

**Estudio Microgravimétrico De Recubrimientos De Policaprolactona En Medio De
Cultivo Celular Para Aplicaciones Biomédicas.**

Yineth Jisela Arias Centeno

Trabajo de Grado para Optar el título de Ingeniero Químico

Director

Darío Yesid Peña Ballesteros

Doctorado En Corrosión

Codirector

Nerly Deyanira Montañez Supelano

Doctorado En Ingeniería De Materiales

**Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ingenierías Físicoquímicas
Escuela de Ingeniería Química**

Bucaramanga

2021

Dedicatoria

A Dios por la vida que me permite disfrutar, por brindarme el conocimiento, las habilidades, perseverancia y su constante compañía en este camino.

A mi madre Martha Centeno y mis hermanos Yolima Rincón y Jhoan Centeno por su apoyo, esfuerzo, comprensión y amor durante esta etapa.

A David cuesta por sus constante palabras de ánimo y amor.

Yineth Jisela Arias Centeno

Agradecimientos

Al director del proyecto, el Ph.D. Darío Yesid Peña Ballesteros, por su acompañamiento y orientación.

A la Ph.D. Nerly Deyanira Montañez Supelano, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación y por compartir sus conocimientos y la orientación.

A los grupos de investigación GIC, CINTROP y GIMBA, a los laboratorios de Espectroscopía Atómica y de Microscopía de la Universidad Industrial de Santander y a la Universidad Nacional de Medellín por permitir el uso de sus instalaciones y equipos.

A la escuela de Ingeniería Química, su personal de apoyo y docentes que, mediante sus enseñanzas, y conocimientos nos formaron para nuestra vida profesional.

A nuestra alma mater la Universidad Industrial de Santander, por la formación brindada y las diferentes experiencias de vida que nos permitió compartir.

Tabla de contenido

	Pág.
Introducción	12
1. Objetivos	17
1.1. Objetivo general	17
1.2. Objetivos específicos	17
2. Metodología	18
2.1. Revisión bibliográfica:	18
2.2. Preparación de la solución polimérica:	18
2.3. Obtención del recubrimiento:	18
2.4. Análisis microgravimétrico:	19
2.5. Caracterización del recubrimiento:	19
2.5.1 SEM:	20
2.5.2 FT-IR:	20
2.5.3 Evaluación electroquímica del recubrimiento	20
3. Resultados y análisis	20
3.1. Caracterización de los recubrimientos	20
3.1.1 SEM	20
3.1.2 FT-IR	22

3.1.3 Evaluación electroquímica de los recubrimientos de PCL	23
3.2 Análisis microgravimétrico de los recubrimientos de PCL	28
4. Conclusiones	30
5. Recomendaciones.....	31
Referencias.....	32
Apéndices.....	36

Lista de tablas

Tabla 1. *Principales longitudes de ondas de los grupos funcionales en la PCL de un espectro*

FT-IR 22

Lista de Figura

	Pag.
figura 1. Diagrama de flujo del desarrollo experimental.	18
figura 2. micrografía del recubrimiento de PCL 1% p/v sobre el cristal de cuarzo a) 500X y b) 1.000X.....	21
figura 3. Micrografía del recubrimiento de PCL 2,5% p/v sobre el cristal de cuarzo a) 1000X y b) 2.000X	21
figura 4. Espectro FT-IR de los recubrimientos de PCL sobre el cristal de cuarzo.....	23
figura 5. Diagrama de Nyquist para el cristal desnudo y el recubrimiento de PCL a) día 1 y b) día 2 de inmersión.....	25
figura 6. circuito equivalente que describe el proceso superficial para los recubrimientos y el cristal.....	27
figura 7. Variación de la R_{tc} para los días de inmersión del cristal y el recubrimiento de PCL en medio de cultivo.....	27
figura 8. Masogramas de los recubrimientos de PCL y el cristal desnudo a) día 1 y b) día 2.....	29

Lista de apéndice

	Pág.
Apéndice A. Diagrama de Bode para las muestras a) día 1 y b) día 2 en contacto con medio de cultivo celular.....	37
Apéndice B parámetros calculados del circuito equivalente.....	38

Abreviaturas

AA	Ácido Acético
EIS	Espectroscopia de Impedancia Electroquímica
EQCM	Microbalanza Electroquímica De Cristal De Cuarzo
FT-IR	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier
PCL	Policaprolactona
QCM	Microbalanza de Cristal de Cuarzo
SEM	Microscopia Electrónica de Barrido

Resumen

Título: Estudio Microgravimétrico De Recubrimientos De Policaprolactona En Medio De Cultivo Celular Para Aplicaciones Biomédicas*.

Autor: Arias Centeno, Yineth Jisela **.

Palabras Clave: Policaprolactona, Microbalanza De Cristal De Cuarzo, Espectroscopía De Impedancia Electroquímica, Spin Coating.

Descripción: En este trabajo se obtuvieron recubrimientos homogéneos de Policaprolactona (PCL) a concentraciones de 1% y 2,5% p/v sobre cristales de cuarzo Au-Cr aplicando la técnica Spin Coating, se realizó una caracterización morfológica de los recubrimientos con la técnica Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), también se realizó un análisis químico del recubrimiento empleando la técnica Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR). Así mismo con la técnica microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo (EQCM), se evaluaron los cambios de masa que ocurren en la superficie del recubrimiento, se estudió la adsorción de especies provenientes del electrolito (medio de cultivo) y se evaluó el comportamiento electroquímico del recubrimiento mediante la técnica espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS).

Los datos obtenidos con la técnica EQCM muestran que el recubrimiento de PCL a una concentración de 2,5% p/v presentó mayor resistencia a la transferencia de carga al segundo día de medición y es más estable al estar en contacto con el medio de cultivo, haciéndolo óptimo para aplicaciones biomédicas. El recubrimiento de menor concentración mostró más afinidad hacia el medio de cultivo produciendo un hinchamiento en la capa polimérica y posterior degradación durante los días de inmersión, causando una pérdida de masa con un valor de $0,247\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Darío Yesid Peña Ballesteros. Doctorado en corrosión. Codirector: Nerly Deyanira Montañez Supelano. Doctorado en Ingeniería de Materiales.

Abstract

Title: Microgravimetric Study Of Polycaprolactone Coatings In cell Culture Medium For Biomedical Applications *.

Author: Arias Centeno, Yineth Jisela **

Key Words: Polycaprolactone, Quartz Crystal Microbalance, Electrochemical Impedance Spectroscopy, Spin Coating.

Description: in this work, homogeneous Polycaprolactone (PCL) coatings were obtained at concentrations of 1% and 2.5% w / v on quartz crystals applying the Spin Coating technique, a morphological characterization of the coatings was performed with the Scanning Electron Microscopy technique. (SEM), a chemical analysis of the coating was also performed using the Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) technique. Likewise, with the electrochemical quartz crystal microbalance (EQCM) technique, capable of quantitatively measuring the small mass changes that occur on the surface of the coating, the adsorption of species from the electrolyte (culture medium) was also evaluated. the interfacial behavior with this technique.

The data obtained with the EQCM show that the 2.5% w / v PCL coating presented greater resistance to charge transfer and is more stable when in contact with the culture medium, which makes it optimal for biomedical applications. The coating of lower concentration showed more instability in its masogram obtained with the QCM presented a loss of mass of $0.247 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ during the days of immersion.

* Degree Work

**Faculty of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director: Darío Yesid Peña Ballesteros. Doctorate in corrosion. Co-director: Nerly Deyanira Montañez Supelano. PhD in Material Engineering.

