



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

**MODIFICACIÓN SUPERFICIAL DE PELÍCULAS DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO), CON PLASMA DE ÁCIDO ACRÍLICO, PARA MEJORAR LA VIABILIDAD CELULAR DE FIBROBLASTOS**

**Tesis que presenta**

XIANEY MARÍA PASOS GONZÁLEZ

**En opción al título de**

MAESTRA DE CIENCIAS

(MATERIALES POLIMÉRICOS)

**Directores de tesis:**

Dr. José Manuel Cervantes Uc

Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes

Mérida, Yucatán, México

Febrero de 2021

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma:  \_\_\_\_\_

Nombre: Xianey María Pasos González

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



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Xianey María Pasos González** titulado “**Modificación superficial de películas de poli (ácido láctico), con plasma de ácido acrílico, para mejorar la viabilidad celular de fibroblastos**”, fue realizado en la Unidad de Materiales, línea de investigación en materiales para medicina regenerativa, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. José Manuel Cervantes Uc y co-dirección de la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes, y pertenece al Programa de Posgrado en Materiales Poliméricos de este Centro.

Atentamente



---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 26 de Febrero de 2021.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada (No. 873574) para la realización de esta investigación y al proyecto del CONACYT de la Convocatoria Ciencia Básica 2016 (No. 283972).

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY) y a la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), por permitirme realizar este proyecto dentro de sus instalaciones.

A mis directores de tesis, el Dr. José Manuel Cervantes Uc y la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes por el apoyo que me brindaron durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

A los integrantes de mi comité tutorial: Dr. Fernando Hernández Sánchez y al Dr. Juan Juárez Moreno por sus valiosas aportaciones para la mejora de esta tesis.

Al Dr. Alejandro Ávila Ortega por las facilidades brindadas para poder llevar a cabo este proyecto con el reactor de plasma, por su tiempo y paciencia a lo largo del proyecto.

Al Dr. Wilberth Antonio Herrera Kao y a la M.C. Rossana Vargas Faride por su apoyo durante las pruebas de caracterización y al trabajo en el laboratorio; y al Dr. Hugo Joel Carrillo Escalante por brindarme en todo momento su apoyo y conocimientos para el desarrollo de mi proyecto.

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a mi familia, por estar presente a lo largo de mi formación, por el apoyo tanto económico como emocional que me brindaron. Gracias a mis padres por apoyarme en mis sueños, por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas. Este logro no sería posible sin su amor.

A Karen porque tu ayuda ha sido de suma importancia, por estar a mi lado inclusive en los momentos y situaciones más difíciles, siempre apoyándome. No fue sencillo culminar con éxito este proyecto, sin embargo siempre obtuve tu motivación y cariño porque siempre supiste que lo lograría.

A Yauri y Zaire por el apoyo que siempre me brindaron día a día en el transcurso de cada año de la maestría, por estar siempre ahí apoyándome e impulsándome a ser mejor y a lograr o que me propongo en la vida, al igual que a Mateo y Thiago.

# CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES.....	5
JUSTIFICACIÓN.....	9
HIPÓTESIS .....	11
OBJETIVOS .....	12
Objetivo general.....	12
Objetivos específicos.....	12
1 MARCO TEÓRICO .....	13
1.1 Ingeniería tisular .....	13
1.2 Biomimetismo .....	14
1.3 Ejemplos de biomimetismo en la historia .....	16
1.4 Adherencia y proliferación celular sobre un material.....	17
1.4.1 Fases de la adhesión celular .....	17
1.5 Poli (ácido láctico), PLA.....	18
1.6 Modificación superficial por plasma .....	20
1.6.1 Modificación superficial por plasma con injertos de AA.....	22
2 PARTE EXPERIMENTAL .....	24
2.1 Materiales.....	24
2.2 Preparación de películas de PLA.....	24
2.3 Modificación superficial por plasma de películas de PLA.....	24
2.3.1 Activación con plasma de Argón.....	25
2.3.2 Injerto de ácido acrílico (AA).....	25
2.4 Caracterización fisicoquímica y morfológica de las películas tratadas. ....	26
2.4.1 Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR).....	26
2.4.2 Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS).....	26
2.4.3 Ángulo de contacto.....	26

2.4.4	Determinación en la densidad de injerto .....	27
2.4.5	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .....	28
2.4.6	Microscopía de fuerza atómica (AFM) .....	29
2.5	Evaluación biológica .....	29
2.5.1	Cultivo celular .....	29
2.5.2	Viabilidad celular .....	30
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
3.1	Modificación superficial por plasma en películas de PLA.....	31
3.1.1	Activación de la superficie con plasma de Argón .....	31
3.1.2	Plasma de ácido acrílico (AA).....	31
3.2	FTIR de las películas tratadas .....	32
3.3	Espectroscopía Fotelectrónica de Rayos-X .....	36
3.4	Ángulo de contacto .....	39
3.5	Energía superficial .....	40
3.6	Cuantificación de Ácidos Carboxílicos por el método TBO .....	41
3.7	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .....	44
3.8	Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).....	46
3.9	Viabilidad células de fibroblastos dérmicos sobre películas de PLA .....	49
	CONCLUSIONES .....	51
	RECOMENDACIONES PARA FUTUROS TRABAJOS.....	52
	REFERENCIAS .....	53

## Índice de Figuras

Figura 1.1 Tecnologías en las que se cimienta la ingeniería en tejidos [34].	14
Figura 1.2 a) Gotas de agua sobre hoja de loto. b) Piel de tiburón [37].	17
Figura 1.3 Fases de la adhesión celular [42].	18
Figura 1.4 Estructura del PLA.	19
Figura 1.5 Estructura del Ácido Acrílico (AA).	22
Figura 1.6 Polimerización por injerto del monómero AA [49].	23
Figura 3.1 Imagen del proceso de activación con plasma de argón.	31
Figura 3.2 Imagen del tratamiento con plasma de ácido acrílico.	32
Figura 3.3 Espectros FTIR de películas de PLA con y sin modificación superficial.	33
Figura 3.4. Espectros FTIR (región $3500-2700\text{ cm}^{-1}$ ) de películas de PLA con y sin modificación superficial.	34
Figura 3.5 Espectros FTIR (región $1800-1500\text{ cm}^{-1}$ ) de películas de PLA con y sin modificación superficial.	35
Figura 3.6 Espectros de reconocimiento de XPS de las películas de PLA tratadas con plasma de AA y sin tratamiento.	37
Figura 3.7 Ángulo de contacto de las películas de PLA sometidas a diferentes condiciones de plasma de AA.	39
Figura 3.8 Representación esquemática del complejo formado entre el TBO y películas de PLA tratadas con plasma de AA [98].	42
Figura 3.9 Concentración de COOH en películas de PLA sometido a diferentes tratamientos con plasma.	43
Figura 3.10 Cambios en el ángulo de contacto en relación con la concentración de COOH's obtenidos por TBO.	44
Figura 3.11 Ensayos de proliferación celular a 570 nm.	50



## Índice de Tablas

Tabla 3.1 Composición química en (%atómico) en la superficie de películas de PLA tratadas y sin tratar con plasma de Argón y AA. ....	38
Tabla 3.2 Energía superficial en películas de PLA bajo diferentes tratamientos con plasma. ....	41
Tabla 3.3 Imágenes SEM de las muestras de PLA tratadas con plasma de AA y sin tratamiento. ....	45
Tabla 3.4 Imágenes del AFM de las muestras de PLA modificadas con plasma. ....	47
Tabla 3.5 Rugosidad de las superficies de las muestras. ....	48

## RESUMEN

Con el fin de incrementar la afinidad celular del poli (ácido láctico), PLA, por los fibroblastos, en el presente trabajo se realizó la modificación superficial de películas de este polímero, mediante tratamientos con plasma. Para esto se injertó ácido acrílico (AA) sobre la superficie del PLA para mejorar la humectabilidad de las películas, así como su química superficial. Los tratamientos de modificación superficial se llevaron a cabo mediante un pretratamiento con plasma de argón (a 30 W y 3 min) para activar la superficie del material, y posteriormente se sometió a las películas de PLA a un tratamiento de plasma de ácido acrílico, variando tanto la potencia del plasma (20, 30 y 40 W) como el tiempo de exposición (2.5 y 5 min). Los cambios superficiales inducidos en las superficies de las películas fueron monitoreados mediante varias técnicas analíticas como FTIR, XPS, ángulo de contacto, entre otros. Los resultados obtenidos indican que, tanto la potencia del plasma, como el tiempo del tratamiento, producen un aumento en la humectabilidad de las películas reduciendo su ángulo de contacto. Los resultados de XPS revelaron un cambio en la química superficial y; los resultados de AFM arrojaron un aumento en la rugosidad de las películas de PLA. Aunque ambas variables influyen en el cambio de la química, la rugosidad y la hidrofilia de las películas, el tiempo de exposición es el que produjo el mayor impacto en las propiedades superficiales del material.

## **ABSTRACT**

In order to increase the affinity of fibroblast cells for poly (lactic acid), (PLA), in the present work the surface modification of this polymer was carried out by means of acrylic acid (AA) plasma treatments. In order to achieve this, a two-step surface treatment method was used which consisted of a pretreatment with argon plasma at 30 W for 3 minutes, to activate the material surface, and later submit the PLA films to an AA plasma treatment, varying the power plasma (20, 30 and 40 W) and time (2.5 and 5 min). The surface modification was monitored by different analytical techniques such as FTIR, XPS, and water contact angle, among others. The results indicated that the AA was grafted onto PLA films surface and, that both, the plasma power, and the treatment time increased the wettability of the films by reducing their contact angles. XPS results showed a change on the surface chemistry and AFM results exhibited an increase on the roughness of PLA films. Although both variables had influence on the chemistry surface, roughness and hydrophilicity of the films, exposure time had the highest impact on the material surface properties. On contrary, variables studied in this work (power and time) had no clear effect on fibroblast cell viability.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, los biomateriales se han consolidado en el campo de la medicina, causando el interés de investigadores de diferentes áreas. Recientemente se ha estudiado la interacción entre diferentes tipos de células con materiales biomédicos, debido a que los materiales compatibles con las células son de gran importancia en muchas aplicaciones biomédicas [1]. Cuando los materiales utilizados en medicina no son biocompatibles o bioactivos, se requiere la modificación superficial de éstos para que mejoren su desempeño *in vivo*. Una técnica utilizada para crear superficies compatibles con fluidos o tejidos humanos es la modificación química de superficies por la técnica de plasma [2]. El objetivo que se pretende alcanzar durante las modificaciones superficiales de los materiales es imitar la naturaleza del tejido u órgano a reemplazar (biomimetismo), con la idea de mejorar su desempeño y promover de esta manera su interacción con células y/o tejidos. Entre los materiales que se han utilizado para diversas aplicaciones biomédicas se encuentran los metales, los cerámicos y los polímeros; entre estos últimos destacan por su importancia la poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), el poli (ácido láctico) (PLA), el poli (láctico- co-glicólido) (PLGA) entre otros [3]. El caso del PLA, es interesante ya que, aunque está aprobado por la Agencia de Drogas y Alimentos (FDA) de Estados Unidos, presenta una pobre bioactividad, una energía superficial baja y una alta hidrofobia, lo que conduce a una poca afinidad celular y por lo tanto no promueve la regeneración de tejidos [4].

Para que las células puedan adherirse y proliferar en los materiales poliméricos, deben tomarse en cuenta varios aspectos físico-químicos de la superficie del material, como son: la humectabilidad (hidrofilia/hidrofobia de la superficie), su química, la carga eléctrica, la topografía, la rugosidad, la rigidez, etc., [1]; lo anterior, puede ser modulado a través de la introducción de grupos funcionales específicos en la superficie del polímero [5].

La modificación superficial por la técnica de plasma es un método utilizado para mejorar la biocompatibilidad de la superficie de un material, mientras mantiene intactas las propiedades volumétricas del mismo, tales como sus propiedades físicas, mecánicas y de biodegradabilidad [5]. El plasma es un gas ionizado que contiene iones positivos, electrones, átomos de gas neutros y moléculas con suficiente energía para reorganizar la estructura electrónica de las especies presentes en la superficie del material. Los radicales libres creados durante la activación en el tratamiento con plasma, pueden interactuar con las partículas un gas e injertar de esta manera nuevos grupos funcionales en la superficie

del polímero. Entre los grupos de naturaleza que pueden ser injertados para mejorar las propiedades de adhesión celular en polímeros se encuentran: los carboxilo (-COOH), hidroxilo (-OH), amina (-NH) [6]; y entre éstos, el grupo carboxilo es uno de los mejores grupos para la adhesión celular [5] [7].

El ácido acrílico (AA) es el ácido carboxílico insaturado más simple; se usa comúnmente en procesos de injerto para aumentar la adhesión celular, ya que actúa como un conector para unir proteínas al sustrato. El doble enlace carbono-carbono en la estructura química del AA se une fácilmente con el sustrato, conservando las propiedades físico-químicas del mismo [5].

Las condiciones que generalmente se varían en los tratamientos con plasma son el tipo y el flujo de gas, la presión de salida y el tiempo de exposición de la pieza. Este último parámetro es de especial interés ya que la sobreexposición del material al plasma puede generar la creación de capas de débil cohesión, perjudiciales para la adhesión [6].

Con el fin de incrementar la bioactividad de las películas de PLA en este trabajo se propone la modificación superficial por plasma del PLA con injertos de AA, variando el tiempo de exposición y la potencia del plasma. Los cambios en la superficie del sustrato se observarán por Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia Fotelectrónica de Rayos-X (XPS), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), ángulo de contacto, así como se determinará la densidad de grupos carboxilo obtenida en cada caso mediante la técnica de azul de o-toluidina (TBO). Así mismo, se realizará la evaluación biológica de las películas de PLA con fibroblastos, para determinar la interacción entre las células y el material a través de técnicas espectrofotométricas.

## ANTECEDENTES

El tratamiento con plasma utiliza generalmente gases no polimerizables como el Ar, N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, que conducen a la formación de grupos funcionales como hidroxilo, amino, amida, carboxilo, hidroperóxido y carbonilo. La presencia de estos grupos en la superficie de un material puede alterar la humectabilidad, la topografía, la morfología y la biocompatibilidad de las superficies poliméricas [8], [9].

El injerto inducido por plasma es un método bastante exitoso, que ha sido empleado para mejorar la biocompatibilidad de diferentes polímeros; algunos monómeros que se han utilizado para esto son el ácido acrílico, el ácido metacrílico y los monómeros de acrilamida [9]. Es importante mencionar que el injerto de grupos funcionales mediante tratamientos con plasma mantiene las modificaciones logradas por tiempos prolongados, en comparación con los resultados obtenidos mediante tratamientos con plasma de gases no polimerizables, en donde los cambios generados en la superficie son transitorios [10].

En 1998, Lee [11] estudió la adhesión de distintos tipos de células, sobre superficies poliméricas con diferentes gradientes de humectabilidad. El autor encontró que las células se adherían y proliferaban en la superficie del material con una hidrofiliidad moderada [11], [12]; así mismo, la adhesión máxima de las células apareció aproximadamente a un ángulo de contacto con el agua de 57° [11].

En 2004, Janorkar [13] injertó grupos de AA a películas de PLA previamente tratadas con plasma de oxígeno; dichas películas mostraron un aumento significativo en la hidrofilia del material ya que el ángulo de contacto disminuyó de 80° a 45°. Más tarde, Park (2007) [14] injertó AA sobre películas de PLA y observó una mejora en la bioactividad del material debido al aumento en la hidrofilia del material. El aumento en la hidrofilia del PLA con injertos de AA también fue confirmado más tarde por Yun Zhao *et al* [15].

En los trabajos en donde se injerta AA sobre diferentes materiales poliméricos, los resultados obtenidos varían considerablemente ya que han estudiado infinidad de parámetros como el tipo de material, la potencia. Gupta 2007 [8] injertó grupos de AA sobre un monofilamento de polipropileno y, el ángulo de contacto en agua pasó de 88° a 23°, para un grado de injerto de 42 µg/cm<sup>2</sup>; se concluyó que el ángulo de contacto disminuye a medida

que aumenta el grado de injerto. Estos resultados concuerdan con los trabajos de Tamada (1993), Gupta (2002) y Cheng (2004) [5], [16], [17].

Posteriormente, en 2012, Gupta llevó a cabo el injerto de AA sobre un monofilamento de PCL, con un pretratamiento con plasma de oxígeno. Ellos determinaron que la presencia de grupos carboxílicos polares (proporcionados por el ácido acrílico) modifica la superficie hidrófoba del PCL a una más hidrófila. Por otro lado, se observó que el grado de injerto aumentó con el incremento de la potencia y el tiempo de tratamiento sobre el monofilamento de PCL [18][19]. En estos estudios, el factor predominante en el grado de injerto fue el tiempo de tratamiento, observándose una reducción del ángulo de contacto y, por ende, un aumento en la humectabilidad, a mayores tiempos de exposición.

En lo que respecta a estudios biológicos, existen reportes sobre el comportamiento de las células en la superficie de los polímeros que han sido sometidos a tratamientos con plasma para injertar AA. Por ejemplo, en 2002, Mirzadeh [20] injertó grupos de AA, mediante tratamientos con plasma, sobre una superficie de poli (tereftalato de etileno) (PET), obteniendo un grado de injerto de 102  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Sus resultados también indicaron que la polimerización por injerto del AA redujo la adhesión de plaquetas y evitó la formación de trombos. En 2004, Cheng [5] modificó superficialmente una película delgada de PCL con injertos de AA. Ellos estudiaron las películas de PCL sin modificar y observaron poca adherencia y proliferación celular de fibroblastos dérmicos humanos en la superficie de la película de PCL. Así mismo, en las películas con injertos de AA no se observó la proliferación de fibroblastos y no se obtuvo un resultado detallado del comportamiento de las células sobre las películas con injertos de AA.

