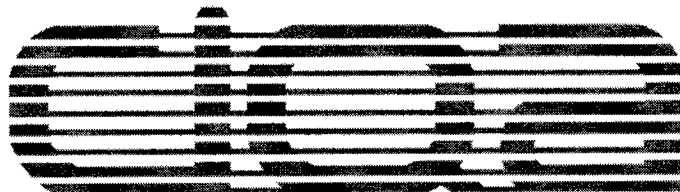


CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA



**POLIMERIZACIÓN POR PLASMA DE PELÍCULAS
POLIMÉRICAS PARA USOS MÉDICOS**

CASO DE ESTUDIO

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA APLICADA

OPCIÓN : QUÍMICA ANALÍTICA


CENTRO DE INFORMACIÓN

11 NOV 2005

PRESENTA:

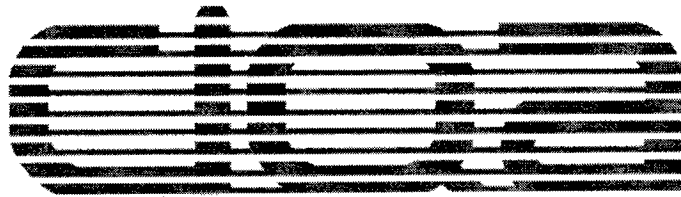
RECIBIDO

MARTHA MONZERRATH OROZCO SIFUENTES

SALTILLO, COAH.

SEPTIEMBRE 2005.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA



MARTHA MONZERRATH OROZCO SIFUENTES

**POLIMERIZACIÓN POR PLASMA DE PELÍCULAS
POLIMÉRICAS PARA USOS MÉDICOS**

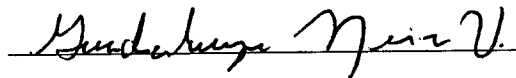
CASO DE ESTUDIO

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA APLICADA

OPCIÓN : QUÍMICA ANALÍTICA

ASESORA:

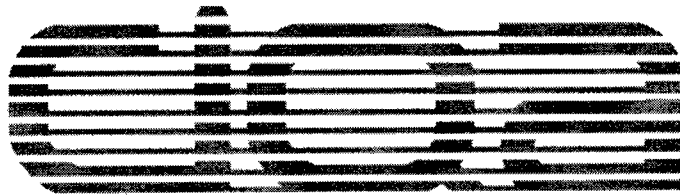


DRA. GUADALUPE NEIRA VELAZQUEZ

SALTILLO, COAH.

SEPTIEMBRE 2005.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA



MARTHA MONZERRATH OROZCO SIFUENTES

**POLIMERIZACIÓN POR PLASMA DE PELÍCULAS
POLIMÉRICAS PARA USOS MÉDICOS**


CASO DE ESTUDIO

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA APLICADA

OPCIÓN : QUÍMICA ANALÍTICA

EVALUADORES



DR. JOSÉ LUIS ANGULO SÁNCHEZ



DR. ROBERTO BENAVIDES CANTÚ

SALTILLO, COAH.

SEPTIEMBRE 2005.

CONTENIDO

INDICE.....	i
ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS.....	iii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO.....	2
I. PLASMA.....	3
1.1 Generalidades.....	3
1.1.1 El dominio del plasma.....	4
1.2 Propiedades del plasma.....	5
1.3 Aplicaciones del plasma.....	6
1.4 Plasma aplicado a polímeros.....	6
1.4.1 Modificación superficial.....	6
1.4.2 Injertos superficiales generados por plasma.....	8
1.4.3 Preparación de recubrimientos por plasma.....	9
1.5 Equipo de plasma.....	9
II. POLIMERIZACIÓN POR PLASMA.....	11
2.1 Generalidades.....	11
2.2 Parámetros que afectan la polimerización por plasma.....	12
2.2.1 Efecto de la velocidad de flujo del monómero.....	13
2.2.2 Efecto de la potencia del plasma.....	13
2.2.3 Efecto de la presión.....	13
2.2.4 Efecto de parámetros combinados.....	14
III. RECUBRIMIENTOS APLICADOS POR PLASMA.....	16
3.1 Aplicaciones.....	16
3.1.1 Aplicaciones generales del plasma.....	16
3.1.2 Industria textil.....	17
3.2 Industria médica.....	19
3.2.1 Recubrimientos biocompatibles.....	19
3.2.2 Preparación de la superficie a ser recubierta.....	24

IV. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.....	26
4.1 Espectroscopía infrarroja (FTIR-ATR).....	26
4.2 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS).....	27
4.3 Espectroscopía de masas de ión secundario (SIMS).....	28
4.4 Ángulo de contacto.....	29
4.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	30
4.6 Espectroscopía de resonancia de electrones (ESR).....	31
4.7 Microbalanza de cuarzo.....	31
V. ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO.....	33
5.1 Interacción polímero-células.....	35
5.2 Células endoteliales.....	36
5.3 Evaluación de la biocompatibilidad en polímeros de plasma.....	38
5.4 Polimerización por plasma y microlitografía.....	46
5.5 Aplicaciones médicas generales.....	52
5.5.1 Suturas.....	53
5.5.2 Implantes y sistemas de liberación controlada de medicamentos.....	54
5.5.3 Ingeniería de tejidos.....	55
VI. CONCLUSIONES.....	58
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

UV	=	Ultravioleta
PS	=	Poliestireno
PP	=	Polipropileno
PET	=	Polietilentereftalato
PMMA	=	Polimetilmetacrilato
PE	=	Polietileno
PX	=	Paraxileno
VP	=	Vinilpirrolidinona
UHMWPE	=	Polietileno de ultra alto peso molecular
Cu	=	Cobre
Zn	=	Zinc
Ni	=	Níquel
Al	=	Aluminio
HUVEC	=	Células endoteliales de vena umbilical humana
HeLa	=	Células humanas
RGD	=	Péptido (arginina-glicina-ácido aspártico)
IKVAV	=	Péptido (isoleucina-lisina-valina-alanina-valina)
FTIC-B5a	=	Albúmina sérica bovina marcada con isotiocianato
XPS	=	Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X
SIMS	=	Espectroscopía de masas de ion secundario
FTIR	=	Espectroscopía de infrarrojo
SAXS	=	Difracción de rayos X de ángulo pequeño
SEM	=	Microscopía electrónica de barrido
RF	=	Radio Frecuencia
W	=	Watts
s	=	segundos
ms	=	milisegundos
Å	=	Ángstrom
Pa	=	Pascal

nm	=	nanómetros
min	=	minutos
μm	=	micrómetros
λ	=	Camino medio libre de una molécula
r	=	radio
θ	=	Ángulo entre dos superficies

INTRODUCCIÓN

El uso de polímeros en la medicina procede desde hace miles de años cuando los Egipcios utilizaban materiales fibrosos como dispositivos biomédicos (materiales derivados de la naturaleza) para cerrar heridas. El escenario ha cambiado rápidamente en este siglo con el nacimiento de la síntesis de polímeros que tienen una diversidad de características físico-químicas. Hasta hoy, un gran número de polímeros ha sido estudiado para su aplicación como biomateriales, lo cual ha llevado al desarrollo de nuevos materiales en el área de la medicina, que son aplicados a la farmacéutica y a la cirugía.

Los biomateriales son materiales que se derivan de fuentes biológicas o que son utilizados en contacto con tejidos o con el cuerpo humano tales como en implantes o prótesis. Requieren ciertos criterios para funcionar en aplicaciones médicas específicas, entre estas el comportamiento mecánico, la compatibilidad del tejido y la inmunidad. Comúnmente, polímeros tales como el nylon, poliéster, polipropileno, y teflón son utilizados como biomateriales. La complejidad surge a causa de las grandes diferencias en el requerimiento de un material que corresponda a el amplio rango de sitios de aplicación en el cuerpo humano. Por ejemplo un material polimérico en contacto con la sangre podría experimentar adhesión celular, lo que subsecuentemente podría llevar hacia una trombogénesis. Así al mismo tiempo, para polímeros como implantes, el tejido podría provocar una reacción adversa en la forma de una inflamación.

El uso inicial de polímeros en la medicina fue en la forma de implantes y vendaje de heridas. La nueva era es testigo de un número de campos técnicamente importantes, tales como la ingeniería de tejidos, basada en la comprensión de las interacciones de bio-receptividad entre polímero y células.

Hoy en día los plásticos son utilizados ampliamente en la manufactura de dispositivos médicos, donde han remplazado casi en su mayoría a los materiales clásicos de metal. El ensamble de estos dispositivos necesita en la mayoría de los casos un pre-tratamiento de la superficie polimérica, que por lo general presenta propiedades de adhesión y biocompatibilidad muy pobres.



El tratamiento por plasma es un buen método industrial para mejorar las propiedades superficiales de los polímeros. El plasma es mejor conocido como el cuarto estado de la materia y es un gas ionizado, compuesto de diferentes especies. Las especies del plasma reaccionan con las superficies poliméricas y mejoran las propiedades superficiales de estas. Mediante plasma se pueden agregar nuevos grupos químicos en las superficies de los materiales poliméricos, además también se pueden preparar películas poliméricas con características especiales: por ejemplo, se pueden preparar recubrimientos poliméricos con grupos químicos altamente compatibles con diversos tipos de células.

Los polímeros sintetizados por plasma presentan propiedades muy singulares que difieren grandemente de las propiedades de los polímeros obtenidos por síntesis convencionales. Mediante plasma se pueden preparar películas poliméricas ultra delgadas, con alto grado de entrecruzamiento, alta resistencia química, excelente permeabilidad a gases y con buena adhesión hacia el sustrato en el que se depositan. Los polímeros de plasma tienen un campo de aplicación muy importante como recubrimientos biocompatibles.

En el presente trabajo se ofrece una recopilación de información relacionada con la teoría del plasma, la síntesis de polímeros vía plasma (polimerización por plasma), los métodos de caracterización de éstos polímeros y sus aplicaciones como recubrimientos biocompatibles en el campo de la medicina.

OBJETIVO

Introducir al lector en la tecnología de plasma, la preparación de recubrimientos poliméricos vía plasma y las aplicaciones de los recubrimientos en el área médica.

I. PLASMA

1.1 Generalidades del plasma

En física y química, el plasma es un gas parcialmente ionizado compuesto principalmente de electrones, iones positivos y negativos, átomos y radiación electromagnética. Este estado de agregación, denominado *cuarto estado de la materia*, fue identificado por primera vez por el físico Inglés Sir William Crookes en 1879, y fue denominado "plasma" por Irving Langmuir.

Crookes, al experimentar con descargas eléctricas en gases, se dio cuenta de que el gas en donde se establecía la descarga se comportaba sustancialmente diferente a un gas regular y sugirió la existencia de un nuevo estado al cual llamó *el cuarto estado de la materia*.¹

En la Figura 1, se presenta un esquema representando los 4 estados de la materia: sólido, líquido, gaseoso, y plasma. Se toma como ejemplo al agua, por lo cual los primeros tres estados son los siguientes: hielo (sólido), agua (líquido), vapor(gaseoso). El estado de plasma del agua estaría formado por núcleos de hidrógeno y electrones.²

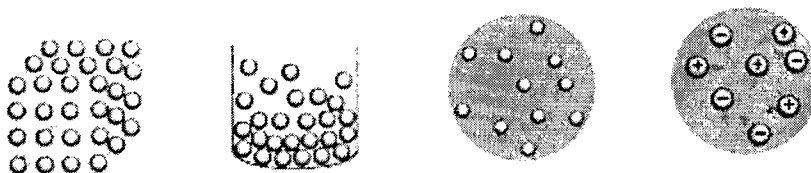


Figura 1. Esquema de los 4 estados de la materia.

La materia en condiciones normales en la tierra tiene electrones que orbitan alrededor del núcleo atómico. Los electrones están unidos al núcleo por la acción de la fuerza atractiva electrostática mutua. Si la temperatura es lo suficientemente alta, los electrones (por lo menos los de órbitas más externas) adquieren bastante energía cinética como para escapar del potencial del átomo (similar a una nave espacial que escapa de la fuerza de gravedad de la Tierra).³ En la atmósfera baja, cualquier átomo que pierde un electrón lo recupera pronto o atrapa otro, pero la situación a temperaturas altas, como las que existen en el sol, es muy diferente. Cuanto más caliente está el gas, más rápido se mueven sus moléculas y átomos, y a temperaturas muy altas las colisiones entre estos átomos moviéndose muy rápidamente son lo suficientemente violentas como para liberar los electrones.² En esta situación los electrones ya

no están atrapados en órbitas alrededor del núcleo. Este es el estado del plasma, donde un gas se convierte en una colección de electrones de carga negativa que han escapado a la fuerza del núcleo y los iones de carga positiva han perdido uno o más electrones. La ionización se puede producir mediante la introducción de grandes concentraciones de energía, como el bombardeo con electrones externos rápidos mediante irradiación con luz láser o mediante calentamiento a temperaturas muy altas. Las partículas cargadas individuales que forman el plasma responden a campos eléctricos y magnéticos, por lo que pueden ser manipuladas y contenidas. A diferencia de los gases fríos (Ej. el aire a temperatura ambiente), los plasmas conducen la electricidad y son fuertemente influenciados por los campos magnéticos.²

1.1.1 El dominio del plasma

Aunque casi toda la materia del Universo se encuentra en forma de plasma, este estado no nos es familiar pues en nuestro entorno cercano es raro y efímero. Estamos rodeados de sólidos, líquidos y gases y sólo aparecen plasmas cerca de nosotros cuando, por ejemplo, un relámpago cruza la atmósfera y ioniza momentáneamente el aire, o mientras está encendida una lámpara fluorescente. También la atmósfera se convierte en un plasma cuando ocurre una *aurora*, ese fenómeno luminoso que se observa en el cielo cerca de los polos y que constituye el espectáculo natural más bello que podamos imaginar. Así mismo, constituyen un plasma los átomos ionizados y sus electrones libres en la estructura cristalina de un metal sólido, siendo estos últimos capaces de moverse con mucha facilidad para transportar una corriente eléctrica. Pero conforme nos alejamos de la superficie de nuestro planeta nos vamos adentrando cada vez más en el dominio del plasma. La parte alta de nuestra atmósfera, la *ionosfera*, es un plasma, y el material que puebla nuestro entorno magnético, nuestra *magnetosfera*, también es un plasma. El medio interplanetario está lleno de plasma, el *viento solar*; y prácticamente todo nuestro sol es una esfera de plasma. Del mismo modo el plasma envuelve a todos los demás planetas, y todas las estrellas del Universo son cuerpos de plasma. Además de esto, el plasma llena también el medio interestelar y el espacio intergaláctico. Aristóteles tenía razón y la naturaleza le tiene horror al vacío: ha llenado todo el espacio de plasma.

En la Figura 2 se observa la gran diversidad de condiciones en que aparecen los plasmas y algunos de los lugares donde se encuentra cada uno de ellos.

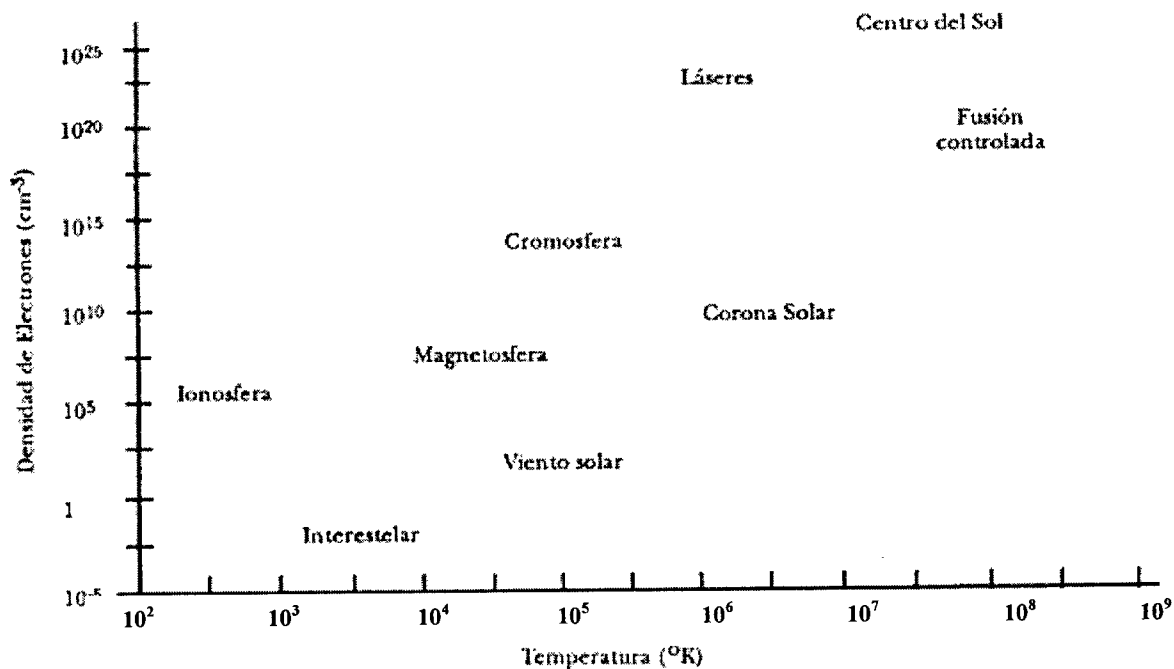


Figura 2. Rango de temperaturas y densidades de los plasmas.

En comparación, los sólidos, los líquidos y los gases sólo existen en rangos pequeños de temperaturas y presiones.

1.2 Propiedades del plasma

El requisito para que el gas pueda definirse como un “plasma“ es que sus especies con carga eléctrica tengan un comportamiento colectivo, o la capacidad de las cargas libres de distribuirse espacialmente en caso de producirse una perturbación electrostática en el gas, de modo de aislar al plasma de dicha perturbación y preservar su condición de gas neutro. Así por ejemplo, si se introduce un cuerpo cargado negativamente, se produce un flujo de iones positivos hacia el cuerpo y un flujo de electrones en dirección opuesta. Como resultado, se genera una delgada lámina alrededor del mismo con carga espacial positiva, la que cancela la perturbación y mantiene la neutralidad eléctrica del plasma. La región de carga espacial se denomina “lámina de plasma”, debe tenerse presente que por el hecho de tener una carga neta positiva, el gas ionizado de la lámina no satisface la definición de “plasma”. Este efecto permite generar un bombardeo de iones positivos sobre un substrato cuando se asigna al mismo un potencial negativo con respecto al plasma.

