

Estudio microgravimétrico y electroquímico de recubrimientos de colágeno de bovino tipo I en cristales de cuarzo Au-Cr mediante EQCM para aplicaciones biomédicas

Daniel Fernando González Velasco

Trabajo de Grado para Optar el título de Ingeniero Químico

Director

Darío Yesid Peña Ballesteros

PhD. en corrosión

Codirector

Nerly Deyanira Montañez Supelano

M.sc en Ingeniería de materiales

**Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas
Escuela de Ingeniería Química
Bucaramanga**

2018

Dedicatoria

*A Dios por darme salud y fortaleza para avanzar cada día más en esta escalera finita,
llamada vida.*

*A mi madre, que me apoyo en este reto personal, siempre estuvo presente para brindarme
consejos, subirme el animo y expresarme todo su infinito amor. A ella le debo la vida, y lucharé
hasta el final para darle lo mejor de mí.*

*A mi padre, por sus sabios consejos, su incondicional apoyo y su gran sentido del humor. Él
es mi ejemplo por seguir, hombre generoso y humilde que con berraquera logro sacar adelante
a su familia y hoy en día todo ese esfuerzo se ve reflejado en mí.*

Gracias padres, los amo con todo mi corazón.

*A mi hermana, por reflejarme esa alegría, demostrar su preocupación a cada momento y
manifestar su felicidad al verme triunfar en cada logro.*

*A mi novia, le agradezco por estar siempre en cada paso que he dado en este proceso, por el
amor brindado y ser un soporte, el cual nunca me dejo bajar la cabeza.*

*Y finalmente, a mis amigos Michael, Marcos, Borda, Sergio, Carlos, Ingri, Kathe, Monroy;
esta lista se alargaría demasiado para expresar ese cariño a todas las personas que han
compartido esta increíble carrera conmigo, ellos saben quiénes son. Con todos ellos vivimos
momentos muy especiales y estos hechos quedaran marcados en nuestras memorias.*

Daniel Fernando González Velasco

Agradecimientos

Al Ph.D. Dario Yesid Peña Ballesteros por su orientación y dirección en la realización de este proyecto, por sus consejos y enseñanza.

A la ingeniera química M. Sc Nerly Deyanira Montañez Supelano, por brindarme la oportunidad de trabajar con ella, por entregar su confianza y conocimiento en la elaboración de este proyecto, usted fue la principal promotora de este grandioso proyecto, muchas gracias.

A Joaquín Orozco, profesional de laboratorios de la escuela Ingeniería Química, por suministrar sus conocimientos y ayudar en el entendimiento de las técnicas implementadas en este proyecto.

A la escuela Ingeniería Química, por su personal de apoyo y docentes, son grandes seres humanos, con ayuda de sus enseñanzas y conocimientos me formaron para dar el siguiente paso, a una larga vida profesional e integra.

A los grupos de investigación GIC, CINTROP, LEAM Y GIP, a los laboratorios de la Universidad Industrial de Santander y a la Universidad Nacional Sede Medellín por facilitar el uso de sus instalaciones y equipos.

A nuestra alma mater la Universidad Industrial de Santander, por las experiencias vividas, que de alguna forma me dejaron muchas enseñanzas y permitieron formarme todo un profesional.

Contenido

	Pág.
Introducción.....	13
1. Metodología.....	17
1.1 Solubilización del colágeno de tendón de bovino.	18
1.3 Recubrimientos de colágeno de bovino sobre cristales de cuarzo Au-Cr.	19
1.4 Caracterización de los recubrimientos de colágeno resultantes.	19
1.5 Evaluación de los recubrimientos mediante la microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo EQCM.	20
2. Resultados y análisis.....	21
2.1 Caracterización de los recubrimientos.....	22
2.2 Evaluación electroquímica de los recubrimientos mediante la técnica EQCM.....	28
3. Conclusiones.....	36
4. Recomendaciones	37
Referencias Bibliográficas.....	38
Apéndices	42

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. <i>Principales enlaces en el espectro FTIR de colágeno de tendón achiles bovino tipo I a 0.4% P/V y 0.8%P/V.</i>	25
Tabla 2. <i>Principales enlaces en el espectro Raman de colágeno de tendón achiles bovino tipo I.</i>	27

Lista de Figuras

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Diagrama de flujo del desarrollo experimental	18
<i>Figura 2.</i> Micrografías SEM de colágeno al 0.4% P/V (a) 500X, (c) 2000X y de colágeno al 0.8% P/V (b) 500X, (d) 2000X.....	23
<i>Figura 3.</i> Espectros IR Colágeno de tendón de achiles bovino tipo I a 0.4 %P/V y 0.8 %P/V. ..	24
<i>Figura 4.</i> Espectros Raman de Colágeno de tendón de achiles bovino tipo I a 0.4 % P/V y 0.8 % P/V.....	27
<i>Figura 5.</i> Diagrama Nyquist para las muestras con y sin resonancia a (a) 0 días de inmersión y (b) 1 día de inmersión en medio de cultivo.	29
<i>Figura 6.</i> Circuito equivalente con una constante de tiempo propuesto para simular la interacción de los recubrimientos de COL y del cristal durante 0 y 1 día de inmersión en medio de cultivo.	32
<i>Figura 7.</i> Cambio de la masa con respecto al tiempo de las concentraciones de COL, (a) 0 día de inmersión, (b) 1 día de inmersión.	34
<i>Figura 8.</i> Cambios de resistencia con respecto al tiempo de las concentraciones de COL, (a) 0 día de inmersión y (b) 1 día de inmersión.	35

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Montaje experimental para las pruebas electroquímicas.....	42
Apéndice B. Microbalanza de cristal de cuarzo QCM200	43
Apéndice C. Diagramas de Bode para los recubrimientos de COL y cristal desnudo con y sin resonancia a 0 y 1 día de inmersión. a) 0 días de inmersión. b) 1 día de inmersión.	44
Apéndice D. Valores de los parámetros de los circuitos equivalentes para EIS sin QCM.	45
Apéndice E. Valores de los parámetros de los circuitos equivalentes para EQCM.	46

Abreviaturas

AA	Ácido Acético
COL	Colágeno
ECM	Matrix extracelular
EIS	Espectroscopia de impedancia electroquímica
EQCM	Microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo
FTIR	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier
QCM	Microbalanza de cristal de cuarzo
OCP	Potencial de circuito abierto
RAMAN	Espectroscopia Raman
SEM	Microscopía electrónica de barrido

Resumen

TÍTULO: ESTUDIO MICROGRAVIMÉTRICO Y ELECTROQUÍMICO DE RECUBRIMIENTOS DE COLÁGENO DE BOVINO TIPO I EN CRISTALES DE CUARZO AU-CR MEDIANTE EQCM PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS*.

AUTOR: GONZÁLEZ VELASCO, DANIEL FERNANDO **.

PALABRAS CLAVE: ÁCIDO ACÉTICO, COLÁGENO DE BOVINO TIPO I, SPIN COATING, MICROBALANZA ELECTROQUÍMICA DE CRISTAL DE CUARZO.

DESCRIPCIÓN: En esta investigación se elaboró un estudio microgravimétrico y electroquímico del colágeno de tendón Aquiles bovino tipo I por medio de la técnica EQCM. Se realizaron recubrimientos por Spin Coating de ácido acético y colágeno sobre cristales de cuarzo en dos concentraciones (0.4 % P/V y 0.8 % P/V), para cada recubrimiento se llevó a cabo 5 capas, con un secado de 10 minutos entre capa y capa, obteniendo así la evaporación de la mayor parte del solvente y las películas poliméricas en los cristales. Así mismo, se caracterizaron los recubrimientos por medio de la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopia infrarroja (FT-IR) y espectroscopia RAMAN. De esta manera, se identificó que los recubrimientos a una concentración de COL a 0.4 % P/V lograron una distribución uniforme sobre el cristal; sin embargo, los picos del espectro FT-IR más pronunciados se consiguieron en el COL 0.8 % P/V debido a la presencia de una mayor cantidad de colágeno. Por último, se implementó la técnica EQCM y se determinó que los recubrimientos de COL 0.8 %P/V tuvieron menor degradación y un incremento de masa de 1.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ a 3.25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; presentando propiedades destacadas para su potencial aplicación en la biomedicina.

* Proyecto de grado. Modalidad: Proyecto de investigación.

** Facultad de Ingeniería Fisicoquímica. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph.D. Dario Yesid Peña Ballesteros. Codirector: M.sc Nerly Deyanira Montañez Supelano.

Abstract

TITLE: MICROGRAVIMETRIC AND ELECTROCHEMICAL STUDY OF TYPE I BOVINE COLLAGEN COATINGS IN QUARTZ CRYSTALS AU-CR USING EQCM FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS*.

AUTHOR: GONZÁLEZ VELASCO, DANIEL FERNANDO **.

KEYWORDS: ACETIC ACID, COLLAGEN OF BOVINE TYPE I, SPIN COATING, QUARTZ CRYSTAL ELECTROCHEMICAL MICROBALANCE.

DESCRIPTION: In this research, a microgravimetric and electrochemical study of bovine Achilles tendon type I collagen was carried out using the EQCM technique. Spin Coating coatings of acetic acid and collagen were made on quartz crystals in two concentrations (0.4 % P/V and 0.8 % P/V), for each coating 5 layers were carried out, with a drying of 10 minutes between layer and layer, thus obtaining the evaporation of most of the solvent (acetic acid) and the polymer films in the crystals. Likewise, the coatings were characterized by the technique of scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy by Fourier transforms (FT-IR) and RAMAN spectroscopy. In this way, it was identified that the coatings at a concentration of COL at 0.4 % P/V achieved a uniform distribution on the crystal according to the SEM micrographs; however, the most pronounced FT-IR spectrum peaks were achieved in the COL 0.8 % P/V due to the presence of a greater amount of collagen. Finally, the EQCM technique was implemented and it was determined that the coatings of COL 0.8 % P/V had lower degradation and an increase in mass from 1.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ to 3.25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; presenting outstanding properties for its potential application in the biomedicine.