En 2010, Saxena [21] estudió el comportamiento celular de fibroblastos de ratón 3T3 suizos, sobre suturas de polipropileno injertadas con AA, obteniendo grados de injerto de 24  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  y 199  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de AA. La polimerización por injerto de AA sobre la superficie del polímero condujo a una drástica reducción en la adhesión y proliferación celular, particularmente con un grado de injerto de 199  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . El caso contrario ocurrió con la sutura correspondiente al grado de injerto de AA de 24  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , en donde se obtuvo adhesión y proliferación de las células. Gupta 2002 [17] obtuvo resultados similares a los de Saxena cuando estudió el comportamiento de células de músculo liso humano, sobre películas de PET modificadas superficialmente por plasma con injertos de AA. Observó que

las células se adhieren a la superficie de la película no modificada, pero su crecimiento fue muy lento. En contraste, en la superficie modificada con injertos de AA (con una densidad de  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), las células no muestran una tendencia a adherirse a la superficie y mueren rápidamente; se llegó a la conclusión de que los injertos de poli(ácido acrílico) en ciertas cantidades, resultan tóxicos para las células musculares lisas [17], [22].

Estudiando a fondo los trabajos previos, se pudo observar que al aumentar las concentraciones de los grupos funcionales pertenecientes al AA (carboxilos), se reduce el ángulo de contacto, aumenta la energía superficial, se modifica la topografía del polímero y aumenta la densidad de injerto sobre el material; sin embargo, la mayoría de estos trabajos enfocan sus esfuerzos en injertar grandes cantidades de AA sobre la superficie (como si esto garantizara a priori una mayor adhesión y proliferación celular) y son pocos los estudios que reportaron los efectos del plasma de AA en pequeñas concentraciones.

Detomaso (2005) [23], [24] estudió el comportamiento celular de fibroblastos sobre superficies modificadas con plasma de ácido acrílico. El autor reporta una buena adherencia y proliferación celular sobre películas de poliestireno (PS) injertadas con plasma de AA, con una baja densidad de grupos carboxílicos. Además, postuló que los fibroblastos tienen una marcada tendencia a migrar e interactuar con las superficies modificadas con AA y sugiere la posibilidad de usar estas superficies para aplicaciones donde se necesiten interacciones de sustrato celular definidas. Así mismo, menciona la problemática de encontrar una clara correlación cuantitativa entre la densidad de ciertos grupos químicos en la superficie y el comportamiento celular, ya que existen factores como la estabilidad, morfología y humectabilidad que afectan la adhesión de proteínas en las superficies y el comportamiento de las células adheridas en dicha capa de proteínas.

Un estudio que sustenta la hipótesis de Detomaso (2005) fue el desarrollado por Gupta 2001 [19], quien estudió el comportamiento de las células sobre películas con injertos de AA inducidos por plasma; el estudio menciona que existe una correlación entre el grado de injerto del AA en pequeñas cantidades y la adhesión celular. El autor estudió el cultivo de células de músculo liso vesical sobre una superficie de PET modificada con ácido poliacrílico (PAA) y densidades de injerto de  $0.4$  y  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Se observó que con una concentración de  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de PAA, las células de músculo liso no se adhirieron y, por el contrario, hubo muerte celular. Por otro lado, en superficies con una densidad de injerto de



0.4  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de PAA, las células musculares lisas de la vejiga se adhirieron y crecieron hasta la confluencia (la cobertura de toda la superficie). Se concluyó que el exceso de concentración de AA pudo haber sido tóxico para las células y que la toxicidad dependía de la densidad de injerto de grupos carboxilo.

De la revisión bibliográfica anterior se tiene que la adhesión y proliferación de células sobre la superficie de un material depende de la morfología de la superficie, la humectabilidad y la concentración de los grupos funcionales [8], [10], [11], [20]–[22], [25], con una estrecha relación entre uno y otro. Esta idea será de suma importancia para el presente estudio, ya que se procurará encontrar una densidad de injerto que permita un grado de humectabilidad adecuada (ni muy hidrófobo ni muy hidrófilo), para propiciar que las células proliferen en la superficie del PLA, pero sin llegar a grados de injerto muy grandes, pues se corre el riesgo de dañar las células con un exceso de polímero injertado.

## JUSTIFICACIÓN

La ingeniería de tejidos (IT) es un área de investigación que se ha desarrollado rápidamente en los últimos treinta años, para tratar de desarrollar materiales que permitan la regeneración de tejidos y órganos en una variedad de aplicaciones como piel, hueso, tejido neural, tejido cardiovascular, entre otras. Para poder alcanzar el objetivo antes mencionado, se deben de resolver una infinidad de problemáticas asociadas a este campo del conocimiento. Uno de los principales problemas que debe ser resuelto, cuando cierto material es usado en el campo de la IT, es de la bioactividad. En este sentido, se ha encontrado que los materiales de origen natural presentan una bioactividad aceptable, pero poseen baja resistencia mecánica. Por otro lado, los materiales de origen sintético presentan excelente resistencia mecánica pero aún no se logra obtener una buena afinidad entre la célula y el material, por lo que continúan siendo objeto de investigación [26].

Por otro lado, a pesar de que el PLA es uno de los polímeros biodegradables más utilizado en aplicaciones biomédicas, debido a sus excelentes propiedades mecánicas, biodegradabilidad, biocompatibilidad y no toxicidad [27], éste posee una baja energía superficial, así como un ángulo de contacto con el agua relativamente alto (75–85); lo anterior conduce a una pobre citocompatibilidad y, en algunas ocasiones, causa inflamación como respuesta del tejido circundante por el contacto directo con el material [28]–[32].

Para mejorar la bioactividad (relación célula - material) de la superficie de un material, se ha utilizado la técnica de modificación superficial por medio de plasma con el fin de injertar monómeros con grupos funcionales específicos a la superficie de un material, mientras se mantienen intactas las propiedades volumétricas del mismo [5].

Como se mencionó anteriormente, el PLA posee buenas propiedades mecánicas que le confieren una alta versatilidad y, si la superficie de este polímero lograra adquirir una alta afinidad por cierto tipo de células, el material obtenido podría ser utilizado en aplicaciones como injertos de piel, de hueso, tejido neural, cardiovascular etc., y con ello ayudar a resolver uno de los obstáculos existentes en la ingeniería tisular.

En este sentido, son pocos los estudios que reportan la adherencia y proliferación celular sobre superficies de PLA injertadas con AA; en su mayoría, los estudios concluyeron que

un alto grado de injerto de AA podría resultar tóxico para las células [17][33]. Por lo tanto, en el presente trabajo de investigación se estudiará el efecto de la potencia y el tiempo de exposición, durante el tratamiento con plasma de AA sobre la superficie del PLA, tratando de obtener un grado de injerto óptimo, de tal forma que favorezca la proliferación celular en contacto directo con el material.

## **HIPÓTESIS**

Es posible establecer una correlación entre la densidad de injerto de grupos carboxilo (COOH) presentes en la superficie del poliácido láctico (PLA) modificado y la viabilidad celular de fibroblastos.

# OBJETIVOS

## Objetivo general

Estudiar el efecto del tiempo y la potencia del plasma de ácido acrílico (AA) sobre la conducta de viabilidad celular de fibroblastos en películas de poli (ácido láctico), (PLA).

## Objetivos específicos

- Modificar superficialmente películas de PLA mediante tratamiento con plasma frío de ácido acrílico (AA).
- Caracterizar las películas de PLA modificadas por plasma, utilizando técnicas analíticas como FTIR, XPS, SEM, AFM, y ángulo de contacto.
- Estudiar la viabilidad celular en las superficies de PLA modificado por plasma, mediante el protocolo con Alamar Blue®.

# 1 MARCO TEÓRICO

## 1.1 Ingeniería tisular

La ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario y multidisciplinario, que aplica los principios de la biología y la ingeniería, para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de los tejidos y órganos [34]. La ingeniería de tejidos evoca visiones de órganos construidos desde cero en el laboratorio, listos para ser trasplantados a pacientes gravemente enfermos [35].

El término ingeniería de tejidos nació en 1987 y se desarrolló como una alternativa al trasplante tradicional de órganos, debido a la escasez de éstos, o rechazo por parte de los pacientes. La filosofía de la ingeniería de tejidos parte de la capacidad del cuerpo humano para curarse a sí mismo; es decir, que el cuerpo use sus propios sistemas para recrear células y reconstruir tejidos y órganos, aunque en ocasiones pueda requerir de un sustituto biológico. El proceso de reparación/regeneración se ha mejorado en gran medida, gracias a los avances en la tecnología médica; entre éstos, se pueden mencionar los avances en implantes, prótesis y manipulaciones a nivel celular y biomolecular. Uno de los objetivos más importante de esta área es el diseño de biomateriales, como los andamios, que soporten las células y las moléculas de señalización para la posterior regeneración del tejido [26].

La Ingeniería de tejidos aplica los principios de la biología e ingeniería para el desarrollo de materiales sintéticos funcionales, que regeneren el tejido dañado. La ingeniería de tejidos se compone de tres tecnologías (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**):

- a) desarrollo de andamios que sean sustitutos apropiados para la MEC nativa;
- b) aislamiento, proliferación y suministro de células (específicas de tejido / progenitoras) para permitir la regeneración funcional del tejido, y
- c) aislamiento, expresión y suministro de factores de crecimiento, los cuales actúan como moléculas de señalización para inducir / modular la función celular [36]–[38].



Figura 1.1 Tecnologías en las que se cimienta la ingeniería en tejidos [34].

Se sabe que, dentro del cuerpo, las células madre se adhieren a la lámina basal y, la diferenciación de éstas está determinada por el tipo de matriz extracelular (MEC). Uno de los principales desafíos de la ingeniería de tejidos es el desarrollo de andamios cuya prioridad principal sea imitar la MEC natural. Esta estructura proporciona organización espacial, anclaje y resistencia mecánica para diferentes células dentro de un tejido. También es responsable del control y la regulación de las funciones celulares como la adhesión, la proliferación, la migración, la diferenciación y la apoptosis, al proporcionar estímulos mecánicos y bioquímicos, lo que a su vez permite la regeneración adecuada del tejido [36]–[39].

El ámbito de la ingeniería de tejidos involucra el uso de biomateriales que puedan imitar el entorno natural de las células, para facilitar la viabilidad celular. Los polímeros son los más usados como sustituto de tejidos en aplicaciones de medicina regenerativa por su alta versatilidad [39].

## 1.2 Biomimetismo

El desarrollo de biomateriales para aplicaciones en ingeniería de tejidos se ha centrado recientemente en el diseño de materiales biomiméticos que sean capaces de provocar respuestas celulares específicas y dirigir la formación de tejido, mediada por reconocimiento biomolecular, y que pueda manipularse alterando los parámetros de diseño del material [34], [40].

El término “Biomimético”, proviene de los prefijos griegos “bios”, que significa vida, y “mimesis”, que significa imitar. La biomimética estudia los principios de la naturaleza, tanto en elementos, sistemas, mecanismos y procesos biológicos (como la síntesis de proteínas o la fotosíntesis); la biomimética tiene como propósito desarrollar productos similares a la naturaleza mediante mecanismos artificiales que imitan o se inspiran de la naturaleza para solucionar problemas [41]. Los materiales biomiméticos imitan muchas funciones de la MEC en los tejidos; por ejemplo, los andamios biomiméticos pueden proporcionar señales biológicas para que las interacciones entre la matriz y la célula promuevan el crecimiento del tejido; la incorporación de secuencias peptídicas en los materiales también puede hacer que el material sea atractivo para la adhesión de especies bioactivas [40].

El objetivo en el desarrollo de modificaciones superficiales biomiméticas es emular a la naturaleza para diseñar biomateriales con mayor funcionalidad. Así mismo, promueve las interacciones entre las células y la superficie del sustrato. Esto se puede lograr por medio de la inmovilización de péptidos o de componentes de la MEC sobre las superficies de los materiales, que ligan receptores específicos de adhesión de las células y promueven la adhesión celular [3]. La naturaleza puede proporcionar una guía útil con respecto a la optimización en todos los niveles de la compleja relación entre la composición, síntesis, montaje, estructura, propiedades y rendimiento de un biomaterial [42].

El material biomimético modificado con moléculas bioactivas se puede utilizar como un andamio de ingeniería de tejidos que potencialmente sirve como una MEC artificial que proporciona señales biológicas adecuadas para guiar la formación de nuevos tejidos [40].

El biomimetismo funcional se logra cuando el material se recupera de un organismo donante, se esteriliza y se remodela para reemplazar un tejido dañado en un huésped [42]. Habitualmente, también se requiere que el material del cual está constituido el andamio sea biodegradable, de forma que vaya desapareciendo con el tiempo, para ser sustituido progresivamente por el nuevo tejido biológico hasta que, finalmente, éste repare el defecto original [38].



### 1.3 Ejemplos de biomimetismo en la historia

A lo largo de la historia, el ser humano se ha guiado de la naturaleza para el desarrollo de productos que aporten soluciones a los problemas o, simplemente para facilitar la vida cotidiana; por ello, se han creado varios productos imitando la estructura, función o mecanismo de la naturaleza. Tal es el caso de las propiedades de super hidrofobicidad con aplicaciones en los parabrisas y pinturas de exteriores, fuselajes de barcos y aviones, textiles o paneles, entre otros; donde las gotas de agua resbalan sobre la superficie del material, creando así un efecto de autolimpieza. Esta tecnología surgió al observar la hoja de loto, que, a pesar de encontrarlas en aguas de estanques con fango, siempre se mantenían limpias; esta super hidrofobicidad se da por consecuencia de su estructura. Las células epidérmicas de la hoja forman micro y nano asperezas (o papilas), lo que le confiere una rugosidad a escala microscópica. A su vez, la superficie de las hojas está cubierta con una variedad de ceras compuestas de una mezcla de hidrocarburos con una fuerte repulsión al mojado (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.a**).

Otro ejemplo de biomimetismo aplicado a productos es la piel de tiburón. Los científicos se preguntaban cómo los tiburones pueden moverse a través del agua a altas velocidades; la respuesta la encontraron en su piel, ya que su ingenioso diseño le permite reducir el coeficiente de fricción, del 5 al 10 por ciento, y autolimpiarse de ectoparásitos. Los dentículos de la piel de tiburón están ribeteados con ranuras longitudinales (alineadas en paralelo a la dirección de flujo local del agua (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.b**), lo que permite que el agua se mueva muy eficientemente sobre su superficie. En 2006, Speedo® creó un traje de baño de cuerpo entero para nadadores de élite. El traje está hecho de poliuretano tejido con una textura basada en los dentículos del tiburón, lo que, en efecto, les confiere mayor velocidad a los nadadores. Por otro lado, los fabricantes de barcos y aviones están intentando imitar la piel de tiburón para reducir la fricción por arrastre y minimizar la adherencia de microorganismos [41].

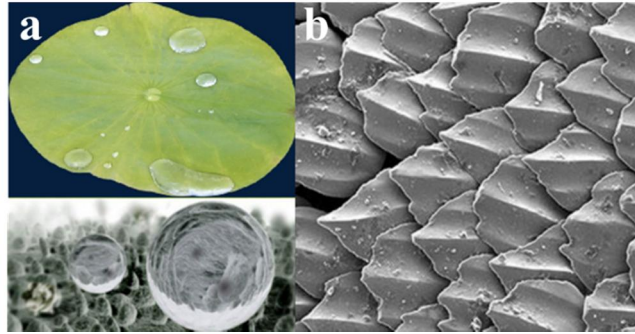


Figura 1.2 a) Gotas de agua sobre hoja de loto. b) Piel de tiburón [37].

## 1.4 Adherencia y proliferación celular sobre un material

La adhesión desempeña un papel integral en la comunicación y regulación celular, y tiene una importancia fundamental en el desarrollo y mantenimiento de los tejidos. La adhesión celular es la capacidad de las células para adherirse a otras células, o bien, a la matriz extracelular (MEC). Estas distintas formas de adhesión están mediadas por moléculas de adhesión celular (CAM), las cuales se dividen en cuatro grupos principales: las cadherinas, las integrinas, las selectinas y la superfamilia de inmunoglobulinas [43], [44], [39].

### 1.4.1 Fases de la adhesión celular

El proceso de adhesión celular se caracteriza por tres etapas (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**): acoplamiento inicial de la célula al sustrato, por proyecciones dinámicas de filopodios (Fase I); posteriormente, las células continúan aplanándose y extendiéndose sobre el sustrato, lo que resulta en la disminución de la altura de la célula (la célula se aplanan) y se incrementa el área de contacto (Fase II). El proceso de propagación es la combinación de la adhesión continua, con la reorganización y distribución del esqueleto de actina alrededor del borde del cuerpo de la célula. Por último, se forman entidades de las células altamente especializadas y distintas, conocidas como adhesiones o contactos focales. Las adherencias focales enlazan las moléculas de la MEC a los componentes del citoesqueleto de actina de la célula, mediando así la señalización transmembrana. Las células alcanzarán su máxima proliferación a través de la expansión;

a su vez, la fuerza de adhesión se volverá más fuerte (Fase III). La propagación celular parece estar acompañada por la organización de la actina en paquetes de microfilamentos. La fuerza de adhesión se hace más fuerte con el tiempo, durante el cual se permite que una célula se adhiera a un sustrato u otra célula [45]–[47].

