CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA

MODIFICACIÓN SUPERFICIAL DE MATERIALES POR PLASMA PARA APLICACIONES MEDICAS

CASO DE ESTUDIO

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA APLICADA

OPCIÓN: QUÍMICA ANALÍTICA

PRESENTA:

YZAMARY MARTÍNEZ RESÉNDIZ

CENTRO DE INFORMACIÓN

11 NOV 2005

RECIBIDO

SALTILLO, COAHUILA **SEPTIEMBRE 2005**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA

MODIFICACIÓN SUPERFICIAL DE MATERIALES POR PLASMA PARA APLICACIONES MEDICAS

CASO DE ESTUDIO

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA APLICADA

OPCIÓN: QUÍMICA ANALÍTICA

PRESENTA:

YZAMARY MARTÍNEZ RESÉNDIZ

ASESORA:

DRA. GUADALUPE NEIRA VELÁZQUEZ

SALTILLO, COAHUILA **SEPTIEMBRE 2005**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA

MODIFICACIÓN SUPERFICIAL DE MATERIALES POR PLASMA PARA APLICACIONES MEDICAS

CASO DE ESTUDIO

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA APLICADA

OPCIÓN: QUÍMICA ANALÍTICA

PRESENTA:

YZAMARY MARTÍNEZ RESÉNDIZ

EVALUADORES

DRA. GRACIELA ARIAS GARCÍA | **DRA. LYDIA BERLANGA DUARTE**

SALTILLO, COAHUILA | **SEPTIEMBRE 2005**

CONTENIDO

INDICE....i
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS....iii
INTRODUCCION....1
OBJETIVO....3
I. PLASMA....3
1.1Generalidades....3
1.2 Propiedades del plasma....4
II. MODIFICACION DE POLIMEROS POR PLASMA....7
2.1 Modificación superficial de polímeros....7
2.2 Reacciones químicas que ocurren durante el tratamiento con plasma....9
2.2.1 Limpieza de superficies....10
2.2.2 Erosión....11
2.2.3 Modificación Superficial....12
2.2.4 Entrecruzamiento de la superficie....13
2.3 Equipo de plasma....14
2.3.1 Cámaras....15
2.3.2 Bombas....15
2.3.3 Generadores....16
2.3.3.1 Reactores con electrodos internos....17
2.3.3.2 Reactores con electrodos externos....18
2.3.3.3 Reactores sin electrodos....18
III. APLICACIONES GENERALES DEL PLASMA....19
3.1 Limpieza de superficies....20
3.2 Adhesión....20
3.3 Control de la energía superficial....21
3.4 Mejora de biocompatibilidad....21
3.5 Entrecruzamiento....24
IV. TECNICAS DE CARACTERIZACION....25
4.1 Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X....25
4.2 Análisis infrarrojo....27

4.3 Medición del ángulo de contacto.....28
4.4 Espectroscopia de masas de ión secundario (SIMS).....29
4.5 Microscopia Óptica (MOP).....31
4.6 Microscopia electrónica de barrido (SEM).....32
4.7 Microscopía de fuerza atómica.....33
4.8 Sondas electrostáticas.....34
V. TÉCNICAS DE CARACTERIZACION BIOLÓGICA.....36
5.1 Obtención y Estimación de la Cantidad de Células.....36
5. 2 Pruebas de Viabilidad y Funcionalidad Celular.....36
5. 2. 1 Método de exclusión de azul tripano.....36
5. 2. 2 Fagocitosis in vitro (Prueba de NBT).....38
VI. ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO.....40
6.1 Aplicaciones médicas de polímeros modificados por plasma.....40
6.1.1. Bioseparación.....42
6.1.2. Esterilización.....42
6.1.3. Prótesis oculares.....44
6.1.4. Aplicaciones ortopédicas.....44
6.1.5. Cultivos de tejidos.....44
VII. CONCLUSIONES.....67
VIII. REFERENCIAS.....68

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

UV	=	Ultravioleta
PS	=	Poliestireno
PHB	=	Polihidroxibutirato
PP	=	Polipropileno
PC	=	Policarbonato
PET	=	Polietilentereftalato
PTFE	=	Politetrafluoroetileno
PMMA	=	Polimetilmetacrilato
PE	=	Polietileno
PVC	=	Policloruro de Vinilo
PU	=	Poliuretano
PDLLA	=	Poli(D-L-ácido láctico)
PLAG	=	Poli(D,L-láctico-co-ácido glicolico)
SAN	=	Copolímero de estireno acrilonitrilo
C	=	Carbón
O	=	Oxígeno
N	=	Nitrógeno
Cl	=	Cloro
CO_2	=	Dióxido de Carbono
H_2O	=	Agua
HUEVEC	=	Células del Cordón Umbilical Humano
XPS	=	Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X
SIMS	=	Espectroscopía de masas de ion Secundario
FTIR	=	Espectroscopia de infrarrojo
SEM	=	Microscopia electrónica de barrido
MOP	=	Microscopia óptica
RF	=	Radio Frecuencia
W	=	Watts
s	=	segundos

Å	=	Angstroms
nm	=	nanómetros
min	=	minutos
λ	=	Camino libre de una molécula
r	=	radio
λ_D	=	Longitud de Debye
ε_0	=	Permeabilidad de espacio libre
e	=	Carga del electrón
K	=	Constante de Boltzmann
T_e	=	Temperatura de electrones
n_e	=	Densidad de electrones
V*	=	Potencial de excitación
V_i	=	Potencial de ionización
K.E	=	Energía Cinética del fotoelectrón
hv	=	Energía de rayos x
B.E	=	Energía de enlace del electrón
θ	=	Angulo entre dos superficies

INTRODUCCIÓN

Los polímeros cuentan con buenas propiedades físicas, químicas y mecánicas que los hacen atractivos para un gran número de aplicaciones en el área médica, donde son empleados para la fabricación de biosensores, bioseparadores, instrumentos cardiovasculares, dentales, oftalmológicos, ortopédicos, farmacéuticos, cajas para cultivo de tejidos, dispositivos biomédicos como equipo de inyección, bolsas para suero o sangre, mangueras o tubos flexibles, adhesivos, pinzas, cintas elásticas, hilos de sutura, vendas, etc.

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 a el 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 éstas 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 pretratamiento 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 establecido 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 éstas. Mediante plasma se pueden agregar nuevos grupos químicos en las superficies de los materiales poliméricos, compatibles con diversos tipos de células.

La tecnología de plasma nos permite transformar polímeros convencionales de bajo costo en polímeros con superficies especiales de alto valor agregado para aplicaciones específicas. En el presente trabajo se describen los principios del plasma. También se describe el uso de la tecnología de plasma aplicada a la modificación superficial de los polímeros y se presenta una revisión de los últimos trabajos publicados en el área, enfocándose principalmente a las aplicaciones médicas.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es introducir al lector en los conocimientos básicos del plasma, la modificación de superficies poliméricas mediante la tecnología del plasma y la importancia en las aplicaciones médicas de estos materiales modificados

I. PLASMA

1. 1 Generalidades

El plasma es mejor conocido como el cuarto estado de la materia y es un gas parcialmente ionizado compuesto de iones, electrones, átomos, moléculas y radiación electromagnética. [1] El requisito para que el gas pueda definirse como un "plasma" es que sus especies tengan una carga eléctricamente neutra, esto quiere decir que tengan una concentración de cargas positivas prácticamente igual a la de cargas negativas. [2] En la figura 1 se aprecian los diferentes estados de la materia. Los tres primeros corresponden a sólido, líquido y gas.[3] Para comprender de una forma más sencilla lo que es un plasma, pensemos en un trozo de hielo, si a éste le aplicamos energía en forma de calor pasaremos del estado sólido al estado líquido, si continuamos aplicando calor al líquido, tendremos el estado gaseoso, donde se puede observar que las moléculas tienen más libertad de movimiento y ya no se encuentran tan ordenadas como en el caso del estado sólido. Si a ese gas se le aplica más energía en forma de calor entonces tendremos el estado de plasma.

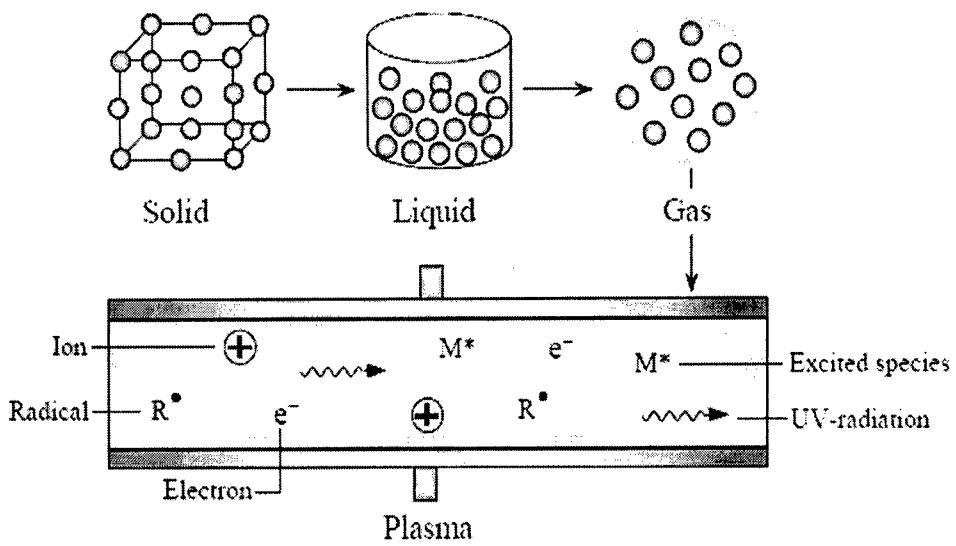


Figura 1. Diferentes estados de la materia [3]

Hay dos tipos de plasma uno de alta temperatura y otro de baja temperatura. El plasma de baja temperatura es un gas parcialmente ionizado, mientras que el plasma de alta temperatura es un gas con un porcentaje de ionización muy alto. Los plasmas de baja temperatura son utilizados para la modificación y limpieza de superficies, y son gases ionizados generados a presiones de entre 0.1 y 2 torrs.

Los plasmas fríos, también conocidos como descargas luminosas, son producidos en la materia con pequeñas cantidades de energía, los grados de ionización son pequeños (0.1- 0.005%) y los átomos, las moléculas cargadas, las especies neutras presentan energías bajas, mientras que los electrones tienen energías relativamente altas. Esas descargas eléctricas son plasmas en desequilibrio y debido a sus niveles de energía son capaces de modificar la materia orgánica, por ejemplo los polímeros. En este estudio nos enfocaremos únicamente a las aplicaciones del plasma frío y de aquí en adelante nos referiremos al plasma frío solamente como plasma. **[2]**

1. 2 Propiedades del plasma

Las energías características de los plasmas fríos son del orden de 3-4 eV (1 eV = 11600 K), lo que es equivalente a 34800 - 46400 K. **[4]** Sin embargo, debido a la baja capacidad calorífica de los electrones y a su masa tan pequeña, estas energías no incrementan significativamente las temperaturas de las superficies que confinan el plasma. Este tipo de plasmas están a temperatura ambiente, y por esta razón los polímeros pueden ser modificados superficialmente sin temor a ser degradados durante la modificación. Estos sistemas son caracterizados por la presencia simultánea de fotones, electrones, iones de polaridad positiva y negativa, especies neutrales, moléculas de gas y sus correspondientes especies excitadas. Los plasmas fríos pueden ser considerados como gases casi neutrales exhibiendo un comportamiento colectivo.

Los electrones juegan un papel primordial dentro del plasma, ya que ellos inician el proceso de ionización del gas. Cuando un campo eléctrico es aplicado en el sistema, los electrones se empiezan a mover rápidamente de un lado a otro y en este tiempo empiezan a colisionar con las moléculas de gas presentes en el sistema, debido a las colisiones las moléculas se ionizan.

La distribución de energía de los electrones de los plasmas puede ser descrita por la aproximación de Druvesteyn **[5]** y una curva típica de distribución de energías se muestra en la figura 2, se observa que sólo un pequeño número de electrones presentan energías relativamente altas (5-15eV), mientras que la mayoría de los electrones pertenecen al rango de electrones de baja energía (0.5-5 eV). En la Tabla 1, se presentan los potenciales de ionización para diferentes gases. Como el potencial de ionización de estos gases pertenece a la región de altas energías de la curva de distribución de electrones y en esta región existe un número de electrones limitado, por lo tanto los bajos grados de ionización obtenidos en los plasmas fríos son obvios. De aquí, se concluye, que los electrones en el plasma, poseen la energía suficiente para ionizar la mayoría de los gases.

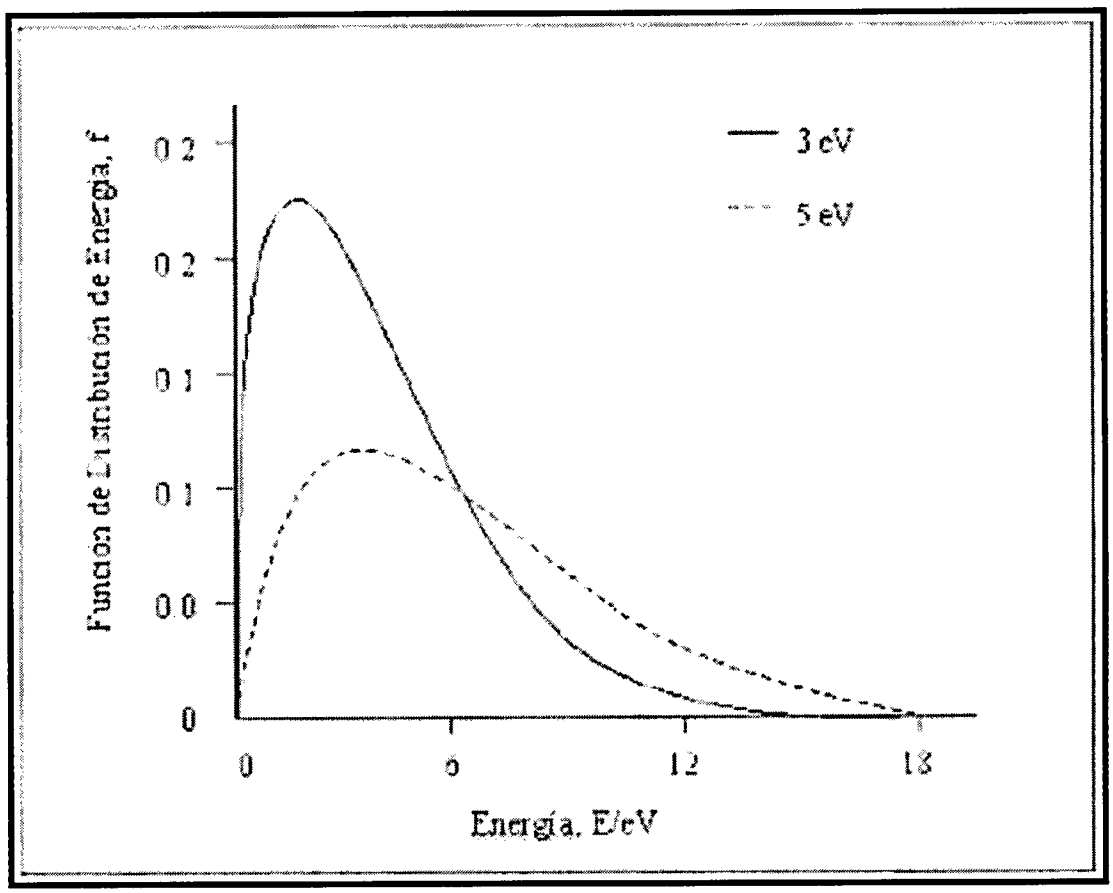


Figura 2. Distribución de energía de los electrones de plasmas de baja presión descrita por la aproximación de Druvesteyn **[5]**

Tabla 1. Potenciales de excitación (V*) y ionización (V_i) de varios átomos y moléculas **[6]**

Gas	V* (eV)	V_i (eV)	**Proceso de Ionización**
H_2	7	15.37	$H_2 \rightarrow H_2^+ + e^-$
		18	$H_2 \rightarrow H^+ + H + e^-$
		26	$\rightarrow H^+ + H +$ Energía Cinética $+ e^-$
		46	$\rightarrow H^+ + H^+ +$ Energía Cinética $+ e^-$
H		13.6	$H \rightarrow H^+$
N_2	6.3	15.57	$N_2 \rightarrow N_2^+ + e^-$
		24.5	$\rightarrow N^+ + N + e^-$
O_2	7.9	12.5	$O_2 \rightarrow O_2^+ + e^-$
		20	$\rightarrow O^+ + O + e^-$
Ar	11.7	15.7	$Ar \rightarrow Ar^+ + e^-$
He	21.2	24.5	$He \rightarrow He^+ + e^-$
CO	6.2	14.1	$CO \rightarrow CO^+ + e^-$
		22	$\rightarrow C^+ + O + e^-$
		24	$\rightarrow C + O^+ + e^-$
		44	$\rightarrow CO^+ + e^-$
CO_2	3.0	14	$CO_2 \rightarrow CO_2^+ + e^-$
		19.6	$\rightarrow CO + O^+ + e^-$
		20.4	$\rightarrow CO^+ + O + e^-$
		28.3	$\rightarrow C^+ + O + O + e^-$
NO	5.4	9.5	$NO \rightarrow NO^+ + e^-$
		21	$\rightarrow O^+ + N + e^-$
		22	$\rightarrow O + N^+ + e^-$
NO_2	—	11	$NO_2 \rightarrow NO_2^+ + e^-$
		17.7	$\rightarrow NO + O^+ + e^-$
N_2O	—	12.9	$N_2O \rightarrow N_2O^+ + e^-$
		16.3	$\rightarrow N_2 + O^+ + e^-$
		15.3	$\rightarrow NO^+ + N + e^-$
		21.4	$\rightarrow NO + N^+ + e^-$
H_2O	7.6	12.59	$H_2O \rightarrow H_2O^+ + e^-$
		17.3	$\rightarrow HO^+ + H + e^-$
		19.2	$\rightarrow H—OH^+ + e^-$

II. MODIFICACIÓN DE POLÍMEROS POR PLASMA

2.1 Modificación superficial de polímeros

Los polímeros en general tienen muy buenas propiedades físicas, químicas, mecánicas y presentan además bajo costo; por estas razones son empleados en un gran número de aplicaciones. Sin embargo los polímeros también tienen la desventaja de tener baja energía superficial, por lo cual propiedades tales como: adhesión, impresión, fricción, compatibilidad, biocompatibilidad, etc. son afectadas. Existen diferentes técnicas que nos permiten mejorar la energía superficial de los polímeros, entre las cuales podemos mencionar: limpieza de superficies con ácidos, tratamiento corona, tratamiento ultravioleta, tratamiento con flama, tratamiento por plasma, etc.

El tratamiento por plasma nos permite modificar las últimas capas superficiales de los polímeros sin afectar las propiedades en masa. Algunas otras ventajas que podemos mencionar son: que los tratamiento pueden ser por tiempos cortos, se puede modificar cualquier polímero, se pueden generar en la superficie una gran variedad de grupos químicos, dependiendo del gas utilizado; el proceso es relativamente limpio, no afecta al medio ambiente, se puede modificar piezas de geometría complicada. Entre las desventajas que podemos mencionar del método es que la inversión inicial del equipo es alta y se requiere uso continuo de equipo para alto vacío. En la figura 3 se aprecia un reactor de plasma para modificación de polímeros.