* Thesis

** Facultad de Ingeniería Fisicoquímica. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph.D. Dario Yesid Peña Ballesteros. Codirector: M.sc Nerly Deyanira Montañez Supelano.

Introducción

Los desafíos impuestos por la naturaleza son la principal causa de la evolución de nuevas tecnologías desarrolladas por el hombre; con el propósito de mejorar la calidad de vida de los seres humanos. El avance en la ciencia ha permitido a personas con discapacidades la realización de actividades anteriormente improbables y así mismo, el envejecimiento se ha logrado posponer a lo que normalmente se acostumbraba. Los materiales cerámicos y metálicos se han implementado en la medicina desde hace mucho tiempo, comenzando en el antiguo Egipto donde se utilizaban dispositivos para llevar a cabo el cierre de heridas y en la India 1000 años antes de nuestra era, la historia relata que se realizaban trasplantes de huesos de animales a humanos. A mediados del siglo XVI, los materiales como acero, nylon y la seda habían sido comúnmente usados en el ámbito médico, pero no lograban abarcar todas las necesidades que se presentaban, entre ellas implantes de huesos o dientes, por lo que incrementó el estudio de materiales que fueran compatibles con el ser humano. Solo a fines del siglo XX, hubo un acontecimiento que marcó el avance y credibilidad de una particularidad de materiales con propiedades capaces de adaptación, este hecho fue el primer reemplazo de cadera por Chamley en 1962 (Damodaran, Bhatnagar, & Murthy, 2016; V. Dos Santos, Brandalise, & Savaris, 2017).

A pesar del esfuerzo se obtuvieron inconvenientes relacionados con la aceptación del implante por el cuerpo. En consecuencia, surge el concepto de biocompatibilidad. Al comienzo se creía que un material era biocompatible por ser totalmente inerte para el organismo humano, lo cual es errado porque cualquier presencia de un material siempre involucra una respuesta del

medio biológico; por lo tanto, lo adecuado es que un material sea admitido dentro del organismo y aceptado como parte de un todo, además de no presentar signos de toxicidad (Vadgama, 2005). Esta clase de material es conocido como biomaterial, el cual se define como un material sintético o natural utilizado para reemplazar parte de un sistema vivo o para funcionar en contacto íntimo con tejido vivo (Park & Lakes, 2007).

Los polímeros de origen natural se encuentran entre los más destacados debido a que tienen la ventaja de ser multifacéticos y se utilizan desde simples suturas medicas hasta andamios altamente complejos en ingeniería de tejidos, implantes médicos y dispositivos de liberación de fármacos; por esta razón, en los últimos años el estudio de estos en el campo de la biomedicina ha tenido un gigantesco desarrollo (Damodaran et al., 2016). Se han realizado investigaciones para analizar con más profundidad características, propiedades y comportamientos de los polímeros por medio de técnicas electroquímicas, en este caso mediante la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS), este es un método experimental no destructivo que permite analizar áreas superficiales, la transferencia de masa y mecanismos de degradación de los polímeros (Drioli, 2016; Lasia, 2002). No solo es una técnica común, sino también ofrece múltiples formas de trabajo, una de ellas es la combinación con una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), conocida como microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo (EQCM), que brinda las capacidades de la QCM, como son la medición de cambios de masa en nanogramos, también sigue el comportamiento adhesivo entre células y la superficie del elemento sensor. Su principio se basa en un cristal piezoeléctrico, con forma de disco al que se puede controlar sus oscilaciones por medio de la aplicación de corriente eléctrica (Bragazzi et al., 2015; Chen, Penn, & Xi, 2018; Kreysa, Ota, & Savinell, 2014).

En 2002 *Sabot et al* estudiaron la degradación de películas finas de polímeros mediante la combinación EQCM y EIS. Determinaron que la combinación de estas técnicas permite estudiar con gran detalle el mecanismo de degradación de los polímeros y comportamientos viscoelásticos y en 2009 *Aldana et al* analizaron electroquímicamente la degradación de recubrimientos de ácido poliláctico (PLA) inmovilizados en cristales de cuarzo, mediante la técnica EQCM y encontraron que mediante la técnica EIS se presenta una disminución en la resistencia del polímero y evidenciaron que el uso de la EQCM permite cuantificar electroquímicamente la pérdida de masa de la superficie (Aldana, Estupiñán, Vásquez, & Peña, 2009; Sabot & Krause, 2002).

El polímero de interés en este estudio es el colágeno, dado que sobresale de los demás por ser la proteína más abundante de la matriz extracelular (ECM) presente en diferentes tejidos del cuerpo humano como la piel, el tendón, el hueso, los dientes y cartílagos. Su principal función es transmitir la fuerza de los músculos a los huesos y acumular energía elástica, con el objetivo de que sea posible caminar; adicionalmente, tiene una alta resistencia y dureza (Fratzl, 2008). Hasta la fecha se han identificado 29 tipos de colágeno, entre estos el de tipo I resalta por encontrarse en el 90% del organismo. Esta proteína natural tiene un alto grado de compatibilidad que puede promover la adhesión y la proliferación celular, además este tipo de polímeros puede degradarse progresivamente y las células donantes adheridas pueden producir su propia ECM (Damodaran et al., 2016; Schutte, E., Picciolo, G., & Kaplan, 2004).

Sin embargo, la ECM posee una alta complejidad en su estructura tridimensional porque se compone de la unión de varias proteínas naturales; por este motivo, no es sencillo reproducirlo sintéticamente y tiene un elevado costo realizarlo. Una forma de resolver este inconveniente es

utilizar ECM natural, que se puede obtener por descelurización de tejidos, principalmente de bovino (Bassas-Galia, Follonier, Pusnik, & Zinn, 2016).

Una de las principales fuentes de colágeno tipo I son los tendones de Aquiles bovinos, pero esta proteína, además de poseer baja resistencia mecánica, tiene otras desventajas; una de ellas es la inmunogenicidad, donde estudios realizados por *Soo et al* confirman la falencia que tenían los implantes de colágeno de bovino y determinaron que la exposición a biomateriales con base en este polímero, puede dar como resultado reacciones de hipersensibilidad localizadas, así como hinchamiento de la piel en la zona del implante (Soo, Rahbar, & Moy, 1993).

En 2017 *Ferraro et al* investigaron las propiedades fisicoquímicas del colágeno natural tipo I recuperado de hueso bovino por ácido acético teniendo en cuenta las edades y anatomía de los huesos; acordaron que la edad de los bovinos y la forma de extraer juegan un papel importante para su aplicación en el sector biológico o técnico (Ferraro et al., 2017). Sin embargo, hasta este momento los estudios en la utilización de técnicas electroquímicas y EQCM en recubrimientos de colágeno de tendón bovino sobre cristales de cuarzo, para su uso en la biomédica son escasos; lo cual implica que la biomedicina tiene un campo de aplicación en incremento. Según el reporte de MarketsandMarkets TM la demanda de polímeros biomédicos ha crecido exponencialmente, ya que en 2016 se estimó en 70.90 mil millones de USD y se espera que para el 2021 alcance los 149.17 mil millones de USD, a una tasa de crecimiento anual compuesta de 16.0% ('Biomaterials Market by Type of Materials & Application - 2021 | MarketsandMarkets', n.d.).

A solicitud de las empresas Quirúrgicos Especializados S.A y Jaime Rueda & CIA de querer innovar sus productos y hacer parte del mercado que se mantiene en constante cambio, se ejecuta un macroproyecto llamado "Obtención y caracterización de superficies biomiméticas

nanoestructuradas sobre materiales de osteosíntesis para generación de nuevos productos de innovación de la empresa Quirúrgicos especializados S.A y Jaime Rueda & CIA”, del presente, nace este proyecto, en el cual se va a estudiar microgravimétricamente y electroquímicamente con y sin frecuencia de resonancia, recubrimientos de colágeno de bovino tipo I a diferentes concentraciones, extraídos del tendón de bovino sobre cristales de cuarzo en presencia de medio de cultivo, al mismo tiempo serán caracterizados a través de microscopia electrónica de barrido (SEM), espectroscopia Raman y espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) con el fin de obtener características superficiales y propiedades fisicoquímicas para su implementación en aplicaciones biomédicas.

1. Metodología

A continuación, se describe la metodología utilizada para la realización del proyecto, en el cual se empleó cristales de cuarzo Au-Cr como sustrato para llevar a cabo los recubrimientos de colágeno de tendón de bovino tipo I solubilizados en ácido acético (AA) a dos concentraciones diferentes. Por último, se describe la metodología y los parámetros de operación usados para la implementación de las técnicas electroquímicas.

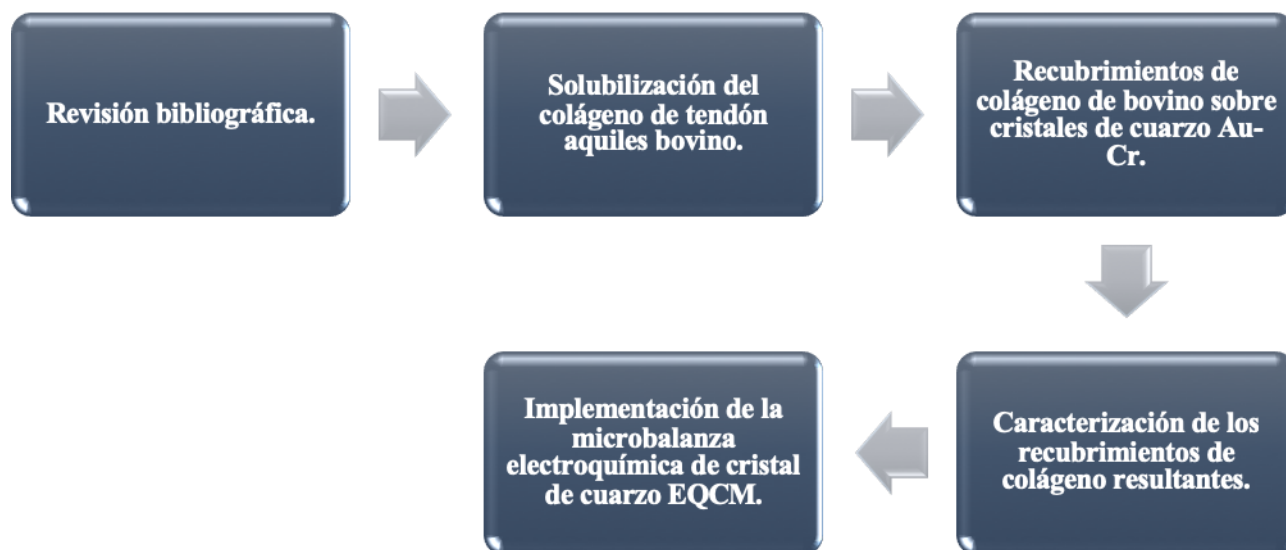


Figura 1. Diagrama de flujo del desarrollo experimental

1.1 Solubilización del colágeno de tendón de bovino.

El colágeno de tendón Aquiles de bovino obtenido de la empresa SIGMA ALDRICH con número CAS 9007-34-5 se presenta en forma de fibras e insoluble, por ello fue necesario solubilizarlo en AA. Se prepararon 2 concentraciones diferentes de colágeno (0.4 % P/V y 0.8 % P/V). Se empleó una balanza de precisión para medir el respectivo peso de las fibras, estas se solubilizaron en ácido acético a una concentración de 0.5 M; cada una se dejó en agitación mecánica de 300 rpm durante 4 horas a temperatura ambiente, hasta el momento en que se aprecia una solución dispersa uniforme. Todo esto con el fin de extraer la mayor cantidad de