Introducción

En los últimos años, en el área de regeneración ósea, se han empleado materiales de diferente naturaleza como son los metales, cerámicos y polímeros, estos últimos cuentan con gran aplicación debido que sin importar que sean de tipo natural o sintético muchos de ellos cuentan con propiedades biocompatibles y biodegradables, esto hace que sean más tolerados por el cuerpo humano, facilitando su uso en la industria biomédica. De ahí la importancia de estudiar la propiedad de biodegradación de estos materiales, para determinar la estabilidad en el proceso de osteointegración, también se busca estudiar el comportamiento o sus características en una interfaz biológica para optimizar la adsorción de proteínas que ayudan a estimular el crecimiento celular para la regeneración en la superficie (Lavado Garcia , Estepa Fernández, Domínguez Flores, & Rodríguez Fernández, 2013).

Un polímero empleado en aplicaciones biomédicas es la policaprolactona (PCL) que tiene características peculiares como: semicristalino, biodegradable con buenas propiedades mecánicas, fácil de procesar, compatible tanto con tejidos duros como blandos y aceptado por la FDA (Food and Drug Administration). En condiciones fisiológicas, se hidrolizan los enlaces ésteres, a una velocidad muy lenta, por lo que es aplicado como material para la implantación de dispositivos en el cuerpo humano a largo plazo (Lavado Garcia , Estepa Fernández, Domínguez Flores, & Rodríguez Fernández, 2013). Kim HW *et al* investigaron la morfología, las propiedades mecánicas y el comportamiento de biodegradación de recubrimiento compuesto de HA-PCL, donde la lenta degradación del PCL resulto beneficiosa cuando lo que se busca es liberar medicamentos o proteínas a largo plazo (Kim, Knowles, & Kim, 2004). La PCL es útil en la producción de fibras electrohiladas que simulan la matriz extracelular. Sin embargo, su hidrofobicidad limita la

adhesión y proliferación celular. Con la finalidad de mejorar su hidrofobicidad, propiedades mecánicas y térmicas de membranas que se emplearon como base de matriz extracelular, se mezcló con polímeros hidrofílicos y materiales naturales que faciliten la adhesión celular (Barrera, 2014). Fang R. *et al* (2010) mostraron que la PCL se ha combinado con varios materiales basados en fosfato calcio con el propósito de obtener mejores propiedades mecánicas y biológicas y algunos de estos materiales se han aplicado en regeneración ósea (Fang, Zhang , Xu , & Wei , 2010). Se encuentra que el uso de fibras de PCL con partículas de HA facilita la actividad celular y muestra buena bioactividad (Wutticharoenmongkol, Sanchavanakit , & Pavasant , 2006).

Durante las últimas décadas un método de obtención de películas finas es el Spin Coating, el proceso consiste en la deposición de una pequeña cantidad de sustrato en el centro de la pieza a recubrir para durante o posteriormente hacerla girar. La aceleración centrífuga hace que la gota depositada se extienda y se obtenga la fina capa de sustrato sobre la pieza. El espesor de la película y otras propiedades dependen de la naturaleza del sustrato (viscosidad, velocidad de secado, porcentaje de sólidos, tensión superficial, etc.) y de los parámetros elegidos durante el proceso de giro. Factores como la velocidad de rotación, aceleración, y vapores contribuyen a la definición de las propiedades de la película depositada (Gonsalve García, 2005). En el 2016 Iliane Rafaniello utilizó como disolvente el diclorometano para preparar una mezcla polimérica de polietilenglicol, para obtener recubrimientos sobre cristales de cuarzo por spin-coating, con el fin de realizar mediciones con la QCM y el SPR (Resonancia superficial de plasmones) (Rafaniello, 2016). Este estudio demuestra que la técnica es una opción propicia al momento de obtener recubrimientos sobre cristales de cuarzo.

La técnica de Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS, por sus siglas en inglés), es un método electroquímico utilizado para interpretar el comportamiento de las interfaces

electrolito/electrodo, el cual se basa en el uso de una señal de corriente alterna (CA) que es aplicada al electrodo y generalmente los datos obtenidos son ajustados a modelos de circuitos equivalentes para su interpretación. Comúnmente se aplica una pequeña señal de potencial (E) a un electrodo y se mide su respuesta en corriente (I) a diferentes frecuencias, en ciertas circunstancias, es posible aplicar una señal pequeña de corriente y medir la respuesta en potencial-tiempo y corriente-tiempo, dando como resultado una serie de valores de impedancia correspondientes a cada frecuencia estudiada. Esta relación de valores de impedancia y frecuencia se denomina “espectro de impedancia” (Mendoza Flores, Duran Romero, & Genesca LLon). Las aplicaciones más importantes de la técnica de EIS dentro del campo de los biomateriales, son la caracterización de la interfase biomaterial/fluido humano, el análisis de recubrimientos, el estudio de los procesos de adsorción de proteínas sobre la superficie y las propiedades de la interfase en función del acabado superficial del biomaterial. (Vázquez , 2007)

La microbalanza de cristal de cuarzo es una técnica acústica donde el equipo aplica una corriente alterna y los sensores que se utilizan son unos discos muy finos de cuarzo que están recubiertos por cada lado con un electrodo. Normalmente los electrodos están hechos de oro y pueden ser recubiertos por una amplia variedad de materiales. Gracias al carácter piezoeléctrico del cuarzo, cuando se aplica la corriente alterna sobre el sensor, este oscila a una determinada frecuencia de resonancia. La frecuencia de resonancia depende de la masa total que oscila, del sensor y también de las capas que se adhieren en la superficie de este. Durante un experimento con este equipo, se miden dos parámetros a tiempo real a medida que se va formando una capa en la superficie. Estos parámetros son la frecuencia y la disipación. El primer parámetro entrega información sobre el grosor de la película que se ha formado y sobre la cantidad de masa que se ha adsorbido en la superficie. En cambio, el segundo parámetro da una idea sobre la viscoelasticidad de la película, es decir, permite deducir la

rigidez de dicha película. Cuando algo se deposita sobre el sensor, la frecuencia disminuye (Rafaniello, 2016).

La electrogravimetría está basada en una microbalanza de cuarzo electroquímica (EQCM) usada en régimen dinámico. Donde la señal de salida del sistema (QCM), puede ser considerada como una señal de frecuencia modulada, en el cual la señal moduladora es la tensión senoidal aplicada a la celda electroquímica. La frecuencia de resonancia del QCM está en el rango de los MHz, mientras que la perturbación aplicada se encuentra en un rango de frecuencia de 1 MHz a 1 KHz (Montagut Ferizzola, 2011). Es una herramienta valiosa en investigaciones de procesos interfaciales como: La corrosión, la intercalación de iones, la adsorción de iones y el hinchamiento del polímero. Es una técnica de bajo costo en comparación con otras técnicas utilizadas en electroquímica (Varela, Malta, & Torresi, 2000).

La Espectroscopía Infrarroja (FT-IR) se basa en la excitación de los modos de vibración y rotación de los enlaces entre los átomos al ser irradiados con un haz de luz infrarroja. Cada molécula, según las características de sus enlaces absorberá radiación de una o varias longitudes de onda específicas por lo que podrá ser identificada. Los espectros de absorción, emisión y reflexión en el infrarrojo, de especies moleculares, se pueden explicar asumiendo que todos son el resultado de los distintos cambios energéticos producidos en las transiciones de las moléculas de unos estados de energía vibracionales y rotacionales a otros (Albella, 1993).

El microscopio electrónico de barrido (SEM, Scanning Electron Microscopy) es uno de los instrumentos más versátiles para el examen y análisis de características microestructurales de sólidos; proporciona información morfológica y topográfica de la superficie de estos. Una de las razones de ello es su alta resolución (de 20 a 50 Å) (Goldstein & Yakowitz, 1977).

