

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA



**ANÁLISIS Y EVALUACIÓN DE PELÍCULAS
POLIMÉRICAS DELGADAS DE USO BIOMÉDICO**

CASO DE ESTUDIO

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA APLICADA

OPCIÓN: ANÁLISIS Y EVALUACIÓN DE POLÍMEROS



CENTRO DE INFORMACIÓN

03 SEP 2008

PRESENTA:

RECIBIDO

BEATRIZ LILIANA ESPAÑA SÁNCHEZ

SALTILLO, COAHUILA

AGOSTO 2008

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA



**ANÁLISIS Y EVALUACIÓN DE PELÍCULAS POLIMÉRICAS
DELGADAS DE USO BIOMÉDICO**

CASO DE ESTUDIO

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

**ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
OPCIÓN: ANÁLISIS Y EVALUACIÓN DE POLÍMEROS**

PRESENTA:

BEATRIZ LILIANA ESPAÑA SÁNCHEZ,



CENTRO DE INFORMACIÓN

03 SEP 2008

ASESOR:

Dr. Carlos Alberto Ávila Orta

RECIBIDO

SALTILLO, COAHUILA

AGOSTO 2008

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA



**ANÁLISIS Y EVALUACIÓN DE PELÍCULAS POLIMÉRICAS
DELGADAS DE USO BIOMÉDICO**

CASO DE ESTUDIO

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

**ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
OPCIÓN: ANÁLISIS Y EVALUACIÓN DE POLÍMEROS**

PRESENTA:

BEATRIZ LILIANA ESPAÑA SÁNCHEZ

EVALUADORES:

M.C. Teresa Rodríguez

Dr. Mario Gutiérrez

SALTILLO, COAHUILA

AGOSTO 2008

ÍNDICE

	Página
Nomenclatura	i
Índice de figuras	iii
I INTRODUCCIÓN	1
II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Definición	2
2.2. Propiedades	3
2.2.1. Resistencia mecánica	3
2.2.2. Cristalinidad	3
2.2.3. Superficie	3
2.2.4. Biocompatibilidad	4
2.3. Métodos de fabricación	4
2.3.1. Centrifugado (Spin Coating)	4
2.3.2. Deposición física de vapor (Physical Vapor Deposition, PVD)	5
2.3.3. Deposición química de vapor (Chemical Vapor Deposition, CVD)	6
2.3.4. Deposición de películas por el método de Langmuir-Blodgett	6
2.3.5. Auto ensamblaje ó Dipping	7
2.4. Aplicaciones	8
2.5. Técnicas de caracterización	8
2.5.1. Microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)	8
2.5.2. Espesor por cizallamiento o por esfuerzo de corte (Thickness Shear Mode, TSM)	9
2.5.3. Difracción de Rayos-X (XRD)	10
2.5.4. Espectroscopia Fotelectrónica de Rayos-X (XPS)	11
2.5.5. Espectrometría de masas (MS)	11
2.5.6. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	12
2.5.7. Espectroscopia de Infrarrojo de transformada de fourier (FTIR)	13
2.5.8. Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)	14

2.5.9. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	15
2.5.10. Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)	16
2.5.11. Microscopia Confocal Láser (LCM)	17
2.5.12. Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC)	18
III ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO	20
3.1. Materiales	20
3.1.1. Sustratos	20
3.1.2. Materias primas	20
3.2. Métodos de fabricación	21
3.3. Caracterización	22
3.3.1. Espesor	23
3.3.1.1. Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM)	23
3.3.1.2. Espesor por cizallamiento o por esfuerzo de corte (Thickness Shear Mode, TSM)	23
3.3.2. Propiedades estructurales	23
3.3.2.1. Difracción de Rayos X (XRD)	23
3.3.2.2. Espectroscopia Foto electrónica de Rayos X (XPS)	24
3.3.2.3. Espectrometría de masas (MS)	24
3.3.2.4. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	24
3.3.2.5. Espectroscopia de Infrarrojo de Transformada de Fourier (FTIR)	25
3.3.3. Propiedades mecánicas	25
3.3.3.1. Tensión	25
3.3.4. Propiedades ópticas	26
3.3.4.1. Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)	26
3.3.4.2. Microscopia Electrónica de barrido (SEM)	26
3.3.4.3. Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)	26
3.3.4.4. Microscopia Confocal Láser (LCM)	27
3.3.5. Propiedades térmicas	27
3.3.5.1. Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC)	27
3.3.5 Biocompatibilidad	27
IV ÁREAS DE OPORTUNIDAD	30

4.1. Fabricación	30
4.2. Caracterización	30
V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	34
VI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

NOMENCLATURA

(m/z)	Relación masa-carga
AFM	Microscopia de Fuerza Atómica
CIQA	Centro de Investigación en Química Aplicada
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
FIR	Infrarrojo lejano
FTIR	Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier
HA	Hidroxi apatita
KV	Kilovoltios
LB	Langmuir-Blodgett
LCM	Microscopia Confocal Láser
MALDI	Técnica de ionización por desorción láser asistido por una matriz
MIR	Infrarrojo medio
MS	Espectrometría de masas
NIR	Infrarrojo cercano
Nm	Nanómetros
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN C¹³	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
RMN H¹	Resonancia Magnética Nuclear de protones
PBH	Poli hidroxí butirato
PE	Polietileno
PEI	Polietilén imida
PEO	Polióxido de etileno
PET	Polietilén tereftalato
PMMA	Polimetil metacrilato
PS	Poliestireno
PSS	Poliestirén sulfonato
PVA	Alcohol polivinílico
QCM	Microbalanza de cristal de cuarzo
SA	Auto ensamblaje
SEM	Microscopia Electrónica de Barrido

STEM	Células madre
TEM	Microscopia Electrónica de Transmisión
TSM	Thicknees Shear Mode
XPS	Espectroscopia Foto electrónica de Rayos X
XRD	Difracción de Rayos X
µg/cm²	Microgramos por centímetro cuadrado

INDICE DE FIGURAS

- Figura 2.1.** Fotografía que ejemplifica una película polimérica delgada (Gallego, N.; 2007).
- Figura 2.2.** Representación esquemática de la técnica de Spin-coating (Petty, 2000).
- Figura 2.3.** Representación esquemática de un sistema típico de evaporación a vacío (Petty, 2000).
- Figura 2.4.** Representación esquemática del método Langmuir-Blodgett en donde se observa la deposición de las capas en base a su comportamiento anfifílico (Rosas-García, V.M. 2005).
- Figura 2.5.** Esquema que representa el método de Auto ensamblaje ó Dipping (Arias, 2008).
- Figura 2.6.** Fotografía que muestra un transistor fabricado a partir de una película polimérica delgada (Gutiérrez del Olmo, 2008).
- Figura 2.7.** Esquema del dispositivo experimental del TSM (Le Guillou *et al.* 2005).
- Figura 2.8.** Esquema de un difractor de rayos-X, (Kämpf, G, 1986).
- Figura 2.9.** Representación del fundamento de la espectrometría de masas (Matsuo, T. and Seyama, Y. 2000).
- Figura 2.10.** Esquema que representa el acomodamiento molecular en base a un campo magnético.
- Figura 2.11.** Esquema de un espectrómetro de infrarrojo (Hesse, 1995).
- Figura 2.12.** Esquema que representa el funcionamiento del Microscopio Electrónico de Transmisión (Schweitzer, J. 2006).
- Figura 2.13.** Esquema que representa el funcionamiento del Microscopio Electrónico de Barrido (Schweitzer, J. 2006).
- Figura 2.14.** Esquema que representa el funcionamiento del Microscopio de Fuerza Atómica (West, P. and Ross A. 2002).
- Figura 2.15.** Esquema básico del funcionamiento del Microscopio Confocal Láser (Soto-Eguibar, E. 1993).
- Figura 2.16.** Representación esquemática de un calorímetro diferencial de barrido (Kämpf, 1986).



INTRODUCCIÓN

A lo largo de las últimas décadas los investigadores han puesto atención en la elaboración de películas poliméricas que tengan la característica de no sobrepasar las 100 micras de espesor y que además cuenten con excelentes propiedades mecánicas, eléctricas, ópticas y de biocompatibilidad. Estas propiedades permiten que este tipo de materiales puedan ser utilizados como dispositivos microelectrónicos, componentes ópticos, membranas, adhesivos y pinturas, surgiendo un gran interés por el área biomédica.

En la actualidad, los estudios sobre películas poliméricas delgadas van enfocados a la investigación y desarrollo en el área de la biomedicina, enfatizando su uso como materiales afines a la incorporación en huesos como sensores dentro del cuerpo humano, dispositivos de liberación controlada de medicamentos, implantes ortopédicos, productos cardiovasculares, instrumentos quirúrgicos, dentales y de ortodoncia, entre otros.

En búsquedas bibliográficas recientes se ha podido observar la falta de información acerca del uso y caracterización de películas poliméricas delgadas aplicadas en el ámbito biomédico. Esta situación nos hace pensar en la necesidad de desarrollar una metodología apropiada para el análisis y evaluación de este tipo de materiales, tomando en cuenta la disposición de instrumentación y equipos presentes en el CIQA, el personal capacitado y a quien va dirigido el servicio.

El objetivo de este trabajo es contar con un marco teórico que permita visualizar de manera rápida las diferentes técnicas necesarias para el análisis y evaluación de propiedades morfológicas, mecánicas, ópticas, térmicas y de biocompatibilidad de películas poliméricas delgadas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En el siguiente capítulo se presentan los conceptos generales sobre películas poliméricas delgadas, sus propiedades más relevantes, sus métodos de fabricación y finalmente sus aplicaciones, haciendo énfasis en el ámbito biomédico.

2.1. Definición

Una película es una forma bidimensional de un polímero y se caracteriza por tener una gran área superficial con respecto a su proporción en volumen (*Shanks, 2003*). La diferencia entre una película y una película delgada es su espesor, siendo esta última entre 10 nm y 100 micras. Normalmente el término de “Película delgada” no se aplica a pinturas ó barnices debido a la diferencia que puede haber en su espesor. Para obtener una película delgada es de vital importancia entender y distinguir la relación entre sus propiedades estructurales (topografía, cristalografía ó defectos en el cristal), el tipo de materiales a utilizar y el método de fabricación (*Corengia y col. 2000*).

Una película delgada se debe adherir bien al sustrato subyacente para poder ser útil, puesto que depende del mismo para su apoyo estructural. Este apoyo puede ser logrado por medio de uniones químicas entre la película y el sustrato ó por medio de interacciones de Van der Waals ó electrostáticas.



Figura 2.1. Fotografía que ejemplifica una película polimérica delgada (*Gallego, N.;* 2007).

2.2. Propiedades

Las propiedades de las películas poliméricas delgadas dependen de su estructura molecular, de la distribución de su peso molecular y de su morfología cristalina. Para que una película delgada sea útil debe de ser químicamente estable en el entorno donde se usará, adherirse bien al sustrato, debe tener un espesor uniforme y presentar lo mínimo en imperfecciones.

2.2.1. Resistencia mecánica

La resistencia mecánica de un elemento es la capacidad que tiene este de reaccionar frente a diferentes acciones externas como pueden ser la tensión, la compresión y el corte. En estudios realizados por *Lecacher y col. (1985)* se observó que al fabricar películas delgadas a partir de polímeros y teniendo un control del volumen, éstas registraban alta resistencia, por lo cual podían ser incorporadas a las superficies de las prótesis.

2.2.2. Cristalinidad

Una de las propiedades más destacadas de este tipo de materiales son las de cristalinidad. *Reiter y col. (2003)* investigaron el comportamiento de copolímeros de bajo peso molecular de polióxido de etileno (PEO) y determinaron que la cristalización en películas poliméricas delgadas depende directamente de la viscosidad del polímero con el que se va a fabricar y del control adecuado del espesor y, por lo tanto, relacionan la morfología con la cinética de crecimiento del cristal. *Huang y col. (2004)* observan el comportamiento de los mismos copolímeros estudiando el cambio en la orientación cristalina, concluyendo que la morfología de los cristales esta determinada por los espesores de las películas empleadas. Otros estudios efectuados por *Wucher y col. (2007)* corroboran lo anterior y además utilizan biomoléculas de origen polimérico capaces de controlar el crecimiento de los cristales y de determinar su morfología por medio de una ruta de templado.

