

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.  
Posgrado en Materiales Poliméricos

PREPARACIÓN DE UN MATERIAL COMPUESTO  
POLIDIMETILSILOXANO-COLÁGENO CON USO  
POTENCIAL COMO SUSTITUTO DE PIEL

Tesis que presenta  
Juan Antonio Juárez Moreno

En opción al título de  
DOCTOR EN CIENCIAS  
MATERIALES POLIMERICOS

Mérida, Yucatán, Enero 2016



Mérida, Yucatán, México; Enero de 2016

## **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación 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, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán 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.

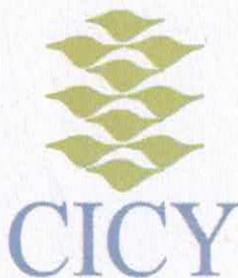


---

Juan Antonio Juárez Moreno

---

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



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de JUAN ANTONIO JUÁREZ MORENO titulado: PREPARACIÓN DE UN MATERIAL COMPUESTO POLIDIMETILSILOXANO-COLAGENO CON USO POTENCIAL COMO SUSTITUTO DE PIEL fue realizado en la Unidad de Materiales, dentro de la línea de investigación "MATERIALES PARA MEDICINA REGENERATIVA" del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez, perteneciente al Programa de Doctorado en Ciencias (Materiales Poliméricos) del Centro.

Atentamente

---

Dr. Manuel Martínez Estévez  
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 10 de Diciembre de 2015

## **AGRADECIMIENTOS**

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que con su soporte científico y humano han colaborado en la realización de este trabajo de investigación.

Particularmente agradezco al Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez, director de esta tesis, por su orientación, soporte y discusión crítica para la realización de la presente tesis de doctorado.

Al Dr. Alejandro Ávila Ortega adscrito a la Facultad de Ingeniería Química – UADY, por permitirme el uso del reactor de plasma para la realización de las modificaciones superficiales al PDMS.

Al Dr. Iván Oliva adscrito al CINVESTAV-IPN Unidad Mérida, por la realización de los análisis de microscopia de fuerza atómica.

Al Dr. Francis Avilés Cetina por su orientación y consejos para la realización de las pruebas de pelado.

A la M. C. Ligia Guadalupe Brito Argáez por su inestimable ayuda en la obtención y caracterización del colágeno tipo I. Sus aportaciones a esta tesis han sido de mucha importancia.

A la Q.I. Rossana Faride Vargas Coronado por su ayuda para la adquisición de los espectros de FTIR y la obtención de las micrografías con el microscopio electrónico de barrido.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán por permitirme realizar mis estudios de doctorado.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante todo el periodo de mis estudios de doctorado.

Agradezco especialmente a Abad Arcos Alomía, quien me ha brindado su amistad y ayuda durante estos cuatro años.

Finalmente, agradezco a mi familia por su apoyo y cariño.



<b>ÍNDICE</b>	<b>Pág.</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>v</b>
<b>RESUMEN. ....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT. ....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Quemaduras. ....</b>	<b>9</b>
<b>1.2. Úlcera diabética.....</b>	<b>13</b>
<b>1.3. Sustitutos de piel. ....</b>	<b>16</b>
<b>1.3.1. Autoinjertos de piel.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3.1.1. Injertos de piel de espesor parcial.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3.1.2. Injertos de piel de espesor total.....</b>	<b>19</b>
<b>1.3.1.3. Piel autóloga cultivada.....</b>	<b>19</b>
<b>1.3.2. Aloinjertos.....</b>	<b>20</b>
<b>1.3.2.1. Aloinjertos epiteliales / epidérmico. ....</b>	<b>20</b>
<b>1.3.2.2. Aloinjertos acelulares dérmicos. ....</b>	<b>21</b>
<b>1.3.2.3. Aloinjertos celulares dérmicos. ....</b>	<b>21</b>
<b>1.3.2.4. Aloinjertos compuestos.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3.3. Xenoinjertos.....</b>	<b>22</b>
<b>1.3.4. Sustitutos sintéticos. ....</b>	<b>23</b>
<b>1.3.4.1. Sustitutos sintéticos disponibles comercialmente.....</b>	<b>24</b>
<b>1.3.4.1.1. Sustituto sintético monocapa. ....</b>	<b>24</b>
<b>1.3.4.1.2. Sustitutos sintéticos bicapa.....</b>	<b>24</b>
<b>1.3.5. Avances recientes en el campo de los sustitutos sintéticos de piel. ....</b>	<b>27</b>
<b>CAPÍTULO 2. FUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES E INMOVILIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS MEDIANTE TÉCNICAS DE PLASMA. ....</b>	<b>30</b>
<b>2.1. Fundamentos del tratamiento con plasma. ....</b>	<b>34</b>
<b>2.2. Tipos de plasma.....</b>	<b>36</b>

2.3. El plasma frío.....	38
2.3.1. Tratamientos superficiales con plasmas fríos. ....	39
JUSTIFICACIÓN.....	44
OBJETIVO.....	45
OBJETIVOS PARTICULARES.....	45
HIPÓTESIS.....	45
<b>CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS. ....</b>	<b>46</b>
3.1. Aislamiento y caracterización de colágeno tipo I.....	46
3.2. Síntesis de películas de PDMS. ....	46
3.3. Modificación superficial de PDMS.....	47
3.4. Preparación del material compuesto. ....	48
3.5. Caracterización de materiales. ....	48
3.5.1. Caracterización del colágeno tipo I. ....	48
3.5.1.1. Dodecil sulfato de sodio- electroforesis en gel de poliacrilamida. ....	49
3.5.1.2. Análisis calorimétrico diferencial. ....	49
3.5.2. Medición del ángulo de contacto.....	50
3.5.3. Análisis de la morfología superficial.....	50
3.5.4. Análisis químico superficial.....	51
3.5.5. Medición de la resistencia a la rotura.....	52
3.5.6. Ensayo de adhesión.....	52
3.6. Análisis estadístico.....	54
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....</b>	<b>55</b>
4.1. Identificación y caracterización de colágeno de tipo I.....	55
4.1.1. Composición y peso molecular de las subunidades de colágeno de tendón de cola de rata. ....	55
4.1.2. Mojabilidad de la superficie, morfología, caracterización química y mecánica y análisis calorimétrico de colágeno de tipo I.....	56
4.2. Efecto de la relación potencia - tiempo sobre las propiedades superficiales del PDMS.....	60
4.2.1. Mojabilidad.....	60
4.2.1.1. Tratamiento con plasma de oxígeno. ....	61

4.2.1.2. Tratamiento con plasma de nitrógeno. ....	65
4.2.1.3. Tratamiento con plasma de argón. ....	69
4.2.2. Morfología superficial. ....	72
4.2.2.1. Tratamiento con plasma de oxígeno. ....	72
4.2.2.2. Tratamiento con plasma de nitrógeno. ....	77
4.2.2.3. Tratamiento con plasma de argón. ....	81
4.2.3. Química de la superficie. ....	86
4.2.3.1. Tratamiento con plasma de oxígeno. ....	86
4.2.3.2. Tratamiento con plasma de nitrógeno. ....	88
4.2.3.3. Tratamiento con plasma de argón. ....	91
4.3. Preparación y caracterización del material compuesto PDMS-colágeno.....	93
4.3.1. Condiciones óptimas de proceso. ....	93
4.3.2 Morfología de la sección transversal. ....	93
4.3.3. Propiedades mecánicas a tensión.....	94
4.3.4. Resultados del ensayo de pelado.....	96
4.3.4.1. Tratamiento con plasma de oxígeno. ....	96
4.3.4.2. Tratamiento con plasma de nitrógeno. ....	98
4.3.4.3. Tratamiento con plasma de argón. ....	100
4.3.5. Esquema propuesto de las interacciones del PDMS modificado por plasma de oxígeno y nitrógeno con el colágeno. ....	101
 CONCLUSIONES.....	 105
PERSPECTIVAS.....	107
REFERENCIAS.....	109

<b>Tabla 1.1 Algunas características ideales de sustitutos de la piel .....</b>	<b>17</b>
<b>Tabla 4.1 Resultados de la medición del ángulo de contacto del PDMS modificado con plasma de oxígeno.....</b>	<b>61</b>
<b>Tabla 4.2 Resultados de la medición del ángulo de contacto del PDMS modificado con plasma de nitrógeno.....</b>	<b>66</b>
<b>Tabla 4.3 Resultados de la medición del ángulo de contacto del PDMS modificado con plasma de argón.....</b>	<b>69</b>
<b>Tabla 4.4 Valores de rugosidad (RMS) y superficie envolvente del PDMS tratado por plasma de oxígeno. ....</b>	<b>75</b>
<b>Tabla 4.5 Valores de rugosidad (RMS) y superficie envolvente del PDMS tratado por plasma de nitrógeno. ....</b>	<b>80</b>
<b>Tabla 4.6 Valores de rugosidad (RMS) y superficie envolvente del PDMS tratado por plasma de argón.....</b>	<b>84</b>
<b>Tabla 4.7 Propiedades mecánicas a tensión del PDMS sin modificar, modificado con plasma de oxígeno y material compuesto PDMS-colágeno.....</b>	<b>95</b>

## LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1.1 Composición y estructura de la piel .....	7
Figura 1.2 Quemadura de 2º grado. ....	10
Figura 1.3 Distribución geográfica de los casos de quemaduras durante el año 2013. ....	12
Figura 1.4 Distribución geográfica de los casos de quemaduras durante el primer semestre del año 2014. ....	12
Figura 1.5 Pie Diabético (isquemia) y amputación del quinto dedo en pie diabético. ....	14
Figura 1.6 Prevalencia de diabetes en adultos por diagnóstico previo según entidad federativa. ....	14
Figura 1.7 Autoinjerto de piel de espesor total.....	19
Figura 3.1 Sylgard 184, reacción para obtención de película de polidimetilsiloxano . ....	47
Figura 3.2 Configuración experimental para el tratamiento de plasma. ....	47
Figura 3.3 Vista esquemática del ensayo de pelado en T del material bicapa PDMS- colágeno. ....	53
Figura 4.1 Representación esquemática del patrón electroforético de (1) marcador de peso molecular, (2) colágeno tipo I de tendón de cola de rata comercial y (3) colágeno tipo I extraído en el laboratorio de tendón de cola de rata. ....	55
Figura 4.2 Micrografía de película de colágeno.....	56
Figura 4.3 Espectro de infrarrojo de colágeno tipo I.....	58
Figura 4.4 Gráfica esfuerzo deformación de película de colágeno tipo I.....	59
Figura 4.5 Termograma de colágeno hidratado en agua ácido acético. ....	59
Figura 4.6 Termograma de colágeno hidratado en agua desionizada. ....	60

<b>Figura 4.7 (a) Superficie de respuesta para el ángulo de contacto en agua en función del tiempo y potencia (experimental), (b) Superficie de respuesta para el ángulo de contacto en agua en función del tiempo y potencia (optimización), (c) Gráfica de contorno del ángulo de contacto en agua en función del tiempo y potencia, (d) Gráfica de interacción potencia-tiempo (tratamiento con plasma de oxígeno). .....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 4.8 (a) Superficie de respuesta para el ángulo de contacto en agua en función del tiempo y potencia (experimental), (b) Superficie de respuesta para el ángulo de contacto en agua en función del tiempo y potencia (optimización), (c) Gráfica de contorno del ángulo de contacto en agua en función del tiempo y potencia, (d) Gráfica de interacción potencia-tiempo (tratamiento con plasma de nitrógeno).....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 4.9 (a) Superficie de respuesta para el ángulo de contacto en agua en función del tiempo y potencia (experimental), (b) Superficie de respuesta para el ángulo de contacto en agua en función del tiempo y potencia (optimización), (c) Gráfica de contorno del ángulo de contacto en agua en función del tiempo y potencia, (d) Gráfica de interacción potencia-tiempo (tratamiento con plasma de argón). .....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 4.10 Imágenes de SEM de: (a) la superficie del PDMS sin modificar e imágenes de la superficie del PDMS modificado con oxígeno, (b) tratamiento de 40 W y 5 min, (c) tratamiento de 40 W y 15 min, (d) tratamiento de 80 W y 10 min, (e) tratamiento de 120 W y 5 min, (f) tratamiento de 120 W y 15 min.....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 4.11 Topografía AFM del PDMS. (a) sin tratamiento, (b-c) 40 y 120 W / tratamiento de 5 minutos, (d) 80 W / tratamiento de 10 minutos, (e-f) y 120 W / tratamiento de 15 minutos (plasma de oxígeno). .....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 4.12 Valores de ángulo de contacto y rugosidad como función de la potencia y tiempo de tratamiento de: (a) 5 min, y (b) 15 min (plasma de oxígeno).....</b>	<b>76</b>
<b>Figura 4.13 Imágenes de SEM de: (a) la superficie del PDMS sin modificar e imágenes de la superficie del PDMS modificado con nitrógeno, (b) tratamiento de 40 W y 5 min, (c) tratamiento de 40 W y 15 min, (d)</b>	

tratamiento de 80 W y 10 min, (e) tratamiento de 120 W y 5 min, (f) tratamiento de 120 W y 15 min.....	78
<b>Figura 4.14 Topografía AFM del PDMS. (a) sin tratamiento (b-c) 40 y 120 W / tratamiento de 5 minutos (d) 80 W / tratamiento de 10 minutos, (e-f) y 120 W / tratamiento de 15 minutos (plasma de nitrógeno) .....</b>	<b>79</b>
<b>Figura 4.15 Valores de ángulo de contacto y rugosidad como función de la potencia y tiempo de tratamiento de: (a) 5 min, y (b) 15 min (plasma de nitrógeno) .....</b>	<b>80</b>
<b>Figura 4.16 Imágenes de SEM de: (a) la superficie del PDMS sin modificar e imágenes de la superficie del PDMS modificado con argón, (b) tratamiento de 40 W y 5 min, (c) tratamiento de 40 W y 15 min, (d) tratamiento de 80 W y 10 min, (e) tratamiento de 120 W y 5 min, (f) tratamiento de 120 W y 15 min.....</b>	<b>82</b>
<b>Figura 4.17 Topografía AFM del PDMS. (a) sin tratamiento (b-c) 40 y 120 W / tratamiento de 5 minutos (d) 80 W / tratamiento de 10 minutos, (e-f) y 120 W / tratamiento de 15 minutos (plasma de argón) .....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 4.18 Valores de ángulo de contacto y rugosidad como función de la potencia y tiempo de tratamiento de: (a) 5 min, y (b) 15 min (plasma de argón) .....</b>	<b>85</b>
<b>Figura 4.19 Espectros FTIR del PDMS para diferentes tratamientos de plasma de oxígeno (a) PDMS sin modificar, (b) 40 W/5 min, (c) 120 W/5 min, (d) 80 W/10 min, (e) 40 W/15 min y (f) 120 W/15 min. ....</b>	<b>88</b>
<b>Figura 4.20 Espectros FTIR del PDMS para diferentes tratamientos de plasma de nitrógeno (a) PDMS sin modificar, (b) 40 W/5 min, (c) 120 W/5 min, (d) 80 W/10 min, (e) 40 W/15 min y (f) 120 W/15 min. ....</b>	<b>90</b>
<b>Figura 4.21 Aumento en la intensidad de la banda 1820 cm<sup>-1</sup> y la formación de una nueva banda a 2158 cm<sup>-1</sup>.....</b>	<b>90</b>
<b>Figura 4.22 Espectros FTIR del PDMS para diferentes tratamientos de plasma de argón (a) PDMS sin modificar, (b) 40 W/5 min, (c) 120 W/5 min, (d) 80 W/10 min, (e) 40 W/15 min y (f) 120 W/15 min. ....</b>	<b>92</b>
<b>Figura 4.23 Imagen de SEM de la sección transversal del material compuesto PDMS- colágeno. ....</b>	<b>94</b>

<b>Figura 4.24 Curva esfuerzo-deformación del (a) PDMS sin tratamiento, (b) PDMS tratado y (c) material compuesto PDMS-colágeno. ....</b>	<b>95</b>
<b>Figura 4.25 Resistencia normalizada vs desplazamiento durante el ensayo de pelado en T del material compuesto PDMS/colágeno (tratamiento con plasma de oxígeno). ....</b>	<b>97</b>
<b>Figura 4.26 Resistencia normalizada vs desplazamiento durante el ensayo de pelado en T del material compuesto PDMS/colágeno (tratamiento con plasma de nitrógeno). ....</b>	<b>99</b>
<b>Figura 4.27 Resistencia normalizada vs desplazamiento durante el ensayo de pelado en T del material compuesto PDMS/colágeno (tratamiento con plasma de argón). ....</b>	<b>101</b>
<b>Figura 4.28 Propuesta de reacción para la activación de la superficie del PDMS mediante plasma de oxígeno. ....</b>	<b>102</b>
<b>Figura 4.29 Patrones de formación de puentes de hidrogeno colágeno - PDMS (a) puente de hidrogeno amina – carboxilo, (b) puente de hidrogeno carbonilo – hidroxilo, (c) puente de hidrogeno hidroxilo – hidroxilo y (d) formación simultanea de puentes de hidrogeno. ....</b>	<b>103</b>
<b>Figura 4.30 Propuesta de reacción para la activación de la superficie del PDMS mediante plasma de nitrógeno. ....</b>	<b>103</b>
<b>Figura 4.31 Patrones de formación de puentes de hidrogeno colágeno - PDMS (a) puente de hidrogeno amina – amina, (b) puente de hidroxilo – nitrilo y (c) formación simultanea de puentes de hidrogeno. ....</b>	<b>104</b>

## RESUMEN

La unión química directa de biomoléculas sobre la superficie de polímeros químicamente inertes, como el polidimetilsiloxano (PDMS), no se logra fácilmente; por lo tanto, es necesaria la pre-activación de tales materiales, seguida de la unión de la biomolécula. Esta tesis describe un procedimiento para funcionalizar la superficie del PDMS con plasmas a base de oxígeno, nitrógeno y argón, seguido de la adhesión de colágeno tipo I para la preparación de un material compuesto bicapa libre de adhesivo y previsto como un sustituto de piel. Tratamientos de plasma entre 40 y 120 W entre 5 y 15 min fueron usados y el grado de modificación superficial fue seguido mediante ángulo de contacto, espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR), microscopía de fuerza atómica (AFM), microscopía electrónica de barrido (SEM) y pruebas de adhesión. Se encontró que a medida que se incrementa la potencia y el tiempo del tratamiento de plasma, el ángulo de contacto del PDMS disminuye mientras que la rugosidad superficial se incrementa según lo revelado por SEM y AFM. La formación de grupos funcionales que contienen oxígeno y nitrógeno en la superficie se detectó mediante FTIR. Las pruebas de pelado en T, realizadas a los PDMS tratados a las condiciones óptimas de proceso de cada uno de los gases de plasma y recubiertos con colágeno, mostraron valores de fuerza máxima, superiores a los medidos para el material compuesto bicapa sin tratamiento. Los PDMS tratados con plasma de oxígeno mostraron el mayor valor en el ensayo de pelado de 0.1 N/mm, que fue 3.3 veces más alto que el del material compuesto no tratado.

La mejora observada en la adhesión fue atribuida al mayor anclaje mecánico promovido por el aumento de la rugosidad y la formación de grupos funcionales hidrofílicos. Esto proporcionó un material compuesto libre de adhesivo de dos capas adecuado como sustituto de la piel.

## **ABSTRACT**

Direct chemical bonding of biomolecules to the surface of chemically inert polymers such as polydimethylsiloxane (PDMS) is not easily achieved; therefore, pre-activation of such materials, followed by attachment of the biomolecule is necessary. This thesis describes a procedure to functionalize a PDMS surface by oxygen, nitrogen and argon-based plasma followed by the adhesion of collagen type I for the preparation of adhesive-free bilayer composite intended as skin substitute. Plasma treatments between 40 and 120 W for 5 to 15 min were used and the extent of surface modification was followed by contact angle, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, atomic force microscopy (AFM), scanning electron microscopy (SEM) and adhesion tests. It was found that as the plasma power and time were increased, PDMS contact angle decreased while surface roughness increased as revealed by SEM and AFM. The formation of oxygen- and nitrogen-containing functional groups at the surface was detected by FTIR. T-peel tests performed on PDMS treated with each of gas-plasma at optimal process conditions and covered with collagen showed higher peel strength values than that measured for the untreated bilayer composite. The PDMS treated by oxygen plasma exhibited the highest value from adhesive strength T-peel test, 0.1 N/mm, which was 3.3 times higher than the untreated composite.

The observed enhancement in the adhesion strength was attributed to the increased mechanical interlocking driven by the increased roughness and the formation of hydrophilic functional groups. This provides an adhesive-free bilayered composite suitable as skin substitute.

## INTRODUCCION

Los silicones son polímeros que se construyen alrededor de un marco de átomos de silicio y oxígeno, en el que los radicales alifáticos, generalmente grupos metilo, a menudo están presentes [1]. Las cadenas de polímero individuales pueden diferir en longitud y en el grado de entrecruzamiento. La longitud de cadena y entrecruzamiento son críticos en la determinación de las propiedades físicas de los silicones [2]. Estos materiales se han utilizado en la medicina por más de 65 años [1].

Los polidimetilsiloxanos (PDMS) tienen una larga historia de uso como biomaterial debido a su buena biocompatibilidad, baja toxicidad y buenas propiedades mecánicas. Estos polímeros, en general, pueden dar origen a cadenas muy flexibles ( $T_g \approx -120^\circ\text{C}$ ) con una buena estabilidad térmica y química [3-5]. Debido a que es un polímero relativamente barato y de fácil procesamiento, se ha utilizado en una amplia gama de productos biomédicos, dispositivos, implantes y prótesis [5, 6].

En el cuidado de heridas por quemadura la historia del uso de silicones data de los años sesenta donde se utilizaban fluidos de PDMS como un tratamiento de inmersión para pacientes quemados. La técnica fue particularmente eficaz en las manos [7, 8]. Desafortunadamente, el modo de acción de los fluidos de PDMS en el tratamiento de quemaduras nunca fue explicado y su uso se detuvo cuando se inyectaron silicones de grado industrial impuros para aumentar tejidos blandos [9].

El PDMS se ha convertido en una herramienta muy útil en el tratamiento no invasivo de heridas, y otro ejemplo son los apósitos absorbentes recubiertos con silicón que fueron introducidos para la fijación de injertos de piel [10]. Estas láminas o películas se ponen en contacto con la herida, evitando que el apósito absorbente secundario se pegue a la herida (o a la piel alrededor de la herida). Esto ayuda a minimizar el dolor durante el cambio del apósito.

Otros biomateriales novedosos para el tratamiento de las heridas de la piel son los sustitutos dérmicos acelulares cubiertos por una lámina de PDMS. Estos funcionan

como una pseudoepidermis temporal (generalmente de 2-3 semanas, posteriormente, la capa de PDMS se sustituye por un injerto delgado de piel, que cierra de forma estable la herida), y que incluyen diversos biopolímeros como nanofibras de fibroína de seda, colágeno, quitosano y varios materiales compuestos [11-13]. Muchos de estos materiales se encuentran bajo investigación y algunos ya se encuentran disponibles comercialmente. Este tema se describirá en el Capítulo 1.

En particular, películas semipermeables de PDMS son ampliamente utilizadas en la fabricación de apósitos para heridas debido a su capacidad de simular la función de la piel de transmisión de humedad, así como sus propiedades de flujo de naturaleza tixotrópica, lo que permite su aplicación uniforme con penetración controlada sobre superficies como películas de colágeno.

La reacción de entrecruzamiento del PDMS se da por reacción con grupos hidroxilo, y dado que los grupos hidroxilo también están presentes en la capa de colágeno, la unión entre las capas es posible. Esto a su vez, evita la necesidad de un material adhesivo para unir la capa del polímero y la capa del biopolímero [14].

Un pre polímero de PDMS vinil terminado ampliamente utilizado como biomaterial, disponible comercialmente y de fácil uso, es el Sylgard® 184 (Dow Corning, EEUU). Este PDMS no posee grupos hidroxilo que reaccionen con el colágeno, por lo que es necesario recurrir a tecnologías mediante las cuales se modifique y/o funcionalice la superficie del PDMS para lograr la unión entre ambas capas.

Los métodos tradicionales de tratamiento de superficies son en su mayoría procesos químicos, no obstante las exigencias ecológicas actuales han obligado a buscar métodos alternativos menos perjudiciales con el medio ambiente [15-22].

La tecnología de plasma sobre superficies poliméricas ocupa un papel destacado en la investigación actual acerca de la funcionalización y modificación superficial de polímeros; éstos poseen una relativa estabilidad térmica, un coeficiente de fricción bajo, una energía superficial baja y una escasa reactividad química. No obstante,

estas dos últimas características no favorecen la adhesión con otros materiales, lo que puede perjudicar su biocompatibilidad [23].

Cuando se ponen en contacto superficies de polímeros con plasmas fríos, varios procesos concurrentes pueden ocurrir en la interface de plasma-polímero, dependiendo de las características químicas y físicas del propio plasma. De hecho, los plasmas fríos, producidos por descargas eléctricas en los gases de baja presión, se componen de una mezcla de especies altamente reactivas, es decir, iones, radicales, electrones, fotones y moléculas excitadas. Su composición y características dependen en gran medida de los parámetros del dispositivo, tales como la geometría del reactor, la presión del gas, la tasa de flujo de gas, la alimentación eléctrica y la frecuencia [24].

El tratamiento de superficies con plasmas fríos permite una activación funcional, o funcionalización de las superficies, cosa que por tratamientos químicos no puede lograrse fácilmente [25, 26]. Los plasmas pueden hacer que las moléculas de una superficie se enlacen con componentes moleculares de otras sustancias; eligiendo adecuadamente los gases con que se generan los plasmas, éstos servirán para modificar la superficie de un determinado material. Dicho de otro modo, promueve la formación de grupos moleculares químicamente funcionales que mejoran la adhesión interfacial y así, la superficie tratada con un plasma, por ejemplo, de oxígeno será receptiva a posteriores tratamientos.

Este trabajo está dividido en cuatro Capítulos con estructura tal que se puedan leer independientemente. En el primer Capítulo se presenta una breve descripción de la piel y sus afecciones como son las quemaduras y las úlceras diabéticas. Asimismo se mencionan los antecedentes en cuanto a los avances para el tratamiento de este tipo de heridas y el desarrollo de los sustitutos de piel. A continuación, en el Capítulo 2 se describen brevemente algunos conceptos sobre tratamientos de superficies e inmovilización de bio-moléculas mediante técnicas de plasma. En este trabajo se ha utilizado la técnica de plasma de baja presión para la modificación de las

propiedades superficiales utilizando oxígeno, nitrógeno y argón como gases de ionización.

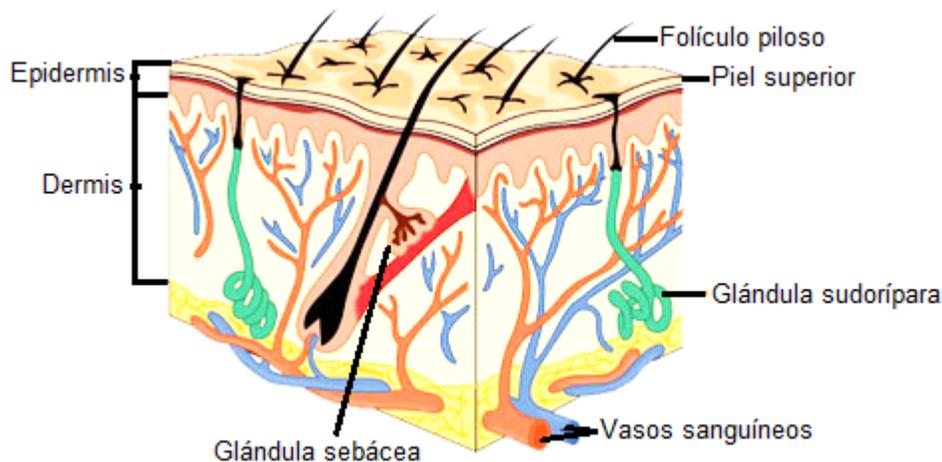
En el Capítulo 3 se describe la metodología experimental que se desarrolló para la preparación del material compuesto PDMS-Colágeno. Primeramente se describe la metodología para la extracción del colágeno tipo I. También se presenta el dispositivo experimental con el que se hicieron las modificaciones al PDMS con diferentes condiciones de potencia-tiempo y se da una descripción de los métodos de caracterización realizados a estos materiales. Posteriormente, el Capítulo 4 describe los resultados estadísticos obtenidos de las modificaciones superficiales del PDMS, caracterización y pruebas de adhesión.

Finalmente, se presentan las conclusiones del trabajo y se hace una reflexión sobre las perspectivas del desarrollo de sustitutos de piel.

## CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

La piel, es el órgano más grande del organismo y realiza una gran variedad de funciones vitales para el mantenimiento de la homeostasis corporal. Comprende aproximadamente el 15% del peso corporal. La superficie total de la piel de un adulto oscila entre 1.3 y 2 metros cuadrados. En términos de composición química, la piel es alrededor de 70% agua, 25% de proteínas y 2% lípidos. El resto incluye minerales, ácidos nucleicos, glicosoaminoglicanos, proteoglicanos y muchos otros productos químicos.

La piel se compone de dos capas: la epidermis, o capa externa, y la dermis o capa interna, las cuales se unen a través de la unión dermoepitelial (Figura 1.1).



*Figura 1.1 Composición y estructura de la piel (Procedencia de la imagen: Huntsman Cancer Institute de la Universidad de Utah, 2015).*

La epidermis es un epitelio escamoso estratificado y se compone normalmente de cuatro capas, que son, de profunda a superficial: estrato basal, estrato espinoso, estrato granular y estrato córneo. Su estructura y espesor varían según el sitio estudiado, siendo más gruesa y compleja en la palma de la mano y en la planta del pie. En estas regiones alcanza un espesor de hasta 1.5 mm. Los queratinocitos son las principales células de la epidermis (85%), el resto son células dentríticas epidermales residentes: células de Langerhans (5-8%), melanocitos (5%) y células

de Merkel (3-5%). Otras células como linfocitos, eosinófilos y neutrófilos pueden encontrarse en la epidermis pero no son células residentes.

La dermis es el mayor componente estructural de la piel. Proporciona una matriz para las estructuras de soporte y las secreciones que mantienen e interaccionan con la epidermis y sus anexos. Estas incluyen el tejido conjuntivo, vasos sanguíneos y linfáticos, nervios y receptores, y componentes celulares. Es una estructura termorreguladora y sensorial importante, que contribuye significativamente al almacenamiento del agua en el cuerpo.

La dermis es la capa que le otorga elasticidad, plegabilidad, textura y consistencia a la piel. Y en la piel dañada, la cantidad de dermis remanente es muy importante para la evolución posterior, porque la dermis no se regenera. Este es el principal motivo por el cual el desarrollo de los "sustitutos de piel" tiene tanta importancia.

La unión dermoepitelial es la interface entre la epidermis y la dermis, siendo responsable de la cohesión entre ambas capas. Está compuesta por la membrana plasmática de los queratinocitos del estrato basal de la epidermis y la membrana basal de la dermis, la cual se divide en: lámina lúcida, lámina densa y sub-lámina densa.

La matriz del tejido conjuntivo dérmico consiste principalmente en fibras de colágeno tipo I y fibras elásticas, organizadas en un patrón coherente, principalmente haces de colágeno rodeados de fibras elásticas. Los componentes no fibrosos consisten en proteoglicanos, y determinadas glicoproteínas. La dermis superficial se compone de fibras delgadas de colágeno irregularmente distribuidas, y una red de fibras de elastina. En la dermis más profunda, el colágeno es grueso y denso y las fibras tienden a ir en paralelo a la superficie cutánea; las fibras de elastina también son gruesas pero menos numerosas [27, 28].

La pérdida de piel puede ocurrir por muchas razones, incluyendo trastornos genéticos (condiciones ampulosas), traumatismo agudo, heridas crónicas o incluso intervenciones quirúrgicas. Una de las razones más comunes para la pérdida de la

piel es el trauma térmico, donde áreas sustanciales de la piel pueden ser dañadas sin la posibilidad de regeneración. Las quemaduras a veces pueden dar lugar a rápidas, extensas y profundas heridas que no pueden ser tratadas con éxito con las técnicas comunes y puede llevar a la muerte. Heridas crónicas a menudo dejan a los pacientes en riesgo de infección, hospitalización y potencial amputación de los miembros infectados; esto a su vez conduce a altas tasas de morbilidad y mortalidad, disminución de la calidad de vida y altos costos de atención médica.

La complejidad en la composición y estructura de la piel hace que su reconstrucción en muchos casos, siga siendo un reto cuando es comprometida [29].

Las características diferentes del paciente y la reconstrucción en sí deben ser consideradas antes de elegir cualquier tratamiento específico. El análisis debe considerar la anatomía normal de la piel, la condición del paciente, enfermedades relacionadas, tipo de herida, el tejido perdido y el nivel de contaminación. El uso de vendajes de diferentes materiales, ya sean sintéticos o naturales, para asistir los procesos de reparación de las heridas comenzó buscando una sola funcionalidad: la protección de la lesión, es decir una función pasiva. En años recientes, la idea ha evolucionado con el fin de crear materiales que tengan un rol activo y que ayuden a que las heridas sanen de forma más rápida o promoviendo la regeneración de tejido. En este marco, un plan de reconstrucción se puede formular con los objetivos de cierre de heridas, prevención de la infección y una cobertura estable-robusta [30].

### **1.1. Quemaduras**

Las quemaduras, culpables del trauma más serio y devastador que le puede suceder a un ser humano son lesiones que tradicionalmente han sido definidas como daños físicos o traumatismos causados por la transferencia aguda de energía (mecánica, térmica, eléctrica, química, radiación) que genera, de forma local, zonas de hiperemia, estasis, necroptosis (necrosis, apoptosis, autofagia asociada con muerte celular), así como una respuesta inflamatoria sistémica que busca detener

y reparar dicho daño. En años recientes, esta definición ha sido ampliada integrando el daño psicológico y el daño económico que acompañan tanto de forma aguda como crónica a los pacientes, a sus familiares y a la sociedad [31].

En México, según datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), el 62% de la población, ha sufrido algún tipo de accidente; de los cuales el 5.7% ha sufrido y ha tenido que ser atendido por causa de quemaduras. Sin embargo, no hay cifras confiables del número de pacientes quemados a nivel nacional.

Con base en los datos reportados por el INEGI a través del Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados del Instituto Nacional de Rehabilitación (CENIAQ), en el país 11 mil 500 personas ingresan anualmente a hospitales públicos por quemaduras, el 20 por ciento con quemaduras de segundo grado (Figura 1.2) y tercer grado, las catalogadas como graves [32].



*Figura 1.2 Quemadura de 2º grado  
(Procedencia de la imagen: ADAM Health Solutions, 2015).*

El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica reportó que durante el año 2013 hubo 126,786 nuevos casos por quemaduras, mientras que de enero a junio de 2014 se presentaron 65,182. De dichas quemaduras, 56% sucedieron en adultos de 20 a 50 años de edad y 32% en niños de 0 a 19 años de edad. 85% de las quemaduras de los adultos sucedieron al estar realizando actividades laborales mientras que las quemaduras de niños sucedieron, en 90% de los casos, dentro de sus hogares, y de las cuales, el 80% fueron debidas a agua caliente.

A escala nacional, el 93% de todos los pacientes quemados fueron atendidos en hospitales públicos. El IMSS atendió a 67.5%, la Secretaría de Salud a 19.8%, otras instituciones atendieron a 6.9%, el ISSSTE a 3.3% y 2.5% DIF, PEMEX, SEMAR y SEDENA [33]. La distribución geográfica de los casos, del año 2013 y de enero a junio del año 2014 se resumen, respectivamente, en las Figuras 1.3 y 1.4 [31].

La atención médica del paciente quemado es muy cara por los gastos prehospitales y hospitalarios (incluyendo los costos de la biotecnología consumible, estudios paraclínicos, medicamentos, nutrición, etcétera). Se ha estimado que los costos por paciente varían de 35 mil a 600 mil pesos (2,173 a 36,231 dólares americanos) en casos de severidad leve sin disfunción orgánica. Estos costos se elevan de 600 mil a 6 millones de pesos (36,231 a 362,318 dólares americanos) en casos de severidad moderada (con o sin disfunción orgánica) y de 6 a 50 millones (362,318 a 2 millones 989,550 dólares americanos) en casos severos (con o sin falla orgánica múltiple). En la mayoría de los casos, el gobierno paga dicha atención médica en instituciones de salud pública ya que dichos montos no pueden ser solventados en forma exclusiva por los pacientes y sus familias [31].

