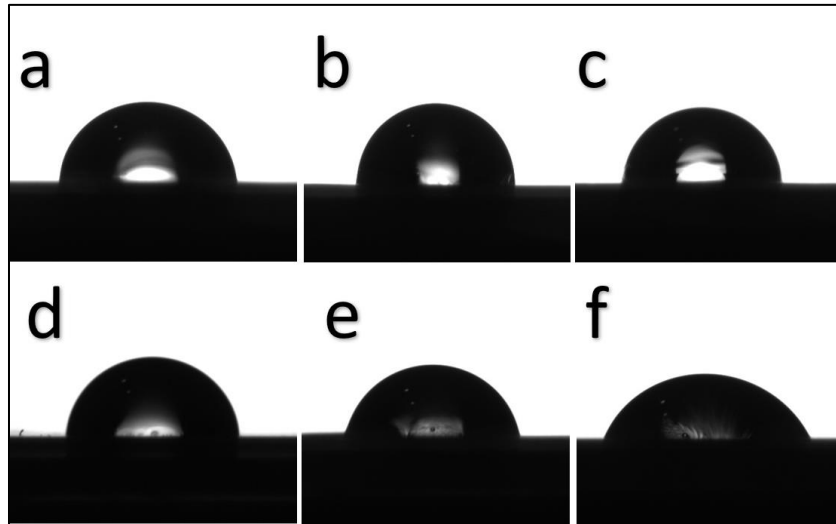


Figura 3.9 Imágenes de las gotas de agua formadas entre ésta y los diferentes sustratos evaluados. Películas de PLA injertadas a: a) 0 min (control), b) 10 min, c) 20 min. d) 30 min. e) 60 min. f) 180 min.

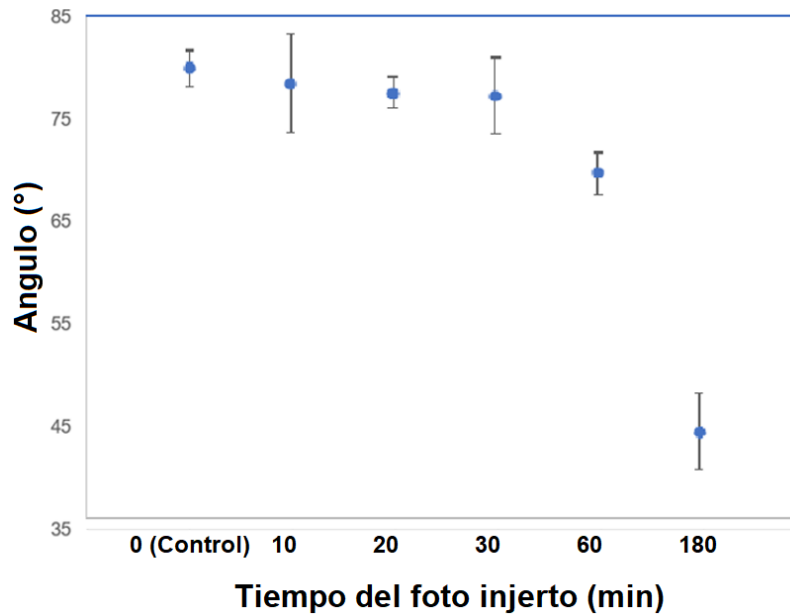


Figura 3.10 Mediciones de ángulo de contacto del PLA y de las muestras injertadas a los diversos tiempos propuestos.

Los resultados obtenidos mediante esta prueba coinciden con lo obtenido por el análisis de FTIR-ATR, en donde se observó la presencia de un grupo carbonilo adicional en las muestras

tratadas, el cual fue atribuido a la existencia de grupos COOH provenientes del ácido acrílico, en la superficie de los sustratos; lo anterior implica que las reacciones de fotoinjerto se llevaron a cabo de manera exitosa.

3.2.5 Método colorimétrico de azul de o-toluidina (TBO) para la determinación de la concentración de grupos carboxílicos.

El fotoinjerto ha sido usado con anterioridad para aumentar el carácter hidrófilo de la superficie de los polímeros mediante la incorporación de grupos que contienen oxígeno tales como los hidroxilos y/o carboxilos. Sin embargo, no se ha esclarecido cuáles de estos grupos generados influyen de manera más notable en la interacción célula-biomaterial. Martins et al. [56] han sugerido que los oxígenos de los grupos COOH son más eficientes en promover esta interacción, en comparación con los grupos ésteres o hidroxilos. Por lo tanto, en este trabajo se decidió determinar la cantidad de los grupos carboxílicos presentes en los sustratos obtenidos, mismos que fueron cuantificados mediante la técnica de TBO. Esta molécula tiene una carga positiva que se puede combinar específicamente con los grupos COOH, por lo que se podría estimar la cantidad generada de estos grupos durante el fotoinjerto, asumiendo que éstos reaccionan estequiométricamente en una relación 1:1 [57]. Este método (TBO) ha sido ampliamente reportado como un enfoque complementario para cuantificar la densidad de grupos carboxílicos presente en la superficie de materiales poliméricos [58, 59].

La densidad de los grupos COOH fue determinada, tanto en los sustratos modificados como en los que no fueron sometidos a la modificación. Los resultados obtenidos muestran que la concentración de los ácidos carboxílicos (en $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$) en las muestras aumenta al incrementarse el tiempo de irradiación UV. Estos incrementos resultaron significativos, para los materiales tratados a tiempos mayores de 30 minutos en comparación con el control (ver Figura 3.11).

Como se puede apreciar, esta técnica no solo confirma que grupos carboxílicos del AA fueron injertados en la superficie del material, sino que también corroboran los resultados obtenidos anteriormente con el FTIR-ATR y la medición del ángulo de contacto, los cuales señalaban que grupos polares COOH eran generados durante el foto injerto.