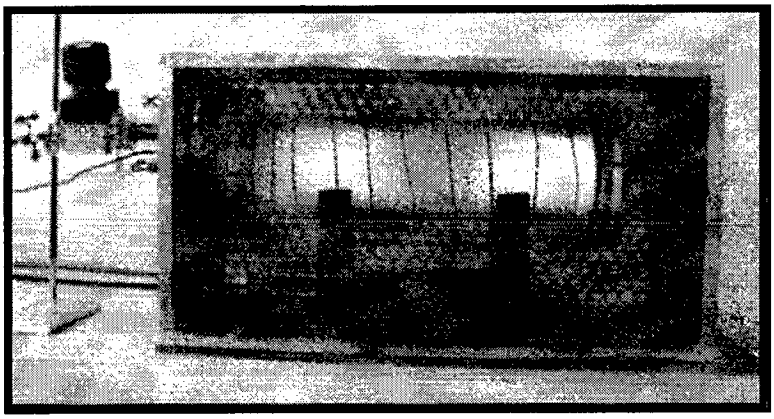


Figura 3. Modificación superficial de polímero mediante plasma

El plasma es capaz de producir radicales libres en la superficie polimérica ya que el contenido energético de las especies que conforman el plasma es mayor que las energías de disociación que conforman las superficies poliméricas como se puede apreciar en la Tabla 2.

En el proceso de la modificación superficial, una descarga de plasma es creada por evacuación con una cámara de reacción y relleno con un gas de baja presión. El gas es entonces energizado por uno de los siguientes tipos de energía: radiofrecuencia, microondas, o por una corriente alterna o directa. Las especies reactivas que conforman el plasma son iones, electrones, radicales, metaestables y radiación de ultravioleta. Las superficies a modificar se ponen en contacto con el gas plasma, así estas son bombardeadas por dichas especies reactivas y su energía es transferida del plasma al sólido. En la figura 4, se ilustra como los diferentes componentes del plasma interactúan con una superficie polimérica.

Tabla 2. Energías de disociación para las moléculas diatómicas y poliatómicas que caen dentro del rango de energías de las especies del plasma de 0-20 eV [7]

Energías de Disociación			
Moléculas Diatómicas	Energía (eV)	Moléculas Poliatómicas	Energía (eV)
C-H	5.3	$CH_2=CH_2$	7.6
C-N	7.8	CH≡CH	10.0
C-Cl	4.0	CH_3-H	4.5
C-F	5.7	C_2H_5-H	4.3
C=O	11.2	CH_2CH-H	4.8
C-C	6.3	CHC-H	5.7
C-Si	4.6	CH_3-CH_3	3.9
C-O	11.16	$CF_2=CF_2$	3.3
O-Si	8.3	CH_3-CN	5.3
O-Sn	5.5	CN-CN	5.6
Sn-Sn	1.93	$C_6H_5CH_2$-$NHCH_3$	3.0
Si-Si	3.4	CO-$Fe(CO)_4$	1.8
N-N	9.8	HO_2-$OCH_2C(CH_3)_3$	2.0
Cl-Cl	2.5		
F-F	1.6		
Al-Al	1.4		

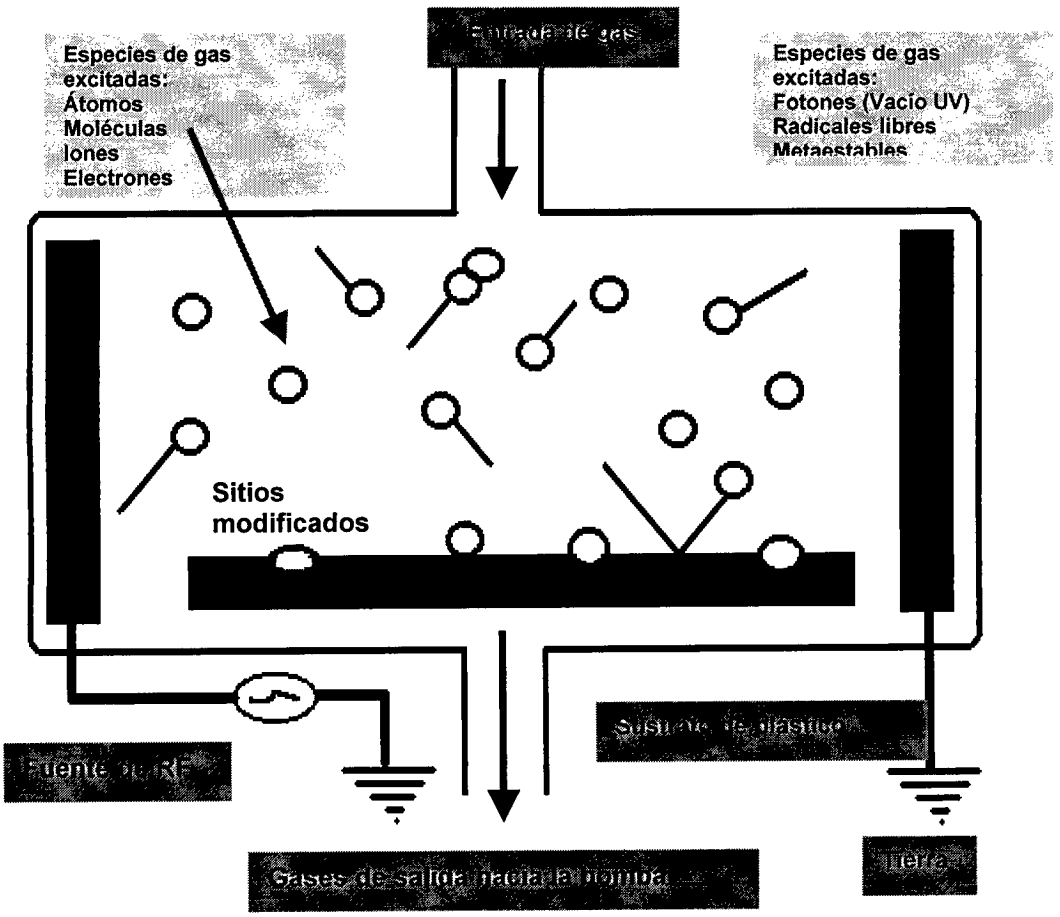


Figura 4. Interacción entre los componentes del plasma y un polímero

2. 2 Reacciones químicas que ocurren durante el tratamiento con plasma

Durante el procesamiento con plasma una serie de reacciones químicas pueden ocurrir simultáneamente en la superficie del polímero:

1) Limpieza de superficies: remoción de contaminantes adheridos a la superficie, tales como: aceites, grasas, hidrocarburos de bajo peso molecular.
2) Erosión de las capas superficiales de polímero.
3) Formación de radicales libres y creación de nuevos grupos químicos.
4) Entrecruzamiento.

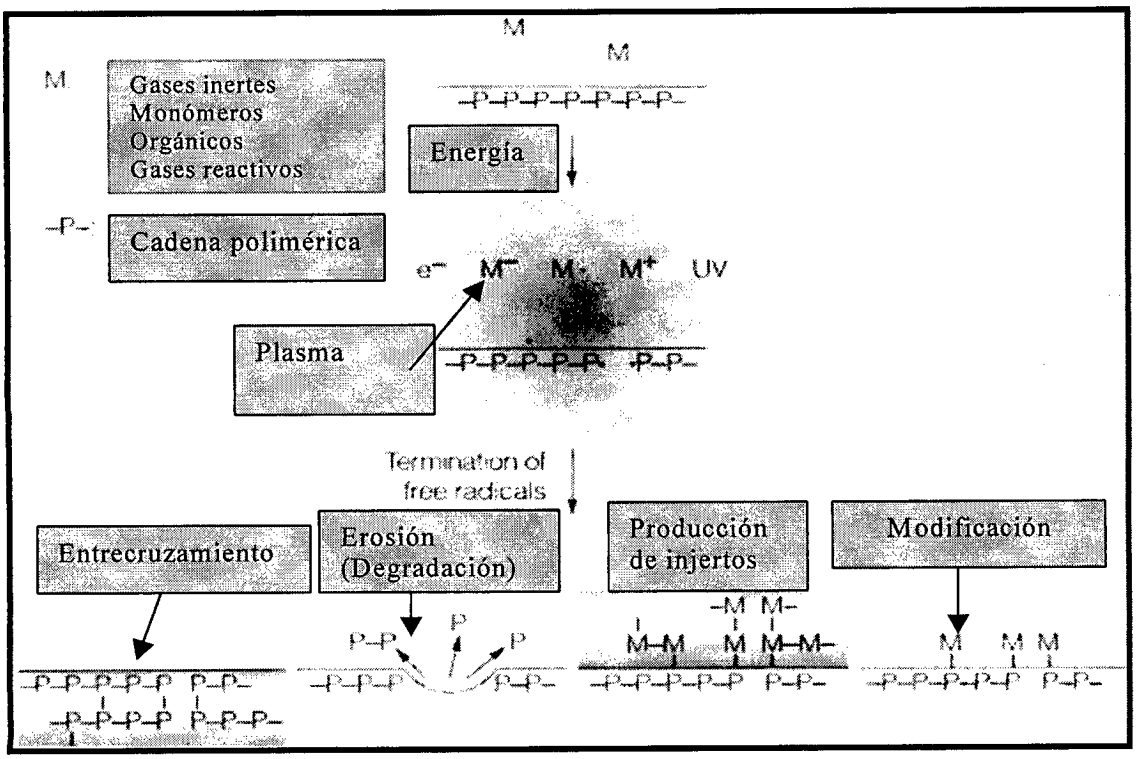


Figura 5. Reacciones que ocurren cuando una superficie de polímero es expuesta a un plasma [2]

2. 2. 1 Limpieza de superficies

En muchos procesos científicos e industriales, es crucial una limpieza extrema de las superficies. El plasma puede remover materiales indeseables de las superficie mediante el bombardeo de iones y radiación ultravioleta. Por ejemplo, la superficie de polietileno es típicamente contaminada con moléculas de bajo peso molecular como ceras, oligomeros de etileno, o monómeros. Estos contaminantes deben ser removidos de la superficie antes de aplicar el tinte de impresión. Durante el tratamientos por plasma los fragmentos mencionados son degradados rápidamente y convertidos en compuestos volátiles que son removidos con la ayuda de vacío. Por lo tanto la estructura base queda esencialmente intacta y con una mínima erosión. [8]

2.2.2 Erosión

Para obtener superficies poliméricas altamente adherentes con frecuencia es necesario la erosión, que consiste en remover las últimas capas superficiales del polímero. El plasma puede producir una superficie con topografía rugosa, la cual contribuye a mejorar las propiedades superficiales. Esto se puede alcanzar mediante la apertura de microporos o mediante la remoción de contaminantes que rodean la porosidad. En la figura 6A se observa la morfología de la superficie de una muestra de PET sin modificación superficial, mientras en la Figura 6B, se observa la superficie del PET después de haber sido expuesto a un plasma de argón durante 5 minutos. Se observa que el PET sin tratar presenta una morfología muy lisa (figura 6A), mientras que el PET tratado tiene una superficie montañosa (figura 6B).

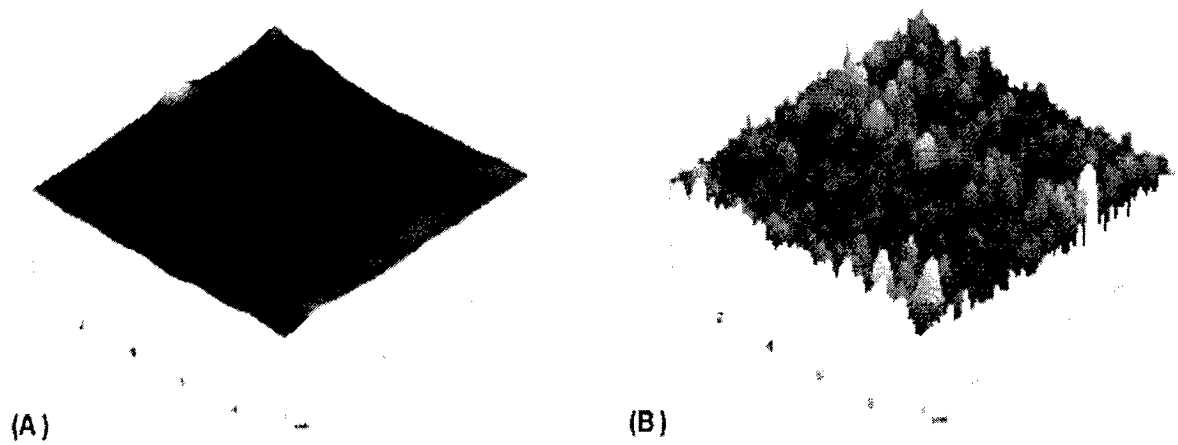


Figura 6. Micrografías de AFM de A) PET sin tratar, B) PET tratado en un plasma de Argón. [9]

Durante el tratamiento con plasma, las cadenas de polímeros experimentan ruptura y se forman productos de bajo peso molecular, los cuales son removidos de la superficie por el sistema de bombeo. Los polímeros experimentaran diferentes velocidades de erosión dependiendo de la estructura química del polímero, el peso molecular, el tipo de gas utilizado, la potencia del plasma, la presión del gas, el tiempo de exposición, etc. Los gases comúnmente utilizados son oxígeno, tretrafloruro de carbono y mezclas de éstos o mezclas con gases nobles (argón, helio).

2. 2. 3 Modificación superficial

La modificación superficial es la alteración de las características superficiales por la sustitución o adición de nuevos grupos químicos que provienen del plasma por grupos normalmente presentes en el polímero base. Por ejemplo, grupos tales como hidroxilo y ácido carboxílico pueden ser injertados en polietileno para hacer la superficie más hidrofílica. Los grupos amida y amina pueden ser injertados en la superficie de polietileno, haciendo la superficie más receptiva a ciertas tintas de impresión. Los gases más empleados para la modificación de polímeros son oxígeno, nitrógeno, helio, argón, tretrafloruro de carbono, dióxido de carbono, aire, amoniaco, etc. también se emplean mezclas de los gases mencionados. El mecanismo de activación se lleva a cabo mediante la creación de radicales libres en la superficie del polímero y por la subsecuente reacción química de esos radicales libres con especies activas del plasma. Dependiendo del gas de proceso, una gran variedad de grupos químicos puede ser incorporada en la superficie.

Para entender mejor la complejidad de los procesos químicos involucrados, se puede considerar el caso de un plasma de oxígeno. El siguiente esquema de reacción es el patrón lógico que se sigue para producir grupos oxigenados injertados en una superficie polimérica. Primero, el hidrógeno es removido de la cadena polimérica R, por oxígeno atómico presente en el plasma dejando el polímero con un radical libre.
Luego, el oxígeno molecular que esta dentro del plasma puede reaccionar con el radical libre creando un radical peroxilo.

$$RH + O\bullet \rightarrow R\bullet + \bullet OH$$

$$R\bullet + O_2 \rightarrow RO_2^{\cdot}$$

Posteriormente el radical peroxilo puede abstraer un hidrógeno a una cadena de polímero vecina y de esta forma se produce un grupo de ácido carboxílico o un ester en la superficie polimérica.

$$RO_2\bullet + R'H \rightarrow RO_2H \text{ (ácido carboxílico)} + R'\bullet$$

$$RO_2\bullet + R'\bullet \rightarrow RO_2R' \text{ (ester)}$$

Los productos secundarios son generalmente: dióxido de carbono, agua e hidrocarburos de bajo peso molecular y son regularmente removidos por un sistema de bombeo. En la figura 7 se ilustran los diferentes grupos químicos generados en la superficie cuando se utiliza un plasma de argón o un plasma de nitrógeno .

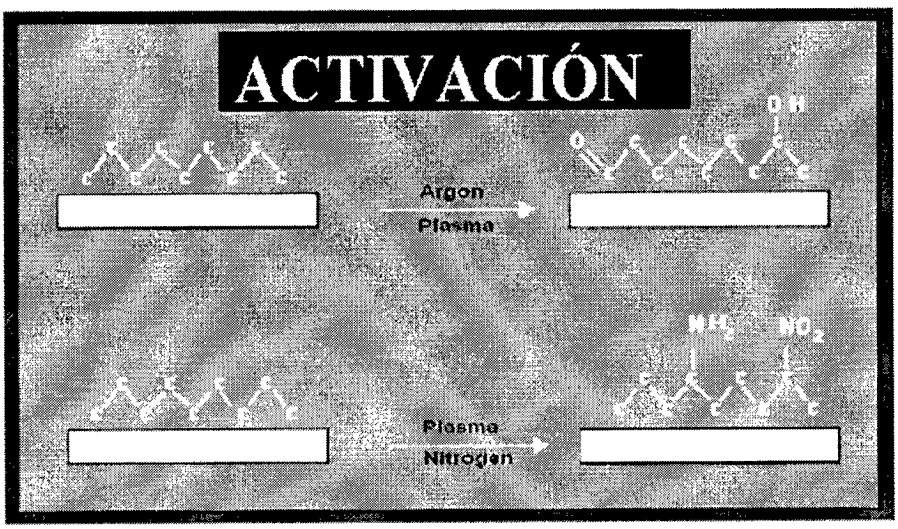


Figura 7. Modificación superficial de polímeros en plasma de argón y plasma de nitrógeno [10]

2. 2. 4 Entrecruzamiento de la superficie

El entrecruzamiento empieza con la formación de macroradicales libres en la cadena polimérica; si los macroradicales reaccionan entre si entonces el entrecruzamiento se ve beneficiado. Se ha reportado que los gases inertes, tales como argón o helio favorecen el entrecruzamiento. El entrecruzamiento incrementa la densidad en la superficie del polímero y algunas propiedades superficiales tales como resistencia química. En la figura 8 se representa el entrecruzamiento de polietileno expuesto a un plasma de oxígeno.

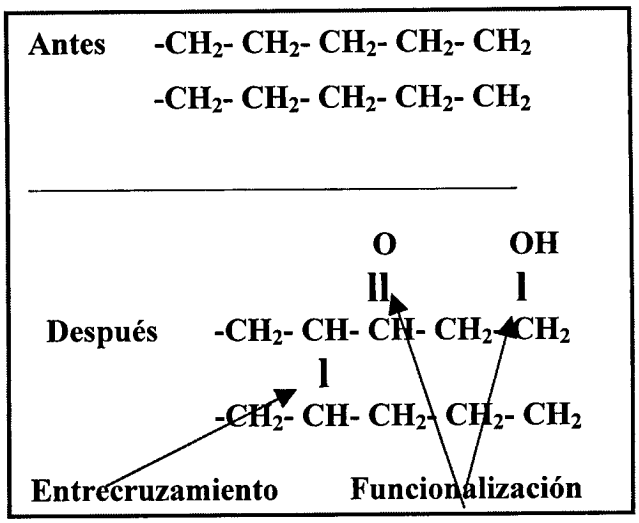


Figura 8. Entrecruzamiento de polietileno expuesto a un plasma de oxígeno.

2. 3 Equipo de plasma

Los principales componentes del reactor de plasma son: (1) cámara, (2) sistema de bombeo para alto vacío, (3) generador de potencia. Otros componentes secundarios pueden incluir trampas de nitrógeno líquido, medidores de presión y válvula de control de flujo de gases. Además diversos equipos de diagnóstico de plasma pueden ser acoplados a la cámara de vacío: espectrómetro de masas, sonda de Langmuir, reflectómetro. En la figura 9 se presenta la fotografía de un reactor de plasma, utilizado para el tratamiento superficial polímeros.