Actualmente en el país se cuenta con 17 unidades equipadas para la atención a quemados: cinco en el Distrito Federal; una en Toluca, Estado de México; una en Morelia, Michoacán; una en Guadalajara, Jalisco; una en Hermosillo, Sonora; una en Villahermosa, Tabasco; una en Tlaxcala, Tlaxcala; una en Chihuahua, Chihuahua; Ciudad Victoria, Tamaulipas; una en Monterrey, Nuevo León; una en Xalapa y dos en el puerto de Veracruz, Veracruz. Además se cuenta con un centro nacional: el CENIAQ, ubicado en la ciudad de México.

El Instituto Mexicano del Seguro Social cuenta con una unidad para quemados en el Centro Médico Nacional de Occidente; otra, en el Hospital de Traumatología Lomas Verdes, y una más en el Hospital Magdalena de las Salinas. El Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado cuenta con una unidad en el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre. Todos se encuentran en el Distrito Federal.



Figura 1.3 Distribución geográfica de los casos de quemaduras durante el año 2013.



Figura 1.4 Distribución geográfica de los casos de quemaduras durante el primer semestre del año 2014.

En el estado de Yucatán no existe alguno de estos centros; sin embargo, en este año 2015 el Hospital Regional de Alta Especialidad de la Península de Yucatán (HRAEPY), ya inició la obra para la Unidad de Quemados que se ubicará en el cuarto piso de este nosocomio y será la primera en su tipo en el sureste de México. En 2014, se presentaron mil 62 casos de personas quemadas que fueron atendidas en el HRAEPY.

Idealmente, la terapia convencional se traduciría en la curación, lo que elimina la aparición de heridas crónicas y la necesidad de intervención adicional. Sin embargo, en el caso de que las heridas no cicatricen, se aplican formas más agresivas de tratamiento para promover la cicatrización de heridas, tales como la aplicación de apósitos, sustitutos de piel o la administración de factores de crecimiento [34].

## **1.2. Úlcera diabética**

Las complicaciones del pie (Figura 1.5), representan uno de los principales problemas de salud de los pacientes con diabetes mellitus, y la úlcera plantar es una de las lesiones más habituales. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), hay 171 millones de diabéticos en el mundo, y se estima que en el año 2025 el número aumentará hasta los 366 millones [35], debido principalmente al incremento de la esperanza de vida, la obesidad, el estilo de vida sedentario y el cambio de hábitos alimentarios [36].

En nuestro país en el año 2012, se estimó que el total de nuestra población era de 116.9 millones de habitantes. La prevalencia de la enfermedad se estimó en 9.2 % [37]. La distribución geográfica de los casos del año 2012 se resumen en la Figura 1.6 [38].

Se sabe que aproximadamente el 15% (uno de cada seis) de los pacientes diabéticos de todo el mundo presentarán al menos una úlcera plantar a lo largo de su vida [39-41], estimándose una incidencia anual del 2.4-2.6%, con una prevalencia del 4-10% [42].



Figura 1.5 a) Pie Diabético (isquemia), b) Amputación del quinto dedo en pie diabético.  
(Procedencia de la imagen: IMSS, 2012)



Figura 1.6 Prevalencia de diabetes en adultos por diagnóstico previo según entidad federativa.

La úlcera plantar o del pie diabético es una llaga o herida abierta que en general se produce en la planta del pie y que incluye, además, la gangrena y la necrosis. Esta afección puede llevar a una amputación menor o mayor, e incluso colocar en un alto riesgo la vida del paciente. Para que se tenga una idea sobre esta patología, el 85% de estas amputaciones está precedido por una úlcera en el pie. La amputación disminuye considerablemente la calidad de vida de los pacientes, donde solo un

tercio de estos pacientes vuelve a caminar con una prótesis. La evolución de los diabéticos con una amputación tiene un mal pronóstico, el 30% fallece en el primer año después de la intervención y al cabo de 5 años, un 50% sufre la amputación de la otra extremidad inferior. Lo alarmante de estas cifras es que el 80% de estas amputaciones se pudo haber prevenido y/o no haberse indicado.

Las úlceras y amputaciones constituyen un gran problema de salud que genera un alto costo para el paciente, sus familiares y los sistemas de salud pública que se ven obligados a destinar, en subsidios y atención médica, recursos importantes que pudieran destinarse a programas sociales, de investigación o desarrollo tecnológico. Más del 25% de los ingresos hospitalarios de pacientes diabéticos están relacionados con la presencia de pie diabético [43].

Actualmente en el país se registran más de 75 mil casos de amputación de pie diabético al año [44].

Veracruz, Estado de México y Tamaulipas son las entidades que reportan el mayor número de casos de úlcera diabética y de amputaciones por este padecimiento; sin embargo, en ninguna entidad la población está exenta de este padecimiento. La parte del cuerpo que se amputa con mayor frecuencia a los enfermos de pie diabético son los dedos del pie. En el Instituto Mexicano del Seguro Social por causa de la diabetes existen 97 mil 113 casos nuevos por año, 40 defunciones diarias, 4.5 millones de consultas en medicina familiar, 600 mil consultas en medicina no familiar, 57 mil egresos hospitalarios, letalidad de 5.7 por cada 100 diabéticos; es el segundo motivo de demanda de consulta en medicina familiar y el primer motivo de demanda en especialidades [44]. Investigaciones del Instituto Mexicano del Seguro Social revelan que los daños de la úlcera diabética en los enfermos continuarán hasta que las instituciones de salud apliquen nuevas tecnologías, tales como los sustitutos de piel, los derivados de factores de crecimiento, el oxígeno hiperbárico, los apósitos biológicos, las herramientas para realizar desbridamientos ultrasónicos, la terapia con células madre, nuevos antibióticos, etc. [45-47]. En la actualidad, el tratamiento de las úlceras plantares consiste en el control de las comorbilidades

(niveles de glucosa y enfermedad vascular), el desbridamiento, el manejo del exudado con los diferentes apósitos existentes, el manejo de la infección y la descarga del pie afectado. Esto regula el padecimiento, pero el riesgo de la amputación es latente.

### **1.3. Sustitutos de piel**

La finalidad del tratamiento del paciente con defectos cutáneos es la sustitución de la piel dañada por piel sana lo más rápidamente posible y con los mejores resultados estéticos y funcionales [28]. Esta aseveración es fácil de hacer, pero muy difícil de llevar a cabo.

Los avances en el tratamiento de quemaduras en los años 1960 y 1970, incluyeron: la escisión temprana, la reanimación con líquidos, la ventilación mecánica, los tópicos antimicrobianos y las técnicas de injerto de piel, los cuales permitieron a las víctimas de quemaduras con una gran superficie corporal quemada, sobrevivir.

Mundialmente la técnica más utilizada para cubrir un defecto cutáneo es el autoinjerto de piel. Sin embargo, en determinadas situaciones y/o regiones corporales no sólo es necesario alcanzar una cobertura cutánea estable, sino que también, una buena calidad de la piel.

La incapacidad para lograr la cobertura de la piel autóloga de grandes quemaduras fue un incentivo importante para los Institutos Nacionales de Salud para invertir en el desarrollo de sustitutos de piel en los años 1970 y 1980. La inversión en estos proyectos produjo una mejor comprensión de los requisitos de los sustitutos de la piel y también llevó a la comercialización de varias tecnologías que se utilizan actualmente para el tratamiento de pacientes quemados y se han extendido, en algunos casos, para su uso en la cirugía reconstructiva y el tratamiento de las heridas [48, 49].

Los sustitutos de la piel son un grupo heterogéneo de materiales que ayudan en el cierre temporal o definitivo de muchos tipos de heridas, dependiendo de la cobertura de la herida, la cual varía en función de la herida y las características del producto. Estos productos, sin embargo, no son sustitutos del desbridamiento o de los tratamientos quirúrgicos. Los sustitutos de la piel ofrecen soluciones reconstructivas que pueden ser superiores a otros métodos disponibles, ya que pueden requerir menos vascularizado de la herida, aumentar el componente dérmico de la herida cicatrizada, reducir o eliminar los factores inhibitorios, reducir la respuesta inflamatoria y proporcionar una cobertura rápida y segura.

Actualmente no existe un sustituto perfecto o ideal de la piel. Las propiedades ideales cualitativas del producto perfecto se mencionan en la Tabla 1.1. Estas características no son fácilmente cuantificables en los productos individuales; sin embargo, los médicos pueden considerar cómo estos principios afectan la selección del producto y la disponibilidad. Cada tipo de producto tiene aplicaciones, ventajas y desventajas, que varían dependiendo del escenario clínico. La variedad es tan grande que una verdadera comparación hombro con hombro de todos los productos no es factible [50].

***Tabla 1.1. Algunas características ideales de sustitutos de la piel.***

*Resistencia bacteriana*  
*Resistencia mecánica*  
*Plegabilidad*  
*Elasticidad*  
*Semipermeable al oxígeno y al agua*  
*No tóxico*  
*No inflamatoria*  
*No inmunogénico*  
*Función de largo plazo*  
*Pigmento*  
*Estructura epidérmica especializada (por ejemplo la piel sin pelo)*  
*Fácil de preparar*  
*Disponibilidad*  
*Bajo costo*

Los sustitutos de piel pueden clasificarse según su:

- Permanencia: transitorio y permanente.
- Origen: biológicos (aloinjerto, xenoinjerto, autoinjerto) y sintéticos.
- Composición: epidérmicos, dérmicos y mixtos [51].

A continuación se mencionan las características de algunos de ellos.

### **1.3.1. Autoinjertos de piel**

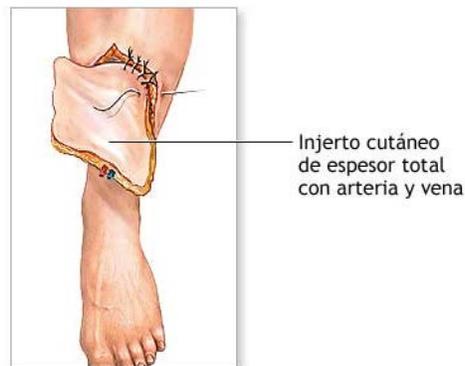
Los autoinjertos son tejidos de otras partes sanas de la piel injertados en una nueva posición en el mismo individuo. El uso de autoinjertos es el tratamiento más utilizado para sustituir la piel perdida, lo cual es de gran utilidad en quemaduras de menos del 40% de la superficie corporal total. En los casos de quemaduras con el 60% o más de la superficie corporal total, se utilizan injertos de donadores. Aunque con la aplicación de este método se conduce a la recuperación de toda la superficie perdida, el tiempo de espera por el paciente puede provocar algunos inconvenientes como dolor, infecciones, cicatrices que producen compromiso funcional y deformidades, entre otros. Normalmente se dividen en 3 categorías principales: injertos de piel de espesor parcial, injertos de piel de espesor total y piel autóloga cultivada.

#### **1.3.1.1. Injertos de piel de espesor parcial**

Los injertos de piel de espesor parcial contienen la epidermis y las capas superiores de la dermis con un espesor variable, dejando las capas restantes de la dermis para sanar por epitelización secundaria a partir de los bordes de la herida y los queratinocitos en los anexos de la dermis profunda.

### 1.3.1.2. Injertos de piel de espesor total

Los injertos de piel de espesor total (Figura 1.7), contienen la epidermis y toda la dermis [52]. Estos injertos son preferidos en zonas donde cicatrices significativas o contracturas de los injertos provocan consecuencias nocivas estéticas o funcionales. Debido a que hay una cantidad limitada de sitios donadores de injertos de piel de espesor total, son generalmente reservados para la reconstrucción de las heridas de cabeza, cuello, manos, áreas de los genitales y pechos.



*Figura 1.7 Autoinjerto de piel de espesor total (Procedencia de la imagen: ADAM Health Solutions, 2015).*

### 1.3.1.3. Piel autóloga cultivada

Los sustitutos de piel autóloga cultivada, con frecuencia se conocen como autoinjertos epidérmicos cultivados. Esta nomenclatura incluye injertos epidérmicos e injertos excluyentes de dermis/epidermis.

Algunos ejemplos de autoinjertos comerciales son: Epicel<sup>®</sup> (Genzyme biosurgery, Cambridge, MA) y Laserskin<sup>®</sup>. (Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italia) [53, 54].

### **1.3.2. Aloinjertos**

Los aloinjertos son injertos trasplantados entre individuos genéticamente no idénticos de la misma especie. La mayoría de aloinjertos de sustitución de piel humana provienen de órganos procedentes de cadáveres. Dependiendo de los métodos para procesarla y almacenarla, pueden clasificarse como aloinjertos cadavéricos criopreservados y preservado con glicerol. Su ventaja es que logra sellar la herida optimizando el sistema inmunológico del paciente. Su obtención es de un cadáver con no más de 18 horas postmortem, una vez que el injerto se adhiere a la piel, puede ser revascularizado por medio de inoculación. Este injerto proporciona factores de crecimiento y citosinas esenciales para provocar quimiotaxis y proliferación en el lecho de la herida. Los aloinjertos también pueden dividirse en 3 categorías: epitelial/epidérmico, dérmico y compuesto (epidermis y dermis). Dentro de estas categorías puede ser acelular, celular/viviente o celular/no-viviente [55].

#### **1.3.2.1. Aloinjertos epiteliales / epidérmico**

El epitelio de la membrana amniótica humana proporciona una buena protección contra la pérdida por evaporación, funciona como barrera, mientras que la matriz de fibronectina y de colágeno dérmico proporciona alguna función dérmica. Es transparente, permite un buen seguimiento de la herida, y es mínimamente adherente. Sin embargo, es difícil de obtener, preparar y almacenar y debe ser cambiado con frecuencia; tiene un potencial más importante para la transmisión de enfermedades infecciosas que otros productos. Tiene bajo costo en su almacenamiento y preparación, es por eso que se utiliza principalmente en países con economías emergentes, donde el acceso a otros sustitutos de piel es limitado. El injerto tiene que ser renovado cada dos días. Puede ser utilizado inmediatamente o ser congelado a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  en combinación con hipoclorito de sodio [56].

### **1.3.2.2. Aloinjertos acelulares dérmicos**

Son productos que consisten en la dermis de diferentes grosores en la que la epidermis ha sido removida (des-epitelializada/des-epidermizada), tomada de donantes cadavéricos humanos. Los injertos son criopreservados, liofilizados y glicerolizados en preparación para eliminar células donadoras, materiales infecciosos y antigénicos. La estructura dérmica acelular resultante sirve como un andamio o plantilla para el crecimiento interno de los fibroblastos y capilares hasta que se sustituye por tejido huésped. Algunos productos comerciales incluyen a AlloDerm® (LifeCell, NJ), GraftJacket® (Wright Medical Technologies, Inc., Arlington, TN), y DermaMatrix™ [57].

### **1.3.2.3. Aloinjertos celulares dérmicos**

Se usan sólo células de donantes para ayudar a crear una estructura compuesta de regeneración de un andamio de varios materiales. Esta estructura es entonces sembrada con fibroblastos donantes que sintetizan proteínas y otros componentes de matriz extracelular que sirven para ayudar a estimular las células dentro de la herida del huésped para promover la curación (cicatrización). Ejemplos de aloinjertos celulares dérmicos son: ICX-SKN (Intercytex Ltd, Manchester, UK), TransCyte®. (Advanced BioHealing, Inc., La Jolla, CA) y Dermagraft®. (Advanced Biohealing, Inc., La Jolla, CA) son ejemplos de aloinjertos acelulares dérmicos [58, 59].

### **1.3.2.4. Aloinjertos compuestos**

Los aloinjertos compuestos son los productos más avanzados y cercanos a la piel viva que se encuentran actualmente disponibles en el mercado. Los 2 productos prototípicos de esta línea son el Apligraf® y el Orcel®.

Apligraf® (Graftskin; Organogénesis, Inc., Canton, MA), es un producto compuesto bicapa que utiliza una combinación de gel de colágeno bovino tipo I y fibroblastos neonatales vivientes como componente dérmico, con una capa epidérmica cornificada compuesta de queratinocitos neonatales [60].

Orcel® (Ortec International, Inc., Nueva York, NY), es un producto bicapa compuesto en el que los queratinocitos neonatales se cultivan en una esponja recubierta no porosa la cual está compuesta de colágeno bovino tipo I. Los fibroblastos neonatales también son cultivados por el otro lado de la esponja porosa de colágeno. Este compuesto bicapa sirve como una matriz absorbible, con citocinas y factores de crecimiento secretados por los fibroblastos alogénicos [61].

### **1.3.3. Xenoinjertos**

Los xenoinjertos son tejidos provenientes de una especie utilizados como un injerto temporal en otra especie. En el mercado actual los productos porcinos son los más utilizados como xenoinjertos [62]. Estos consisten de la dermis en diferentes grosores en la que la epidermis ha sido removida (des-epitelializada/des-epidermizada). Dependiendo del proceso de preservación, los xenoinjertos se almacenan congelados o refrigerados para mantener la adhesividad, y la dermis pueda ser mallada para permitir el drenado de trasudados. Los xenoinjertos están indicados para aplicaciones en limpieza de heridas de espesor parcial y sólo se utilizan como cobertura temporal. Las recientes modificaciones a la piel de cerdo incluyen el entrecruzamiento con aldehídos y la impregnación de iones de plata para proporcionar injertos más duraderos y con mayor resistencia antimicrobiana.

Algunos ejemplos de xenoinjertos incluyen al Permacol™ (Tissue Science Laboratories, Hampshire, UK) y OASIS® Wound Matrix (HEALTHPOINT Ltd, Fort Worth, TX).

Históricamente, los médicos han preferido primeramente las membranas biológicas las cuales tienen propiedades de adherencia, hemostáticas y supresoras del dolor,

incluyen piel de cadáver, piel de cerdo y de membrana amniótica. Xenoinjertos, como la piel de cerdo, mostraron una buena cobertura temporal, pero la muy elevada antigenicidad resultó en un fracaso predecible a largo plazo. La piel de cadáver humano funciona bien como un sustituto temporal de piel pero tiende al rechazo entre los 10 y 14 días después de la aplicación. Además, el suministro puede ser errático y también hay una posibilidad de transmisión de enfermedades bacterianas o de otro tipo. Es evidente que se necesita mejores técnicas para el tratamiento de heridas muy grandes de forma más óptima.

#### **1.3.4. Sustitutos sintéticos**

Los sustitutos sintéticos de piel se caracterizan por formarse de moléculas no biológicas o polímeros no presentes en la piel normal, con la finalidad de permitir el cubrimiento por células epiteliales, así como el crecimiento de fibroblastos y vasos sanguíneos, además de evitar desencadenar una respuesta inmune [63]. Hasta principios de los 80, sólo unos cuantos productos para el cuidado de las heridas estaban disponibles, además de los apósitos tradicionales (productos derivados de la gasa) y las vendas con pasta de zinc.

Los primeros productos sintéticos presentados a mediados de los 80 habitualmente combinaban dos características principales: conservación de la humedad y absorción (espumas de poliuretano, hidrocoloides) o conservación de la humedad, y antibacterianos (geles yodóforos).

A mediados de los 90, los sustitutos sintéticos quirúrgicos se ampliaron a grupos de productos perfectamente reconocibles como películas permeables al vapor, hidrogeles, hidrocoloides, alginatos y espumas sintéticas. Además, se presentaron nuevos grupos de productos, como las mallas antiadherentes, en su mayor parte de silicón, los adhesivos tisulares, las películas de barrera y los sustitutos sintéticos con colágeno o plata.

En la actualidad, se comercializan diferentes tipos de productos sintéticos; sin embargo, el desarrollo de nuevos productos sintéticos compuestos y sustitutos cutáneos biotecnológicos sigue adelante.

#### **1.3.4.1. Sustitutos sintéticos disponibles comercialmente**

##### **1.3.4.1.1. Sustituto sintético monocapa**

Los sustitutos sintéticos monocapa son apósitos acelulares que se aplican sobre la piel una sola vez, permaneciendo en su lugar hasta generarse la reepitelización completa. Un ejemplo es el Suprathel® (Institute of Textile and Process Engineering, Denkendorf, Alemania; Burn Department of Marien Hospital, Stuttgart, Alemania), el cual es un vendaje sintético biodegradable monocapa acelular basado en ácido poli(DL-láctico) (> 70%), carbonato de trimetileno y policaprolactona. Se utiliza para cubrir los sitios donantes de injertos de piel de espesor parcial y quemaduras de espesor parcial [64].

##### **1.3.4.1.2. Sustitutos sintéticos bicapa**

Los sustitutos sintéticos de doble capa son productos acelulares de ingeniería, sin células alogénicas. Ellos funcionan como plantillas o matrices dérmicas que promueven el crecimiento interno de los tejidos del huésped para reparar los defectos o crear una neodermis. Contienen una capa de silicona epidérmica removible para ayudar a proteger la herida de la pérdida de humedad y la contaminación. Biobrane® e Integra® son los dos sustitutos de piel sintética de los que se ha acumulado una amplia experiencia clínica.

Biobrane® (UDL Laboratories, Inc., Rockford, IL) es un sustituto de la piel biosintético que consta de una membrana bilaminada de malla de nylon unida a una capa delgada de silicón [65]. La malla es recubierta con colágeno derivado de péptidos porcinos tipo I (análogo dérmico). La capa de silicón funciona como la

epidermis. Los poros pequeños están presentes para hacer a Biobrane® semipermeable, permitiendo a los transpirados escapar. La herida sana cuando los fibroblastos huéspedes y capilares invaden la herida reparando el defecto cutáneo, lo que permite la re-epitelización por el borde de la herida y los queratinocitos anexiales. Cuando la regeneración de la piel se lleva a cabo, Biobrane® es retirado de la herida. Biobrane® está indicado para quemaduras de espesor parcial en las que no intervengan sustancias químicas o productos derivados del petróleo y para la cobertura temporal de heridas parcial o completamente profundas recién extirpadas. También puede ser utilizado para la cobertura de sitios donantes de espesor parcial [50, 65].

Debido a la amplia experiencia clínica de Biobrane® desde su desarrollo en 1979, se ha convertido en un estándar de sustituto de piel para cobertura de lesiones térmicas. Biobrane® fue introducido por primera vez como una alternativa de menor costo a la piel de cadáver (aloinjerto) para la cobertura temporal de las heridas.

Integra® (Integra Life Sciences Corp., de Plainsboro, NJ) es un sustituto sintético bicapa de piel acelular compuesto por una hoja exterior de silicón (Silastic®-Dow Cornig), (análogo de la epidermis) con una matriz compuesta de colágeno bovino y glicosaminoglicanos (análogo dérmico) [66]. La matriz dérmica está diseñada para tener un tamaño de poro de 20 a 50 micrómetros para promover el crecimiento interno de fibroblastos y células endoteliales por la base de la herida. Integra proporciona una matriz y andamiaje para la regeneración de la estructura dérmica. La herida gradualmente remodela o reabsorbe la matriz para crear una neodermis que es incorporada en el tejido huésped durante un período de 3 a 6 semanas [67]. Después de que se haya producido la adecuada vascularización de la matriz y la neodermis se haya formado, la lámina de Silastic® puede ser retirada y el injerto de piel realizado. Esto se logra generalmente de 21 a 28 días después de la colocación. La hoja de Silastic®; sin embargo, puede dejarse en su lugar por un máximo de 61 días, en espera de la incorporación de la matriz o que los pacientes puedan convertirse en candidatos idóneos para un injerto de piel por otras

razones [68]. Alternativamente, muchas heridas pequeñas pueden volver a epitelizar sin la necesidad del injerto. Integra fue aprobado por la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés), para la cobertura de la heridas por quemaduras profundas de espesor parcial o completo que ponen en peligro la vida, cuando el autoinjerto no es suficiente o no estaba disponible para la cobertura o, cuando el autoinjerto no es deseable debido a otras circunstancias [69]. Integra<sup>®</sup> Life Sciences Corporation enumera otras indicaciones incluyendo úlceras por presión, úlceras venosas, úlceras diabéticas, heridas quirúrgicas, heridas traumáticas y drenajes quirúrgicos, con numerosos casos reportados que parecen demostrar su uso para aplicaciones casi infinitas. También se ha utilizado para reconstruir heridas de alto riesgo y heridas irradiadas en pacientes adultos mayores después de la resección del tumor [68].

Integra<sup>®</sup> ha sabido ofrecer una cobertura inmediata confiable después de la escisión de quemaduras profundas, mejorar la toma de autoinjertos epidérmicos delgados, disminuir la cicatrización hipertrófica mediante la limitación de la respuesta inflamatoria, mejorar la función y rango de movimiento de las articulaciones y extremidades, ofreciendo mejores resultados cosméticos para los pacientes [67, 70].

Ventajas adicionales de Integra<sup>®</sup> incluyen su disponibilidad inmediata para la cobertura de la herida, estética mejorada y elasticidad de los tejidos, reducción de la morbilidad del sitio donante y cicatrización, así como la eliminación del riesgo teórico de transmisión de enfermedades infecciosas presentes con los aloinjertos.

Las desventajas de Integra<sup>®</sup> son su costo relativamente alto y su mayor riesgo de formación de seroma/hematomas después de la colocación inicial, debido a su uso en heridas agudas. Integra es actualmente el sustituto de piel sintético más aceptado para su uso en pacientes con quemaduras [71].

El desarrollo de Integra<sup>®</sup> es considerado como el método precursor de ingeniería tisular para generación de piel artificial [72, 73].

Desde entonces se han creado nuevos prototipos que se han difundido y han demostrado mejorar la calidad de vida de pacientes con enfermedades genéticas relacionadas con la piel y principalmente con el tratamiento de quemaduras de tercer grado, o bien, que superan el 50% de la superficie corporal total [74-76].

A pesar del desarrollo y los avances en la tecnología de materiales sustitativos de piel, la pérdida de tejidos u órganos como consecuencia de las quemaduras y heridas crónicas, sigue siendo un serio problema de salud a nivel mundial. Por lo que se continúa investigando en la producción de biomateriales sintéticos, con base en polímeros, para la obtención de piel artificial o tejido de protección con características muy similares a los tejidos vivos de piel humana, pero a precios más reducidos.

#### **1.3.5. Avances recientes en el campo de los sustitutos sintéticos de piel**

La historia del cuidado de las heridas abarca desde la prehistoria hasta la medicina moderna; a medida que la tecnología evoluciona, las metodologías y materiales usados en el cuidado de heridas han alcanzado un nuevo ritmo y dirección. El campo de los sustitutos de piel se ha desarrollado con una gran cantidad de intereses económicos, y en un esfuerzo por desarrollar la próxima generación de nuevos y mejores sustitutos de piel, apósitos son desarrollados con variadas combinaciones de sustancias sintéticas y/o biológicas.

En el mercado de los biomateriales, polímeros de origen sintético y natural juegan un papel decisivo en las nuevas estrategias para el desarrollo de nuevos sustitutos de piel. Materiales tales como quitosano, colágeno, pululano, gelatina, pectina alginato, hidrogeles, hidrocoloides (carboximetilcelulosa), celulosa, algodón/rayón, películas de polímero, entre otras opciones son utilizados para el desarrollo de apósitos para heridas debido a su influencia en la respuesta celular local [77], al mantenimiento adecuado de la humedad de la herida, al buen control microbiano, a

la limpieza en los tejidos lesionados, la minimización del dolor, la eliminación de espacios muertos y tejidos no viables y al buen control del olor [78, 79].

La incorporación de productos con propiedades de emoliente, demulcente, epitelizante, astringente, anti-inflamatorias y antioxidantes se utilizan para mejorar el proceso de cicatrización de la herida [80]. De igual manera, antimicrobianos (antibióticos tópicos y productos antifúngicos), como sulfadiazina de plata, azul de metileno, cristal violeta, miel, polihexametileno biguanida y yodo cadexómero se usan, para la prevención de la infección local, especialmente en heridas crónicas [81].

Apósitos con carbón activado, se desarrollan debido a sus propiedades de absorción, que actúan como filtro o trampa absorbente molecular, para eliminar líquidos y toxinas que retardan el proceso de cicatrización de la herida [82].

Para la protección perilesional se han incorporado selladores de piel, pastas de barrera de humedad y polvos de barrera de piel [83].

La administración de factores de crecimiento y la aplicación de polímeros naturales o sintéticos utilizados como andamios tridimensionales, para la adhesión y la integración de células, son el concepto del sustituto de piel interactivo el cual busca prever los cambios en el entorno de la herida para una mejor epitelización. Recientemente, hay una gran afluencia del uso de polímeros biodegradables y bioreabsorbibles, ya que se degradan cuando el tejido funcional y el original se regeneran durante la cicatrización [84].

Matrices desarrolladas con nanofibras, microesferas o espumas sólidas de hidrogeles obtenidas a partir de andamios poliméricos biodegradables y biocompatibles, que contienen moduladores celulares y moleculares para la estimulación de la cicatrización de heridas son usados debido a su estructura porosa abierta y una buena resistencia mecánica, proporcionando un microambiente óptimo para la proliferación celular, la migración, y diferenciación [85].

El uso de membranas poliméricas electrohiladas como sustitutos de la piel es tendencia reciente; éstas son elaboradas a partir de polímeros naturales (por ejemplo, colágeno, fibrinógeno, elastina) o sintéticas (por ejemplo, poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), polidioxanona, poli- $\epsilon$ -caprolactona, polivinilpirrolidona, alcohol de polivinilo, polietilen glicol), con micro/nanoescalas de entre 80 nm y 1.5  $\mu$ m; sin embargo, la mayoría de estos intentos se encuentran aún en etapas de desarrollo, en ensayos *in vitro*, *in vivo* o ensayos preclínicos [86].

Por otro lado, se prevé que, en el futuro, los avances en sustitutos de piel estarán dirigidos a traer un gran cambio en la naturaleza del cuidado clásico de las heridas. El futuro de los sustitutos de piel se basa en el éxito de las actuales investigaciones que se centran, como se ha mencionado, en la fabricación de matrices poliméricas inteligentes acelulares que puedan atraer células hacia la periferia del lecho de la herida, actuando como una barrera física antimicrobiana, administrando antimicrobianos, liberando exudados de la herida, mejorando la angiogénesis y la eliminación de la formación de cicatrices. Tales materiales inteligentes de bioingeniería pueden utilizar nanomateriales que pueden estimular la división celular, la migración celular y la curación de heridas, actuando a nivel genómico o proteómico para regular la expresión de biomoléculas importantes que intervienen en estos eventos [87].

El trabajo presentado en esta tesis tiene como objetivo contribuir en este campo, mediante la modificación superficial de PDMS con tratamientos de plasma con el fin de unir colágeno (biomolécula), a la superficie por medio de interacciones químicas y/o mecánicas.

El tratamiento de superficies de películas de PDMS con espesor micrométrico por plasma es un método atractivo para la obtención de materiales compuestos del tipo bicapa, mediante el control de las condiciones experimentales y la inclusión de colágeno.

## **CAPÍTULO 2. FUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES E INMOVILIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS MEDIANTE TÉCNICAS DE PLASMA**

Hace aproximadamente 50 años, los primeros materiales sintéticos se emplearon con éxito en la prevención y la prolongación de la vida humana. Estos primeros materiales fueron elegidos por su inercia biológica. Este campo ha comenzado lentamente su desarrollo en el diseño de materiales bioactivos que puedan controlar la reacción en el entorno fisiológico. A principios de la década de 1980, el concepto de biomaterial se definía como "cualquier sustancia, distinta de un fármaco, de origen sintético o natural, el cual pueda ser utilizado por cualquier período de tiempo, como un todo o como parte de un sistema que trata, aumenta o reemplaza cualquier tejido, órgano o función del cuerpo" [88].

La ciencia moderna de los biomateriales se caracteriza por el creciente énfasis en la identificación de parámetros de diseño específicos que son críticos para el desempeño del material en el nuevo entorno al que estará expuesto. El diseño de estos materiales está siendo integrado con nuevos avances que emergen de estudios de las interacciones célula-matriz o procesos de señalización celular, entre otras [89].

Los biomateriales deben poseer propiedades en masa que permitan su función en el bio-entorno, pero también las mejores propiedades superficiales. El diseño de materiales que cumplan con ambas necesidades no es fácil, por lo tanto, un enfoque común es fabricar materiales con propiedades en masa adecuadas seguido de un tratamiento especial para mejorar la propiedades superficiales [90].

El objetivo es entender cómo las propiedades superficiales de un material controlan la reactividad biológica de una célula que interactúa con la superficie [91].

Hay una necesidad de reexaminar muchos de los enfoques actuales para controlar las interacciones biológicas en las superficies. En lugar de preparar la superficie de un material con la adhesión de proteínas y examinar la interacción de las células y su entorno, el nuevo paradigma es tratar de imitar lo que la naturaleza hace todo el

tiempo; es decir, superficies diseñadas que promuevan con precisión las reacciones biológicas que queremos y no más [92].

Enfoques para mejorar las biointerfaces incluyen la reducción de la adsorción de proteínas no específicas, [93, 94] mayor adsorción de proteínas específicas [95] o la modificación del material mediante la inmovilización de los motivos (estructura supersecundaria de las proteínas) del reconocimiento celular para obtener una interacción controlada entre las células y sustratos sintéticos [96]. Por lo general, el parámetro más importante en esta área es el reconocimiento biomolecular. Los sistemas biológicos pueden reconocer características especialmente diseñadas en la escala molecular. Esto debe tenerse en cuenta cuando se trata de diseñar una superficie para funciones biológicas [97].

El reconocimiento biomolecular de materias se ha logrado mediante la modificación de la superficie con moléculas bioactivas tales como la matriz extracelular de cadena larga (ECM), péptidos y proteínas que tienen interacciones específicas con receptores celulares [98]. Estas moléculas se enlazan con las moléculas de adhesión en el citoesqueleto (receptores celulares) que se comunican activamente con una variedad de cascadas de transducción de señales, que están siendo clarificadas en varios contextos [99].

Aunque la interacción fundamental se produce a escala molecular, hay una conexión interesante y única en la topografía superficial a escalas nanométricas y micrométricas cuando las células se presentan [100]. Cuando las células llegan a la superficie, lo que encuentran es una superficie cubierta con proteínas. Por lo tanto, cuando hablamos de las interacciones superficie-célula, de hecho es una interacción entre las células y las biomoléculas enlazadas a la superficie [97]. La influencia de la química de superficies y la topografía para el crecimiento y la función de las células ha sido estudiada por muchos grupos, pero aún continúa sin comprenderse totalmente. Esta química puede potencialmente influir no sólo en su adhesión, sino también en su diferenciación, convirtiendo superficies adaptadas en una forma potencial de actuar como estímulos para la diferenciación celular guiada

[101]. Una dirección importante es la modificación química y topográfica de las superficies para mejorar su biocompatibilidad [97].

Casi todos los materiales se pueden utilizar para estos fines, incluyendo a los metales, cerámicos, polímeros y materiales compuestos, los cuales pueden modificar su superficie para interactuar selectivamente con un tipo específico de célula a través de procesos biomoleculares de reconocimiento [102]. Se predice que los materiales avanzados requerirán la construcción de sobrecapas, con patrones específicos para obtener las funciones deseadas. Las superficies nativas son poco sofisticadas en comparación con las de arquitectura biológica que tratan de interactuar, lo que provoca una respuesta suave en el sistema biológico. La superficie de la célula tiene una variedad de receptores que se unen con otras células o proteínas específicas [102]. Por lo tanto, la arquitectura molecular de las superficies debe generar el reconocimiento en el lado biológico. Estas microarquitecturas son necesarias para la aplicación y comprensión de los procesos bio-interfaciales [97].

Con la combinación de las nuevas técnicas de modelado y estrategias sintéticas novedosas, es posible preparar superficies orgánicas complejas, con estructuras y química bien definidas [103, 104] que pueden inducir la adhesión y el crecimiento celular.