moléculas de colágeno en suspensión y así mismo preservarlas en estado inactivo a una temperatura de 4°C en un refrigerador (Ferraro et al., 2017).

Por último, se realizó una centrifugación en una centrifuga HETTICH EBA 21 a 3000 rpm por 10 min a un volumen de suspensión de 10 mL, puesto que se desea el sobrenadante de esta, debido a que contiene el colágeno de tipo I solubilizado.

1.3 Recubrimientos de colágeno de bovino sobre cristales de cuarzo Au-Cr.

Los recubrimientos de colágeno se realizaron mediante la técnica Spin Coating utilizando un equipo de marca Laurell WS-650HZB-23NPPB. Se elaboraron 5 capas con un volumen de 100 microlitros cada una, las dos primeras se llevaron a cabo a 3000 rpm durante 30 segundos y las siguientes a 4000 rpm por 30 segundos. Estas condiciones se encontraron mediante pruebas preliminares. Entre capa y capa se efectuó un secado a una temperatura de $37.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos, ya que al ser una proteína natural, posiblemente se degrade a temperaturas mayores a las definidas (Bosco, Van Den Beucken, Leeuwenburgh, & Jansen, 2012).

1.4 Caracterización de los recubrimientos de colágeno resultantes.

Se realizó microscopía electrónica de barrido para estudiar la morfología de los recubrimientos, facilitando el análisis de la uniformidad de estos. Esta técnica se efectuó en un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 650 por electrón secundario. Seguidamente, se desarrolló la técnica de espectrometría infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) a las muestras en las siguientes condiciones; 400-4000 en longitud de onda en modo transmitancia por ATR, con una

resolución de 4 cm^{-1} y un número de 32 barridos. Por último, se usó espectroscopia Raman, en un equipo de marca Horiba Jobin-Yvon, modelo Xplora-plus, sus condiciones para la caracterización fueron de: láser de 738 nm, 15 acumulaciones y tiempo de adquisición de 10 segundos. Estas dos últimas técnicas permiten determinar los grupos funcionales, espectros característicos e información sobre cambios estructurales en los recubrimientos.

1.5 Evaluación de los recubrimientos mediante la microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo EQCM.

La evaluación electroquímica se realizó dentro de una incubadora marca MMM-Group a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, en ausencia de CO_2 , además, se usó agua desionizada auto clavada con azul de metileno en una bandeja interna de la incubadora para evitar algún tipo de proliferación bacteriana. Los cristales recubiertos se sumergieron en 3 mL de medio de cultivo RPMI 16-40, el cual se utilizó como electrolito en una celda especial de la QCM y se llevó a cabo la técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) sin resonancia del cristal, en un potencióstato Gamry 600 durante dos días consecutivos, utilizándose como electrodo de trabajo el cristal de cuarzo junto con el holder de la QCM, el electrodo de referencia fue Ag/AgCl marca Gamry y un contraelectrodo de platino. Antes de cada corrida se procedió a realizar una prueba de potencial de circuito abierto (OCP) con una duración de 600 segundos para alcanzar la estabilización del sistema dentro de un margen de $\pm 5\text{ mV}$. Para proceder con la prueba EIS se utilizó, un voltaje AC 10 mV, voltaje DC 0 mV y un amplio rango de frecuencia entre 0.01 Hz hasta 100000 Hz, esto favorece la obtención de un espectro completo del comportamiento del material a estudiar (Flores, Romero, & Llongueras, n.d.).

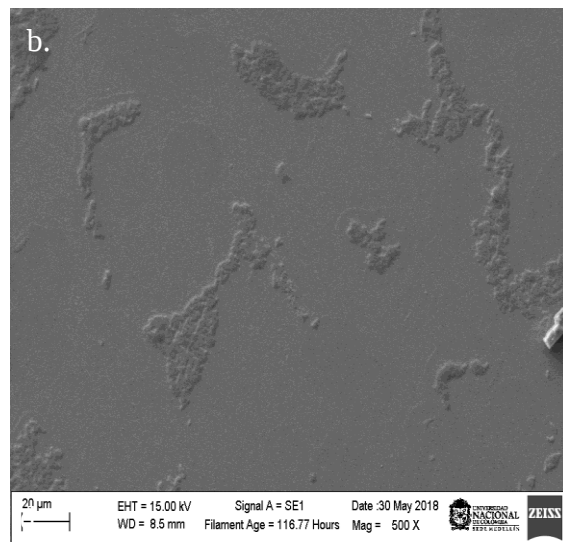
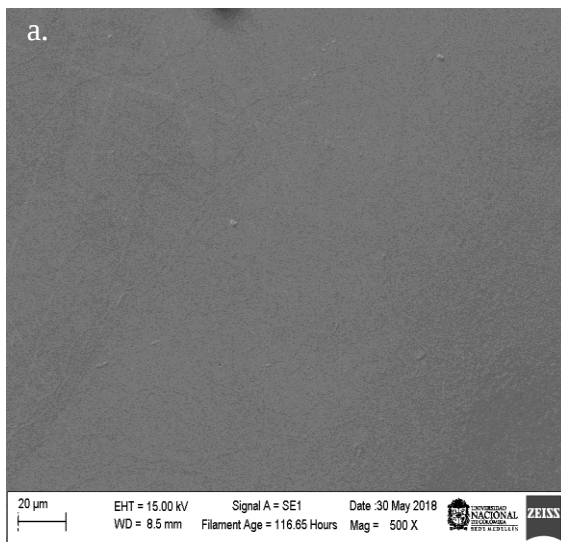
Además, los procesos electroquímicos reales son netamente no lineales, pero la técnica EIS se basa en conductas lineales, de modo que, se aplicó una amplitud de señal lo suficientemente pequeña para que se cumpla la linealidad requerida por esta técnica, por este motivo, se trabajó con una amplitud de señal que no sobrepasara los 10 mV. También, se trabajó con una densidad de siete puntos por década de frecuencia, en vista de que este rango proporciona un balance apropiado entre la exactitud de la toma de datos y el tiempo total requerido para la adquisición de estos; adicionalmente el fluido presentó una temperatura de 37°C (García Rueda, Peña Ballesteros, & Estupiñán Durán, 2017).

Para las pruebas con resonancia del cristal se usó una microbalanza de cristal de cuarzo QCM200 Stanford Research Systems con interfaz de RS-232. Se realizaron dos tipos de pruebas; en primer lugar, sin resonancia del cristal, la cual tenía una duración de 60 minutos y las pruebas con resonancia de 40 minutos, con un tiempo de descanso de 60 minutos entre cada prueba. Se utilizaron cristales piezoeléctricos recubiertos de Au-Cr de 1 pulgada de diámetro, con una frecuencia de resonancia de 5 MHz; con el fin de detectar cambios de masa sobre la película y seguir el comportamiento adhesivo de las moléculas que se adhieran mediante este fenómeno (Bragazzi et al., 2015). El montaje experimental para las pruebas realizadas y el esquema de la QCM se presentan en el anexo A y B respectivamente.

2. Resultados y análisis

2.1 Caracterización de los recubrimientos

Las micrográficas SEM muestran los recubrimientos de colágeno de las dos concentraciones, obteniéndose mayor uniformidad en el de concentración 0.4 % P/V, ya que a concentraciones bajas de colágeno se logra una mejor disolución de las fibras; sin embargo, se logra observar una mínima aglomeración en la parte superior izquierda de la figura 2 c). Por otro lado, el recubrimiento de 0.8 % P/V tuvo varias zonas marcadas de COL, debido a que se tiene una mayor concentración y por ende una menor solubilización. (M. H. Santos et al., 2013). También se observan trazas de ácido acético en la figura 2 d), una de las causas es el manejo de temperaturas bajas en el secado de los recubrimientos, debido a que estos no deben sobrepasar los 37°C para evitar así la degradación de estos.



