

**EVALUACIÓN DEL DIRECCIONAMIENTO ELECTROQUÍMICO DE PROTEÍNAS
SOBRE RECUBRIMIENTOS DE ÁCIDO POLI-LÁCTICO ACTIVADOS
SUPERFICIALMENTE**

YURLEY KARINA ANAYA JAIMES

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

2009

**EVALUACIÓN DEL DIRECCIONAMIENTO ELECTROQUÍMICO DE PROTEÍNAS
SOBRE RECUBRIMIENTOS DE ÁCIDO POLI-LÁCTICO ACTIVADOS
SUPERFICIALMENTE**

YURLEY KARINA ANAYA JAIMES

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de
Ingeniero Químico

Director:

DARÍO YESID PEÑA BALLESTEROS

Ph.D en Corrosión

Codirector:

HUGO ARMANDO ESTUPIÑAN DURÁN

M.Sc Ingeniero Metalúrgico

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

2009

***A mis padres, Juana y Ramiro, por su amor, dedicación, formación,
y apoyo incondicional, a uds les debo todo lo que soy.***

***A mis hermanos, Lidy y Jeison, y a toda mi familia
por su confianza y cariño.***

***A Jorge Augusto, por estar siempre conmigo, por ser mi fortaleza
y mi mayor alegría cada día.***

***A mis amigos de universidad, compañeros de clase, de alegría,
de tristeza, de todos aprendí muchísimo.***

Gracias

Yurley Karina Anaya Jaimes

AGRADECIMIENTOS

A DARIO YESID PEÑA, ingeniero metalúrgico Ph.D, Director de ésta investigación.

A HUGO ARMANDO ESTUPIÑAN DURÁN, ingeniero metalúrgico M.Sc, Codirector de ésta investigación.

A CUSTODIO VÁSQUEZ, ingeniero metalúrgico M.Sc, Director del GRUPO DE INVESTIGACIONES EN CORROSIÓN.

A MARCELA GELVES, ingeniera química y DALGY ALDANA, por su amistad y apoyo incondicional.

A mis compañeros y amigos del GRUPO DE INVESTIGACIONES EN CORROSIÓN GIC, Eddy, Carlos Mejía, Ingrid y a todas las personas que de una u otra manera colaboraron en el desarrollo de ésta investigación.

Al centro de investigaciones en enfermedades tropicales, CINTROP.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1 INGENIERÍA DE TEJIDOS	3
1.2 BIOCOMPATIBILIDAD	3
1.2.1 Polímeros biocompatibles y biodegradables	4
1.3 PROTEÍNAS	5
1.3.1 Colágeno	5
1.3.2 Albúmina de suero bovino (<i>BSA</i>).....	6
1.4 DIRECCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS.....	6
1.5 ACTIVACIÓN SUPERFICIAL	7
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	8
2.1 MATERIALES	9
2.2 ELECTRODEPOSICIÓN DE PELICULAS DE PLA SOBRE CRISTAL DE CUARZO	10
2.3 MEDICIONES ELECTROQUÍMICAS Y DE MICROBALANZA DE CRISTALD E CUARZO.....	10
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
3.1 ANÁLISIS DEL PROCESO DE ADSORCIÓN POR EIS.....	12
3.2 ANÁLISIS DEL PROCESO DE ADSORCIÓN POR QCM.....	16
3.3 COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS TERMODINÁMICOS OBTENIDOS DE LA TÉCNICA EQCM.....	18
4. CONCLUSIONES	21
BIBLIOGRAFÍA.....	22
ANEXOS.....	28
ANEXO A. PARÁMETROS DE CIRCUITOS EQUIVALENTES.....	29

ANEXO B. CÁLCULOS ENERGÍA DE GIBBS DE ADSORCIÓN A PARTIR DE DATOS ELECTROQUÍMICOS Y MICROGRAVIMÉTRICOS	34
ANEXO C. ISOTERMAS DE LANGMUIR.....	38

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Espectro de FT IR tomado de la literatura y experimental del colágeno9	
Figura 2. Esquema de electrodeposición de PLA sobre el cristal de cuarzo (a), esquema de activación superficial usando luz UV (b).....	10
Figura 3. Fotografía y esquema del montaje EQCM.....	11
Figura 4. Circuito equivalente.....	12
Figura 5. Espectro de adsorción de una solución de BSA de 20 µg/ml a 45°C, a) Diagrama de Bode y b) Diagrama de Nyquist.....	13
Figura 6. Cambio de energía libre de Gibbs de adsorción con la temperatura obtenidos usando EIS, a) 0.00 V, b) 0.15 V, c) 0.30 V y d) 0.45 V	15
Figura 7. Espectro cambio de frecuencia con respecto al tiempo para una solución de albúmina de suero bovino de 20 µg/ml a 37°C	17
Figura 8. Cambio de la energía libre de Gibbs de adsorción con la temperatura obtenido de QCM.....	18
Figura 9. Esquema de adsorción de proteínas, a) albúmina, b) colágeno	19
Figura 10. Micrografías de la superficie a 10X, a) cristal recubierto con PLA, b) cristal con albúmina adsorbida de una solución de 20 µg/ml en recubrimiento polimérico y c) cristal con colágeno adsorbido de una solución de 5 µg/ml en rucubrimiento polimérico	20

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición salina de PBS.....	9
Tabla 2. Variable para el diseño de experimentos	11
Tabla 3. Datos calculados del cambio en la energía libre de Gibbs de adsorción	18
Tabla 4. Datos calculados a partir de la curva de cambio de energía libre de Gibbs de adsorción con la temperatura.....	20

LISTA DE ANEXOS

Pág.

ANEXO A. PARÁMETROS DE CIRCUITOS EQUIVALENTES.....	29
ANEXO B. CÁLCULOS ENERGÍA DE GIBBS DE ADSORCIÓN A PARTIR DE DATOS ELECTROQUÍMICOS Y MICROGRAVIMÉTRICOS	34
ANEXO C. ISOTERMAS DE LANGMUIR.....	38

RESUMEN

TITULO: EVALUACIÓN DEL DIRECCIONAMIENTO ELECTROQUÍMICO DE PROTEÍNAS SOBRE RECUBRIMIENTOS DE ÁCIDO POLI-LÁCTICO ACTIVADOS SUPERFICIALMENTE *

AUTOR: YURLEY KARINA ANAYA JAIMES**

PALABRAS CLAVE: Electroquímica, QCM, Biomateriales, Colágeno, BSA, Adsorción.

DESCRIPCIÓN

El estudio de la adsorción de proteínas en materiales biocompatibles es importante en el desarrollo de implantes médicos, trasplante de órganos e implantación de partes artificiales. En este trabajo se ha realizado una activación superficial mediante irradiación con luz UV de películas de Ácido Poli-Láctico (PLA) electrodepositadas sobre cristales de cuarzo Au/Cr, en las cuales se estudia la adhesión y direccionamiento de proteínas de colágeno y albumina bovina BSA disueltas en solución buffer de fosfatos (PBS) bajo la imposición de un sobre potencial electroquímico anódico. Cambios de masa, de capacitancia interfacial y de impedancia de adsorción de la monocapa proteínica fueron evaluados simultáneamente mediante microbalanza de cristal de cuarzo QCM y Espectroscopia de Impedancia Electroquímica, obteniendo de esta manera los circuitos equivalentes y parámetros termodinámicos que describen el proceso de adsorción.

La adsorción de proteína en PLA fue ajustada a la isoterma de Langmuir calculando los respectivos valores de energía de Gibbs, entalpía y entropía, que manifiestan la afinidad de las moléculas de proteína con la superficie polimérica activada y la naturaleza entrópica del proceso. Además se observaron tendencias, como el aumento de la resistencia a la transferencia de carga con la disminución de la concentración de la solución proteica y la disminución simultánea en los cambios de masa. Comparando los parámetros termodinámicos del proceso de adsorción para las dos proteínas se encontró que el colágeno se adsorbe de manera más específica que la albumina.

*Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Químico. Modalidad trabajo de investigación.

**Facultad de Ingenierías Físico - químicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph. D. Darío Peña Ballesteros. Codirector: M.Sc. Hugo Armando Estupiñan Durán.

ABSTRACT

TITLE: ELECTROCHEMICAL ADDRESSING EVALUATION OF PROTEINS ON POLYLACTIC ACID COATINGS SUPERFICIALLY ACTIVATED *

AUTHOR: YURLEY KARINA ANAYA JAIMES **

KEY WORDS: electrochemical QCM, biomaterials, collagen, BSA, adsorption.

DESCRIPTION

The study of adsorption of proteins in biocompatible materials is important in the development of medical implants, organ transplantation and implantation of artificial parts. In this work, it has been done a surface activation by UV irradiation of poly-lactic acid (PLA) films electrodeposited on Au/Cr quartz crystals, in which there were studied the adhesion and addressing of proteins of collagen and bovine albumin BSA dissolved in phosphate buffer solution (PBS) under the imposition of an anodic electrochemical overpotential. Mass, interfacial capacitance and impedance changes of the monolayer adsorption of protein were assessed simultaneously by quartz crystal microbalance QCM and electrochemical impedance spectroscopy, obtaining the equivalent circuits and thermodynamic parameters that describe the adsorption process.

The adsorption of protein on PLA was adjusted to the Langmuir isotherm finding the respective values of Gibbs free energy, enthalpy and entropy, which shows the affinity of the protein molecules with the activated polymer surface and the entropic nature of the process. In addition, there were observed trends such as increased resistance to charge transfer with the decrease of concentration of protein solution and the simultaneous decrease in mass changes. Comparing the thermodynamic parameters of the adsorption process for the two proteins, it was found that collagen is adsorbed more specifically than albumin.

*Working Grade qualify for the title of Chemical Engineering. Research Mode.

** Physical-Chemical Engineering Faculty. School of Chemical Engineering. Director: Ph. D. Darío Yesid Peña Ballesteros. Co-director: M. Sc. Hugo Armando Estupiñan Durán.

INTRODUCCIÓN

Durante mucho tiempo se ha tratado el problema de los tejidos dañados o perdidos usando trasplante de órganos o implantes hechos de materiales que pueden ser tolerados por el cuerpo humano. Aún así existen problemas asociados al uso de estos injertos biológicos, como una respuesta natural del tejido huésped, es decir, la no biocompatibilidad y la biodegradación en un corto plazo, del tejido implantado.

La industria biomédica ha encaminado sus estudios a la producción de nuevos materiales. Biomateriales que reemplacen total o parcialmente los tejidos y órganos dañados o deteriorados en el cuerpo humano, principalmente huesos y tendones, como respuesta a problemas específicos que aquejan la cotidianidad del ser humano, tales como fracturas en los huesos, ruptura de ligamentos, traumas como consecuencia de accidentes, cáncer, enfermedades congénitas, quemaduras, etc., han motivado el desarrollo de la ingeniería de tejidos como una solución efectiva y rápida para la regeneración, recuperación o cambio total de tejidos y órganos dañados.

Cuando un tejido se daña, no solo se pierden las células, también su matriz extracelular, por esta razón se debe crear una matriz biológica artificial. Ésta debe tener propiedades estructurales, mecánicas y superficiales similares a las del tejido nativo que se pretende reparar. También se pueden utilizar células específicas, retiradas del tejido nativo, las cuales son aisladas mediante biopsias, para promover su crecimiento bajo condiciones controladas. Dichas células orientan las nuevas células y estimulan su crecimiento, para ofrecer al paciente un nuevo tejido, que pueda ser implantado. Sin embargo existen tejidos complejos, que requieren principal cuidado en el direccionamiento de sus células, como los huesos [1].

Atendiendo a estos requerimientos, se estudió de la adsorción orientada de proteínas sobre superficies poliméricas semiconductoras de ácido poli-láctico (PLA) activadas con luz UV, utilizando métodos electroquímicos para promover su respectivo direccionamiento, mediante la aplicación de un sobrepotencial anódico en un rango de 0 V a 0,45 V. El proceso de adsorción fue estudiado usando mediciones simultáneas de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) y microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), en un rango de temperaturas de 25°C a 45°C, variando la concentración proteica entre 5 y 20 µg/ml en solución buffer de fosfato, a un pH 7.4.

Los resultados mostraron que al aumentar la concentración de proteínas en el electrolito, disminuye la resistencia a la transferencia de carga, exhibiendo así una mayor adsorción sobre la superficie, además de aumentar la magnitud de los cambios de masa en el procesos de adsorción medidos mediante la QCM.

Los parámetros termodinámicos y los circuitos equivalentes determinados para el proceso, mostraron comportamientos similares de adsorción para la albúmina bovina y el colágeno. Debido a la forma globular de la BSA se observa una mayor adsorción específica para esta proteína, haciendo a la superficie de PLA más estable, es decir, tiene una menor energía superficial de Gibbs.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. INGENIERÍA DE TEJIDOS

El daño total o parcial de tejido y la pérdida de la función de un órgano se encuentran entre los problemas más graves y costosos de la salud humana. Inicialmente, esos problemas se han abordado mediante el trasplante de órganos y tejidos alogénicos¹, sin embargo, esta opción se ve limitada por la baja disponibilidad de donantes [2]. Como consecuencia, cada año muere un gran número de pacientes en listas de espera y, más grave aún, muchos otros no llegan siquiera a integrarlas [3, 4].

La creciente necesidad de órganos ha llevado a los investigadores a plantear la posibilidad de utilizar células y materiales de diversa naturaleza para la reconstrucción de órganos y tejidos, para dar así nacimiento a una disciplina conocida hoy como ingeniería de tejidos (IT) [5], la cual se define como el uso de los principios y métodos de la ingeniería, la biología y la bioquímica orientados a la comprensión de la estructura y la función de los tejidos normales y patológicos de los mamíferos, y el consecuente desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar su función[6].

1.2 BIOCMPATIBILIDAD

La adsorción de proteínas juega un papel fundamental en la producción de implantes biocompatibles. La biocompatibilidad de los materiales depende en gran medida de las interacciones que ocurren entre la superficie y el ambiente biológico. Se sabe que el contacto de un cuerpo vivo con un material induce la

¹ Dícese de tejidos, células, suero, etc., pertenecientes a un individuo de la misma especie pero no de la misma estirpe que la del individuo considerado.

adsorción de proteínas en su superficie, creando una interfase, en la que otras proteínas y células se adsorben [7].

