

**ESTUDIO MICROGRAVIMÉTRICO DEL COMPORTAMIENTO FISICOQUÍMICO
SUPERFICIAL DE PLA/PLG/HAP Y PLA/PLG/BIOVIDRIO MODIFICADOS CON
POLISACÁRIDO, EN PRESENCIA DE PROTEÍNAS**

DIANA CAROLINA PARADA QUINAYÁ



**FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA METALÚRGICA Y CIENCIA DE MATERIALES
MAESTRÍA EN INGENIERÍA DE MATERIALES
BUCARAMANGA
2011**

**ESTUDIO MICROGRAVIMÉTRICO DEL COMPORTAMIENTO FISICOQUÍMICO
SUPERFICIAL DE PLA/PLG/HAP Y PLA/PLG/BIOVIDRIO MODIFICADOS CON
POLISACÁRIDO, EN PRESENCIA DE PROTEÍNAS**

DIANA CAROLINA PARADA QUINAYÁ

Trabajo de investigación para optar el título de
Magíster en Ingeniería de Materiales

DIRECTOR
DARÍO YESID PEÑA BALLESTEROS
Ph.D en Corrosión

**FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA METALÚRGICA Y CIENCIA DE MATERIALES
MAESTRÍA EN INGENIERÍA DE MATERIALES
BUCARAMANGA**

2011

*Dedicado a Nhurt Quinayá y Marco Tulio Parada.
No hay palabras para expresar mi gratitud
por su apoyo incondicional.*

AGRADECIMIENTOS

En este espacio quisiera expresar mi agradecimiento a las personas que de un modo u otro contribuyeron con el desarrollo de esta tesis tanto con sus aportes como por su apoyo.

Primero que todo a los profesores Darío Yesid Peña y Custodio Vásquez por la confianza que depositaron en mi al brindarme la oportunidad de trabajar en el GIC y porque sus aportes y su guía fueron de gran ayuda durante estos años.

A los integrantes del Grupo de Investigaciones en Corrosión GIC con quienes compartí durante estos años. Por su amistad, por compartir sus experiencias conmigo, por su ayuda desinteresada y su apoyo ante cada dificultad presentada. A Paola Reyes, Nerly Montañez, Laura Quiroz, Carlos Mejía, Carlos Mauricio Ordoñez, Laura Gómez, Adriana Córdoba, Oscar Morales y a todos los estudiantes que tuve la oportunidad de conocer en el laboratorio.

A los compañeros de la maestría, especialmente a Ludy Margarita Cáceres por su compañía y el ánimo cuando las fuerzas decaían y a Clara López por su apoyo. Junto con los diseñadores industriales Lucho Laguado, Vaslak Rojas, Alirio Pinilla, Orlando Angulo, Germán Díaz, Juan Carlos Daza y los ingenieros metalúrgicos Jan Ender Pradilla y Julián Herrera; por los ratos de esparcimiento y de reflexión.

A los profesores Franklin Jaramillo y Gustavo Neira por sus aportes y sugerencias.

Al profesor Arturo Plata por su tiempo, buena disposición y contribución en este trabajo.

A mi compañera del GIC, Nerly Montañez por la síntesis del biovidrio utilizado durante esta investigación.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	15
1 MARCO TEÓRICO.....	17
1.1 BIOMATERIALES.....	17
1.1.1 Materiales Semi-inertes.....	17
1.1.2 Materiales Bioactivos.....	18
1.1.3 Materiales biodegradables.....	18
1.2 POLÍMEROS UTILIZADOS COMO BIOMATERIALES.....	19
1.2.1 Ácido Poliláctico (PLA).....	20
1.2.2 Ácido Poliglicólico (PLG).....	20
1.3 MATERIALES CERÁMICOS.....	21
1.3.1 Hidroxiapatita (HAP).....	22
1.3.2 Biovidrio (BV).....	22
1.4 PROTEÍNAS.....	23
1.4.1 Albumina de Suero Bovino (ASB).....	23
1.4.2 Colágeno.....	23
1.5 QUITOSANO.....	24
1.6 MODIFICACIÓN SUPERFICIAL.....	25
1.7 BIOADHESIÓN.....	26
1.8 PROTEÍNAS EN INTERFASES.....	32
1.9 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA (EIE).....	35
1.10MICROGRAVIMETRÍA.....	36
1.10.1 Microbalanza Electroquímica de Cristal de Cuarzo, EQCM.....	38
2 ESTADO DEL ARTE.....	41
3 OBJETIVOS.....	50
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	50
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
4 HIPÓTESIS.....	51

5	DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	52
5.1	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	52
5.2	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	53
5.2.1	Obtención y caracterización de materiales poliméricos	54
5.2.2	Obtención y Caracterización de Material Cerámico.....	57
5.2.3	Obtención de materiales compuestos PLA/PLG/BV, PLA/PLG/HAP	58
5.2.4	Modificación de materiales compuestos.....	59
5.2.5	Obtención de recubrimientos sobre cristales de cuarzo piezoeléctrico.....	59
5.2.6	Caracterización y evaluación superficial de recubrimientos.....	61
5.2.7	Medición de ángulos de contacto	63
5.2.8	Ensayos de adsorción de proteínas	64
6	DISCUSIÓN GENERAL Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	67
6.1	CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES POLIMÉRICOS	67
6.1.1	Caracterización de ácido poliláctico (PLA)	67
6.1.2	Caracterización de ácido poliglicólico (PLG)	69
6.1.3	Caracterización de PLA/PLG	70
6.1.4	Caracterización de hidroxiapatita (HAP)	72
6.2	CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE RECUBRIMIENTOS.....	74
6.2.1	Dureza.....	74
6.2.2	Microscopía óptica	74
6.2.3	Mediciones electroquímicas	80
6.2.4	Determinación de los ángulos de contacto.....	83
6.3	ADSORCIÓN SUPERFICIAL DE ASB Y COLÁGENO SOBRE RECUBRIMIENTOS COMPUESTOS Y MODIFICADOS.....	86
6.3.1	Mediciones de adhesión por EQCM.....	87
6.3.2	Representación del proceso de adsorción proteínica a la isoterma de Langmuir	94
6.3.3	Energía de adsorción de Gibbs a partir de parámetros electroquímicos	99
7	CONCLUSIONES.....	103
8	RECOMENDACIONES	105
9	BIBLIOGRAFÍA.....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Quitosano (a) Apariencia física (b) Estructura molecular.....	24
Figura 2. Interacción de la superficie de un material posterior al momento del implante .	25
Figura 3. Equilibrio de las fuerzas de tensión y ángulo de contacto.	29
Figura 4. Esquema del proceso de adsorción sobre la superficie de un sustrato sólido. ...	33
Figura 5. Microbalanza de cristal de cuarzo QCM200.....	36
Figura 6. Esquema típico de un cristal de cuarzo piezoeléctrico	37
Figura 7. Representación esquemática del montaje para la EQCM.	39
Figura 8. Esquema de la metodología	52
Figura 9. Esquema de materiales obtenidos.	53
Figura 10. Etapas en el proceso de obtención de ácido poliláctico (PLA).	54
Figura 11. Montaje para la reacción de policondensación de ácido poliláctico.	55
Figura 12. Montaje para la reacción de policondensación de ácido polilglucólico.....	56
Figura 13. Montaje utilizado para la realización de ensayos.	62
Figura 14. Montaje de holder y cristal de cuarzo piezoeléctrico.	63
Figura 15. Montaje de pruebas colorimétricas.....	66
Figura 16. Espectro FTIR de material polimérico obtenido (PLA).....	68
Figura 17. Termograma de DSC para el material polimérico obtenido (PLA).	69
Figura 18. Espectro FTIR de material polimérico PLG sintetizado	70
Figura 19. Termograma de DSC para el material polimérico obtenido (PLG).....	70
Figura 20. Espectro FTIR de material obtenido (PLA/PLG). Dopado con 1,5% Zn.....	71
Figura 21. Diagrama de difracción de rayos X del material cerámico obtenido.	72
Figura 22. Espectro FTIR de hidroxiapatita obtenida.	73
Figura 23. Microscopia óptica del recubrimiento PLA.....	75
Figura 24. Microscopia óptica del recubrimiento PLA, en PBS por 5 horas.....	76
Figura 25. Microscopia óptica del recubrimiento PLA/PLG a 100x	77
Figura 26. Microscopia óptica del recubrimiento PLA/PLG/HAP..	77
Figura 27. Microscopia óptica del recubrimiento PLA/PLG/HAP.	78
Figura 28. Microscopia óptica del recubrimiento PLA/PLG/HAP. 4 horas en PBS.....	79
Figura 29. Microscopia óptica del recubrimiento PLA/PLG/HAP/Q a 10X.	79
Figura 30. Variación de la capacitancia con el tiempo ($C = 1/ 2\pi f Z$)	81

Figura 31. Espectro de Bode, cristal de cuarzo en solución PBS.....	82
Figura 32. Graficas de Arrhenius para ASB usando un electrodo de oro en PBS	82
Figura 33. Variación de la frecuencia de resonancia del cristal de cuarzo	87
Figura 34. Variación de la resistencia con el tiempo	88
Figura 35. Δf para diferentes concentraciones de ASB.	89
Figura 36. Ganancia de masa sobre el electrodo durante la adsorción de ASB.....	89
Figura 37. Δf para adsorción de ASB sobre PLA/PLG/HAP/Quitano.	90
Figura 38. Espectros de impedancia realizados con concentración de 0,05 g/l ASB. (a) Diagrama de Nyquist. (b), Diagrama de Bode.....	91
Figura 39. Modelo de circuito equivalente propuesto	92
Figura 40. Dependencia de cR_{tc} con la concentración de proteína. Isotermas de Langmuir presentadas en su forma linealizada.....	95
Figura 41. Isotermas de adsorción de ASB sobre recubrimientos poliméricos.	96
Figura 42. Isotermas de adsorción de colágeno sobre recubrimientos poliméricos.....	96
Figura 43. Dependencia de la cantidad adsorbida máxima de ASB con la temperatura...	97
Figura 44. Dependencia de la cantidad adsorbida máxima de colágeno con la temperatura.	98
Figura 45. Energía de adsorción de Gibbs Vs Temperatura. Adsorción de ASB.....	100
Figura 46. Energía de adsorción de Gibbs Vs Temperatura. Adsorción de colágeno....	101

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de operación electrodeposición sobre cristales.....	60
Tabla 2. Reactivos utilizados en la preparación de la solución buffer de fosfatos	64
Tabla 3. Grupos funcionales de PLA obtenido	68
Tabla 4. Grupos funcionales de PLA/PLG obtenido	71
Tabla 5. Fases cristalinas presentes en HAP obtenida	73
Tabla 6. Valores promedio de la medición de dureza tipo Shore D.....	74
Tabla 7. Parámetros de mojabilidad para los materiales sin modificación de quitosano...	84
Tabla 8. Parámetros de mojabilidad para PLA/PLG/BV con quitosano.	85
Tabla 9. Parámetros de mojabilidad para PLA/PLG/HAP modificado con de quitosano...	85

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I. Curva de Calibración BSA	115
ANEXO II. Caracterización Biovidrio (BV).....	117
ANEXO III. Isotermas de Langmuir para adsorción de ASB (forma linealizada).....	118
ANEXO IV. Isotermas de Langmuir para adsorción de colágeno (forma linealizada).	119
ANEXO V. Isotermas de ASB adsorbida sobre recubrimientos poliméricos.	120
ANEXO VI. Isotermas de colágeno adsorbido sobre recubrimientos poliméricos.	121
ANEXO VII. Parámetros termodinámicos Adsorción de proteínas	122

RESUMEN

TÍTULO:

ESTUDIO MICROGRAVIMÉTRICO DEL COMPORTAMIENTO FISCOQUÍMICO SUPERFICIAL DE PLA/PLG/HAP Y PLA/PLG/BIOVIDRIO MODIFICADOS CON POLISACÁRIDO, EN PRESENCIA DE PROTEÍNAS[§]

AUTOR: Ing. DIANA CAROLINA PARADA QUINAYÁ*

PALABRAS CLAVES:

POLILÁCTICO, POLIGLICÓLICO, MATERIALES COMPUESTOS, ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS, QUITOSANO, HIDROXIAPATITA (HA), BIOVIDRIO, CIRCUITOS EQUIVALENTES.

DESCRIPCIÓN

La modificación superficial de biomateriales constituye un área de investigación de gran importancia dado que se puede mejorar la biocompatibilidad de un material, promoviendo la activación de los mecanismos fisiológicos relacionados con la adhesión y proliferación celular, y así garantizar un mayor reconocimiento por parte del organismo.

La presente tesis está enfocada al estudio de la superficie de un biomaterial conformado por dos polímeros biodegradables: ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PLG), reforzados mediante la adición de fases cerámicas tanto de hidroxiapatita (HA) como de biovidrio (BV), interactuando con proteínas (albúmina de suero bovino, colágeno), en un ambiente que simula condiciones fisiológicas (PBS), así mismo, la respuesta ante la modificación superficial del material realizada con un polisacárido (quitosano), con el fin de mejorar sus propiedades de biocompatibilidad y mojabilidad. Se concluyó que la modificación de los materiales compuestos con quitosano mejoró las propiedades superficiales, lo cual se reflejó en un aumento en la cantidad de proteína adherida. Adicionalmente, se encontró que la interacción hidroxiapatita-quitosano con recubrimientos biodegradables presentó mejores propiedades superficiales de adhesión que la de biovidrio-quitosano. Los resultados de cantidad de proteína adsorbida se ajustaron adecuadamente a un modelo monocapa adsorbida de acuerdo con la isoterma de Langmuir y el comportamiento electroquímico de los recubrimientos fue representado satisfactoriamente mediante un circuito equivalente en el cual se representaron las interfases (electrolito PBS / monocapa proteínica / recubrimiento poroso / Cristal de cuarzo), relacionando la impedancia total del sistema con la cantidad de proteína adsorbida.

