

**EFFECTO DE LA CONDUCTIVIDAD DEL PLA+ZINC Y PGA MEZCLADO CON
HIDROXIAPATITA Y QUITOSANO SOBRE LA ANISOTROPÍA DE CÉLULAS
OSTEOBLASTICAS**

**ADRIANA MERCEDES RIBERO ROA
MAYRA ALEJANDRA MOLANO MORENO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2011**

**EFFECTO DE LA CONDUCTIVIDAD DEL PLA+ZINC Y PGA MEZCLADO CON
HIDROXIAPATITA Y QUITOSANO SOBRE LA ANISOTROPÍA DE CÉLULAS
OSTEOBLASTICAS**

**ADRIANA MERCEDES RIBERO ROA
MAYRA ALEJANDRA MOLANO MORENO**

**Trabajo de Grado presentando como requisito para optar el título de
Ingeniero Químico.**

**Director
DIONISIO LAVERDE
Ingeniero Metalúrgico, Ph.D**

**Codirector
NERLY DEYANIRA MONTAÑEZ SUPELANO
Ingeniera Química, MsC**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2011**

A mis padres Carlos Arturo Ríbero y Ana Ilma Roa quienes desde el cielo han sido mi guía en todas las etapas de mi vida.

A mi difunto y querido abuelito Arturo Ríbero, quien hizo el papel de padre y madre, por su mano firme y dura pero al mismo tiempo amoroso y tierno quien ayudó a construir las bases que hoy sustentan mi existencia.

A mi tío Ricardo Ríbero, por su ayuda incondicional durante mis estudios en la universidad.

A todos mis familiares y amigos quienes tuvieron siempre palabras de apoyo a lo largo de este trabajo de investigación.

A ti Miguel Chaverra, por ser la luz en cada obstáculo y por brindarme tu compañía permanente en los buenos y malos momentos.

Y a Mayra Alejandra Molano, compañera de proyecto con quien compartí vivencias estudiantiles y porque en esta armonía grupal lo hemos logrado.

*Muchas gracias a todos
Adriana Mercedes Ríbero Roa*

Hoy quiero dedicar este triunfo a Dios mi guía de cada día por darme sabiduría para afrontar cada etapa de este proceso.

A mis papas Alfonso Molano y Cecilia Moreno, por su apoyo incondicional y confianza en los momentos más difíciles de mi vida.

A mis hermanos Giovanny, Morelva, Dayanna y por supuesto a Jimena mi sobrina más linda, por estar siempre a mi lado y por servirme de gran motivación para alcanzar este logro.

A Carlitos mi compañero incondicional, quien a lo largo de toda mi carrera siempre estuvo allí para darme su apoyo.

Y por último a mi compañera de proyecto, Adriana Ríbero Roa, por ser una persona llena de motivación y empuje.

*Gracias a todos
Alejandra Molano Moreno*

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus más sinceros agradecimientos a las personas que de una u otra manera contribuyeron al desarrollo de este trabajo de grado:

A DIONISIO LAVERDE Ph.D, director del proyecto de grado.

A NERLY D. MONTAÑEZ, Ingeniera Química, codirectora del proyecto, por su valiosa colaboración, orientación y apoyo durante el desarrollo del proyecto.

A CUSTODIO VÁSQUEZ QUINTERO, ingeniero metalúrgico M.sc, y Director del grupo del Grupo de Investigaciones en Corrosión (GIC).

A DARÍO YESID PEÑA BALLESTEROS Ph.D, por su confianza.

A HUGO ARMANDO ESTUPIÑÁN DURÁN M.Sc, por su asesoría.

AL GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN CORROSIÓN GIC, de la Universidad Industrial de Santander.

AI CINTROP, centro de investigaciones en enfermedades tropicales.

A LA UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER por la oportunidad de formación como Ingenieros Químicos.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	16
1. CONCEPTOS TEÓRICOS	18
1.1 TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS.	18
1.1.1 MOTT SCHOTTKY	18
1.1.2 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA "EIS".	19
1.2 CONDUCTIVIDAD EN POLÍMEROS	21
1.3 DISCOS DE Ti6Al4V	21
1.4 CÉLULAS DE TIPO OSTEOBLÁSTICO HOS	21
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	24
2.1 PREPARACIÓN SUPERFICIAL DE DISCOS Ti6Al4V	25
2.2 DISEÑO DE EXPERIMENTOS Y MATRIZ POLIMÉRICA	25
2.3 DOPADO ELECTROQUÍMICO	26
2.4 ELECTRODEPOSICIÓN	26
2.5 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA	27
2.5.1 MÉTODO MOTT SCHOTTKY	27
2.5.2 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA.	28
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	30
3.1 ELECTRODEPOSICIÓN.	30
3.2 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA.	30
3.2.1 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA.	30
3.2.2 MÉTODO MOTT SCHOTTKY.	37
4. CONCLUSIONES	40
5. RECOMENDACIONES	41
CITAS BIBLIOGRÁFICAS	42
BIBLIOGRAFÍA	44
ANEXOS	46

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Soluciones preparadas variando el porcentaje de Quitosano y $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	25
Tabla 2. Valores de las capacitancias células-recubrimiento para las diferentes soluciones a las 0 y 24 horas.	33
Tabla 3. Análisis de varianza para resistencia cel-rec.	34
Tabla 4. Matriz polimérica óptima.	36
Tabla 5. Ecuación línea de tendencia y correlación de las diferentes soluciones.	38
Tabla 6. Valores de las propiedades semiconductoras para cada porcentaje de dopado y quitosano a diferentes tiempos.	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráfica Mott-Schottky. a) Semiconductor tipo p, b) semiconductor tipo n.	19
Figura 2. Diagrama de Nyquist.	20
Figura 3. Diagrama de Bode, a) Impedancia vs Frecuencia y b) Angulo de fase vs Frecuencia.	20
Figura 4. Esquema de la célula y su membrana celular	22
Figura 5. Circuito Equivalente	23
Figura 6. Esquema general de la metodología de trabajo.	24
Figura 7. Montaje realizado para la electrodeposición catódica.	27
Figura 8. Montaje realizado para el método Mott Schottky y EIS.	28
Figura 9. Micrografías de los recubrimientos realizados sobre discos de Ti6Al4V	30
Figura 10. Circuito equivalente utilizado para la representacion de los espectros de impedancia obtenidos experimentalmente	31
Figura 11. Sistema utilizado para las pruebas EIS y Mott Scottky	32
Figura 12. Diagrama de Bode y Nyquist a 0 y 24 horas para la solución Q3% - Zn1.5%.	32
Figura 13. Diagrama de Pareto.	34
Figura 14. Diagrama de efectos principales.	35
Figura 15. Diagrama de interacciones	36
Figura 16. Diagrama Mott Schottky a diferentes porcentajes de Zn y Quitosano.	38

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. SÍNTESIS DEL ÁCIDO POLILÁCTICO PLA.	46
Anexo B. SÍNTESIS DEL ÁCIDO POLIGLICÓLICO PGA.....	47
Anexo C. SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITA	48
Anexo D. CARACTERIZACIÓN DE LOS POLÍMEROS PLA, PGA E HIDROXIAPATITA.	49
Anexo E. MICROGRAFÍAS DE LOS DIFERENTES RECUBRIMIENTOS.....	51
Anexo F. CIRCUITOS EQUIVALENTES.....	53
Anexo G. DATOS OBTENIDOS DE LA SIMULACIÓN EN ZVIEW A LAS 0 Y 24 HORAS	55
Anexo H. GRÁFICAS EXPERIMENTALES DE NYQUIST Y BODE A LAS 0 Y 24 HORAS.	56
Anexo I. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	59

RESÚMEN

TÍTULO:

EFECTO DE LA CONDUCTIVIDAD DEL PLA+ZINC Y PGA MEZCLADO CON HIDROXIAPATITA Y QUITOSANO SOBRE LA ANISOTROPÍA DE CÉLULAS OSTEOLÁSTICAS*.

AUTORES:

Adriana Mercedes Ribero Roa
Mayra Alejandra Molano Moreno** .

PALABRAS CLAVES:

Adhesión celular, células HOS, discos de Ti6Al4V, dopado electroquímico, Mott Schottky, Espectroscopía de Impedancia Electroquímica.

DESCRIPCIÓN:

En los últimos años se han utilizado implantes y dispositivos biomédicos que tienen como fin reemplazar la función perdida del tejido afectado, pero estas soluciones están sujetas a limitaciones como fatiga, fracturas, toxicidad y desgaste. Además, el comportamiento de estos implantes y dispositivos no responden completamente a las exigencias de órganos y tejidos que reemplaza. Es por esto que surge una nueva alternativa en el campo de los polímeros biomédicos que representan una solución viable a dichas dificultades, ya que actúan interfacialmente con sistemas biológicos.

El crecimiento y adhesión celular sobre biomateriales depende de las características superficiales de los materiales empleados, recubrimientos realizados y el desarrollo de matrices porosas que proporcionen el soporte necesario para las células.

En este trabajo se modificó la conductividad del polímero (PLA, PGA, HAp, Quitosano) mediante la adición de un agente dopante como el sulfato de sulfato zinc heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) en concentraciones de 1% y 1,5% p/v, mediante la técnica electroquímica de Mott Schottky. Por otra parte, se evaluó la adhesión celular de células de osteosarcoma humano (HOS) sobre discos de Ti6Al4V, utilizando técnicas como la impedancia de espectroscopia electroquímica (EIS). Estos ensayos se llevaron a cabo simulando condiciones fisiológicas dentro de una incubadora. Por último se realizó un análisis estadístico que mostró los factores significativos a la variable de respuesta, Resistencia entre célula-recubrimiento.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ingenierías Físico-Químicas, Escuela de Ingeniería Química. Director del proyecto: Ph. Dionisio Laverde. Codirector del proyecto: Ing. Nerly D. Montañez

ABSTRACT

TITLE:

EFFECT OF CONDUCTIVITY OF PLA+ZINC AND PGA MIXING WITH HYDROXYAPATITE AND CHITOSAN ON THE ANISOTROPY OF OSTEOBLASTIC CELLS*.

AUTHOR:

Adriana Mercedes Ribero Roa
Mayra Alejandra Molano Moreno** .

KEY WORDS:

Cell adhesion, HOS cells, Ti6Al4V discs, electrochemical doping, Schottky Mott, electrochemical impedance spectroscopy.

DESCRIPTION:

In recent years we have used biomedical implants and devices intended to replace the lost function of the affected tissue, but these solutions are subject to limitations such as fatigue, fracture, toxicity and wear. Moreover, the behavior of these implants and devices do not respond fully to the demands of organs and tissues it replaces. That is why there is a new alternative in the field of biomedical polymers represent a viable solution to these difficulties, since interfacial act with biological systems.

Growth and cell adhesion on biomaterials depends on surface characteristics of materials, coatings made and the development of porous matrices that provide the necessary support for cells.

In this work we modified the conductivity of the polymer (PLA, PGA, PAH, chitosan) by the addition of a doping agent such as zinc sulfate heptahydrate sulfate ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) at concentrations of 1% and 1.5% p/v, by the electrochemical technique of Mott Schottky. Moreover, we evaluated the cell adhesion of human osteosarcoma cells (HOS) on Ti6Al4V discs, using techniques such as electrochemical impedance spectroscopy (EIS). These tests were carried out simulating physiological conditions in an incubator. Finally, a statistical analysis showed significant factors to the response variable, resistance between cell-coating.

* Project Grade

** Physical and Chememical Departament, Chemical Engineering Departament. Director of project: Ph. Dionisio Laverde. Co-Director of Project: Ing. Nerly D. Montañez

INTRODUCCIÓN

Los traumas y las enfermedades de huesos y articulaciones frecuentemente llevan a daños estructurales en la superficie del cartílago articular y en el hueso, lo que produce un dolor severo y la discapacidad de millones de personas alrededor del mundo.

Las estrategias actuales para reparar el hueso incluyen el uso de autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos, las cuales son terapias con muchas limitaciones, debido a problemas como fuentes limitadas de obtención de hueso, morbilidad de los sitios donantes, problemas de rechazo del injerto y transmisión de enfermedades. El éxito de esta ingeniería de tejidos depende del desarrollo de matrices porosas que proporcionen el soporte necesario a las células para su proliferación y el mantenimiento de sus funciones diferenciadas o señales biológicas requeridas para la conservación de la expresión específica de los genes en el tejido.

Es por esto que se incursiona en el campo de los polímeros biomédicos que representan una solución viable a dichas dificultades, ya que son capaces de actuar interfacialmente con sistemas biológicos. Los polímeros de PLA y PGA son los más empleados para esta aplicación, gracias principalmente a su biocompatibilidad, sin embargo pierden sus propiedades mecánicas en un corto lapso de tiempo.

Gracias a su excelente biocompatibilidad y a su semejanza química y cristalina con la fase mineral del hueso, los fosfatos de calcio como la hidroxiapatita (HA) se han usado en medicina. Aunque no han mostrado efecto osteoinductivo, los fosfatos de calcio tienen efectos osteoconductivos y pueden, en ciertas condiciones, unirse al hueso.

También lo es el uso de membranas de Quitosano “polisacárido” para la regeneración ósea.

El desarrollo de matrices de PLA, PGA, hidroxiapatita y Quitosano, para la aplicación en ingeniería de tejido óseo ha dado muy buenos resultados por lo que se trabajará con ellos en el transcurso de este proyecto.

La capacidad de osteointegración de un biomaterial, depende de la naturaleza físico-química de su superficie. Esta es esencial en los procesos de adhesión que determinan el crecimiento del tejido celular. Para este caso, discos de Ti6Al4V serán utilizados para realizar recubrimientos con las diferentes soluciones previamente preparadas, soluciones que variarán su composición, tipos de compuesto y porcentaje de dopado, con el objetivo de estudiar cómo se verá afectada la conductividad frente a estos parámetros.

La conductividad frente a un proceso de dopado se altera de manera proporcional con el incremento o disminución del porcentaje de dopado. En la presente investigación se usará como agente dopante $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$.

Otro aspecto muy importante es la espectroscopía de impedancia electroquímica que es una técnica relativamente nueva. Sin embargo, se ha convertido en una herramienta muy útil como método de caracterización de muchas propiedades eléctricas de los materiales así como de sus interfaces. También se utilizarán las gráficas Mott-Schottky que permitirán obtener información sobre el comportamiento semiconductor de las películas pasivas formadas sobre metales y aleaciones.

1. CONCEPTOS TEÓRICOS

Los métodos para sintetizar el ácido poliláctico, el ácido poliglicólico y la hidroxiapatita, ya han sido descritos en trabajos anteriores [1-2] y se muestran en los anexos 1-2-3.