Las propiedades de la monocapa adsorbida de proteína son de vital importancia en la integración del implante en el cuerpo. Dependiendo de la complejidad del tejido al que se va a implantar, se requieren ciertas características, un ejemplo claro de esto son los huesos y los dientes, los cuales necesitan de una excelente adhesión direccionada de proteínas, que permita el crecimiento, formación y estabilización del conjunto implante-hueso, para llevar a cabo el proceso de biomineralización.

1.2.1 Polímeros biocompatibles y biodegradables. Los materiales sintéticos han sido aplicados para la sustitución de tejidos y órganos, ya que cumplen con algunas funciones auxiliares, y mejora de la comodidad y el bienestar de los pacientes. Con materiales sintéticos se pueden crear tejidos y órganos con propiedades mecánicas controladas y comportamiento biológico bien definido. En el área de biomateriales, hay dos tipos de polímeros sintéticos: no absorbible, y absorbible. Los polímeros no absorbibles se han utilizado como materiales clave para los órganos artificiales, implantes, y otros dispositivos médicos. En la mayoría de los casos, los polímeros absorbibles no son adecuados en la fabricación de dispositivos permanentes, ya que la absorción o la degradación de los materiales, implica deterioro de las propiedades del material [1]. Estos polímeros absorbibles son utilizados para formar matrices tridimensionales que sirven como dispositivos que proporcionan a las células el apoyo necesario para su proliferación, manteniendo sus funciones diferenciadas, generando las señales biológicas requeridas para la conservación de la expresión génica específica, además, definen la arquitectura del tejido. Permitiendo que las células generen tejido natural a una velocidad similar a la que el tejido artificial va saliendo del cuerpo [8].

El ácido poli-láctico (PLA) es un polímero sintético absorbible de la familia de los alfa-hidroxiácidos o poliésteres alifáticos, el cual es biocompatible,

inmunológicamente inerte, atóxico, reabsorbible y biodegradable ya que produce la metabolización del ácido láctico que comienza con la actividad de la enzima lactado deshidrogenasa (LDH) sobre el lactato, transformándolo a piruvato, el cual sufre una reacción de descarboxilación oxidativa generando acetilcoenzima A que se integra en el ciclo del ácido cítrico o Ciclo de Krebs mitocondrial. El resultado de cada ciclo es ATP debido a la fosforilación oxidativa, más H₂O y CO₂, que serán posteriormente eliminados por la respiración y por la orina. Haciendo del ácido poli-láctico un material clave para materiales en aplicaciones biomédicas[9].

1.3 ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS

Cuando la proteína se pone en contacto con una superficie sólida, ésta última sufre ciertas modificaciones causadas por la adsorción que se lleva a cabo en dicha superficie [10]. Por otro lado, las propiedades de la superficie influyen en la adsorción de proteínas, siguiendo ciertas tendencias generales:

- La afinidad de la superficie es determinada por la hidrofiliidad [11, 12].
- La disminución de la estabilidad de la proteína, aumenta la afinidad de la adsorción en la mayoría de las superficies [12, 13].
- Las proteínas con cargas eléctricas opuestas a las de la superficie, se adsorben con mayor afinidad [14, 15]. Además la afinidad en la adsorción, depende de la ubicación de la carga superficial [16].
- El tamaño y la forma de la proteína puede desempeñar un papel importante en la adsorción, ya que el número de sitios de unión por proteína adsorbida, se incrementan.

1.3.1 Colágeno. El colágeno es una proteína de la matriz extracelular, cuya estructura es la más grande del reino animal. La molécula de colágeno tipo I (largo ~ 30nm, diámetro ~ 1.5nm) es una hélice formada por tres polipéptidos. Las partes

no helicoidales son llamadas telopéptidos, y se encuentran al final de cada molécula. El colágeno puede agregarse en forma de fibrillas, in situ e in vitro [17]. Además contiene secuencias de aminoácidos, los cuales pueden ser reconocidos por células receptoras [18]. De esta manera debido a su forma, dimensiones y su propiedad de autoadherencia, el colágeno ofrece perspectivas promisorias para crear una capa de adsorbato, con un direccionamiento deseado.

1.3.2 Albúmina de suero bovino (BSA). La albúmina es una proteína abundante en el plasma sanguíneo, que desempeña un papel importante en el transporte de compuestos de bajo peso molecular por la sangre [19]. Ésta proteína globular en forma esferoidal con dimensiones de 4nm*4nm*14nm [20], posee una gran adaptabilidad debido a que es una “proteína suave” y representa un 52-62% en el plasma de la sangre [21]. Su principal función fisiológica es mantener la presión osmótica y el pH de la sangre además de transportar una gran cantidad de componentes endógenos y exógenos, incluyendo ácidos grasos, metales, aminoácidos [22].

1.4 DIRECCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS

Como respuesta a los requerimientos direccionales de las proteínas para la formación de tejidos, se han implementado numerosas técnicas. Usando flujo; como la extrucción mecánica, la utilización de canales microfluidilizados y por anisotropía química. Sin embargo, éstas han presentado inconvenientes en la densidad de formación, la elasticidad, y el tamaño final [23-28]. Por otro lado también se han orientado las fibras de proteína, utilizando campos magnéticos, los cuales requieren la utilización de imanes superconductores, ya que el colágeno posee un valor bajo en la constante diamagnética [29]. La orientación por inmersión en soluciones concentradas [30] y por electrospinning, son técnicas que pueden tardar de semanas a meses y además tiene una limitación muy importante, la utilización de utilización de solventes tóxicos y corrosivos [31].

Debido a estos problemas se ha presentado un enfoque alternativo, la manipulación electroquímica la cual puede disminuir el tiempo de proceso a minutos u horas, utilizando como variables claves, el voltaje y la corriente, con electrodos en una solución de proteína en una celda electroquímica, en donde al aplicarse un voltaje determinado es posible producir el direccionamiento de la proteína [32].

1.5 ACTIVACIÓN SUPERFICIAL

En los últimos años se han desarrollado una serie de técnicas de activación superficial, para el desarrollo de dispositivos biomédicos que permiten la obtención de biomateriales sofisticados. Estas técnicas van desde la fotolitografía, ablación por láser, manchado, litografía por haz de electrones, nanolitografía de inmersión, hasta la activación por fuerzas magnéticas [33]. La fotolitografía implica la irradiación de una superficie con un haz de alta energía, por lo general de luz ultravioleta. La alteración superficial puede causar fotodisociación, rotura de enlaces químicos, el inicio de polimerización [34-36], produciéndose de ésta forma superficies activas superficialmente [37].

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este trabajo se estudiaron las propiedades termodinámicas de la adsorción direccionada electroquímicamente de colágeno y BSA, en superficies de PLA activadas por irradiación con luz UV, realizando un monitoreo en tiempo real de su interacción mediante técnicas electroquímicas y microgravimétricas.

La técnica electroquímica denominada EIS *Electrochemical impedance spectroscopy*, es una herramienta eficaz para estudiar los procesos de electrodo, utilizando una perturbación de carácter eléctrico, un voltaje de corriente continua, que superpone una señal de potencial sinusoidal de amplitud pequeña. Este método permite la medición de la capacitancia de la doble capa, de la interfase electrodo/solución, con lo cual es posible generar modelos en forma de circuitos equivalentes que permiten obtener información de la película modificada en la superficie del electrodo [38, 39].

La microbalanza de cuarzo *Quartz Crystal Microbalance QCM*, es una potente técnica para realizar un seguimiento de la cinética de adsorción de diferentes sistemas, sólido-líquido y sólido-sólido, como los átomos, moléculas, proteínas o incluso de células vivas [40, 41]. El fenómeno físico del sensor se basa en el efecto piezoeléctrico. En el cristal de cuarzo se produce una onda acústica que interacciona con el medio en contacto con el cristal. El tipo de interacción es generalmente caracterizada a través de desplazamientos de fase y amplitud (dependiente de la frecuencia), siendo dichos desplazamientos función de la composición y propiedades del medio en contacto. La onda acústica se propaga en una pequeña distancia, en el medio en contacto, de esta forma la respuesta está determinada predominantemente por las propiedades interfaciales.

2.1 MATERIALES

Acido poli-láctico (PLA) sintetizado por policondensación del ácido L-láctico (MERCK) con Zn^{+2} como catalizador. Este polímero fue disuelto en acetona (MERCK) a 15% p/v para realizar las electrodeposiciones.

La solución salina amortiguada por fosfatos, phosphate buffer solution (PBS) utilizada para la dilución de la proteína, se preparó a partir de NaCl (MERCK), $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (CarloErba), KCl (MERCK), K_2HPO_4 (CarloErba) y tamponado a un pH de 7,4.

Reactivos	Cantidad
NaCl	8,06 g
KCl	0,22 g
Na_2HPO_4	1,15 g
$KH_2PO_4 \cdot H_2O$	0,20 g
dH_2O	Aforar 1 L

Tabla 1. Composición salina de PBS.

La Albumina Bovina (BSA) 98% para electroforesis (Sigma A7906).

El colágeno fue empleado como polvo liofilizado (RSAD08I25201), el cual fue caracterizado usando FT IR, cuyos espectros se muestra en la figura 1. En donde el espectro del colágeno tomado de la literatura se encuentra en la parte superior del espectro obtenido experimentalmente.

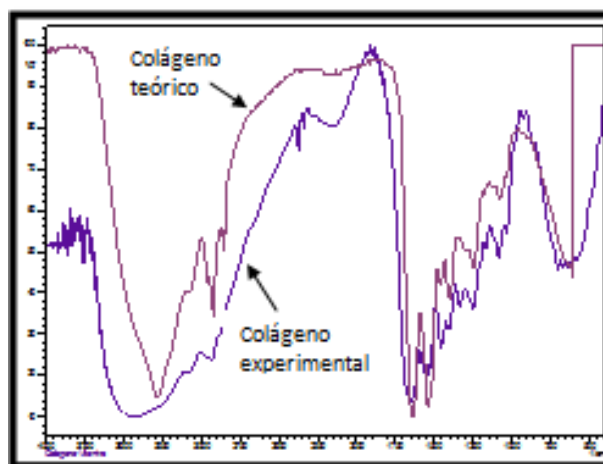


Figura 1. Espectro de FT-IR tomado de la literatura y experimental del colágeno.

2.2 ELECTRODEPOSICIÓN DE LA PELÍCULA DE PLA SOBRE EL CRISTAL DE CUARZO Au/Cr

Para realizar el recubrimiento de los cristales de cuarzo con la solución de PLA en acetona al 15% p/v, se utilizó una fuente de potencia, marca Thermo Electron Corporation EC570-90, para aplicar un voltaje de 3 Voltios, donde el cátodo fue conectado con el cristal de cuarzo de Au-Cr y el ánodo a una lámina de acero, como se muestra en la figura 2.a), durante un tiempo de 5 minutos a condiciones estándar de presión y temperatura. Posteriormente se irradió un área preferencial con un espesor de 1mm y longitud 1in con luz UV ubicada en el centro del cristal (Figura 2.b)).

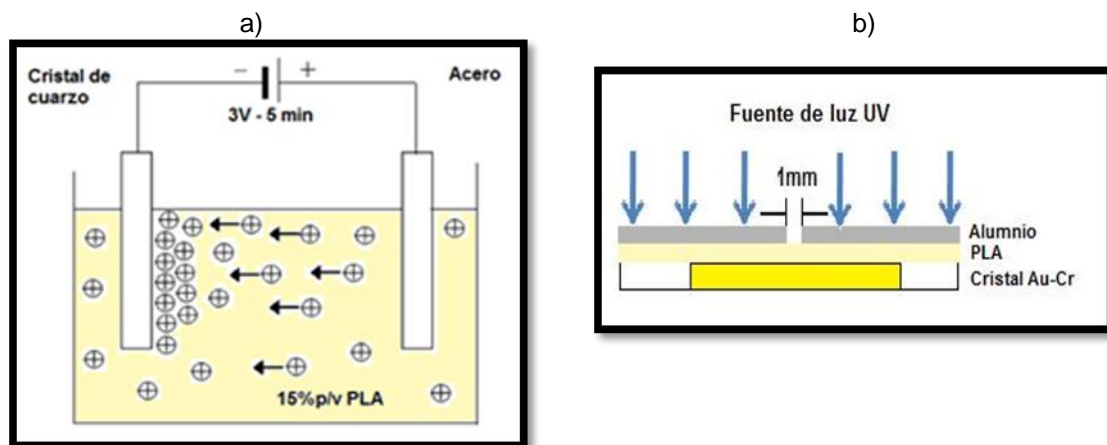


Figura 2. Esquema de electrodeposición de PLA sobre el cristal de cuarzo (a), esquema de la activación superficial usando luz UV (b).

2.3 QCM Y MEDICIONES ELECTROQUÍMICAS DE ADSORCIÓN.

Se prepararon soluciones de proteínas en PBS a 5, 12.5 y 20 $\mu\text{g/ml}$. Para las mediciones electroquímicas y de la QCM simultáneas, se empleó una celda plana de tres electrodos, en donde el electrodo de trabajo fue el cristal recubierto, contra-electrodo de grafito, y un electrodo de referencia de Ag-AgCl. Las mediciones electroquímicas se realizaron usando un potenciostato GAMRY PC4/750 y las mediciones de la QCM se realizaron con una QCM200 *Stanford Research Systems*, previamente calibrada. Las mediciones de espectroscopia de

impedancia fueron desarrolladas en un rango de frecuencia de 0.01 a 100000 Hz a un voltaje natural de 0V y 0.15, 0.30 y 0.45 V de potencial de corriente continua y 10mV de potencial de corriente alterna. El montaje se muestra en la figura 3.