El presente trabajo, evaluó el comportamiento microgravimétrico de recubrimientos de policaprolactona a diferentes concentraciones en medio de cultivo celular, por medio de la microbalanza de cristal de cuarzo QCM200, que permitió medir en tiempo real y en el orden de

microgramos las interacciones biomoleculares sobre la superficie del polímero. Cuando se emplea la técnica electroquímica EIS en simultáneo con la QCM, se busca información adicional sobre las propiedades eléctricas superficiales y características interfaciales de la policaprolactona en contacto con el medio de cultivo celular.

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Evaluar el comportamiento microgravimétrico de un recubrimiento de policaprolactona en medio de cultivo celular por medio de microgravimetría piezoeléctrica QCM200.

1.2. Objetivos específicos

- Obtener recubrimientos homogéneos de policaprolactona sobre cristales de cuarzo Au-Cr por medio de la técnica Spin-Coating.
- Caracterizar fisicoquímicamente los recubrimientos obtenidos mediante las técnicas SEM, FT-IR.
- Evaluar electroquímicamente los recubrimientos mediante microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo EQCM y espectroscopía de impedancia electroquímica.

2. Metodología

Para el desarrollo de las pruebas experimentales del proyecto, se empleó la metodología que se muestra en la figura 1.

figura 1.

Diagrama de flujo del desarrollo experimental.



2.1.Revisión bibliográfica: la recopilación de información permitió tener una perspectiva más completa de los temas relacionados con el estudio microgravimétrico y la técnica EQCM. La búsqueda de la información se realizó con la ayuda de las bases de datos de la Universidad Industrial de Santander de artículos y libros especializados.

2.2.Preparación de la solución polimérica: La policaprolactona (PCL) se disolvió en ácido acético glacial (AA), con el fin de preparar soluciones a 2.5% y 1% p/v, para obtener soluciones dispersas uniformemente se colocaron en agitación mecánica durante 4 horas a temperatura ambiente. (Herrera & López, 2018)

2.3 Obtención del recubrimiento: Se utilizó la técnica Spin Coating, para obtener recubrimientos homogéneos. Para ello, con la ayuda de una micropipeta se depositó 100 μ L de solución polimérica en la probeta (cristales de cuarzo Au-Cr, con una pulgada de diámetro), para

así obtener cuatro probetas recubiertas con las dos concentraciones del polímero. Se llevó a cabo la deposición de 5 capas. Las dos primeras se llevaron a cabo a 3000 rpm, mientras que las otras 3 se realizaron a 4000 rpm en un tiempo de 30 segundos. Con el fin de mejorar la adhesión del recubrimiento, se aplicó un secado en una estufa a las condiciones de 50°C durante 10 minutos entre cada deposición de la película polimérica. (Herrera & López, 2018)

2.4 Análisis microgravimétrico: Se empleó una microbalanza de cristal de cuarzo QCM200 con interfaz de RS-232, un contador de frecuencia y un medidor de resistencia incorporados. Se utilizaron cristales piezoeléctricos con frecuencia de resonancia de 5MHz, recubiertos con PCL por una de sus caras, la cual se encontraba en contacto con el medio de cultivo (electrolito). El cristal de cuarzo se colocó en un holder, donde se le acomodó una celda electroquímica, en la cual se llenó de medio de cultivo con un volumen de 3000 µl. Posteriormente se conectó a la QCM por medio de un oscilador de cristal QCM25. El montaje se llevó a una incubadora para simular el ambiente del cuerpo humano (37°C) antes de hacer el montaje, la celda se debe exponer a luz UV para evitar la propagación de hongos o bacterias que alteren el medio de cultivo. Al finalizar el montaje se procedió a realizar la toma de datos con la QCM200, el tiempo de análisis es de una hora, el día uno se hacen dos mediciones y se repiten al día siguiente. Todas las mediciones se hicieron por duplicado, para cada concentración de PCL y el cristal desnudo.

2.5 Caracterización del recubrimiento:

Con el fin de analizar la morfología del recubrimiento de PCL sobre el cristal de cuarzo se utilizó la técnica microscopía electrónica de barrido (SEM), con la técnica espectrometría infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) se determinó los grupos funcionales de la PCL.

2.5.1 SEM: se utilizó un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 650, se obtuvieron las imágenes con los electrones secundarios y a un voltaje de 20 kV.

2.5.2 FT-IR: Se trabajó con un espectrómetro Nicolet iS50, con la técnica de reflexión total atenuada (ATR), 32 SCAN y una resolución de 4 cm^{-1} , en un intervalo de número de onda entre 4000 a 400 cm^{-1} .

2.5.3 Evaluación electroquímica del recubrimiento: Con el fin de determinar la compatibilidad e interacción del recubrimiento con el medio de cultivo. Se empleó, un potenciostato GAMRY 600, utilizando como contraelectrodo un alambre de platino, un electrodo de referencia Ag-AgCl y como electrodo de trabajo un cristal de cuarzo. Las pruebas de potencial en circuito abierto (OCP) se llevó a cabo durante 600 segundos, con el fin de alcanzar la estabilización del sistema. Para la realización de las pruebas de EIS, se trabajó con un voltaje de 10 mV, con un rango de frecuencias desde 0.01 Hz hasta 100,000 Hz y con una densidad de 7 puntos por década. Se realizaron tres mediciones electroquímicas el día 1 y se repitieron al día siguiente. La primera se realiza sin el oscilador de cristal QCM25 y las otras dos con el encendido del oscilador de cristal QCM25.

3. Resultados y análisis

3.1 Caracterización de los recubrimientos

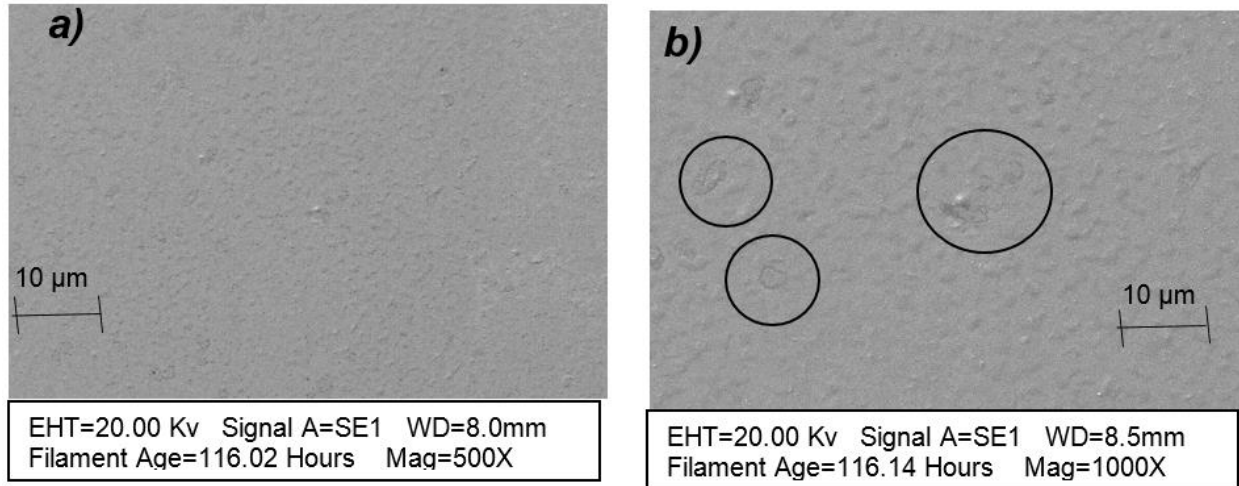
3.1.1 SEM

En la figura 2a se aprecia la micrografía obtenida del recubrimiento de PCL 1%p/v sobre el cristal de cuarzo, a una magnitud de 500 se observa unos gránulos de polímero es probable que no

se disolvieran bien durante la preparación de la solución polimérica, ocasionando un recubrimiento más grueso, además el recubrimiento es homogéneo, para una magnitud 1.000 se hacen notorias irregularidades que se asocian al atrapamiento de aire entre el recubrimiento y el cristal, destacadas en círculos negros de la figura 2b (Estupiñán, Vásquez , & Peña, 2011).

figura 2.