La naturaleza tiende a organizar moléculas complejas en superficies, que permiten a las señales biomoleculares ser entregadas con gran precisión. Tratar de conseguir este grado de organización molecular es un ejemplo de la estrategia biomimética. Las biomoléculas utilizadas en estrategias de inmovilización incluyen proteínas, lípidos, polipéptidos, polinucleótidos y polisacáridos [91]. Las técnicas de inmovilización van desde relativamente bajas a extremadamente alta especificidades. Las características de un bioreconocimiento de superficie exitoso incluyen la presencia de un sitio ligando y la afinidad al ligando-receptor, una apropiada densidad superficial de esos sitios, o una distribución espacial de los ligandos.

La modificación superficial se ha presentado como la clave para lograr un mejor reconocimiento biomolecular. La modificación de la superficie permite que las propiedades mecánicas y la funcionalidad de un dispositivo no sean afectadas, mientras que el entorno biológico – material interface puedan ser mejorados [105].

Entre otras técnicas de modificación superficial, los tratamientos a base de plasma pueden cambiar la superficie y las características de materiales normalmente inertes, siendo atractivo debido a su versatilidad y flexibilidad, como en los aspectos ecológicos y económicos [106]. Los últimos 20 años han sido testigo de una revolución en la modificación de superficies para aplicaciones de biomateriales con la técnica de plasma [90]. Entre otros ejemplos, las técnicas de plasma se han aplicado para esterilización, modificación de lentes intraoculares, recubrimientos de implantes dentales y óseos, modificación de membranas o materiales de separación para cultivos celulares *in vitro* [107, 108].

Los beneficios del procesamiento con plasma surgen de la buena comprensión de la física y química del plasma [107], que permiten la introducción de los diferentes grupos funcionales y del control sobre la topografía inducida en las superficies tratadas. Es una técnica que es generalmente reproducible, relativamente barata y aplicable a diferentes tamaños y geometrías de muestras, así como diferentes materiales. Puede escalarse a producción industrial con relativa facilidad, mientras que otras técnicas tienen una flexibilidad menor [105].

Micro-patronos asistidos por plasma químico se pueden realizar mediante el uso de plantillas, transfiriendo el patrón a la superficie mediante la alteración de las regiones no enmascaradas. Por lo general, a través de la técnica de deposición superficial por plasma, una capa delgada es depositada sobre las superficies tratadas, a fin de no cambiar las propiedades mecánicas o funcionales, evitando el riesgo de delaminación. Por lo general, alrededor de 1 nm de espesor sería suficiente, pero en la práctica, una película más gruesa es necesario para lograr la uniformidad, durabilidad y funcionalidad requerida [90].

Inicialmente un elevado número de estudios exploraron las superficies producidas por tratamiento con plasma para el control de las interacciones bio-interfaciales, pero recientemente la mayoría de los grupos de investigación utilizan estas superficies como capas de unión interfacial para la posterior inmovilización de biomoléculas que inducen el biorreconocimiento [109]. En los últimos diez años, las superficies funcionalizadas por plasma se han utilizado con éxito como sustratos para la inmovilización química estable de diferente tipo de biomoléculas para obtener una respuesta celular específica [107, 110].

Entre todas las técnicas de modificación superficial por plasma, hay diferentes maneras de lograr la modificación. Una de estas técnicas es de alta relevancia para este trabajo, la llamada modificación por plasma a baja presión (también conocido como descarga luminiscente o “glow discharge”. El plasma con esta tecnología se obtiene en cámaras de reacción a presiones muy reducidas (entre 0.1 y 10 Torr), aplicando una diferencia de potencial entre pares de electrodos, mediante un generador de energía, que puede ser de baja frecuencia (50 Hz) o radiofrecuencia (40 kHz a 13.56 MHz) ionizando así el gas de tratamiento.

Las principales ventajas que aporta esta técnica son la homogeneidad del tratamiento, necesaria para mejorar las propiedades humectantes y de adhesión de los sustratos tratados, así como la posibilidad de trabajar con distintos tipos de gases y conseguir tanto superficies hidrófobas como hidrofílicas.

Entre todas las técnicas de modificación superficial, la modificación por plasma muestra un camino adecuado para alcanzar las superficies deseadas bajo el control de su química, para enlazar moléculas biológicas de interés que después puedan desempeñarse como plataforma para una mayor interacción celular.

## **2.1. Fundamentos del tratamiento con plasma**

En general, el plasma, puede ser referido como el cuarto estado de la materia, compuesto por especies atómicas, moleculares y iónicas, radicales y fotones,

altamente excitados, con una carga eléctrica neutra en el sentido macroscópico [111]. Por lo general, se obtiene mediante la excitación de un gas o vapor en estado altamente energético por radiofrecuencia, microondas, descargas luminiscentes de corriente alterna o continua, así como por electrones de una descarga de un filamento caliente. El plasma es un entorno altamente inusual y reactivo. La alta densidad de especies ionizadas y excitadas en el plasma puede cambiar la superficie de materiales normalmente inertes [90].

La existencia de diversas técnicas de plasma y variadas formas de generación, permite métodos de modificación por plasma para ser adaptados a cualquier tipo de material y requerimientos específicos.

Para generar el plasma es necesario ionizar los átomos o moléculas en la fase de gas. Cuando un átomo o moléculas gana suficiente energía a partir de una fuente de excitación externa o a través de colisiones con otra molécula, la ionización ocurre [90]. Esto sucede generalmente cuando las moléculas están en condiciones específicas, como un calor extremo, generando los denominados plasmas calientes, o bajo descargas eléctricas luminiscentes, para los plasmas fríos [112]. Los plasmas pierden energía con su entorno a través de procesos de colisión y de radiación; como resultado, la energía debe ser suministrada de forma continua al sistema para mantener el estado de plasma. La forma más fácil para suministrar energía a un sistema de una manera continua es con una fuente eléctrica. Por lo tanto, las descargas eléctricas luminiscentes son los plasmas más comunes [111].

La generación de una descarga eléctrica puede llevarse a cabo mediante la aplicación de corriente directa (CD) o de diferentes oscilaciones al campo eléctrico. Las descargas luminosas por CD se producen por la aplicación de un potencial entre dos electrodos a bajas presiones. El potencial que se encuentra cerca del cátodo varía lentamente en el plasma, y ocurre lo mismo en el ánodo. Los electrones que se originan en el cátodo son acelerados mediante procesos de colisión, transferencia de energía, difusión o recombinación. La energía que se transfiere al ánodo es baja.

La energía suministrada para la generación del plasma puede llevarse a cabo de manera indirecta, ya sea por un acoplamiento resistivo, capacitivo o inductivo. En el acoplamiento resistivo el tipo de descarga se produce a partir de una fuente de corriente eléctrica, que puede ser directa o con oscilaciones. Dichas descargas son acopladas electrónicamente por un compilador automático entre los electrodos, los cuales promueven la ionización de los átomos. Los iones y electrones se comportan como una resistencia entre los electrodos, lo que produce que los electrones tiendan a pasar linealmente de un electrodo a otro. Por otro lado, en el acoplamiento capacitivo las descargas se realizan de forma similar a las resistivas; son producidas por generadores de corriente directa o alterna y el gas interno o las paredes del reactor pueden funcionar como dieléctricos. Finalmente, en el acoplamiento inductivo, la descarga se induce desde el exterior del reactor mediante una bobina de cobre enrollada alrededor de éste, formando un campo electromagnético debido al flujo de electrones a través de la bobina [113].

Las descargas de resplandor de CD se establecen a causa de la diferencia de potencial entre los electrodos del reactor. Con descargas a frecuencias mayores a 1 MHz ya no se necesita contacto directo de los electrodos y el plasma. A estas frecuencias se pueden tener acoplamientos capacitivos y/o inductivos. En una descarga de resplandor con radiofrecuencia (RF) sin electrodos no se tienen las diferentes zonas que se tienen en una descarga CD; lo que se tiene es una descarga parecida a la columna positiva de la descarga CD. En el plasma de radiofrecuencia (13.56 MHz), por lo tanto, no se requiere contacto entre los electrodos y el plasma. El plasma puede ser iniciado y sostenido por electrodos externos, a mucho menor voltaje que el requerido para el mantenimiento de una descarga luminiscente de corriente directa [111, 114, 115].

## **2.2. Tipos de plasma**

Clasificar la diversidad de tipos de plasmas que existen en la naturaleza o que se pueden generar de forma artificial no es fácil, ya que resulta arriesgado escoger

parámetros aislados que sirvan de criterio para establecer las diferencias. Pese a tales dificultades, una primera clasificación de los tipos de plasmas puede atender a su equilibrio térmico, es decir, si la temperatura o energía media de las partículas que lo forman es o no la misma para cada tipo de partícula.

Todas las partículas tienen la misma temperatura (equilibrio térmico) en el caso del plasma de los interiores estelares o de sus análogos terrestres, los plasmas termonucleares de deuterio, tritio e impurezas de bajo número atómico (carbono) generados en los dispositivos experimentales de fusión nuclear controlada (JET, ITER). El plasma del interior estelar suele estar compuesto por una alta proporción de partículas ionizadas: el número de electrones, y de iones, es similar al de las partículas neutras. Estos plasmas reciben también la denominación de plasmas calientes o térmicos, ya que la temperatura en su interior llega a alcanzar millones de grados ( $10^7$ - $10^9$  °C), lo mismo para electrones que para especies pesadas.

Existe otro tipo de plasma térmico, con ciertas aplicaciones industriales, que se genera a presiones altas, por encima de los 100 Torr, algo más de una décima de atmósfera y con temperaturas mucho menores ( $10^4$ - $10^5$  °C), que las de los plasmas de fusión. Los sopletes de plasmas para tratamientos de superficies o las lámparas de plasmas producidos en descargas de alta intensidad para alumbrado público o faros de coches de gama alta son plasmas de ese tipo.

Cuando la presión del gas es baja o la tensión eléctrica aplicada en la descarga es alta, los electrones del plasma adquieren, en el tiempo entre colisiones con otras partículas del plasma, energías cinéticas superiores a la energía asociada al movimiento térmico aleatorio de las partículas neutras (átomos y moléculas) del plasma. Se puede atribuir cierto grado de desviación del equilibrio térmico al plasma, ya que los electrones, iones y partículas neutras tienen diferentes temperaturas o energías cinéticas medias.

Los plasmas no térmicos, conocidos también como plasmas fríos, o plasmas no equilibrados se caracterizan por el hecho de que la temperatura de las especies

pesadas (las partículas neutras y los iones) es cercana a la temperatura ambiente (25-100 °C). La temperatura electrónica es, en cambio, mucho mayor (entre 5000 y  $10^5$  °C). Los plasmas fríos suelen producirse a baja presión ( $p < 100$  Torr) en reactores con muy diversas geometrías. Tales reactores generan plasmas mediante sistemas de corriente continua, radiofrecuencia, microondas o en descargas pulsadas.

### **2.3. El plasma frío**

Los plasmas fríos resultan muy útiles para muchas aplicaciones técnicas porque, al no encontrarse en equilibrio térmico, es posible controlar la temperatura, por una parte, de las especies iónicas y neutras y, por otra, de los electrones. Sin embargo, la elevada energía de los electrones constituye el genuino factor determinante a la hora de iniciar muchas reacciones químicas que, en medios activados térmicamente, resultarían muy ineficientes, si no imposibles.

Las aplicaciones industriales de los plasmas fríos conforman una parte muy importante de la infraestructura productiva de los países avanzados. En los plasmas fríos se generan un gran número y diversidad de especies reactivas muy energéticas que activan procesos físicos y químicos difíciles de conseguir en entornos químicos ordinarios. Entre esas especies se encuentran fotones en el intervalo visible y en el ultravioleta, partículas cargadas (electrones e iones), especies neutras muy reactivas, como los radicales libres o los átomos de oxígeno, flúor y cloro, especies atómicas y moleculares excitadas, excímeros (molécula electrónicamente excitada que carece de estado fundamental estable) y monómeros (subunidad química muy reactiva que puede unirse a otras iguales para formar polímeros).

Gracias a los plasmas fríos, ciertos procesos industriales se realizan de forma más eficiente y barata, con lo que se reducen la contaminación y los residuos tóxicos generados.

La química de los plasmas fríos, o química fría, así llamada por la baja temperatura (en general inferior los 100 °C) de las especies pesadas del plasma, puede ser de tipo homogéneo o de tipo heterogéneo. Será de tipo homogéneo cuando las reacciones se produzcan en fase gaseosa como en la síntesis de ozono o en la eliminación de sulfuros y nitruros presentes en gases residuales. Será de tipo heterogéneo, cuando el plasma interacciona con una superficie sólida o líquida.

En los procesos de interacción plasma-superficie sólida se reconocen tres categorías: erosión, depósito y alteración físico-química. Por erosión se entiende el desgaste asistido por plasma de una superficie mediante bombardeo iónico simultáneo. Tiene un enorme interés para la industria microelectrónica porque erosiona el material de modo anisótropo, es decir, con una anchura y altura diferentes; lo propio de las técnicas químicas ordinarias es el tallado isótropo. En los procesos de depósito químico en fase vapor asistido por plasma se añade material a la superficie en forma de una capa delgada. Por último, las superficies sólidas tratadas con plasmas experimentan cambios fisicoquímicos como efecto de los procesos de radiación y de las partículas procedentes del plasma que actúan sobre ella.

### **2.3.1. Tratamientos superficiales con plasmas fríos**

La energía y la carga eléctrica de las partículas que constituyen un plasma cambian bruscamente cuando entran en contacto con superficies sólidas, es decir, transfieren parte de su energía a la superficie. Por una parte, los plasmas pueden activar una superficie, esto es, hacer que las moléculas de ésta se enlacen con componentes moleculares de otras sustancias. Eligiendo adecuadamente los gases con que se generan los plasmas, éstos servirán para recubrir la superficie con un determinado material.

La capacidad que poseen los plasmas fríos de modificar las superficies se debe a varios factores. Uno de ellos es la elevada energía media de los electrones libres

presentes en el plasma (1-10 eV), suficiente para romper enlaces químicos. Asimismo, las características únicas de los tratamientos superficiales mediante plasmas fríos dimanan de los efectos producidos sobre la superficie por los fotones y especies activas procedentes del plasma, que sólo penetran hasta una profundidad de entre algunos cientos de angstroms ( $\sim 10^{-10}$  m) y unas 10 micras. Debido a esto, las propiedades en masa del material permanecen inalteradas.

El tratamiento de superficies con plasmas fríos permite una activación funcional, o funcionalización, de las superficies, cosa que los tratamientos químicos no pueden ofrecer. Un ejemplo: el tratamiento de superficies poliméricas con un plasma de oxígeno puro genera en ella grupos hidroxilos, carbonilos y ésteres. Dicho de otro modo promueve la formación de grupos moleculares químicamente funcionales que mejoran la adhesión interfacial y, así, la superficie tratada con un plasma de oxígeno será receptiva a posteriores tratamientos. Estos procesos tienen hoy una importante repercusión económica en muchos sectores [116-119].

El plasma se puede dividir en tres grupos principales de acuerdo con el tipo de gas utilizado para crear el plasma: plasma químicamente no reactivo, plasma químicamente reactivo y plasma de polimerización. Los plasmas del tipo químicamente no reactivos son los de gases inertes monoatómicos, por ejemplo argón o neón, que puede ionizar otras moléculas o forman depósitos (sputter) de materiales pero no consumidos en reacciones químicas. Los plasmas químicamente reactivos utilizan gases moleculares inorgánicos u orgánicos, pero no forman depósitos sobre el sustrato, como  $O_2$  o  $CO$ . Estos tipos de gases son capaces de entrecruzar, incorporar oxígeno o modificar las superficies con las que entran en contacto. Los plasmas de polimerización son químicamente reactivos y forman un depósito polimérico sólido, como el  $CH_4$  o una variedad de monómeros [112, 121-122].

Sobre la base de la clasificación de plasma por el tipo de gas, diferentes tipos de procesos de plasma se pueden utilizar para modificar las superficies:

Un primer proceso es el *depósito físico (physical sputtering)* de los materiales, el cual se basa en un gas no reactivo en fase plasma. Los átomos de este gas se convierten en iones a través de la fase de plasma, los cuales son acelerados hacia el sustrato. Estos transfieren su energía por colisión a los átomos en la superficie, que la transfieren a su vez a sus átomos vecinos. Este proceso de transferencia continúa hasta que uno de los átomos es eliminado en la fase vapor [90, 121].

El *grabado químico (chemical etching)* implica la reacción química de las especies excitadas con los elementos de la superficie, tales como la oxidación por plasma de O<sub>2</sub>. Este involucra fenómenos químicos y físicos dependiendo de la reacción del gas de grabado con el material [121]. Este proceso puede generar modificaciones en la superficie que conducen a un mayor entrecruzamiento en el caso de superficies poliméricas, o cambios en la hidrofobicidad de las superficies, cambiando su naturaleza química [123, 124]. El grabado químico es utilizado para modificar las propiedades de algunos materiales, por ejemplo, con un plasma de oxígeno, se aumenta la actividad superficial [125].

Un último proceso es el depósito por plasma, incluyendo la polimerización, la inserción o el esprayado por plasma [90]. En la polimerización por plasma ocurren dos procesos opuestos: la formación de polímero que conduce al depósito de materiales, y la ablación que lleva a la remoción de los materiales. La ablación de materiales durante los procesos de plasma es un factor importante. Esto es debido a dos mecanismos básicos, el depósito físico del gas y procesos de grabado químico. Las especies reactivas en el plasma no se dan solamente a partir del monómero, sino también especies de la ablación competitiva del material ya depositado [121].

Cada tipo de gas o mezcla de gases produce un plasma diferente, abriendo una amplia gama de posibles modificaciones [126].

El gas utilizado determina fundamentalmente la química y la topografía de la superficie modificada [127, 128].

Con esta diversidad, las técnicas de modificación de superficies por plasma ha ganado popularidad en el campo biomédico, y puede ser aplicada en campos como la limpieza / esterilización, recubrimiento y/o modificación de la química de la superficie del sustrato, como es nuestro caso [90].

Por otro lado y para finalizar este capítulo, se mencionan a continuación algunas de las tendencias actuales en el campo de la modificación de superficies de PDMS mediante técnicas de plasma reportadas en la literatura.

De acuerdo al número de publicaciones, se puede afirmar que se trata de un campo que se ha desarrollado muy rápido durante los últimos 10 años. El desarrollo de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa han creado la necesidad de modificar la superficie de distintos materiales como el PDMS para mejorar los implantes bio-estables existentes [129].

Una tendencia es la consecución de un mejor control sobre la superficie del PDMS, tanto en la composición química, como en el espesor y en la formación de patrones de funcionalidades sobre la superficie modificada del polímero. El desarrollo de nuevas tecnologías y métodos como el uso de microplasmas, plasma jet, plasmas remotos y plasmas a presión atmosférica han permitido nuevas posibilidades y han empujado los límites actuales de la modificación superficial [130-132].

Aunado a lo antes mencionado, un campo de investigación actual es también la funcionalización de superficies de PDMS con gases menos comunes (hexafluoruro de azufre ( $\text{SF}_6$ )), así como el empleo de mezclas complejas de gases ( $\text{SF}_6/\text{O}_2$ ) para la fabricación de estructuras periódicas con características geométricas controladas [133].

En cuanto a las técnicas injerto-post-irradiación de polimerización por plasma, se ha realizado una gran cantidad de investigación enfocado principalmente en la inmovilización de biomacromoléculas sobre sustratos de PDMS [134].

Finalmente, es bien conocido que las modificaciones de superficies de PDMS se han estudiado principalmente en sustratos bidimensionales (2D); sin embargo la co-

evolución con otras áreas de investigación han propiciado el estudio de modificaciones en tres dimensiones (3D), ya algunos estudios demuestran la aplicabilidad de las técnicas de plasma en 3D para la modificación interior de estructuras porosas [135].

Los métodos de modificación descritos anteriormente, se dirigen sobre todo a mejorar la biocompatibilidad y el rendimiento clínico del PDMS, ya que debido a sus características especiales, tiene algunas limitaciones dentro de las aplicaciones biomédicas. Cada uno de estos métodos, dependiendo del sitio de implantación, el medio ambiente en contacto y las limitaciones impuestas por la fabricación pueden preferirse sobre otros.

## **JUSTIFICACION**

Las personas de vez en cuando sufren heridas en la piel, y por lo general en una persona sana estas heridas se recuperan dentro de los plazos previstos. Sin embargo, para las personas que sufren de lesiones por quemaduras, trauma, y/o enfermedades crónico degenerativas (diabetes), las heridas en la piel tienden a convertirse en heridas crónicas, que se definen como las heridas que no sanan en un marco de tiempo esperado en función de la edad del paciente, localización de la herida, tamaño de la herida o etiología de la herida. Las heridas crónicas a menudo dejan a los pacientes en riesgo de infección, hospitalización y potencial amputación de miembros infectados.

Tanto las quemaduras como las úlceras diabéticas constituyen un grave problema de salud en México, que se incrementa año a año, provocando grandes repercusiones socioeconómicas y sanitarias, y alterando la calidad de vida de las personas que lo padecen. Por tales motivos, es evidente la necesidad de materiales sustitutivos de piel que puedan emplearse para el tratamiento de distintos traumatismos (quemaduras) y/o como consecuencia de distintos padecimientos (diabetes).

Adicionalmente, los métodos tradicionales de fabricación de estos materiales sustitutos, se basan en el uso de agentes adhesivos y/o el empleo de polímeros con grupos funcionales específicos para lograr la unión entre éstos y haciendo a la vez, que la preparación de éstos se encarezca.

En un país en desarrollo como México, la disponibilidad de estos materiales sustitutos de piel no es adecuada considerando el número de casos que requieren este tipo de tratamientos.

Puesto que hay necesidad de estos sustitutos de piel, este trabajo pretende contribuir con la preparación de un material de dos capas, libre de adhesivos y adecuado como un posible sustituto de la piel.

## **OBJETIVO**

Modificar superficialmente una película de PDMS, mediante plasma de oxígeno, nitrógeno y argón para la preparación de un material compuesto PDMS/colágeno.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Extraer el colágeno tipo I del tendón de cola de rata.
2. Modificar superficialmente el PDMS mediante plasmas de oxígeno, nitrógeno y argón y caracterizarlo mediante FTIR, AFM, SEM, y ángulo de contacto.
4. Elaborar un material compuesto PDMS/colágeno y caracterizarlo mecánicamente en tensión.
5. Evaluar las propiedades adhesivas inducidas por el tratamiento de plasma.

## **HIPÓTESIS**

Los tratamientos de plasma modifican la superficie del PDMS, favoreciendo el incremento de la fuerza adhesiva entre ambos materiales.

## **CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Aislamiento y caracterización del colágeno tipo I**

El colágeno tipo I fue obtenido a partir de los tendones de la cola de ratas jóvenes albinas (Whistar) ya sacrificadas y que fueron utilizados como modelos experimentales para otros fines. El colágeno se extrajo mediante el método descrito por Navneeta Rajan y colaboradores [136] con una ligera modificación. Las colas de rata se lavaron con solución salina 0.9 % fría, se cortaron longitudinalmente para retirar la piel y extraer los tendones.

En un matraz Erlenmeyer se pesaron 2 g de tendón y se adicionaron 500 mL de ácido acético 0.5 M. La mezcla se agitó a 4 °C con un agitador magnético durante 48 horas. Después de la agitación, la solución se centrifugó a 4 °C y 40000 rpm durante 120 min. El sobrenadante se recolectó, congeló y liofilizó para obtener el colágeno de tipo I en forma de fibras enredadas. Películas de colágeno (20 mm x 20 mm x 0,2 mm) se obtuvieron después de la disolución y evaporación de las fibras en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (Sigma-Aldrich, EE.UU.) [137].

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés), medición del ángulo de contacto, microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés), y ensayos de tensión mecánica fueron utilizados para caracterizar el colágeno tipo I.

### **3.2. Síntesis de películas de PDMS**

Sylgard® 184 (Dow Corning, EEUU), se compone de un pre-polímero (parte A) y un agente de curado (parte B), los cuales se mezclaron en relación 10:1 sobre una caja de Petri y posteriormente se calentó a 65 °C durante 8 h para acelerar el proceso de entrecruzamiento (Figura 3.1). Transcurrido el tiempo, la película flexible-

transparente, se cortó en piezas rectangulares (aproximadamente 20 mm × 20 mm × 0.2 mm).

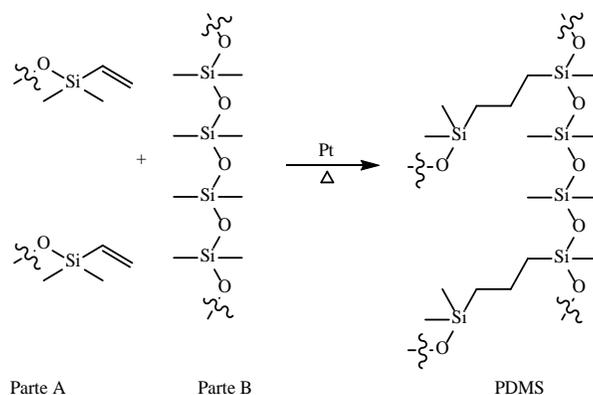


Figura 3.1 Reacción para obtención de película de polidimetilsiloxano Sylgard 184.

### 3.3. Modificación superficial de PDMS

La modificación superficial se llevó a cabo en un reactor tubular de vidrio (Figura 3.2), acoplado a un par de electrodos capacitivos internos, conectados a un acoplador de impedancias (Advanced Energy, EE.UU.) y a un generador de radiofrecuencias de 13.56 MHz (Cesar Advanced Energy, EE.UU.). La presión de la cámara y la velocidad de flujo de gas se mantuvieron constantes [138].

La presión mínima del sistema de vacío fue de aproximadamente  $1 \times 10^{-2}$  Torr.

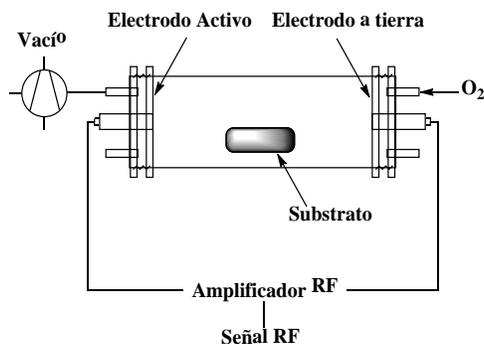


Figura 3.2 Configuración experimental para el tratamiento de plasma.

Películas de PDMS totalmente entrecruzadas fueron tratadas con plasmas generados en oxígeno, nitrógeno, y argón puros, a dos niveles de potencia de 40 y 120 W, y dos tiempos de exposición: 5 y 15 min. El número de experimentos, factores y repeticiones fueron definidos utilizando un diseño factorial del tipo  $2^k$  con punto central (80 W, 10 min), para estudiar los efectos de las interacciones de la potencia y el tiempo de tratamiento en las propiedades de mojabilidad y la morfología de la superficie. Los parámetros investigados fueron seleccionados sobre la base de las regiones de interés, identificados en pruebas preliminares y intervalos soportados por el sistema de tratamiento de plasma.

Para el diseño de la matriz factorial  $2^k$ , se realizaron cuatro corridas que correspondieron al diseño  $2^2$ , realizando una réplica por cada combinación de niveles de factores y dos corridas se llevaron a cabo en el punto central, para estimar el efecto global de curvatura. El orden en que se realizaron las corridas fue al azar para evitar errores sistemáticos. Una estimación de la confianza del 95% se utilizó para determinar la significancia estadística (valor p) [139-141].

### **3.4. Preparación del material compuesto**

Finalizado el tratamiento sobre las superficies del PDMS con los distintos gases generadores de plasma, las películas se retiraron del reactor e inmediatamente se colocaron en contacto con el colágeno tipo I disuelto en 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP). El material compuesto bicapa PDMS-colágeno se formó una vez que el disolvente se evaporó completamente.

### **3.5. Caracterización de materiales**

#### **3.5.1. Caracterización del colágeno tipo I**

### **3.5.1.1. Dodecil sulfato de sodio- electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés)**

La pureza de las soluciones de colágeno fue verificada por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, basándose en el método de Laemmli [142]. Las muestras se mezclaron con una solución amortiguadora de Tris-HCl 0.6 M (pH 6.8), SDS al 2% (v/v), glicerol al 25% (w/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 5% (v/v), azul de bromofenol 0.1 % (w/v) y agua desionizada en relación 1:1. Esta mezcla se llevó a ebullición durante 10 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Finalmente, se cargaron 20  $\mu$ l de muestra al gel de poliacrilamida, donde se empleó un sistema discontinuo de gel de poliacrilamida con una concentración de 7.5% para el gel separador y 5% para el gel concentrador a 20 mV durante 2 h. Al término de ésta se retiró el gel de la cámara (Mini-Protean 3 Cell, Bio-Rad, EE. UU.), se tiñó en una solución de azul de Comassie R-250 durante toda la noche, para finalmente desteñir con una solución de metanol 40%(v/v), ácido acético 10% (v/v) y agua desionizada 50 % (v/v). Dentro del ensayo, también se corrió un estándar comercial (colágeno tipo I purificado a partir de la cola de rata, Sigma-Aldrich, EE.UU.) y un marcador de peso molecular conocido (Prestained SDS-PAGE standards broad range, Bio-Rad, EE.UU.).

### **3.5.1.2. Análisis calorimétrico diferencial**

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica termoanalítica que se utilizó para monitorear la estabilidad térmica del colágeno, así como la caracterización de sus transiciones.

El análisis calorimétrico diferencial para el colágeno se llevó a cabo siguiendo el método de Rochdi con una ligera modificación [143]. Las muestras se rehidrataron mediante la adición de agua desionizada y/o en ácido acético 0.05 M en una relación sólido/solución de 1:40 (w/v). Las mezclas se dejaron reposar durante 2 días a 4 °C. El análisis se realizó usando un calorímetro diferencial de barrido (Perkin Elmer, Modelo DSC7).

La calibración de la temperatura se realizó utilizando el estándar de indio. Las muestras se pesaron con precisión en las charolas de aluminio y fueron selladas. Las muestras fueron analizadas a una rampa de calentamiento de 1 °C/min en el intervalo de 0-50 °C. Se hizo una primera corrida, luego el material se enfrió y subsecuentemente se hizo una segunda corrida, ambas con el mismo intervalo de temperatura y la misma velocidad de calentamiento.

Una charola vacía se utilizó como referencia y las temperaturas de transición y desnaturalización se estimaron a partir de los termogramas adquiridos en la primera corrida.

### **3.5.2. Medición del ángulo de contacto**

La mojabilidad de las muestras modificadas fue monitoreada mediante el método de la gota estática, utilizando un goniómetro óptico (Tantec Inc., EE.UU.), acoplado con una jeringa de precisión (Hamilton Inc., EEUU.). La muestra se colocó debajo de la jeringa, y una gota (aproximadamente de 3 µL) de agua desionizada fue depositada.

El conjunto de pruebas establecido en el diseño de experimentos para los tratamientos de plasma generados con oxígeno, nitrógeno y argón se efectuaron por triplicado; las mediciones del ángulo de contacto se realizaron a dos diferentes muestras de PDMS por cada tratamiento, en las cuales cinco mediciones en diferentes puntos de la superficie fueron adquiridas y promediadas. Todas las mediciones del ángulo de contacto se realizaron 30 min después del tratamiento de la superficie.

### **3.5.3. Análisis de la morfología superficial**

Microscopía electrónica de barrido (SEM) se utilizó para estudiar la morfología de las películas de colágeno y los cambios en la morfología causados por los

tratamientos de plasma sobre las películas de PDMS. Las micrografías SEM fueron tomadas con un microscopio electrónico de barrido, JSM-6360LV (JEOL, EEUU.). Las superficies fueron imágenes de un punto aleatorio, con ángulo de la cámara perpendicular. El potencial de aceleración fue de 10-20 kV y las ampliaciones de 500 veces. Antes de la obtención de imágenes, las muestras fueron tratadas por pulverización-recubrimiento catódico con oro, para que sean conductoras.

Las películas de PDMS tratadas por plasma fueron también analizadas mediante microscopia de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés), La raíz de las medias cuadráticas de la rugosidad superficial (RMS) se obtuvieron usando un microscopio de fuerza atómica universal SPM/AFM (Ambios Technology Inc., EE.UU.) en modo contacto, para completar el análisis de la morfología de superficie. Un cantilever piramidal de nitruro de silicio CSC 17 (Ambios Technology Inc., EE.UU.) con un radio de punta de 8 nm y una frecuencia de resonancia de aproximadamente 12 kHz se utilizó para escanear áreas aleatorias de 25  $\mu\text{m}$   $\times$  25  $\mu\text{m}$ . Los análisis se realizaron por duplicado analizando tres áreas por cada muestra tratada con cada uno de los distintos plasmas utilizados. Los parámetros de rugosidad ( $R_{\text{RMS}}$ ) y las superficies envolventes fueron determinadas utilizando el software WSxM v5.0 de Nanotec [144].

#### **3.5.4. Análisis químico superficial**

La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier en reflectancia total atenuada (ATR-FTIR), se utilizó para identificar los grupos funcionales presentes en la molécula de colágeno y PDMS, así como para analizar los efectos químicos de los tratamientos sobre la superficie del PDMS tratado por plasma. Los espectros FTIR de las muestras se registraron con un espectrofotómetro de infrarrojo iS10 (Nicolet, EEUU.). Los espectros son la media de 50 barridos con una resolución acumulada de 4  $\text{cm}^{-1}$  en el intervalo de número de onda de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  usando un cristal de diamante ATR.

### **3.5.5. Medición de la resistencia a la rotura**

El módulo de elasticidad ( $E$ ), el esfuerzo de tensión máximo ( $\sigma^{\max}$ ) y la deformación máxima ( $\epsilon^{\max}$ ), del PDMS sin tratamiento, PDMS tratado, el material compuesto y películas de colágeno se determinaron utilizando una máquina de ensayos universales AGS-X (Shimadzu Corporation, Japón). El ensayo de tensión se realizó de acuerdo al método de prueba estándar para propiedades de tensión de películas plásticas delgadas [145]. La fuerza de tensión se aplicó a probetas de PDMS de 60 mm (40 mm de longitud útil)  $\times$  5 mm  $\times$  0.7 mm (área de la sección transversal de aproximadamente 3.5 mm<sup>2</sup>) a una velocidad de deformación de 50 mm/min usando una celda de carga de 100 N. El módulo de elasticidad se obtuvo de la pendiente de una regresión lineal, en la región de baja tensión y bajos valores de deformación (zona elástica). En base a la ecuación de mínimos cuadrados se realizó un ajuste para la determinación del módulo y el valor promedio fue considerado.

Las propiedades de tensión del colágeno se midieron usando probetas de ensayo de 60 mm (40 mm de longitud útil)  $\times$  5 mm  $\times$  0.01 mm (área de la sección transversal de aproximadamente 0.05 mm<sup>2</sup>). Los extremos de estas probetas fueron envueltos con cinta adhesiva para evitar deslizamientos y fallas prematuras cerca de las mordazas. La velocidad de deformación, celda de carga y el número de especímenes fueron idénticos a los de los grupos de muestras de PDMS mencionados anteriormente.

### **3.5.6. Ensayo de adhesión**

Para estudiar el efecto de los tratamientos de plasma generados con oxígeno, nitrógeno, y argón en la adherencia entre PDMS y el colágeno, un ensayo estándar de adherencia al pelado en T [146] se llevó a cabo usando la máquina de ensayos universal AGS-X (Shimadzu Corporation, Japón). Los ensayos de pelado en T se realizaron operando en modo de extensión utilizando una celda de carga de 100 N y una velocidad de desplazamiento del cabezal de 23.5 mm/min. Se utilizaron

muestras de ensayo de 60 mm × 5 mm. El espesor total del material compuesto fue aproximadamente de 0.81 mm que correspondió a una capa de 0.4 mm de PDMS y una capa de ~ 10 µm de colágeno, como se muestra en la figura 3.3.

Puesto que el objetivo de esta prueba era medir las propiedades adhesivas (interfaz entre el colágeno depositado y PDMS de soporte), y no las propiedades de tensión del colágeno, una capa de PDMS adicional se depositó sobre la capa de colágeno para asegurar un pelado adecuado y evitar el deslizamiento de las mordazas y la ruptura del colágeno durante la prueba.