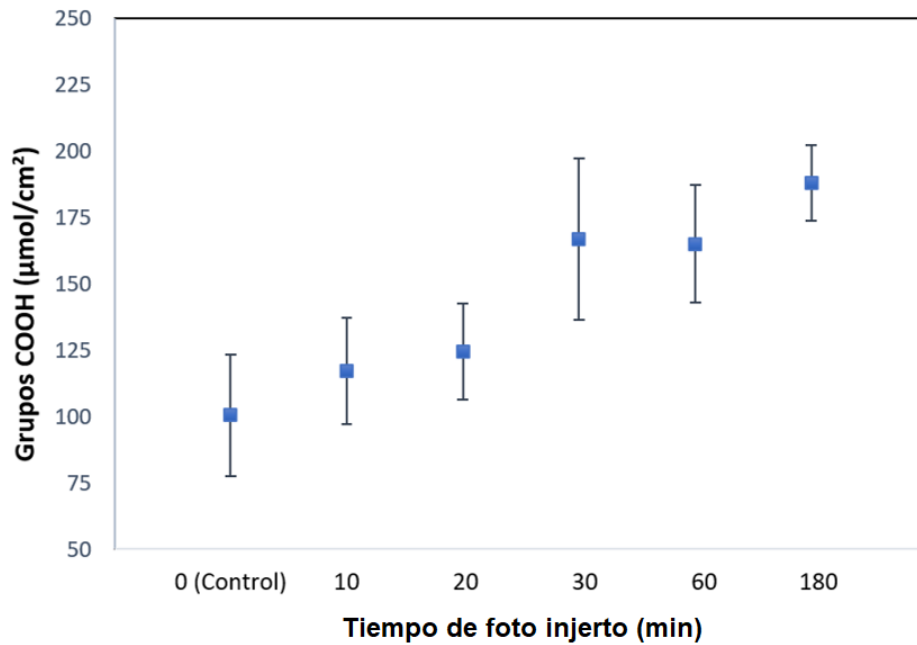


Figura 3.11 Densidad de grupos COOH ($\mu\text{mol cm}^{-2}$) en las películas de PLA injertadas a diferentes tiempos.

3.2.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM).

La Figura 3.12 muestra las micrografías SEM de la superficie de las películas de PLA sin tratamiento (control), comparada con la de las películas injertadas, a los diversos tiempos propuestos. Se puede observar que la muestra de PLA sin modificación presenta una superficie lisa, sin defectos mientras que las micrografías de las muestras tratadas muestran la aparición de estructuras circulares, las cuáles son mayores en número, a medida que aumenta el tiempo de exposición. Estos círculos, observados a una amplificación de 500X, fueron analizados de una manera más cercana, a amplificaciones mayores (1000x y 5000X).

Estos defectos circulares en las muestras tratadas podrían estar asociados con un mecanismo de fractura circular de la película debido al proceso de irradiación. En general los bordes observados en los defectos circulares parecen ser más agudos a medida que se aumenta el tiempo de irradiación, y en consecuencia del injerto de AA alcanzado.

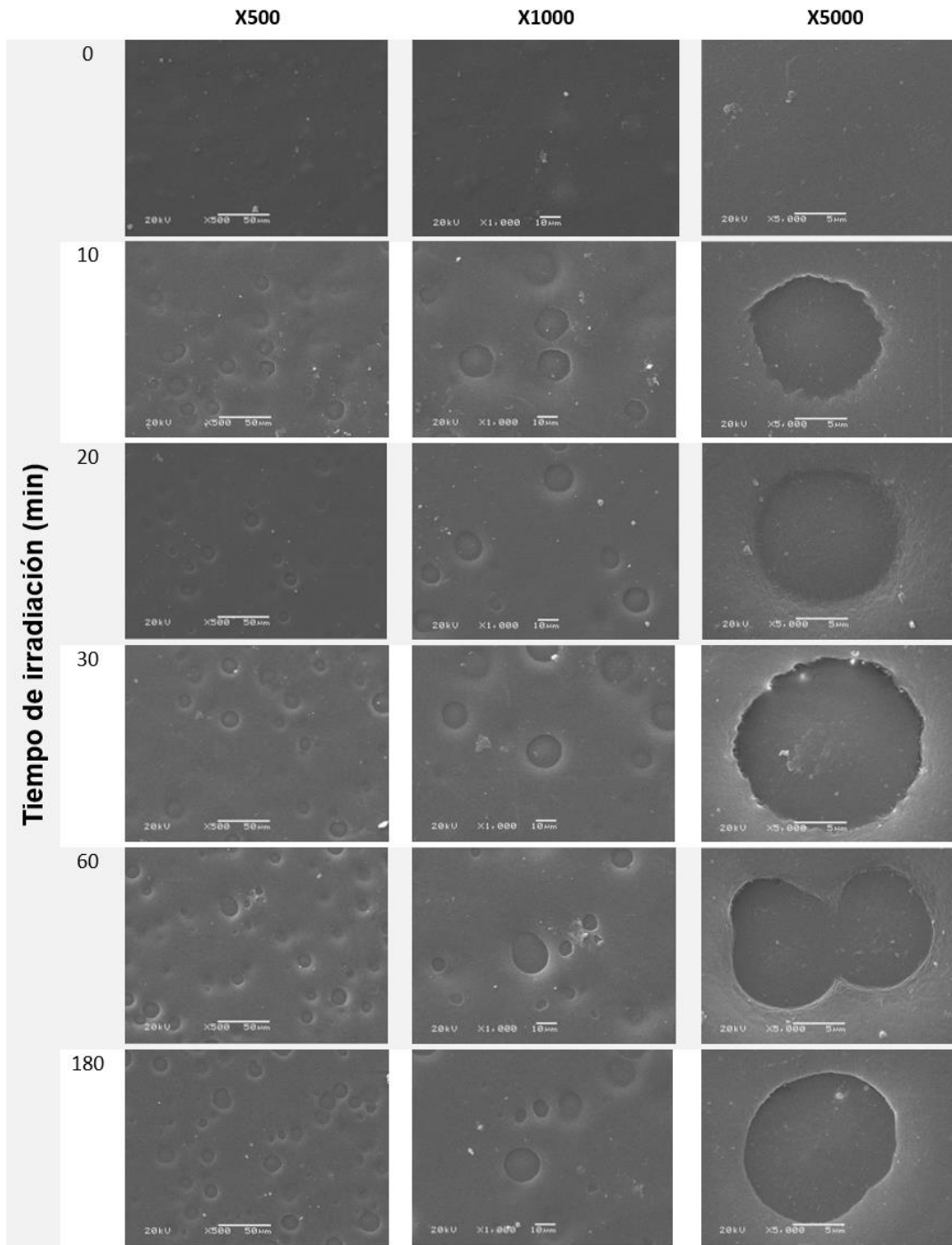


Figura 3.12 Micrografías SEM, del PLA y de las muestras injertadas a los diversos tiempos propuestos.