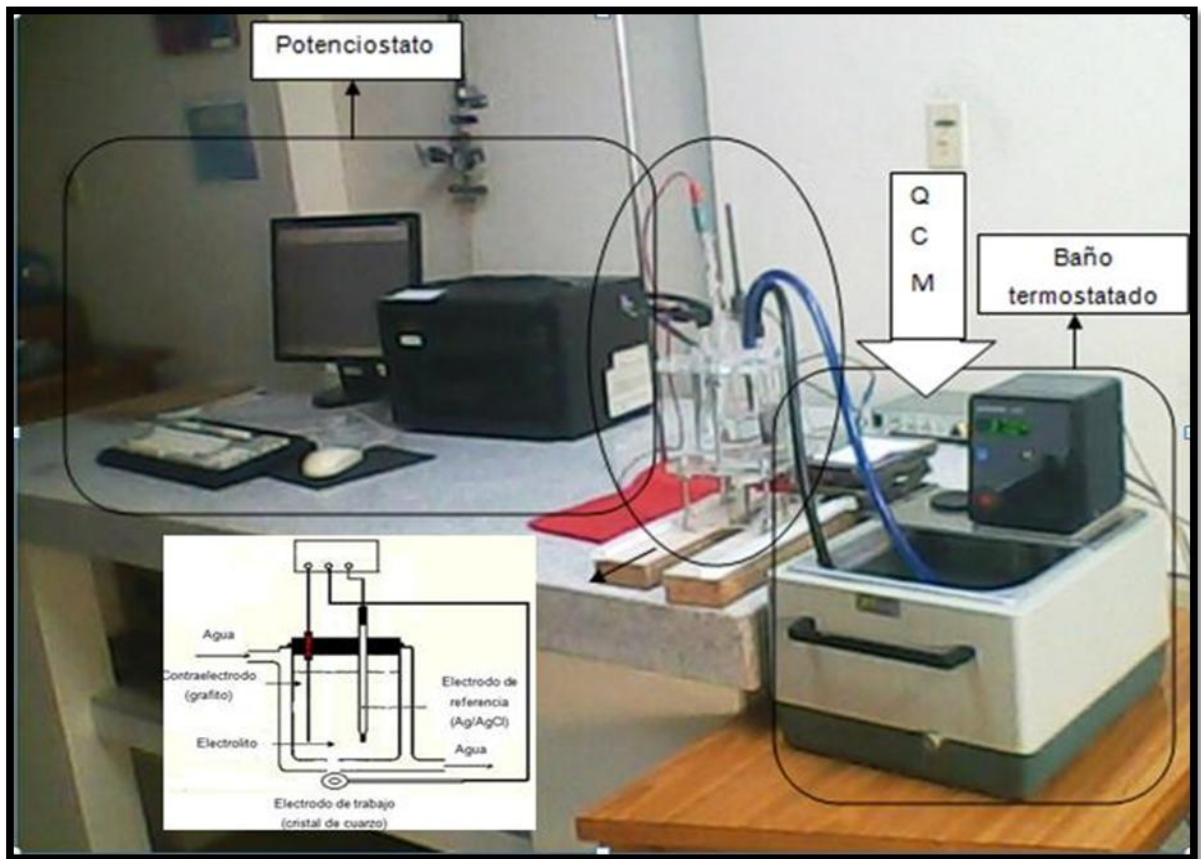


Figura 3. Fotografía y esquema del montaje EQCM.

Para el desarrollo del trabajo, se realizó un diseño de experimentos cuyas variables se muestran en la tabla 2.

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Voltaje (V)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
5	0.15	25
12.5	0.30	37
20	0.45	45

Tabla 2. Variables para el diseño de experimentos.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ANÁLISIS DEL PROCESO DE ADSORCIÓN POR EIS

La técnica de EIS fue empleada para investigar la adsorción de la proteína de BSA y colágeno en el recubrimiento de PLA. Para asegurar la caracterización completa de la interface y los procesos superficiales, las mediciones de EIS fueron realizadas con siete puntos por década, desde 0.01 a 100000 Hz, a un potencial natural de 0.0V y a 0.15, 0.30 y 0.45V. La figura 5 muestra el espectro obtenido para la adsorción de solución para BSA de 20 $\mu\text{g/ml}$ a 45°C, espectros similares fueron obtenidos para las demás concentraciones y temperaturas. La presentación de los datos en forma de espectros de Bode, mostraron claramente la presencia de dos constantes de tiempo, una a alta y otra a baja frecuencia. De acuerdo a esto, se pudo representar el fenómeno de adsorción en polímeros biodegradables con un circuito eléctrico equivalente similar al de un material con recubrimiento poroso, como se muestra en la figura 4. De esta manera, asumiendo la existencia de las dos constantes de tiempo, los datos experimentales fueron ajustados usando el software Zview 2 (los resultados de la simulación se presentan en el anex A).

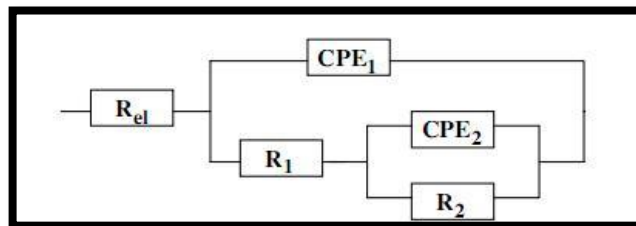


Figura 4. Circuito equivalente.

En este circuito, los elementos eléctricos tienen los siguientes significados: R_{el} es la resistencia del electrolito (PBS + proteína) entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, R_1 es la resistencia de los procesos faradaicos de

degradación en la interfase polímero-solución, la capacitancia representada como un elemento de fase constante a altas frecuencias CPE_1 , R_2 es la suma en serie de la resistencia a la transferencia de carga de la interfase cristal-polímero y la resistencia a la transferencia de carga de adsorción entre el polímero y la proteína en la zona de altas frecuencias, debido a que entre el cristal y el recubrimiento polimérico no existe transferencia de masa, R_2 se puede asumir como la resistencia total a la transferencia de carga de adsorción y CPE_2 es la capacitancia característica de los procesos de carga y de adsorción, que se evidencia a bajas frecuencias. Se realizó un ajuste de los datos obtenidos en las pruebas electroquímicas para determinar los respectivos circuitos equivalentes encontrando buenos ajustes, con porcentajes de error entre 1 y 5% entre los datos experimentales y los ajustados (línea punteada y continua, respectivamente en la Figura 5) en donde se usa un elemento de fase constante (CPE) dependiente de la frecuencia en lugar de una capacitancia pura (C). En general, el uso de CPE es necesario debido a una distribución de los tiempos de relajación como consecuencia de las heterogeneidades presentes a nivel microscópico de la interfaz.

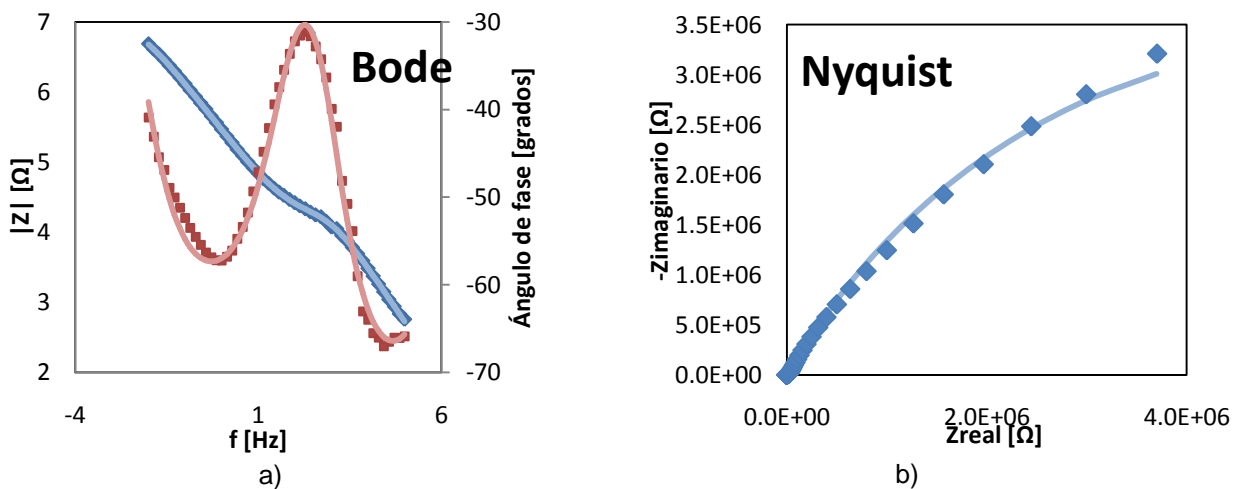


Figura 5. Espectro de adsorción de una solución de BSA de 20 $\mu\text{g/ml}$ a 45°C, a) Diagrama de Bode y b) Diagrama de Nyquist.

R_{ct} se define como una intersección de una curva extrapolada EIS en un diagrama de Nyquist con el eje real

$$R_{ct} = \lim_{f \rightarrow m\acute{a}x} |(Z_f)_{real}| \quad (1)$$

Trabajos realizados anteriormente han mostrado que la resistencia a la transferencia de carga es inversamente proporcional a la masa adsorbida específica en la superficie del electrodo [42-44], por lo tanto, pueden ser utilizadas como una medida de la velocidad de reacción y de la cantidad de proteína adsorbida en la superficie. Como consecuencia se asume el inverso de la resistencia a la transferencia de carga R_{ct}^{-1} , es directamente proporcional a la cantidad de proteína adsorbida, Γ (molcm^{-2}) y a la densidad de carga superficial, Q_{ADS} (Ccm^{-2}), como se muestra en la ecuación (2):

$$\Gamma = \frac{Q_{ADS}}{nF} \quad (2)$$

Para los cálculos en este trabajo se asume que $n=1$ en las dos proteínas.

La adsorción de proteínas puede ser descrita con la ecuación de Langmuir [42, 43, 45] (Ecu. 4) expresa la relación entre la concentración de la proteína, c , y la cantidad de material adsorbido en la superficie:

$$\frac{c}{(R_{ct})^{-1}} = \frac{1}{(R_{ct})^{-1}_{m\acute{a}x}} + \frac{c}{(R_{ct})^{-1}_{m\acute{a}x} B_{ADS}} \quad (3)$$

$$\frac{c}{\Gamma} = \frac{1}{\Gamma_{m\acute{a}x}} + \frac{c}{\Gamma_{m\acute{a}x} B_{ADS}} \quad (4)$$

Donde B_{ADS} es el coeficiente de adsorción y $\Gamma_{m\acute{a}x}$ representa la máxima cantidad de material que se puede adsorber en la superficie. Estos, valores se obtienen del intercepto y la pendiente de la curva de c/Γ contra c , respectivamente. El B_{ADS} está relacionado con la afinidad de la proteína a ser adsorbida en la superficie del electrodo a una temperatura dada. Por lo tanto se puede obtener la energía libre de adsorción como [45]:

$$\Delta G = -RT \ln(55.5 B_{ADS}) \quad (5)$$

En donde 55.5 (dm³/mol) es la concentración molar de la solución acuosa (PBS).

Los resultados mostraron (Figura 6 a, b, c y d), que la adsorción de proteínas (BSA y colágeno) es espontánea a las diferentes temperaturas, mostrando una disminución en el valor de la resistencia a la transferencia de carga al aumentar la concentración de proteína. Los datos calculados se muestran en el anexo B. Resultado que concuerda con la literatura [42, 43]. Por último se realizaron los cálculos del cambio de entropía y de entalpía, como la pendiente y el punto de corte de gráfica ΔG vs T , respectivamente (Tabla 3).

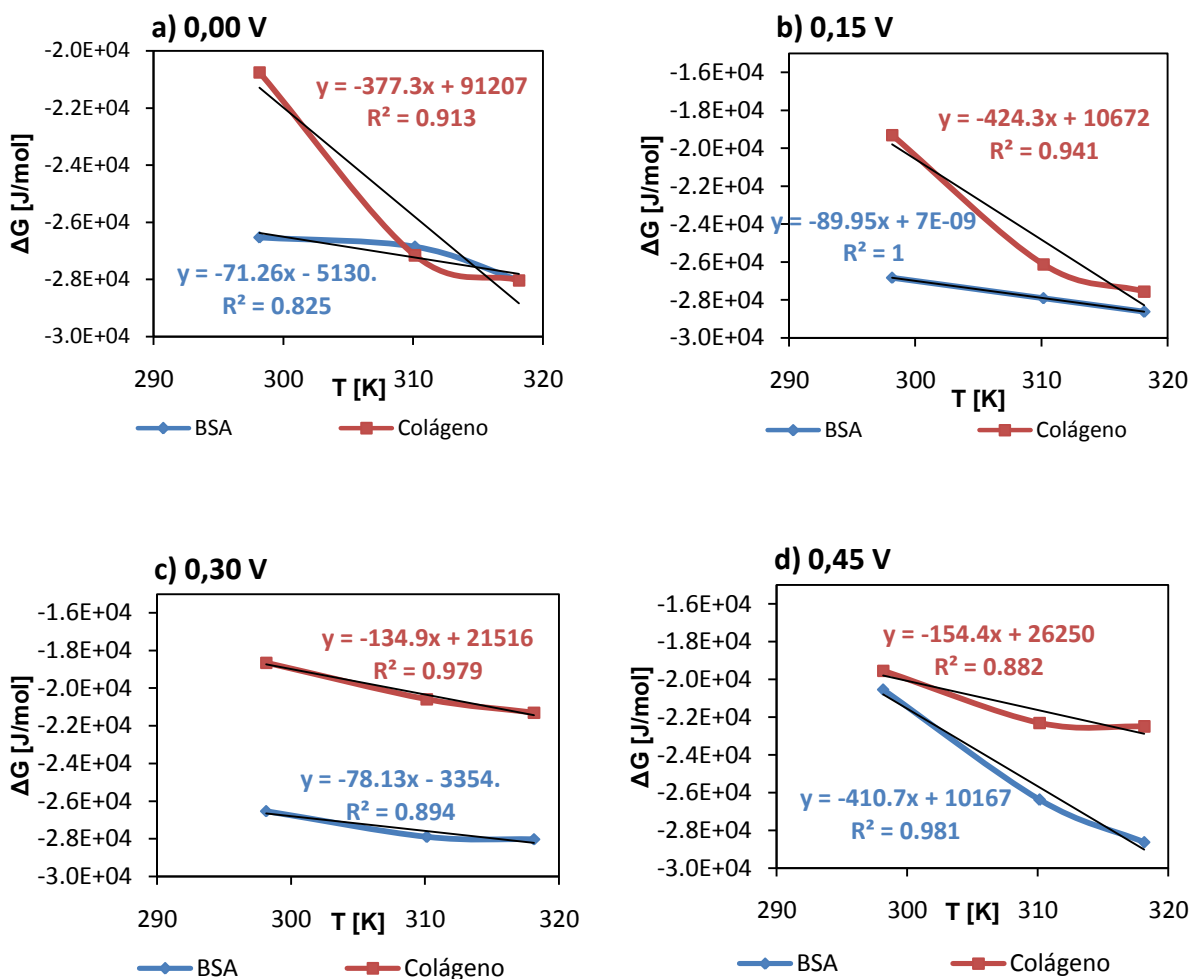


Figura 6. Cambio de energía libre de Gibbs de adsorción con la temperatura obtenidos usando EIS, a) 0,00 V, b) 0,15 V, c) 0,30 V y d) 0,45 V.