1.3 Aplicaciones del plasma

Debido a su versatilidad, el plasma tiene un gran número de aplicaciones: El procesamiento por plasma se refiere, en su contexto más amplio, a un número de técnicas que utilizan plasma para modificación superficial o volumétrica de materiales. En el caso de procesos superficiales, los mismos incluyen tanto el depósito de un recubrimiento delgado sobre un sustrato de un material diferente, como la modificación de las capas superficiales de un material, alterando su morfología, limpieza o composición química. En ambos casos el objetivo de las modificaciones es adaptar de la manera más efectiva posible las propiedades superficiales del material tratado a sus requerimientos de comportamiento funcional. Así, por ejemplo, puede mejorarse la resistencia al desgaste o a la corrosión de un material dado, su compatibilidad fisicoquímica con determinados medios, su apariencia estética, etc.

1.4 Plasma aplicado a polímeros

En general se puede decir que el plasma incide con los polímeros principalmente en las siguientes tres categorías. 1) Modificación superficial 2) Injertos superficiales 3) Preparación de recubrimientos.

1.4.1 Modificación superficial por plasma

Consiste en la alteración de las características superficiales por la sustitución de grupos químicos por grupos normalmente presentes en la cadena polimérica modificada. El mecanismo asumido es la creación de radicales libres y acoplamiento de esos radicales libres con especies activas del ambiente de plasma. Dependiendo del gas seleccionado una gran variedad de grupos químicos puede ser incorporada en la superficie. Estos grupos pueden ser hidroxilos, carbonilos, ácidos carboxílicos, aminos, peróxidos, etc. Con esa técnica la energía y la reactividad química de la superficie del polímero pueden ser completamente alteradas sin afectar las propiedades en masa del polímero. Por ejemplo, si una película de polietileno es tratada en un plasma de argón por algunos segundos se obtendrá una superficie altamente hidrofílica.⁴

Utilidad:

- Tratamiento de artículos plásticos para uniones con pegamentos
- Tratamiento de piezas plásticas para pintura
- Tratamientos superficiales de polímero para trabajos de impresión

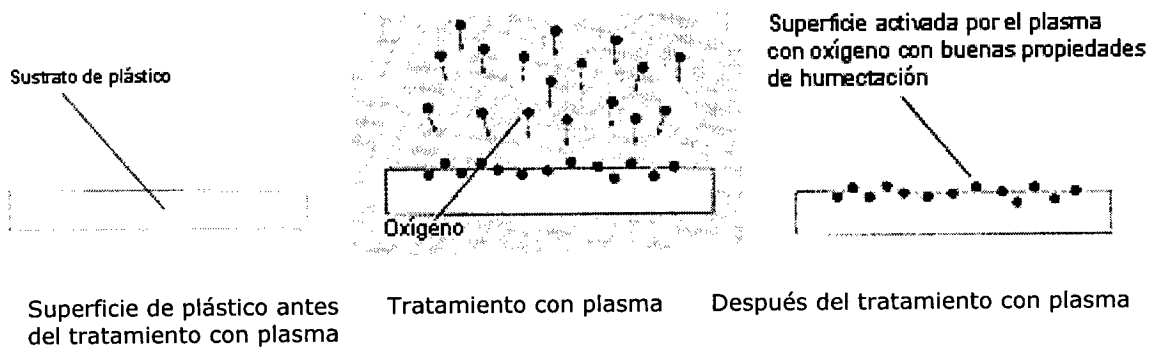


Figura 3. Proceso de modificación superficial por plasma.

Durante la modificación superficial de polímeros por plasma, 4 reacciones principales pueden ocurrir. 1) Que los radicales libres (macro radicales) reaccionen unos con otros para producir superficies con alto grado de entrecruzamiento. Por ejemplo, cuando se emplean gases inertes, tales como argón y helio se obtienen polímeros con superficies altamente entrecruzadas. 2) Otra reacción que toma lugar durante la modificación es la ruptura de cadenas y que provoca que las últimas capas sean erosionadas. Dependiendo del gas empleado, la erosión se puede presentar en mayor o menor grado, por ejemplo, el oxígeno puede producir alta erosión, mientras que con nitrógeno la erosión es mínima. 3) Las especies del plasma rompen enlaces covalentes formando radicales libres en la superficie, esos radicales libres pueden reaccionar con algunas otras moléculas o iones presentes para generar nuevos grupos químicos (modificación química). Los nuevos grupos químicos generados en la superficie pueden ser aldehídos, cetonas, alcoholes, aminas, iminas, amidas, etc. 4) Si una vez generados los radicales libres en el polímero, se añade un monómero al reactor, el monómero puede reaccionar con el radical y producir pequeñas cadenas poliméricas, que le imparten características especiales a la superficie. En la Figura 4 se presentan los diferentes mecanismos de reacción que pueden ocurrir durante la exposición de una superficie polimérica a un plasma.

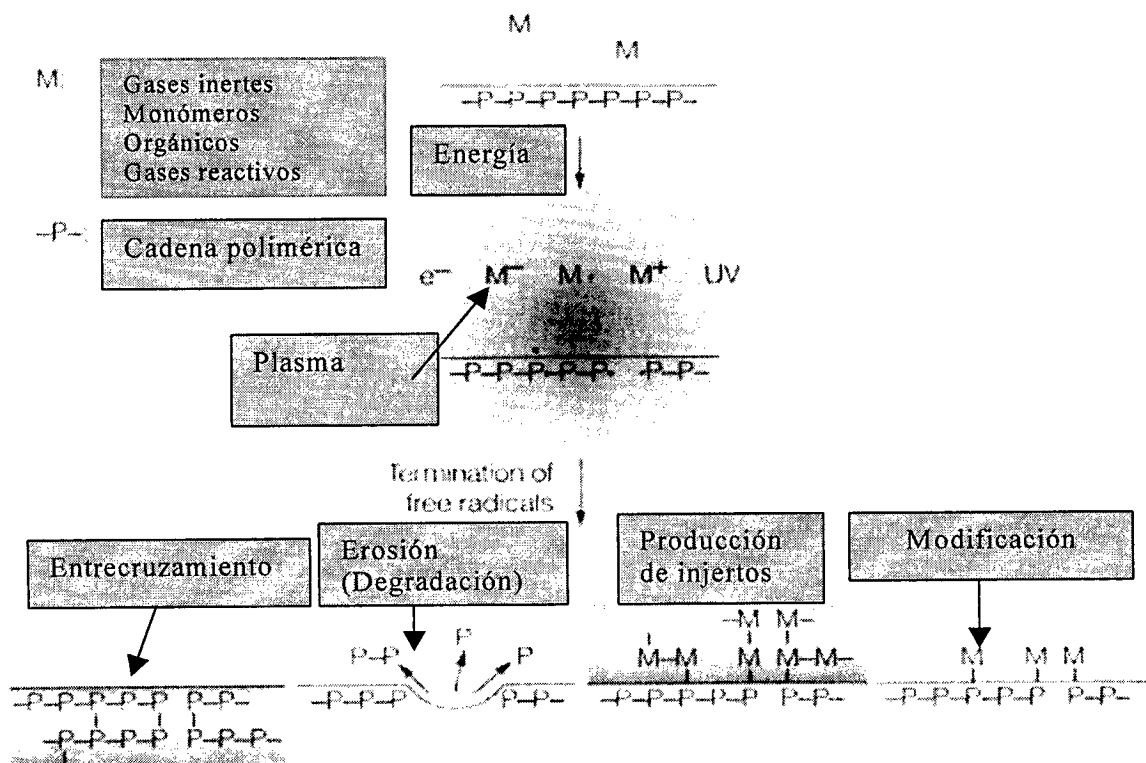


Figura 4. Reacciones durante la modificación superficial.

1.4.2 Injertos superficiales generados por plasma

Por otro lado la técnica de injerto generado por plasma permite también la modificación de una superficie polimérica. Por ejemplo si un gas noble es utilizado, un gran número de radicales libres son creados a lo largo de la cadena polimérica. Si el plasma es extinguido pero antes de la introducción de aire, un monómero insaturado tal como alcohol alílico es introducido en la cámara de reacción, este puede reaccionar con los radicales libres produciendo así un polímero injertado. El rango de sitios reactivos y funcionales incorporados dentro de una superficie es incrementado significativamente con esta técnica. Este proceso difiere del proceso de modificación en el aspecto de que, en lugar de modificar por grupos funcionales la superficie, se añaden pequeñas cadenas poliméricas.

1.4.3 Preparación de recubrimientos por plasma

La tercera categoría por procesamiento por plasma, denominada polimerización por plasma o depósito por plasma, utiliza gases o vapores que se fraccionan y experimentan polimerización bajo la influencia de energía de radio frecuencia. Por ejemplo el metano bajo la influencia de plasma puede depositarse como un hidrocarburo con una densidad de 1.6 g/cm^3 . Cualquier material que pueda ser introducido como vapor dentro de la cámara de procesamiento es un candidato potencial para llevar a cabo la polimerización por plasma. En la Figura 5, se ilustra el proceso de polimerización por plasma.

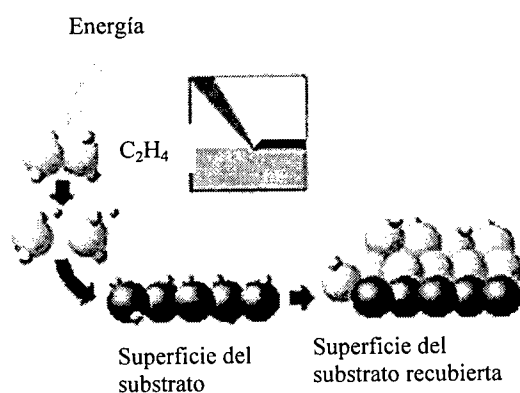


Figura 5. Esquema del proceso de polimerización por plasma.

Por medio de la polimerización asistida por plasma se pueden depositar en la fase gaseosa delgados estratos en el orden de $\text{nm} - \mu\text{m}$. La selección de los monómeros a ser depositados, determina las características específicas del recubrimiento obtenido, y por lo tanto las características de la superficie modificada, la cual puede ser hidrófila, hidrófoba, promotora de la adhesión, antiadherente, anticorrosiva, barrera, etc. En el capítulo siguiente del presente trabajo, se abordará más ampliamente el tema de la polimerización por plasma.

1.5 Equipo de plasma

Los principales componentes del reactor de plasma son: 1) cámara de vacío, 2) sistema de bombeo para alto vacío y 3) generador de potencia. Otros componentes secundarios pueden incluir trampas de nitrógeno líquido, medidores de presión, válvulas de control de flujo de gases. Además diversos equipos de diagnóstico de plasma pueden ser acoplados a la cámara

de vacío tales equipos pueden ser: espectrómetro de masas, sonda de Langmuir, reflectómetro, que proporcionan información de las propiedades químicas y físicas del plasma. En la Figura 6 se presenta un equipo de plasma a nivel laboratorio con sus diferentes componentes. Una de las partes más importantes del sistema es el generador de radiofrecuencia. El sistema de bombeo también juega un papel fundamental, ya que si la presión dentro de la cámara no es lo suficientemente baja no se producirá el plasma.

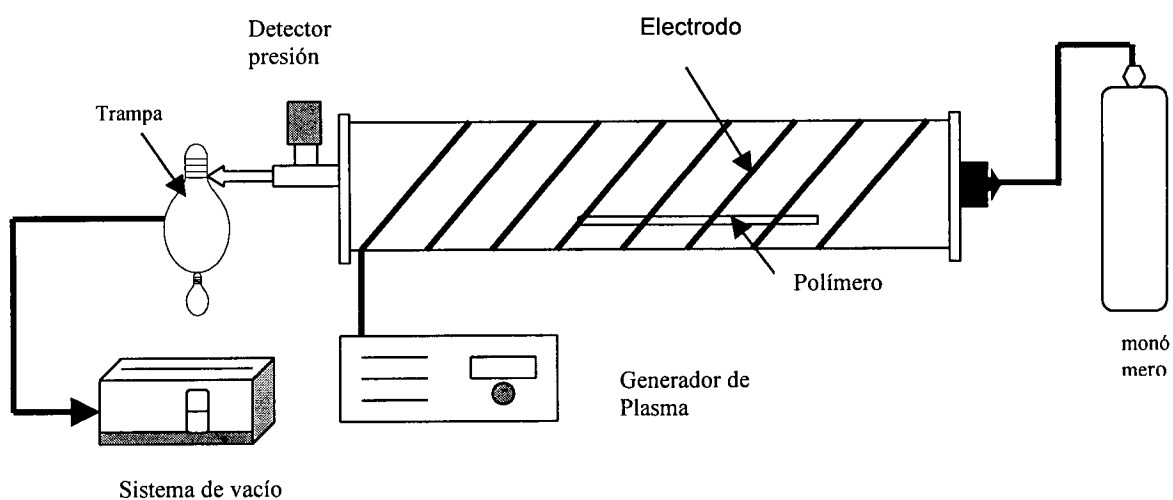


Figura 6. Equipo de plasma y sus componentes.

Un gran número de reactores son empleados para llevar a cabo el depósito de polímeros de plasma. Reactores de vidrio/cuarzo o cámaras de aluminio con electrodos de metal paralelo son los que predominan en la literatura. La radio frecuencia (RF) de excitación usada por varias compañías manufactureras de equipo para plasma puede ser tan baja como 2 KHz o más usualmente de 13.56 MHz. Los sistemas de plasma de microondas también son utilizados para el depósito de polímeros por plasma. La selección de equipo utilizada en polimerización por plasma es dictada por la velocidad de depósito deseada, las propiedades de la película y otras consideraciones prácticas tales como tamaño de las partes al ser tratadas.



II POLIMERIZACIÓN POR PLASMA

2.1 Generalidades

El proceso de polimerización por plasma es un método en el cual el monómero gaseoso excitado por el plasma se polimeriza y precipita sobre un sustrato. El polímero obtenido es en forma de película altamente entrecruzado. El grado de entrecruzamiento puede ser controlado mediante los parámetros del proceso, tales como presión, flujo de gas, tiempo y potencia eléctrica.

En este tipo de polimerización se requieren altas energías para la disociación de enlaces insaturados y para la formación de radicales libres de un número pequeño de átomos. Debido a esto los polímeros obtenidos por plasma presentan estructuras generalmente caracterizadas por insaturación y con arquitecturas ramificadas y entrecruzadas como se observa en la Figura 7.

Los gases en plasma experimentan polimerización generalmente vía radicales libres. Cuando un gas es ionizado por la energía de radiofrecuencia, el plasma resultante contiene electrones libres, iones así como especies meta-estables y radiación UV. Cuando el gas de proceso está formado por un monómero los radicales libres son los sitios en el cual el proceso de polimerización es iniciado. A medida que el peso molecular del polímero se incrementa, éste se deposita sobre el sustrato colocado en la cámara de plasma. Debido a la fragmentación del monómero alimentado se generan radicales libres que inician el proceso de polimerización así un gas tal como el metano, el cual tiene una funcionalidad cero pueden ser empleado para formar polímeros de plasma. Además de metano otros hidrocarburos tales como etileno y propileno han sido utilizados para producir polímeros mediante la técnica de plasma. Debido a la naturaleza compleja del proceso de fragmentación la estructura del polímero resultante es muy diferente a la estructura obtenida mediante procesos de polimerización convencionales. El nivel de fragmentación depende del nivel de energía suministrada. Además la estructura de los polímeros de plasma puede ser variada cambiando las condiciones de reacción incluyendo el uso de co-monómeros o la introducción de oxígeno, nitrógeno o amonio dentro de la cámara de reacción durante el proceso de polimerización. En la Figura 7 se observan las estructuras de un polímero obtenido por síntesis convencional y de un polímero obtenido por plasma y en la Figura 8 se presenta la preparación de un recubrimiento aplicado por plasma.

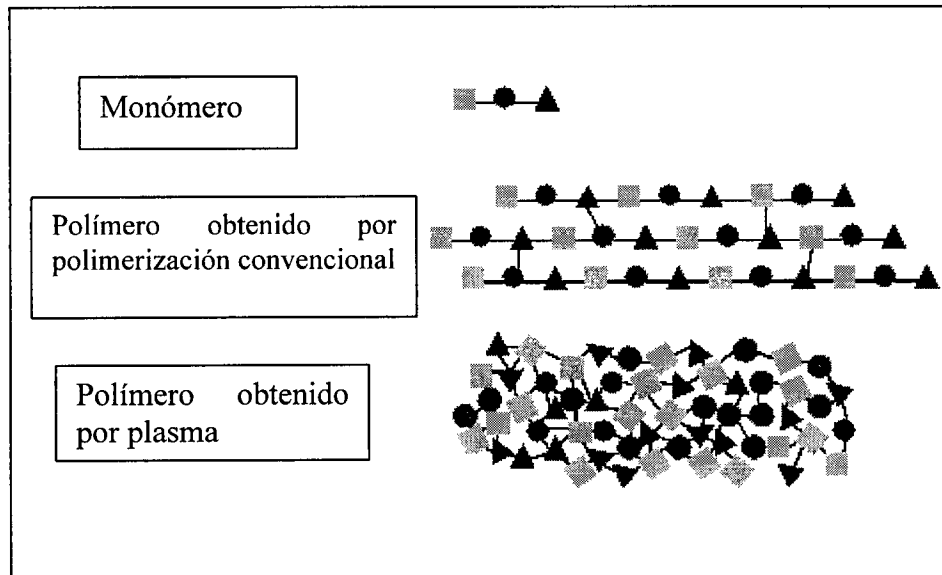


Figura 7. Polimerización convencional y por plasma.

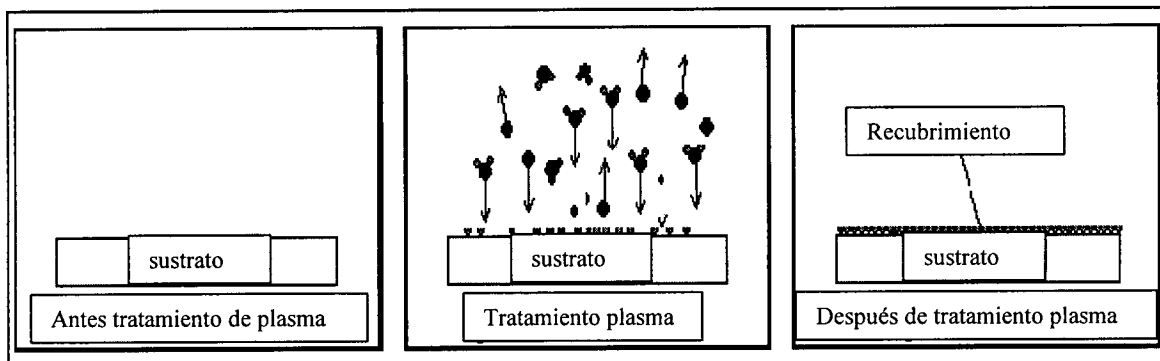


Figura 8. Proceso de Polimerización por plasma sobre un sustrato.