2.2.3. Superficie

Las propiedades de superficie de películas delgadas son muy importantes en aplicaciones biomédicas y son un aspecto prometedor en investigaciones futuras enfocadas a la biomedicina en general. Características como la densidad, estabilidad,

coeficiente de difusión y permeabilidad son vitales para la fabricación de películas delgadas formadas a partir de polímeros semicristalinos. Otro factor importante es que las propiedades de superficie en materiales poliméricos funcionan como plataforma para el desarrollo de biocompatibilidad, acción antimicrobiana, reactividad con biomoléculas entre otros. Yin y col. (2007) estudiaron las propiedades de absorción en películas delgadas y encontraron que dependiendo del tipo de material, las isotermas de adsorción/desorción van a ser distintas; pero que el comportamiento de los polímeros en general era de barrera.

2.2.4. Biocompatibilidad

La biocompatibilidad se define como la habilidad de un material de actuar con una respuesta adecuada al huésped, en una aplicación específica. A este tipo de material se le conoce como biomaterial, siendo utilizado en el área médica para la interacción con los sistemas biológicos induciendo una actividad biológica específica. La compatibilidad de los materiales y dispositivos de fabricación artificial con los tejidos y los líquidos corporales se considera un requisito fundamental para que cualquier procedimiento médico se desenvuelva correctamente sin afectar al huésped ó paciente (Martínez, C.H. y Moreno, F., 2000).

Las pruebas de biocompatibilidad *in-vivo* que comúnmente se llevan a cabo son las de la incorporación del material polimérico en animales de experimentación, los cuales pueden ser conejos o ratas; además de la existencia de pruebas *in-vitro* hechas con especies celulares viables controladas a nivel laboratorio. Nichols y col. (2007) evaluaron por medio de pruebas *in Vitro* la citocompatibilidad de películas delgadas a base de monómeros de ácido acrílico utilizando osteoblastos humanos dentro de un periodo de 7 días obteniendo resultados favorables.

2.3. Métodos de fabricación

Existen diversos métodos para la obtención de películas delgadas, cada uno varía en complejidad y en la orientación cristalina deseada, además del espesor requerido. A continuación se presenta una breve explicación de los métodos principales de fabricación.

2.3.1. Centrifugado (Spin Coating)

Comúnmente utilizado a nivel industrial en el área de microelectrónica, colocando capas de poli imidas en discos giratorios de silicón. Una cantidad de un polímero en solución es colocada primero en un disco giratorio a una velocidad constante, para que la solución genere flujos radiales, se evapore el solvente y finalmente se genere una película de espesor uniforme. En esta técnica hay que tomar en cuenta la cantidad de solución a añadir en el sustrato, la viscosidad de la solución y la velocidad de centrifugado puesto que de aquí depende el espesor de la película a obtener (Petty, 2000).

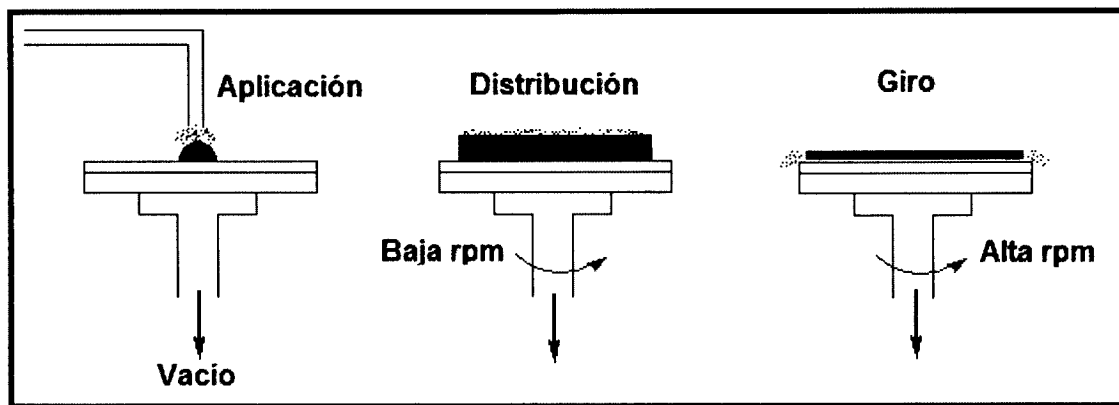


Figura 2.2. Representación esquemática de la técnica de Spin-coating (Petty, 2000)

2.3.2. Deposición física de vapor (Physical vapor deposition, PVD)

La vaporización de la mayoría de los materiales sólidos se lleva a cabo cuando son calentados a temperaturas suficientemente altas a través de una fase líquida. Se obtiene una película delgada por la condensación del vapor dentro de un sustrato frío. Este método ha sido utilizado para la colocación de películas en materiales inorgánicos, ya sean metales ó aleaciones. Sin embargo, actualmente se ha comenzado a utilizar esta técnica para la formación de capas de compuestos orgánicos de bajo peso molecular. A este método también se le conoce como *Evaporación al alto vacío ó epitaxia*. (Petty, 2000)

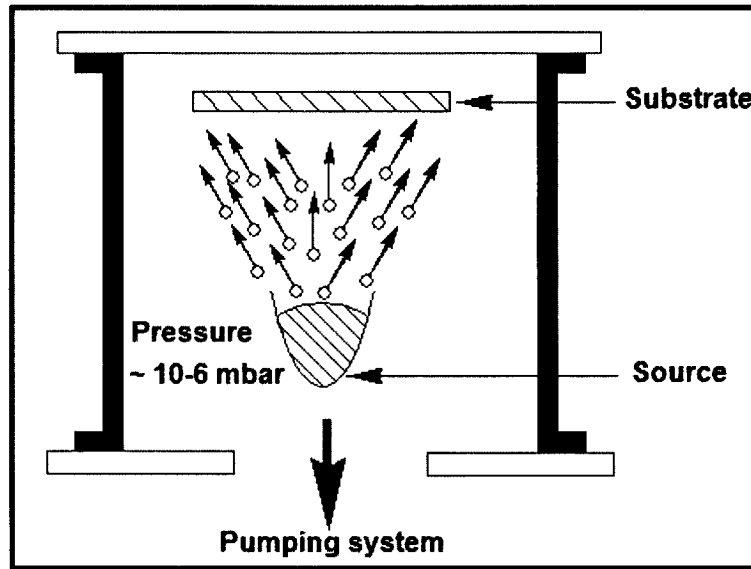


Figura 2.3. Representación esquemática de un sistema típico de evaporación a vacío
(Petty, 2000).

2.3.3. Deposición química de vapor (Chemical vapor deposition, CVD)

Este proceso está basado en la descomposición y/o la generación de radicales ó especies químicas por medio de vapor y calor, bajo la acción de una descarga de plasma ó láser. Este método se utiliza en dispositivos microelectrónicos para la fabricación de películas inorgánicas con características semiconductoras. A esta técnica se le puede nombrar como *Casting*. (Petty, 2000) (Elkasabi y col. 2006).

2.3.4. Deposición de películas delgadas por el método de Langmuir-Blodgett

Este método actualmente maneja la manipulación de materiales de escala nanométrica y solo involucra a moléculas anfifílicas. Este tipo de películas son preparadas primero por la colocación de una pequeña cantidad de un compuesto anfifílico que se encuentre disuelto en un solvente volátil, para ser colocado en una superficie de agua purificada. Cuando el solvente ha sido evaporado, las moléculas orgánicas pueden comprimirse cuidadosamente para formar una película unicapa. Este método depende de las interacciones entre la parte polar y la no-polar de las moléculas y de la naturaleza del enlace que existe entre la primera capa y la superficie del substrato (Petty, 2000) (Stevens y col. 2002).

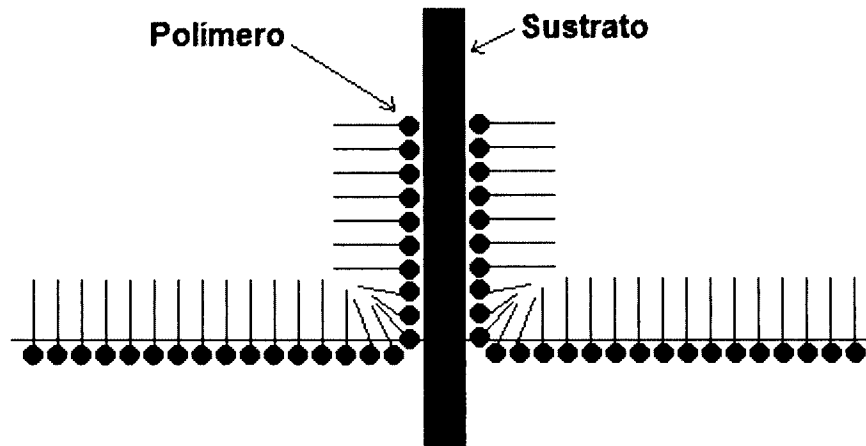


Figura 2.4. Representación esquemática del método Langmuir-Blodgett en donde se observa la deposición de las capas en base a su comportamiento anfifílico (Rosas-García, V.M. 2005).

2.3.5. Auto ensamblaje ó Dipping

El auto ensamblaje es un proceso mucho más simple que el anterior. En este caso las láminas unimoleculares son formadas por la inmersión de un sustrato previamente tratado dentro de una solución de un material orgánico. El proceso de auto ensamblaje esta determinado predominantemente por fuertes interacciones entre los grupos cabeza de la molécula a auto ensamblar y el sustrato resultando un enlace químico entre el grupo cabeza y un sitio específico de la superficie. (Petty, 2000) (Kim y col. 2002)

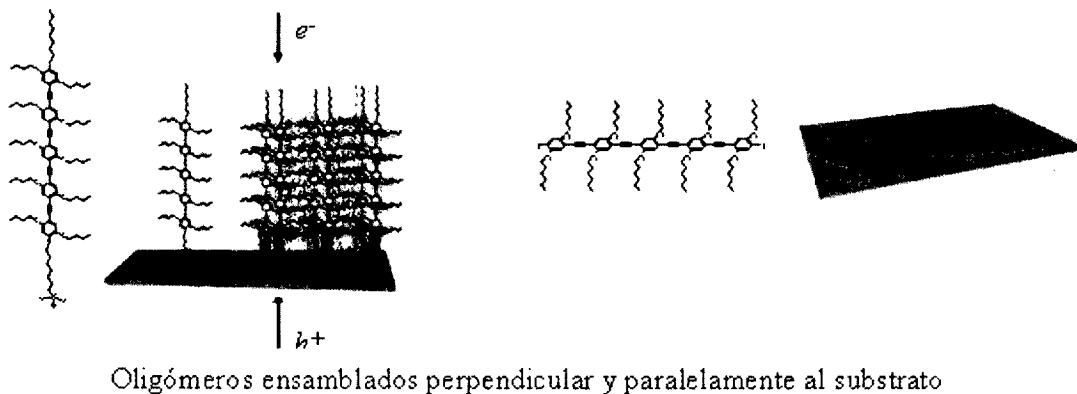


Figura 2.5. Esquema que representa el método de Auto ensamblaje ó Dipping (Arias, 2008)

2.4. Aplicaciones

El uso de este tipo de materiales se considera relativamente nuevo, en un principio se aplicaron como circuitos electrónicos (Curran, 1995), (Young, 1997), posteriormente se utilizaron como dispositivos en pantallas (Yamasaki, 2000), (Asano, 2006) y como transistores (Yoshikawa, 1998), (Son y col. 2006).



Figura 2.6. Fotografía que muestra un transistor fabricado a partir de una película polimérica delgada (Gutiérrez del Olmo, 2008).