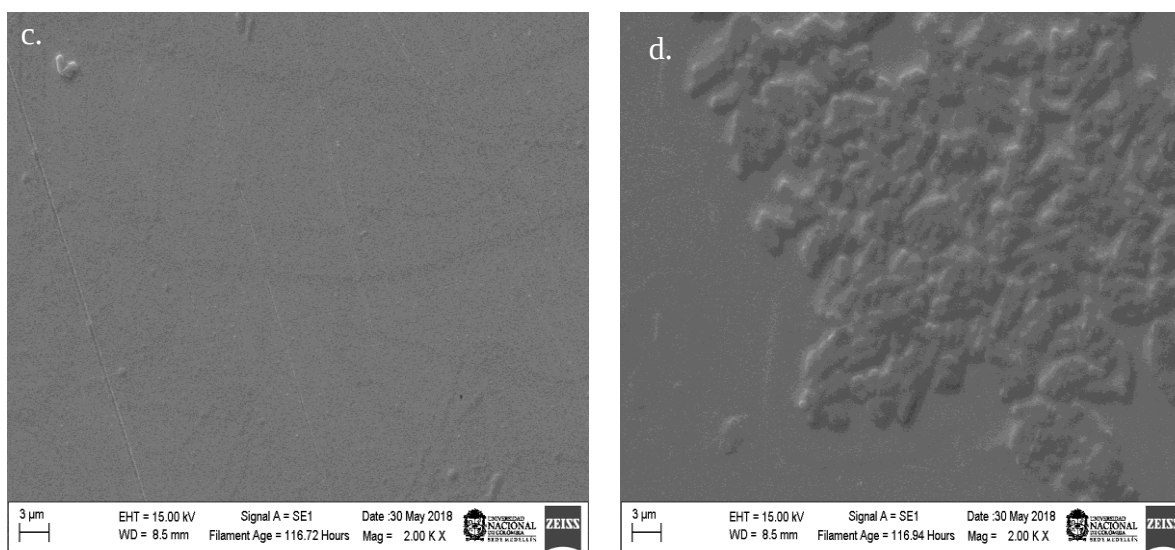


Figura 2. Micrografías SEM de colágeno al 0.4 %P/V (a) 500X, (c) 2000X y de colágeno al 0.8% P/V (b) 500X, (d) 2000X.

El espectro FT-IR de los recubrimientos de colágeno de tendón bovino tipo I se muestra en la figura 3. Se observa las bandas 3306 cm^{-1} y 3292 cm^{-1} correspondientes al estiramiento OH y NH de la amida A, las bandas 2921 cm^{-1} y 2920 cm^{-1} pertenecen a la amida B debido al estiramiento simétrico de $-\text{CH}_2$, la cual solo se pudo evidenciar pronunciadamente en la concentración de colágeno de 0.8% P/V, esto se puede atribuir al tener mayor cantidad de fibras de COL se haya logrado una mayor señal en el espectro (Li et al., 2018; Liu, Ma, Wang, & Qin, 2018; Silva et al., 2015). Se evidencia dos bandas de 1743 cm^{-1} y 1162 cm^{-1} , estas se atribuyen a trazas de ácido acético y bandas de estiramientos particulares del colágeno de tipo I (Movasaghi, Rehman, & Rehman, 2008; M. H. Santos et al., 2013). Las bandas de amidas I, II y III representan la triple hélice de la molécula de colágeno, la cual no presento un daño o cambio significativo a partir de la extracción en medio ácido. La banda 1656 cm^{-1} y 1665 cm^{-1} es característico de la amida I debido a la vibración de estiramiento del grupo péptido carbonilo -

C=O, la banda 1545 cm^{-1} y 1550 cm^{-1} se atribuye a la amida II por las vibraciones en el plano del enlace N-H y el estiramiento C-N. Las bandas 1241 cm^{-1} y 1240 cm^{-1} son representativas de la amida III y se deben al estiramiento C-N y vibración de flexión N-H; según estudios se ha encontrado que esta amida es usualmente débil en el espectro infrarrojo (De Campos Vidal & Mello, 2011; Movasaghi et al., 2008; M. H. Santos et al., 2013). Además, se encontró una banda de 1459 cm^{-1} la cual se atribuye a la vibración del enlace -C-H₃ del colágeno; por último, en 1050 cm^{-1} se presenta un estiramiento en el enlace C-O-C sujeto a los ácidos nucleicos presentes en la proteína (Movasaghi et al., 2008).

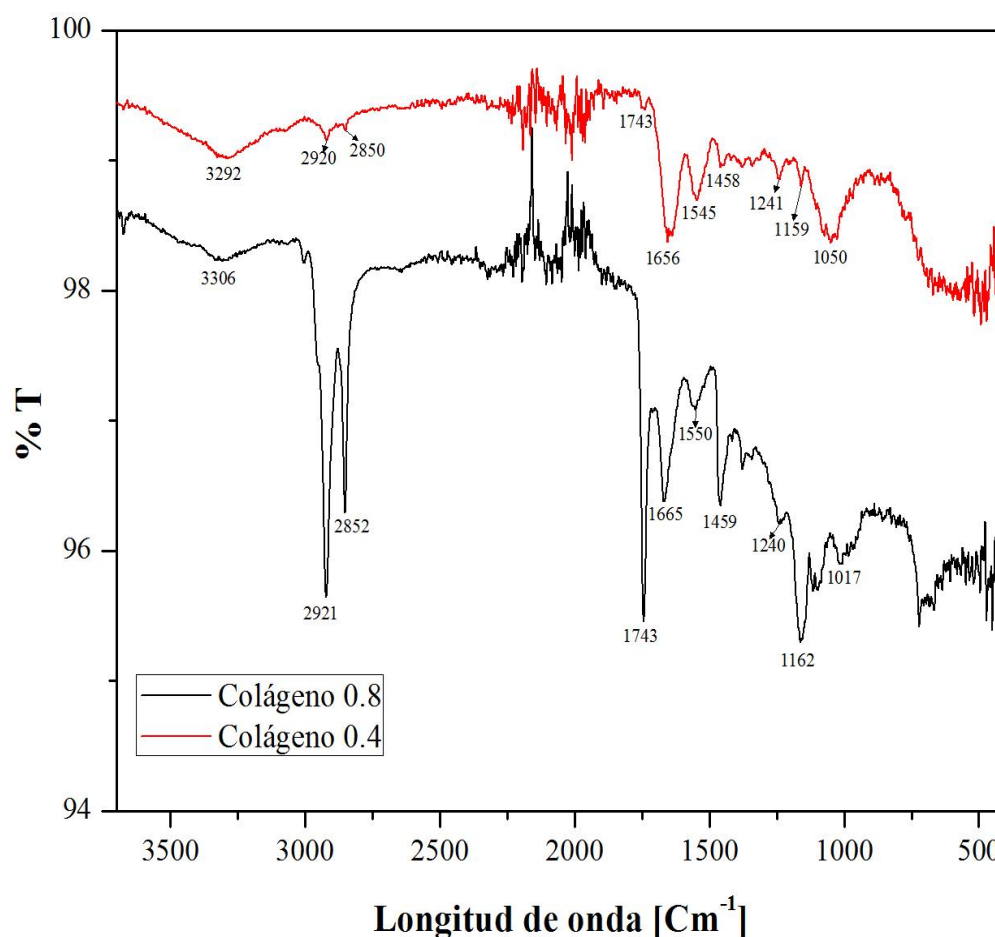


Figura 3. Espectros IR Colágeno de tendón de achiles bovino tipo I a 0.4 %P/V y 0.8 %P/V.

Tabla 1.

Principales enlaces en el espectro FTIR de colágeno de tendón achiles bovino tipo I a 0.4% P/V y 0.8%P/V.

Enlace correspondiente (Grupo funcional)	Banda COL 0.8%P/V [cm ⁻¹]	Banda COL 0.4%P/V [cm ⁻¹]
Estiramiento OH y NH de Amida A	3306	3292
Estiramiento simétrico CH ₂ de Amida B	2921	2950
Estiramiento simétrico CH ₂ de lípidos	2852	2850
Vibración en tensión del grupo funcional carboxílico - COOH	1743	1743
Estiramiento de la base de pirimidina C=O Amida I	1667	1656
Vibración de N-H y estiramiento C-N de la Amida II	1550	1545
Vibración CH ₃ del colágeno	1459	1458
Estiramiento C-N y vibración de flexión N-H de amida III	1240	1241
Estiramiento del enlace C-O	1162	1159
Estiramiento de C-O-C de ácidos nucleicos	1017	1050

A continuación, se evidencia los espectros Raman de los recubrimientos de colágeno a 0.4% P/V y 0.8% P/V en la figura 4. Se obtuvieron los espectros característicos del colágeno, como lo es la Amida I y Amida III, con longitudes de onda de 1666.32 cm^{-1} y 1245.74 cm^{-1} respectivamente. Esta técnica permitió obtener el pico de la Amida III más pronunciado que en el espectro FT-IR, lo cual corrobora la presencia de este en los recubrimientos realizados. Además, se obtuvo el pico 855.02 cm^{-1} , este indica la presencia del aminoácido hidroxiprolina, el más común en la cadena de polipéptidos que tiene el colágeno y característico en los tejidos biológicos, el cual no fue apreciable en el espectro infrarrojo. La espectroscopia Raman sirvió de complemento para la caracterización de los recubrimientos, ya que se adquirieron picos desconocidos, los cuales no fueron susceptibles por la técnica FT-IR (Esmonde-White, 2014; Kumar, Sripriya, Balaji, Senthil Kumar, & Sehgal, 2011; Paschou, Katsikini, Christofilos, Arvanitidis, & Ves, 2018).