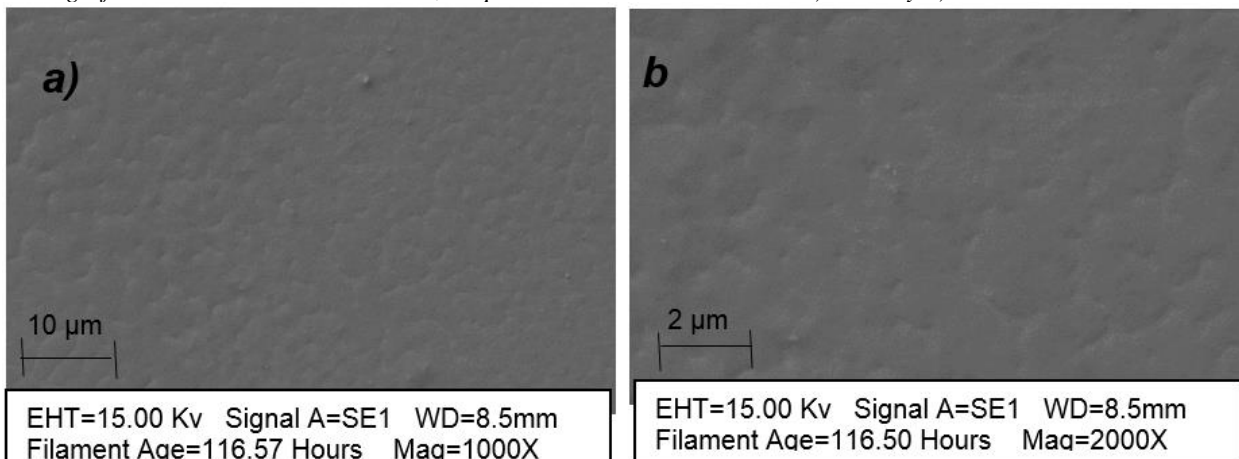
micrografía del recubrimiento de PCL 1% p/v sobre el cristal de cuarzo a) 500X y b) 1.000X



En la figura 3 se observa el recubrimiento de PCL a 2,5 % P/V sobre el cristal de cuarzo, se muestra mayor disolución del PCL formando una superficie más lisa y homogénea comparado con el recubrimiento de PCL a 1% p/v, en esta figura se observa que hubo mejor adhesión del recubrimiento sobre el cristal ya que no se presentan ninguna irregularidad.

figura 3.

Micrografía del recubrimiento de PCL 2,5% p/v sobre el cristal de cuarzo a) 1000X y b) 2.000X



3.1.2 FT-IR

Los espectros de transmitancia FT-IR de los recubrimientos de PCL a las concentraciones empleadas sobre el cristal de cuarzo se muestran en la figura 4. El espectro obtenido se comparó con la literatura, y se comprueba que el número de onda de 1720 cm^{-1} a 1730 cm^{-1} se asigna el enlace carbonilo (C=O) en modo de estiramiento. El estiramiento asimétrico del (CH) se asignó en un rango número de onda de 2950 cm^{-1} a 2920 cm^{-1} . El estiramiento simétrico del metileno (CH) corresponde al número de onda de 2859 cm^{-1} a 2844 cm^{-1} . En cuanto a los enlaces C-O y C-C de la fase cristalina de la cadena principal de la PCL se encuentran en el rango número de onda 1293 cm^{-1} a 1281 cm^{-1} . En la tabla 1 se presentan los principales grupos funcionales que se identifican en los espectros FT-IR de la PCL, de acuerdo con (Elzein, Nasser-Eddine, Bistac, & Dumas, 2004).

El espectro de absorción FT-IR obtenido por Zhang, Qiang, et al. en la investigación sobre Caracterización de andamios fibrosos de policaprolactona / colágeno por electro spinning y su bioactividad, presentaron número de ondas a 1241 cm^{-1} y 961 cm^{-1} en los estiramientos del C-O-C simétrico y asimétrico respectivamente (Zhang & Qiang, 2015). Resultados similares fueron obtenidos para el espectro FT-IR con los recubrimientos de PCL.

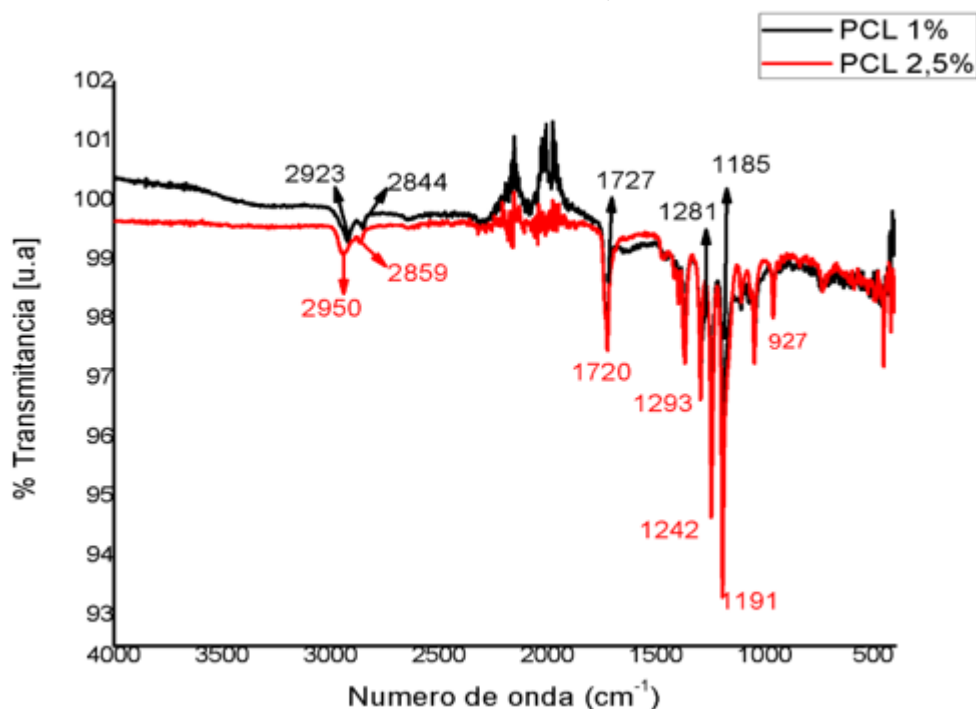
Tabla 1

Principales longitudes de ondas de los grupos funcionales en la PCL de un espectro FT-IR.

Grupo funcional	Longitud de onda (cm^{-1}) PCL (Elzein, Nasser-Eddine, Bistac, & Dumas, 2004)
Estiramiento asimétrico CH	2942
Estiramiento simétrico CH	2863
Estiramiento carbonilo C=O	1723
Estiramiento C-C y C-O en fase cristalina	1291

figura 4

Espectro FT-IR de los recubrimientos de PCL sobre el cristal de cuarzo.