2.2 Parámetros que afectan la polimerización

Existen parámetros que afectan la estructura química del polímero durante el proceso de polimerización por plasma y que además repercuten en la velocidad de polimerización, entre estos parámetros podemos mencionar: la geometría del reactor, presión, potencia, flujo de gases, temperatura del sustrato, posición del sustrato, tipo de monómero, tiempo de polimerización y potencia de la excitación. Por lo cual la manipulación adecuada de los

parámetros nos permitirá obtener el polímero adecuado para cada aplicación. Diferentes investigadores han discutido sobre estos parámetros en distintas ocasiones.⁵⁻⁶

2.2.1 Efecto de la velocidad de flujo del monómero

Generalmente, cuando los otros parámetros se mantienen constantes (potencia, presión, etc.), la velocidad de recubrimiento de polímero disminuye en función de la velocidad de flujo del monómero. Por lo tanto a mayor velocidad de flujo de monómero, la velocidad de depósito disminuye esto se debe a que el tiempo de residencia de los gases alimentados disminuye y las especies activadas no logran alcanzar al sustrato porque son bombeadas hacia fuera del reactor. Un máximo de polimerización ocurre cuando los procesos son balanceados.

2.2.2 Efecto de la potencia del plasma

Un incremento en la potencia da como resultado un incremento en la densidad de los electrones y iones energéticos. Cuando la presión y la velocidad de flujo permanecen constantes, la velocidad de polimerización se incrementa con la potencia en un principio, pero después se hace independiente de la potencia a valores de potencia altos.⁵

2.2.3 Efecto de la presión

Los efectos de la presión en polimerización por plasma incluyen:

- a) Efecto del tiempo de residencia; el tiempo de residencia incrementa al incrementar la presión
- b) Efecto de la energía promedio de los electrones
- c) Efecto del camino medio libre; el camino medio libre de una molécula en un gas puede ser expresada como:

$$\lambda = 1/4 \pi r^2 D$$

Donde;

λ es el camino medio libre de una molécula

r es el radio de la molécula

D es la densidad del gas.

La presión puede afectar el camino medio libre ya que afecta la densidad del gas.

Los requerimientos para la formación de polímero por plasma son el camino medio libre pequeño, tiempo de residencia largos y energía de los electrones relativamente altas. Por lo tanto, la polimerización por plasma puede ocurrir más fácilmente a presiones altas. Sin embargo, un incremento en la presión también puede dar como resultado inhomogeneidad en la distribución de la velocidad de depósito. La mayoría de los procesos de polimerización por plasma son llevados a cabo a presiones menores de 133 Pa con la finalidad de obtener películas más homogéneas e incrementar la interacción del plasma con la superficie. Ha sido observado experimentalmente que la velocidad de depósito se incrementa al principio en función de la presión y luego tiende a alcanzar el equilibrio.⁵

2.2.4 Efecto de parámetros combinados

Yasuda⁷ introdujo un parámetro compuesto: La relación W/FM para monitorear el proceso de depósito, donde W es la potencia del plasma, F es la velocidad de flujo y M masa molecular del monómero. Se ha encontrado, que la velocidad de depósito del polímero en un plasma de baja temperatura se incrementa con el valor de la relación W/FM. La velocidad de polimerización depende fuertemente de la estructura química de los gases alimentados, mientras que a altos valores del componente W/FM la estructura de los gases alimentados tiene muy poca influencia en la velocidad de depósito de polímero.^{7,8}

Los autores Akovali y Dilsiz^{9,10} reportaron los efectos de ciertos parámetros tales como tipo de electrodo (Cu, Zn, Ni, Al) y la temperatura del sustrato sobre la estructura química y velocidad de depósito del polímero obtenido. Ellos encontraron que diferentes tipos de electrodos producen estructuras químicas y velocidades de depósito similares.

Sadhir y colaboradores¹¹ reportaron el efecto de la temperatura del sustrato en la conductividad eléctrica de películas poliméricas obtenidas por plasma. Ellos observaron que con un incremento de temperatura en el sustrato de 25 a 150°C bajo condiciones de polimerización de plasma similares, la conductividad de las películas de tetrametil germanio obtenidas por plasma se incrementaba por cuatro órdenes de magnitud. Las películas depositadas a 150°C mostraban un comportamiento típico de los semiconductores, pero la



conductividad de las películas era muy baja si eran depositadas a una temperatura de sustrato de 25°C.

En adición, es bien conocido que algunos otros factores pueden tener un efecto dominante en las propiedades finales del producto. Por lo que podemos decir que las características de recubrimientos obtenidos por polimerización por plasma dependerán de las variaciones de los parámetros ya mencionados.

III. RECUBRIMIENTOS APLICADOS POR PLASMA

3.1 Aplicaciones

3.1.1 Aplicaciones Generales del plasma

La tecnología de plasma tiene un gran número de aplicaciones entre estas la formación de recubrimientos poliméricos los cuales pueden actuar como una barrera contra el agua y de esta forma proteger las partes que se dañan por éste líquido, desde teléfonos personales, computadoras, cámaras, circuitos y chips electrónicos hasta una amplia variedad de artículos electrónicos. Los recubrimientos pueden ser aplicados a cualquier tipo de fibra, en la industria textil, son extremadamente repelentes a los líquidos y su energía superficial puede alcanzar una tercera parte de la energía superficial del teflón, además y debido a que el recubrimiento es muy delgado no se afecta la respirabilidad de la tela. Otra de las cualidades de los recubrimientos es inhibición o retardamiento de la corrosión de sustratos metálicos. En la medicina la modificación y el recubrimiento son utilizados para obtener materiales compatibles con tejidos y células, y de esta forma se han fabricado, cajas de cultivo, válvulas cardiacas, lentes de contacto, prótesis, implantes de tejido, y una serie de dispositivos médicos biocompatibles. En la industria automotriz el plasma se aplica para limpiar superficies además de brindar una mayor adhesión para el proceso de pintado.

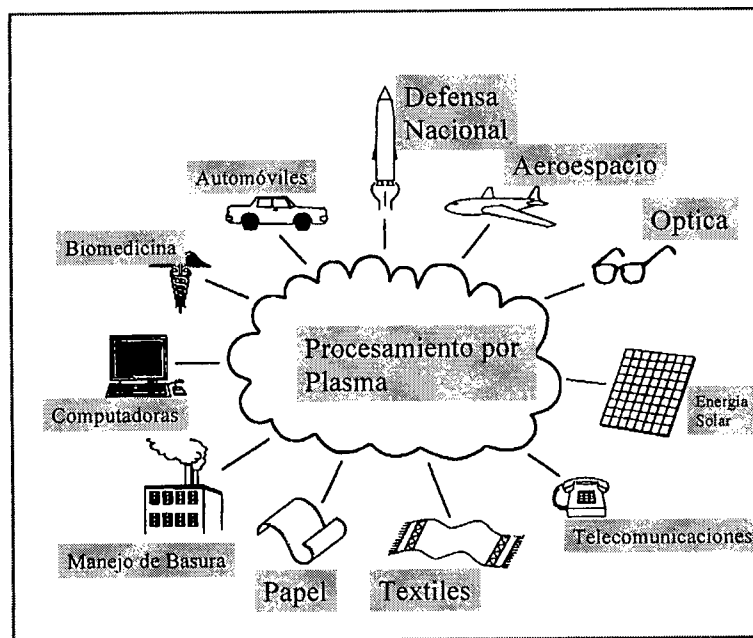


Figura 9. El procesamiento por plasma es aplicado en diferentes áreas.

3.1.2 Industria textil

Es una de las aplicaciones más obvias del proceso de polimerización por plasma, el uso de la tecnología para el recubrimiento de telas. Una gran ventaja es que las prendas completas pueden ser recubiertas, sobre todo prendas deportivas. Algunas compañías de ropa deportiva exclusiva están interesadas en la tecnología porque quieren diseñar una nueva generación de ropa repelente al agua y a las manchas. Un recubrimiento de este tipo facilitaría el lavado de las prendas ya que existiría una barrera entre la mancha y la tela. En la Figura 10 se muestra un trozo de tela que ha sido recubierto con un polímero de plasma, el efecto hidrofóbico que se observa se obtiene utilizando monómeros que contengan fluor en su estructura química. El plasma permite preparar recubrimientos tan hidrofóbicos como los observados en la Figura 11.

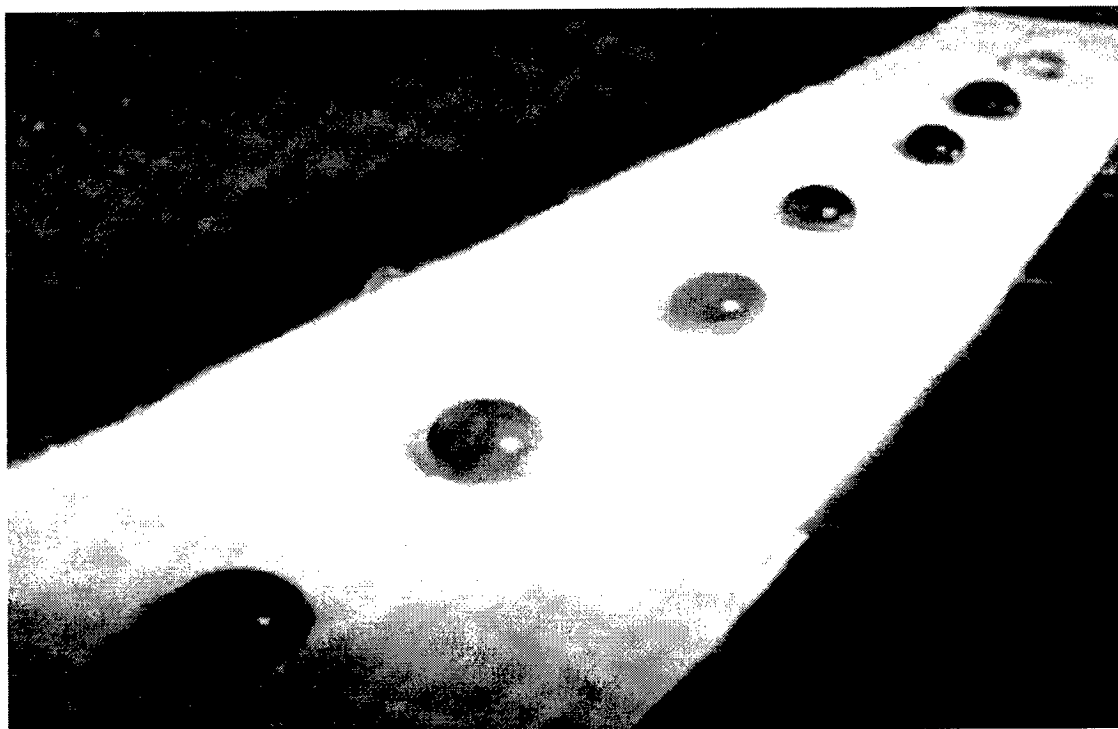


Figura10. Textiles con propiedades hidrofóbicas obtenidos por tratamiento plasma.

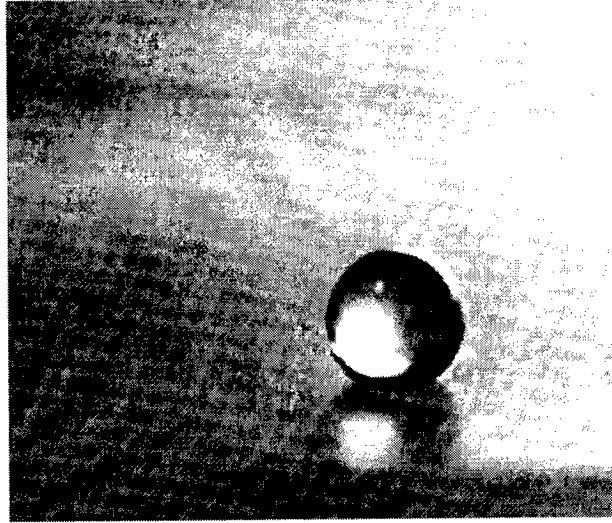


Figura 11. Textiles altamente repelentes al agua.

Mediante la modificación superficial de polímeros por plasma podemos pasar de una superficie hidrofóbica como la observada en la foto de la Figura 12 a una superficie hidrofílica, como la observada en la foto derecha de la Figura 13.

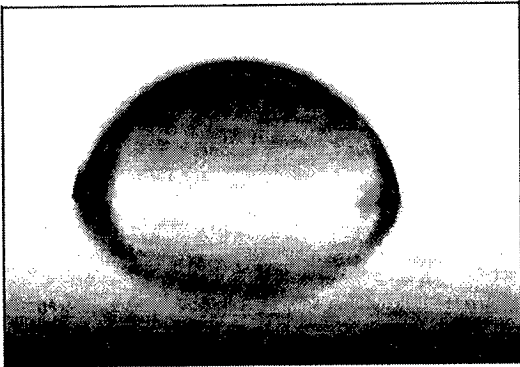


Figura 12. Superficie hidrofóbica.

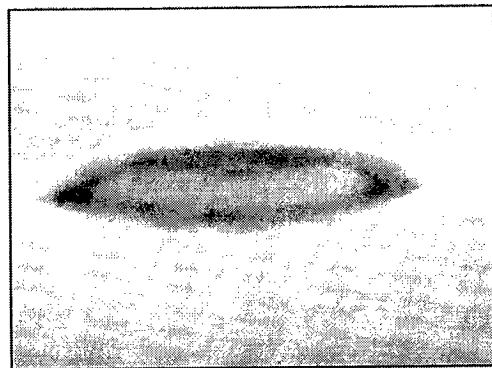


Figura13. Superficie hidrofílica.



3.2 Industria médica

3.2.1 Recubrimientos Biocompatibles

Una gran variedad de artículos de aplicación médica pueden ser recubiertos mediante esta técnica, se pueden fabricar recubrimientos biocompatibles y éste tipo de recubrimientos incrementan la adhesión de células y proteínas a la superficie recubierta, estas superficies recubiertas son ideales para el cultivo de células y la técnica se puede emplear para el recubrimiento de cajas petri.

Dos compañías en Inglaterra: Plasso y Celltran¹² están produciendo vendas recubiertas con polímeros aplicados por plasma, estos polímeros depositados son biocompatibles con la piel humana y se ha encontrado que cuando las vendas son aplicadas a pacientes con quemaduras graves o úlceras el proceso de sanación de la piel es acelerado. Las aplicaciones médicas de éste tipo de polímero se tratará más ampliamente en el capítulo V. En la Tabla 1 se muestran los diferentes polímeros empleados como dispositivos para el área médica, en la Tabla 2 se presenta una lista de polímeros que han sido modificados por plasma para aplicaciones en medicina.

**Tabla 1. Aplicaciones médicas de materiales poliméricos.¹³**

Polímero	Aplicación Médica
Celulosa	Hemodiálisis
Acetato de celulosa	Dispositivos de liberación controlada Membranas de riñón artificial Osmosis inversa Hiperfiltración
Colágeno	Hemodiálisis
Resina epóxica	Encapsulación
Colodión	Experimentos en riñón artificial
Albúmina	Aumento de compatibilidad sanguínea Dispositivos de liberación controlada
Policarbonato	Implantes craneales Oxigenadores de sangre Membranas para hemodiálisis
Poli(alquil cianoacrilato)	Adhesión de tejidos Dispositivos de liberación controlada
Poliamidas	Microencapsulación a corto plazo Células artificiales
Polietileno	Prótesis de cadera
Poliectrolitos/hidrogel	Hemodiálisis Oxigenadores de sangre Lentes de contacto Dispositivos de liberación controlada Recubrimientos de implantes
Poliacrilonitrilos	Hemodiálisis Materiales para heridas y quemaduras
Poli(ácido glicólico) y copolímeros con poli(ácido láctico)	Dispositivos de liberación prolongada
Poli(etilen tereftalato)	Refuerzos de implante Promotor de crecimiento de tejido vivo
Poli (vinil cloro)	Contenedores, recipientes y tubos para sangre
Poliuretanos	Arteria artificial
Poli(hidroxietyl metacrilato)	Lentes de contacto Dispositivos de liberación controlada Materiales para heridas y quemaduras
Poli(metil metacrilato)	Prótesis ortopédica Lentes de contacto
Polipropileno	Membrana para oxigenación de sangre
Poliestireno	Soporte artificial Dispositivo de liberación controlada

**Tabla 2. Polímeros modificados por plasma y sus aplicaciones como biomateriales.¹⁴**

Aplicaciones	Dispositivos	Materiales	Propósito
Biosensor	Membranas del sensor Biosensores de diagnóstico	PC, celulosa, PP, PS	Inmovilización de biomoléculas
Bioseparación	Separación de membranas Hemodiálisis Membranas	PP, derivados de celulosa	Incremento de la Biocompatibilidad
Cardiovascular	Injertos vasculares Catéteres	PET, PTFE, PE, SiR, PVC, PU	Mejora de biocompatibilidad Fricción reducida Capas de lubricación Recubrimientos antimicrobianos
Dental	Implantes dentales	Aleaciones de Ti	Mejora del crecimiento celular
Investigación fundamental		Polímeros, vidrios metales, cerámicos.	Interacciones biológicas con el plasma para la modificación de la superficie.
Oftalmológicas	Lentes de contacto Lentes intraoculares Corneas artificiales	PMMA, SiR, PMMA, PVA; PHEMA	Incremento de biocompatibilidad Recubrimientos antimicrobianos Mejora del crecimiento celular Incremento de la hidroflicidad
Ortopédico	Implantes de metal Ligamentos Placas de hueso	Aleaciones de Ti-Ni, Co-Cr. UHMWPE PET PGA, PLA	Limpieza de superficies, Mejor adhesión de células/crecimiento Mejor biocompatibilidad, Mejora la adherencia del cemento de los huesos, Mejora el crecimiento de lo tejidos finos.
Farmacéutico	Dispositivos de liberación controlada de medicamentos	SiR, Hidrogeles, PGA, PLA	Reduce la difusión de moléculas Liberación controlada de medicamentos
Cultivo de tejidos	Cultivo de tejidos en cajas petri.	PS, PET	Mejora la adhesión de células/ crecimiento Fricción reducida
Otros	Instrumentos en general		Esterilización, limpieza de superficies, promoción de adhesión

Ramírez y colaboradores,¹⁵ modificaron por plasma las superficies de PET para mejorar la biocompatibilidad de células endoteliales humanas en la superficie de éste polímero. En la industria médica, pequeños injertos vasculares artificiales son fabricados a base de polímeros y estos injertos son modificados superficialmente mediante plasma con la finalidad de mejorar la biocompatibilidad de estos materiales con los medios biológicos a los que son expuestos. Los autores han encontrado que existen problemas de oclusión en los injertos vasculares artificiales que han sido aplicados en pacientes. Encontraron que las fallas de estos injertos vasculares de diámetro interior pequeño son causadas por la carencia de una pared endotelial estable en la superficie del polímero, que permita interaccionar de manera más adecuada con las células. Ellos sugieren que las superficies poliméricas de los injertos pueden optimizarse mediante tratamientos apropiados que permitan el crecimiento celular homogéneo y uniforme para la aplicación de prótesis artificiales. En el estudio, las superficies de polietilentereftalato fueron tratadas mediante un proceso de plasma utilizando oxígeno, amonio y una mezcla de estos gases para verificar el efecto de los grupos funcionales sobre el crecimiento de la célula endotelial. Las modificaciones químicas se caracterizaron por medio del XPS. Además se efectuaron pruebas de citotoxicidad y citocompatibilidad de las superficies de PET modificadas para evaluar el comportamiento de las células de las venas endoteliales provenientes del cordón umbilical humano (HUVEC). Se encontró que cuando se trata con plasma la superficie de PET no se tiene efecto de toxicidad. En la Tabla 3 se muestra la composición química obtenida por XPS del PET.