3.2.7 Microscopía de fuerza atómica (AFM).

Las estrategias actuales para mediar la reacción de los dispositivos biomédicos implantables se centran en reducir la adsorción de proteínas, la adhesión celular inicial, la secreción de citoquinas inflamatorias y la fusión de células gigantes de cuerpo extraño. Con lo anterior, se asumen dos enfoques generales: (1) la modulación de las propiedades químicas y físicas de la superficie del dispositivo y (2) la incorporación de señales bioactivas en el material para mediar en la interacción material-tejido huésped.

Centrándose en el primer enfoque, los diseños de ingeniería de materiales incluyen mejorar distintas propiedades fisicoquímicas entre las que se encuentran: la resistencia al desgaste, humectabilidad, la carga y la cristalinidad de la superficie, la química de la superficie, rugosidad, rigidez del sustrato, y la geometría de los polímeros en dispositivos implantables [60].

Además de los factores fisicoquímicos discutidos anteriormente, la topografía se reconoce cada vez más como un factor importante que influye en la respuesta celular, debido a que se aumenta el área de contacto por la rugosidad del área superficial, por lo que, se resalta la posibilidad de usar la topografía para mediar la reacción del tejido al dispositivo implantable [61-64].

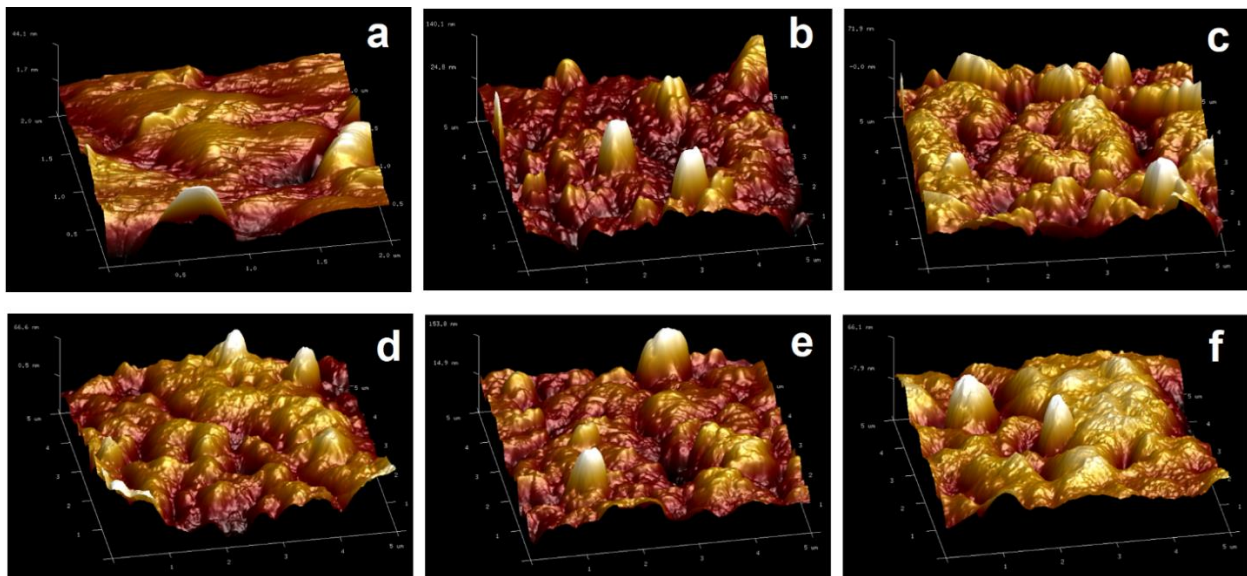


Figura 3.13 Imágenes 3D de AFM de las superficies de los sustratos de PLA injertados: a) 0 min (control), b) 10 min, c) 20 min. d) 30 min. e) 60 min. f) 180 min.

Debido a lo anterior, la morfología de las películas de PLA, antes y después del fotoinjerto se analizó también mediante AFM (Figura 3.13), para observar y analizar las características topográficas de la superficie de las películas tratadas, ya que, como se observó en la sección

anterior (resultados de SEM), el fotoinjerto tiene a formar defectos circulares en las muestra; lo anterior, debe conducir a un aumento en la rugosidad de las muestras, el cual puede ser determinado por esta técnica.

La rugosidad promedio para la muestra de PLA sin tratamiento (control) fue de 17.1 ± 0.3 μm , mientras que para las muestras irradiadas a 10, 20, 30, 60 y 180 min se obtuvieron valores de 22.7 ± 2.4 , 19.7 ± 2 , 26.4 ± 7.2 , 37.4 ± 9.4 , 38 ± 7.2 , respectivamente. Con los datos obtenidos y el análisis de las imágenes, se observa un incremento gradual de la rugosidad superficial de los materiales tratados, en comparación al PLA de control, al aumentar el tiempo de exposición.

3.3 Caracterización biológica.

3.3.1 Hemólisis.

La hemólisis de los eritrocitos consiste en la ruptura de estas células sanguíneas causada por la difusión de agua hacia el interior de la misma cuando éstas se encuentran en un ambiente con una concentración menor de sales, en comparación con el interior de las células. Cuando ocurre la ruptura de los glóbulos rojos, la hemoglobina liberada genera un cambio en la coloración de la solución, tiñéndola de color rojizo. A través del ensayo de hemólisis se cuantifica la hemoglobina liberada, tomando como referencia los valores de absorbancia medidos en los controles (sustancias que inducen o no la lisis de los glóbulos rojos). De esta manera es posible determinar si los materiales evaluados causan reacciones adversas al ponerlos en contacto con este componente sanguíneo [65].

