

WIELOWARSTWOWA UNIWERSALNA POWŁOKA OCHRONNO-TERAPEUTYCZNA NA IMPLANTY – KONTROLOWANE UWALNIANIE LEKU Z PARYLENU C MODYFIKOWANEGO PLAZMĄ TLENOWĄ

M.GOLDA^{1*}, K.GĘBAROWSKA², M.MUSIAŁ-KULIK²,
J.KASPERCZYK^{2,3}, A.KOTARBA¹

¹UNIERSYTET JAGIELLOŃSKI, WYDZIAŁ CHEMII,
UL. INGARDENA 3, 30-060 KRAKÓW, POLSKA

²POLSKA AKADEMIA NAUK,
CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH
UL. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-800 ZABRZE, POLSKA

³ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY, KATEDRA BIOFARMACJI,
UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

*E-MAIL: GOLDA@CHEMIA.UJ.EDU.PL

Streszczenie

Opracowano wielowarstwową ochronną powłokę polimerową na bazie parylenu C, którą modyfikowano plazmą tlenową. Przeprowadzono badania składu chemicznego powierzchni (XPS) i Swobodnej Energii Powierzchniowej (kąta zwilżania, metoda Owens-Wendta) próbek modyfikowanego parylenu C. Otrzymano matryce z bioresorbowalnego kopolimeru L-laktydo-ko-glikolidu (PLGA) zawierające cząsteczki modelowego leku przeciwbólowego (ibuprofen), następnie matryce poddano degradacji hydrolytycznej oraz ocenie profilu uwalniania substancji leczniczej. Zmiany zachodzące w mikrostrukturze łańcucha kopolimerowego obserwowano przy wykorzystaniu wysokorozdzielczej spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), natomiast kinetykę uwalniania leku z matryc badano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

Słowa kluczowe: parylen C, plazma tlenowa, swobodna energia powierzchniowa, powierzchnia implantów, kontrolowane uwalnianie leków.

[*Inżynieria Biomateriałów*, 122-123, (2013), 36-39]

MULTILAYER VERSATILE PROTECTIVE AND THERAPEUTIC COATING FOR IMPLANTS - CONTROLLED DRUG DELIVERY FROM OXYGEN PLASMA TREATED PARYLENE-C

M.GOLDA^{1*}, K.GĘBAROWSKA², M.MUSIAŁ-KULIK²,
J.KASPERCZYK^{2,3}, A.KOTARBA¹

¹JAGIELLONIAN UNIVERSITY, FACULTY OF CHEMISTRY,
3 INGARDEN STR., 30-060 KRAKÓW, POLAND

²POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS
34 SKŁODOWSKA-CURIE STR., 41-800 ZABRZE, POLAND

³MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, SCHOOL OF PHARMACY,
DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,
1 NARCYZÓW STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

*E-MAIL: GOLDA@CHEMIA.UJ.EDU.PL

Abstract

The multilayer protective polymer coating based on parylene C modified with oxygen plasma was developed. The paper reports an investigation on surface chemical composition (XPS) and surface free energy (contact angle, Owens-Wendt) of modified parylene C. Bioresorbable L-lactide-co-glycolide copolymer (PLGA) was used to obtain drug-loaded matrices. The matrices underwent hydrolytic degradation and estimation of drug release profile. The microstructural changes which appeared during degradation were observed by means of high resolution nuclear magnetic spectroscopy (NMR). The kinetic profiles of drug release were investigated with high performance liquid chromatography (HPLC).

