

**“DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LA
ADSORCIÓN DE MONOCAPAS PROTEÍNICAS SOBRE SOPORTES
COPOLIMÉRICOS BIODEGRADABLES SEMICONDUCTORES DE
POLILÁCTICO-POLIGLICÓLICO”**

**IVON MARITZA CARREÑO GONZALEZ
LADY PAOLA TENJO FUENTES**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
BUCARAMANGA
2008**

**“DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LA
ADSORCIÓN DE MONOCAPAS PROTEÍNICAS SOBRE SOPORTES
COPOLIMÉRICOS BIODEGRADABLES SEMICONDUCTORES DE
POLILÁCTICO-POLIGLICÓLICO”**

**IVON MARITZA CARREÑO GONZALEZ
LADY PAOLA TENJO FUENTES**

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
Ingeniero Químico

Director
DARÍO YESID PEÑA BALLESTEROS
Ingeniero Metalúrgico Ph. D
Codirector
Hugo Armando Estupiñán
Ingeniero MSc.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
BUCARAMANGA
2008**

*A Dios...que permitió que pueda vivir este momento con mis seres amados
A Fidel y Amparo, mis padres... Por que no existen palabras que puedan expresar el
amor incondicional*

*A Germán, por compartir este momento a mi lado ... y por hacerme sonreír
A mis amigas, por todos los momentos que hemos pasado juntas y el apoyo que me han
brindado*

*Y extendo los agradecimientos a todas las personas que no las mencione anteriormente
por que no hay tantos espacios en esta hoja para decirles mil gracias....*

Sronne

A Dios, por recordarme a cada instante la magia de las dificultades y la belleza de superarlas, por estar a mi lado aún cuando me negaba a escucharlo, sencillamente por darme el país, la familia y la vida perfecta para ser totalmente feliz.

A mamá y papá (Carlos J y Marina), por hacer de mí su mejor obra, por ser su niña... por brindarme los tesoros más hermosos e importantes de universo.

A Nancy, mi hermana por su incondicional apoyo y por tantos momentos felices...

A mis hermanas por ser parte de mi vida, por apoyarme, guiarme y aguantarme y por darme el hogar más completo y cálido

A mis sobrinos por recordarme que no se es más feliz que cuando se es niño...

A mis amigas y amigos por luchar junto a mí en los momentos más difíciles y no dejarme caer, por cada sonrisa y por cada lágrima...

A todas las personas que recuerdo y a las que no, que han dejado huella y enseñanza en capítulos de mi vida....

Lady Paola...

AGRADECIMIENTOS

Las autoras expresa sus más sinceros agradecimientos a:

Darío Yesid Peña Ballesteros Ingeniero metalúrgico Ph. D, director de ésta investigación.

Hugo Armando Estupiñan Durán Ingeniero metalúrgico M. Sc codirector de ésta investigación.

Custodio Vásquez, miembro directivo del Grupo de Investigaciones en el área de Corrosión (GIC-Guatiguará).

Guillermo Acero, Wilson Carreño Soler y Eduardo Carreño Perez, técnicos del Laboratorio de Ingeniería Química,

A mis amigos, al mejor grupo de trabajo: Nicolás por su constante apoyo y colaboración, July, Lili y Aura por apoyarnos, luchar y superar todas las dificultades junto a nosotras.

A todos mis compañeros y amigos del GIC: Paolita, Carlos Mejia, Carlos Pabón, Carlos Mauricio, Luisa, Diana, Marcela, Laura y a todas las personas que de una u otra manera colaboraron en ésta investigación.



TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. CONCEPTOS TEÓRICOS	3
1.1 BIOMATERIALES Y BIOCOMPATIBILIDAD	3
1.2. POLÍMEROS CONDUCTORES BIODEGRADABLES	4
1.2.1 Poli (láctico-co-glicólico) o (PLGA).	5
1.3 ADSORCIÓN DE PROTEINAS EN BIOMATERIALES CONDUCTORES	6
1.3.1 Fundamentos Termodinámicos	7
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	9
2.1 REACTIVOS	9
2.2 EQUIPOS	10
2.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	12
2.4 DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	13
2.4.1 Pruebas preliminares	13
2.4.1.1. Copolimerización de PLA-PGA	13
2.4.1.2 Determinación de los rangos de trabajo	14
2.4.2 Pruebas Finales	16
2.4.2.1 Pruebas electroquímicas	16



2.4.2.2. Caracterización electroquímica de la adsorción obtenida.	17
2.4.2.3 Caracterización morfológica	18
2.4.2.4 Caracterización química	18
2.4.2.5 Análisis estadístico de los datos	18
3 ANÁLISIS DE RESULTADOS	19
3.1 PRUEBAS PRELIMINARES	19
3.1.1 Espectroscopia por rayos infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)	19
3.2 PRUEBAS FINALES	20
3.2.1 Caracterización Electroquímica	20
3.2.1.1 Análisis de los parámetros del circuito	20
3.2.1.2 Análisis de los parámetros termodinámicos	24
3.2.2 Voltametría Cíclica	27
3.2.3 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	27
3.2.4 Espectrofotometría de UV (A_{280nm})	28
3.2.5 Análisis estadístico de los datos	29
CONCLUSIONES	
RECOMENDACIONES	
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Copolimerización del PLGA abertura de anillos	13
Figura 2. Montaje para pruebas electroquímicas	15
Figura 3. Espectro FITR del copolímero 50:50	19
Figura 4. Diagrama EIE. Comparación de las proteínas y la solución buffer	20
Figura 5. Circuito eléctrico equivalente usado para modelar los datos de EIS	21
Figura 6. Diagramas del EIE de la Albúmina con un voltaje aplicado de 0.4 V a 37°C con variación de concentración	22
Figura 7. Diagramas del EIE de la Albúmina con una concentración de 20µg/ml con un voltaje aplicado de 0V con variación de temperatura	23
Figura 8. Diagramas del EIE de la Albúmina con una concentración de 20µg/ml a una 37°C con variación de voltaje aplicado	24
Figura 9. Isotherma de adsorción de de la Albúmina con voltaje aplicado de 0V sobre la superficie del copolímero PLGA	25
Figura 10. Isotherma de adsorción de Langmuir de la Albúmina con voltaje aplicado de 0V sobre la superficie del copolímero PLGA	26
Figura 11. Micrografías SEM	28
Figura 12. Gráfica de absorbancia vs. concentración de proteínas	29
Figura 13. Diagrama estadísticos para la albúmina. a) Diagrama de pareto b) Diagrama de efectos principales	30
Figura 14. Diagrama estadísticos para la amilasa. a) Diagrama de pareto b) Diagrama de efectos principales	30



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos de la solución de buffer fosfatos	10
Tabla 2. Variables independientes	16

TABLA DE ANEXOS

ANEXO A	Conceptos de técnicas electroquímicas utilizadas	40
ANEXO B	Protocolo de esterilización	43.
ANEXO C	Matriz de diseño experimental de pruebas	46
ANEXO D	Matriz para pruebas preliminares	48
ANEXO E	Voltagrama del PLGA en solución PBS	50
ANEXO F	Datos de adsorción del circuito equivalente	52
ANEXO G	Diagramas electroquímicos de la adsorción de amilasas a diferentes concentraciones	55
ANEXO H	Diagramas electroquímicos de la adsorción de amilasas a diferentes temperaturas	57
ANEXO I	Diagramas electroquímicos de la adsorción de amilasas a diferentes voltajes aplicados	59
ANEXO J	Isoterma de adsorción de la amilasa con voltaje aplicado de 0 V, sobre la superficie del copolímero PLGA	61
ANEXO K	Isoterma de adsorción de Langmuir de la Amilasa con un voltaje aplicado de 0 V sobre la superficie del copolímero PLGA	63
ANEXO L	Gráfica de la dependencia de la energía libre de Gibbs de adsorción de la temperatura	65
ANEXO M	Datos termodinámicos de los valores de adsorción para la Albúmina y la Amilasa	67
ANEXO N	Protocolo de cuantificación de proteínas totales mediante A ₂₈₀	69



RESUMEN

TITULO: DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LA ADSORCIÓN DE MONOCAPAS PROTEÍNICAS SOBRE SOPORTES COPOLIMÉRICOS BIODEGRADABLES SEMICONDUCTORES DE PLA-PGA*

AUTORES: IVON M. CARREÑO, LADY P. TENJO**

PALABRAS CLAVES: adsorción, biodegradación, proteína, electroquímica.

DESCRIPCIÓN

Con el propósito de evaluar co-polímeros biodegradables semiconductores, para determinar el grado de biocompatibilidad de un determinado biomaterial a la hora de diseñar una prótesis para aplicaciones biomédicas. En este trabajo se determinó la presencia y concentración de proteínas adsorbidas sobre poliláctico-poliglicólico (PLGA) modificado con alta concentración de zinc, en solución buffer de fosfatos mediante, Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIE) y se evaluó el efecto de la interacción proteínica sobre estos copolímeros, mediante análisis termodinámico basado en la cinética de transferencia electrónica de las proteínas adsorbidas. Adicionalmente, se realizó mediante pruebas de químicas y morfología, la interpretación de la interacción proteínica sobre la superficie polimérica.

El análisis de los datos de (EIE), demostró que con el aumento relativo en la concentración de proteínas, la cantidad de proteínas electroactivas de adsorción en la interfase aumenta, conduciendo a un aumento en la densidad de carga y capacitancia para la proteína de menor peso molecular, además con el aumento en la concentración de proteínas en solución, el valor de la resistencia de transferencia de carga disminuye considerablemente indicando que la geometría de las proteínas y la carga de la superficie del copolímero de PLGA afectan la adsorción de proteínas en la superficie estudiada.

* Proyecto de Grado

** Facultad Físicoquímicas. Escuela Ingeniería Química. Director Darío Peña Ballesteros. Codirector Hugo Armando Estupiñán



ABSTRACT

TITLE: DETECTION AND CHARACTERIZATION ELECTROCHEMISTRY OF PROTEIN ADSORPTION MONOLAYERS MOUNTS ON SEMICONDUCTORS COPOLYMER BIODEGRADABILITY OF PLA-PGA *

AUTHORS: M. IVON CARREÑO, P. LADY TENJO **

KEY WORDS: adsorption, biodegradation, protein, electrochemistry.

DESCRIPTION

In order to evaluate the co-biodegradable polymer semiconductors, to determine biocompatibility degree of a biomaterial in the design of a prosthesis for biomedical applications. In this study we determined the presence and concentration of proteins adsorbed on polylactic-polyglycolic (PLGA) modified with a high concentration of zinc, phosphate buffer solution through, Electrochemical impedance spectroscopy (EIE) and the effect of the protein interaction on these co-polymers, by thermodynamic analysis based on the kinetics of electron transfer proteins adsorbed. Additionally, conducted chemical tests morphology and the interpretation of the interaction of protein on the surface polymer. The analysis of the data (IEE) showed that the relative increase in the concentration of proteins, the amount of protein electroactivas adsorption in the interface increases, leading to an increase in the density and capacitance for the lower protein molecular weight, in addition to the increase in the concentration of proteins in solution, the value of the charge transfer resistance decreases significantly, indicating that the geometry of proteins and the burden of the surface of the copolymer PLGA affect the adsorption of proteins in the area studied

* Degree Project.

**Faculty of Physical-Chemistry Engineerings. Chemical Engineer
Department..Director: Darío Yesid Peña Ballesteros. PhD. Codirector: Hugo Armando BEstupiñan



INTRODUCCIÓN

Los polímeros se caracterizan en general por ser materiales aislantes, pero desde hace unos treinta años se ha logrado sintetizar polímeros que son buenos conductores de la electricidad, llamados polímeros conductores (CPs) y por tal descubrimiento en el año 2000, Hegger, Diarmid y Shirakawa recibieron el premio Nóbel de química ^[1]

Actualmente existen numerosos polímeros conductores utilizados en el campo biomédico que han revelado adhesión celular, migración y síntesis del ADN. Específicamente se han realizado estudios que incluyen nervios, músculos y células cardíacas entre otras debido a la biocompatibilidad con muchas moléculas biológicas y la habilidad de compartir carga frente a las reacciones bioquímicas. ^[3]

Entre las muchas aplicaciones de los CPs se encuentra el proceso de regeneración osteoarticular que sucede en una fractura ósea, en el que se coloca un implante osteointegrado o se realiza un injerto para aumentar el sustrato óseo antes de la inserción de implantes, para la regeneración (la formación de hueso que sea idéntico al preexistente)^[6]. Para la regeneración ósea se debe considerar tanto el equilibrio de tipo electrolítico, como el aporte nutricional para los diferentes tejidos que constituyen el hueso. En este caso, el descubrimiento en línea de proteínas en suero es de relevancia clínica debido al crecimiento de una película sobre los implantes o prótesis, como la generación de hemólisis (ruptura y liberación de la hemoglobina en el plasma por destrucción de los glóbulos rojos) que conlleva a la coagulación de sangre en la superficie implantada y el riesgo subsecuente de rechazo del implante. La hemólisis empieza con la adherencia de plaquetas y proteínas que al

mismo tiempo comienzan con una serie de reacciones que inducen sangre de coagulación. Por consiguiente la superficie del biocompatible debe reducir la adherencia de proteínas y plaquetas ^[3].

Hay varios métodos para la determinación de proteínas en solución, sin embargo, la mayoría determina la concentración (rango nanomolar) de las proteínas por métodos colorimétricos, en el cual hay sobrestimación sobre la cantidad de proteína que tiene enlaces covalentes y la proteína físicamente adsorbida.

En este orden de ideas, esta investigación esta enfocada en la detección y caracterización electroquímica de monocapas proteínicas sobre soportes poliméricos de PLGA biodegradables semiconductores por medio, EIE y SEM.

Para este propósito, se realizaron diversas pruebas, variando los parámetros de concentración de proteína, temperatura y el voltaje aplicado. La adsorción de cada una de las proteínas en el copolímero, se analizó por medio de las gráficas obtenidas del EIE y la morfología se obtuvo por SEM.

Los resultados mostraron, que el aumento de la concentración, la temperatura y el voltaje aplicado disminuyeron la resistencia a la transferencia de carga, favoreciendo la adsorción de proteínas. Los análisis termodinámicos indicaron que la adsorción de proteínas en la superficie del material semiconductor, se presentó espontáneamente bajo todas las condiciones propuestas en el diseño de experimentos.