En la Tabla 3 se observa la influencia de la irradiación con luz UV como una activación superficial haciendo que la energía libre de Gibbs de adsorción tenga un valor superior a una misma temperatura (25°C).

3.2 ANÁLISIS DEL PROCESO DE ADSORCIÓN POR QCM

La figura 7 muestra la respuesta de cambio de frecuencia vs tiempo, como resultado de la adsorción de BSA a 37°C, en una solución de 20µg/ml, obtenida usando la QCM. Similares respuestas se obtuvieron para las todas las concentraciones, en cuyo gráfico correspondiente se observó una disminución en la pendiente con la disminución en la concentración, de igual forma, para el colágeno. Con base en los cambios de frecuencia en el estado de equilibrio de adsorción, cuando el cambio en masa fue nulo, se calculó la cantidad de proteína adsorbida en la superficie del recubrimiento de PLA usando la ecuación de Sauerbrey:

$$\Delta F = \frac{-2F_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}} \Delta m \quad (6)$$

Donde ΔF es la medición de cambio de frecuencia [Hz], F_0 es la frecuencia de resonancia del modo fundamental microbalanza de cuarzo [Hz], A es el área efectiva del electrodo, ρ_q es la densidad del cuarzo 2.648 [g cm⁻³], μ_q es el módulo de corte del cuarzo [2.947 x 10¹¹ g cm⁻¹ s⁻²], Δm es el cambio de masa [µg], por lo tanto agrupando todos los valores constantes, tenemos que:

$$\Delta F = -C_f \Delta m \quad (7)$$

El factor de sensibilidad para el cristal C_f tiene un valor 56,6 Hz µg⁻¹ cm² para un cristal AT-cut 5 MHz.

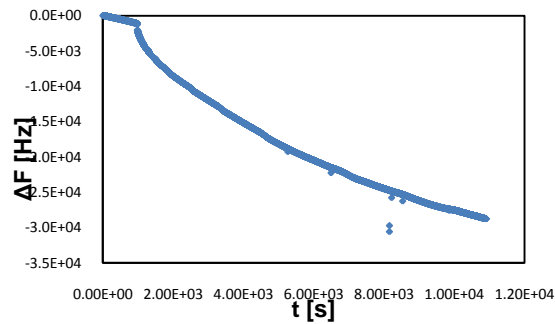


Figura 7. Espectro cambio de frecuencia con respecto al tiempo para una solución de albúmina de suero bovino de 20 $\mu\text{g/ml}$ a 37°C.

Cuando la QCM se emplea en solución acuosa la ecuación (7), no puede ser empleada debido a los efectos de las propiedades interfaciales como la viscosidad, densidad y conductividad [46, 47, 48]. Sin embargo, se conoce que la ecuación (7) puede ser usada para un sistema en condiciones específicas, donde la influencia de los cambios de la viscoelasticidad del polímero son despreciables. En este trabajo, en el cual los tiempos de prueba fueron cortos, alrededor de 1.5 horas de exposición en medio acuoso, se puede asumir que no se presentaron cambios viscoelásticos. En los experimentos, se observó una relación lineal entre el cambio de masa y la frecuencia de la QCM en el aire y en solución acuosa. Esto significó que la ecuación de Sauerbrey pudo ser aplicada en el sistema acuoso de la experimentación.

En consecuencia y basados en los cambios de frecuencia, se calculó la cantidad de proteína adsorbida específicamente en el recubrimiento de PLA Δm [$\mu\text{g/cm}^2$]. Los datos de la QCM, al ser obtenidos simultáneamente con los electroquímicos, también pueden ser tratados usando la isoterma de adsorción de Langmuir. En donde el cambio específico de masa Δm [$\mu\text{g/cm}^2$] se sustituye por Γ , que representa la cantidad de proteína adsorbida por unidad de área y puede ser reemplazado en la ecuación (4):

$$\frac{C}{|\Delta m|} = \frac{1}{|\Delta m_{m\acute{a}x}|} + \frac{C}{|\Delta m_{m\acute{a}x}| B_{ADS}} \quad (8)$$

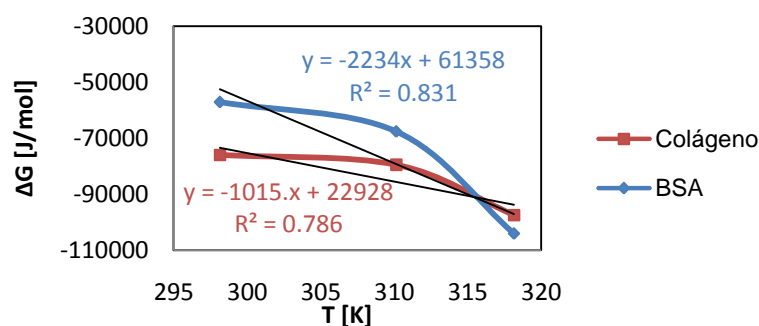


Figura 8. Cambio de energía libre de Gibbs de adsorción con la temperatura obtenidos usando QCM.

Consecuentemente, de la curva de $C/|\Delta m|$ contra la concentración C , se obtuvo una relación lineal de la cual se obtuvieron los valores de B_{ADS} y $|\Delta m_{m\acute{a}x}|$ de la pendiente y de corte, respectivamente. De esta forma se puede realizar los cálculos de ΔG usando la ecuación 5, como se muestra en la figura 8 (cálculos en el anexo B) y los cambios de entalpía y entropía tabla 3.

3.3 COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS TERMODINÁMICOS OBTENIDOS DE LA TÉCNICA EQCM

Tanto de EIS y de QCM se obtuvieron las propiedades termodinámicas, estas propiedades se compararon. Se esperaba una activación superficial al aplicar un voltaje de 0.15V, 0.3V y 0.45V. Un aumento en el ΔG corrobora la hipótesis planteada de la activación, de igual forma se observa una activación superficial en el PLA al ser irradiado con luz ultra violeta.

T [K]	Proteína	0V	0.15V	0.3V	0.45V	QCM
		-ΔG [J/mol]	-ΔG [J/mol]	-ΔG [J/mol]	-ΔG [J/mol]	-ΔG [J/mol]
298,15	BSA	26527.89	26819.86	26527.89	20534.59	57126.58
	COL	20750.92	19304.52	18639.81	19537.11	75917.77
310,15	BSA	26853.78	27899.31	27899.31	21687.66	67673.88
	COL	27157.49	26111.97	20574.19	26853.78	79548.71
318,15	BSA	28028.70	28618.94	28028.70	28618.94	104129.4
	COL	28028.70	27546.45	21294.55	22495.77	97448.61
298,15	BSASIN UV	26266.72	26266.72	26266.72	27271.80	54353.24
	COLSIN UV	25814.78	20161.42	21139.33	20870.34	71476.32

Tabla 3. Datos calculados del cambio de energía libre de Gibbs de adsorción.

Aunque la QCM es una técnica muy sensible, no es selectiva, esta es la razón por la cual se obtienen mayores valores de cambio de energía libre de adsorción, ya que se tienen en cuenta la adsorción de especies no electroactivas, además de la degradación de la superficie polimérica. El proceso de adsorción de albúmina y colágeno se puede esquematizar como se muestra en la figura 9

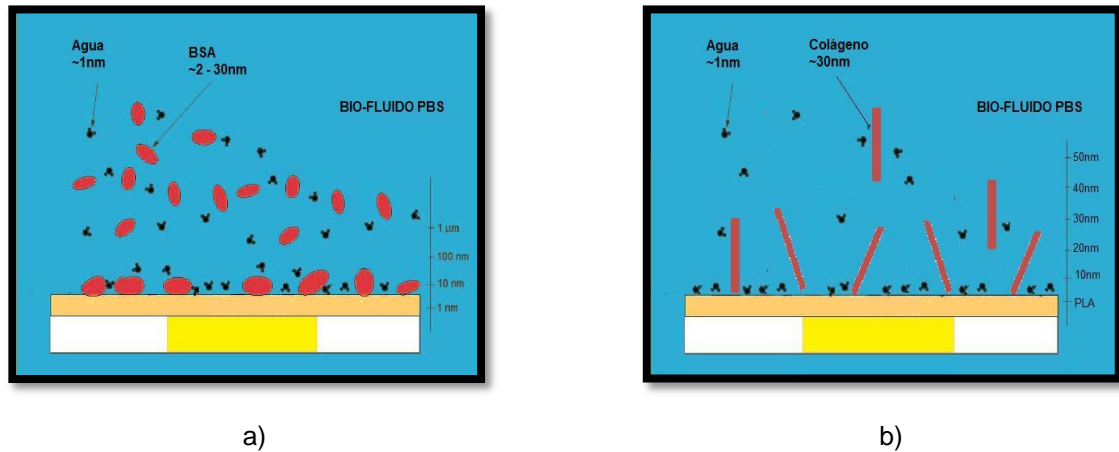


Figura 9. Esquema de adsorción de proteínas: a) Albúmina, b) Colágeno.

Los valores obtenidos de entalpía y entropía concuerdan con la literatura y se muestran en la tabla 4, caracterizado por un proceso endotérmico, resultado de las siguientes contribuciones: cambios en el estado de hidratación de la superficie, asociación/disociación de protones de grupos cargados en la superficie, a la superposición de campos eléctricos, debidos a los voltajes aplicados, a la incorporación de otros iones diferentes a protones en la superficie adsorbida y finalmente a la acomodación de las moléculas de la proteína [51], dando como resultado un proceso de adsorción espontáneo [43, 44, 49, 50]. Sharon G. Roscoe y colaboradores encontraron que la entalpía de adsorción es debida a algunos aspectos del proceso, como desplazamiento del solvente en la superficie del electrodo y a los cambios en la tensión superficial por el estado de hidratación de las proteínas en adición a sus cambios estructurales [51]. Los grandes valores de la entropía se deben a la gran dispersión de proteína en la superficie, favoreciendo la adsorción.

Proteína	0V		0.15V		0.3V		0.45V		QCM	
	ΔH J/mol	ΔS J/molK	ΔH J/mol	ΔS J/molK	ΔH J/mol	ΔS J/molK	ΔH J/mol	ΔS J/molK	ΔH J/mol	ΔS J/molK
BSA	-5130	71.26	-2E-9	89.95	-3354	78.13	99983	404.2	20493	878.9
COL	91207	377.3	10672	424.3	21516	134.9	24569	147.9	14296	302.5

Tabla 4. Datos calculados a partir de la curva de cambio de energía libre de Gibbs con la temperatura.

En la figura 10 se observa la morfología de las películas de PLA en los cristales, con las proteínas de BSA y colágeno inmovilizado sobre su superficie.

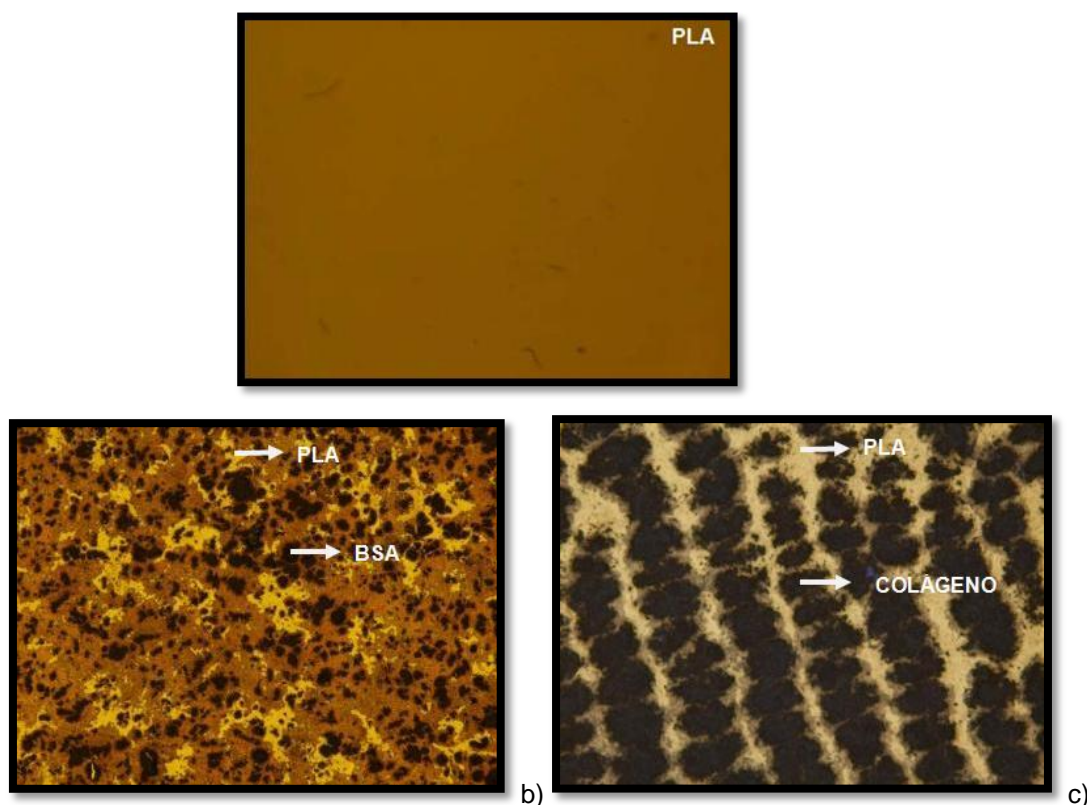


Figura 10. Micrografías de la superficie a 10X a) cristal recubierto con PLA, b) cristal con BSA adsorbida de una solución de 20 μ g/ml en recubrimiento polimérico y c) cristal con Colágeno adsorbido de una solución de 5 μ g/ml en recubrimiento polimérico.