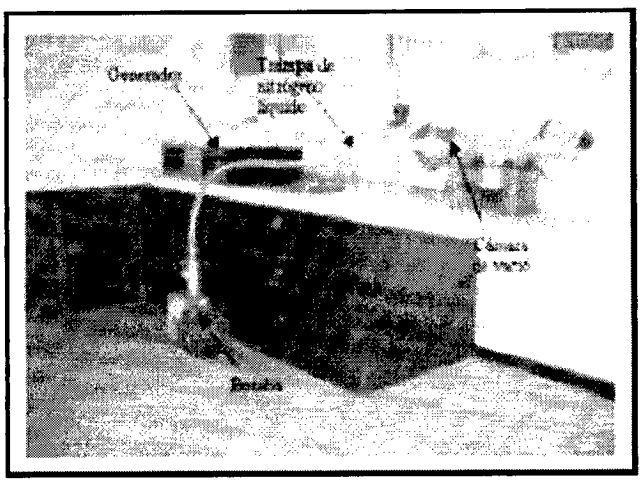


Figura 9. Reactor de plasma.

2. 3. 1 Cámaras

La cámara es donde se lleva a cabo el proceso de modificación superficial. La cámaras de vacío pueden ser de diversos materiales entre los cuales podemos mencionar vidrio, cuarzo, acero inoxidable, aluminio y zinc. El tamaño de las mismas varía dependiendo del tamaño de las piezas a tratar. Por ejemplo, hay cámaras cilíndricas de 4 litros para tratar piezas muy pequeñas o también existen cámaras más grandes para tratar piezas automotrices. El material de la cámara debe soportar presiones de alto vacío.

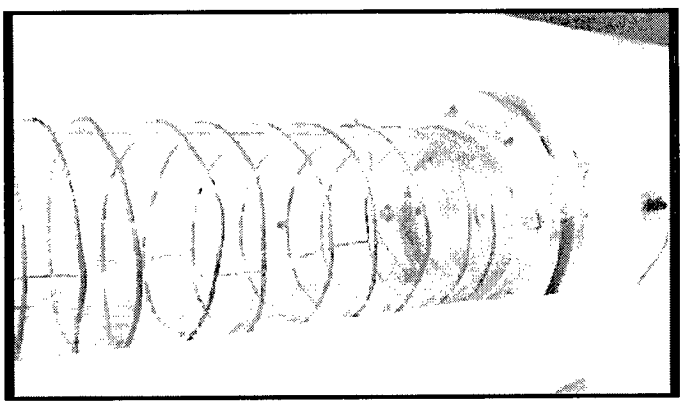


Figura 10. Cámara de vacío

2. 3. 2 Bombas

Las bombas utilizadas pueden ser bombas mecánicas que producen vacíos de alrededor de 1.33 Pa. También se puede utilizar bombas turbo moleculares las cuales producen vacíos mucho mayores de alrededor 1.33 x 10^{-6} Pa siendo éstas mucho más eficientes que las primeras pero con la desventaja de que tienen costos más altos. Se puede utilizar una bomba mecánica en conjunto con una turbo molecular, esto permite optimizar el proceso de evacuación de las cámaras donde se llevan a cabo las reacciones de plasma.

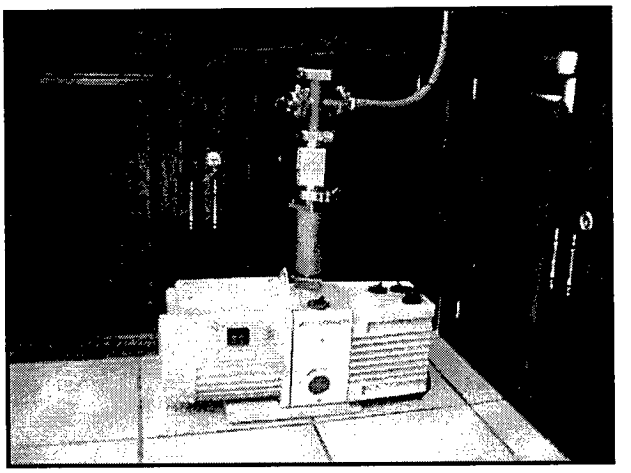


Figura 11.- Bombas

2. 3. 3 Generadores

El generador es la parte principal de un reactor de plasma, es el que le proporciona la energía necesaria para el que gas pueda ser transformado en plasma. Existen dos tipos principales de generadores: generadores de radiofrecuencia y generadores de microondas. 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. En la actualidad se están utilizando ampliamente los generadores denominados generadores de pulsos. Este tipo de generadores tienen la particularidad de prenderse y apagarse en períodos de milisegundos. Además se ha encontrado que con este tipo de generadores se producen modificaciones más estables y con mejor control químico.

También existen los generadores llamados "generadores de microondas", este tipo de sistema produce energías mucho más altas que las producidas por los generadores de radiofrecuencia, y se utilizan para la modificación superficial de materiales que requieren mayores niveles de energía tales como metales o cerámicos. Los sistemas de plasma de microondas también son utilizados para la depositación de polímeros por plasma.

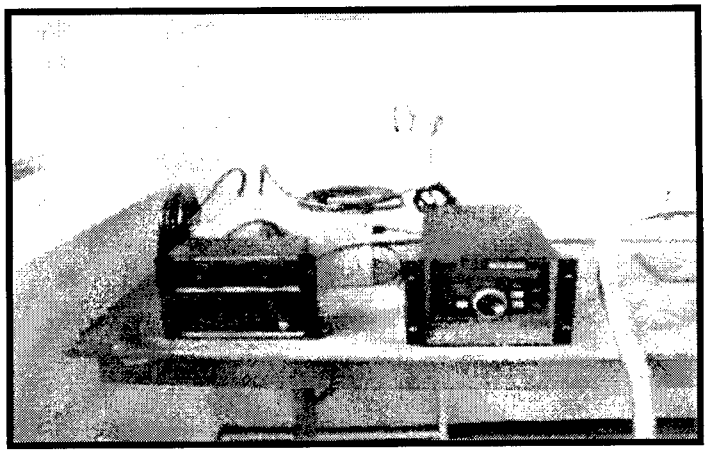


Figura 12. Generador de plasma de radiofrecuencia

Los reactores más ampliamente utilizados pueden ser divididos en tres clases:

a) Reactor de electrodos internos, b) reactor de electrodos externos, c) reactor sin electrodos que puede ser de microondas o alta frecuencia.

2. 3. 3.1 Reactores con electrodos internos

El generador esta conectado a la cámara de vacío mediante electrodos, los electrodos son de diferentes diseños, y tienen diferentes nombres, por ejemplo de platos paralelos, de diodos etc., sus principales características son el suministro de potencia, el sistema de acoplamiento, la cámara de vacío, el electrodo aterrizado y el porta muestras. El suministro de potencia de radiofrecuencia esta acoplado al sistema por medio de un capacitor (acoplamiento capacitivo) o acoplamiento directo. En el primer caso el potencial del electrodo de referencia oscila alrededor del potencial del cátodo el cual puede ser muy negativo. Con este sistema debe tenerse cuidado con las condiciones de trabajo y la geometría del equipo, ya que ellos pueden influenciar significativamente el bombardeo de iones hacia el polímero, así como a la distribución de energía de los electrones y la producción de especies activas del plasma. Entre los arreglos de electrodos internos el reactor tipo cilindro, con electrodos metálicos de platos paralelos es el más frecuentemente utilizado. Las cámaras de vacío pueden ser hechas ya sea de vidrio o materiales conductores, tales como el metal. El diseño y arreglo del cátodo

requiere de especial atención: una protección metálica alrededor del electrodo mejora grandemente el confinamiento de la descarga dentro del espacio entre electrodos; el material de los electrodos y el área afectan de manera importante el nivel de modificación química impartida a los polímeros.

2. 3. 3. 2 Reactor con electrodos externos

Los reactores de electrodos externos pueden ser acoplados de forma inductiva o capacitiva; la potencia es transmitida desde un suministro de potencia al gas por un capacitor y un alambre enrollado alrededor del reactor. Reactores tubulares aislados son generalmente utilizados (pueden ser de vidrio o de cuarzo o alúmina). Los reactores tubulares acoplados inductivamente, cuando son operados a baja presión (presión << 133 Pa), no son uniformemente acoplados al suministro de potencia; sin embargo la uniformidad del acoplamiento se incrementa con la presión de trabajo.

Muchos arreglos experimentales han sido reportados; cada uno difiere básicamente en las potencias suministradas, la geometría del reactor y la posición de la muestra. Las frecuencias de trabajo más comúnmente utilizadas varían de 13.56 a 35 MHz. **[11]** Las posiciones de la muestra o el flujo de gas pueden variar para obtener deferentes posiciones de polímero y diferentes propiedades.

2. 3. 3. 3 Reactores sin electrodos

El nombre de estos reactores implica que no habrá impurezas de los electrodos que se incorporen a las películas producidas o modificadas por plasma. En este tipo de reactores la potencia es generada por energía de microondas y son generalmente fabricados de tubos pirex y las potencias típicamente suministradas son del orden de 2.45 GHz. El plasma es generado en la cavidad resonante y el polímero es generalmente modificado fuera de la región del plasma. Algunos investigadores no modifican los polímeros en la región de la descarga más bien introducen un gas acarreador y el sustrato (polímero) puede ser colocado lejos de la entrada de gas.

III. APLICACIONES GENERALES DEL PLASMA

La Tecnología del Plasma ofrece muchas posibilidades para modificar superficies. Debido a esto se encuentra en un gran número de aplicaciones, siendo la industria electrónica una de las grandes áreas de aplicación. El plasma se utiliza en la fabricación de circuitos electrónicos, semiconductores, microchips. En la figura 13 se observan las diferentes aplicaciones del plasma en diferentes áreas.

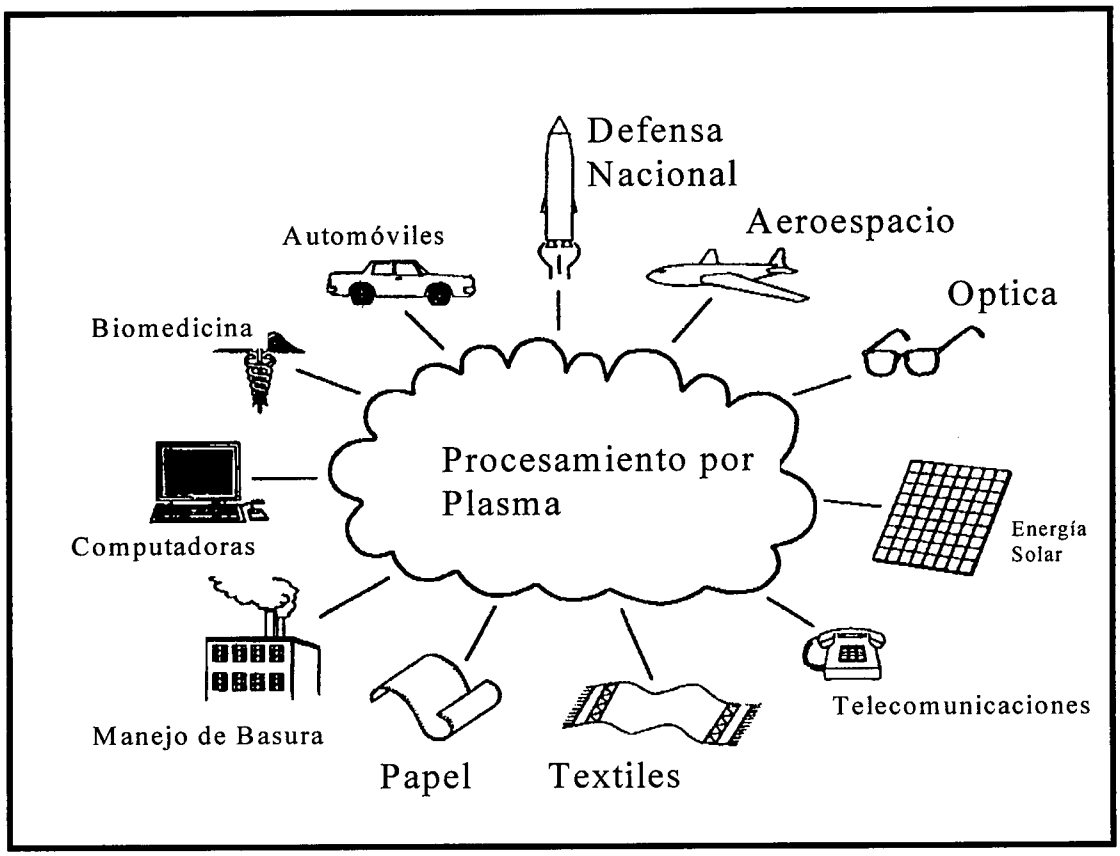


Figura 13. Aplicaciones del plasma en diferentes áreas

Tabla 3. Propiedades superficiales que mejoran por el tratamiento con plasma [2]

- Promoción de la Adhesión.
- Aumento de la humectabilidad y modificación de la superficie.
- Aumento en la energía superficial.
- Mejoramiento de la Biocompatibilidad.
- Funcionalización de la superficie.
- Reducción de la fricción .
- Inmovilización molecular.

3. 1 Limpieza de superficies

El tratamiento plasma con oxígeno es una alternativa muy aceptable desde el punto de vista ambiental. Una gran variedad de industrias utilizan el tratamiento por plasma para remover contaminantes orgánicos de materiales que requieren limpieza extrema. Las especies activas del plasma de oxígeno combinadas con la energía UV reaccionan con los contaminantes superficiales, produciendo como resultando su volatilización y remoción de la cámara de reacción.

3. 2 Adhesión

La mejora de la adhesión entre dos superficies es una aplicación común del plasma. Una buena adhesión requiere de fuerzas interfaciales grandes vía compatibilidad química y/o enlace químico. El tratamiento de superficies por plasma puede generar grupos funcionales químicamente activos, tales como amina, carbonilo, hidroxilo y grupos carboxílicos, los cuales mejoran la adhesión interfacial.

3. 3 Control de la energía superficial

El plasma también es utilizado para controlar la energía superficial. Se pueden obtener superficies poliméricas hidrofílicas o hidrofóbicas dependiendo del gas utilizado, si se usa oxígeno se generaran grupos hidroxilo en la superficie y se tendrá una superficie más hidrofílica. Los polímeros generalmente presentan baja energía superficial y un tratamiento con plasma puede incrementar su energía superficial hasta tres veces su valor original.

Este proceso ha sido empleado para optimizar las propiedades superficiales de catéteres, modificando superficialmente las paredes del catéter. De igual manera las superficies poliméricas pueden ser tratadas para mejorar el enlace de proteínas y mejorar la compatibilidad con sangre. Aplicaciones comunes son: el tratamiento de cajas para el cultivo de tejidos, medios de filtración y lentes de contacto.

3. 4 Mejora de biocompatibilidad

Las características más importantes que deben cumplir los biomateriales, en las numerosas áreas de aplicación, son biofuncionalidad y biocompatibilidad. En la mayoría de los casos la funcionalidad se cubre satisfactoriamente con las características mecánicas de los materiales habitualmente utilizados. Sin embargo, éstos productos deben retener sus funciones en ambientes agresivos durante el período de tiempo que uno desea. Esto se logra únicamente cuando el material es biocompatible.

La biocompatibilidad se define más exactamente como la capacidad que tiene un material de desarrollar, en condiciones óptimas, la función interna para la cual se ha diseñado sin provocar una respuesta negativa en el organismo. **[12]**

Los biomateriales que entran en contacto con sangre o proteínas requieren de tratamientos superficiales especiales para incrementar la biocompatibilidad. Los polímeros en general presentan baja biocompatibilidad, pero con la aplicación de una modificación química superficial mediante plasma, la biocompatibilidad se puede incrementar de forma importante.

Por ejemplo, los grupos funcionales amina, que pueden ser generados en la superficie mediante tratamiento con plasma de amonio actúan como enlaces para anticoagulantes tales como heparina y disminuyen los efectos trombogénicos.

Cuando un material polimérico entra en contacto con las células de un sistema biológico, las proteínas son el primer material que va y se deposita sobre el implante, es decir se forma una interfase entre el implante y el medio biológico, donde las proteínas serán la parte mediadora entre el polímero y las células que forman parte del medio biológico, esto debido a la afinidad de los compuestos generados en la superficie con las estructuras químicas que componen a las proteínas. En la figura 14 se puede observar lo mencionado.

Los materiales poliméricos que sirven como implantes pueden ser activados superficialmente mediante plasmas para permitir la inmovilización celular de péptidos (fibronectina y laminina) derivados de las proteínas de la matriz extracelular. Los péptidos injertados en la superficie polimérica pueden promover una cobertura completa de la superficie con una monocapa de células endoteliales y así formar una superficie natural compatible con sangre. Así, estos bioimplantes pueden mejorar la biocompatibilidad y reducir la antigénesis y la trombogénesis. La trombogénesis es el proceso de coagulación de la sangre, los coágulos formados pueden obstruir el paso de la sangre y causar hasta la muerte. Si el polímero no es compatible se pueden formar dichos coágulos.

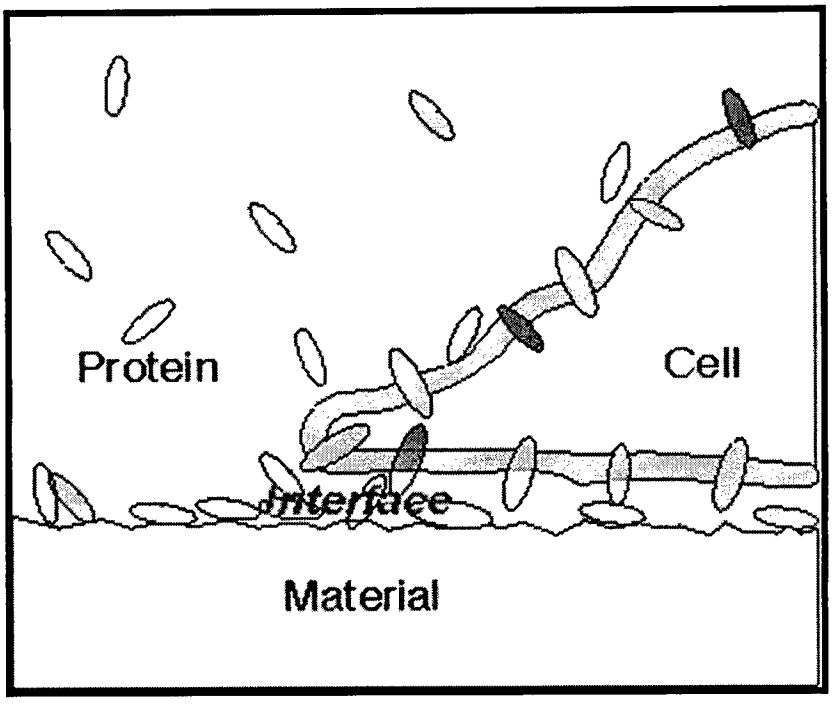


Figura 14. Las proteínas sirven como enlace entre las células y el material polimérico [13]

Mediante el tratamiento de superficies por plasma se puede insertar grupos químicos tales como aldehídos o cetonas, estos pueden interaccionar químicamente con proteínas de un medio biológico, como se observa en la figura inferior. Estas proteínas enlazadas químicamente a la superficie del polímero permitirán que se incremente la biocompatibilidad del polímero con el resto de los componentes del medio biológico. **[13]**

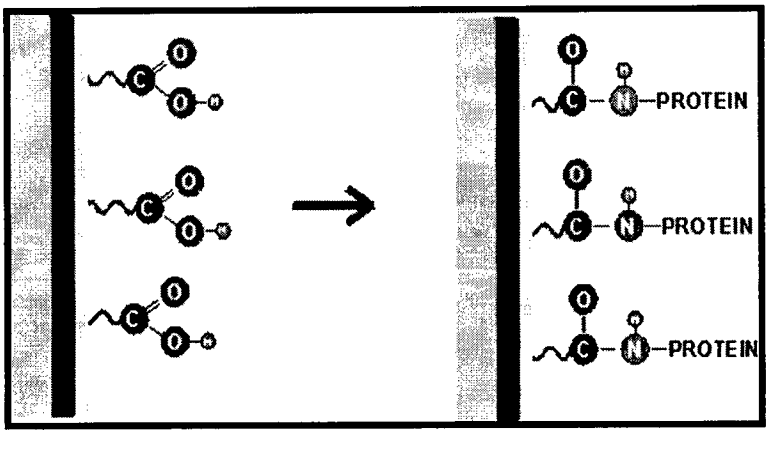


Figura 15. Interacción de especies modificadas en la superficie de polímero con especies superficiales de proteínas

Las aplicaciones comunes del plasma, incluyen el pretratamiento de artículos médicos tales como catéteres, artículos cardiovasculares, componentes de jeringas, partes de bombas para diálisis y bolsas plásticas para el almacenamiento de sueros.