En esta prueba se identifican fundamentalmente dos elementos: un sobrenadante y un precipitado (conformado por los glóbulos rojos). Como control positivo (C+) se utilizó agua destilada, para favorecer el hinchamiento de los eritrocitos y su consecuente lisis, por lo que la hemoglobina liberada tiñe el medio de color rojo, mientras que en el fondo se aprecian células vacías. Por el contrario, en el control negativo (C-), el sobrenadante es transparente, el botón celular permanece intacto en el fondo, con un color rojizo, evidenciando que la solución salina isotónica no genera la ruptura de estas células sanguíneas.

Los resultados obtenidos en esta prueba se presentan en la Figura 3.14. Se observa, con agrado, que todas las muestras producen una ruptura de glóbulos rojos menor al 1%, independientemente del tiempo de tratamiento. Lo anterior indica que estos materiales pueden ser categorizados como no hemolíticos [66], siguiendo con lo establecido en la norma ISO 10993-4. Por otra parte, el porcentaje de hemólisis para el PLA y el PLA-g-AA se mantuvo constante entre el 0 y 0.5%.

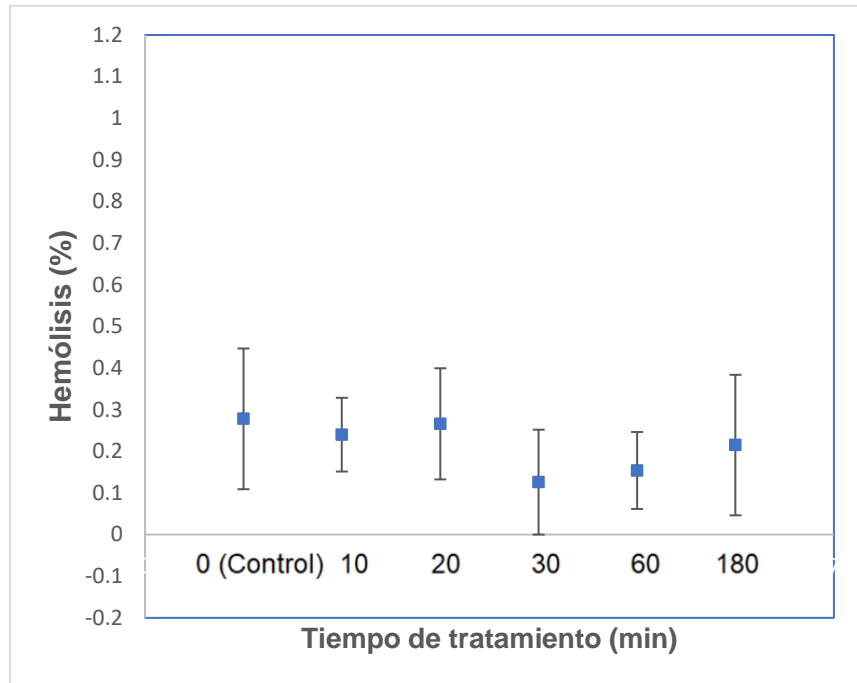


Figura 3.14 Hemólisis causada por las películas de PLA e injertadas a diferentes tiempos.

3.3.2 Agregación Plaquetaria.

Las plaquetas, también conocidas como trombocitos, son células sanguíneas que se producen en la médula ósea, y desempeñan un papel importante en el proceso de formación de coágulos de sangre. Sin embargo, la producción excesiva de plaquetas puede guiar a problemas de salud tales como la trombosis [67].

El proceso de agregación plaquetaria se desarrolla en dos secuencias: en primer lugar, mediante la adhesión de las plaquetas a la superficie vascular lesionada y, posteriormente, mediante la activación plaquetaria, cuyo resultado final consiste en la creación de un entramado de plaquetas y cadenas de fibrinógeno que conducen a la formación de un trombo [68]. Debido a esto último, en este ensayo se realizó una caracterización cualitativa de la morfología de las plaquetas para todas las películas de PLA injertadas con AA a diferentes tiempos.

Los controles, positivos y negativos (Figura 3.15), son referencias para describir el comportamiento plaquetario que se ha obtenido con el tratamiento realizado, así como para visualizar los aumentos y/o decrementos de dicha actividad.

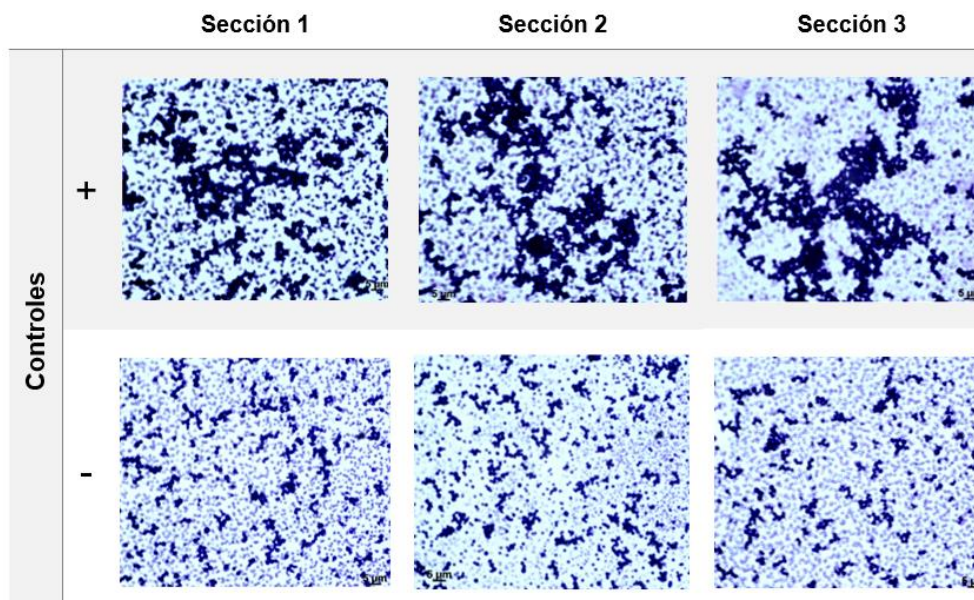


Figura 3.15 Controles positivos y negativos de agregación plaquetaria.