La adsorción de proteína sobre la superficie polimérica, presentó una zona de mayor adsorción de proteína BSA (figura 10.b)), como resultado de la activación superficial. Se observa que la proteína que respondió a la activación direccionada fue la proteína de colágeno.

4. CONCLUSIONES

Las mediciones simultáneas de espectroscopia de impedancia electroquímica y en microbalanza de cristal de cuarzo, permitió establecer que el proceso de adsorción fue descrito por la isoterma de Langmuir. A partir de las micrográficas tomadas, se evidencia que el colágeno adsorbido tuvo un mayor direccionamiento sobre la superficie polimérica activada, debido muy probablemente a su forma helicoidal la cual permite una mejor acomodación e interacción con la superficie que la BSA, cuya forma es esférica [43].

La resistencia a la transferencia de carga es inversamente proporcional a la concentración de proteínas, indicando que la adsorción está acompañada por una transferencia de carga del electrodo a través de los grupos carboxilo en la proteína [42].

La tendencia de los valores de energía de Gibbs de adsorción, muestran que las moléculas de proteína con menor peso molecular (BSA) tienen mayor afinidad con la superficie, por sus mayores valores negativos en la energía de Gibbs. Además de mostrar mayor espontaneidad en los procesos de adsorción de proteína, llevados a cabo a un sobrepotencial de 0.3V.

La tensión superficial del PLA aumenta al activar la superficie de material mediante la adición de un potencial o por irradiación con luz UV, debida al aumento en la energía libre de Gibbs, la cual es directamente proporcional a la tensión superficial. Evidenciando que se puede mejorar la hidrofiliidad y a la vez la biocompatibilidad.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] YOSHITO IKADA. Tissue Engineering, Fundamentals and Applications. ELSEVIER 2006.
- [2] LANGER R. and VACANTI J. P. Tissue engineering. Science 1993; 260 (5110): 920-926.
- [3] FALKE G. F. Y ATALA A. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. Arch Argent Pediatr 2000; 98(2):103-105.
- [4] YANG S.; LEONG K. F.; DU Z. and CHUA C. K. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques. Tissue Eng 2002; 8(1):1-11.
- [5] HARDINGHAM T.; TEW S. and MURDOCH A. Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. Arthritis Res 2002; 4 (Suppl 3):S63-S68.
- [6] SKALAK R. and FOX C. F. Tissue engineering. Granlibakken, Lake Tahoe: Proc workshop; New York:Liss; 1988.
- [7] D. F. WILLIAMS. The Williams Dictionary of Biomaterials, Liverpool University Press, 1999.
- [8] KIM B. S.; BAEZ C.E. and ATALA, A. Biomaterials for tissue engineering. World Journal of Urology. Vol. 18, No.1 (Feb 2000), p. 2-9.
- [9] RODRIGUEZ RUIZ, DANIEL. Obtención de capas de nitruro de titanio mediante tratamiento termoquímico en titanio y Ti6A14V y caracterización de sus propiedades para aplicaciones biomédicas. Scientia et Technica Año XIII, No36, Septiembre de 2007. Universidad Tecnológica de Pereira. ISSN 0122-1701.
- [10] J. L. BRASH, P. W. WOJCIECHOWSKI Interfacial Phenomena and Bioproducts, JL Brash, PW Wojciechowski, eds, Marcel Dekker, 1996.

- [11] J. D. ANDRADE, V. HLADY, A. P. WEI, C. H. HO, A. S. LEA, S. I. JEON, Y. LIN, E. STROUP. Proteins at interfaces: principles, multivariate aspects, protein resistant surfaces, and direct imaging and manipulation of adsorbed proteins, *Clinical Materials* 11 (1992) 67–84.
- [12] D.W. URRY, C. H. LUAN. Proteins at interfaces II, TA Horbett and JL Brash Edition, no. 602 in ACS Symposium series, Washington DC, 1995.
- [13] J. MCGUIRE, M. C. WAHLGREN, T. ARNEBRANDT. Structural stability effects on the adsorption and Dodecyltrimethylammonium Bromide-Mediated, elutability of bacteriophage T4 lysozyme at silica surfaces, *Journal of Colloid and Interface Science* 179 (1995) 182–192.
- [14] W. NORDE. Driving forces for protein adsorption at solid surfaces, *Macromolecular Symposium* 103 (1996) 5–81.
- [15] E. BLOMBERG, P. M. CLAEISSON. Proteins at interfaces II, TA Horbett and JL Brash Edition, no. 602 in ACS Symposium series, Washington DC, 1995.
- [16] J. D. ANDRADE, V. HLADY. In *Advances in polymer science* 79 (1986) 1–63.
- [17] K KADLER, *Protein profile* 1 (1994) 519.
- [18] R. GRINNELL, S. NAGAKAWA and C. H HO, *Exp. Cell Res* 182 (1989) 668.
- [19] T. PETERS JR. *All About Albumin: Biochemistry, Genetic and Medical Applications*, Academic Press, San Diego (1996).
- [20] S.J.MCCLELLAN, E.I. FRANSES. Effect of concentration and denaturation on adsorption and surface tension of bovine serum albumin, *Colloids Surf.B: Biointerfaces* 28 (2003) 63–75.
- [21] N. BRANDES, P.B. WELZEL, C. WERNER, L.W. KROH. Adsorption-induced conformational changes of proteins onto ceramic particles: differential scanning calorimetry and FTIR analysis, *J. Colloid Interface Sci.* 299 (2006) 56–69.

- [22] B.X. HUANG, H.-Y. KIM. Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15 (2004) 1237–1247.
- [23] DENIS FA, PALLANDRE A, NYSTEN B, JONAS AM, DUPONT-GILLAIN CC. Alignment and assembly of adsorbed collagen molecules induced by anisotropic chemical nanopatterns. *Small* 2005;1:984–91.
- [24] EVANS HJ, SWEET JK, PRICE RL, YOST M, GOODWIN RL. Novel 3D culture system for study of cardiac myocyte development. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 2003; 285:H570–8.
- [25] GUO C, KAUFMAN LJ. Flow and magnetic field induced collagen alignment. *Biomaterials* 2007; 28:1105–14.
- [26] LEE P, LIN R, MOON J, LEE LP. Microfluidic alignment of collagen fibers for in vitro cell culture. *Biomedical Microdevices* 2006; 8:35–41.
- [27] SILVER FH, CHRISTIANSEN DL, SNOWHILL PB, CHEN Y. Role of storage on changes in the mechanical properties of tendon and self-assembled collagen fibers. *Connective Tissue Research* 2000; 41:155–64.
- [28] SILVER FH, FREEMAN JW, SEEHRA GP. Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *Journal of Biomechanics* 2003; 36:1529–53.
- [29] TORBET J, RONZIERE MC. Magnetic alignment of collagen during self-assembly. *Biochemical Journal* 1984; 219:1057–9.
- [30] MOSSER G, ANGLO A, HELARY C, BOULIGAND Y, GIRAUD-GUILLE MM. Dense tissue-like collagen matrices formed in cell-free conditions. *Matrix Biology* 2006; 25: 3–13.
- [31] MATTHEWS JA, WNEK GE, SIMPSON DG, BOWLIN GL. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules* 2002; 3:232–8.

- [32] XINGGUO CHENG, UMUT A. GURKAN, CHRISTOPHER J. DEHEN, MICHAEL P. TATE, HUGH W. HILLHOUSE, GARTH J. SIMPSON, OZAN AKKUS. An electrochemical fabrication process for the assembly of anisotropically oriented collagen bundles. *Biomaterials* 29 (2008) 3278–3288.
- [33] A.L. HOOK, N.H. VOELCKER, H. THISSEN. Patterned and switchable surfaces for biomolecular manipulation. *Acta Biomaterialia* (2009).
- [34] FALCONNET D, KOENIG A, ASSI T, TEXTOR M. A combined photolithographic and molecular-assembly approach to produce functional micropatterns for applications in the biosciences. *Adv Funct Mater* 2004; 14:749–56.
- [35] OTSUKA H, HIRANO A, NAGASAKI Y, OKANO T, HORIIKE Y, KATAOKA K. Two-dimensional multiarray formation of hepatocyte spheroids on a microfabricated PEG-brush surface. *ChemBioChem* 2004; 5:850–5.
- [36] MCFARLAND CD, THOMAS CH, DEFILIPPIS C, STEELE JG, HEALY KE. Protein adsorption and cell attachment to patterned surfaces. *J Biomed Mater Res* 2000; 49:200–10.
- [37] PAPAVALIIOU G, SONGPRAWAT P, PEREZ-LUNA V, HAMMES E, MORRIS M, CHIU YC. Et al. Three-dimensional patterning of poly(ethylene glycol) hydrogels through surface-initiated photopolymerization. *Tissue Engineering Part C-Methods* 2008; 14:129–40.
- [38] FLAVIO SANTOS DAMOS, RENATA KELLY MENDES AND LAURO TATSUO KUBOTA. Applications of QCM, EIS and spr in the investigation of surfaces and interfaces for the development of (bio)sensors. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13084-971 Campinas – SP.
- [39] XUEEN JIA, QINGJI XIE, YOUYU ZHANG, AND SHOUZHUO YAO. Simultaneous Quartz Crystal Microbalance – Electrochemical Impedance

Spectroscopy Study on the Adsorption of Antihuman Immunoglobulin G and Its Immunoreaction at Nanomaterial-modified Au Electrode Surfaces. ANALYTICAL SCIENCES JUNE 2007, VOL. 23.

[40] HANS ELWING. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 11 (1998) 255–264.

[41] M.S. JENKINS. Biotechnology and bioengineering, (2004), vol. 88, no3, pp. 392–398.

[42] JENNIFER E.I. WRIGHT, SHARON G. ROSCOE. Electrochemical impedance spectroscopy and quartz crystal nanobalance (EQCN) studies of insulin adsorption on Pt. Journal of Electroanalytical Chemistry 564 (2004) 185–197.

[43] MATTHEW F. SMIECHOWSKI. Electrochemical detection and characterization of proteins. Biosensors and Bioelectronics 22 (2006) 670–677.

[44] SASHA OMANOVIC and SHARON G. ROSCOE. Journal of Colloid and Interface Science 227, 452–460 (2000).

[45] SLOBODAN K. MILONJIĆ. A consideration of the correct calculation of thermodynamic parameters of adsorption. *J. Serb. Chem. Soc.* 72 (12) 1363–1367 (2007).

[46] T. NOMURA, M. IJIMA. Anal. Chim. Acta 131 (1981) 97.

[47] K.K. KANAZAWA, J.G. GORDON. Anal. Chim. 57 (1985) 1770.

[48] S. BRUCKENSTEIN, M. SHAY. Electrochim. Acta 30 (1985) 1295.

[49] SHARON G. ROSCOE. Food Research International, Vol. 30, No. 1. pp. 13–20, 1997.

[50] SHARON G. ROSCOE. Journal of Colloid and Interface Science 184, 449–455 (1996).

[51] NICHOLAS P. COSMAN, KHALID FATIH, SHARON G. ROSCOE. Electrochemical impedance spectroscopy study of the adsorption behaviour of α -lactalbumin and β -casein at stainless steel. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 574 (2005) 261–271.

ANEXOS

ANEXO A
PARÁMETROS DE CIRCUITOS EQUIVALENTES

C [$\mu\text{g/ml}$]	T [°C]	Rs [Ω]	CPE1 [F]	N1	R1 [Ω]	CPE2 [F]	N2	R2 [Ω]
5	25	28.8012	2.3885E-08	0.74	3575.13868	0.00108992	0.804	12938000
	45	168.895	2.2181E-08	0.451	12972.9394	1.059E-05	0.796	15300000
	25 sin uv	43.8384629	9.3136E-08	0.754	106055.016	3.9869E-06	0.65	29600000
	25	27.6602002	1.604E-07	0.715	82761.7848	1.238E-06	0.542	4404512.33
12,5	37	3.61640037	5.0408E-08	0.908	97958.2381	4.6177E-06	0.586	1302485.39
	45	392.088	9.0576E-09	0.393	44319.873	2.6997E-07	0.713	4159814.41
	25 sin uv	439.272	2.669E-08	0.45	943273.158	2.1199E-06	0.317	6570807.45
	25	272.712	4.3105E-08	0.405	11760.1711	6.1342E-06	0.308	163780.88
20	37	49.0160234	1.0333E-08	0.373	8536.1619	0.00011767	0.707	418292.129
	45	291.637	3.9845E-08	0.693	145360.504	5.8214E-07	0.517	865337.854
	25 sin uv	146.805	2.5102E-08	0.857	127847.523	3.5081E-06	0.316	1194180.85

Parámetros de circuitos equivalentes para BSA a 0V.

C [$\mu\text{g/ml}$]	T [°C]	Rs [Ω]	CPE1 [F]	N1	R1 [Ω]	CPE2 [F]	N2	R2 [Ω]
5	25	138.39	1.822E-08	0.759	185130.139	2.3428E-07	0.195	3950596.6
	37	20.7422239	1.9216E-07	0.748	162685.691	1.7418E-07	0.587	12525346.8
	45	2.46534184	4.0818E-07	1	104166.579	1.1575E-06	0.364	7785856.98
	25 sin uv	4.81190242	3.9554E-08	0.746	185564.558	4.5603E-06	0.083	4626528.46
12,5	25	27.6602002	2.5539E-07	0.821	34730.1328	7.0153E-06	0.288	795779.602
	37	131.915555	2.1689E-08	0.649	62472.1053	3.0757E-06	0.407	2641002.67
	45	3.1036815	1.0392E-06	0.688	62086.4836	2.5515E-07	0.452	2229761.27
	25 sin uv	5.74481005	2.3407E-08	0.793	146251.447	4.3394E-07	0.034	1113939.64
20	25	4.71414369	1.8199E-08	0.833	153188.28	5.5043E-08	0.195	339351.542
	37	5.75170703	1.161E-08	0.671	89875.1568	1.9258E-05	0.184	553106.985
	45	88.4953	8.0791E-09	0.599	68208.6178	2.6341E-08	0.409	599368.042
	25 sin uv	5.30625673	4.8462E-07	0.268	97504.6421	7.0885E-06	0.677	306018.664

Parámetros de circuitos equivalentes para colágeno a 0V.