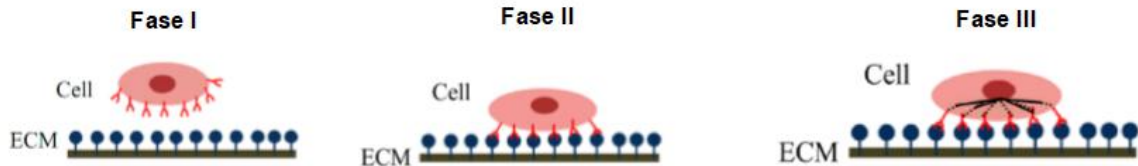


Figura 1.3 Fases de la adhesión celular [42].

De acuerdo con el "modelo de adhesión celular", cuanto más se adhiere una célula, ya sea a otra célula o a la superficie del sustrato, mayor es el número de enlaces químicos que tiene en su superficie. La adhesión celular está involucrada en la estimulación de señales que regulan la diferenciación celular, el ciclo celular, la migración celular, así como la supervivencia celular. La afinidad de las células al sustrato es una consideración crucial en el diseño y desarrollo de biomateriales. Los materiales utilizados en los andamios para la generación de tejido son necesarios para que actúen como sustrato y promuevan la adhesión de las células, la proliferación posterior y la biosíntesis celular [46].

## 1.5 Poli (ácido láctico), PLA

El Poli(ácido láctico) (PLA) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), es un poliéster alifático compuesto de unidades repetitivas de ácido láctico [48]; se caracteriza por su alta temperatura de fusión (160°C) y una temperatura de transición vítrea de 60° [4].

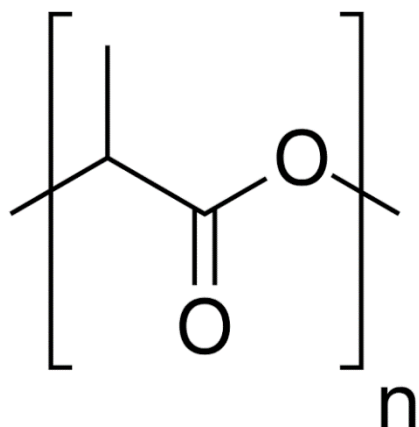


Figura 1.4 Estructura del PLA

El PLA fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration, EE. UU.) en la década de 1970 [49] y, desde entonces, es uno de los polímeros biodegradables más utilizados en aplicaciones médicas, andamios para ingeniería de tejidos, dispositivos para la administración de fármacos [30], así como en el envasado de alimentos [50]. Todo lo anterior es debido a que posee excelentes propiedades mecánicas y tasas de degradación aceptables [48][49]. Dentro de las propiedades mecánicas importantes se encuentran la resistencia al desgaste, resistencia a la tracción, alto módulo de Young, resistencia al impacto y módulo de flexión [51]. Por otro lado, el PLA tiene algunas limitaciones para aplicaciones industriales, como lo son una pobre tenacidad, alta fragilidad, baja temperatura de flexión por calor y baja estabilidad térmica [28].

El PLA puede prepararse mediante diferentes procesos de polimerización a partir del ácido láctico, el cual se deriva de fuentes vegetales como el maíz, la yuca y la caña de azúcar [30],[51]. Dentro de los procesos de polimerización del PLA se incluyen principalmente la policondensación y la polimerización por apertura de anillo, siendo este último método más ventajoso que el anterior, puesto que da como resultado PLA de alto peso molecular; no obstante, también se puede obtener mediante métodos directos como la polimerización enzimática [51]. La síntesis de PLA requiere un control riguroso de las condiciones de proceso (temperatura, presión y pH), el uso de catalizadores y largos tiempos de polimerización [51]. Cabe destacar que durante la producción del PLA se consumen grandes cantidades de dióxido de carbono [28].

Por otro lado, la degradación del PLA tarda de 3 a 5 años, y se da generalmente por hidrólisis cuando se implanta en organismos vivos; el PLA se hidroliza a su  $\alpha$ -hidroxiácido constituyente, luego se incorpora al ciclo del ácido tricarboxílico y se excreta. La hidrólisis del PLA conduce a la escisión de los enlaces éster, con la generación de grupos carboxilos e hidroxilos [28].

El mecanismo primario de degradación ocurre mediante un proceso de dos pasos que comienza con la hidrólisis, seguido por un ataque bacteriano [51]. En la primera fase, el agua penetra en las cadenas del PLA, atacando preferentemente los enlaces químicos en la fase amorfa y convirtiendo las largas cadenas del polímero en fragmentos más cortos que finalmente se disuelven en agua. En la segunda fase, se produce un ataque enzimático a los fragmentos. El metabolismo de los fragmentos resulta en una rápida pérdida del Mw del polímero [28] [51].

Debido a la baja tasa de degradación *in vivo* del PLA, éste ha sido considerado en aplicaciones a largo plazo como implantes y dispositivos para la administración de fármacos. Sin embargo, el PLA presenta baja bioactividad y una energía superficial baja (alta hidrofobicidad), factores que afectan negativamente a la adhesión y proliferación celular [28]–[30]. Por lo tanto, una estrategia comúnmente utilizada para mejorar esto es modificar químicamente los poliésteres introduciendo grupos funcionales específicos en la superficie [52].

## **1.6 Modificación superficial por plasma**

El término plasma fue introducido por Langmuir en 1929 (Gombotz y Hoffman, 1987), y se utiliza para describir al cuarto estado de la materia. Un plasma es un gas parcialmente ionizado, y puede definirse como un sistema de partículas que contiene electrones, iones y radicales libres, aunque también suelen contener partículas neutras (átomos, moléculas), sostenidas por una fuente de energía externa como una radiofrecuencia (RF), microondas (MW) o descargas eléctricas [7], [53]–[56].

La modificación superficial por plasma es un método rápido y respetuoso con el medio ambiente. El tratamiento de plasma también modifica la carga superficial, la rugosidad y la cristalinidad del polímero, lo que tiene una influencia importante en la adhesión celular. La creación de nuevos grupos funcionales, y la modificación de la topografía de la superficie,

favorece la adhesión de diferentes tipos de células. Numerosos estudios han demostrado que el tratamiento con plasma mejora significativamente la bioactividad de los materiales poliméricos [57].

Durante los tratamientos con plasma generalmente se utilizan dos tipos diferentes de éste: plasma frío o de baja temperatura y plasma caliente o alta temperatura. Los arcos de presión atmosférica pueden generar plasma caliente, mientras que, el plasma frío se genera utilizando una descarga luminiscente a baja temperatura [36]. Es evidente que los plasmas térmicos, con sus altas temperaturas, son destructivos para los polímeros y, por lo tanto, casi todas las aplicaciones para la modificación de superficies de biopolímeros usan plasmas fríos o no térmicos [53].

Así, pueden ser distinguidas tres categorías principales de reacciones de plasma, según el resultado de la interacción:

- **Polimerización por plasma:** Se deposita una fina capa funcional, de espesor inferior a una micra, en la superficie del material a recubrir. El recubrimiento se crea debido a la excitación del monómero en fase de vapor, que se introduce en el plasma para dar lugar a su posterior deposición y polimerización de las especies excitadas en la superficie de un material. Los polímeros formados mediante polimerización por plasma son, en la mayoría de los casos, altamente ramificados y reticulados [55], [58], [59].
- **Tratamiento con plasma:** Para activación de superficies y funcionalización de polímeros. Cuando un plasma entra en contacto con superficies poliméricas, éste induce modificaciones químicas y físicas como, por ejemplo, la generación de sitios más reactivos, o cambios en el peso molecular en la superficie del polímero. Las funcionalidades introducidas pueden usarse posteriormente para unir polímeros u otras moléculas a la superficie, con el fin de lograr propiedades superficiales específicas. Además, la superficie también puede funcionalizarse mediante injertos inducidos por plasma. Por lo general, el tratamiento con plasma se usa solo para obtener superficies más hidrófilas [55], [58], [59].
- **Grabado con plasma (o ablación):** El grabado con plasma se utiliza esencialmente para eliminar el material de una superficie. Puede llevarse a cabo con una variedad

de fuentes de descarga, tales como descargas incandescentes de corriente continua, descarga de RF de corriente capacitiva, etc. Los tres parámetros importantes para el grabado, son: uniformidad de velocidad, anisotropía y selectividad [55], [58], [59].

### 1.6.1 Modificación superficial por plasma con injertos de AA

La polimerización por injerto es un método atractivo para la funcionalización química de un material [5], [7], [25], en la que un monómero deseado se puede injertar sobre la superficie de un material a través de un enlace covalente, lo que proporciona una buena estabilidad del cambio efectuado [5].

El injerto por plasma ofrece una característica innovadora en términos de la modificación, a nano escala, de las capas superficiales de un material, para que las propiedades inherentes a éste permanezcan intactas mientras que la superficie adquiere la funcionalidad deseada [25].

El ácido carboxílico es uno de los grupos funcionales más utilizados para modificar superficies por este método, ya que las superficies conteniendo grupos carboxílicos tienen importantes aplicaciones biomédicas tales como soporte para la inmovilización de moléculas biológicas, biosensores y como barrera contra la corrosión de implantes. Los grupos COOH son conocidos por lograr una buena adhesión y proliferación de fibroblastos y de otros tipos de células [7]. El ácido acrílico (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) es un monómero muy conveniente para procesos de injerto por plasma ya que es volátil, soluble en agua y se polimeriza fácilmente. Además, la presencia de grupos carboxílicos polares, aumenta la humectabilidad del sustrato [52].

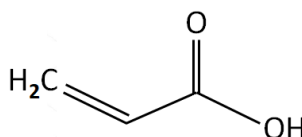


Figura 1.5 Estructura del Ácido Acrílico (AA).

Las especies ionizantes y los radicales que constituyen el plasma, interactúan con la superficie del material y crean especies oxidativas, como los hidroperóxidos, los cuales

inician la polimerización de un monómero para producir un copolímero por injerto [25]. En el caso de la polimerización por injerto del AA, se crean cadenas de poli(ácido acrílico) en la superficie del polímero [8] tal y como se ilustra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** La cantidad de injerto de poli (ácido acrílico) se ve considerablemente influenciada por los parámetros de tratamiento con plasma y las condiciones de reacción [19].**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

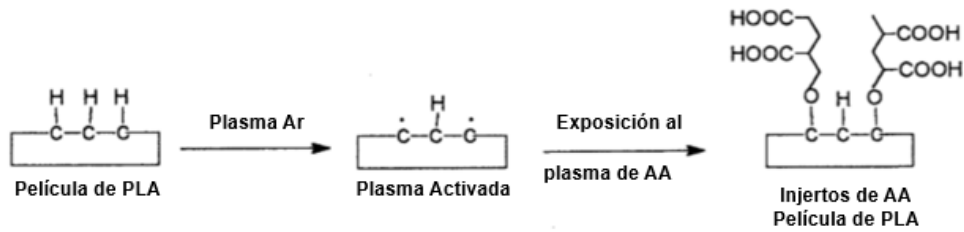


Figura 1.6 Polimerización por injerto del monómero AA [49].



## 2 PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 Materiales

Para la preparación de las películas se utilizó poli (ácido láctico) (PLA) Ingeo 2002D de Natureworks. Los reactivos químicos, tales como cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) 99.8%, y ácido acrílico ( $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$ ) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Para el tratamiento con plasma, se utilizó un reactor tubular de vidrio con las siguientes dimensiones: 8.2 cm de diámetro y 30 cm de longitud, y gas argón ultra alta pureza (99.999%min), los cuales fueron proporcionados por el Dr. Alejandro Ávila Ortega, profesor investigador de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY). El Alamar blue fue adquirido de Invitrogen™, mientras que los medios de cultivo y el búfer de fosfatos fueron adquiridos de Caisson, Labs.

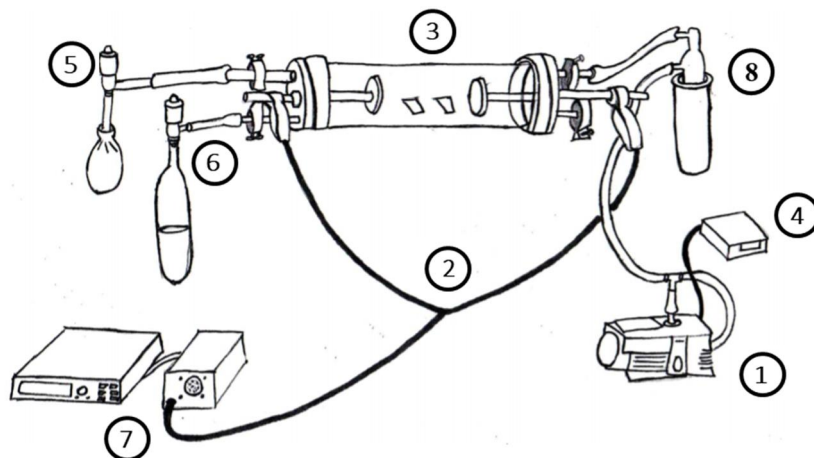
### 2.2 Preparación de películas de PLA

Para la preparación de las películas se utilizó el método de “*solvent-casting*”. Para esto, se disolvió 0.5 g de pellets del polímero (PLA) en 10 ml de disolvente (cloroformo). Posteriormente se vertió la solución en cajas Petri de 60 mm de diámetro, colocadas en una bolsa de atmósfera controlada, a 25° C donde se evaporó el disolvente lentamente. Previo a esto, se creó una atmósfera de cloroformo al interior de la bolsa.

### 2.3 Modificación superficial por plasma de películas de PLA

La modificación superficial del PLA mediante tratamiento con plasma se llevó a cabo en dos pasos. En primera instancia se realizó un tratamiento con plasma de argón (Ar) a baja presión para activar la superficie de las películas poliméricas y, posteriormente, se injertó el monómero de AA sobre la superficie de las películas al exponer éstas a un plasma de AA. El proceso de activación con plasma de Ar en la superficie de las películas de PLA se realizó para inducir la creación de sitios activos capaces de iniciar el injerto del AA [18]. Este procedimiento se efectuó en un reactor de plasma cilíndrico de vidrio con dimensiones de 8.2 cm de diámetro y 30 cm de longitud. El plasma se generó al ionizar las moléculas del argón, aplicando una radiofrecuencia de 13.56 MHz y un acoplador de impedancia conectados inductivamente al recipiente del reactor Figura 2.1 [60].

Para llevar a cabo un procedimiento adecuado durante la modificación superficial con plasma de Ar e injerto de AA, se tomaron como referencia los siguientes trabajos [52], [61]–[66].



- |                         |   |
|-------------------------|---|
| 1) Bomba de vacío       | 5) Válvula de argón                           |
| 2) Electrodo            | 6) Válvula de ácido acrílico                  |
| 3) Cilindro de vidrio   | 7) Generador de rf y acoplador de impedancias |
| 4) Indicador de presión | 8) Trampa de vacío con nitrógeno              |

**Figura 2.1** Representación esquemática del reactor de plasma utilizado y sus componentes.

### 2.3.1 Activación con plasma de Argón

En primera instancia, se colocaron las películas de PLA en el reactor. Antes del tratamiento con plasma, el reactor se purgó a una presión de  $2 \times 10^{-2}$  Torr aproximadamente. El proceso de activación se llevó a cabo durante 3 min, a una potencia de 30 W; estas condiciones fueron establecidas con base en pruebas preliminares. Una vez completado el proceso de activación, se cortó el flujo de Ar para continuar con el injerto de AA.

### 2.3.2 Injerto de ácido acrílico (AA)

Para la reacción de injerto, se desgasificó el monómero de AA antes de ser utilizado; esto se logró abriendo la válvula del AA al mismo tiempo que se mantuvo encendida

la bomba de vacío. El vapor del monómero se introdujo a través de una válvula y la reacción de injerto se realizó a dos tiempos (2.5 y 5 min) y tres potencias (20 W, 30 W y 40 W). El monómero se introdujo hasta obtener una de presión menor a  $8 \times 10^{-2}$  Torr aproximadamente; la válvula permaneció abierta durante todo el período de injerto.

## **2.4 Caracterización fisicoquímica y morfológica de las películas tratadas.**

### **2.4.1 Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)**

El análisis de los grupos funcionales presentes en la superficie de las películas de PLA modificadas superficialmente por plasma y sin modificar, se llevó a cabo por medio de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) utilizando un equipo Nicolet 8700 Thermo Scientific. Se utilizó un promedio de 100 exploraciones, una resolución de  $4 \text{ cm}^{-1}$ , en el rango de  $4000 \text{ cm}^{-1}$  a  $650 \text{ cm}^{-1}$ .

### **2.4.2 Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS)**

El análisis de los grupos funcionales presentes en la superficie de las películas de PLA modificadas por plasma y sin modificar, se evaluó por Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos-X (XPS), con una fuente de radiación Al  $K\alpha_{1,2}$  no cromatizada y una energía de 1253.6 eV. Los espectros se tomaron con un ángulo de análisis de  $50^\circ$ . Se tomó un espectro de exploración de la muestra y se determinaron las estequiometrías elementales de la superficie a partir de las proporciones de área-pico.

### **2.4.3 Ángulo de contacto**

La humectabilidad de las muestras se evaluó a partir de mediciones de ángulo de contacto y, para esto, se utilizó un goniómetro Rahmé-hart instrument Co., modelo no. 250-U1. El ángulo de contacto se estimó a partir de las imágenes de la gota formada por el líquido en contacto con la superficie de las películas de PLA. Posteriormente se introdujeron las imágenes al programa ImageJ para calcular el ángulo de contacto de la gota. Se realizaron 6 mediciones, por cada líquido y por cada muestra con un área de  $0.5 \text{ cm}^2$ ; la selección de

las muestras se realizó de tres películas tratadas previamente con plasma, eligiendo dos puntos diferentes en cada película tratada. Las mediciones se llevaron a cabo después de que la gota permaneció en la superficie por 3 s.