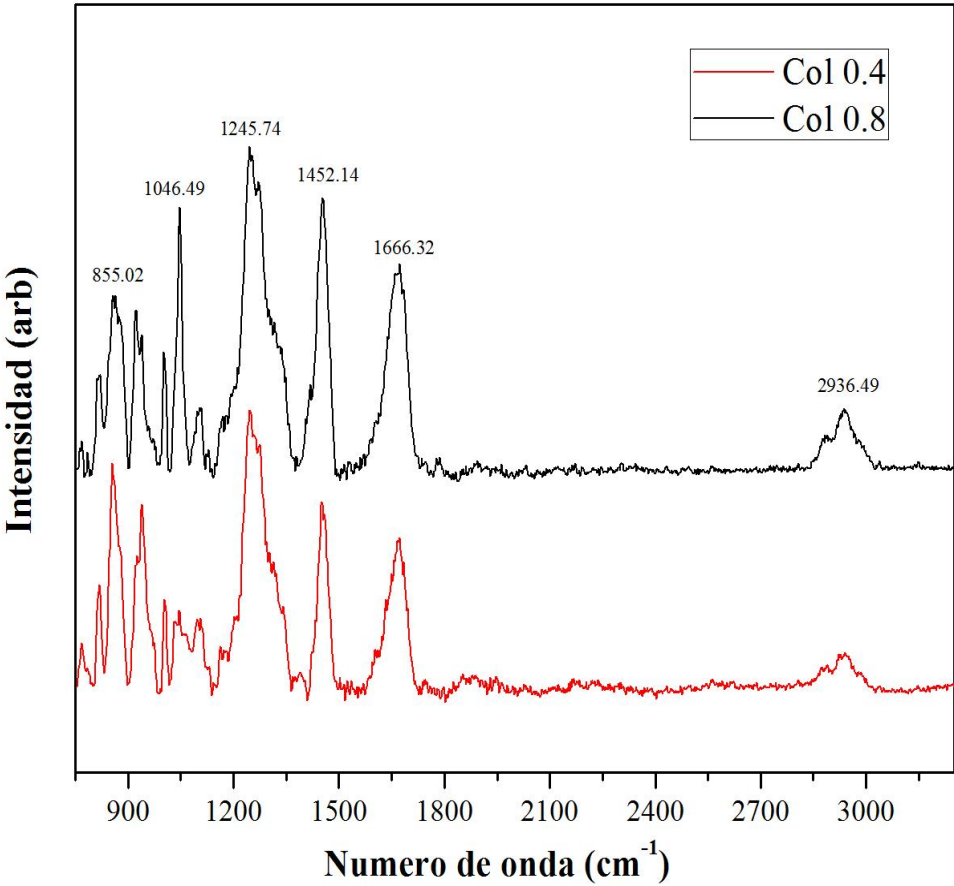


Figura 4. Espectros Raman de Colágeno de tendón de achiles bovino tipo I a 0.4 % P/V y 0.8 % P/V.

Tabla 2.

Principales enlaces en el espectro Raman de colágeno de tendón achiles bovino tipo I.

Banda	Enlace correspondiente
[cm^{-1}]	(Grupo funcional)
2936.49	Estiramiento asimétrico del grupo CH_2
1666.32	Vibración de estiramiento de C=O de la banda Amida I

1452.14	Vibración de CH ₂ /CH ₃ en residuos de aminoácidos
1245.74	Estiramiento C-N y vibración de flexión N-H de amida III
1046.49	Estiramiento del enlace C-C
855.02	Banda de Hidroxiprolina

2.2 Evaluación electroquímica de los recubrimientos mediante la técnica EQCM.

La técnica EIS se utilizó con el fin de caracterizar la interfase de los recubrimientos de colágeno de tendón bovino en presencia de medio de cultivo y estudiar los procesos superficiales que se llevan a cabo. Las condiciones de voltaje, rango de frecuencias y puntos por década, que se nombró anteriormente, fueron elegidos según estudios previos encontrados en la literatura, los cuales ajustan y maximizan la calidad de las pruebas (Flores, Romero, & Llongueras, s.f.).

Para llevar a cabo el análisis de los datos conseguidos mediante esta prueba, se obtuvo los correspondientes espectros de Nyquist y Bode. Se implementó un software de gráficos para elaborar los distintos espectros. En la figura 5 se visualiza el diagrama Nyquist para las concentraciones evaluadas a 0 y 1 día de inmersión con y sin resonancia del cristal respectivamente. Estas gráficas se identifican por tener una constante de tiempo, dependiendo de la interacción que tuvieron los recubrimientos y el cristal desnudo con el electrolito durante los tiempos evaluados.

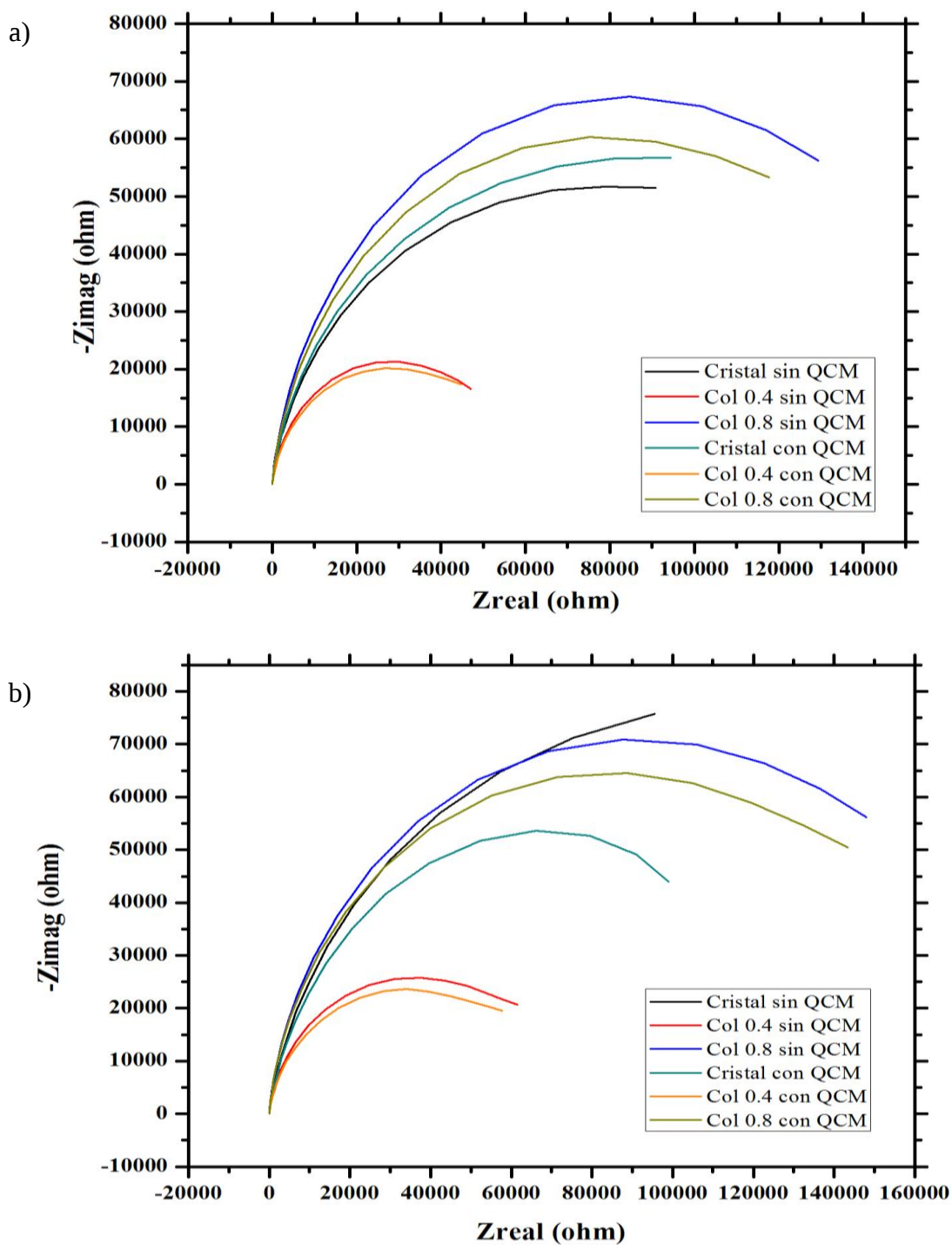


Figura 5. Diagrama Nyquist para las muestras con y sin resonancia a (a) 0 días de inmersión y (b) 1 día de inmersión en medio de cultivo.

A partir de estos resultados, se obtiene información relacionada con los parámetros que rigen los procesos superficiales en la capa polimérica, como la resistencia ofrecida por el electrolito (Cultivo celular RPMI 16-40) o resistencia de la solución R_s , es la que está presente entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, este valor depende de varios factores como la concentración de iones, la temperatura, entre otros. La R_s se determina en el límite de altas frecuencias del eje real en el diagrama Nyquist. La resistencia que ofrece el polímero R_{pol} se encuentra a medias frecuencias (resistencia de la doble capa, relacionada con la transferencia de carga de la interfaz solución/polímero). Por último, se encuentra la resistencia que presenta el cristal R_{cris} , está ligado a la transferencia de carga de la interfase cristal/polímero o en su debido caso la interfase cristal/electrolito, en caso de haber ausencia de recubrimiento. La R_{cris} representa la reacción que se lleva a cabo en la superficie del cristal/recubrimiento o cristal/electrolito, al mismo tiempo mide la estabilidad electroquímica del sistema, frecuentemente se localiza a bajas frecuencias. Debido a que el sistema mostró una sola constante de tiempo evidenciado en la figura 5, la R_p y R_{cris} es una sola resistencia, ya que solo hay una interfase presente (recubrimiento de COL) (Saavedra, 2014).

Cuando el cristal sin recubrimiento está en contacto con la solución (0 días de inmersión), se observa la apariencia de un semicírculo en el diagrama de Nyquist. Al mismo tiempo, se presenta un ángulo de -78° en el diagrama de Bode (Ver anexo C), esto indica que existe un comportamiento capacitivo ocasionado por la doble capa eléctrica, que se produce cuando los iones presentes en la solución se encuentran en la superficie del electrodo, generando una diferencia de potencial lo que ocasiona dicha conducta capacitiva (Saavedra, 2014).

Los diagramas de Bode del anexo C muestran a bajas frecuencias un comportamiento capacitivo, que está relacionado con la transferencia de carga de la interfase

crystal/recubrimiento y a altas frecuencias, un comportamiento resistivo que define los procesos de transferencia vinculados a la interfase recubrimiento/electrolito (Aldana et al., 2009).

En la medición de espectroscopia de impedancia electroquímica sin QCM (resonador apagado), los sistemas evaluados mostraron un aumento en las resistencias de la solución R_s y resistencias R_p , lo cual se debe a la compactibilidad de la capa polimérica hacia el cristal. La concentración de 0.8 % P/V presentó valores superiores de R_{cris} y R_{pol} que la de 0.4 % P/V en ambos días; la relación de estas dos resistencias representa de forma indirecta el estado de degradación del polímero. Se obtuvo una mayor resistencia a la degradación, debido a que esta condición se mejora al aumento de la concentración de colágeno en el recubrimiento. Por otra parte, en la implementación del resonador en el cristal, se observó que ambos recubrimientos presentaron una reducción en la R_s y R_p , lo cual implica que se llevó a cabo una degradación mayor del recubrimiento en el sistema. La capa de COL 0.4 % P/V fue la más propensa a la degradación, dado que ofreció en ambos días los valores de resistencias más bajos.