[§] Tesis de maestría en Ingeniería de Materiales.

*Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Metalúrgica. Director: Ph.D Darío Yesid Peña Ballesteros.

ABSTRACT

TITLE: MICROGRAVIMETRIC STUDY OF PHYSICOCHEMICAL BEHAVIOR SURFACE PLA / PLG/HAP AND PLA/PLG/BIOGLASS MODIFIED WITH POLYSACCHARIDE IN THE PRESENCE OF PROTEINS[§]

AUTHOR: Ing. DIANA CAROLINA PARADA QUINAYÁ^{**}

KEY WORDS:

POLYLACTIC POLYGLYCOLIC, COMPOSITE MATERIALS, PROTEIN ADSORPTION, CHITOSAN, HYDROXYAPATITE (HA), BIOGLASS, EQUIVALENT CIRCUITS.

DESCRIPTION

The surface modification of biomaterials is a research area of great importance since it can improve the biocompatibility of a material, promoting activation of the physiological mechanisms related to cell adhesion and proliferation, thereby ensuring greater recognition by the body.

This thesis focuses on the study of the surface of a biomaterial composed of two biodegradable polymers: polylactic acid (PLA) and polyglycolic acid (PLG), reinforced by the addition of ceramic phases of both hydroxyapatite (HA) and bioglass (BV), upon interaction with proteins (BSA, Collagen) in an environment that simulates physiological conditions and the response to surface modification of material made with a polysaccharide (chitosan) to improve their biocompatibility and wettability properties. The modification of the composites with chitosan, improved surface properties which was reflected in an increase in the amount of protein attached. Additionally, we found that the interaction with hydroxyapatite - chitosan biodegradable coatings exhibited better adhesion surface properties of bioglass - chitosan. The results of adsorbed protein amount was adjusted appropriately to an adsorbed monolayer model according to the Langmuir isotherm and the electrochemical behavior of the coatings was successfully represented by an equivalent circuit which represented the interfaces (electrolyte PBS / protein monolayer / porous coating / quartz glass), relating the total impedance of the system with the amount of protein adsorbed.

[§] Master's Thesis Materials Engineering.

^{*} Faculty of Physical and Chemical Engineering. School of Metallurgical Engineering . Directress: Ph.D Darío Yesid Peña Ballesteros.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales estímulos que dio lugar a los avances en la ciencia de los biomateriales durante las dos últimas décadas, ha sido la necesidad de desarrollar implantes ortopédicos con características adecuadas y adaptación al ambiente biológico al que van a ser expuestos.

En la sociedad actual se requiere todo tipo de implantes, y estos cada vez son más necesarios como consecuencia de problemas articulares, lesiones causadas por accidentes de tráfico y por la guerra, entre otras. Debido a la creciente demanda, desde la década de 1950 se viene investigando sobre biomateriales, sustancias no farmacológicas apropiadas para su inclusión en sistemas que potencian o sustituyen las funciones de los órganos y tejidos corporales.

Sin embargo, algunos materiales utilizados para la fabricación de prótesis en el campo quirúrgico actualmente presentan algunos inconvenientes en la adhesión, fijación y compatibilidad con los procesos de adaptación del organismo; lo cual puede traer resultados indeseados a largo plazo, como el aflojamiento de las prótesis al momento de la intervención quirúrgica o más adelante, debido a la insuficiente respuesta biológica del material, es decir, la baja oseointegración entre el material y el tejido que limita el crecimiento celular y por lo tanto la regeneración de los tejidos. Lo anterior tiene como consecuencia problemas en la recuperación de los pacientes y en algunos casos la necesidad de una segunda intervención quirúrgica para la extracción del implante.

Dentro de este contexto, la investigación juega un papel fundamental en el desarrollo de nuevos materiales y la modificación de los existentes para la elaboración de implantes, que tengan la posibilidad de recuperar el buen estado de los tejidos de una forma más rápida y confiable, y con menos efectos secundarios.

Posterior al momento del implante, es la superficie del biomaterial la que entra en contacto directo con el medio fisiológico, por esta razón se requiere analizar el comportamiento fisicoquímico superficial y las interacciones entre el medio fisiológico y el material, mediante un estudio de sus propiedades y características superficiales que determine la aceptación del material en el organismo. El contacto entre el material y los tejidos vivos, y la naturaleza de este contacto, es el principal factor en la determinación de su biocompatibilidad, ya que el primer proceso biológico que ocurre en las etapas iniciales es la adsorción de proteínas, y de este proceso depende la respuesta celular y la integración del material con el tejido.

El estudio microgravimétrico mediante el uso de la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), permite monitorear interacciones biomoleculares en tiempo real y detectar ganancias de masa del orden de microgramos sobre la superficie de películas de diversos materiales. Por otro lado, la posibilidad de sincronizar los resultados de QCM con mediciones de impedancia electroquímica provee información adicional sobre los cambios en las propiedades eléctricas superficiales de biomateriales a medida que se lleva a cabo la adsorción de proteínas, así como información sobre el cambio de las características interfaciales.

1 MARCO TEÓRICO

1.1 BIOMATERIALES

Los biomateriales se definen como sustancias o combinaciones de sustancias de origen natural o sintético; diseñados para actuar interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de sustituir algún tejido, órgano o función del organismo humano ^[1,2]. Aunque la biocompatibilidad de un material depende de diversos factores, es la superficie química del biomaterial la que determina su respuesta biológica en el cuerpo.^[3] Los fluidos biológicos corporales contienen proteínas que interactúan con la superficie del biomaterial como un paso de mediación para las células y las interacciones de los tejidos.^[4] Algunos materiales al ser implantados en el cuerpo tienen la capacidad de reaccionar bioquímicamente de diferentes maneras, según la respuesta que inducen en el tejido circundante pueden clasificarse en:

1.1.1 Materiales Semi-inertes.

Considerados muy poco reactivos debido a que son poco solubles cuando están dentro del cuerpo humano. La reacción fisiológica que toma lugar en los alrededores de una prótesis hecha de este tipo de materiales es la formación de cápsulas de tejido fibroso entre el tejido circundante y la superficie del implante. Entre los materiales casi inertes están cerámicas como la alúmina (Al_2O_3) y el

zirconio y metales como el acero inoxidable. Las cerámicas semi-inertes pueden ser utilizadas en forma densa o porosa, para facilitar el crecimiento óseo entre los poros del implante, lo que confiere una fijación mecánica del mismo ^[2].

1.1.2 Materiales Bioactivos.

Este tipo de materiales permiten una respuesta biológica específica en su interfase, formando enlaces químicos entre el material y el tejido que lo rodea. El requisito de un material para ser bioactivo es la habilidad para formar o inducir la formación de apatita sobre su superficie luego de estar en contacto con el tejido óseo en el cuerpo. De modo que el implante hecho de un material bioactivo es enlazado al hueso a través de esta capa de apatita intermedia. Dentro de éste grupo de materiales pueden distinguirse dos categorías muy amplias: los vidrios bioactivos, y las cerámicas basadas en hidroxiapatita (HA), $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ y otros fosfatos de calcio; estos últimos tienen una estructura similar al hueso, por lo que se considera un material totalmente Biocompatible ^[5].

1.1.3 Materiales biodegradables.

Los polímeros biodegradables están subdivididos en:

- Bioerodibles, que se descomponen en el cuerpo dejando algunos fragmentos que pueden o no pueden abandonar el cuerpo.
- Bioabsorbibles, también llamados reabsorbibles, tienen la capacidad de ser compatibles con el tejido y de degradarse cierto tiempo después de ser

implantados; dando lugar a productos que no son tóxicos y pueden ser eliminados por el organismo o metabolizados por éste como poliésteres y poliaminoácidos, que son completamente metabolizados y resintetizados a proteínas o eliminados del cuerpo.

También existen materiales cerámicos reabsorbibles ^[6,7] los cuales después de ser implantados son reabsorbidos y reemplazados paulatinamente por el tejido óseo. Sin embargo, esto implica una correlación entre la velocidad de reabsorción de la cerámica y la velocidad de regeneración del hueso. En este grupo se encuentran el sulfato cálcico y algunos fosfatos de calcio ^[8].

1.2 POLÍMEROS UTILIZADOS COMO BIOMATERIALES

El desarrollo de los polímeros biodegradables a principios de los años 60 ha sido de gran interés en el ámbito ortopédico. Estos, ya sean naturales o sintéticos, se han utilizado en numerosas aplicaciones como biomateriales en la fabricación de dispositivos médicos que incluyen, tanto implantes degradables como implantes a largo plazo. ^[9,10] En comparación con otros materiales, el uso de polímeros en aplicaciones médicas ha aumentado considerablemente; debido principalmente a su amplia gama de propiedades químicas, físicas y mecánicas, su procesamiento sencillo por una variedad de técnicas diferentes y su disponibilidad en diferentes formas ^[11]. Sin embargo, a pesar de las grandes ventajas que los polímeros biodegradables representan, éstos carecen de propiedades mecánicas suficientes

para aplicaciones en las cuales se precisa soportar altas cargas como ocurre en la mayoría de aplicaciones ortopédicas ^[12].

1.2.1 Ácido Poliláctico (PLA)

Es un polímero semicristalino, termoplástico y biodegradable basado en ácido láctico que como biomaterial ha demostrado su capacidad de permitir el crecimiento controlado del tejido biológico durante su biodegradación. El PLA puede hidrolizarse fácilmente a ácido láctico, mediante un proceso de degradación hidrolítica. Debido a que el ácido láctico es un intermediario común en el metabolismo de los carbohidratos en nuestro organismo, el uso de PLA es aceptado desde el punto de vista toxicológico. ^[12] El punto de fusión del ácido poliláctico es de aproximadamente 174 -184°C. Si el polímero consiste solo en el isómero L, se conoce como ácido poli (L-láctico), PLLA, que se usa comúnmente en los implantes ortopédicos y es un polímero semicristalino (grado de cristalinidad del 37%), debido principalmente a su estereoregularidad, tiene alta resistencia a la tensión y baja elongación, y consecuentemente tiene un módulo de Young elevado, lo que hace al polímero muy adecuado para aplicaciones que tienen que soportar una carga, como son las suturas y fijaciones ortopédicas. ^[13-16]

1.2.2 Ácido Poliglicólico (PLG)

Es un poliéster lineal biodegradable, alifático, hidrofílico y de cristalinidad elevada (46-52 %). Se caracteriza por un punto de fusión elevado y una temperatura de transición vítrea relativamente baja. En lo que respecta a las propiedades

mecánicas, se puede considerar que el PLG es un polímero tenaz y poco flexible. El ácido poliglicólico es de gran interés por su amplia gama de aplicaciones en el campo de la medicina, se utiliza principalmente como material de implantes o suturas biodegradables, como dispositivo de fijación ósea en forma de varillas, planchas o tornillos, como implante para sustituir fragmentos óseos o como sistema de liberación de medicamentos. Los implantes a base de este compuesto están constituidos por microfibrillas orientadas con alternancia de fases cristalinas y fases amorfas.

1.3 MATERIALES CERÁMICOS

Los materiales cerámicos son aquellos constituidos por compuestos inorgánicos no metálicos formados a partir de la unión de elementos metálicos con elementos no metálicos por medio de enlaces iónicos y covalentes. Desde hace más de 20 años comenzaron los estudios relacionados con la aplicación de cerámicos como biomateriales, debido a que estos son los más parecidos al componente mineral del tejido óseo, lo que les confiere buena compatibilidad y capacidad de osteointegración ^[16]. Los biomateriales cerámicos en su mayoría son óxidos metálicos, razón por la cual presentan muy baja corrosión en el medio biológico y poseen una gran dureza que los hace resistentes a la fricción y el desgaste. Sin embargo, su aplicación en áreas que deben soportar cargas representa un problema difícil de resolver, dado que son rígidas y quebradizas ^[15].

1.3.1 Hidroxiapatita (HAP)

La hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), es una apatita con una relación molar Ca/P igual a 1,67. Desde el punto de vista biológico, presenta algunas ventajas, como la ausencia de reacción inflamatoria o reacción ante la presencia de cuerpos extraños al ser implantada. Además, este fosfato de calcio es el principal componente mineral del tejido óseo por lo cual su uso como material de fabricación o recubrimiento de prótesis permite obtener una mayor oseointegración entre el hueso y la prótesis implantada ^[17]. La similitud de esta cerámica con la fracción mineral del hueso es la causa de la reacción bioquímica positiva en la interfase cerámica-hueso, ya que la HAP se comporta como una estructura osteoconductiva que permite ser invadida por tejido conectivo proveniente del hueso circundante para posteriormente osificarse, manteniendo en su interior las características de su origen ^[5].