Finalmente se encontró que el fenómeno de adsorción para las proteínas de amilasa y albúmina empleadas en este estudio presentaron grandes similitudes en su comportamiento de adsorción; sin embargo, la proteína de amilasa, por su mayor peso molecular mostró mayor resistencia a la transferencia de carga y una menor adsorción.

1. CONCEPTOS TEORICOS

1.1 BIOMATERIALES Y BIOCOMPATIBILIDAD

Los biomateriales se definen, según el acuerdo de la conferencia de consensos de la sociedad Europea de biomateriales en 1986, "como cualquier sustancia o combinación de sustancias (a excepción de los fármacos), de origen natural (tejidos bovinos o porcinos, proteínas del tejido conectivo) o sintético (metales, polímeros o cerámicas), que pueden ser usados por algún periodo, como un todo o como parte de un sistema que trata, aumenta, o reemplaza algún tejido, órgano o función del cuerpo" ^[27] ^[13]

La biocompatibilidad de un material implantado o un dispositivo protético es un proceso dinámico con dos vertientes, una que comprende los efectos que provoca el organismo receptor en el material implantado, y otra los efectos producidos por el implante o sus productos de degradación en el organismo receptor. Por ello es necesario valorar exhaustivamente todo tipo de interacciones y riesgos asociados con la introducción de sustancias extrañas en el organismo, de tal forma que el diseño y la aplicación de biomateriales requiera un estudio completo de sus propiedades y características, para la aplicación en la biomedicina. ^[12]

En los últimos años se ha dedicado gran atención al análisis de los fenómenos que aparecen a nivel de interfase entre las prótesis y los tejidos afectados por el implante. En este sentido ha de considerarse que al introducir un implante en el seno de un tejido, se produce la

separación física de los perfiles en contacto con la prótesis, disminuyendo al menos a la mitad las vías de alimentación y oxigenación celular de la interfase tejido-implante^[12].

El conocimiento de los procesos que aparecen a nivel de interfase, permite predecir con relativa garantía el grado de biocompatibilidad de un determinado biomaterial a la hora de diseñar una prótesis. En cualquier caso, la implantación de un dispositivo biodegradable en el organismo humano, requiere que se garantice su total reconocimiento por parte del complejo sistema fisiológico^[12].

1.2 POLÍMEROS CONDUCTORES BIODEGRADABLES

Los polímeros que son buenos conductores eléctricos^[3] constan de sistemas de dobles enlaces conjugados, es decir, una serie alternada de enlaces sencillos (sigma, fijos) y dobles (algo móviles). Ello hace que se forme una especie de nube electrónica a un lado y al otro del plano en el que está situado el sistema alternante de enlaces aunque esta disponibilidad electrónica no es suficiente para que la macromolécula adquiera la propiedad de conductor eléctrico^[6], debido a que un polímero entra en fase conductora, gracias a la adición de dopantes que aumentan o disminuyen el número de electrones en la banda de valencia, alterando la brecha de transición (brecha energética)^[3].

Aunque se denominan polímeros conductores el rango de conductividad es similar a los semiconductores, aunque cuando hay variación de la temperatura, los CPs disminuyen la conductividad al aumentar la temperatura debido a la descomposición del dopado, mientras que la conductividad de los semiconductores aumenta con la temperatura.^[2]

Entre los biomateriales poliméricos que se utilizan como implantes biodegradables se emplea el copolímero de PLGA principalmente por su biocompatibilidad.^[16]

1.2.1 Poli (láctico-co-glicólico) o (PLGA). La copolimerización permite modificar la estructura y las propiedades de las macromoléculas por incorporación a la cadena polimérica de unidades estructurales diferentes a las del homopolímero. Esta incorporación provoca una alteración de la regularidad estructural, y reduce la cristalinidad.^[32]

El PLGA puede cambiar su tiempo de degradación y las propiedades mecánicas cambiando la proporción de los monómeros utilizados durante su copolimerización, lo que significa que puede tener diversas aplicaciones según lo requiera el implante.^[21]

El copolímero de PLGA es ampliamente utilizado debido a que a condiciones fisiológicas normales, sus monómeros son metabolizados, produciendo una mínima toxicidad como biomaterial. Sin embargo, puede causar algún problema para personas intolerantes a la lactosa.^[16]

1.3 ADSORCIÓN DE PROTEINAS EN BIOMATERIALES CONDUCTORES

La adsorción, es la transferencia selectiva de uno o más solutos (adsorbato) de una fase fluida a una de partículas sólidas (adsorbente). Muchas sustancias son adsorbidas espontáneamente sobre la superficie de un sustrato en solución, por lo general, porque el sustrato es energéticamente más favorable que la solución^[5].

En el uso de polímeros conductores para uso clínico, las primeras interacciones entre la superficie del biomaterial y el entorno biológico ocurren, apenas algunos segundos después de su implantación en el cuerpo, y suceden, con las proteínas presentes en el medio fisiológico. Es sólo después de esta primera etapa cuando los neutrófilos y los macrófagos (las células que intervienen en primera instancia en todos los procesos de inflamación) llegan a la superficie del material. Estas células desencadenan entonces, un complejo proceso biológico de cascadas de señalización. Este proceso constituye la respuesta biológica que, en función de las células reclutadas posteriormente, llega a la aceptación del biomaterial en el tejido, o a su rechazo.

Por una parte, la naturaleza de la monocapa de proteínas adsorbida en la superficie del material, constituye uno de los principales factores, para que suceda esta respuesta celular. Las células dependen de proteínas específicas para adherirse y comunicarse. En particular, los osteoblastos necesitan interacciones específicas con la superficie del biomaterial para poder expresar un fenotipo diferenciado. Estas interacciones dependen de la cantidad, naturaleza y conformación de las proteínas adsorbidas en la superficie del material.

Por otra parte, las características superficiales del material, como la composición química o la energía superficial, determinan la naturaleza de la adsorción proteica, y particularmente, la orientación y conformación de las proteínas adsorbidas. Además, las características físico-químicas, como las cargas superficiales y/o la energía superficial del material, así como su topografía, pueden influenciar indirectamente (a través de la capa proteica) y/o directamente en el crecimiento celular.

[33]

1.3.1 Fundamentos Termodinámicos. Se ha demostrado que las proteínas, normalmente se adsorben sobre superficies de metales, permitiendo el tratamiento del sistema proteína-electrodo como un ejemplo de la cinética de traslado de electrones de capas electroactivas adsorbidas.^[14]

El proceso por el cual el copolímero PLA-PGA (adsorbente) liga moléculas se debe principalmente a la naturaleza de la superficie en la cual el PLA a pesar de ser hidrofóbico, es ayudado por el PLG, el cual posee una naturaleza superficial hidrofílica, atrayendo a la proteína^[16], que es un factor determinante de la adsorción, por tener sitios de particular atracción para la adsorción de moléculas debido a que el copolímero se encuentra dopado con metales.

Las moléculas del adsorbato (proteína) pueden ser móviles o fijas en una posición debido a la intensidad de las fuerza de enlaces dando a lugar a la clasificación de adsorción como quimisorción y fisorción. Aunque la alta complejidad de las superficies sólidas, hace que la mayor parte de los fenómenos de adsorción sean combinaciones de los dos tipos^[18].

La fisorción o adsorción física está asociada con una entalpía de adsorción numéricamente inferior a -40 KJ mol^{-1} , mientras que valores mayores a -80 KJ mol^{-1} , son característicos de la quimisorción o adsorción química. La entalpía de fisorción es comparable a la entalpía de condensación, mientras que la entalpía de quimisorción es comparable a la entalpía de las reacciones químicas^[26].

- **Isotermas de adsorción.** La adsorción es un medio para neutralizar o satisfacer las fuerzas de atracción que existen en una

superficie o una interfase, y que se deben a la discontinuidad en la naturaleza de la estructura. En consecuencia la adsorción produce una disminución de la energía libre interfacial ^[29]

La capacidad de adsorción está definida con base en las isothermas de adsorción en disolución. La isoterma de adsorción es la relación de dependencia, a una temperatura constante, de la cantidad de adsorbato adsorbido por peso unitario de adsorbente, con respecto a la concentración del adsorbato en equilibrio. Una de las hipótesis más útiles en adsorción, es la de Langmuir, que postuló que en la adsorción, donde predominan las fuerzas de tipo químico, se forman capas monomoleculares del adsorbato sobre el sustrato adsorbente y se fundamenta sobre ciertas suposiciones ^[29]:

1. La superficie es homogénea
- 2 Ambos, soluto y solvente, ocupan la misma área por molécula adsorbida, es decir, por sitio interfacial.
3. No existen interacciones laterales, es decir que la energía de desorción es constante.
4. La adsorción máxima corresponde a una capa monomolecular.

El modelo de Langmuir se ha adoptado con frecuencia para explicar el proceso de adsorción de una proteína en un sitio específico sobre un adsorbente de afinidad. En este modelo, el adsorbente de afinidad es visualizado como un material que tiene un número de sitios no interactuantes idénticos sobre su superficie, la cual, puede aceptar solamente una simple molécula de soluto. ^[30]

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 REACTIVOS

Probetas PLGA. Para obtener las probetas de PLGA, se realizó una copolimerización del ácido poliglicólico y del ácido poliláctico, (cada uno de los cuales fue sintetizado previamente, utilizando como catalizador 1% de Zn con 40 horas de policondensación y 0.3% de cloruro de estaño con 20 horas de policondensación, respectivamente¹) con composición de 50% de PLA y 50% de PGA con el área de las probetas de 0,81 cm².

Proteínas. Para el estudio electroquímico de la adsorción, se emplearon dos clases de proteínas, las cuales fueron escogidas, debido a que se encuentran en el cuerpo humano. La albúmina se encuentra en gran proporción en el plasma sanguíneo, siendo la principal proteína de la sangre y a su vez la más abundante del cuerpo humano. Por su parte la amilasa se encuentra en la saliva y en el páncreas.

Además los pesos moleculares y la estructura molecular de las proteínas puede influir sobre la adsorción sobre los co-polímeros. Por estas razones se utilizaron las siguientes proteínas las cuales simulan las que se encuentran en el organismo humano y difieren en peso y estructura molecular:

- **β -Amilasa Tipo I-B**, suspensión de sulfato de amonio, 750-1,000 unidades/mg proteína (E1%/280). (Sigma Chemical Company, Producto N° A 7005). Molécula 200 kDa, es tetramétrica con simetría molecular.^[16]

¹ Trabajo de investigación llevado a cabo en el GIC, Bueno Juliana

- **Albúmina de suero bovino**, pH ~7 (1% in 0.15 M NaCl), ≥98% (agarose gel electrophoresis), *lyophilized powder*. (Sigma Chemical Company, Producto N° A 7906). Molécula 69 kDa, consiste en una sola cadena de polipéptido^[16].

Electrolito (Solución PBS). Para las pruebas electroquímicas se usó como electrolito una solución salina buffer de fosfatos (PBS)^[24], con un PH entre 7.4 -7.5. Para la preparación de 1000mL de PBS se utilizó agua desionizada y los reactivos que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Reactivos de la solución de buffer fosfatos

REACTIVOS	CANTIDAD (g)
NaCl	8
KCl	0.20
KH ₂ PO ₄	0.14
Na ₂ HPO ₄ ·10H ₂ O	0.91

2.2 EQUIPOS

Equipo electroquímico

Las pruebas electroquímicas (EIE y voltametría Cíclica) fueron realizadas usando un potenciostato marca, ACM Instruments Versión 5; Gill AC Serial n° 1288. Se usó una celda de base plana de 1000 mL con tres electrodos. Se utilizó como contra electrodo, grafito de alta pureza, como electrodo de referencia se usó un electrodo de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl, NaCl) (3 M), el cual se puso en contacto con el electrolito por medio de un *luggin* y el electrodo de trabajo fueron,



las probetas de PLGA. Todos los potenciales en la presente investigación fueron, medidos con respecto al electrodo de referencia.

Otros equipos

También fueron utilizados los siguientes equipos en esta investigación

- Balanza Metter AE 240
- Medidor de PH Hach Sension 3
- Termómetro
- Plancha de calentamiento. Marca SCHOTT
- Baño termostatado con recirculación y control de temperatura
- Voltímetro.
- Infrarrojo FTIR -8400s Fourier tranfrom Simansu
- Espectrofotómetro Jeway 6305
- Cubeta de cuarzo

2.3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Para alcanzar los objetivos propuestos en esta investigación se realizaron las siguientes etapas:



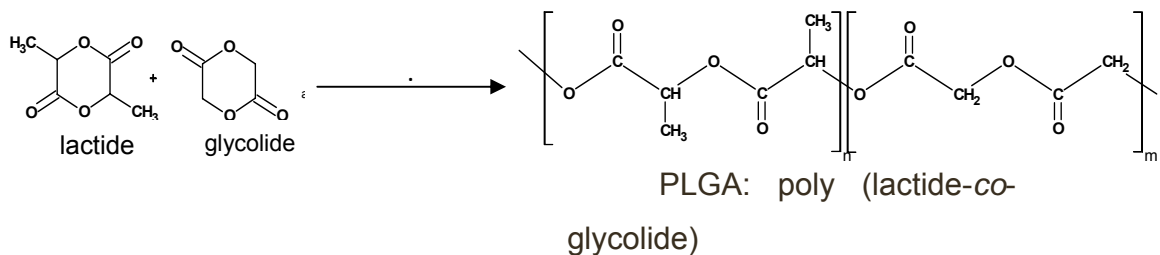
2.4 DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.4.1 Pruebas preliminares. Las pruebas preliminares constaron de una copolimerización de PLA-PGA (PLGA) y determinación del rango de trabajo para las pruebas electroquímicas con el EIE.

Para todas las pruebas se siguió un protocolo de esterilización antes y después de cada una de ellas, debido a la manipulación de material químico (ver Anexo B).