Para todas las muestras utilizadas, la longitud del pelado fue de 45 mm y la longitud de la parte doblada de las mordazas fue de 15 mm. La prueba de adherencia al pelado en T se llevó a cabo una vez sujetado el extremo del PDMS en una mordaza y el otro extremo correspondiente a la película de colágeno en la segunda mordaza. Por lo menos cinco réplicas de los ensayos de pelado se realizaron a muestras del material compuesto tratados con los distintos plasmas y las no tratadas. Todas las muestras fallaron en la interfaz y el valor medio se tomó como una medida de la fuerza adhesiva.

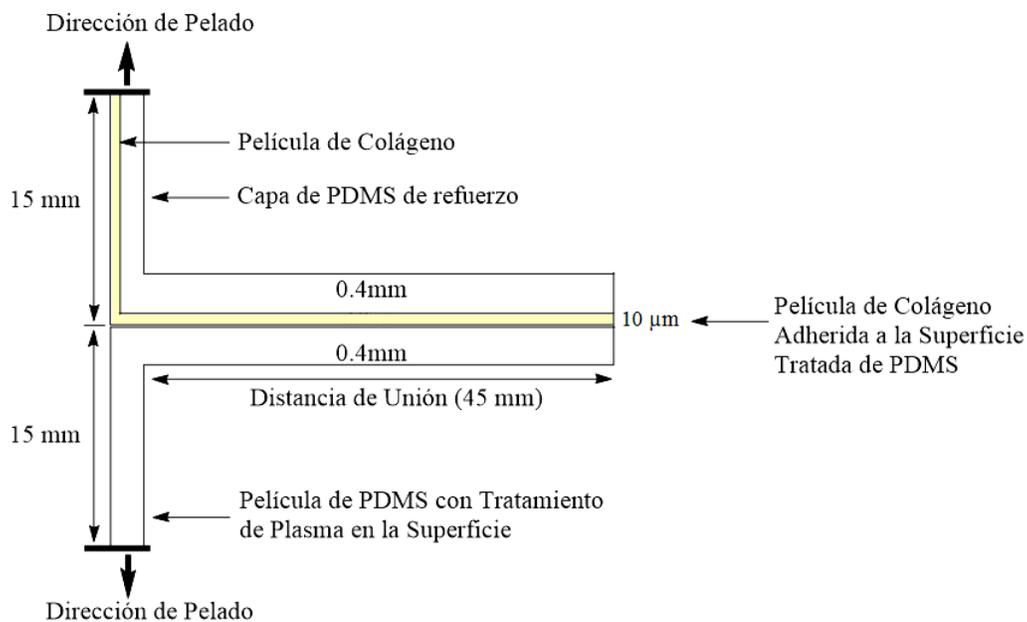


Figura 3.3 Vista esquemática del ensayo de pelado en T del material bicapa PDMS-colágeno.

### **3.6. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), la cual es una colección de técnicas estadísticas que permiten inspeccionar una respuesta, que se puede mostrar como una superficie, cuando los experimentos investigan el efecto que tiene el variar factores cuantitativos en los valores que toma una variable dependiente o respuesta. Esto es, se trata de encontrar los valores óptimos para las variables independientes que maximizan, minimizan o cumplen ciertas restricciones en la variable respuesta. Dicho de manera práctica, se busca determinar los parámetros de modificación de la superficie del PDMS y obtener las mejores condiciones de tratamiento con los plasmas generados con oxígeno, nitrógeno, y argón para la adhesión de la capa de colágeno a la superficie de PDMS [147].

La paquetería Minitab 16.1 fue utilizada para el análisis estadístico de los datos obtenidos. Para todas las pruebas, los valores promedio y la desviación estándar fueron reportados.

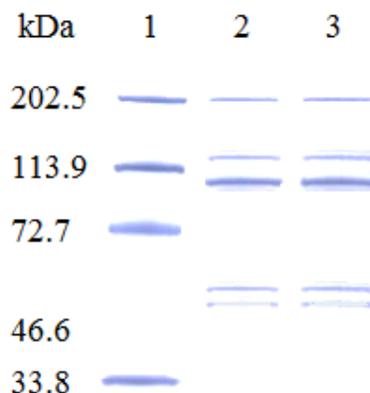
## CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Identificación y caracterización del colágeno de tipo I

#### 4.1.1. Composición y peso molecular de las subunidades de colágeno del tendón de cola de rata

La composición del colágeno extraído se examinó por SDS-PAGE (Figura 4.1). Tanto la muestra como el control muestran al menos dos cadenas  $\alpha$  diferentes:  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  con pesos moleculares aproximados de 117.3 kDa y 107.4 kDa respectivamente, estimados a partir del marcador de peso molecular (posición 1). Por otra parte, se obtuvo una pequeña cantidad del dímero  $\beta$ . Estos resultados indicaron que el colágeno extraído de la cola de rata Wistar puede caracterizarse como colágeno tipo I ya que el colágeno tipo I de tendón de cola de rata comercial mostró un patrón similar [148].

Adicionalmente, en el gel se puede observar una ligera desnaturalización del colágeno; es decir, bandas con un peso molecular inferior a la cadena  $\alpha 2$ , en consistencia con lo reportado previamente [149].

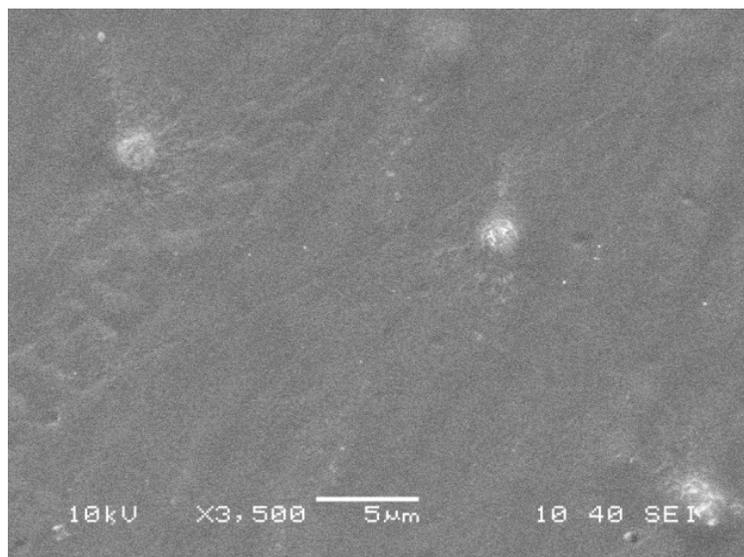


*Figura 4.1 Representación esquemática del patrón electroforético de (1) marcador de peso molecular, (2) colágeno tipo I de tendón de cola de rata comercial y (3) colágeno tipo I extraído en el laboratorio de tendón de cola de rata.*

#### 4.1.2. Mojabilidad de la superficie, morfología, caracterización química y mecánica y análisis calorimétrico de colágeno de tipo I

Las películas de colágeno se obtuvieron por evaporación del disolvente a partir de una solución de colágeno en HFIP y su ángulo de contacto se midió 30 minutos después de la evaporación del disolvente con el método de la gota sésil. El ángulo de contacto de agua de la película de colágeno fue de aproximadamente 50 grados. Por lo tanto, el colágeno es una proteína hidrófila debido al mayor contenido de residuos de aminoácidos hidroxilados, ácidos y bases que los residuos lipófilos [150].

La morfología de la superficie de la película de colágeno se investigó mediante microscopia electrónica de barrido. En la micrografía (Figura 4.2) se observan una variedad de estructuras con un patrón morfológico uniforme. No se observan fibras de colágeno. El arreglo que se observa asemeja pequeños paquetes conglomerados de estas fibras o agregaciones radiculares salinas, lo cual ha sido reportado de manera similar para el caso específico del colágeno de cerdo [151].



*Figura 4.2 Micrografía de película de colágeno.*

Las películas de colágeno también se caracterizaron por medio de espectroscopia de FTIR tal como se muestra en la Figura 4.3. Se observaron al menos 3 bandas bien definidas, que fueron suficientes para su caracterización. Estas bandas fueron las de 1650, 1500 y 1200  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponden a las llamadas bandas de absorción del enlace peptídico o enlace amida. La absorción de la amida I se debe principalmente a vibraciones de estiramiento del enlace C=O; la amida II está constituida por vibraciones de torsión N-H y vibraciones de estiramiento C-N; y la amida III es compleja y se deriva de componentes de estiramiento C-N y torsión N-H en el doblez del plano del enlace amida, así como de absorciones que se originan del movimiento vibracional de grupos  $\text{CH}_2$  del esqueleto polipeptídico con residuos de glicina y prolina en sus cadenas laterales [152]. Las absorciones en 1451, 1399, 1339 y 1282  $\text{cm}^{-1}$  se atribuyen a vibraciones wagging de grupos  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$  [153]. La vibración de estiramiento N-H libre se produce en el intervalo de 3400 a 3440  $\text{cm}^{-1}$  y cuando el grupo N-H de un péptido está implicado en un enlace de hidrógeno, la posición se desplaza a frecuencias más bajas, por lo general alrededor de 3300  $\text{cm}^{-1}$ . El resultado indicó que los grupos N-H de este colágeno estaban involucrados en un enlace de hidrógeno, probablemente con un grupo carbonilo de la cadena peptídica [154].

Las películas de colágeno mostraron un valor de esfuerzo de tensión máximo de  $\sigma^{\text{max}} = 5.4 \pm 0.29$  MPa, un módulo elástico de  $E = 48.3 \pm 2.95$  MPa y una deformación máxima de  $\epsilon^{\text{max}} = 34.8 \pm 3.63$  % (Figura 4.4). Estos valores están dentro del intervalo de los datos reportados en la literatura [155-158]. Sin embargo, también se han reportado valores de módulo de elasticidad para colágeno tipo I que van desde 2.3 MPa hasta 11.5 GPa en forma de fibras [159]. Las propiedades mecánicas de materiales de colágeno son conocidos por ser fuertemente dependientes de cambios en su concentración, el tipo, el grado de entrecruzamiento, la alineación espacial y el grado de hidratación, y pueden conducir a grandes efectos sobre sus propiedades mecánicas [160].

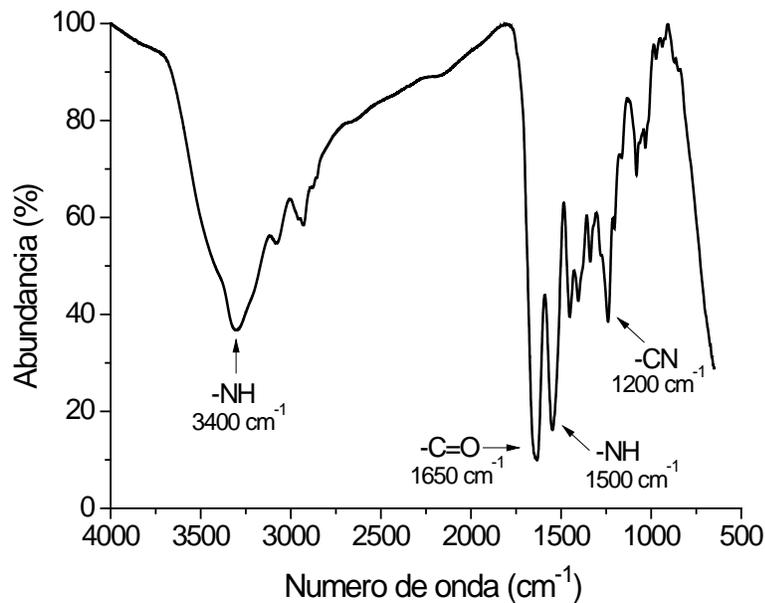


Figura 4.3 Espectro de infrarrojo de colágeno tipo I.

En su aplicación como sustituto de piel, el colágeno estará en contacto con la herida donde las condiciones de humedad son relativamente altas y las propiedades mecánicas como se mencionó anteriormente serán diferentes.

Puesto que el constituyente principal de la piel normal es el colágeno, su papel primordial en el sustituto es promover la migración y proliferación celular de una forma ordenada. En su aplicación como sustituto de piel, el colágeno estará unido al PDMS, el cual entre una de sus funciones es dar el soporte mecánico a dicho sustituto de piel.

Los termogramas de colágeno de tendón de cola de rata hidratado en ácido acético 0.05 M y agua desionizada se muestran en las Figuras 4.5 y 4.6 respectivamente. En ellas se observan, los picos endotérmicos, con temperaturas de desnaturalización ( $T_{max}$ ) de 38.1 y 40.0 °C, adquiridos en la primera corrida respectivamente. Cuando el colágeno se rehidrata en ácido acético, se observó que la  $T_{max}$  se desplaza ligeramente a temperatura más bajas.

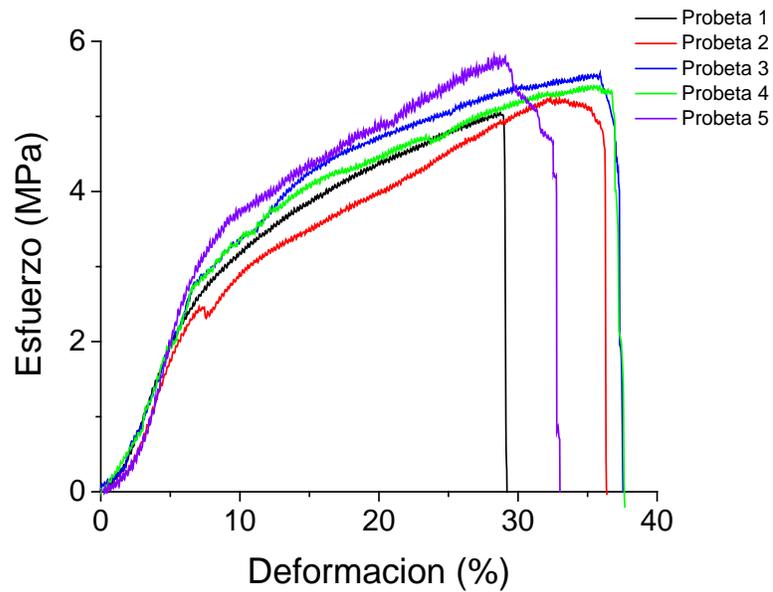


Figura 4.4 Gráfica esfuerzo-deformación de la película de colágeno tipo I.

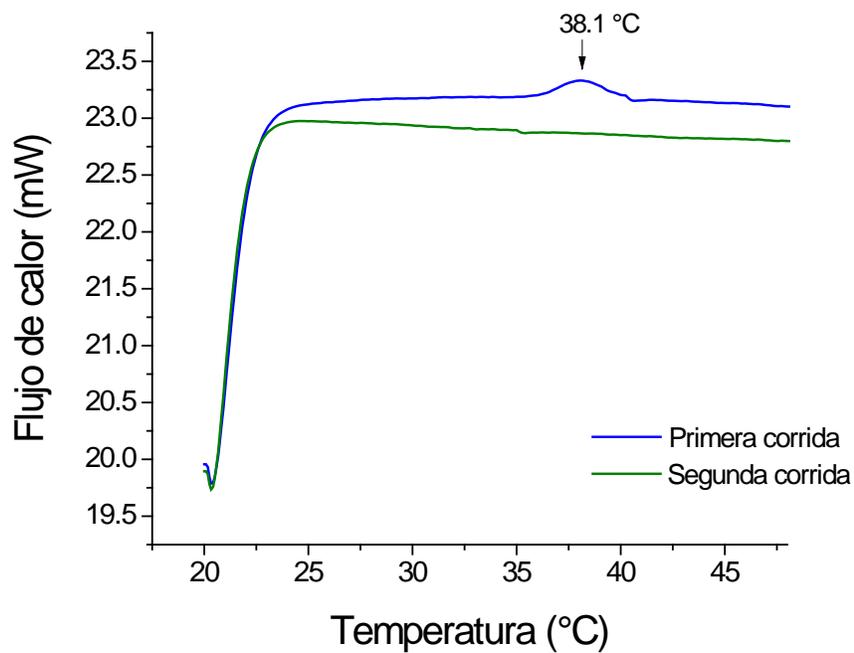


Figura 4.5 Termograma de colágeno hidratado en agua ácido acético.

El resultado sugiere que los enlaces de hidrógeno intramoleculares que estabilizan la estructura de triple hélice del colágeno pueden ser interrumpidos a algunos niveles en la presencia de ácido acético, principalmente debido a la repulsión de las moléculas de colágeno en solución ácida [161]. Por otro lado, un mayor entrecruzamiento del colágeno probablemente contribuye a la  $T_{max}$  más alta.

Diferencias en la  $T_{max}$  entre los colágenos de diferentes especies se correlaciona con diferentes contenidos de ácidos imino (prolina e hidroxiprolina) [162].

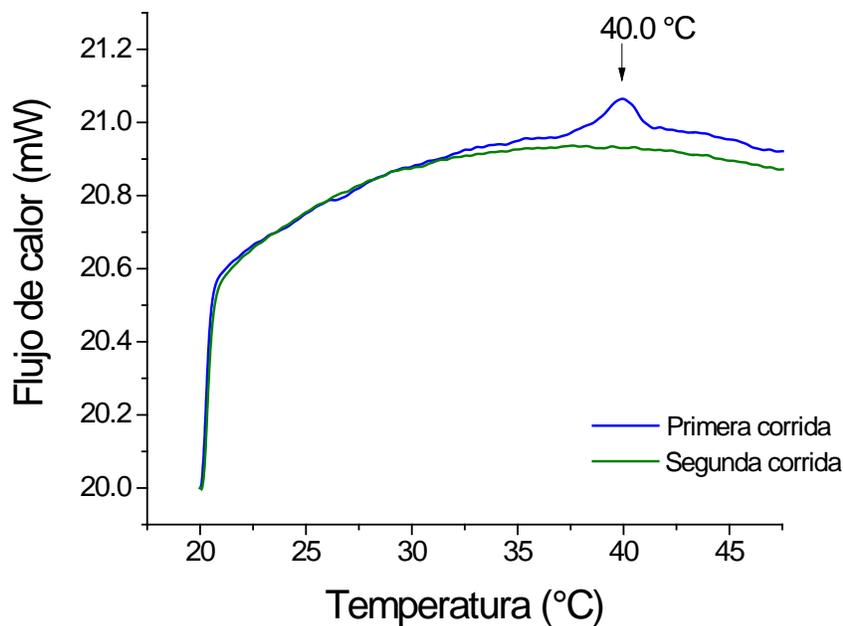


Figura 4.6 Termograma de colágeno hidratado en agua desionizada.

## 4.2. Efecto de la relación potencia - tiempo sobre las propiedades superficiales del PDMS

### 4.2.1. Mojabilidad

La medición del ángulo de contacto es uno de los métodos más simples para determinar los cambios que tienen lugar en la capa más externa de los materiales

durante su tratamiento superficial. Este método se utilizó para evaluar el cambio en la mojabilidad del PDMS modificado por plasmas de oxígeno, nitrógeno y argón.

#### 4.2.1.1. Tratamiento con plasma de oxígeno

El ángulo de contacto del PDMS sin tratamiento fue de 102 grados y por lo tanto su superficie se puede considerar como hidrofóbica. Los ángulos de contacto promedio del PDMS modificado a diferentes condiciones de potencia y tiempo se muestran en la Tabla 4.1.

*Tabla 4.1. Resultados de la medición del ángulo de contacto del PDMS modificado con plasma de oxígeno.*

<i>Experimento</i>	<i>Potencia (W)</i>	<i>Tiempo (min)</i>	<i>Angulo de Contacto (°)</i>	<i>D.E.*</i>
4	40	5	80	1.6
7	40	5	74	1.2
6	40	5	60	3.2
10	40	5	56	1.1
1	80	10	62	2.0
3	80	10	60	1.2
2	120	15	60	1.6
8	120	15	60	1.2
5	120	15	64	2.1
9	120	15	62	1.3

\* *D.E. Desviación estándar*

Los resultados de las mediciones del ángulo de contacto se analizaron estadísticamente estimándose los dos efectos principales y su interacción, comprobándose estadísticamente (nivel de significancia del 5%) que los factores potencia, tiempo y la interacción potencia-tiempo resultaron ser significativamente influyentes sobre la disminución del ángulo de contacto en razón a su valor  $p < 0.05$  (menor del 5% de significancia).

Además, la interpretación del coeficiente de determinación ( $R^2$ ), siendo una medida descriptiva que sirve para determina la bondad de ajuste del modelo para replicar los resultados y la proporción de variación de estos, con un valor obtenido de  $R^2$

ajustado = 89.02 % nos indica que el modelo explica el 89 % de la variabilidad de la respuesta, lo que en pocas palabras significa un buen ajuste y una metodología adecuada hacia la búsqueda de las condiciones experimentales que permitan la mayor modificación superficial del PDMS, con el tratamiento de plasma de oxígeno.

El modelo de segundo orden se graficó como una superficie tridimensional que representa la respuesta (ángulo de contacto) como una función de los dos factores (potencia y tiempo) para el intervalo experimental considerado. En la superficie de respuesta real (Figuras 4.7a) y en el modelo ajustado (Figura 4.7b), se observó que, para bajas potencias, el ángulo de contacto disminuyó al aumentarse el tiempo de tratamiento. Por lo tanto, ángulos de contacto menores se obtienen para tiempos de tratamiento más largos dentro del intervalo de potencias bajas. Esto es debido al hecho de que a potencias bajas, el tiempo es el factor más significativo. Sin embargo, a mayor potencia se observó un comportamiento diferente. El ángulo de contacto disminuyó inicialmente alcanzando un mínimo, y luego el ángulo de contacto se mantuvo casi constante con tiempos más largos. En la gráfica, la línea es casi plana, lo que indicó que el tratamiento a altas potencias no se vio afectado por el tiempo.

Para tiempos de tratamiento cortos, el ángulo de contacto disminuyó con el aumento de la potencia por lo que, la potencia fue el factor más significativo dentro del intervalo de tiempos cortos. En la superficie de respuesta optimizada (Figura 4.7b), la línea del ángulo cae abruptamente, lo que indica un efecto positivo fuerte debido a un incremento de la potencia.

A tiempos más largos, el ángulo de contacto disminuyó hasta alcanzar un valor mínimo a potencias intermedias y finalmente, incrementar ligeramente a altas potencias. Este es el resultado de una interacción positiva tiempo-potencia y un coeficiente cuadrático positivo para la potencia, probablemente causado por la formación de grupos funcionales de oxígeno y el cambio de la hidrofobicidad de la superficie de PDMS.

La formación de grupos funcionales de oxígeno es un objetivo deseable, ya que éstos incrementan la mojabilidad superficial del PDMS y consecuentemente la disminución del valor de ángulo de contacto. Por lo tanto, las condiciones de operación que deben elegirse y a las cuales esta formación de grupos funcionales es favorable, son potencias medias y tiempos de tratamiento más largos.

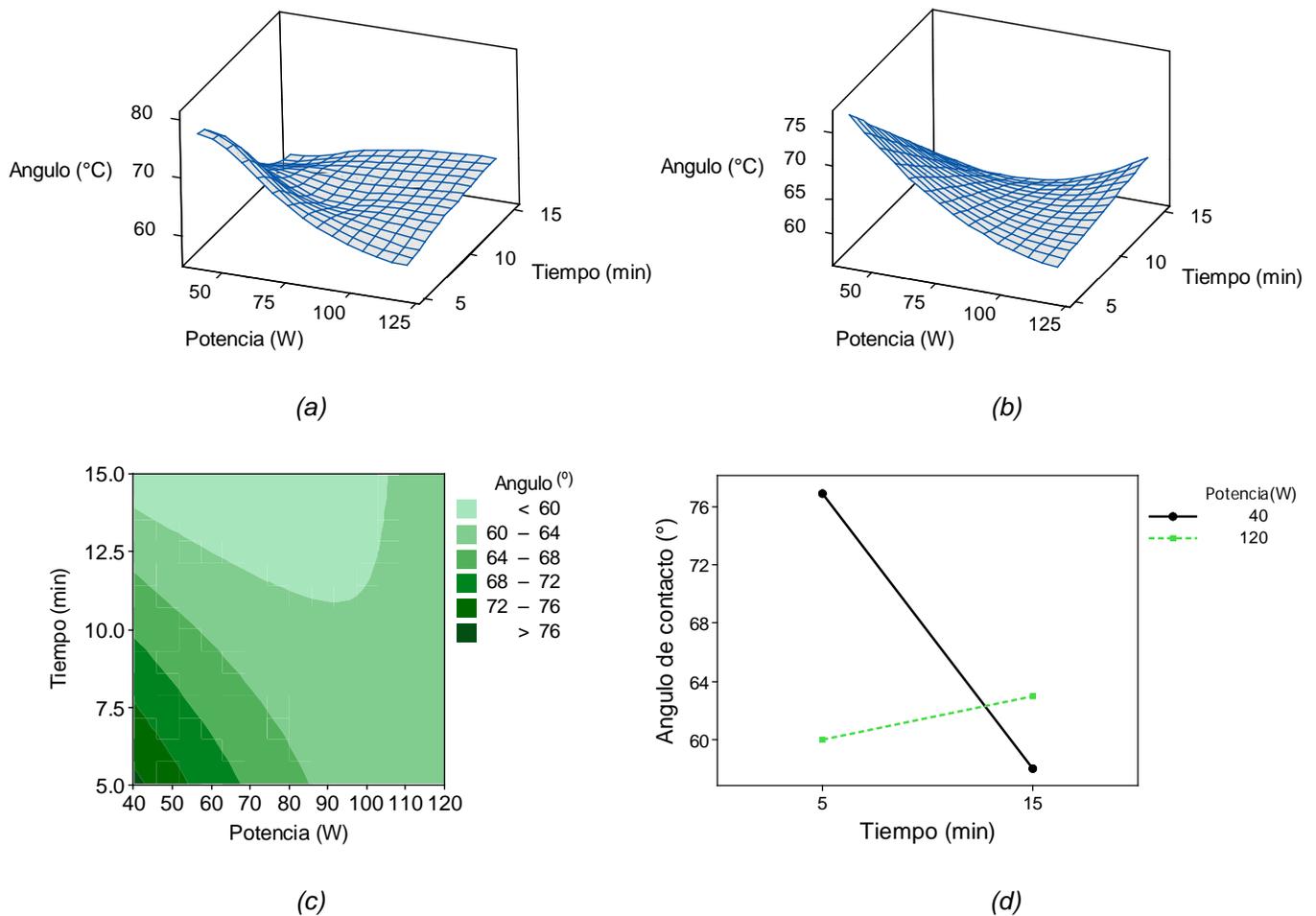


Figura 4.7 (a) Superficie de respuesta para el ángulo de contacto en agua en función del tiempo y potencia (experimental), (b) superficie de respuesta para el ángulo de contacto en agua en función del tiempo y potencia (Optimización), (c) Gráfica de contorno del ángulo de contacto en agua en función del tiempo y potencia, (d) Gráfica de interacción potencia-tiempo (tratamiento con plasma de oxígeno).

A fin de comprender la forma de la superficie de respuesta, la gráfica de contorno (Figura 4.7c) muestra curvas concéntricas de color que representan intervalos específicos de valores, la región más clara representa las condiciones a las cuales el menor ángulo de contacto es obtenido. Finalmente, la Figura 4.7d muestra la gráfica de interacción entre la potencia y el tiempo de tratamiento. Líneas paralelas en una gráfica de este tipo indicarían que no hay interacción; sin embargo, mientras mayor sea la diferencia en la pendiente entre las líneas, mayor será el grado de interacción. En base a lo antes mencionado, la gráfica 4.7d reveló una interacción entre el tiempo de tratamiento y la potencia de RF. El PDMS adquirió una mayor hidrofiliidad cuando el material fue tratado a potencias de 120 W en lugar de 40 W a 5 minutos. Sin embargo, cuando el tiempo de tratamiento fue de 15 minutos, el PDMS presentó una mayor hidrofiliidad cuando la potencia fue de 40 W. Adicionalmente, una gráfica de interacciones no revela si la interacción es estadísticamente significativa. El resultado de la variable independiente principal, que para este caso en específico es la potencia, cuando se da condicionado a cada uno de los dos valores de la variable independiente condicionante (tiempo), se refleja en una línea recta en la gráfica. Estas líneas representan cada uno de los efectos simples de la variable independiente principal [120].

En general, estas gráficas revelaron que la exposición al plasma de oxígeno incrementó la mojabilidad de la superficie del PDMS [163].

Durante el tratamiento con plasma de oxígeno, los grupos metilo superficiales son removidos y sustituidos por especies químicas como grupos hidroxilo, los cuales son dipolos cargados negativamente produciendo un comportamiento hidrofílico de la superficie; por lo tanto dado que el agua es un dipolo con cierta afinidad a los grupos hidroxilo, la gota formada exhibió un ángulo de contacto menor [164]. Sin embargo, la hidrofilia no es permanente y el PDMS tratado tiende a recuperar en corto plazo su propiedad de hidrofobicidad [165], por lo cual el ángulo de contacto regresó a  $94^\circ$  (medición realizada al PDMS tratado a 80 W/10 min a los 8 días después del tratamiento), cerca del valor de ángulo de contacto de la superficie de

PDMS sin tratamiento. Las razones fundamentales para la recuperación de la hidrofobicidad del PDMS siguen sin estar claras. Por lo general, la migración de las especies de bajo peso molecular no entrecruzadas desde el interior (bulk) del polímero a la superficie se considera que es la causa principal. Además, una pérdida de grupos hidrofílicos a la atmósfera bajo condiciones de alto vacío y la reorientación de subproductos de la oxidación se han sugerido. A pesar de esto, una exposición prolongada o altas potencias de RF reducen las diferencias en el corto plazo [166, 167].

#### **4.2.1.2. Tratamiento con plasma de nitrógeno**

Los resultados de la medición del ángulo de contacto del PDMS tratado con plasma de nitrógeno, se presentan en la Tabla 4.2 y Figura 4.8(a-d) respectivamente. El análisis estadístico se llevó a cabo con los resultados experimentales; se estimaron los efectos principales y el efecto de la interacción. La significancia obtenida para el factor tiempo de tratamiento fue  $p > 0.05$  indicando un mínimo cambio en las propiedades superficiales del PDMS (valores de ángulo de contacto altos). Sin embargo el análisis indicó que aunque el factor tiempo no es estadísticamente significativo, fue la variable que mejor respuesta tuvo en el diseño. El efecto potencia y la interacción potencia-tiempo resultaron poco significativos ( $p > 0.05$ ).

El valor de  $R^2$  obtenido del ajuste fue del 30.24 %, indicando que el modelo ajustado explica solo el 30 % de la variabilidad de la respuesta, con una incertidumbre del 70 %. Se recomienda que el valor de  $R^2$  sea de al menos 75% para considerar la posibilidad de obtener condiciones adecuadas para la optimización de un proceso, de no ser así es muy probable que el procedimiento requiera la definición de intervalos más amplios en los factores de prueba.

Tabla 4.2. Resultados de la medición del ángulo de contacto del PDMS modificado con plasma de nitrógeno.

Experimento	Potencia (W)	Tiempo (min)	Angulo de Contacto (°)	D.E.*
5	40	5	81	1.2
6	40	5	88	2.0
8	40	15	80	2.1
10	40	15	82	0.8
1	80	10	78	1.4
7	80	10	80	1.2
3	120	5	90	1.0
4	120	5	82	5.2
2	120	15	78	0.8
9	120	15	78	1.2

\* D.E. Desviación estándar

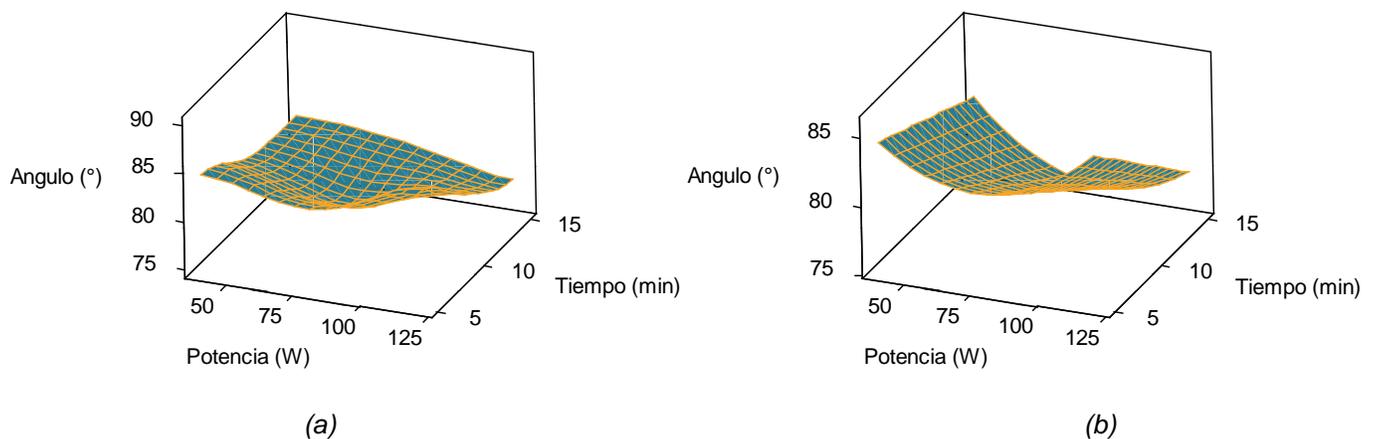
De igual manera este modelo de segundo orden se graficó como una superficie tridimensional representando la respuesta (ángulo de contacto) como una función de los dos factores (potencia y tiempo) para el intervalo experimental considerado. La Figura 4.8a es la superficie de respuesta experimental y la Figura 4.8b es el ajuste al modelo experimental. En dichas superficies, se observó que tanto para tratamientos a bajas y altas potencias, la disminución inicial del ángulo de contacto a tiempos cortos fue prácticamente la misma. Al irse incrementando el tiempo de tratamiento, el ángulo de contacto presentó una pequeña disminución, acentuándose un poco más en los tratamientos de mayor potencia. En las gráficas de superficie se observa a los ejes correspondientes a las potencias que disminuyen casi de forma paralela. Esto es debido al hecho de que la potencia del tratamiento dentro de este intervalo de prueba fue un factor poco significativo para el tratamiento con plasma de nitrógeno.

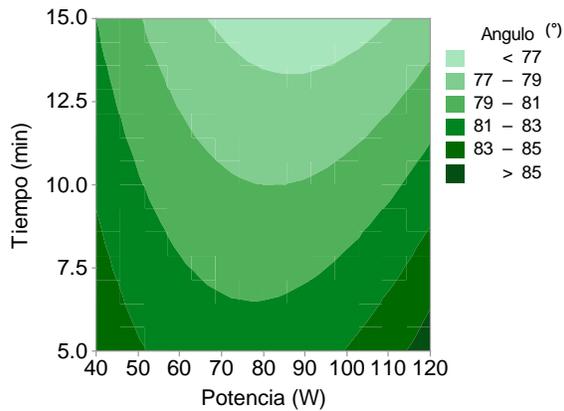
Con respecto a los tiempos de tratamiento, un comportamiento similar se observó entre ellos. Al irse incrementando la potencia del tratamiento, el ángulo de contacto presentó una pequeña disminución; sin embargo a medida que la potencia continuó incrementando, el valor del ángulo de contacto tuvo una recuperación hacia valores mayores acentuándose un poco más en los tratamientos de menor tiempo de

tratamiento. En la superficie de respuesta optimizada (Figura 4.8b), las líneas presentan una ligera forma de U, lo que indicó que el aumento de la hidrofiliidad del PDMS se vio favorecida en los puntos centrales del tratamiento, probablemente causado por la formación de grupos funcionales tales como grupos amina, imina, amida y/o nitrilo los cuales brindan un carácter hidrofílico sobre la superficie del polímero.

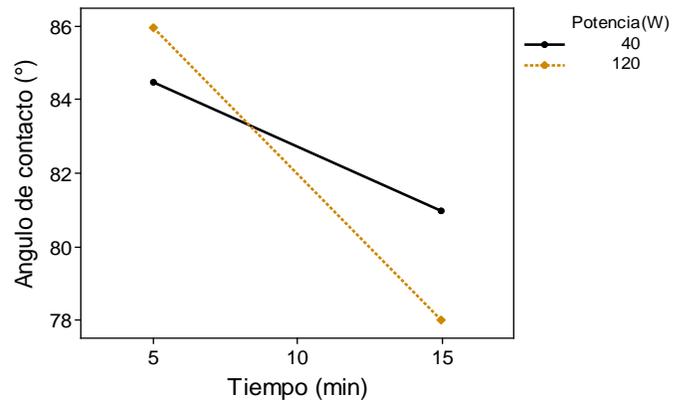
A diferencia del tratamiento de plasma de oxígeno donde se presentó un mayor descenso del valor de ángulo de contacto y observándose en las gráficas de superficie descensos más pronunciados, para el tratamiento con nitrógeno, las gráficas de superficie exhibieron una superficie casi horizontal en todos sus ejes confirmando que la superficie del PDMS tratadas con plasma de nitrógeno mostraron una menor capacidad de mojabilidad que las superficies tratadas con oxígeno. Esto es probablemente debido a una débil interacción de las especies de nitrógeno en el plasma con la superficie del PDMS bajo las condiciones de proceso evaluadas [168].