C [µg/ml]	T [°C]	Rs [Ω]	CPE1 [F]	N1	R1 [Ω]	CPE2 [F]	N2	R2 [Ω]
5	25	27.3446	2.4962E-08	0.738	3192.69553	0.00407421	0.879	12253068
	37	18.9569	7.3061E-08	0.873	8305.39242	0.00042691	0.843	5749000
	25 sin uv	49.5671008	8.7741E-08	0.634	74544.888	5.5497E-06	0.492	15146000
	25	21.971278	1.3251E-07	0.655	57441.805	1.2698E-05	0.55	2678376.24
12,5	37	0.24653431	2.7195E-05	0.847	44417.9615	7.5029E-07	0.561	1441163.35
	45	360.391	6.2108E-09	0.289	34460.1139	9.0706E-07	0.679	2771644.37
	25 sin uv	360.769	1.6058E-08	0.728	112027.479	1.9949E-08	0.326	3854287.54
	25	275.171	4.5768E-08	0.431	11856.3242	6.8015E-06	0.351	170957.098
20	37	54.9968829	8.6698E-09	0.334	7220.75332	0.00034512	0.757	268536.161
	45	262.453	3.0629E-08	0.674	82699.9654	2.6653E-06	0.606	441973.387
	25 sin uv	190.808995	1.0324E-08	0.428	24138.5318	6.5614E-07	0.407	606807.248
	25	275.171	4.5768E-08	0.431	11856.3242	6.8015E-06	0.351	170957.098

Parámetros de circuitos equivalentes para BSA a 0.15V.

C [µg/ml]	T [°C]	Rs [Ω]	CPE1 [F]	N1	R1 [Ω]	CPE2 [F]	N2	R2 [Ω]
5	25	195.11	1.9354E-08	0.722	94764.8525	4.1773E-07	0.235	1986500
	37	89.8997	2.9188E-08	0.786	214320.875	1.1312E-06	0.563	5934460
	45	2.19723823	1.5847E-06	0.711	70947.7572	1.1417E-06	0.254	4917270
	25 sin uv	2.64166138	2.5914E-06	0.853	37063.4391	9.3892E-07	0.178	1966842
12,5	25	65.8870653	4.418E-08	0.655	27504.6854	6.6699E-05	0.48	652539.011
	37	139.173101	1.1842E-08	0.516	34513.8115	2.0782E-05	0.452	1344334.3
	45	104.528463	1.0528E-08	0.354	36168.5737	6.866E-07	0.516	1225717
	25 sin uv	3.1036815	8.6232E-07	0.624	33187.0581	9.5433E-07	0.399	628420.128
20	25	117.787	1.8776E-08	0.683	67200.6892	5.0515E-05	0.389	315769.336
	37	255.607	1.033E-08	0.615	47402.2543	6.9266E-05	0.434	493646.732
	45	110.549124	4.5261E-09	0.201	16582.6655	1.9945E-06	0.474	362768.014
	25 sin uv	15.1088	1.8262E-08	0.712	76870.0229	6.8761E-07	0.238	236164.263

Parámetros de circuitos equivalentes para colágeno a 0.15V.

C [µg/ml]	T [°C]	Rs [Ω]	CPE1 [F]	N1	R1 [Ω]	CPE2 [F]	N2	R2 [Ω]
5	25	26.7542	2.7724E-08	0.753	3475.94201	0.00182895	0.842	13000246
	37	18.8814	7.894E-08	0.875	6811.13237	0.00048747	0.835	5946826
	45	119.138	5.6681E-08	0.361	10124.4109	2.5195E-05	0.669	13964682
	25 sin uv	110.55656	1.364E-08	0.471	55083.7706	1.1483E-05	0.53	15224648
12,5	25	34.8959073	9.253E-08	0.689	53774.3724	8.8684E-06	0.573	2945457.5
	37	2.76615905	2.5801E-06	0.859	46066.1149	5.9112E-06	0.467	1385012.46
	45	338.757	1.099E-08	0.43	40362.2631	8.5111E-07	0.661	3806264.14
	25 sin uv	328.341	5.1831E-08	0.704	355481.561	6.5073E-06	0.443	4240138.5
20	25	276.088	7.2265E-08	0.474	12730.1355	9.0044E-06	0.374	142720.383
	37	54.9968829	1.143E-08	0.364	6759.47656	0.00030994	0.734	235754.547
	45	234.185	4.0626E-08	0.735	82565.8738	2.6544E-06	0.623	138255.606
	25 sin uv	179.609441	4.6974E-09	0.249	19615.2567	2.039E-05	0.505	787308.986

Parámetros de circuitos equivalentes para BSA a 0.3V.

C [µg/ml]	T [°C]	Rs [Ω]	CPE1 [F]	N1	R1 [Ω]	CPE2 [F]	N2	R2 [Ω]
5	25	217.04	2.6888E-08	0.803	81701.048	2.0357E-07	0.226	1963795.4
	37	105.581	2.686E-08	0.756	164201.689	1.3713E-06	0.553	4547465.22
	45	1.74532837	2.8685E-06	0.799	60432.0738	6.6137E-06	0.385	3712467.61
	25 sin uv	139.607	7.2694E-08	0.764	146133.101	4.0273E-05	0.255	1943974.69
12,5	25	87.1557427	3.1918E-08	0.639	27592.9773	9.8989E-05	0.697	788965.376
	37	194.832852	1.6575E-08	0.753	43182.0436	2.3478E-06	0.53	1205087.77
	45	241.921896	5.5046E-09	0.401	29646.4639	2.138E-07	0.417	908559.287
	25 sin uv	131.593539	1.1246E-08	0.461	24616.6275	1.7331E-06	0.399	505962.342
20	25	178.147	1.9242E-08	0.741	45462.3627	7.5026E-05	0.538	352630.239
	37	338.955	1.7935E-08	0.753	63181.3321	0.00013305	0.7	480065.791
	45	353.972892	2.9729E-09	0.242	17650.2312	2.1236E-06	0.53	457698.985
	25 sin uv	168.713	1.1838E-08	0.561	51313.9154	6.1739E-05	0.477	106857.598

Parámetros de circuitos equivalentes para colágeno a 0.3V.

C [µg/ml]	T [°C]	Rs [Ω]	CPE1 [F]	N1	R1 [Ω]	CPE2 [F]	N2	R2 [Ω]
5	25	26.0294	2.9886E-08	0.763	1298.50083	9.8653E-05	0.576	3021825.46
	37	18.8905	7.7897E-08	0.876	3524.36214	6.8391E-05	0.584	3899648.78
	45	107.573	4.7207E-08	0.355	11160.3434	2.5296E-05	0.673	14964694.4
	25 sin uv	659.928	8.3021E-09	0.643	44977.1184	1.7312E-06	0.357	8206879.54
12,5	25	19.5819221	2.2421E-07	0.712	30575.2311	1.6398E-06	0.374	863756.499
	37	24.6521793	3.8858E-07	0.868	36394.144	1.5982E-05	0.53	974092.203
	45	328.456	9.2547E-09	0.301	36028.5873	3.0404E-07	0.301	3131147.73
	25 sin uv	283.169	3.7832E-08	0.702	182215.045	8.5282E-07	0.149	1507432.22
20	25	280.224	6.4331E-08	0.413	13450.9635	1.1135E-05	0.413	161342.752
	37	54.9968829	1.0801E-08	0.327	7645.11769	0.00020524	0.735	300578.152
	45	223.562	3.6047E-08	0.677	90830.6408	7.2476E-07	0.527	194751.144
	25 sin uv	265.201159	3.0319E-09	0.212	2714.90722	0.00092014	0.197	13126.3276

Parámetros de circuitos equivalentes para BSA a 0.45V.

C [µg/ml]	T [°C]	Rs [Ω]	CPE1 [F]	N1	R1 [Ω]	CPE2 [F]	N2	R2 [Ω]
5	25	246.841	2.0745E-08	0.724	49445.8513	1.7492E-06	0.07	789343.64
	37	34.8994967	1.0241E-07	0.719	63736.6523	1.8701E-06	0.485	4126097.49
	45	31.1042092	1.125E-07	0.713	22639.4575	9.2453E-08	0.322	597724.448
	25 sin uv	192.332	2.7819E-08	0.718	50955.357	1.3086E-05	0.03	3202397.49
12,5	25	124.260312	2.1725E-08	0.628	8365.71988	4.7647E-05	0.042	217156.983
	45	201.221868	5.8125E-09	0.318	8909.9969	0.0001762	0.563	104355.42
	25 sin uv	304.561622	3.578E-09	0.268	3282.79268	0.0030181	0.677	840830.889
20	25	238.284	1.2985E-08	0.569	25589.7882	5.2961E-05	0.088	98009.0428
	37	329.323	1.4426E-08	0.682	23632.775	2.154E-05	0.168	133246.329
	45	89.7178609	3.6657E-09	0.233	554.489561	8.9646E-07	0.352	1266.99264
	25 sin uv	226.225	1.1284E-08	0.6	25776.6683	1.8922E-05	0.224	120311.464

Parámetros de circuitos equivalentes para colágeno a 0.45V.

ANEXO B

**CÁLCULOS ENERGÍA DE GIBBS APARTIR DE DATOS ELECTROQUÍMICOS Y
DE MICROBALANZA DE CRISTAL DE CUARZO**

T [K]	Proteína	C[ug/ml]	Rct [Ω]	Γ _{máx} [mol/cm ²]	Bads [ml/ug]	-ΔG [J/mol]
298,15	BSA	5ug/ml	12938000	0.00000025	0.044444444	26527.89499
		12.5ug/ml	4404512.329			
		20ug/ml	163780.8799			
	COL	5ug/ml	3950596.6			
		12.5ug/ml	795779.602			
		20ug/ml	339351.5418			
310,15	BSA	5ug/ml	5460000	0.000001	0.033333333	26853.78166
		12.5ug/ml	1302485.395			
		20ug/ml	418292.1287			
	COL	5ug/ml	12525346.8			
		12.5ug/ml	2641002.67			
		20ug/ml	553106.9846			
318,15	BSA	5ug/ml	15300000	0.00000025	0.04	28028.7059
		12.5ug/ml	4159814.412			
		20ug/ml	865337.8544			
	COL	5ug/ml	7785856.983			
		12.5ug/ml	2229761.274			
		20ug/ml	599368.0425			
298,15	BSA SIN IRRADIAR	5ug/ml	29600000	0.000000125	0.04	26266.72534
		12.5ug/ml	6570807.445			
		20ug/ml	1194180.846			
	COL SIN IRRADIAR	5ug/ml	4626528.458			
		12.5ug/ml	1113939.636			
		20ug/ml	306018.6635			

Cálculos del cambio de energía libre de Gibbs 0,00 V.

T [K]	Proteína	C [ug/ml]	Rct [Ω]	Γ _{máx} [mol/cm ²]	Bads [ml/ug]	-ΔG [J/mol]
298,15	BSA	10ug/ml	12253068.00	0.00000025	0.05	26819.85783
		12.5ug/ml	2678376.24			
		20ug/ml	170957.10			
	COL	5ug/ml	1986500.00			
		12.5ug/ml	652539.01			
		20ug/ml	315769.34			
310,15	BSA	5ug/ml	5749000.00	0.0000005	0.05	27899.30876
		12.5ug/ml	1441163.35			
		20ug/ml	268536.16			
	COL	5ug/ml	5934460.00			
		12.5ug/ml	1344334.30			
		20ug/ml	493646.73			
318,15	BSA	5ug/ml	12975740.00	0.00000025	0.05	28618.94271
		12.5ug/ml	2771644.37			
		20ug/ml	441973.39			
	COL	5ug/ml	4917270.00			
		12.5ug/ml	1225717.00			
		20ug/ml	362768.01			
298,15	BSA SIN IRRADIAR	5ug/ml	15146000.00	0.00000025	0.04	26266.72534
		12.5ug/ml	3854287.54			
		20ug/ml	606807.25			
	COL SIN IRRADIAR	5ug/ml	1966842.00			
		12.5ug/ml	628420.13			
		20ug/ml	236164.26			

Cálculos del cambio de energía libre de Gibbs 0,15 V.

T [K]	Proteína	C[ug/ml]	Rct [Ω]	Γ máx [mol/cm ²]	Bads [ml/ug]	-ΔG [J/mol]	
298,15	BSA	10ug/ml	13000246.00	0.00000025	0.044444444	26527.89499	
		12.5ug/ml	2945457.50				
		20ug/ml	142720.38				
	COL	5ug/ml	1963795.40				5.42241E-05
		12.5ug/ml	788965.38				
		20ug/ml	352630.24				
310,15	BSA	5ug/ml	5946826.00	0.00000005	0.05	27899.30876	
		12.5ug/ml	1385012.46				
		20ug/ml	235754.55				
	COL	5ug/ml	4547465.22				1.1419E-05
		12.5ug/ml	1205087.77				
		20ug/ml	480065.79				
318,15	BSA	5ug/ml	13964682.00	0.00000025	0.04	28028.7059	
		12.5ug/ml	3806264.14				
		20ug/ml	138255.61				
	COL	5ug/ml	3712467.61				1.59434E-05
		12.5ug/ml	908559.29				
		20ug/ml	457698.99				
298,15	BSA SIN IRRADIAR	5ug/ml	15224648.00	0.00000025	0.04	26266.72534	
		12.5ug/ml	4240138.50				
		20ug/ml	787308.99				
	COL SIN IRRADIAR	5ug/ml	1943974.69				1.9782E-05
		12.5ug/ml	505962.34				
		20ug/ml	106857.60				

Cálculos del cambio de energía libre de Gibbs 0,30 V.