La energía superficial se determinó a partir del método Owens – Wendt y la ecuación extendida de Fowkes. Para esto se utilizaron los ángulos de contacto de dos líquidos: uno polar  $\gamma^p$  (agua) y uno no-polar  $\gamma^d$  (diyodometano) para sustituirlos en la ecuación 1 y hallar la energía superficial total  $\gamma_s$  [67].

$$\gamma_l \cdot (1 + \cos(\theta)) = 2 (\gamma_s^d \cdot \gamma_l^d)^{1/2} + 2 (\gamma_s^p \cdot \gamma_l^p)^{1/2}$$

#### 2.4.4 Determinación en la densidad de injerto

La determinación del grado de injerto se estimó a partir de la cuantificación de los grupos carboxílicos presentes en la superficie de la película, mediante el método colorimétrico de tinción con azul de toluidina O (TBO). Para esto, se preparó una solución del colorante con una concentración de 0.5 mM, a un pH de 10 y se colocó 1 cm<sup>2</sup> de la película tratada con plasma de AA en dicha solución, durante 6 horas, con agitación constante a temperatura ambiente. Luego, la película se retiró y se lavó a fondo con una solución de hidróxido de sodio con pH 9 para eliminar el tinte no adherido a la superficie. El colorante se desorbió de la película en una solución de ácido acético al 50 %, y el contenido final de colorante se obtuvo mediante la medición de la absorbancia de la solución utilizando un espectrofotómetro UV-Visible a 623 nm. El contenido de ácidos carboxílicos se obtuvo a partir de la gráfica de calibración de la densidad óptica (absorbancia) respecto a una concentración de tinte conocida (Figura 2.2). Durante este proceso se forman complejos iónicos entre los grupos –COOH y el colorante catiónico (+) del TBO, en un búfer alcalino. Este método colorimétrico se basa en el mecanismo de intercambio de iones y, se asume que los grupos funcionales son capaces de unirse a la misma cantidad molar de moléculas que el del colorante [62] [68].

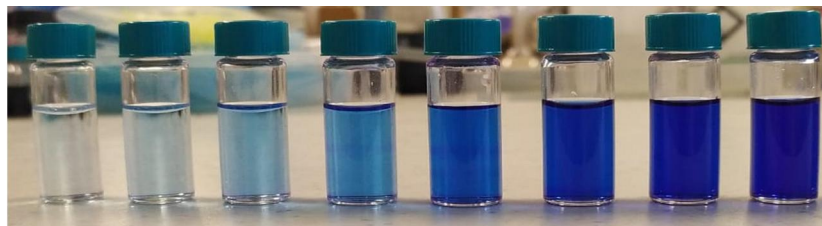
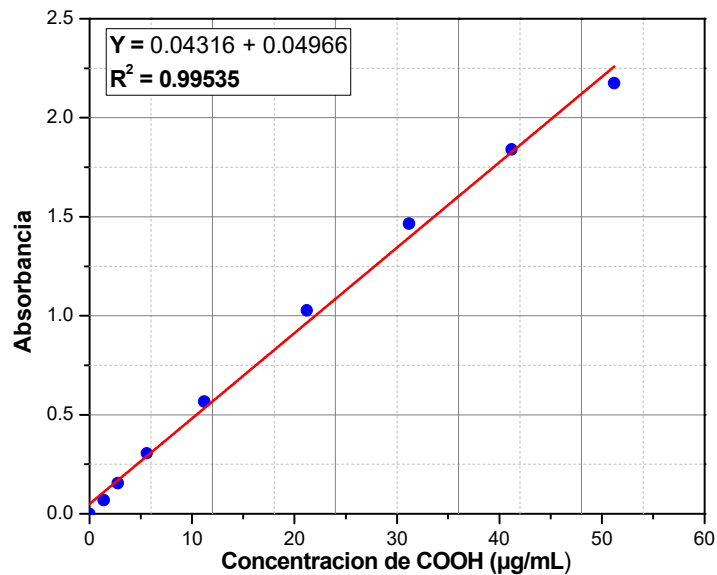


Figura 2.2 Curva de calibración con concentraciones conocidas de TBO.

### 2.4.5 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Para analizar la topografía de las muestras de PLA, con y sin tratamiento superficial, se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM) marca JEOL, modelo JSM-6360LV. Las muestras se recubrieron con oro, utilizando un dispositivo de recubrimiento por pulverización catódica de alta resolución, con el fin de obtener una ruta para electrones debido al carácter no conductor de los polímeros y un contraste adecuado en las micrografías de SEM. El voltaje del haz de electrones fue de 20 kV [6].

### **2.4.6 Microscopía de fuerza atómica (AFM)**

La topografía de las películas de PLA también se caracterizó por la técnica de AFM, a temperatura ambiente, utilizando un equipo Bruker modelo INNOVA SPM. Todas las imágenes se realizaron en modo Tapping con una punta de silicio RTESP nanoprobe Bruker comercial, en forma de cantiléver, con una frecuencia de resonancia de 300 KHz, una constante de resorte de 40N/m y 8 nm de radio de la punta. La frecuencia de escaneo fue 0.2 Hz.

Además, para calcular la rugosidad de las muestras, se utilizó el siguiente procedimiento: se seccionó el área escaneada de 5  $\mu\text{m}$  x 5  $\mu\text{m}$ , en 4 subáreas de 2.5  $\mu\text{m}$  x 2.5  $\mu\text{m}$ , calculando la rugosidad para cada subárea, usando el software Nanoscope Analysis. El promedio estadístico y la desviación estándar de la rugosidad de cada muestra fue reportada tomando en cuenta 20 mediciones.

## **2.5 Evaluación biológica**

### **2.5.1 Cultivo celular**

Las células de fibroblastos se obtuvieron de biopsias dérmicas de espesor total de donantes voluntarios en concordancia con la World Medical Association's Declaration of Helsinki y aprobada por el Comité de bioética del Hospital General "Dr. Ignacio Morones Prieto", en San Luis Potosí, México (CONBIOETICA-24-CEI-001-20160427). Las biopsias de 2 mm de diámetro se procesaron de acuerdo con lo reportado por Fernández et al. (2020) [69] para obtener fibroblastos dérmicos. Posteriormente, las células fueron cultivadas en Medio Esencial Mínimo (D-MEM; GibcoBRL), suplementado con glutamina 2 mM, penicilina/estreptomicina al 1% y suero fetal bovino al 10% (FBS) manteniendo el ambiente de cultivo a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad. Las películas de PLA se esterilizaron mediante tratamiento UV durante 1 hora (30 min cada lado) y, posteriormente, se colocaron en tubos conteniendo 200  $\mu\text{l}$  de PBS al 1% con penicilina/estreptomicina durante 18 h a 37 °C; transcurrido este tiempo se pre-humedecieron en D-MEM durante 24 h a 37 °C [70].

### 2.5.2 Viabilidad celular

Se sembraron fibroblastos sobre las películas de PLA utilizando placas de cultivo celular de 96 pocillos, a una densidad de 1500 células/pozo [70]. Posteriormente, al volumen total del pocillo con el medio de cultivo y las células (200  $\mu$ l), se adicionó 10% de reactivo de alamarBlue (AB) siguiendo las pautas del fabricante, y manteniendo los cultivos en una incubadora celular (marca Binder, serie 16-03457) durante el tiempo de estudio. El cambio de color AB es indicativo de la proliferación celular, y se cuantificó midiendo la absorbancia en un lector CYTATION3 a 570 nm. Se realizaron mediciones inmediatamente después de la adición del AB (0 h) y cada 24 h hasta alcanzar los 3 días de cultivo celular [71]. La elección del AB para medir la viabilidad celular, fue debido a que éste es un indicador sensible de oxidación-reducción, que emite fluorescencia y cambia de color al ser reducido por las enzimas mitocondriales [4]. La viabilidad fue calculada utilizando la siguiente fórmula:

$$(\text{Absm} / \text{Abs ctrl}) \times 100 = \% \text{ de viabilidad, donde Absm} = \text{Absorbancia}$$

## 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Modificación superficial por plasma en películas de PLA

#### 3.1.1 Activación de la superficie con plasma de Argón

La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** presenta el proceso de activación de la película de poli (ácido láctico), PLA, utilizando Argón. El color violeta es característico de la formación del plasma y es debido al desplazamiento y desdoblamiento de las líneas espectrales de los átomos y moléculas del gas, en presencia de un campo eléctrico estático. El plasma de argón tiene una longitud de onda visible que va desde el azul (435 nm) hasta el rojo (700 nm) [72] [73].



Figura 3.1 Imagen del proceso de activación con plasma de argón.

El color “violeta” del argón se debe a una amplia gama de líneas, en toda la región espectral del visible. Los espectros de emisión se producen cuando los átomos de un gas se "excitan"; los átomos excitados tienen electrones en orbitales superiores y estos emiten fotones con longitudes de onda específicas cuando descienden a orbitales inferiores [74].

#### 3.1.2 Plasma de ácido acrílico (AA)

La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra el tratamiento con plasma de ácido acrílico (AA), el cual condujo a la aparición de un color “azul”.



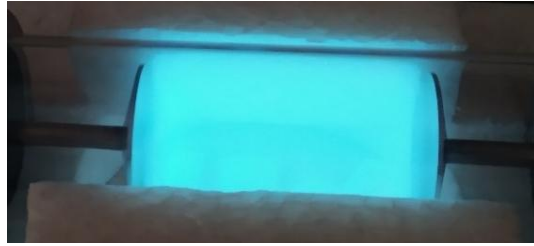


Figura 3.2 Imagen del tratamiento con plasma de ácido acrílico.

El hecho de que el plasma del ácido acrílico presente un color “azul” en el interior del reactor, está relacionado con el desplazamiento y desdoblamiento de las líneas espectrales de los átomos del gas. El plasma de AA posee una longitud de onda específica situada en la región entre 430 – 490 nm y cuyo color característico de la molécula del AA dentro del espectro visible, es azul [72].

### 3.2 FTIR de las películas tratadas

Se utilizó espectroscopía infrarroja para corroborar la presencia de grupos funcionales que validen el injerto de PAA en la superficie de las películas de PLA. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, se presentan los espectros FTIR de las películas modificadas y sin modificar; en ellos se observa la presencia de las bandas características, relacionadas con las vibraciones de los grupos del PLA. Así, se distinguen bandas en 2998 y 2946  $\text{cm}^{-1}$ , debido a las vibraciones de estiramiento asimétrico y simétrico del enlace C-H, respectivamente [75][48]. Así mismo, se puede identificar claramente la banda perteneciente al grupo carbonilo (C=O) del éster en 1748  $\text{cm}^{-1}$  y 1270  $\text{cm}^{-1}$ ; la banda correspondiente a las vibraciones de flexión del enlace C-H en 1452; el estiramiento del C-O-C en 1182  $\text{cm}^{-1}$ ; la banda a 1125  $\text{cm}^{-1}$  y 1040  $\text{cm}^{-1}$  pertenecientes al estiramiento C-O; y el estiramiento en 866 y 755  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a las fases amorfa y cristalina respectivamente propias del PLA [11][76]–[79].

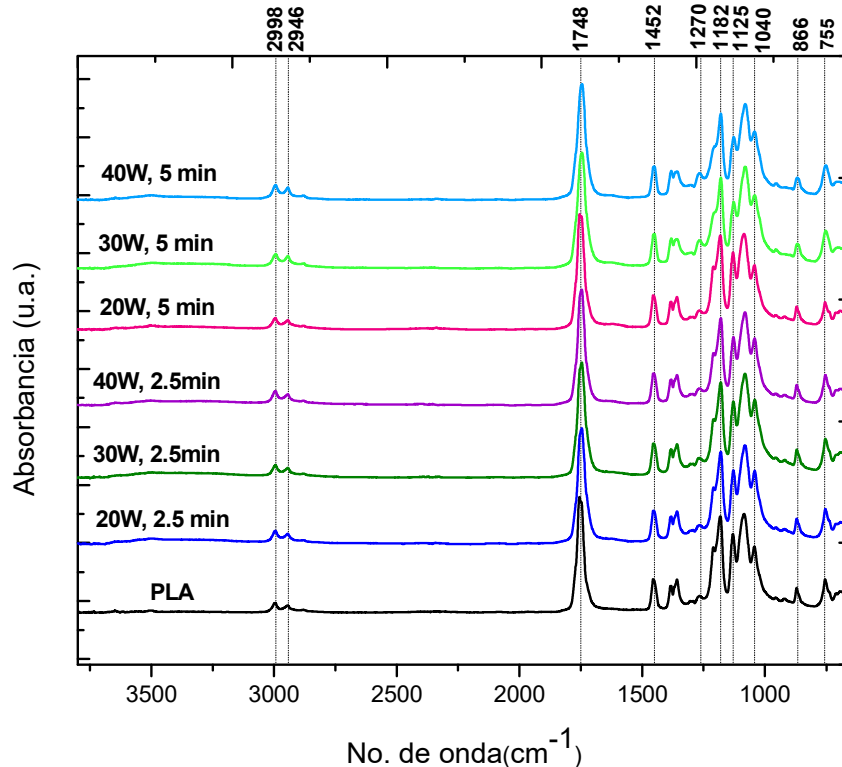


Figura 3.3 Espectros FTIR de películas de PLA con y sin modificación superficial.

La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** presenta la región del espectro IR de 3500-2700  $\text{cm}^{-1}$  donde, según trabajos con injertos de AA sobre PLA [80] [81], han reportado la presencia de una banda alrededor de 3300  $\text{cm}^{-1}$ , la cual podría estar asociada al estiramiento O-H de los grupos carboxílicos [17]. Como se mencionó anteriormente, las películas de PLA no presentan banda de absorción en esa región, y solo en procesos de polimerización por plasma de AA, a través de fenómenos de fragmentación y reordenamiento de la molécula, se induce la generación de nuevos grupos funcionales, con frecuencias de vibraciones adicionales [82].

Se puede observar en la misma región del IR (3300-2700  $\text{cm}^{-1}$ ), que los espectros de las películas tratadas muestran una pequeña banda alrededor de 3300  $\text{cm}^{-1}$ , (en realidad se aprecia solo una pequeña elevación de la línea base a 3270  $\text{cm}^{-1}$ ), que corresponde al estiramiento del enlace O-H; esta elevación parece ser más pronunciada, mientras mayor es el voltaje. Por consiguiente, y dado los resultados obtenidos, se puede postular que cuando se tratan películas de PLA con plasma de AA durante las potencias y tiempos

empleado en este trabajo, el cambio de los grupos funcionales detectado por el FTIR no es grande. Esto podría deberse a dos cosas: la primera a que la cantidad de grupos COOH injertados sobre la muestra es pequeña y, la segunda, a la profundidad de análisis de esta técnica, la cual es de alrededor de unas 5 micras, por lo que, si durante el tratamiento solo se modifican algunas capas del orden nanométrico, no podríamos seguir la modificación con esta técnica analítica.

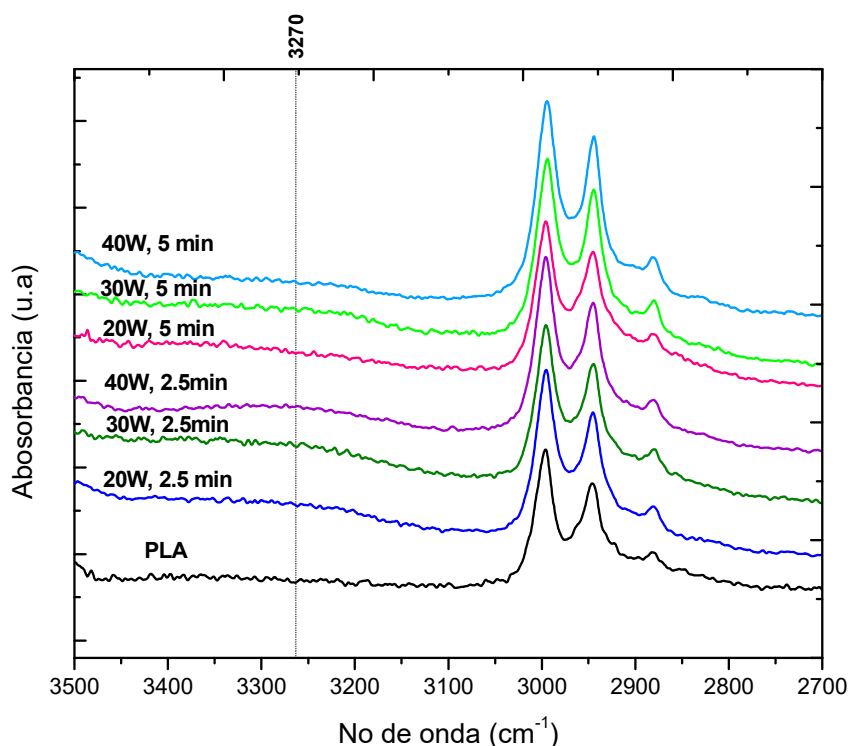


Figura 3.4. Espectros FTIR (región 3500-2700  $\text{cm}^{-1}$ ) de películas de PLA con y sin modificación superficial

Algo similar se observa al analizar la región del IR entre 1800 – 1500  $\text{cm}^{-1}$ , en donde es posible observar una señal de baja intensidad, en la región 1630  $\text{cm}^{-1}$  (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) en los espectros del PLA tratado, que no es visible en la muestra del PLA sin tratamiento. Esta banda es similar a la observada por Steffens 2002 [80], quien la relacionó con la presencia de injertos de PAA. La banda 1630  $\text{cm}^{-1}$  es más prominente al aumentar el tiempo de exposición al plasma de AA, aunque sigue siendo de muy baja intensidad, como la observada a 3270  $\text{cm}^{-1}$ .

