

Autoensamble de capas de polímeros iónicos sobre polietileno funcionalizado por plasma de pirrol

J. Morales*, C. Osorio, R. Montiel, H. Vázquez, R. Olayo

Departamento de Física, UAM-I, Apdo. Postal 55-534, Iztapalapa, México, D.F.

M.G. Olayo, G.J. Cruz,

Departamento de Física, ININ, Apdo. Postal 18-1027, CP 11801, México, D.F.

E. Pérez

Instituto de Física, UASLP, Apdo. Postal 78290, SLP, México

(Recibido: 14 de abril de 2008; Aceptado: 4 de agosto de 2008)

Se presenta un estudio sobre la modificación de polietileno de bajo peso molecular (PE) mediante la adición de fosfatasa alcalina (FA), enzima que facilita el proceso de biominerización, promueve la hidrólisis de los ortofosfatos y aumenta la absorción de calcio. El trabajo se desarrolla en dos etapas. En la primera se sintetiza por plasma una capa delgada de polipirrol (PPy) buscando que se adhiera la mayor cantidad de grupos amina sobre la superficie. En la segunda etapa se agregan capas delgadas, por inmersión en solución de los polielectrolitos, de polialilamina hidroclorada (+) (PAH) y poliestireno sulfonado (-) (PSS), que se autoensamblan debido a su naturaleza iónica; y al final se adiciona la FA. Se probaron varias secuencias de adición de polielectrolitos sobre el sustrato funcionalizado PE-PPy. Los materiales compuestos se caracterizaron por espectroscopía infrarroja con reflectancia total atenuada, ATR-IR y SEM. Los resultados muestran las diferentes etapas del autoensamble.

Palabras clave: Capas autoensambladas; Polimerización por plasma; Fosfatasa Alcalina; Polielectrolitos

This work presents a superficial modification of low molecular weight polyethylene (PE) with the addition of alkaline phosphatase (FA). This enzyme promotes the biominerization, hydrolysis of orthophosphates and increase the absorption of calcium. The superficial modification of PE starts with the addition of a thin layer of polypyrrole (PPy) synthesized by plasma to add amine groups on the surface. After that, sequential layers of two polyelectrolytes with different ionic charge were added to the PE-PPy surface by immersion in solutions of poly(allylamine hydrochloride) (+) (PAH) and polystyrene sulfonate (-) (PSS). The polyelectrolytes were self-assembled because of their opposite ionic charge. After this step, another layer of FA was added. Several sequences of polyelectrolytes were tested on the PE-PPy surface. The characterization of the surfaces was done by attenuated reflectance infrared spectroscopy (ATR-IR) and scanning electron microscopy (SEM).

Keyword: Self Assembly layers; Plasma Polymerization; Alkaline Phosphatase; Polyelectrolytes

1. Introducción

La biocompatibilidad de un implante está íntimamente ligada a sus propiedades superficiales. La interacción que ocurre en la interfase biomaterial-tejido celular es crucial para el buen funcionamiento del implante [1-3]. Una forma de diseñar biomateriales para la siguiente generación es modificando su superficie a través de la adición de capas delgadas de polímeros con grupos funcionales que permitan una mejor interacción con las células que lo rodean [4,5]. De Giglio et al, realizan la electropolimerización de polipirrol sobre substratos de Titanio y Ti-Al-V para el diseño de nuevas superficies bioactivas [6-10].

El procesamiento por plasma puede ser aplicado a estos sistemas, ya que puede usarse para sintetizar materiales que modifiquen sólo las propiedades superficiales en entornos libres de contaminantes químicos o patógenos. Además, debido a la alta energía cinética que adquieren las

partículas cargadas en el plasma, los materiales que se sintetizan se adhieren fuertemente a la superficie del biomaterial [11-16].

Las superficies ricas en aminas tienen gran influencia en la adsorción de proteínas y en la adhesión celular, ya que proveen sitios para la inmovilización de biomoléculas. En la literatura se encuentran reportes de que el polipirrol sintetizado por plasma crea una capa superficial rica en grupos amina [17-22]. A partir de una primera capa de polipirrol, rica en grupos amina, se pueden autoensamblar polímeros iónicos o polielectrolitos por atracción electrostática entre cargas eléctricas opuestas. Posteriormente, se pueden inmovilizar moléculas de fosfatasa alcalina, la cual favorece el proceso de biominerización que está asociado a la regeneración de tejido óseo [23-24]. Los polielectrolitos generan un campo electrostático, atrayendo o repelriendo objetos macromoleculares (proteínas o polisacáridos). Cuando se combinan las técnicas de polimerización por plasma y el