2.4.1.1 Copolimerización de PLA-PGA. Se realizó mediante la polimerización por apertura de anillos del ácido láctico y ácido glicólico, utilizando como disolvente cloroformo.^[20]

Figura 1. Copolimerización del PLGA apertura de anillos



Fuente: MIDDLETON, J.^[17]

La composición del polímero fue 50% PLA y 50% PGA, la cual es reportada en anteriores investigaciones por presentar un menor tiempo de biodegradación^[20]; Luego por moldeo se formaron las probetas de PLGA.

Las probetas resultantes fueron secadas en un desecador por mínimo 4 horas. Para determinar si se obtuvo la copolimerización, se realizó una caracterización por la técnica de espectroscopia por rayos infrarrojos



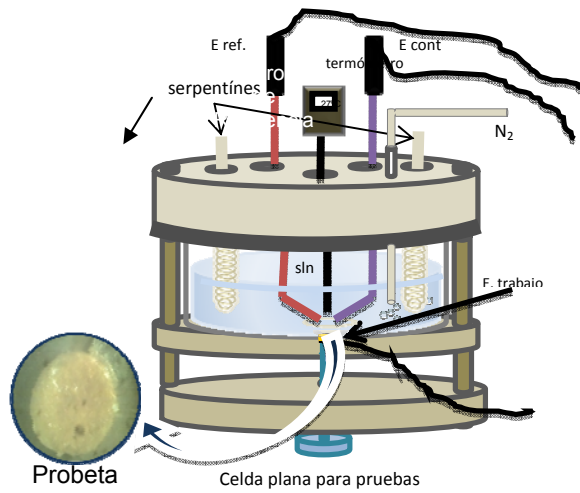
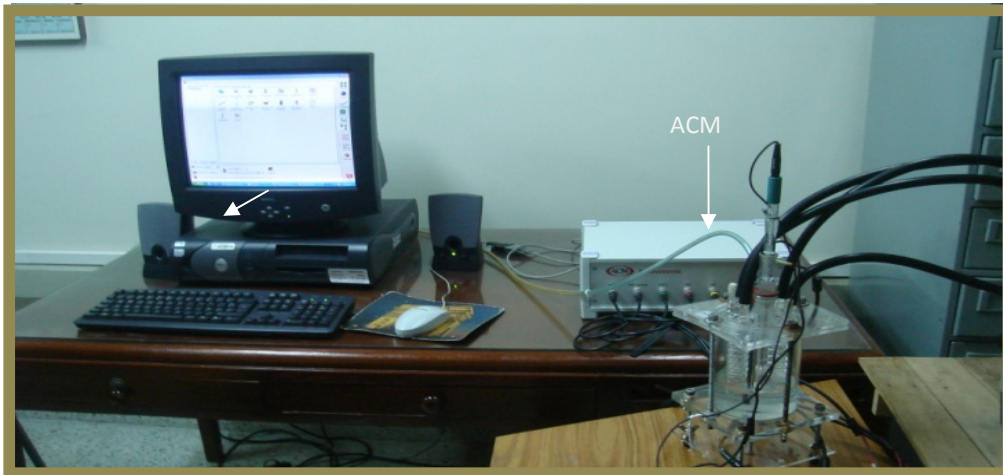
por transformada de Fourier (FTIR), con el fin de comparar con resultados revisados en la bibliografía.

- **Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR).** A las probetas obtenidas, se les realizaron análisis por espectroscopia de infrarrojo, para identificar y determinar cuantitativamente la presencia de distintas sustancias en mezcla. Por medio de sus espectros, se identificaron las bandas correspondientes a las tensiones de los grupos funcionales presentes, y así mismo se pudieron determinar los cambios representativos. Este análisis fue llevado a cabo en un equipo para espectroscopia de infrarrojo FTIR-8400S Fourier Transform Shimadzu.

2.4.1.2 Determinación de los rangos de trabajo

- **Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE).** Para determinar las condiciones de trabajo, se realizaron pruebas preliminares con soluciones de PBS y PBS con proteínas a diferentes rangos de frecuencia y tiempo de estabilización. El montaje para esta prueba se realizó con una celda plana como lo muestra la figura 2.

Figura 2. Montaje para pruebas electroquímicas



CELDA

2.4.2 Pruebas Finales

2.4.2.1 Pruebas electroquímicas

- **Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE).** Según los análisis de las pruebas preliminares, se establecieron las pruebas finales de EIE, con un diseño factorial que se puede observar en el Anexo C, el cual considera como variables independientes los parámetros mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2. Variables independientes

Concentración de proteína en PBS (µg/ml)	Temperatura (°C)	Potencial aplicado (V)
5	25	0
10	30	0.2
15	37	0.4

Estas variables se seleccionaron, según investigaciones anteriores de adsorción de proteínas sobre superficies metálicas. La aplicación de un sobre potencial se realizó con el fin de acelerar el proceso de adsorción [16]. Se utilizó un rango de frecuencia entre 0.001 y 100000Hz y un tiempo de estabilización de 30 minutos, para todas las pruebas. Como variables fijas en el diseño, se mantuvieron la composición del electrolito, las dimensiones de la celda y la distancia entre ánodo y cátodo.

Voltametría cíclica. Mediante esta técnica electroquímica, se pretendió, evaluar las posibles de reacciones de oxido-reducción en

estado sólido del copolímero evaluado de interés. Para estos ensayos, se seleccionó una velocidad de barrido de 20 mV s⁻¹.

2.4.2.2. Caracterización electroquímica de la adsorción obtenida. A partir de los resultados obtenidos de EIE, se planteó un modelo de circuitos equivalentes, representando, la correspondiente adsorción de las proteínas ^[9], en el cual fue posible evaluar las variaciones en los fenómenos electroquímicos superficiales presentados. Donde el proceso de adsorción de proteínas en la superficie del copolímero de PLGA se ajustó a la isoterma de Langmuir^[19]:

$$\frac{C}{\Gamma} = \frac{1}{B_{ADS}\Gamma_{\max}} + \frac{C}{\Gamma_{\max}} \quad [1]$$

Donde c (mol/cm³) es la concentración de equilibrio de la proteína en la solución volumen buffer de fosfato, Γ (mol/cm²) es la cantidad de proteína adsorbida, o la concentración superficial proteica, Γ_{\max} (mol/cm²) es el valor máximo de Γ , y el parámetro B_{ADS} (cm/mol) que refleja la afinidad de las moléculas de adsorbato hacia los sitios de adsorción.

Luego, con las isotermas de Langmuir, se pudieron encontrar los parámetros, para determinar los valores de ΔG_{ADS} , lo cual indica, el trabajo necesario para nuclear y crecer cierta cantidad de proteína sobre la superficie.

$$B_{ads} = \frac{1}{C_{solvent}} \exp\left(\frac{-\Delta G_{ads}}{RT}\right) \quad [2]$$

A partir de estos valores, se encontraron los demás parámetros termodinámicos. Los valores de entropía se obtuvieron de la pendiente de la recta que se produce al graficar los cambios de la energía libre de

Gibbs con la temperatura y el cambio en la entalpía de adsorción, se encontró con relaciones termodinámicas.

2.4.2.3 Caracterización morfológica

Microscopia electrónica de barrido (SEM). La microscopia electrónica de barrido, permitió visualizar las superficies del sustrato, con el fin de evaluar su morfología (porosidad, uniformidad, caracterización de defectos).^[13].

2.4.2.4 Caracterización química

Espectrofotometría UV (280 nanómetros). Las proteínas muestran un fuerte grado de absorción a 280nm en UV, debido principalmente a los residuos de triptófano y la tirosina de las proteínas. Ya que las concentraciones de estos aminoácidos en las proteínas son constantes, se puede utilizar la absorbancia a 280nm para estimar la concentración de proteínas usando la ley de Beer.^{[22] [23]}

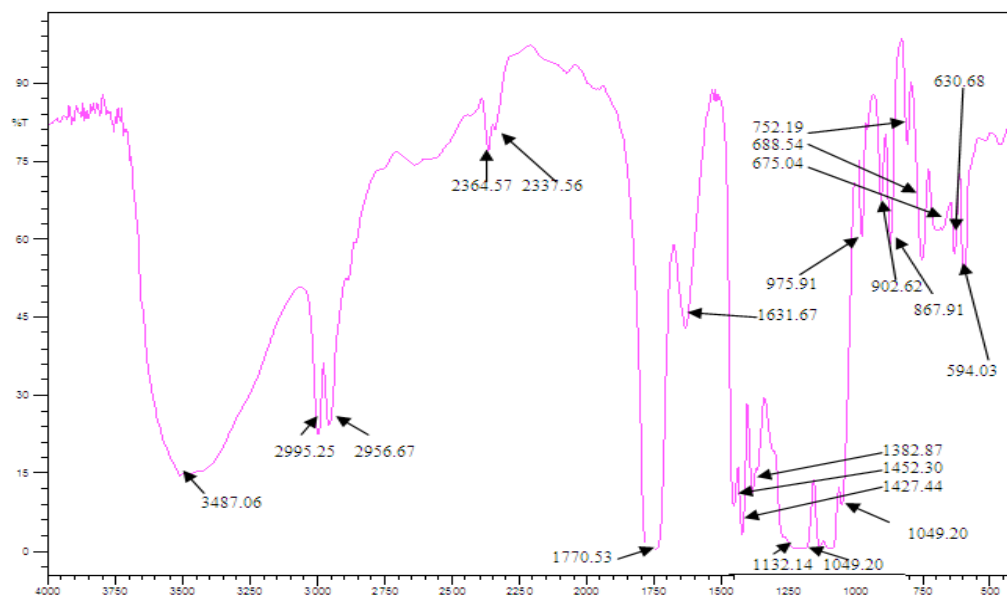
2.4.2.5 Análisis estadístico de los datos. Se realizó un diseño experimental factorial de tres variables independientes con la ayuda de un software estadístico, con el que además se realizaron los análisis estadísticos correspondientes, teniendo como variable respuesta la resistencia a la polarización (R_{ADS}) para obtener finalmente las variables que mas influye y favorece la adsorción de las proteínas.

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 PRUEBAS PRELIMINARES

3.1.1 Espectroscopia por rayos infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR). Las probetas del copolímero de PLGA fueron analizados estructuralmente por espectroscopia infrarroja (Figura 3), presentando las siguientes bandas de absorción (ν , cm^{-1}): 2997–2965 (CH_2 , CH_3), 1770 ($\text{C}=\text{O}$), 1360–1450 (CH_3), 750(CH). Además se compararon los espectros infrarrojos del copolímero obtenido de PLGA reportado por Motta, A.C ^[20], en el cual se observó gran similitud en los espectros y las bandas de los grupos funcionales típicas del copolímero.

Figura 3. Espectro FITR del copolímero 50:50

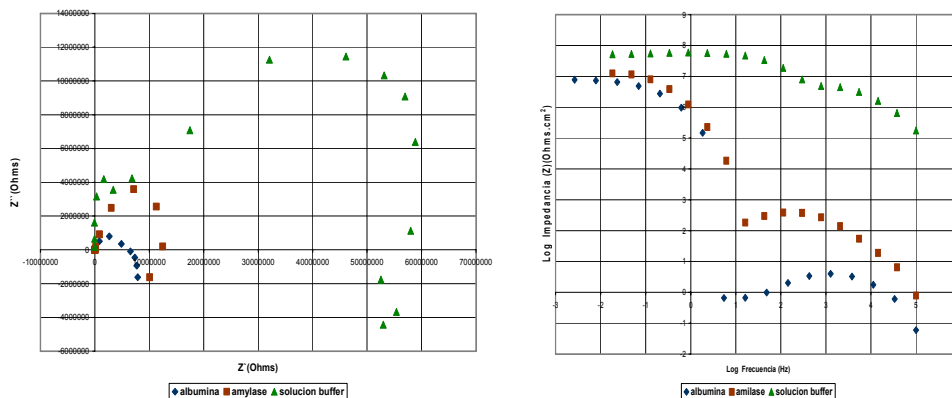


3.2 PRUEBAS FINALES

3.2.1 Caracterización Electroquímica de la adsorción de proteínas

3.2.1.1 Análisis de los parámetros del circuito. Los diagramas de EIE registrados para las diferentes condiciones estudiadas con y sin proteínas pueden dividirse en dos regiones correspondientes a dos constantes de tiempo que se utilizaron para modelar los valores experimentales (Figura 4). La comparación de la Figura 4, mostró que las dos constantes de tiempo son mas visibles en la solución con proteínas que en la solución buffer, debido a que la adsorción de proteínas tiene una menor resistencia que la de los iones de la solución buffer.

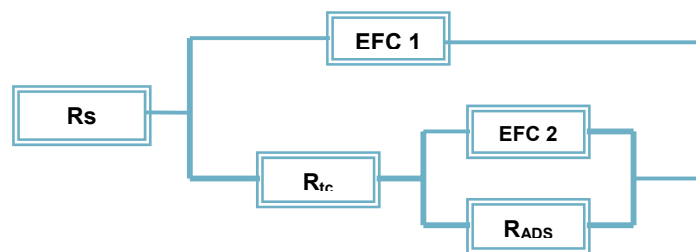
Figura 4. Diagrama de EIE. Comparación de las proteínas y la solución buffer.



Resultados similares se encuentran en investigaciones anteriores por lo cual un circuito equivalente compuesto de un subcircuito interno correspondiente al fenómeno de adsorción en paralelo con el subcircuito externo propio de la doble capa electroquímica, modelan el comportamiento interfacial entre el copolímero PLGA y el electrolito, tal como se muestra en la figura 5 ^[14,16,19]

Con el fin de ajustar la desviación respecto del comportamiento capacitivo ideal, de los sistemas reales, se utilizó un elemento de fase constante en lugar de una capacitancia pura.