Keywords: parylene C, oxygen plasma, surface free energy, implant surface, controlled drug delivery
[*Engineering of Biomaterials*, 122-123, (2013), 36-39]

Wprowadzenie

Parylen C (poli(monochloro-p-ksylilen)) to syntetyczny polimer, który z powodzeniem stosowany jest jako powłoka chroniąca przed korozją powierzchnie implantów metalowych [1]. Jak wykazano w dotychczasowych badaniach, jego właściwości mechaniczne oraz chemiczna bierność w kontakcie z płynami fizjologicznymi pozwalają na wykorzystanie go jako materiał pokrywający różnego rodzaju implanty ortopedyczne [2]. Z drugiej strony jednym z głównym trendów badawczych w inżynierii materiałowej jest kontrolowane, dmiejscowe uwalnianie leków z powierzchni implantowanych materiałów. W tym celu stosuje się chemiczne, fizyczne i mechaniczne metody modyfikacji powierzchni w celu przystosowania jej do kontrolowanego uwalniania leków lub przyłączenia warstwy biodegradowalnego polimeru z lekiem. Połączeniem metod chemicznej i fizycznej modyfikacji powierzchni polimerów jest plazma tlenowa, która umożliwia wprowadzenie w warstwę powierzchniową tlenu i utworzenie polarnych grup funkcyjnych. Kontrolując parametry działania plazmy (czas, ciśnienie, moc) można zmieniać topografię początkowo gładkiego polimeru w nanochropowatą, która promuje adhezję komórek ludzkich. Modyfikowana powierzchnia parylenu C umożliwia nałożenie warstwy terapeutycznej z lekiem przeciwniektynym lub przeciwzapalnym wymieszany z polimerem bioresorbowalnym. Obecnie dużym zainteresowaniem w tym kontekście cieszą się materiały polimerowe oparte na biokompatybilnych i bioresorbowalnych kopolimerach L-laktydu i glikolidu uzyskiwane przy udziale $Zr(acac)_4$ jako inicjatora. Ze względu na możliwość sterowania czasem resorpcji poprzez zastosowanie różnego udziału molowego komonomerów, wykorzystywane są one jako nośniki w systemach kontrolowanego uwalniania leków [3].

Materiały i metody

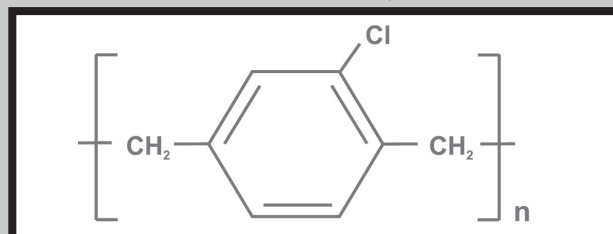
Parylen-C jest polimerową formą para-chloro-ksylilenu, którego wzór chemiczny (C_8H_7Cl) pokazano na RYS.1. Depozycja cienkich powłok o grubości 8 μm została wykonana za pomocą metody osadzania z fazy gazowej (CVD). Do modyfikacji powierzchni parylenu C i stworzenia centrów aktywnych do przyłączania innych cząsteczek wykorzystano plazmę tlenową. Eksperymenty modyfikacji powierzchni parylenu C przeprowadzono w urządzeniu Plasma System FEMTO Diener Electronics. Czas działania plazmy wynosił 0 i 60 min. Skład powierzchni był monitorowany przy pomocy spektroskopii fotoelektronów wzbudzonych promieniowaniem rentgenowskim (XPS) z analizatorem półsferycznym SES R4000 (GammaData Scienta). Źródłem promieniowania była lampa Mg K α (1486.6 eV) o mocy 350 W. Poziom próżni podczas pomiaru widm wynosił ok. 8×10^{-10} mbar. Otrzymane widma analizowano przy użyciu programu Casa- XPS 2.3.10. Do obliczeń swobodnej energii powierzchniowej (SEP) parylenu C metodą Owens-Wendta (WZÓR 1) wykorzystano pomiar kąta zwilżania wody destylowanej i diiodometanu przy użyciu aparatury SurfTens Universal i oprogramowania SurfTens 4.3 - WIPS. Badania wykonano w temperaturze pokojowej. Matryce kopolimerowe z PLGA z lekiem wylano i suszono w warunkach próżniowych. Następnie wycięto z nich krążki, które poddano degradacji hydrolytycznej w buforze fosforanowym w temperaturze 37°C w warunkach ciągłego wytrząsania. Krążki badano, rejestrując widma 1H i ^{13}C NMR oraz stosując technikę HPLC. Naniesienie warstwy kopolimerowej z lekiem na parylen C wykonano metodą zanurzeniową.