Tabla 3. Composición atómica de PET sin tratar (1) y tratado (2-4).

Muestras	C (%)	O (%)	N (%)	C-O/C== O (%)
PET	68.2	31.8	0	1.35
1	56.1	43.9	0	1.74
2	63.6	36.4	0	1.40
3	66.5	28.0	5.5	1.60
4	65.4	28.6	5.9	1.96

La citotoxicidad del PET tratado fue analizada y se encontró que no producen inhibición en el crecimiento y viabilidad de las células. Se llegó a la conclusión de que el PET tratado con plasma es efectivo para el crecimiento de HUVEC sin necesidad de agregar proteínas extracelulares a la matriz. La reproducibilidad y el control del proceso químico inducido por el plasma dio como resultado una buena respuesta biológica para los tratamientos con oxígeno y gas amonio. En la Figura 14 se presenta el proceso de preparación de injertos cardiovasculares artificiales modificados mediante tratamiento por plasma

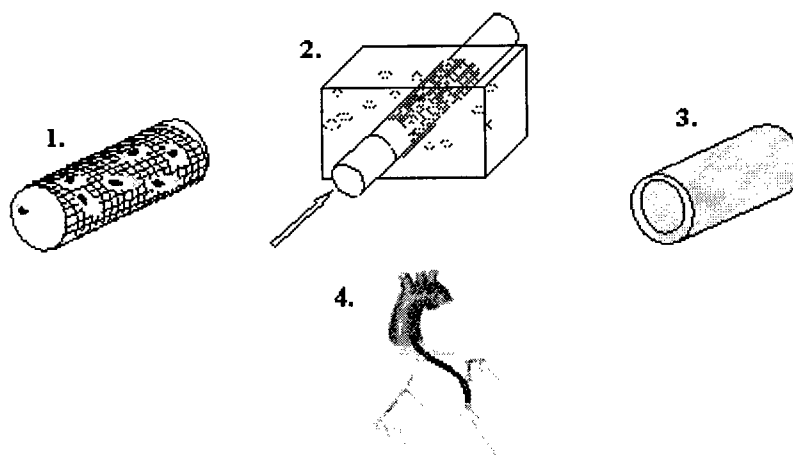


Figura 14. Proceso de preparación de injertos cardiovasculares artificiales.

1. Las células musculares son sembradas en un tubo de matriz polimérica biodegradable. La matriz polimérica es modificada superficialmente por plasma para aumentar la compatibilidad con las células musculares.
2. El tubo es colocado en un bioreactor.
3. Dos meses más tarde, el músculo es regenerado en la superficie del tubo
4. Las células endoteliales son adheridas a la superficie del tubo. Los tubos tienen diámetros muy pequeños y pueden ser usados como arterias artificiales en cirugías del corazón.

3.2.2 Preparación de la superficie a ser recubierta

Otro aspecto de vital importancia en la aplicación de recubrimientos orgánicos es la preparación del sustrato, ya que de ella dependerá la adhesión del recubrimiento, así como las condiciones de aplicación del recubrimiento, y que pueden afectar su buen desempeño. Los recubrimientos utilizados para una finalidad particular se seleccionan en la premisa de que el sustrato debe de ser receptivo al recubrimiento, o compatible con el mismo. Cuando los recubrimientos no cumplen con los requerimientos esperados de durabilidad y protección, se debe en gran medida a las condiciones poco adecuadas del sustrato. Entre las variables que presentan un efecto marcado sobre la eficiencia de los sistemas sustrato-recubrimiento, destacan la composición superficial, preparación, y pretratamientos.

Es necesario limpiar la superficie del material antes de aplicar el recubrimiento, con la finalidad de eliminar contaminantes que afecten la adhesión entre el recubrimiento y el sustrato. Existen diversas técnicas que permiten la limpieza de superficies poliméricas, entre las que podemos mencionar limpieza con disolventes, con ácidos, agentes oxidantes, plasma. Este último tiene la ventaja de no afectar el medio ambiente. La limpieza con plasma se realiza utilizando gases tales como oxígeno o argón. En éste caso las piezas a recubrir se introducen en el reactor y previo a la aplicación del recubrimiento son dejadas en un plasma de oxígeno o argón durante un par de minutos. El plasma gaseoso además de limpiar la superficie también le imparte cierta rugosidad, la cual es buena para el anclaje del recubrimiento. una vez que la superficie ha sido preparada un recubrimiento aplicado por plasma se adhiere bien a la superficie.

En las Figuras 15 y 16 se puede observar como un tratamiento con plasma de oxígeno puede remover impurezas de una superficie. Esta superficie puede ser posteriormente recubierta con una película delgada aplicada por plasma. El proceso de limpieza de superficies es llevado a cabo en el mismo reactor donde se llevara a cabo la polimerización por plasma. Es importante remover cualquier contaminante antes de aplicar un recubrimiento, si la superficie no esta completamente limpia no existirá una buena adhesión entre el sustrato y el recubrimiento aplicado por plasma.

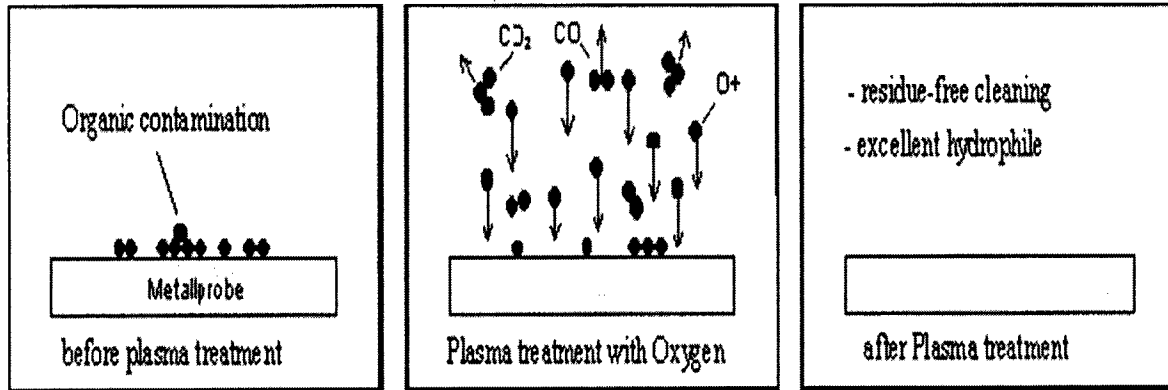


Figura 15. Remoción de contaminaciones orgánicas por plasma en superficies.

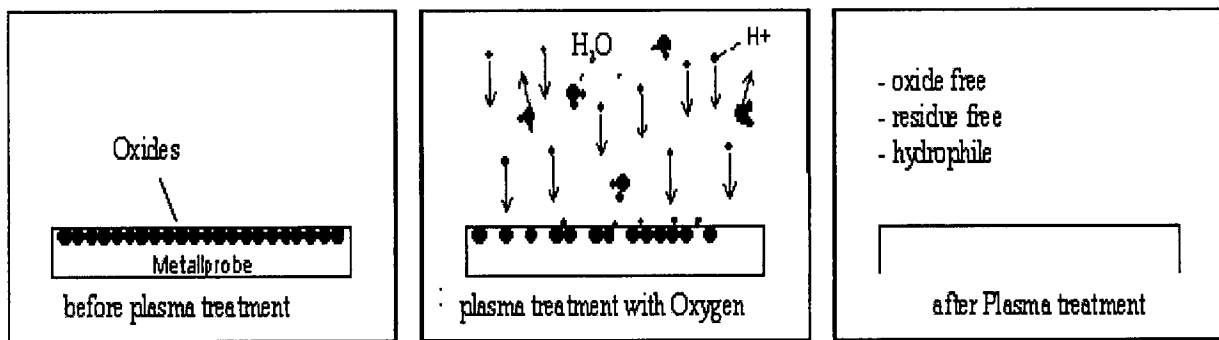


Figura 16. Remoción de óxidos por plasma en superficies.

IV. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

Desafortunadamente, las técnicas instrumentales que nos permiten analizar la masa de un polímero no son adecuadas para caracterizar la superficie del mismo. Las técnicas de análisis en general nos proporcionan información química, física y morfológica del volumen o masa de un material, pero proporcionan muy poca información acerca de la superficie. Por ésta razón es necesario utilizar técnicas específicas que nos proporcionen información de la superficie. Las películas de polímeros producidos por plasma son generalmente amorfas. La composición química y la naturaleza de los enlaces internos de los polímeros de plasma generalmente difiere de los polímeros convencionales basados en los mismos componentes. Los polímeros de plasma pueden tener un alto grado de entrecruzamiento y además contener enlaces insaturados. En la mayoría de los experimentos por plasma se producen muy pequeñas cantidades del polímero, típicamente del orden de miligramos. Además, estos polímeros son generalmente insolubles en solventes orgánicos debido a su alto grado de entrecruzamiento y estos factores afectan la caracterización de los polímeros de plasma. Por esta razón, técnicas más sofisticadas deben ser utilizadas en lugar de los métodos convencionales utilizados para el análisis de polímeros en general.

En las últimas cuatro décadas se han desarrollado algunas técnicas que permiten obtener información química, física y morfológica de la superficie, a continuación se explican algunas de éstas técnicas, aunque existe un gran número de ellas, nos enfocaremos específicamente aquellas que han sido utilizadas en los reportes presentados en este estudio.

4.1 Espectroscopía infrarroja (FTIR-ATR)

La espectroscopía infrarroja es utilizada para elucidar grupos funcionales en los polímeros de plasma. Aunque principalmente se utiliza como técnica de análisis cualitativo, también ha sido empleada para medir cuantitativamente las concentraciones de grupos funcionales y la densidad de entrecruzamiento de los polímeros. La espectroscopía de infrarrojo también puede ser utilizada para incrementar la utilidad del XPS (espectroscopía fotoelectrónica de rayos X); El FTIR puede indicar la presencia de grupos funcionales cualitativamente y la técnica de XPS nos proporciona una medida semicuantitativa de su concentración. El polímero de plasma

puede ser depositado directamente sobre una pastilla de bromuro de potasio (KBr) y de aquí se puede obtener directamente el espectro de infrarrojo de la película.

La técnica de FTIR solo nos proporciona información de la masa del material analizado, por lo que no es muy útil para el análisis superficial, sin embargo, para obtener información acerca de la superficie se utiliza un aditamento llamado ATR (reflectancia total atenuada), el cual es un dispositivo que se acopla al espectrómetro de infrarrojo y permite la detección de los grupos químicos en la superficie del material a analizar, como se muestra en la Figura 17.

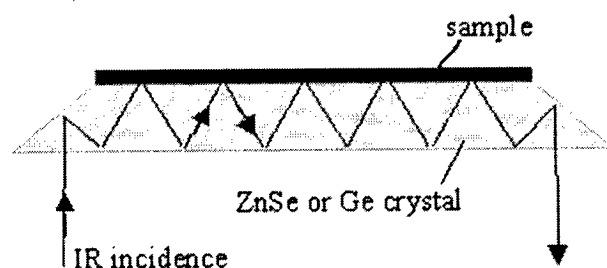


Figura 17. ATR-IR.

4.2 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

Esta técnica es muy importante para el análisis de superficies de películas poliméricas obtenidas por plasma, estas películas son extremadamente delgadas y el XPS es adecuado para la determinación de las propiedades químicas de esas películas, la técnica nos proporciona análisis elemental semicuantitativo, identificación de grupos funcionales y análisis de profundidad. En la técnica de XPS los electrones cercanos al núcleo del átomo son expulsados debido al ataque con una fuente de rayos X incidentes (Figura 18). Estos electrones expulsados se denominan fotoelectrones; la energía a la cual éstos fotoelectrones están enlazados al átomo, así como el número de fotoelectrones expulsados de la superficie de la muestra son medidos; cada elemento químico de la tabla periódica tiene una energía de enlace característico y en el espectro de XPS se gráfica energía de enlace contra número de electrones. La profundidad de análisis de la técnica es de alrededor de 100 nm. Esta técnica de

análisis también proporciona información de los grupos funcionales presentes en la superficie del polímero.

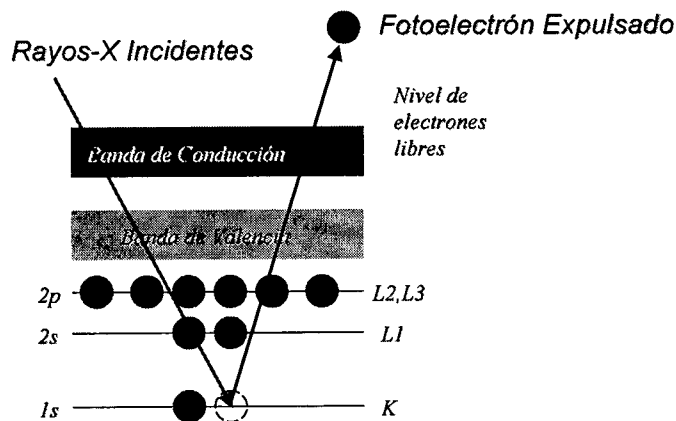


Figura 18. Fundamento de la espectroscopía de rayos X. El fotón de rayos X provoca la excitación y emisión de fotoelectrones.

4.3 Espectroscopía de ion secundario (SIMS)

La técnica proporciona información de los elementos y grupos químicos presentes en la superficie de un material. La técnica consiste en bombardear con iones primarios la superficie del material a analizar, este bombardeo provoca que iones secundarios sean expulsados de la superficie, los iones expulsados son analizados por espectroscopía de masas, obteniéndose así información de los pesos moleculares de los iones expulsados y la información puede ser correlacionada con la estructura química de la superficie analizada. La técnica es muy utilizada para obtener la estructura química de los polímeros de plasma.

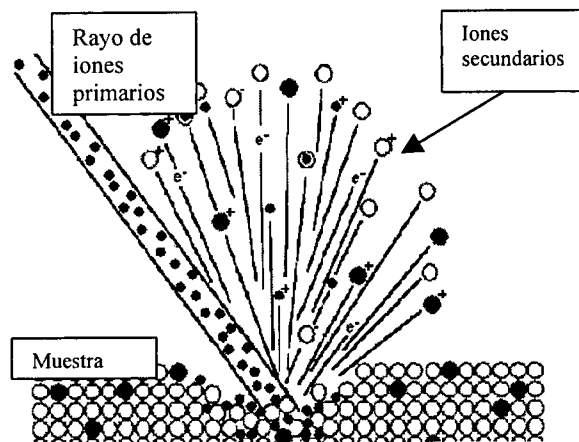


Figura 19. Proceso de SIMS.

4.4 Ángulo de contacto

La medición de ángulo de contacto es un método fiable para caracterizar la interacción entre un líquido y una superficie y nos proporciona información indirecta de la energía superficial. Esta técnica es muy utilizada para medir el grado de hidroflicidad o hidrofobicidad (Figura 20) de un recubrimiento polimérico aplicado por plasma. También se puede obtener la energía superficial del recubrimiento, utilizando diferentes líquidos para obtener el ángulo de contacto. El ángulo de contacto que puede ser obtenido midiendo el ángulo formado entre el sólido y la tangente a la superficie de la gota (Figura 21), de aquí se toma la altura de la gota en el punto medio y el ancho de la misma, con estos datos y utilizando la ecuación de la tangente ($\tan \theta = 2.2h/w$) se obtiene el ángulo de contacto.

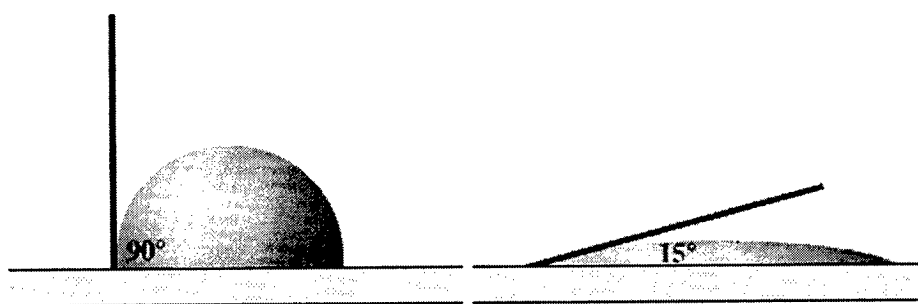


Figura 20. Superficie hidrofóbica e hidrofílica.

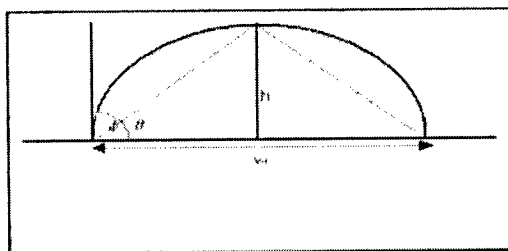


Figura 21. Determinación de ángulo de contacto entre polímero y gota.