Figura 5. Circuito eléctrico equivalente usado para modelar los datos de EIS



Fuente: Bard. ^[14]

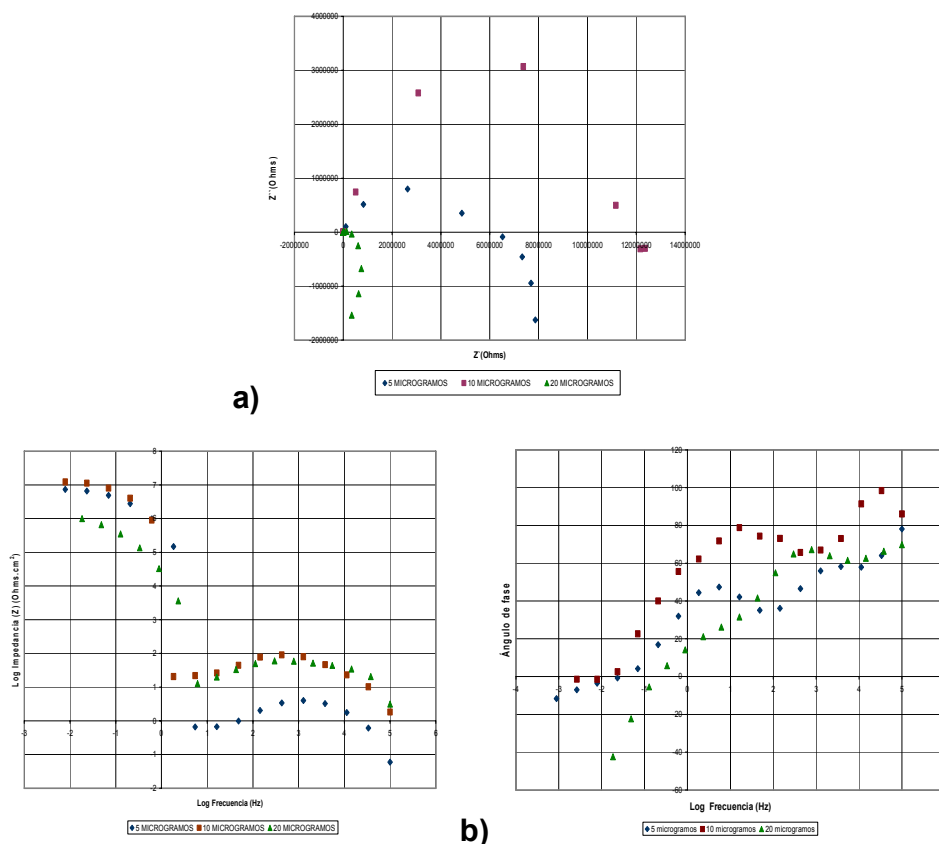
A partir de las frecuencias de las dos constantes de tiempo en el sistema, el subcircuito exterior que tuvo la menor constante de tiempo a altas frecuencias, se relacionó con los procesos de carga y descarga de la interfase electrodo/electrolito, donde el EFC₁ esta a favor de la capacitancia de la doble capa y R_{tc} para los resistencias de los procesos de transferencia de carga. Para todas las pruebas realizadas se encontraron altos valores de R_{tc}, lo cual indica una disminución en la degradación del material.

Por otro lado el subcircuito interno con una alta constante de tiempo a bajas frecuencias representa un proceso más lento asociado con el transporte de masa de especies electroactivas. ^[14,16,19]

Variaciones de concentración. Para ambas proteínas amilasa y albúmina la resistencia a la adsorción disminuyó al aumentar su concentración en la solución buffer de fosfato, como se muestra en la figura 6 y en los datos reportados en el Anexo G y H, lo cual indica que

a mayor cantidad de proteína la adsorción en la probeta aumenta debido a que existe una mayor cantidad de iones que pueden ser retenidos en la superficie del material.

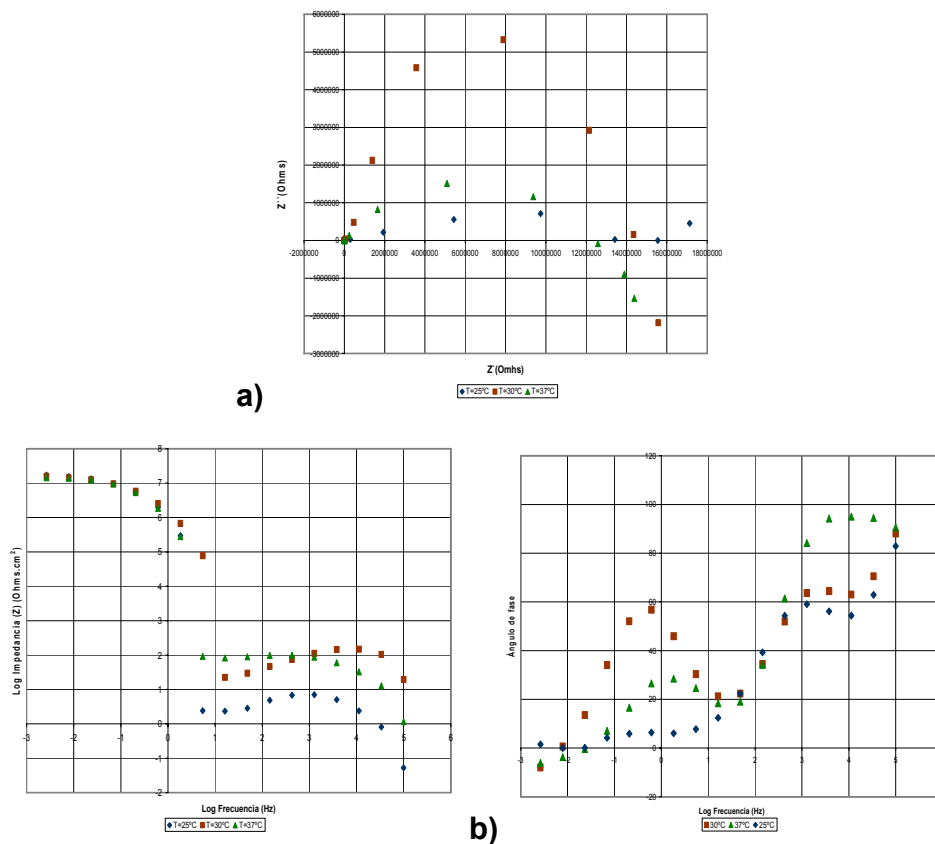
Figura 6 Diagramas del EIS de la Albúmina con un voltaje aplicado de 0.4 V a 37°C con variación de concentración a) Nyquist b) Bode



Variaciones de temperatura. Para las diferentes combinaciones de concentraciones y voltaje aplicado en las dos proteínas un aumento en la temperatura mostró una disminución en la resistencia a la adsorción como el ejemplo mostrado en la Figura 7 (Datos reportados en el Anexo

G y I). Esto indica que al aumentar la temperatura se favorece la adsorción de proteínas,

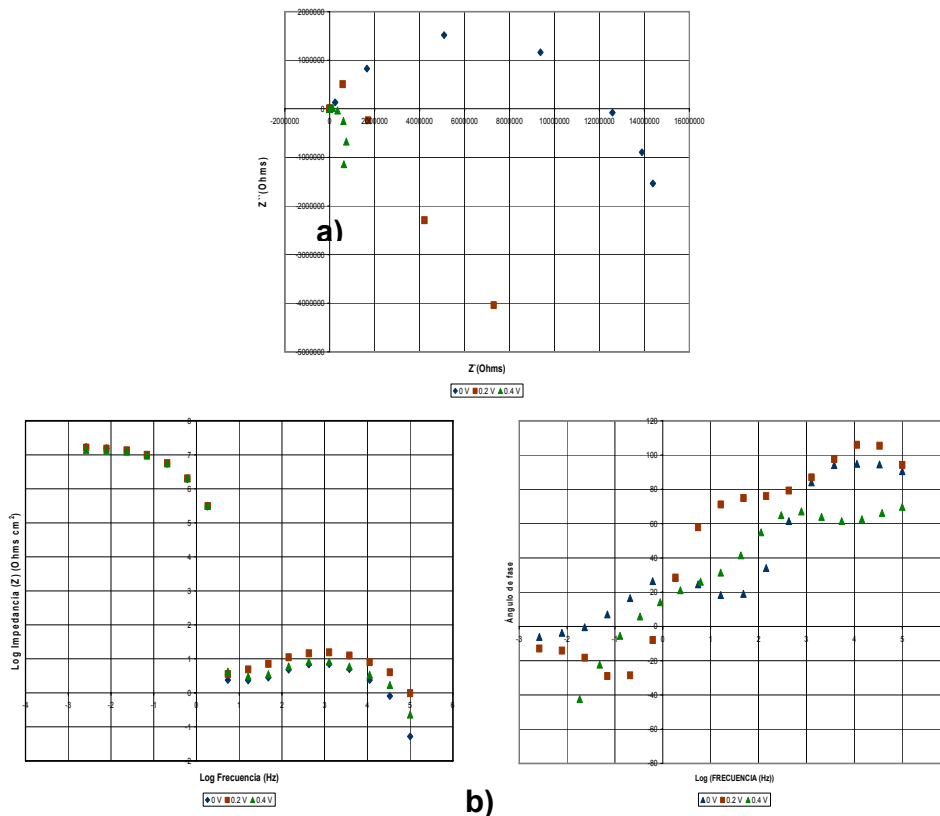
Figura 7. Diagramas del *EIS* de la Albúmina con una concentración de 20µg con un voltaje aplicado de 0V con variación de temperatura a) Nyquist b) Bode



Variaciones de voltaje. Para cada una de las proteínas de la investigación los datos de impedancia mostraron un rasgo capacitivo a altas frecuencias, y a bajas frecuencias un gran semicírculo capacitivo deprimido. Al aumentar el potencial aplicado a bajas frecuencias la capacitancia disminuye (Figura 8). Los valores de impedancia fueron

significativamente mayores para soluciones que contenían la proteína de mayor peso molecular es decir, la Amilasa.

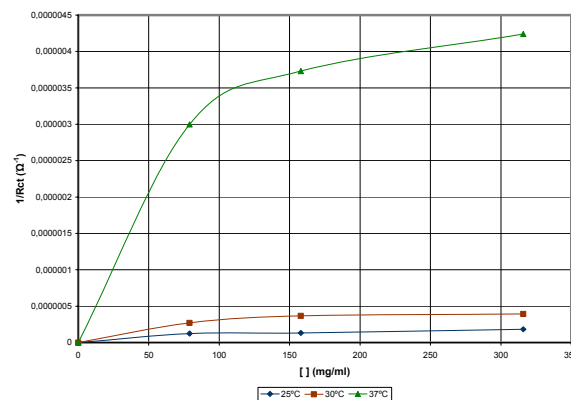
Figura 8. Diagramas del EIS de la Albúmina con una concentración de $20\mu\text{g}$ a una 37°C con variación de voltaje aplicado a) Nyquist b) Bode



3.2.1.2 Análisis de los parámetros termodinámicos. Con el fin de investigar la influencia de la Albúmina y la Amilasa en el comportamiento de la superficie del copolímero de PLGA, se muestra en la Figura 9, la dependencia de la resistencia a la transferencia de carga con la concentración de la albúmina en todo el rango de temperaturas estudiado, el cual tiene un comportamiento similar con la

Amilasa (Anexo K). Por lo tanto, con el aumento en la concentración de proteínas, el valor de la resistencia de transferencia de carga disminuye bruscamente y después alcanza un nivel de meseta en cada una de las temperaturas a cierta concentración.

Figura 9. Isotherma de adsorción de de la Albúmina con voltaje aplicado de 0V sobre la superficie del copolimero PLGA

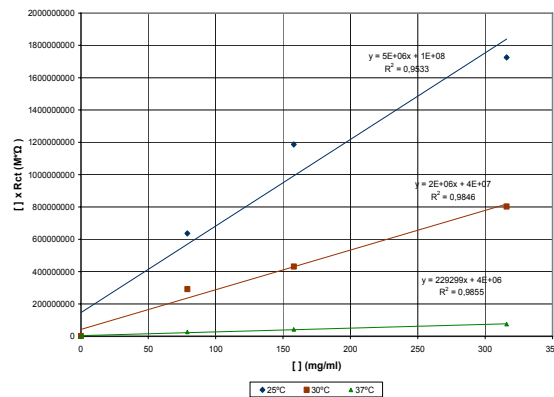


- **Isotermas de adsorción de Langmuir**

Cuando un material está inmerso en una solución electrolito, comienza espontáneamente a pasivarse formando y envejeciendo la película de protección en su superficie. Esto inhibe significativamente la disolución del material, y por lo tanto, la corrosión aumenta su estabilidad. Sin embargo, la figura 10 muestra que la adicción de proteínas en la solución buffer de fosfato produjo un incremento en la velocidad de disolución del material que se observa en la disminución de la resistencia a la transferencia de carga. Esto se puede atribuir a que los complejos de iones metálicos en proteínas pueden reducir la energía de activación o aumentar el cambio de la energía libre química asociados con la disolución de metales, y aumenta la velocidad de corrosión. Dado que la densidad de corriente de corrosión es inversamente proporcional a la resistencia de la transferencia de carga, puede ser

correlacionada con la concentración de la superficie de cada una de las proteínas r ($1/R_{TC} \propto r$). Por otro lado la adsorción de proteínas en la superficie de copolímero de PLGA se ajustó y fue descrito por la isoterma de Langmuir (Figura 10, Anexo L).

Figura 10. Isoterma de adsorción de Langmuir de la Albúmina con voltaje aplicado de 0V sobre la superficie del copolimero PLGA



La dependencia de $C \cdot R_{TC}$ con la concentración de la proteína en la solución a lo largo de las temperaturas estudiadas resultó lineal, por lo cual se mostró que la isoterma de Langmuir se ajustó al estudio realizado.

A partir de estas rectas se pudieron encontrar los parámetros para encontrar los valores de ΔG_{ADS} y los demás parámetros termodinámicos. Los valores de entropía se encontraron a partir de la pendiente de la recta que se produce al graficar los cambios de la energía libre de Gibbs con la temperatura (Anexo M). Y finalmente el ΔH_{ADS} se encontró con la relación termodinámica.

De los datos termodinámicos encontrados se observó (Anexo N) que ambas proteínas presentaron un comportamiento de adsorción

espontánea en la superficie de la probeta de copolímero PLGA, ya que los valores de ΔG_{ADS} son negativos (Anexo N). Debido a que este estudio se realizó con un material semiconductor los valores del cambio de energía de Gibbs que se presentaron en esta investigación son menores que los reportados en diferentes artículos con la adsorción de las mismas proteínas en materiales conductores como acero inoxidable. Esta diferencia se debe a que en los materiales conductores existe un mayor número de iones disponibles para la interacción con el electrolito, por lo cual la adsorción se hace aun más espontánea. Se encontró que el proceso de adsorción fue ligeramente endotérmico, probablemente siendo el resultado del exceso de energía requerido para el rompimiento de interacciones intramoleculares proteína/solvente y aquellas involucradas en la formación de interacciones de proteína-metal. También se encontró que fue un proceso entrópico, sugiriendo algún desdoblamiento estructural de la proteína ocurrió durante el proceso de adsorción.