1.1 TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS.

1.1.1 MOTT SCHOTTKY

Las gráficas Mott-Schottky (M-S) han sido ampliamente utilizadas para determinar electroquímicamente las propiedades de un material semiconductor tales como el potencial de banda plana y la concentración de portadores de carga. La obtención de gráficas Mott-Schottky es una manera usual de caracterización electroquímica de materiales semiconductores, ya que permiten obtener información sobre el comportamiento semiconductor de las películas pasivas formadas sobre metales y aleaciones. Estas gráficas se representan como el inverso del cuadrado de la capacitancia de la región de espacios de carga C_{SC}^{-2} , frente al potencial de electrodo semiconductor E , como se muestra en la Figura 1, para un semiconductor tipo p y un semiconductor tipo n. La densidad de donadores se calcula por la pendiente de la recta y el potencial de banda plana por el intercepto. Los valores de capacitancia son calculados a partir de mediciones de impedancia [3-4].

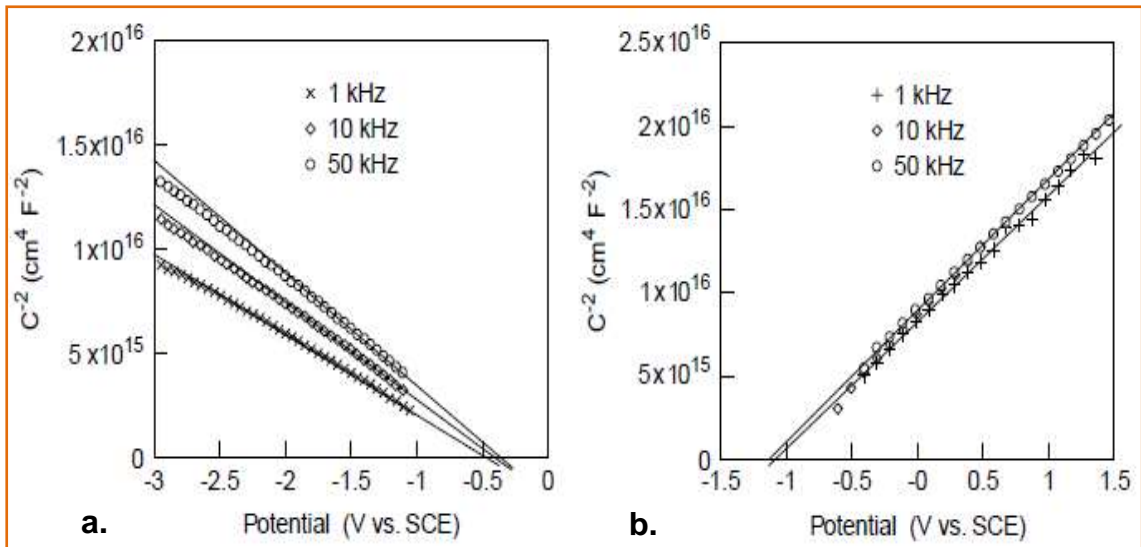
La relación Mott-Schottky se define en la ecuación (1):

$$\frac{1}{C_{SC}^2} = \frac{2}{e\epsilon\epsilon_0 N_D} \left(E - E_{fb} - \frac{kT}{e} \right) \quad (1)$$

donde C_{SC} es la capacitancia de la región de espacios de carga, ϵ_r la constante dieléctrica del semiconductor, ϵ_0 la permitividad del espacio libre, N_D la densidad de donadores (concentración de electrones donados para un semiconductor tipo n, o concentración de huecos aceptados para un

semiconductor tipo p), E el potencial aplicado, E_{fb} el potencial de banda plana, k la constante de Boltzmann, T la temperatura y e , la carga del electrón [5-6].

Figura 1. Gráfica Mott-Schottky. a) Semiconductor tipo p, b) semiconductor tipo n.



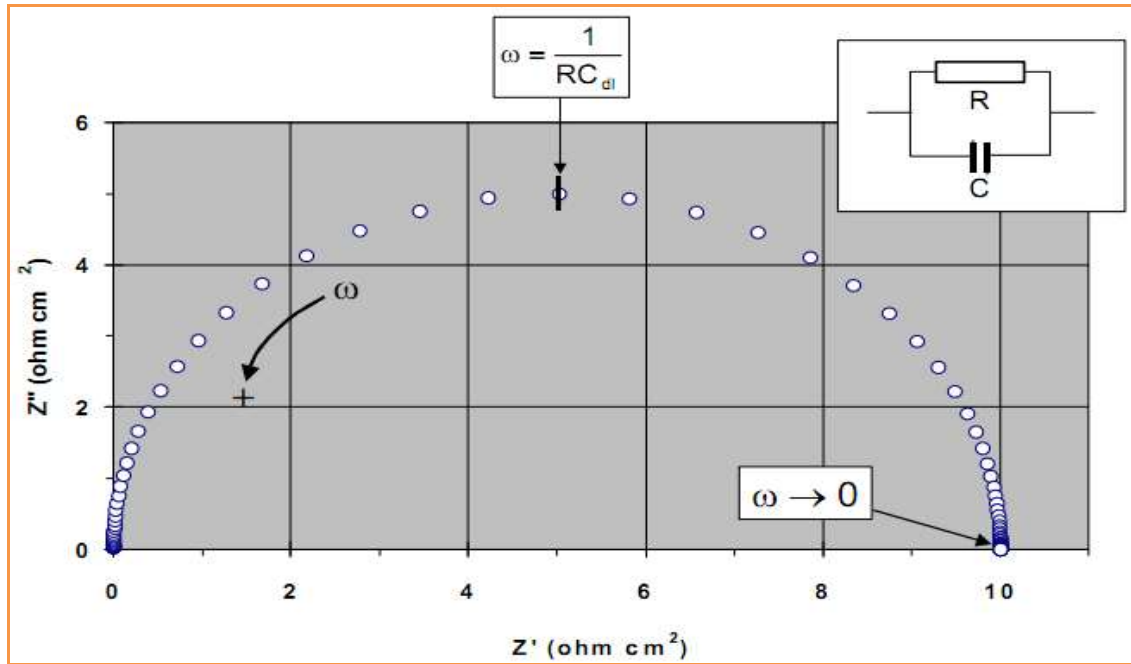
Fuente: BOTT, Adrian W. Electrochemistry of Semiconductors. Bioanalytical Systems, Inc.

1.1.2 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA “EIS”.

La espectroscopía de impedancia electroquímica da información que permite deducir el comportamiento de la interfase material-solución, como una red de elementos resistivos y capacitivos, ya que el diagrama de impedancias ofrece una visión de los comportamientos, permitiendo ver características de las superficies, como la porosidad, los fenómenos de transporte de masa, y el transporte de carga, los cuales pueden ser analizados mediante circuitos equivalentes que reproduzcan los espectros de impedancia medidos.[7-8-9]

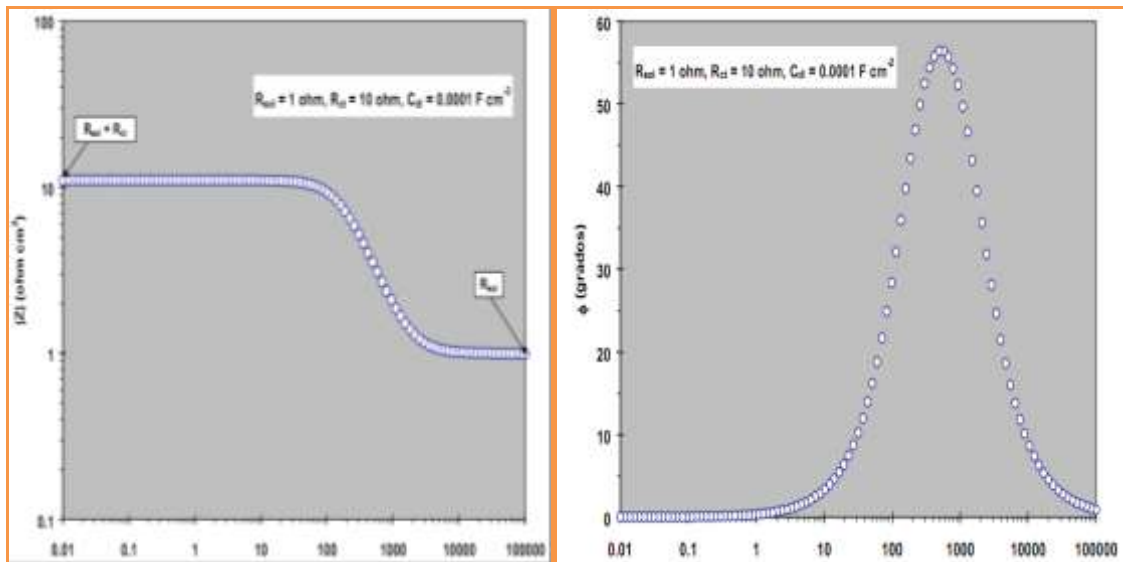
Para el registro de los datos de impedancias por EIS, se utilizan los gráficos de Nyquist y Bode como se observan en las figuras 2 y 3.

Figura 2. Diagrama de Nyquist.



Fuente: MENDOZA J., ROMERO R, GENESCA J., Espectroscopia de impedancia electroquímica en corrosión, Instituto Mexicano del Petróleo; Facultad de Química, UNAM.

Figura 3. Diagrama de Bode, a) Impedancia vs Frecuencia y b) Angulo de fase vs Frecuencia.



a) Impedancia vs frecuencia

b) Angulo de fase vs Frecuencia.

Fuente: MENDOZA J., ROMERO R, GENESCA J., Espectroscopia de impedancia electroquímica en corrosión, Instituto Mexicano del Petróleo; Facultad de Química, UNAM.

1.2 CONDUCTIVIDAD EN POLÍMEROS

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, tan buenos que se han denominado metales sintéticos. Los polímeros conductores reúnen las propiedades eléctricas de los metales y las ventajas de los plásticos que tanta expectación despertaron en los años cuarenta. Una vez demostrada la posibilidad de conducir la electricidad de los polímeros la idea se difundió rápidamente. La conductividad se debe principalmente a la adición de ciertas cantidades de otros productos químicos (dopado), pero también a la presencia de dobles enlaces conjugados que permiten el paso de un flujo de electrones a través la cadena polimérica [10].

1.3 DISCOS DE Ti6Al4V

La aleación Ti6Al4V es uno de los materiales metálicos más empleados como biomaterial, por su adecuada biocompatibilidad y la resistencia a la corrosión, debido a que posee la cualidad de formar sobre su superficie un óxido capaz de resistir los ataques químicos producidos por el ambiente biológico del cuerpo humano. [11]

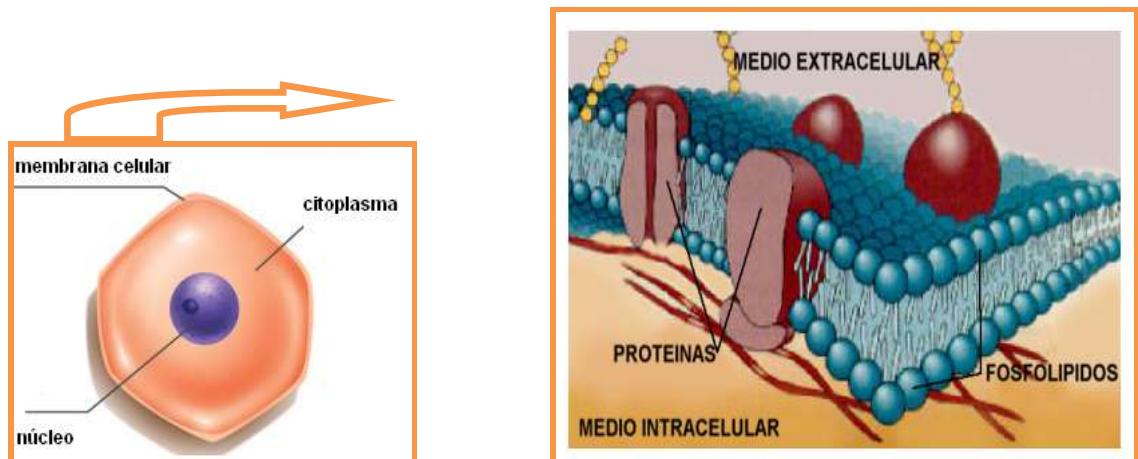
1.4 CÉLULAS DE TIPO OSTEOBLÁSTICO HOS

El esqueleto se desarrolla a partir de las células mesodérmicas programadas para diferenciarse en tres tipos celulares especializados: condrocitos (células formadas de cartílago), osteoblastos (células formadas de hueso), osteoclastos (células degradadoras de huesos).

Los osteoblastos producen la mayoría de las proteínas para la matriz ósea extracelular y controlan su mineralización [12]. Presentan una estructura celular que incluye un gran retículo endoplásmico, complejo de Golgi y características celulares relacionadas con su papel de síntesis de proteínas y de células

secretoras. Participan activamente en la formación de hueso [13]. En este trabajo se usaron células de osteosarcoma humano HOS para evaluar la matriz polimérica más eficiente en el proceso de adhesión de células de tipo osteoblástico.

Figura 4. Esquema de la célula y su membrana celular



a) Célula

b) Membrana Celular

Fuente: Y. Salazar Muñoz, Introducción a la medida de Impedancia Eléctrica de los tejidos

1.5 CIRCUITOS EQUIVALENTES

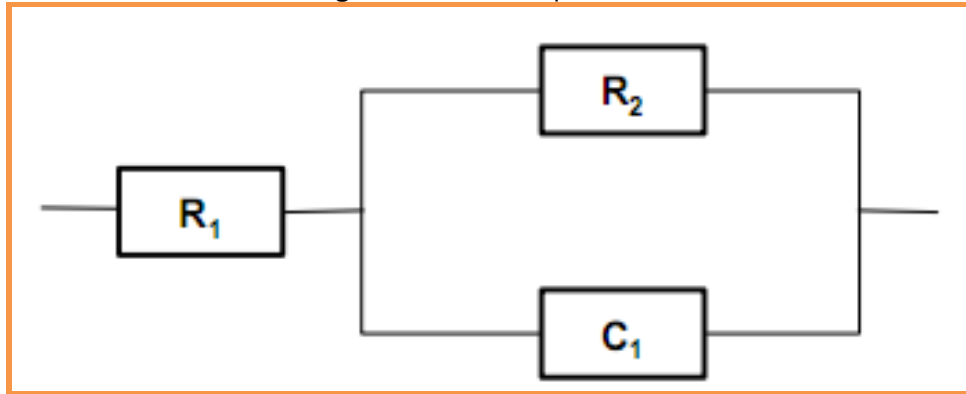
Un circuito equivalente es una combinación de elementos pasivos (resistencia, capacitancias, inductores y otras formas de impedancia distribuidas) que dan la misma respuesta, a toda frecuencia, de una celda electroquímica.