4.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido es una técnica utilizada para obtener información morfológica de las películas obtenidas por plasma. En este tipo de microscopía se genera un haz de electrones que llega a la muestra sin atravesarla, y choca contra su superficie. Un generador de barrido es el responsable de producir el movimiento del haz, de manera que barre la muestra punto por punto. De la interacción entre los electrones incidentes con los átomos que componen la muestra se generan señales, las cuales son captadas con detectores y posteriormente convertidas en señales electrónicas que son proyectadas en un tubo de rayos catódicos. La homogeneidad de las superficies y el grado de rugosidad de las películas de plasma también es evaluado por esta técnica. La técnica de SEM también se emplea para observar células sobre la superficie de polímeros y para determinar la adhesión de diferentes tipos de células a las superficies de diferentes polímeros. Con SEM también se puede medir el espesor de los polímeros de plasma, que generalmente son muy delgados y difíciles de medir mediante otras técnicas. La síntesis de películas lisas libres de defectos ha sido demostrada por SEM.^{16,17}

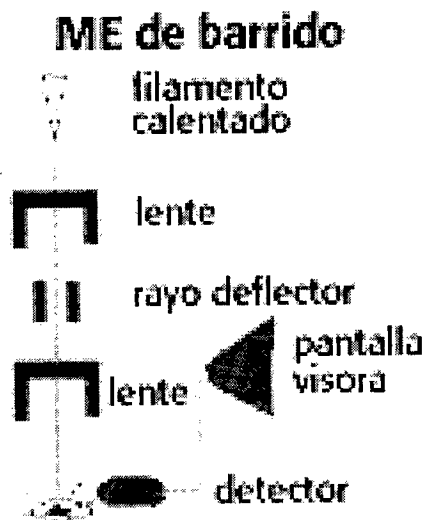


Figura 22. Componentes principales de un microscopio electrónico de barrido.



4.6 Espectroscopía de resonancia de electrones (ESR)

La espectroscopía de resonancia es una técnica de caracterización que puede detectar radicales libres en el polímero. La amplitud de la señal obtenida por ESR es función de la naturaleza y ambiente de los radicales libres en algunos casos se puede identificar la naturaleza química de esos radicales.

4.7 Microbalanza de Cuarzo

Entre los métodos no destructivos, las técnicas de resonancia mediante materiales piezoeléctricos como el cuarzo son muy útiles, porque permiten medir con mucha precisión masas del orden del nanogramos, comparables a una sola capa de moléculas pegadas a una superficie. La microbalanza de cristal de cuarzo consiste en una pequeña lámina de cristal de cuarzo cortado adecuadamente de tal forma que aplicando un potencial eléctrico oscilante entre sus caras se puede provocar una oscilación mecánica y medir sus propiedades de resonancia. Estas propiedades cambian cuando se colocan sobre el cristal diversos materiales, permitiendo conocer no solo la masa del material en estudio sino también su elasticidad, viscosidad, porosidad, etc. La microbalanza nos permite medir *in situ* las velocidades de polimerización por plasma. Para llevar a cabo las mediciones, un aditamento de la microbalanza es introducido dentro del reactor de plasma, el aditamento contiene un cristal redondo donde se va a depositar el polímero durante el proceso. El polímero se va depositando sobre el cristal, (el cristal esta depositado en el aditamento que esta conectado a la microbalanza) y la microbalanza mide la cantidad de polímero depositado en función del tiempo, de esta forma se miden las velocidades de polimerización y también se puede obtener el espesor de la película depositada, la información proporcionada por la microbalanza es muy difícil de obtener mediante otras técnicas de análisis, ya que las películas depositadas son ultradelgadas. En la Figura 23 se ilustra como el dispositivo de la microbalanza es introducido dentro del reactor de plasma.

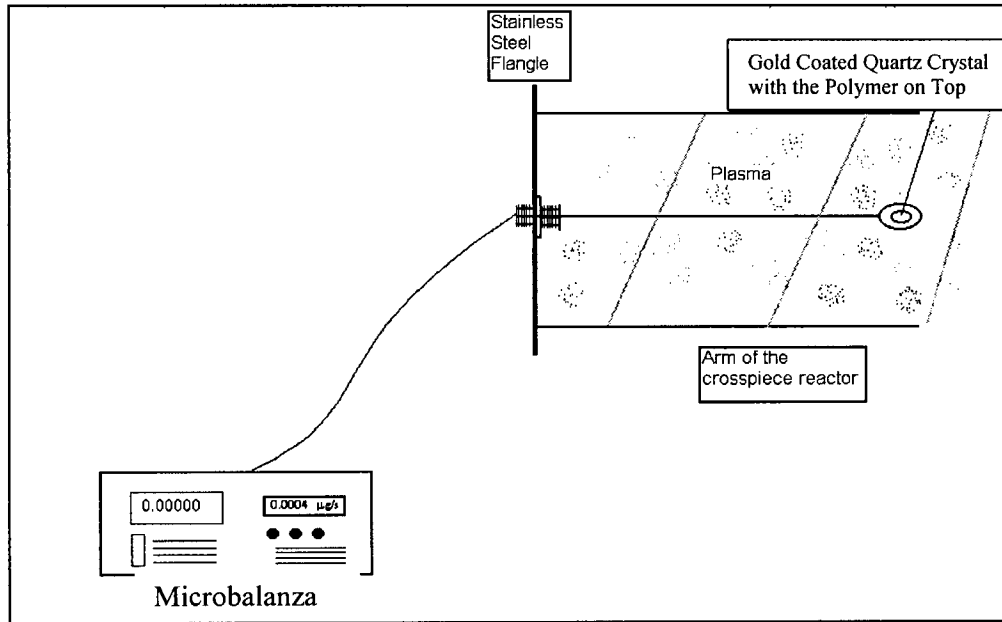


Figura 23. Sección transversal de reactor de plasma. Medición *in situ* de la velocidad de polimerización.

V. ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

Las aplicaciones de los “biomateriales” datan de 2000 años atrás, y un ejemplo de ello es el uso del oro por los Romanos y Chinos en restauraciones dentales. Sin embargo, no fue sino hasta después de la segunda guerra mundial que los materiales empezaron a ser utilizados más ampliamente en los seres humanos. Desde entonces, toda clase de materiales han sido utilizados como biomateriales. Por ejemplo, durante la segunda guerra mundial, los médicos se sorprendieron al encontrar pequeños trozos de polimetilmetacrilato (PMMA) en los ojos de los pilotos, lo cuales eran tolerados por el organismo. El polimetilmetacrilato y otros polímeros de metacrilato son utilizados actualmente para fabricar ojos falsos, dientes, cemento para huesos y lentes de contacto. Existen otros biomateriales importantes que incluyen polímeros de silicón, utilizado en implantes y en uniones de huesos. El polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE) y PMMA junto con aleaciones de acero inoxidable o Ti son la base para fabricar caderas artificiales, sin embargo, ninguno de estos materiales fue diseñado originalmente como biomaterial. Como consecuencia de esto, el sistema inmunológico detecta a esos materiales como “agentes extraños”, y como resultado los implantes provocan inflamaciones en las regiones aledañas. Esto atrae células blancas, conocidas como macrófagos hacia el lugar del implante. Los intentos de los macrófagos (glóbulos blancos) por digerir estos materiales resultan inútiles, y forman grandes multinúcleos de macrófagos. Finalmente, se forma una cicatriz de tejido alrededor del implante, este tejido sirve como barrera entre el implante y los fluidos corporales, lo cual impide que se forme tejido normal alrededor, y como consecuencia la vida útil de éste se ve reducida, especialmente si ocurre inflamación.¹⁸

Existen algunos biomateriales que son bien tolerados en el cuerpo humano y por lo tanto son capaces de evadir ataques del sistema inmunológico, además de poseer características que favorecen el crecimiento de tejido, lo que los hace potencialmente más efectivos en la fabricación de nuevos dispositivos médicos. Cientos de investigadores se han dedicado a estudiar la interacción entre células y diversos materiales para encontrar cuales son las características que proporcionan las bases para lograr una excelente compatibilidad. Se ha encontrado, por ejemplo que las células óseas se adhieren bastante bien a superficies de titanio, y por esta razón el titanio es ampliamente utilizado en la fabricación de implantes

dentales y médicos. Pero sin lugar a dudas nuevos y mejores materiales podrán ser desarrollados una vez que se tenga un claro entendimiento de la interfase biomaterial-tejido, y particularmente los factores que afectan el crecimiento de tejido nuevo alrededor del implante.

Aunque existen materiales que son aceptados sin mucho problema por el organismo, generalmente no son muy comunes, y normalmente se presentan problemas de rechazo del organismo hacia el material implantado. Por lo cual, la tecnología de plasma es por hoy una técnica que brinda la oportunidad de obtener nuevos materiales con propiedades de superficie adecuadas para llevar a cabo una buena interacción, específicamente para aplicaciones donde el polímero va a tener contacto directo con fluidos biológicos como la sangre. A través del tiempo se han utilizado una serie de polímeros como implantes, en general se buscaba que cumplieran con las propiedades mecánicas y físicas de la pieza a sustituir y se prestaba poca atención a las interacciones entre el medio biológico y la superficie del material implantado. En los últimos años los investigadores han logrado fabricar materiales con las propiedades en masa deseadas y las propiedades superficiales adecuadas que permitan una buena compatibilidad entre el medio biológico y el material que estará en contacto con éste. Es aquí donde técnicas como la polimerización por plasma juega un papel importante en la creación de esos nuevos materiales con propiedades superficiales específicas.

Como ya se ha mencionado anteriormente la polimerización por plasma: es una técnica utilizada para obtener películas delgadas de polímeros, que están altamente entrecruzadas y por lo tanto son insolubles en la mayoría de los solventes, son térmicamente estables y químicamente resistentes, siendo comúnmente adherentes a una variedad de sustratos entre los que se incluyen polímeros convencionales, vidrio y superficies metálicas.¹⁹ Son las propiedades originales y agregadas las que hacen a estas superficies atractivas para desarrollar y diseñar polímeros que sean aceptados por biosistemas.^{20,21}

5.1 Interacción polímero-células

La adhesión celular es uno de los aspectos que se evalúa con más frecuencia en las pruebas de biocompatibilidad por ser la característica que proporciona una mayor información del comportamiento celular hacia el material de prueba, aproximándose sobre todo al efecto más real posible que el material tendrá sobre el sistema biológico o en su lugar al cuerpo humano.

Se sabe que cuando un material entra en contacto con las células de un sistema biológico, las proteínas (péptidos) son las primeras que se depositan sobre el material, es decir forman una interfase entre el material y las células, donde las proteínas serán mediadoras de la interacción entre estas dos partes (Figura 24). Mediante la polimerización por plasma se pueden preparar recubrimientos que contengan en su superficie ciertos grupos químicos (aldehídos, cetonas, aminas, amidas, etc.) que presenten buena compatibilidad con las proteínas del medio biológico, como se muestra en la Figura 25. Estas proteínas enlazadas químicamente a la superficie del polímero permitirán un incremento en la biocompatibilidad del polímero con el resto de los componentes del medio biológico, especialmente con las células.

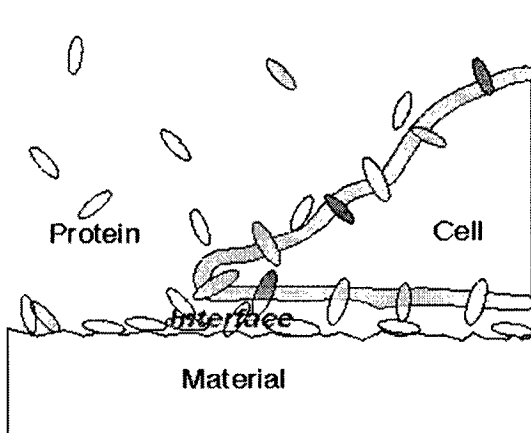


Figura 24. Esquema de la interacción entre un biomaterial y tejido celular mediada por proteínas.

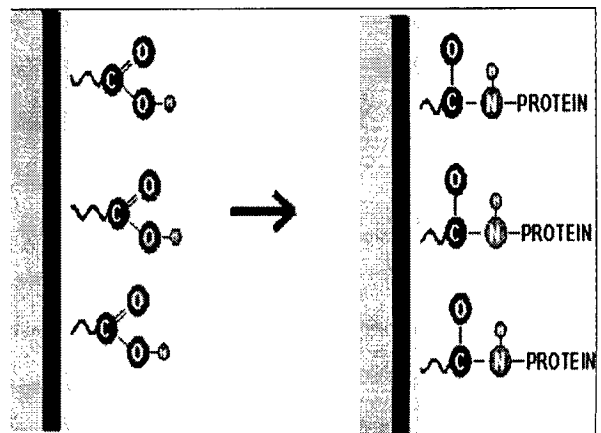


Figura 25. Adhesión mediada por proteínas.

5.2 Células endoteliales

Las células endoteliales forman la interfase natural de la sangre con el sistema vascular, se encuentran formando monocapas de patrones irregulares en venas y arterias y llevan a cabo varios procesos de regulación en su interacción con la sangre. Por esta razón es importante que los implantes cardiovasculares estén recubiertos por células endoteliales. Estas células son utilizadas en pruebas de adhesión sobre diferentes superficies poliméricas. Los cultivos de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) son utilizados frecuentemente para estudiar propiedades de implantes cardiovasculares. Estas células son aisladas enzimáticamente de la vena de cordón umbilical humano e incubadas por una semana, para posteriormente ser utilizadas en estudios de biocompatibilidad de diversos implantes poliméricos²². En la Figura 26 se describe el proceso general de extracción de este tipo de células y su cultivo en superficies poliméricas. Mediante polimerización por plasma se pueden fabricar recubrimientos delgados que contengan grupos químicos que sean compatibles con las células endoteliales y que posteriormente puedan servir como implantes cardiovasculares. .

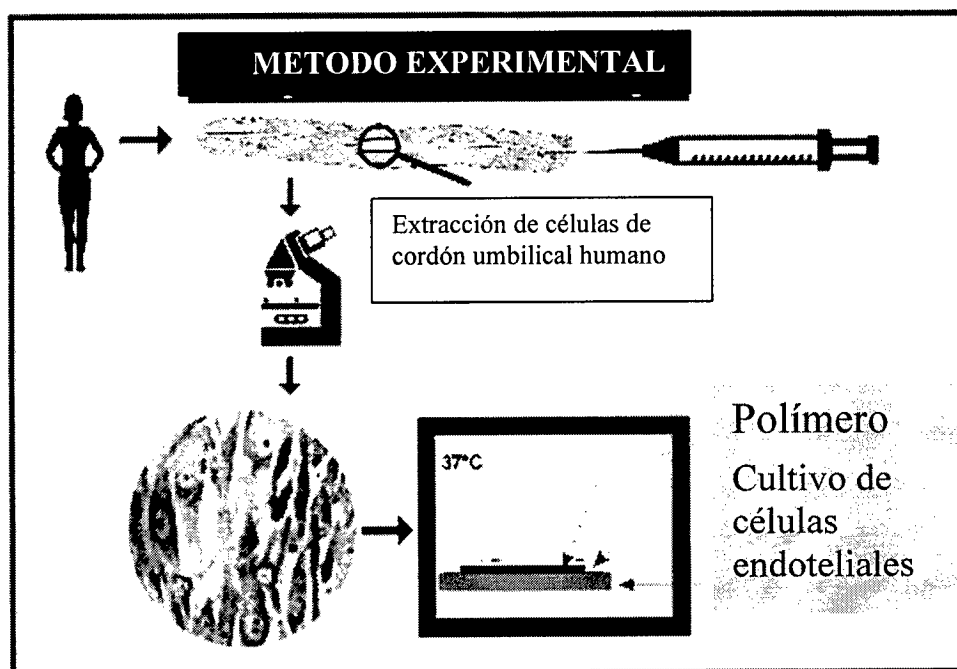


Figura 26. Estudio de implantes celulares cardiovasculares.

En una investigación reciente²³ se evaluó la modificación superficial de politetrafluoroetileno (PTFE) por medio de la adhesión y crecimiento de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC's) *in vitro*. El PTFE es uno de los materiales más comunes para implantes en contacto con sangre y tejido. La mayoría de los injertos cardiovasculares son preparados con este polímero. La química inerte del fluoropolímero requiere estrategias especiales para modificarlo superficialmente. En éste trabajo, la modificación del polímero fue realizada por medio de tratamiento plasma con amonio y mezclas de hidrógeno/vapor de agua. El plasma es frecuentemente utilizado para aumentar la adhesión superficial. La adhesión y proliferación de células en materiales poliméricos depende de las características superficiales, tales como composición química, energía superficial, carga eléctrica, rugosidad y rigidez. La principal causa de las variaciones en la adhesión celular es atribuida a la alteración de los patrones de absorción de proteínas. La adhesión de las células endoteliales se correlaciona directamente con los parámetros de procesamiento del plasma y con las correspondientes propiedades fisicoquímicas de la superficie. Se encontró un balance de heteroelementos (nitrógeno, oxígeno) en la superficie del PTFE después del tratamiento plasma que inducen una máxima estimulación en la adhesión de células endoteliales..

Como se mencionó con anterioridad, para que haya una buena compatibilidad entre células y superficie polimérica es importante que las proteínas de adhesión interactúen primeramente con la superficie polimérica. La importancia de la absorción de proteínas adhesivas en la superficie del polímero para la adhesión de células endoteliales es ilustrada por medio de la técnica de microlitografía, esto se aprecia en la Figura 27, en la primera etapa se colocaron tiras de fibronectina sobre la superficie de una caja petri de cultivo de células de PS. La fibronectina es una proteína de adhesión que sirve como enlace entre la superficie del polímero y las células. Posteriormente se añadieron las células endoteliales, las cuales se adhirieron sobre las tiras de fibronectina, en la Figura 27 se observa como las células se orientaron en la dirección de las fibras. Las células no se adhirieron en la superficie de PS donde no había fibronectina.

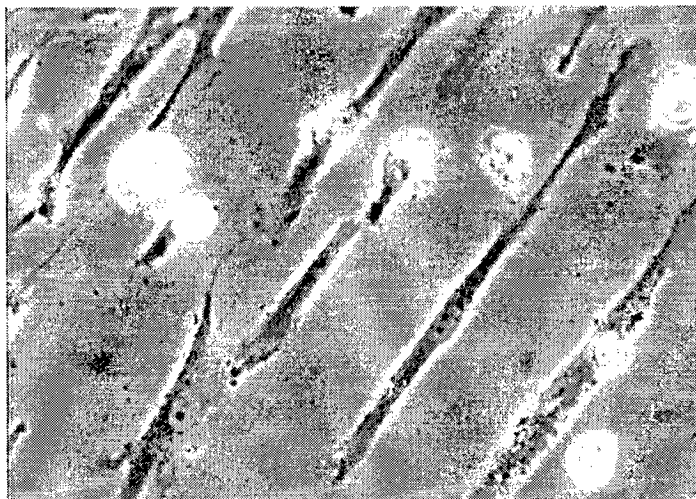


Figura 27. Células endoteliales humanas sobre superficie de poliestireno microestructurado con fibronectina.

La producción de recubrimientos con estructura química adecuada para la adhesión de células ha sido ampliamente estudiada en los últimos años. En algunos estudios se ha encontrado que ciertos grupos químicos son adecuados para atraer células y proteínas.²⁴ De manera particular superficies con grupos base nitrógeno responden mejor a la respuesta de adhesión celular. Griesser y colaboradores²⁵ se han enfocado a investigar la unión y crecimiento de células endoteliales y fibroblastos humanos sobre superficies poliméricas obtenidas por polimerización por plasma de monómeros amina y amida, y en superficies tratadas con plasma amonio. Encontraron que las células interactúan fuertemente con las superficies poliméricas cuando existe una concentración alta de grupos amida presentes en las superficies.