3. 5 Entrecruzamiento

El entrecruzamiento de superficies es utilizado con frecuencia para incrementar la funcionalidad de los polímeros. Como resultado del entrecruzamiento se obtiene un incremento en la dureza, así como en la resistencia química del material tratado. Por ejemplo; componentes del hule de silicón tratados en plasma de gas inerte pueden ser modificados para formar un recubrimiento duro en la superficie. El resultado es una disminución substancial en el coeficiente de fricción. Con este método se pueden entrecruzar las superficies de botellas de PET, el PET tiene alta permeabilidad a gases, lo cual es una desventaja. Un tratamiento superficial de las botellas de PET utilizando plasmas de argón o helio provoca que la superficie se entrecruce y se disminuya enormemente la permeabilidad a gases indeseables, tales como el oxígeno.

IV. TECNICAS DE CARACTERIZACION

Las técnicas de caracterización generalmente utilizadas para caracterizar polímeros no son adecuadas para el análisis de las superficies modificadas por plasma, ya que las técnicas comunes de análisis de polímeros generalmente caracterizan la masa del material y no la superficie. A continuación se describen algunas de las técnicas de caracterización empleadas para analizar las superficies de polímero modificadas por plasma.

4. 1 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

La técnica XPS se basa en el análisis de energía de los electrones que emite un sólido cuando es irradiado con rayos X. Esta es una técnica de análisis superficial la cual nos proporciona información elemental cuantificable con una sensibilidad de hasta 10 nm. **[14]** El haz de rayos X es con lo que se excitan electrones de la superficie lo que permite conocer con precisión la naturaleza química de los átomos de la superficie ya que la energía de los fotoelectrones depende directamente de la configuración energética de los átomos de los que provienen. Esta técnica, prácticamente no causa daños en la superficie y puede usarse en materiales delicados. El análisis es superficial ya que solamente los fotoelectrones localizados en la superficie pueden escapar y ser analizados, esto debido a que los fotoelectrones localizados a mayor profundidad experimentan colisiones con moléculas y átomos del material y pierden energía quedando atrapados dentro del material. En la figura 16 se presenta el proceso de XPS .

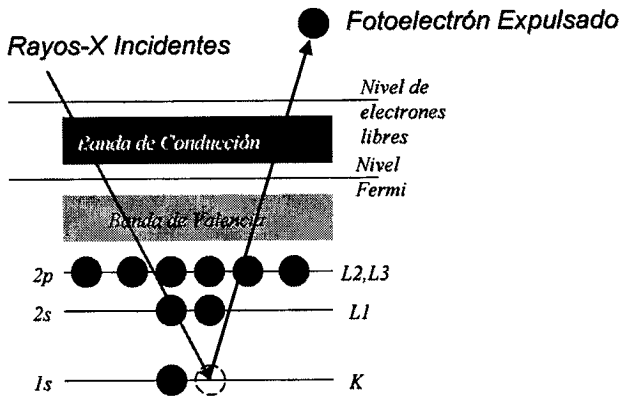


Figura 16. Proceso de XPS

La superficie es irradiada mediante rayos X, los cuales producen la foto-emisión de electrones (Figura 16). Los electrones tienen energía cinética la cual es igual a la energía de radiación de excitación (energía proporcionada por los rayos X) y la energía del enlace del electrón en el átomo según lo demuestra la siguiente ecuación: **[15]**

$$K.E. = h\nu - B.E. - \phi$$

Donde:

K.E.= energía cinética del fotoelectrón

$h\nu$= energía del fotón de rayos X

En la Figura 17 se presenta un espectro XPS de PS tratado durante 15 s en un plasma de argón, se pueden apreciar los picos correspondientes a carbón (C 1s), nitrógeno (N 1s) y oxígeno (O 1s).

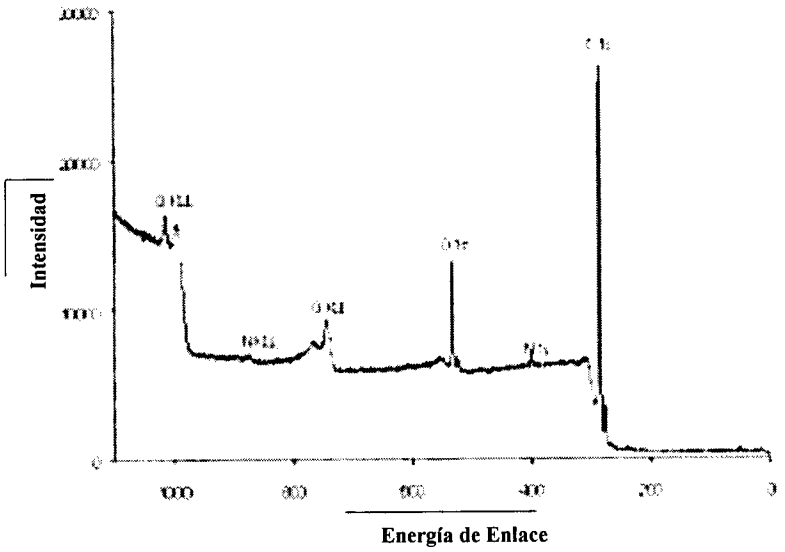


Figura 17. Espectro XPS de PS tratado durante 15 s en un plasma de argón [16]

4. 2 Análisis de infrarrojo (IR)

Esta es una técnica analítica complementaria que nos permite la identificación de los grupos funcionales de una muestra. Las mayoría de los compuestos químicos absorben energía electromagnética en la región infrarroja del espectro. La radiación infrarroja no tiene suficiente energía para ocasionar la excitación de los electrones, pero da lugar a que los átomos y grupos de los compuestos orgánicos vibren alrededor de los enlaces covalentes que los unen.

En el caso de análisis de superficies es necesario utilizar el análisis infrarrojo en la modalidad de ATR (reflectancia total atenuada), ya que el análisis de infrarrojo normal nos proporciona información de la masa, pero la modalidad de ATR nos proporciona información química de la superficie.

Cada compuesto químico tiene asociado un espectro infrarrojo característico, donde los máximos de absorción corresponden a determinadas energías de vibración (tensión, flexión, etc.) de los enlaces químicos presentes. Por tanto, esta técnica permite detectar la presencia de

diferentes grupos químicos en el material analizado. Por último, es posible cuantificar el número de enlaces presentes en la muestra analizada, conociendo previamente la absortividad asociada al tipo de enlace correspondiente. **[17]**

4. 3 Medición del ángulo de contacto

La medición de ángulos de contacto es un método fiable para caracterizar la interacción entre un líquido y una superficie y nos proporciona además información indirecta de la energía superficial. Esta técnica es muy utilizada para medir el grado de hidrofilicidad (atracción hacia el agua) o hidrofobicidad (rechazo hacia el agua) de una superficie polimérica modificada por plasma. **[18]** En la figura 18 se presenta un equipo simple que nos permite medir ángulos de contacto.

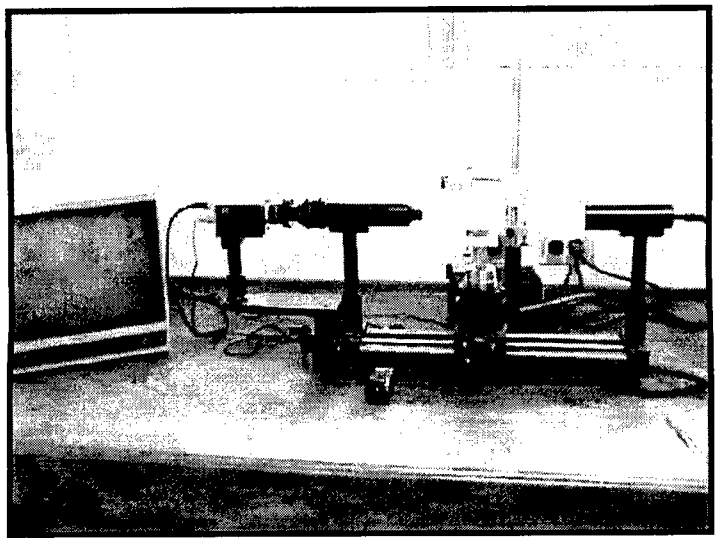


Figura 18. Goniómetro Rame Hart para medir ángulos de contacto

En la figura 19 se aprecia una gota de agua sobre la superficie de Poliestireno que ha sido modificado por un plasma de oxígeno, el plasma le induce un ángulo de contacto muy pequeño a la superficie del polímero.

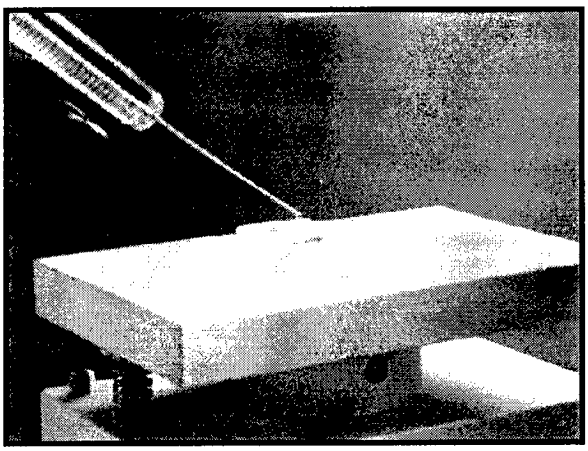


Figura 19. Colocación de una gota de agua sobre una película de Poliestireno que ha sido modificado por un plasma de aire

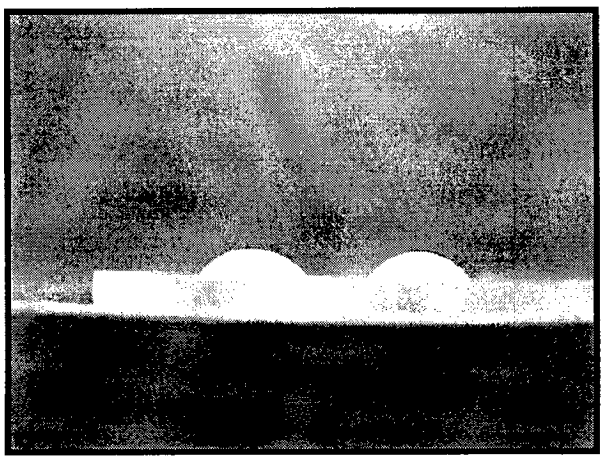


Figura 20. Gotas de agua sobre poliestireno modificado por un tiempo de 5 min. a 50 W por plasma de aire

4. 4 Espectroscopía de masas de ión secundario (SIMS)

El análisis por SIMS consiste en el estudio de la masa de los iones secundarios expulsados de la superficie por una interacción con iones primarios que tienen una mayor energía, estos chocan contra la superficie de la muestra liberando iones secundarios y estos son analizados por espectroscopía de masas. El bombardeo de iones primarios produce la fragmentación y

expulsión de los electrones cuando estos chocan contra la superficie. La mayoría de los fragmentos expulsados de la superficie serán neutros, sin embargo, el 1 % aproximadamente será ionizado. **[15]** En la figura 21 se aprecia el proceso de SIMS de liberación de iones de la superficie de un polímero.

Los fragmentos ionizados se miden directamente con un espectrómetro de masas. Por esta técnica se obtiene mucha información acerca de la estructura química de la superficie. A diferencia de otras técnicas se puede detectar hidrógeno y hace además la distinción entre diferentes tipos de isótopos. La técnica tiene una buena resolución y proporciona excelente información sobre el perfil de concentraciones en función de la profundidad. **[19]**

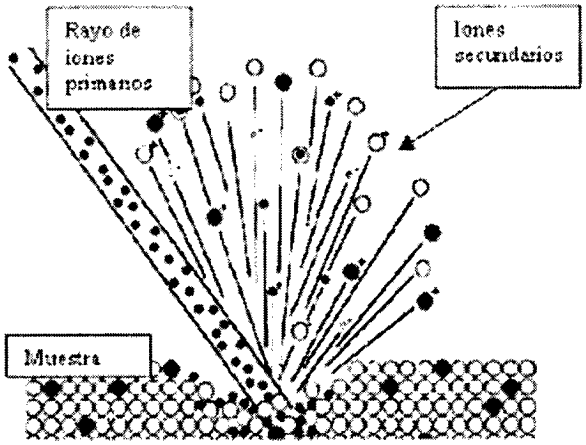


Figura 21. Proceso de SIMS de liberación de iones de la superficie de un polímero

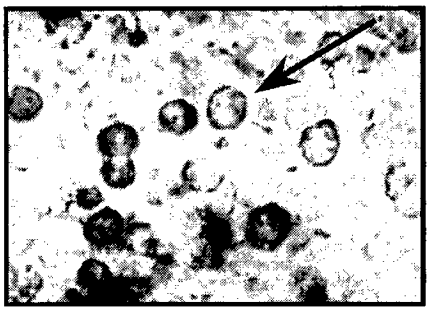
El instrumento de SIMS típicamente utiliza una fuente líquida de iones metálicos para bombardear la superficie polimérica, usualmente es de Galio o Cesio. Con la aplicación de un alto voltaje se producen los iones primarios y con el uso de lentes electroestáticos se pueden enfocar estos iones a un punto fino de la muestra. Los resultados obtenidos con la técnica de SIMS se complementan con los resultados obtenidos por la técnica de XPS, los polímeros tratados por plasma generalmente son analizados por ambas técnicas. **[15]**

4. 5 Microscopía óptica (MOP)

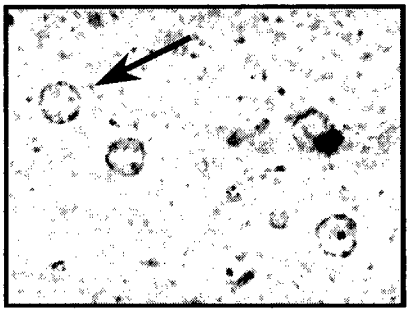
Un microscopio simple (de un lente o varios lentes), es un instrumento que amplifica una imagen y permite la observación detallada de un material determinado. El microscopio aumenta la imagen hasta el nivel de la retina, para captar la información. La resolución depende de la longitud de onda de la fuente luminosa, el espesor del especímen, la calidad de la fijación y la intensidad de la coloración. **[20]**

Otra es la técnica de campo oscuro donde la iluminación es oblicua sobre la muestra que forma una imagen brillante sobre un fondo oscuro y por último la técnica de contraste de fase que permite observar muestras sin colorear y resulta especialmente útil para células vivas. Esta técnica es muy empleada en el análisis de superficies modificadas por plasma, ya que nos proporciona información de la morfología de los polímeros. En el caso de los estudios de adhesión de células en polímeros modificados por plasma se pueden observar las células adheridas a las superficies, además se puede realizar un conteo del número de células por campo, así como algunas de las actividades que la célula realiza como son la ingestión, digestión y modificación enzimática de sustratos.

En las figuras 22A y 22B se muestran las imágenes de células cultivadas sobre la superficie de poliestireno por 30 y 300 seg. modificados por plasma nitrógeno a una potencia de 50 W. Los círculos señalados por las flechas corresponden a las células depositadas sobre la superficie del polímero modificado. Los experimentos fueron realizados por Martínez-Reséndiz y colaboradores. **[21]**



22A) PS 30seg / N_2 1000x



22B) PS 300 seg. / N_2 1000x

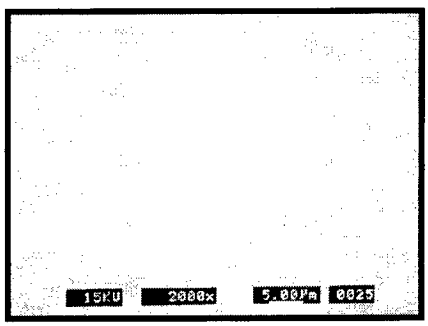
Figuras 22. Células sanguíneas depositadas en películas de poliestireno modificado

4. 6 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Esta técnica, se basa en el siguiente principio: una fuente de energía, un filamento de tungsteno calentado que emite electrones (cátodo), un ánodo, hacia el cual son atraídos los electrones, un diferencial de potencial entre el cátodo y el ánodo imparte un voltaje de aceleración entre 20.000 y 200.000 voltios a los electrones, que crea el haz. El haz pasa por una serie de electroimanes que tienen las mismas funciones que las lentes de vidrio de un microscopio óptico. El condensador forma el haz y modifica el diámetro del haz que incide en el plano del especímen. La imagen final se visualiza sobre una planilla cubierta por fósforo. Las partes de la muestra que han sido atravesadas por los electrones, aparecen brillantes, las porciones que absorbieron o esparcieron los electrones por su densidad inherente o debido al agregado de metales pesados durante la preparación del especímen aparecen oscuras. Se coloca una placa fotográfica o un detector de video por encima o por debajo de la pantalla del visor, con la finalidad de obtener un registro permanente de la imagen sobre la pantalla. **[20]**

Esta técnica de microscopía se utiliza por su alto poder de resolución, ya que se basa en un barrido de la muestra por un haz de electrones para formar una imagen punto por punto. En las figuras 23A y 23B se muestran películas de polihidroxibutirato observadas por SEM modificadas por plasma aire y sin modificar, en ellas se observan cambios en su superficie morfológica, se puede apreciar claramente que la película sin tratamiento presenta rugosidades, en cambio la película modificada presenta una superficie mas lisa y con aglomerados poliméricos. **[21]**

A) PHB sin modificar



B) PHB modificado 300 seg. / 50 W

23. Imágenes de películas de PHB tratadas y sin tratar observadas por SEM

4.7 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

El microscopio de fuerza atómica (AFM) es un instrumento mecánico-óptico que da información sobre la topografía superficial de un material (en el orden de nanómetros) a partir del barrido de una pequeña sonda llamada *cantilever,* la cual es muy sensible y termina en punta con un cristal de forma piramidal, usualmente de nitruro de silicio. El AFM tiene la capacidad de detectar fuerzas a nivel nanométrico del orden del los nanonewtons a través de la medición óptica del movimiento del cantilever sobre la superficie de la muestra. Cuando el cantilever está muy próximo a la superficie de la muestra, la fuerza atómica se detecta a través de la torsión de éste. De esta forma, la dirección de un haz láser, reflejado sobre la parte posterior del cantilever, cambia con la torsión del mismo. La muestra es sometida a un barrido en las tres direcciones espaciales, con lo cual se traza la superficie de la muestra en detalle. Todos los movimientos son controlados por una computadora. La resolución del instrumento es de menos de 1nm, y la pantalla de visualización permite distinguir detalles en la superficie de la muestra con una amplificación de varios millones. En la figura 24 se presenta el esquema de un microscopio de fuerza atómica. **[22]**

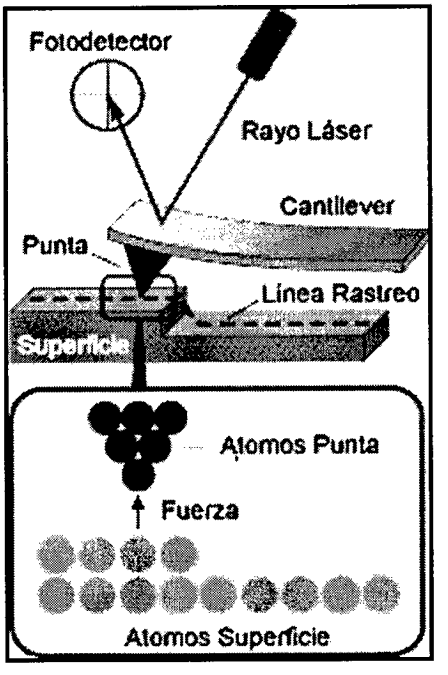


Figura 24. Esquema de las partes y el funcionamiento de un Microscopio de Fuerza Atómica **[9]**

Los polímeros modificados por plasma, generalmente experimentan erosión y el análisis de AFM es adecuado para medir la erosión experimentada por los polímeros durante el tratamiento.