*jmor@xanum.uam.mx

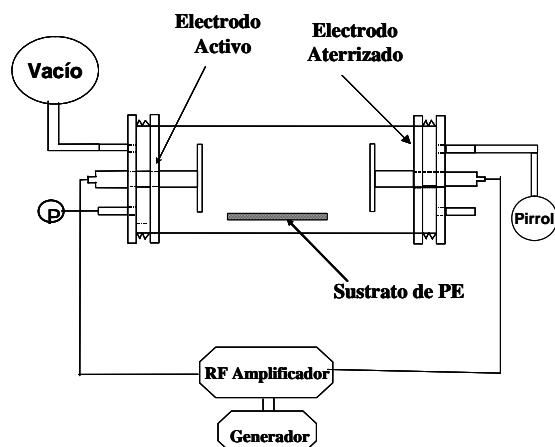


Figura 1. Reactor de polimerización de pirrol mediante plasmas de radiofrecuencia.

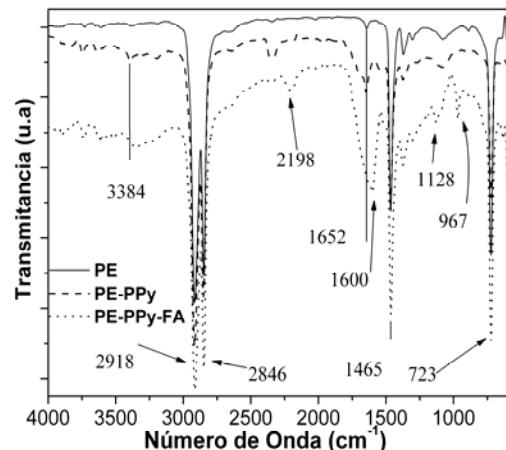


Figura 2. Espectro ATR de PE, PE-PPy y de PE-PPy-FA.

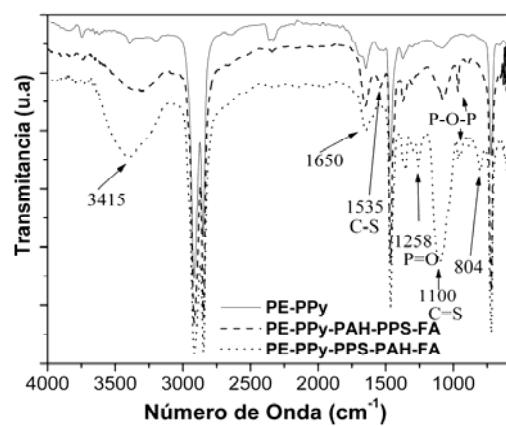


Figura 3. Espectros ATR de PE-PPy, PE-PPy-PSS-PAH-FA y PE-PPy-PAH-PSS-FA.

autoensamblado de polímeros iónicos, el papel del plasma contribuye a funcionalizar al sustrato induciéndole grupos químicos y cargas superficiales para hacerlo compatible con algún sistema biológico en particular. A continuación,

el autoensamblado se forma depositando secuencialmente sobre la superficie a los políelectrolitos por medio de inmersión en solución [25].

En este trabajo se estudian las siguientes secuencias de polímeros sobre la superficie de PE-PPy: FA, PAH-FA, PSS-FA y PAH-PSS-FA. Las muestras se caracterizaron con espectroscopía infrarroja de reflectancia total atenuada (ATR-IR) y microscopía electrónica de barrido (SEM).

2. Experimental

El reactor de polimerización por plasma se presenta de manera esquemática en la Fig. 1, consta de un tubo de vidrio (Pyrex) con longitud de 25 cm, 9 cm de diámetro externo, y espesor de pared de 0.7 cm. En cada extremo del tubo se coloca una tapa de acero inoxidable con dos salidas. Las tapas tienen una perforación en la parte central para insertar un electrodo de acero inoxidable, que está formado por una varilla circular y una placa circular plana de 6 cm. Durante la polimerización, la separación entre los electrodos fue de aproximadamente 10 cm.