Con base en los resultados obtenidos por FTIR, se puede mencionar que es difícil demostrar con precisión, la presencia de cadenas de PAA injertadas en la superficie de las películas de PLA; lo anterior, es debido probablemente a que el haz de luz del FTIR penetra profundamente en el polímero, lo que ocasiona que los posibles cambios ocasionados por el tratamiento en las primeras capas de la película sean minimizados. La profundidad de análisis del FTIR es alrededor de 5 micras; por lo que ATR-FTIR no es un método de análisis de superficie muy sensible para materiales que han sido modificados en solo unos nanómetros /angstroms [13], [17], [27]. Sin embargo, debido a la presencia de pequeñas bandas anchas en  $3270$  y  $1630\text{ cm}^{-1}$  en los espectros del PLA tratado con plasma de AA, es posible sugerir que se llevó a cabo el injerto del AA sobre la película de PLA [83] [84], aunque esto será validado por otras técnicas analíticas.

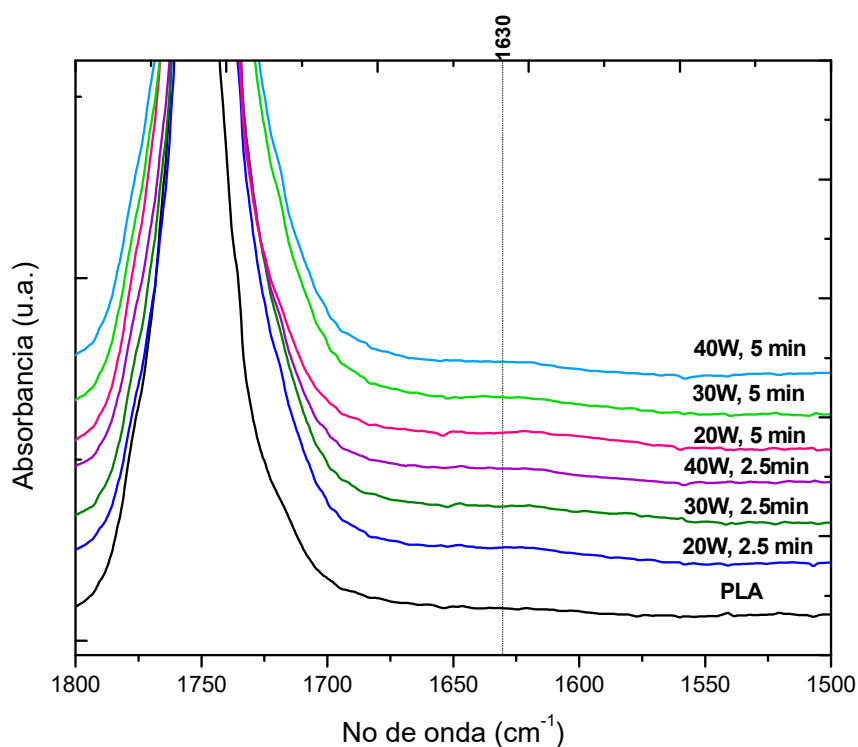
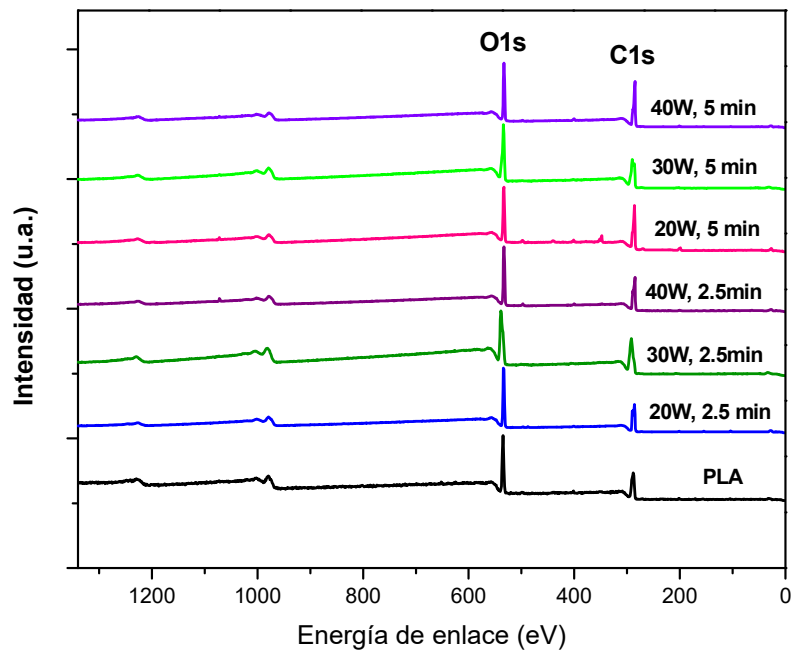


Figura 3.5 Espectros FTIR (región  $1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ ) de películas de PLA con y sin modificación superficial

### 3.3 Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos-X

Los efectos químicos del tratamiento con plasma también fueron estudiados mediante espectroscopia fotoelectrónica de rayos X. La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** ilustra los espectros de reconocimiento de XPS correspondientes a la película de PLA sin tratamiento y después del tratamiento con plasma de AA. Como era de esperarse, todos los espectros presentan señales para  $C_{1s}$  y  $O_{1s}$ , ubicadas en 285 eV y 532 eV, respectivamente [85], [86]; estos elementos forman parte de la estructura química del PLA [67]. A pesar de lo anterior, es interesante notar que la intensidad de la señal  $C_{1s}$  se intensifica (y la del oxígeno parece disminuir ligeramente) a medida que aumenta tanto la potencia, como el tiempo de tratamiento. Esto será analizado un poco más adelante.

Para saber qué grupos funcionales se generaron en la capa superficial después de los tratamientos con plasma, se realizó un análisis de deconvolución sobre las señales del  $C_{1s}$  y  $O_{1s}$ . Un análisis preliminar de estos resultados indicó que la señal del  $C_{1s}$  de las películas de PLA, mostraron cuatro componentes a 284.5, 286.2, 287.4 y 288.4 eV asignándose a los enlaces carbono alifático (C – C)/carbono-hidrógeno (C – H), carbono-oxígeno (C–O), carbonilo de éster (C=O) y carbonilo de ácido carboxílico (O-C=O), respectivamente [85]. Por su parte, el pico del  $O_{1s}$  mostró dos componentes, en 531.4 y 533 eV asignándose a los átomos de oxígeno con enlaces dobles y simples ((C=O y C-O), respectivamente [87] [88].



**Figura 3.6 Espectros de reconocimiento de XPS de las películas de PLA tratadas con plasma de AA y sin tratamiento.**

Como se mencionó anteriormente, los espectros de reconocimiento de XPS de las muestras de PLA parecen exhibir una conducta interesante: la señal del  $C_{1s}$  parece aumentar, y la del oxígeno parece disminuir ligeramente, a medida que aumenta tanto la potencia, como el tiempo de tratamiento. Para poder analizar más a detalle esta tendencia, en la Tabla 3.1 se presentan los porcentajes atómicos obtenidos para cada muestra. Así, se puede observar que existe un incremento en la cantidad de carbono y una disminución en el contenido de oxígeno, al aumentar la potencia del tratamiento; esto fue más evidente cuando el tiempo de exposición fue de 5 minutos (en comparación con el tratamiento de 2.5 min).

Para monitorear de una manera más clara los cambios observados en los espectros de XPS, se estimó la razón C/O, a partir de los porcentajes atómicos obtenidos para ambos elementos. Se puede notar que esta razón también aumenta con el tiempo de exposición y con la potencia del tratamiento. Estos cambios en la química superficial del PLA se verán reflejados en los estudios de humectabilidad y topografía superficial, como se verá más adelante.

La primera está relacionada con el hecho de que durante el tratamiento con plasma se generan funcionalidades, en la superficie del sustrato (en este caso, el PLA), que son deficientes en oxígeno. Esto ocurre tanto, por la pérdida de especies de bajo peso molecular, generada por el rompimiento (fragmentación) de las cadenas poliméricas en las capas superficiales de las películas de PLA por acción del plasma [67], como por la fragmentación (descarboxilación) del ácido acrílico debido al impacto de diversas especies químicas presentes durante el tratamiento con plasma. Por ejemplo, en otros trabajos se ha reportado la fragmentación del AA bajo el impacto de electrones para formar CO y CO<sub>2</sub> [89].

La segunda explicación está relacionada directamente con el injerto de cadenas de PAA sobre la superficie del PLA [15], ya que según la composición química de la unidad repetitiva del ácido acrílico, existirán siempre 3 átomos de carbono por cada dos de oxígeno, por cada molécula de AA que se incorpore a la superficie del PLA.

Así mismo, la diferencia entre los valores de C/O obtenidos 1.8 versus 2.1 (en promedio) para el tiempo de 2.5 y 5 minutos de tratamiento, respectivamente, puede deberse a que el proceso de injerto con plasma es lento a tiempos cortos, mientras que, cuando el tiempo aumenta, la velocidad del proceso de injerto se incrementa y, por ende, la cantidad de grupos injertados es mayor [86] [89].

**Tabla 3.1 Composición química en (%atómico) en la superficie de películas de PLA tratadas y sin tratar con plasma de Argón y AA.**

<b>Composición química superficial (% atómico)</b>				
<b>Tratamiento</b>		<b>C1s</b>	<b>O1s</b>	<b>C/O</b>
PLA sin tratamiento		<b>63.3</b>	<b>36.6</b>	<b>1.7</b>
20W	2.5min	<b>63.4</b>	<b>36.5</b>	<b>1.7</b>
30W	2.5min	<b>64.1</b>	<b>35.8</b>	<b>1.8</b>
40W	2.5min	<b>65.8</b>	<b>34.1</b>	<b>1.9</b>
20W	5 min	<b>68.0</b>	<b>31.3</b>	<b>2.1</b>
30W	5 min	<b>68.1</b>	<b>35.8</b>	<b>1.9</b>
40W	5 min	<b>70.6</b>	<b>29.3</b>	<b>2.4</b>

### 3.4 Ángulo de contacto

Los ángulos de contacto formados entre el líquido polar (agua) y las películas de PLA (con y sin tratamiento), proporcionan información sobre el carácter hidrófilo de las películas y, en consecuencia, dan una idea de la composición química de los polímeros tratados con AA.

Inicialmente se observó que la superficie de la película de PLA sin tratamiento mostró una superficie parcialmente hidrófoba, con un ángulo de contacto de  $73^\circ \pm 3^\circ$  (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**); si bien, este valor no puede considerarse propio de una superficie hidrofóbica, se desea incrementar la hidrofilia del material (disminuir el ángulo del contacto en agua) para mejorar la adhesión célula – material.

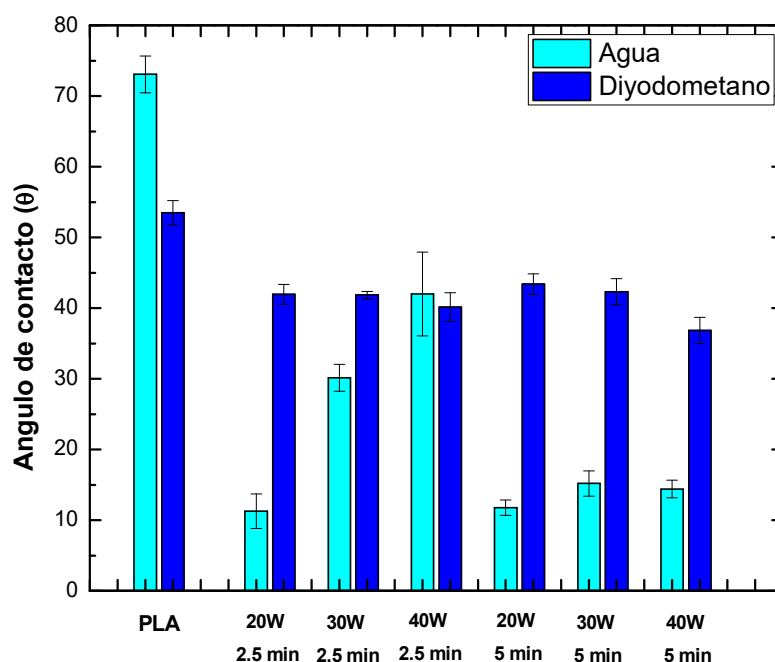


Figura 3.7 Ángulo de contacto de las películas de PLA sometidas a diferentes condiciones de plasma de AA.

La activación con plasma de argón (Ar), produjo una disminución del ángulo de contacto con agua de  $73^\circ$  (para el PLA sin tratamiento) a  $56^\circ$  aproximadamente (datos no mostrados en la Figura por tratarse solo del proceso de activación). Estos resultados coinciden con estudios previos donde se ha reportado que el tratamiento de las películas únicamente con plasma de Ar mejora la hidrofilia en la superficie de las películas [29], [32], [48], [90]–[93].



Cuando las películas de PLA son tratadas con plasma de AA, el ángulo de contacto formado entre éstas y el agua disminuye, con una tendencia que depende, de una manera importante, del tiempo de exposición. Para tiempos cortos (2.5 min), el ángulo de contacto disminuye a voltajes bajos y aumenta de nuevo cuando el voltaje se incrementa; mientras que para tiempos largos (5 min), el ángulo de contacto con agua parece no ser afectado por el voltaje ya que este parámetro oscila entre 10 y 15°.

Estos resultados sugieren que tiempos cortos (2.5 min) y potencias bajas (20W) son suficientes para reducir el ángulo de contacto de las películas de PLA, obteniéndose una superficie con alta hidrofilia (o súper-hidrófila); esta característica también puede ser obtenida con tiempos largos de exposición (5 min). Lo anterior indica la presencia de grupos polares en la superficie tratadas con plasma [94], aunque no necesariamente generadas por el injerto de grupos carboxílicos como se verá más adelante. Cabe recordar que durante la caracterización de las películas por FTIR, se observó una pequeña banda relacionada con el enlace O-H, en los materiales tratados con AA, por lo que se podría relacionar el aumento de la humectabilidad en la superficie del PLA, con la presencia de grupos polares del AA [95].

El incremento del ángulo de contacto en agua, cuando el voltaje aumenta (para un tiempo de tratamiento de 2.5 min), puede ser debido a que un aumento en la potencia del plasma conduce a una mayor fragmentación del monómero (AA), dando como resultado un menor injerto de grupos hidrofílicos [81]. En contraste, menores potencias y menores tiempos da como resultado una mejor retención de la grupos carboxilo [96][97][81].

Por otro lado, el ángulo de contacto formado entre el líquido no polar (diyodometano) y las películas tratadas, se mantiene prácticamente igual en ambos tiempos de exposición (2.5 y 5 min), aunque a tiempos largos se observa una muy ligera disminución. Lo anterior indica que el tratamiento con plasma también incrementa ligeramente la hidrofobia de la superficie.

### **3.5 Energía superficial**

Como se puede apreciar en la Tabla 3.2, la energía superficial de las películas de PLA tratadas con plasma, muestran un incremento notable de 40.5 mJ.m<sup>-2</sup> para la muestra de no tratada, hasta valores que oscilan alrededor de 70 mJ.m<sup>-2</sup> para las muestras tratadas. Interesantemente, este aumento en el valor de la energía superficial de las películas está íntimamente relacionado con el incremento de la componente polar de esta energía, ya que

aumenta de  $8 \text{ mJ.m}^{-2}$  hasta valores que van desde 22.7 hasta  $36.8 \text{ mJ.m}^{-2}$  es decir, la componente polar aumenta casi cuatro veces en promedio. En contraste, aunque la componente dispersiva de la energía también aumenta, este incremento no es tan grande como el de la componente polar. Lo anterior permite comprobar que el tratamiento con plasma está siendo efectivo para introducir grupos polares en la superficie del PLA, y permite corroborar los resultados previamente obtenidos.

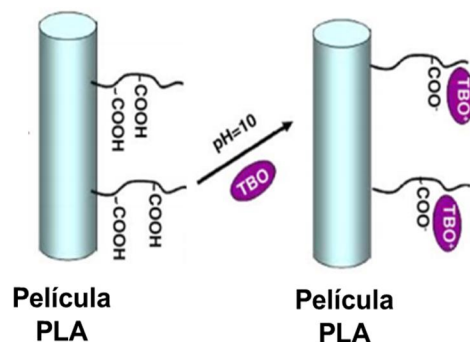
Es un hecho conocido que, la energía superficial aumenta con la presencia de grupos polares que contiene oxígeno, como es el caso de los carboxilo presentes en el AA [67].

Tabla 3.2 Energía superficial en películas de PLA bajo diferentes tratamientos con plasma.