3.1.3 Evaluación electroquímica de los recubrimientos de PCL

La técnica EIS fue empleada para hacer la caracterización de la interfase polímero/electrolito y estudiar los procesos superficiales que se llevan a cabo. Los datos obtenidos durante las pruebas electroquímicas se representan gráficamente por diagramas de bode y Nyquist. La interpretación de los diagramas se facilita cuando se divide el eje de la frecuencia en 3 regiones: altas frecuencias (100000 Hz -100Hz), medias frecuencias (100 Hz- 1Hz) y bajas frecuencias (1Hz- 0.01Hz). También se debe ajustar a un modelo de circuito eléctrico para su análisis, el ajuste se realiza por una simulación con el software Zview de los diagramas de bode y Nyquist. A través del circuito eléctrico se proporciona información relacionada con la resistencia de la solución (R_s), es la presente entre el electrodo de trabajo y el de referencia, dicho valor depende de la concentración de iones y está determinado por el límite a altas frecuencias del eje real en el diagrama de Nyquist. Por su parte la resistencia a la transferencia de carga (R_{tc}) representa la reacción llevada a cabo en

la superficie del metal al estar en contacto con el electrolito, midiendo la estabilidad electroquímica del sistema. El límite a bajas frecuencias en el eje real representa la suma de las 2 resistencias mencionadas anteriormente (Saavedra, 2014). La capacitancia de la doble capa (C_p) está relacionada con las interacciones que tienen lugar en la interfase electrodo/electrolito, el valor de la capacitancia se puede calcular en el punto máximo de la frecuencia. En muchos sistemas reales las curvas de los espectros de impedancia medidos en el gráfico de Nyquist son un arco de círculo en vez de un semicírculo, esto se le atribuye a la rugosidad y falta de homogeneidad de la superficie del sólido (Juttner, 1990.), este desfase hace el empleo de un elemento de fase constante (CPE) en vez de una capacitancia pura. El CPE puede representar varios elementos eléctricos dependiendo de su valor puede ser una capacitancia, inductancia o impedancia de Warburg. Para lograr unos buenos resultados es necesario trabajar con un amplio rango de frecuencia para permitir que el componente imaginario de la impedancia se aproxime a 0 en el diagrama de Nyquist (Vázquez, 2007).

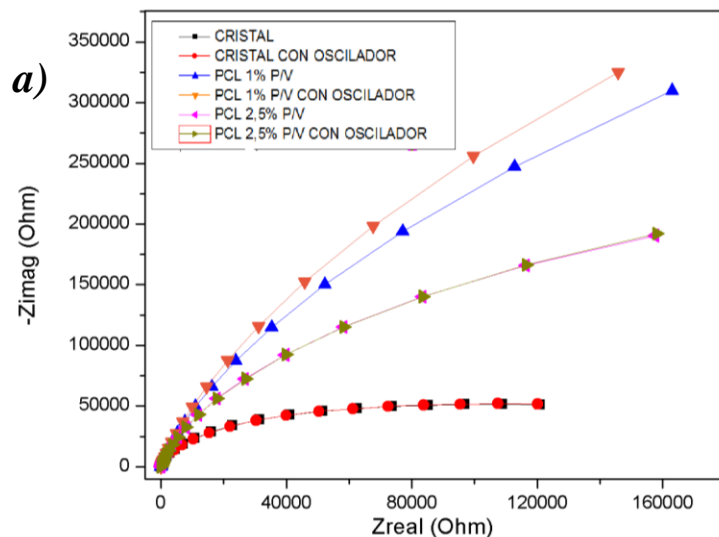
En la figura 5 se muestran los espectros de Nyquist obtenidos de las pruebas realizadas al cristal y al recubrimiento en contacto con el medio de cultivo celular, en el anexo A se encuentran los diagramas de bode obtenidos de las pruebas realizadas. El diagrama de Nyquist muestra los espectros de impedancia para el cristal y el recubrimiento de PCL a los diferentes tiempos de exposición al medio de cultivo, estos tienen la misma tendencia, los domos no se presentan completos y se puede observar la presencia de un arco de círculo para todos los casos evaluados, esta característica está relacionada con la presencia de una constante de tiempo. El diagrama de bode del anexo A muestra a bajas frecuencias un comportamiento capacitivo, que está relacionado con la transferencia de carga de la interfase cristal/recubrimiento y a altas frecuencias, un

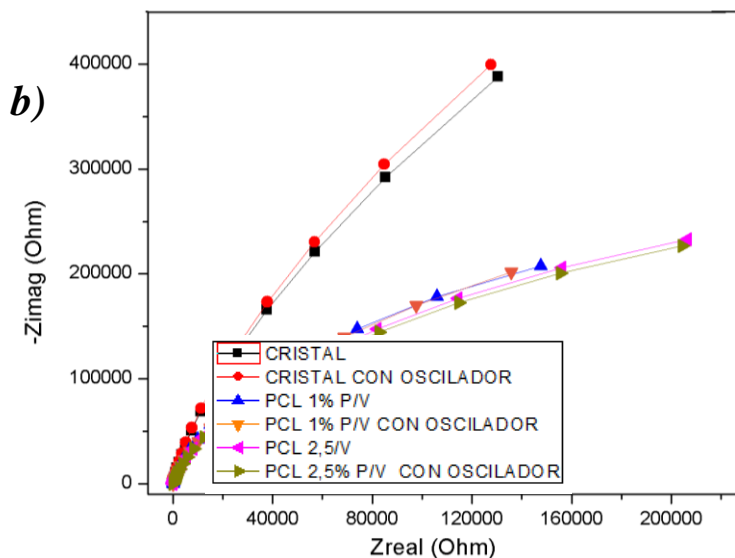
comportamiento resistivo que define los procesos de transferencia vinculados a la interfase recubrimiento/electrolito (Aldana, Estupiñan , Vásquez , & Peña , 2009).

En la figura 5a, se puede observar que los recubrimientos de PCL para las diferentes concentraciones presentaron mayor altura de los domos, describiendo una mayor resistencia a la transferencia de carga, debido a que el ingreso de iones presentes en el electrolito (medio de cultivo celular) al polímero es escaso, dado que el recubrimiento presenta una superficie homogénea (Prada Ramirez & Briceño Aparicio, 2015). También cabe resaltar que el recubrimiento de menor concentración presentó menor resistencia a la transferencia de carga cuando se tenía apagado el oscilador del cristal y para el recubrimiento de mayor concentración tiene la misma tendencia, esto se le atribuye a que no afectó la compatibilidad de la capa polimérica hacia el cristal. La figura 5b, muestra que el recubrimiento de menor concentración obtuvo valores de impedancia menores en comparación al primer día, esta disminución se da por el ingreso de iones en el polímero esto lo hace sensible a la degradación, además el recubrimiento de 2,5% p/v de PCL presentó una estabilidad de la impedancia, por tanto, fue más resistente al ingreso de iones en la capa polimérica procedentes del electrolito (medio de cultivo).

figura 5.

Diagrama de Nyquist para el cristal desnudo y el recubrimiento de PCL a) día 1 y b) día 2 de inmersión.



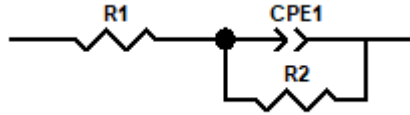


El circuito equivalente representado en la Figura 6 corresponde al más sencillo al que es posible ajustar los datos experimentales, cuando sólo se tiene en cuenta la transferencia de carga (Vázquez, 2007). Los espectros obtenidos, se ajustaron con el software Z view 3.5e, en este caso, se representa mediante una combinación en paralelo de una resistencia R_2 es la suma en serie de la resistencia a la transferencia de carga de la interfase cristal-polímero y la resistencia a la transferencia de carga polímero-electrolito en la zona de altas frecuencias (Contreras Arenas, Sotomonte Motta, Vasquez Quintero, & Montañez Supelano, 2010) y una capacitancia $CPE1$ originado por la capacitancia de la doble capa que se genera en la interfase del recubrimiento y electrolito (medio de cultivo) (Páez & Rueda, 2012), ambas en serie con otra resistencia R_1 es la resistencia del electrolito (medio de cultivo celular). En el anexo B se exponen los valores obtenidos para los elementos del circuito equivalente del cristal y los recubrimientos. El valor de $CPE1-p$ para los recubrimientos de PCL a las diferentes concentraciones y el cristal presentaron un comportamiento capacitivo para los dos días de medición, se da debido a la doble capa eléctrica que se origina al aplicar una diferencia de potencial que polariza los electrodos, haciendo que los

iones procedentes de la solución se absorban en la superficie del recubrimiento, generando un aislamiento que ocasiona el comportamiento capacitivo (Herrera & López, 2018).