3.2.2 Voltametría Cíclica

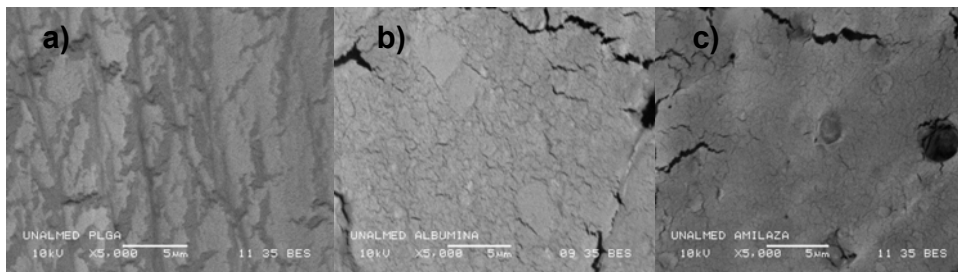
Los voltagramas obtenidos no mostraron picos característicos de las reacciones de oxidación iónica del zinc metálico en presencia del electrolito sino una recta que pasa por el origen correspondiente a una transferencia electrónica con control difusional ^[32] que puede ser debido a la baja concentración de los dopantes (0.3% de cloruro de estaño y 1 de Zn) metálicos que no se detectó ningún pico en la prueba.

3.2.3 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM). La morfología de las probetas del copolímero PLGA sin proteínas y con Albúmina y Amilasas se muestran en la Figura 11a, 11b y 11c, respectivamente. Se pudo apreciar que la probeta del copolímero muestra cierta rugosidad

superficial debido a su forma de elaboración. Las micrografías de la adsorción de cada una de las proteínas muestra una diferente capa formada, debido a que la Albúmina y la Amilasa tienen diferentes pesos moleculares. La capa de adsorción de la Amilasa se notó más homogénea que la formada con la Albúmina.

En los resultados del SEM se puede notar la rugosidad de la superficie, lo cual es de gran importancia para la evaluación del material en usos biomédicos; ya que cuando se aumenta la rugosidad, la proliferación de las células osteoblásticas humanas disminuye. Por otra parte a mayor rugosidad, mayor fuerza de adhesión tenían las células con el sustrato, teniendo una influencia también sobre la morfología celular.

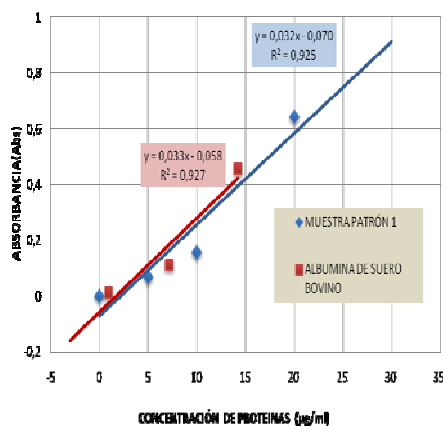
Figura 11. Micrografías SEM: a) PLGA b) Monocapa Albúmina c) Monocapa Amilasa



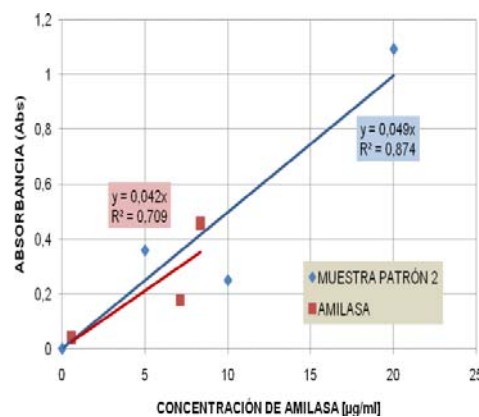
3.2.4 ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE A_{280} . Mediante la ecuación matemática que se basa en la ley de Beer se calculó las concentraciones [$\mu\text{g/ml}$] después de pruebas y se obtuvo mayor porcentaje de disminución de la concentración (antes y después de pruebas) indicando una mayor adsorción sobre la superficie del polímero. Aunque se debe considerar los errores instrumentales en la medición de las concentraciones de la curva patrón y además que las alícuotas de las muestras fueron tomadas de la celda de vidrio en las

que se realizaron las pruebas electroquímicas en la cual se pudieron presentar adherencia de las proteínas en las paredes que influiría en la disminución de la concentración en solución.

Figura 12 .Gráficas de absorbancia vs. Concentración de proteína a) BSA b) Amilasa



a) BSA

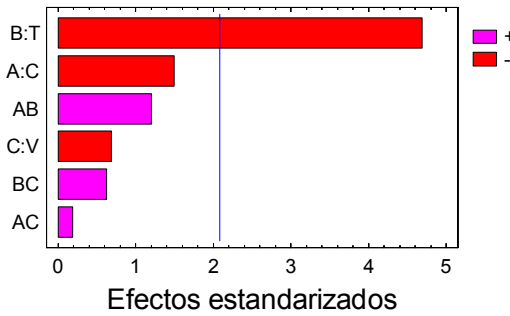


b) Amilasa

3.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO. De las variables independientes del proceso de adsorción de proteínas y de la variable respuesta (R_{ADS}), se realizó el análisis estadístico por medio de los diagramas de pareto. Se encontró que la influencia de cada una de las variables en la variable de respuesta es diferente para cada proteína.

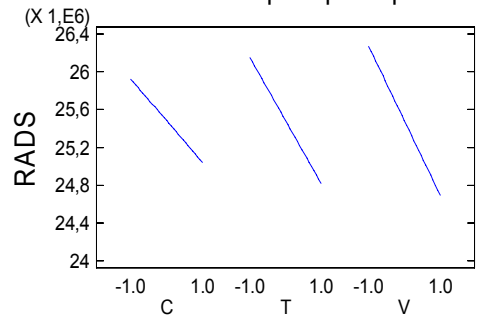
Figura 13. Diagrama estadísticos para la albúmina. a) Diagrama de Pareto b) Diagrama de efectos principales

Gráfico de Pareto estandarizado para RADS



a)

Gráfico de Efectos principales para RADS

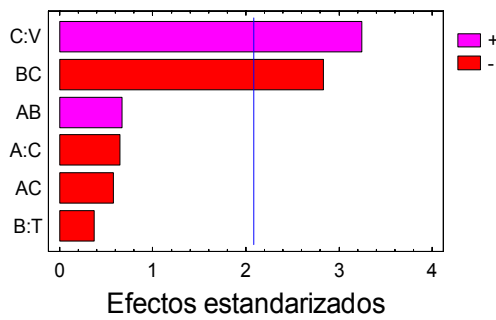


b)

Para la albúmina se pudo observar que la temperatura es el factor más influyente para la variable respuesta R_{ADS} (Figura 12.a). El gráfico de efectos principales (Figura 12.b) mostró la mayor influencia de la temperatura y el voltaje aplicado en R_{ADS} , ya que muestran una mayor pendiente que el de la concentración. De esta manera, se encuentra que se favorece la adsorción, con los aumentos de las tres variables independientes, ya que disminuye la R_{ADS} .

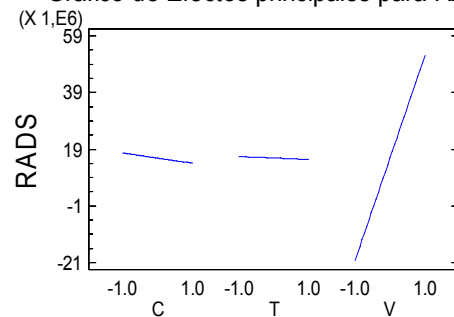
Figura 14. Diagrama estadísticos para la amilasa. a) Diagrama de Pareto b) Diagrama de efectos principales

Gráfico de Pareto estandarizado para RADS



a)

Gráfico de Efectos principales para RADS



b)



En el caso de la amilasa, se pudo observar que el voltaje aplicado y la interacción entre el voltaje y la temperatura son los factores de mayor influencia sobre la variable respuesta R_{ADS} . La figura 12b evidenció la influencia preponderante del voltaje aplicado en R_{ADS} y el efecto minoritario de temperatura y la concentración, ya que la pendiente del voltaje aplicado es mucho mayor. Así mismo, se observó que aumentos de la concentración y la temperatura y disminuciones en el voltaje producen una disminución en la variable de respuesta, es decir, se favorece la adsorción.

CONCLUSIONES

- La adsorción de proteínas en la superficie semiconductor del copolímero muestra claramente que es una adsorción espontánea.
- La concentración de proteínas en una solución, la estabilidad de las proteínas, tamaño, geometría de la probeta y la carga de la superficie del copolímero de PLGA afectan la adsorción de proteínas en la superficie estudiada. Esta investigación fue comparada con anteriores estudios.
- La adsorción de las proteínas en la superficie del copolímero se favoreció debido al carácter hidrofílico del PGA debido a la atracción de grupos polares.
- El estudio y la cuantificación de los parámetros termodinámicos interfaciales involucrados en estos fenómenos podrían ser útiles en el desarrollo de una herramienta potente de predicción del comportamiento biológico de un biomaterial, debido a la importancia de la caracterización energética de las superficies de materiales para aplicaciones biomédicas.
- Los resultados termodinámicos mostraron una adsorción de tipo fisisorción, lo cual difiere de la adsorción mostrada en investigaciones con materiales conductores. Por ello, la monocapa proteica formada tiene una conformación diferente.

RECOMENDACIONES

- Para posteriores investigaciones, cabe la posibilidad de explorar más el copolímero PLA-PGA usando como catalizador otros materiales en diversas cantidades.
- El estudio de este copolímero se puede complementar en una forma más amplia, realizando las pruebas en un medio más cercano al del cuerpo humano, es decir introduciendo células.
- Se recomienda hacer pruebas morfológicas más específicas para los núcelos de proteínas formadas, en la superficie del copolímero.



BIBLIOGRAFIA

- [1] BARBERO ALFREDO, Cesar. Polímeros Conductores y Semiconductores. De la Biología a la Nanotecnología. Universidad Nacional de Rio Cuarto. Asociación Argentina de materiales. 2005. p.1-7.
- [2] YOUNG Luis E, LÓPEZ Guillermo L, RAMÍREZ Siervo A, NARANJO Fernando. VERA, Enrique. Una Revisión de la Dinámica del Solitón en el Transpoliacetileno como explicación del fenómeno de conducción en polímeros. Revista Colombiana de física, vol. 35, no.1. 2003. p.1-3.
- [3] CORTES M.T, OTERO T.F, MÉNDEZ M.A, SUAREZ M. F, DÍAZ M, VERA E. Desarrollo de sensores electroquímicos. Revista Colombiana de Física, vol. 38, no.4. 2006.p.1355-1357
- [4] GODDARD J.M, HOTCHKISS J. H. Polymer Surface Modification For The Attachment of Bioactive Compounds.Prog Polym Sci. vol 32. 2007. p.712-714.
- [5] GUIMARD, Nathalie k. GOMEZ, Natalia. SHMIDT CHRISTINE F. Conducting polymers in biomedical engineering. Prog Polym Sci. Vol. 32. 2007. p.885-893.
- [6] FERNÁNDEZ Isabel. HERNÁNDEZ GIL T, GRACIA ALOBERA Miguel ANGEL, PINGARRON Mariano del Canto, JEREZ BLANCO Luis. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo. Universidad Complutense, Facultad de Ciencias de la Salud. Madrid. 2004.
- [7] OTHMAN SALAH, SACRISTÁN Emilio. Espectrómetro de impedancia compleja para aplicaciones Biomédicas Memorias II



- Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica, La Habana Cuba. 2001.
- [8] KELLY Robert. SCULLY R, John. Electrochemical Techniques in Corrosion Science and Engineering. Marcel Dekker INC. New your.2002.
- [9] COTTIS Robert, TURGOOSE, Stephen. Electrochemical Impedance and Noise.B.C Syrett, Series Editor. Manchester .1999.
- [10] VALENZUELA, Raúl. Caracterización de Materiales Por Espectroscopia de Impedancias. Instituto de Investigaciones en Materiales, Revista Cubana de Física, Vol. 19, no 2. 2002.
- [11] SABINO G, Marcos A. Modificación de superficies de biomateriales poliméricos y estudio de biocompatibilidad. Revista Iberoamericana de Polímeros.Vol 9, no 3. 2008.
- [12] IVIRICO, Jorge Luis. Estudio de hinchamiento “in Vitro” y evaluación preliminar de biocompatibilidad de hidrogeles de poli (acrimida-co-ácido metacrílico).Universidad de la Habana, Biomecánica, Cuba. 2000. p.206-208.
- [13] RODRIGUEZ LARA, Laura M. Evaluación electroquímica de recubrimientos bioactivos de hidroxapatita obtenidos por electrodeposición anódica sobre acero inoxidable 316 LVM. Universidad Industrial de Santander. Tesis de grado. 2007. p.3-4.
- [14] BARD, Alen J.FAULKNER Larry R. electrochemical methods, Fundamentals and Applications. Wiley John y Sons, Inc. 2001.
- [15] COBAS, S.Pavoni, A. ZAYAS, F.RODRÍGUEZ, E. ÁLVAREZ, R.CONTRERAS. Aplicación de la voltametría en el análisis del crecimiento microbiológico.VII Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería. Artículo T061.Habana Cuba. 2007.
- [16] SMIECHOWSKI, Matthew F. LVOVICH, Vadim F. ROY, Shuvo. FLEISCHMAN, Aaron. FISSELL, William H. RIGA, Alan t.