Tratamiento		Ángulo de contacto (°)		Energía superficial ( $\text{mJ.m}^{-2}$ )		
Potencia (W)	Tiempo (min)	Agua destilada	Diyodo – metano	$Y^p_s$	$Y^d_s$	$Y_s$
Sin tratamiento		$73.0 \pm 3$	$53.4 \pm 2$	8.1	32.3	40.5
20 W	2.5	$11.2 \pm 2$	$41.9 \pm 1$	36.4	38.6	75.0
30 W	2.5	$30.1 \pm 2$	$41.8 \pm 1$	29.6	38.7	68.3
40 W	2.5	$42.0 \pm 6$	$40.1 \pm 2$	22.7	39.5	62.3
20 W	5.0	$11.7 \pm 1$	$43.3 \pm 1$	36.8	37.9	74.7
30 W	5.0	$15.1 \pm 2$	$42.3 \pm 2$	35.6	38.5	74.1
40 W	5.0	$14.4 \pm 1$	$36.8 \pm 2$	34.1	41.2	75.3

### 3.6 Cuantificación de Ácidos Carboxílicos por el método TBO

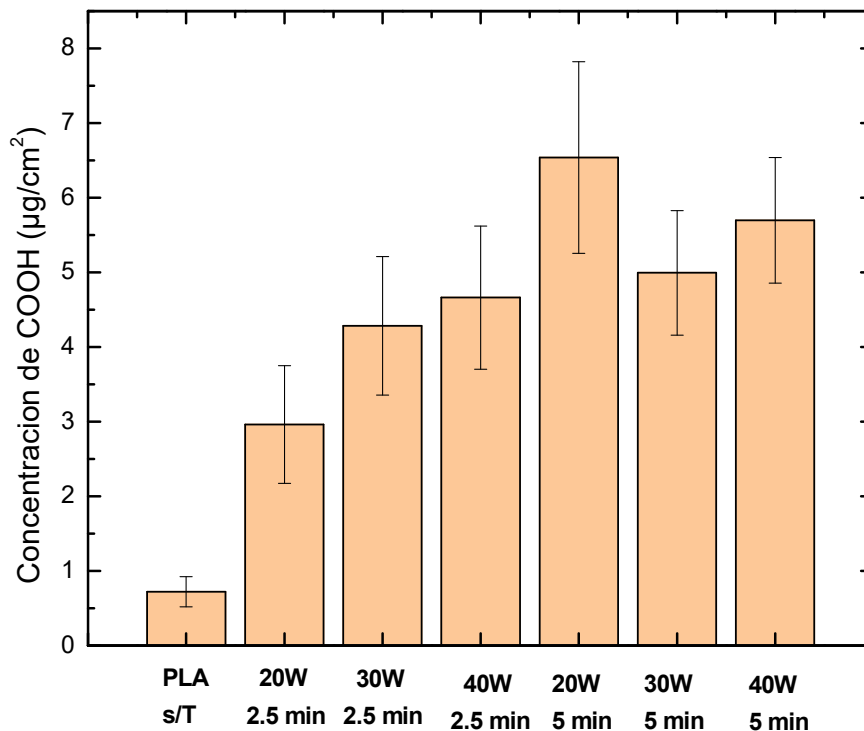
Con el fin de cuantificar la cantidad de grupos carboxílico en la superficie del PLA, se utilizó la técnica de TBO; de esta manera se estimó una densidad de injerto para cada muestra. Con el empleo de esta técnica es posible identificar la presencia de injertos de AA (a través de la presencia de grupos COOH), ya que el grupo amino contenido en la molécula del colorante azul de toluidina (TBO) catiónico, interactuará iónicamente con la carga negativa de los ácidos carboxílicos en un medio alcalino [98]. Por consiguiente, las películas de PLA tratadas con plasma de AA se tiñen de azul al reaccionar con el TBO y liberan este colorante al sumergir las películas en ácido acético debido a la disociación de los grupos de ácido carboxílico de las cadenas de PAA (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).



**Figura 3.8** Representación esquemática del complejo formado entre el TBO y películas de PLA tratadas con plasma de AA [98].

En la Figura 3.9, se presenta la cantidad de grupos carboxílicos (en microgramos por centímetro cuadrado), para las muestras de PLA tratadas y no tratadas. La muestra sin tratamiento exhibe una concentración de  $0.72 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , la cual podría deberse a los grupos terminales en la estructura del PLA.

En las muestras de PLA tratadas con plasma de AA durante un tiempo de reacción de 2.5 min, se observó un incremento en la densidad de grupos COOH, a medida que aumenta la potencia del plasma, llegando a valores de hasta  $4.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  con una potencia de 40W; esta cantidad representa casi 6.5 veces más grupos COOH que la muestra sin tratamiento. De igual forma, al incrementar el tiempo de reacción del plasma a 5 min se observa que la concentración de los COOHs aumenta y permanece constante (tomando en cuenta las desviaciones estándar obtenidas) al aumentar la potencia del plasma. Este comportamiento es diferente a lo que se reportó en estudios similares donde al aumentar el tiempo y la potencia del plasma se observó una disminución en la concentración de COOH al prolongar el tiempo de reacción ya que se estarían rompiendo los enlaces de la molécula de AA [99]. También se ha reportado que al incrementar la potencia del plasma se obtiene una fuerte fragmentación de las moléculas de AA, lo que resulta en una pérdida significativa de la estructura monomérica original, mientras que condiciones menos energéticas dan como resultado una mejor retención de los grupos carboxilo [96], aunque eso depende de los valores de potencia utilizados.



**Figura 3.9 Concentración de COOH en películas de PLA sometido a diferentes tratamientos con plasma.**

En la figura 3.10 se presenta la relación entre el ángulo de contacto y la concentración de grupos COOH's. Para el PLA sin tratamiento, el ángulo de contacto es alto ( $73^\circ$ ) y la concentración de COOH's es ( $0.72 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Interesantemente, parece existir una correlación entre el ángulo de contacto en agua y la cantidad de grupos carboxílicos presentes en la superficie. A tiempos cortos (2.5), aunque el aumento de la potencia parece incrementar el ángulo de contacto y con ello disminuir el carácter hidrófilo de la superficie, la cantidad de grupos COOH también aumenta. Lo anterior implica que los pocos grupos polares generados bajo estas condiciones son atribuidos a grupos carboxílicos. Esta conducta parece ser más clara a 5 minutos, donde ángulos de contacto bajos (para todas las potencias) dan los valores más altos de grupos COOH's, lo que implicaría que la hidrofilia generada por estas condiciones es atribuida a los grupos carboxílicos y no a otros grupos polares. Así, los resultados parecen confirmar que el AA se está injertando en la superficie de la película del PLA.

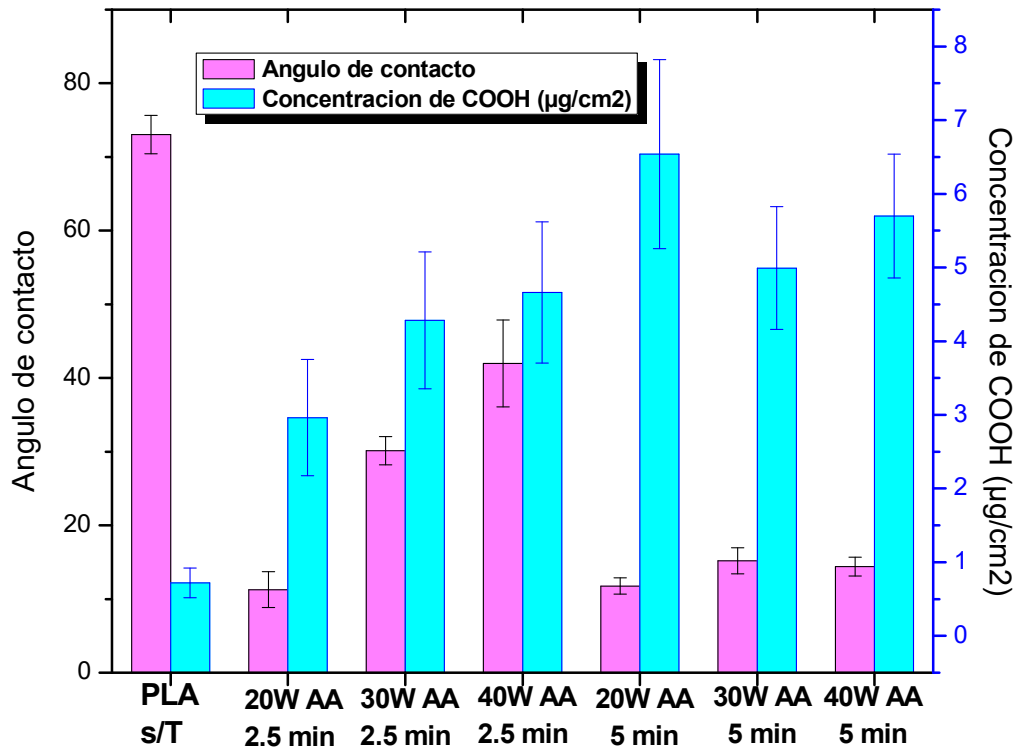


Figura 3.10 Cambios en el ángulo de contacto en relación con la concentración de COOH's obtenidos por TBO.

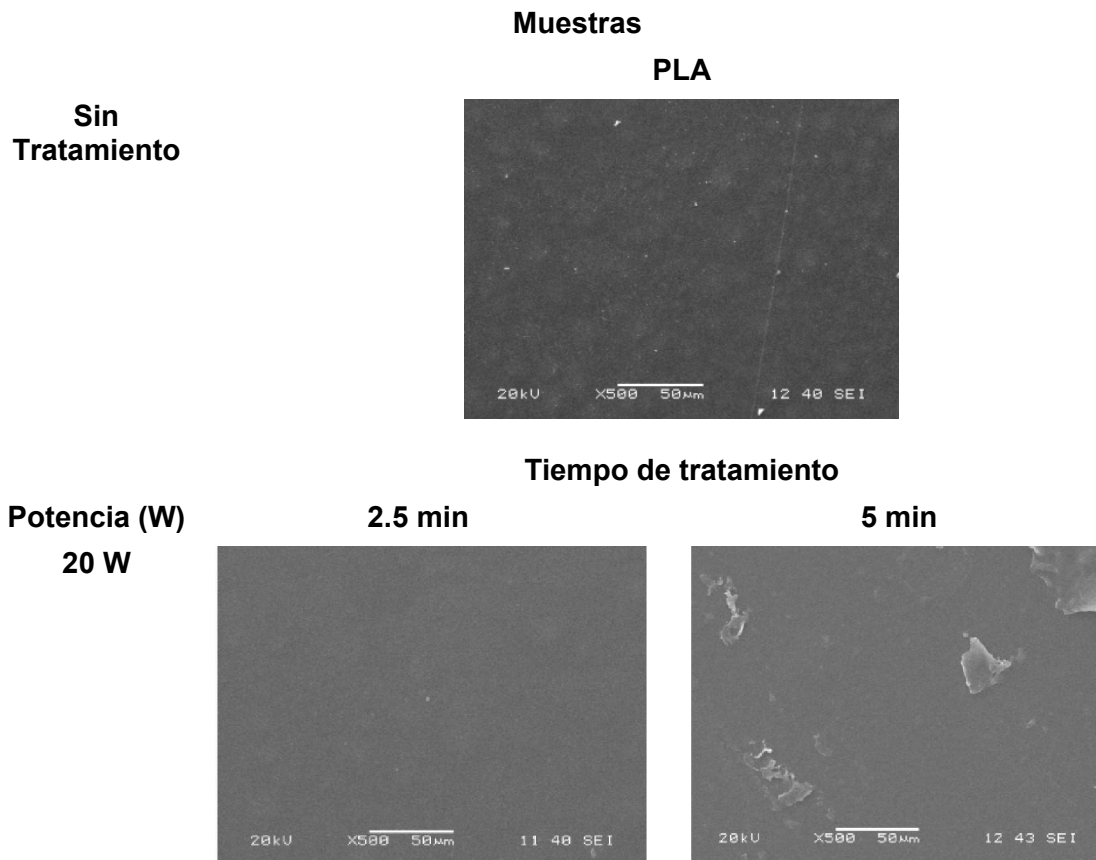
### 3.7 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Una de las características deseables en la morfología de los biomateriales para la ingeniería de tejidos es la creación de superficies que puedan provocar respuestas celulares específicas, y dirigir la regeneración de nuevos tejidos. Por ejemplo, se observó en diversos estudios que la fuerza de adhesión celular se vio favorecida por la rugosidad a nano o microescala, en comparación con superficies lisas [27]. Sin embargo, también se requiere de sustratos planos para promover la adhesión celular, puesto que las células tienen un área más amplia para adherirse (aplanarse) y, por lo tanto, pueden extenderse [100].

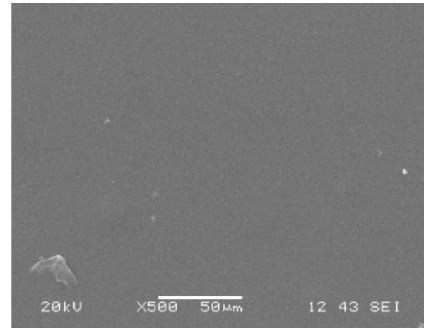
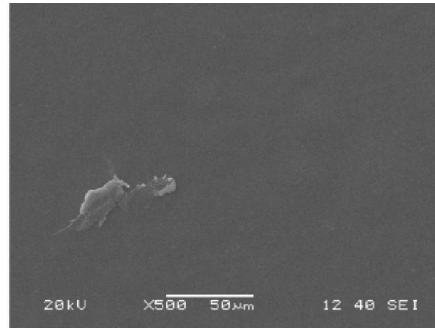
En la Tabla 3.3 se presentan las micrografías SEM de las películas de PLA sometidas a varios tratamientos con plasma de AA, siendo el PLA sin tratamiento el control. En el control, se observa que la superficie presenta una apariencia lisa, con cierta rugosidad en la superficie.

Por otra parte, las muestras tratadas presentan micrografías interesantes y es posible establecer un patrón respecto de la potencia del plasma y del tiempo de tratamiento. En términos generales se puede mencionar que, potencias altas y tiempos largos, generan mayores imperfecciones en la superficie de las películas de PLA tratadas con AA. De esta manera es posible visualizar en las micrografías, fragmentos de lo que tal vez pueda ser PAA y oquedades en la superficie, principalmente en las condiciones de tratamiento más agresivas (mayor tiempo y mayor potencia) resultados similares fueron reportados por Zhao 2013 [15], donde, a pesar de utilizar otros plasmas, concluyó que a mayores potencias en tratamiento, el efecto del plasma resulta más agresivo sobre la película del PLA.

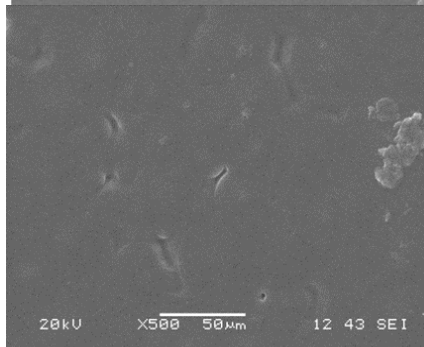
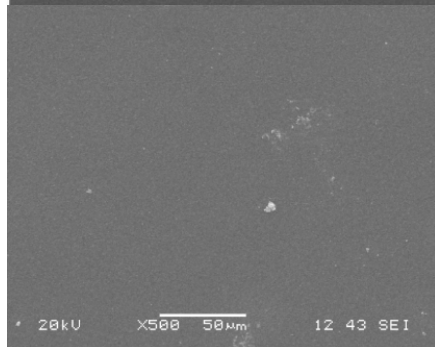
**Tabla 3.3 Imágenes SEM de las muestras de PLA tratadas con plasma de AA y sin tratamiento**



30 W



40 W



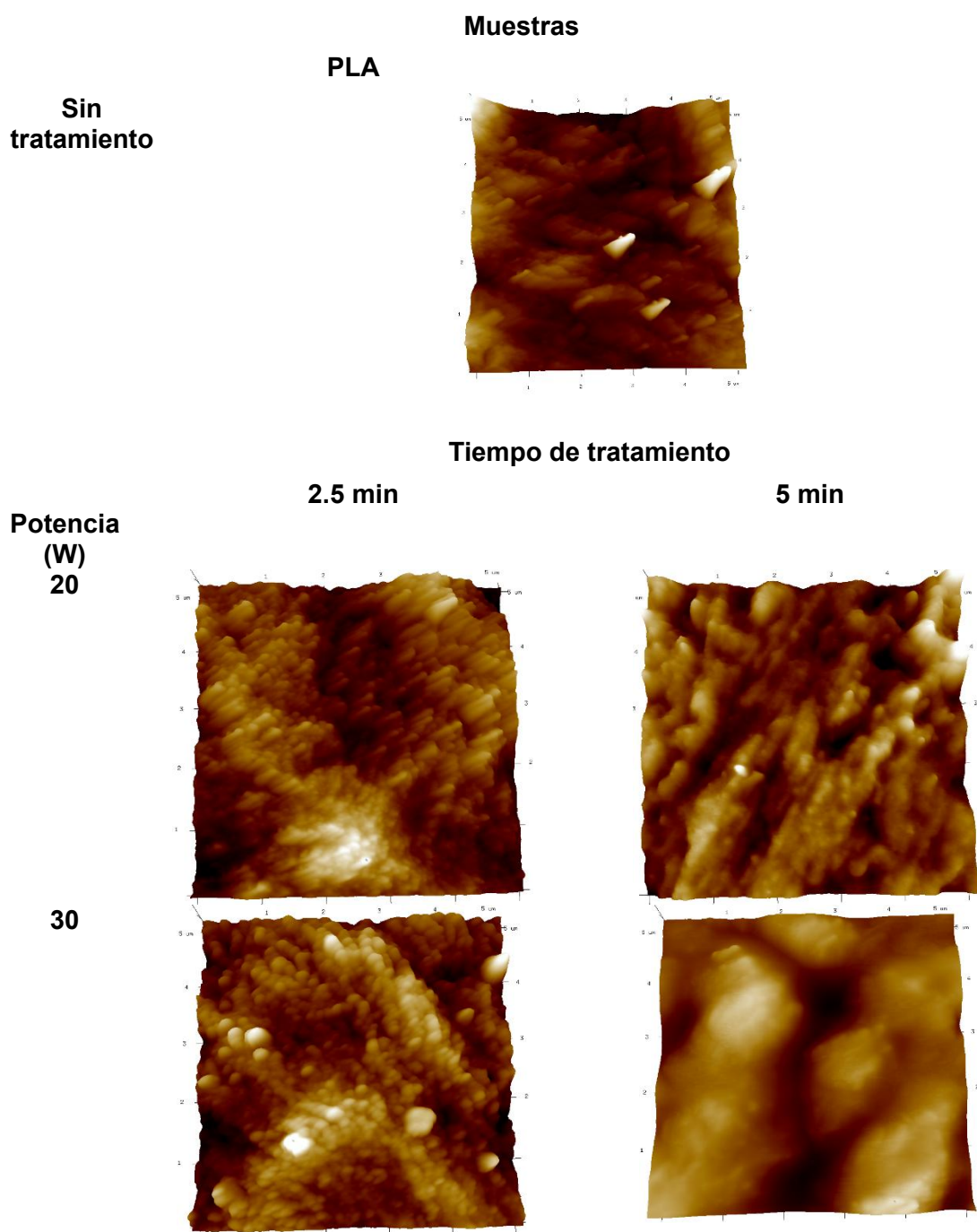
### 3.8 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Para corroborar los resultados obtenidos por SEM, se utilizó la técnica de AFM para observar la topografía de las muestras de PLA en escala nanométrica.