4. 8 Sondas electrostáticas

También conocidas como sondas de Langmuir (desarrolladas por este científico en 1924) estos dispositivos han sido utilizadas en plasmas por lo menos desde hace 75 años. La sonda de Langmuir nos proporciona la siguiente información: densidad y temperatura de los electrones; densidad y temperatura de los iones, también nos proporciona información de las diferencias de potencial existentes en el plasma. La sonda de Langmuir constituye el método de diagnóstico más simple, pues consiste en un conductor que se introduce en la región del plasma y cuya corriente es medida en función del voltaje aplicado. Si bien estas sondas tienen historia y trayectoria, es importante también mencionar que aún están en desarrollo y son utilizadas también en plasmas de fusión (plasmas calientes).**[23]**

La información corriente – voltaje proporcionada por la sonda es graficada y la principal dificultad consiste en la interpretación de los resultados, dado que la intersección de la sonda en el plasma causa fuertes perturbaciones locales en la densidad de especies del plasma.

La sonda o el conductor que se introduce en el plasma es un pequeño electrodo metálico de área conocida, (usualmente se trata de esferas ó cilindros). Las sondas se conectan eléctricamente a una fuente de voltaje variable que se conecta a su vez a un segundo electrodo de referencia inmerso también en el plasma.

La corriente colectada por la sonda proveerá información acerca de las propiedades del plasma. Bajo un amplio rango de condiciones, las perturbaciones que causa la sonda son localizadas y su presencia no afecta las cantidades a medir, salvo ante la acción de campos magnético intensos. En la figura 25 se presenta un diagrama esquemático de una sonda de Langmuir y en la figura 26 un circuito simple para su operación.**[23]**

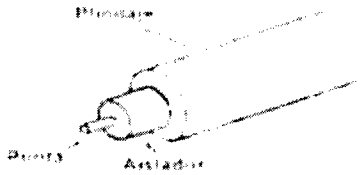


Figura 25. Sonda de Langmuir

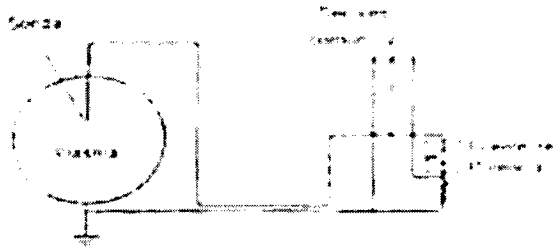


Figura 26. Circuito simple para su operación.

V. Técnicas de Caracterización Biológica.

Existen técnicas que nos permiten medir la biocompatibilidad entre un polímero y un medio biológico. Generalmente un cierto tipo de células es aislado y posteriormente se cultiva sobre una superficie polimérica. A continuación mencionaremos tres técnicas que se emplean en el análisis de células sanguíneas conocidas como células fagocíticas.

5. 1 Obtención y Estimación de la Cantidad de Células.

Esta técnica se utiliza para aislar células especificas, o fraccionar poblaciones celulares viables, es un paso esencial en muchas técnicas usadas en una amplia área de la Biología y disciplinas relacionadas. La separación exitosa de células específicas requiere conocer no sólo los potenciales métodos y sus ventajas y limitaciones individuales, sino también el fundamento y detalle de los protocolos que se sabe rinden en la práctica los resultados esperados, según cada enfoque u objetivo. La separación de una o más poblaciones celulares a partir de una mezcla de ellas, fraccionamiento celular, depende de diferencias en propiedades clave de los distintos tipos celulares tales como tamaño, densidad, carga eléctrica y propiedades hidrofóbicas de superficie y rasgos antigénicos (identidad inmunológica). Una vez aislada la población o subpoblación celular de interés, el siguiente paso es estimar la cantidad de las células seleccionadas, en un volumen específico, lo cual permitirá la determinación cuantitativa de cualquier parámetro morfológico o bioquímico en la citada población celular, además de su propósito, la estimación del número de células por observación al microscopio de una muestra de la población celular, sigue siendo la técnica mas rápida y menos costosa, si bien sigue siendo subjetiva.

5. 2 Pruebas de Viabilidad y Funcionalidad Celular.

5. 2. 1 Método de exclusión de azul tripano.

Todo trabajo con células vivas requiere preservar la viabilidad en las mismas. La máxima viabilidad *in vitro* usualmente se logra conservando las preparaciones celulares a bajas temperaturas (0 – 4 ^{o}C), a excepción de los linfocitos de cobayo que deben permanecer a

temperatura ambiente. Las células por emplear en un experimento deben recuperarse lo mas cercanamente posible al inicio del mismo y el trabajo debe completarse en esa sesión. En general, las células vivas pierden actividad si permanecen toda la noche en refrigeración.
La membrana plasmática de una célula viable no permite la entrada de substancias colorantes no-electrolito, fenómeno que se usa para distinguir los linfocitos vivos de los muertos o no viables (estos se tiñen). Muchos colorantes son adecuados para este propósito, siendo muy comunes el azul tripano y la eosina en solución fisiológica, haciendo la evaluación de preferencia antes de los 10 min de adicionar el colorante.

Para el desarrollo de esta técnica se prepara una suspensión celular de volumen conocido del concentrado de células mononucleares y se mezcla cuidadosamente hasta obtener el volumen requerido para el análisis de suspensión celular y el medio de cultivo. Ya completo el volumen con un ambiente rico en nutrientes, por último se coloca la suspensión celular en los recipientes adecuados, se incuba el tiempo requerido para el análisis, que puede ser de 24, 48 y hasta 72 horas, esto para observar completamente el grado de viabilidad en el volumen de células utilizadas.

Después de cada tiempo de incubación a cada muestra se agrega una gota de la solución de azul tripano, se dejan incubar ahora por espacio de 30 minutos y después se realiza el conteo de células en un invertoscopio de manera directa sobre los recipientes utilizados que permite un conteo de las células sin que estas sufran tanta manipulación, los resultados se reportan en porciento, se hace una relación de porcentajes de células totales, con células que tuvieron la capacidad de impedir la entrada del azul tripano y las células que no la tuvieron, esto se representa como un contraste que realza las células viables.

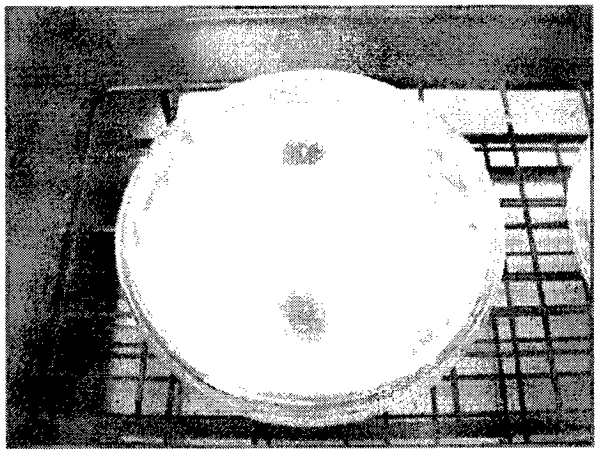


Figura 27. Incubación de células sanguíneas sobre películas de poliestireno a baño María con medio azul tripano

5. 2. 2 Fagocitosis in vitro (Prueba de NBT).

Mediante la fagocitosis, un mecanismo de la resistencia o inmunidad innata, los fagocitos engloban, internalizan y digieren muy distintos materiales, como pueden ser: restos celulares, microorganismos, partículas inorgánicas u orgánicas no viables. Los fagocitos interceptan tales materiales prácticamente en cualquier sitio del organismo (ya que se encuentran estratégicamente localizados a través de todo el cuerpo), mediante un proceso fortuito o bien, químicamente dirigido, después de lo cual ocurre la unión de la partícula "extraña" a la membrana de la célula fagocítica para que esta inicie propiamente la actividad de ingestión por la cual la célula fagocítica puede poner el material ingerido a disposición de la maquinaria digestiva celular. Sin embargo, el proceso de digestión fagocítica no siempre destruye totalmente las partículas ingeridas, incluso los patógenos intracelulares pueden sobrevivir y aún reproducirse, dentro del fagocito.

En el desarrollo de esta técnica se prepara una suspensión celular con la cantidad necesaria de células mononucleares en medio de cultivo; se le añade una cierta cantidad de suero de acuerdo a lo que se necesita para realizar el análisis, el concentrado celular se coloca en recipientes adecuados y de esta forma se garantiza que las células se mantengan en un

ambiente rico en nutrientes.

Por último las células se incubaron el tiempo requerido para el análisis, que puede ser de 24, 48 y hasta 72 horas, esto para observar completamente el grado de viabilidad en la cantidad de células utilizadas.

Después de cada tiempo de incubación se coloca una gota de la solución de nitroazul de tetrazolio a cada cultivo, esto se deja incubar ahora por espacio de 30 minutos y después se realiza el conteo de células en un invertoscopio, este nos permite el conteo de las células a través del recipiente en el cual se lleva acabo el cultivo (caja petri), los resultados se reportan en porciento, se hace una relación de porcentajes de células totales, con células que tuvieron la capacidad de ingerir y digerir las partículas de nitroazul de tetrazolio, transformándolas en formazán, esto debido a su actividad enzimática y las células que no la tuvieron, esto se representa como un contraste que realza las células viables.

VI. ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

En el presente capítulo se presentan algunos trabajos científicos recientes relacionados con el tratamiento superficial de los polímeros por plasma.

Esfuerzos significativos han sido enfocados en la ciencia de biomateriales, para desarrollar superficies poliméricas que exhiban una química interfacial específica. **[24]** El objetivo ha sido generar una mayor compatibilidad entre el biomaterial y el organismo biológico al que el biomaterial es expuesto, para evitar el rechazo de estos organismos hacia el material. Los organismos generan diversas respuestas inmunes hacia los biomateriales o implantes y el uso de plasma para modificarlos superficialmente es una buena opción para eliminar el problema y lograr así el posterior anclaje de células, enzimas, etc.

Los estudios realizados sobre modificación de plasma y su caracterización son muy abundantes debido a la importancia de los tratamientos de plasma en los polímeros y a la posibilidad de construcción de equipos de plasma a nivel laboratorio con inversiones pequeñas. Esta técnica ha recibido amplia atención en capítulos de libros **[25]**, revisiones de revistas **[26]** y artículos en revistas especializadas **[27]**

Numerosos artículos han reportado el uso de tratamientos con plasma que involucran oxígeno y/o tratamientos con gas inerte. La modificación se utiliza como un medio para incrementar la energía, hidrofilicidad, adhesión y polaridad superficial por medio de la generación de grupos funcionales sobre la superficie del polímero, los resultados obtenidos se pueden mejorar por medio de la optimización de los parámetros del plasma, los cuales generalmente son presión, potencia y tiempo.

6.1 Aplicaciones médicas de polímeros modificados por plasma

Los nuevos productos médicos y materiales quirúrgicos mejoran la práctica actual del cuidado de la salud. Muchos de estos productos médicos innovadores utilizan compuestos poliméricos que necesitan cubrir ciertos requerimientos clínicos y costos. Uno de los requerimientos de

estos productos es que exista una biocompatibilidad ente el ambiente fisiológico y la superficie del biomaterial. La modificación superficial por plasma mejora las propiedades de biocompatibilidad y biofuncionalidad. [2]

Los materiales utilizados en estas aplicaciones deben ser materiales diseñados para mantener sus propiedades en largos períodos de tiempo, por lo que se necesita que sean inertes, y debido a que su aplicación es dentro del organismo, deben ser biocompatibles y atóxicos para disminuir el posible rechazo, como ya se ha comentado anteriormente.

Las aplicaciones más importantes son las prótesis o implantes ortopédicos, elementos de fijación como cementos óseos, membranas y componentes de órganos artificiales, entre otros. Entre los materiales más utilizados se encuentran: polímeros fluorados como el teflón, poliamidas, elastómeros, siliconas, poliésteres, policarbonatos, etc. [12]

La versatilidad en propiedades físicas desarrolladas en estos materiales ha llevado a que desplacen a los materiales metálicos y cerámicos que antiguamente cumplían estas funciones y al desarrollo de nuevas aplicaciones cuyos requerimientos antes no eran posibles de satisfacer.

Aunque muchos biomateriales sintéticos tienen propiedades físicas que satisfacen y exceden los requerimientos del humano, sin embargo estos biomateriales pueden con frecuencia causar reacciones fisiológicas adversas tales como infecciones, inflamación y trombosis. Mediante modificación superficial, la biocompatibilidad así como la biofuncionalidad pueden ser alcanzadas sin afectar las propiedades en masa del polímero. Hay muchas formas de alterar la interacción de biomateriales con sus ambientes fisiológicos, por ejemplo plasma es una herramienta muy eficaz para modificar superficies, el proceso es muy flexible, seguro y efectivo.

El uso de materiales sintéticos en aplicaciones biomédicas se incrementó dramáticamente durante la pasada década. Aunque la mayoría de los biomateriales sintéticos tienen propiedades fisiológicas o provienen de componentes naturales, con frecuencia producen un

gran número de reacciones fisiológicas adversas tales como: formación de trombosis, inflamación e infecciones.

La modificación de superficies por plasma es utilizada en una gran variedad de aplicaciones biomédicas. A continuación se enlistan algunos de los ejemplos más importantes. **[28]**

6.1.1 Bioseparación

Las membranas poliméricas con permeación selectiva son ampliamente utilizadas en aplicaciones tales como hemodiálisis, purificación de proteínas, órganos artificiales y biosensores. Los materiales de la membrana deben presentar alta permeación selectiva para obtener una pureza de productos mayor y al mismo tiempo realizar las filtraciones con rapidez. La alta selectividad de las membranas puede ser incrementada incorporando grupos químicos o restricciones físicas (tamaño de poro controlado) a la membrana. Las membranas ideales, las cuales separan moléculas sobre sus propiedades químicas y de tamaño son requeridas de copolímeros en bloque y de polímeros entrecruzados que tengan propiedades hidrofílicas / hidrofóbicas. En los últimos años las superficies de este tipo de membranas han sido modificadas por tratamientos con plasma para mejorar dichas propiedades de acuerdo a sus aplicaciones.

6.1.2 Esterilización

El propósito del proceso de esterilización es destruir la contaminación microbiana de los productos no estériles. Por lo tanto, un producto estéril es aquel que está libre de microorganismos viables. Los dos principales procesos utilizados son el tratamiento por óxido de etileno y la ionización.

El óxido de etileno ha sido uno de los métodos tradicionales de esterilización. Sin embargo sus características inflamables, reactivas y tóxicas causan riesgos tanto para la salud como para el medio ambiente por lo que el proceso debe ser adecuadamente gestionado y controlado. Su poder de penetración es limitado actuando principalmente como agente esterilizador de superficies. Además puede dejar trazas o residuos en los productos tratados, por lo que requiere de aireación post-esterilización y cuarentena.

Una segunda alternativa para la esterilización de productos médicos lo constituye el uso de plasma. En este proceso, un gas (por ejemplo: peróxido de hidrógeno) es ionizado en su fase de plasma. Los radicales libres del plasma destruyen los microorganismos. Este sistema es no tóxico y no afecta al medio ambiente, el sistema es fácil de manejar y requiere bajos suministros de energía. No deja residuos químicos en los artículos esterilizados, como en el caso de la esterilización con óxido de etileno. Los ciclos de esterilización son más cortos que en el caso de oxido de etileno. Presenta la desventaja de que no todos los equipos médicos pueden ser esterilizados mediante este proceso. Debido a la naturaleza corrosiva del plasma, papel y celulosa no pueden ser esterilizados. **[12]**

La tecnología de plasma también ha sido utilizada para la desinfección y esterilización de aparatos médicos. El aspecto más importante de la tecnología es su potencial para simultáneamente realizar modificación superficial y esterilización en equipo biomédico. La esterilización por plasma puede ser adecuada para implantes médicos e instrumentos sensibles a la temperatura, radiación y reactivos químicos.

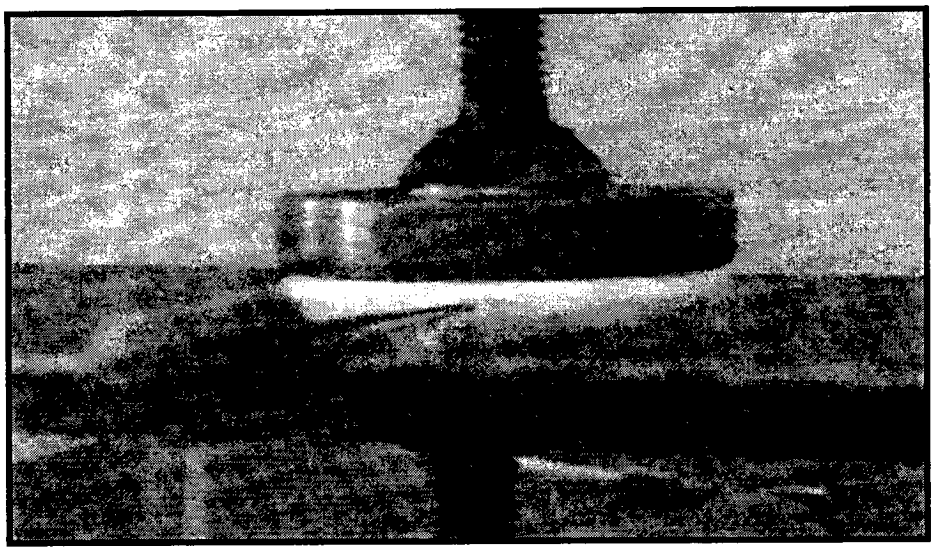


Figura 28. Esterilización de una aguja en un plasma de aire a presión atmosférica

6.1.3 Prótesis oculares.

Productos tales como los lentes de contacto y lentes intraoculares han sido modificados exitosamente por tratamiento con plasma con la finalidad de impartirles biocompatibilidad hacia células y proteínas, disminuir la adhesión de bacterias, mejorar la hidrfílicidad de la superficie e incrementar el confort del usuario. Los tratamientos de plasma de amonio son utilizados para modificar la superficie de córneas artificiales e incrementar el crecimiento y la adhesión de células epiteliales.