Introduction

Parylene C (poly(chloro-para-xylylene)) is a synthetic polymer, which can be used as anticorrosive protecting coating for metal implants surface [1]. As was reported before, its mechanical properties and chemical inertness when in contact with body fluids, allow to use parylene C as orthopaedic implants coating [2]. One of the recent research trends in the materials engineering is controlled, site-specific drug release from the surface of implanted materials. In order to obtain that, several chemical, physical and mechanical methods of surface modification can be applied to prepare the surface for the drug release or connection with the drug-loaded biodegradable polymer layer. Oxygen plasma treatment is the combination of chemical and physical modification which allows the incorporation of oxygen containing functional groups into the originally oxygen free polymers. The plasma parameters may be adjusted by a precisely controlling the process (oxygen partial pressure, power and exposition time) and therefore, the topography of the originally smooth polymer surface can be changed into rough, for better human cell adhesion. Modification allows also addition of the biodegradable therapeutical layer loaded with antibiotic or anti-inflammatory drug. Recently, much interest is paid to biocompatible and bioresorbable polymeric materials, as PLGA obtained via ring opening polymerization with use of $Zr(acac)_4$ as non-toxic initiator. These copolymers are commonly utilized in drug delivery systems due to possibility of comonomeric unit ratio moderating which can influence time of resorption [3].

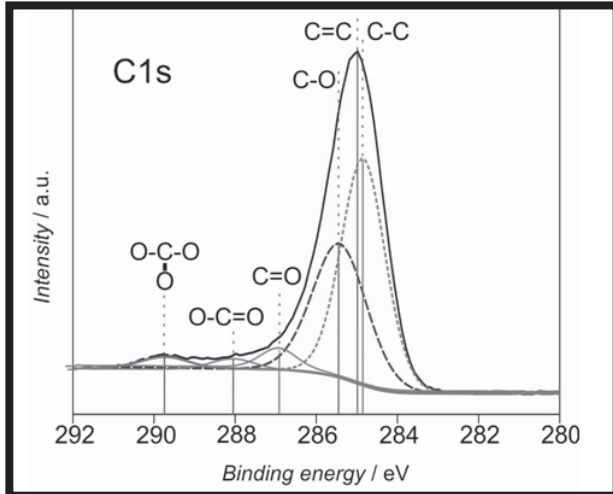
Materials and methods

Parylene-C is a polymeric form of para-chloro-xylylene, which monomer's chemical formula (C_8H_7Cl) is shown in FIG.1.



RYS.1. Wzór chemiczny monomeru parylenu C
FIG.1. Chemical formula of the parylene C monomer

Deposition of the thin films was performed via Chemical Vapor Deposition (CVD). For the tests, 8 μm films were used. In order to modify parylene C and create reactive sites for attachment of other compounds, polymer surface was treated with plasma of an oxidizing agent. A plasma system FEMTO (low-pressure plasma) manufactured by Diener Electronics was used. Time of plasma treatment was 0 and 60 min. The surface composition was monitored by X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) analyses using an ultra high vacuum system equipped with SES R4000 (GammaData Scienta) analyzer. The un-monochromatic Mg K α source (1486.6 eV) operated at 350W was applied. The vacuum in the spectrometer chambers was better than 8×10^{-10} mbar. Collected XPS spectra were analyzed using Casa- XPS 2.3.10 software. The modification of the hydrophilic properties was evaluated via contact angles of distilled water and diiodomethane measurements with SurfTens Universal and SurfTens 4.3 - WIPS. The experiments were performed under ambient conditions. PLGA drug-loaded matrices were cast and dried in high vacuum.



RYS.2. Widmo XPS piku C1s dla modyfikowanej próbki parylenu C wraz z dekonwolucją identyfikującą powstałe grupy funkcyjne.
FIG.2. C1s XPS peak profile for the treated parylene C and its deconvolution identifying the formed functional groups.