Actualmente, se investigan nuevas áreas de aplicación, entre las que destacan la medicina y el desarrollo de dispositivos para la liberación controlada de medicamentos. Algunas de las aplicaciones más prometedoras en éste campo son la implementación de películas con grupos funcionales afines al hueso con el objetivo de la reparación del mismo (Kamei y col. 1997), implantes ortopédicos (Hubler, R. 1999), productos cardiovasculares (Aebischer y col. 1988), instrumentos quirúrgicos (Hollstein, F. y Louda, P. 1999), instrumentos dentales y de ortodoncia (Ektessabi, A.M. 1997) fabricación de sensores que permiten detectar cualquier anomalía en el funcionamiento del cuerpo humano (Tucker y col. 1997) ó el desarrollo de dispositivos para la liberación de fármacos a partir de películas delgadas de origen polimérico (Zeng y col. 2006) (Cristescu y col. 2007).

2.5. Técnicas de caracterización

2.5.1. Microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)

Mide la superficie de una muestra por unidad de masa por medio del cambio en la frecuencia de un resonador de cristal de cuarzo. La resonancia es generada por la adición o la remoción de una cantidad pequeña de masa (nano gramos) debida al

aumento ó disminución de la oxidación en el proceso de deposición de la película delgada que ocurre en la superficie del resonador acústico. El método QCM comprende una delgada capa de cristal de cuarzo entre dos electrodos de metal que establecen un campo eléctrico alterno a través del cristal, causando un movimiento vibracional del mismo y una frecuencia resonante. Esta frecuencia es muy sensible a cambios de masa tanto del cristal como de sus electrodos (Buttry, D.A. y Ward, M.D.; 1992)

El sistema QCM puede ser utilizado bajo condiciones de vacío, en fase gaseosa y recientemente en ambientes líquidos. Este método es muy útil para monitorear la velocidad de deposición de una película dentro de un sistema a vacío. En ambientes líquidos es muy eficaz para determinar la afinidad de las moléculas en superficies funcionalizadas con sitios de reconocimiento. Las mediciones de frecuencia son de alta precisión, por lo tanto es fácil de medir las densidades que se localizan por debajo de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

2.5.2. Espesor por cizallamiento o esfuerzo de corte (Thickness Shear mode, TSM)

Esta técnica esta basada en la propagación de una onda ultrasónica de cizallamiento generada por un campo eléctrico sinusoidal a través de un resonador piezoeléctrico de cuarzo, que provee medios potentes y no destructivos para generar cambios en interfases sólido-sólido ó sólido-líquido.

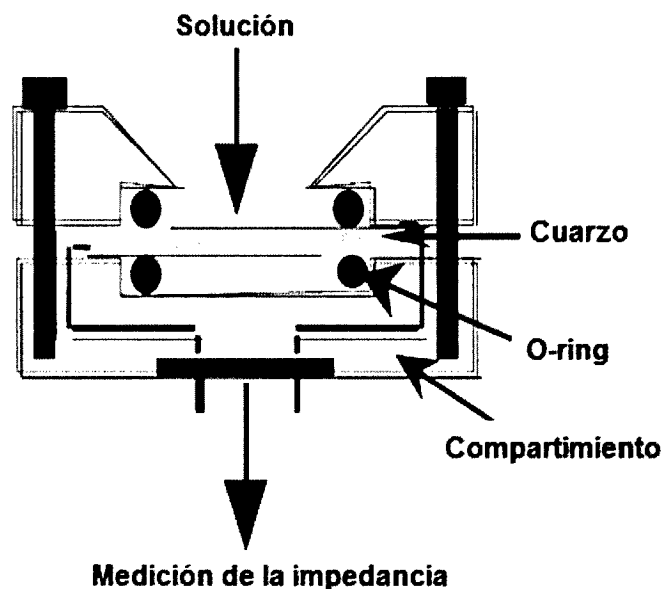


Figura 2.7. Esquema del dispositivo experimental del TSM (Le Guillou y col. 2005)

2.5.3. Difracción de Rayos-X (XRD)

La difracción de rayos-X es una técnica que mide la cristalinidad de un material. Los rayos-X son producidos por el bombardeo de un ánodo metálico con un haz de electrones de alto voltaje (de 20 a 50 KV). La conversión de electrones a rayos-X es efectuada en la superficie del ánodo. La mayor parte de la energía de los electrones es convertida en calor por medio de un tubo de vacío, la energía emitida sale al exterior a través de una ventana de berilio en forma de un rayo bien delimitado. Los rayos-X difractados pueden detectarse por medio de un contador de radiación y un amplificador electrónico que alimente a un registrador (Kämpf, G, 1986).

Lo anterior nos permite estudiar la disposición de los átomos por medio de la interacción de la radiación electromagnética para producir efectos de interferencia con estructuras comparables en tamaño a la longitud de la radiación. Si las estructuras se encuentran ordenadas, las interferencias son nítidas y la radiación es difractada de forma característica dependiendo del tipo de material.

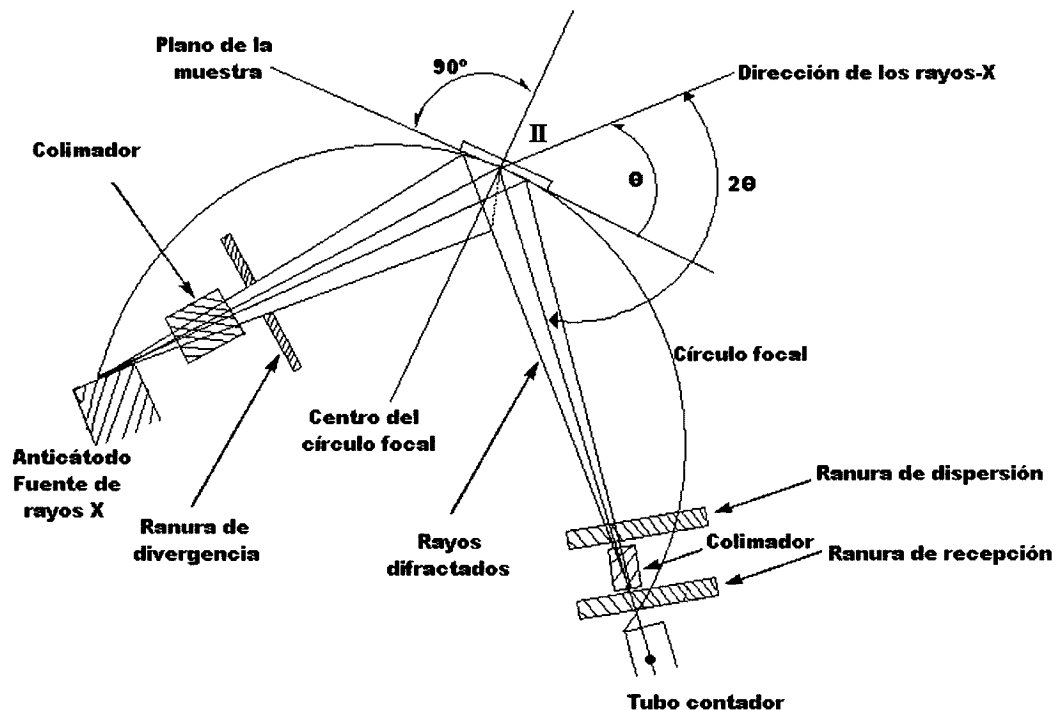


Figura 2.8. Esquema de un difractómetro de rayos-X, (Kämpf, G, 1986).

2.5.4. Espectroscopia Fotoelectrónica de rayos-X (XPS)

Es una técnica cuantitativa que mide la composición elemental, fórmula química, estado químico y electrónico de los elementos presentes dentro de un material. Los espectros de XPS se obtienen mediante la irradiación de un material con una celda de Rayos-X de aluminio ó magnesio y al mismo tiempo mide la energía cinética y el número de electrones que emiten entre 1-10 nm de la superficie del material (*Kämpf, G, 1986*). El XPS es una técnica de análisis químico superficial que puede ser utilizada para analizar la química de la superficie de un material tal cual esta conformado.

2.5.5. Espectrometría de Masas (MS)

La espectrometría de masas es una técnica experimental que permite la medición de iones derivados de moléculas. El espectrómetro de masas es un instrumento que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-carga (m/z). Puede utilizarse para identificar los diferentes elementos químicos que forman un compuesto o para determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto.

El espectrómetro de masas mide razones carga/masa de iones, calentando un haz del material del compuesto a analizar hasta vaporizarlo e ionizar los diferentes átomos. El haz de iones produce un patrón específico en el detector, que permite analizar el compuesto. En la industria es altamente utilizado en el análisis elemental de semiconductores, biosensores y cadenas poliméricas complejas (*Hesse, 1995*).

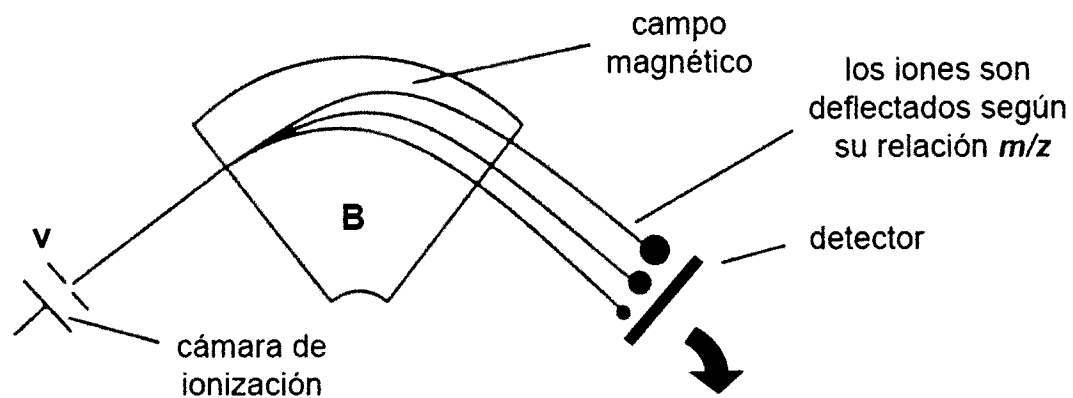


Figura 2.9. Representación del fundamento de la espectrometría de masas (Matsuo, T. and Seyama, Y. 2000)

2.5.6. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear es una técnica empleada principalmente en la elucidación de estructuras moleculares, aunque también se puede emplear con fines cuantitativos. Algunos núcleos atómicos sometidos a un campo magnético externo absorben radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias. Como la frecuencia exacta de esta absorción depende del entorno de estos núcleos, se puede emplear para determinar la estructura de la molécula donde se encuentran estos.

La espectroscopia de RMN fue desarrollada a finales de los años cuarenta para estudiar los núcleos atómicos. En 1951 se descubrió que la RMN podía ser utilizada para determinar las estructuras de los compuestos orgánicos. Esta técnica puede utilizarse solo para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos). Esta situación se da en los átomos de H^1 , C^{13} , F^{19} , P^{31} . Este tipo de núcleos son magnéticamente activos, es decir poseen espín, igual que los electrones, ya que los núcleos poseen carga positiva y poseen un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes.

En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar. Sin embargo, cuando una muestra se coloca en un campo magnético, los núcleos con espín

positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado estado de espín alfa (α), mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín beta (β).

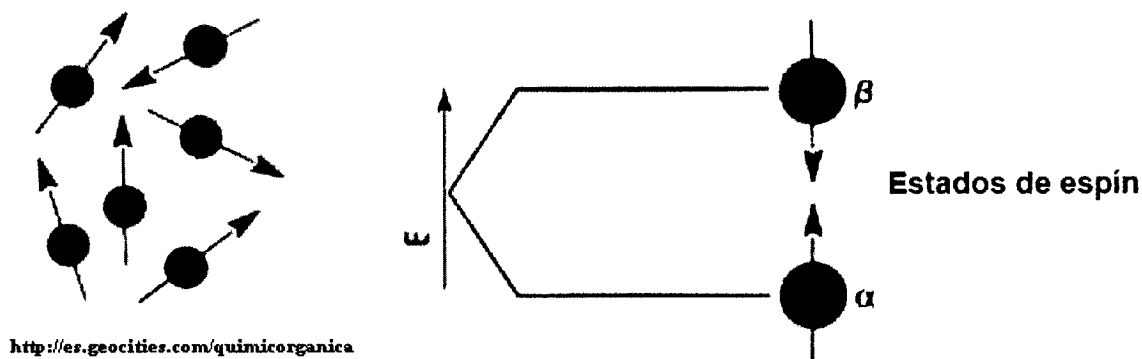


Figura 2.10. Esquema que representa el acomodamiento molecular en base a un campo magnético.