1.3.2 Biovidrio (BV)

Los llamados biovidrios, han ocupado un lugar importante en el área de la medicina regenerativa ósea. La característica principal de estos materiales es que desarrollan en su superficie una capa biológicamente activa de hidroxiapatita carbonatada (HCA), la cual provee la interfase de unión con el tejido. Estos materiales reaccionan en contacto con el fluido formando una especie de gel hidratado en la superficie el cual es rico en iones Ca y P. La cristalización de esta capa conlleva a la formación de apatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3$) y por lo tanto a la unión con el hueso. La capa formada en la superficie del implante es similar tanto química

como estructuralmente a la fase mineral del hueso, y es por esto que se da la unión interfacial hueso-implante^[18].

1.4 PROTEÍNAS

1.4.1 Albumina de Suero Bovino (ASB)

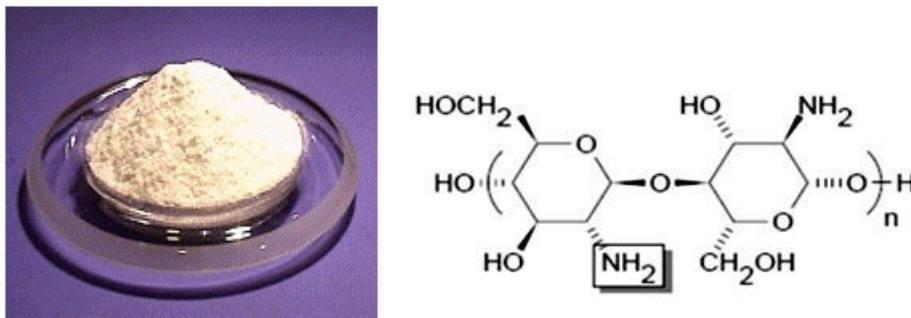
La albúmina es una proteína de origen animal, es la proteína más abundante en el plasma y está conformada por una larga cadena de 585 aminoácidos con 17 puentes disulfuro entrecruzados en su molécula que forman una estructura compleja tridimensional que le da características químicas necesaria para la distribución correcta de los líquidos corporales entre el compartimento intravascular y el extravascular, localizado entre los tejidos.

1.4.2 Colágeno

El colágeno tipo I es uno de los componente de la piel, huesos, tendones, y otros tejidos conectivos fibrosos. El colágeno tipo I se diferencia de otros por la hidroxilación de la lisina y su composición baja en carbohidratos. A pesar de los diferentes tipos de colágeno existentes, todos son compuestos de moléculas que contienen tres cadenas de polipéptidos dispuestos en una conformación helicoidal triple con pequeñas diferencias en su estructura primaria^[17].

1.5 QUITOSANO

El quitosano (figura 1) es un polisacárido catiónico de origen natural, extraído por procesos químicos del caparazón de crustáceos. Por su estructura y propiedades en medios hidratados, resulta muy interesante como material para diversas aplicaciones biomédicas ^[18]. Es conocido como un material biodegradable biocompatible, y no tóxico y ha sido usado extensamente en investigación farmacéutica e industrial para el transporte y liberación de fármacos y como material biomédico. Las prótesis cubiertas con este polisacárido son capaces de producir la colonización por células, ya que promueve la osteogénesis y la oseointegración.



Todas estas interesantes características conducen al desarrollo de numerosas aplicaciones del quitosano en biomedicina, tales como hilos de sutura, esponjas y vendas biodegradables, matrices (en microesferas, microcápsulas, membranas y tabletas comprimidas) para dosificación de fármacos, en ortopedia y en estomatología, entre otros ^[19-21]. El quitosano es soluble en soluciones acuosas de

varios ácidos, pero sus moléculas no pueden formar micelas en agua. Aparte de su carácter biodegradable en condiciones fisiológicas, el quitosano tiene grupos reactivos amina e hidroxilo, que ofrecen posibilidades de modificación, reacciones de injerto e interacciones iónicas [22].

1.6 MODIFICACIÓN SUPERFICIAL

En la comprensión de los fenómenos y mecanismos involucrados en las interacciones de un biomaterial con el medio biológico juegan un papel muy importante la superficie de los biomateriales y sus características interfaciales. Por ello, la modificación superficial de biomateriales puede mejorar la biocompatibilidad de un material o dispositivo sin alterar sus propiedades en masa, buscando un mayor control de sus características superficiales [23].

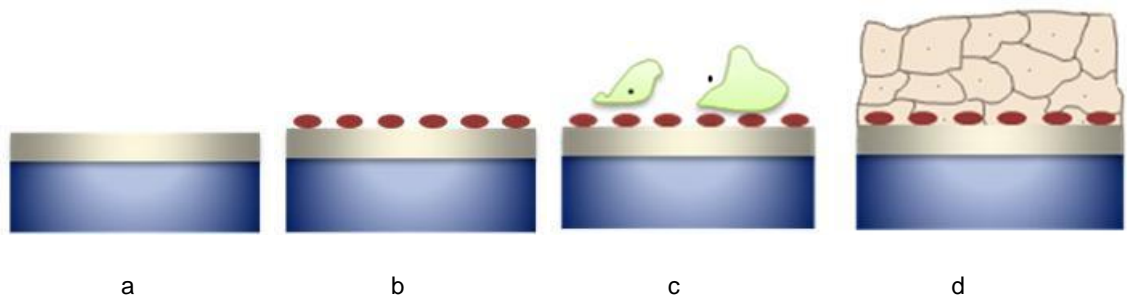


Figura 2. Interacción de la superficie de un material posterior al momento del implante (a) Superficie, (b) Adsorción de biomoléculas, (c) Interacción celular, (d) Integración con el tejido.

Cuando un biomaterial está en contacto con una célula, tejido, sangre u otros fluidos biológicos, es la superficie del material la que entra en contacto con el medio ambiente fisiológico (figura 2). En general, el primer proceso fisiológico que

se produce en las etapas iniciales de la exposición, es la adsorción de biomoléculas en la superficie y esto puede ser seguido por interacciones celulares.

Hay diferentes parámetros que caracterizan una superficie: la composición química, la cristalinidad, la heterogeneidad, la rugosidad y la mojabilidad, todos ellos son de mucha importancia para la respuesta biológica. Además, el área de contacto entre el material y los tejidos afecta la adsorción de las proteínas en el material ^[3]. Una gran variedad de métodos de modificación son empleados generalmente para aumentar o disminuir propiedades tales como la hidrofobicidad de la superficie, la carga iónica, la adsorción de moléculas, la adhesión de microorganismos, la permeación de moléculas, la cinética química o biológica, la rugosidad, las impurezas y las propiedades eléctricas entre otras.^[24] Algunos de los métodos usados son: sol-gel, plasma, recubrimientos, láser, fotolitografía, bombardeo de iones, deposición química en fase vapor, deposición física de vapor, entre otras.

1.7 BIOADHESIÓN

El término bioadhesión es utilizado para describir un fenómeno que se relaciona con la capacidad de algunas macromoléculas sintéticas o biológicas de adherirse a tejidos biológicos. Este proceso sólo tiene lugar en presencia de agua. Para que un material posea una capacidad adhesiva apropiada debe tener algunas características:

- Grupos funcionales capaces de formar enlaces tipo puente de hidrógeno (-OH, -COOH)
- Cargas aniónicas
- Cadenas poliméricas con elasticidad suficiente
- Alto peso molecular

Para entender los mecanismos que explican la bioadhesión a partir del comportamiento de los materiales en la interfase, existen diferentes teorías relacionadas con el comportamiento de las interfases polímero–sustrato biológico. Para estudiar la bioadhesión, estas teorías pueden clasificarse de acuerdo con el mecanismo químico o físico de la interacción.

La *Teoría mecánica* establece que el fenómeno se debe al anclaje del adhesivo en los poros y oquedades superficiales del sustrato, que proveen un aumento de área superficial y al endurecerse se fijan a múltiples sitios de anclaje. La *Teoría de fractura* relaciona las fuerzas de adhesión con la fuerza necesaria para separar las dos superficies adheridas. Se utiliza para explicar el comportamiento bioadhesivo de polímeros rígidos.

La *Teoría electrónica* se fundamenta en que el sistema adhesivo–sustrato se comporta como un condensador, que se carga por contacto entre los dos materiales. La separación de las partes, como una interfase de ruptura, da lugar a

una separación de carga y a una diferencia de potencial que aumenta hasta que ocurre la descarga. La interpretación en el comportamiento bioadhesivo establece que tanto el polímero como el tejido sustrato presentan diferente estructura electrónica, la cual da lugar a una doble capa con carga eléctrica localizada en la interfase entre el bioadhesivo y el tejido. Las fuerzas de atracción electrostática se deben a la transferencia de electrones, entre las glicoproteínas del tejido biológico y el material bioadhesivo, lo cual induce atracciones electrostáticas entre las dos superficies.

La *Teoría de adsorción* explica la bioadhesión en términos del desarrollo de fuerzas superficiales que generan uniones químicas entre el polímero y el sustrato como enlaces covalentes y enlaces iónicos o fuerzas débiles como puentes de hidrógeno y del tipo Van der Waals. De acuerdo con este modelo, la adhesión se produce cuando el adhesivo moja al sustrato. Para cuantificar esta capacidad se miden los ángulos de contacto (θ) de diversos líquidos patrón sobre la superficie del sustrato. A partir de los valores de ángulo de contacto se puede calcular la energía de superficie del sustrato o trabajo de bioadhesión (W_{SL}), mediante la ecuación de Neuman:

$$W_{SL} = \gamma_{GL}(1 + \cos\theta_{SL}) \quad [1]$$

γ_{GL} es la tensión superficial del líquido, la capacidad óptima para mojar se consigue cuando el ángulo de contacto es bajo. Además se produce una adhesión

intrínseca adecuada cuando W_{SL} del sustrato es mayor que la energía superficial de adhesivo.

Mediante la ecuación de Young se relacionan las tensiones en las tres fases de contacto y el ángulo formado por el líquido bioadhesivo (figura 3), con el tejido que actúa como sustrato, en un ambiente fisiológico:

$$\gamma_{GL} \cos \theta_{SL} = \gamma_{SG} - \gamma_{SL} \quad [2]$$

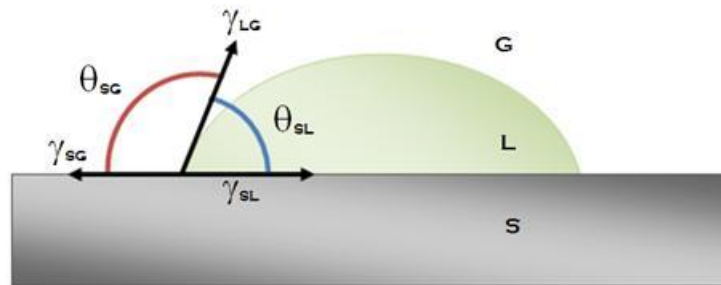


Figura 3. Equilibrio de las fuerzas de tensión y ángulo de contacto.

El trabajo de bioadhesión puede explicarse termodinámicamente como la suma de las tensiones superficiales del material bioadhesivo y el tejido menos la tensión interfacial, de acuerdo con la ecuación de Dupré:

$$W_{SL} = \gamma_{SG} + \gamma_{LG} - \gamma_{SL} \quad [3]$$

Es posible analizar la interacción de la interfase fluido/recubrimiento por medio de mediciones microgravimétricas. La siguiente ecuación indica la relación entre el

cambio de frecuencia de resonancia y el radio de una gota de líquido en el centro del cristal de una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM).

$$\Delta f = \int_0^{2\pi} \int_0^{r_e} S(r, \theta) m(r, \theta) r dr d\theta \quad [4]$$

Donde S es el diferencial de sensibilidad (df/dm) y $m(r, \theta)$ representa la distribución de masa angular y radial. En trabajos anteriores^[27] se demostró que para líquidos Newtonianos la sensibilidad $S(r, \theta)$ puede ser descrita por la siguiente función Gaussiana:

$$S(r, \theta) = S r_e = K \exp(-\beta r^2 / r_e^2) \quad [5]$$

Donde K representa la máxima sensibilidad en el centro del resonador ($r = 0$), β es una constante que define la correlación de la sensibilidad con r , (se han reportado previamente valores de β para capas rígidamente elásticas),^[26] y r_e es el radio del electrodo, es decir de la superficie de oro sobre el cristal de cuarzo. El cambio de frecuencia debido al contacto con el aire (fluido 1) está dado por la siguiente ecuación:

$$\Delta f_1 = -\pi \alpha \delta_1 \rho_1 K \frac{r_e^2}{\beta} \left[1 - \exp\left(-\beta \frac{r^2}{r_e^2}\right) \right] \quad [6]$$

donde $\delta_1 = (\eta_1 / \pi f_0 \rho_1)^{1/2}$ siendo f_0 la frecuencia inicial de la QCM, y ρ_L y η_L son la densidad y la viscosidad del aire respectivamente. Si una pequeña gota de un fluido 2 con radio r se deposita en el centro del cristal, el cambio de frecuencia estará dado por:

$$\Delta f_2 = - \left\{ \int_r^{r_0} K \exp\left(-\beta \frac{r^2}{r_e^2}\right) \alpha \delta_1 \rho_1 (2\pi r dr) + \int_0^r K \exp\left(-\beta \frac{r^2}{r_e^2}\right) \alpha \delta_2 \rho_2 (2\pi r dr) \right\} \quad [7]$$

$$\Delta f_2 = -\pi\alpha K \frac{r_e^2}{\beta} \left\{ \delta_1 \rho_1 \left[\exp\left(-\beta \frac{r_0^2}{r_e^2}\right) - \exp\left(-\beta \frac{r_0^2}{r_e^2}\right) \right] + \delta_2 \rho_2 \left[1 - \exp\left(-\beta \frac{r_0^2}{r_e^2}\right) \right] \right\} \quad [8]$$