Apoyándose en lo anterior, y analizando distintas secciones de los sustratos sometidos a la modificación (ver Figura 3.16, y Tabla 3.3), se observa que para la muestra control, es decir, la que no posee modificación, se obtienen pequeñas cantidades de agregación plaquetaria llegando a formar algunas cadenas tal y como se observa en la micrografía de la sección 3.

Por otra parte, a medida que se aumentó el tiempo del fotoinjerto, se observa una mayor formación de cadenas plaquetarias en las secciones analizadas, para todas las muestras. Sin embargo, a partir de la muestra injertada a tiempos de 30 min y superiores, se observa un descenso en la formación de cadenas plaquetarias, tal como se muestra en las micrografías de la Figura 3.17, y se confirma en las mediciones de plaquetas registradas.

Los resultados anteriores indican que las películas fotoinjertadas con AA durante 20-30 min presentan la mayor capacidad de formación de trombos, aunque nunca se llega a los niveles del control positivo. En conjunto con los resultados previamente obtenido de las demás caracterizaciones, se puede deducir que, a tiempos de fotoinjerto mayores a 30 min, se incrementa la cantidad de grupos carboxílicos en la superficie del PLA y, en consecuencia, se obtiene un incremento en la hidrofilia del mismo, derivado de la incorporación de dichos grupos de naturaleza polar. Además, se presenta descenso en la hemólisis causada por el material, al igual que una agregación plaquetaria menor a los controles positivos y a la exhibida por las muestras injertadas a 10 y 20 min.

Con la idea de determinar de una manera más cuantitativa el efecto del tiempo de fotoinjerto sobre la conducta trombogénica del material, se cuantificaron los pixeles obtenidos en

todas y cada una de las muestras, así como de los controles (positivo y negativo) y los resultados se presentan en la Tabla 3.3.

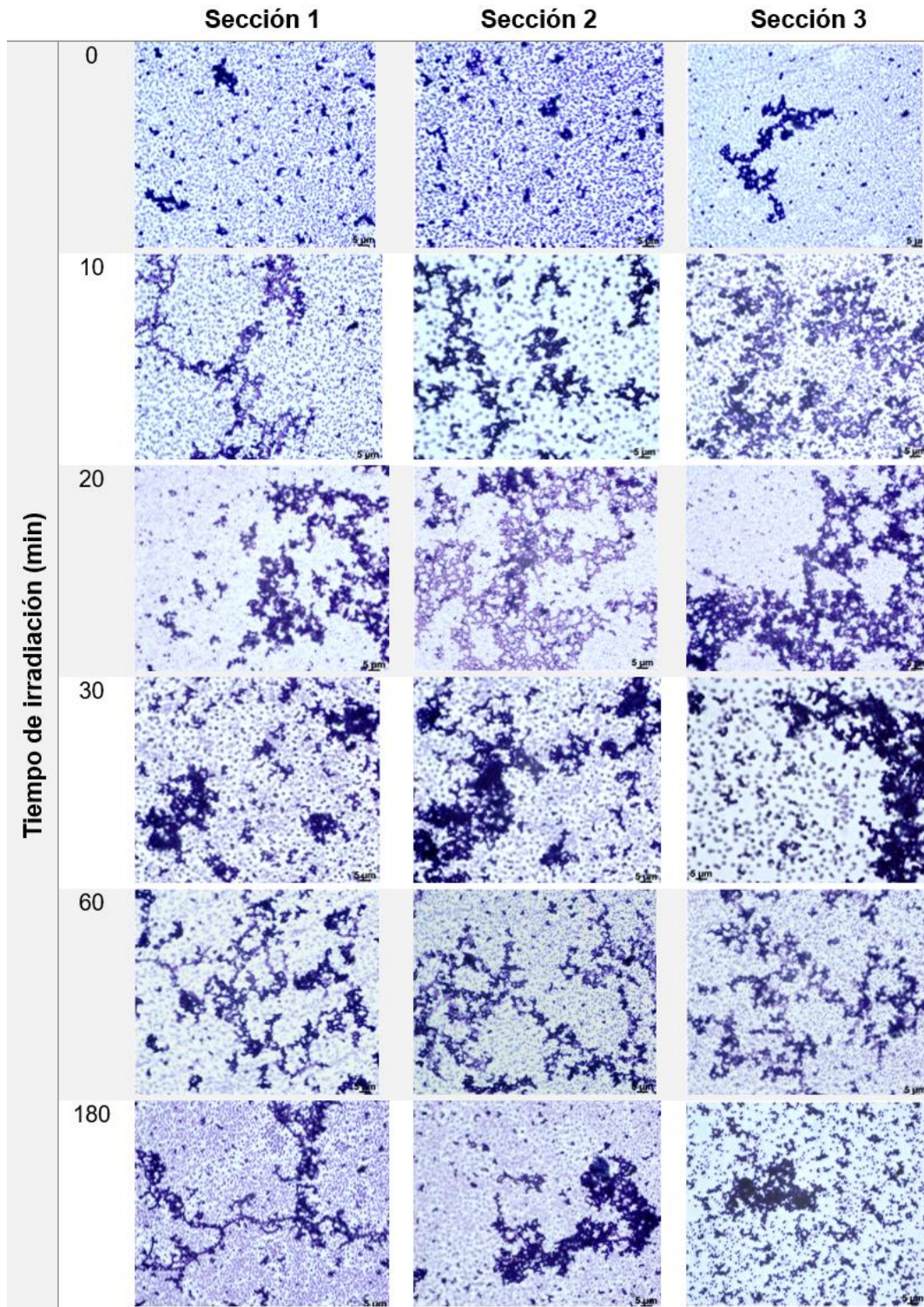


Figura 3.16 Micrográficas de la agregación plaquetaria exhibida por las películas de PLA fotoinjertadas con AA a diferentes tiempos.

Tabla 3.3 Cuantificación de los pixeles exhibidos por las micrografías de la Figura 3.16 para estimar cuantitativamente el efecto trombótico de los materiales.