figura 6

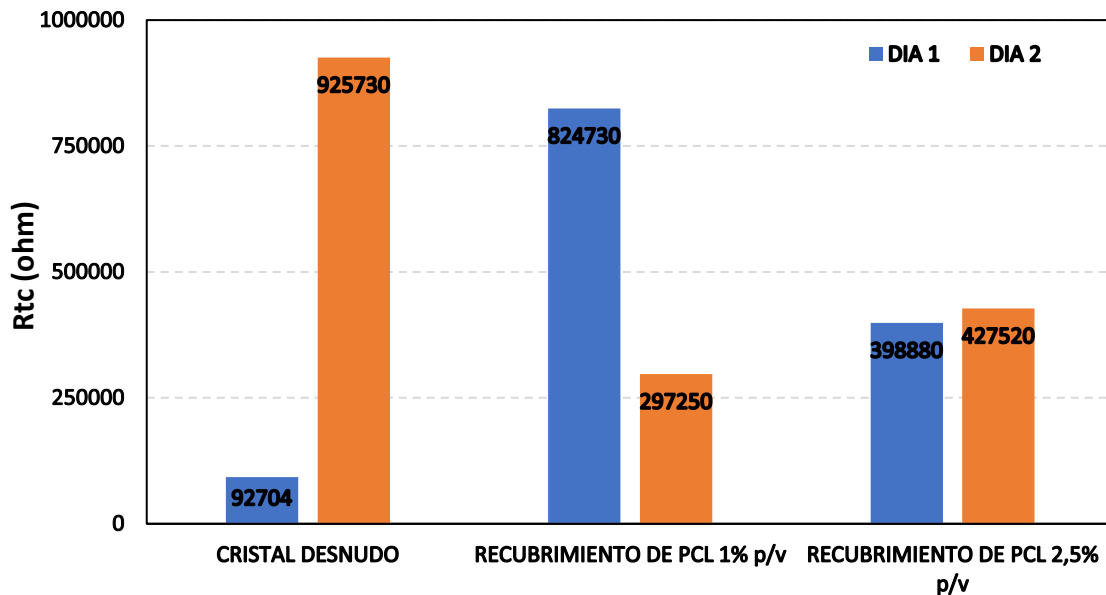
circuito equivalente que describe el proceso superficial para los recubrimientos y el cristal.



Para evaluar la degradación del recubrimiento se observa como varia el R_{tc} durante los días de inmersión en el medio de cultivo. En la figura 7 se muestra que el recubrimiento a la concentración de 1% p/v de PCL disminuyó el R_{tc} para el segundo día, esto se le atribuye a una degradación del recubrimiento, Gallardo *et al* afirma que la R_{tc} es inversamente proporcional al área de delaminación (Gallardo, Durán, & de Damborenea, 2004). Para el recubrimiento con 2.5% p/v, hubo una mayor resistencia al segundo día de evaluación con respecto al recubrimiento con concentración de 1% p/v. Esto probablemente se deba a una mayor resistencia a la degradación, por el efecto que ejerce el medio de cultivo.

figura 7.

Variación de la R_{tc} para los días de inmersión del cristal y el recubrimiento de PCL en medio de cultivo



3.2 Análisis microgravimétrico de los recubrimientos de PCL

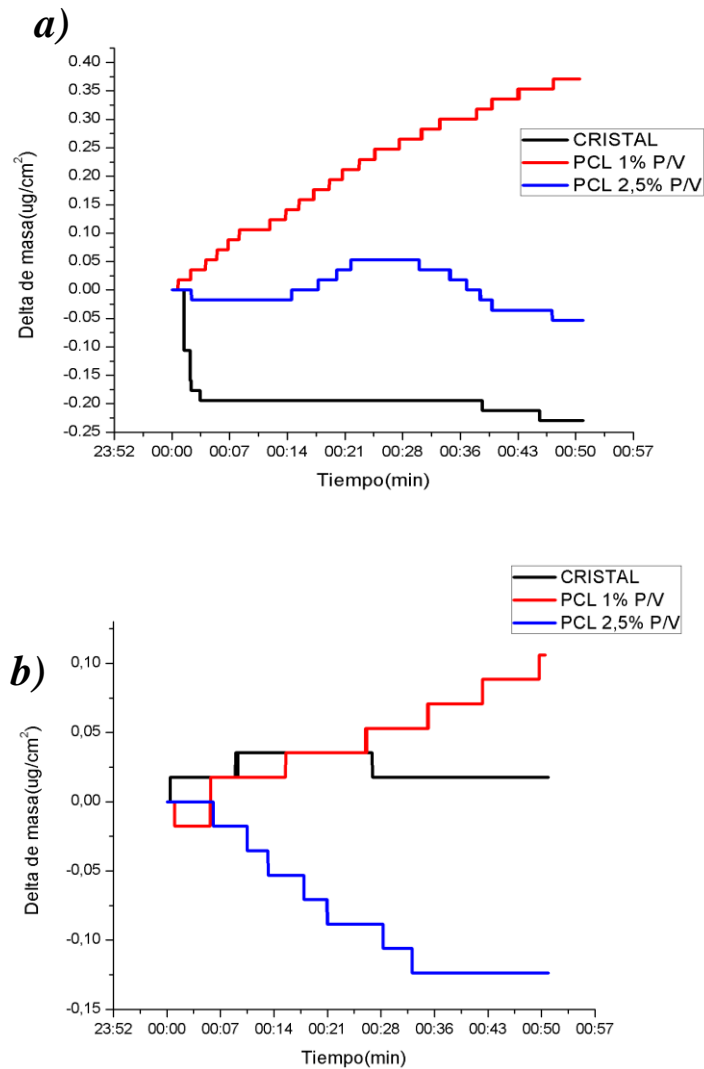
La técnica QCM es empleada para estudiar los cambios de masa que se puedan llegar a presentar en los recubrimientos de PCL como consecuencia de la interacción con el medio de cultivo. Ya que la relación de Sauerbrey predice una relación lineal entre la masa perdida o adsorbida y el cambio de frecuencia (Arnau, Sogorb, Jiménez, & Gómez, 2002). Cuando se realizan pruebas usando la QCM con líquidos, la ecuación de Sauerbrey no es válida, ya que las medidas en estas condiciones son más complejas porque depende de la viscosidad y densidad de la solución e influye en la medida de la frecuencia de resonancia (Systems, 2005). Sin embargo, la ecuación se puede utilizar en determinadas condiciones, donde los cambios de viscoelásticos no presentan una variación significativa. En los resultados obtenidos, se observó una relación lineal entre el cambio de masa respecto a el cambio de frecuencia, por lo tanto, la ecuación de Sauerbrey puede ser aplicada (Parada Quinayá & Peña Ballesteros , 2011).