Los valores obtenidos de los espectros de Nyquist y Bode de los días 0 y 1 fueron ajustados utilizando el software Zview V3.5e y representados por medio de circuitos equivalentes, los parámetros calculados se encuentran en el anexo D. Se consiguieron buenos ajustes en la simulación de las pruebas electroquímicas con χ^2 menores a 10^{-4} entre los datos experimentales y los simulados. El modelo adecuado del circuito equivalente se muestra en la figura 6.

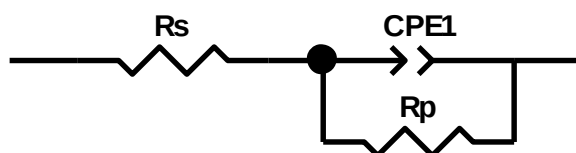


Figura 6. Circuito equivalente con una constante de tiempo propuesto para simular la interacción de los recubrimientos de COL y del cristal durante 0 y 1 día de inmersión en medio de cultivo.

Los elementos que conforman los circuitos equivalentes constan de R_s : resistencia a la solución, CPE_1 : elemento de fase constante a la transferencia de carga, R_p : resistencia relacionada con el recubrimiento polimérico y cristal. El circuito equivalente planteado permitió obtener información de la capa polimérica perturbada y del cristal desnudo. Esta información proviene de analizar las propiedades del electrolito y los cambios presentados en la impedancia, causados por la morfología del recubrimiento y los procesos electroquímicos que suceden en él. La configuración del circuito se estableció en paralelo, ya que esta forma indica el número de superficies existentes en las muestras, las cuales solo presentaron una superficie, debido a que solo hay una constante de tiempo.

El valor de la R_s obtuvo valores bajos en las pruebas, a causa de que la concentración de iones es alta en el medio de cultivo, por este motivo, no habrá una resistencia alta en oposición a que la corriente circule a través de este.

Seguidamente, se presentan los ensayos microgravimétricos (figura 7 y 8). Estos ensayos se llevaron a cabo con el fin de estudiar el comportamiento interfacial del colágeno de tendón bovino tipo I, detectar cambios de masa y resistencia en el transcurso del ensayo. Durante la realización de las pruebas se obtuvieron los diagramas característicos de cambios de masa respecto al tiempo (masogramas), los cuales plasman la ganancia o pérdida de masa y el cambio en la resistencia del sistema cristal-recubrimiento en contacto con el medio de cultivo. La ecuación Sauerbrey relaciona linealmente el cambio de masa respecto a el cambio de frecuencia

de resonancia del cristal, donde C_f es la constante de sensibilidad de masa para un cristal de 5 MHz y su valor es $56.6 \frac{\text{Hz}}{\mu\text{g} \cdot \text{cm}^2}$

$$\Delta f = -C_f \cdot \Delta m$$

Si bien, cuando se realizan pruebas usando la QCM con líquidos, la ecuación anterior no es válida, ya que las mediciones en estas condiciones son más complejas porque dependen de la viscosidad y densidad de la solución e influyen directamente en la medida de la frecuencia de resonancia (Systems, 2005). Sin embargo, la ecuación de Sauerbrey se puede utilizar en determinadas condiciones, donde los cambios 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 (1) puede ser aplicada (Parada Quinayá, 2011). Seguidamente, se presentan los respectivos Masogramas de las películas de colágeno para los tiempos 0 y 1 día de experimentación.

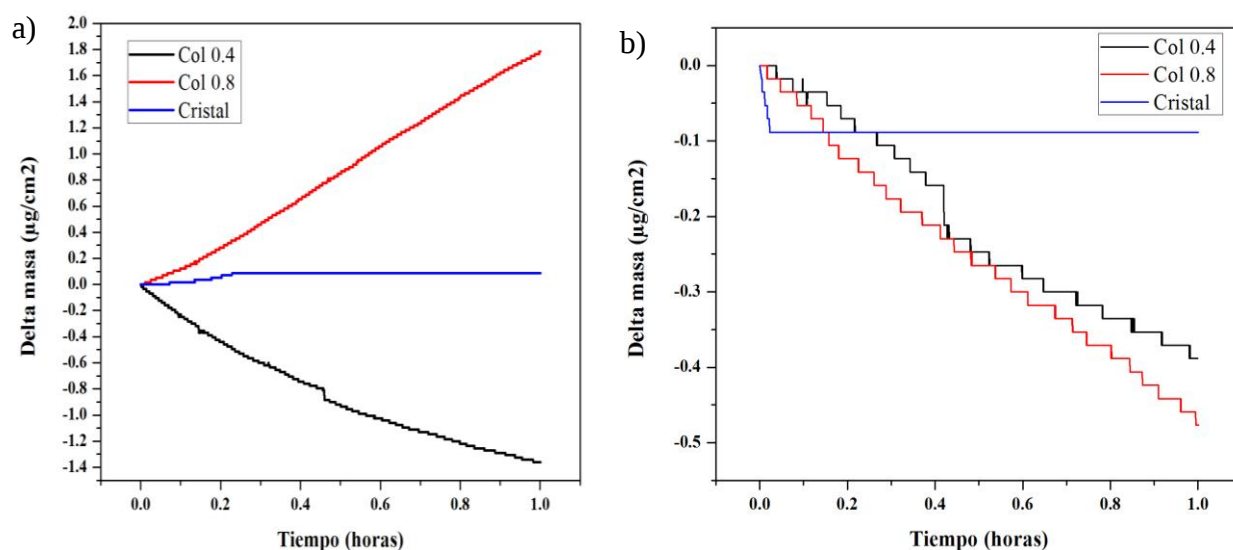


Figura 7. Cambio de la masa con respecto al tiempo de las concentraciones de COL, (a) 0 día de inmersión, (b) 1 día de inmersión.

De la figura 7 se observa que el recubrimiento de COL 0.4 % P/V presentó una degradación constante durante ambos días, posiblemente a que la película tenía un espesor muy delgado. Se presenció una pérdida de masa considerable, lo cual aumentaría la formación de poros en la película y apresamiento de iones de la solución en dichos poros (Aldana et al., 2009); consecutivamente esto favoreció a que el electrolito ingresara entre la película y el cristal, dando por resultado un aumento en la fracción del área del cristal. Para el cristal desnudo se evidencia un comportamiento constante de la masa durante la experimentación, ya que este tipo de superficie lisa con muy baja porosidad no permite la entrada de iones o proteínas en esta, obteniendo un estado de estabilidad (Herrera & López, 2018).

En comparación al COL 0.4 % P/V, el recubrimiento de COL de 0.8 % P/V exhibió un hinchamiento durante la primera hora en la figura 7 (a). Este comportamiento se puede justificar a una mejor compactibilidad y la ganancia de masa en el sistema en el día cero de ensayo, así mismo una mayor afinidad al medio de cultivo. No obstante, pasado un día de inmersión y pruebas electroquímicas, se presenció la degradación de la película de COL de 0.8 % P/V, evidenciado por la pérdida de masa en la figura 7 (b). Por último, cabe resaltar que las concentraciones mostraron dos mecanismos de degradación diferentes, a pesar de proceder de la misma fuente.

A continuación, se presentan los cambios de resistencia con respecto al tiempo (figura 8); con el propósito de estudiar características superficiales observando el cambio en la resistencia del sistema.

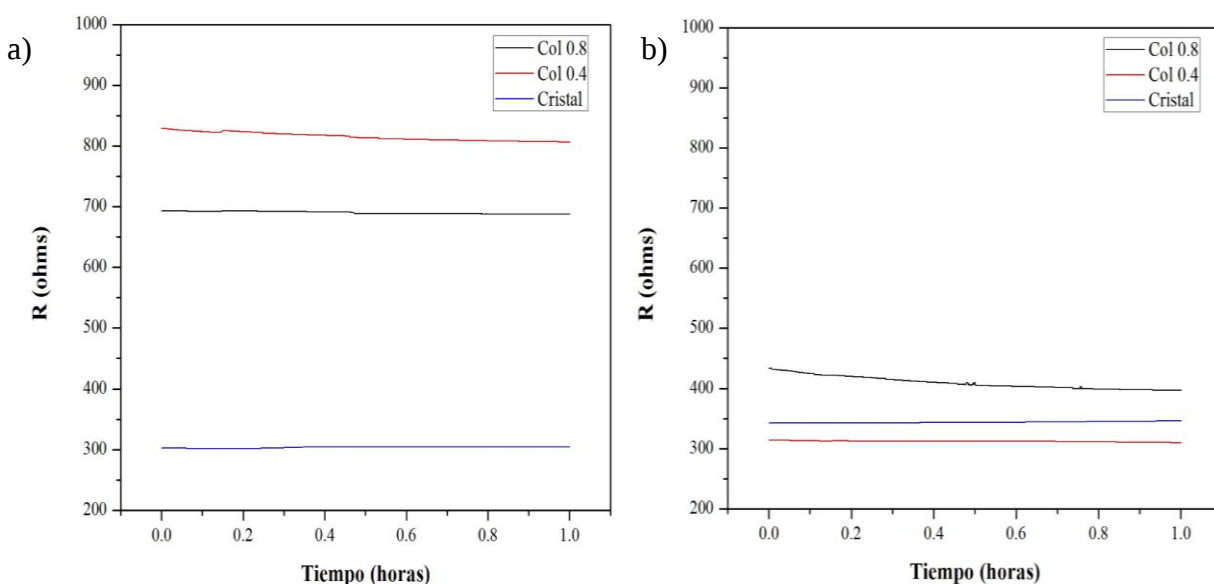


Figura 8. Cambios de resistencia con respecto al tiempo de las concentraciones de COL, (a) 0 día de inmersión y (b) 1 día de inmersión.