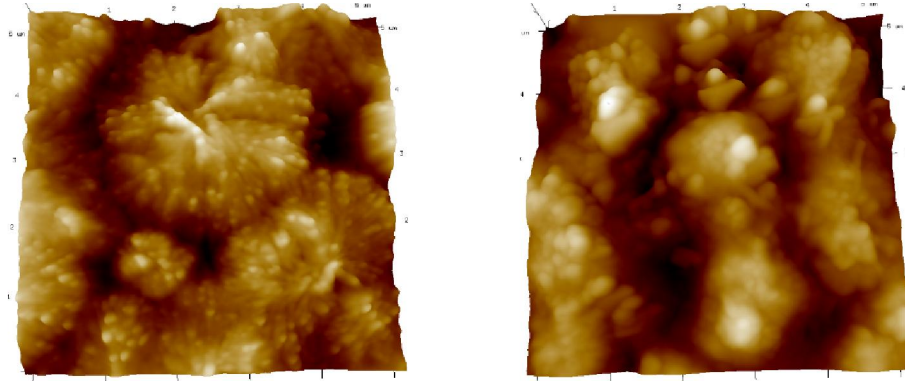
Los cambios en la topografía de la superficie se observan claramente al usar esta técnica de caracterización (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.4**). Las imágenes de AFM muestran que el tratamiento con plasma de AA da como resultado una topografía diferente a la del control (PLA tratamiento), con la presencia de mayor cantidad de picos que se transforman en estructuras anulares a medida que se aumenta tanto la potencia del plasma como el tiempo del tratamiento de este, en comparación con estructuras periódicas en forma de pico antes del tratamiento con plasma. El aumento de la rugosidad de la superficie se debe al efecto de grabado del tratamiento con plasma. Después del injerto con AA, se sugiere a que las cadenas de injerto modifican la superficie química del PLA, lo que podría favorecer la formación de un nuevo enlace tal como es el PAA sobre el PET como lo reporta Ying et al. [101].

El estudio con AFM confirma que el aumento en la rugosidad de la superficie ocurre en una escala nanométrica, y los resultados de la rugosidad superficial, en valores de ( $R_{rms}$ ), son reportados en la Tabla 3.5 [67].

Tabla 3.4 Imágenes del AFM de las muestras de PLA modificadas con plasma







Los resultados de las tablas 3.4 y 3.5 indican que el tratamiento con plasma de AA afectó claramente la topografía del material. El PLA sin tratamiento presenta una morfología superficial con ciertas irregularidades superficiales en forma de cono/pico, poco significativas, y una rugosidad superficial ( $Ra$ ) de 7.80 nm. Por su parte, los resultados de las muestras tratadas con plasma de AA indican que la rugosidad aumenta a medida que se incrementa la potencia del plasma; aunque esto se observó para ambos tiempos de exposición (2.5 y 5 min), el incremento solo fue estadísticamente significativo (respecto de la muestra sin tratamiento), en aquellas superficies tratadas durante 5 minutos. De esta manera, es posible postular que la potencia del plasma aumenta gradualmente la rugosidad superficial, sin embargo, el efecto del tiempo de exposición causa un mayor impacto en la modificación superficial del material. Stankevich 2017 [102] concluyó que las características estructurales de la superficie observadas en el PLA tratado con plasma de AA son causadas por el atrapamiento del PAA.

**Tabla 3.5 Rugosidad de las superficies de las muestras.**

Tratamiento		Rugosidad (nm)
Potencia (W)	Tiempo (min)	
Sin tratamiento		$7.8 \pm 1.9$
20 W	2.5	$9.8 \pm 2.5$
30 W	2.5	$13.7 \pm 0.9$
40 W	2.5	$10.6 \pm 1.7$
20 W	5.0	$23.9 \pm 3.5$
30 W	5.0	$18.1 \pm 2.8$
40 W	5.0	$33.8 \pm 3.8$

### 3.9 Viabilidad células de fibroblastos dérmicos sobre películas de PLA

En este trabajo se llevó a cabo un ensayo de proliferación celular utilizando la técnica de Alamar Blue®, y los resultados son presentados como absorbancia a 570 nm (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Debido a que la generación de la coloración azul es directamente proporcional a la actividad oxidativa de la enzima deshidrogenasa, la disminución en los valores que se obtengan al medir la absorbancia se puede correlacionar a la actividad metabólica y, determinar de esta manera, la viabilidad celular del material. Este término está relacionado con el número de células sanas en una muestra [103].

Las células de fibroblastos proliferaron en todas las películas de PLA tratadas con plasma de AA demostrando que, independientemente de las condiciones del plasma utilizados en el presente trabajo, todos los tratamientos pueden considerarse como no citotóxicos, según establecido en ISO Estándar 10993-5. Así mismo, las células proliferan de igual forma con el material, que sin él; es decir, la viabilidad del material no mejora con los tratamientos con plasma, pero mantiene dicha viabilidad; con estos ensayos confirmamos la no citotoxicidad del PLA hacia las células.

El análisis estadístico de los resultados indica que el PLA tratado con plasma de AA a 30 W durante 2.5 min, presenta un ligero aumento en la viabilidad celular con respecto a la muestra sin andamio (control) y con respecto a los demás tratamientos, para el día 1. En contraste, los resultados de viabilidad al día 3 muestran una disminución con respecto al día 1, para todos los tratamientos. A pesar de lo anterior, todos los valores siguen por arriba del 70% de viabilidad que marca la norma para considerar a un material como no citotóxico.

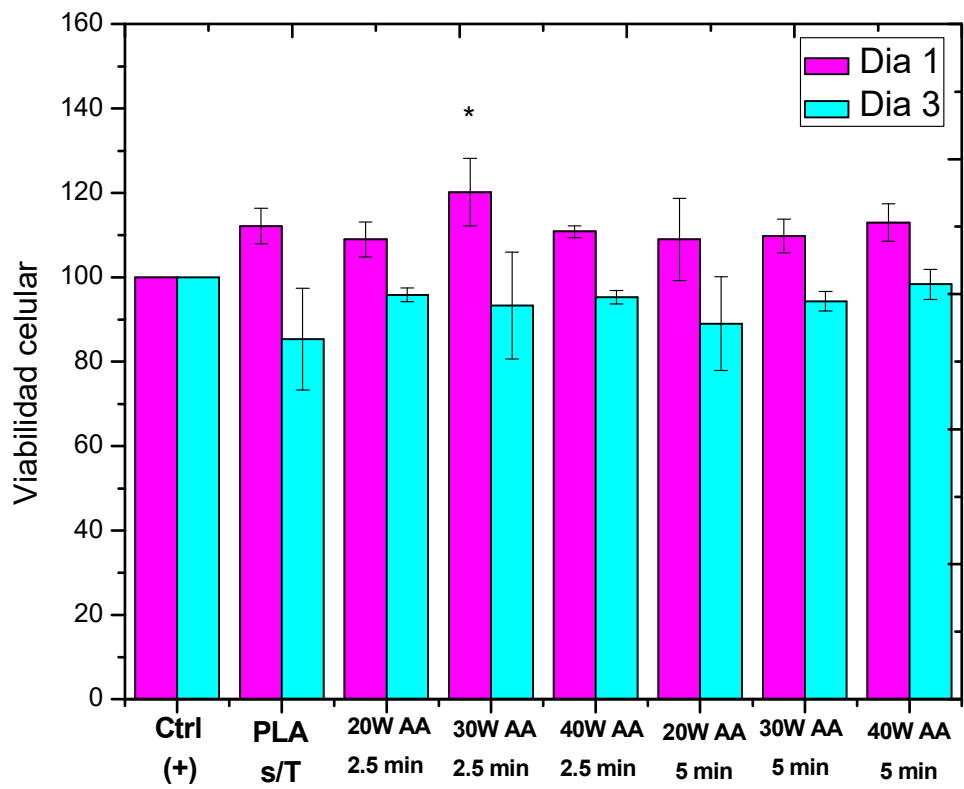


Figura 3.11 Ensayos de proliferación celular a 570 nm.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo, nos permitió llegar a las siguientes conclusiones:

- a) Las pruebas de FTIR y XPS permiten postular que la superficie de las películas de PLA experimenta un cambio en su composición química, cuando éstas son tratadas con plasma de AA. Lo anterior fue confirmado por los resultados de ángulo de contacto en agua y los valores de energía superficial obtenidos por el método Owens - Wendt, ya que se observa un claro incremento en la componente polar de los materiales.
- b) La densidad de injerto del poli (ácido acrílico) se vio influenciado por el tiempo y potencia del tratamiento con plasma.
- c) Los resultados obtenidos por SEM y AFM demuestran que el tratamiento con plasma genera imperfecciones en la superficie de las películas de PLA y aumenta la rugosidad de las mismas. Este efecto es más notorio cuando la potencia es alta (40W) y el tiempo es más largo (5 min).
- d) Aunque los resultados de viabilidad celular con fibroblastos dérmicos fueron satisfactorios porque todos los materiales resultaron ser no citotóxicos, no se pudo establecer una correlación entre este parámetro y la química de las superficies obtenidas.

## RECOMENDACIONES PARA FUTUROS TRABAJOS

Entre las recomendaciones que se hacen para trabajos futuros se pueden mencionar las siguientes:

- a) Estudiar la viabilidad celular de las muestras tratadas a mayores tiempos.
- b) Completar la caracterización fisicoquímica de las películas tratadas utilizando técnicas como Raman, EDS, entre otras.
- c) Estudiar el efecto del tratamiento con plasma, sobre las propiedades mecánicas de las películas de PLA.

## REFERENCIAS

- [1] J. H. Lee, G. S. Khang, J. W. Lee, and H. B. Lee, "Interactions of proteins and cells on functional group gradient surfaces," *Macromol. Symp.*, vol. 118, no. 4, pp. 571–576, 1997.
- [2] E. Colín Orozco, *Síntesis de Polímeros Biocompatibles por Plasma*, Universidad Autónoma Metropolitana, México, 2007.
- [3] S. E. Rodil, "Modificación Superficial De Biomateriales Metálicos," *Materiales*, vol. 29, no. 2, pp. 67–83, 2009.
- [4] T. Patrício, M. Domingos, A. Gloria, and P. Bártolo, "Characterisation of PCL and PCL/PLA scaffolds for tissue engineering," *Procedia CIRP*, vol. 5, pp. 110–114, 2013.
- [5] Z. Cheng and S. Teoh, "Surface modification of ultra thin poly (  $\epsilon$ -caprolactone ) films using acrylic acid and collagen," *Biomaterials*, vol. 25, no. 11, pp. 1991–2001, 2004.
- [6] N. Encinas, M. Pantoja, J. Abenojar, and M. A. Martínez, "Control of wettability of polymers by surface roughness modification," *J. Adhes. Sci. Technol.*, vol. 24, no. 11–12, pp. 1869–1883, 2010.
- [7] R. Bitar, P. Cools, N. De Geyter, and R. Morent, "Acrylic acid plasma polymerization for biomedical use," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 448, no. 1, pp. 168–185, 2018.
- [8] B. Gupta, S. Saxena, and A. Ray, "Plasma Induced Graft Polymerization of Acrylic Acid onto Polypropylene Monofilament," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 107, no. 1, pp. 2–8, 2007.
- [9] S. Lee, G. Hsiue, C. Kao, and P. Chuen-thuen, "Plasma-induced grafted polymerization of acrylic acid and subsequent grafting of collagen onto polymir film as biomateriah," vol. 17, no. 16, pp. 1599–1608, 1996.
- [10] H. Sun, L. Zhang, H. Chai, and H. Chen, "Surface modification of poly ( tetrafluoroethylene ) films via plasma treatment and graft copolymerization of acrylic acid," *Desalination*, vol. 192, no. 1–3, pp. 271–279, 2006.
- [11] J. H. Lee, G. Khang, J. W. Lee, and H. B. Lee, "Interaction of Different Types of Cells on Polymer Surfaces with Wettability Gradient," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 205, no. 2, pp. 323–330, 1998.
- [12] P. B. Van Wachem, T. Beugeling, J. Feijen, and J. P. Detmers, "Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities," *Biomaterials*, vol. 6, no. 6, pp. 403–408, 1985.
- [13] A. V Janorkar, A. T. Metters, and D. E. Hirt, "Modification of Poly ( lactic acid ) Films : Enhanced Wettability from Surface-Confined Photografting and Increased Degradation Rate Due to an Artifact of the Photografting Process," *Macromolecules*, vol. 37, no. 24, pp. 9151–9159, 2004.
- [14] K. Park, Y. M. Ju, J. S. Son, K. Ahn, and D. Keun, "Surface modification of biodegradable electrospun nanofiber scaffolds and their interaction with fibroblasts nanofiber scaffolds and their interaction with fibroblasts," *J. Biomater. Sci.*, vol. 18, no. 4, pp. 369–382, 2007.

- [15] Y. Zhao, A. Fina, A. Venturello, and F. Geobaldo, "Effects of gas atmospheres on poly(lactic acid) film in acrylic acid plasma treatment," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 283, pp. 181–187, 2013.
- [16] Y. Tamada and Y. Ikada, "Cell adhesion to plasma-treated polymer surfaces," *Polymer (Guildf.)*, vol. 34, no. 10, pp. 2208–2212, 1993.
- [17] B. Gupta, C. Plummer, I. Bisson, and P. Frey, "Plasma-induced graft polymerization of acrylic acid onto poly ( ethylene terephthalate ) films : characterization and human smooth muscle cell growth on grafted films," *Biomaterials*, vol. 23, no. 3, pp. 863–871, 2002.
- [18] B. Gupta, K. Krishnanand, and B. L. Deopura, "Oxygen plasma-induced graft polymerization of acrylic acid on polycaprolactone monofilament," *Eur. Polym. J.*, vol. 48, no. 11, pp. 1940–1948, 2012.
- [19] B. Gupta, J. G. Hilborn, I. Bisson, and P. Frey, "Plasma-Induced Graft Polymerization of Acrylic Acid onto Poly ( ethylene terephthalate ) Films," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 81, no. 12, pp. 2993–3001, 2001.
- [20] H. Mirzadeh and M. Dadsetan, "Platelet Adhesion on Laser-Induced Acrylic Acid – Grafted Polyethylene Terephthalate," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 86, no. 13, pp. 3191–3196, 2002.
- [21] S. Saxena *et al.*, "Development of a New Polypropylene-Based Suture : Plasma Grafting , Surface Treatment , Characterization , and Biocompatibility Studies," *Macromol Biosci*, vol. 11, no. 3, pp. 373–382, 2011.
- [22] M. Dhayal and S. Cho, "Leukemia cells interaction with plasma-polymerized acrylic acid coatings," *Vacuum*, vol. 80, no. 6, pp. 636–642, 2006.
- [23] L. Detomaso, R. Gristina, R. Agostino, G. S. Senesi, and P. Favia, "Plasma deposited acrylic acid coatings : Surface characterization and attachment of 3T3 murine fibroblast cell lines," *Surf. Coat. Technol.*, vol. 200, no. 1–4, pp. 1022–1025, 2005.
- [24] L. Detomaso, R. Gristina, G. S. Senesi, and P. Favia, "Stable plasma-deposited acrylic acid surfaces for cell culture applications," *Biomaterials*, vol. 26, no. 18, pp. 3831–3841, 2005.
- [25] S. Saxena, A. R. Ray, and B. Gupta, "Graft Polymerization of Acrylic Acid onto Polypropylene Monofilament by RF Plasma," *Rev. Cienc. Apl. polímeros*, vol. 116, no. 5, pp. 2884–2892, 2010.
- [26] A. C. Colorado, C. A. Agudelo, M. Elena, and A. Moncada, "Análisis de biomateriales para uso en ingeniería de tejido de piel : revisión," *Rev. Ing. Biomédica*, vol. 7, no. 14, pp. 11–23, 2013.
- [27] Y. Jiao and F. Cui, "Surface modification of polyester biomaterials for tissue engineering," *Biomed. Mater*, vol. 2, no. 4, pp. 24–37, 2007.
- [28] E. Baran and H. Erbil, "Surface Modification of 3D Printed PLA Objects by Fused Deposition Modeling: A Review," *Colloids and Interfaces*, vol. 3, no. 2, p. 43, 2019.
- [29] P. Cools, N. De Geyter, and R. Morent, "PLA Enhanced via Plasma Technology : A Review," in *In: New Developments in Polylactic Acid Research*, New York, NY, USA: Nova Science, 2015, p. 32.