5.3 Evaluación de la biocompatibilidad en polímeros de plasma

También se ha encontrado que una superficie hidrofílica promueve la adhesión de células a través de la adsorción de proteínas tales como fibronectina y vitronectina. Para evaluar la adhesión celular Griesser y colegas²⁶ utilizaron dos glicoproteínas adhesivas: la vitronectina (Vn) y la fibronectina (Fn) y encontraron que en polímeros de plasma que contienen solo grupos oxigenados (carbonilos, hidroxilos, cetonas), la vitronectina (Vn) promovía la adhesión celular, pero la fibronectina no. En cambio en polímeros de plasma conteniendo nitrógeno, sintetizados a partir de monómeros de amina y amida, ambas glicoproteínas (Fn y Vn) fueron capaces de mediar la adhesión celular. Encontraron que la capacidad de las superficies

poliméricas de soportar la unión y el anclaje del crecimiento celular depende de la estructura química del polímero.

La caracterización química de los recubrimientos de plasma juega un importante papel en la elucidación de las interacciones en la interfase tejido-biomaterial. Davidson y colaboradores²⁷ prepararon películas de acetonitrilo. Las películas fueron depositadas sobre sustratos de silicón y sobre cajas petri de poliestireno (PS) para cultivo de células. Fueron caracterizadas por espectroscopía infrarroja (FTIR) y por espectroscopía electrónica de rayos X (XPS). El análisis de FTIR reveló que las películas depositadas por plasma contenían una alta concentración de grupos funcionales de nitrógeno; incluyendo amina, imina y grupos nitrilo. Algunos de los recubrimientos de poli-acetonitrilo (PAN) fueron expuestos a radiación ultravioleta. Por XPS, se encontró que la exposición de las películas a la radiación de ultravioleta (UV) provocó la oxidación de éstas: el contenido de oxígeno aumentó de 3 a 17%, después de 300s de exposición al UV, los recubrimientos fueron evaluados con fibroblastos humanos y se observó un aumento en la biocompatibilidad. Estas células también fueron depositadas en cajas petri de PS (modificadas químicamente por plasma), y en cajas petri sin tratamiento superficial alguno.

En la Figura 28 se observan los resultados encontrados. Las células depositadas en el PS sin tratar son redondas (Figura 28a), esto indica que no hay una buena interacción entre las células y el sustrato, la figura 28b corresponde a la adhesión de células en cajas de PS usadas para cultivo de células (TCPS), las Figuras 28c y 28d corresponden a las películas de acetonitrilo preparadas por plasma, la película de la Figura 28d fue expuesta a radiación UV. Tanto en las superficies de las películas de acetonitrilo, como en el PS modificado, se observa la adhesión de un gran número de células, además se observa que las células están completamente extendidas sobre las superficies poliméricas, lo cual indica que existe una buena compatibilidad entre superficies y células.

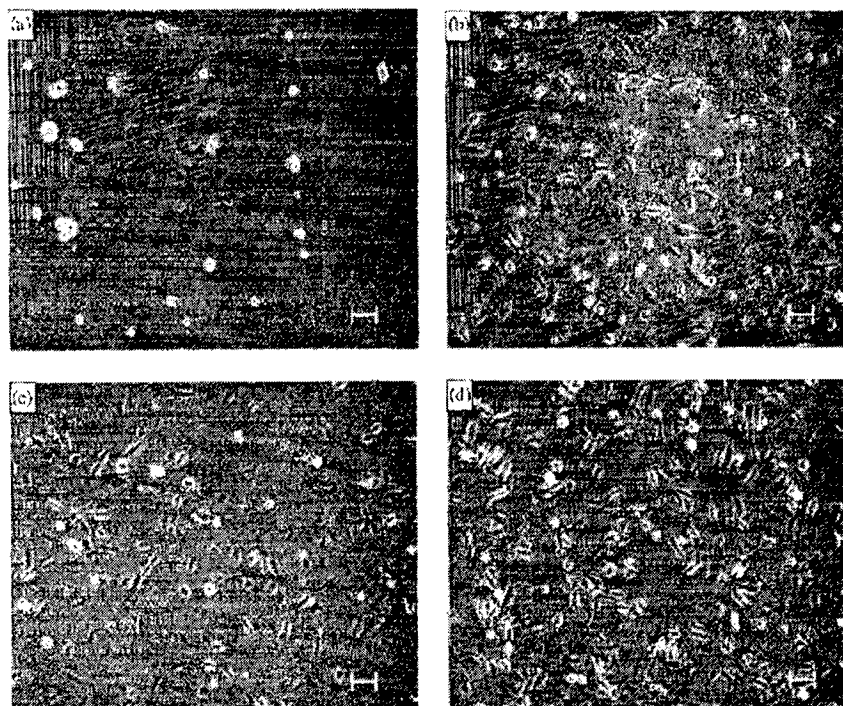


Figura 28. Adhesión celular en (a) poliestireno sin tratamiento, (b) TCPS, (c) acetonitrilo polimerizado por plasma y (d) acetonitrilo polimerizado por plasma y expuesto a radiación UV por 300s. Escala =100 μ m.

Hamerli y colaboradores,²⁸ polimerizaron alilamina sobre membranas de poliéster (PET) para obtener superficies con buenas propiedades de adhesión celular. Las membranas fueron recubiertas usando un generador de plasma de microondas, durante la polimerización se variaron diferentes parámetros. Los efectos de los parámetros sobre las propiedades físicas y químicas de la alilamina polimerizada por plasma fueron evaluados estudiando su composición química elemental, así como la concentración de grupos amina, la hidrofiliidad (mojabilidad) y la morfología superficial. Se encontró una concentración relativamente alta de grupos amina (por arriba de 50 nmol/cm²) en las películas. Independientemente de las condiciones del tratamiento, oxígeno fue incorporado a la estructura del polímero. Las superficies de alilamina polimerizadas por plasma (PPA) fueron más hidrofílicas que las del PET de acuerdo a los resultados de las mediciones de ángulos de contacto. Se encontró que la mojabilidad de las películas obtenidas dependía de la concentración de grupos amina. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido indican que las películas depositadas presentan superficies muy homogéneas y no afectan la permeabilidad del PET. La evaluación

in vitro de la biocompatibilidad de los polímeros de alilamina fue llevada a cabo estudiando la interacción de fibroblastos de piel humana con la superficie. Se encontró que la unión celular y la viabilidad de las células en los recubrimiento de alilamina fue mucho mejor que en el caso de las membranas de PET sin recubrir. Los fibroblastos se extendieron mejor en las superficies recubiertas que en las superficies sin recubrir.

Harsch²⁹ y colaboradores obtuvieron polímeros con estructuras químicas más controladas de alilamina polimerizada por medio de plasma pulsado. El plasma pulsado consiste en un sistema que se prende y apaga automáticamente en periodos de milisegundos. Con este tipo de sistemas se obtienen polímeros de plasma con estructura química más controlada. El polímero fue preparado sobre un sustrato de polisiloxano hidrofóbico y el objetivo del trabajo fue obtener superficies aptas para cultivo celular. Además del interés de que los recubrimientos obtenidos por polimerización por plasma presenten buenas características, que propicien la adhesión celular, también se busca que estos biomateriales tengan una resistencia a condiciones extremas como lo son los procesos de esterilizado, garantizando así la reutilización del material. En el presente trabajo, se lograron obtener películas con buena estabilidad a varios ciclos de esterilizado por autoclave.

Se realizaron dos experimentos de plasma pulsado utilizando un generador de RF de 200W: (1) un ciclo de 3ms de encendido y 5ms de apagado (3/5); (2) un ciclo de 3ms de encendido y 45ms de apagado (3/45). Las superficies fueron caracterizadas por XPS y ángulo de contacto con agua y la biocompatibilidad de las superficies se evaluó con células de tejido espinal embrionario. Se evaluó la adhesión y el crecimiento celular. Las películas de alilamina preparadas en el experimento (3/45) presentaron mayor contenido de amina que las películas preparadas bajo las condiciones (3/5). Las condiciones de procesamiento afectaron las propiedades químicas de las películas obtenidas. Las pruebas de biocompatibilidad mostraron que las células se dispersaron mejor en las películas procesadas bajo las condiciones 3/45.



Un grupo de investigadores de la Universidad de Sheffield ³⁰, ha trabajado en los últimos 15 años en la preparación de polímeros de plasma biocompatibles con células de la piel. Ellos han estudiado los efectos de la química superficial en el comportamiento celular.

Seleccionando el monómero adecuado y controlando cuidadosamente las condiciones de operación han preparado películas por plasma que retienen la estructura química del monómero. Por ejemplo, han utilizado compuestos orgánicos conteniendo carboxilato para preparar polímeros que contienen hasta un 80% de ácido carboxílico en su estructura química. Para preparar estos polímeros con estructura controlada han mezclado un hidrocarburo con el monómero de carboxilato. Esta técnica permite producir superficies con la funcionalidad química deseada en condiciones controladas.

Los investigadores han estudiado una diversa variedad de células en los polímeros de plasma, aunque se han enfocado principalmente a las células de la piel (queratinocitos). El objetivo ha sido el de producir mejores sistemas de cultivo de células y nuevos biomateriales que apoyen al área de ingeniería de tejidos de la piel. En los últimos años han enfocado sus esfuerzos en desarrollar una venda de transferencia de células, en la cual se puedan cultivar *in vitro* células de la piel de pacientes con quemaduras o úlceras. Posteriormente esa venda se coloca en la piel afectada del paciente y las células de la venda deben transferirse sin complicación a la parte afectada. Esto permitirá acelerar el proceso de sanación de la piel afectada. Este tipo de vendas no han sido comercializadas en la actualidad, pero éste grupo de investigación ha recibido financiamiento de diversos organismos y ellos han creado dos compañías: CellTran y Plasso. Estas compañías estarán ofreciendo a la venta en un futuro cercano este tipo de vendas y algunos otros productos biomédicos procesados por medio de la polimerización por plasma.

En las primeras investigaciones realizadas por el grupo de Sheffield, se estudio la adhesión de los queratinocitos en dos superficies control, colágeno y cajas petri de PS utilizadas para el cultivo de células. Se encontró que los queratinocitos son difíciles de cultivar y que no se adherían bien a la superficie de las cajas de cultivo, el sustrato preferido por estos es el colágeno I, el cual se localiza en la membrana de la piel, entre la epidermis y la dermis.

Al mismo tiempo se probaron algunos polímeros de plasma. Para esto, primero se cultivaron durante 24 horas queratinocitos frescos obtenidos de la piel de un paciente, los queratinocitos fueron depositados sobre las dos superficies control antes mencionadas y sobre los polímeros de carboxilato preparados por plasma. Posteriormente se determinó la concentración de células adheridas en las diferentes superficies y en la Figura 29 se observan los resultados. Se observa que la concentración de grupos carboxilato en los polímeros de plasma tiene un efecto importante sobre la adhesión de queratinocitos. Una concentración de grupos carboxilato de 2.3% es la más adecuada si se desea una alta adhesión de queratinocitos, mientras que para polímeros con una concentración de grupos carboxilato de 10% la adhesión de células es baja. Las cajas petri de PS también presentaron una baja adhesión de células. El sustrato de colágeno presentó alta adhesión celular, lo cual era de esperarse.

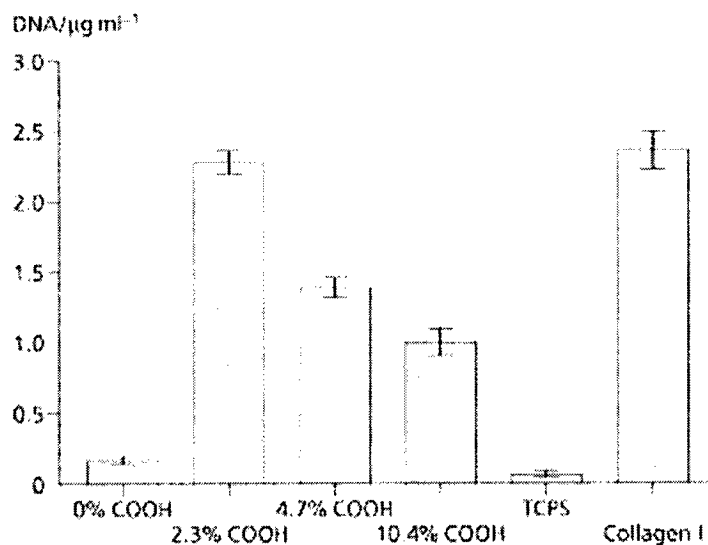


Figura 29 . Queratinocitos adheridos a polímeros de plasma, tejido cultivado en poliestireno(TCPS) y en colágeno I.

Algunas hipótesis reportadas en la literatura han tratado de relacionar la energía superficial con la adhesión celular. Una teoría menciona que las superficies con energía superficial intermedia promueven una mejor adhesión de células. Sin embargo el grupo de Sheffield encontró que los polímeros de plasma conteniendo 2.3% de grupos carboxilato, tenían una energía superficial muy baja y fueron los que mejor adhesión celular presentaron, por lo que concluyeron que la adhesión estaba más relacionada con la estructura química que con la

energía superficial. Los resultados de esta investigación mostraron que los polímeros de plasma son excelentes sustratos sintéticos para el cultivo rápido de células de la piel. Para una transferencia de células efectiva los queratinocitos deben abandonar la superficie del biomaterial y ser transferidos eficazmente a la piel afectada del paciente. Los polímeros de plasma cumplieron con este requisito.

Para evaluar la transferencia de células, éstas fueron cultivadas en las superficies de polímeros de ácido acrílico, luego los polímeros con las células cultivadas se colocaron en un trozo de piel, y se realizó un conteo de las células transferidas del polímero a la piel. Se encontró una buena transferencia de células del polímero hacia la piel. En base a los resultados encontrados, existe gran optimismo en que los biomateriales desarrollados son excelentes vehículos para el tratamiento exitoso de quemaduras graves y úlceras.

En otro estudio relacionado con el anterior, varios copolímeros de plasma a base de ácido acrílico y 1,7-octadieno fueron desarrollados por Haddow y colaboradores.³¹ Los copolímeros fueron diseñados para cultivar células de la piel (queratinocitos) y posteriormente transferirlas a piel humana. Se quería probar si los copolímeros de plasma eran buenos agentes de transporte de las mencionadas células. En este estudio también se utilizaron otros sustratos: colágeno, un polímero de hidrocarburo y PVC. Los queratinocitos fueron cultivados en estas superficies. En este trabajo, se evaluó la unión de las células a los diferentes sustratos, se encontró que los copolímeros con alto contenido de ácido acrílico y el colágeno presentan una alta compatibilidad hacia los queratinocitos, se observó un número grande de células en las superficies de éstos sustratos.

Posteriormente se procedió a la etapa de la transferencia de células. Los diferentes sustratos mencionados anteriormente, conteniendo las células en su superficie, fueron expuestos directamente en contacto con una muestra de piel humana de un donador. La idea era, de que los queratinocitos viajaran desde los sustratos hacia la dermis (piel), y se llevará a cabo el proceso de transferencia de células. Se encontró que los sustratos poliméricos de ácido acrílico y el colágeno son los materiales más adecuados para la transferencia de célula. Después de 4 días en contacto con la piel, los sustratos fueron removidos y el nivel de células residuales y la

transferencia de células a la piel fueron evaluadas utilizando un ensayo de viabilidad celular. Las muestras de piel conteniendo las células transferidas fueron teñidas con un colorante que tiñe los queratinocitos. Las muestras de piel que presentan mayor coloración, son las que recibieron un mayor número de células. En las fotografías de la Figura 30 se aprecia que las muestras de piel que estuvieron en contacto con colágeno y los copolímeros del ácido acrílico recibieron un mayor número de células, ya que son las que presentan mayor tinción. Las muestras de piel expuestas al polímero de hidrocarburo y al PVC presentan bajos niveles de tinción. Los autores concluyeron, que las superficies que contienen ácido carboxílico polimerizado por plasma representa una gran promesa en el área de curación de quemaduras graves y úlceras.

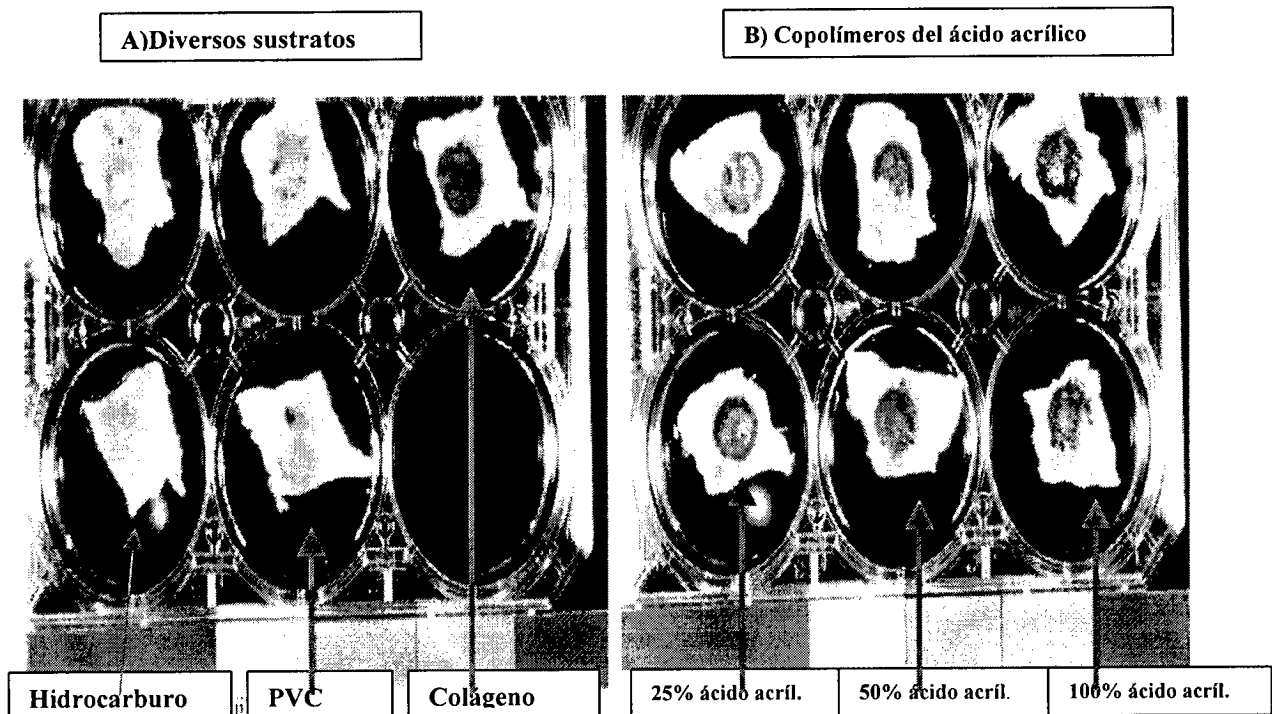


Figura 30. Fotografías ilustrando el nivel de teñido atribuido a la transferencia de los queratinocitos desde varios sustratos hacia la piel humana.