Cuando el análisis de los datos de EIS se realiza mediante un ajuste de los datos experimentales a un circuito eléctrico equivalente, se obtienen valores de diferentes parámetros eléctricos. Estos valores son utilizados para obtener información, tanto de velocidades de corrosión como de mecanismos de corrosión.

El número de circuitos equivalentes que pueden cumplir el comportamiento de una celda electroquímica es prácticamente infinito. No obstante, existe una condición esencial para la selección de un circuito equivalente: tanto los

componentes del circuito, como el circuito eléctrico en sí mismo, deben tener explicación física [8].

Figura 5. Circuito Equivalente

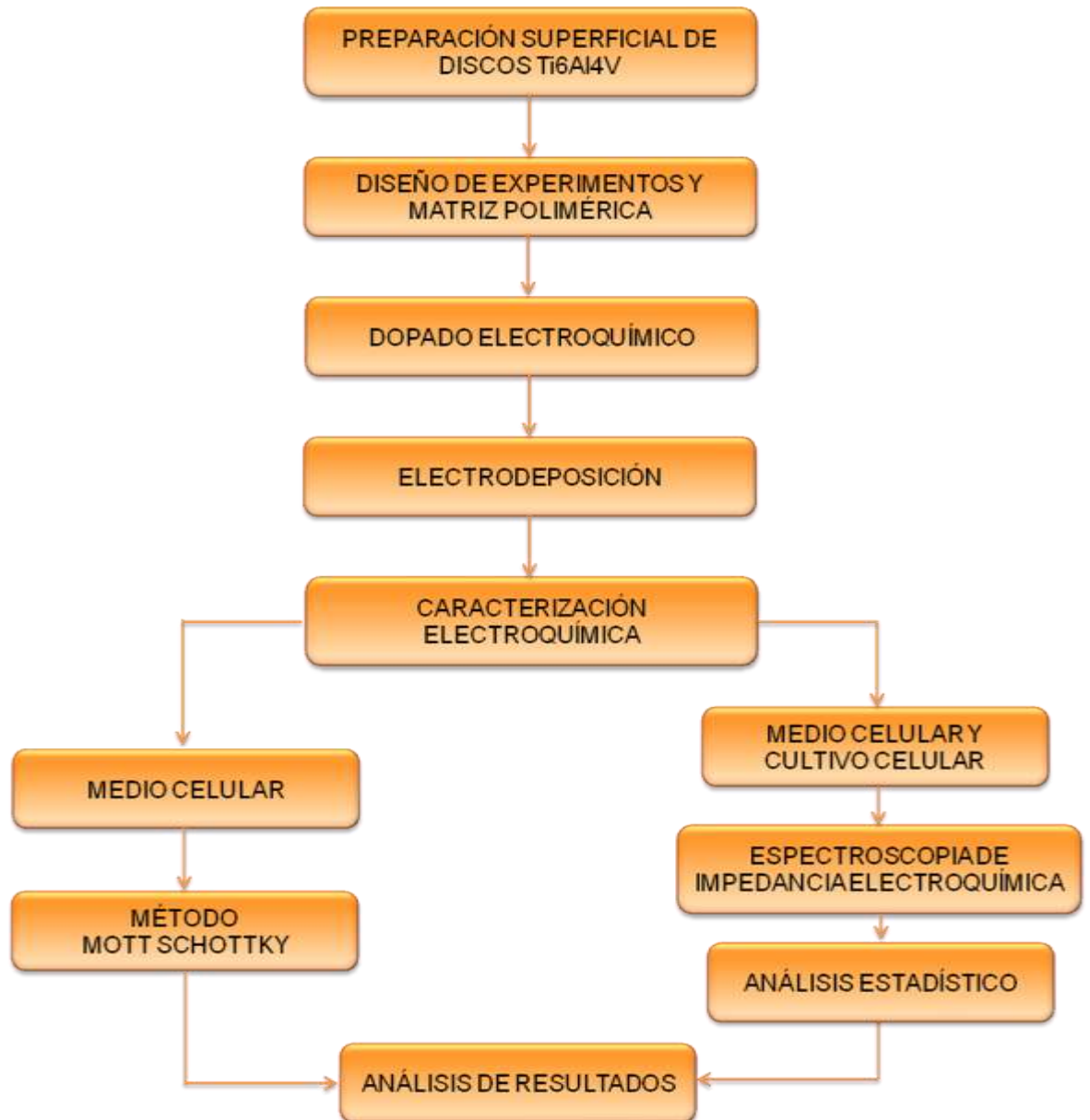


Fuente: J. Mendoza, R. Duran, J. Genescá, EIS en corrosión

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En la figura 6 se indican las etapas de la metodología que se llevaron a cabo para la realización de esta investigación.

Figura 6. Esquema general de la metodología de trabajo.



Fuente: Autores.

2.1 PREPARACIÓN SUPERFICIAL DE DISCOS Ti6Al4V

Discos de Ti6Al4V de 12 mm de diámetro y 2 mm de espesor, fueron empleados como sustratos para llevar a cabo los recubrimientos. Tales recubrimientos realizados mediante electrodeposición catódica requirieron de una superficie libre de asperezas, por tal motivo fue necesario preparar la superficie de los discos utilizando diferentes tipos de papel abrasivo SiC de granos 400, 600, 800, 1000, 1200 y 1500. Una vez pulidos los discos se observaron y se seleccionaron los discos que poseían una óptima superficie.

2.2 DISEÑO DE EXPERIMENTOS Y MATRIZ POLIMÉRICA

Para la realización de este proyecto fue necesario crear diferentes soluciones teniendo en cuenta las variables fijas¹ y las variables independientes². Se hizo un diseño experimental factorial de 2³, cada factor de 2 variables, quitosano (3% p/v y 7% p/v), ZnSO₄·7H₂O (1% p/v y 1.5% p/v) y tiempo (0h, 24h). Se llevaron a cabo 2 repeticiones escogidas al azar. Por medio del análisis estadístico se encontró la variable de respuesta³.

Se prepararon 5 soluciones representadas en la tabla 1, variando el porcentaje de Quitosano y de ZnSO₄·7H₂O disueltos en 40 ml de acetona.

Tabla 1. Soluciones preparadas variando el porcentaje de Quitosano y ZnSO₄·7H₂O

SOLUCIÓN	HAp	PLA	PGA	QUITOSANO	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
1	10%	70%	30%	0%	0%
2	10%	70%	30%	3%	1.0%
3	10%	70%	30%	3%	1.5%
4	10%	70%	30%	7%	1.0%
5	10%	70%	30%	7%	1.5%

Fuente: Autores.

¹ Variables fijas: Hidroxiapatita 10%, PLA 70% y PGA 30%.

² Variable independiente: Quitosano (3% - 7%); ZnSO₄·7H₂O (1% - 1.5%).

³ Variable de respuesta: Capacitancia.

El ácido Poliláctico, ácido poliglicólico e Hidroxiapatita se sintetizaron según protocolos establecidos. El Quitosano fue suministrado por la compañía Sigma Aldrich con 85% de grado de desacetilación.

Los polímeros PLA y PGA se caracterizaron mediante espectrometría de infrarrojo para verificar la composición del polímero respecto a los espectros encontrados en la literatura, y la hidroxiapatita se caracterizó por medio de difracción de rayos X. (anexo 4)

2.3 DOPADO ELECTROQUÍMICO

Para el proceso de dopado electroquímico se empleó como agente dopante Sulfato de zinc heptahidratado, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, con un 98.89% de pureza, marca Merck, en porcentajes de 1% y 1.5% en p/v para las diferentes soluciones ya preparadas.

2.4 ELECTRODEPOSICIÓN

Se llevó a cabo el método de electrodeposición catódica para la obtención de recubrimientos sobre discos de Ti6Al4V, utilizando las diferentes soluciones ya preparadas a diferentes porcentajes de Quitosano y $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Una vez realizados los recubrimientos se observaron y se tomaron micrografías en un microscopio óptico OLYMPUS BX51 (anexo 5).

El montaje de esta electrodeposición se muestra en la figura 7, para el cual se necesitó una plancha de calentamiento utilizando vasos de precipitado de 50 ml para cada solución sin emplear agitación. Una lámina de acero inoxidable se empleó como electrodo auxiliar (contraelectrodo) y como electrodo de trabajo se utilizaron los discos de Ti6Al4V, sujetas a un portaprobetas del mismo material, todo esto conectado a una fuente de voltaje.

Mediante pruebas preliminares se establecieron los valores para el voltaje y tiempo con el fin de obtener recubrimientos uniformes; se llegó a la conclusión de utilizar 9 voltios a un tiempo de 15 minutos.

Figura 7. Montaje realizado para la electrodeposición catódica.



Fuente: Autores.

Luego del proceso de electrodeposición, los discos fueron secados con aire frío y se tomaron mediciones de espesor, necesarias para el método Mott Schottky.

2.5 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA

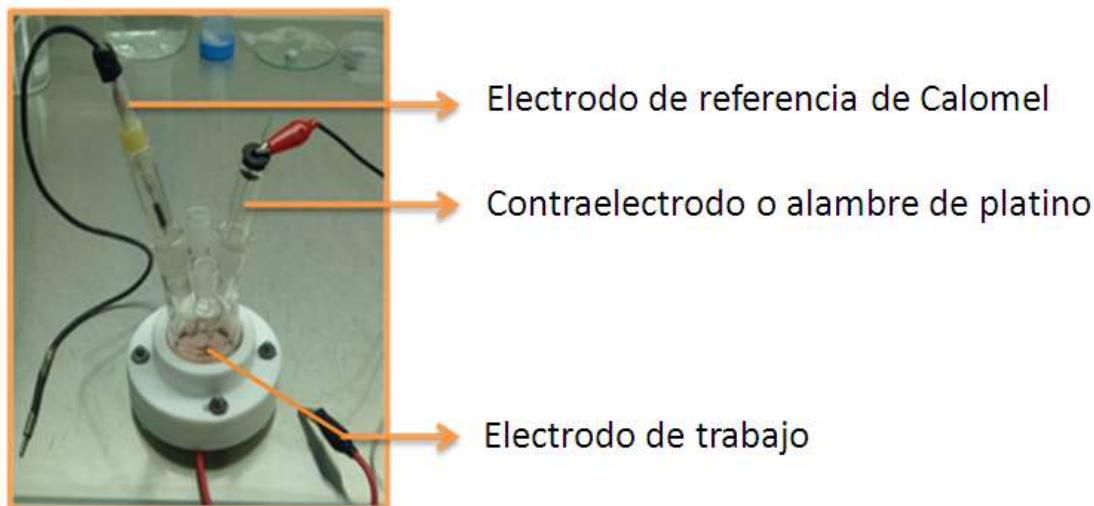
2.5.1 MÉTODO MOTT SCHOTTKY

Una vez obtenidos los recubrimientos se hizo un montaje ilustrado en la figura 8, para el cual se utilizó una celda fabricada en vidrio y teflón, en la cual el disco se encontraba sujeto en la parte inferior y en contacto con 5 ml de medio de cultivo RPMI 10% SBF1 (simulate body fluid) P-E (penicilina estreptos).

El disco con el recubrimiento cumple la función de ser el electrodo de trabajo, como contraelectrodo un alambre de platino fue colocado dentro de un capilar luggin y por último el electrodo de referencia es un electrodo de Calomel SCE fue situado dentro de un segundo luggin. Dicho montaje fue realizado dentro de

una cabina de flujo laminar con el fin de no perder la esterilidad⁴ de los materiales y así evitar una posible contaminación.

Figura 8. Montaje realizado para el método Mott Schottky y EIS.



Fuente: Autores

Una vez realizado el montaje de la celda, se introdujo en una incubadora a condiciones que simulaban el cuerpo humano, temperatura de 37°C y 5% de dióxido de carbono (CO₂). Posteriormente, se procedió a realizar la prueba en un Potenciostato/Galvanostato tipo Gamry 600ZRA con una Amplitud de 10 mV, Frecuencia de 1000 Hz, Rango de potencial vs el electrodo de referencia desde -1 a 1 V y un Barrido de potencial de 200 mV/s.

2.5.2 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA.

Las pruebas de EIS se llevaron a cabo con una frecuencia de 100000 a 0.01 Hz a una amplitud de 10 mV en un Potenciostato/Galvanostato tipo Gamry 600ZRA.

En esta prueba se utilizó una celda electroquímica de tres electrodos igual a la empleada en la prueba Mott Schottky, figura 8.

⁴ Esterilización: proceso que mata o elimina todas las clases de microorganismo y esporas por medio de la luz UV.

Se utilizaron células con una concentración de 30.000 cel/ml de células tipo osteoblásticas de la línea celular HOS y se pipetearon 4 ml de medio de cultivo más 1 ml de células para las pruebas de EIS.

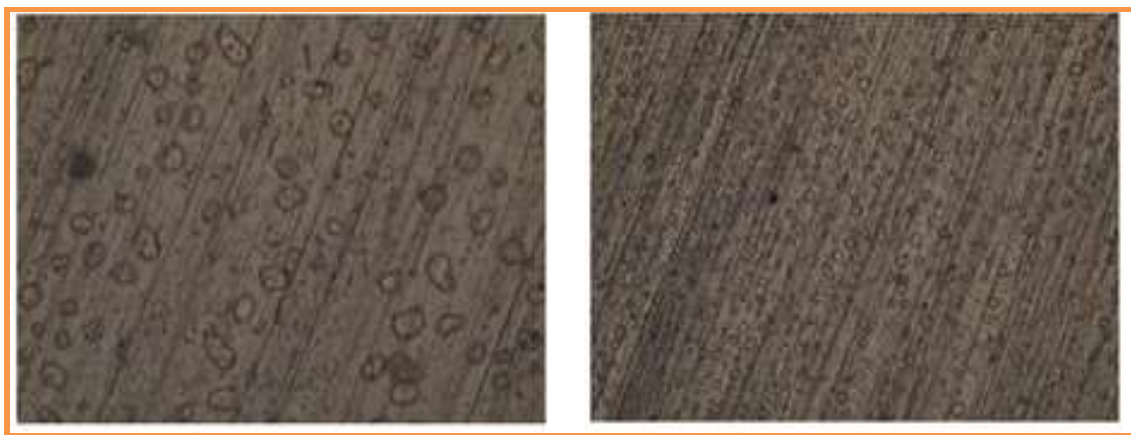
El Gamry se conectó a un computador para el registro y almacenamiento de los resultados de las mediciones que se llevaron a cabo a las 0 y 24 horas. El sistema se estabilizó corriendo pruebas de potencial de corrosión hasta que estas dieran inferiores a 5 mV.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 ELECTRODEPOSICIÓN.