- [30] E. V. Le, S. Wang, W. Cui, and J. Bei, "Bulk and surface modifications of polylactide," *Anal Bioanal Chem*, vol. 381, no. 3, pp. 547–556, 2005.
- [31] M. Nakagawa, F. Teraoka, S. Fujimoto, Y. Hamada, H. Kibayashi, and J. Takahashi, "Improvement of cell adhesion on poly ( L-lactide ) by atmospheric plasma treatment," *J Biomed Mater Res*, vol. 77, no. 1, pp. 112–118, 2006.
- [32] T. Jacobs, H. Declercq, N. De Geyter, and R. Cornelissen, "Plasma surface modification of polylactic acid to promote interaction with fibroblasts," *J Mater Sci Mater Med*, vol. 24, no. 2, pp. 469–478, 2013.
- [33] A. E. Swilem *et al.*, "Developing a biomaterial interface based on poly(lactic acid) via plasma-assisted covalent anchorage of D-glucosamine and its potential for tissue regeneration," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 148, pp. 59–65, 2016.
- [34] P. X. Ma, "Biomimetic materials for tissue engineering," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 2, pp. 184–198, 2008.
- [35] C. O. F. Page, L. G. Griffith, and G. Naughton, "Tissue Engineering — Current Challenges and Expanding Opportunities," *Science (80- )*, vol. 295, no. 5557, pp. 1009–1014, 2002.
- [36] D. Katti, R. Vasita, and K. Shanmugam, "Improved Biomaterials for Tissue Engineering Applications: Surface Modification of Polymers," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 8, no. 4, pp. 341–353, 2008.
- [37] M. Yamaguchi, M. S. T. Shinbo, T. Kanamori, P. Wang, M. Niwa, and M. S. H. Kawakami, "Surface modification of poly ( L-lactic acid ) affects initial cell attachment , cell morphology , and cell growth," *J. Artif. Organs*, vol. 7, no. 4, pp. 187–193, 2004.
- [38] R. Langer and J. P. Vacanti, "Tissue Engineering," *Science (80- )*, vol. 260, no. 5110, pp. 920–926, 1993.
- [39] M. Rizwan, J. W. Tse, A. Nori, K. W. Leong, and E. K. F. Yim, *Cell e Substrate Interactions*. 2019.
- [40] H. Shin, S. Jo, and A. G. Mikos, "Biomimetic materials for tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 24, no. 24, pp. 4353–4364, 2003.
- [41] M. D. Castellano, "Ingeniería Biomimética e Ingeniería Tisular . Reflexión sobre el ingeniero del siglo XXI," Sevilla, 2014.
- [42] D. E. Glaser and C. Viney, "Biomimetic Materials," in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Third Edit., Elsevier, 1987, pp. 349–360.
- [43] D. Brüggemann, J. P. Frohnmayer, and J. P. Spatz, "Model systems for studying cell adhesion and biomimetic actin networks," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 5, no. 1, pp. 1193–1202, 2014.
- [44] E. M. Balzer and K. Konstantopoulos, "Intercellular adhesion : mechanisms for growth and metastasis of epithelial cancers," *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, vol. 4, no. 2, pp. 171–181, 2012.
- [45] A. A. Calvert P, "Biomimetic Materials : Properties and Processing," *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*. pp. 595–602, 2001.
- [46] A. A. Khalili and M. R. Ahmad, "A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical



- and Biological Applications,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 8, pp. 18149–18184, 2015.
- [47] T. Reintjes, J. Tessmar, and A. Göpferich, “Biomimetic polymers to control cell adhesion,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 18, no. 1, pp. 15–24, 2008.
- [48] C. Chaiwong, P. Rachtanapun, P. Wongchaiya, R. Auras, and D. Boonyawan, “Surface & Coatings Technology Effect of plasma treatment on hydrophobicity and barrier property of polylactic acid,” *Surf. Coat. Technol.*, vol. 204, no. 18–19, pp. 2933–2939, 2010.
- [49] Z. Ma, C. Gao, Y. Gong, and J. Shen, “Chondrocyte behaviors on poly- L -lactic acid ( PLLA ) membranes containing hydroxyl , amide or carboxyl groups,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 21, pp. 3725–3730, 2003.
- [50] Y. Cheng, S. Deng, P. Chen, and R. Ruan, “Polylactic acid ( PLA ) synthesis and modifications : a review,” *Front. Chem. China*, vol. 4, no. 3, pp. 259–264, 2009.
- [51] R. Advanced, D. Delivery, S. Farah, D. G. Anderson, and R. Langer, “Physical and mechanical properties of PLA , and their functions in,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 107, no. 15, pp. 367–392, 2016.
- [52] M. Bryjak and A. Frankiewicz, “Modification of polysulfone membranes . 2 . Plasma grafting and plasma polymerization of acrylic acid,” *Acta Polym*, vol. 50, no. 9, pp. 317–326, 1999.
- [53] N. De Geyter and R. Morent, *Cold plasma surface modification of biodegradable polymer biomaterials*. Woodhead Publishing Limited, 2014.
- [54] R. N. S. Sodhi, “Application of surface analytical and modification techniques to biomaterial research,” *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena*, vol. 81, no. 3, pp. 269–284, 1996.
- [55] P. K. Chu, J. Y. Chen, L. P. Wang, and N. Huang, “Plasma-surface modification of biomaterials,” *Mater. Sci. Eng.*, vol. 36, no. 5–6, pp. 143–206, 2002.
- [56] R. D. S. and D. A. S. E. J. Szili, “Surface modification of biomaterials by plasma polymerization,” *Surf. Modif. Biomater. Woodhead Publ.*, pp. 3–39, 2011.
- [57] N. Recek, “Biocompatibility of Plasma-Treated Polymeric Implants,” *Materials (Basel)*, vol. 12, no. 2, p. 240, 2019.
- [58] T. Desmet, R. Morent, N. De Geyter, C. Leys, E. Schacht, and P. Dubruel, “Nonthermal Plasma Technology as a Versatile Strategy for Polymeric Biomaterials Surface Modification : A Review,” *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 9, pp. 2351–2378, 2009.
- [59] Z. Zhihong, “Surface Modification by Plasma Polymerization and Application of Plasma Polymers as Biomaterials,” Verlag nicht ermittelbar., China, 2003.
- [60] L. A. Can-Herrera, A. Ávila-Ortega, S. de la Rosa-García, A. I. Oliva, J. V. Cauich-Rodríguez, and J. M. Cervantes-Uc, “Surface modification of electrospun polycaprolactone microfibers by air plasma treatment: Effect of plasma power and treatment time,” *Eur. Polym. J.*, vol. 84, pp. 502–513, 2016.
- [61] R. M. France, R. D. Short, E. Duval, F. R. Jones, R. A. Dawson, and S. Macneil, “Plasma Copolymerization of Allyl Alcohol / 1 , 7-Octadiene : Surface Characterization

- and Attachment of Human Keratinocytes,” vol. 4756, no. 6, pp. 1176–1183, 1998.
- [62] Y. Hsieh and M. Wut, “Residual Reactivity for Surface Grafting of Acrylic Acid on Argon Glow-Discharged Poly ( ethylene terephthalate ) ( PET ) Films,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 43, no. 11, pp. 2067–2082, 1991.
- [63] K. Johnsen and K. Redford, “Modification of Polyolefin Surfaces by Plasma-Induced Grafting,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 59, no. 10, pp. 1651–1657, 1996.
- [64] V. N. Vasilets *et al.*, “Microwave CO<sub>2</sub> plasma-initiated vapour phase graft polymerization of acrylic acid onto polytetrafluoroethylene for immobilization of human thrombomodulin,” *Biomaterials*, vol. 18, no. 17, pp. 1139–1145, 1997.
- [65] D. S. Wavhal and E. R. Fisher, “Hydrophilic modification of polyethersulfone membranes by low temperature plasma-induced graft polymerization,” *J. Memb. Sci.*, vol. 209, no. 1, pp. 255–269, 2002.
- [66] Z. Zhao, J. Li, D. Zhang, and C. Chen, “Nanofiltration membrane prepared from polyacrylonitrile ultrafiltration membrane by low-temperature plasma I. Graft of acrylic acid in gas,” *J. Memb. Sci.*, vol. 232, no. 1–2, pp. 1–8, 2004.
- [67] A. Jordá-vilaplana, V. Fombuena, D. García-garcía, M. D. Samper, and L. Sánchez-nácher, “Surface modification of polylactic acid ( PLA ) by air atmospheric plasma treatment,” *Eur. Polym. J.*, vol. 58, pp. 23–33, 2014.
- [68] B. Gupta, J. G. Hilborn, I. Bisson, and P. Frey, “Plasma-Induced Graft Polymerization of Acrylic Acid onto Poly ( ethylene terephthalate ) Films,” *Biomaterials*, vol. 23, no. 3, pp. 863–871, 2001.
- [69] I. Fernández-cervantes *et al.*, “Cell-free scaffold from jellyfish *Cassiopea andromeda* (Cnidaria; Scyphozoa) for skin tissue engineering,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 111, no. 130, p. 110748, 2020.
- [70] M. Luisa *et al.*, “Development of collagen-EDC scaffolds for skin tissue engineering : physicochemical and biological characterization,” *IJOER Eng. J.*, vol. 2, no. 4, pp. 73–83, 2016.
- [71] N. Rodríguez-fuentes *et al.*, “Biochemical and Biophysical Research Communications Nukbone Ò promotes proliferation and osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic membrane,” *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 434, no. 3, pp. 676–680, 2013.
- [72] M. Bashir and S. Bashir, “Polymerization of acrylic acid using atmospheric pressure DBD plasma jet,” *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 146, no. 1, pp. 1–9, 2016.
- [73] P. Pacheco, “Caracterización de espectros de aire y mezcla aire-argón mediante la técnica de Espectroscopía de Plasma producido por Láser, LPPS,” *Bistua Rev. la Fac. Ciencias Básicas*, vol. 7, no. 2, pp. 17–23, 2009.
- [74] T. Para, “Estudio físico sobre la interacción de plasmas atmosféricos con colorantes textiles: caso negro ácido 194,” Universidad Autónoma del Estado de México, 2018.
- [75] T. Elzein, M. Nasser-eddine, C. Delaite, S. Bistac, and P. Dumas, “FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 273, no. 2, pp. 381–387, 2004.

- [76] J. R. Rocca-smith *et al.*, "SC," *Polym. Degrad. Stab.*, 2016.
- [77] A. Abdolmaleki and Z. Mohamadi, "Acidic ionic liquids catalyst in homo and graft polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone," *Colloid Polym Sci*, vol. 291, no. 8, pp. 1999–2005, 2013.
- [78] N. De Geyter, R. Morent, and C. Leys, "Surface characterization of plasma-modified polyethylene by contact angle experiments and ATR-FTIR spectroscopy," *Surf. Interface Anal. An Int. J. devoted to Dev. Appl. Tech. Anal. surfaces, interfaces thin Film.*, vol. 40, no. 3–4, pp. 608–611, 2008.
- [79] H. Desai, "Synthesis of Biodegradable Polylactic Acid Polymer By Using Lactic Acid Monomer," *Int. J. Appl. Chem.*, vol. 13, no. 2, pp. 377–384, 2017.
- [80] L. Nothdurft, G. Buse, H. Thissen, and D. Klee, "High density binding of proteins and peptides to poly ( D , L -lactide ) grafted with polyacrylic acid," *Biomaterials*, vol. 23, no. 16, pp. 3523–3531, 2002.
- [81] S. Zanini, R. Ziano, and C. Riccardi, "Stable poly(Acrylic Acid) films from acrylic acid/argon plasmas: Influence of the mixture composition and the reactor geometry on the thin films chemical structures," *Plasma Chem. Plasma Process.*, vol. 29, no. 6, pp. 535–547, 2009.
- [82] I. Topala, N. Dumitrascu, and G. Popa, "Properties of the acrylic acid polymers obtained by atmospheric pressure plasma polymerization," *Nucl. Inst. Methods Phys. Res. B*, vol. 267, no. 2, pp. 442–445, 2009.
- [83] R. Jantas, S. Połowiński, D. Stawski, and J. Szumilewicz, "Modification of a polylactide fibre surface," *Fibres Text. East. Eur.*, vol. 81, no. 4, pp. 87–91, 2010.
- [84] R. Morent *et al.*, "Stability study of polyacrylic acid films plasma-polymerized on polypropylene substrates at medium pressure," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 257, no. 2, pp. 372–380, 2010.
- [85] F. Teraoka, M. Nakagawa, and M. Hara, "Surface modification of poly(L-lactide) by atmospheric pressure plasma treatment and cell response," *Dent. Mater. J.*, vol. 25, no. 3, pp. 560–565, 2006.
- [86] E. Číková, J. Kuliček, I. Janigová, and M. Omastová, "Electrospinning of ethylene vinyl acetate/Poly(Lactic Acid) blends on a water surface," *Materials (Basel)*, vol. 11, no. 9, p. 1737, 2018.
- [87] A. Shah, S. Shah, G. Mani, J. Wenke, and M. Agrawal, "Endothelial cell behaviour on gas-plasma-treated PLA surfaces : the roles of surface chemistry and roughness," *J Tissue Eng Regen Med*, vol. 5, no. 4, pp. 301–312, 2011.
- [88] R. Jafari, F. Arefi-Khonsari, M. Tatoulian, D. Le Clerre, L. Talini, and F. Richard, "Development of oligonucleotide microarray involving plasma polymerized acrylic acid," *Thin Solid Films*, vol. 517, no. 19, pp. 5763–5768, 2009.
- [89] M. R. Alexander and T. M. Duc, "The chemistry of deposits formed from acrylic acid plasmas," *J. Mater. Chem.*, vol. 8, no. 4, pp. 937–943, 1998.
- [90] M. Sheets, P. L-lactic, T. Hirotsu, T. Tsujisaka, A. Mas, and F. Schue, "Plasma Surface Treatments of Melt-Extruded Sheets of Poly( L-Lactic acid)," *Polym. Eng. Sci.*, vol. 42, no. 2, pp. 299–306, 2002.

- [91] H. Lee *et al.*, "Applied Surface Science Role of reactive gas in atmospheric plasma for cell attachment and proliferation on biocompatible poly e -caprolactone film," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 254, no. 18, pp. 5700–5705, 2008.
- [92] A. Martins *et al.*, "Surface Modification of Electrospun Polycaprolactone Nanofiber Meshes by Plasma Treatment to Enhance Biological Performance," *Small*, vol. 5, no. 10, pp. 1195–1206, 2009.
- [93] R. R. M. D. Conceição, I. D. D., Silva, L. R. C. D., Alves, T. S., Barbosa, R., & Sousa, "Investigation of the Wettability Using Contact Angle Measurements of Green Polyethylene Flat Films and Expanded Vermiculite Clay Treated by Plasma 2 . Materials and Methods," *Mater. Res.*, vol. 22, pp. 1–7, 2019.
- [94] N. De Geyter *et al.*, "Plasma modification of polylactic acid in a medium pressure DBD," *Surf. Coatings Technol.*, vol. 204, no. 20, pp. 3272–3279, 2010.
- [95] I. Armentano, G. Ciapetti, and M. Pennacchi, "Role of PLLA Plasma Surface Modification in the Interaction with Human Marrow Stromal Cells," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 114, no. 6, pp. 3602–3611, 2009.
- [96] P. Pleskunov *et al.*, "Plasma Polymerization of Acrylic Acid for the Tunable Synthesis of Glassy and Carboxylated Nanoparticles," *J. Phys. Chem. B*, vol. 124, no. 4, pp. 668–678, 2020.
- [97] O. Carton, D. Ben Salem, S. Bhatt, J. Pulpytel, and F. Arefi-Khonsari, "Plasma polymerization of acrylic acid by atmospheric pressure nitrogen plasma jet for biomedical applications," *Plasma Process. Polym.*, vol. 9, no. 10, pp. 984–993, 2012.
- [98] E. T. Kang, K. L. Tan, K. Kato, Y. Uyama, and Y. Ikada, "Surface Modification and Functionalization of Polytetrafluoroethylene Films," *Macromolecules*, vol. 29, no. 96, pp. 6872–6879, 1996.
- [99] B. R. Pistillo, L. Detomaso, E. Sardella, P. Favia, and R. Agostino, "RF-Plasma Deposition and Surface Characterization of Stable ( COOH ) -Rich Thin Films from Cyclic L -Lactide," *Plasma Process. Polym.*, vol. 4, pp. 817–820, 2007.
- [100] M. A. Mateos-Timoneda, O. Castano, J. A. Planell, and E. Engel, "Effect of structure, topography and chemistry on fibroblast adhesion and morphology," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 25, no. 7, pp. 1781–1787, 2014.
- [101] L. Ying *et al.*, "Immobilization of galactose ligands on acrylic acid graft-copolymerized poly(ethylene terephthalate) film and its application to hepatocyte culture," *Biomacromolecules*, vol. 4, no. 1, pp. 157–165, 2003.
- [102] K. S. Stankevich, N. V Danilenko, R. M. Gadirov, S. I. Goreninskii, S. I. Tverdokhlebov, and V. D. Filimonov, "A new approach for the immobilization of poly ( acrylic ) acid as a chemically reactive cross-linker on the surface of poly ( lactic ) acid-based biomaterials," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 71, pp. 862–869, 2017.
- [103] N. Geusens, M. Hanssens, C. Luyten, and R. Pijnenborg, "The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability , migration and invasion of choriocarcinoma cells," *Hum. Reprod.*, vol. 22, no. 5, pp. 1304–1309, 2007.