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron (Sigma-Aldrich): poliestireno sulfonado (PSS), polialilamina hidroclorada (PAH), fosfatasa alcalina (FA) y pirrol, todos los reactivos se utilizaron sin purificación adicional. Las muestras de PE de baja densidad, 2.0 cm x 1.0 cm x 0.004 cm, se colocaron en la parte central del reactor. Antes de iniciar la polimerización, el reactor se purgó durante diez minutos para remover impurezas; después se introdujo el pirrol para recubrir las muestras. Las condiciones al inicio de la polimerización fueron: 1.2×10^{-1} Torr, 14 W y 13.5 MHz. Cuando termina la reacción de polimerización, sobre la superficie del material expuesta al plasma hay radicales libres, positivos y negativos, que pueden interactuar con los políelectrolitos o con la FA, que tiene grupos iónicos de fosfato.

Para el autoensamblado de polímeros iónicos se prepararon soluciones individuales con agua destilada de 1 mg/ml de PSS, PAH y FA. Después de depositar la capa de PPy, para la adsorción de los polímeros iónicos, las muestras se sumergieron en la solución respectiva durante 20 min. Se lavaron con agua destilada entre cada cambio de solución. Las combinaciones realizadas fueron: PE-PPy-FA, PE-PPy-PAH-FA, PE-PPy-PSS-FA y PE-PPy-PAH-PSS-FA.

Los análisis de IR-ATR se hicieron con un espectrofotómetro Perkin-Elmer GX System con un accesorio ATR Smith de diamante Durasample II. Las micrografías se tomaron con un microscopio electrónico de barrido Philips XL-30.

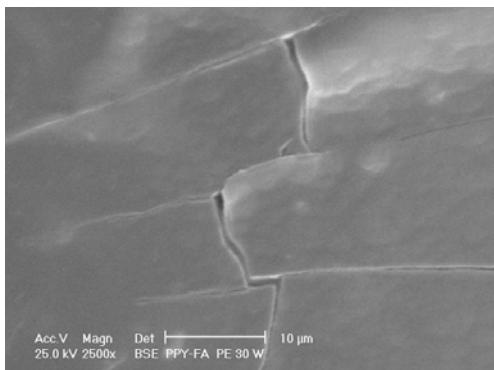


Figura 6. Morfología de PE-PPy-FA.

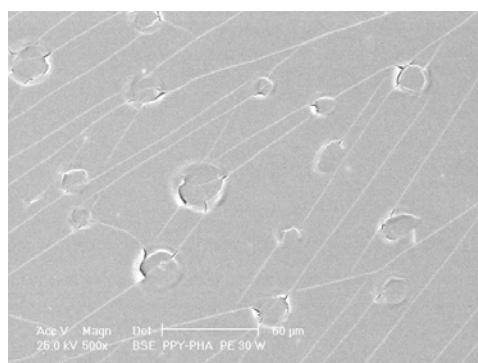


Figura 7. Morfología de PE-PPy-PAH.

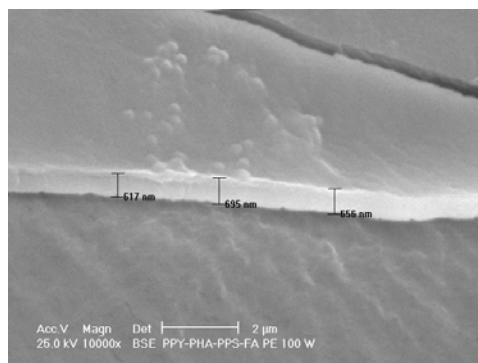


Figura 8. Capa del autoensamblado PE-PPy-PAH-PSS-FA.

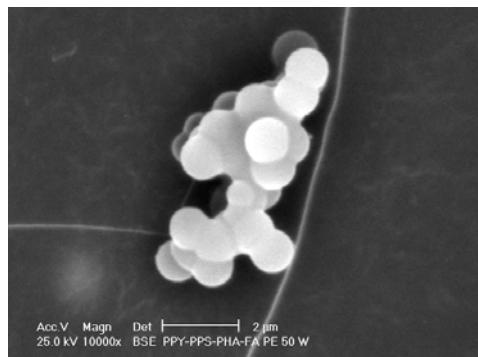


Figura 9. Formación de estructuras esféricas sobre el autoensamblado.

3. Resultados y Discusiones

3.1. Espectroscopia de FT-IR por ATR

Las Figuras 2, 3 y 4 presentan espectros IR-ATR de las películas de polietileno con las diferentes capas que se adicionaron. La Fig. 2 contiene el espectro de PE, de PE recubierto con PPy y de PE-PPy con inmovilización de la enzima de fosfatasa alcalina. El espectro de PE muestra las bandas de absorción características de los enlaces C-H y C-C en 2918, 2846, 1465 y 723 cm⁻¹. Hay una pequeña absorción en 1652 cm⁻¹ que indica ligera oxidación inicial en el polímero.