2.5.7. Espectroscopia de Infrarrojo de Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja estudia las interacciones de la luz o la radiación electromagnética de la región infrarroja obteniendo como resultado la absorción de energía vibracional producida por un átomo o molécula. Los agrupamientos funcionales de las moléculas orgánicas muestran vibraciones características, a las que les corresponden bandas de absorción en regiones definidas del espectro infrarrojo. Estas vibraciones moleculares están asociadas en gran parte al grupo funcional y no abarcan al resto de la molécula (Hesse, 1995). De esta forma, se pueden identificar grupos funcionales dependiendo de su banda de absorción. El espectro de infrarrojo se divide en tres regiones, el infrarrojo cercano (NIR) con una longitud de onda $\lambda = 0.76$ a 2.5μ que corresponde a un número de onda $\nu = 13200-4000 \text{ cm}^{-1}$. El infrarrojo medio (MIR) con una longitud de onda $\lambda = 2.5$ a 50μ que corresponde a un número de onda $\nu = 4000-200 \text{ cm}^{-1}$ y el infrarrojo lejano (FIR) cuya longitud de onda va de $\lambda = 50 \mu$ a 1 mm y que corresponde a un número de onda $\nu = 200-10 \text{ cm}^{-1}$. La región MIR es de particular interés para análisis de IR así como para la determinación estructural de los compuestos en estudio (Hesse, 1995).

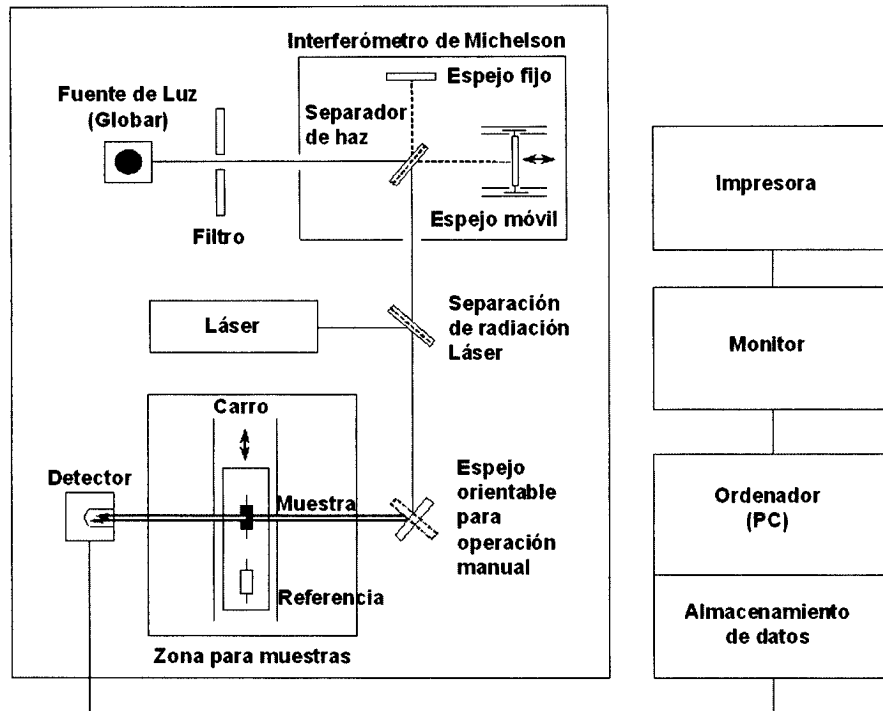


Figura 2.11. Esquema de un espectrómetro de infrarrojo (Hesse, 1995)

2.5.8. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Consta de un microscopio que utiliza un haz de electrones para visualizar un objeto debido a que la potencia amplificadora de un microscopio óptico esta limitada por la longitud de onda de la luz visible. Debido a que los electrones tienen una longitud de onda mucho menor que la de la luz visible, pueden mostrar estructuras mucho más pequeñas.

El microscopio electrónico de transmisión emite un haz de electrones dirigido hacia el objeto que se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada de la muestra.

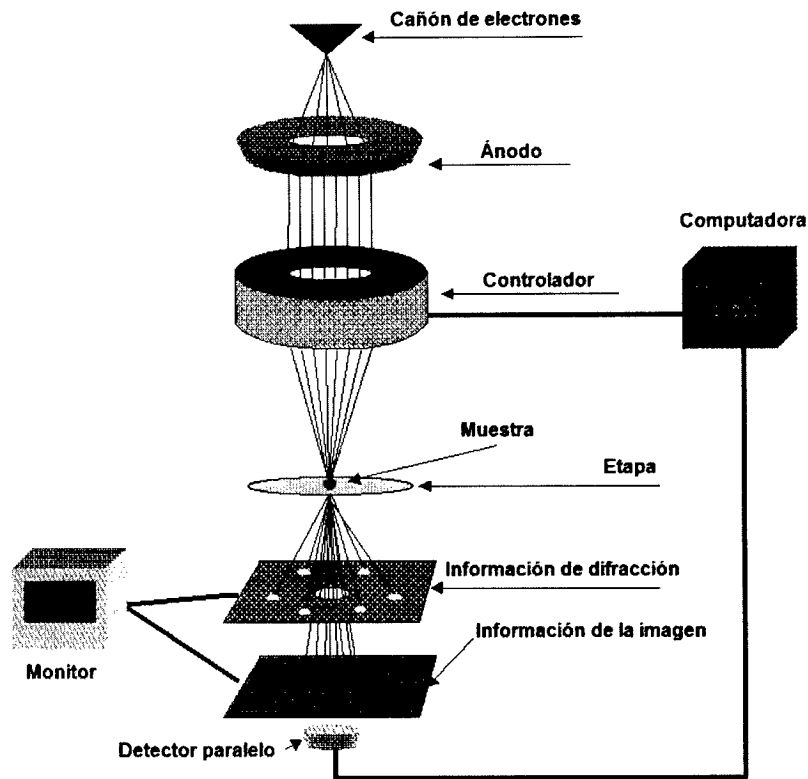


Figura 2.12. Esquema que representa el funcionamiento del Microscopio Electrónico de Transmisión (Schweitzer, J. 2006).

2.5.9. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial en materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado. Usa electrones en lugar de luz para formar una imagen y tiene gran profundidad de campo, la cual permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra, produciendo imágenes de alta resolución, lo que significa que características espacialmente cercanas en la muestra puedan ser examinadas a una alta magnificación.

En el microscopio electrónico de barrido la muestra es recubierta con una delgada capa de metal y es barrida con electrones enviados desde un cañón. Un detector mide la cantidad de electrones enviados que arroja la intensidad de la zona de la muestra siendo capaz de mostrar figuras en tres dimensiones proyectadas en una imagen de televisión. Su resolución está entre 3 y 20 nm. dependiendo del microscopio (Grágeda, M.Z. y Montesinos, S. 2000).

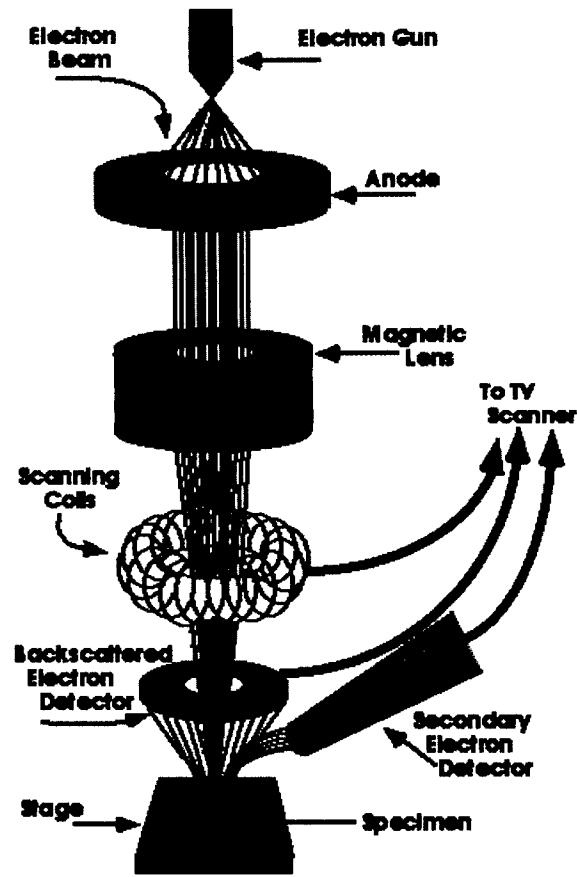


Figura 2.13. Esquema que representa el funcionamiento del Microscopio Electrónico de Barrido (Schweitzer, J. 2006).

2.5.10. Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)

El microscopio de fuerza atómica es un instrumento mecánico-óptico capaz de detectar fuerzas del orden de los nanonewton. Al analizar una muestra se registra continuamente la altura sobre la superficie de una sonda o punta cristalina de forma piramidal.

El AFM puede realizar dos tipos de medidas: imagen y fuerza. En la modalidad de imagen, la superficie es barrida en el plano de la superficie por la punta. Durante el barrido la fuerza interatómica entre los átomos de la punta y los átomos en la superficie de la muestra, provoca una flexión del listón. La fuerza interatómica se puede detectar cuando la punta esta muy próxima a la superficie de la muestra. Provee la imagen de una superficie sin que intervengan los efectos eléctricos, al medir las fuerzas mecánicas en la punta detectora, por lo que también resulta útil para materiales no conductores. (Sahin y col. 2007).

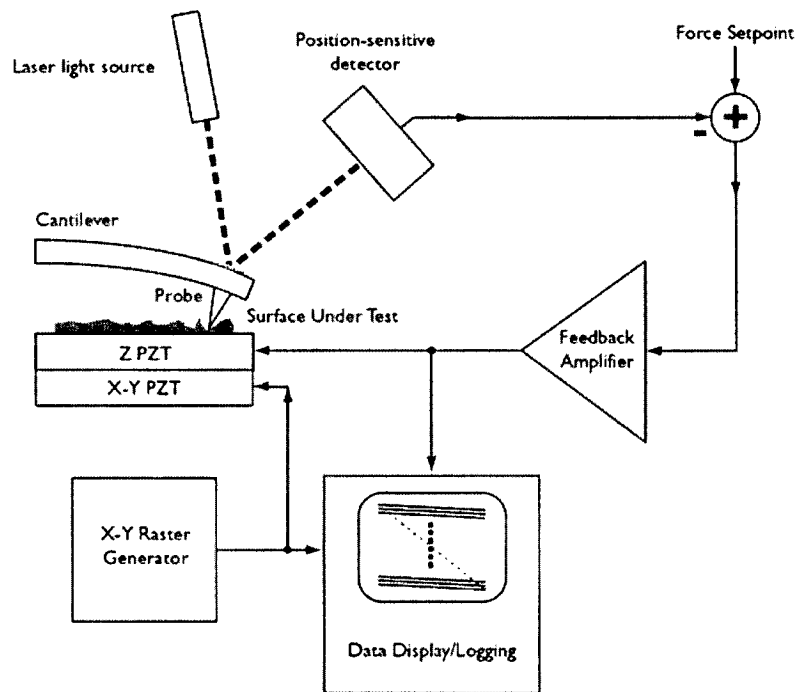


Figura 2.14. Esquema que representa el funcionamiento del Microscopio de Fuerza Atómica (West, P. y Ross A. 2002)

2.5.11. Microscopía Confocal Láser (LCM)

La Microscopía Confocal Láser es una técnica de observación microscópica por la cual se obtienen imágenes de mayor nitidez y contraste. El principio de la microscopía confocal se basa en la eliminación de la luz reflejada ó fluorescente de los planos fuera del foco. Para ello se ilumina una pequeña zona de la muestra y se toma el haz luminoso que proviene del plano focal, eliminándose los haces procedentes de los planos inferiores y superiores (Boyde, 1988).