- Electrochemical detection and characterization of proteins. Biosensors and Bioelectronics. Vol. 22. 2006. p.670–677.
- [17] MIDDLETON, J., Tipton, A.J., “Synthetic Biodegradable Polymers as Orthopedic Devices”, *Biomaterials*. Vol 20. 2000.p. 2335-2346
- [18] SMITH, J.M. VANNESS.H.C. ABBOTT, M.M.INTRODUCCIÓN a la termodinámica en ingeniería química .sexta edición .Mc Graw Hill.2004.p.628-629.
- [19] COSMAN Nicholas P, FATIH, Khalid. ROSCO, Sharon G. Electrochemical impedance spectroscopy study of the adsorption behaviour of α -lactalbumin and β -caseinat stainless steel. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 574. 2005.p.262
- [20] MOTTA, A.C., DUEK, E.A.R. Síntese, Caracterização e Degradação “*in vitro*” do poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico). *Revista Matéria*, v. 11, n.3, Sorocaba, Brasil.2006.p.340 – 350
- [21] RITTO, Korrodi A. tornillos reabsorbibles para anclaje ortodóncico.*The orthodontic Cyber Journal*. 2007. p.4-10.
- [22] LAYNE, Métodos Spectrophotometric y Turbidimetric del E. para medir las proteínas. *Métodos en enzimología* 3.1957.p. 447 - 455
- [23] FERNANDEZ REYES, Emilio. CEJUDO GLAVÁN Aurora. Métodos para la cuantificación de proteínas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales.14071-Cordoba. 2006.
- [24] HECHAVARRÍA BALMASEDA, Ángel. Manual de procedimientos de técnicas para el diagnostico del dengue. División de Desarrollo de Sistemas y Servicios de Salud. Programa de Medicamentos Esenciales y Tecnología. Servicios de Laboratorios y Sangre. El Salvador. 2002.
- [25] DOUILLARD, Roger. DAOUH, Mohamed. AGUIE´-BE´GHIN, Ve´ronique. Polymer thermodynamics of adsorbed protein layers.

- France bService de Physique de l'Etat Condense', Colloid and Interface Science 8. 2003. p. 380–386.
- [26] HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, José Carlos. GRACÍA GONZÁLEZ, Cristina. RIBELLES GÓMEZ, José Luis. PRADAS MONLEÓN, Manuel. SÁNCHEZ SALMERÓ, Manuel. Centro de Biomateriales, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España. 2008.
- [27] D.F Williams, ed. Definitions in Biomaterials: proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomateriales, Progress in Biomedical Engiennering, Vol 4. ISBN: 0444428585 Elsevier, Amsterdam. 1987.
- [28] AGUILAR, Gelancio. Fundamentos de adsorción. Universidad Autónoma de puebla, mexico. 2006.p.13-14.
- [29] SALAGER, Jean Lois. Adsorción-mojabilidad. Laboratorio de formulación, interfase, reologia y procesos. Universidad de los Andes. Merida. Venezuela. versión 2. 1998. p.1-3.
- [30] CISNEROS MONTESINOS, Rosa MA.MANSIR TEJADA, Armando. ZAMUDIO.GUZAMAN Roberto. APLICADAS A LA BIOTECNOLOGIA: DINÁMICA DE SISTEMAS DE AFINIDAD. Departamento de investigaciones científicas y tecnológicas.2000.p.17-45.
- [31] AMENOS FELIU MARSAL. Proyección de hilos. Ediciones UPC. Politext. 1997.p.66-67.
- [32] BORRÁS, Carlos, MÁRQUEZ, Olga P.MÁRQUEZ, Jairo. ORTÍZ E YRIS MARTÍNEZ, Reynaldo. Synthetic aspects of the electrochemical oxidation of 4-methyl anisole. Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia v.28 n.1 Maracaibo.2005.p.4-10.
- [33] MICHIARDI, Alexandra. GIL MUR, Francisco José. BÁDENA APARICIO, Conrado José. Nuevo tratamiento de oxidación en aleaciones de NiTi para aplicaciones biomédicas. Caracterización



superficial y respuesta biológica in vitro. Universidad Politécnica de Catalunya. 2005



ANEXOS



ANEXO A

CONCEPTOS TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS UTILIZADAS

CONCEPTOS TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS UTILIZADAS

Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE)

La espectroscopia de impedancia se logra por diferentes variantes de técnicas de barridos de frecuencia o técnicas de Fourier, esta técnica de barrido permite caracterizar los procesos de interés como es la adsorción de especies que no son electroactivas que cambia a menudo el comportamiento electroquímico o alteran la velocidad de transferencia de electrones sobre la superficie del electrodo de trabajo^[9].

Los datos obtenidos en los ensayos de EIE, son reportados en los diagramas de Nyquist y Bode. El primero de ellos, también conocido como gráfico en plano complejo, corresponde a graficar Z'' vs. Z' . El diagrama de Bode es la representación de impedancia vs. frecuencia.

Para los estudios de adsorción que usan EIE, los espectros de impedancia obtenidos se analizan mediante circuitos eléctricos equivalentes^[13]. Donde el circuito equivalente es una combinación de elementos como resistencias, capacitancias, inductores, etc.

Los valores de estos parámetros eléctricos fueron utilizados para obtener información que simula el proceso de adsorción por afinidad de proteínas con el copolímero.

Voltametría Cíclica. La Voltametría cíclica es una de las técnicas de caracterización electroquímica que consiste en realizar la variación del potencial del electrodo de trabajo con el tiempo, entre dos límites, superior e inferior, a la vez que se registra la corriente que circula a través de este electrodo.

Esta técnica consiste en aplicar tensión controlada entre los electrodos de la celda electrolítica en donde la forma de onda es triangular. Como resultado se obtiene curvas de corriente-tensión (voltagramas).^[15]

Fuente: COBAS, S.2007.^[15]



ANEXO B

PROTOCOLO DE ESTERILIZACIÓN

LIMPIEZA Y CUIDADOS PARA EL MANEJO DE MATERIAL BIOLÓGICO

1. Se deben limpiar los objetos inmediatamente después de usados, con agua, jabón y cepillo de instrumental. En determinados casos, se pueden dejar sumergidos en agua jabonosa, no dejándolos mucho tiempo para evitar su oxidación.
2. Pasar los instrumentos u objetos por corriente de agua tibia, para arrastrar todas las sustancias adheridas.
3. Todo esto se completa con una adecuada utilización del material, evitando que los objetos punzantes se golpeen o doblen, que no se oxiden, manteniéndolos en el mejor estado posible.
4. Con alcohol isopropano al 70% desinfecta termómetros y superficies.
5. La celda plana y el envase de las probetas y soluciones se lavan con solución acuosa de formaldehído al 40% (formol) siendo eficaz contra: Virus, Bacterias, Hongos, Bacilo Tuberculoso.
6. Se deben limpiar los objetos inmediatamente después de usados, con agua, jabón y cepillo de instrumental. En determinados casos, se pueden dejar sumergidos en agua jabonosa, no dejándolos mucho tiempo para evitar su oxidación.
7. Pasar los instrumentos u objetos por corriente de agua tibia, para arrastrar todas las sustancias adheridas.

8. Todo esto se completa con una adecuada utilización del material, evitando que los objetos punzantes se golpeen o doblen, que no se oxiden, manteniéndolos en el mejor estado posible.
9. Con alcohol isopropano al 70% desinfecta termómetros y superficies
10. La celda plana y el envase de las probetas y soluciones se lavan con solución acuosa de formaldehído al 40% (formol) siendo eficaz contra: Virus, Bacterias, Hongos, Bacilo Tuberculoso.
11. Durante todo las pruebas con material biológico se recomienda la utilización de guantes de nitrilo, mascara y algodón para limpiar sobre las superficies.

Fuente: Protocoló de esterilización insalud Zaragoza .1990



ANEXO C
MATRIZ DE DISEÑO EXPERIMENTAL DE PRUEBAS

MATRIZ EXPERIMENTAL PARA LAS PRUEBAS ELECTROQUÍMICA

PRUEBAS	TEMPERATURA(°C)	CONCENTRACION($\mu\text{g}/\text{m}$)	VOLTAJE AC	
1	25	5	0	
2	25	5	0,2	
3	25	5	0,4	
5	25	10	0	
6	25	10	0,2	
7	25	10	0,4	
8	25	15	0	
9	25	15	0,2	
10	25	15	0,4	
11	30	5	0	
12	30	5	0,2	
13	30	5	0,4	
14	30	10	0	
15	30	10	0,2	
16	30	10	0,4	
17	30	15	0	
18	30	15	0,2	
19	30	15	0,4	
20	37	5	0	
21	37	5	0,2	
22	37	5	0,4	
23	37	10	0	
24	37	10	0,2	
25	37	10	0,4	
26	37	15	0	
27	37	15	0,2	
28	37	15	0,4	
29	25	15	0	REPETICIÓN
30	30	5	0	REPETICIÓN
31	37	5	0,4	REPETICIÓN



32	37	15	0	REPETICIÓN
----	----	----	---	------------

ANEXO D
MATRIZ DE EXPERIMENTOS PARA PRUEBAS PRELIMINARES

MATRIZ PARA PRUEBAS PRELIMINARES

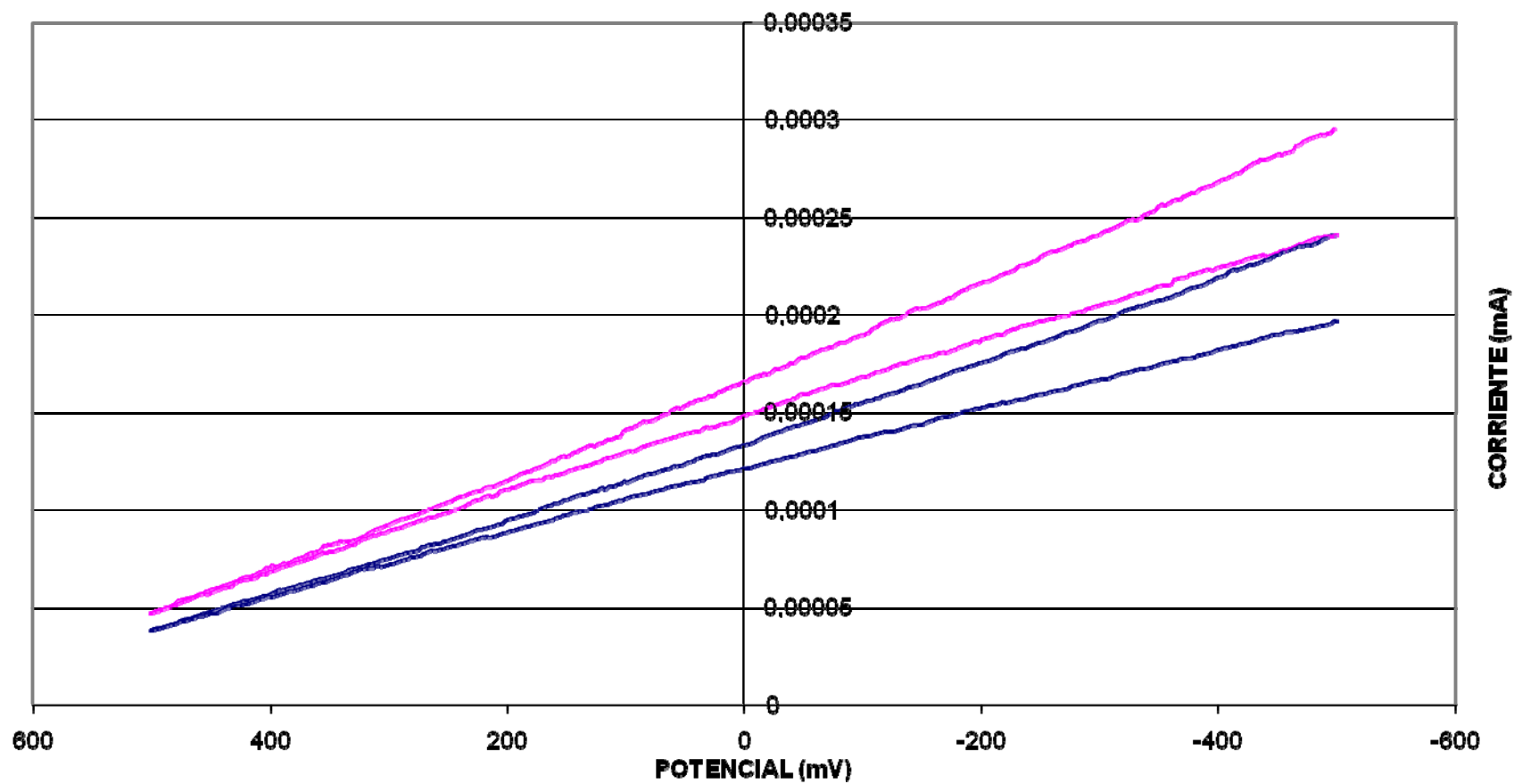
tiempo de Estabilización	Rango de Frecuencia	
15	0,001-100000	
15	0,01-100000	
15	0,1-100000	
30	0,001-100000	
30	0,01-100000	
30	0,1-100000	
30	0,001-100000	
60	0,01-100000	
60	0,1-100000	
60	0,001-100000	
30	0,01-100000	REPETICIÓN
60	0,1-100000	REPETICIÓN
15	0,001-100000	REPETICIÓN
30	0,01-100000	REPETICIÓN
60	0,1-100000	REPETICIÓN
15	0,001-100000	REPETICIÓN
30	0,01-100000	REPETICIÓN
60	0,1-100000	REPETICIÓN



ANEXO E

VOLTAGRAMA DE PLGA EN SOLUCION DE PBS

VOLTAMETRIA





ANEXO F

DATOS DE ADSORCIÓN DEL CIRCUITO EQUIVALENTE

DATOS DE ADSORCIÓN DEL CIRCUITO EQUIVALENTE

a) Datos del circuito interno correspondiente al fenómeno de adsorción de proteínas a 37°C y 0 V aplicado a diferentes concentraciones.

		CIRCUITO INTERNO			
PROTEINA	[] (g/L)	R _{ADS} (Ohm)	C _{ADS} (F)	n ₂	EFC 2
ALBUMINA	0.05	3,34E+05	1,41984E-06	0,55980615	7,94833E-07
	0.1	2,68E+05	3,2394E-07	0,55691711	1,80408E-07
	0.2	1,36E+05	3,48719E-06	0,62088676	2,16515E-06
AMYLASE	0.05	9,35E+04	1,92223E-06	0,55980615	1,07608E-06
	0.1	7,79E+04	8,74386E-07	0,55691711	4,8696E-07
	0.2	7,36E+04	3,51025E-07	0,00620887	2,17947E-07

b) Datos del circuito interno correspondiente al fenómeno de adsorción de 20µg/ml de las proteínas con 0 V aplicado a diferentes temperaturas.