T [K]	Proteína	C [ug/ml]	Rct [Ω]	Γ máx [mol/cm ²]	Bads [ml/ug]	-ΔG [J/mol]	
298,15	BSA	10ug/ml	3021825.46	1.26239E-05	0.00396075	20534.58989	
		12.5ug/ml	863756.50				
		20ug/ml	161342.75				
	COL	5ug/ml	789343.64				7.55116E-05
		12.5ug/ml	217156.98				
		20ug/ml	98009.04				
310,15	BSA	5ug/ml	3899648.78	1.11221E-05	0.00449555	21687.66008	
		12.5ug/ml	974092.20				
		20ug/ml	300578.15				
	COL	5ug/ml	4126097.49				0.000001
		12.5ug/ml	1150514.68				
		20ug/ml	133246.33				
318,15	BSA	5ug/ml	14964694.40	0.0000002	0.05	28618.94271	
		12.5ug/ml	3131147.73				
		20ug/ml	194751.14				
	COL	5ug/ml	597724.45				5.06201E-05
		12.5ug/ml	104355.42				
		20ug/ml	1266.99				
298,15	BSA SIN IRRADIAR	5ug/ml	8206879.54	3.33333E-07	0.06	27271.79999	
		12.5ug/ml	1507432.22				
		20ug/ml	13126.33				
	COL SIN IRRADIAR	5ug/ml	3202397.49				1.10248E-05
		12.5ug/ml	840830.89				
		20ug/ml	120311.46				

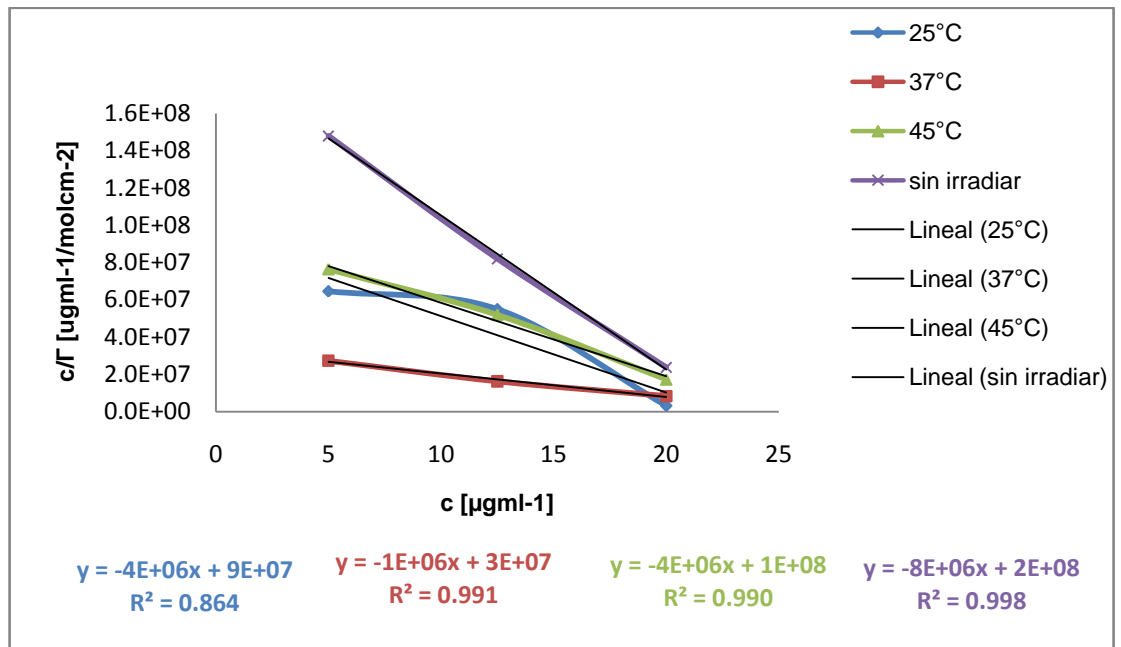
Cálculos del cambio de energía libre de Gibbs 0,45 V.

T [°C]	Proteína	C [ug/ml]	Δm_{prom} [ugcm-2]	Δm_{max} [ugcm-2]	B_{ADS} [ml/ug]	$-\Delta G$ [J/mol]
25	BSA	10ug/ml	388.095238	500.000	10204.082	57126.58
		12.5ug/ml	633.90171			
		20ug/ml	11511.2982			
	COL	5ug/ml	3161.33977	20000.000	20000000	75917.77
		12.5ug/ml	12884.0718			
		20ug/ml	25212.612			
37	BSA	5ug/ml	307.693595	1000.000	250000	67673.88
		12.5ug/ml	2635.3293			
		20ug/ml	36829.4575			
	COL	5ug/ml	4869.64812	25000.000	25000000	79548.71
		12.5ug/ml	17198.2395			
		20ug/ml	39964.1691			
45	BSA	5ug/ml	1535.22585	125000.000	1.25E+11	104129.4
		12.5ug/ml	11887.7896			
		20ug/ml	62238.47			
	COL	5ug/ml	24808.5055	100000.000	1E+10	97448.61
		12.5ug/ml	77367.7272			
		20ug/ml	927367.727			
25 sin irradiar	BSA SIN IRRADIAR	5ug/ml	150.025338	100.000	3333.3333	54353.24
		12.5ug/ml	495.733722			
		20ug/ml	1553.07453			
	COL SIN IRRADIAR	5ug/ml	1536.21978	33333.333	3333333.3	71476.32
		12.5ug/ml	4310.04527			
		20ug/ml	11140.7746			

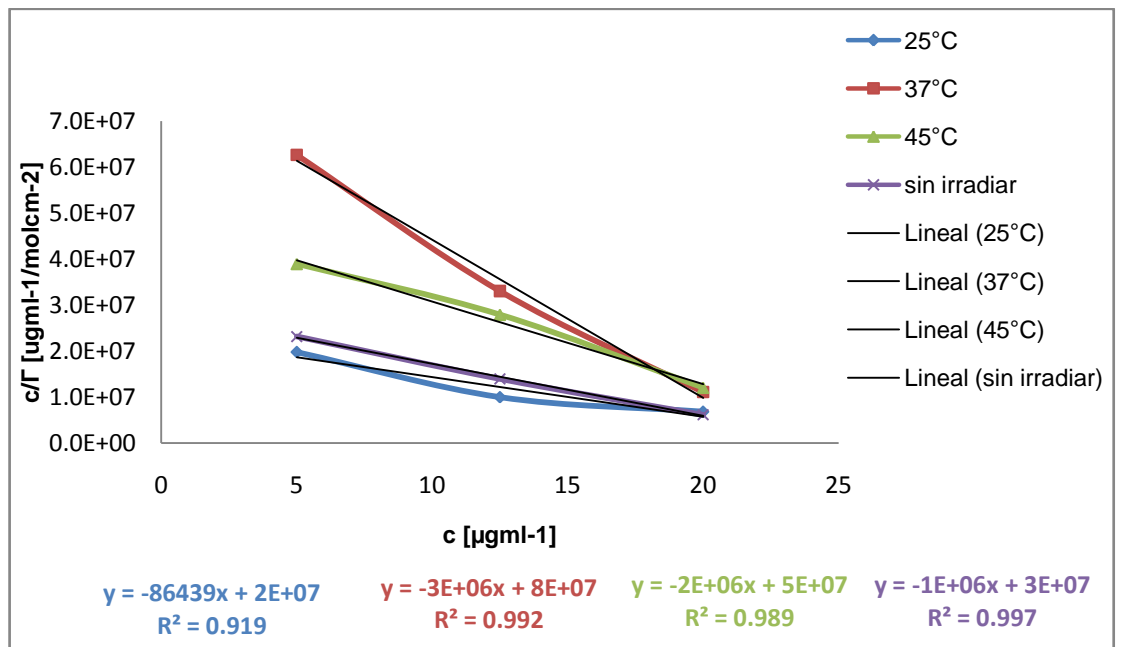
Cálculos del cambio de energía libre de Gibbs usando QCM.

ANEXO C

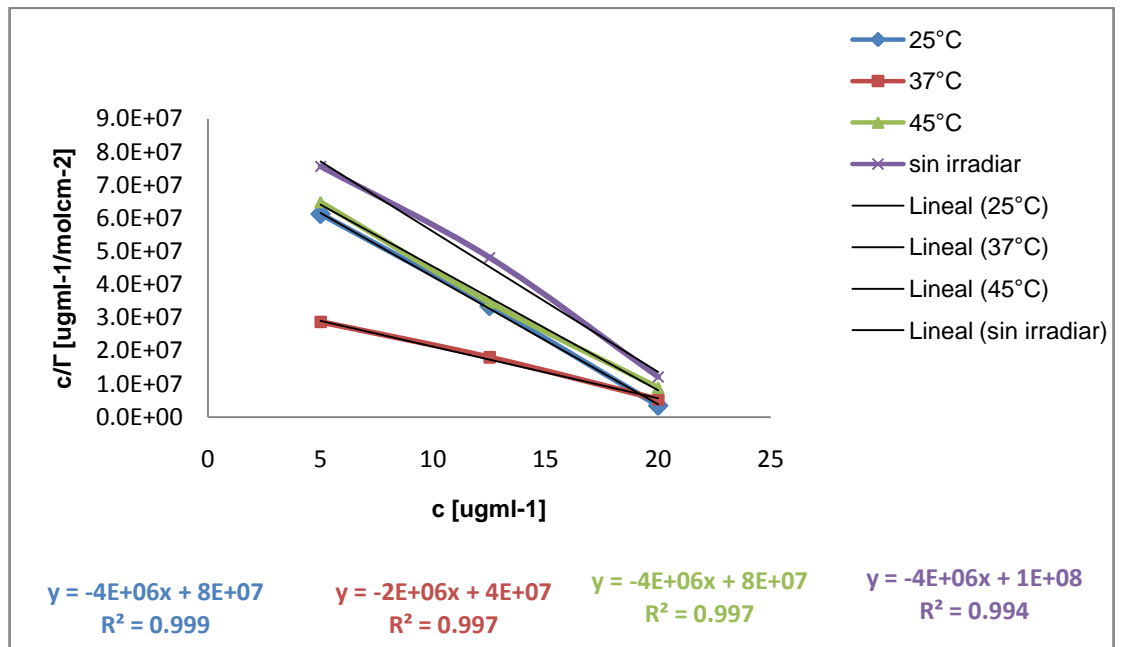
ISOTERMAS DE LANGMUIR APARTIR DE MEDICIONES ELECTROQUIMICAS Y DE MICROBALANZA DE CIRSTAL DE CUARZO



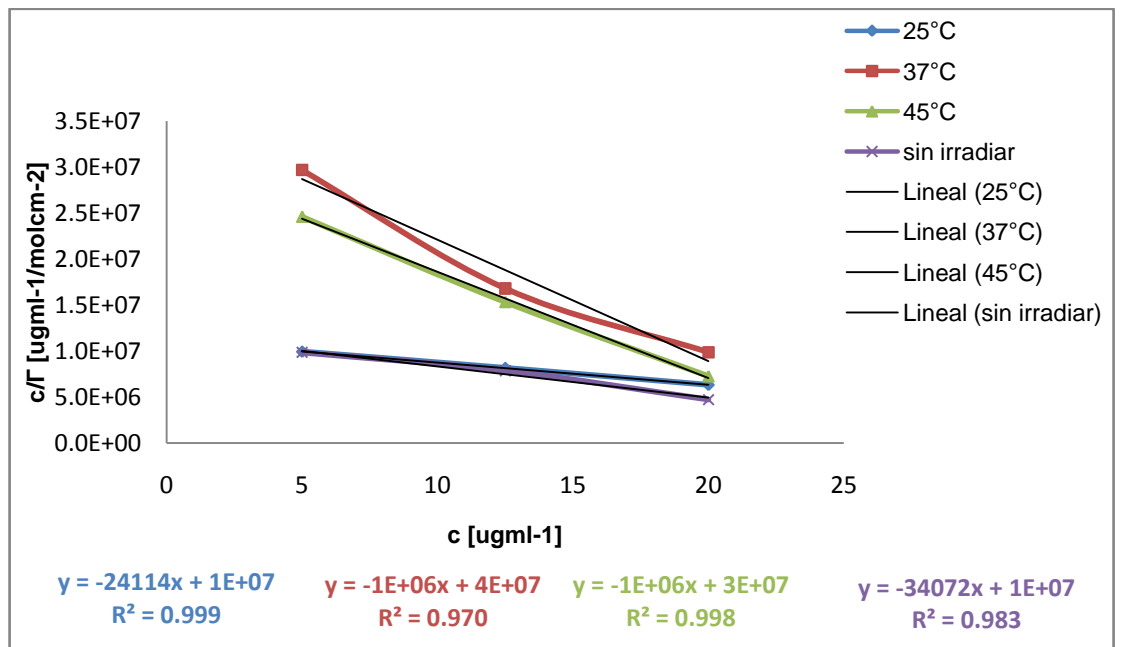
Isoterma de Langmuir para adsorción de BSA a un potencial natural de 0V.