Donde $\delta_2 = (\eta_2/\pi f_0 \rho_2)^{1/2}$ y ρ_L y η_L son la densidad y la viscosidad del fluido 2, respectivamente. El término r_0 incluye las regiones desnudas del cristal de cuarzo más allá de los límites del electrodo. En consecuencia, el cambio de frecuencia que acompaña a la adición de una pequeña gota de líquido en el centro del cristal es descrito por la siguiente ecuación, de esta manera r_0 se elimina.

$$\Delta f = \Delta f_2 - \Delta f_1 = \pi\alpha K \frac{r_e^2}{\beta} \left[1 - \exp\left(-\beta \frac{r_0^2}{r_e^2}\right) \right] [\delta_1 \rho_1 - \delta_2 \rho_2] \quad [9]$$

Como para el aire $\delta_1 \rho_1 \approx 0$

$$\Delta f = -\pi\alpha \delta_2 K \frac{r_e^2}{\beta} \left[1 - \exp\left(-\beta \frac{r_0^2}{r_e^2}\right) \right] \quad [10]$$

Esta expresión ilustra el hecho de que si las densidades y viscosidades se conocen, el radio de contacto de la gota puede ser determinado a partir de los cambios de frecuencia. Las expresiones se pueden simplificar aún más si se considera que el radio de la gota es mucho menor que el radio del electrodo de oro ^[27], entonces:

$$\Delta f = -(\pi\alpha K \rho_2 \delta_2) r^2 \quad [11]$$

$$C = \pi\alpha K \rho_2 \delta_2 \quad [12]$$

$$\Delta f = -C r^2 \quad [13]$$

El volumen de una gota líquida sobre una superficie sólida está dada por:

$$V_d = 1/3\pi R^3(2 - 3 \cos \theta + \cos^3 \theta) \quad [14]$$

Donde R es el radio de curvatura y θ es el ángulo de contacto formado entre la gota líquida y la superficie sólida. El radio de contacto esta dado por $r = R \sin \theta$, entonces:

$$r^2 = \frac{\left(\frac{3V_d}{\pi}\right)^{2/3} (1 - \cos^2 \theta)}{(2 - 3 \cos \theta + \cos^3 \theta)^{2/3}} \quad [15]$$

1.8 PROTEÍNAS EN INTERFASES.

La adsorción es el proceso mediante el cual un átomo o una molécula de sustancia se adhiere en la superficie de un sólido o en la interfase entre dos fluidos. En la adhesión celular sobre la superficie de biomateriales pueden intervenir algunas proteínas presentes en la matriz extracelular (fibronectina, laminina), las cuales se adsorben al exponerse a fluidos fisiológicos in vivo o simulados (in vitro). Por lo tanto, la respuesta biológica dependerá de la concentración de proteínas adsorbidas, así como de la conformación que éstas adquieran y a la fuerza de adhesión entre sustrato-proteína.^[29] Las características superficiales del material (energía superficial, grupos funcionales presentes en la superficie, propiedades electroquímicas, cargas superficiales, etc.), así como de la naturaleza de la proteína (grupos funcionales susceptibles de interacciones con los del sustrato, cargas, etc.) y el ambiente en donde tiene lugar la adsorción (electrolitos, concentración, etc.) son de gran importancia en el proceso de

adsorción proteína-biomaterial. Durante el proceso de adsorción de proteínas ocurren las siguientes etapas:

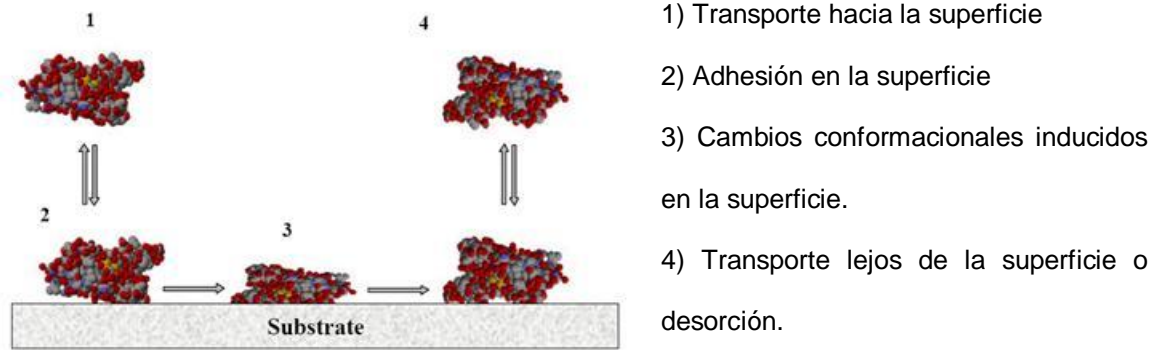


Figura 4. Esquema del proceso de adsorción sobre la superficie de un sustrato sólido.

El proceso de adsorción procede que la energía haya alcanzado un mínimo, es decir cuando alcanza el equilibrio y todos los sitios del sustrato están ocupados, o cuando el empaquetamiento de las moléculas adsorbidas produce fuerzas contrarias. En realidad es un equilibrio dinámico entre el proceso de adsorción y el proceso opuesto llamado desorción, en el cual una molécula adsorbida regresa al seno del líquido. Este equilibrio existe cuando las fuerzas involucradas tienen un carácter físico, es decir para la fisisorción ^[28].

Las proteínas en interfases sólidos/líquidos han atraído la atención en el campo científico debido a la tendencia natural de algunas proteínas para localizarse en una fase límite. Las uniones con las superficies son principalmente no covalentes, tales como enlaces hidrógeno y electrostáticas. ^[29] Se han utilizado varios modelos de adsorción de proteínas para cuantificar y predecir las tasas de adsorción sobre superficies sólidas, las isothermas de Freundlich y las isothermas de Langmuir son

los modelos usados más frecuentemente, ya que pueden ser aplicados a un amplio rango de concentraciones de adsorbato.

El modelo para el proceso de adsorción presentado por Langmuir en 1916 se obtiene al igualar la velocidad de adsorción con la velocidad de desorción. Dicha isoterma presenta una correlación acertada para representar la adsorción de monocapas proteínicas sobre superficies sólidas ^[30]. La forma general de la ecuación para obtener las isothermas de Langmuir es:

$$\Gamma = \Gamma_{max} \frac{c_e * K_L}{1 + c_e * K_L} \quad [16]$$

En la cual c_e (mg/cm³) es la concentración de proteína en el equilibrio, Γ (mg/cm²) es la cantidad de proteína adsorbida en equilibrio o concentración superficial de proteína, Γ_{max} (mg/cm²) es la máxima capacidad de adsorción de proteína adsorbida o concentración superficial saturada, correspondiente a la formación de una monocapa que cubre completamente la superficie del adsorbente y K_L (cm³/mg) es la constante de Langmuir, un parámetro que refleja la afinidad de las moléculas de proteína hacia los sitios de adsorción en el recubrimiento. Los valores de Γ_{max} y K_L son evaluados de la pendiente y el intercepto de la forma lineal de la ecuación de Langmuir:

$$\frac{c_e}{\Gamma} = \frac{1}{\Gamma_{max} * K_L} + \frac{c_e}{\Gamma_{max}} \quad [17]$$

De igual manera, la siguiente ecuación relaciona el parámetro K_L con la energía libre de Gibbs de adsorción sobre la superficie del recubrimiento para diferentes temperaturas ^[32]:

$$\Delta G_{ads} = -RT \ln(55,5 * K_L) \quad [18]$$

Donde T es la temperatura (K), R la constante de los gases (J/mol*K), ΔG_{ads} (J/mol) la energía libre de Gibbs de adsorción y 55,5 (mol/dm³) es la concentración molar del agua.

La velocidad de fijación a la superficie es proporcional a las concentraciones y el área disponible para la adsorción. Las isothermas de adsorción relacionan la concentración de sustancia adsorbida y la concentración en el seno de la fase fluida a temperatura constante^[31].

1.9 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA (EIE)

Mediante técnicas electroquímicas es posible estudiar la respuesta de biomateriales ante una estimulación eléctrica evaluando la pérdida o ganancia de electrones que estos sufren durante la estimulación. Estas reacciones de reducción y oxidación pueden proporcionar información sobre la superficie del electrodo, concentración, cinética, mecanismos de reacción y otros comportamientos de las especies que se encuentran en solución. La Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIE) es una de las técnicas de análisis electroquímico más utilizada, consiste en la aplicación de una señal alterna al sistema y se analiza la respuesta del mismo frente a esta perturbación.

Esta es tan rápida que en esencia no interfiere en los fenómenos de transporte de materia. Mediante esta técnica se puede utilizar un modelo electrónico para representar una celda electroquímica. Algunas aplicaciones de esta técnica son: evaluación de recubrimientos, corrosión general, baterías, electrodeposición, síntesis de electro-orgánicos, semiconductores, celdas de combustión, etc^[25].

1.10 MICROGRAVIMETRÍA

La microgravimetria piezoeléctrica es un método establecido para la medición de pequeños cambios de masa. La técnica de medición se basa en el comportamiento piezoeléctrico de un cristal de cuarzo en forma de disco muy fino con corte cristalográfico AT sobre el que se han depositado, por ambas caras, recubrimientos metálicos (oro, platino, cobre o plata) que actúan como electrodos. El equipo utilizado se observa en la figura 5 y el esquema de los cristales utilizados se observan en la figura 6.



Figura 5. Microbalanza de cristal de cuarzo QCM200

Esta técnica está basada en el comportamiento piezoeléctrico del cristal de cuarzo, es decir que al aplicar un potencial eléctrico a través del cristal de cuarzo, éste experimenta una deformación en la dirección de cizalla que es proporcional al potencial aplicado, lo que da lugar a una oscilación del cristal paralelo a estas superficies. Si el espesor aumenta (por ejemplo por la deposición de material o la adsorción sobre una de las superficies del electrodo) la frecuencia disminuye.

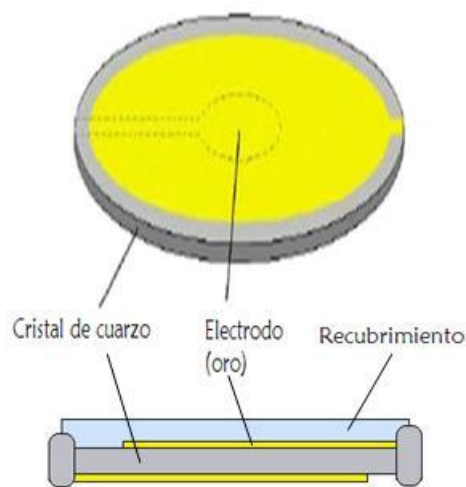


Figura 6. Esquema típico de un cristal de cuarzo piezoeléctrico

La relación entre los cambios en masa por unidad de superficie (Δm) y frecuencia (Δf) se dan por medio de la ecuación de Sauerbrey, que relaciona los cambios de masa, por unidad de área en la superficie del electrodo del cristal con el cambio en la frecuencia de resonancia del mismo.

$$\Delta f = \frac{-2\Delta m n f_0^2}{A \sqrt{\mu_q \rho_q}} \quad [19]$$

- Δf : Variación de la frecuencia de resonancia (Hz)
- Δm : Variación en la masa del material depositado (μg),
- f_0 : Frecuencia fundamental o de resonancia del cristal de cuarzo. (Hz)
- A : Área superficial del electrodo (área piezoeléctricamente activa) (cm^2)
- μ_q : Modulo de cizalla del cuarzo (2.95×10^{11} dina / cm^2)
- ρ_q : Densidad del cuarzo (2.65 g / cm^3)

El signo negativo indica que un incremento de la masa en la superficie del cristal, por ejemplo por la deposición o adsorción de un material ajeno, da lugar a una disminución en su frecuencia de resonancia y viceversa. Esta ecuación normalmente se simplifica como:

$$\Delta f = -C_f \Delta m \quad [20]$$

En la que C_f es una constante que engloba todas las propiedades de los materiales mencionadas anteriormente y la frecuencia de oscilación del oscilador de la microbalanza antes de producirse el cambio de masa. Para cristales de 5 MHz, el valor de C_f es $56.6 \text{ Hz cm}^2 \mu\text{g}^{-1}$. Cuando el sistema QCM está en contacto con una solución, hay una disminución en la frecuencia que depende de la viscosidad y la densidad de la solución (η_s y ρ_s , respectivamente):

$$\Delta f = -f_0^{3/2} \left(\frac{\rho_s \eta_s}{\pi \rho_q \mu_q} \right)^{1/2} \quad [21]$$

La ecuación de Sauerbrey es el fundamento de la mayoría de las medidas de QCM en las que se determinan los cambios de masa producidos en la interfase directamente a partir de los cambios en la frecuencia del resonador de cuarzo. Con esta técnica, es posible realizar mediciones de frecuencia con gran precisión, por tanto, es posible medir masas muy pequeñas como las de biomacromoléculas individuales ^[50,65].