En el espectro de PE-PPy, además de los picos de PE, se observa que se incrementa la absorción en el intervalo de 3600 a 3300 cm⁻¹, debido a la presencia de grupos O-H y N-H en el material. El incremento en la absorción en 1652 cm⁻¹ sugiere dobles enlaces de oxígeno que pueden deberse a la fuerte oxidación del PE y del polipirrol. Esta oxidación es frecuentemente encontrada en los polímeros sintetizados o procesados por plasma y se origina en los radicales que se neutralizan con el oxígeno atmosférico al final del tratamiento. La comparación entre los dos espectros indica que hay enlaces C=O, O-H y N-H en la superficie de PE, lo que podría conferirle carácter hidrofílico al PE, requisito indispensable para el crecimiento celular. En la misma Fig. 2 se muestra el espectro de PE-PPy-FA. Este espectro sugiere que la FA se adhiere a la superficie del sustrato, como lo muestran las bandas en 967 y 1128 cm⁻¹ que corresponden a las vibraciones de los grupos O-P y C-O de la FA, respectivamente. La absorción en 1600 cm⁻¹ corresponde a los grupos N-H del PPy.

En la Figura 3 se presentan los espectros FT-IR de PE-PPy, PE-PPy-PSS-PAH-FA y PE-PPy-PAH-PSS-FA. Alrededor de 3415 cm⁻¹ hay un ensanchamiento de la banda de absorción de los grupos N-H y O-H provenientes de PAH. En 1258 cm⁻¹ se localizan las vibraciones de los grupos P=O y C-O de la FA. El pico que se encuentra en la posición 1100 cm⁻¹ puede asociarse a los grupos O=S del PSS. Finalmente, en 804 cm⁻¹ se reporta la vibración del enlace C-Cl de PAH. Estos resultados sugieren que se logró el ensamblado de los polímeros iónicos y de la FA sobre la superficie de PE recubierta con una capa delgada de PPy.

3.2. Morfología

Las Figuras 4-9 presentan micrografías SEM de las películas de PE con los polielectrolitos sobre su superficie. La superficie del PE es preponderantemente lisa, ver Fig. 4. En la Fig. 5 se observa el perfil de PE recubierto con PPy. Sobre la superficie se puede apreciar una película de recubrimiento uniforme (PPy). Las grietas de la película pudieron ser originadas durante la manipulación de la muestra.

La micrografía de PE-PPy-FA, ver Fig. 6, muestra la formación de una capa muy delgada, posiblemente FA. También se pueden apreciar grietas que le dan la apariencia

de una pared de ladrillos. En la Fig. 7 se muestra la morfología de PE-PPy-PAH, que contiene una especie de surcos lineales que terminan en lugares donde la película se fracturó. No se aprecia la capa interior de PPy, lo que indica que el recubrimiento de PAH fue muy uniforme. La película muestra discontinuidades, posiblemente por la acción del agua.

La Fig. 8 se aprecia la fotografía del ensamble PE-PPy-PAH-PSS-FA, se puede apreciar una capa delgada de aproximadamente 650 nm resultante de la acumulación de los diferentes polímeros que intervienen en el autoensamblado. La superficie contiene pequeñas estructuras esféricas que pudieron ser originadas por el PSS. En la Fig. 9 se aprecia nuevamente la formación de estructuras esféricas, aunque de mayor tamaño, sobre la superficie del autoensamblado PE-PPy-PSS-PAH-FA. La presencia del PSS en el ensamble induce la formación de aglomerados de estructuras esféricas de diámetro menor a 1 μ m. Estos aglomerados pueden formar mallas tridimensionales con huecos del orden de nanómetros.

4. Conclusiones

El polietileno recubierto con polipirrol permite la adsorción de los polielectrolitos PAH, PSS y de la enzima FA, formando conjuntos que se autoensamblan por las cargas iónicas que contienen. Al cambiar secuencialmente la carga superficial de los substratos, se pueden anclar proteínas susceptibles de ser atraídas por cargas electrostáticas. Estos conjuntos pueden tener aplicaciones importantes en biomateriales porque permiten anclar de manera directa proteínas como FA, que es uno de los factores que promueven la proliferación y desarrollo de células del tipo osteoblastos en la regeneración de masa ósea. Estos materiales también pueden tener aplicaciones en el campo de cultivos celulares o en interacciones con medios biológicos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al programa de mejoramiento del profesorado, PROMEP, por el financiamiento parcial al desarrollo de este trabajo bajo el programa de Apoyo a la Incorporación de Nuevos Profesores de Tiempo Completo, Convenio PROMEP-UAM Núm. 33805, y al programa de Formación de Redes de Investigación PROMEP mediante el Proyecto "Inmovilización de Proteínas sobre Superficies Biocompatibles" (PROMEP/103.5/04/2278); Convenio PROMEP-UAM Núm. 33871. También agradecen al CONACYT por el apoyo parcial de los proyectos 47467 y 52411.