El principio del funcionamiento del microscopio confocal se basa en la existencia de dos diafragmas (*Pinhole*), uno entre la fuente de luz y el objetivo y el otro entre el objetivo y el detector. Ambos *Pinhole* deben de estar perfectamente alineados de forma que el segundo de ellos únicamente deje llegar al detector la luz procedente del plano focal. La utilización de un láser como fuente de luz permite focalizar la iluminación en una región muy pequeña de la muestra y con una gran intensidad.

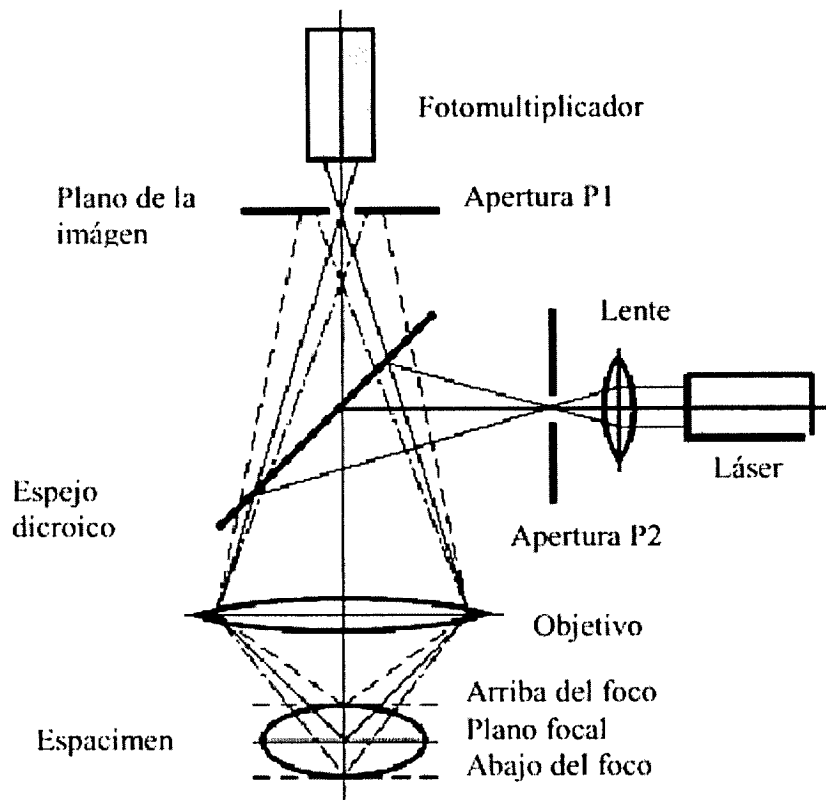


Figura 2.15. Esquema básico del funcionamiento del Microscopio Confocal Láser
 (Soto-Eguibar, E. 1993).

2.5.12. Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC)

Se basa en el registro cuantitativo de la diferencia del flujo de calor entre una muestra y una referencia en función de la temperatura. Por medio de esta técnica se mide la cantidad de energía que necesita una muestra para estar equilibrada térmicamente con un material de referencia, mientras ambas se sujetan a un programa de temperatura controlado (Mathot, 1994). El ensayo se realiza en base a que prácticamente todos los materiales sólidos o líquidos presentan procesos térmicos en los que ocurre un cambio en su entalpía o calor específico.

El equipo consta de de dos cámaras aisladas, cada una con un sensor de temperatura, en donde la primera contiene la muestra a analizar y la segunda contiene el patrón de referencia. El objetivo es que ambas cámaras tengan la misma temperatura. La diferencia de calor que entra a la muestra y a la referencia genera una señal eléctrica, la cual es registrada por el equipo (Kämpf, 1986). De acuerdo a los datos obtenidos se

construye una gráfica, que representa el flujo de calor por unidad de masa en función de la temperatura de calentamiento programada ó el tiempo.

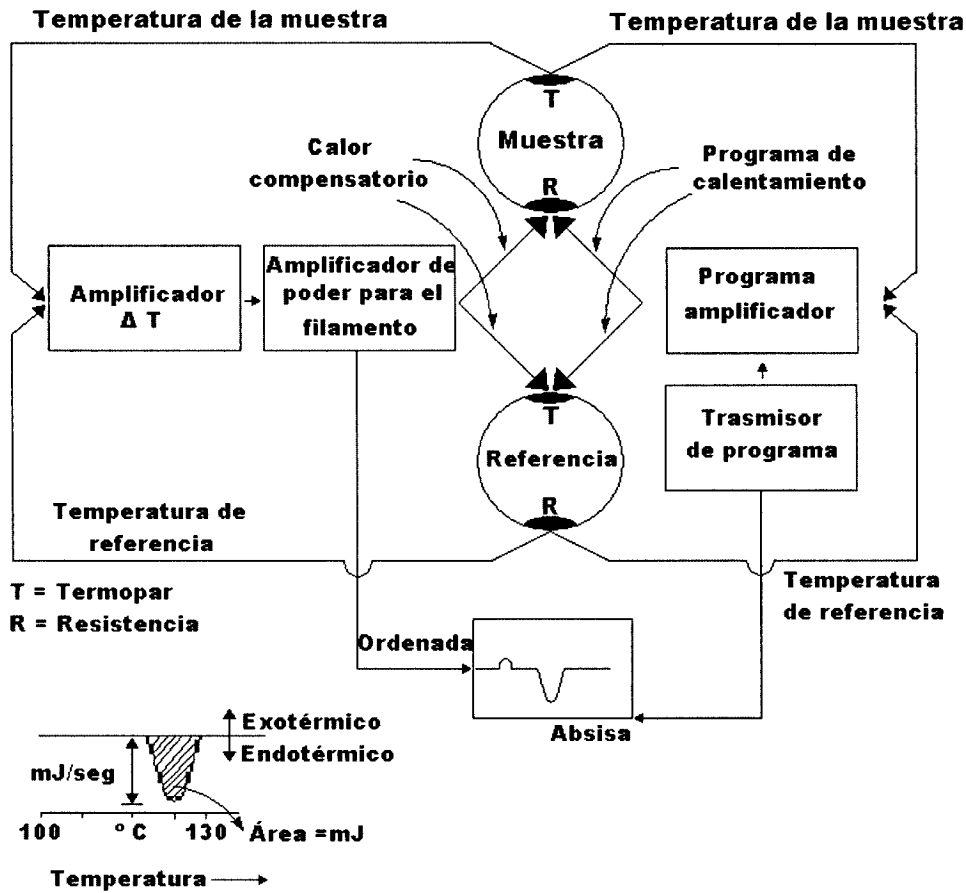


Figura 2.16. Representación esquemática de un calorímetro diferencial de barrido
 (Kämpf, 1986).

ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

En este capítulo se presenta el estado actual del conocimiento de películas poliméricas delgadas, tomando en cuenta los materiales utilizados comúnmente (tanto el sustrato como el polímero que compone la película delgada); los métodos de fabricación empleados por los autores y finalmente las técnicas de caracterización implementadas en cada uno de los casos. La búsqueda de información se realizó en motores de búsqueda como Scifinder, Scirus, ISI web of knowledge, entre otros.

3.1. Materiales

3.1.1. Sustratos

Un sustrato funge como la base o la superficie donde será depositada la película delgada, lo único con lo que debe de cumplir es en no alterar la morfología de la muestra. Por un lado, se ha utilizado vidrio como sustrato para la fabricación de películas delgadas a las cuales se les incorporaban enzimas (*Santos y col.*, 2000). Otros estudios efectuados por *Kim y col.* (2002) presentan el uso de silicón como sustrato ópticamente transparente. Otras investigaciones apuntan al uso de sustratos que pueden ser a partir de un metal, un cerámico, polímeros de origen orgánico, tejido animal ó vegetal, o el uso de tejido humano como hueso ó diente (*Kim, H.M. y Ko, J.S.*, 2002).

3.1.2. Materias primas

El uso de materias primas es muy extenso, desde metales hasta cerámicos. En este caso nos enfocamos al uso de materiales de origen polimérico, tomando en cuenta que no deben perder sus propiedades mecánicas y que en su mayoría son materiales semicristalinos.

Existen reportes en la literatura de uso de polímeros como el polietileno (PE) y el polietilentereftalato (PET) (*Kamei y col.* 1997); además del uso de polietilenimida (PEI) y poliestirensulfonato (PSS) (*Santos y col.* 2001). Otras reportes sugieren el uso de policaprolactona (*Hta y col.* 2004); alcohol polivinílico (PVA) (*Horkay y col.* 2005); polióxido de etileno (PEO) (*Prodduturi y col.* 2005), poliuretanos en general (*Janik,*

H.S.; 2005), monómeros de tirosina (Marx, K.A.; 2007) policaprolactona y polipropileno succinato (Bikiaris y col. 2007), polímeros de diacetileno (Stevens y col. 2002), copolímeros de anhídrido maléico (Renner y col. 2002), nylon 6/6 (Ajikumar y col. 2004), polihidroxibutirato (Fujita y col. 2004), poliestireno (Atashbar y col. 2005), monómeros de ácido acrílico (Nichols y col. 2007), polimetilmetacrilato y poliestireno-co-butil metacrilato (Catre y col. 1999).

Un material que es prometedor para su aplicación biomédica es el quitosán, propuesto por Cárdenas y col. (2008). El quitosán puede ser utilizado tanto en animales como en humanos sin ningún riesgo; al contrario, se pueden obtener diversos beneficios cuando el cuerpo humano es dañado por cirugías, lesiones, quemaduras y úlceras. El quitosán muestra un efecto específico en el proceso de recuperación de lesiones. Adicionalmente, el quitosán es un producto atractivo para el tratamiento específico de quemaduras, debido a su fácil formación de películas, resistencia, biocompatibilidad, absorción de agua y su degradación natural por enzimas del cuerpo. Otra ventaja de este tratamiento es que permite la permeabilidad óptima de oxígeno hacia todos los tejidos y evita la pérdida de líquidos corporales, lo que resulta de vital importancia para prevenir el flujo de oxígeno hacia los tejidos dañados.

3.2. Métodos de fabricación

Los métodos de fabricación de películas delgadas van a variar dependiendo de la composición química del material que se va a emplear y por consiguiente de sus propiedades.

Stevens y col. (2002) realizaron películas delgadas mediante el método de Langmuir-Blodgett del polímero diacetileno con el objetivo de estudiar su estructura cristalina, obteniendo a su vez buenos resultados. Otros estudios realizados el mismo año utilizan una combinación del método de auto-ensamblaje para depositar grupos alcanotiol en películas delgadas, que a su vez serían depositadas en sustratos poliméricos por medio de la técnica de Deposición física de vapor. (Kim y col. 2002). Wiesner (2006), utilizando la técnica de auto ensamblaje fabricó películas delgadas a partir de copolímeros en nanoescala, los cuales pueden ser aplicados en microelectrónica y en nanobiotecnología.

Otro método de obtención de películas delgadas es el empleado por *Arcana y col.* (2006), en donde utilizan “Casting” de polímeros en solución seguido de moldeo por compresión, observando que al realizar esta técnica se disminuye la cristalinidad de los polímeros. *Elkasabi y col.* (2006) efectuaron la Deposición Química de Vapor como una simple estrategia para la obtención de superficies multi funcionales presentes en un sustrato. Otra de las técnicas que ha tenido auge es la presentada por *Kecskemeti y col.* (2006) denominada Pulsed Laser Deposition (PLD), la cual permite la fabricación de películas poliméricas delgadas de alta calidad a partir de polímeros biodegradables como el polihidroxibutirato (PBH). Otros materiales que se han empleado en esta técnica son el polietileno, policarbonato, polimetilmetacrilato, polietilenglicol, polianilina y politetrafluoroetileno entre otros. Se ha observado que por medio de este método se pueden fabricar dispositivos biomédicos debido a que tiene un control riguroso del espesor de la película.