Para la caracterización electroquímica se realizaron recubrimientos sobre discos de Ti6Al4V. Se seleccionaron los recubrimientos más uniformes como el representado en la figura 9.

Figura 9. Micrografías de los recubrimientos realizados sobre discos de Ti6Al4V



Fuente: autores.

Posteriormente se realizaron mediciones de masa, diámetro y espesor de los discos de Ti6Al4V con el fin de obtener los cálculos necesarios para el método Mott Schottky.

3.2 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA.

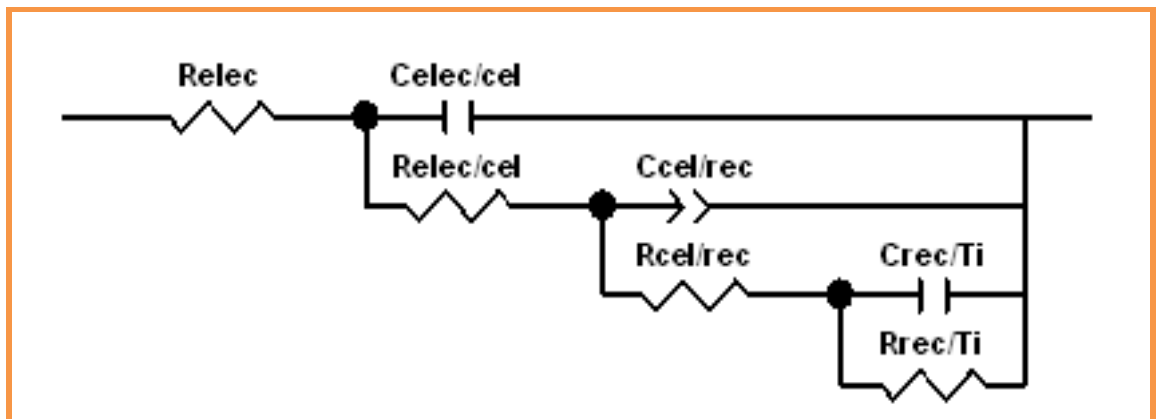
3.2.1 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA.

El espectro de impedancia electroquímica se representó por los diagramas de Nyquist y Bode, este último de gran funcionalidad ya que permite observar de una forma más clara el cambio en la resistencia de transferencia de carga (procesos faradaicos) de las muestras que tienen lugar en la interfase metal-recubrimiento.

La obtención de los circuitos equivalentes para cada prueba se basó en el circuito de Randles. Los diagramas experimentales de Nyquist y Bode fueron simulados en el software Zview dando como resultado tres modelos para cada tiempo (0 horas y 24 horas). Ver anexo 6. El ajuste determinado por el valor de chi-cuadrado resulto del orden de 10^{-4} y 10^{-5} lo que indica que hubo un muy buen ajuste para todas las simulaciones. Ver anexo 7.

En la figura 10 se muestra uno de los circuitos equivalentes utilizados, que tiene tres constantes de tiempo, cada una relacionada con una resistencia y capacitancia en paralelo, lo que indica la similitud entre las constantes conductivas. En este circuito se utilizaron capacitores puros, y un elemento de fase constante debido a la no homogeneidad en el sistema.

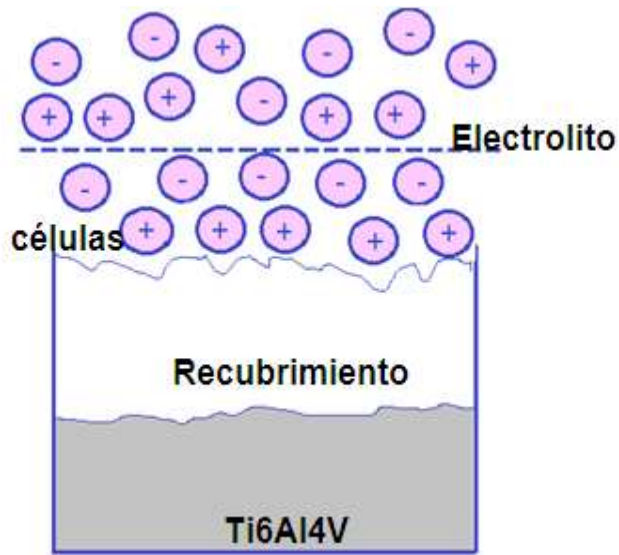
Figura 10. Circuito equivalente utilizado para la representación de los espectros de impedancia obtenidos experimentalmente



Fuente: Autores

El sistema utilizado para las pruebas de espectroscopía de impedancia electroquímica y para la técnica electroquímica de Mott Schottky se muestra en la figura 11. Para el método de mott schottky no se utilizaron células, solo se utilizó medio celular.

Figura 11. Sistema utilizado para las pruebas EIS y Mott Scottky

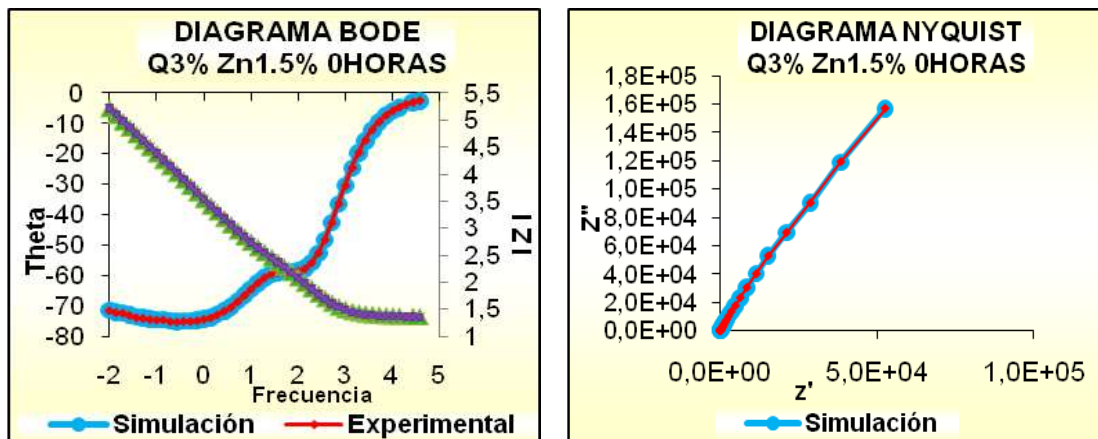


Fuente: Autores

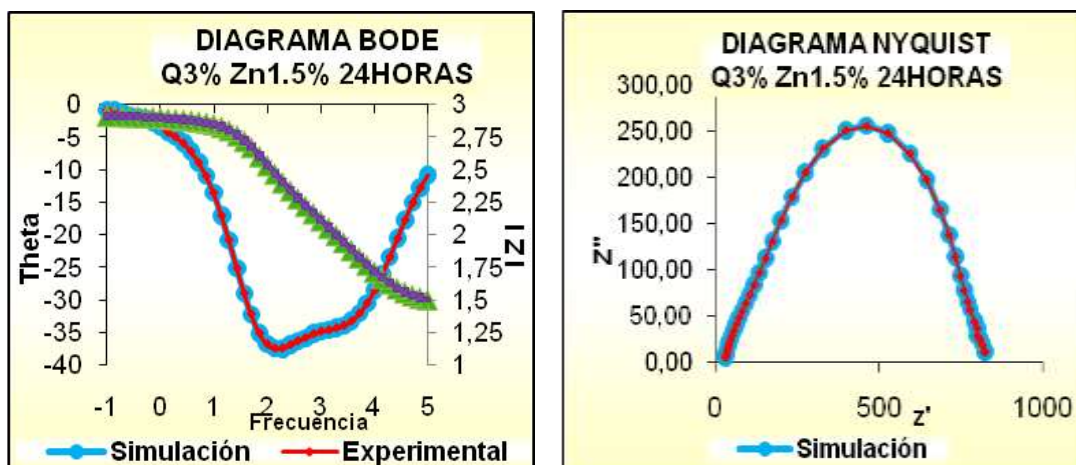
En la figura 12, se muestran los espectros de Bode y Nyquist con los datos experimentales y simulados a las 0 horas y 24 horas.

Al comparar las graficas de Nyquist⁵, se encontró que el sistema es más capacitivo a las 24 horas que a las 0 horas, lo cual indica que las interfases células-recubrimiento poseen una menor resistencia.

Figura 12. Diagrama de Bode y Nyquist a 0 y 24 horas para la solución Q3% - Zn1.5%.



⁵ Ver anexo 8. gráficas experimentales de Nyquist y Bode a las 0 y 24 horas.



Fuente: Autores.

Según la tabla 2, se observó un pequeño aumento de las capacitancias células-recubrimiento en las soluciones Q0% Zn 0% y Q3% Zn1%, lo que indica que a las 24 horas hubo una mayor adhesión celular.

Tabla 2. Valores de las capacitancias células-recubrimiento para las diferentes soluciones a las 0 y 24 horas.

Ccel/rec (F/cm ²)							
SOLUCIÓN		0 HORAS				24 HORAS	
		Ccel/rec-T	Ccel/rec-P	Ccel/rec/Ti-T	Ccel/rec/Ti-P	Ccel/rec-T	Ccel/rec-P
1	Q0% Zn0%	2,47E-05	0,77277	N	N	2,129E-05	0,75715
2	Q3%,Zn1%	2,69E-05	0,92392	N	N	2,4185E-05	0,91293
3	Q3% Zn 1,5%	N	N	6,19E-05	0,84877	7,7276E-07	1,095
4	Q7% Zn1%	3,74E-05	0,79869	N	N	1,6277E-05	0,90281
5	Q7% Zn1,5%	N	N	5,51E-05	0,8926	1,0134E-05	0,71066

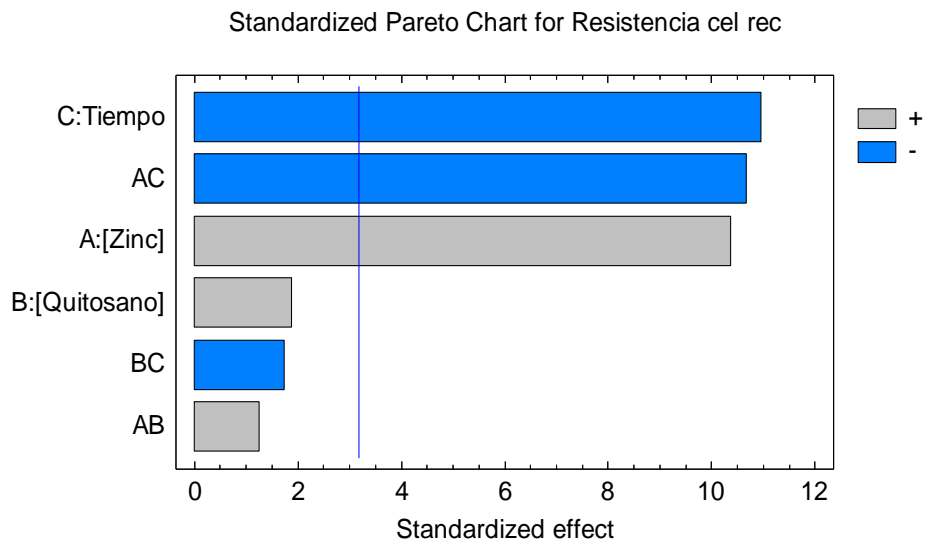
Fuente: Autores.

3.2.1.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

En el gráfico de Pareto, figura 13, se observan los factores significativos en la variable de respuesta. El factor tiempo tiene efecto negativo en la variable de respuesta, lo que indica que a mayor tiempo, menor es la Resistencia célula-recubrimiento, esto era lo que se esperaba ya que a las 24 horas el sistema es más capacitivo lo que quiere decir que la membrana celular muestra una menor resistencia al paso de corriente. El factor Zn, tiene un efecto positivo, es decir

que a medida que este aumenta su porcentaje, el valor de la resistencia célula-recubrimiento también aumenta.

Figura 13. Diagrama de Pareto.



Fuente: Autores.

Aunque el factor quitosano no tiene valores p menores de 0.05, ver tabla 3, si este se excluye del modelo, el R^2 , disminuye significativamente, por lo que el factor quitosano es un factor importante que ayuda a explicar mejor la variabilidad de los datos al modelo ajustado.

Tabla 3. Análisis de varianza para resistencia cel-rec.

Factor	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F-Radio	P-Valor
A:[Zinc]	1,75E+12	1	1,75E+12	107,68	0,0019
B:[Quitosano]	5,82E+10	1	5,82E+10	3,59	0,1546
C:Tiempo	1,95E+12	1	1,95E+12	120,31	0,0016
AB	2,58E+10	1	2,58E+10	1,59	0,2964
AC	1,85E+12	1	1,85E+12	113,82	0,0018
BC	4,92E+10	1	4,92E+10	3,03	0,18
Total error	4,87E+10	3	1,62E+10		
Total (corr.)	5,23E+12	9			

Fuente: Autores.

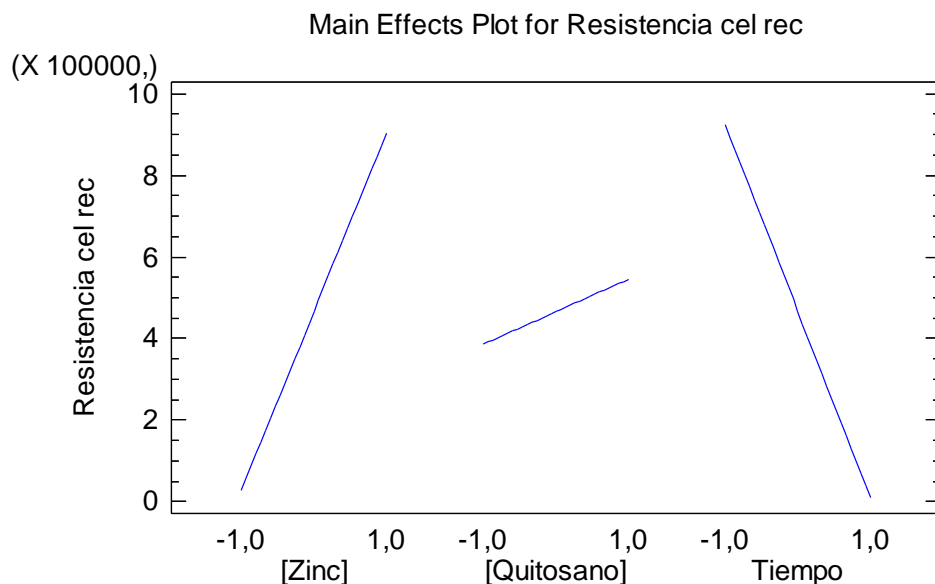
$$R^2 = 99,0699 \%$$

$$R^2 \text{ (ajustado a grados de libertad)} = 97,2097 \%$$

La anterior es la tabla de análisis de varianza o anova, la cual muestra la significancia estadística de cada uno de los efectos comparando el cuadrado medio contra una estimación del error experimental. Se evidencia que tres factores son estadísticamente significativos a la variable de respuesta, los cuales han obtenido valores-p inferiores a 0,05, lo que indica que son estadísticamente significativos en el 95,0% de nivel de confianza.