Tiempo de tratamiento (min)	Plaquetas registradas (pixeles)				Agregación plaquetaria (%)
	Sección 1	Sección 2	Sección 3	Promedio	
0	3.8 x10 ⁵	7.03 x10 ⁵	3.3 x10 ⁵	4.7 x10 ⁵	0
10	6.2 x10 ⁵	9.7 x10 ⁵	12.6 x10 ⁵	9.5 x10 ⁵	30.5
20	10.0 x10 ⁵	15.6 x10 ⁵	14.5 x10 ⁵	13.45 x10 ⁵	70.7
30	10.3 x10 ⁵	13.2 x10 ⁵	12.0 x10 ⁵	11.84 x10 ⁵	54.7
60	11.15 x10 ⁵	10.8 x10 ⁵	11.2 x10 ⁵	11.0 x10 ⁵	46.2
180	8.6 x10 ⁵	9 x10 ⁵	12.1 x10 ⁵	9.9 x10 ⁵	34.7
CONTROL +	17.8 x10 ⁵	16.8 x10 ⁵	13.9 x10 ⁵	16.26 x10 ⁵	100
CONTROL -	6.65 x10 ⁵	7.1 x10 ⁵	6.1 x10 ⁵	6.6 x10 ⁵	0

Finalmente, y tomando en cuenta todos los resultados obtenidos en este trabajo, resulta interesante conocer el efecto que tiene la topografía y la química superficial de los sustratos, sobre las propiedades hemocompatibles de los materiales, ya que mantiene la hemólisis de los glóbulos rojos por debajo de lo establecido para materiales hemolíticos y, en contraposición, el comportamiento de la agregación plaquetaria exhibida en las muestras se mantiene por debajo de los controles positivos, alcanzado su punto máximo para la muestra fotoinjertada a 20 minutos. Lo anterior, permite postular que el fotoinjerto de ácido acrílico sobre películas de poli(ácido láctico) representa una alternativa interesante de modificación superficial del sustrato, capas de modular sus propiedades superficiales, propiedades térmicas, topografía y humectabilidad. Todas estas propiedades influyen en la interacción material-célula, de manera que al variar los distintos parámetros de la reacción, en este caso el tiempo del fotoinjerto, se obtienen diferentes respuestas para la interacción del material con la sangre. Es importante señalar que, en el sistema estudiado, se mantiene una biocompatibilidad adecuada y se evita el efecto trombótico sobre este material, siendo esto de suma importancia para distintas aplicaciones biomédicas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten concluir lo siguiente:

1. Se realizó la modificación superficial de películas de PLA mediante foto injerto de ácido acrílico a diferentes tiempos. Dicha reacción se llevó a cabo de manera exitosa, tal y como lo demuestran los resultados obtenidos por FTIR-ATR, ángulo de contacto y la medición de la densidad de ácidos carboxílicos por TBO; y, en consecuencia, la superficie del PLA se volvió más hidrofílica, se generaron cambios en la topografía de las películas, produciendo un aumento gradual en la rugosidad de las mismas, lo cual condujo a un comportamiento no hemolítico, para los sustratos, y se mantuvo una agregación plaquetaria menor al control positivo.
2. Los resultados del FTIR-ATR demostraron que grupos carboxilos, provenientes del ácido acrílico, fueron injertados sobre la superficie de las películas de PLA, estando éstos en mayor cantidad, a medida que se aumentó al tiempo del tratamiento. Este comportamiento, también pudo observarse cuando se determinó la densidad de ácidos carboxílicos, obtenida mediante el ensayo de TBO.
3. Aunque la estabilidad térmica del material aumentó al incrementar el tiempo de fotoinjerto, la Tg, la Tc y la Tm no presentaron cambios significativos.

RECOMENDACIONES

Entre las recomendaciones que se sugieren para trabajos futuros, se tienen las siguientes:

1. Estudiar el efecto de la variación de concentración del fotoiniciador (benzofenona) y del monómero sobre el fotoinjerto de ácido acrílico y sus propiedades fisicoquímicas.
2. Determinar el grado de cristalinidad de los sustratos fotoinjertados y realizar pruebas de degradación
3. Evaluar otros parámetros de hemocompatibilidad (prueba de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activada)
4. Estudiar el efecto de la modificación superficial del PLA, sobre la citotoxicidad y viabilidad celular utilizando células endoteliales de aorta pulmonar.

REFERENCIAS

1. B. Keselowsky. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials*, 25, 5947-5954, 2004.
2. D.G. Caster; B.D. Ratner. Biomedical surface science: Foundations to frontiers. *Surface Science*, 500, 28-60, 2002.
3. Z. Ma. Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. *Colloids and Surface B: BioInterfaces*, 60, 137-157, 2007.
4. H. Estupiñan; D. Peña; D. Laverde; P. Rivero; C. Vásquez. Estudio de la adsorción de proteínas sobre superficies de ácido poliláctico mediante técnicas gravimétricas y electroquímicas. *Dyna*. 169, 167-175, 2011.
5. T.A. Horbett. Hydrophilic-hydrophobic copolymers as cell substrates: Effect on 3T3 cell growth rates. *Journal of Colloid and Interface Science*. 104, 28-39, 1985.
6. Y. Feng; H. Zhao; L. Zhang; J. Guo. Surface modification of biomaterials by photochemical immobilization and photograft polymerization to improve hemocompatibility. *Frontiers of Chemical Engineering in China*, 4(3), 372–381, 2010
7. V. Hoven; K. Chombanpaew; Y. Iwasaki; P. Tasakorn. Improving blood compatibility of natural rubber by UV-induced graft polymerization of hydrophilic monomers. *Journal of Applied Polymer Science*, 112(1): 208–217, 2009.
8. Z. Isa; I. Hobkirk. Dental implants: biomaterial, biomechanical and biological considerations. *Annal Dent Univ Malaya*, 7:27-35, 2000.
9. F. Joseph; K.J Arun; A.A Navas; J. Irene. Biomedical Applications of Polymers - An Overview. *Curr Trends Biomedical Eng & Biosci*. 15(2): 555-909, 2018.
10. Yoruc, ABH, Sener BC. Biomaterials. In: Prof. Kara S, editor. A roadmap of biomedical engineers and milestones; 2012, ISBN: 978-953-51-0609-8.
11. J. Anderson. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res*; 31:81-110, 2001.
12. K. Anselme. Osteoblast adhesion on biomaterials, review. *Biomaterials*. 21:667-681, 2000.
13. M. Mehdizadeh; J. Yang. Design strategies and applications of tissue bioadhesives. *Macromol Biosci*; 13(3):271-288, 2013.
14. A. Agrawal; A.D Saran; S.S Rath; A Khanna. Constrained nonlinear optimization for solubility parameters of poly(lactic acid) and poly(glycolic acid) - validation and comparison. *Polymer*, 45: 8603-8612. 2004.
15. S.J Huang. Poly (Lactic Acid) and Copolyesters, En C. Bastioli (Ed.), *Handbook of Biodegradable Polymers*, Rapra Technology. pp. 287-302. 2005.