Actualmente, *Jacob y col.* (2008) realizaron la polimerización por plasma de radiofrecuencia, utilizado para la fabricación de películas poliméricas delgadas. La polimerización por plasma, también denominada “Descarga química luminosa” inicia cuando un polímero es depositado en forma de películas en superficies presentes en el mismo ambiente a partir de una descarga luminosa de los gases orgánicos que constituyen a los polímeros. La polimerización por plasma es una técnica importante para la fabricación de películas poliméricas delgadas debido que puede ser empleada para la mayoría de los polímeros que generen vapores orgánicos. Las películas obtenidas mediante este método resultan de alta calidad, obteniendo materiales homogéneos, químicamente inertes, insolubles, mecánicamente resistentes y térmicamente estables.

3.3. Caracterización

Las diferentes técnicas a seguir en la caracterización de películas delgadas de origen polimérico van a depender de su morfología y por consiguiente de sus propiedades.

3.3.1. Espesor

3.3.1.1. Microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para la medición del espesor en películas poliméricas delgadas. Un enfoque prometedor para el seguimiento de la adhesión y la proliferación de células en sustratos sólidos está basado en esta técnica, según lo efectuado por *Le Guillou y col. (2005)*. En investigaciones realizadas por *Renner y col. (2005)* se puede observar la aplicación de este método para el análisis en cambios de superficie en copolímeros de anhídrido maléico. En ese mismo año, *Horkay y col. (2005)* efectuaron mediciones en películas delgadas de alcohol polivinílico (PVA) en las que se presentaban cambios osmométricos. *Santos y col. (2001)* demostraron por medio de monitoreo que las películas delgadas de poliéter-imina y de poliestirensulfonato crecen de manera secuencial cuando se encuentran dentro de un soporte sólido. Por otro lado, *Das y col. (2003)* observaron que por medio del método de QCM se podía realizar el reconocimiento de la concentración de bacterias presentes en películas delgadas, fabricadas a partir de polímeros.

3.3.1.2. Espesor por cizallamiento o esfuerzo de corte (Thickness Shear mode, TSM)

En estudios realizados por *Le Guillou y col. (2005)* el método TSM fue utilizado para la medición del espesor en base a las interacciones ocurridas entre células (fibroblastos) y polímeros (PMMA) desarrolladas durante el proceso de adhesión celular.

3.3.2. Propiedades estructurales

3.3.2.1. Difracción de rayos X (XRD)

Para la observación y caracterización de películas delgadas algunos autores se basan en la técnica de difracción de rayos-X, la cual nos permite obtener información en cuanto a la estructura cristalina del material. *Hontsu y col. (1996)*, realizaron por medio de esta técnica la evaluación de la estructura, cristalinidad, composición y morfología de la superficie de películas delgadas formadas a partir de hidroxiapatita. Por otro lado, *Ajikumar y col. (2004)* caracterizaron películas delgadas de Nylon 6/6 con carbonato de calcio por medio de éste método. Otras investigaciones efectuadas por *Repka y col.*

(2005) utilizaron la difracción de rayos-X para corroborar la presencia de estructuras cristalinas de la lidocaína y, además, de polímeros formados a partir de la celulosa, encontrándose que la intensidad de los picos se ve ligeramente disminuida debido a la presencia de componentes cristalinos presentes dentro de la mezcla física, observando también la presencia de un pico característico que corresponde a componentes de tipo amorfo. *Bikiaris y col.* (2007) utilizó este método para la caracterización física de las películas delgadas obtenidas, en donde se observa un incremento de la cristalinidad al aumentar el tiempo de la hidrólisis enzimática en mezclas de policaprolactona y polipropileno-succinato.

3.3.2.2. Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos-X (XPS)

Este método es considerado como una técnica confirmatoria de la estructura superficial de una muestra. *Nichols y col.* (2007) muestran la formación de una película delgada polimérica de 2 nm. de espesor y su composición uniforme, además se observa la deposición de partículas de hidroxiapatita en su superficie de forma homogénea. Por otro lado, estudios efectuados por *Elkasabi y col.* (2006) revelan el estudio de la superficie de una película delgada en donde se confirma la inmovilización de biomoléculas. *Santos y col.* (2001) afirman que por medio de la técnica de XPS se confirma el crecimiento y la deposición de capas delgadas de enzimas para la formación de películas delgadas.

3.3.2.3. Espectrometría de masas (MS)

La técnica de espectrometría de masas mide los fragmentos o los iones de las moléculas. Algunos autores utilizan este método para la detección de compuestos en la superficie de películas poliméricas delgadas. *Xu y col.* (2003) utilizaron la espectrometría de masas incorporado con la técnica MALDI para la detección de partículas contaminantes incorporadas a la superficie de películas delgadas. Por otro lado, *Nichols y col.* (2007) utilizaron esta técnica para la detección de partículas de hidroxiapatita presentes en la superficie de películas poliméricas delgadas.

3.3.2.4. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La determinación de películas delgadas de origen polimérico por este método va encaminada a la caracterización del polímero con el que se fabricó la película (*Bikiaris y*

col. 2007), en donde se puede mostrar un espectro con un pico característico atribuido a los protones metileno provenientes del ácido succínico y picos múltiples característicos de la policaprolactona. Por otro lado, *Al-Raqa y col. (2008)* sintetizaron por vía química un compuesto orgánico y utilizaron las técnicas de NMR H^1 y NMR C^{13} para la caracterización del mismo, este compuesto con la capacidad de ser soluble en solventes orgánicos y que además sirva para la fabricación de películas delgadas por el método de spin coating.

3.3.2.5. Espectroscopia de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja puede ser utilizada para entender las modificaciones en la superficie de un material. *Ajikumar y col. (2004)* observó las modificaciones efectuadas en películas delgadas debida a los tratamientos sometidos de tipo ácido ó base, empleando el modo atenuado para la observación de enlaces característicos N-H y C=O. Por otro lado, esta técnica puede ser empleada para verificar la presencia de grupos funcionales o de partículas presentes en la superficie de películas delgadas obtenidas a partir de la copolimerozación del 4-aminometil, [2,2] paraciclofeno y del 4-trifluoroacetil, [2,2] paraciclofeno (*Elkasabi y col. 2006*).

3.3.3. Propiedades Mecánicas

Las propiedades mecánicas dependen tanto de la estructura macroscópica como de la naturaleza de su micro estructura cristalina (*Buchko y col. 1999*).

3.3.3.1. Tensión

Para este caso hay que considerar la fuerza de cohesión entre los cristales de la película y su crecimiento sobre el sustrato. La idea básica de la generación de la tensión es que la película es depositada en un estado fuera del equilibrio para que posteriormente el material con el que se obtiene la película sea deformado para generar esfuerzo de tensión en la misma (Nix, W.D., 2005)

3.3.4. Propiedades ópticas

3.3.4.1. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

En estudios recientes el uso del microscopio electrónico de transmisión va enfocado a la morfología superficial y a la estructura de películas poliméricas delgadas, como lo llevado a cabo por *Fujita y col. (2004)*, en donde se puede observar la orientación molecular de películas de polihidroxibutirato (PBH), su espesor, su estructura superficial y su comportamiento a la degradación enzimática.

Por otro lado, *Nichols y col. (2007)* mostraron que por medio de esta técnica se puede determinar la incorporación uniforme de nanopartículas de hidroxiapatita en películas delgadas formadas a partir de polímeros.

3.3.4.2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido puede ser utilizado para la caracterización morfológica de películas delgadas. *Bikiaris y col. (2007)* efectuaron observaciones en la morfología de películas delgadas formadas a partir de mezclas de polímeros, en base a su pérdida en peso provocada por la hidrólisis enzimática de su superficie, mostrando un cambio poco considerable. Por otro lado, *Ajikumar y col. (2004)* emplearon este método de caracterización para la observación de la morfología y de la naturaleza del crecimiento de los cristales formados durante la formación de la película.

3.3.4.3. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

El microscopio de fuerza atómica ha tenido uso como técnica de caracterización en películas poliméricas delgadas. *Hontsu y col. (1996)* evaluaron la morfología superficial de películas delgadas de materiales poliméricos. Actualmente el AFM resulta de gran utilidad para la evaluación de la rugosidad y de las texturas superficiales de películas poliméricas delgadas. *Atashbar y col. (2005)* realizó el estudio cualitativo en modo de no contacto de las películas delgadas obtenidas y de los sustratos utilizados. Mediante esta técnica se pudo calcular el valor de la rugosidad en películas hechas de poliestireno (PS). Por otro lado, *Fujita y col. (2004)* revelaron la presencia de texturas fibrosas gruesas en la superficie de la película delgada orientada a partir de polihidroxibutirato, en la que las lamelas están por debajo del crecimiento normal, corriendo de forma paralela a la dirección del corte.



3.3.4.4. Microscopía Confocal Láser (LCM)

Le Person y col. (1998) proponen que la técnica del microscopio confocal láser puede ser empleada para el monitoreo de películas poliméricas delgadas dentro del ámbito farmacéutico en donde la observación de la muestra es llevada a cabo en la superficie dentro del espesor de la misma, evitando el daño o corte de la película delgada obteniendo mucha mejor resolución. Por otro lado, *Catry y col. (1999)* observaron las modificaciones superficiales de películas poliméricas delgadas de polimetilmetacrilato (PMMA) y de poliestiren-co-butil metacrilato a partir de la irradiación láser de un diodo infrarrojo; estas imágenes revelan diferentes morfologías en las áreas estructuradas, indicando la influencia importante de la matriz polimérica al incidir el láser.

3.3.5. Propiedades Térmicas

3.3.5.1. Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC)

La aplicación del DSC en la caracterización de películas delgadas sirve básicamente para la observación del comportamiento térmico de las mismas (*Bikiaris y col. 2006*). Estos autores observaron los termogramas correspondientes a los puntos de fusión de la policaprolactona y el polipropileno-succinato, siendo de 45° y 65.2° respectivamente, además de observar y analizar sus entalpías de fusión y sus temperaturas de cristalización. Por otro lado, *Repka y col. (2005)* utilizaron esta técnica de caracterización para estudiar la cristalinidad de la lidocaína en películas delgadas y el mezclado físico de su formulación, encontrando un endoterma que representa el punto de fusión a los 69° C, indicando que la lidocaína es un fármaco cristalino y que su cristalinidad se puede ver afectada al efectuar mezclas de polímeros para obtener películas delgadas.

3.3.6. Biocompatibilidad

Actualmente esta característica es muy prometedora debido a sus aplicaciones en el área biomédica. A partir del año 2000, los investigadores se han enfocado en el estudio de películas que contengan sus principales propiedades, pero que además sean compatibles con el cuerpo humano.

En el 2005, *Prodduturi y col.* realizaron un estudio del uso de películas delgadas fabricadas a partir de polióxido de etileno (PEO) que en sus superficie contenía Clotrimazol, un medicamento antimicótico. Estos autores observaron la cristalización del fármaco, su estabilidad física y su interacción con la piel, encontrando que el medicamento era inestable (recristalización) debido probablemente al método de fabricación de la película (extrusión en mezcla caliente).

En estudios recientes *Nichols y col. (2007)* observaron que con la incorporación de nanopartículas de hidroxiapatita (HA) a películas delgadas de origen polimérico se genera biocompatibilidad al ser adheridas a la superficie del hueso, dado que la hidroxiapatita proporciona características similares en cuestión de tamaño a nivel molecular, composición química y en su estructura cristalina; por lo tanto, esta incorporación favorece el crecimiento óseo y su regeneración.

Otras investigaciones surgen a partir de la adhesión de películas poliméricas delgadas a superficies metálicas (ejemplo, prótesis de hueso) con el objetivo de evitar y prevenir la corrosión del metal ó la fabricación de una película biodegradable y biocompatible que funja como dispositivo para la liberación controlada de medicamentos (*Shaw y col. 2008*).