En el diagrama de efectos principales, figura 14, se muestra que a mayor tiempo (24 horas) y a una concentración menor de Zn (1%) y quitosano (3%), se obtiene una menor resistencia célula-recubrimiento.

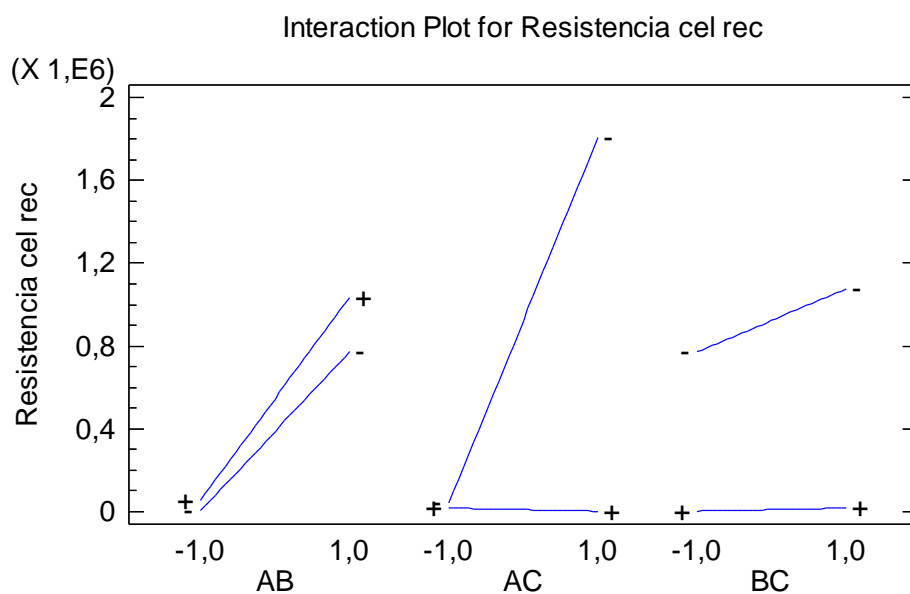
Figura 14. Diagrama de efectos principales.



Fuente: Autores.

En el diagrama de interacciones, figura 15, se muestra el efecto que tienen las interacciones de los factores principales, sobre la variable de respuesta. Por ejemplo, la interacción AC que es una de las de más significancia, muestra que a menor concentración de Zn y a mayor tiempo, da como resultado una menor resistencia, y a medida que aumenta la concentración de Zn con tiempo mayor, hay menor resistencia que la anterior. A una concentración de Zn de 1.5%, y menor tiempo, la resistencia aumenta.

Figura 15. Diagrama de interacciones



Fuente: Autores.

El valor óptimo se calculó de acuerdo al concepto de minimizar la resistencia, la tabla 4, muestra que la matriz polimérica óptima es Zn 1.5%, Q 3% con tiempo de 24 horas, lo cual corrobora lo observado en los diagramas de nyquist para los casos Q 3%, Zn 1.5%, en donde se evidencia que a 24 horas la impedancia disminuye significativamente, debido principalmente a que el dopado y las moléculas de quitosano en una concentración menor hacen la matriz mas conductora, y porosa, teniendo efectos positivos sobre el cultivo celular, y este se encuentre en estado de integridad.

Tabla 4. Matriz polimérica óptima.

Factor	Bajo	Alto	Optimo
[Zinc]	-1	1	1
[Quitosano]	-1	1	-1
Tiempo	-1	1	1

Fuente: Autores.

Para la mayoría de los casos, se evidenció una disminución de los dos componentes de la impedancia en el espectro de Nyquist. Tanto la impedancia imaginaria como la impedancia real disminuyeron sus valores a 24 horas lo que muestra que el sistema es más capacitivo a las 24 horas y que el recubrimiento

de matriz polimérica es una buena opción para material potencial empleado en dispositivos biomédicos.

3.2.2 MÉTODO MOTT SCHOTTKY.

El análisis de Mott Schottky se utilizó para determinar electroquímicamente las propiedades de un material semiconductor tales como el potencial de banda plana y la concentración de portadores de carga.

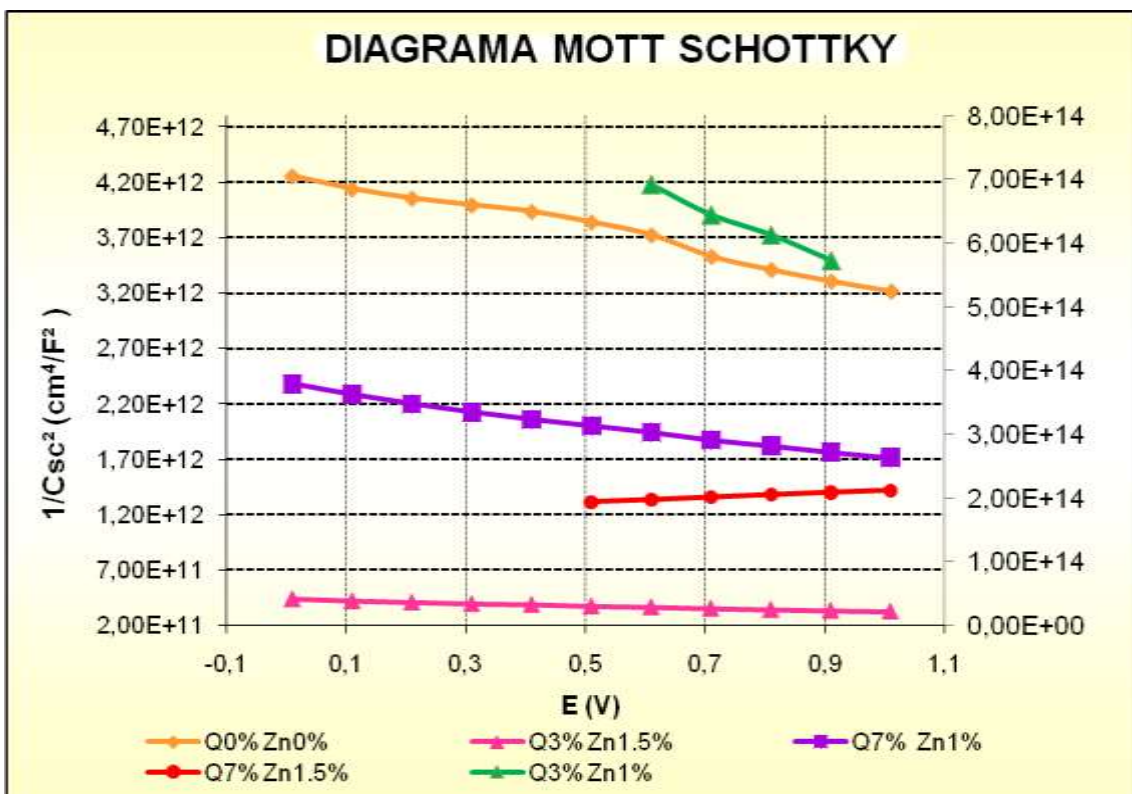
Se calculó el valor de la permitividad relativa ϵ_r de la ecuación (2), donde e es el espesor del recubrimiento, C_R es la capacitancia células/recubrimiento hallada con la técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica expuestas en la tabla 2 y ϵ_0 es la permitividad al vacío equivalente a ($8,8542 \cdot 10^{-12}$ F/m).

$$\epsilon_r = \frac{e C_R}{\epsilon_0} \quad (2)$$

En la figura 16 se observa la representación de la tendencia de las diferentes pruebas realizadas. A partir de los resultados ilustrados, la pendiente que se forma para un ajuste lineal es positiva para la solución Q7% Zn1.5%, con comportamiento catódico, y negativa para las soluciones Q0% Zn0%, Q3% Zn1%, Q3% Zn1.5% y Q7% Zn1%, mostrando un comportamiento anódico.

La respuesta a la señal en la región de la doble capa electroquímica muestra para el recubrimiento Q7% Zn1.5% una conducción de efecto n (los electrones son transferidos desde el electrodo hacia el electrolito, por lo tanto hay carga positiva), y para los demás recubrimientos una conducción tipo p (la conducción se hace por huecos).

Figura 16. Diagrama Mott Schottky a diferentes porcentajes de Zn y Quitosano.



Fuente: Autores.

Tabla 5. Ecuación línea de tendencia y correlación de las diferentes soluciones.

SOLUCION	ECUACION LINEA DE TENDENCIA	CORRELACION R ²
Q0% Zn0%	$y = -1E+12x + 4E+12$	0,982
Q3%,Zn1%	$y = -4E+14x + 9E+14$	0,9941
Q3% Zn 1,5%	$y = -1E+11x + 4E+11$	0,9935
Q7% Zn1%	$y = -7E+11x + 2E+12$	0,9924
Q7% Zn1,5%	$y = 2E+11x + 1E+12$	0,9991

Fuente: Autores.

Los cálculos para la densidad de donadores N_d y el potencial de banda plana E_{fb} , se calcularon a partir de las ecuaciones (3) y (4), donde N_A es el número de Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$ 1/mol) y F es la constante de Faraday ($\sim 9,65 \times 10^4$ C/mol). En la tabla 6 se ilustran los resultados para ϵ_r , N_d y E_{fb} .

$$N_d = \frac{2N_A}{mF\epsilon_r\epsilon_0} \quad (3)$$

$$E_{fb} = \frac{bN_d F \epsilon_r \epsilon_0}{2N_A} \quad (4)$$

Tabla 5. Valores de las propiedades semiconductoras para cada porcentaje de dopado y quitosano a diferentes tiempos.

SOLUCIÓN	ϵ_r		Nd (1/cm ³)		Efb (V)	
	0 HORAS	24 HORAS	0 HORAS	24 HORAS	0 HORAS	24 HORAS
BLANCO	11,4992	9,9301	1,2264E ⁺¹⁹	1,42019E ⁺¹⁹	4,00	4,00
Q3% Zn1%	12,5640	11,2804	1,1225E ⁺¹⁶	1,25019E ⁺¹⁶	2,00	2,00
Q3% Zn1,5%	27,4865	0,3433	5,1307E ⁺¹⁹	4,10833E ⁺²¹	4,00	4,00
Q7% Zn1%	24,1121	10,4841	8,3554E ⁺¹⁸	1,92163E ⁺¹⁹	2,86	2,86
Q7% Zn1.5%	39,1596	7,2026	1,8007E ⁺¹⁹	9,78993E ⁺¹⁹	5,00	5,00

Fuente: Autores.

A partir de los resultados obtenidos se muestra que ϵ_r disminuye con el paso de tiempo, esto debido a variaciones en la cinética de degradación, producidas por la no uniformidad en la red polimérica.

Se observó que con la variación del tiempo el potencial de banda plana (Efb) se mantuvo constante debido a la estabilidad de la banda conductora.

A un mismo porcentaje de quitosano para las 0 y 24 horas, la densidad de donadores (Nd) incrementa su valor directamente proporcional al porcentaje de ZnSO₄·7H₂O, lo cual representa un aumento en la conductividad eléctrica del material.

4. CONCLUSIONES

- Según los valores de resistencias células-recubrimientos calculados con el software Zview a las 0 y 24 horas, se observó que al hacerse más pequeña esta resistencia a las 24 horas, la membrana celular se hizo más capacitiva, demostrando la integridad celular a medida que transcurrió el tiempo.
- Mediante la técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica se logró establecer la matriz polimérica más eficiente con el valor más bajo de resistencia célula-recubrimiento, siendo esta sulfato de zinc (Zn) 1.5% y Quitosano 3% con tiempo de 24 horas.
- A partir de los resultados obtenidos mediante el método Mott Schottky, se encontraron comportamientos similares a los del semiconductor tipo n y en su mayoría para los diferentes recubrimientos realizados semiconductores tipo p, lo que indica que la conducción se realizó mediante electrones y huecos.
- El porcentaje de dopado que permitió una mayor adhesión celular a las 24 horas, fue de 1,5% de sulfato de zinc; esto debido a que las propiedades del material semiconductor tales como la densidad de donadores, para estas concentraciones de sulfato de zinc, aumentó a medida que la concentración de iones de zinc aumentó, lo cual representó un aumento en la conductividad eléctrica del material, permitiendo que en el campo biomédico, estos materiales proporcionen el soporte necesario a las células para su adhesión y posterior proliferación.

5. RECOMENDACIONES

Para posteriores proyectos de investigación, se recomienda emplear otros agentes dopantes a diferentes concentraciones, con el objetivo de optimizar las propiedades de conductividad. Es aconsejable trabajar con concentraciones bajas de quitosano ya que para las mediciones de espectroscopía de impedancia electroquímica a bajas frecuencias, se observaron perturbaciones a concentraciones altas de quitosano, esto tal vez debido al espesor del recubrimiento. Por último sería favorable realizar mediciones de espectroscopía de impedancia electroquímica con un tiempo de incubación mayor a 24 horas, con el fin de observar una mayor adhesión celular.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] GOMEZ Laura Patricia; Modificación superficial de biopolímeros semiconductores para aplicaciones biomédicas; trabajo de grado, escuela de ingeniería química, universidad industrial de Santander, Bucaramanga 2009.

[2] BUENO Juliana Andrea; Obtención y evaluación de hidrogeles poliméricos reabsorbibles semiconductores de PLA y PLG modificados con zinc y estaño; trabajo de grado, escuela de ingeniería química, universidad industrial de Santander, Bucaramanga 2008.

[3] BONDARENKO, Alexander S. y RAGOISHA Genady A. Variable Mott-Schottky plots acquisition by potentiodynamic electrochemical impedance spectroscopy. Physico-Chemical Research Institute, Belarusian State University. 2005.

[4] LEVINE Kirill L.; TALLMAN, Dennis E. y BIERWAGEN, Gordon P. Mott-Schottky analysis of aluminum oxide formed in the presence of different mediators on the surface of aluminum alloy 2024-T3. Department of Chemistry and Molecular Biology, North Dakota State University, United States, 2007.

[5] BOTT, Adrian W. Electrochemistry of Semiconductors. Bioanalytical Systems, Inc.