5.4 Polimerización por plasma y microlitografía

La técnica de polimerización por plasma ha sido utilizada en los últimos 5 años para construir microchips biológicos por medio de las técnicas de microlitografía. En la fabricación de microsensores biológicos, se requieren superficies con diferentes funcionalidades y con propiedades hechas a la medida. Mediante la técnica de microlitografía se pueden realizar letras o figuras de tamaño nanométrico con una alineación muy precisa. A continuación se presentan algunos trabajos realizados en ésta área.

Wilkinson y Curtis,³² de la Universidad de Glasgow (Escocia), han estudiado los efectos de la topografía superficial en la adhesión de células, y han encontrado que las células se alinean de acuerdo a las características topográficas de las superficies, como se puede apreciar en la Figura 31. Tales efectos dependen del tamaño y tipo de célula. Ciertas células, tales como los fibroblastos (responsables de producir matriz extracelular durante el sanado de heridas) cuando son colocadas en biomateriales con superficies llenas de surcos, tienden a salirse de los surcos. Mientras, que los macrófagos tienden a permanecer dentro de los surcos. Tales comportamientos celulares, son indudablemente importantes para diseñar nuevos biomateriales capaces de controlar el crecimiento de tejidos.

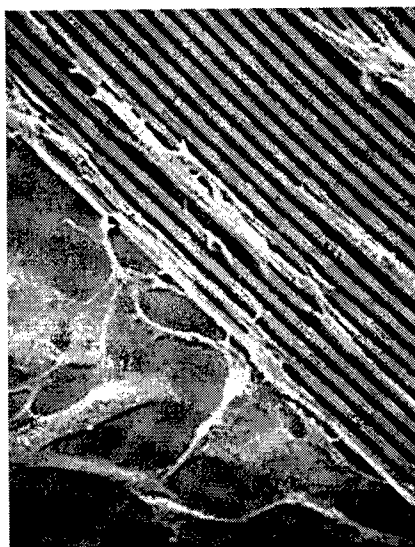


Figura 31. Células sobre la superficie ranurada de titanio, elongadas y alineadas por sí mismas en las ranuras.

Goessl y colaboradores³³ diseñaron una técnica denominada microlitografía por plasma la cual utiliza la fotolitografía y polimerización por plasma para la obtención de sustratos para cultivo celular. En este estudio se diseñaron superficies con figuras definidas y observaron que las células se concentraban dentro de las fronteras de las figuras diseñadas. Se estudió la adhesión y el comportamiento de células musculares sobre el recubrimiento de plasma. En este estudio se utilizaron sustratos de polietilentereftalato. Al sustrato de PET se le aplicó una capa del polímero de tetraetilenglicol dimetil eter (Tetraglyme), y posteriormente sobre esta capa se diseñaron figuras por litografía por plasma de polifluorocarbono (Figura 32). La capacidad de controlar la forma y el crecimiento de las células es de gran importancia en la investigación de la influencia de las variables geométricas sobre la fisiología celular

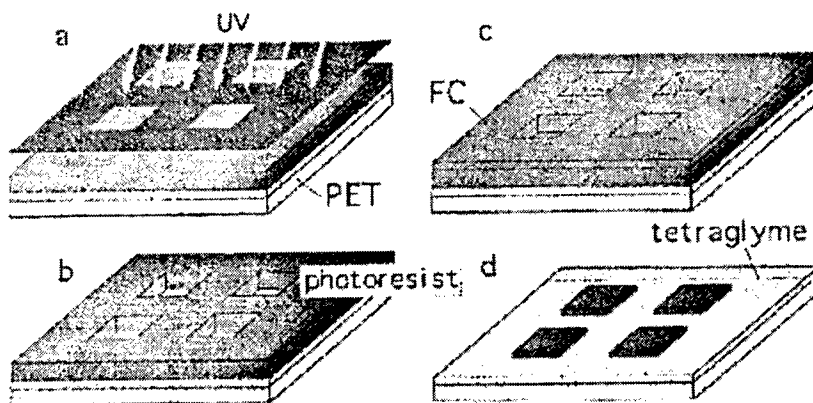


Figura 32. Representación esquemática del proceso de litografía por plasma. (a) Un material fotoresistente es colocado sobre la superficie del sustrato PET-Tetraglyme y expuesto a radiación UV (b) Formación de la máscara fotoresistente en el sustrato (c) El polímero de flurocarbono (FC) es aplicado por plasma para formar una película ultradelgada sobre la superficie (d) Remoción del material fotoresistente y se obtiene la arquitectura final de la superficie.

El análisis químico por espectroscopía de electrón (XPS) y espectroscopía de masas de ion secundario fue utilizado para optimizar las condiciones de depósito y caracterizar los polímeros resultantes. Las imágenes obtenida por SIMS fueron utilizadas para visualizar la distribución espacial de los componentes poliméricos de la superficie micropatrón. Las células musculares fueron sembradas sobre las superficies patrón para mostrar que los sustratos presentan las propiedades deseadas, y que la morfología celular puede ser verdaderamente

controlada. Se encontró que las células musculares se adherían perfectamente al Polifluorocarbono, pero no se adhirieron en lo absoluto al Tetraglime. También se diseñaron recubrimientos lineales muy delgados con polímero de Polifluorocarbono y se encontró que las células se acomodaban y alineaban dentro de los diseños delgados, es decir las células tomaban el diseño y tamaño del recubrimiento. Para mantener la temperatura de estas células el medio fue alimentado con 10% de suero de ternero, y el medio fue cambiado cada 3 días. En éste estudio se encontró que la técnica de microlitografía por plasma es útil para modificar el tamaño y la forma de las células adheridas y como consecuencia se afecta también el comportamiento celular.

Diferentes tipos de recubrimientos pueden ser aplicados a un solo sustrato. Un recubrimiento puede adherir, cierto tipo de células o proteínas, mientras que el otro recubrimiento puede adherir otro tipo de células, se pueden fabricar recubrimientos que sean hidrofóbicos en una posición e hidrofílicos en otra. La simplicidad de la técnica de desprendimiento (lift-off) y la firmeza y versatilidad de los recubrimientos polimerizados por plasma, son ideales para aplicaciones en chips biológicos (bio-MEMS), donde superficies patrón con diferentes funcionalidades son requeridas en el mismo microchip. Utilizando ésta tecnología, Bouaidat y colaboradores³⁴ prepararon en un mismo sustrato recubrimientos de adhesión y no-adhesión celular. Para las pruebas de biocompatibilidad, utilizaron bacterias *E. coli* K-12. Ellos prepararon 4 recubrimientos de polímeros mediante plasma: para-xileno (PX), 1,2 - vinilpirrolidona (VP), polidifluoruro de vinilo (PVDF) y vidrio fosforoso (SiPOC). Los polímeros fueron depositados en sustratos de silicón (SiO_2). Los micropatrones de PX y VP fueron funcionalizados sobre el sustrato de silicón. Con los recubrimientos de PX y VP se diseñaron letras. Los tamaños característicos de los diseños fueron de $2\mu\text{m}$. La alineación de los diseños fue precisa. Estos diseños se obtuvieron utilizando técnicas de desprendimiento y fotolitografía de limpieza. En la Figura 33 se observa una fotografía de SEM de una superficie de SiO_2 con recubrimientos diseñados en forma de letras (la palabra RESEARCH). Las letras pueden ser hidrofílicas (polímero VP) o hidrofóbicas (polímero PX) dependiendo de la estructura química del recubrimiento que se haya aplicado.

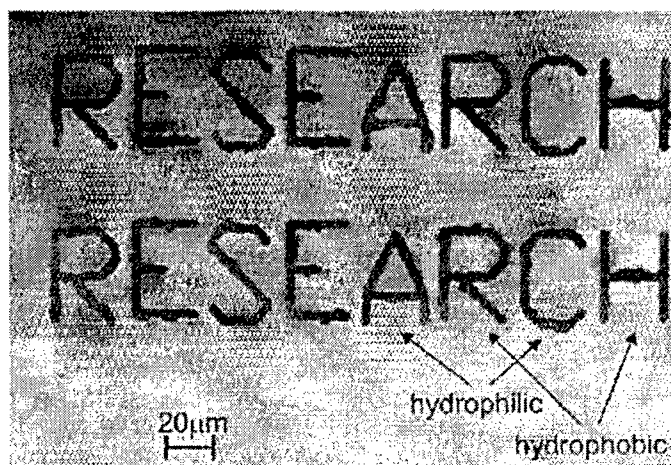


Figura 33. Imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) de una superficie de SiO_2 con patrones recubiertos. Las letras son alternadamente hidrofóbicas e hidrofílicas, y corresponden a los polímeros PX y VP, respectivamente.

Las pruebas de biocompatibilidad hacia la bacteria *E. coli* k-12 fueron realizadas sobre los recubrimientos: SiPOC y PVDF, para estas pruebas, los recubrimientos fueron expuestos a cultivos de la bacteria. En los recubrimientos de SiPOC no se observó ninguna interacción con la bacteria, mientras que en los recubrimientos a base de PVDF se observó la adhesión de un gran número de ellas.

En otro estudio de microlitografía, Bouaidat y colaboradores³⁵ depositaron recubrimientos de polietileneóxido aplicados por plasma de baja frecuencia en sustratos (portaobjetos) de vidrio. Las propiedades “no-adhesivas” de los recubrimientos fueron probadas con células humanas (HeLa) y proteínas marcadas con fluoresceína (albúmina sérica bovina marcada con isotiocianato, FTIC-B5a). Los recubrimientos fueron micromodelados utilizando fotolitografía de alta limpieza y desprendimiento de capas, de tal forma que se obtuvieron los portaobjetos recubiertos con el polímero PEO, y sobre el recubrimiento se diseñaron pequeñas figuras bien definidas, es decir se desprendieron capas del recubrimientos para diseñar estas figuras. De tal forma que la superficie estaba conformada en partes por el recubrimiento de PEO y en partes por vidrio. Los investigadores encontraron que las células humanas y las proteínas se concentraban y adherían perfectamente en la región donde se encontraban las figuras (en el vidrio), pero la adhesión fue nula en el recubrimiento de PEO (Figuras 34 y 35).



Figura 34. Izquierda: Imagen de microscopía óptica de un soporte de vidrio con recubrimiento de polímero plasma. Las células HeLa forman claramente las letras “SMB”, ofreciendo un alto grado de contraste entre los patrones sin recubrimiento y la región recubierta. Derecha: Los cuadros aislados miden 50 μm de lado. Las células se esparcen completamente sobre la geometría entera de los cuadrados.

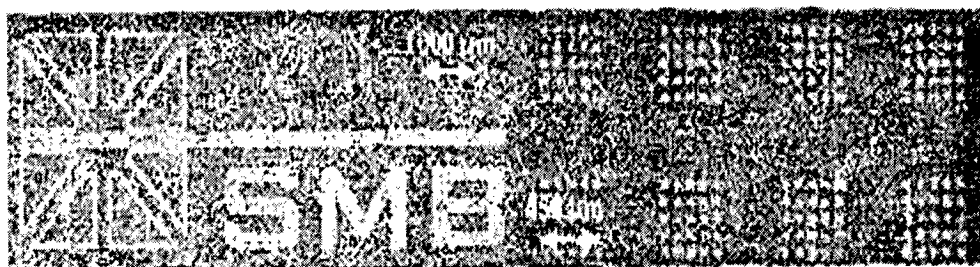


Figura 35. Izquierda: Proteínas marcadas con fluoresceína (FTIC-BSA) en una superficie moldeada con polímero de plasma, donde la fluoresceína se absorbe selectivamente en las letras y en el logotipo (superficie de vidrio). Derecha: Escuadrillas fluorescentes de FTIC-BSA absorbida selectivamente en círculos con diámetro de 50 μm formando cuadrados de 5 x 5.

En otro estudio llevado a cabo por Mitchell y colegas,³⁶ se prepararon polímeros de n-Hexano mediante la técnica de polimerización por plasma, los polímeros se depositaron en cajas de plástico (PS) para cultivo de células. El análisis químico de las superficies se realizó por XPS y la morfología superficial se evaluó por AFM. Para el proceso de litografía, se utilizaron máscaras cuadradas y hexagonales. Las máscaras permiten la realización de diseños y figuras sobre la superficie de la caja de PS. La función de estas máscaras es que el polímero solamente se deposite en ciertas regiones del sustrato de PS y deje sin recubrir otras regiones específicas (litografía). En la Figura 36 se observa como el polímero de n-Hexano fue depositado formando figuras hexagonales.

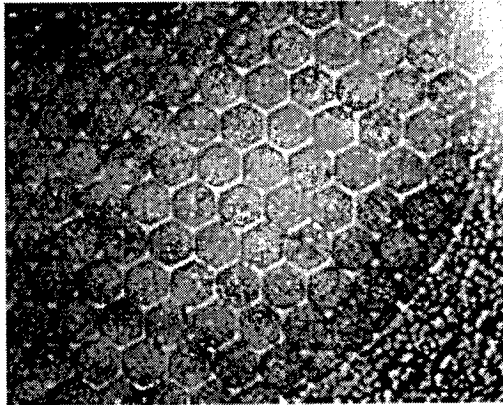


Figura 36. Fotografía del polímero de n-Hexano depositado por plasma en una caja petri de PS.

Para evaluar las diferencias en biocompatibilidad de la superficie se agregaron células al sustrato recubierto. Y se encontró que las células se adherían a las partes de PS descubierto, pero no se observaron células en la parte recubierta, Figuras 37 y 38. Se observa que las células buscan adherirse y alinearse donde hay PS, pero no se adhirieron sobre el recubrimiento de n-Hexano.

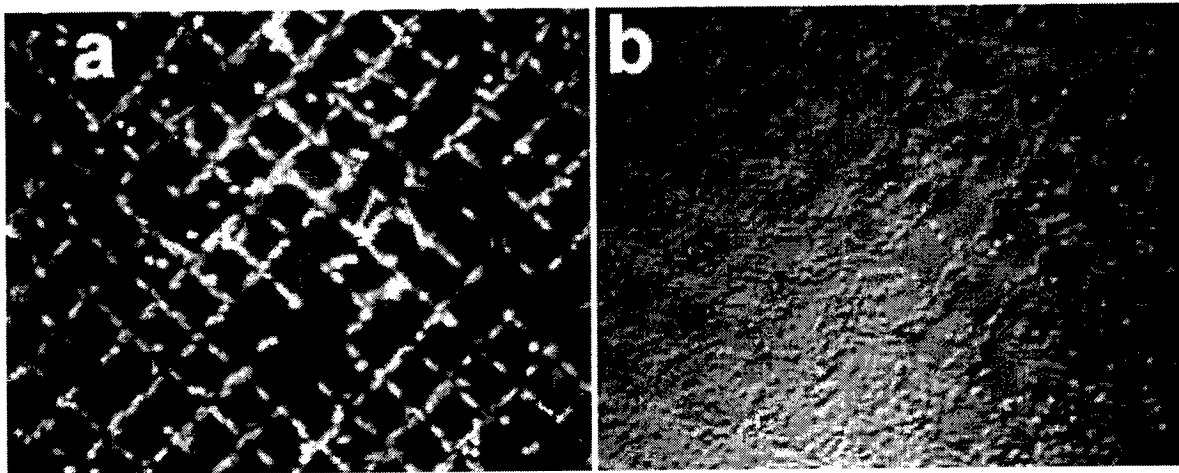


Figura 37. Células alineadas después de 24 horas de incubación

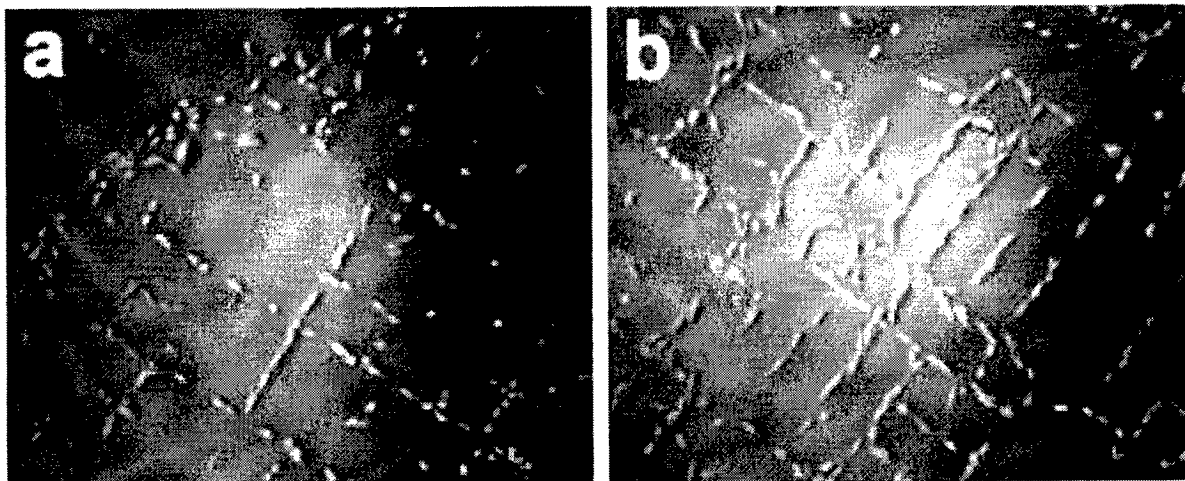


Figura 38. Células alineadas y siguiendo un patrón de comportamiento en superficies preparadas por litografía y plasma de n-Hexano.

5.5 Aplicaciones médicas generales

Como ya se ha dicho antes, la respuesta inicial del cuerpo humano hacia los biomateriales depende de las características superficiales; porque es la superficie del biomaterial la que está en contacto con los tejidos vivos. De aquí, que un diseño propio de la superficie es la parte más importante para incrementar la compatibilidad del material.