Wyniki i dyskusja

Modyfikacja Parylenu C przy pomocy plazmy tlenowej prowadzi do zmian składu chemicznego i swobodnej energii powierzchniowej. Na RYS.2 pokazano widmo XPS uzyskane dla próbki parylenu C modyfikowanej plazmą tlenową przez 60 min z przypisanymi grupami funkcyjnymi powstałymi w wyniku modyfikacji. Dla Parylenu C niemodyfikowanego można zaobserwować maksimum C1s (285 eV), które koresponduje z wartościami energii dla wiązań C-C, C=C. Widmo uzyskane dla próbki modyfikowanej różni się znacznie kształtem maksimum węgla C1s. Można wyróżnić nowe składowe, które wskazują na stworzenie nowych grup zawierających tlen: C-O (285.4 eV), C=O (286.9 eV), O-C=O (288.0 eV), O-C(O)-O (289.7 eV) [3,4]. Energia powierzchniowa materiałów do zastosowań biologicznych ma szczególne znaczenie np. w procesie adhezji komórek, można ją obliczyć wykorzystując metodę Owens-Wendta. Jest to metoda powszechnie stosowana do obliczania swobodnej energii powierzchniowej polimerów. Wyniki pomiarów kąta zwilżania oraz obliczeń SEP przedstawiono w TABELI 1. Charakterystyczna wartość kąta zwilżania wody niemodyfikowanego parylenu wynosi 88°, po modyfikacji plazmą tlenową znacznie maleje do 17.6°. Wartość SEP dla niemodyfikowanej próbki parylenu C wynosi 42.4 mJ/m² i wzrasta do 70.0 mJ/m² dla próbki modyfikowanej. Jest to satysfakcjonująca wartość dla materiałów do zastosowań biologicznych, ponieważ wysokie wartości SEP korelują z szybszym wzrostem tkanek na powierzchni materiału. Analiza widm ¹H i ¹³C NMR pozwoliła na zbadanie zmian zachodzących podczas degradacji hydrolytycznej w obrębie łańcucha kopolimerowego [5]. Wyznaczono średnie długości bloków komonomerycznych, co pozwoliło stwierdzić, iż początkowym etapie uwalnianie były krótsze bloki laktydylowe, a pod koniec długie, natomiast w przypadku bloków glikolidylowych początkowo uwalniane były bloki dłuższe (RYS.3). Obliczona wartość współczynnika randomizacji wyniosła ponad 1.0, co wskazuje na statystyczną budowę matrycy kopolimerowych przez cały czas prowadzenia badań, co wpływa na równomierne uwalnianie substancji leczniczej. Badania przy pomocy HPLC wykazały, iż w ciągu pierwszych 7 tygodni badań z matrycy PLGA uwolniło się do 13% leku. W tym czasie nie zaobserwowano zjawiska 'burst effect' (RYS.4).

$$\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p, \text{ gdzie/where:}$$

$$(\gamma_s^d)^{1/2} = \frac{\gamma_d(\cos\theta_d + 1) - \sqrt{(\gamma_d^p/\gamma_w^p)\gamma_w(\cos\theta_w + 1)}}{2\left(\sqrt{\gamma_d^d} - \sqrt{\gamma_d^p(\gamma_w^d/\gamma_w^p)}\right)}$$

$$(\gamma_s^p)^{1/2} = \frac{(\cos\theta_w + 1) - 2\sqrt{\gamma_s^d\gamma_w^d}}{2\sqrt{\gamma_w^p}}$$

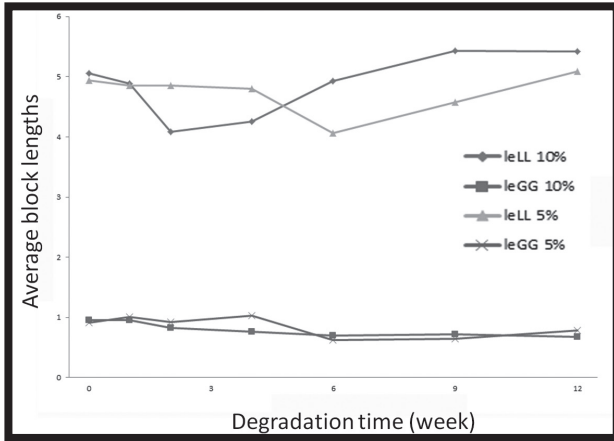
WZÓR 1 / EQUATION 1.