[6] KUNADIAN, Illayathambi; ANDREWS, Rodney; MENGÜC, M. Pinar and QIAN, Dali. Thermoelectric power generation using doped MWCNTs. Center of Applied Energy Research, University of Kentucky. ELSEVIER. USA, 12 de Noviembre, 2008.

[7] BOADA LOPEZ J; Degradación electrolítica de recubrimientos de ácido poliláctico sobre sustratos Ti6Al4v en solución sanguínea simulada; trabajo de

grado, escuela de ingeniería química, universidad industrial de Santander, Bucaramanga 2007.

[8] JUAN MENDOZA F., RUBEN DURAN R., JOAN GENESCÀ LI., Espectroscopia de impedancia electroquímica en corrosión, Notas, Instituto mexicano del petróleo, Facultad de química UNAM.

[9] COTTIS Robert, TURGOOSE Stephen. Electrochemical impedance and Noise, Serie Corrosion Testing Made Easy, NACE International, USA 1999.

[10] MARTI BARROSO, M. Caracterización y propiedades anticorrosivas de pinturas marinas modificadas con polímeros conductores. Departamento de Ingeniería, Química, Barcelona, 2002.

[11] ANDRADE R. Manuel, ESTUPIÑAN Hugo. Comportamiento Electroquímico de Aleación de Ti6Al4V Anodizada. Scientia Et Technica, Colombia 2007.

[12] PASSARGE, Genética texto y atlas, 3ra edición, editorial médica y panamericana.

[13] Zona Médica. Medicina ilustrada, poster osteoporosis.

[14] PARADA Diana Carolina, ESTUPIÑAN Hugo. Obtención de ácido poliláctico mediante policondensación con catalizador de cinc metálico. Scientia Et Technica, Colombia 2007.

BIBLIOGRAFÍA

- ANDRADE R. Manuel, ESTUPIÑAN Hugo. Comportamiento Electroquímico de Aleación de Ti6Al4V Anodizada. Scientia Et Technica, Colombia 2007.
- BOADA LOPEZ J; Degradación electrolítica de recubrimientos de ácido poliláctico sobre sustratos Ti6Al4v en solución sanguínea simulada; trabajo de grado, escuela de ingeniería química, universidad industrial de Santander, Bucaramanga 2007.
- BONDARENKO, Alexander S. y RAGOISHA Genady A. Variable Mott-Schottky plots acquisition by potentiodynamic electrochemical impedance spectroscopy. Physico-Chemical Research Institute, Belarusian State University. 2005.
- BUENO Juliana Andrea; Obtención y evaluación de hidrogeles poliméricos reabsorbibles semiconductores de PLA y PLG modificados con zinc y estaño; trabajo de grado, escuela de ingeniería química, universidad industrial de Santander, Bucaramanga 2008.
- COTTIS Robert, TURGOOSE Stephen. Electrochemical impedance and Noise, Serie Corrosion Testing Made Easy, NACE International, USA 1999.
- GOMEZ Laura Patricia; Modificación superficial de biopolímeros semiconductores para aplicaciones biomédicas; trabajo de grado, escuela de ingeniería química, universidad industrial de Santander, Bucaramanga 2009.

- JUAN MENDOZA F., RUBEN DURAN R., JOAN GENESCÀ LI., Espectroscopia de impedancia electroquímica en corrosión, Notas, Instituto mexicano del petróleo, Facultad de química UNAM.
- KUNADIAN, Illayathambi; ANDREWS, Rodney; MENGÜC, M. Pinar and QIAN, Dali. Thermoelectric power generation using doped MWCNTs. Center of Applied Energy Research, University of Kentucky. ELSEVIER. USA, 12 de Noviembre, 2008.
- LEVINE Kirill L.; TALLMAN, Dennis E. y BIERWAGEN, Gordon P. Mott-Schottky analysis of aluminum oxide formed in the presence of different mediators on the surface of aluminum alloy 2024-T3. Department of Chemistry and Molecular Biology, North Dakota State University, United States, 2007.
- PARADA Diana Carolina, ESTUPIÑAN Hugo. Obtención de ácido poliláctico mediante policondensación con catalizador de cinc metálico. Scientia Et Technica, Colombia 2007.

ANEXOS

Anexo A. SÍNTESIS DEL ÁCIDO POLILÁCTICO PLA.

Tabla. Materiales y reactivos utilizados en la síntesis de PLA.

REACTIVOS	MATERIALES
Acido láctico carlo Erba al 98%	Condensador
Agua	Rotoevaporador con bomba de vacío
Trampa de Nitrógeno	Rotoevaporador con bomba de vacío
Aceite mineral	Salida lateral

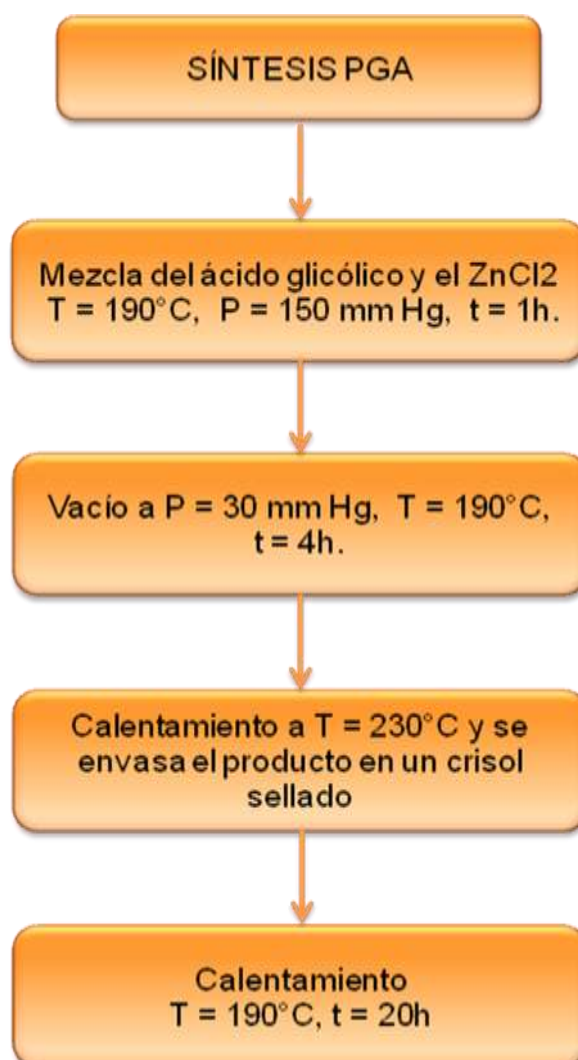
Fuente: GONZALEZ B. Aurora, PARADA Q. Diana



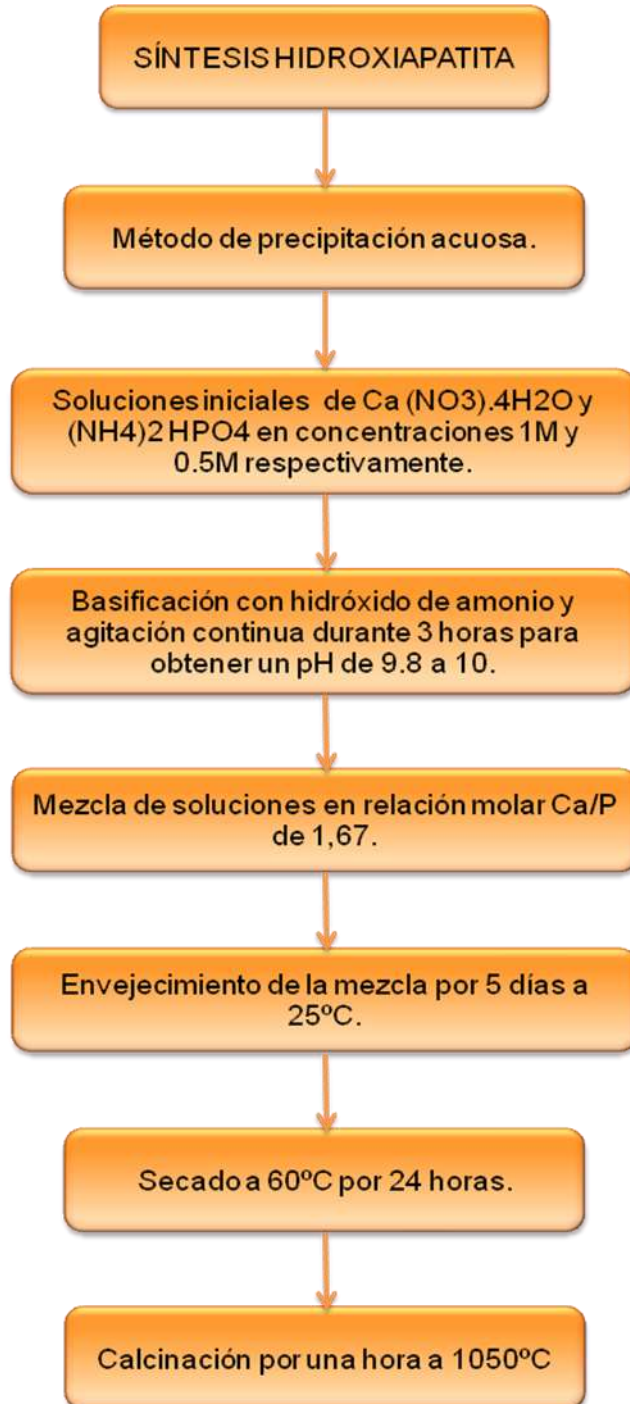
Anexo B. SÍNTESIS DEL ÁCIDO POLIGLICÓLICO PGA.

Tabla. Materiales y reactivos utilizados en la síntesis de PLA.

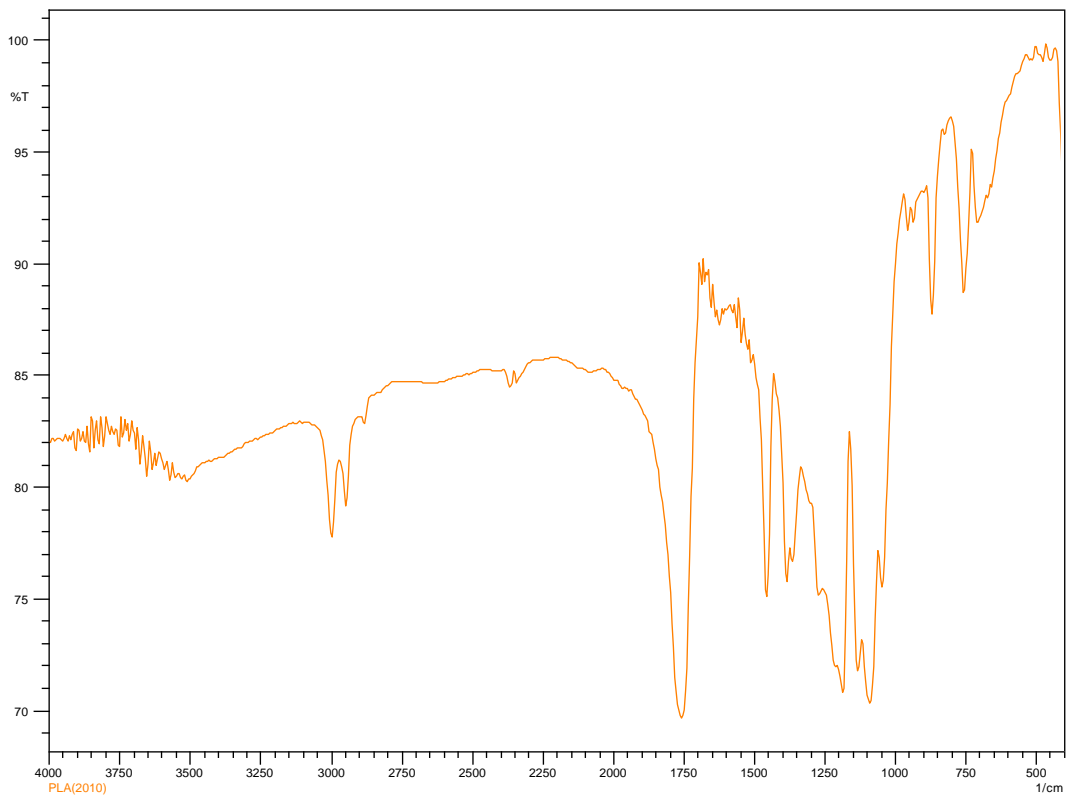
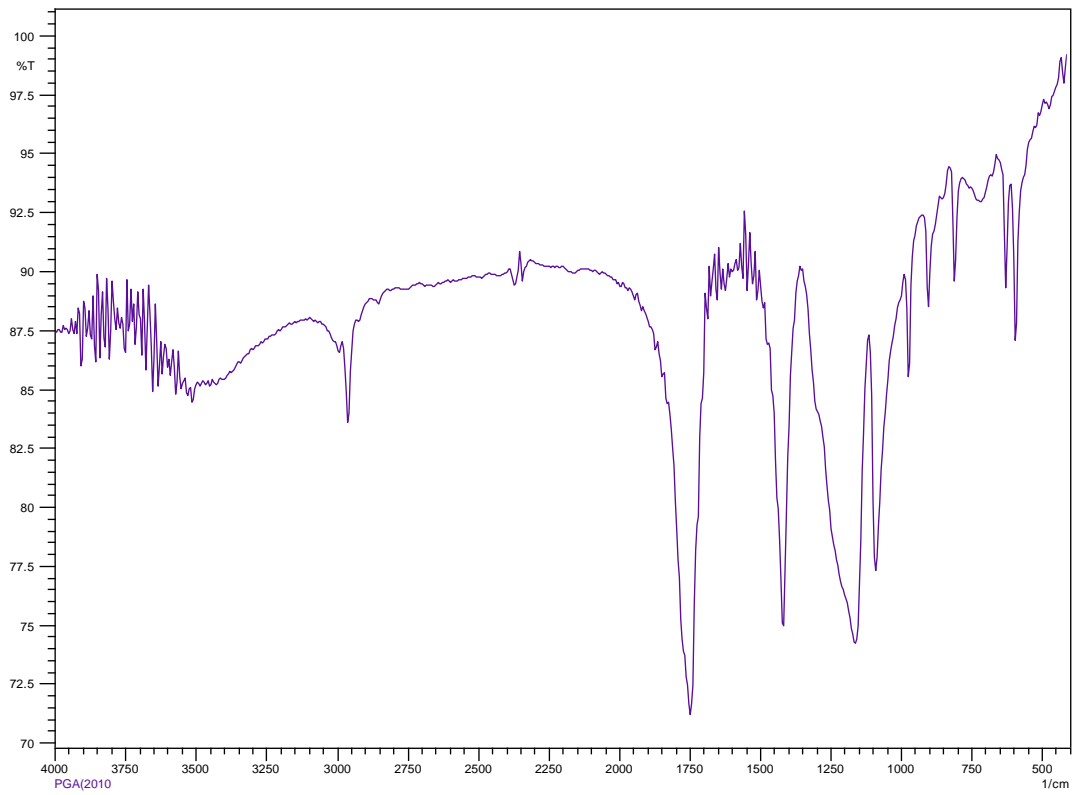
REACTIVOS	MATERIALES
Acido glicólico Carlo Erba al 98%	Rotoevaporador con bomba de vacío
Agua	Codo para vacío
Aceite mineral	Salida lateral