6.1.4 Aplicaciones ortopédicas.

Un perfecto aparato para prótesis reemplazará todas las funciones que sean requeridas y será completamente biocompatible. El plasma también ha sido utilizado para modificar la superficie de implantes metálicos para promover la adhesión con cementos para hueso y para incrementar la adhesión y el crecimiento de células. También se puede aplicar por plasma un polímero de tipo biológico altamente entrecruzado sobre la superficie del implante con la finalidad de regular la velocidad de degradación del material y la compatibilidad.

El cobre y el cobalto han sido acomplejados por un copolímero de ácido acrílico–divinilbenceno para prevenir infecciones micóticas, mientras que los polímeros de estaño y arsénico han sido usados para infecciones bacterianas y fúngicas, así mismo los heteropolimolibdatos son usados como anticoagulantes y por sus propiedades lipolíticas. Las microesferas han sido usadas también para introducir iones metálicos. Recientemente, polímeros funcionalizados paramagnéticos y ferromagnéticos han sido propuestos como potencial magnético de resonancia de imágenes en contraste con agentes, los cuales puedan mejorar la resolución del el tracto gastrointestinal y tejidos de alrededor. **[3]**

6.1.5 Cultivo de tejidos.

Las superficies de materiales para cultivo de células, tales como cajas petri y membranas pueden ser modificadas mediante tratamiento por plasma para mejorar el crecimiento celular, enlace de proteínas y adhesión específica de células. Esto se puede lograr mediante el control de las estructuras químicas superficiales, así como el control de la energía superficial. En la

tabla 4 se muestra la aplicaciones de algunos biomateriales que se han modificado superficialmente por plasma.

Tabla 4. Aplicaciones de biomateriales modificados superficialmente por plasma **[2]**

Aplicaciones	**Dispositivos**	**Materiales**	**Propósito**
Biosensor	Membranas del sensor Biosensores de diagnóstico	PC, celulosa, PP, PS, PHB	Inmovilización de biomoléculas
Bioseparación	Separación de membranas Hemodiálisis Membranas	PP, PHB, PU, 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 hidroficilidad
Ortopédico	Implantes de metal Ligamentos Placas de hueso	Aleaciones de Ti-Ni, C0-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 drogas y fármacos	SiR, hidrogeles, PGA, PLA	Reduce la difusión de moléculas Degradación controlada para la liberación de la droga o medicamento
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

Yang y colaboradores, **[29]** utilizaron el tratamiento con gases anhidros de amonio para mejorar la afinidad de células como son los fibroblastos de ratón a la superficie de las películas de poli ácido (D,L-láctico). Ellos realizaron los estudios de la composición química de la superficie por medio de XPS, encontrando que grupos hidroxilo y amino fueron incorporados a la superficie del polímero durante el tratamiento con plasma. Para evitar la perdida de la modificación de los polímeros tratados fue necesario mantenerlos a temperaturas bajas de 0-4 ^{0}C.

Se presentaron disminuciones en el ángulo de contacto en las películas de PDLLA tratado con el plasma de amonio como se muestra en la Tabla 5. Los investigadores encontraron que el ángulo de contacto de la muestra depende fuertemente de los parámetros del plasma incluyendo potencia, presión y tiempo de tratamiento. El ángulo de contacto disminuyó en función del tiempo de tratamiento.

Tabla 5. Tendencia del ángulo de contacto en función de los parámetros de tratamiento con plasma.

Muestra	Condición			
	Potencia(W)	Tiempo (sec)	Presión (Pa)	Angulo de contacto del agua
1	50	10	20	60.5
2	50	20	20	47.5
3	50	30	20	37.0
4	50	60	20	25.0
5	50	120	20	21.5
6	30	120	60	49.5
7	30	120	40	44.0
8	90	120	20	44.0
9	70	120	20	27.5
10	50	120	80	40.5
Control	-	-	-	78.5

En los espectros de XPS para el polímero tratado con plasma de NH_3 se observó la presencia de nitrógeno (N 1s), oxígeno (O 1s) y carbono (C 1s), el polímero sin tratar contiene carbón. De los resultados obtenidos por ésta técnica se concluye que los grupos que contienen nitrógeno, tales como NH_2 fueron incorporados a la superficie del PDLLA durante el tratamiento con plasma.

El nivel de hidrofilicidad y la energía superficial de las películas de PDLLA de los polímeros se incrementó con el tratamiento como lo demuestran los resultados de ángulo de contacto (Tabla 5). La hidrofilicidad de los polímeros modificados se mantiene estable si las superficies se conservan a temperaturas bajas (0-4°C). Si las muestras se dejan a temperatura ambiente, la modificación superficial se va perdiendo con los días.

Ramírez y colaboradores **[30]** modificaron por plasma 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 causados 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 (HUEVEC). Se encontró que cuando se trata con

plasma la superficie de PET no se tiene efecto de toxicidad. **[24]** En la Tabla 6 se muestra la composición química obtenida por XPS del PET.

Tabla 6. Composición atómica de PET

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 los grupos químicos injertados durante el tratamiento no producen inhibición en el crecimiento y viabilidad de la célula.

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 dió como resultado una buena respuesta biológica para tratamientos con oxígeno y gas amonio. En la figura 29 se presenta el proceso de preparación de injertos cardiovasculares artificiales modificados mediante tratamiento por plasma.

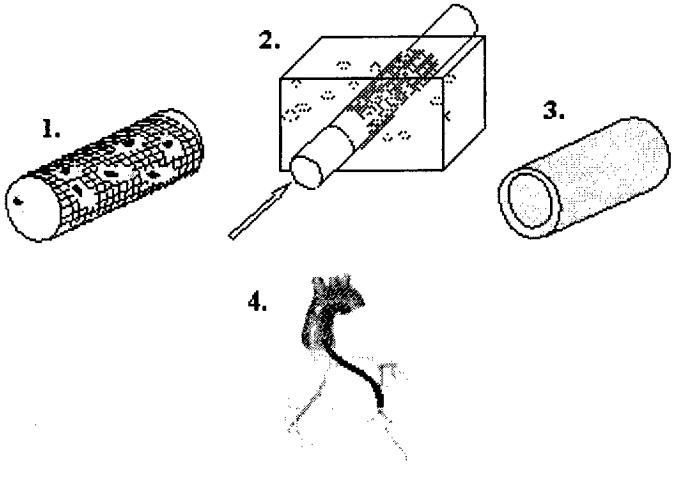


Figura 29. Proceso de preparación de injertos cardiovasculares artificiales

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 que pueden ser utilizados en cirugías del corazón.

Johansson y colaboradores **[31]** utilizaron un plasma de aire de radiofrecuencia para incorporar nuevas funcionalidades en las superficies de los polímeros de ciclo-olefina (Zeonex y Topas), polimetilmetacrilato (PMMA), copolímero de estireno-acrilonitrilo (SAN) y poliestireno (PS). El objetivo del tratamiento con plasma para los diferentes polímeros fué incrementar la hidrofilicidad en la superficie y obtener una superficie con características adecuadas para el crecimiento de células. Los polímeros fueron tratados a potencias del plasma altas (50 – 100W) y potencias de plasma bajas (3 – 10W), los polímeros modificados fueron lavados con etanol al 70%. El lavado con etanol se realizó para remover grupos funcionales que no estuvieran enlazados químicamente a la superficie. Los polímeros tratados a potencias bajas fueron menos hidrofílicos.

Los polímeros tratados a potencias del plasma altas presentaron alta hidrofilicidad y mayor estabilidad al lavado con etanol; mientras que los polímeros tratados a bajas potencias presentaron grados de hidrofilicidad menores y una mayor estabilidad al lavado con etanol. Los polímeros tratados a altas potencias presentan superficies más estables al lavado con etanol que los polímeros tratados a altas potencias.

Las características de crecimiento y adhesión de las células de HeLa Cervix en los polímeros modificados, fueron tan buenas como las del poliestireno comercial para el cultivo de tejidos.

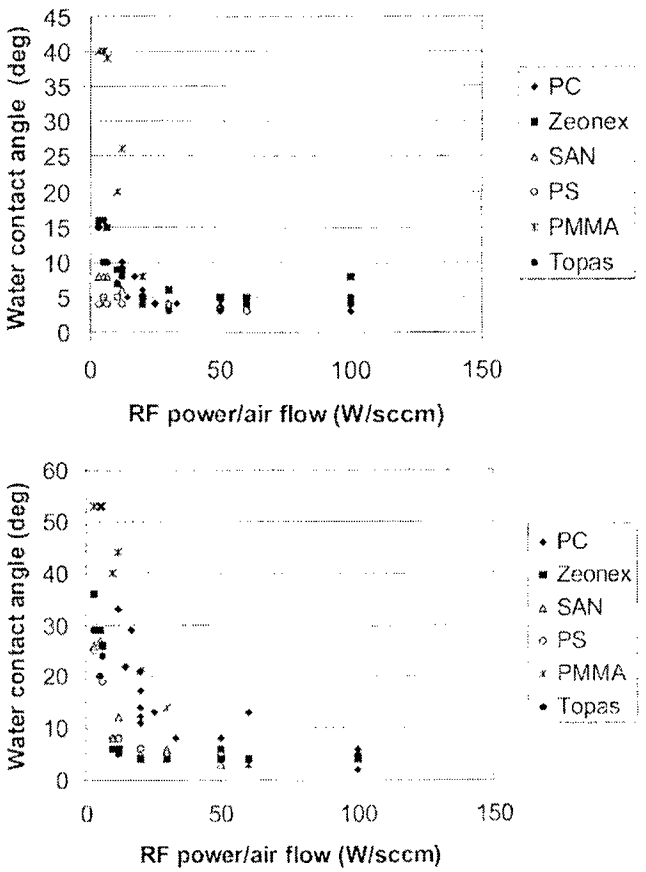


Figura 30. Ángulos de contacto

En la figura 30 se presenta el ángulo de contacto de los diferentes materiales tratados en el plasma. Se observa que el ángulo de contacto disminuye sustancialmente en función de la potencia del plasma. Una considerable disminución en el ángulo de contacto < 20° fue observado para todos los polímeros tratados.

En otro trabajo, Steele **[32]** modificó la superficie de poliestireno en un plasma de argón. El polímero fue modificado a diferentes tiempos (30, 60, 120, 300 y 1800 s), la potencia del plasma fue de 10W y la presión de argón durante el tratamiento fue de 2.5 x 10^{-2} mbar. El polímero fue analizado mediante espectroscopía fotoelectrónica de rayos X. El espectro del polímero original sólo presentó el pico de carbono, pero los espectros de los polímeros modificados presentaban además los picos correspondientes a oxígeno y nitrógeno. El plasma de argón generó grupos químicos de oxígeno y nitrógeno en la superficie del polímero. Steele,

además cultivó proteínas en la superficie del poliestireno y observó que había mayor adhesión de proteínas en las superficies del polímero que contenían mayores niveles de nitrógeno.

Short y colaboradores **[33]** han estado trabajando en los últimos 15 años en la modificación superficial de polímeros para aplicaciones médicas. Ellos han modificado un gran número de polímeros utilizando una gran variedad de plasmas: aire, argón, oxígeno, nitrógeno, etc. Además de modificar la superficie polimérica mediante la injertación de grupos químicos; Short y su grupo también trabajan con la tecnología de polimerización por plasma para aplicar recubrimientos que son altamente compatibles con los medios biológicos.

Short ha desarrollado algunos sistemas de "piel artificial" utilizando la tecnología de polimerización por plasma, este tipo de sistemas acelera el proceso de recuperación de la piel. Algunos de los sistemas desarrollados por el grupo han sido ya probados en pacientes con quemaduras o úlceras graves. El grupo ha tenido bastante éxito con este tipo de investigaciones y en el año 2001 crearon un par de compañías: Plasso y Cell-tran 3 que trabajan en conjunto con la Universidad de Sheffield en Inglaterra, las cuales se dedican a producir algunos materiales procesados por plasma para aplicaciones médicas.

Neira- Velázquez, **[34]** modificó las superficies de tuberías de teflón (PTFE) utilizadas para fabricar sensores para la detección de enfermedades estomacales. Los sensores son fabricados en el departamento de Física-Médica de la Universidad de Sheffield (Inglaterra). Los sensores son adheridos a una tubería de teflón que es introducida en el cuerpo del paciente. El problema se presentaba porque el teflón tiene muy baja energía superficial debido a la presencia de los grupos flúor y el sensor estaba presentando problemas de adhesión hacia la superficie de la tubería de teflón. La tubería fue tratada en un plasma de argón durante 10 minutos. El plasma de argón removió los átomos de flúor de la superficie. Las superficies del polímero modificado por plasma presentaron una adhesión muy buena hacia el sensor. En la figura 31 se presenta el proceso de eliminación de flúor de la superficie de teflón cuando éste es expuesto a un plasma de argón.

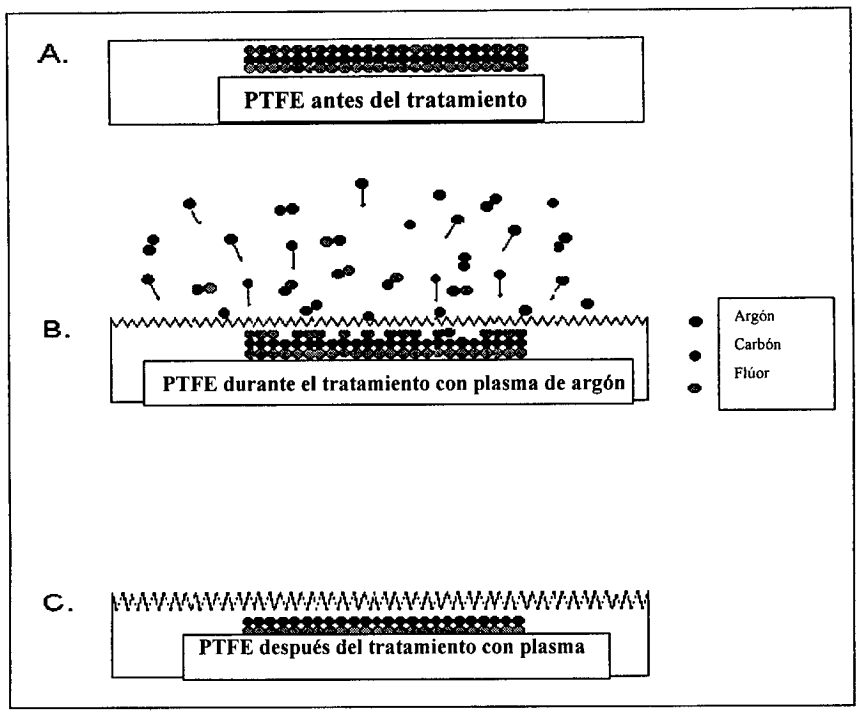


Figura 31. Proceso de eliminación de flúor de la superficie de teflón expuesto a un plasma de argón

En otros estudios, Neira-Velázquez y colaboradores, **[35]** han modificado las superficies de varios polímeros. Polietilentereftalato, Poliácido láctico, Polihidroxibutirato, Poliestireno y Policarbonato fueron modificados en un plasma de aire. Los polímeros fueron tratados en un reactor tubular de vidrio a una potencia de 10W. Los polímeros fueron caracterizados mediante ángulos de contacto, microscopía electrónica de barrido y microscopía de fuerza atómica. En todos los polímeros se observó que los ángulos de contacto disminuían en función del tiempo de tratamiento, en la figura 32 se presenta una gráfica con los ángulos de contacto de la superficie de PET modificada a diferentes tiempos. Los análisis de AFM mostraron que las superficies de PLA tratadas con plasma de argón presentan capas erosionadas; en el polímero sin modificar la morfología de la superficie es lisa y homogénea. Los autores pretenden cultivar células eucariotas sobre los polímeros tratados con la finalidad de investigar el grado de afinidad de los polímeros hacia dichas células.

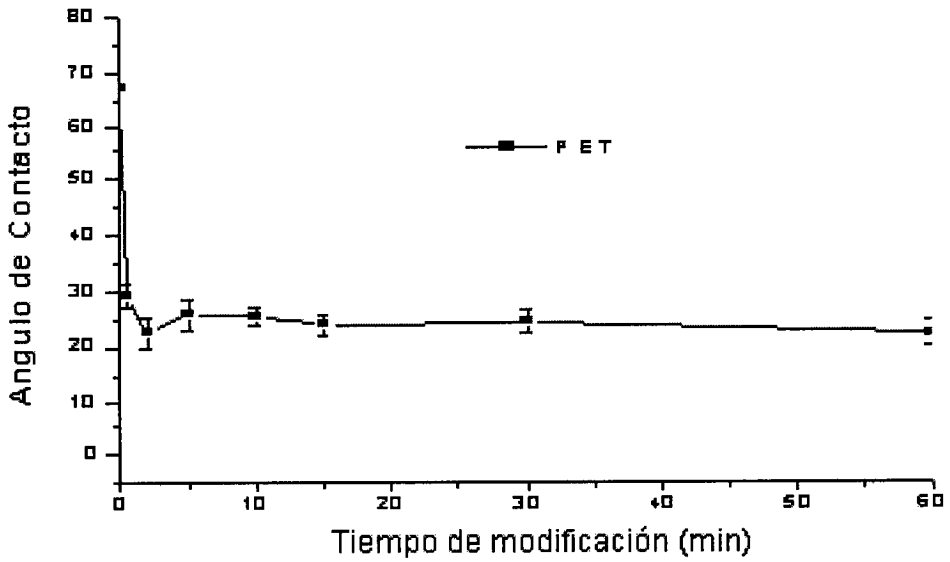


Figura 32. Cambios en ángulo de contacto en películas de PET con plasma aire a diferentes tiempos.

En las figuras 33 y 34 se observan los espectros XPS de PS virgen y tratado en plasma de argón durante 15 s. En el espectro de PS virgen solamente se aprecia el pico correspondiente al carbón (C 1s), mientras que en el espectro correspondiente a PS tratado en argón se aprecia la aparición de dos nuevos picos correspondientes a nitrógeno (N 1s) y oxígeno (O 1s).