1.10.1 Microbalanza Electroquímica de Cristal de Cuarzo, EQCM.

(*Electrochemical Quartz Cristal Microbalance*) Una aplicación reciente de la QCM

es el acoplamiento con mediciones electroquímicas denominado microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo. La técnica EQCM puede ser utilizada para la medición de cambios de masa asociados con procesos electroquímicos, tales como adsorción, electrodeposición, corrosión, y equilibrio redox de polímeros sometidos a reacciones de transferencia de carga. Por lo tanto se considera como una nueva herramienta analítica para la caracterización "in situ" de procesos electroquímicos. La aplicación de QCM a los cambios de masa que se producen durante procesos electroquímicos se realiza mediante un acoplamiento con un sistema electroquímico (figura 7).

El electrodo QCM que está en contacto con la solución sirve también como electrodo de trabajo en la celda electroquímica, es decir, la adsorción, la deposición, los procesos de transporte, etc.

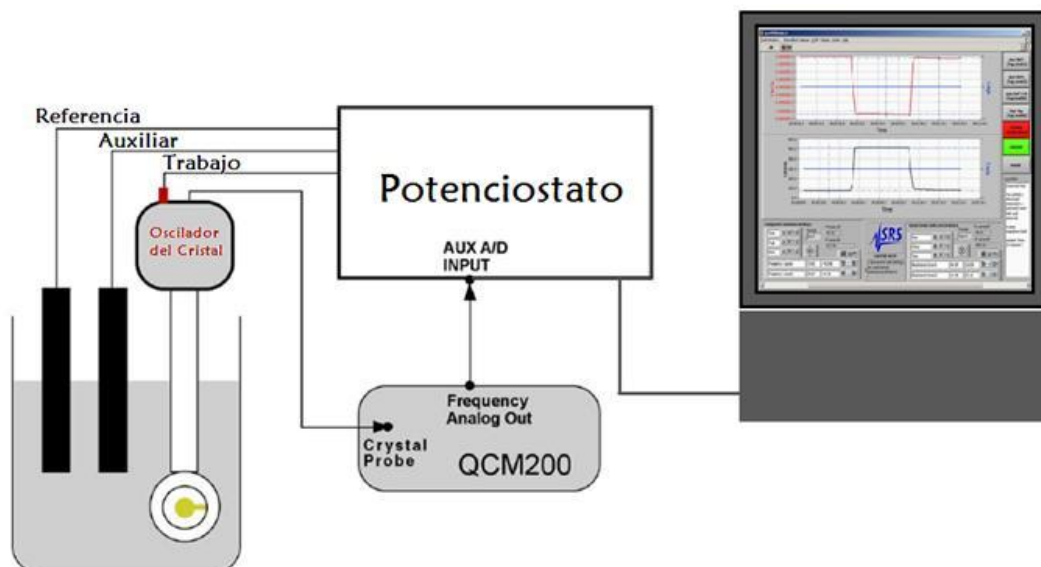


Figura 7. Representación esquemática del montaje para la Microbalanza de Cristal de Cuarzo Electroquímica (EQCM).

La interpretación Cuantitativa de los datos EQCM se basa en la combinación de la ecuación Sauerbrey y la Ley de Faraday. El primero se refiere cambios en la frecuencia con cambios en la masa, mientras que el segundo ($Q = nFN$) relaciona la carga que pasa en un experimento electroquímico (Q) con el número de moles de material electrolizado (N) (n = número de electrones que participan en la reacción electroquímica). Por lo tanto, los cambios de frecuencia pueden estar relacionados con la carga total que pasa ^[66,67].

2 ESTADO DEL ARTE

Biljana A. Cavic, Michael Thompson. (1998) Midieron la adsorción de albúmina de suero humana, citocromo, fibrinogeno, hemoglobina, inmunoglobulina G y apotransferrina sobre la superficie de dos organosiloxanos por medio del análisis de sensores de onda acústica. Se observó adsorción de proteínas irreversible. Las diferencias observadas para la adsorción en varios casos son asignadas al papel desempeñado por interacciones moleculares en la interfase líquido/sólido ^[48].

Majeti & Kumar (2000) Según estos autores se pudo verificar la biocompatibilidad, baja toxicidad, biodegradación y bioactividad del quitosano por lo cual lo consideraron apto para aplicaciones tecnológicas y biomédicas, que incluyen la ingeniería de tejidos ^[36].

R. Etchenique, V. L. Brudny. (2000) Propusieron un nuevo modelo para la caracterización de materiales porosos usando el análisis de impedancia de cristal de cuarzo. El modelo describe la impedancia eléctrica y/o mecánica equivalente del cristal de cuarzo en contacto con una capa finita de un material poroso rígido sumergido en un líquido y predijo una relación lineal entre la impedancia equivalente del cuarzo $Z = R + XL$ ($XL = iwL$ $w = 2\pi f$, f frecuencia de oscilación del resonador de cuarzo) y la relación: grosor de capa (d)/ longitud de poro (ξ). El

modelo permitió explicar por primera vez el comportamiento casi lineal de R contra XL a lo largo del proceso de crecimiento de polímeros conductores que presentan una estructura fibrosa ^[52].

Chatelet Et. al. (2001) Sus estudios demostraron que la quitina y el quitosano se biodegradan in vivo debido a su susceptibilidad a la hidrólisis enzimática de los enlaces β . Sus productos de degradación son oligosacáridos o monosacáridos, metabolitos naturales que son luego absorbidos y pueden ser incorporados a las rutas metabólicas. Realizaron pruebas clínicas con quitosano en el cuerpo humano, las cuales no reportaron reacciones inflamatorias o alérgicas luego de la implantación, inyección, aplicación tópica o ingestión ^[37].

H. Stadler, M. Mondon, C. Ziegler. (2003) La adsorción de albúmina de suero bovina (ASB) sobre oro fue determinada para diferentes concentraciones de proteína en solución acuosa mediante mediciones de ángulo de contacto dinámico (DCA) y microbalanza de cristal de cuarzo (QCM). Los ángulos de contacto de avance y retroceso y la histéresis correspondiente fueron medidos con la técnica de plato Wilhelmy con un medidor de ángulo de contacto dinámico y un Tensiómetro. Se determinó una correlación entre la masa adsorbida y la homogeneidad e hidrofiliidad de la película adsorbida ^[49].

Varawut Tangpasuthadol, Noppong Pongchaisirikul, Vipavee Hoven. (2003) La superficie de películas de quitosano se modificó utilizando cloruro de ácido y anhídridos de ácido. La composición química en la superficie de la película fue

analizada por reflectancia atenuada total, espectroscopia infrarroja de transformada Fourier (ATR-FTIR) y espectroscopia de fotoelectrón de rayos X (XPS). Las películas modificadas seleccionadas fueron sometidas a estudios de adsorción de proteínas, en los cuales la cantidad de proteína adsorbida fue determinada mediante ensayos de BCA (bicinchoninic acid assay) ^[38].

Luminita Balau, Gabriela Lisa, M.I. Popa, V. Tura, V. Melnig. (2004) Obtuvieron películas de quitosano a partir de una solución acuosa en ácido acético. Las películas, con espesor menor a 20 μm , fueron transparentes, flexibles y con superficies lisas. El aumento de espesor de la película induce un aumento de la fragilidad, las tensiones internas y la consiguiente formación de una superficie áspera. Investigaciones de la estructura por difracción de rayos X y transformada de Fourier y análisis IR, mostraron que las películas de quitosano, fueron amorfas. La evaluación de las películas por TG, DTG, y DTA revelaron que la descomposición térmica de las películas de quitosano preparadas procede en dos etapas que comienzan a 180 °C y 540 °C ^[39].

Kim et al. (2004) Desarrollaron un material compuesto adicionando hidroxiapatita y quitosano a un polímero biodegradable polimetilmetacrilato (PMMA), con esto lograron aumentar su bioactividad y osteoconductividad manteniendo su procesabilidad. La biocompatibilidad fue examinada en conejos mediante pruebas in vivo y se pudo observar un mayor grado de formación de nuevo hueso en comparación con lo observado para el PMMA puro ^[40].

Shi G, Rouabhia M, (2004) Sintetizaron materiales compuestos de PLA con nanopartículas de polipirrol (PPy) que resultaron ser degradables y conductores. Se encontró que los fibroblastos se adherían y crecían sobre los composites con mayor viabilidad cuando se estimulaban con corrientes entre 10-50 μA ^[53].

Cárcamo, Carla. (2005) Obtuvieron láminas de quitosano (Qo), alginato (Alg) y del sistema Qo-Alg. Las propiedades de bioadhesión se determinaron por el peso molecular (PM), la concentración del polímero, la flexibilidad de las cadenas poliméricas y los grupos químicos que pudieran formar uniones electrostáticas como puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Según los resultados, las láminas de alginato presentaron las propiedades de bioadhesión más pobres en comparación con las de quitosano. Las propiedades de bioadhesión de los complejos presentaron valores intermedios entre los de sus respectivos polielectrolitos, debido a que los grupos catiónicos presentes interactuaron con la superficie de la piel cargada negativamente, lo que les entregó características bioadhesivas. Como conclusión se llegó a que la adición de Qo al Alg mejora sus propiedades bioadhesivas y que a mayor PM, se obtiene una mayor bioadhesión ^[41].

Chien-Yang Hsieh et al. (2005) Modificaron matrices de quitosano mediante la adición de poli (ácido glutámico) (g-PGA), un polímero biodegradable e hidrofílico. Se obtuvo como resultado g-PGA/quitosán denso y poroso con diferentes

cantidades de PGA. El ángulo de contacto de las matrices disminuyó de 113° a 94° esto sugirió que la hidrofiliidad de la superficie, la velocidad de absorción de agua y el radio de hinchazón mejoraron por la adición de PGA a las matrices. Además, las propiedades mecánicas de las matrices porosas evaluadas mejoraron notablemente con la modificación realizada y se encontró que la adhesión y proliferación de células fue apropiada ya que la densidad celular en el material luego de la modificación aumento casi al triple en comparación con el material no modificado^[42].

Atashbar, Bejcek, Vjih, Singamaneni. (2005) Los autores reportaron una mejora en el enlazamiento de proteínas y moléculas de un anticuerpo IgG sobre biosensores QCM modificando la superficie de oro del cristal de cuarzo con una película de poliestireno de 35 nm seguida de un tratamiento ácido. Realizaron estudios complementarios de microscopia de fuerza atómica (AFM) para entender los parámetros responsables de la mejora del enlazamiento biomolecular. Los estudios de AFM revelaron una disminución significativa en la rugosidad del substrato de 98.4 a 1.75 nm cuando se cubrió con la película de poliestireno. Este aumento en la suavidad superficial causó una cobertura biomolecular más alta en la superficie del sensor lo que causo cambios de frecuencia mayores^[50].

Zhang, Fung, Hui Sun, Zhu, Shouzhuo Yao. (2005) Realizaron un estudio de la adsorción de dos proteínas, albúmina de suero bovina (ASB) y fibrinogeno sobre recubrimientos de polímero conductor basados en polianilina (PAN), PAN dopada

por iones ($\text{PAN}+\text{ClO}_4^-$) o PAN dopada con dodecil sulfato de sodio (SDS) ($\text{PAN}+\text{SDS}$), los cuales fueron preparados por métodos electroquímicos. La adsorción fue supervisada in situ usando tanto QCM como el método de impedancia electroquímica. Se estudio el efecto del grosor de la película de polímero y los agentes de dopado en la adsorción de proteínas. Los resultados de adsorción máxima de proteínas en películas de PAN, $\text{PAN}+\text{ClO}_4^-$ y $\text{PAN}+\text{SDS}$, mostraron 0.71, 0.65 y 0.99 g/cm^2 para ASB y 2.73, 1.85 y 4.07 g/cm^2 para fibrinogeno, respectivamente. Se encontró que la adsorción de proteínas en las películas de PAN seguía la isoterma Langmuir y los resultados del estudio de la cinética de adsorción mostraron dos pasos consecutivos en la adsorción de ASB y fibrinogeno [51].

Peniche, Carlos. (2006) Estudio la interacción de polielectrolitos de quitosano con polímeros acrílicos y con otros polisacáridos. Se obtuvieron membranas de quitosano/ácido poliacrílico (APA), con contenidos de agua en el equilibrio (W_{inf}) dependientes del pH y la composición. Para experimentos realizados a 25, 37 y 50°C se observó el mismo patrón y para una composición dada, W_{inf} aumentó con el aumento del pH, debido a la ruptura de los enlaces salinos inter-polielectrolíticos y la disociación de los grupos $-\text{COOH}$ libres [43].

Fimbeau, Grelier, Alain, Veronique. (2006) Prepararon películas compuestas de quitosano y ácido poliláctico (PLA) por un proceso de disolución por separado en diferentes solventes. El quitosano fue disuelto en ácido acético, y el PLA se

disolvió en cloroformo. Los objetivos principales de este estudio fueron la elaboración y la caracterización de bioempaques basados en quitosano/PLA y el estudio de la actividad antifúngica de las películas. Se relacionó el impacto del contenido de PEG, permitiendo una fácil recuperación de las películas sin disminuir las propiedades de barrera de humedad de los materiales, sin embargo fueron encontradas dificultades para producir películas homogéneas ^[44].

Po-Liang Lin, Hsu-Wei Fang, Tiffany Tseng, Wun-Hsing Lee. (2007) Realizaron un estudio en el cual se evaluaron los efectos de la adición de hidroxiapatita (HAP) en diferentes dosis a una matriz polimérica de ácido poliláctico (PLA) sobre las propiedades mecánicas, la velocidad de degradación y la biocompatibilidad. Se demostró que el nivel de HAP determina la velocidad de proliferación celular, ya que esta fue mayor en compuestos PLA/HAp que en PLA puro, por lo cual compuestos con un alto contenido de HAP presentaron mayor biocompatibilidad y bioactividad. Igualmente se encontró que las propiedades mecánicas del material y su biodegradabilidad se pueden controlar eficientemente al controlar el peso molecular del PLA y el contenido de HAP en los compuestos ^[35].