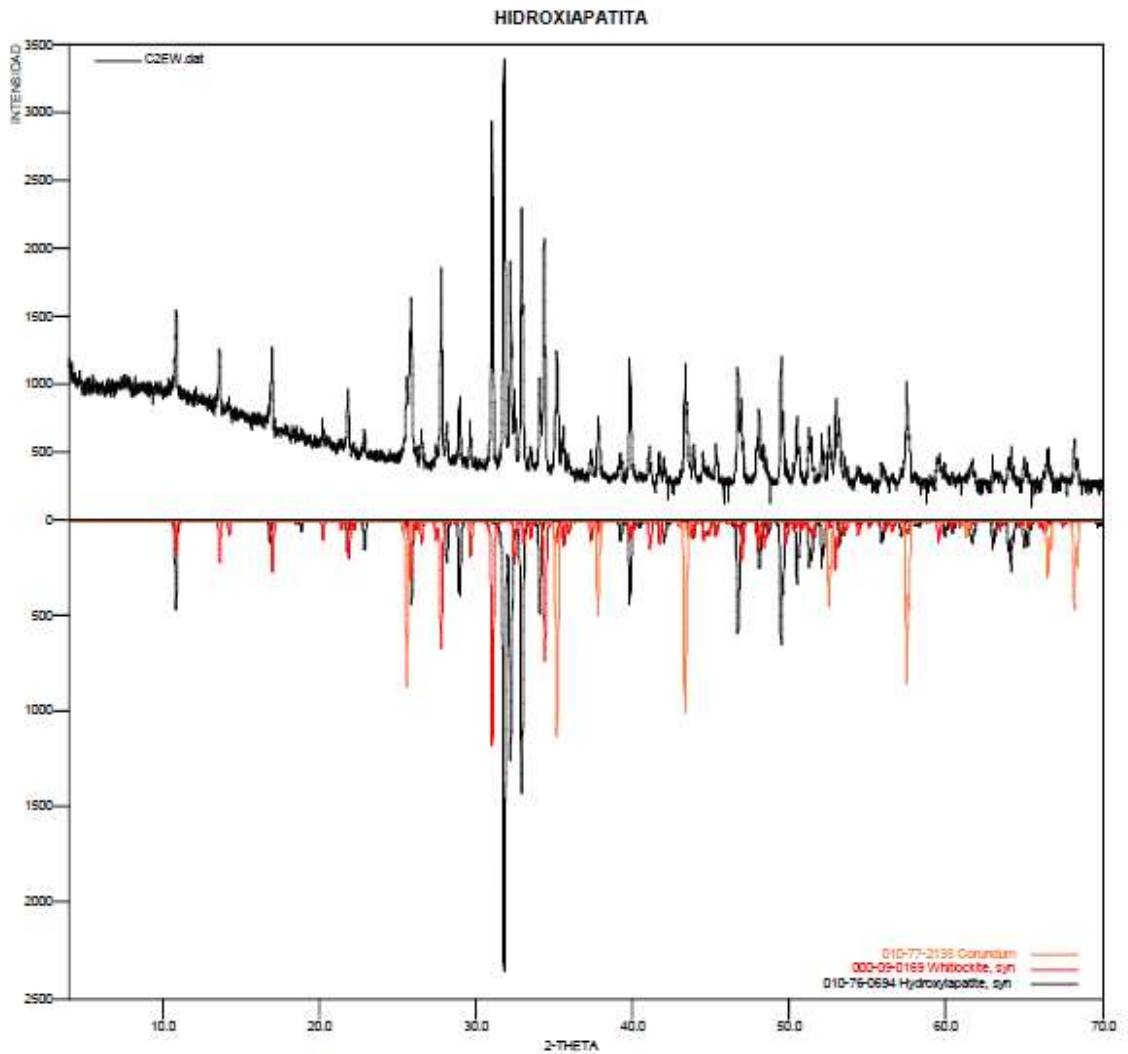
Anexo C. SINTESIS DE HIDROXIAPATITA









Anexo D. CARACTERIZACIÓN DE LOS POLÍMEROS PLA, PGA E HIDROXIAPATITA.

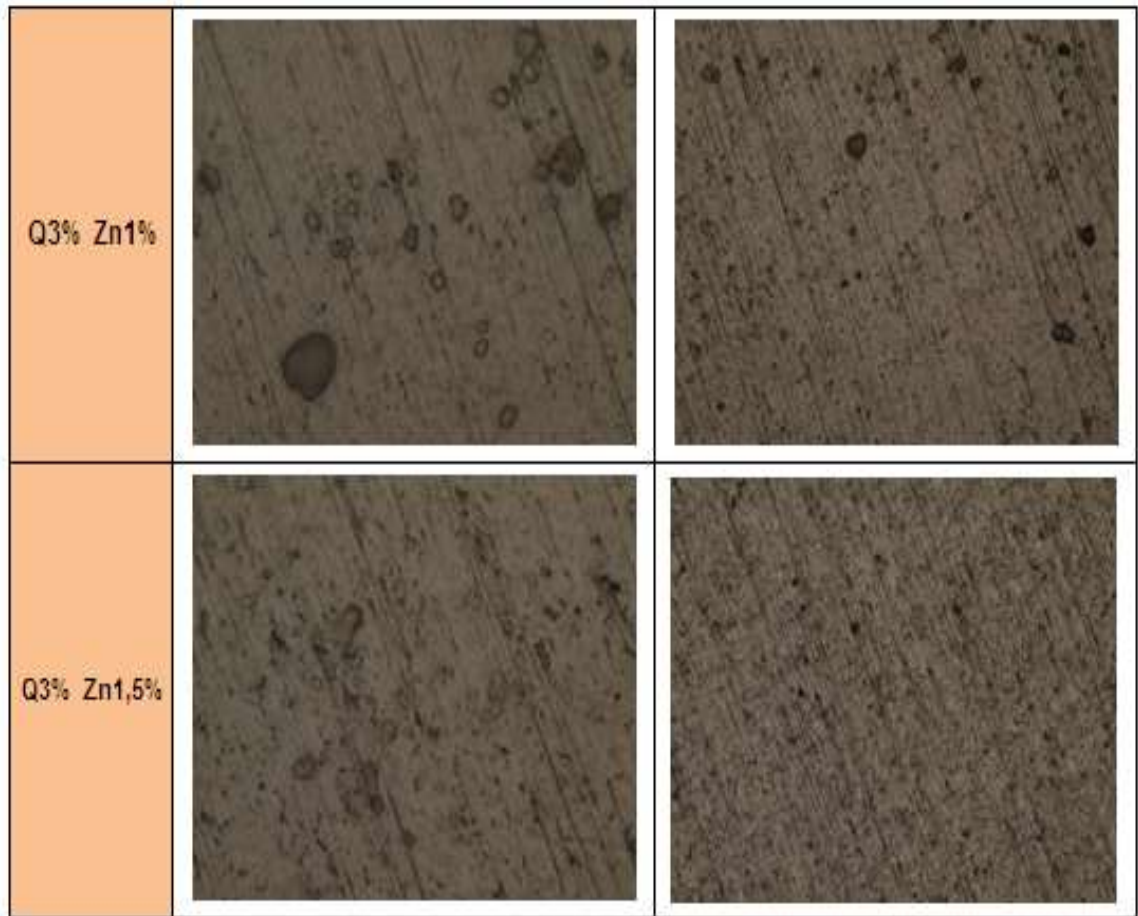


Al comparar estos espectros con artículos hallados [14] y con el FTIR correspondientes al PLA de la literatura se comprobó, que el polímero sintetizado es similar al ácido poli láctico reportado.



Anexo E. MICROGRAFÍAS DE LOS DIFERENTES RECUBRIMIENTOS

BLANCO		
Q7% Zn1%		
Q7% Zn1,5%		

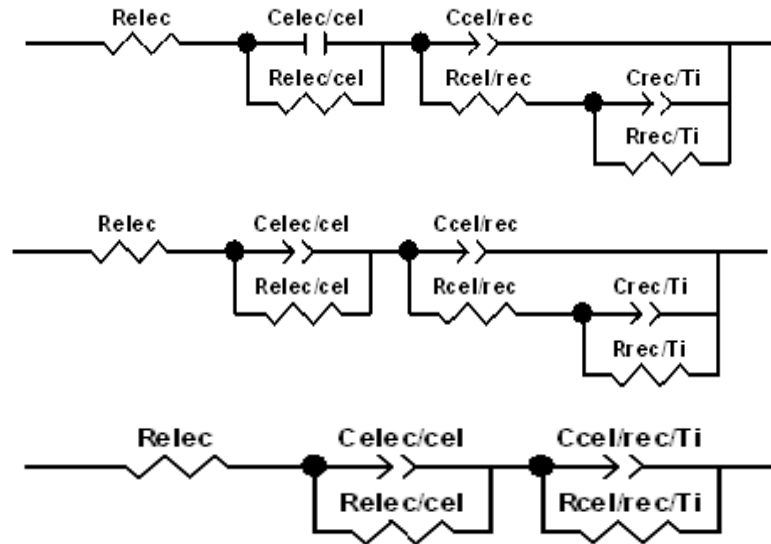


Fuente: Autores.

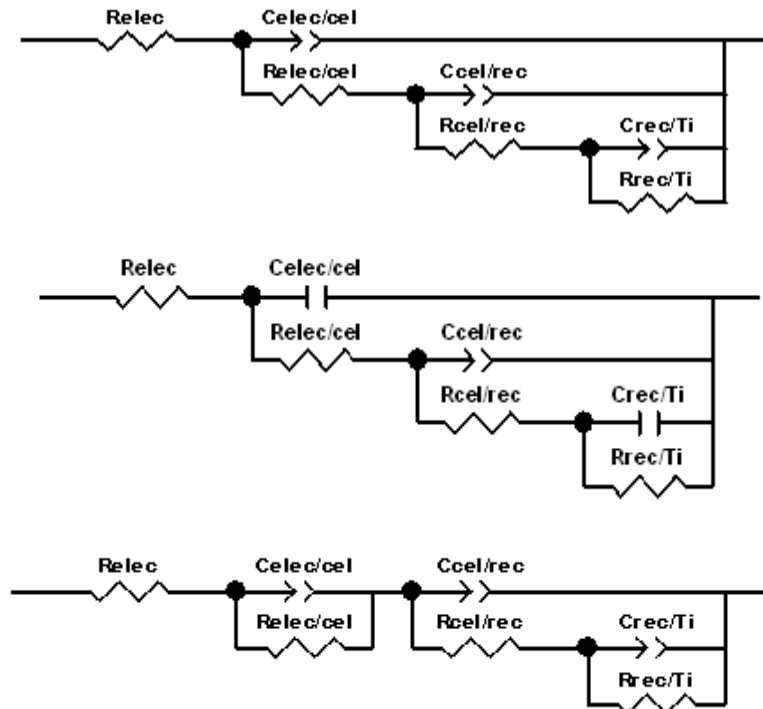
En la micrografía Q7% Zn1% se observó el recubrimiento más uniforme y este presentó una de las capas más gruesas entre todas las soluciones.

Anexo F. CIRCUITOS EQUIVALENTES

0 horas



24 horas



Fuente: Autores.

Donde;
Relec=Resistencia del electrolito

$C_{elec/cel}$ = capacitancia del electrolito sobre las células

$R_{elec/cel}$ = resistencia del electrolito sobre las células

$C_{cel/rec}$ = capacitancia de las células sobre el recubrimiento

$R_{cel/rec}$ = resistencia de células sobre recubrimiento

$C_{rec/Ti}$ = capacitancia del recubrimiento sobre discos de Ti6Al4V

$R_{rec/Ti}$ = Resistencia del recubrimiento sobre discos de Ti6Al4V

$C_{cel/rec/Ti}$ = capacitancia de las células con el recubrimiento y discos de Ti6Al4V

$R_{cel/rec/Ti}$ = Resistencia de las células con el recubrimiento y discos de Ti6Al4V