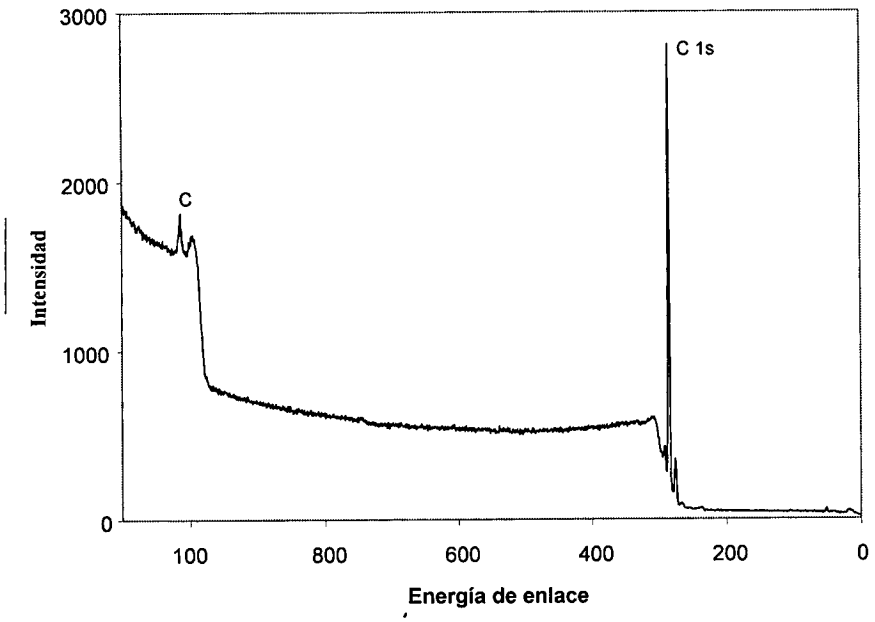


Figura 33. Espectro XPS de Poliestireno virgen

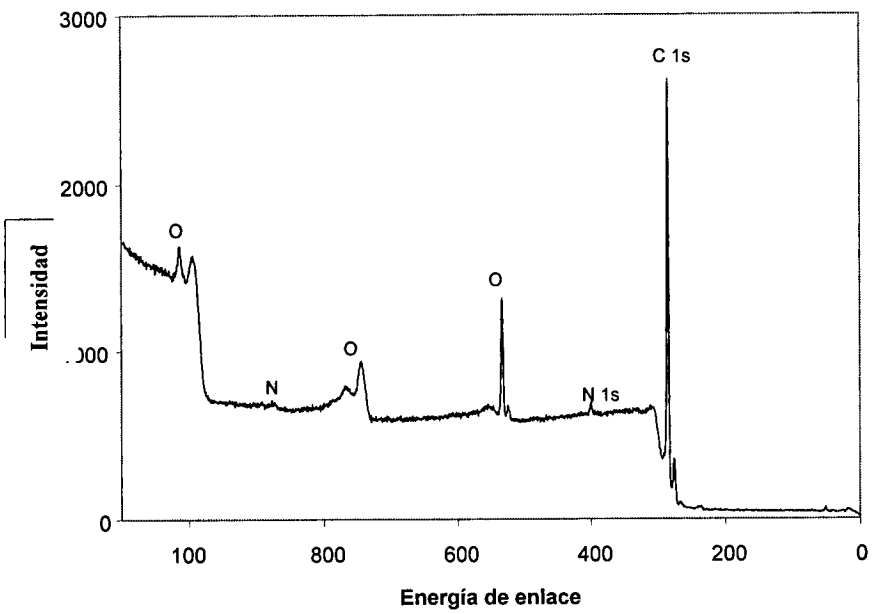


Figura 34. Espectro XPS de Poliestireno tratado por 15 s en plasma de argón

El polietilentereftalato fue modificado en un plasma de oxígeno / argón (25%/75%) durante un tiempo de 7.5 minutos a una presión de 0.013 mbar. Las muestras fueron caracterizadas por microscopía de fuerza atómica y en la figura 38 se observan las imágenes obtenidas para el PET sin tratar y para el PET tratado. Se observa en la figura 38 B que el plasma ha erosionado las capas más superficiales del polímero. Los autores concluyen que esa superficie rugosa generada por el plasma es adecuada para anclar cierto tipo de drogas o medicamentos.

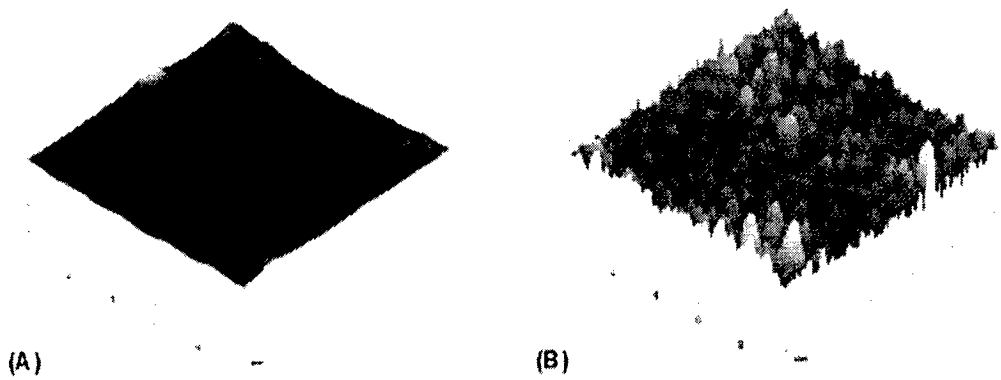


Figura 38. Imágenes de AFM A) PET sin tratar B) PET tratado en un plasma de oxígeno/argón [9]

Hsu y colaboradores **[36]** modificaron la superficie de poliuretano mediante el uso de plasma de argón. Al producirse el plasma de argón se formaron radicales libres en la superficie del polímero, después se introdujo el ácido L-láctico y de esta forma se introdujeron injertos de ácido L-láctico en la superficie del polímero. La modificación de la superficie fue caracterizada por medidas de ángulo de contacto y por XPS, donde se observó que el ángulo de contacto del agua en la superficie del poliuretano fue decreciendo por el injerto del ácido L-Láctico. La disminución en ángulo de contacto indica un incremento en la hidrofilicidad de la superficie modificada. El injerto de ácido L-Láctico también incrementó la relación atómica Carbón / Oxígeno. Además, sobre las superficies modificadas del polímero se probaron dos tipos de células: fibroblastos de ratón (NIH-3T3) y células endoteliales del cordón umbilical. Los ángulos de contacto para el polímero tratado y no tratado se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Datos estadísticos del ángulo de contacto del agua

Muestras	Condición	Angulo de contacto
A	No tratadas	73 ± 2
B	Tratadas únicamente con plasma	36 ± 1
C	Tratadas con plasma y dejadas en tolueno	76 ± 1
D	Plasma e injertos de ácido L-Láctico	45 ± 2

El decrecimiento en el ángulo de contacto (incremento de hidrofilicidad) fue causado por el hidroperóxido u otro grupo polar generado por la oxidación en la superficie de PU (poliuretano) durante el tratamiento con plasma de argón.

En la figura 35 se presentan los espectros de XPS de la muestra de PU tratada a diferentes condiciones en el plasma de argón. En los espectros se pueden observar 3 picos los cuales corresponden al C 1s (285 eV), N ls (400 eV) y O 1s (532 eV).

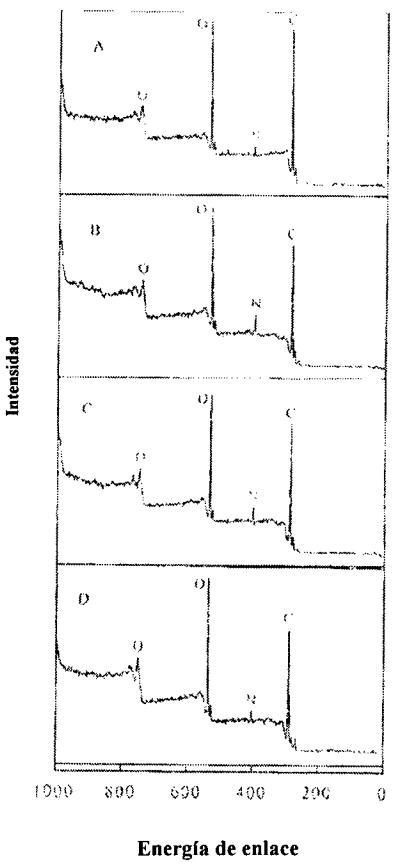


Figura 35. Espectro del XPS de la muestra de PU sujeta a diferentes tratamientos

En las figuras 36 se muestran las fotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de los fibroblastos agregados después de 12 horas de la incubación sobre las superficies del poliuretano sin modificar y modificado por plasma y ácido L-láctico. Se observa que el polímero modificado presenta un número mayor de células adheridas a su superficie que el polímero no modificado.

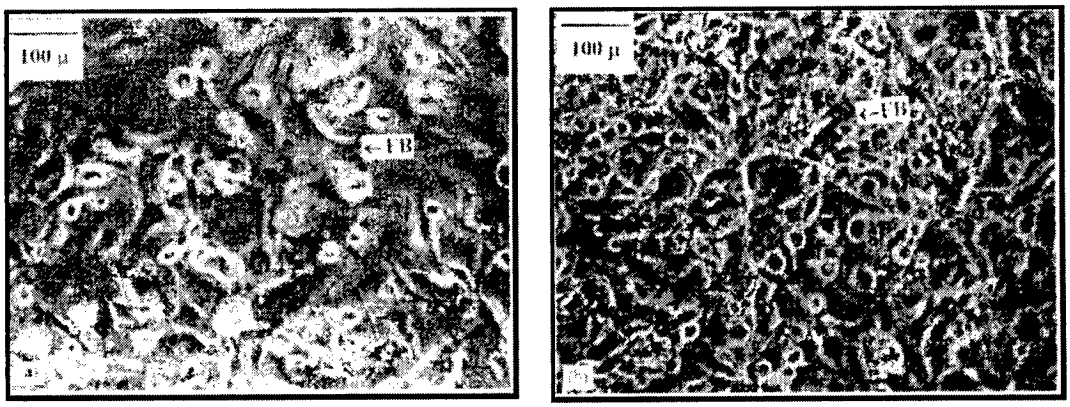


Figura 36. Micrografías del fibroblastos 3T3 que se adhieren a: (a) al PU sin tratamiento (foto superior), (b) al PU tratado en plasma de argón (foto inferior)

En la figura 37 se muestra la adhesión de las células de las venas endoteliales del cordón umbilical humano sobre el PU. El polímero modificado presentó mucho mayor adhesión de células endoteliales y fibroblastos que el polímero sin modificar. Se concluye que la técnica de modificación-injerto puede ser empleada para incrementar el sembrado de células endoteliales en injertos vasculares de poliuretano.

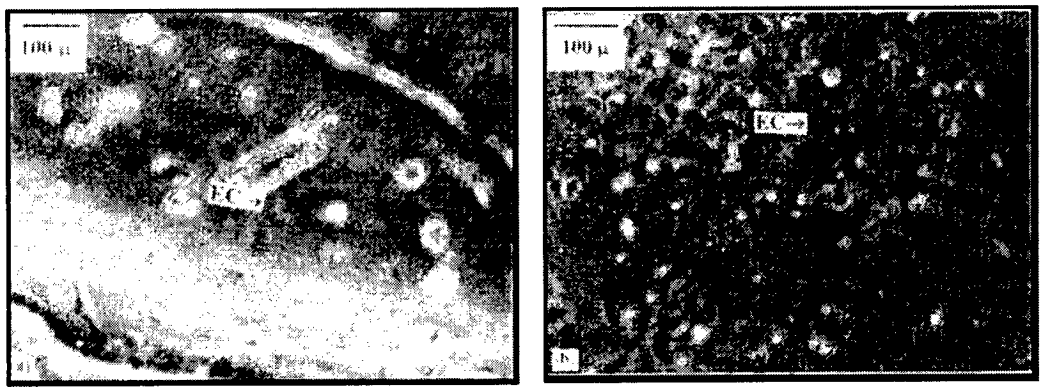


Figura 37. Micrografías de las células de las venas que se adhieren (a) al PU sin tratamiento (foto superior), (b) al PU tratado en plasma de argón (foto inferior)

Mason y colaboradores, **[37]** encontraron que la superficie de polipropileno, poliestireno, politetrafluoroetileno eran modificadas químicamente utilizando plasmas de radiofrecuencia de Ar y NH_3. Mediante el tratamiento se introdujeron grupos amino en la superficie del polímero, estos grupos reaccionaron posteriormente con el ácido hialuronico (HA) y de esta forma se generaron injertos del HA sobre la superficie polimérica. Los grupos injertados del HA son candidatos idóneos para adhesión y crecimiento de células.

Yoon y colaboradores **[38]** modificaron la superficie de poli(D,L-láctico-co-ácido glicólico) PLAG para mejorar la adhesión de células específicas en la superficie del polímero vía interacción-ligante-receptor. Primero se generaron radicales libres en la superficie del polímero y posteriormente se hizo reaccionar la galactosa sobre esos radicales. La galactosa fue el medio ligante y el medio receptor fue el asialoglico-proteínico presente en la membrana de los hepatocitos. Esto se hizo para tener una superficie altamente biocompatible con la sangre. Los resultados mostraron que un incremento en la concentración de galactosa en la superficie del polímero provocó un incremento en la viabilidad de las células.

Gerenser **[39]** utilizó diferentes plasmas (gases inertes, oxígeno y nitrógeno) para modificar la superficie de polietileno. El polímero fue caracterizado *in situ* mediante XPS. El demostró que plasmas de oxígeno y de nitrógeno generan nuevas especies químicas sobre la superficie del polímero, mientras que los gases inertes no tienen ningún efecto químico detectable por XPS. Sin embargo, también encontró que cuando el polímero tratado con gases inertes es expuesto a la atmósfera, reacciona con oxígeno del medio y la presencia de oxígeno es detectada por XPS. Se concluye en este estudio que es importante realizar el análisis de XPS *in situ.*

Otras publicaciones **[40,41]** hacen referencia a que los cambios superficiales inducidos por los tratamientos son parcialmente reversibles con el tiempo (recuperando hidrofobicidad o hidroficilidad) y esto es particularmente importante desde el punto de vista de las aplicaciones médicas. En estos estudios fue demostrado que la recuperación hidrofóbica depende del polímero y del tratamiento. El proceso de recuperación se acelera por la ruptura de cadenas y por el entrecruzamiento.

Se han realizado investigaciones con diferentes tipos de gases **[42]** como por ejemplo; plasmas de helio, neón, argón y kriptón han sido utilizados para modificar superficies de polietileno, polietilentereftalato, politetrafluoroetileno, polisiloxano, hule de silicón, policarbonato, poliestireno, copolímeros de polietileno-tetrafluoroetileno etc. Plasmas de nitrógeno han sido utilizados para modificar polietileno, polietilentereftalato, poli-p-xileno, hule de silicón. Los plasmas de oxígeno y plasmas de hidrógeno modifican varios polímeros. Plasmas de metano, etileno y acetileno han sido utilizados para modificar las superficies de polietileno, politetrafluoroetileno, policloruro de vinilo y polifluoruro de vinilo. También los plasmas de organosilanos son utilizados para modificar una variedad de polímeros.

Los plasmas de argón han sido usados para modificar la superficie de diferentes polímeros tales como poliestireno, polipropileno, polietilentereftalato, logrando injertar grupos con oxígeno y nitrógeno Se realizó un diseño de experimentos para cada uno de estos polímeros con el propósito de determinar a que tiempos, presión y potencia del gas podían ser generados la mayor cantidad de grupos funcionales, sobre las superficies de los polímeros modificados. **[42]**

Entre otros estudios realizados en la modificación superficial de polímeros para aplicaciones biomédicas se encuentra la revisión de Favia y d´Agostino **[43]** que describe biomateriales tratados por técnicas de plasma a baja presión para mejorar la biocompatibilidad, enfatizan como aprovechar mejor la técnica de plasma y las reacciones superficiales que pueden conducir al entendimiento y control químico de los procesos de plasma.

También se puede mencionar que dentro de las aplicaciones de polímeros modificados se han desarrollado implantes elastoméricos biodurables tales como el polieteruretano (PUE), los cuales pueden sufrir biodegradación en un medio ambiente biológico. Estos procesos pueden ser detenidos por medio de la modificación superficial por plasma.

Por otro lado, la modificación de la superficie de polímeros se ha empleado para el desarrollo de recubrimientos antimicrobianos para uso biomédico como los poliuretanos y silicones. En

estos materiales el cambio en la hidrofilicidad y funcionalización de la superficie podría promover una adhesión bacterial y retención antibiótica. Estos tratamientos podrían servir como un artificio para reducir infecciones.

En un estudio interesante **[44]** se modificó por activación de plasma la polietercetona (PEEK) y posteriormente se evaluó su influencia en la formación de fosfato de calcio como recubrimiento para aplicaciones biomédicas.

Un polímero grandemente utilizado en la construcción de aparatos cardiovasculares, tales como catéteres, ventrículos, injertos vasculares son los poliuretanos. Para mejorar su hemocompatibilidad sus propiedades pueden ser optimizadas a través de la modificación superficial, sin afectar sus propiedades mecánicas. Entre los diferentes tratamientos para disminuir la trombogénesis en implantes cardiovasculares, se encuentra la inmovilización de heparina en la superficie del poliuretano, un tratamiento por plasma puede generar grupos químicos que permiten la inmovilización de la heparina. Las propiedades químicas y físicas de los biomateriales poliuretánicos pueden ser hechas a la medida por medio de la modificación por plasma. **[45,46]**

Dewez y colaboradores **[47]** en 1999 estudiaron la adhesión de células mamarias a superficies de poliestireno por tratamiento de plasma de oxígeno. Varias superficies de polímeros como el polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), polietilentereftalato (PET) y polimetilmetacrilato (PMMA) fueron modificadas por plasma de vapor de agua. El tratamiento de estos polímeros demostró ser un método efectivo para producir alta cantidad de grupos hidroxilo en su superficie. La interacción de células de ovarios de Hamsters con el polímero modificado produjo adherencia y crecimiento sobre el polímero, según reporta Lee y colaboradores. **[48]**

Kang, **[45]** modificó la superficie de un copolímero de la familia de los PHA el poli-3-hidroxibutirato-hidroxivalerato por medio de plasma de oxígeno para producir peróxidos en su superficie. Estos peróxidos fueron utilizados como iniciadores en la polimerización de injerto del ácido acrílico (AA) para inducir la formación de grupos carboxilo. Posteriormente

inmovilizó insulina sobre la superficie modificada usando una reacción de acoplamiento. El observó que la proliferación de fibroblastos humanos en la superficie se aceleró significativamente con la inmovilización de la insulina.

Clarotti **[49]** reportó que por medio de plasma de argón conteniendo perfluorocarbono se presenta una polimerización de gases la cual produce un delgado y suave recubrimiento fluorocarbonado con propiedades hidrofóbicas sobre la superficie del polímero tratado, sin dañar las propiedades de la masa. Esta técnica ofrece un incremento en la biocompatibilidad y hemocompatibilidad de polisulfonas y polihidroxibutiratos.

Shué y colaboradores **[50]** aumentaron la bio y hemocompatibilidad de membranas de Poli (hidroxibutirato–co–hidroxivalerato) y polisulfonas con plasma de mezclas de perfluorohexano con óxido de etileno e hidrógeno para obtener recubrimientos hidrofóbicos, menos hidrofóbicos y medianamente hidrofóbicos, sin afectar su capacidad de filtrado.
Realizaron cultivos con células del islote de Langerhans sobre las membranas tratadas, en las membranas de PHB no se modificó la excelente biocompatibilidad que ellas tienen con los sistemas biológicos, mientras que la biocompatibilidad de los otros polímeros mejoró por la depositación de las capas de fluorocarbonos de los tratamientos.