La figura 8 muestra los masogramas de los recubrimientos y el cristal obtenidos de la QCM debido al contacto con el medio de cultivo. El recubrimiento de PCL 1% p/v presentó una ganancia de masa constante durante los días de inmersión en el medio de cultivo, , esto se atribuye a la presencia de poros, favoreciendo el ingreso de iones procedentes del medio de cultivo entre la película y el cristal, como consecuencia, del carácter biodegradable de la PCL a bajas concentraciones en medio hidrolítico, se manifiesta como hinchamiento del recubrimiento (Lavado Garcia , Estepa Fernández, Domínguez Flores, & Rodríguez Fernández, 2013). El recubrimiento de 2,5% p/v de PCL muestra una variación en el masograma de la figura 8a, esto se asocia a la adsorción-desorción de iones de sales o proteínas presentes en el medio de cultivo que a un desgaste del recubrimiento. Este fenómeno se presentó debido a que la concentración y las fuerzas iónicas de las sales y proteínas adsorbidas no se encontraron en ambiente óptimo para que la

adsorción fuera permanente (Zong , Wei , & Morgan, 2013) . El segundo día de inmersión el recubrimiento de PCL 2,5%p/v empieza a presenta una pérdida de masa $-0,124 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ como resultado de un desgaste en la superficie del recubrimiento al estar en contacto con el medio de cultivo. Para el cristal desnudo se evidenció un comportamiento constante de la masa durante la experimentación, ya que este tipo de superficies lisa con muy baja porosidad no permiten la entrada de iones o proteínas en esta, obteniendo un estado de estabilidad (Herrera & López, 2018).

figura 8.

Masogramas de los recubrimientos de PCL y el cristal desnudo a) día 1 y b) día 2



4. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se concluye que la técnica sping-coating es muy útil, sencilla y fácil de emplear a la hora de obtener recubrimientos homogéneos sobre cristales de cuarzo sin importar la concentración de PCL que se trabaje. Mediante la técnica SEM se mostró una mejor distribución del PCL 1%p/v sobre el cristal y los picos más pronunciados en el FT-IR se obtuvieron para el PCL 2,5%p/v.

Mediante la evaluación electroquímica, se determinó que el recubrimiento de 1% p/v de PCL presentó una disminución en la resistencia a la transferencia de carga asociado al ingreso de iones del electrolito al polimérico y estos resultados se complementan con los obtenidos en la técnica QCM donde hay una ganancia de masa constante que son atribuidos a hinchamiento causados por el ingreso del medio de cultivo y posterior degradación del recubrimiento, por lo tanto, para aplicaciones biomédicas en donde el polímero es expuesto a medios biológicos, funciona de mejor manera el recubrimiento de mayor concentración (2,5% p/v). Este último recubrimiento no presentó ganancia de masa al segundo día, mostrando que no hubo hinchamiento de la película polimérica a causa de la entrada del electrolito que conduce a una mayor tasa de degradación del recubrimiento.

5. Recomendaciones

Para futuros trabajos con la QCM se sugiere emplear tiempos de medición mayores a 1 hora para obtener más datos y así poder hacer un mejor análisis de cambios de frecuencias y de masas. También se recomienda aumentar los días de contacto del recubrimiento con el medio de cultivo para poder determinar y cuantificar que proteínas son absorbidas con mayor facilidad en el recubrimiento.

Referencias

- Albella, J. (1993). *Introducción a la ciencia de materiales. Técnicas de preparación y caracterización*. España: et al.
- Aldana, D., Estupiñan, H., Vásquez, C., & Peña, C. (2009). Análisis electroquímico de la degradación de recubrimientos de PLA inmovilizados en cristales de cuarzo Au-Cr mediante EQCM. *ION*, 23, 47-58.
- Ardila, L., Estupiñan, H., Vásquez, C., & Peña, D. (2011). Estudio de la biodegradación hidrolítica de recubrimientos de biopolímeros/cerámico mediante EQCM. *Revista de ingeniería*, 41-46.
- Arnau, A., Sogorb, T., Jiménez, Y., & Gómez, J. (2002). Cristales piezoeléctricos de cuarzo en aplicaciones como microbalanza QCM. *CES MEDICINA*, 27-37.
- Barrera, S. A. (2014). *“Obtención de nanofibras modificadas de Poli(*ε*-caprolactona) por electrohilado para aplicaciones biomédicas”*. Mexico.
- Bayona Alvarez, Y. M., & Daza Rodriguez, J. J. (2017). *efecto de la geometría del grabado láser en el comportamiento electroquímico de superficies de Ti-6Al-4V*. Bucaramanga.
- Contreras Arenas, A. M., Sotomonte Motta, I. D., Vasquez Quintero, C., & Montañez Supelano, N. (2010). *EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA Y GRAVIMÉTRICA DE LA ADSORCIÓN DE COLÁGENO EN SUPERFICIES ELECTROACTIVAS DE PLA-PGA-BIOCERÁMICO-QUITOSANO*. Bucaramanga.
- Duarte, v., & Cerrolaza, M. (2013). Modelado piezoeléctrico del hueso mediante el método de los elementos de contorno. *revista de la facultad de ingeniería*, 131-142.
- Elzein, T., Nasser-Eddine, C., Bistac, S., & Dumas, P. (2004). FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. *journal of colloid and interface science*, 381-387.

- Estupiñan Duran , H., Peña Ballesteros , D., & Martínez, N. (2014). Adhesión de osteoblastos sobre andamios de PLA-PLG-biocerámicos-colageno, fotosensibilizados con luz UV. *revista ION*, 7-15.
- Estupiñán, H., Vásquez , C., & Peña, D. (2011). Degradación de ácido poliláctico/hidroxiapatita y ácido poliglicólico en fluido corporal simulado. *UIS Ingenierías*, 145-150.
- Fang, R., Zhang , E., Xu , L., & Wei , S. (2010). Electrospun PCL/PLA/HA based nanofibers as scaffold for osteoblast-like cells. *J Nanosci Nanotechnol*, 10(11), 7747-51.
- Gallardo, J., Durán , A., & de Damborenea, J. (2004). Electrochemical and in vitro behaviour of sol-gel coated 316L satainless steel. *corrosion science*, 795-806.
- Galli Marxer, C. (2002). *protein and cell adsorption: topographical dependency and layer viscoelastic properties determined with oscillation amplitude of quartz resonator*. Switzerland.
- Goldstein, J., & Yakowitz, H. (1977). *Practical Scanning Electron Microscopy: Electron and Ion microprobe Analysis*. New York.
- Gonsalve García, S. (2005). *Tecnología y Procesos de Fabricación de Microsistemas* . sevilla.
- Herrera, P., & López, M. (2018). *Obtencion y caracterizacion de recubrimientos de policaprolactona funcionalizada con nanotubos de carbon multipared para aplicaciones biomedicas*. bucamanga.
- Juttner, K. (1990.). Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) of corrosion process on inhomogeneous surfaces. *Electrochimica Acta*, vol. 35, nº 10, 1501-1508.
- Kim, H., Knowles, J., & Kim, H. (2004). Hydroxyapatite/poly(epsilon-caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. *Biomaterials*, 25(7-8), 1279-1287.

Lavado Garcia , J., Estepa Fernández, A., Domínguez Flores, M., & Rodríguez Fernández, C.

(2013). *Policaprolactona (PCL) y su aplicación a la regeneración tisular*. sevilla.

Mendoza Flores, J., Duran Romero, R., & Genesca LLon. (s.f.). *ESPECTROSCOPIA DE*

IMPEDANCIA ELECTROQUIMICA EN CORROSION. MEXICO.

Montagut Ferizzola, Y. (2011). *Sistema Oscilador Mejorado para Aplicaciones de Microbalanza*

(QCM) en Medios Líquidos y Propuesta de un Nuevo Método de Caracterización para Biosensores Piezoeléctricos. Valencia.

Páez, m., & Rueda, O. (2012). *Evaluación electroquímica de los recubrimientos Ni-Cr y Ni-Cr-*

WC aplicados por proyección térmica sobre un acero SAE-AAISI 1015. Bucaramanga.

Parada Quinayá, D. C., & Peña Ballesteros , D. Y. (2011). *Estudio microgravimétrico del*

comportamiento fisicoquímico superficial de PLA/PLG/HAP y PLA/PLG/biovidrio modificados con polisacárido, en presencia de proteínas. . Bucaramanga.