Xiong Lu et al. (2007) Este artículo alcanzó resultados relacionados con la modificación superficial de recubrimientos de un material compuesto hidroxiapatita/quitosano (HA/CS) sobre superficies de titanio (Ti). Estas últimas fueron tratadas con álcali mediante la combinación de precipitación hidrotérmal in situ y la técnica de recubrimiento sol-gel. El tratamiento con álcali convirtió la

superficie hidrófoba del Ti en altamente hidrófila. Además, en ensayos preliminares se reveló mediante cultivos celulares que los recubrimientos fueron biocompatibles y soportaron la adhesión de osteoblastos ^[45].

Guimarda, Nathalie K. Et al. (2007) Proporcionaron información sobre las propiedades de polímeros conductores usados en aplicaciones biomédicas y su modificación para lograr tales propiedades. Se concluyó que la degradabilidad y la topografía de la superficie son parámetros importantes para las reacciones en la interfase de polímeros conductores con células ^[54].

Kirchhof, Kristin (K); Groth, Thomas (T). (2008) Utilizaron la técnica de capa sobre capa para acumular multicapas de polielectrolitos (PEMs) compuestos de heparina, una glicosaminoglicana aniónica (GAG) y quitosano, sobre superficies de un biomaterial. PEMs fueron caracterizados fisicoquímicamente por mediciones de ángulo de contacto estático y microbalanza de cuarzo (QCM) y se estudiaron las interacciones célula-superficie con fibroblastos humanos sobre PEMs. Por medio de este estudio, se demostró que el pH de las soluciones tiene un fuerte impacto en la adhesión celular haciendo superficies extremadamente citofóbicas o moderadamente citofilicas ^[45].

M.A. García, A. Pinotti, M. Martino, N. Zaritzky. (2009) Obtuvieron películas de quitosano (CH) y metilcelulosa (MC) y analizaron el efecto de un campo eléctrico aplicado sobre la estructura y las propiedades macroscópicas de diferentes

membranas con porcentajes de CH y MC variables. Los ensayos de SEM y difracción de rayos X indicaron que las películas de CH tratadas eléctricamente expusieron una estructura más ordenada, una superficie menos homogénea y una menor solubilidad en agua con respecto a las películas de control. En cuanto a las propiedades mecánicas, las películas tratadas eléctricamente presentaron valores de modulo de Young mayores y se pudo comprobar que el modulo de Young y la resistencia a la tensión de las muestras de control se incrementaron con la concentración de CH, produciendo películas más fuertes. Además se reportó que el tratamiento eléctrico, no alteró la apariencia de las películas y mejoró la flexibilidad de la película^[47].

Lo anterior confirma que durante los últimos años se ha venido investigando ampliamente en el desarrollo de nuevos biomateriales con mejores propiedades y se han utilizado diversos métodos para mejorar su biocompatibilidad, propiedades mecánicas y químicas entre otros, la contribución del presente trabajo está enfocado en la obtención y el análisis superficial de materiales biodegradables, reforzados con fases cerámicas de hidroxiapatita y biovidrio y modificados con quitosano, con el fin de mejorar la adhesión de proteínas. Esto se realizó por medio de la evaluación de la mojabilidad superficial, su comportamiento electroquímico y la adsorción de albúmina de suero bovino y colágeno tipo I, presentes en la matriz extracelular, por medio de técnicas de impedancia electroquímica y microgravimetría piezoeléctrica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto de la modificación superficial de materiales compuestos PLA/PLG/HAP y PLA/PLG/Biovidrio mediante la adición de quitosano, sobre la adsorción de proteínas por medio de microgravimetría piezoeléctrica QCM y espectroscopia de impedancia electroquímica EIE.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de la adición de quitosano sobre las propiedades superficiales y la mojabilidad de materiales compuestos PLA/PLG/HAP y PLA/PLG/Biovidrio.
- Proponer un posible modelo para representar el mecanismo de adsorción de proteínas sobre PLA/PLG/HAP y PLA/PLG/Biovidrio modificados con quitosano, mediante circuitos equivalentes.

4 HIPÓTESIS

La modificación del material compuesto biodegradable PLA/PLG/cerámico mediante la adición de quitosano, mejorará las características bioadhesivas de la superficie aumentando la adsorción de proteínas en la interfase.

5 DESARROLLO EXPERIMENTAL



Figura 8. Esquema de la metodología

5.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En esta etapa se revisaron y analizaron investigaciones realizadas en el campo de los materiales poliméricos biodegradables, cerámicos, compuestos, modificación química, adsorción de proteínas, polisacáridos, caracterización superficial química, etc. Se revisó la información contenida en las bases de datos, así como tesis, memorias de simposios, congresos, y normas técnicas (ASM, ISO, etcétera).

A partir de la revisión de la información disponible sobre el tema, se preparó un plan detallado de trabajo, elaborando un procedimiento programado de las actividades del proyecto e incluyendo protocolos de los equipos, diseño de

experimentos y procedimientos de las normas relacionadas.

5.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Se llevó a cabo la síntesis de cada uno de los materiales utilizados en la investigación, PLA, PLG, hidroxiapatita. A partir del PLA y el PLG se obtuvo la matriz polimérica que posteriormente fue reforzada mediante la adición de una fase cerámica de hidroxiapatita HAP y de biovidrio, formando los materiales compuestos PLA/PLG/HAP y PLA/PLG/Biovidrio respectivamente. A continuación se describen los procedimientos utilizados para la obtención de cada uno de los materiales mencionados.

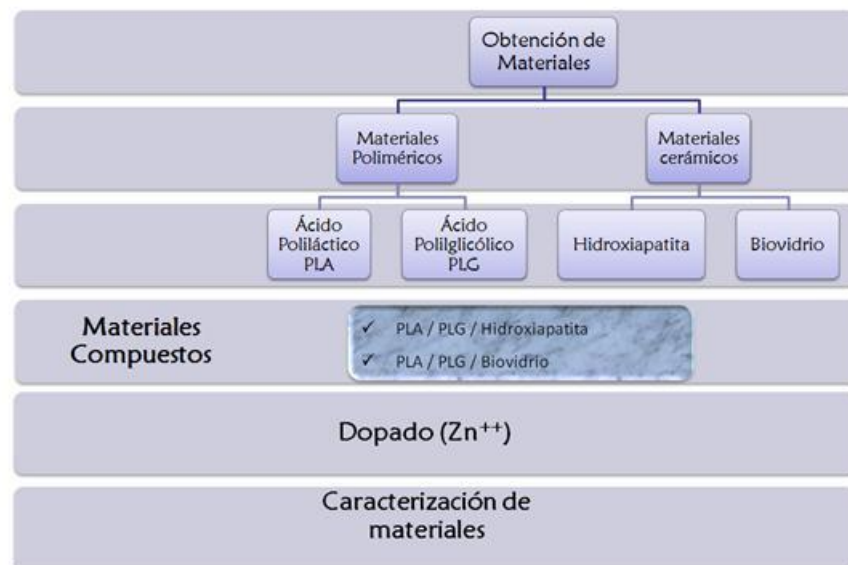


Figura 9. Esquema de materiales obtenidos.

5.2.1 Obtención y caracterización de materiales poliméricos

Se preparó ácido poliláctico y ácido poliglicólico por policondensación de ácido láctico y ácido glicólico respectivamente. La estructura y composición de los polímeros obtenidos se caracterizó mediante espectroscopia de infrarrojo IR y se compararon los respectivos espectros con los encontrados en la literatura.

5.2.1.1 Obtención de Ácido Poliláctico (PLA)

El ácido poliláctico se preparó a partir de ácido láctico Carlo Erba al 98%, mediante una serie de pasos (figura 10), usando cloruro de cinc como catalizador con una concentración de 1,5% en peso, y tiempo de reacción de 40 horas, estas condiciones resultaron ser las más adecuadas para la obtención de este material según estudios anteriores.^[55] El montaje empleado (figura 11) incluyó un rotoevaporador con controlador de vacío y temperatura, y entrada de gas nitrógeno con el fin de mantener la reacción en condiciones de atmosfera inerte.



Figura 10. Etapas en el proceso de obtención de ácido poliláctico (PLA).



Figura 11. Montaje para la reacción de policondensación de ácido poliláctico.

Luego de concluir la última etapa, se dejó enfriar durante aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente y se trituró en un mortero obteniendo un polvo fino.

5.2.1.2 Obtención de ácido polilglucólico (PLG)

Se realizó la policondensación a partir de ácido glicólico Carlo Erba al 98%, con 0,2% de cloruro de estaño como catalizador.



Figura 12. Montaje para la reacción de policondensación de ácido poliglicólico.

La obtención de PLG se realizó en cuatro etapas^[73], en la primera se llevo a cabo la reacción entre el ácido glicólico y el catalizador a una temperatura de 190°C, a vacío de 150mmHg por una hora, en la siguiente etapa se redujo la presión hasta 30mmHg manteniendo la temperatura y sin agitación durante 4 horas. En la etapa siguiente se aumentó la temperatura a 230°C y finalmente se mantuvo en un crisol a 190°C, por 20 horas.

5.2.1.3 Obtención de PLA/PLG

Una vez obtenidos los materiales poliméricos PLA y PLG, se obtuvo PLA/PLG por un método físico de disolución-evaporación de solvente con diferentes cocientes PLA/PLG, utilizando como solvente cloroformo.

Posterior a la obtención de PLA/PLG, se realizó la primera modificación en la cual se aportaron a la matriz polimérica propiedades semiconductoras ^[70,71],

fundamentales en el proceso de electrodeposición polimérica que se utiliza más adelante para el recubrimiento de los cristales. El dopado químico se logró durante la disolución de la matriz PLA/PLG, mediante la adición de Zn^{+2} (1.5%) como agente dopante a la matriz polimérica PLA/PLG, seguido por agitación y secado. La morfología y composición de la matriz polimérica se caracterizaron mediante microscopía óptica y espectroscopia de infrarrojo (IR).

5.2.2 Obtención y Caracterización de Material Cerámico

La caracterización de los materiales cerámicos se realizó mediante los espectros cualitativos y cuantitativos de difracción de rayos X (DRX) que determinaron los grupos fosfatos y carbonatos presentes en los cristales obtenidos y la relación Ca/P.

Para la toma de datos en el análisis de difracción se utilizó un difractómetro de polvo marca RIGAKU, utilizando los siguientes parámetros y condiciones: Voltaje: 40kV, Corriente: 30 mA, Muestreo: 0.02° (2θ), Rango de Medición: $2-70^\circ$ (2θ), Monocromador: Grafito. El análisis cualitativo de las fases presentes en la muestra se realizó mediante comparación del perfil observado con los perfiles de difracción reportados en la base de datos PDF-2 del International Centre for Diffraction Data (ICDD), mientras que el análisis cuantitativo se realizó mediante el refinamiento por el Método de Rietveld del perfil observado agregado a la muestra una cantidad conocida de un estándar interno (Aluminum oxide, -100mesh, 99%. Corundum, α -phase. Aldrich No. 23,474-5) correspondiente al 20%.

5.2.2.1 Síntesis de Hidroxiapatita (HAP)

Los cristales de hidroxiapatita, se obtuvieron utilizando el método de precipitación acuosa, con nitrato de calcio tetrahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y fosfato amónico ($\text{H}_2(\text{PO}_4)\text{NH}_4$) en concentraciones 1M y 0.5M respectivamente, adicionados en relación molar de 1,67. Se ajustó el pH de las soluciones entre 9.8-10 antes de mezclar, utilizando hidróxido de amonio y agitación continua. Se dejó la solución en envejecimiento por 24 horas a temperatura ambiente; y luego se secó a 60°C por 24 horas. Por último se calcino a 1050°C .

5.2.2.2 Síntesis de Biovidrio (BV)

El biovidrio utilizado en esta investigación fue preparado a partir de fosfato amónico y nitrato de calcio mediante método de precipitación acuosa y aportado por estudiantes del Laboratorio de Investigaciones en Corrosión.

5.2.3 Obtención de materiales compuestos PLA/PLG/BV, PLA/PLG/HAP

Para la elaboración de los materiales compuestos, se utilizó la técnica de dispersión, usando cloroformo como solvente para homogenizar la mezcla.^[16] Inicialmente se pulverizó la hidroxiapatita y el biovidrio. El material polimérico PLA/PLG, se disolvió en cloroformo a 50°C en una relación de 10g de PLA/PLG por cada 50ml de solvente, agitando por aproximadamente media hora. Luego las partículas de material cerámico fueron adicionadas a la solución polimérica en proporción al 30% p/v y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una hora.

5.2.4 Modificación de materiales compuestos

La modificación de los materiales compuestos se realizó por codisolución de una solución de quitosano [74,75]. El quitosano y el PLA/PLG fueron disueltos por separado en diferentes solventes. Para la preparación de la solución de quitosano, inicialmente se disolvió una cantidad de quitosano en polvo en solución acuosa de ácido acético 0.1 M. El pH se ajustó a un valor de 5 con NaOH. Luego se agitó por 24 horas y se filtró para remover sustancias insolubles. Simultáneamente se disolvió el PLA/PLG/HAP y el PLA/PLG/Biovidrio en cloroformo, bajo agitación durante 2 horas. La solución de quitosano se adicionó a ambas soluciones en diferentes proporciones y se mezclaron durante 2 horas bajo agitación magnética para homogenizar. Finalmente se secó la solución por dos días a temperatura ambiente para remover los solventes utilizados.