Gdzie: γ_s - energia swobodna powierzchni, γ_s^d - dyspersyjna składowa energii powierzchni, γ_s^p - składowa polarna energii swobodnej powierzchni, γ_d jest całkowitą energią swobodną diiodometanu, γ_d^p oraz γ_d^d jej składowymi odpowiednio polarną i dyspersyjną, analogiczne oznaczenia z dolnym indeksem - w odnośną się do wody. θ_d oraz θ_w to odpowiednio wartości kąta zwilżania diiodometanu i wody. Where: γ_s - surface free energy, γ_s^d - dispersive component of surface energy, γ_s^p - polar component of surface free energy, γ_d total free energy of diiodomethane, γ_d^p and γ_d^d polar and dispersive components of Total free energy of diiodomethane, similarly - Lower index w is for water. θ_d and θ_w - contact angles of diiodomethane and water, respectively.

Discs were cut from matrices and underwent hydrolytical degradation in phosphate buffer at 37°C. The discs were investigated by means of ¹H and ¹³C NMR spectroscopy and HPLC. Obtaining copolymeric layer on parylene C was performed by dip method.

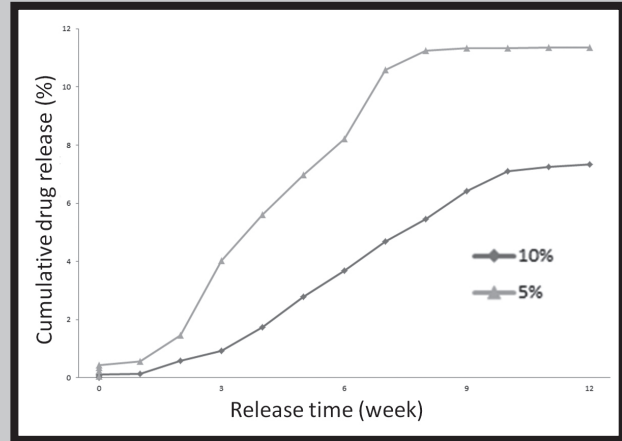
Results and discussions

Oxygen plasma modification of parylene C led to the changes in chemical composition and SFE. In FIG.2 the XPS spectra of modified parylene C is presented together with functional groups generated upon treatment. For the unmodified parylene C, the C1s peak (285 eV) can be observed which can be described as C-C and C=C bonds. In the case of the modified sample, several additional components, such as C-O (285.4 eV), C=O (286.9 eV), O-C=O (288.0 eV), O-C(O)-O (289.7 eV) can be distinguished [3,4] while spectra obtained for the unmodified sample has different shape. SFE of the materials for biological application is crucial eg. during the cell adhesion process and can be calculated using Owens-Wendt method (EQUATION 1). It is commonly used equation for SFE calculation of polymers. The results of the contact angle measurements and SFE are presented in TABLE 1. The contact angle of water for the untreated sample is 88° and after oxygen plasma modification it decreases to 17.6°. SFE value for the untreated sample is 42.4 mJ/m² and increases to 70.0 mJ/m² for the modified one. The SFE value is satisfactory for the biological materials as high SFE value correlates with faster tissue growth on the materials surface. Study of ¹H and ¹³C NMR spectra allowed investigation of the changes in the copolymer chain microstructure occurring during hydrolytical degradation. Average block lengths were estimated [5]. At the beginning, shorter lactidyl blocks were released in contrary to glycolidyl blocks (FIG.3).