Los resultados obtenidos en los diagramas de resistencia muestran una disminución de la resistencia ofrecida por el polímero para ambas concentraciones en la figura 8 b), pero fue mayor en la película de COL a 0.4 % P/V, esto se debe a la formación de poros y desprendimiento del polímero sobre el cristal, los recubrimientos a esta concentración muestran una menor resistencia a la degradación, lo cual concuerda con los masogramas mostrados en la figura 7. La película de COL 0.8 % P/V presentó mejor compactibilidad y una mayor afinidad al electrolito, lo cual se vio reflejado en el ensayo al día 1 de experimentación, donde la resistencia disminuye debido a la degradación del polímero, pero con valores de resistencia mayor a la del cristal desnudo y el recubrimiento de COL 0.4 % P/V.

Los espectros Bode (Ver anexo C) no tuvieron cambios considerables, presentaron un comportamiento semejante en ambos días de experimentación. Sin embargo, se encontraron

ángulos de fase mayores que la prueba inicial de EIS en el rango de -84° , aumentando así la conductancia capacitiva, esto principalmente se debe a los cambios superficiales que sufrieron las películas poliméricas a lo largo de las pruebas, permitiendo de esta forma la deposición de iones de la solución sobre los recubrimientos. Los parámetros calculados para los circuitos equivalentes por EQCM se encuentran en el anexo E.

3. Conclusiones

Se obtuvieron recubrimientos de colágeno de bovino solubilizados en ácido acético, en dos concentraciones diferentes, mediante la técnica de Spin-Coating sobre cristales de cuarzo. El recubrimiento de COL de 0.8 % P/V presentó aglomeraciones de fibras y trazas de AA, lo cual se puede atribuir a la presencia de una mayor cantidad de colágeno.

Por medio de las técnicas microscopía (SEM), espectroscopia (FT-IR) y espectroscopia (Raman), se caracterizaron dos tipos de concentración de colágeno de bovino. Se identificaron las respectivas longitudes de onda de los recubrimientos mediante la técnica FT-IR y su morfología por medio del SEM. La concentración de COL 0.4 % P/V obtuvo una distribución homogénea sobre la superficie en el análisis de microscopía (SEM); sin embargo, los picos más pronunciados en el espectro (FT-IR) se consiguieron en el COL 0.8 % P/V. Adicionalmente, el espectro Raman presentó grupos funcionales complementarios al espectro infrarrojo y asimismo permitió validar la presencia de la banda Amida III.

A partir de los resultados obtenidos mediante la técnica EQCM con y sin frecuencia de resonancia, se estudió el comportamiento electroquímico y microgravimétrico de los recubrimientos. Se determinó que el COL de 0.8 % P/V presentó un mejor comportamiento en los días de experimentación en comparación con el COL de 0.4 % P/V. Dicha concentración logró una mejor compactibilidad sobre la superficie, mayor afinidad con el medio de cultivo y adquirió una máxima cantidad de masa de $3.25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ en los dos días consecutivos; además de una resistencia mayor a las 24 horas de experimentación, mostrando propiedades destacadas para su potencial aplicación en la biomedicina.

4. Recomendaciones

Utilizar diferentes técnicas de recubrimientos con el fin de lograr películas superficiales distintas y evaluar cual es mejor sobre los cristales de cuarzo, luego caracterizarlas por SEM, FT-IR y RAMAN.

Aumentar el número de capas en los recubrimientos con el mismo tiempo de secado entre capas para obtener un recubrimiento con capas más gruesas. Incrementar el tiempo de estudio a 5 días de inmersión para la realización de las técnicas electroquímicas y micro gravimétricas.

Referencias Bibliográficas

- 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.
- Bassas-Galia, M., Follonier, S., Pusnik, M., & Zinn, M. (2016). Natural polymers: A source of inspiration. In *Bioresorbable Polymers for Biomedical Applications: From Fundamentals to Translational Medicine* (pp. 31–64). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100262-9.00002-1>
- Biomaterials Market by Type of Materials & Application - 2021 | MarketsandMarkets. (n.d.). Retrieved 20 August 2018, from https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biomaterials-393.html?gclid=CjwKCAjwzenbBRB3EiwAItS-u1dESjBfQwb38dWCf0R_OK-c7ywIOC8YM_QlpsxFAJdFGj4V7ZFUnxoCZVEQAvD_BwE
- Bosco, R., Van Den Beucken, J., Leeuwenburgh, S., & Jansen, J. (2012). Surface Engineering for Bone Implants: A Trend from Passive to Active Surfaces. *Coatings*, 2(3), 95–119. <https://doi.org/10.3390/coatings2030095>
- Bragazzi, N. L., Amicizia, D., Panatto, D., Tramalloni, D., Valle, I., & Gasparini, R. (2015). Quartz-Crystal Microbalance (QCM) for Public Health: An Overview of Its Applications. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (1st ed., Vol. 101, pp. 149–211). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2015.08.002>
- Chen, J. Y., Penn, L. S., & Xi, J. (2018). Quartz crystal microbalance: Sensing cell-substrate adhesion and beyond. *Biosensors & Bioelectronics*, 99(June 2017), 593–602. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.032>
- Damodaran, V. B., Bhatnagar, D., & Murthy, N. S. (2016). Biomedical Polymers: Synthesis and Processing (pp. 55–71). SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32053-3_3

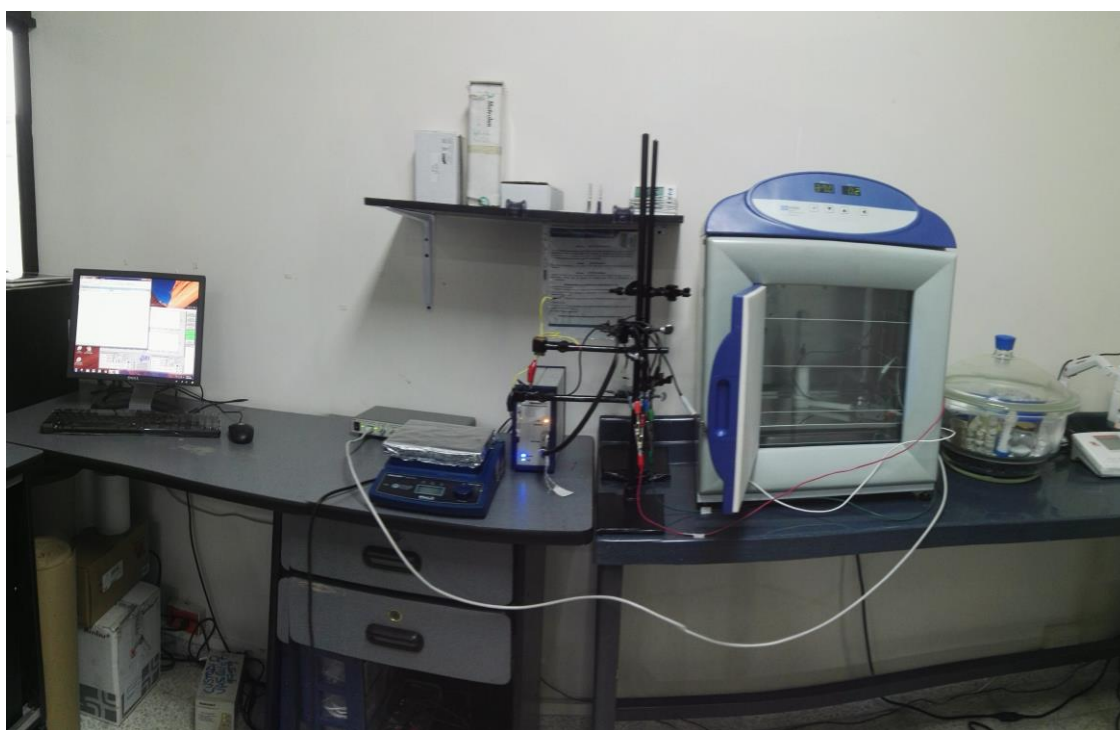
- De Campos Vidal, B., & Mello, M. L. S. (2011). Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron*, 42(3), 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.09.010>
- Dos Santos, V., Brandalise, R. N., & Savaris, M. (2017). *Engineering of Biomaterials*. Porto Alegre: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-58607-6>
- Drioli, E. (2016). *Encyclopedia of Membranes*. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-44324-8>
- Esmonde-White, K. (2014). Raman spectroscopy of soft musculoskeletal tissues. *Applied Spectroscopy*, 68(11), 1203–1218. <https://doi.org/10.1366/14-07592>
- Ferraro, V., Gaillard-Martinie, B., Sayd, T., Chambon, C., Anton, M., & Santé-Lhoutellier, V. (2017). Collagen type I from bovine bone. Effect of animal age, bone anatomy and drying methodology on extraction yield, self-assembly, thermal behaviour and electrokinetic potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.068>
- Flores, J. M., Romero, R. D., & Llongueras, J. G. (n.d.). *ESPECTROSCOPÍA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA EN CORROSIÓN*. México. Retrieved from <http://depa.fquim.unam.mx/labcorr/libro/Manual-EIS-IMP-UNAM.PDF>
- Fratzl, P. (2008). *Collagen Structure and Mechanics*. Boston, MA: Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-73906-9>
- García Rueda, F. C., Peña Ballesteros, D. Y., & Estupiñán Durán, H. A. (2017). Comportamiento morfológico y electroquímico de un recubrimiento Dip Coating policaprolactona-quitosano-colágeno sobre Ti6Al4V. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica*, 38(1), 54–75. <https://doi.org/10.17488/RMIB.38.1.4>
- Herrera, P. A., & López, M. J. (2018). *OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE RECUBRIMIENTOS DE POLICAPROLACTONA FUNCIONALIZADA CON NANOTUBOS DE CARBONO MULTIPARED PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS*. UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER.
- Kreysa, G., Ota, K., & Savinell, R. F. (Eds.). (2014). *Encyclopedia of Applied Electrochemistry*. *Encyclopedia of Applied Electrochemistry*. New York, NY: Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6996-5>