Hasirci y colaboradores **[51]** mejoraron la absorción de películas de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHB) para utilizarse en la ingeniería de tejidos. Ellos utilizaron el plasma oxígeno para modificar las películas y cambiar su capacidad de absorción analizada por la medición de ángulos de contacto, así como su composición química y morfológica analizadas por las técnicas de XPS y SEM. De este modo observaron que existía una correlación directa entre el incremento en la concentración de grupos oxígeno en las superficies de las películas, aumentando de esta forma su hidrofilicidad.

Por lo tanto la modificación superficial puede ayudar a modificar la topografía de las películas, así como hacer ajustes químicos (modificar los grupos funcionales presentes) en dichas superficies para aumentar su aplicación en la ingeniería de tejidos, en las cuales las propiedades de adhesión y crecimiento celular son críticas.

Fukai y colaboradores **[52]** utilizaron películas de polietilenglicol (PEG) con grupos epoxidos y aldehídos como grupos funcionales, y estos fueron injertados con polietilentereftalato (PET) que contenían grupos amina y alcohol. Estos injertos fueron tratados con anterioridad con polialilamina (PAH) y polietilenamina (PEI). Dichos injertos fueron cuantificados y caracterizados por la técnica de XPS, basándose en el aumento del pico de carbono en el PEG. Además se realizaron pruebas de ángulo de contacto en las superficies, lo que dió como resultado que las superficies con cadenas más largas, mostraran ángulos bajos, a diferencia de estas las superficies de cadenas más cortas muestran ángulos mayores; esto indica que las superficies de cadenas largas son más hidrofílicas. Después de la inserción de las cadenas de PEG, la cantidad de proteínas adsorbidas en las superficies disminuyeron en todos los casos, las proteínas utilizadas fueron: colágeno, lisozima y albúmina.

Zhi Ding y colaboradores **[53]** inmovilizaron quitosan injertándolo en la superficie de Poli-L-ácido láctico (PLLA) por plasma, para controlar la morfología de células como fibroblastos y células de hígado. Las superficies de PLLA modificadas por los injertos de quitosan fueron caracterizadas por las técnicas de ángulos de contacto y XPS, demostrando que el espesor de dichos injertos fue de varios nanómetros. Ellos utilizaron dos líneas celulares; la L929 (fibroblastos de ratón) y la L02 (hepatocitos humanos), las cuales se cultivaron sobre las superficies de PLLA modificadas con quitosan y se encontraron con que las células podían propagarse ampliamente y tendían a ser redondas, pero podían proliferar casi a la misma velocidad que en los cultivos hechos en superficies de vidrio. Además las películas mostraron ser poco adherentes, lo que sugiere que otros substratos pueden ayudar a controlar la morfología de las células y tener un gran potencial en la ingeniería de tejidos.

Martínez-Reséndiz y colaboradores **[21]** realizaron la modificación de películas de poliestireno, policarbonato y poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) 8%. Estas películas fueron modificadas por dos diferentes plasmas, aire y nitrógeno, a diferentes tiempos de tratamiento y una potencia de 50 W. Las películas tratadas y sin tratar se pusieron en contacto con material biológico, como son las células sanguíneas (macrófagos y neutrofilos); esto para observar el comportamiento de dichas células al estar en contacto con los tres polímeros; para

esto se les realizaron pruebas biológicas que evaluaron la viabilidad y funcionalidad de las células sobre las superficies modificadas y sin modificar; además se realizaron pruebas de caracterización de los materiales modificados como son las mediciones de ángulos de contacto, MOP y SEM; estas dieron como resultado un aumento en la hidrofilicidad de las películas modificadas, así como se muestra en las figuras 39A a la 39E que presentan cambios en los ángulos de contacto debido a la variación en los tiempos de tratamiento. 1El ángulo de contacto disminuye en función del tiempo de tratamiento.

PS sin tratar (Figura 39A)

PS Tratado durante 15 s a 50 W (Figura 39B)

PS Tratado durante 30 s a 50 W (Figura 39C)

PS Tratado durante 2 min a 50 W (Figura 39D)

PS Tratado durante 5 min a 50 W (Figura 39E)

PS Tratado durante 30 min a 50 W (Figura 39F)

Figuras 39. Cambios en ángulo de contacto para PS tratado en plasma de aire

La figura 40 es una gráfica de medidas de ángulo de contacto de poliestireno modificado a tres diferentes tiempos por plasma de aire y nitrógeno, se observa que hay una disminución en el ángulo de contacto con respecto al tiempo de tratamiento, el plasma de nitrógeno genera

superficies mas hidrofílicas, ya que las muestras tratadas por este gas presentaron ángulos de contacto menores que las tratadas en plasma de aire.

La figura 41 es una gráfica de medidas de ángulo de contacto de polihidroxibutirato modificado en plasma de aire y nitrógeno a tres diferentes tiempos, en esta gráfica se observa que los ángulos de contacto disminuyen en función del tiempo de tratamiento; para este polímero el plasma de aire es el que genera ángulos de contacto menores.

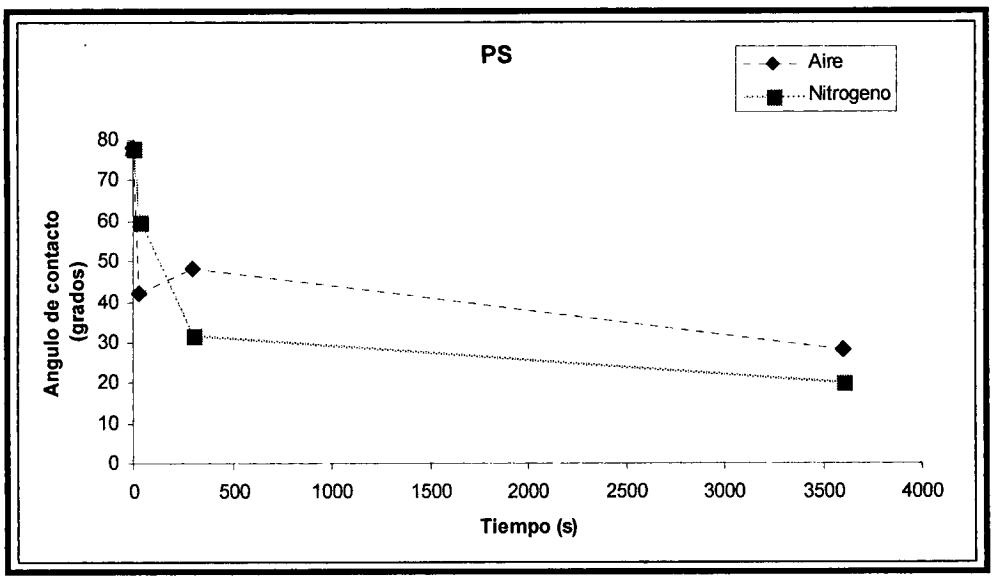


Figura 40. Poliestireno modificado a 30, 300 y 3600 s en plasma de aire y nitrógeno a 50 W de potencia

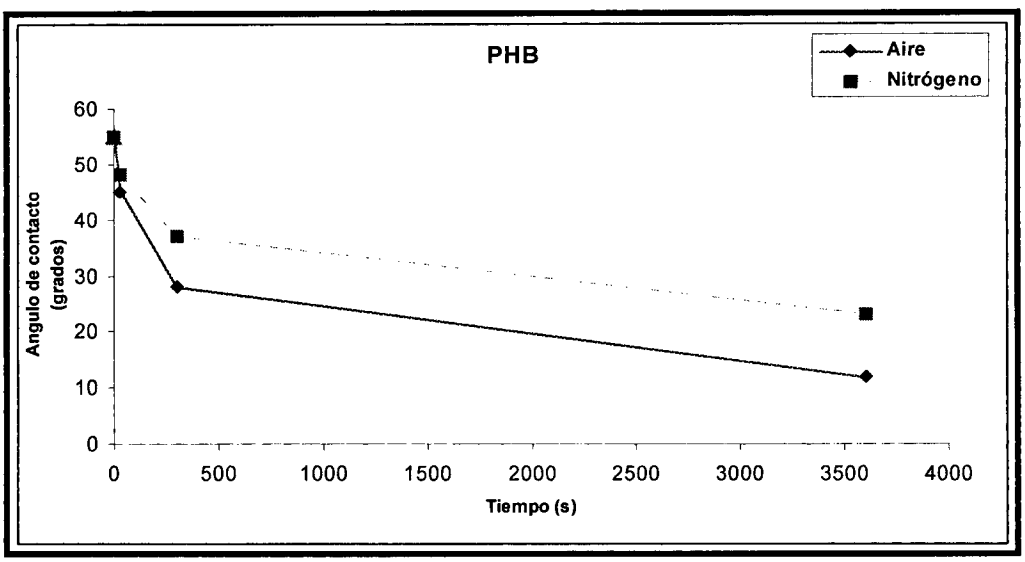
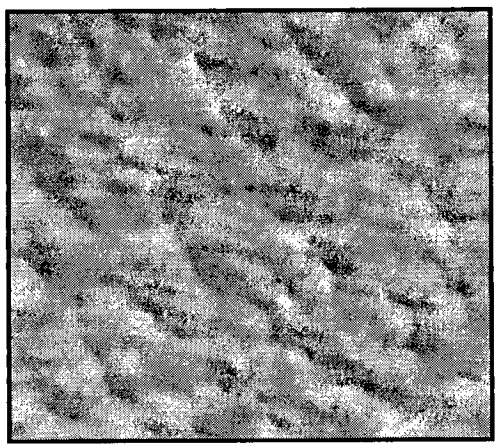
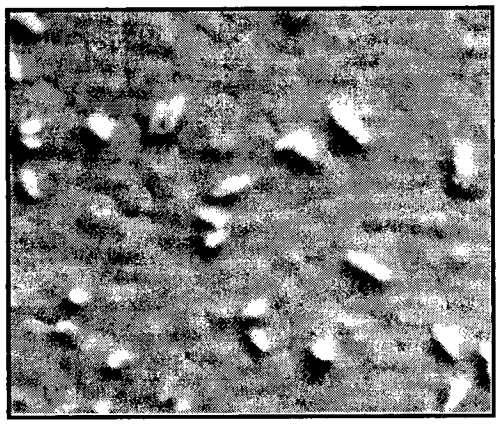


Figura 41. Poli hidroxibutirato modificado a 30, 300 y 3600 s por plasma de aire y nitrógeno a 50 W de potencia

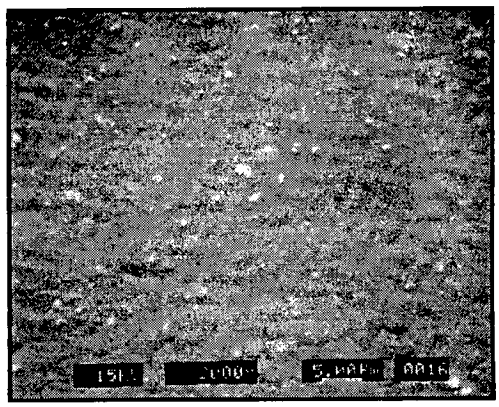
En las figuras 42, 42A y 42B, se presentan las micrografías de SEM de las películas de PHB sin tratar, tratadas a 30 seg. y 300 seg. a 50 W en plasma de nitrógeno. En las películas tratadas se observan partículas que pueden ser producto de la erosión de la superficie.



PHB Sin tratar



A) 30seg / 50 W Nitrógeno



B) 300seg / 50 W Nitrógeno

Figura 42. Cambios morfológicos en películas de PHB tratadas y sin tratar

VII. CONCLUSIONES

De acuerdo a la información encontrada en literatura a la fecha se puede concluir los siguiente:

- La superficie de los polímeros puede ser modificada por la técnica de plasma.

- El uso de esta tecnología nos permite modificar únicamente la superficie del polímero, sin afectar las propiedades en masa del material.

- Con plasma se mejoran propiedades superficiales específicas tales como: adhesión, incremento en la energía superficial, compatibilidad, bicompatibilidad, fricción, etc.

- La modificación superficial le proporciona a los polímeros la propiedades adecuadas para la interacción con sustancias biológicas.

- Las capas superficiales modificadas resisten la delaminación en soluciones acuosas y proteicas.

- Las superficies modificadas permiten el crecimiento y la adhesión de células y proteínas.

- Los biomateriales se adaptan a las propiedades fisiológicas del cuerpo humano, evitando reacciones adversas, tales como trombosis, inflamaciones e infecciones.

- Los biomateriales se pueden utilizar en la fabricación de biosensores, en bioseparación, cardiovascular, en cultivo de tejidos, en implantes dentales, en oftalmología, en ortopedía, en la industria farmaceútica, etc.

- En el presente estudio se ha generado una base de datos referente a la modificación superficial de polímeros y sus aplicaciones médicas. La información generada en este estudio será de gran utilidad para los estudiantes que al momento estan realizando sus tesis en el área de modificación de polímeros vía plasma.

VIII. REFERENCIAS

1.- Nasser E., "Fundamentals of gaseous Ionization and Plasma Electronics", Wiley Interscience, 1971.

2.- Loh I. H., "Plasma surface modification in biomedical application" AST Technical Journal , Advanced Surface Technology, **10** (1): 24-30,1999.

3.- http://www.windows.ucar.edu/tour/link=/sun/Solar_interior/Sun_layers/ Core/four_states.sp.html&edu=high.

4.- Venugopalan M., "Reactions under plasma conditions", Wiley Interscience, **11** (1) 1971.

5.- Grill A., "Cold plasma, in material fabrication", 9, Press. 1994.

6.- Braithwaite, "Plasma treatment of polymers" 2000.

7.- Sardani M., Denes F., Tappi Journal, **79** (8), 1996.

8.- Coates M., Kaplan L. S., "Modification of polymeric materials surface with plasma", Chapter IV of plasma processing of advance material, 1996.

9.- http://www.tecnicaenlaboratorios.com/Molecular/que_es_afm.htm

10.- Narro-Céspedes R. I., protocolo de tesis de doctorado, 2003.

11.- Shi F. F.,"Recent advances in polymer thin prepared by plasma synthesis, structural characterization, properties and application", Surface and Coating Technology, **82** (1) 1996.

12.- http://bibliotecnica.upc.es/PFC/arxius/migrats/36143-3.pdf

13.- http://www.ipfdd.de/research/res16/electro

14.- http://www.icmm.csic.es/fis/espa/xps_ups_aes_eels.html

15.- France R. M., tesis de doctorado, University of Sheffield, 1996.

16.- Neira- Velásquez M. G., trabajo realizado para el departamento de física-médica de la Universidad de Sheffield, Inglaterra, 1999.

17.- Gómez-Fernández A. C.,http://www.icmm.csic.es/fis/espa/xps_ups_aes_eels.html

18.- Neira-Velázquez M. G., tesis de doctorado, University of Sheffield, 2002.

19.- Lira F. M., López J. M., CINVESTAV

20.- http://www.monografias.com/trabajos7/micro/micro.shtml#tipods

21.- Martínez-Reséndiz Y., Orozco-Sifuentes M. M., Neira-Velázquez M. G., Ramos

-Cano A. I., trabajo experimental realizado en CIQA 2005.

22.- http://www.jenck.com/shim-spm9500-t.htm

23.- Brühl S. P.,"Diagnóstico de plasmas", Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Concepción del Uruguay, 2002.

24.- Oss V., C. J., J. Molec. Recogn., 3,128, 1990.

25.- Chan C., "Polymer surface modification and characterization", Hanser, Munich, Chapter 6, 1994.

26.- Chan C., Ko T., Hiraoka H., Surface Science Rep., **24** (1) 1996.

27.- Mittal K., Van Ooiji W., Journal Adhesion. Science Technology, **7** (10) 1993.

28.- Ratner B. D., " Surface modification of polymers: Chemical, Biological and Surface Analytical Challenges", Biosensors & Bioelectronics, **10,** 797-804, 1995.

29.- Yang J., Bei J., Wang S., "Improving cell affinity of poly(D,L-Lactice) film modified by anhydrous ammonia plasma treatment", Polymers for Advanced Technologies, **13**, 220, 2002.

30.- Ramirez B. D.,"Surface modification of polymers: Chemical, Biological and Surface Analytical Challenges", Biosensors & Bioelectronics, **10**, 797, 1995.

31.- Johansson B. L., Larsson A., Ocklind A., Öhrlund A., "Characterization of air plasma-treated polymer surfaces by ESCA and contac angle measurements for optimization of surface stability and cell growth", Journal of Applied Polymer Science **86**, 2618, 2002.

32.- Steele D., tesis de doctorado, University of Sheffield, 2000.

33.- Short R. D., Grupo de investigación de superficies de la Universidad de Sheffield, Inglaterra.

34.- Neira- Velásquez M. G., trabajo realizado para el departamento de física-médica de la Universidad de Sheffield, Inglaterra, 1999.

35.- Neira-Velázquez M.G., Narro- Céspedes R. I., trabajo experimental realizado en CIQA, 2004.

36.- Hsu, Hui S., Chen, Chih W., "Improved cell adhesion by plasma-induced grafting of L-lactide onto polyurethane surface", Biomaterials, **21**(4) 359-367, 2000.

37.-Masson M., Vereruysse K.P, Kirker K. R., Frisch R.,Marecak D. M., Prestwich G. D., Pitt W. G.,"Attachment of hyaluronic acid to polypropylene, polystyrene and

polytrtrafluoroethylene", Biomaterials, **21** (31) 2001.

38.- Yoon J. J., Nam Y. S., "Surface immobilization of galactose onto aliphatic biodegradable polymers for hepatocyte culture", Biotechnology and Bioengineering, **78** (1), 2002.

39.- Gerenser L. J., Adhesion Science Technology, **1,** 303, 1987.

40.- Occhiello E., Garbassi F., Coburn W., "Plasma chemical plasma process", **9** (3) 1989.

41.- Della Volpe C., Fambri L., Fenner R. , Journal Materials Science, **29**, 3919, 1994.

42.- Encyclopedia Polymer Science, 1990.

43.- Encyclopedia Polymer Science, "Surface modificaction", 1990.

44.- Kirch M., Birchler F., Wintermantel E., Transactions of the meeting of the society for biomaterials in conjunction with the internationals biomaterials symposium V soc. for biomaterials, USA., 564, 1996.

45.- Kang I., Seo E., Huh M., Kim K., Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, **12** (10), 1091, 2001.

46.- Kang I., Seo E. , Huh M., Kim K., Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, **36** (13), 2331, 1998.

47.- J. Dewez,, E. Lhoest, V. Detrait, C. Berger, Biomaterials Programme, Universite Catholique de Louvain, Place Croix du Sud 2/18, 1348 Louvain- La-Neuve, Belgium 1999.

48.- Lee J., Park J., Lee H., Polymer Research Laboratory , Korea Research Institute of Chemical Technology, 1982.

49.- Clarotti G., Scue F., Sledz A., Biomaterials, **13** (12), 832,1991.

50.- Shué F., Clarotti G., Sledz J., Mas A., Geckeler K. E., Göpel W., Orsettid A., Macromolecules Chemical Macromolecules Symposia **73** 217 – 236, 1993.

51.- Hasirci V., Tezcaner A., Hasirci N., Süzer S., Journal of Applied Polymer Science, **87**, 1285 – 1289, 2003.

52.- Fukai R., Dakwa P. H. R., Chen W., Journal of Polymer Science: Parte A Polymer Chemistry, **42**, 5389 – 5400, 2004.

53.- Ding, Z. J., Chen, Gao S., J., Chang, Zhang J., Kang E. T., Biomaterials **25**, 1059 – 1067, 2004.