Referencias

- [1] G. Kühn, I. Retzko, A. Lippitz, W. Unger, J. Friedrich. *Surf. Coat. Technol.* **142**, 494 (2001).
- [2] E. Johnston, D. Ratner. *J. Electron Spectroscopy*. **81**, 303 (1996).
- [3] J. Beck, R. Jones and D. Short. *Polymer*. **37**, 24 (1996).
- [4] M.T. Van Os, B Menges, R. Foerch, G. J. Vancso, W. Knoll. *Chem. Mater.* **11**, 3252 (1999).
- [5] D.S. Bodas, S.M. Desai, S.A. Gangal. *Appl. Surf. Sci.* **245**, 186 (1999).
- [6] E. De Giglio, S. Cometa, L. Sabbatini, P. Zambonin, S. Colucci, A. di Benedetto. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics*. **2(3)**, 206 (2004).
- [7] E. DE Giglio, L. DE Gennaro, L. Sabbatini, G. Zambonin. *J. Biomater. Sci. Polymer*. **12(1)**, 63 (2001).
- [8] E. De Giglio, S. Cometa, N. Cioffi, L. Torsi, L. Sabbatini. *Anal Bioanal Chem.* **389**, 2055 (2007).
- [9] E. De Giglio, C. D. Calvano, I. Losito, L. Sabbatini, P. G. Zambonin, A. Torrisi and A. Licciardello. *Surf. Interface Anal.* **37**, 580 (2005).
- [10] E. De Giglio, M.R. Guascito, L. Sabbatini, G. Zambonin. *Biomaterials*. **22**, 2609 (2001).
- [11] A.J. Benck, S. Candan, R.D. Short, A. Goodyear, N. St. J. Braithwaite. *J. Phys. Chem B*. **105**, 5730 (2001).
- [12] Y. Tran, P. Auroy. *Eur. Phys. J. E*. **5**, 65 (2001).
- [13] P. Favia, R. D'Agostino. *Surf. Coat. Technol.* **98**, 1102 (1998).
- [14] U. Hayat, A.M. Tinsley, M.R. Calder, J. Clarke. *Biomaterials*. **13**, 11 (1992).
- [15] B. Gupta, N. Anjum. *Adv. in Pol. Sci.* **162**, 35 (2003).
- [16] G. Barnes, P.J. Kostenuik, L. C. Gertenfeld, T.A. Einhorn, *Journal of Bone and Mineral Research*. **14(11)**, 1805 (1999).
- [17] R. Olayo, C. Ríos, H. Salgado-Ceballos, G. Cruz, J. Morales, MG Olayo, M. Alcaraz-Zubeldia, A. Alvarez, R. Mondragon, A. Morales, A. Diaz-Ruiz., *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. **19 (2)**, 817 (2008).
- [18] M. G. Olayo, J. Morales, G. J. Cruz, R. Olayo, J. applied Polymer Science. **93**, 1031 (2004).
- [19] J. Morales, M. G. Olayo, G. J. Cruz, R. Olayo, J. Polym. Sci. Part B, *Polymer Physics*. **40**, 1850 (2002).
- [20] J. Morales, M. G. Olayo, G. J. Cruz, R. Olayo. *J. Applied Polymer Science*. **85**, 263 (2002).
- [21] J. Morales, M.G. Olayo, G.J. Cruz, M.M. Castillo-Ortega, R. Olayo, *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*. **38**, 3247 (2000).
- [22] G.J. Cruz, J. Morales, R. Olayo, *Thin Solid Films*. **342**, 119 (1999).
- [23] D.G. Castner, B.D. Ratner. *Biom. Surf. Sci.* **500**, 28 (2002).
- [24] B. Feng, J. Weng, B. C. Yang, S. X. Qu, D. Zhang; *Biomaterials*. **25**, 3421 (2004).
- [25] D.L. Elbert, J.A. Hubbell. *Annu. Rev. Mater.* **26**, 365 (1996).