RYS.3. Zmiana średnich długości bloków laktydylowych (l_{LL}^e) i glikolidylowych (l_{GG}^e) podczas degradacji matrycy PGLA z lekiem.

FIG.3. Changes of average lactidyl (l_{LL}^e) and glycolidyl (l_{GG}^e) block lengths during degradation of PGLA drug-loaded matrice.



RYS.4. Wykres kinetyczny kumulacyjnego uwalniania ibuprofenu z matrycy PLGA zawierającej 5 i 10% leku.

FIG.4. Kinetic of cumulative release of ibuprofenu from PLGA matrices containing 5 and 10% of drug.

TABELA. 1. Wyniki pomiarów kąta zwilżania i obliczeń swobodnej energii powierzchniowej metodą Owensa-Wendta.

TABLE 1. Results of the contact angle measurements and surface free energy calculations using Owens-Wendt method.

Próbka Sample	Ciecz Liquid	Kąt zwilżania Contact angle [θ]	Swobodna energia powierzchniowa Surface free energy [mJ/m ²]
Parylen niemodyfikowany Unmodified parylene C	H ₂ O	88.0 ± 5.1	42.4
	CH ₂ I ₂	34.4 ± 1.9	
Parylen modyfikowany Modified parylene C	H ₂ O	17.6 ± 0.8	70.0
	CH ₂ I ₂	34.0 ± 0.8	

Wnioski

Modyfikacja plazmą tlenową prowadzi do utworzenia na powierzchni parylenu C grup funkcyjnych zawierających tlen. Powoduje to wzrost hydrofilowości powłoki oraz swobodnej energii powierzchniowej, co zwiększa biogodność powierzchni materiału implantacyjnego. Powstałe grupy funkcyjne zawierające tlen sprzyjają również zaszczepieniu biodegradowalnego polimeru zawierającego cząsteczki leku. Zastosowany kopolimer pozwala na uwalnianie leku w sposób kontrolowany przez czas rzędu 7 tyg.

Podziękowania

Projekt realizowany w ramach programu Ventures Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej - Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

Piśmiennictwo

- [1] M.Cieślik, K.Engvall, J.Pan, A.Kotarba: Silane-parylene coating for improving corrosion resistance of stainless steel 316L implant material. *Corros. Sci.*, 53 (2011), pp. 296–301
- [2] M.Cieślik, S.Zimowski, M.Golda, K.Engvall, J.Pan, W.Rakowski, A.Kotarba: Engineering of bone fixation metal implants biointerface-Application of parylene C as versatile protective coating. *Mater. Sci. Eng. C*, 32 (2012), pp. 2431–2435

The randomization ratio was over 1.0 what indicates randomized copolymeric structure which is favorable to reach uniform drug release from matrices. HPLC results showed release of maximum 13% of drug from PLGA matrices during first 7 weeks of investigations and no burst effect was observed (FIG.4).

Conclusions

Oxygen plasma treatment is efficient in functional oxygen group formation on the parylene C surface. It results in increase of the coating hydrophilicity and surface free energy which influence biocompatibility of the implant material surface. Generated oxygen containing functional groups facilitate grafting of drug-loaded biodegradable polymer. The developed versatile coating allows for the controlled drug release for 7 weeks.

Acknowledgments

Project operated within the Foundation for Polish Science Ventures Programme, co-financed by the EU European Regional Development Fund.

References

- [3] J.W. Seong, K.W.Kim, Y.W.Beang, S.K.Koh, K.H.Yoon, J.H.Lee: Effects of ion bombardment with reactive gas environment on adhesion of Au films to Parylene C film. *Thin Solid Films*, 476 (2005), pp. 386–390.
- [4] K.G.Pruden, K.Sinclair, S.Beaudoin: Characterization of Parylene-N and Parylene-C photooxidation. *J Polym Sci A Polym Chem*, 41 (2003), pp. 1486–1496
- [5] Ch.Wischke A.T.Neffe, S.Steuer, A.Lendlein, *Journal of Controlled Release* 138 (2009) pp. 243-250