		CIRCUITO INTERNO			
PROTEINA	T (°C)	R _{ADS} (Ohm)	C _{ADS} (F)	n ₂	EFC 2
ALBUMINA	25	5,46E+06	1,40845E-07	0,74038221	1,04279E-07
	30	2,54E+06	3,2394E-07	0,39698598	4,03785E-08
	37	1,36E+05	3,48719E-06	0,62088676	2,16515E-06
AMYLASE	25	6,08E+06	2,95697E-08	0,74038221	2,18929E-08
	30	4,09E+06	2,12356E-06	0,39698598	8,43025E-07
	37	7,36E+04	3,51025E-07	0,62088676	2,17947E-07

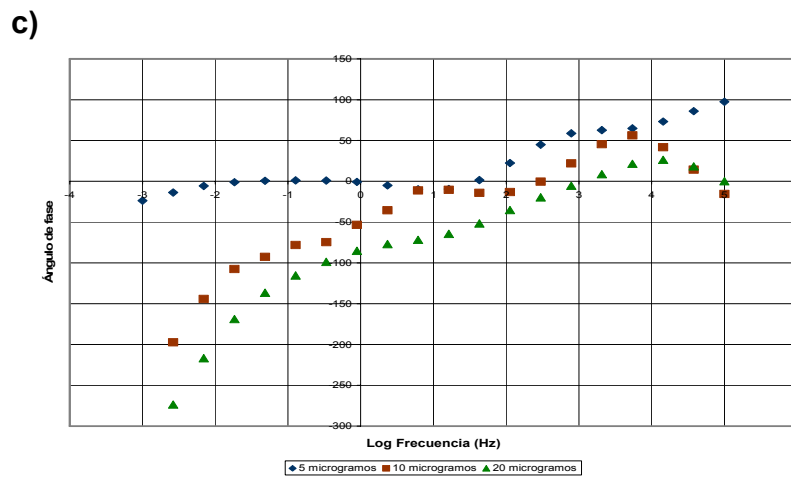
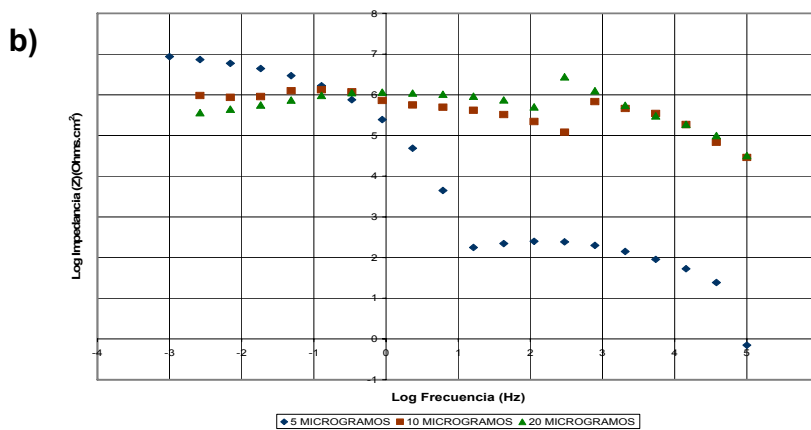
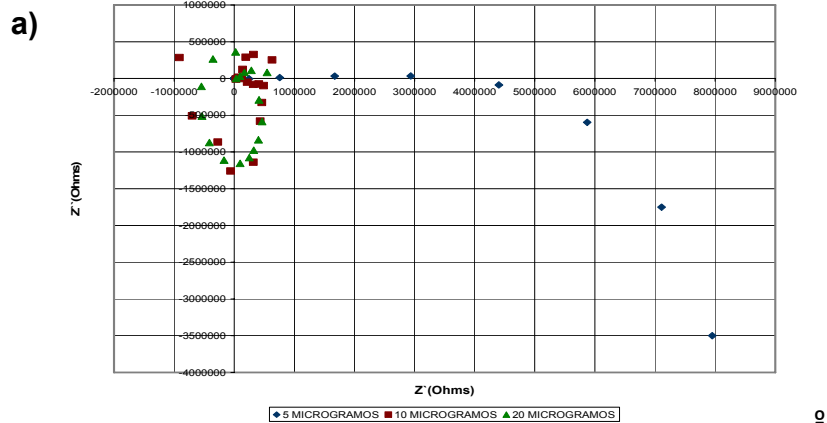
c) Datos del circuito interno correspondiente al fenómeno de adsorción de 20µg/ml de las proteínas a 37°C con diferentes voltajes aplicados.

		CIRCUITO INTERNO			
PROTEINA	V APLICADO (V)	R_{ADS} (Ohm)	C_{ADS} (F)	n₂	EFC 2
ALBUMINA	0	1,36E+05	3,48719E-06	0,62088676	2,16515E-06
	0.2	1,85E+06	1,3964E-07	0,74438118	1,03945E-07
	0.4	7,66E+05	1,13408E-07	0,7235819	8,20601E-08
AMYLASE	0	1,36E+05	3,48719E-06	0,62088676	2,16515E-06
	0.2	1,12E+06	4,21441E-07	0,74438118	3,13713E-07
	0.4	2,11E+06	8,51347E-08	0,7235817	6,16019E-08



DATOS G
DIAGRAMAS ELECTROQUÍMICOS DE LA ADSORCIÓN DE
AMILASA A DIFERENTES CONCENTRACIONES

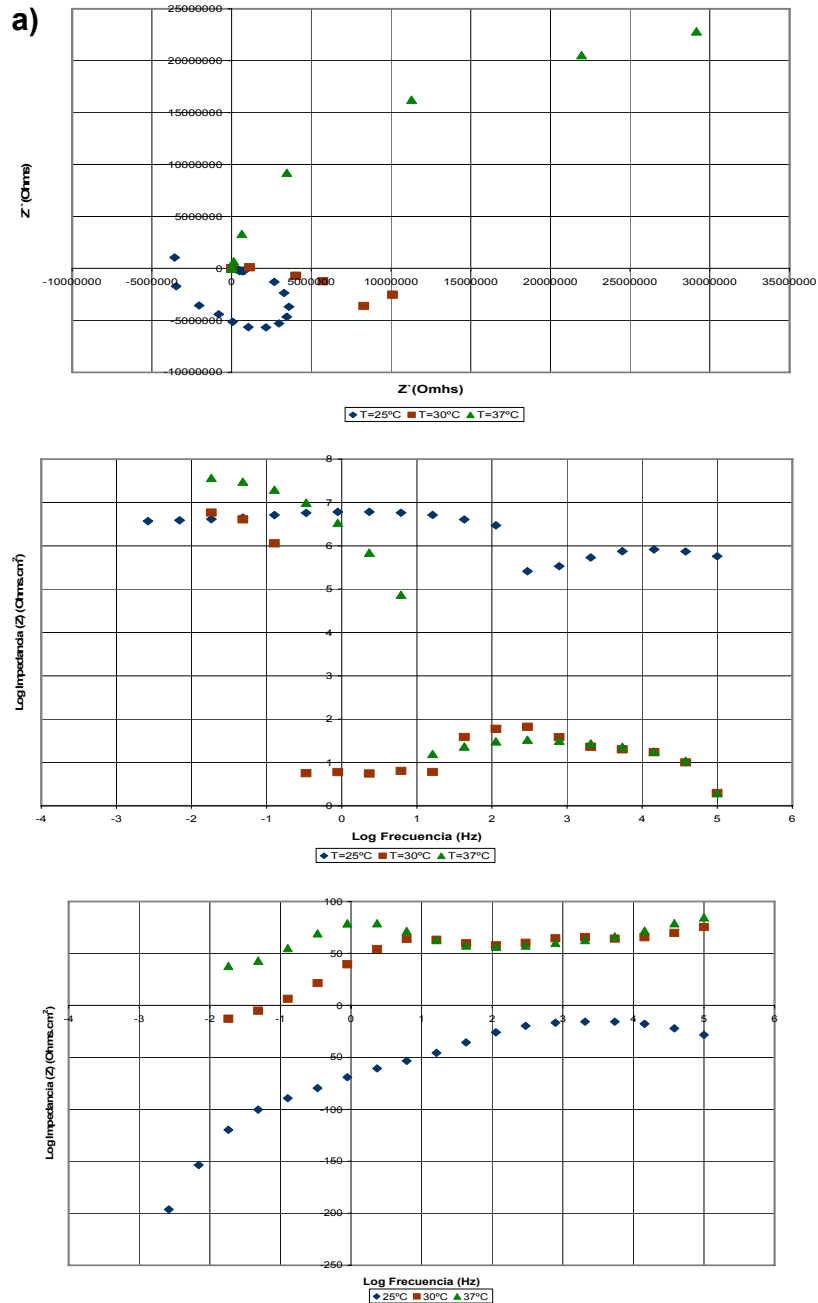
DIAGRAMAS DEL EIE DE LA AMILASA A UN VOLTAJE APLICADO DE 0.2 V A 37°C. A) NYQUIST B) BODE





DATOS H
DIAGRAMAS ELECTROQUÍMICOS DE LA ADSORCIÓN DE
AMILASA A DIFERENTES TEMPERATURAS

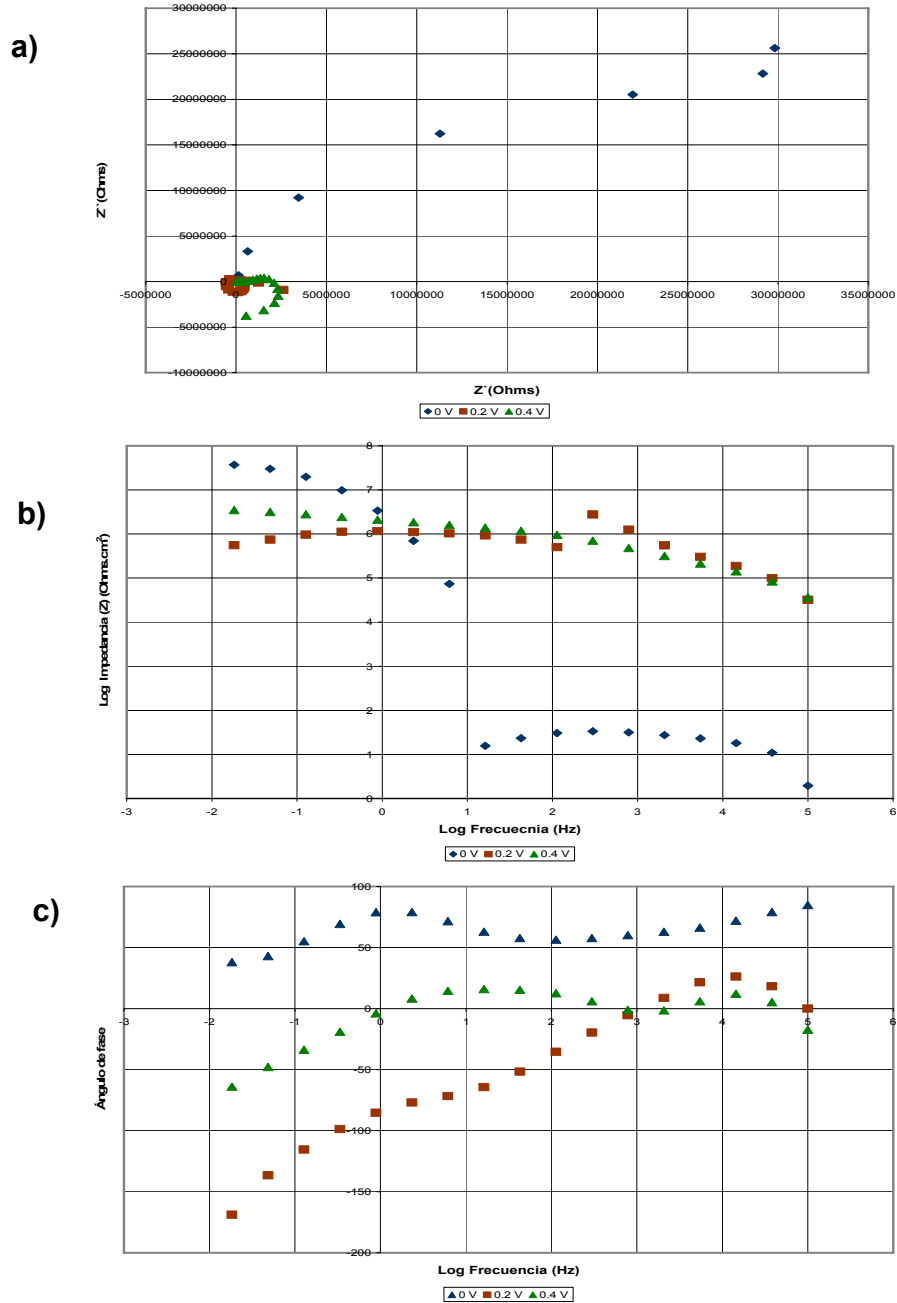
DIAGRAMAS DEL EIE DE LA AMILASA CON UNA CONCENTRACIÓN DE 20 MG/ML CON UN VOLTAJE APLICADO DE 0 V A) NYQUIST B)