Estudios realizados por *Song y col. (2008)* presentan el comportamiento de películas delgadas que contienen proteínas de colágeno y quitosán. Al ser incorporadas en la superficie de un hueso, se producen interacciones entre las células madre, las cuales generan adhesión, expansión y proliferación de las mismas entre el hueso y la película. Esto genera la reconstitución del hueso y además permite su aplicación en dispositivos ortopédicos, evitando la incorporación de otro tipo de materiales como los metales ó los cerámicos.

En investigaciones realizadas por *Gómez-Pinedo y col. (2001)* presentaron el uso del silicón y del quitosán para la tubulización del nervio ciático lesionado en ratas, tomando en cuenta que el silicón es de naturaleza inerte y que el quitosán es un componente bioactivo que puede fungir como vehículo para la liberación prolongada de compuestos. Obtuvieron que ambos polímeros favorecían la regeneración del tejido nervioso, pero

que con el quitosán tenían la ventaja de no volver a realizar una cirugía para su remoción, lo que ocurre en el caso del silicón.

Manzanilla-García y col. (1992) llevaron a cabo la incorporación de prótesis fabricadas a partir de silicón y de metilmetacrilato en tres especies diferentes (perros, conejos y ratas) en donde se les dio seguimiento hasta por un año para investigar biocompatibilidad, tolerancia o toxicidad de los materiales, además de observar la reacción tisular local y sistémica, tanto en la forma clínica como por medio del estudio histológico de escroto, pulmón, hígado y riñón.

Leone y col. (1990) colocaron una película intraperitoneal en veinte ratas, diez hechas de polipropileno y las restantes de poliglactina (un material hecho a base de ácido poliglicólico y proteínas; en un periodo de 45 días fueron sacrificadas y por medio de un examen histológico se demostró que en los materiales absorbibles (Poliglactina) no había reacción inflamatoria; mientras que con los materiales no absorbibles había gran respuesta inflamatoria con la formación de granulomas.

En investigaciones efectuadas por *Chang-Min y col. (2005)* se injertaron monómeros de N-vinilpirrolidona y anhídrido maléico en la superficie de películas delgadas de polipropileno mediante la irradiación ultravioleta, lo anterior con el objetivo de formar un material con características antimicrobianas y de biocompatibilidad. Estas películas fueron caracterizadas mediante FTIR y UV-visible para determinar la presencia de los monómeros injertados, además de llevar a cabo análisis antimicrobianos *in vitro* utilizando cepas de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*. Los resultados arrojan que tanto en el FTIR como en el UV-visible se observan las señales características de compuestos pirrolidona, mientras que en las pruebas antimicrobianas se observó que al poner en contacto las películas injertadas los microorganismos inhiben su crecimiento en su totalidad, por lo que a este tipo de materiales se les puede considerar como buenos candidatos en aplicaciones biomédicas.

AREAS DE OPORTUNIDAD

Para llevar a cabo una metodología adecuada de análisis y evaluación de películas delgadas es preciso tomar en cuenta el que el método de fabricación juega un papel importante en la morfología de la muestra y consecuentemente en sus propiedades. Dado que diversos autores utilizan diferentes métodos de obtención, se deben de considerar factores como costo-beneficio, producción a nivel industrial y sobre todo que el método de fabricación no comprometa la biocompatibilidad de la muestra.

4.1. Fabricación

Espinosa-González y col. (2003) mencionan que tanto la técnica Langmuir-Blodgett (LB) como la de auto ensamblaje (SA) son excelentes herramientas para la fabricación de películas delgadas; sin embargo, la técnica de LB ha tenido un bajo impacto a nivel industrial debido a su complejidad durante el proceso. Por otro lado, la técnica de auto-ensamblaje se considera atractiva para la deposición de nano películas debido a su fácil proceso de elaboración, que ofrece un amplio control del espesor y la posibilidad de utilizar sustratos de cualquier tamaño o geometría, por lo cual se le considera como una técnica viable para su producción en masa. Otros autores mencionan que el método del auto ensamblaje es eficaz en la fabricación de películas poliméricas delgadas por el control adecuado de su espesor (*Kim y col. 2002*) (*Wegner, 2006*).

4.2. Caracterización

Para realizar una metodología de caracterización es preciso cubrir todos los aspectos en función de la evaluación de sus propiedades, además de tomar en cuenta los métodos de caracterización más actuales y frecuentemente utilizados por los autores. Por otro lado también es conveniente efectuar consideraciones en equipos y personal capacitado para la realización de las evaluaciones correspondientes.

En cuanto a la evaluación del espesor de material, tanto la técnica de microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) como la de TSM son excelentes para el control adecuado y la medición correcta del espesor de una película polimérica delgada, tomando en cuenta que su aplicación es reciente (*Le Guillou y col. 2005*), (*Renner y col. 2005*). Por otro

lado, es preciso observar que aquí en el CIQA no se cuentan con ambos equipos, por lo tanto sería conveniente pensar en la adquisición del mismo o en dado caso buscar otras alternativas por las cuales se pueda cuantificar el espesor de una película delgada.

Para la evaluación de sus propiedades estructurales, tales como su morfología superficial, estructura química y su cristalinidad se cuentan con diversas técnicas de caracterización, de las cuales podemos obtener información detallada de la muestra a analizar. La difracción de rayos X (XRD) nos proporciona información sobre su estructura cristalina, lo cual es de gran importancia porque repercute directamente sobre las propiedades de la película en general. Esta técnica ha sido usada desde los años 90's con buenos resultados (*Hontsu y col. 1996*) hasta la actualidad (*Bikiaris y col. 2007*). Además, otro factor que es de gran importancia es que dentro del CIQA se cuenta con el equipo apropiado para la caracterización.

Otro método alternativo para obtener información estructural de una película delgada de origen polimérico es el XPS, en el cual se realiza un análisis cualitativo de los elementos presentes en la muestra y la naturaleza de sus enlaces químicos, tal como lo propone *Nichols y col. (2007)*, *Elkasabi y col. (2006)*; el inconveniente que tiene es que actualmente no se tiene acceso a este equipo en el CIQA. El análisis mediante Resonancia Magnética Nuclear (NMR) resulta un método atractivo para la caracterización de este tipo de materiales de acuerdo con lo reportado por *Bikiaris y col. (2007)* y *Al-Raqa y col. (2008)*, en donde se evalúa la composición química de la superficie de la película además de la presencia de grupos funcionales presentes, mismos que favorecerán la unión de la película delgada con cualquier componente del cuerpo humano, en cuestiones biomédicas; en este caso si se cuenta con el equipo necesario para llevar a cabo la evaluación.

Otra de las propiedades a evaluar en películas poliméricas delgadas es la relacionada con su comportamiento mecánico. Puesto que el CIQA cuenta con un departamento que evalúa éstas propiedades, se puede asumir que contamos con las herramientas apropiadas para la evaluación de éste tipo de materiales. Sin embargo, dada la naturaleza física de la muestra, pruebas como flexión y resistencia al impacto no se

pueden efectuar, solamente la prueba de tensión, de acuerdo con lo reportado por *Nix y col. (2005)*.

Una de las características principales de las películas delgadas es su respuesta óptica. Para ello, es vital contar con equipos apropiados para la observación de las mismas, como lo es la microscopía electrónica de transmisión (TEM) puesto que por medio de ésta técnica podemos obtener información importante como el espesor, la orientación molecular, la presencia y la forma de estructuras cristalinas además de observar la incorporación uniforme de nanopartículas, tal como lo efectuado por *Nichols y col. (2007)*. Otra técnica que nos va a ser de gran utilidad es la microscopía electrónica de barrido (SEM), puesto que nos da información visual acerca de la morfología superficial de la muestra, la incorporación de partículas en la superficie de la muestra y la naturaleza de las mismas (*Bikiaris y col. 2007*). Finalmente, otro método eficaz es el microscopio de fuerza atómica (AFM), puesto que nos muestra la rugosidad de las películas delgadas y la morfología de la superficie (*Atashbar y col. 2005*).

Para los métodos anteriores se cuentan con los equipos adecuados para realizar los análisis correspondientes, considerando la preparación previa de la muestra. La técnica mas utilizada para la caracterización de películas poliméricas delgadas es el AFM, aunque no se pretende limitar la evaluación microscópica de este tipo de materiales.

Respecto a la medición de las propiedades térmicas de películas delgadas, lo reportado por los autores apunta al uso del calorímetro diferencial de barrido (DSC), en donde se pueden obtener datos como el punto de fusión de la muestra, además de observar la cristalización de la misma. La ventaja de éste tipo de análisis es que el CIQA cuenta con el equipo adecuado y el personal capacitado para la realización de la misma.

La biocompatibilidad es un aspecto fundamental de las películas delgadas dada su aplicación en componentes biológicos. Las pruebas de biocompatibilidad comúnmente son realizadas en animales dada su naturaleza y semejanza con el mecanismo de funcionamiento del cuerpo humano, además de tener gran ventaja con respecto a las pruebas *in-vitro* en cuanto a costos. Para llevar a cabo tales pruebas es necesario contar con áreas específicas en donde se puedan almacenar y monitorear a las especies y contar



con el equipo adecuado para realizar implantes en los mismos, teniendo en cuenta las condiciones apropiadas de higiene y sanidad. Actualmente el CIQA no cuenta con un laboratorio específico en el cual se puedan realizar pruebas en animales ni los análisis posteriores.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La planeación adecuada de una metodología para la caracterización de películas poliméricas delgadas juega un papel crucial, desde la elección del método de fabricación hasta las técnicas de análisis.

El control del espesor en una película delgada es un factor indispensable que repercute directamente en sus propiedades. Para tal efecto se considera el uso de la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), siendo un método que permite controlar los cambios en la superficie de películas y el espesor uniforme. Además de la técnica de cizallamiento por esfuerzo de corte (TSM), que muestra buenos resultados al estudiar las interacciones interfaciales entre un material biológico y uno polimérico.

En cuanto a las propiedades estructurales pueden utilizarse diversas técnicas para la caracterización de una película polimérica delgada. La difracción de rayos-X (XRD) permite el estudio de la estructura cristalina de un material, gracias a ello se puede evaluar la morfología y la cristalinidad de películas delgadas. Otra técnica de utilidad es la espectroscopia fotoelectrónica de rayos-X (XPS), en la cual se observa la composición superficial en muestras formadas a partir de polímeros. Para la detección de compuestos en la superficie de películas delgadas se puede utilizar el espectrómetro de masas (MS). Otra técnica para la identificación de compuestos es la resonancia magnética nuclear (RMN), dado que se obtienen buenos resultados según lo efectuado por diversos autores. Al igual que este método, la espectroscopia infrarroja (FTIR) ofrece la identificación cualitativa de componentes presentes en una muestra.

En cuanto a las propiedades mecánicas de películas poliméricas delgadas no se obtuvo suficiente información debido a la falta de referencias bibliográficas con respecto al tema, la prueba que ofrece resultados contundentes es la de tensión.

Por otro lado, la medición de las propiedades ópticas resultan atractivas dado que permiten la visualización de la morfología y la observación de la distribución uniforme de partículas dentro de la superficie de una muestra. Técnicas como la microscopia

electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía de fuerza atómica (AFM) y la microscopía confocal láser (LCM) son las más concurridas por los investigadores.

Con respecto a las propiedades térmicas se pueden efectuar análisis del comportamiento térmico de películas poliméricas delgadas por medio del calorímetro de barrido diferencial (DSC), obteniendo datos como el punto de fusión y cristalización de las muestras.

Se puede decir que el CIQA cuenta con la mayoría de las técnicas de caracterización de películas delgadas como son la difracción de rayos-X, espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, infrarrojo, microscopía electrónica de transmisión, microscopía electrónica de barrido, microscopía de fuerza atómica, microscopía confocal láser, calorimetría diferencial de barrido y una máquina universal para pruebas mecánicas. No obstante, se puede apreciar la falta de una microbalanza de cristal de cuarzo para la medición del espesor, así como del equipo de XPS; ambos importantes para la evaluación de este tipo de materiales.