- Kumar, R., Sripriya, R., Balaji, S., Senthil Kumar, M., & Sehgal, P. K. (2011). Physical characterization of succinylated type I collagen by Raman spectra and MALDI-TOF/MS and in vitro evaluation for biomedical applications. *Journal of Molecular Structure*, 994(1–3), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2011.03.005>
- Lasia, A. (2002). *Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications. Modern Aspects of Electrochemistry*. Springer New York. https://doi.org/10.1007/0-306-46916-2_2
- Li, J., Wang, M., Qiao, Y., Tian, Y., Liu, J., Qin, S., & Wu, W. (2018). Extraction and characterization of type I collagen from skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its potential application in biomedical scaffold material for tissue engineering. *Process Biochemistry*, (June), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.009>
- Liu, Y., Ma, D., Wang, Y., & Qin, W. (2018). A comparative study of the properties and self-aggregation behavior of collagens from the scales and skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 516–522. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.044>
- Movasaghi, Z., Rehman, S., & Rehman, I. U. (2008). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43(2), 134–179. <https://doi.org/10.1080/05704920701829043>
- Parada Quinayá, D. C. (2011). *Estudio microgravimétrico del comportamiento físicoquímico superficial de pla/plg/hap y pla/plg/biovidrio modificados con polisacárido, en presencia de proteínas*. Universidad Industrial de Santander.
- Park, J., & Lakes, R. S. (2007). *Biomaterials. Biomaterials: An introduction Third Edition*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-37880-0>
- Paschou, A. M., Katsikini, M., Christofilos, D., Arvanitidis, J., & Ves, S. (2018). *High pressure Raman study of type-I collagen. FEBS Journal* (Vol. 285). <https://doi.org/10.1111/febs.14506>
- Saavedra, R. M. (2014). *Simulación Mediante Circuitos Equivalentes De La Impedancia Electroquímica De Armaduras De Acero Inoxidable En Mortero*. Escuela Politécnica Superior de la Universidad de Carlos III de Madrid. Retrieved from https://e-archivo.uc3m.es/bitstream/handle/10016/22773/PFC_ruben_martin_saavedra_2014.pdf

- Sabot, A., & Krause, S. (2002). Simultaneous quartz crystal microbalance impedance and electrochemical impedance measurements. Investigation into the degradation of thin polymer films. *Analytical Chemistry*, 74(14), 3304–3311. <https://doi.org/10.1021/ac0200724>
- Santos, M. H., Silva, R. M., Dumont, V. C., Neves, J. S., Mansur, H. S., & Heneine, L. G. D. (2013). Extraction and characterization of highly purified collagen from bovine pericardium for potential bioengineering applications. *Materials Science and Engineering C*, 33(2), 790–800. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.11.003>
- Schutte, E., Picciolo, G., & Kaplan, D. (Ed.). (2004). *Tissue Engineered Medical Products (TEMPs)*. <https://doi.org/10.1520/STP1452-EB>
- Silva, Z. S., Botta, S. B., Ana, P. A., França, C. M., Fernandes, K. P. S., Mesquita-Ferrari, R. A., ... Bussadori, S. K. (2015). Effect of papain-based gel on type I collagen - spectroscopy applied for microstructural analysis. *Scientific Reports*, 5, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep11448>
- Soo, C., Rahbar, G., & Moy, R. (1993). The immunogenicity of bovine collagen implants. *Dermatol Surg Oncol*, 19, 431–434.
- Systems, S. R. (2005). *QCM200 Quartz Crystal Microbalance*. Power. California, USA. Retrieved from <https://www.thinksrs.com/downloads/pdfs/manuals/QCM200m.pdf>
- Vadgama, P. (2005). *Surfaces and interfaces for biomaterials*. *Surfaces and Interfaces for Biomaterials*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9781845690809>

Apéndices

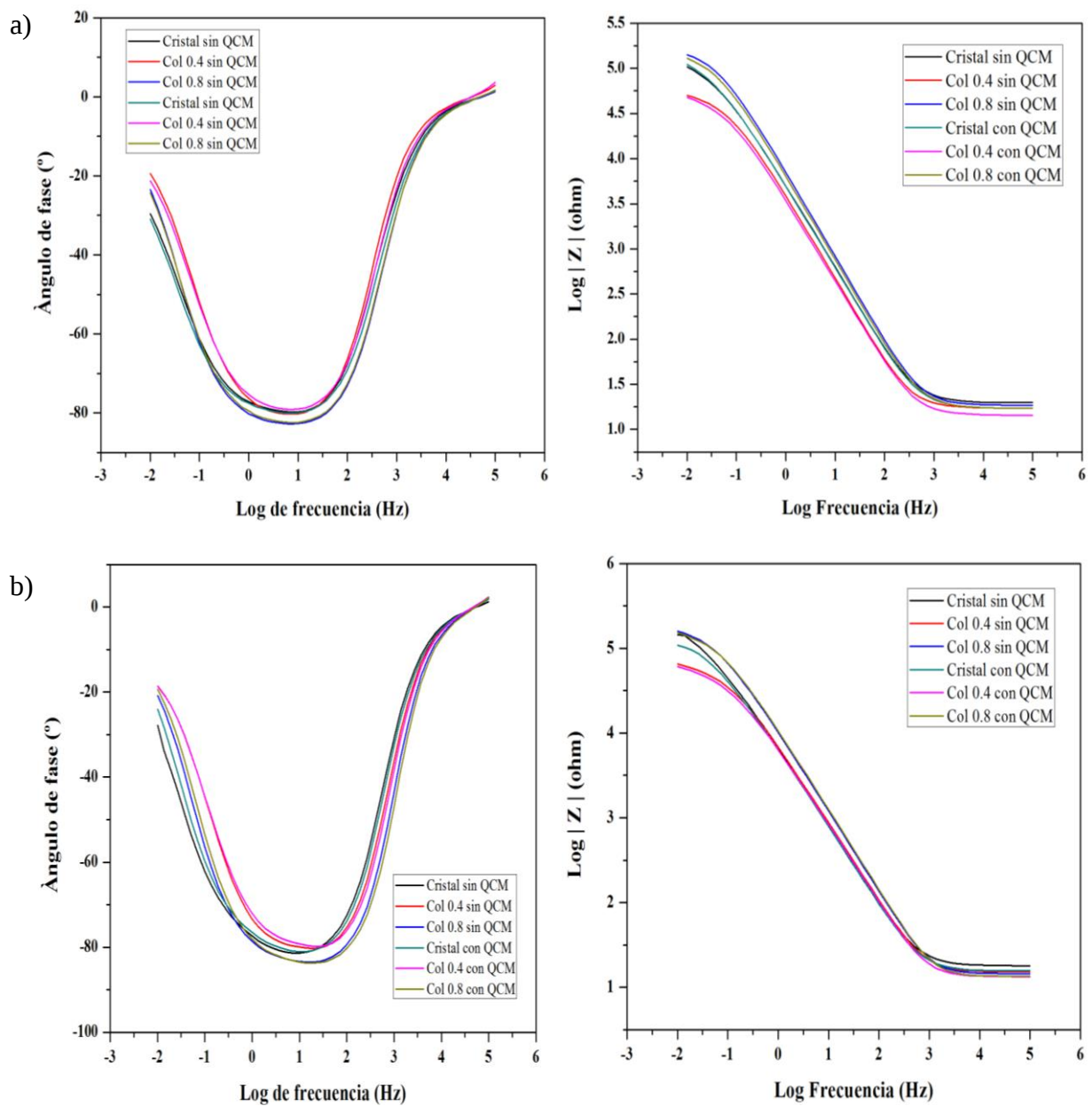
Apéndice A. Montaje experimental para las pruebas electroquímicas.



Apéndice B. Microbalanza de cristal de cuarzo QCM200

Microbalanza de cristal de cuarzo QCM200. Adaptado de (Systems, 2005). California / Stanford Research Systems Inc. Retrieved from <https://www.thinksrs.com/downloads/pdfs/manuals/QCM200m.pdf>

Apéndice C. Diagramas de Bode para los recubrimientos de COL y cristal desnudo con y sin resonancia a 0 y 1 día de inmersión. a) 0 días de inmersión. b) 1 día de inmersión.



Apéndice D. Valores de los parámetros de los circuitos equivalentes para EIS sin QCM.

Parámetros de los circuitos equivalentes para los recubrimientos a 0 días de inmersión en medio de cultivo.

Día 0				
Recubrimientos		Cristal	Col 0.4 %P/V	Col 0.8 %P/V
Parámetros	Rs	19,86	17,25	18,63
	CPEp-T	3,93E-05	4,97E-05	2,63E-05
	CPEp-P	0,89846	0.90977	0,92768
	Rp	100800	46586	140360
	Chi squared	4,481E-04	5,458E-04	2,867E-04

Parámetros de los circuitos equivalentes para los recubrimientos a 1 día de inmersión en medio de cultivo.

Día 1				
Recubrimientos		Cristal	Col 0.4 %P/V	Col 0.8 %P/V
Parámetros	Rs	17,98	15,06	14,34
	CPEp-T	2,91E-05	2,79E-05	1,82E-05
	CPEp-P	0,90701	0,9048	0,93279
	Rp	138050	56990	144930
	Chi squared	7,107E-04	1,26E-03	8,94E-04

Apéndice E. Valores de los parámetros de los circuitos equivalentes para EQCM.

Parámetros de los circuitos equivalentes para los recubrimientos a 0 días de inmersión en medio de cultivo.

Día 0				
Recubrimientos		Cristal	Col 0.4 %P/V	Col 0.8 %P/V
Parámetros	Rs	17,29	14.37	17.36
	CPEp-T ± %error	3.969E-05	5.681E-05	2.926E-05
	CPEp-P ± %error	0,89908	0,89629	0,9231
	Rp	109600	43962	124330
	Chi squared	7,107E-04	5,14E-04	3,66E-04

Parámetros de los circuitos equivalentes para los recubrimientos a 1 día de inmersión en medio de cultivo.

Día 1				
Recubrimientos		Cristal	Col 0.4 % p/v	Col 0.8 % p/v
Parámetros	Rs	15,58	13,11	13,3
	CPEp-T ± %error	3,10E-05	3,07E-05	1,72E-05
	CPEp-P ± %error	0,90479	0,89898	0,93473
	Rp	110040	51665	132980
	Chi squared	9,12E-04	1,72E-03	1,00E-03