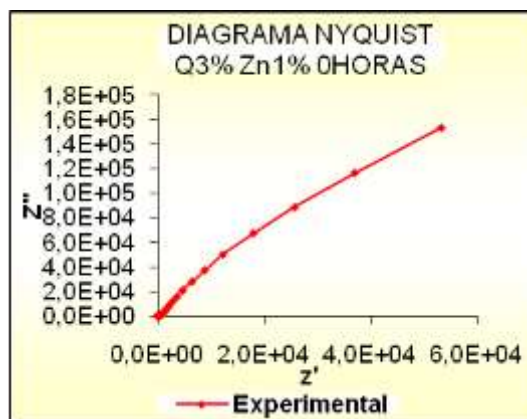
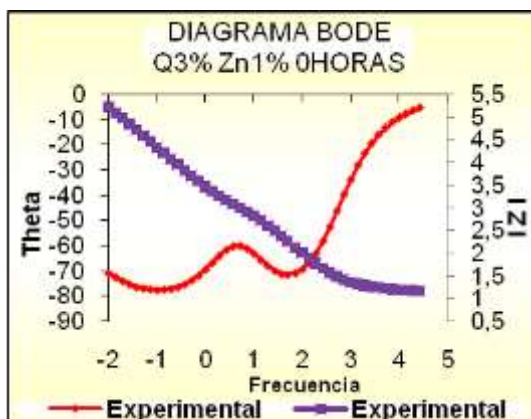
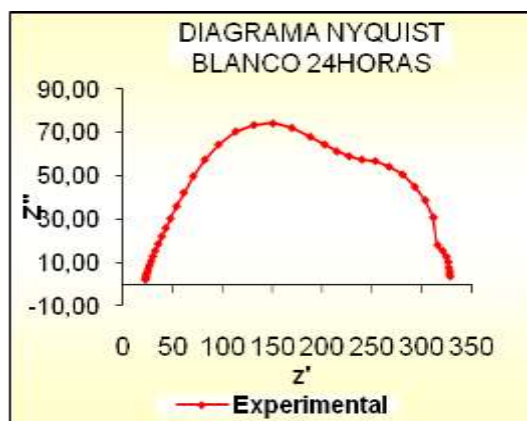
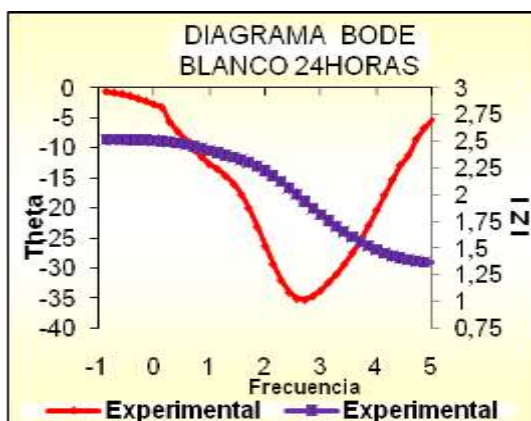
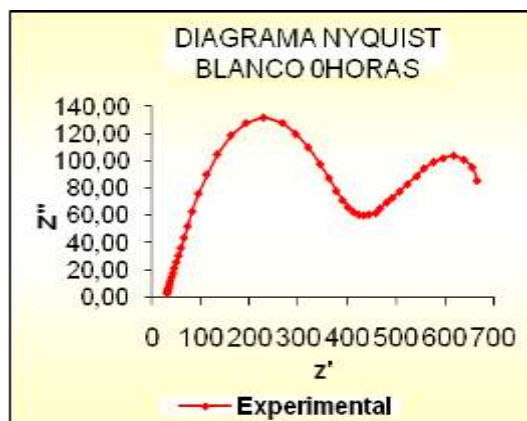
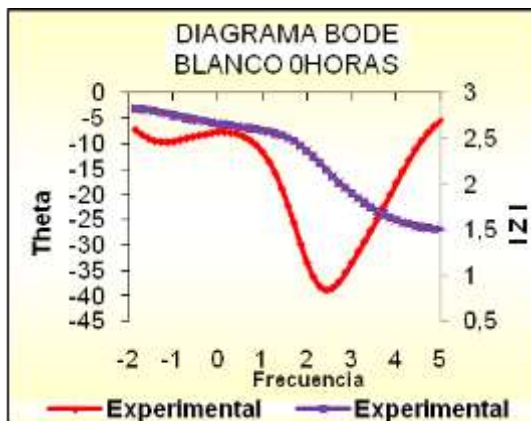
**Anexo G. DATOS OBTENIDOS DE LA SIMULACIÓN EN ZVIEW A LAS
0 Y 24 HORAS**

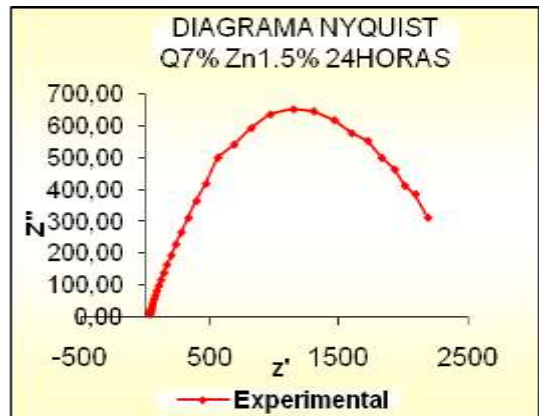
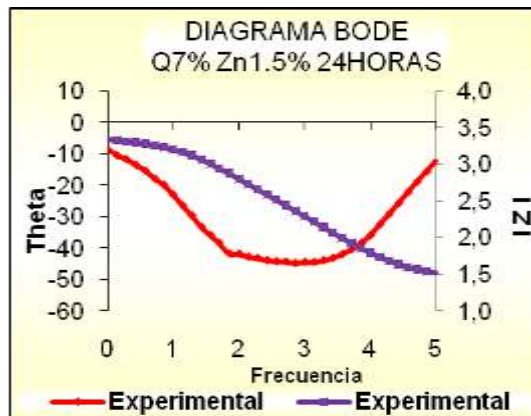
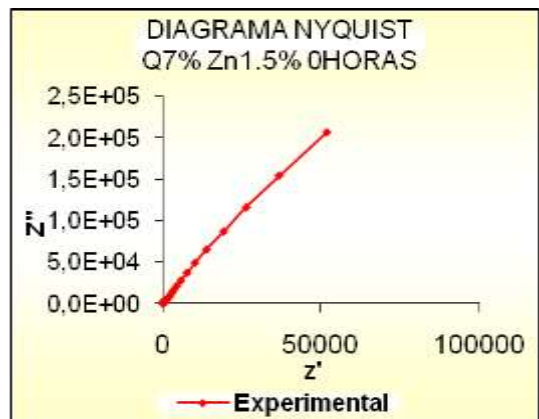
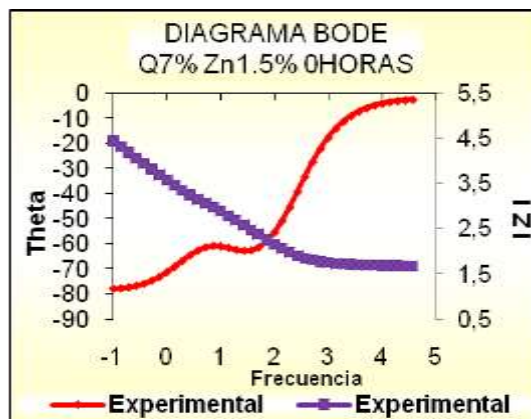
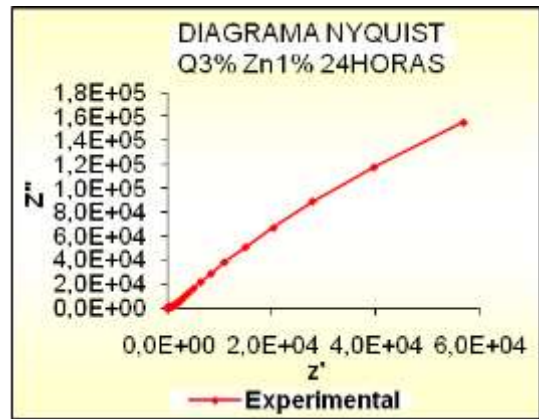
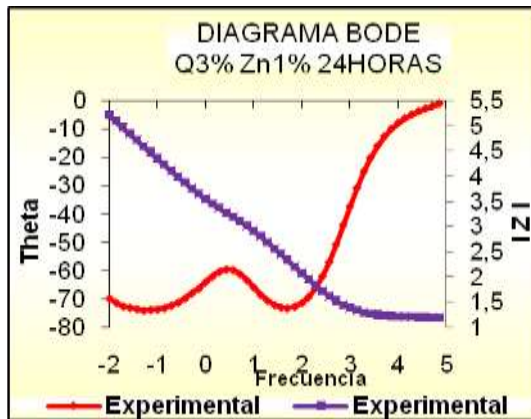
SOLUCIÓN - 24 HORAS					
ELEMENTO	Q0% Zn0%	Q3% Zn1%	Q3% Zn1.5%	Q7% Zn1%	Q7% Zn1.5%
Relec/cel	21,91	15,38	27,26	174,9	28,74
Celec/cel	N	N	N	1,8841E-06	N
Celec/cel-T	0,000017307	4,8873E-04	2,3634E-05	N	9,6948E-06
Celec/cel-P	0,75238	0,69282	0,64721	N	0,70245
Relec/cel	61,01	2,4	305,2	13,78	529,8
Ccel/rec-T	2,129E-05	2,4185E-05	7,7276E-07	1,6277E-05	1,0134E-05
Ccel/rec-P	0,75715	0,91293	1,095	0,90281	0,71066
Rcel/rec	175,1	2737	228,4	236	1720
Crec/Ti	N	N	N	9,3043E-06	N
Crec/Ti-T	0,00039029	4,2642E-05	5,2854E-06	N	0,00091298
Crec/Ti-P	0,96014	0,84929	1,033	N	1,055
Rrec/Ti	67,75	1,0718E+06	261,7	240,8	181,7
Chi-Squared	0,00020052	0,00013964	0,00020133	0,00012384	1,1275E-04

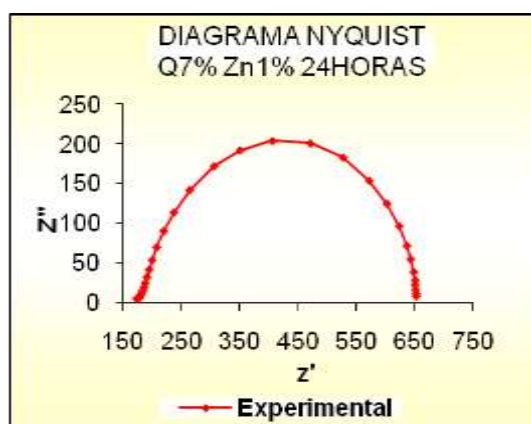
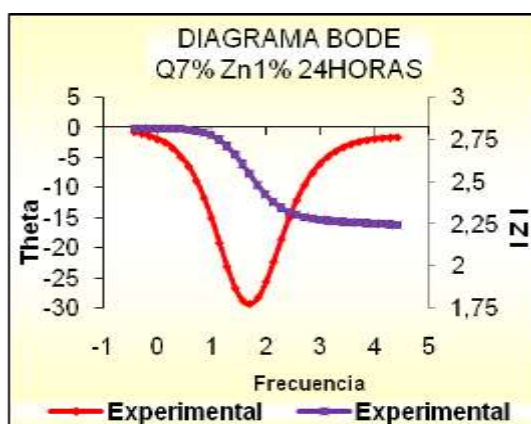
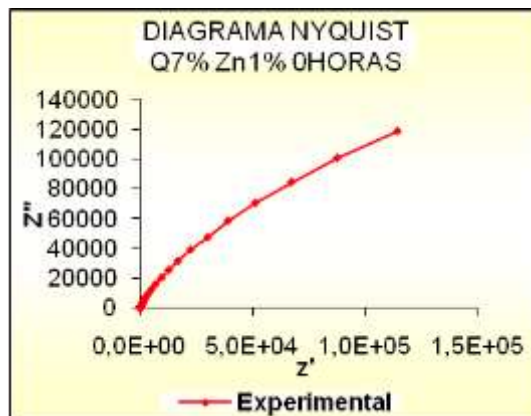
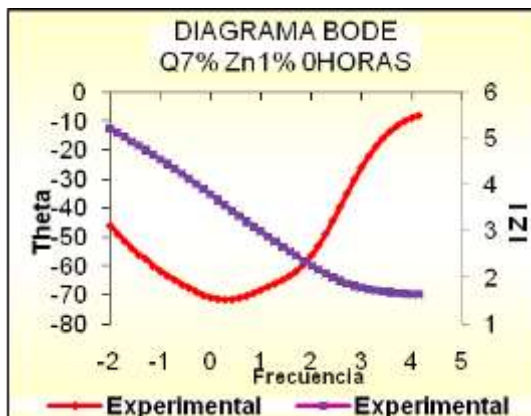
SOLUCIÓN - 0 HORAS					
ELEMENTO	Q0% Zn0%	Q3%,Zn1%	Q3% Zn 1,5%	Q7% Zn1%	Q7% Zn1,5%
Relec	36,96	13,84	22,5	40,5	48,53
Celec/cel	2,63E-06	N	N	5,97E-06	N
Relec/cel	12,15	N	N	7,086	N
Celec/cel-T	N	0,00054795	6,75E-05	N	6,80E-05
Celec/cel-P	N	0,59769	0,88156	N	0,83601
Relec/cel	N	6,1	109,2	N	590,5
Ccel/rec-T	2,47E-05	2,69E-05	N	3,74E-05	N
Ccel/rec-P	0,77277	0,92392	N	0,79869	N
Rcel/rec	411,6	1684	N	2,20E+05	N
Ccel/rec/Ti-T	N	N	6,19E-05	N	5,51E-05
Ccel/rec/Ti-P	N	N	0,84877	N	0,8926
Rcel/rec/Ti	N	N	1,54E+06	N	2,07E+06
Crec/Ti-T	0,0040784	4,43E-05	N	0,00012518	N
Crec/Ti-P	0,4992	0,887	N	1,18	N
Rrec/Ti	1545	8,45E+05	N	1,01E+05	N
Chi-Squared	0,0003065	9,17E-05	0,0002349	0,00088956	0,00026665

Fuente: Autores.

Anexo H. GRÁFICAS EXPERIMENTALES DE NYQUIST Y BODE A LAS 0 Y 24 HORAS.







Fuente: Autores.

Anexo I. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Análisis de diseño

Diseño experimental factorial 2³

Factores independientes: Quitosano(3%, 7%); Zn (1%, 1.5%); tiempo (0h, 24h)

2 Repeticiones escogidas al azar

Experimento	Zinc	Quitosano	tiempo	R cel/rec
1	-1	-1	-1	1684
2	1	-1	-1	1540000
3	-1	1	-1	220000
4	1	1	-1	2070000
5	-1	-1	1	2737
6	1	-1	1	228,4
7	-1	1	1	95,19
8	1	1	1	1720
9	-1	1	1	236
10	-1	1	-1	1633

Fuente: Autores.

TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA PARA RESISTENCIA cel rec

Factor	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F-Radio	P-Valor
A:[Zinc]	1,75E+12	1	1,75E+12	107,68	0,0019
B:[Quitosano]	5,82E+10	1	5,82E+10	3,59	0,1546
C:Tiempo	1,95E+12	1	1,95E+12	120,31	0,0016
AB	2,58E+10	1	2,58E+10	1,59	0,2964
AC	1,85E+12	1	1,85E+12	113,82	0,0018
BC	4,92E+10	1	4,92E+10	3,03	0,18
Total error	4,87E+10	3	1,62E+10		
Total (corr.)	5,23E+12	9			

Fuente: Autores.

$$R^2 = 99,0699 \%$$

$$R^2 \text{ (ajustado a grados de libertad)} = 97,2097 \%$$

La anterior es la tabla de análisis de varianza o anova, la cual muestra la significancia estadística de cada uno de los efectos comparando el cuadrado medio contra una estimación del error experimental. Se evidencia que tres

factores son estadísticamente significativos a la variable de respuesta, los cuales han obtenido valores-p inferiores a 0,05, lo que indica que son estadísticamente significativos en el 95,0% de nivel de confianza.

De estos factores dos son factores principales y uno es un factor de interacción (tiempo, Zn y tiempo*Zn). El coeficiente de determinación R^2 indica que el modelo obtenido explica el 99,07% de la variabilidad de los datos para la variable de respuesta resistencia de células-recubrimiento, lo que indica un ajuste muy bueno del modelo obtenido a los datos. Lo mismo sucede con el coeficiente de determinación R^2 ajustado que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, tiene 97,21%. El modelo obtenido se ajusta muy bien a los datos obtenidos experimentalmente.