Prada Ramirez, O. M., & Briceño Aparicio, R. A. (2015). *Estudio de la Bioactividad de*

Recubrimientos de Policaprolactona/Quitosano/Biovidrio y su Influencia en el Comportamiento Electroquímico del Acero Inoxidable aisi sae 316l. bucaramanga.

Rafaniello, I. (2016). *Monitorización del fouling en superficies poliméricas utilizando QCM-D y*

SPR. San Sebastian.

Saavedra, R. (2014). *Simulación mediante circuitos equivalentes de la impedancia electroquímica*

de armaduras de acero inoxidable en mortero. madrid .

Systems, S. R. (2005). *QCM200 Quartz Crystal Microbalance*. . california.

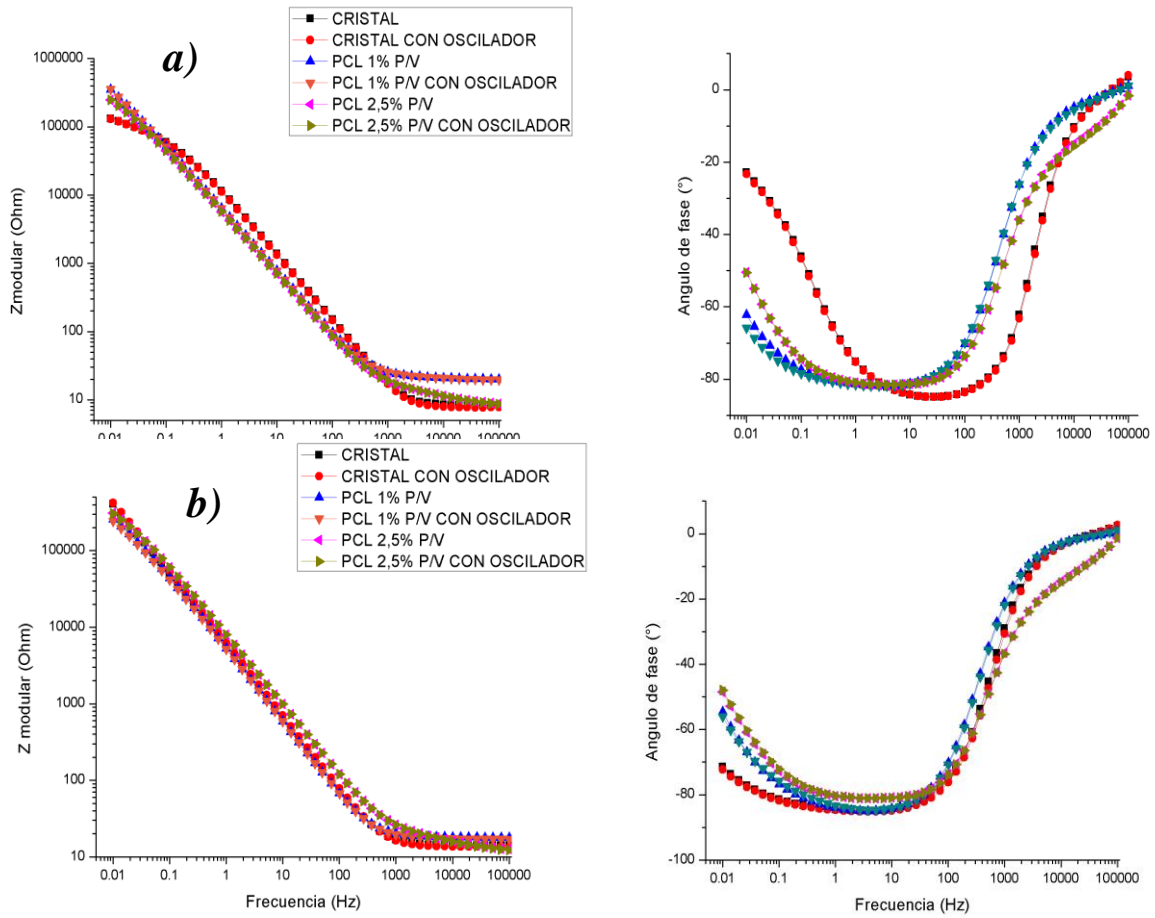
T.Elzein, M. N.-E. (s.f.). FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. *journal*

of colloid and interface science, 381-387.

- TAMILSELVI, R., & RAJENDRAN, N. (2006). corrosion behaviour of ti-6al-7nb and ti-6al-4v eli alloys in the simulated body fluid solution by electrochemical impedance spectroscopy. *elsevier*, 8.
- Varela, H., Malta , M., & Torresi, R. (2000). TÉCNICAS IN SITU DE BAIXO CUSTO EM ELETROQUÍMICA: A MICROBALANÇA A CRISTAL DE QUARTZO. *QUÍMICA NOVA*, 23(5), 664-679.
- Vázquez , L. (2007). *Empleo de la técnica de espectroscopía de impedancias electroquímicas para la caracterización de biomateriales aplicación a una aleación biomédica de Co-Cr-Mo. valencia .*
- Vazquez Gutierrez, J. (2007). *Empleo de la tecnica de espectroscopia de impedancias electroquímicas para la caracterizacion de biomateriales. valencia.*
- Wutticharoenmongkol, P., Sanchavanakit , N., & Pavasant , P. (2006). Novel bone scaffolds of electrospun polycaprolactone fibers filled with nanoparticles. . *J Nanosci Nanotechnol.*, 6(2), 514-22.
- Zhang, & Qiang. (2015). Characterization of polycaprolactone/collagen fibrous scaffolds by electrospinning and their bioactivity. *international journal of biological macromolecules*, 76, 94-101.
- Zong , Y., Wei , Y., & Morgan, S. (2013). *Procesos de adsorción / desorción de copolímeros sensibles al pH en superficies dentales modelo mediante análisis QCM y AFM. sociedad Química Americana.*

Apéndices

Apéndice A. Diagrama de Bode para las muestras a) día 1 y b) día 2 en contacto con medio de cultivo celular.



Apéndice B parámetros calculados del circuito equivalente*valores de los elementos del circuito para el día 1 de medición.*

ELEMENTO DEL CIRCUITO	CRISTAL SIN RECUBRIMIENTO		CRISTAL CON RECUBRIMIENTO DE PCL 1% P/V		CRISTAL CON RECUBRIMIENTO DE PCL 2,5% P/V	
	IN OSCILADOR	CON OSCILADOR	IN OSCILADOR	CON OSCILADOR	SIN OSCILADOR	CON OSCILADOR
	DÍA 1	DÍA 1	DÍA 1	DÍA 1	DÍA 1	DÍA 1
R1 (Ohm)	7.995	7.465	20.66	20.55	10.66	10.56
CPE1-T (F)	1.579E-5	1.63E-5	2.943E-5	2.98E-5	3.418E-5	3.407E-5
CPE1-P (F)	0.943	0.943	0.916	0.914	0.902	0.901
R2 (Ohm)	93311	92704	634500	824730	397130	398880

Valores de los elementos del circuito para el 2 día de medición.

ELEMENTO DEL CIRCUITO	CRISTAL SIN RECUBRIMIENTO		CRISTAL CON RECUBRIMIENTO DE PCL 1% P/V		CRISTAL CON RECUBRIMIENTO DE PCL 2,5% P/V	
	SIN OSCILADOR	CON OSCILADOR	SIN OSCILADOR	CON OSCILADOR	SIN OSCILADOR	CON OSCILADOR
	DÍA 2	DÍA 2	DÍA 2	DÍA 2	DÍA 2	DÍA 2
R1 (Ohm)	14.03	13.47	18.01	17.2	14.71	14.71
CPE-T (F)	2.973E-5	2.839E-5	3.427E-5	3.546E-5	2.465E-5	2.465E-5
CPE-P (F)	0.949	0.951	0.948	0.942	0.897	0.897
R2 (Ohm)	858530	925730	327990	297250	427520	427520