16. T. Ohkita; S.H Lee. Thermal Degradation and Biodegradability of Poly (lactic acid)/Com Starch Biocomposites. *Journal of Applied Polymer Science*, 100: 3009-3017. 2006
17. K.L.G Ho; A.L Pometto III; P.N Hinz. Effects of Temperature and Relative Humidity on Polylactic Acid Plastic Degradation. *Journal of Polymers and the Environment*, 7: 83-92, 1999.
18. N. Shelke; R. Nagarale; S. Kumbar. *Em Natural and Synthetic Biomedical Polymers*; Elsevier: Saint Louis, MO, USA, 2014, cap. 7
19. L.N. Novikova; L.N. Novikov; J.O. Kellerth. Biopolymers and biodegradable smart implants for tissue regeneration after spinal cord injury. *Current Opinion in Neurology*. 16, 711–715, 2003.
20. S.H Lee; S.Y Yeo. Improvement of hydrophilicity of polylactic acid (PLA) fabrics by means of a proteolytic enzyme from *Bacillus licheniformis*. *Fibers Polymers*. 17, 1154–1161, 2016.
21. D.F Williams. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*. 30, 5897-5009
22. N. Geyter; R. Morent; C. Leys; L. Gengembre; E. Payen. Treatment of polymer films with a dielectric barrier discharge in air, helium and argon at medium pressure. *Surface and Coatings Technology*. 201, 7066-7075. 2007.
23. H. Ma; R.H Davis; C.N Bowman. A Novel Sequential Photoinduced Living Graft Polymerization. *Macromolecules*, 33: 331-335, 2000.
24. V. Costamagna; D. Wunderlin; M. Larrañaga; I. Mondragón. Surface Functionalization of Polyolefin Films via the Ultraviolet-Induced Photografting of Acrylic Acid: Topographical Characterization and Ability for Binding Antifungal Agents. *Journal of Applied Polymer Science*, 102: 2254-2263, 2006.
25. U. Edlund; M. Kallrot; A.C Albertsson. Single-Step Covalent Functionalization of Polylactide Surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 127: 8865-8871, 2005.
26. M.C Gupta; V.G Deshmukh. Radiation effects on poly(lactic acid). *Polymer*, 24: 827-830, 1983.
27. K.A Hooper; J.D Cox; J. Kohn. Comparison of the effect of ethylene oxide and gamma-irradiation on selected tyrosine-derived polycarbonates and poly(L-lactic acid). *Journal of Applied Polymer Science*, 63: 1499-1510, 1997.
28. S.C.J Loo; C.P Ooi; Y.C.F Boey. Radiation effects on poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and poly(L-lactide) (PLLA). *Polymer Degradation and Stability*, 83: 259-265, 2004
29. M. Kallrot. *Covalent Surface Modification of Degradable Polymers for Increased Biocompatibility*. Tesis Doctoral, KTH Fibre and Polymer Technology, Stockolmo, Suecia, 2005.
30. J.P Deng; W.T Yang; B. Ranby. Surface Photografting Polymerization of Vinyl Acetate (VAc), Maleic Anhydride, and Their Charge Transfer Complex. I. VAc(I). *Journal of Applied Polymer Science*, 77: 1513-1521, 2000

31. G. Odian. *Principies of Polymerization*. John Wiley & Sons, New York, 4^a edición 2004.
32. C.M Xing; J.P Deng; W.T Yang. Surface Photografting Polymerization of Binary Monomers: Maleic Anhydride and n-Butyl Vinyl Ether on Polypropylene Film II. Some Mechanical Aspects. *Polymer Journal*, 34: 809-816, 2002.
33. F. Garbassi; M. Morra; E. Occhiello. *Polymer Surfaces: From Physics To Technology*. John Wiley & Sons, England. 1998.
34. W.T Yang; B. Ranby. Bulk Surface Photografting Process and Its Applications. II. Principal Factor Affecting Surface Photografting. *Journal of Applied Polymer Science*, 62: 545-555, 1996
35. H. Ma; R.H Davis; C.N Bowman. Principal factors affecting sequential photoinduced graft polymerization. *Polymer*, 42: 8333-8338, 2001.
36. Y. Li; J.M Desimone; C.D Poon; E.T Samulski. Photoinduced Graft Polymerization of Styrene onto Polypropylene Substrates. *Journal of Applied Polymer Science*, 64: 883-889, 1999.
37. W.T Yang; B. Ranby. Bulk Surface Photografting Process and Its Applications. I. Reactions and Kinetics. *Journal of Applied Polymer Science*, 62: 533-543. 1996
38. C. Decker; K. Moussa. Photopolymerization of Multifunctional Monomers in Condensed Phase. *Journal of Applied Polymer Science*, 34: 1603-1618, 1987.
39. M. Takeishi. Photopolymerization of N-vinylpyrrolidone Accelerated by Oxygen. *Journal of Polymer Science*, 27: 301-305, 1989.
40. H. Meléndez; G. Burillo; E. Bucio. *Capítulo 11. Aplicaciones de radiación gamma y UV para el injerto molecular y el diseño de matrices para aplicaciones terapéuticas. Biomateriales aplicados al diseño de sistemas terapéuticos avanzados*. Imprensa Da Universidade De Coimbra: Portugal, 2015, 453-484.
41. J.A. López. Surface treatment of collagen-based. Biomaterials in medical applications. PhD Thesis, Tomas Bata University in Zlín, Czech Republic, 2012.
42. [Hemocompatibilidad - Polímeros termoplásticos, elastómeros y aditivos \(mexpolimeros.com\)](http://mexpolimeros.com)
43. G. Raghavendra; K. Varaprasad; T. Jayaramudu. Biomaterials. *Nanotechnology Applications for Tissue Engineering*, 21–44, 2015.
44. H. Chen; L. Yuan; W. Song; Z. Wu; D. Li- Biocompatible polymer materials: role of protein-surface interactions. *Progress in Polymer Science*, 33(11): 1059–1087, 2008.
45. J. Anderso. Mechanism of inflammation and infection with implanted devices. *Cardiovasc Pathol*; 2:33S-41S, 1993.
46. A. Iftekhhar. Biomedical composites. In: Standard handbook of biomedical engineering and design. McGraw-Hill Companies, Chapter 12, 2004.