5.2.5 Obtención de recubrimientos sobre cristales de cuarzo piezoeléctrico

Se utilizaron cristales de cuarzo piezoeléctricos tipo AT-cut cubiertos con finas capas de oro-cromo y titanio-platino, con frecuencia de 5 MHz y 1 pulgada de diámetro. La preparación superficial de los cristales de cuarzo piezoeléctricos se realizó inmediatamente antes de realizar los recubrimientos con el fin de remover cualquier resto de contaminación superficial. Inicialmente, se adicionaron tres gotas de acetona sobre la superficie metálica en la parte superior de cada cristal durante cinco minutos, posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada y se secaron en una corriente de aire frío. Para la obtención de los recubrimientos de cada uno de los materiales se realizó un pequeño diseño factorial con tiempo y

voltaje aplicado como variables.

Tabla 1. Condiciones de operación electrodeposición sobre cristales.

Condiciones	-	o	+
Voltaje (V)	3	6	9
Tiempo (min)	5	7	10

Con el análisis de estos resultados se determinaron las condiciones de trabajo utilizadas en el transcurso de la investigación (potencial aplicado 3V, tiempo 10 minutos) para obtener recubrimientos con las características de espesor y homogeneidad requeridos, luego de este tiempo se secó la superficie a temperatura ambiente. Mediante este procedimiento se obtuvieron recubrimientos delgados sobre la cara superior del cristal.

Los experimentos se realizaron en una celda electroquímica con el electrodo metálico sobre el cristal de cuarzo como electrodo de trabajo y una lámina de platino-titanio como electrodo de referencia. Se utilizaron soluciones de PLA, PLG y PLA/PLG (75:25), (10% en peso) preparadas usando como disolvente cloroformo y de igual manera se realizó el procedimiento para depositar los materiales compuestos y modificados con diferentes concentraciones de quitosano sobre una de las caras de cristales de cuarzo piezoeléctricos, con el fin de obtener recubrimientos homogéneos.

5.2.6 Caracterización y evaluación superficial de recubrimientos

La caracterización de la superficie del material compuesto obtenido es uno de los puntos clave en el estudio de su comportamiento interfacial; así como el análisis de los elementos absorbidos o adheridos luego de un determinado tiempo de contacto. Se estudió el comportamiento electroquímico de películas de PLA/PLG/HAP/Quitosano y PLA/PLG/BV/Quitosano mediante técnicas de espectroscopia de impedancia electroquímica EIE y microgravimetría en solución fisiológica simulada PBS (Phosphate Buffer Solution) con pH=7,4. Esta es una solución que simula las condiciones fisiológicas cuya composición química se presenta en la tabla 2.

5.2.6.1 Mediciones electroquímicas

La caracterización de la interfase y los procesos superficiales que ocurren sobre los recubrimientos, se realizó por medio de mediciones electroquímicas, estas se llevaron a cabo en un potenciostato/galvanostato tipo GAMRY PC4/750, con conexión a una celda de vidrio con tres electrodos en la cual se utilizó el electrodo de oro sobre el cristal como electrodo de trabajo, un electrodo de referencia de Ag/AgCl y como contraelectrodo una barra de grafito. Con el fin de asegurar la completa caracterización de la interfase electrodo/electrolito y los procesos superficiales, las mediciones se realizaron con diez puntos por década, a una amplitud de 10 mV (rms) y en un rango de frecuencia entre 0,01 – 100.000 Hz, con el fin de examinar el comportamiento del sistema antes y después del proceso de adsorción de proteína.

Utilizando el montaje de la celda electroquímica descrita en combinación con el montaje de la microbalanza electroquímica (figura 13), se llevaron a cabo mediciones simultáneas de cambio de frecuencia, resistencia e impedancia electroquímica.

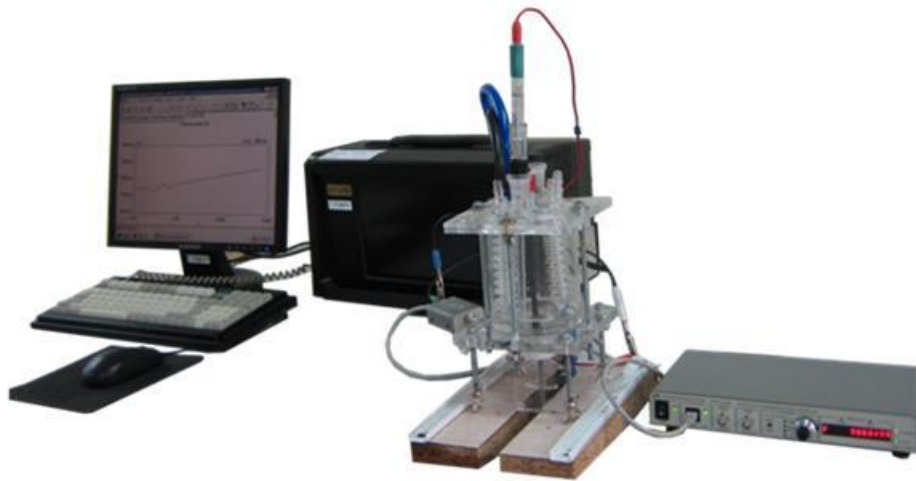


Figura 13. Montaje utilizado para la realización de ensayos simultáneos de microgravimetría e impedancia.

Luego de realizar la conexión del cristal de cuarzo a la microbalanza y al potencióstato Gamry, se estabilizó la frecuencia de resonancia en la microbalanza durante aproximadamente 1000 segundos. A continuación se adicionó el electrolito (PBS) a la celda y nuevamente se permitió que se estabilizara la frecuencia de la solución. Una vez estabilizada, se realizaron barridos de EIE. Inmediatamente después de efectuar estas pruebas, se adicionó la solución de ASB al electrolito y se realizaron nuevamente ensayos de espectroscopia de impedancia electroquímica EIE cada hora, para evaluar el proceso de adsorción.

5.2.6.2 Ensayos Microgravimétricos

Para los ensayos micro-gravimétricos se empleó una microbalanza de cristal de cuarzo QCM200 con interfaz de RS-232, un contador de frecuencia y un medidor de resistencia incorporados. Se utilizaron cristales piezoeléctricos AT-cut de 1 pulgada de diámetro, con frecuencia de resonancia de 5MHz, recubiertos con oro, con una de sus caras en contacto con la solución electrolito. El cristal de cuarzo se conectó a la microbalanza por medio de un oscilador de cristal QCM25 con regulador RJ-45, el esquema de este montaje se presenta en la figura 14.



Figura 14. Montaje de holder y cristal de cuarzo piezoeléctrico recubierto con una fina lámina de oro.

Posteriormente, luego de que la frecuencia del electrodo QCM en PBS se estabilizó, el experimento de adsorción comenzó añadiendo soluciones de proteína (5ml) de diferentes concentraciones. Se midieron simultáneamente los cambios de frecuencia de resonancia y de resistencia sobre el cristal.

5.2.7 Medición de ángulos de contacto

La medición de ángulos de contacto y tensión superficial de los recubrimientos se realizó utilizando la microbalanza de cristal de cuarzo, para esto se diseñó una celda cilíndrica de teflón conectada al holder de la microbalanza, que contó con

una abertura en la parte superior, en la cual se adaptó una micropipeta con sensibilidad +/- 0.5 µl. En cada ensayo, se dejó caer una gota de PBS con 10 µl de volumen en la superficie de cada cristal recubierto con los diferentes materiales, y se registraron los cambios de frecuencia producidos en el momento de la caída de la gota. Los ángulos de contacto fueron determinados por la medición de cambios en la frecuencia de resonancia de los cristales de cuarzo recubiertos usando el método de Newton-Raphson ^[27].

5.2.8 Ensayos de adsorción de proteínas

Se estudio la adsorción de Albumina de Suero Bovina (ASB) de grado analítico, (Sigma Chemical Company, Producto N° A 7906). Molécula 69 kDa, y colágeno Tipo I, sobre la superficie de recubrimientos de PLA/PLG/HAP, PLA/PLG/HAP/Quitosano, PLA/PLG/BV y PLA/PLG/BV/Quitosano en un rango de temperaturas entre 25 y 45°C. Los ensayos de adsorción de proteínas ^[76] se realizaron por medio de técnicas de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE) y mediciones microgravimétricas, las cuales se llevaron a cabo utilizando una microbalanza de cristal de cuarzo. Las proteínas fueron adicionadas al electrolito, una solución buffer salina de fosfatos (PBS), con pH = 7,4 para obtener concentraciones finales entre 0 y 0.05 g/L.

Tabla 2. Reactivos utilizados en la preparación de la solución buffer de fosfatos

Reactivos PBS	Composición (g/l)
NaCl	8
KCl	0.20
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	1.44
KH ₂ PO ₄	0.24
HCl	Para ajustar el pH=7,4

Las pruebas preliminares de adsorción de proteínas fueron llevadas a cabo para cristales de cuarzo inicialmente sin recubrimiento y posteriormente para cristales modificados con los recubrimientos poliméricos obtenidos (PLA/PLG/HAP, PLA/PLG/BV, PLA/PLG/HAP/Quitosano, PLA/PLG/BV/Quitosano). El proceso de adsorción de proteínas sobre la superficie de los recubrimientos se representó por medio de isothermas de Langmuir.

Adicionalmente, se realizaron pruebas colorimétricas para corroborar la presencia de proteína sobre cada uno de los materiales. El método colorimétrico utilizado para la cuantificación espectrofotométrica de ASB fue el Método Bradford, utilizando azul brillante de coomasie en forma aniónica. Este método constituye una forma rápida y confiable para la determinación de proteínas y se basa en la cuantificación de la unión del colorante azul brillante de coomassie a una proteína, y la comparación de esta unión con la de diferentes cantidades de una proteína estándar. El azul de coomasie reacciona y la absorbancia varía tras añadir proteína debido a la estabilización de la forma aniónica del mismo por interacciones hidrofóbicas e iónicas.

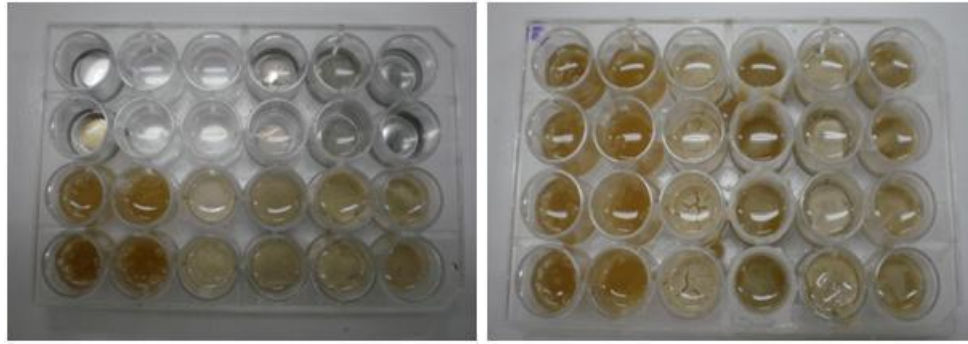


Figura 15. Montaje de pruebas colorimétricas.

Se utilizaron dos placas de 24 pozos, se realizaron por duplicado y con dos mediciones por cada prueba. Los ensayos se realizaron en recubrimientos sobre probetas de la aleación Ti6AL4V obtenidos por medio de procesos de electrodeposición catódica⁵⁵ y sobre los materiales poliméricos directamente.

6 DISCUSIÓN GENERAL Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1 CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES POLIMÉRICOS

La caracterización de los materiales utilizados en esta investigación es de gran importancia, ya que fue posible evidenciar que los diferentes materiales sintetizados en el laboratorio correspondieron a los materiales que fueron utilizados posteriormente como recubrimientos, cumpliendo con las características químicas requeridas.

6.1.1 Caracterización de ácido poliláctico (PLA)

En la figura 16 se presenta el espectro FTIR que muestra la absorción característica del PLA sintetizado en el laboratorio de investigaciones en corrosión, este espectro se comparó con el espectro para el PLA encontrado en la literatura ^[14] y se comprobó la similitud de las bandas, lo cual confirma que el polímero obtenido es similar al ácido poli (L-láctico) comercial.

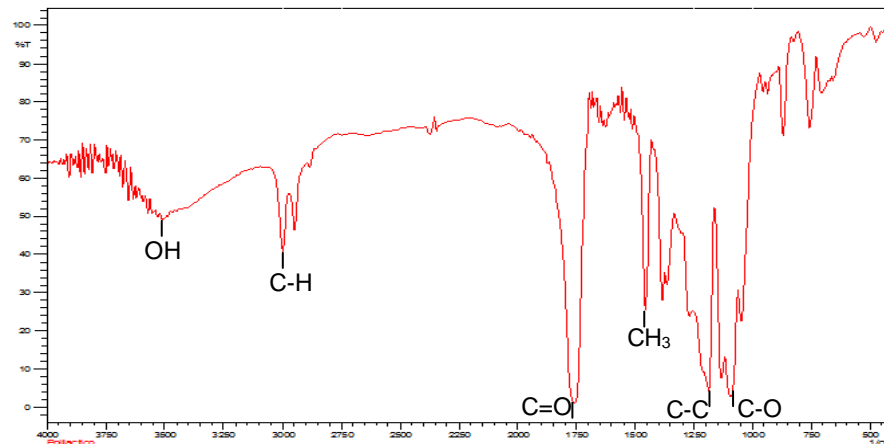


Figura 16. Espectro FTIR de material polimérico obtenido (PLA). 40 horas de oligomeración dopado con 2% de Zn.