El efecto del tratamiento de plasma sobre la superficie del PDMS, es similar si el gas utilizado es oxígeno, nitrógeno u otro. En cada caso, se producirá una superficie hidrófila; sin embargo diferentes condiciones de potencia-tiempo son necesarias para equiparar los resultados, con plasmas generados con diferentes gases (oxígeno, nitrógeno, y argón, en nuestro caso) [169].





(c)



(d)

Figura 4.8 (a) Superficie de respuesta para el ángulo de contacto en agua en función del tiempo y potencia (experimental), (b) superficie de respuesta para el ángulo de contacto en agua en función del tiempo y potencia (Optimización), (c) Gráfica de contorno del ángulo de contacto en agua en función del tiempo y potencia, (d) Gráfica de interacción potencia-tiempo (tratamiento con plasma de nitrógeno).

Para caracterizar y analizar con mayor detalle la curvatura de la superficie de respuesta, la forma directa de hacer esto es mediante la gráfica de contorno (Figura 4.8c), la cual facilita la visualización de la forma de la superficie. Cada franja de color contiene un número infinito de combinaciones potencia-tiempo para los cuáles el ángulo de contacto medio esperado se encuentra en un determinado intervalo.

La Figura 4.8d confirma una interacción entre factores. A tiempos de tratamiento de 5 minutos, el PDMS adquirió una mayor hidrofiliicidad cuando el material fue tratado a potencias de 40 W. Sin embargo, cuando el tiempo de tratamiento fue de 15 minutos, el PDMS presentó la mayor hidrofiliicidad cuando la potencia fue de 120 W.

#### 4.2.1.3. Tratamiento con plasma de argón

Los resultados de la medición del ángulo de contacto del PDMS tratado con plasma de argón se presentan en la Tabla 4.3 y Figura 4.9(a-d). El análisis estadístico se llevó a cabo con los resultados experimentales estimándose los efectos principales y el efecto de la interacción.

Los resultados de la Tabla 4.3 corresponden al análisis cuantitativo del experimento en los cuáles se comprueba estadísticamente (nivel de significancia del 5%) que el factor tiempo y la interacción potencia-tiempo resultaron ser significativamente influyentes sobre la disminución del ángulo de contacto en razón a su valor  $p < 0.05$  (menor del 5% de significancia); no ocurre lo mismo con el factor potencia que resulta ser poco significativo en razón a su valor  $p > 0.05$ , presentando un efecto menor con respecto al del tiempo.

Además, la interpretación del  $R^2$  ajustado = 94.92 % nos indica que el modelo ajustado explica el 95 % de la variabilidad de la respuesta, obteniéndose para el caso del tratamiento con plasma de argón un buen ajuste y una metodología adecuada hacia la búsqueda de las mejores condiciones experimentales que permitan la mayor modificación de la superficie del PDMS.

Tabla 4.3 Resultados de la medición del ángulo de contacto del PDMS modificado con plasma de argón.

<i>Experimento</i>	<i>Potencia (W)</i>	<i>Tiempo (min)</i>	<i>Angulo de Contacto (°)</i>	<i>D.E. *</i>
7	40	5	87	1.3
9	40	5	88	1.3
1	40	15	65	2.8
4	40	15	58	5.0
2	80	10	54	3.6
6	80	10	58	1.2
5	120	5	76	1.0
8	120	5	77	2.8
3	120	15	62	0.8
10	120	15	65	1.7

\* D.E. Desviación estándar

Las Figuras 4.9a respuesta real y 4.9b modelo ajustado, representan las superficies de respuesta calculadas con base en un modelo de segundo orden; para cada combinación de potencia y tiempo se representa gráficamente el valor estimado de la respuesta media (ángulo de contacto) para el intervalo experimental considerado.

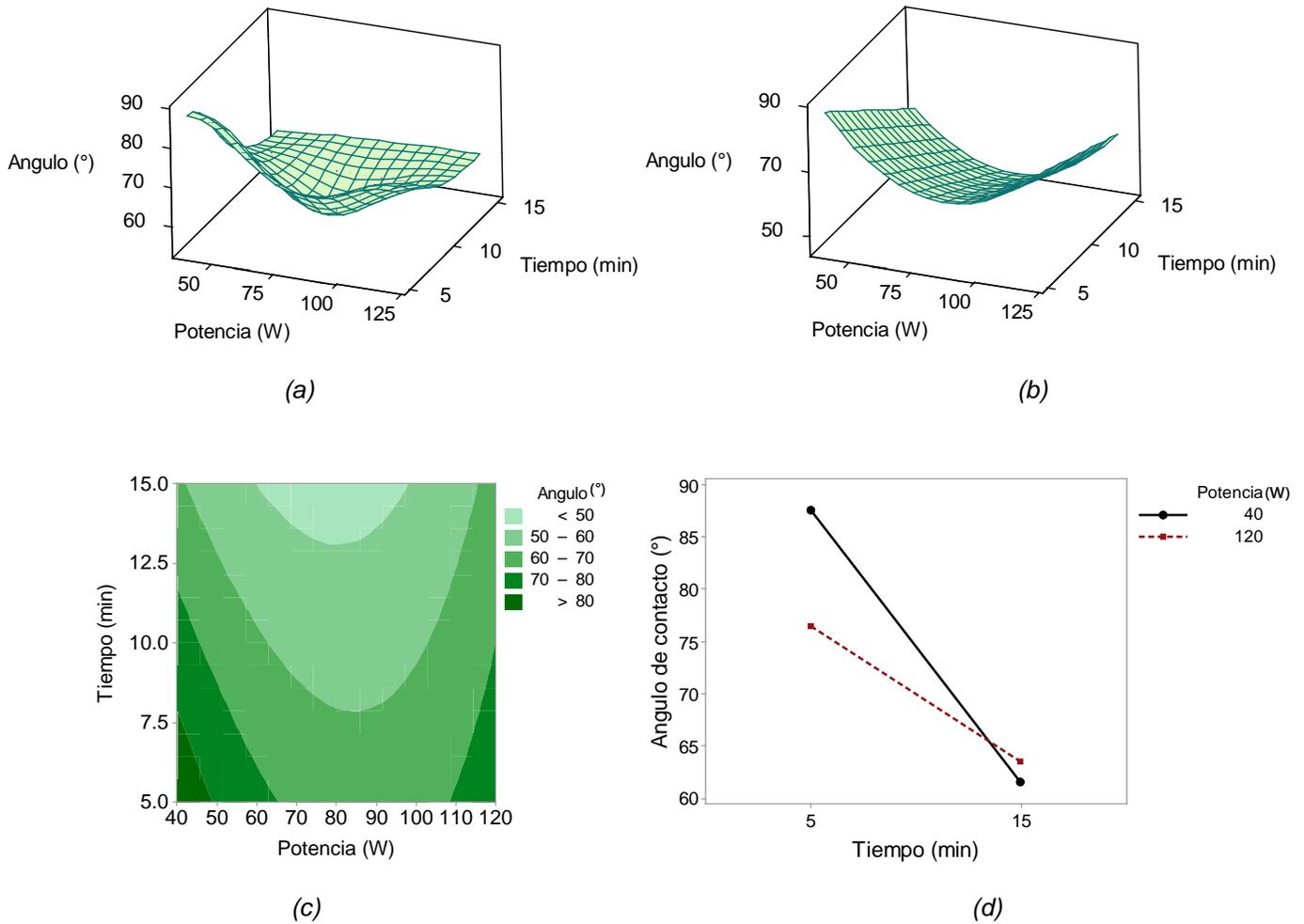


Figura 4.9 (a) Superficie de respuesta para el ángulo de contacto en agua en función del tiempo y potencia (experimental), (b) superficie de respuesta para el ángulo de contacto en agua en función del tiempo y potencia (Optimización), (c) Gráfica de contorno del ángulo de contacto en agua en función del tiempo y potencia, (d) Gráfica de interacción potencia-tiempo (tratamiento con plasma de argón).

Se observó que para tratamientos a baja potencia, la disminución del ángulo de contacto a tiempos cortos fue pequeña, obteniéndose altos valores iniciales de ángulo de contacto. Conforme el tiempo de tratamiento se incrementó, el valor de ángulo de contacto disminuyó significativamente. Cuando el tiempo de tratamiento fue más alto, el valor del ángulo de contacto tuvo una ligera recuperación hacia valores mayores siendo aún significantes estadísticamente.

Un comportamiento similar se presentó para los tratamientos a potencias mayores y tiempos cortos de tratamiento; de un valor inicial de ángulo de contacto alto (menor que el obtenido a bajas potencia), hasta un valor de ángulo de contacto bajo y significativo, estadísticamente.

La potencia en el tratamiento con argón tuvo poca influencia en el cambio de mojabilidad del PDMS, debido al hecho de que el tiempo fue el factor más significativo.

Con respecto a los tiempos de tratamiento, un comportamiento en forma de U, se observó. Al incrementarse la potencia del tratamiento, el ángulo de contacto fue disminuyendo hasta un valor mínimo (vértice); posterior a ese punto el ángulo de contacto se incrementó conforme la potencia aumenta. El valor del ángulo de contacto tuvo una recuperación hacia valores mayores siendo aún significantes estadísticamente y acentuándose evidentemente en los tratamientos de menor tiempo de tratamiento.

Esto es el resultado de un coeficiente cuadrático positivo para el factor tiempo, por lo que esta variable, en el tratamiento de plasma generado con argón, fue un parámetro importante que determina la magnitud del cambio de la mojabilidad del PDMS. Particularmente, el plasma de argón favoreció dicho cambio en los puntos centrales de las condiciones potencia y tiempo evaluados.

La Figura 4.9c, corresponde al gráfico de contorno o curvas de nivel del modelo ajustado equivalente a la misma superficie de respuesta del modelo, pero trasladado a dos dimensiones para facilitar la interpretación.

La Figura 4.9d muestra la gráfica de interacción potencia - tiempo de tratamiento. Para ambos factores se corrobora la existencia de una interacción y el efecto positivo sobre la respuesta.

El tratamiento con plasma es, evidentemente, una oxidación progresiva de la superficie. En los tratamientos de plasma, los átomos de hidrógeno se retiran de la cadena del PDMS para generar radicales dentro de las cadenas del polímero situadas en la superficie. Algunos de estos radicales se combinan con los radicales formados en el plasma resultando en grupos funcionales [170]. Para la activación de la superficie del PDMS con plasma de argón, que no puede por sí mismo introducir grupos funcionales, los radicales formados en la superficie pueden reaccionar con el oxígeno o la humedad en el aire, formando grupos  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Si-OH}$  o grupos  $\text{Si-CH}_2\text{OH}$  en la superficie PDMS [171].

La fuente de oxígeno en los plasmas de nitrógeno y argón puede ser aire residual en el reactor, vapor de agua, que también es muy difícil de eliminar con la bomba de vacío u oxígeno retenido en el propio polímero.

Otro factor importante que afecta a la mojabilidad de PDMS es la rugosidad de la superficie. En presencia de una mayor rugosidad, la hidrofiliidad o hidrofobicidad de la muestra será acentuada [172]. Este efecto será discutido en la Sección 4.2.2.

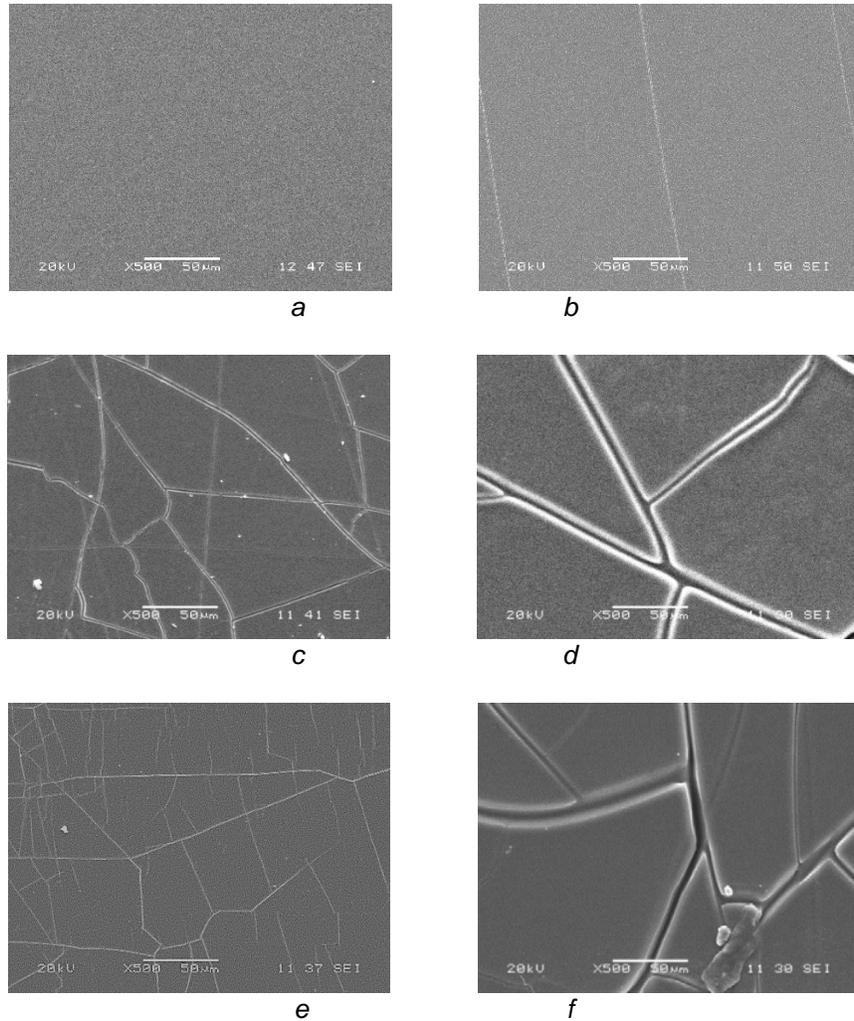
## **4.2.2. Morfología superficial**

### **4.2.2.1. Tratamiento con plasma de oxígeno**

La Figura 4.10a presenta la imagen de microscopía electrónica correspondiente a la superficie de la película de PDMS sin tratamiento, donde una superficie lisa fue observada, es decir, el material presenta una rugosidad superficial baja.

Las Figuras 4.10b-f, presenta micrográficas SEM de las superficies de PDMS modificadas. Una comparación de las imágenes muestra cómo la exposición al plasma de oxígeno dio lugar a cambios en la superficie, a través de la formación

aleatoria de ranuras superficiales, los cuales indican la oxidación de la superficie del polímero.



*Figura 4.10 Imágenes de SEM de (a) la superficie del PDMS sin modificar e imágenes de la superficie del PDMS modificado con oxígeno, (b) tratamiento de 40 W y 5 min, (c) tratamiento de 40 W y 15 min, (d) tratamiento de 80 W y 10 min, (e) tratamiento de 120 W y 5 min, (f) tratamiento de 120 W y 15 min.*

En la Figura 4.10f, se observa claramente que películas de PDMS tratadas con 120 W y 15 min mostraron ranuras bien definidas y con mayor amplitud, en comparación

con las superficies de películas de PDMS tratadas con potencias de RF bajas y tiempos de tratamiento más cortos, las cuales exhibieron ranuras más delgadas y menos definidas. De manera que, potencias de RF bajas y tiempos cortos de tratamiento condujeron a superficies con baja rugosidad, mientras que el aumento de la potencia de RF y un tiempo prolongado de exposición, incrementó la rugosidad de la superficie [173-175].

Las morfologías de las superficies también se observaron por medio de imágenes de microscopia de fuerza atómica. La Figura 4.11b, que corresponde a la superficie del PDMS tratado a potencias bajas y tiempos cortos, exhibió superficies lisas, en contraste con la Figura 4.11f, una superficie de PDMS expuesta a potencias más altas y tiempos largos de tratamiento la cual presentó una mayor rugosidad debido a la formación de ranuras. La cuantificación de la rugosidad superficial ( $R_{RMS}$ ) y la medición de la superficie envolvente, se estimó para los distintos tratamientos, a partir de las imágenes obtenidas por microscopia de fuerza atómica. Estos valores son presentados en la Tabla 4.4.

El valor de la raíz media cuadrática (RMS) de la rugosidad de las muestras expuestas a bajas potencias y tiempos cortos ( $25.1 \pm 4.8$  nm), fue menor al de las muestras expuestas a mayor potencia y tiempos más largos de tratamiento ( $132.2 \pm 5.0$  nm). Para muestras tratadas a potencias altas y tiempos largos, la superficie envolvente fue también mayor. Un valor de superficie envolvente alto en muestras expuestas a potencias altas y tiempos largos fue causado por una mayor rugosidad en la superficie. Se observó que tanto la rugosidad y la relación del área superficial (definida como la fracción de la verdadera superficie, es decir la superficie envolvente dividida por las dimensiones de exploración), se maximizó a potencias altas y tiempos más largos de tratamiento.

Las ranuras generadas en la superficie son el resultado de la liberación de un exceso de energía de deformación en respuesta a un esfuerzo aplicado sobre una fina capa rígida formada sobre la capa soporte de PDMS (indicativo de una capa oxidada de SiOx, en la cual los grupos metilo del PDMS han sido sustituidos con

átomos de oxígeno). Esto significa que esas ranuras son el resultado de una diferencia de elasticidad entre la parte interna del PDMS (bulk) y la capa oxidada [176].

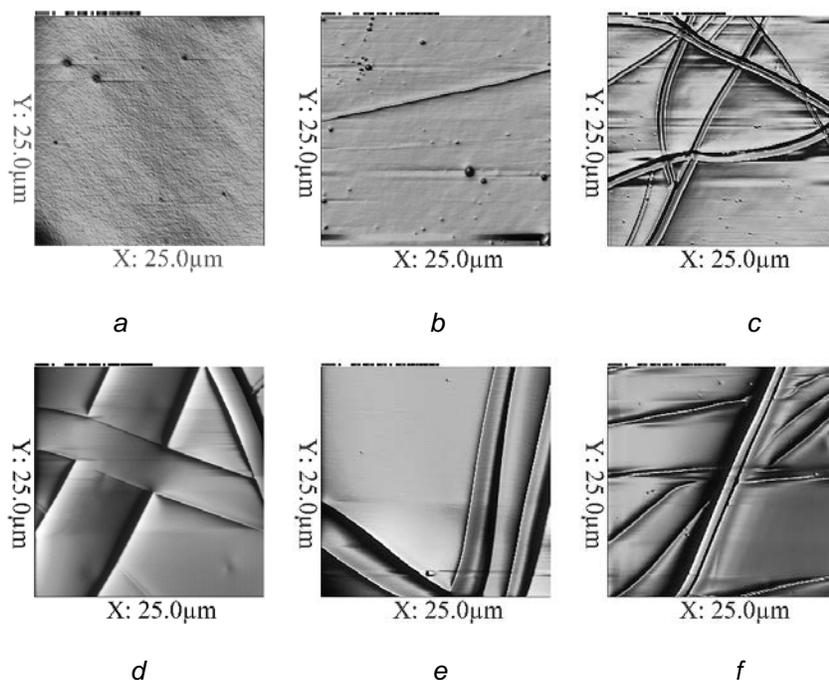


Figura 4.11 Topografía AFM del PDMS. (a) sin tratamiento, (b-c) 40 y 120 W / tratamiento de 5 minutos, (d) 80 W / tratamiento de 10 minutos, (e-f) 40 y 120 W / tratamiento de 15 minutos (plasma de oxígeno).

Tabla 4.4 Valores de rugosidad (RMS) y superficie envolvente del PDMS tratado por plasma de oxígeno.

Tratamientos	RMS rugosidad (nm)	D.E.	Superficie envolvente ( $\mu\text{m}^2$ )	D.E.
0 W	16.7	9.3	2500.8	0.9
40 W / 5 min	25.1	4.8	2502.8	0.6
40 W / 15 min	78.2	6.4	2508.8	0.5
80 W / 10 min	104.0	4.4	2512.2	0.6
120 W / 5 min	62.8	4.1	2507.4	0.3
120 W / 15 min	132.2	5.0	2520.6	0.3

\* D.E. Desviación estándar

Con el fin de correlacionar hidrofiliicidad con la rugosidad de la superficie, la Figura 4.12 (a-b) muestra las variaciones del ángulo de contacto y la rugosidad RMS. Los resultados indicaron que para las películas expuestas a tiempos cortos (Figura 4.12a) y las películas expuestas a tiempos más largos (Figura 4.12b), el incremento de la rugosidad reduce los ángulos de contacto. Se observa que la mojabilidad del PDMS es causada de manera importante por un aumento muy grande en la rugosidad de la superficie (también visto por SEM y AFM como un aumento en la formación de ranuras), inducida por un bombardeo de iones de oxígeno. Adicionalmente, la unidad repetitiva del PDMS,  $-\text{OSi}(\text{CH}_3)_2-$ , lo hace una superficie hidrófoba y posteriormente al tratamiento con plasma de oxígeno, los grupos metilo,  $\text{SiCH}_3$ , son eliminados, formándose probablemente, una capa de sílice hidrófila,  $\text{SiOx}$  o  $\text{SiOH}$ . Por otra parte, la rugosidad de la superficie implica una mayor área superficial lo que conduce a un incremento del área superficial total y como resultado una reducción del valor del ángulo de contacto. Sin embargo, es difícil de separar el efecto de la rugosidad en la superficie y los grupos funcionales superficiales en la medición de los ángulos de contacto.

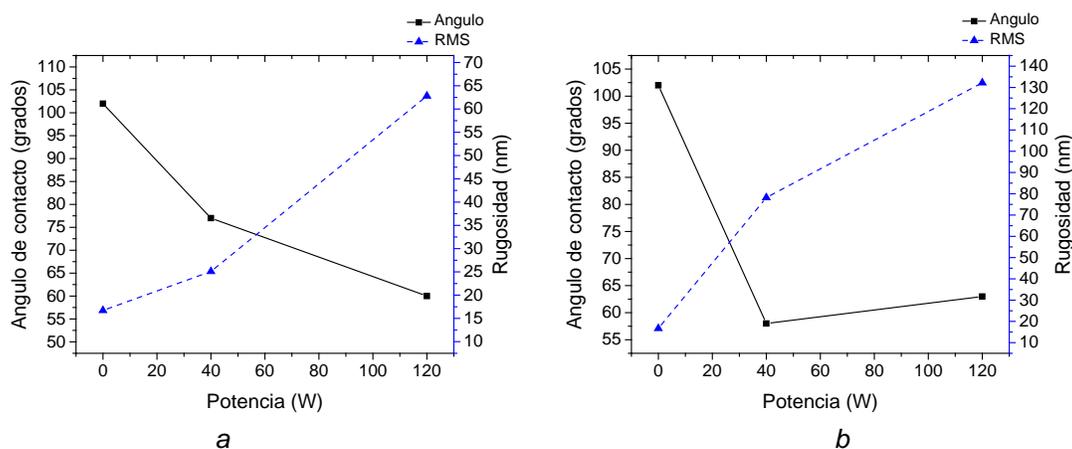


Figura 4.12 Valores de ángulo de contacto y rugosidad como función de la potencia y tiempo de tratamiento de: (a) 5 min y (b) 15 min (plasma de oxígeno).

De los resultados anteriores se puede observar que la rugosidad de la superficie en el PDMS cambia con la exposición al tratamiento con plasma de oxígeno [41]. Dado

que la rugosidad de la superficie se observó en ambos, tratados y no tratados PDMS, las diferencias en la morfología de la superficie por sí sola no pueden explicar la mejora en las propiedades de mojabilidad de las superficies de los PDMS modificados [16]. Con el fin de investigar el efecto de los tratamientos de plasma en las modificaciones químicas de la superficie, grupos funcionales en la superficie del PDMS tratado con plasma se analizaron mediante espectroscopia infrarroja, discutida en la Sección 4.2.3.

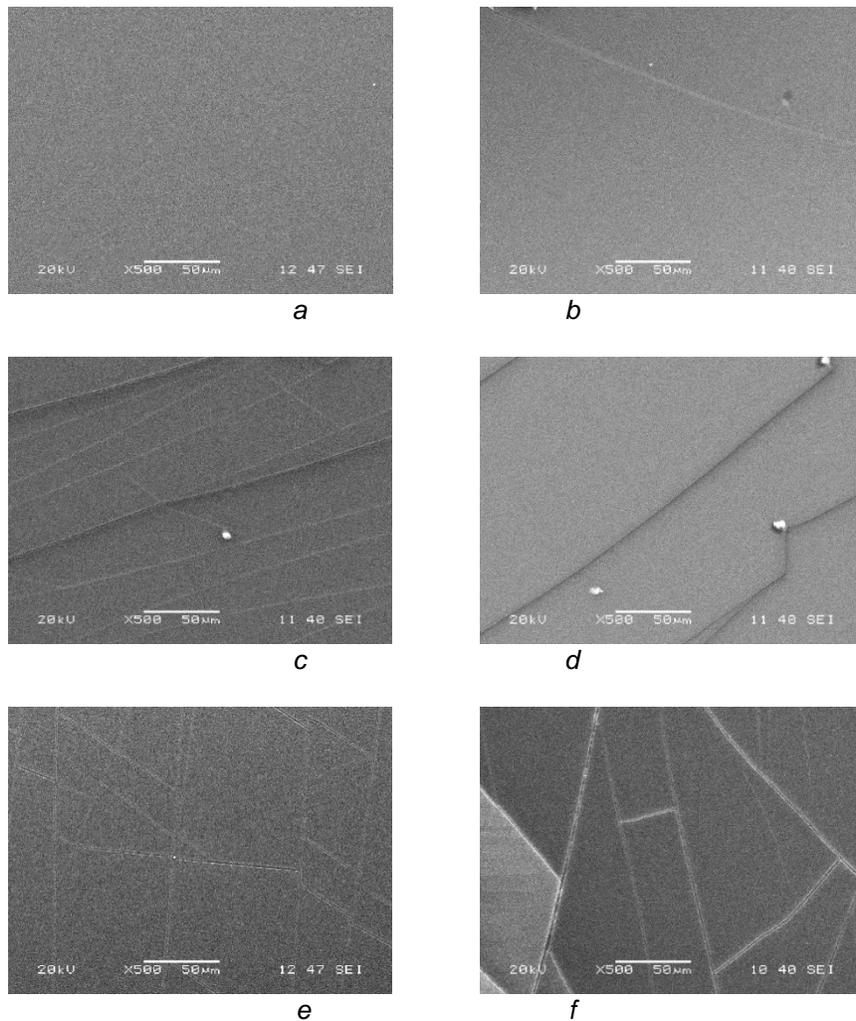
#### **4.2.2.2. Tratamiento con plasma de nitrógeno**

Desde el punto de vista morfológico general, no hay diferencias entre el tipo de plasma utilizado para el tratamiento de la superficie del PDMS. El tratamiento con plasma generado con nitrógeno también produjo texturas ranuradas sobre las superficies. Las diferencias se observan en el grado de rugosidad causado en la superficie debido a las condiciones del tratamiento.

La Figura 4.13a muestra la micrografía de la película de PDMS sin tratamiento. Como ya se discutió anteriormente, en ella se observa que el material presentó una rugosidad superficial baja.

Análogo al tratamiento con oxígeno, las Figura 4.13b, tratamiento de baja potencia y corto tiempo, presentó la menor formación de ranuras en la superficie del PDMS.

El PDMS tratado a potencias altas y tiempos más largos de tratamiento presentaron un mayor número de ranuras sobre la superficie, las cuales fueron más definidas que las obtenidas a condiciones menores. De la misma manera que para el tratamiento de plasma de oxígeno, tiempos cortos de exposición condujeron a superficies con baja rugosidad, mientras que tiempos prolongados las superficies exhibieron estructuras más rugosas. Sin embargo, y en concordancia con las mediciones de ángulo de contacto, el tratamiento con plasma de oxígeno produjo una mayor rugosidad superficial del PDMS, favoreciendo con esto los posibles sitios de anclaje para la unión de la biomolécula de colágeno.

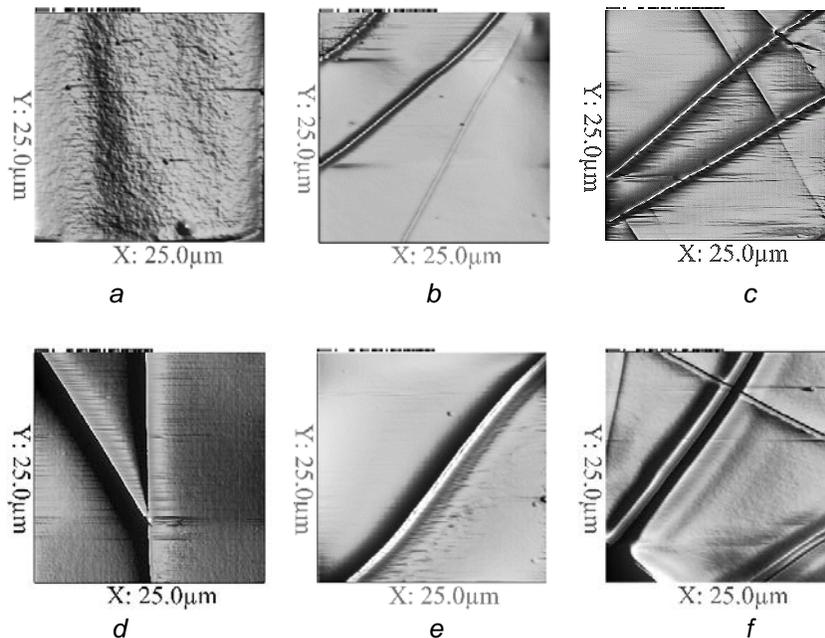


*Figura 4.13 Imágenes de SEM de (a) la superficie del PDMS sin modificar e imágenes de la superficie del PDMS modificado con nitrógeno, (b) tratamiento de 40 W y 5 min, (c) tratamiento de 40 W y 15 min, (d) tratamiento de 80 W y 10 min, (e) tratamiento de 120 W y 5 min, (f) tratamiento de 120 W y 15 min.*

La técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM) es útil, no sólo en una forma cualitativa, sino también para la determinación cuantitativa, ya que permite una representación 3D de la superficie tratada y cuantifica los efectos del tratamiento de plasma mediante el cálculo de la rugosidad superficial (rugosidad cuadrática media RMS). En una forma cuantitativa, podemos confirmar el aumento de rugosidad de la superficie a medida que aumenta la potencia y el tiempo de exposición.

La Figura 4.14(a-f) presenta imágenes AFM de superficies del PDMS sin modificar y modificado con plasma de nitrógeno. Los perfiles de rugosidad para los diferentes tratamientos muestran claramente este ligero aumento de la rugosidad de la superficie que fue significativo para tiempos de exposición largos, como se puede observar en la Figura 4.14f.

Los valores de rugosidad ( $R_{RMS}$ ) y la medición de la superficie envolvente se presentan en la Tabla 4.5. El valor de RMS para el PDMS sin tratar se encuentra cercano a los 5.8 nm. Este valor se incrementó hasta valores de 83.4 nm cuando la potencia y el tiempo de exposición fueron las condiciones más altas de tratamiento de plasma de nitrógeno. El mismo caso es observado para la relación del área superficial, la cual se maximizó a potencias altas y tiempos más largos de tratamiento.



*Figura 4.14 Topografía AFM del PDMS. (a) sin tratamiento, (b-c) 40 y 120 W / tratamiento de 5 minutos, (d) 80 W / tratamiento de 10 minutos, (e-f) 40 y 120 W / tratamiento de 15 minutos (plasma de nitrógeno).*

Tabla 4.5 Valores de rugosidad (RMS) y superficie envolvente del PDMS tratado por plasma de nitrógeno.

Tratamientos	RMS rugosidad (nm)	D.E.	Superficie envolvente ( $\mu\text{m}^2$ )	D.E.
0 W	5.8	7.5	2500.3	0.3
40 W / 5 min	15.4	5.8	2500.9	0.8
40 W / 15 min	42.6	2.3	2506.2	0.5
80 W / 10 min	52.4	9.8	2507.0	1.0
120 W / 5 min	53.8	9.3	2507.2	0.1
120 W / 15 min	83.4	4.0	2511.3	0.6

\* D.E. Desviación estándar

En la Figura 4.15(a-b) representa la correlación entre hidrofiliicidad y la rugosidad de la superficie. Se observó que tanto para tiempos cortos como para tiempos largos de exposición al tratamiento de plasma, el incremento de la rugosidad redujo los ángulos de contacto. La mojabilidad del PDMS es causada de manera importante por un incremento en la rugosidad de la superficie.

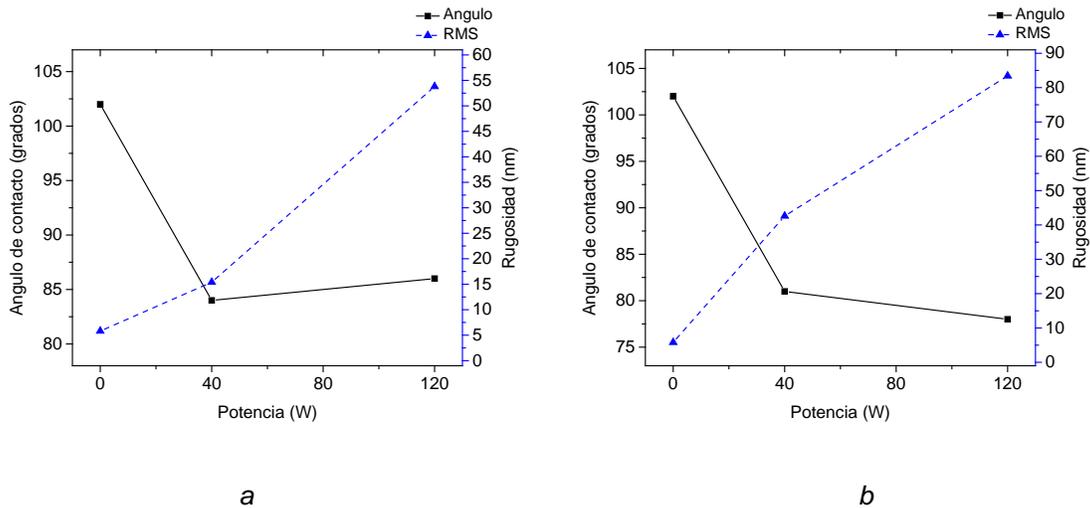


Figura 4.15 Valores de ángulo de contacto y rugosidad como función de la potencia y tiempo de tratamiento de: (a) 5 min y (b) 15 min (plasma de nitrógeno).

El plasma de nitrógeno no es tan agresivo como los plasmas oxidantes pero la acción de algunas especies presentes en el plasma promueve la escisión de las cadenas del PDMS, y ésto podría conducir a la formación de ranuras, promoviendo así los cambios en la rugosidad de la superficie, que en la mayoría de los casos, contribuye positivamente a un aumento de la mojabilidad [177].