47. Biological evaluation of medical devices - Part 4: Selection of tests for interactions with blood (ISO 10993-4:2017)
48. Z. Yue; Z. You; Q. Yang; P. Lv; H. Yue; B. Wang; D. Ni; Z. Su; W. Wei; G. Ma. Molecular structure matters: PEG-b-PLA nanoparticles with hydrophilicity and deformability demonstrate their advantages for high-performance delivery of anti-cancer drugs. *J. Mater. Chem. B* 1, 3239–3247, 2013.
49. W. Qian. PAA-g-PLA amphiphilic graft copolymer: synthesis, self-assembly, and drug loading ability. *Polymer Chemistry*. 7, 54562-54569, 2017.
50. A.V. Janorkar; E.W. Fritz; K.J. Burg; A.T. Metters; D.E Hirt. Grafting aminoterminated branched architectures from poly(L-lactide) film surfaces for improved cell attachment. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, 8 1B, 142–152, 2007.
51. A Källrot; U. Edlund; A.C Albertsson. Surface functionalization of degradable polymers by covalent grafting. *Biomaterials*, 27, 1788–1796, 2006.
52. H.G. Zhu, J. Ji, R. Lin, C. Gao, L. Feng, J. Shen. Surface engineering of poly(dl-lactic acid) by entrapment of alginate-amino acid derivatives for promotion of chondrogenesis. *Biomaterials*. 23, 3141-3148, 2002.
53. A. Zhu, F. Zhao, T. Ma. Photo-initiated grafting of gelatin/N-maleic acyl-chitosan to enhance endothelial cell adhesion, proliferation and function on PLA Surface. *Acta Biomaterialia*. 5, 2033-2044, 2009.
54. A.V. Janorkar, A.T. Metters, D.E. Hirt. Modification of Poly(lactic acid) Films: Enhanced Wettability from Surface-Confined Photografting and Increased Degradation Rate Due to an Artifact of the Photografting Process. *Macromolecules*. 37, 9151-9159, 2004.
55. I. Horcas, R. Fernandez, J. Gómez, J. Colchero, J. Gómez, A. Baro. A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Review Science Instrument* 2007.
56. A. Martins, E. Pinho, S. Faria, I. Pashkuleva, A. Marques, R. Reis, N. Neves. Surface modification of electruspun polycaprolactone nanofiber meshes by plasma treatment to enhance biological performance. *Small* 5, 1195-1206, 2009.
57. G. Friedbacher, H. Bubert. Surface and thin film analysis: A compendium of principles, instrumentation and applications, Second edition. Ed. Wiley VCH Verlag, GmbH & Co. KGaA, 2011
58. L. Ying, C. Yin, R. Zhuo, K. Leong, H. Mao, E. Kang, K. Neoh. Immobilization of galactose ligands on acrylic acid graft-copolymerized poly(ethylene terephthalate) film and its application to hepatocyte culture. *Biomacromolecules* 4: 157-165,2003.

59. E. Uchida, Y. Uayma, Y. Ikada. Sorption of low-molecular-weight anions into thin polycation layers grafted onto a film. *Langmuir* 9, 1121-1124, 1993.
60. G. Voskerician; P.H Gingras; J.M Anderson. Macroporous condensed poly-(tetrafluoroethylene). I. In vivo inflammatory response and healing characteristics. *J Biomed Mater Res A*; 76:234–42, 2006.
61. E.K Yim; S.W Pang; K.W Leong KW. Synthetic nanostructures inducing differentiation of human mesenchymal stem cells into neuronal lineage. *Exp Cell Res*; 313:1820–9, 2007.
62. M.J Dalby; N. Gadegaard; A.S Curtis; R.O Oreffo. Nanotopographical control of human osteoprogenitor differentiation. *Curr Stem Cell Res Ther*;2: 129–38, 2007.
63. J.C Hansen; J.Y Lim; L.C Xu; C.A Siedlecki; D.T Mauger; H.J Donahue. Effect of surface nanoscale topography on elastic modulus of individual osteoblastic cells as determined by atomic force microscopy. *J Biomech*; 40:2865–71, 2007.
64. M.J Dalby; N. Gadegaard; C.D Wilkinson. The response of fibroblasts to hexagonal nanotopography fabricated by electron beam lithography. *J Biomed Mater Res A*; 84:973–9, 2008.
65. J. Szebeni y P. Haima, Hemocompatibility of medical devices, blood products, nanomedicines and biologicals, TECOMedical, Suiza, 2013.
66. Y. Zhang, J. Cai, C. Li, J. Wei, Z. Liu, W. Xue, Effects of thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) on blood coagulation, *Journal of Materials Chemistry B*, 4:21, 3733-3749, 2006.
67. X. Lai. et al. Predictors of in-stent stenosis and occlusion after endovascular treatment of intracranial vascular disease with the Willis covered stent. *J. Clin. Neurosci.* 20, 122–127, 2019.
68. M. Haidegger, M. Kneihsl, K. Niederkorn, K. Blood biomarkers of progressive atherosclerosis and restenosis after stenting of symptomatic intracranial artery stenosis. *Sci Rep* 11, 15599, 2021.