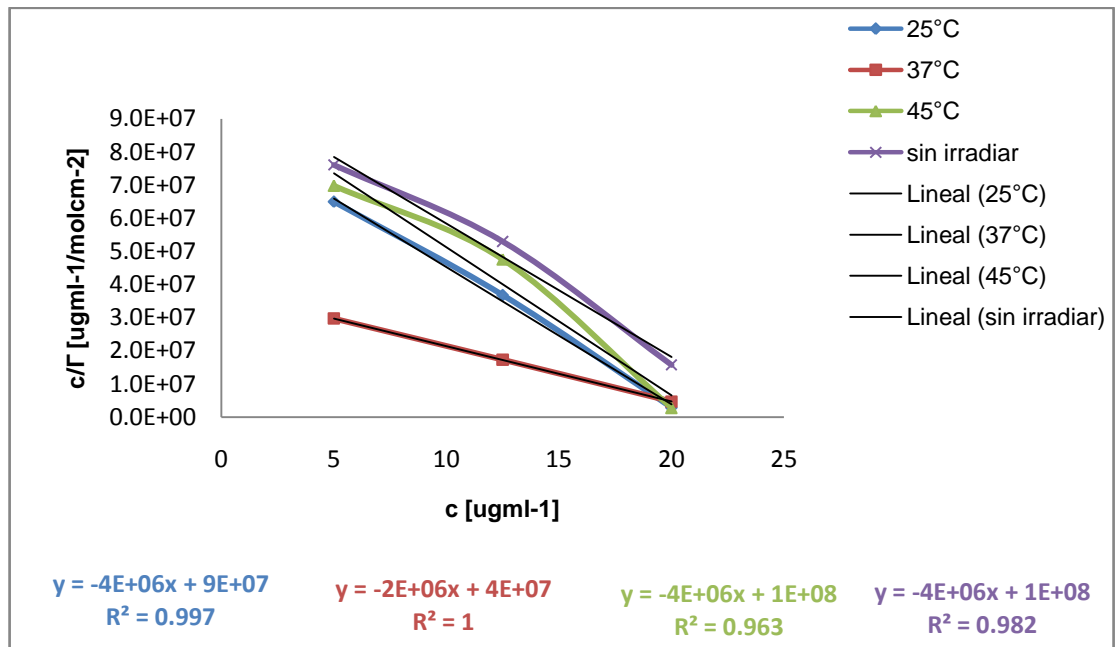
Isoterma de Langmuir para adsorción de Colágeno a un potencial natural de 0V.



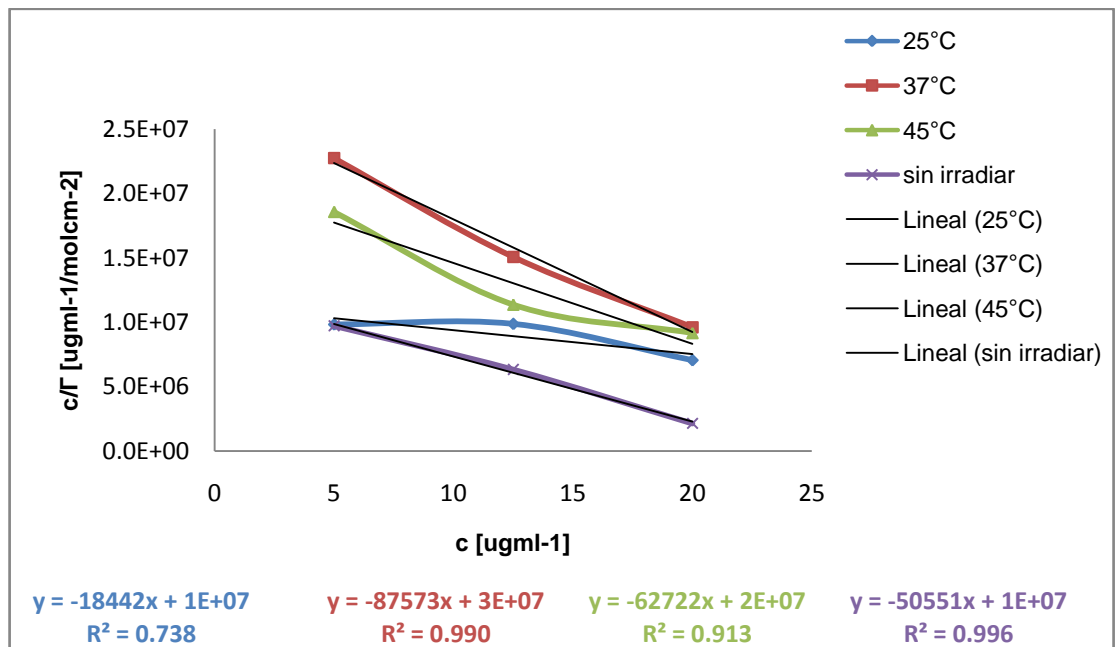
Isoterma de Langmuir para adsorción de BSA a un potencial natural de 0.15V.



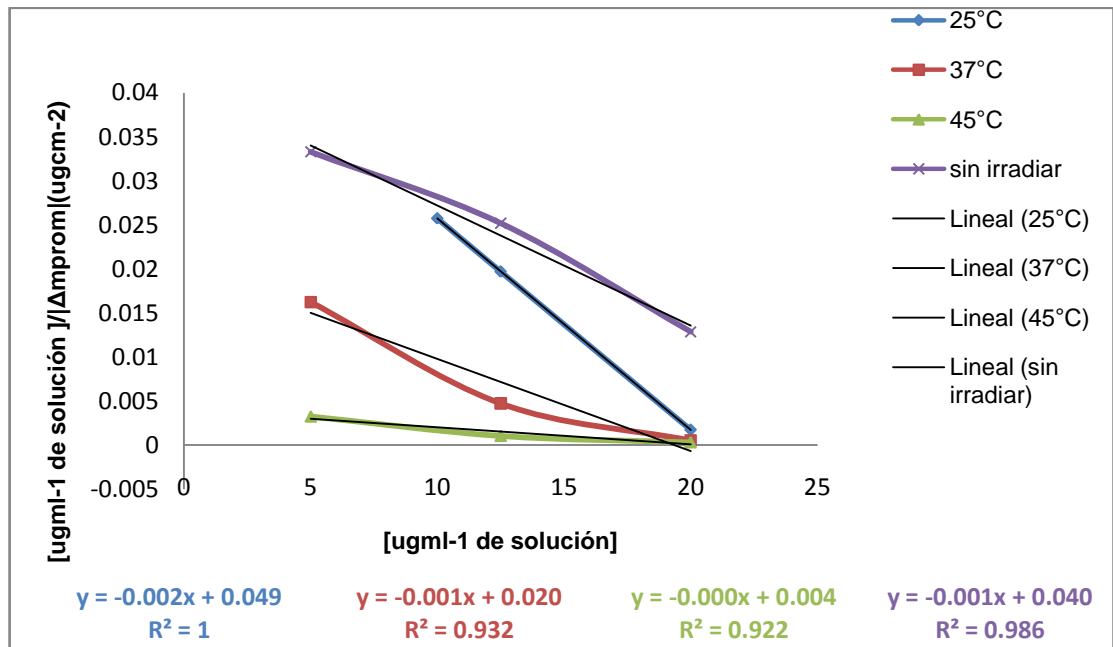
Isoterma de Langmuir para adsorción de Colágeno a un potencial natural de 0.15V.



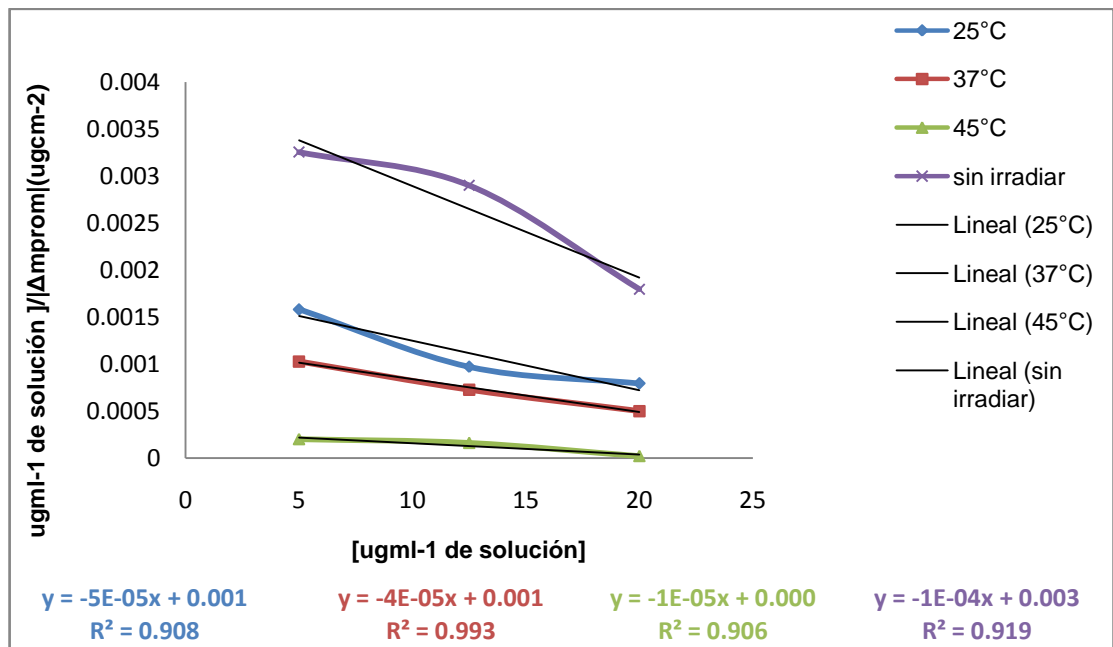
Isoterma de Langmuir para adsorción de BSA a un potencial natural de 0.3V.



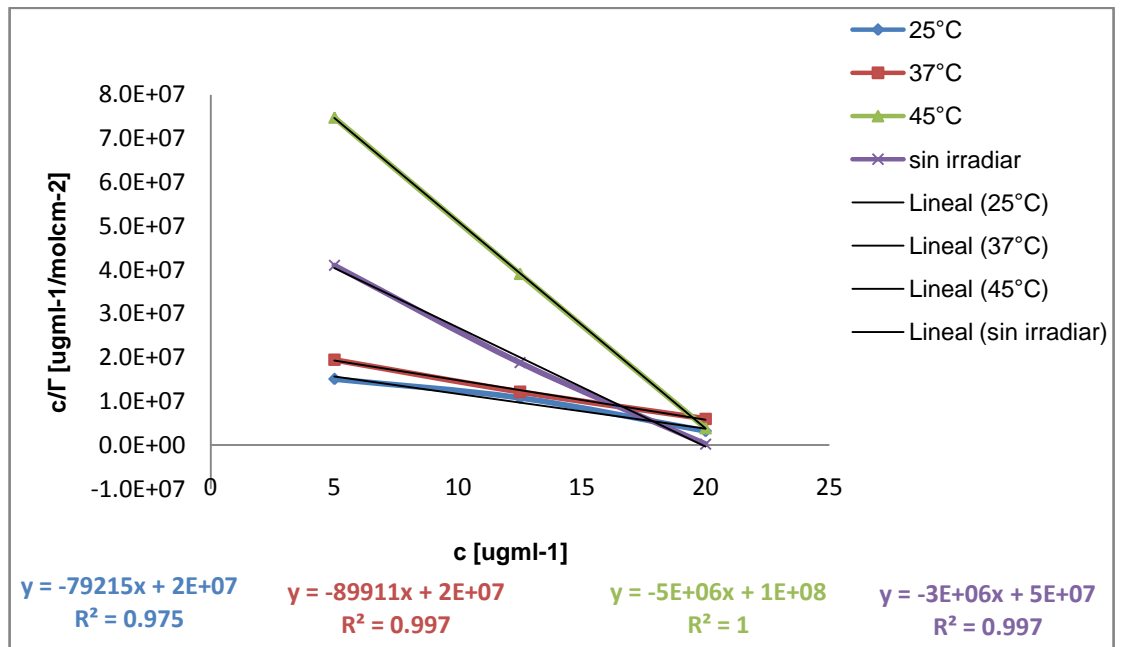
Isoterma de Langmuir para adsorción de Colágeno a un potencial natural de 0.3V.



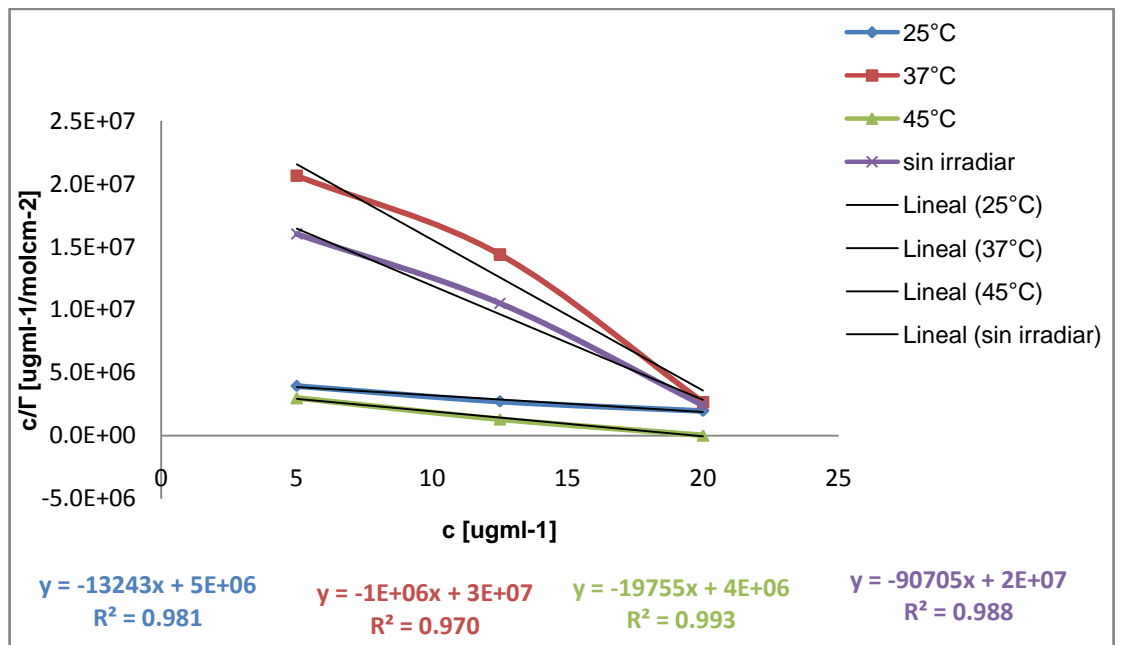
Isoterma de Langmuir para adsorción de BSA a un potencial natural de 0.45V.



Isoterma de Langmuir para adsorción de Colágeno a un potencial natural de 0.45V.



Isoterma de Langmuir para adsorción de BSA medido por microbalanza de cristal de cuarzo.



Isoterma de Langmuir para adsorción de Colágeno medido por microbalanza de cristal de cuarzo.