ANEXO I
DIAGRAMAS ELECTROQUÍMICOS DE LA ADSORCIÓN DE
AMILASA A DIFERENTES VOLTAJES APLICADOS

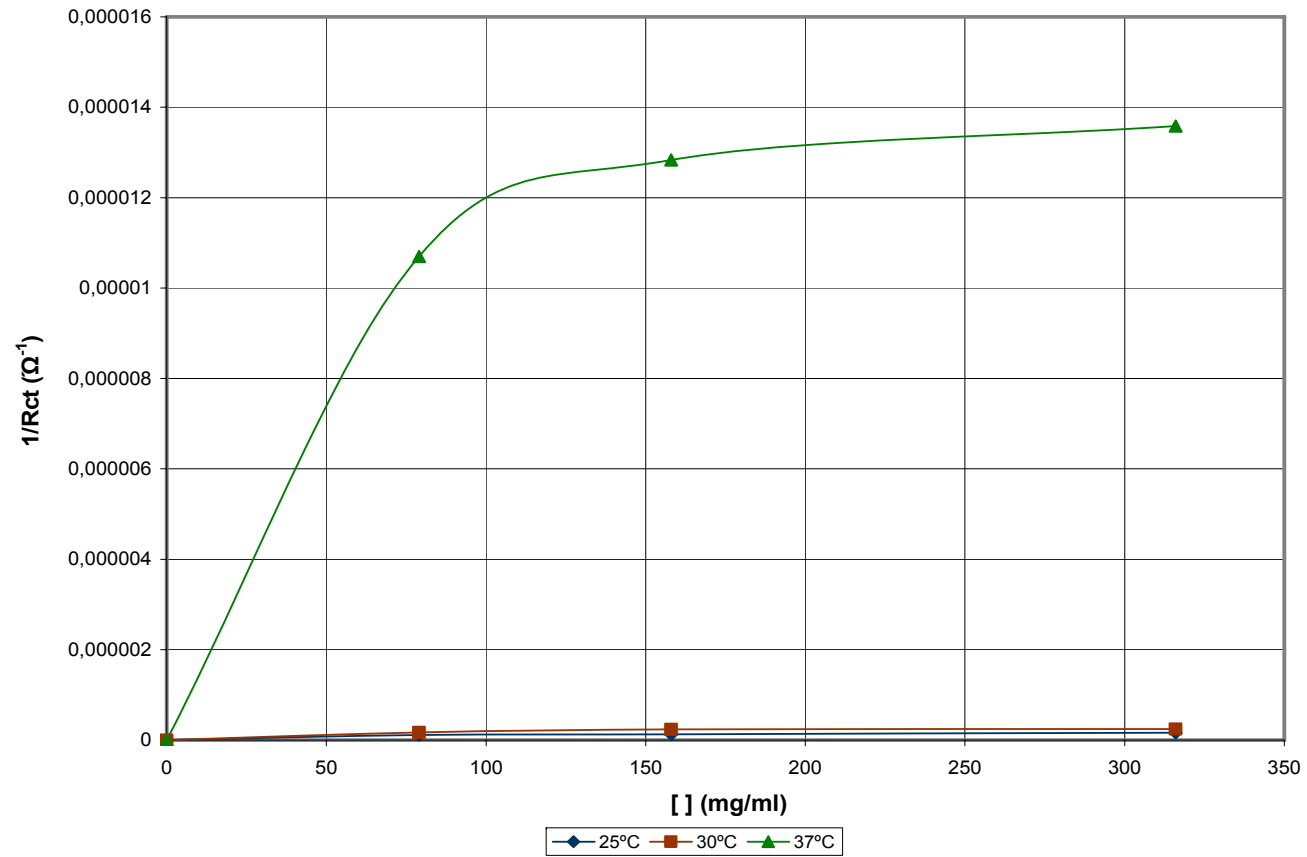
DIAGRAMAS DEL EIE DE LA AMILASA CON UNA CONCENTRACIÓN DE 20 MG/ML A 37°C A) NYQUIST B) BODE





ANEXO J
ISOTERMA DE ADSORCIÓN DE DE LA AMYLASE CON VOLTAJE
DE 0V APLICADO SOBRE LA SUPERFICIE DEL COPOLIMERO
PLGA

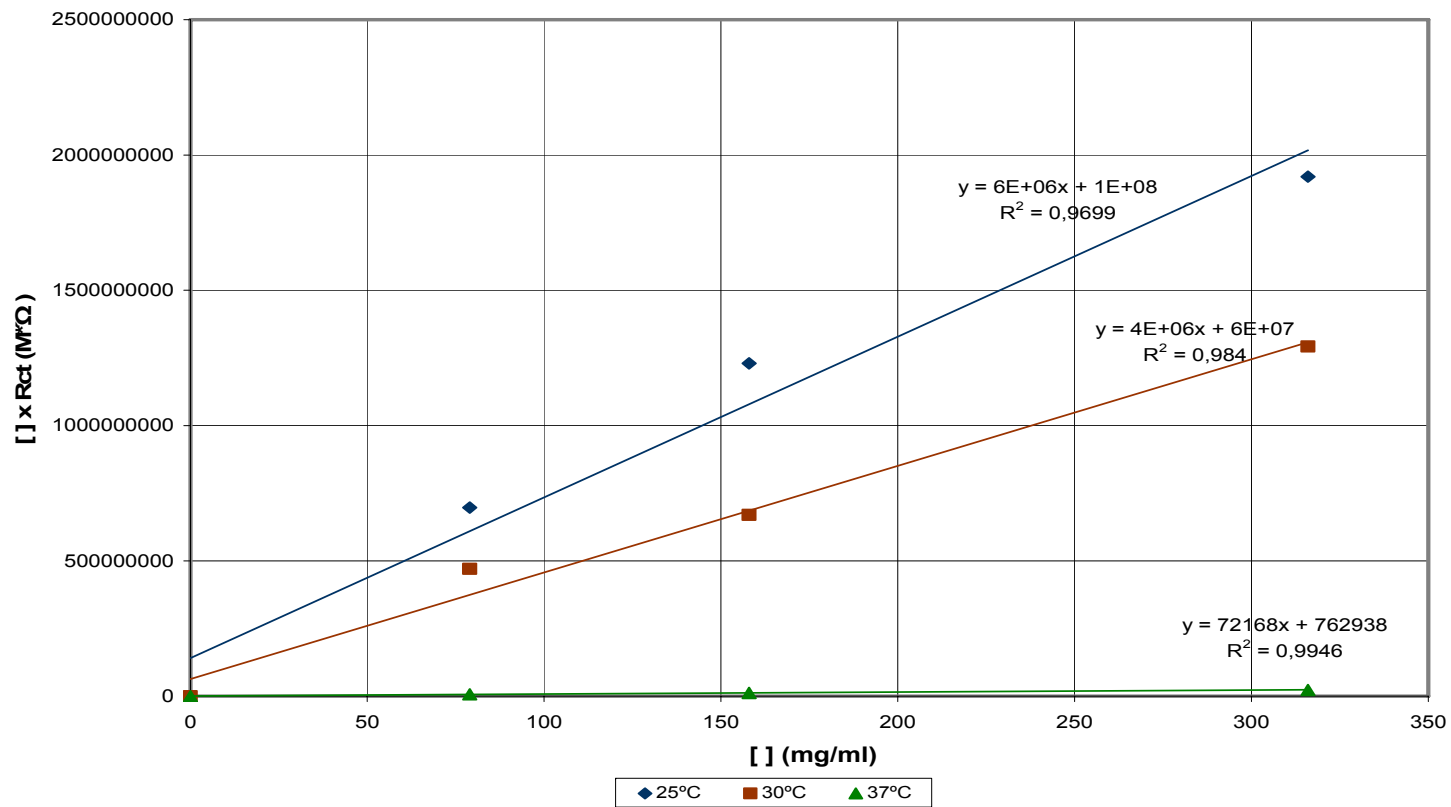
ISOTERMA DE ADSORCION DE LA AMILASA





ANEXO K
ISOTERMA DE ADSORCIÓN DE LANGMUIR DE LA AMILASA CON
VOLTAJE APLICADO DE DE 0 V SOBRE LA SUPERFICIE DEL
COPOLIMERO PLGA

ISOTERMA DE ADSORCIÓN DE LANGMUIR DE LA AMILASA

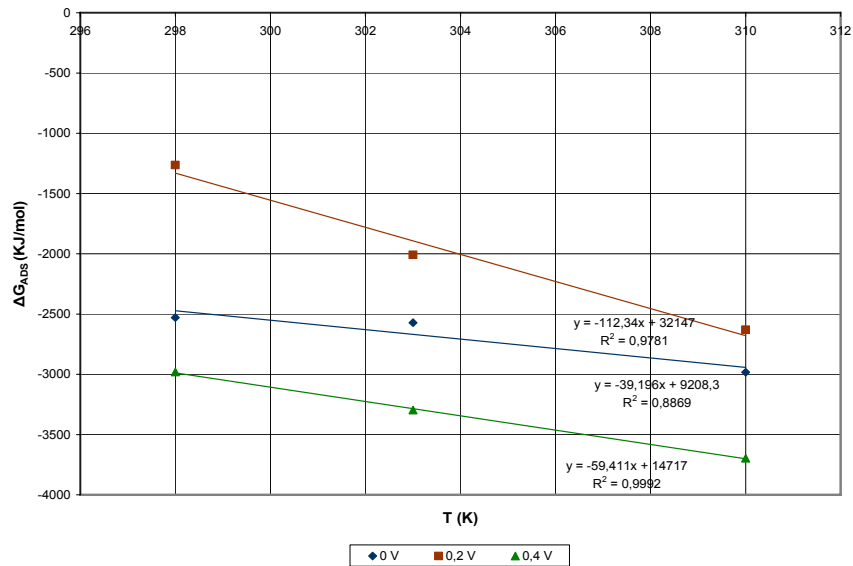




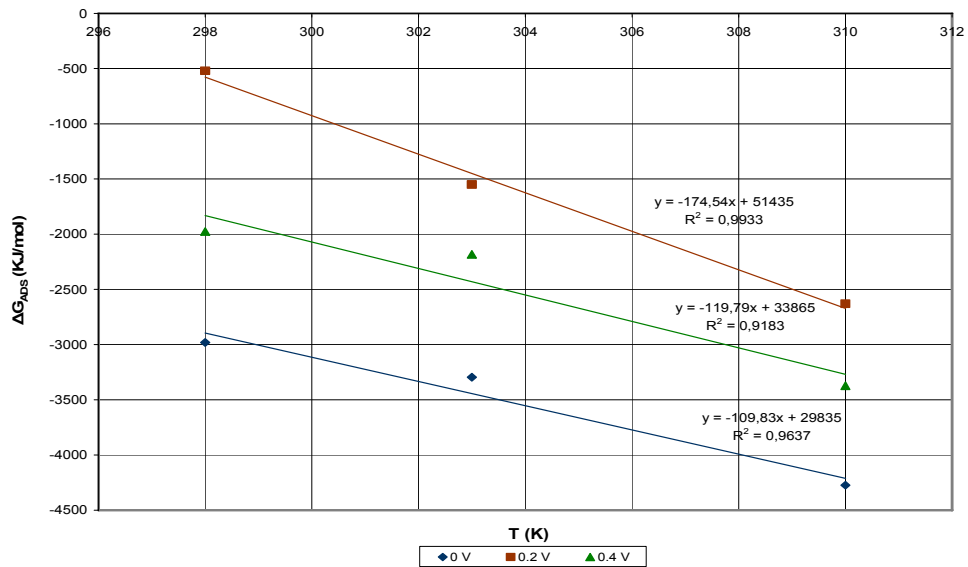
ANEXO L
GRAFICA DE LA DEPENDENCIA DE LA ENERGIA LIBRE DE GIBBS
DE ADSORCION DE LA TEMPERATURA

ENERGÍA LIBRE DE GIBBS VS TEMPERATURA

a) Albumina



b) Amilasa





ANEXO M
DATOS TERMODINÁMICOS DE LOS VALORES DE ADSORCIÓN
PARA LA ALBUMINA Y LA AMILASA.

VALORES TERMODINÁMICOS PARA LAS DOS PROTEINAS ESTUDIADAS

	V (V)	T (°C)	B _{ADS}	Γ _{MÁX}	Γ	ΔG (J/mol)	ΔS (J/mol)	ΔH (J/mol)
ALBUMINA	0	25	0,05	0,0000002	7,861E-16	-2528,83	39,196	779133,798
		30	0,05	0,0000005	3,930E-15	-2571,26		924779,348
		37	0,0573	4,3611E-06	7,861E-14	-2983,03		376540,012
	0.2	25	0,03	1,6667E-07	3,930E-16	-1263,18	112,34	608874,498
		30	0,04	0,00000025	1,572E-15	-2009,11		815620,528
		37	0,05	0,0000005	7,861E-15	-2630,67		888269,981
	0.4	25	0,06	1,6667E-07	7,861E-16	-2980,57	59,411	998750,726
		30	0,0666	0,0000005	5,241E-15	-3296,01		1145647,26
		37	0,0755	1,3232E-06	3,144E-14	-3695,44		1045488,28
AMYLASE	0	25	0,06	1,6667E-07	7,861E-16	-2980,57	109,83	888320,4
		30	0,06666	0,00000025	2,620E-15	-3296,01		998801,145
		37	0,09459	1,3857E-05	4,121E-13	-4273,92		1325027,4
	0.2	25	0,02222	0,0000005	8,735E-16	-519,618	125,98	154972,431
		30	0,03333	0,000001	5,241E-15	-1549,80		469716,397
		37	0,05	0,000001	1,572E-14	-2630,67		815634,168
	0.4	25	0,04	2,5E-08	7,861E-17	-1975,96	119,79	588956,556
		30	0,0428	3,3333E-07	2,246E-15	-2182,92		661546,362
		37	0,06666	0,0000005	1,048E-14	-3372,15		1045488,28



ANEXO N
PROTOCOLO DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES
MEDIANTE A₂₈₀

PROTOCOLO DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES MEDIANTE A 280

En la determinación de la absorción de proteínas en solución buffer de fosfatos (PBS) se realizó los siguientes pasos:

1. Se calentó el espectrofotómetro (cerca de 30 min.)
2. Se ajustó la longitud de onda a 280 nanómetros
3. Con la solución tampón (PBS) solamente, se calibró a absorbancia cero
4. se realizó un patrón de cada proteína con concentración conocida
5. Se midió la absorbancia de la solución de las proteínas

Debido a que existe una relación lineal entre la absorbancia y la concentración (ley de Beer), se realizó una curva de calibración con la proteína estándar seleccionada (albúmina de suero bovino que tiene un coeficiente de absorción de 63) mediante la siguiente ecuación:

$$C_m = \frac{A_m}{A_e} C_e \quad [3]$$

Donde A_e es la absorbancia del estándar, A_m es la absorbancia de la muestra, C_e es la concentración del estándar y C_m es la concentración de la muestra.

Con base a lo anterior se calcula la concentración desconocida después de las pruebas electroquímicas.

Fuente:

STOSCHECK, CM. Cuantificación de la proteína. *Métodos en enzimología* 182:50 - 69. 1990.