Por ejemplo, diversos dispositivos médicos, tales como catéteres, injertos artificiales, cánulas y endoscopios son insertados en el cuerpo humano. Una lubricación efectiva del instrumento es necesaria para disminuir la resistencia entre la superficie del instrumento y la membrana mucosa durante la inserción o remoción del mismo. El coeficiente de fricción es función de diversas variables, tales como el tipo de material, la configuración y la tensión aplicada. El recubrir las superficies de los instrumentos con polímeros preparados a base de monómeros hidrofílicos reduce de manera notoria la fricción.^{37,38} El recubrir la superficie de polipropileno (PP) con polímero de dimetilacrilamida da como resultado un polímero con una superficie altamente hidrofílica y resbalosa con bajo coeficiente de fricción. A continuación se describen algunas aplicaciones prácticas de los polímeros de plasma en el campo de la medicina.



5.5.1 Suturas

Una gran cantidad de trabajo ha sido llevado a cabo en el diseño de suturas quirúrgicas y prótesis recubriendo las superficies de estos dispositivos con polímeros de plasma adecuados. Los hidrogeles son candidatos idóneos para las aplicaciones biomédicas debido a su alto grado de hinchamiento en medios acuosos, lo cual provee rutas continuas para la difusión de metabolitos de bajo peso molecular hacia los tejidos. Los hidrogeles presentan propiedades mecánicas débiles en el estado hinchado y por esta razón sus aplicaciones como materiales de sutura están restringidas. Una de las formas de usar hidrogeles como materiales de sutura, es utilizándolos como recubrimientos aplicados por plasma en las superficies de soportes tales como PET, nylon y PP. Así, se obtienen materiales con buenas propiedades en masa y el hidrogel localizado en la superficie realiza el trabajo de biocompatibilidad. En diversos estudios se ha llevado a cabo la modificación superficial de los polímeros mediante la inserción de monómeros tales como: 2 hidroxietil metacrilato, ácido acrílico, acrilamida y N-vinilpirrolidona para producir materiales con características superficiales de hidrogel y buenas propiedades mecánicas.^{39,40}

En los últimos años se han desarrollado también suturas antimicrobiales. La desventaja principal de las suturas es el crecimiento de bacterias en los inter-espacios entre los filamentos, lo cual causa infección.⁴¹ El depósito de monómeros iónicos o polares en las suturas produce una superficie con funcionalidad iónica, donde un medicamento o droga adecuada puede ser inmovilizada. Diversas suturas antimicrobiales de seda han sido desarrolladas mediante el depósito de ácido metacrílico sobre el hilo de seda y subsecuente inmovilización de 8-hidroxiquinolina (medicamento) sobre el polímero.⁴² La actividad antimicrobial de esas suturas ha sido medida y se encontró son efectivas contra microorganismos y bacterias. Diversos tipos de fibras de nylon han sido modificadas con recubrimientos de poliácido acrílico, los grupos de ácido acrílico son utilizados posteriormente para inmovilizar antibióticos tales como penicilina y gentamicina, los cuales contrarrestan la acción de la bacteria Gram (-).⁴³

5.5.2 Implantes y sistemas de liberación controlada de medicamentos

En la actualidad existe una gran demanda en el campo médico de materiales que tienen contacto directo con sangre y tejidos. El acoplamiento de proteínas y otras biomoléculas a una superficie polimérica permite desarrollar superficies con aplicaciones médicas. Por ejemplo, los biomateriales hemocompatibles requieren que exista poca interacción entre el biopolímero y las proteínas de la sangre, esto para evitar una trombosis. Se sabe, que el polióxido de etileno (PEO) tiene muy poca afinidad hacia las proteínas, por lo tanto, se han preparado recubrimientos a base de éste polímero en artículos médicos, dando como resultado una disminución de las proteínas de la sangre en la superficie del material.

El PET ha sido utilizado como sustrato en la preparación de injertos vasculares, donde es importante que la superficie del PET sea compatible con la sangre, para lograr esto, la superficie de PET es recubierta con PEO aplicado por plasma.⁴⁴ Posteriormente, moléculas de heparina son inmovilizadas sobre el recubrimiento polimérico de PEO con la finalidad de disminuir la posibilidad de una trombosis.

Algo similar a lo anterior, ha sido observado en el caso de poliuretano recubierto con PEO.⁴⁵ El poliuretano es uno de los materiales más ampliamente utilizados en la fabricación de catéteres y dispositivos para el corazón debido a sus excelentes propiedades mecánicas y biocompatibilidad con la sangre. Sus características antitromogénicas pueden ser mejoradas mediante la incorporación de heparina. La superficie de poliuretano puede ser recubierta con PEO aplicado por plasma y posteriormente se puede inmovilizar heparina en la superficie del recubrimiento. Como la heparina se enlaza covalentemente a la superficie, la selectividad de la superficie es mucho mayor que en el caso de heparina inmovilizada iónicamente. La heparina inmovilizada en la superficie de poliuretano es adecuada para la supresión de la formación de trombos. La adhesión de células mononucleares también se disminuye en las superficies poliméricas modificadas.

La heparina inmovilizada sobre superficies de copolímeros de bloque de estireno-butadieno-estireno injertados con vinil piridina también presenta buena biocompatibilidad. La absorción de albúmina y fibrinógeno son reducidas al incrementarse el contenido de heparina en la

superficie del polímero. La liberación controlada de medicamento utilizando polímeros modificados es un área interesante y en desarrollo. Los polímeros son modificados, recubriéndolos con un polímero apropiado considerando sitios de intercambio iónico o polar. En un último paso, un medicamento apropiado es inmovilizado en la superficie del recubrimiento. Tan pronto como el polímero con el medicamento es puesto en contacto con el organismo, la matriz se hincha y se libera el medicamento hacia el medio externo.

5.5.3 Ingeniería de Tejidos

Millones de procedimientos quirúrgicos son llevados a cabo anualmente para tratar pacientes con órganos afectados. Actualmente existe una demanda creciente de polímeros para usos en ingeniería de tejidos para el tratamiento de pacientes con órganos afectados. Para suplir esta demanda, es necesario diseñar y desarrollar polímeros adecuados para la inmovilización de moléculas biológicas y células.^{46,47} En éste proceso, las células vivas de un paciente son aplicadas en la superficie del polímero y son cultivadas como tejido para una subsiguiente trasplatación a el paciente. El tejido es integrado estructuralmente en el cuerpo. Esta tecnología soluciona el problema de escasez de donadores y el rechazo del organismo hacia implantes hechos a base de biomateriales que no cumplen con las características biológicas necesarias para ser aceptadas por el organismo. Las innovaciones en esta área abren una ruta hacia la fabricación de diversos órganos humanos biocompatibles.

La ingeniería de tejidos presenta importantes desafíos y oportunidades para los investigadores, desde el diseño y el procesado del material. Los polímeros tienen bajos niveles de funcionalidad superficial y presentan en general bajos niveles de compatibilidad con los medios biológicos. Es necesario generar grupos químicos tales como hidroxilo, carboxilo, amidas, aminas e iminas. Estos grupos actúan como sitios para la inmovilización de proteínas y posteriormente para el cultivo de células humanas.

La modificación de polímeros puede llevarse a cabo mediante el depósito de polímeros de plasma. Esta técnica es muy adecuada para mejorar la inmovilización de biomoléculas y la adhesión de células.^{48,49} Por ejemplo, las películas, fibras, y textiles de PET han sido muy utilizados para la inmovilización de biomoléculas.⁵⁰ Para poder llevar a cabo el proceso de



inmovilización, las superficies de PET han sido recubiertas con polímeros de ácido acrílico, de esta forma se genera una superficie de PET con grupos carboxílicos, posteriormente se inmoviliza una capa de colágeno sobre ésta superficie. El ácido poliacrílico tiene cargas ligeramente negativas, con algunas funcionalidades del ácido carboxílico desprotonadas, las cuales interactúan con las aminas positivas del colágeno para formar superficies entrecruzadas iónicamente. De esta forma se genera una superficie polimérica altamente biocompatible, ya que el colágeno interacciona bien con diversos tipos de tejidos y células. Entre mayor cantidad de grupos carboxilo tenga el recubrimiento mayor será la inmovilización de colágeno sobre la superficie.

La reconstrucción de la vejiga urinaria es una de las innovaciones más recientes en el campo de la ingeniería de superficies. En éste proceso, las células urotoriales y musculares pueden ser aplicadas a un soporte polimérico, cultivadas *in vitro*, y expandidas a los tamaños requeridos.^{51,52} Las superficies de PET recubiertas con colágeno proveen un excelente sustrato para el cultivo de células urotoriales y células musculares. Estas células se adhieren y crecen bien en las superficies del colágeno inmovilizado sobre la superficie de PET. Para preparar un soporte adecuado para las células, las fibras de PET son tejidas. Las estructuras tejidas de PET ofrecen una excelente matriz simulada para la construcción de la vejiga artificial. Estas estructuras tejidas pueden elongarse y volver a recuperar sus dimensiones iniciales. De esta forma, el crecimiento de las células urotoriales y musculares en las superficies tejidas produce una plataforma más apropiada para el cultivo de células.^{53,54}

El área de ingeniería de tejidos, también ha tenido éxito en el diseño y transplante de cabello artificial en el cráneo humano.⁵⁵ El cabello artificial es fabricado a partir de monofilamentos de PET. A la superficie del monofilamento se le añade un recubrimiento polimérico biocompatible aplicado por plasma. El recubrimiento puede ser de poliácido acrílico. Posteriormente se inmoviliza colágeno sobre el ácido poliacrílico, y sobre el colágeno se inmovilizan células, finalmente el filamento está listo para ser implantado en el cráneo. Este procedimiento es muy exitoso y ha sido aplicado en más de 110,000 cueros cabelludos alrededor del mundo.



Los injertos vasculares también son una área importante de la ingeniería de tejidos, como lo demuestran las aproximadamente 750,000 cirugías de arteria coronaria realizadas a la fecha. El método tradicional de tratamiento es utilizar arterias sanguíneas localizadas en el cuerpo del paciente (auto-injertos), por ejemplo de la pierna. El problema con el procedimiento de auto-injertos es que se requieren de varias cirugías y se incrementan los riesgos y también los costos para el paciente. Además un 30% de los pacientes con problemas coronarios no poseen arterias sanguíneas adecuadas. Los injertos artificiales proporcionados por la ciencia de ingeniería de tejidos, son una alternativa factible y muy atractiva. Fibras trenzadas y textiles poliméricos son materiales excelentes para la fabricación de dichos injertos. Estos materiales pueden ser recubiertos por plasma con monómeros adecuados que permitan la inmovilización de colágeno, donde posteriormente se puedan cultivar células u otras moléculas biológicas.

VI. CONCLUSIONES

1.- Casi ningún material es 100% biocompatible. Y por esta razón es importante desarrollar materiales poliméricos con la mínima respuesta hacia el organismo. Las superficies poliméricas deber ser diseñadas propiamente en términos de funcionalidad química, de tal forma que la compatibilidad del biomaterial con el organismo sea incrementada.

2.- La tecnología de plasma permite preparar películas ultradelgadas con propiedades excelentes, que pueden ser aplicadas como recubrimientos en materiales poliméricos o en otros materiales. Algunas de esas propiedades son: excelente adhesión a diferentes tipos de sustratos, resistencia química, baja permeabilidad a gases y iones, alta densidad de entrecruzamiento. En adición, las películas de plasma son depositadas con alta eficiencia y con poco efecto negativo hacia el medio ambiente.

3.- La polimerización por plasma de monómeros específicos ofrece una solución atractiva para la modificación superficial de polímeros. Con éste método se mejoran las propiedades superficiales del material, mientras que las propiedades en masa no son afectadas. Las películas de plasma presentan propiedades únicas que las hacen ideales como recubrimientos biocompatibles. La mejora de la compatibilidad dependerá en gran medida del monómero utilizado.

4.- En el presente estudio se ha explicado la teoría del proceso de polimerización por plasma y se ha recopilado una serie de datos relacionada con recubrimientos aplicados sobre superficies poliméricas para aplicación principalmente en el área médica. La base de datos generada en este trabajo servirá de apoyo para las tesis que se realicen en ésta área en un futuro cercano.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- es.wikipedia.org/wiki/Plasma_(estado_de_la_materia) - 13k - Cached
- 2.- www.pslc.ws/spanish/pc.htm - 7k -
- 3.- www.windows.ucar.edu/tour/link=/sun/Solar_interior/Sun_layers/Core/plasma_state.sp.html
- 4.- Neira M.G -Velázquez, *Tesis de doctorado, Capítulo 4, University of Sheffield.*
- 5.- d'Agostino R., Cramarossa F., Fracassi F., Illuzzi F., *Academic Press.* (1990).
- 6.- Biederman H., *Vacuum.* (1987), **37**, 367.
- 7.- Yasuda H., *J. Polym. Sci. Macromol. Rev.* (1981),**16**, 199.
- 8.- Czeremuszkina G., Wrobel A.M., Kryszewski M., *J. Appl. Polym. Sci.* (1992), **44**, 883.
- 9.- Akovali G., Dilsiz N., *Polym. Eng. Sci.* (1990), **30**, 485.
- 10.- Akovali G., *J. Appl. Polym. Sci.* (1986), **32**, 4027.
- 11.- Sadhir R.K., Saunders H.E., Byers W.A., *Polym. Eng. Sci.* (1993), **33**, 645.
- 12.- Short R.D., <http://www.whiteroseseedcorn.com/plasso.html>
- 13.- Braybrook J.H., Hall L.D., *Prog. Polym. Sci.* (1990), **15**, 715.
- 14.- http://www.astp.com/plasma/pl_examples.html
- 15.- Ramirez B.D., *Biosensors & Bioelectronics.* (1995), **10**, 797.
- 16.- Liepins R., Campbell M., Clements J.S., Hammond J., Fries R.J., *J. Vac. Sci. Technol.* (1981), **18**, 1218.
- 17.- Letts S.A., Meyers D.W., Witt L.A., *J. Vac. Sci. Technol.* (1981),**19**, 739.
- 18.- Ratner B.D., *Biomaterials Science Academic Press.* (1996).
- 19.- Arefi F., Andre V., Montazer P-Rahmati, Amouroux J., *Pure & Appli. Chem.* (1992), **64** (5), 715.
- 20.- Gupta Bhuvanesh., Anjum Nishat., *Advances in Polymer Science.* (2003), **162**, 35.
- 21.- Ratner B.D., Martin S.M., Giachelli C.M., Marshall A.J., Bornstein P., Kyriakides T., *Polymeric Materials: Science & Engineering.* (2004), **90**, 680.
- 22.- Simon F., Hermel G., Lunkwitz D., Werner C., Eichhorn K., Jacobasch H-J., *Macromol Sym.* (1996), **103**, 243.
- 23.- <http://www.ipfdd.de/research/res16/res16.html>
- 24.- France R.M., Short R.D., Dawson R.A., MacNeil S., Mater J., *Chem.* (1998), **8** (1), 191.



- 25.- Griesser H.J., Chatelier R.C., Gengenbach T.R., Johnson G., Steele J.G., *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* (1994), **5** (6), 531.
- 26.- Griesser H.J., Chatelier R.C., Gengenbach T.R., Johnson G., Steele J.G., *Polymer Preprints* (American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry). (1993), **34**(1), 657.
- 27.- Davidson M.R., Mitchell S.A., Bradley R.H., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* (2004), **34**, 213.
- 28.- Hamerli P., Weigel Th., Groth Th., Paul D., *Biomaterials.* (2003), **24**, 3989.
- 29.- Harsch A., Calderon J., Timmons R.B., Gross G.W., *Journal of Neuroscience Methods.* (2000), **98**, 135.
- 30.- France R. M., *J. Mater. Chem.* (1998), **8**, 37.
- 31.- Haddow D.B., Steele D.A., Short R.D., Dawson R.A., MacNeil S., *Journal of Bimedical Materials Research Part A.* (2003), **64A** (1), 80.
- 32.- Wilkinson C., Curtis A., *Biomaterials.* (1997), **18**, 1573.
- 33.- Goessl A., Bowen D.F.-Pope., Hoffman A.S., *Journal Biomedical Materials Res.* (2001), **57**, 15.
- 34.- Bouaidat S., *Sensor and Actuators A 110* (2004) 390.
- 35.- Bouaidat S., Berendsen C., Thomsen P., Petersen S.G., Wolff A., Jonsmann J., *Miniaturization for Chemistry, Biology y Bioengineering Lab Chip.* (2004), **4**, 632.
- 36.- Mitchell S.A., Emmison N. & Shard A.G., *European Cells and Materials.* (2002), **4**(2), 52.
- 37.- Uyama Y., Tadokaro H., Ikada Y., *J. Appl. Polym. Sci.* (1990), **39**, 489.
- 38.- Tomita N., Tamais S., Okajima E., Hirao Y., Ikeuchi K., Ikada Y., *J. Appl. Biomat.* (1994), **5**, 75.
- 39.- Ratner B.D., Hoffman A.S., Wihiffen J.D., *J. Bioeng.* (1978), **2**, 313.
- 40.- Lee H.B., Shim H.S., Andrade J.D., *Am. Chem. Soc. Polym. Preprint.* (1972), **13**, 729.
- 41.- Alexander J.W., Kaplan J.Z., Altemeier W.A., *Ann. Surg.* (1967), **165**, 192.
- 42.- Singh H., Tyagi P.K., *Die. Angew. Makromol. Chemie.* (1989), **172**, 87.
- 43.- Buckenska J., *J. Appl. Polym. Sci.* (1996), **62**, 567.
- 44.- Kim Y.J., Kang I., Huh M.W., Yoon. *Biomaterials.* (2000), **21**, 121.
- 45.- Bae J., Seo E., Kang I., *Biomaterials.* (1999), **20**, 529.



- 46.- Yamata M., Konno C., Utsumi M., Kikuchi A., Okano T., *Biomaterials*. (2002), **23**, 561.
- 47.- Kishida A., Iwata H., Tamada Y., Ikada Y., *Biomaterials*. (1991), **12**, 786.
- 48.- Lee S., Hsiue G., Chang P.C., Kao C., *Biomaterials*. (1996), **17**, 1599.
- 49.- Gupta B., Hilborn J., Bisson I., Frey P., *American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry*. (2000), **41**(1), 1040.
- 50.- Tamada Y., Ikada Y., *J Biomed Mater Res*. (1994), **28**, 783.
- 51.- Gupta B., Frey P., Bisson I., Hilborn J., *Polym Preprints*. (2000), **4**, 1040.
- 52.- Kim H., Mayo U., Ko K.T., Minoda M., Miyamoto T., Nakamura T., *Biomaterials*. (2001), **22**, 2489.
- 53.- Revagade N., *M Tech Thesis, IIT Delhi, India*. (2001).
- 54.- Bisson I., Kosinski M., Rualts S., Gupta B., Hilborn J., Wurm F., *Biomaterials*. (2002), **23**, 3149.
- 55.- Kato K., Yoshihito Y., Yamamoto M., Tomita N., Yamada S., Ikada Y., *J Adhesion Sci Technol*. (2000), **14**, 635.