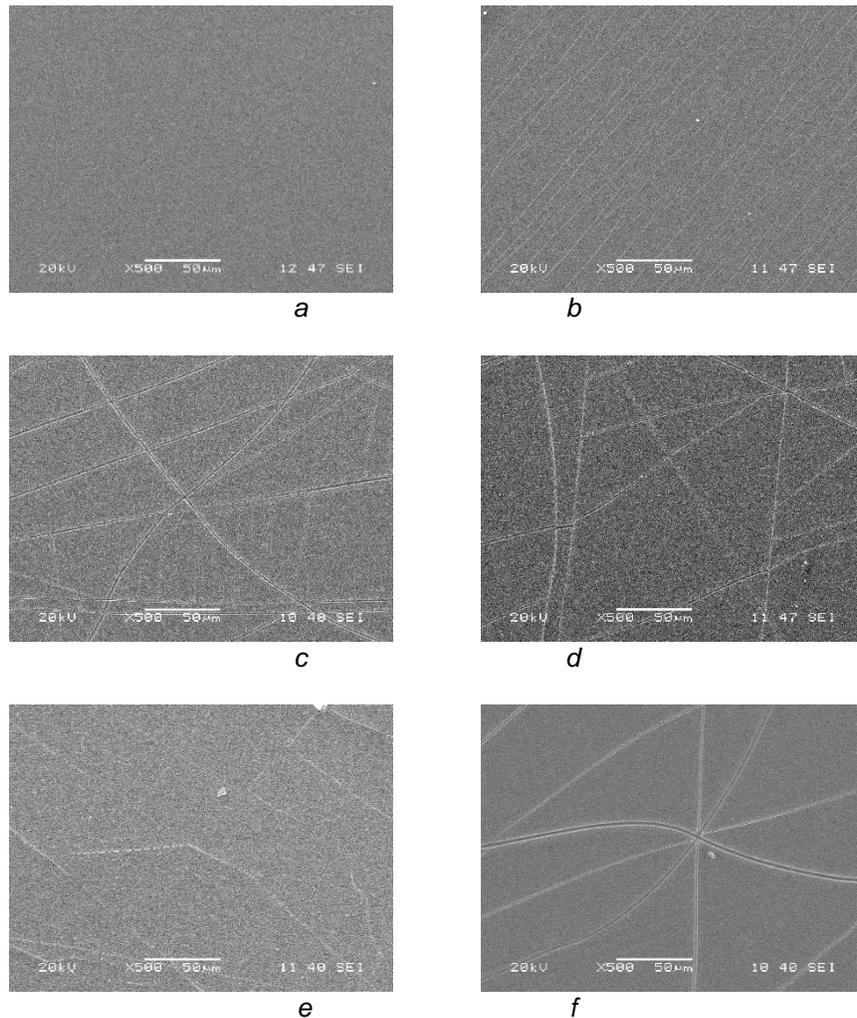
Como ya mencionó anteriormente, la hidrofilia en el PDMS no es permanente; sin embargo no toda la mejora en la mojabilidad se pierde durante el proceso de envejecimiento. Esto es debido, en parte, al hecho de que la funcionalización de la superficie no es el único mecanismo de actuación del plasma; parte del material también será removido [178]. Este hecho es en gran medida responsable de cierta modificación de la superficie (por lo general un aumento de rugosidad) que contribuye a mejorar las propiedades de hidrofilia de las películas tratadas con plasma. Los cambios en la topografía causados por la formación de ranuras no son tan sensibles al proceso de envejecimiento como los grupos polares introducidos en la superficie del material [177].

#### **4.2.2.3. Tratamiento con plasma de argón**

La morfología de las superficies no tratadas y tratadas con plasma de argón se analizó por microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM). En ambos casos, cambios en la superficie del PDMS tratado con plasma de argón (cambios de rugosidad) fueron observados.

El PDMS no tratado mostró una superficie suave y sin la formación de ranuras (Figuras 4.16a), a diferencia de las diferentes películas tratadas con plasma de argón, en las cuales la formación de surcos fueron detectados. En la Figura 4.16(b-f), se muestran las imágenes SEM de las superficies de PDMS modificadas por plasma de argón. La comparación de las imágenes muestra cómo la exposición al plasma de argón derivó en un cambio superficial, formándose hendiduras definidas en su superficie. De igual manera que en los tratamientos de plasma de O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>,

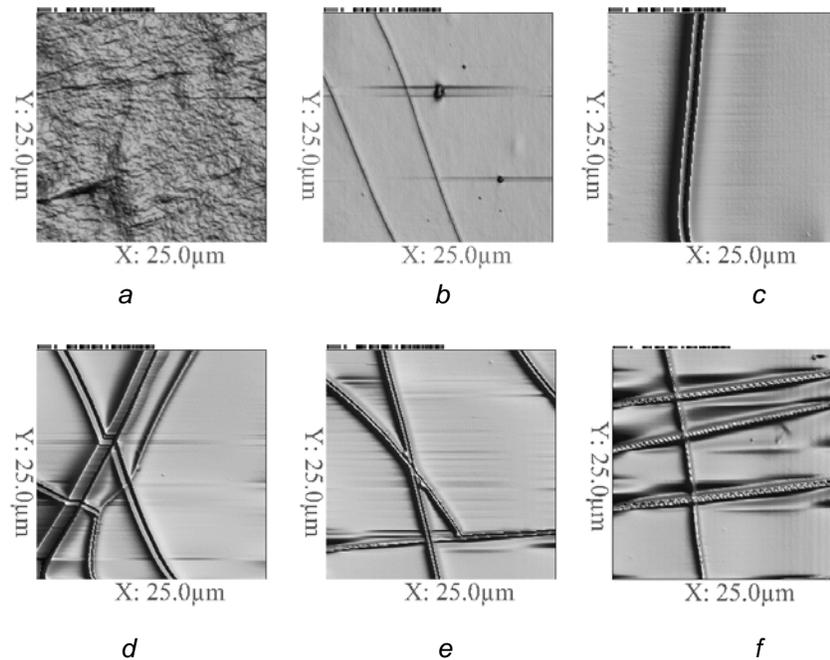
tiempos cortos de exposición condujeron a superficies con menor rugosidad, mientras que en tiempos prolongados, las superficies exhibieron estructuras más rugosas.



*Figura 4.16 Imágenes de SEM de (a) la superficie del PDMS sin modificar e imágenes de la superficie del PDMS modificado con argón, (b) tratamiento de 40 W y 5 min, (c) tratamiento de 40 W y 15 min, (d) tratamiento de 80 W y 10 min, (e) tratamiento de 120 W y 5 min, (f) tratamiento de 120 W y 15 min.*

En la Figura 4.17 se muestran imágenes de AFM. La figura 4.17a, que corresponde a la muestra de PDMS sin tratamiento, presentó una superficie lisa con baja

rugosidad mientras que las muestras tratadas, Figura 4.17(b-f), presentan una mayor rugosidad consecuencia de la formación de ranuras en su superficie. Esta tendencia a la rugosidad como una función del tratamiento es similar a los tratamientos con oxígeno y nitrógeno.



*Figura 4.17 Topografía AFM del PDMS. (a) sin tratamiento (b-c) 40 y 120 W / tratamiento de 5 minutos (d) 80 W / tratamiento de 10 minutos, (e-f) 40 y 120 W / tratamiento de 15 minutos (plasma de argón).*

Para muestras tratadas a potencias superiores y tiempos más largos, el área total envolvente también fue mayor. El área total envolvente para muestras expuestas a potencias altas y tiempos más largos fue causada por una mayor rugosidad en la superficie. Se observó que tanto la rugosidad como el área total envolvente, se maximiza a potencias y tiempos más largos de tratamiento.

La cuantificación de la rugosidad (RMS) y el área total envolvente se presentan en la Tabla 4.6. Los valores medidos para muestras expuestas a potencias bajas y tiempos cortos son menores que la de las muestras expuestas a mayor potencia y

tiempos más largos. Los valores de rugosidad obtenidos para este tratamiento son mayores a los previamente reportados para el tratamiento de plasma de oxígeno y nitrógeno. El incremento de la rugosidad condujo a un aumento del área superficial resultando en una mayor formación de ranuras superficiales.

El inicio de la formación de ranuras en el material, es una función del gas de plasma utilizado, la potencia de RF, la presión dentro del reactor y el tiempo de tratamiento. Estudios han demostrado el nivel de RF necesario para observar el inicio de la formación de hendiduras sobre la superficie de un PDMS, en los cuales se compararon cuatro gases de plasma (Ar, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> y He), y mantuvieron constantes el tiempo y la presión del tratamiento. Los resultados evidenciaron que el argón proporcionó el tratamiento de plasma más intenso, requiriendo sólo 5 W para la formación de las hendiduras, en segundo lugar el oxígeno necesitó 25 W para la formación de éstas, nitrógeno 100 W y el helio, el tratamiento de menor intensidad requiriendo 375 W para iniciar con el ranurado de la superficie del material [169].

*Tabla 4.6 Valores de rugosidad (RMS) y superficie envolvente del PDMS tratado por plasma de argón.*

<i>Tratamientos</i>	<i>RMS rugosidad (nm)</i>	<i>D.E.</i>	<i>Superficie envolvente (µm<sup>2</sup>)</i>	<i>D.E.</i>
<i>0 W</i>	<i>11.1</i>	<i>3.2</i>	<i>2500.8 µm<sup>2</sup></i>	<i>0.8</i>
<i>40 W / 5 min</i>	<i>34.5</i>	<i>7.1</i>	<i>2504.1 µm<sup>2</sup></i>	<i>0.7</i>
<i>40 W / 15 min</i>	<i>82.2</i>	<i>4.4</i>	<i>2510.3 µm<sup>2</sup></i>	<i>0.5</i>
<i>80 W / 10 min</i>	<i>118.9</i>	<i>6.2</i>	<i>2515.7 µm<sup>2</sup></i>	<i>0.9</i>
<i>120 W / 5 min</i>	<i>73.3</i>	<i>3.7</i>	<i>2508.1 µm<sup>2</sup></i>	<i>0.8</i>
<i>120 W / 15 min</i>	<i>146.4</i>	<i>6.5</i>	<i>2523.4 µm<sup>2</sup></i>	<i>0.2</i>

*\* D.E. Desviación estándar*

Por los valores de rugosidad obtenidos para las muestras tratadas con plasma de argón (Tabla 4.6), y por lo reportado en la literatura, es evidente que el argón proporciona el tratamiento más poderoso para cambiar la rugosidad de la superficie, mientras que el nitrógeno proporcionó el menor [179].

Las muestras tratadas por plasma de oxígeno presentaron estructuras que son más definidas, con ranuras de mayor amplitud que las tratadas con plasma de nitrógeno y argón. Esto podría atribuirse a la naturaleza altamente oxidante del plasma de oxígeno [180]. Sin embargo, dado que el argón es un gas inerte, su plasma no puede ser utilizado para introducir nuevos grupos funcionales a la superficie del PDMS, aunque pueden ocurrir la modificación y la reorganización de los grupos químicos que ya están presentes en la superficie. Esto incluye la posibilidad de romper viejos y formar nuevos enlaces mediante procesos de escisión de cadenas que tienen lugar en la superficie del polímero, resultado del ranurado de la superficie del PDMS [181-183].

Los análisis de la topografía superficial realizada por AFM en los niveles axiales de potencia y tiempo de tratamiento están en una adecuada concordancia con lo obtenido a partir de SEM. La correlación entre la hidrofiliicidad y la rugosidad de la superficie se presenta en la Figura 4.18(a-b), donde se confirma, que el tiempo de tratamiento tiene un efecto significativo en el incremento de la rugosidad, y al mismo tiempo sobre la reducción del valor de los ángulos de contacto.

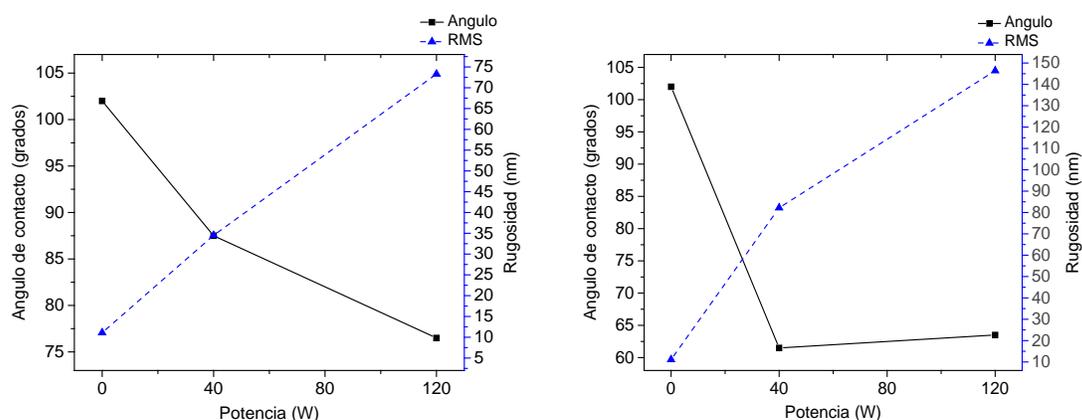


Figura 4.18 Valores de ángulo de contacto y rugosidad como función de la potencia y tiempo de tratamiento de: (a) 5 min y (b) 15 min (plasma de argón).

### 4.2.3. Química de la superficie

#### 4.2.3.1. Tratamiento con plasma de oxígeno

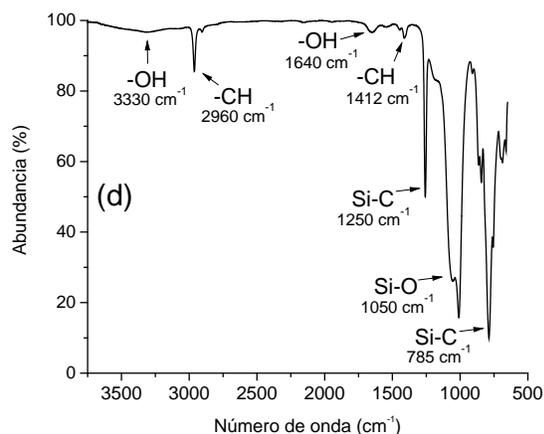
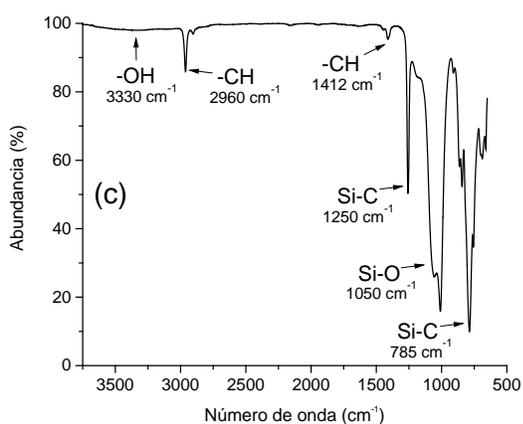
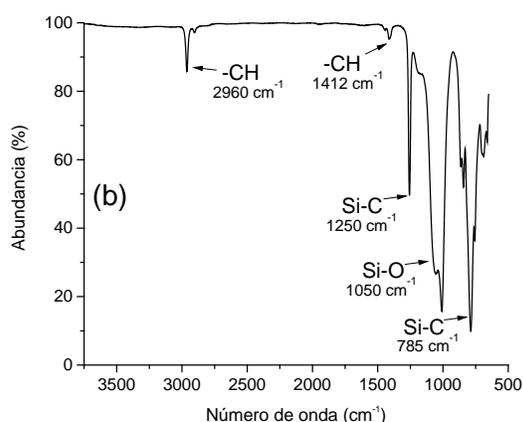
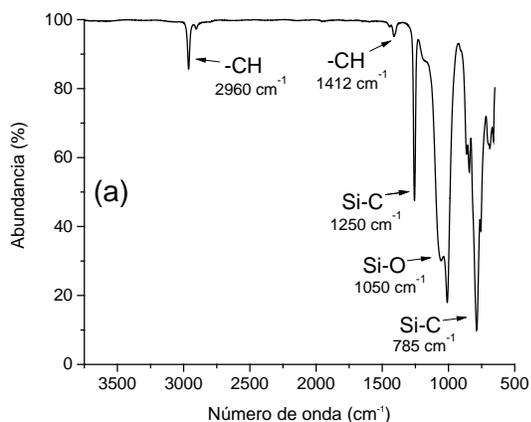
La Figura 4.19(a-f) presenta los espectros FTIR del PDMS sin modificar y el de los diferentes tratamientos de plasma de oxígeno al que fue sometido. El PDMS sin tratamiento (figura 4.19a), presenta las bandas de las vibraciones de tensión asimétrica y simétrica del enlace C-H del grupo metilo; estas señales aparecen a frecuencias más bajas que en los hidrocarburos, a 2900 y 2960  $\text{cm}^{-1}$ . La débil intensidad de la banda de tensión asimétrica se debe a la baja concentración de grupos  $\text{CH}_3$  existentes en la molécula. Las fuertes bandas en la región 1000-1100  $\text{cm}^{-1}$  se deben a la vibración de tensión del enlace Si-O en Si-O-Si y en Si-O-C. La vibración del enlace Si-O en la cadena lineal aparece aproximadamente a 1050  $\text{cm}^{-1}$ . Cuando se incrementa el peso molecular esta banda se ensancha gradualmente y ocupa la región 1000-1110  $\text{cm}^{-1}$ . Las bandas situadas a 1250 y 1412  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente, se asocian al grupo  $\text{Si}-(\text{CH}_3)_2$  y se deben al modo de vibración de la deformación del metilo unido al silicio. Finalmente, las múltiples bandas entre 650-860  $\text{cm}^{-1}$  son debidas a vibraciones de balanceo (rocking) del grupo metilo alrededor del enlace Si-C y a los modos de vibración de tensión del enlace Si-C [184, 185].

Las Figuras 4.19(b-f) presenta los espectros FTIR de los PDMS tratados por plasma de oxígeno. Las principales señales correspondieron a la secuencias del PDMS sin tratamiento: Si-O (1100-1000  $\text{cm}^{-1}$ ), Si-C (860-650  $\text{cm}^{-1}$ ). Adicionalmente, se puede observar que al incrementarse la potencia y el tiempo del tratamiento de plasma, condujo a la aparición de una señal ancha alrededor de 3000-3700  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente a la presencia del grupos hidroxilos en la superficie del PDMS. Aunado a esto, la aparición de la señal a 1640  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a vibraciones de flexión OH. Por lo tanto, se sugiere que radicales libres del oxígeno reaccionaron con los grupos metilo unidos al silicio ( $\text{Si}-\text{CH}_3$ ), sustituyéndolos y formando grupos silanol ( $\text{Si}-\text{OH}$ ).

Simultáneamente, la señal a 1250  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la unión  $\text{Si}-\text{CH}_3$  disminuye. Sin embargo, es bien sabido que los radicales de oxígeno en el aire son

inestables y los grupos silanol están migrando dentro (bulk) del polímero y condensándose para reducir la energía libre superficial. Por lo tanto, la superficie oxidada de PDMS regresa a su estado de hidrofobicidad en corto tiempo [186, 187].

La comparación de los espectros FTIR corrobora la influencia de la potencia y tiempo en la estructura química del material. Por lo tanto, y de acuerdo con las mediciones de ángulo de contacto, los resultados de FTIR indicaron que la activación de la superficie con plasma de oxígeno a potencias altas y tiempos largos, aumentan la hidrofilia en la superficie del PDMS.



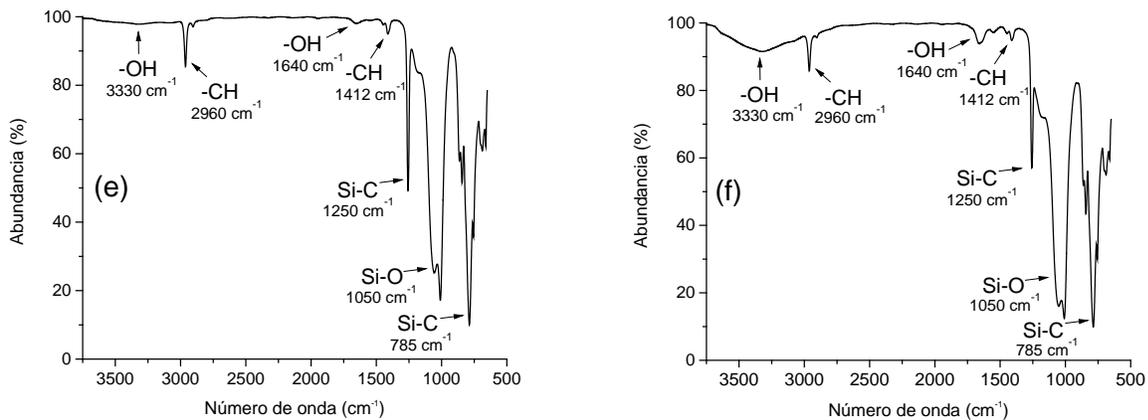


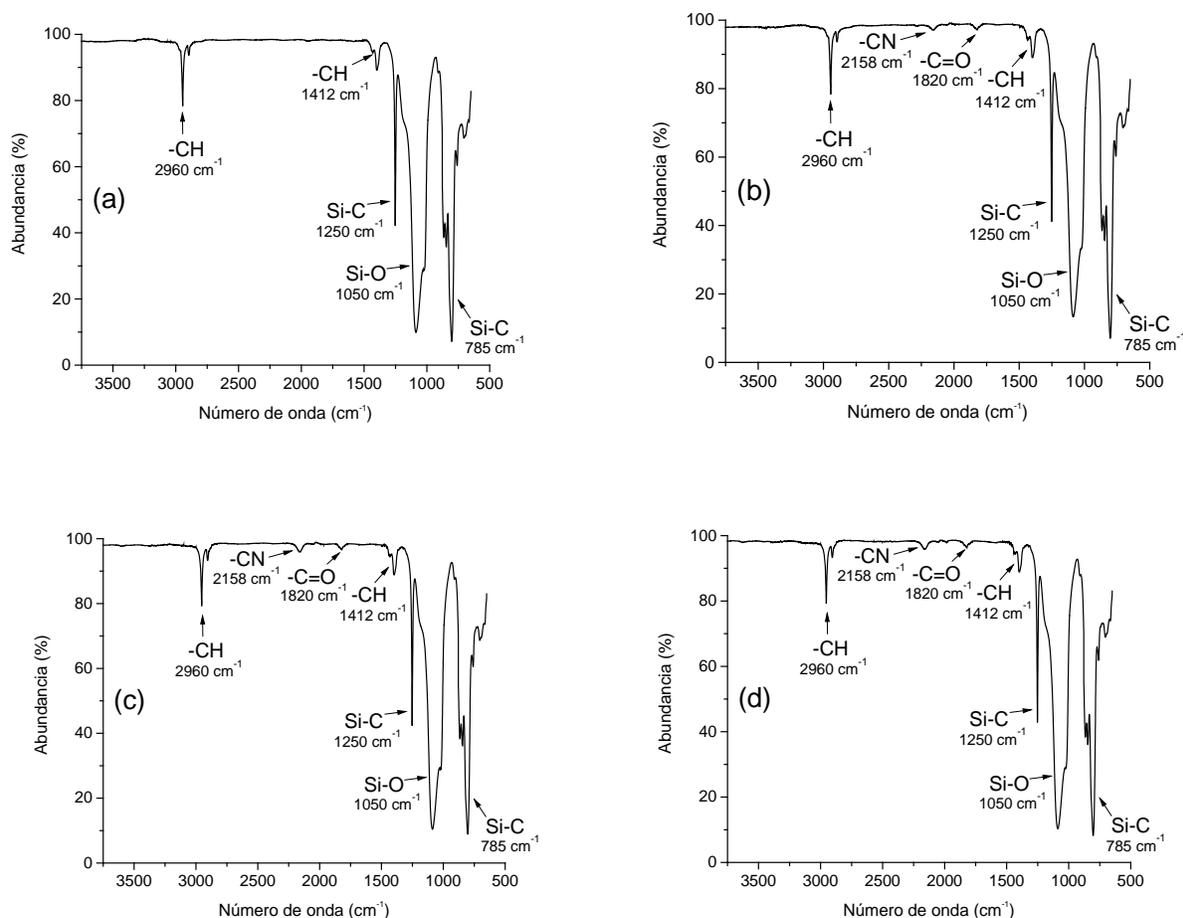
Figura 4.19 Espectros FTIR del PDMS para diferentes tratamientos de plasma de oxígeno (a) PDMS sin modificar, (b) 40 W/5 min, (c) 120 W/5 min, (d) 80 W/10 min, (e) 40 W/15 min y (f) 120 W/15 min.

#### 4.2.3.2. Tratamiento con plasma de nitrógeno

Las bandas de absorción FTIR de las superficies de PDMS antes y después del tratamiento por plasma de nitrógeno se muestran en la Figura 4.20(a-f). Las principales señales correspondieron a la secuencias del PDMS sin tratamiento: CH<sub>3</sub> (2900-2960 cm<sup>-1</sup>) Si-O (1100-1000 cm<sup>-1</sup>), Si-C (860-650 cm<sup>-1</sup>). A diferencia del tratamiento de plasma de oxígeno, donde se pudo observar claramente que el incremento de la potencia y el tiempo del tratamiento de plasma condujo a la aparición de la señal de 3000-3700 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la presencia del grupos hidroxilos, en el tratamiento con plasma de nitrógeno esos cambios no son tan evidentes; sin embargo, los cambios observados son predominantes el aumento de la intensidad de la banda 1800 cm<sup>-1</sup> y la formación de una nueva banda a 2158 cm<sup>-1</sup> (Figura 4.21). Mientras que la banda a 1800 cm<sup>-1</sup> es indicativa de especies del tipo carbonilo formados a partir de la oxidación de la superficie, la banda de 2158 cm<sup>-1</sup> no puede ser asignada a productos de oxidación simples. La literatura sugiere que esta banda puede atribuirse al modo de estiramiento -CN formado por reacción de los fragmentos de nitrógeno en la superficie de PDMS [188].

Otro cambio significativo y característico de la implantación de nitrógeno fue la deformación de la banda del siloxano (Si-O) en la región de  $1080\text{ cm}^{-1}$ , con la fusión de su banda hermana en  $1020\text{ cm}^{-1}$  para conformar una banda ancha con una forma asimétrica entre  $1000$  y  $1100\text{ cm}^{-1}$  [189, 190].

Como ya se había señalado, las superficies de PDMS reaccionan con la exposición a la humedad atmosférica para formar enlaces silanol (Si-OH) [189, 190]. En nuestro caso, lo anterior no fue evidente con el tratamiento con nitrógeno; sin embargo, la literatura las reporta como una pequeña banda ancha alrededor de  $1640\text{ cm}^{-1}$  atribuidos a estiramientos de flexión de grupos -OH y la presencia de una banda débil alrededor de  $3700\text{ cm}^{-1}$  debido al estiramiento -OH del SiOH.



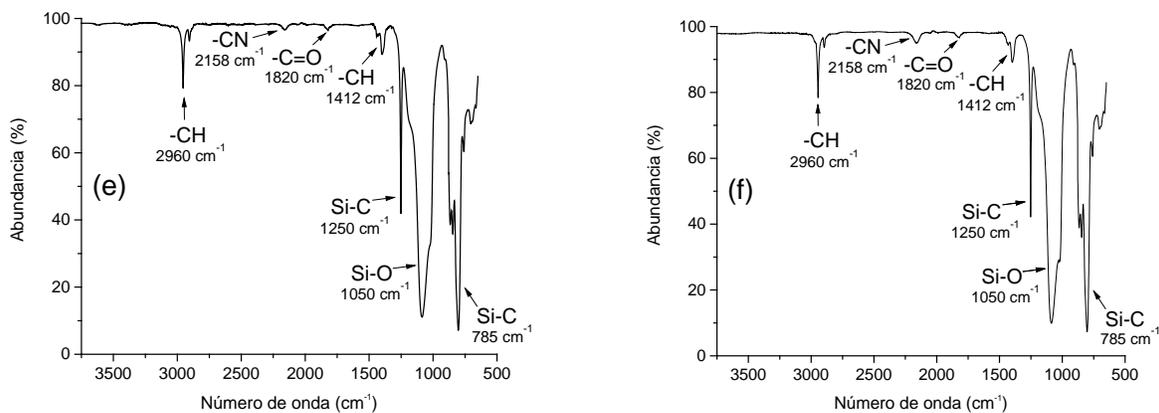


Figura 4.20 Espectros FTIR del PDMS para diferentes tratamientos de plasma de nitrógeno (a) PDMS sin modificar, (b) 40 W/5 min, (c) 120 W/5 min, (d) 80 W/10 min, (e) 40 W/15 min y (f) 120 W/15 min.

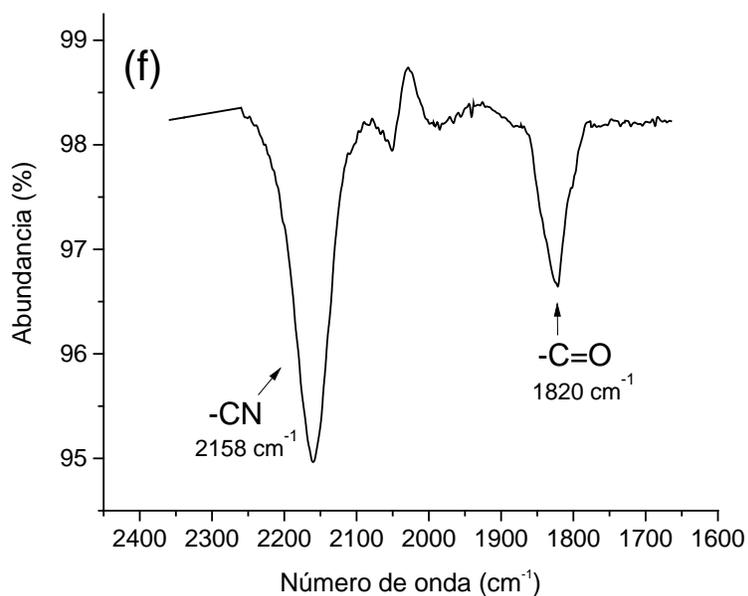


Figura 4.21 Aumento en la intensidad de la banda  $1820\text{ cm}^{-1}$  y la formación de una nueva banda a  $2158\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.2.3.3. Tratamiento con plasma de argón

Los espectros FTIR de los PDMS no tratados y tratados por plasma de argón son presentados en la Figura 4.22(a-f). Las principales señales correspondieron a la secuencias del PDMS sin tratamiento: CH<sub>3</sub> (2900-2960 cm<sup>-1</sup>), Si-O (1100-1000 cm<sup>-1</sup>), Si-C (860-650 cm<sup>-1</sup>). A diferencia del tratamiento con plasma de oxígeno y nitrógeno, donde se pudo observar que al incrementarse la potencia y tiempo del tratamiento de plasma se produce la aparición de la señal de 3000-3700 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la presencia del grupos hidroxilos y la señal de 2158 cm<sup>-1</sup> que corresponde al grupo nitrilo respectivamente, el tratamiento con plasma de argón no mostró señales evidentes que correspondan a algún grupo funcional inducido por el tratamiento.

La introducción de grupos funcionales nuevos, pueden ocurrir si los grupos reactivos del tratamiento con plasma se mantienen en la superficie, y reaccionan cuando la superficie se expone al aire del ambiente, vapor de agua (que es muy difícil de eliminar por bombeo), oxígeno retenido en el propio polímero o cualquier otra atmósfera de gas. Algunos trabajos reportan bandas que aparecen después de la modificación con plasma de argón, las cuales son de baja intensidad y estrechas [191, 192]. Este efecto se relaciona con lo ya mencionado, el mecanismo de modificación. En el plasma de argón, las nuevas funcionalidades son el resultado de la reacción entre los radicales creados en el plasma y los ingredientes de aire (principalmente oxígeno). Sin embargo, para este trabajo, por espectroscopía de FTIR no hubo evidencia de la formación de estas especies o su concentración es tan baja que se encuentra fuera de los límites de detección del equipo.

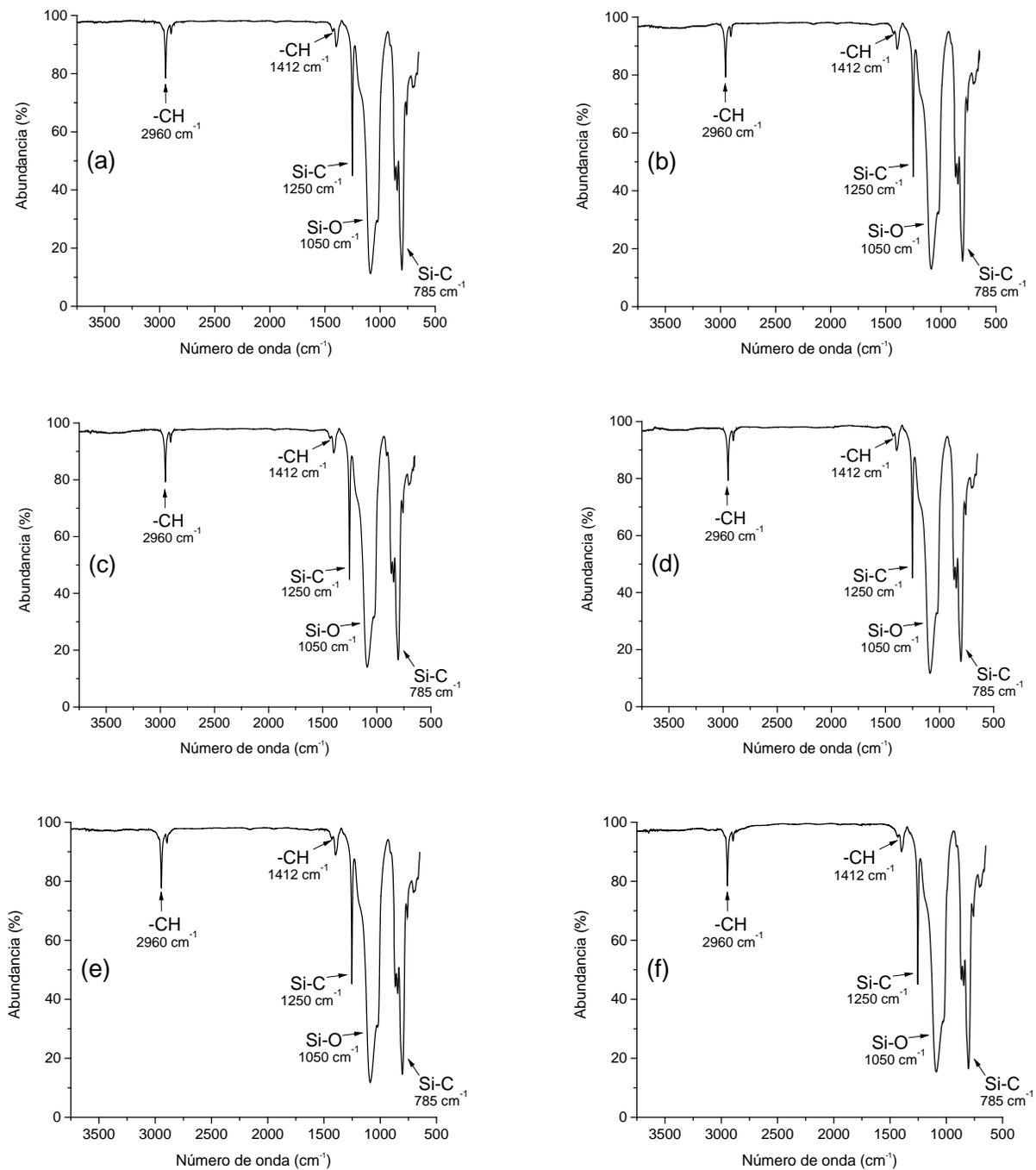


Figura 4.22 Espectros FTIR del PDMS para diferentes tratamientos de plasma de argón (a) PDMS sin modificar, (b) 40 W/5 min, (c) 120 W/5 min, (d) 80 W/10 min, (e) 40 W/15 min y (f) 120 W/15 min.

### **4.3. Preparación y caracterización del material compuesto PDMS-colágeno**

#### **4.3.1. Condiciones óptimas de proceso**

Las superficies de respuesta y gráficas de contorno de los tres distintos tratamientos y sus interacciones se presentaron en las Figuras 4.7-4.9. La observación de estas imágenes fue de gran importancia para identificar las condiciones óptimas con la máxima respuesta, para los diferentes niveles, de los factores ensayados en el diseño de experimentos. La respuesta óptima es referida a la superficie confinada en la curva concéntrica más pequeña del gráfico de contorno. A partir de esto y a pesar de que los tratamientos de plasma incrementaron la rugosidad superficial de las películas de PDMS, es mucho más deseable la presencia de grupos funcionales para lograr una eficiente y estable adhesión entre el PDMS y colágeno. A partir de este señalamiento, las condiciones óptimas de proceso elegidas para la preparación del material compuesto fueron: potencias cercanas al punto central (80W) y tiempos de tratamiento largos, entre trece y quince minutos de tratamiento. Bajo estas condiciones y de acuerdo con las predicciones del modelo, se pueden lograr los valores mínimos de ángulo de contacto.