Otro factor importante es la determinación de la biocompatibilidad en películas delgadas para uso biomédico. Dentro del CIQA no se cuenta con un área específica en donde se puedan efectuar pruebas de biocompatibilidad con animales de experimentación. En este caso, es indispensable considerar el diseño de la misma y las condiciones de higiene y de seguridad, almacén de animales de prueba y un espacio específico para la realización de análisis histológicos. Todo lo anterior con el objetivo primordial de establecer parámetros de análisis de muestras implantadas y su monitoreo. Para llevar a cabo tal efecto también es importante tomar en cuenta la disponibilidad del personal apropiado para el manejo de animales y de residuos biológico-infecciosos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aebisher, P.; Goddard, M.B.; Sassen, H.F.; Hunter, T.J.; Galletti, P.M.; *Biomaterials* (1988), 9, 80.
2. Al-Raqa, S.Y.; Solieran, A.S.; Joraid, A.A.; Alamri, S.N.; Moussa, Z.; Aljuhani, A.; *Polyhedron* (2008), 27, 1256-1261.
3. Arcana, I.M.; Sulaeman, A.; Pandiagan, K.D.; Handoko, A.; Ledyastuti, M.; *Polymer Internacional* (2006), 55(4), 435-440.
4. Asano, A.; *U.S. Pat. Appl. Publ.* (2006), 20 pp.
5. Atashbar, M.Z.; Bejcek, B.; Vjih, A.; Singamaneni, S.; *Sensors and actuators B: Chemical* (2005), B107(2), 945-951.
6. Bikiaris D.N.; Papageorgiu, G.Z.; Achilias, D.S.; Pavlidou, E.; Stergiou, A.; *European Polymer Journal* (2007), 43(6), 2491-2503.
7. Boyde, A.; *Confocal Optical Microscopy. Microscopy and Analysis*, 1988, pp. 7-13.
8. Buttry, D.A. and Ward, M.D.; "Measurement of interfacial processes at electrode surfaces with the electrochemical quartz crystal microbalance", *Chem. Rev.* 1992, 92, 1355-1379.
9. Cárdenas, G.; Anaya, P.; Von Plessing, C.; Rojas, C.; Sepúlveda, J.; *J. Mater. Sci: Mater. Méd.* (2008) 19: 2397-2405.
10. Catry, C.; Jeuris, K.; Jackers, C.; Hofkens, J.; Bastin, L.; Gensch, T.; Grim, P.C.M.; De Schryver, F.C.; Van Damme, M.; *Langmuir*, 1999, 15(4), 1364-1362.
11. Chang-Min, X.; Jian-Ping, D.; Wan-Tai, Y.; *J. Appl. Polym. Sci.* 2005, 97, 2026-2031.
12. Corengia, P.; Ybarra, G.; Mendive, C.; Egidi, D.; Fraigi, L.; Quinteiro, M.; Moina, C.; Instituto Nacional de Tecnología Industrial, 2000.
13. Cristescu, R.; Doraiswamy, A.; Patz, T.; Socol, G.; Grigorescu, S.; Axenter, E.; Sima, F.; Nayaran, R.J.; Mihaiescu, I.N.; Chisholm, B.; Chrisey, D.B.; *Applied Surface Science* (2007), 253, 7702-7706.
14. Curran, J.E.; *Eur Pat. Appl.* (1995), 13 pp.
15. Ektessabi, A.M.; *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B.* 127/128 (1997).

16. Elkasabi, Y.; Chen, H.Y.; Lahann, J.; 38th Central Regional Meeting of the ACS, May 16-20, (2006), CRM-040.
17. Espinosa-González, C.; Moggio, I.; Arias-Marín, E.; Romero-García, J.; Cruz-Silva, R.; Le Moigne, J.; Ortiz-Cisneros, J.; *Synthetic Metals* (2003), 139, 155-161.
18. Fujita, M.; Takikawa, Y.; Teramachi, S.; Aoyagi, Y.; Hiraishi, T.; Doi, Y.; *Biomacromolecules* (2004), 5(5), 1787-1791.
19. Gómez-Pinedo, U.; Chávez-Delgado, E.; López-Dellamary, F.; Mora-Galindo, J.; González-Pérez, O.; Martínez-Contreras, A.; Bañuelos-Pineda, J.; Garzón, P.; Navarro-Ruiz, A.; Luquín, S.; Macías-Islas, M.; García-Estrada, J. *Arch. Neurociencias* 2001, 6(4), 184-193.
20. Grágeda-Zerraga, M. and Montesinos, S. Revista No. 28, Universidad de Chile.
21. Hesse, M.; Meier, H y Zeeh, B.; “Métodos espectroscópicos em química orgânica”, Editorial Síntesis, Versión española, 1995.
22. Hollstein, F. and Louda, P. *Surf. Coat. Techn.* (1999), 627, 120-121.
23. Hontsu, S.; Nakamori, M.; Tabata, H.; Ishii, J.; Kaway, T. *Journal of Applied Physics part 2: Letters* (1996), 35(9B), L1208-L1210.
24. Horkay, F.; Horkayne, S.I.; Basser, P.J.; *Biomacromolecules* (2005), 6(2), 988-993.
25. <http://blogs.creamoselfuturo.com/nano-tecnologia/2008/02/page/2/> Gutierrez del Olmo, M.; 2008.
26. http://innoutopia.blogspot.com/2007_02_01_archive.html Gallego, N.; 2007.
27. <http://www.geocities.com/quimico69/fqav/capas.htm>, Rosas-García, V.M.; Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, 2005.
28. Huang, P.; Zhu, L.; Guo, Y.; Ge, Q.; Jing, A.J.; Chen, W.Y.; Quirk, R.P.; Cheng, S.Z.D.; Thomas, E.L.; Lotz, B.; Hsiao, B.S.; Ávila-Orta, C.A.; Sics, I.; *Macromolecules* 2004, 37, 3689-3698.
29. Hubler, R.; *Surf. Coat. Techn.* (1999), 1116, 116-119.
30. Jacob, M.V.; Easton, C.D.; Woods, G.S.; Berndt, C.C.; *Thin Solid Films* (2008), 516, 3884-3887.
31. Janik, H.S.; *Chemia* (2005), 53, 1-141.
32. Kamei, S.; Tomita, N.; Tamai, S.; Kato, K.; Ikada, Y.; *Journal of Biomedical Materials Research* (1997), 37(3), 384-393.

33. Kämpf, G. en “*Characterization of plastics by physical methods*”, Editorial Hanser Publishers, Munich Viena New York, **1986**, Pág. 179.
34. Kecskemeti, G.; Smausz, T.; Kresz, N.; Toth, Zs.; Hopp, B.; Chrisey, D.; Berkesi, O.; *Applied Surface Science* (**2006**), 253, 1185-1189.
35. Kim, H.M.; Ko, J.S.; *Repub. Corean Kongkae Taeho Kongbo* (**2002**)
36. Kim, S.R.; Teixeira, A.I.; Nealey, P.F.; wendt, A.E.; Abbott, N.L.; *Advanced Materials (Weinheim, Germany)*, (**2002**), 14(20), 1468-1472.
37. Lecacher, F.K.; Federmann, H.; Dawihl, W.; *Ger. Offen.* (**1985**), 9 pp.
38. Leone, R.R.; Vicario, G.P.; Pérez, J.G.; Pisoni, M.; Lemberg, P. *Rev. Argent. Cir.* **1990**, 58(6), 224-226.
39. Manzanilla-García, H.; González-Ramírez, R.; García-Irigoyen, C.; Echeverría Pérez, E.; Reyes-López, A.; *Bol. Col. Mex. Urol.* **1992**, 9(1), 19-31.
40. Martínez, C.H. y Moreno, F. “Fundamentos en biomateriales de uso odontológico: Aplicaciones en estética y cosmética dental”, Universidad del Valle, **2000**.
41. Marx, K.A.; *Series on Chemical Sensors and Biosensors* (**2007**), 5(*piezoelectric sensors*), 371-424.
42. Mathot, V. B. en “*Calorimetry and thermal analysis of polymers*”, Editorial Hanser Publishers, Munich Viena New York **1985**, Pág. 47-51.
43. Matsuo, T. and Seyama, Y.; *J. Mass Spectrom.* (**2000**), 35, 114-130.
44. Nichols, H.L.; Zhang, J.; Shi, D.; Bhanduri, S.; Wen, X.; *Journal of Biomedical Materials Research, Part A.*; (**2007**), 82A(2), 373-382.
45. Nix, W.D.; “Mechanical properties of thin films”, *Material Science and Engineering*, **2005**.
46. Petty, M.C. en “Functional Organic and Polymeric Materials”, Editado por T.H. Richardson, 2000, John Wiley & Sons Ltd, Capítulo 2, página 8-25.
47. Prodduturi, S.; Manek, R.V.; Kolling, W.M.; Stodghill; Steven, P.; Repka, M.A.; *Journal of Pharmaceutical Sciences* (**2005**), 94(10), 2232-2245.
48. Reiter, G.; Castelein, G.; Sommer, J.U.; LNP 606, Springer Verlag Berlin Heidelberg, pp. 131-152, **2003**.
49. Roy, M.D.; Amis, E.J.; Becker, M.L.; *PMSE Preprints* (**2007**), 97, 770-771.
50. Sahin, O.; Magonov, S.; Su, C.; Quate, C.F.; Solgaard, O.; *Nature Nanotechnology* **2007**, 2, 507-514.

51. Santos, J.P.; Welsh, E.R.; Gaber, B.P.; Singh, A.; *Langmuir* (2001), 17 (17), 5361-5367.
52. Schweitzer, J. Purdue University, Radiological & Environmental Management, 2006 <http://www.purdue.edu/REM/rs/sem.htm>
53. Shanks, R. en “*Handbook of plastic films*”, Editado por Abdel-Bary, E.M.; Rapra Technology Limited, Impreso en Shrewsbury, UK; 2003, pág. 5.
54. Shaw, B.; Sikora, E.; Horn, M.; Wolfe, R.C.; *U.S. Pat.* 2008 / 0090097 A1, 12 pp.
55. Son, K.S.; Ryu M.K.; Park, J.C.; Kim, E.S.; Lee, J.H.; Kwon, S.Y.; Im, J.S.; *U.S. Pat. Appl. Publ.* (2006), 5 pp.
56. Song, K.; Wen, P.; Liu, T.; *Key Engineering Materials* 373-374 (2008), 722-725.
57. Soto-Eguibar, E. “La microscopía Confocal”, *Elementos*, 1993, 17, 35-39.
58. Stevens, M.; Longo, M.; Dorset, D.L.; Spence, J.; *Ultramicroscopy* (2002), 90(4), 265-272.
59. Tucker, R.C.; Song, E.; Payer, J.H.; Marchant, R.E.; *Journal of Applied Electrochemistry* (1997), 27, 1079-1087.
60. West, P. and Ross, A.; Pacific Nanotechnology 2002, Santa Clara, CA. <http://www.pacificnano.com/afm-modes.html>
61. Wiesner, U.B.; 231st ACS National Meeting, March 26-30, (2006), PMSE-178.
62. Wucher, B.; Yue, W.; Kulak, A.N.; Mekdrum, F.C.; *Chemistry of Materials* (2007), 19(5), 1111-1119.
63. Xu, Y.; Bruening, M.L.; Watson, J.T.; *Mass Spectroscopy Reviews* (2003), 22(6), 429-440.
64. Yamazaki, S.; *Eur. Pat. Appl.* (2000), 38 pp.
65. Yoshikawa, H.; *Jpn. Kokai Tokyo Koho* (1998), 11 pp.
66. Young, M.D.; *PCT Int. Appl.* (1997), 36 pp.
67. Zeng, J.; Tikare, V.; Jacob, K.I.; *Langmuir* (2006), 22(3), 1333-1340.