Para determinar si el tratamiento de plasma condujo a una mayor fuerza adhesiva entre las capas del material compuesto, obtenido de acuerdo a las condiciones óptimas de cada uno de los tratamientos, un ensayo de pelado se llevó a cabo y los resultados son discutidos en la Sección 4.3.4.

#### **4.3.2 Morfología de la sección transversal**

La Figura 4.23 muestra la imagen SEM de la sección transversal del material compuesto PDMS-colágeno, preparado posteriormente al tratamiento del PDMS con plasma de oxígeno. La capa superior corresponde al colágeno, con un espesor de alrededor de 10-20 micras, mientras que la capa inferior al PDMS tratado con plasma con espesor de 0.8 mm aproximadamente. Esta micrografía también revela la interface entre ambas capas.

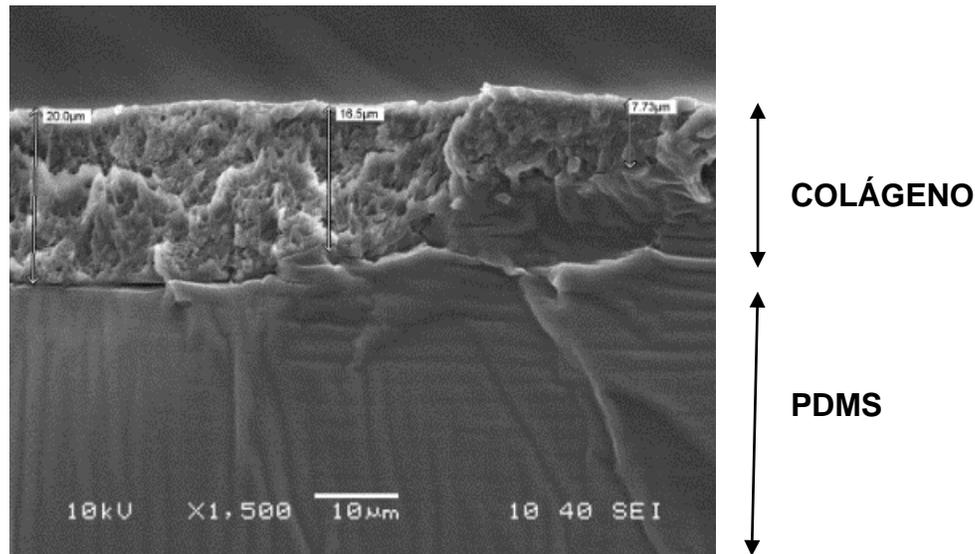


Figura 4.23 Imagen de SEM de la sección transversal del material compuesto PDMS-colágeno.

#### 4.3.3. Propiedades mecánicas a tensión

El ensayo de tensión para el PDMS no tratado, mostró una respuesta elástica lineal hasta un valor de esfuerzo de tensión máximo de  $\sigma^{\max} = 0.9 \pm 0.1$  MPa y fallando el material a una deformación de  $\varepsilon^{\max} = 44.2 \pm 5.4\%$ . A partir de la curva esfuerzo-deformación (Figura 4.24a), se calculó el módulo elástico el cual fue de  $E = 2.0 \pm 0.1$  MPa. Estos valores no se pueden comparar directamente con los reportados en la ficha técnica del fabricante (módulo elástico de 7.1 MPa), ya que no se especifican el tiempo y la temperatura de curado. Además, las propiedades mecánicas de un PDMS entrecruzado, bajo condiciones de preparación bien definidas (relación de mezcla, tiempo y temperatura de curado, espesor, etc.) no siempre se reportan, pero se encuentra entre 1 y 9 MPa [193].

Las propiedades mecánicas de los PDMS tratados (Figura 4.24b), y del material compuesto PDMS-colágeno (Figura 4.24c), no cambiaron significativamente

mostrando un mínimo incremento. Para el caso de los PDMS tratados, el tratamiento con plasma sólo modificó su superficie (menor a una micra de espesor), y las propiedades en masa del material no son afectados [194]. Para el caso del material compuesto, se observó un ligero aumento en el módulo elástico, atribuido al incremento del espesor por la película de colágeno adherida al PDMS. Sin embargo, el cambio no fue estadísticamente significativo.

Un resumen de las propiedades mecánicas a tensión del PDMS no tratado, PDMS tratado con plasma (80 W, 13 min) y el material compuesto se enumeran en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7 Propiedades mecánicas a tensión del PDMS sin modificar, modificado con plasma de oxígeno y material compuesto PDMS-colágeno

Película	$E$ (MPa)		$\sigma^{max}$ (MPa)		$\epsilon^{max}$ (%)	
	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.
<b>PDMS</b>	2.0	0.1	0.9	0.1	44.2	5.4
<b>PDMS tratada</b>	2.3	0.2	0.9	0.1	55.0	7.2
<b>PDMS/Colágeno</b>	2.5	0.6	1.0	0.1	56.5	8.0

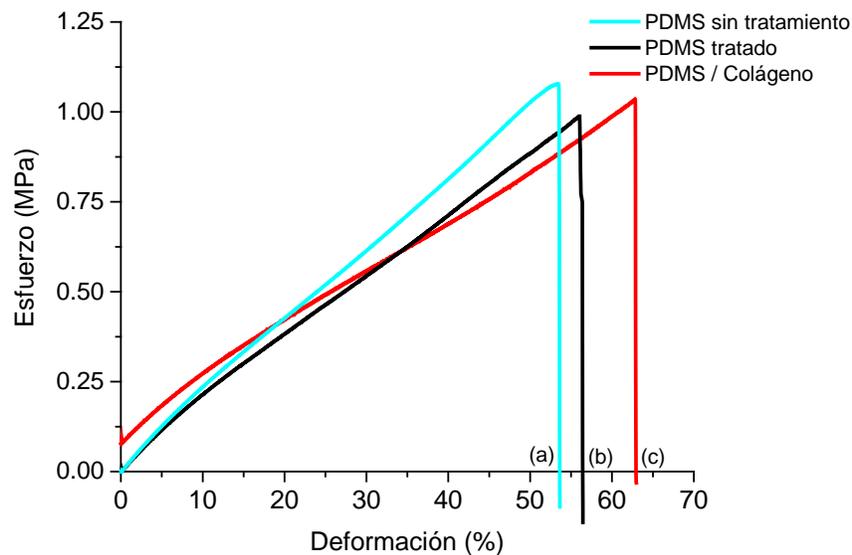


Figura 4.24 Curvas esfuerzo-deformación del (a) PDMS sin tratamiento, (b) PDMS tratado y (c) material compuesto PDMS-colágeno.

#### **4.3.4. Resultados del ensayo de pelado**

##### **4.3.4.1. Tratamiento con plasma de oxígeno**

Un ensayo de adhesión particularmente simple para películas delgadas es la prueba de pelado en T. Este método está destinado principalmente para determinar la resistencia relativa al pelado de uniones adhesivas entre adherentes flexibles.

La gráfica de resistencia contra el desplazamiento durante la prueba de adherencia al pelado en "T" del material compuesto PDMS-colágeno obtenido por tratamiento de plasma de oxígeno, se muestra en la Figura 4.25. Los resultados obtenidos mostraron un aumento de la resistencia de pelado en el material compuesto después del tratamiento de plasma (80 W, 13 min), al PDMS. Los datos indicaron que la resistencia de pelado promedio se incrementó más de 3 veces, es decir, a partir de  $0.03 \pm 0.002$  N/mm para la muestra no tratada hasta  $0.1 \pm 0.003$  N/mm para la muestra tratada. La medición reportada es la resistencia promedio del pelado de unos pocos milímetros dividida por la anchura de la muestra. El valor reportado fue de "0.1 N por mm". Esto significa que una muestra de longitud de 45 mm habría registrado una resistencia al pelado promedio de 4.5 N. Esta es una medida lineal por lo que teóricamente 100 mm de longitud registrarían 10 N de resistencia.

La Figura 4.25 muestra también la evolución de la resistencia por la celda de carga durante la evolución del ensayo. El desprendimiento de las películas tratadas y no tratadas, mostró un avance estable y progresivo a lo largo de la interface, lo que resultó en el colapso total de la muestra. Esto indica que se produjo un fallo de cohesión en el material antes de que hubiera fallo adhesivo [195].

El aumento de la resistencia al pelado se explica por la formación de grupos funcionales después del tratamiento de plasma que contribuyó al mejoramiento de las interacciones químicas entre el PDMS y la superficie de colágeno. Además, también debe considerarse que el aumento de la rugosidad juega un papel importante en la mejora de la adherencia de la capa de colágeno a la superficie de PDMS altamente rugosa.

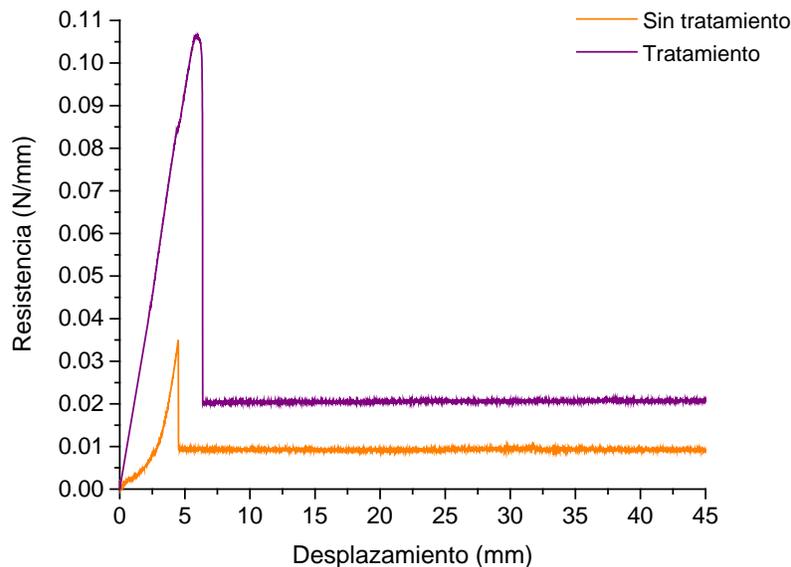


Figura 4.25 Resistencia normalizada vs desplazamiento durante el ensayo de pelado en T del material compuesto PDMS/colágeno (tratamiento con plasma de oxígeno).

El efecto de la rugosidad superficial sobre la resistencia de pelado de biomoléculas en superficies de polímero ha sido estudiado anteriormente; aunque la relación entre las mediciones cuantitativas de la rugosidad, ángulo de contacto y la resistencia al pelado no se ha dado a detalle [196, 197]. Bajo las condiciones de tratamiento de plasma elegidas de acuerdo a la superficie de respuesta, un aumento observado entre el valor de la rugosidad superficial (RMS) y la resistencia al pelado también confirmó la mejora significativa de la adherencia. Una rugosidad superficial de  $98.5 \pm 3.7$  nm causada por el tratamiento con plasma de oxígeno a 80 W durante 13 min produjo una resistencia al pelado de  $0.1 \pm 0.003$  N/mm. Por otro lado, la rugosidad superficial de 16.7 nm para los PDMS no tratados resultó en un  $0.03 \pm 0.002$  N/mm de resistencia al pelado.

A partir de los resultados combinados de FTIR, mediciones del ángulo de contacto, microscopia de fuerza atómica y pruebas de pelado, se pudo establecer que la

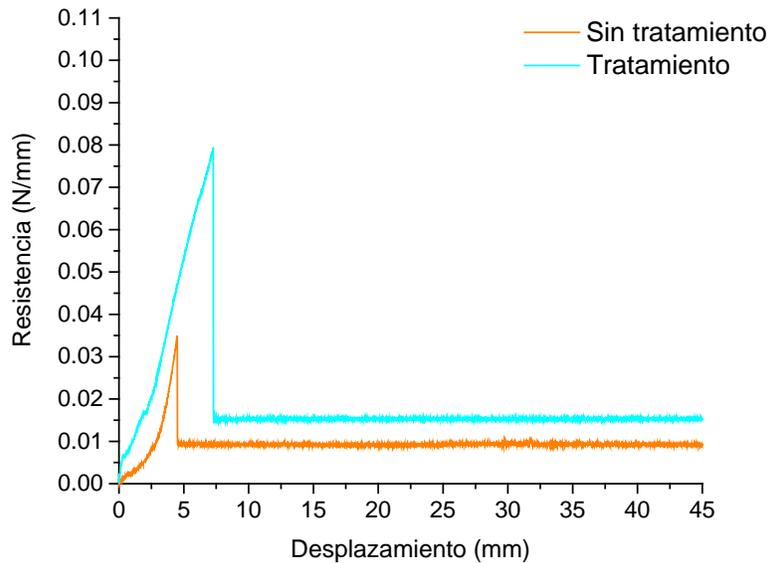
resistencia de pelado se incrementó ligeramente debido a los efectos químicos a baja potencia y tiempos cortos de exposición. Sin embargo, ésta se incrementó aún más cuando una mayor rugosidad en la superficie fue inducida por el aumento de la potencia y el tiempo de exposición, debido al área superficial antes mencionada y los efectos morfológicos.

#### **4.3.4.2. Tratamiento con plasma de nitrógeno**

La curva típica resistencia de pelado vs. desplazamiento para el material compuesto PDMS-colágeno obtenido por plasma de nitrógeno se muestra en la Figura 4.26. En ella se observó una relación carga-desplazamiento lineal con una tendencia aproximadamente constante, hasta alcanzar el punto de falla. Dicho de otra forma, el desprendimiento entre ambas capas comenzó en el borde en dirección longitudinal de la muestra, y luego se propagó en la interface de forma estable y progresiva, en proporción al aumento de la carga de pelado.

Como se esperaba, la resistencia máxima de adherencia del material compuesto, obtenido por tratamiento del PDMS con plasma de nitrógeno a 80 W y tiempo de 14 min fue mayor que la adherencia para el material compuesto de referencia (PDMS no tratado), simplemente unido por adhesión mecánica. Los datos indicaron que la fuerza de pelado promedio se incrementó más de 2.5 veces, es decir, de  $0.03 \pm 0.002$  N/mm para la muestra no tratada hasta  $0.08 \pm 0.002$  N/mm para la muestra tratada.

Este comportamiento se explica por la presencia de grupos funcionales de nitrógeno en la superficie que permiten la formación de diferentes estructuras de redes y un incremento de la rugosidad superficial de  $53.3 \pm 6.8$  nm causada por el tratamiento con plasma con nitrógeno a 80 W por 14 min, lo que favoreció la unión de materiales y la creación de una fuerza de cohesión entre ambos.



*Figura 4.26 Resistencia normalizada vs desplazamiento durante el ensayo de pelado en T del material compuesto PDMS/colágeno (tratamiento con plasma de nitrógeno).*

La comparación de los resultados de este ensayo con los del ensayo de pelado del material tratado por plasma de oxígeno y de acuerdo con los resultados ya discutidos del ángulo de contacto y rugosidad, el material compuesto obtenido por tratamiento con plasma de oxígeno produce una mayor resistencia adhesiva entre capas. Esta mejora se puede atribuir primeramente a los grupos funcionales de oxígeno (hidroxilos), formados en la superficie, los cuales son altamente reactivos, teniendo potenciales de oxidación muy altos, sólo por debajo del flúor. En segundo lugar, la mayor rugosidad obtenida en el tratamiento con oxígeno favoreció la formación de un mayor número de posibles sitios de anclaje e incrementándose así, la unión mecánica.

#### 4.3.4.3. Tratamiento con plasma de argón

En la Figura 4.27 se presenta la curva resistencia-desplazamiento obtenida para el material compuesto PDMS-colágeno preparado por plasma de argón a 80 W y 14 min. En ella se observó que la forma de la curva es dependiente del valor de la resistencia a la cual, la falla fue iniciada. La resistencia se incrementó con el desplazamiento hasta un valor máximo precedido a la falla de la unión de las capas.

La evaluación comparativa entre los resultados del ensayo mostró tres veces más adherencia para el material compuesto con el PDMS tratado, que la obtenida para el material compuesto de referencia. La resistencia de pelado promedio fue de  $0.09 \pm 0.001$  N/mm para la muestra tratada.

Ya que el tratamiento de plasma con argón no introduce por sí sólo grupos funcionales en la superficie, un mecanismo de adhesión que debe tenerse en cuenta es el anclaje mecánico, que para el caso del tratamiento del PDMS con plasma de argón es por mucho el mecanismo dominante. Esto supone que el responsable de la adherencia intrínseca es el anclaje del colágeno en las irregularidades de la superficie del PDMS. La topografía de la superficie del PDMS tratado con plasma de argón creó una estructura que permitió al colágeno prácticamente penetrar sobre los surcos superficiales, formando con ello una región interfacial muy fuerte. Por lo que se pudo demostrar que el tratamiento de plasma con argón aumentó la resistencia de la unión a través del anclaje permitido.

La rugosidad del PDMS tratado con plasma de argón tiende a un valor de alrededor de  $124.9 \pm 6.1$  nm; sin embargo, con un valor de rugosidad de  $98.5 \pm 3.7$  nm, el PDMS tratado con plasma de oxígeno, produjo una mayor resistencia adhesiva entre capas, favorecida por los grupos funcionales formados en la superficie. Como ya se mencionó, dado que el argón es un gas inerte, su plasma por sí sólo no puede introducir nuevos grupos funcionales a la superficie del PDMS. Por lo tanto, la mayor resistencia adhesiva en el material compuesto obtenido por tratamiento de plasma

con oxígeno es resultado de las interacciones químicas formadas entre la superficie funcionalizada del PDMS y los grupos funcionales del colágeno.

De estos resultados, se puede concluir que la rugosidad es muy importante pero el efecto químico de los grupos funcionales es predominante.

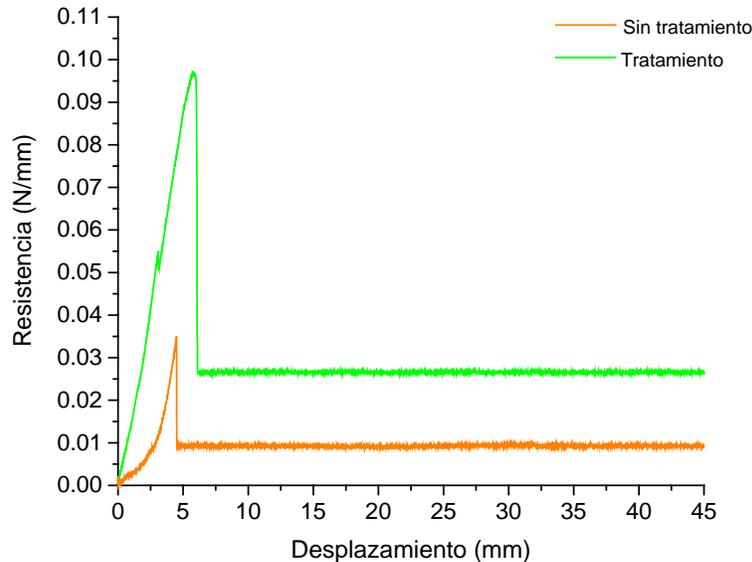


Figura 4.27 Resistencia normalizada vs desplazamiento durante el ensayo de pelado en T del material compuesto PDMS/colágeno (tratamiento con plasma de argón).

#### 4.3.5. Esquema propuesto de las interacciones del PDMS modificado por plasma de oxígeno y nitrógeno con el colágeno

El uso de plasma en modificaciones superficiales del PDMS es ampliamente aceptado, pero a pesar de esto, la química de la superficie no es clara todavía. Basado en la literatura reportada, una propuesta de lo que ocurre en la superficie del PDMS, con el tratamiento con oxígeno, es la eliminación de grupos metilo ( $\text{CH}_3$ ), para posteriormente dar lugar a la formación de grupos funcionales hidroxilo ( $\text{OH}$ ) y carboxilos ( $\text{COOH}$ ). Radicales libres ( $\text{O}^\cdot$ ), pueden producirse y luego convertirse en peróxidos ( $\text{O-O}$ ) [186, 187].

En el caso del tratamiento con nitrógeno, grupos amino (NH) y/o nitrilo (CN) pueden ser formados [185, 188]. Estos nuevos grupos químicos son los responsables de interactuar con el colágeno con el fin de formar un material compuesto estable.

Una propuesta del mecanismo de reacción para la obtención del material compuesto consiste de una primera etapa (Figura 4.28), donde se llevó a cabo la activación de la superficie del PDMS, formando los grupos funcionales que permitieron la adhesión interfacial con el colágeno en una segunda etapa de reacción (Figura 4.29). El colágeno tiene una estructura que consta de tres cadenas polipeptídicas enrolladas en forma levógira las cuales se estabilizan por la formación de enlaces de hidrógeno altamente ordenados [198, 199].

Por lo tanto, la segunda etapa consiste en la formación de nuevos enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo, aminos y grupos carbonilo del propio colágeno con los grupos hidroxilo y carbonilo presentes en el PDMS activado con plasma de oxígeno (Figura 4.29), o los grupos amino y nitrilo presentes en la superficie del PDMS activado con plasma de nitrógeno (Figuras 4.30 y 4.31). Estos nuevos enlaces formados se suman a la estabilización tanto de la conformación molecular como las interacciones de la triple hélice del colágeno y al mismo tiempo permiten la unión química entre el PDMS y el colágeno para la obtención del material compuesto.

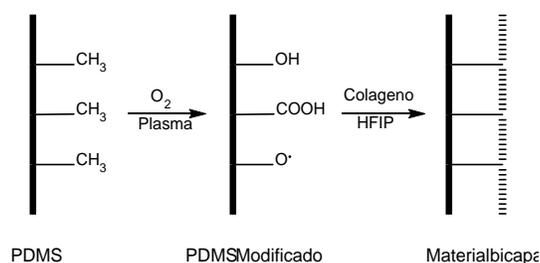


Figura 4.28 Propuesta de reacción para la activación de la superficie del PDMS mediante plasma de oxígeno.

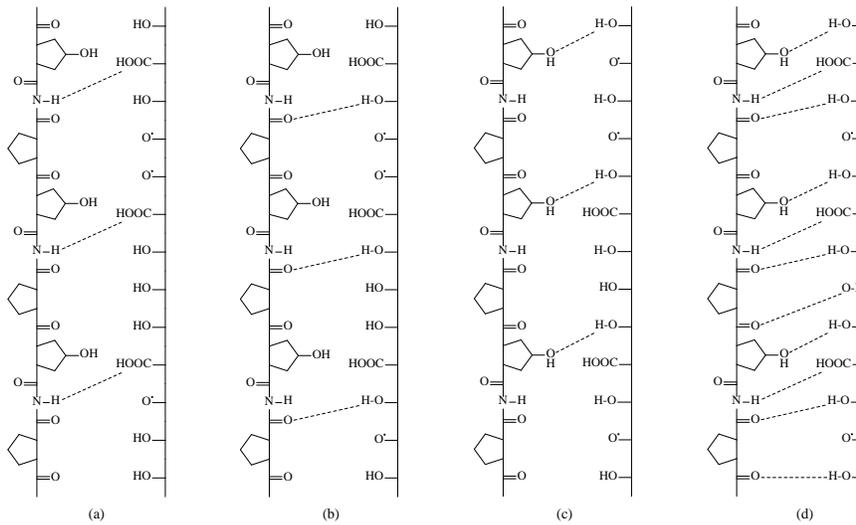


Figura 4.29 Patrones de formación de puentes de hidrógeno colágeno - PDMS. (a) puentes de hidrógeno amina – carboxilo, (b) puentes de hidrógeno carbonilo – hidroxilo, (c) puentes de hidrógeno hidroxilo – hidroxilo y (d) formación simultánea de puentes de hidrógeno.

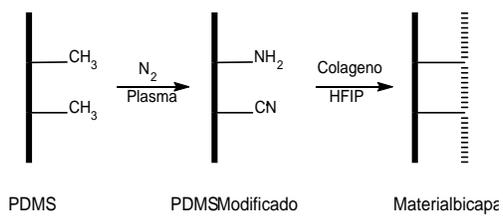


Figura 4.30 Propuesta de reacción para la activación de la superficie del PDMS mediante plasma de nitrógeno.

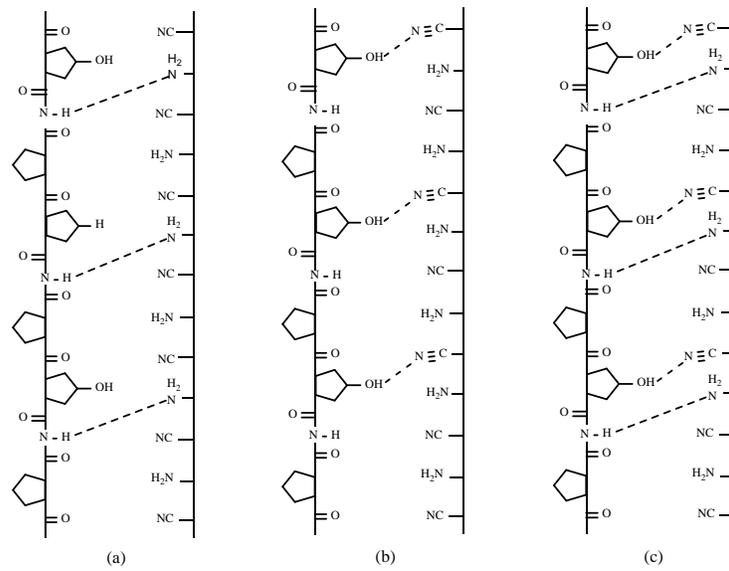


Figura 4.31 Patrones de formación de puentes de hidrógeno colágeno - PDMS. (a) puente de hidrógeno amina – amina, (b) puente de hidroxilo – nitrilo y (c) formación simultanea de puentes de hidrógeno.

## CONCLUSIONES

Este trabajo identificó una metodología para la preparación de un material compuesto PDMS-colágeno, con uso potencial como sustituto para piel.

El PDMS fue tratado con plasmas de oxígeno, nitrógeno y argón, para la activación de su superficie. El análisis del proceso se llevó a cabo mediante la aplicación de un diseño factorial, determinando la respuesta máxima por medio de la metodología de superficie de respuesta.

El PDMS tratado con plasma de oxígeno, nitrógeno y argón mostró un aumento gradual en la rugosidad y mojabilidad de la superficie conforme la potencia y el tiempo del tratamiento se incrementaron. La caracterización por espectroscopía IR mostró para el PDMS tratado con plasma de oxígeno la presencia de una banda ancha alrededor de  $3000-3700\text{ cm}^{-1}$ , la cual corresponde a grupos funcionales del tipo OH. El PDMS tratado con plasma de nitrógeno, presentó una banda alrededor de  $2150-2200\text{ cm}^{-1}$  atribuida a la presencia de grupos  $-\text{CN}$ . Estos grupos fueron responsables del aumento de la hidrofiliidad y a su vez permitieron las interacciones químicas para la preparación de materiales compuestos PDMS-colágeno.

El incremento de la resistencia al pelado se logró para todos los tratamientos con plasma, obteniéndose una mayor resistencia para el PDMS tratado con plasma de oxígeno, atribuida no sólo por la presencia de especies de oxígeno en la superficie del PDMS, sino también a la rugosidad y mayor área superficial obtenidas por el tratamiento.

La rugosidad también tiene un efecto determinante en relación a la resistencia de pelado, ya que puede conducir al anclaje mecánico entre estos dos materiales muy diferentes. El reflejo de esto fue el PDMS tratado con plasma argón, donde se obtuvieron valores de resistencia al pelado, tres veces más que el material compuesto de referencia.

Como conclusión final, se puede confirmar que el tratamiento con plasma es un método alternativo y eficaz para modificar la superficie de PDMS químicamente no reactivos y para mejorar la adhesión o inmovilización de biomoléculas tales como colágeno. De acuerdo a los resultados y al diseño experimental realizado, el mejor resultado se obtuvo para el tratamiento con plasma de oxígeno a un potencial de 80 W y tiempo de 13 min.

## **PERSPECTIVAS**

Los sustitutos de piel actualmente disponibles comercialmente, son eficaces en la aceleración de la reparación de heridas y su uso apropiado puede lograr el cierre de heridas de difícil cicatrización; sin embargo, avances basadas primeramente en el entendimiento del mecanismo de acción terapéutico de los sustitutos de piel pudieran conducir a mejoras sustanciales.

De la misma manera, los esfuerzos de los fabricantes para reducir el costo de los sustitutos de piel podrían cambiar su enfoque de forma dramática. En lugar de ser un post-tratamiento cuando otras modalidades han fallado o son propensas a fallar, la piel de bioingeniería podría utilizarse justificadamente más temprano en la evolución del paciente. El costo menor también podría permitir múltiples aplicaciones y, posiblemente, aumentar la eficacia del tratamiento.

Una atención adicional a los atributos de las heridas cicatrizadas podría ampliar el atractivo para el uso de piel de bioingeniería; si factores como la estética, la recurrencia de la herida y el grosor de la cicatriz resultan ser favorablemente influenciados por su uso.

Se requiere mucho trabajo adicional para definir mejor el papel relativo de las distintas tecnologías de la herida. En algunos casos, el efecto beneficioso de estos pueden ser aditivos; esto ha sido reportado, por ejemplo, para la terapia de heridas basado en células.

Basándose en décadas de avances en la tecnología de cultivo celular, los sustitutos de piel celulares representan las modalidades empíricamente y científicamente más modernas del cuidado de heridas. Ciertamente, las mejoras sobre las tecnologías actuales seguirán apareciendo. Sin embargo, se piensa que el uso actual de los productos de bioingeniería de la piel es inapropiado ya que estos productos son a menudo reservados hasta que los pacientes han sufrido el dolor y la no cicatrización durante muchos meses o incluso años. El advenimiento de métodos sencillos para la identificación temprana de los pacientes que no sanan correctamente con

tratamiento de baja tecnología, mejorará el proceso de selección de candidatos para la piel de bioingeniería y aumentará la popularidad y el costo-efectividad de esta propuesta.

## REFERENCIAS

- [1] L.W. Luria, "The role of medical grade silicones in surgery and its topical applications," *Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 9, pp. 67-74, 2002.
- [2] J.A. Carr M.H. Malick, "Flexible elastomer molds in burn scar control," *American Journal of Occupational Therapy*, vol. 34, no. 9, pp. 603-608, 1980.
- [3] M.A. Brook, H. Sheardown H. Chen, "Silicone elastomers for reduced protein adsorption," *Biomaterials*, vol. 25, pp. 2273-2282, 2004.
- [4] H. Mirzadeh, A. Katbab F. Abbasi, "Modification of polysiloxane polymers for biomedical applications: a review," *Polymer International.*, vol. 50, pp. 1279-1287, 2001.
- [5] S. Beaudoin M. Farrell, "Surface forces and protein adsorption on dextran- and polyethylene glycol-modified polydimethylsiloxane," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 81, pp. 468-75, 2010.
- [6] K. Stappaerts, W. Boeckx, B. Van den Hof E. Van den Kerckhove, "Silicones in the rehabilitation of burns: a review and overview," *Burns*, pp. 205-214, 2001.
- [7] S.B. Hardy, M. Spira, S.W. Law F.J. Gerow, "Immersion treatment for burns: an experimental study," *Surgical forum*, vol. 14, pp. 32-35, 1963.
- [8] S.B. Hardy, M. Spira J. Miller, "Treatment of burns of the hand with silicone dressing and early motion: preliminary report," *The Journal of Bone and Joint Surgery*, vol. 47, no. 5, pp. 938-943, 1965.
- [9] J.H. Evans, J.M. Courtney, J.D.S. Gaylor, W.H. Reid K.J. Quinn, "Non pressure treatment of hypertrophic scars," *Burns*, vol. 12 , pp. 102-108, 1985.
- [10] S. Taylor, D. Gyger, A. Lironi, B. Genin, A. Vunda, G. La Scala, J. Birraux, C. Le Coultre Ph. Bugmann, "A silicone-coated nylon dressing reduces healing time in burned paediatric patients ," *Burns*, vol. 24, pp. 609-612, 1998.
- [11] B.G. Auner C. Valenta, "The use of polymers for dermal and transdermal delivery," *Europ. J. Pharm. Biopharmaceutics* , vol. 58, pp. 279-289, 2004.
- [12] B. Krajewska, T. Hanke, R. Born, S. Heinemann, C. Knieb, H. Worsh H. Ehrlich, "Chitosan membrane as a template for hydroxyapatite crystal growth in a model dual membrane diffusion system," *Journal of Membrane Science* , vol. 273, pp. 124-128, 2006.
- [13] X.-W. Shi, Y.-M. Du, Y.-F. Tang T. Li, "Quaternized chitosan/alginate nanoparticles for protein delivery," *J Biomedical Materials Research, Part A*, vol. 83, no. 2, pp. 383-390, 2007.
- [14] Ioannis V. Yannas, "Multilayer membrane useful as synthetic skin," US4060081, 1977.
- [15] Q. Wei, X. Wang, W. Xu F. Huang, "Dynamic contact angles and morphology of PP fibers treated with plasma," *Polymer Testing* , vol. 25, pp. 22-27, 2006.

- [16] R. Morent, C. Leys, L. Gengembre, and E. Payen N. de Geyter, "Treatment of polymer films with a dielectric barrier discharge in air, helium and argon at medium pressure," *Surface & Coatings Technology*, vol. 201, pp. 7066-7075, 2007.
- [17] D. Xu, S. Yang, C. Liu C. Bao, "Microstructures and electrical properties of polypropylene bombarded by pulsed high energy density plasma," *Materials Chemistry and Physics*, vol. 163-165, p. 1999, 61.
- [18] Y. Jung, and S. J. Park S. Kim, "Preparation and electrochemical behaviors of platinum nanocluster catalysts deposited on plasma-treated carbon nanotube supports," *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, vol. 189, pp. 313-314, 2008.
- [19] P. Choi, H. Efstathiadis, and P. Haldar O. Paschos, "Synthesis of platinum nanoparticles by aerosol assisted deposition method," *Thin Solid Films*, vol. 516, pp. 3796-3801, 2008.
- [20] P. Sajdl, J. Pavlík, P. Malinský, M. Slouf A. Macková, "RBS, XPS, and TEM study of metal and polymer interface modified by plasma treatment," *Vacuum*, vol. 82, pp. 307-310, 2008.
- [21] M. J. Walzak, B. Berno, and N. S. McIntyre H. Y. Nie, "Atomic force microscopy study of polypropylene surfaces treated by UV and ozone exposure: modification of morphology and adhesion force," *Applied Surface Science*, vol. 144-145, pp. 627-632, 1999.
- [22] F. Orsini, A. Raffaele-Addamo, C. Riccardi, E. Selli G. Poletti, "Cold plasma treatment of PET fabrics: AFM surface morphology characterization," *Applied Surface Science*, vol. 219, pp. 311-316, 2003.
- [23] Francisco Yubero, José Cotrino, Leopoldo Contreras, Angel Barranco, Agustín R. González-Elipse Carmen López-Santos, "Formation of Nitrogen Functional Groups on Plasma Treated DLC," *Plasma processes and polymers*, vol. 6, pp. 555-565, 2009.
- [24] E. Selli, R. Barni, C. Riccardi, F. Orsini, G. Poletti, L. Meda, M. Massafra, B. Marcandalli A. Raffaele-Addamo, "Cold plasma-induced modification of the dyeing properties of poly(ethylene terephthalate) fibers," *Applied Surface Science*, vol. 252, pp. 2265-227, 2006.
- [25] Leanne Britcher, Sunil Kumar, Hans J. Griesser Kim Shyong Siow, "Plasma Methods for the Generation of Chemically Reactive Surfaces for Biomolecule Immobilization and Cell Colonization," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 3, pp. 392-418, 2006.
- [26] Amelia Sparavigna Rory Wolf, "Role of Plasma Surface Treatments on Wetting and Adhesion," *Engineering*, vol. 2, pp. 397-402, 2010.
- [27] Amanda A Gosman James F. Thornton, "Skin grafts and skin substitutes," *Selected Readings in Plastic Surgery*, vol. 10, pp. 1-23, 2004.
- [28] Palao R, Vernetta O. Gómez P, "Tratamiento de las quemaduras en el siglo XXI desde la cirugía," *Cirugía Plástica Ibero-latinoamericana*, vol. 28, p. 69, 2002.
- [29] James Stuart L. James S. Elizabeth Shevchenko Rostislav V., "A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction," *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 7, no. 43, pp. 229-258, 2010.

- [30] W. Quinby, C. Bondoc, A. Cosimi, P. Russell and S. K. Szyfelbein J. F. Burke, "Immunosuppression and temporary skin transplantation in the treatment of massive third degree burns," *Annals of Surgery*, vol. 182, no. 3, pp. 183–197, 1975.
- [31] I. Páez-Franco, S. Jiménez-González, K. Miguel-Jaimes, G. Foncerrada-Ortega, A. Sánchez-Flores, N. González-Contreras, N. Albores-de la Riva, V. Nuñez-Luna L. Moctezuma-Paz, "Epidemiología de las quemaduras," *Revista de Especialidades Médico Quirúrgicas*, vol. 20, pp. 78-82, 2015.
- [32] Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2013) Instituto Nacional de Estadística y Geografía. [fecha de consulta: Diciembre 2013, En línea]. <http://www.inegi.org.mx/>
- [33] Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (2014) Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. [fecha de consulta: Noviembre 2014, En línea]. <http://www.sinave.gob.mx/>
- [34] Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados del Instituto Nacional de Rehabilitación. (2014) Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados. [fecha de consulta: Noviembre 2014, En línea]. <http://www.inr.gob.mx>
- [35] Roglic G., Green A., Sicree R., King H. Wild S., "Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030," *Diabetes Care* , vol. 27, pp. 1047-1053, 2004.
- [36] International Diabetes Federation, *IDF Diabetes Atlas*, 5th ed.: Brussels Belgium: International Diabetes Federation , 2011.
- [37] CONAPO. (2012) Consejo Nacional de Poblacion. [fecha de consulta: Enero 2013, En línea]. <http://www.conapo.gob.mx/>
- [38] ENSANUT. (2012) Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. [fecha de consulta: Enero 2013, En línea]. <http://ensanut.insp.mx/>
- [39] Kirsner S., Vileikyte L. Boulton J., "Neuropathic diabetic foot ulcers," *The New England Journal of Medicine*, vol. 351, pp. 48-55, 2004.
- [40] Boulton A., "The diabetic foot: a global view," *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* , vol. 16, pp. 2-5, 2000.
- [41] Irkowska A., "Care of patients with the diabetic foot syndrome based on an international consensus," *Casopis Lékaru Českých*, vol. 140, pp. 230-233, 2001.
- [42] Reiber G, Sanders L, Janisse D, Pogach L. Mayfield J, "Technical Review: Preventive foot care in people with diabetes," *Diabetes Care*, vol. 21, pp. 2161-2177, 1998.
- [43] Got I., "Necessary multidisciplinary management of diabetic foot," *Journal des Maladies Vasculaires*, vol. 26, pp. 130-134, 2001.
- [44] Secretaria de Salud. (2014) Secretaria de Salud. [fecha de consulta: Noviembre 2014, En línea]. <http://portal.salud.gob.mx>

- [45] Marston W., Armstrong D. Wu S., "Wound care: the role of advanced healing technologies," *Journal of the American Podiatric Medical Association*, vol. 100, pp. 385-394, 2010.
- [46] McDonnell J., Verboom P., Lovas K., Kalo Z. Redekop W., "The cost effectiveness of Apligraf treatment of diabetic foot ulcers," *Pharmacoeconomics*, vol. 21, pp. 1171-1183, 2003.
- [47] Choudhary S., Escandon J., Tang J., Lebrun E., Kirsner R. Vivas A., "New therapies in treatment of diabetic foot ulcers: a review of clinical trials," *Surgical Technology International*, vol. 20, pp. 83-96, 2010.
- [48] Föhn M. and Bannasch H., "Artificial skin," *Methods in Molecular Medicine*, vol. 140, pp. 167–82, 2007.
- [49] Kumar T.R. and Baby M. Balasubramani M., "Skin substitutes: a review," *Burns*, vol. 27, pp. 534–44, 2001.
- [50] Robson M.C., Heggors J.P., Phillips L.G., Smith D.J. Jr, McCollum M.C. McHugh T.P., "Therapeutic efficacy of Biobrane in partial- and full-thickness thermal injury.," *Surgery*, vol. 100, pp. 661-664, 1986.
- [51] Rogers A., Karpinski R.H. Feldman D.L., "A prospective trial comparing Biobrane, DuoDERM and Xeroform for skin graft donor sites," *Surgery, gynecology & obstetrics*, vol. 173, pp. 1-5, 1991.
- [52] Beasley R.W., Smith J.W., Grabb W.C., Aston S.J. Thorne C., *Grabb & Smith's Plastic Surgery*, 7th ed.: Lippincott Williams & Wilkins, 1997.
- [53] Nadire K.B., Busto P., Tubo R., McPherson J.M., Wentworth B.M. Wright K.A., "Alternative delivery of keratinocytes using a polyurethane membrane and the implications for its use in the treatment of full-thickness burn injury," *Burns* , vol. 24, pp. 7-17, 1998.
- [54] Pittasch D., Muhlen I., Lehnert H. Lobmann R., "Autologous human keratinocytes cultured on membranes composed of benzyl ester of hyaluronic acid for grafting in nonhealing diabetic foot lesions: a pilot study," *Journal of Diabetes and its Complicationss* , vol. 17, pp. 199-204, 2003.
- [55] Mozingo D.W., Kealey G.P. Hansbrough J.F., "Clinical trials of a biosynthetic temporary skin replacement, Dermagraft- Transitional Covering, compared with cryopreserved human cadaver skin for temporary coverage of excised burn wounds," *Journal of Burn Care & Rehabilitation*, vol. 18, pp. 43-51, 1997.
- [56] Moreno C. Sheridan R.L., "Skin substitutes in burns," *Burns*, vol. 27, no. 1, p. 92, 2001.
- [57] Boc S.F., Lopez R.C. Brigido S.A., "Effective management of major lower extremity wounds using an acellular regenerative tissue matrix: a pilot study," *Orthopedics*, vol. 27, pp. 145-149, 2004.
- [58] Flasz M., Johnson P.A., Roberts J.S., Kemp P. Boyd M., "Integration and persistence of an investigational human living skin equivalent (ICX-SKN) in human surgical wounds," *Regenerative Medicine*, vol. 2, pp. 369-376, 2007.

- [59] Falabella A.F., Eaglstein W.H. Bello Y.M., "Tissue-engineered skin. Current status in wound healing ," *American Journal of Clinical Dermatology*, vol. 2, pp. 305-313, 2001.
- [60] Kirsner R.S. Trent J.F., "Tissue engineered skin: Apligraf, a bi-layered living skin equivalent ," *International Journal of Clinical Practice*, vol. 52, pp. 408-413, 1998.
- [61] Glat P., Silverstein P., Griswold J., Mozingo D. Still J, "The use of a collagen sponge/living cell composite material to treat donor sites in burn patients," *Burns* , vol. 29, pp. 837-841, 2003.
- [62] Burd A. Chiu T., "'Xenograft" dressing in the treatment of burns," *Clinics in Dermatology*, vol. 23, pp. 419-423, 2005.
- [63] Khoo T.L., Shah J.M. Halim A.S, "Biologic and synthetic skin substitutes: An overview ," *Indian Journal of Plastic Surgery*, vol. 43, pp. 23-28, 2010.
- [64] Rapp M., Hartmann H., Hierlemann H., Planck H., Dittel K.K. Uhlig C., "Suprathel-An innovative, resorbable skin substitute for the treatment of burn victims ," *Burns* , vol. 33, pp. 221-229, 2007.
- [65] Compton D.W., Bornhoeft J. Banes A.J., "Biologic, biosynthetic, and synthetic dressings as temporary wound covers: a biochemical comparison," *Journal of Burn Care & Rehabilitation*, vol. 7, pp. 96-104, 1986.
- [66] Pierschbacher M.D., Amodeo M.F., Malaney T.I., Glass J.R. Grzesiak J.J., "Enhancement of cell interactions with collagen/glycosaminoglycan matrices by RGD derivatization," *Biomaterials*, vol. 18, pp. 1625-1632, 1997.
- [67] McPherson M., Longaker M.T. Stern R., "Histologic study of artificial skin used in the treatment of full-thickness thermal injury," *Journal of Burn Care & Rehabilitation* , vol. 11, pp. 7-13, 1990.
- [68] Gabriel A., Bennett.DC. Komorowska-Timek E., "Artificial dermis as an alternative for coverage of complex scalp defects following excision of malignant tumors," *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 115, pp. 1010-1017., 2005.
- [69] Berger A.C., Mailaender P. Machens H.G., "Bioartificial skin," *Cells Tissues Organs*, vol. 167, pp. 88-94, 2000.
- [70] Straus F.H. 2nd, Lee R.C. Orgill D.P., "The use of collagen-GAG membranes in reconstructive surgery," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 888, pp. 233-248, 1999.
- [71] Potokar T., Price P. Nguyen Dai, "An objective long-term evaluation of Integra (a dermal skin substitute) and split thickness skin grafts, in acute burns and reconstructive surgery," *Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries*, vol. 36, pp. 23-28, 2010.
- [72] Yannas I.V., Quinby W.C. Jr, Bondoc C.C. and Jung W.K. Burke J.F., "Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury," *Annals of Surgery*, vol. 194, pp. 413-28, 1981.

- [73] Luterman A., Burke J., Cram A., Herndon D., Hunt J., Jordan M., McManus W., Solem L., Warden G. and Zawacki B. Heimbach D., "Artificial dermis for major burns. A multi-center randomized clinical trial," *Annals of Surgery*, vol. 208, pp. 313-20, 1988.
- [74] R. Bugdahl, O. Rollman, B.R. Johansson and M.S. Ågren U. Mirastschijski, "Epithelial regeneration from bioengineered skin explants in culture," *British Journal of Dermatology*, vol. 154, pp. 42-49, 2006.
- [75] D.L. Chester and R.P.G. Papini, "Skin and skin substitutes in burn management," *Trauma*, vol. 6, pp. 87-99, 2004.
- [76] T.L. Khoo, J.M. Shah A.S. Halim, "Biologic and synthetic skin substitutes: An overview," *Indian J Plastic Surgery*, vol. 43, pp. 23-28, 2010.
- [77] N. Majcen, M. J. Snowden, J. C. Mitchell, B. Voncina V. J. Cornelius, "Preparation of SMART wound dressings based on colloidal microgels and textile fibres," in *SPIE International Symposium on Smart Materials, Nano- and Micro-Smart Systems*, Adelaide, Australia, 22 December 2006, p. 6413.
- [78] K. O'Connor, R. Seeram R. P. Babu, "Current progress on biobased polymers and their future trends," *Progress in Biomaterials*, vol. 2, pp. 1-16, 2013.
- [79] S. V. Sankpal, K. R. Jadhav, V. J. Kadam S. V. Sawant, "Hydrogel as drug delivery system," *Research Journal of Pharmacy and Technology*, vol. 5, pp. 561-569, 2012.
- [80] F. C. Popescu, C. J. Busuioc, H. Pârvanescu, I. Lascar G. D. Mogosanu, "Natural products locally modulators of the cellular response: therapeutic perspectives in skin burns," *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, vol. 53, pp. 249–262, 2012.
- [81] J. J. Elsner M. Zilberman, "Antibiotic-eluting medical devices for various applications," *Journal of Controlled Release*, vol. 130, pp. 202-215, 2008.
- [82] J. C. Kerihuel, "Effect of activated charcoal dressings on healing outcomes of chronic wounds," *Journal of Wound Care*, vol. 19, pp. 208, 210–212, 214–215, 2010.
- [83] I. V. Reshetov T. N. Yudanova, "Modern wound dressings: manufacturing and properties," *Pharmaceutical Chemistry Journal*, vol. 40, pp. 85–92, 2006.
- [84] S. Saraf, A. Vyas, V. Jain, D. Singh M. R. Singh, "Innovative approaches in wound healing: trajectory and advances," *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, vol. 41, pp. 202-212, 2013.
- [85] O. Singh, S. Arora, R. S. R. Murthy T. Garg, "Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery," *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, vol. 29, pp. 1-63, 2012.
- [86] M. Naghibzadeh, "Nanofibers for skin regeneration," *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, vol. 26, pp. 86-102, 2012.
- [87] N. Kalarikkal R. Augustine, "Advancement of wound care from grafts to bioengineered smart skin substitutes," *Progress in Biomaterials*, vol. 3, pp. 103-113, 2014.

- [88] Hocker H. Klee D., *Polymers for Biomedical Applications: Improvement of the Interface Compatibility Advances in Polymer Science*. Berlin: Springer Verlag, 2000.
- [89] Tirrell D. A. Langer R., "Designing materials for biology and medicine," *Nature*, vol. 428, pp. 487-492, 2004.
- [90] Chen J. Y., Wang L. P., Huang N. Chu P. K., "Plasma-surface modification of biomaterials," *Materials Science & Engineering, R: Reports*, vol. R36, pp. 143-206, 2002.
- [91] Ratner B. D. Castner D. G., "Biomedical surface science: Foundations to frontiers," *Surface Science*, vol. 50, pp. 28-60, 2002.
- [92] Malmsten M., *Biopolymers at Interfaces: Second Edition, Revised and Expanded*, 2nd ed.: Marcel Dekker, 2003.
- [93] Lejeune M., Papadopoulou-Bouraoui A., Hasiwa M. Bretagnol F., "Fouling and non-fouling surfaces produced by plasma polymerization of ethylene oxide monomer," *Biomaterialia*, vol. 2, pp. 165-172, 2006.
- [94] Timmons R. B., Jen J. S., Molock F. E. Wu Y. L. J., "Non-fouling surfaces produced by gas phase pulsed plasma polymerization of an ultra low molecular weight ethylene oxide containing monomer," *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, vol. 18, pp. 235-248, 2000.
- [95] Edelman E. R. Balcells M., "Effect of pre-adsorbed proteins on attachment, proliferation, and function of endothelial cells," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 191, pp. 155-161, 2002.
- [96] Dahmen C., Kessler H. Hersel U., "RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond," *Biomaterials*, vol. 24, pp. 4385-4415, 2003.
- [97] Kasemo B., "Biological surface science," *Surface Science*, vol. 500, pp. 656-677, 2002.
- [98] Jo S., Mikos A. G. Shin H., "Biomimetic materials for tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 24, pp. 4353-4364, 2003.
- [99] Boccaccio C., Trusolino L. Comoglio P. M., "Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 15, pp. 565-571, 2003.
- [100] Saltzman W. M. Tan J., "Biomaterials with hierarchically defined micro- and nanoscale structure," *Biomaterials*, vol. 25, pp. 3593-3601, 2004.
- [101] Yan L., Altman M., Lasse M., Nugent H., Frankel F., Lauffenburger D. Zhang S., "Biological surface engineering: a simple system for cell pattern formation," *Biomaterials*, vol. 20, pp. 1213-1220, 1999.
- [102] Kokkoli E., Biesalski M. Tirrell M., "The role of surface science in bioengineered materials," *Surface Science*, vol. 500, pp. 61-83, 2002.
- [103] Graf K. Bonaccorso E., "Nanostructuring effect of plasma and solvent treatment on polystyrene," *Langmuir*, vol. 20, pp. 11183-11190, 2004.

- [104] Reichert W. M. Blawas A. S., "Protein patterning," *Biomaterials*, vol. 19, pp. 595-609, 1998.
- [105] Hoffman A. S., Schoen F. J., Lemons J. E. Ratner B. D., *Biomaterials Science*, 2nd ed.: Elsevier Academic Press, 2004.
- [106] Zhang Z. H., Knoll W. Forch R., "Soft plasma treated surfaces: Tailoring of structure and properties for biomaterial applications," *Plasma Processes and Polymers* , vol. 2, pp. 351-372, 2005.
- [107] Schroder K. Ohi A., "Plasma-induced chemical micropatterning for cell culturing applications: a brief review," *Surface and Coatings Technology* , vol. 116-119, pp. 820-830, 1999.
- [108] S., Wertheimer M., Yahia L. Lerouge, "Plasma Sterilization: A review of parameters, mechanisms, and limitations," *Plasmas and Polymers* , vol. 6, pp. 175-188, 2001.
- [109] Britcher L. Kumar S., Griesser H. J. Siow K. S., "Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization - A review," *Plasma Processes and Polymers* , vol. 3, pp. 392-418, 2006.
- [110] Davidson M. R., Bradley, R. H. Mitchell S. A., "Improved cellular adhesion to acetone plasma modified polystyrene surfaces," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 281, pp. 122-129, 2005.
- [111] F. Denes, "Synthesis and surface modification by macromolecular plasma chemistry," *Trends in Polymer Science (Cambridge, United Kingdom)*, vol. 5, pp. 23-31, 1997.
- [112] Yasuda H., *Plasma Polymerization*. New York: Academic Press, 1985.
- [113] J. Borjas, *Estudio de la modificación superficial de nanofibras de carbón mediante plasma de etileno para la obtención de nanocompuestos de polietileno/nanofibras de carbón*. (Tesis de maestría): Centro de Investigación en Química Aplicada, Saltillo, 2012.
- [114] M.C. Chan, *Polymer surface modification and characterization*. pp. 235-253 Cincinnati: Hanser/Gardner, 1994.
- [115] T. M. Ko, H. Hiraoka C. M. Chan, "Polymer surface modification by plasmas and photons," *Surface Science Reports*, vol. 24, pp. 1-54, 1996.
- [116] Y. P. Raizer. Springer Verlag, *Industrial plasma engineering: applications (vol. 2)*., J. Reece Roth, Ed. Berlin: Institute of Physics Publishing Ltd, 1997.
- [117] A. Perea, J. A. Chaos, J. Gonzalo, C. N. Afonso F. J. Gordillo-Vázquez, "Temporal and spatial evolution of the electronic density and temperature of the plasma produced by laser ablation of linbo3 ," *Applied Physics Letters* , vol. 8, pp. 7-9 , 2001.
- [118] J. M. Albella F. J. Gordillo-Vázquez, "Distinct nonequilibrium plasma chemistry of c2 affecting the synthesis of nanodiamond thin films from C2H2(1%)/H2/AR-rich plasmas," *Journal of Applied Physics*, vol. 94, pp. 6085- 6090, 2003.

- [119] M. Di Stanislao, S. Carrà C. Cavallotti, "Interplay of physical and chemical aspects in the pecvd and etching of thin films," *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* , vol. 48/49, pp. 123-165, 2005.
- [120] O. G. León, I. Montero, *Diseño de investigaciones*. (2<sup>a</sup> ed.). Madrid: McGraw-Hill, 1997.
- [121] H. Yasuda, *Chemical vapor deposition and interface engineering*. New York: Marcel Dekker, 2004.
- [122] J. Bryjak, M. Bryjak, G. Pozniak, W. Tylus I. Gancarz, "Plasma modified polymers as a support for enzyme immobilization 1: Allyl alcohol plasma.," *European Polymer Journal*, vol. 39, no. 8, pp. 1615-1622, 2003.
- [123] C. Pintassilgo, T. Czerwiec, G. Henrion, V. Hody, J. Thiebaut J.M. Loureiro T. Belmonte, "Oxygen plasma surface interaction in treatments of polyolefines," *Surface and Coatings Technology*, vol. 200, pp. 26-30, 2005.
- [124] M. Tatoulian, F. Bretagnol, O. Bouloussa, F. Rondelez F. Arefi-Khonsari, "Processing of polymers by plasma technologies," *Surface and Coatings Technology*, vol. 200, pp. 14-20, 2005.
- [125] H.A. StJohn, J. Bi, P. Zientek, R.C. Chatelier, H.J. Griesser L. Dai, "Biomedical coatings by the covalent immobilization of polysaccharides onto gas-plasma-activated polymer surfaces," *Surface and Interface Analysis* , vol. 29, pp. 46-55, 2000.
- [126] E. Uchida, E. Kang, Y. Uyama, Y. Ikada K. Kato, "Polymer surface with graft chains," *Progress in Polymer Science* , vol. 28, pp. 209-259, 2003.
- [127] N. Rhodes, R. Williams D. Wilson, "Surface modification of a segmented polyetherurethane using a low-powered gas plasma and its influence on the activation of the coagulation system ," *Biomaterials*, vol. 24, pp. 5069-5081, 2003.
- [128] D. Wilson, N. Rhodes R.L. Williams, "Stability of plasma-treated silicone rubber and its influence on the interfacial aspects of blood compatibility," *Biomaterials*, vol. 25, pp. 4659-4673, 2004.
- [129] T. Tzvetkova-Chevolleau, S. Decossas, P. Tracqui, P. Schiavone D. Fuard, "Optimization of poly-di-methyl-siloxane (PDMS) substrates for studying cellular adhesion and motility," *Microelectronic Engineering*, vol. 85, pp. 1289–1293, 2008.
- [130] J. M. Rees, S. Bashir, W. B. Zimmerman M. Bashir, "Characterization of atmospheric pressure microplasma produced from argon and a mixture of argon–ethylenediamine," *Physics Letters A*, vol. 378, pp. 2395–2405, 2014.
- [131] J. H. Cha, M. K. Han, C. S. Ha, D. H. Kim, H. J. Lee, H. J. Lee K. S. Seo, "Surface treatment of glass and poly(dimethylsiloxane) using atmospheric-pressure plasma jet and analysis of discharge characteristics," *Japanese Journal of Applied Physics*, vol. 54, p. 01AE06, 2014.

- [132] P. Puntambekar, A. Shaw, Y. Liu, F. Iza, "Cold atmospheric-pressure plasma treatment for promotion of cell adhesion onto PDMS substrates," Presented at: *Plasmas, surfaces and thin films*: Early career researchers meeting, Loughborough University, 17th June 2015.
- [133] A. Tserepi, V. Constantoudis, N. Vourdas, G. Boulousis, M. Vlachopoulou, A. Tsougeni, D. Kontziampasis E. Gogolides, "Method for the fabrication of periodic structures on polymers using plasma processes ," US8951428 B2, 2015.
- [134] C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, E. Bucio H. I. Melendez-Ortiz, "Grafting of N-vinyl caprolactam and methacrylic acid onto silicone rubber films for drug-eluting products," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 132, p. 41855, 2015.
- [135] R. Rauti, J. Laishram, A. Turco, D. Lonardoni, T. Nieus, M. Prato, D. Scaini, L. Ballerini S. Bosi, "From 2D to 3D: novel nanostructured scaffolds to investigate signalling in reconstructed neuronal networks," *Scientific Reports*, vol. 5, 2014.
- [136] Jason Habermehl, Marie-France Coté, Charles J. Doillon, Diego Mantovani Navneeta Rajan, "Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications," *Nature Protocols* , vol. 1, pp. 2753-2758, 2007.
- [137] S.T. Khew, E.S. Yew, D.I. Zeugolis, "Electro-spinning of pure collagen nano-fibres - Just an expensive way to make gelatin?," *Biomaterials* , vol. 29 pp. 2293-2305, 2008.
- [138] A. Avila-Ortega, J. Morales, J. Cervantes and R. Olayo J. López-Barrera, "Surface modification of quarry stone by hexamethyldisiloxane plasma treatment," *Applied Organometallic Chemistry* , vol. 21, pp. 858-861 , 2007.
- [139] J.Y. Rauch, C. Khan-Malek D. Bodas, "Surface modification and aging studies of addition-curing silicone rubbers by oxygen plasma," *European Polymer Journal* , vol. 44, pp. 2130–2139, 2008.
- [140] J. V. Cauich-Rodríguez S. Hemmilä, "Rapid, simple, and cost-effective treatments to achieve long-term hydrophilic PDMS surfaces," *Applied Surface Science* , vol. 24, pp. 9864-9875, 2012.
- [141] A. Janotta C. Dahmen, "Surface functionalization of amorphous silicon and silicon suboxides for biological applications," *Thin Solid Films* , vol. 427, pp. 201–207, 2003.
- [142] Laemmli U. K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, pp. 680-685, 1970.
- [143] L. Foucat, J. Renou A. Rochdi, "NMR and DSC studies during thermal denaturation of collagen," *Food Chemistry* , vol. 69, pp. 295–299, 2000.
- [144] R. Fernandez, J.M. Gomez-Rodriguez, J. Colchero, J. Gomez-Herrero, A.M. Baro I. Horcas, "A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology," *Review of Scientific Instruments*, vol. 78, p. 013705, 2007.

- [145] American Society for Testing and Materials, "Standard test method for tensile testing of thin plastic sheeting," American Society for Testing and Materials (ASTM), Philadelphia, Annual Books of ASTM Standards ASTM D882, Volume 08.01.
- [146] American Society for Testing and Materials, "Standard test method for peel resistance of adhesives (T-Peel Test)," American Society for Testing and Materials (ASTM), Philadelphia, Annual Books of ASTM Standards ASTM D1876, Volume 15.06.
- [147] E. Farsani S. Raissi, "Statistical Process Optimization Through Multi-Response Surface Methodology," *World Academy of Science, Engineering and Technology* , vol. 3, pp. 3-25, 2009.
- [148] U.K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage," *Nature*, vol. 227, pp. 680-685, 1970.
- [149] C. Piña-Barba, N. Rodríguez-Fuentes K. Gómez-Lizárraga, "Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón bovino ," *Superficies y Vacío* , vol. 24, pp. 137-140, 2011.
- [150] F. Johnston-Banks, *Gelatin. In: Food Gels*, P. Harris, Ed. London: Elsevier Applied Science.
- [151] A. Asadinezhad, J. Pacherník, M. Lehocký, I. Junkar, P. Humpolíček, P. Sáha and P. Valášek J. López García, "Cell Proliferation of HaCaT Keratinocytes on Collagen Films Modified by Argon Plasma Treatment," *Molecules* , vol. 15, pp. 2845-2856, 2010.
- [152] G. Gousspillou C. Petibois, "Analysis of type I and IV collagens by FT-IR spectroscopy and imaging for a molecular investigation of skeletal muscle connective tissue," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 386, pp. 1961-1966, 2006.
- [153] E.G. Bendit, E.R. Blout B.B. Doyle, "Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides ," *Biopolymers* , vol. 14, pp. 937-957, 1975.
- [154] S. Benjakul P. Singh, "Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)," *Food Chemistry*, vol. 124, pp. 97-105, 2011.
- [155] E. Mosler, E. Geerken, E. Knorz, H. Nemetschek-Gonsler, T. Nemetschek, M. Koch W.E. Folkhard, "Quantitative analysis of the molecular sliding mechanism in native tendon collagen - time-resolved dynamic studies using synchrotron radiation," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 9, pp. 169-175, 1986.
- [156] A.N. Lay, D.A. Dickerson, E.A. Nauman, G.A. Livesay, K.C. Dee E. Gentleman, "Mechanical characterization of collagen fibers and scaffolds for tissue engineering," *Biomaterials* , vol. 24, pp. 3805–3813, 2003.
- [157] D.L. Christiansen, R.A. Hahn, S.J. Shieh, J.D. Goldstein, F.H. Silver Y.P. Kato, "Mechanical properties of collagen fibres: a comparison of reconstituted and rat tail tendon fibres ," *Biomaterials* , vol. 10, pp. 38-42, 1989.
- [158] S. Fermani, E. Foresti, B. Parma, K. Rubini, M.C. Sidoti, N. Roveri G. Falini, "Films of self-assembled purely helical type I collagen molecules ," *Journal of Materials Chemistry* , vol. 14, pp. 2297-2302, 2004.

- [159] L. Bozec, M. A. Horton, P. Mesquida, M. Wenger, "Mechanical Properties of Collagen Fibrils," *Biophysical Journal*, vol. 93, pp. 1255-12-63, 2007.
- [160] C.J. French J.M. Gosline, "Elastic proteins: biological roles and mechanical properties," *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological*, vol. 357, pp. 121-132, 2002.
- [161] S. Benjakul M. Ahmad, "Extraction and characterisation of pepsinsolubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*)," *Food Chemistry*, vol. 120, pp. 817–824, 2010.
- [162] S. Benjakul, W. Visessanguan, T. Nagai, M. Tanaka P. Kittiphattanabawon, "Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*)," *Food Chemistry*, vol. 89, pp. 363–372, 2005.
- [163] J.Y. Rauch, C. Khan-Malek D. Bodas, "Surface modification and aging studies of addition-curing silicone rubbers by oxygen plasma," *European Polymer Journal*, vol. 44, pp. 2130-2139, 2008.
- [164] C. Cassinelli M. Morra, "Bacterial adhesion to polymer surfaces: A critical review of surfaces thermodynamic approach," *Journal of Biomaterial Science*, vol. 9, pp. 55-74, 1998.
- [165] U. Gedde H. Hillborg, "Hydrophobicity recovery of polydimethylsiloxane after exposure to corona discharges," *Polymer*, vol. 39, pp. 1991-1998, 1998.
- [166] M.K. Chaudhury, M.J. Owen, T. Orbeck J. Kim, "The mechanisms of hydrophobic recovery of polydimethylsiloxane elastomers exposed to partial electrical discharges," *Colloid and Interface Science*, vol. 244, pp. 200-207, 2001.
- [167] A. Kottantharayil, M. Kumar, S. Mukherji N. Maheshwari, "Long term hydrophilic coating on poly(dimethylsiloxane) substrates for microfluidic applications," *Applied Surface Science*, vol. 257, pp. 451-457, 2010.
- [168] H. Fairbrother, F. Reniers N. Vandencastelee, "Selected effect of the ions and the neutrals in the plasma treatment of PTFE surfaces: An OES-AFM-contact angle and XPS study," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 2, pp. 493-500, 2005.
- [169] M. J. Owen J. L. Fritz, "Hydrophobic recovery of plasma-treated polydimethylsiloxane," *Adhesion*, vol. 54, pp. 33-45, 1995.
- [170] C. Khan-Malek D. Bodas, "Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment -an SEM investigation," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 123, pp. 368–373, 2007.
- [171] M. Dhayal, S.M. Shivaprasad, S.C. Jain V. Sharma, "Surface characterization of plasma-treated and PEG-grafted PDMS for micro fluidic applications," *Vacuum*, vol. 81, pp. 1094-1100, 2007.
- [172] J. J. Bikerman, "The surface roughness and contact angle," *Journal of Physical Chemistry*, vol. 54, pp. 653-658, 1950.

- [173] W.T.S. Huck, K.E. Paul, G.M. Whitesides N. Bowden, "The controlled formation of ordered, sinusoidal structures by plasma oxidation of an elastomeric polymer," *Applied Physics Letters*, vol. 75, pp. 2557–2559, 1999.
- [174] H.T. Ng, S.F.Y Li D.B. Chua, "Spontaneous formation of complex and ordered structures on oxygen-plasma-treated elastomeric polydimethylsiloxane," *Applied Physics Letters*, vol. 76, pp. 721–723, 2000.
- [175] J. Ho, C. Chen, W. Whang T. Shih, "Topographic control on silicone surface using chemical oxidization method," *Applied Surface Science*, vol. 253, pp. 9381–9386, 2007.
- [176] T. Fujii C. Provin, "Reaction-diffusion phenomena in a PDMS matrix can modify its topography," *Lab on a Chip*, vol. 11, pp. 2948-2954, 2011.
- [177] O. Calvo, O. Fenollar, D. Garcia, R. Balart M.R. Sanchis, "Characterization of the surface changes and the aging effects of low-pressure nitrogen plasma treatment in a polyurethane film," *Polymer Testing*, vol. 27, pp. 75–83, 2008.
- [178] D. Tracy, S. Zheng, L. Xiaolua, S. Brown, W. VanDerveer, A. Entenberg, V. Vukanovic, G.A. Takacs, F.D. Egitto, L.J. Matienzo, F. Emmi J.X. Chen, "Photoetching and modification of poly(tetrafluoroethylene-co-hexafluoropropylene) polymer surfaces with vacuum UV radiation," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 79, pp. 399-404, 2003.
- [179] H. Arabi, A. Salem, S. Asiaban S. M. Mirabedini, "Effect of low-pressure O<sub>2</sub> and Ar plasma treatments on the wettability and morphology of biaxial-oriented polypropylene (BOPP) film," *Progress in Organic Coatings*, vol. 60, pp. 105-111, 2007.
- [180] U. Cvelbar, M. Lehocky I. Junkar, "Plasma treatment of biomedical materials," *Materials and Technology*, vol. 45, pp. 221-226, 2011.
- [181] S. Kirkhorn, K. Olafsen, K. Redford, A. Stori K. Johnsen, "Modification of polyolefin surfaces by plasma-induced grafting," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 59, pp. 1651–1657, 1996.
- [182] R.D. Short R.M. France, "Plasma treatment of polymers effects of energy transfer from an argon plasma on the surface chemistry of poly(styrene), low density poly(ethylene), poly(propylene) and poly(ethylene terephthalate)," *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, vol. 93, pp. 3173-3178, 1997.
- [183] X. Liub, Y. Zhuc Y. Yaoa, "Surface modification of high-density polyethylene by plasma treatment," *Journal of Adhesion Science and Technology*, vol. 7, pp. 63-75, 1993.
- [184] S. Roy, A. Bhowmick R.N. Santra, "Studies on miscibility of blends of ethylene methyl acrylate and polydimethyl siloxane rubber," *Polymer Engineering and Science*, vol. 33, pp. 1352-1359, 1993.
- [185] G. Sócrates, *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*, 3rd ed.: John Wiley & Sons, 2004.

- [186] A. Datta, J.M. Berg, S. Gangopadhyay S. Bhattacharya, "Studies on surface wettability of poly(dimethyl) siloxane (PDMS) and glass under oxygen-plasma treatment and correlation with bond strength," *Journal of Microelectromechanical Systems* , vol. 14, pp. 590–597, 2005.
- [187] I. Doi, C. de Menezes Atayde, "Highly stable hydrophilic surfaces of PDMS thin layer obtained by UV radiation and oxygen plasma treatments ," *Physica Status Solidi*, vol. 7, pp. 189–192, 2010.
- [188] M. W. Urban S. R. Gaboury, "Quantitative analysis of the Si-H groups formed on," *Polymer*, vol. 33, no. 23, pp. 5085–5089, 1992.
- [189] A. L. Smith E. D. Lipp, *The Analytical Chemistry of Silicones* , A L Smith, Ed. New York: Wiley, 1991.
- [190] B. Smith, *Infrared Spectral Interpretation*. Boca Raton: CRC, 1999.
- [191] I. Gancarz, W. Tylus K. Malecha, "Argon plasma-assisted PDMS–LTCC bonding technique for microsystem applications," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 20, no. 11, p. 115006, 2010.
- [192] J-Y. Rauch, C. Khan-Malek D. Bodas, "Surface modification and aging studies of addition-curing silicone rubbers by oxygen plasma ," *European Polymer Journal* , vol. 44, pp. 2130–2139, 2008.
- [193] D.K. McCluskey, C.K.L. Tan, M.C. Tracey I.D. Johnston, "Mechanical characterization of bulk Sylgard 184 for microfluidics and microengineering," *J. Micromechanics and Microengineering* 24 (2014) , vol. 24, p. 035017, 2014.
- [194] WTS Huck, KE Paul, GM Whitesides N Bowden, "The controlled formation of ordered, sinusoidal structures by plasma oxidation of an elastomeric polymer," *Applied Physics Letters* , vol. 75, pp. 2557-2559, 1999.
- [195] H. Saeki, S. Kimoto, T. Nishiwaki, N. Nishiyama. Y. Tanimoto, "Evaluation of adhesive properties of three resilient denture liners by the modified peel test method," *Acta Biomaterialia* , vol. 5, pp. 764–769, 2009.
- [196] P. S. Petrou, S. E. Kakabakos, A. Tserepi, E. Gogolides M. E. Vlachopoulou, "High-aspect-ratio plasma-induced nanotextured poly(dimethylsiloxane) surfaces with enhanced protein adsorption capacity ," *Journal of Vacuum Science & Technology B* , vol. 26, p. 2543, 2008.
- [197] A. Tserepi, P. S. Petrou, E. Gogolides, S. E. Kakabakos M. E. Vlachopoulou, "Protein arrays on high-surface-area plasma-nanotextured poly(dimethylsiloxane)-coated glass slides," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 83, pp. 270-276, 2011.
- [198] J. A. M. Ramshaw B. Brodsky, "The collagen triple-helix structure," *Matrix Biology*, vol. 15, pp. 545-554, 1997.
- [199] M. Eaton, B. Brodsky, H.M. Berman J. Bella, "Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution," *Science*, vol. 266, pp. 75-81, 1994.