En este espectro se presentan los picos que representan diferentes grupos funcionales presentes en la estructura de este polímero, los cuales son mostrados en la tabla 3.

Tabla 3. Grupos funcionales de PLA obtenido

$\nu \text{ cm}^{-1}$	Grupo
2997	C-H
1756	C=O
1456	CH ₃
1200-1300	C-C
1086	C-O

Se realizaron pruebas de Calorimetría Diferencial de Barrido DSC con el fin de identificar las transiciones térmicas del polímero a través de un rango de temperaturas. Se encontró que para el PLA obtenido la temperatura de transición vítrea es de 55°C, se observa un pico endotérmico correspondiente a la temperatura de fusión en aproximadamente 300°C y un pico exotérmico de

cristalización se observa a una temperatura de aproximadamente 400°C, el cual indica la presencia de heterogeneidades y regiones cristalinas por lo que a esta temperatura las propiedades físicas del polímero se disminuyen notablemente.

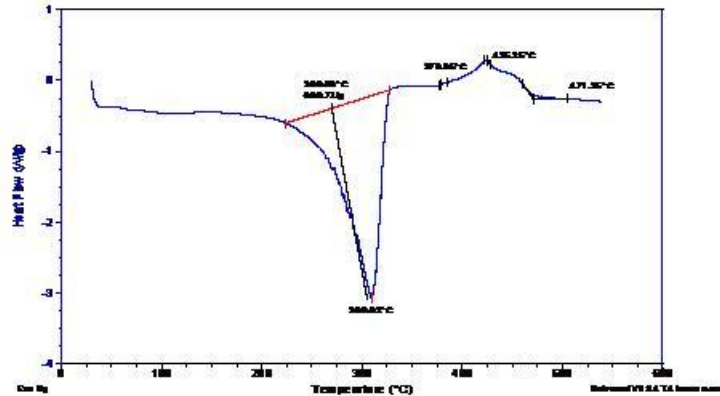


Figura 17. Termograma de DSC para el material polimérico obtenido (PLA). 40 horas de oligomeración, dopado con 2% de Zn.

6.1.2 Caracterización de ácido poliglicólico (PLG)

Se observa que en la región comprendida entre 1091 y 801cm^{-1} se presentaron vibraciones debido a la unidad repetitiva de $[-\text{C}-\text{C}-]_n$. En 1190cm^{-1} se observa la presencia de un grupo C-O, en 1419cm^{-1} se observa un enlace C-H, el pico en 1740cm^{-1} indica la presencia del grupo C=O y los picos de absorción registrados en 2960cm^{-1} indican la presencia del grupo CH.

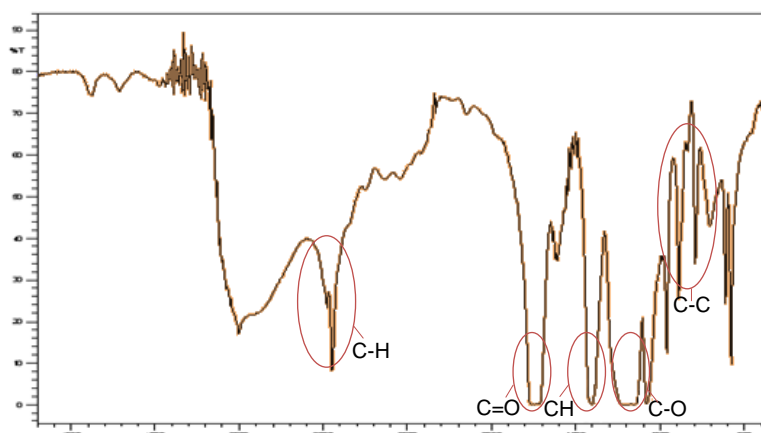


Figura 18. Espectro FTIR de material polimérico PLG sintetizado. Dopado con 2% Zn.

El termograma DSC para el PLG muestra dos picos característicos, el primero se le atribuye a la temperatura de fusión en aproximadamente 205°C y el segundo y más amplio, a una fase de degradación térmica en 314.83°C.

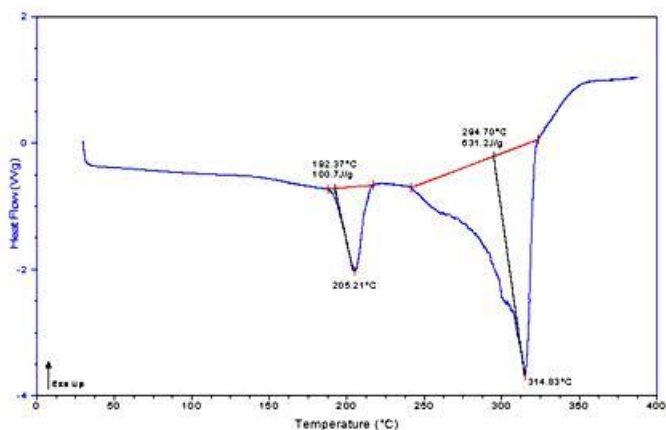


Figura 19. Termograma de DSC para el material polimérico obtenido (PLG).

6.1.3 Caracterización de PLA/PLG

Luego de la obtención de PLA/PLG, se analizó el espectro FTIR, en el cual se presentaron varios picos que identifican la presencia de diferentes grupos funcionales presentes en la estructura de los dos polímeros base, PLA y PLG, esto

es un indicativo de que la composición del material formada por la presencia de los polímeros individuales.

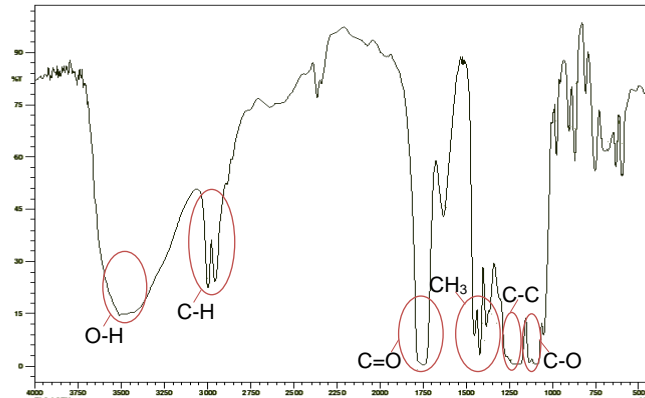


Figura 20. Espectro FTIR de material obtenido (PLA/PLG). Dopado con 1,5% Zn

El espectro FTIR del material PLA/PLG presento las siguientes bandas de absorción mostradas en la tabla 4.

Tabla 4. Grupos funcionales de PLA/PLG obtenido

$\nu \text{ cm}^{-1}$	Grupo
3000-3600	O-H
2997	C-H
1756	C=O
1456	CH ₃
1200-1300	C-C
1086	C-O

Adicionalmente, a estas observaciones, se comparó el espectro obtenido, con el espectro del copolímero PLGA reportado en la literatura ^[13], estableciéndose una gran similitud con las bandas de los grupos funcionales; además se corroboró que la modificación realizada al dopar el copolímero con zinc metálico no afectó la estructura química del material obtenido.

6.1.4 Caracterización de hidroxiapatita (HAP)

Se obtuvo un material cerámico que se identificó como hidroxiapatita según espectros cualitativos y cuantitativos obtenidos mediante Difracción de Rayos X (DRX) que determinaron los grupos fosfatos y carbonatos presentes en los cristales obtenidos.

El análisis cuantitativo, mostró la presencia de fases cristalinas de hidroxiapatita y de fosfato tricálcico (Whitlockita). Este último se presenta en menor proporción, constituyéndose un precursor en la formación de HAP. Los resultados de la difracción de rayos X se muestran en la figura 21, en la cual se observan los picos representativos de la hidroxiapatita.

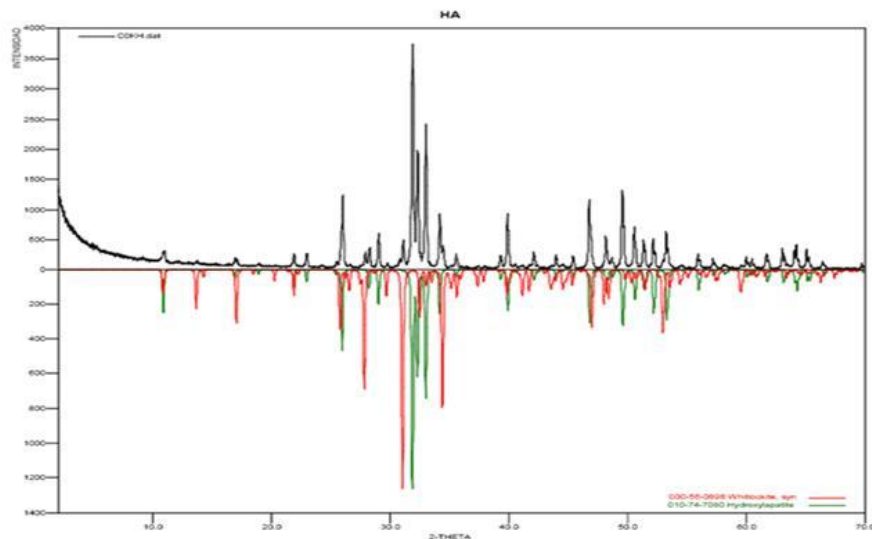


Figura 21. Diagrama de difracción de rayos X del material cerámico obtenido.

Tabla 5. Fases cristalinas presentes en HAP obtenida

Fase cristalina	Nombre	Cuantitativo %	Desviación estándar
$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hidroxiapatita	84.9	0.5
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Whitlockita	15.1	0.4

Adicionalmente, en el perfil de difracción de la muestra obtenida, se observaron dos reflexiones de baja intensidad en 24.28° y 30.84° , las cuales no se asignaron a ninguna de las fases reportadas en la base de datos de la International Centre for Diffraction Data (ICDD); se puede observar también que no se registró la presencia significativa de fases amorfas en la muestra analizada.

En la figura 21 se presenta el espectro obtenido para una muestra de hidroxiapatita. Se observan picos a longitudes de 600cm^{-1} y 1100cm^{-1} correspondiente al grupo fosfato.

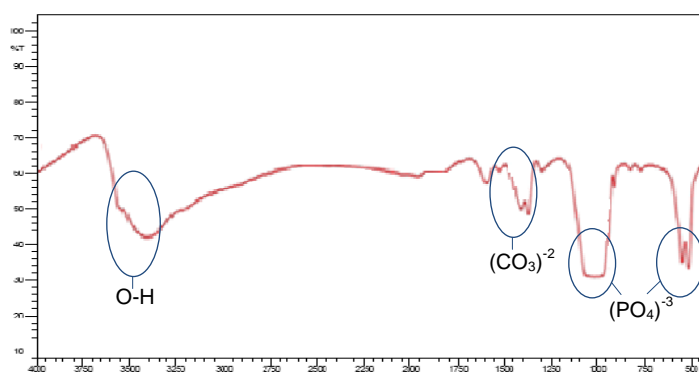


Figura 22. Espectro FTIR de hidroxiapatita obtenida.

Un indicativo de la fase cerámica son las bandas correspondientes al grupo carbonato $(\text{CO}_3)^{2-}$ en aproximadamente 1500cm^{-2} . La banda a 3600 cm^{-1} corresponde a los grupos OH^- .

6.2 CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE RECUBRIMIENTOS

6.2.1 Dureza.

De acuerdo con los resultados de este ensayo, la presencia de una fase cerámica en la matriz polimérica influye en el aumento en la dureza superficial.

Tabla 6. Valores promedio de la medición de dureza tipo Shore D.

Material	Dureza Shore D
PLA	25± 0,01
PLG	35± 0,01
PLA/PLG	30 ± 0,01
PLA/PLG/BV	40 ± 0,01
PLA/PLG/HAP	45 ± 0,01
PLA/PLG/BV/Q	20± 0,01
PLA/PLG/HAP/Q	30± 0,01

Sin embargo, estos materiales modificados con quitosano, presentaron valores menores de dureza. Esta caracterización de dureza puede indicar un aumento de la fragilidad en los materiales con refuerzo y un aumento de ductilidad en los materiales con refuerzo y quitosano.

6.2.2 Microscopia óptica

La respuesta de células y tejidos ante la superficie de un implante es afectada por la topografía de la superficie sobre la base macroscópica, así como por la morfología y la rugosidad de la superficie sobre la base microscópica. Se ha demostrado, que superficies con baja porosidad, además de promover la formación de cápsulas fibrosas alrededor de los implantes, producen un área de contacto menor entre el tejido óseo y el implante, resultando en un torque de

desinserción, inferior al de superficies más rugosas, en las que la unión de la superficie del implante con el tejido, es mejor. También ha sido demostrado, que la interconexión de tejido óseo con materiales implantados, se correlaciona de forma positiva con la rugosidad de la superficie del implante ^[33,34].

En la figura 23 se observa la topografía homogénea obtenida en los recubrimientos de ácido poliláctico sobre los cristales de cuarzo.

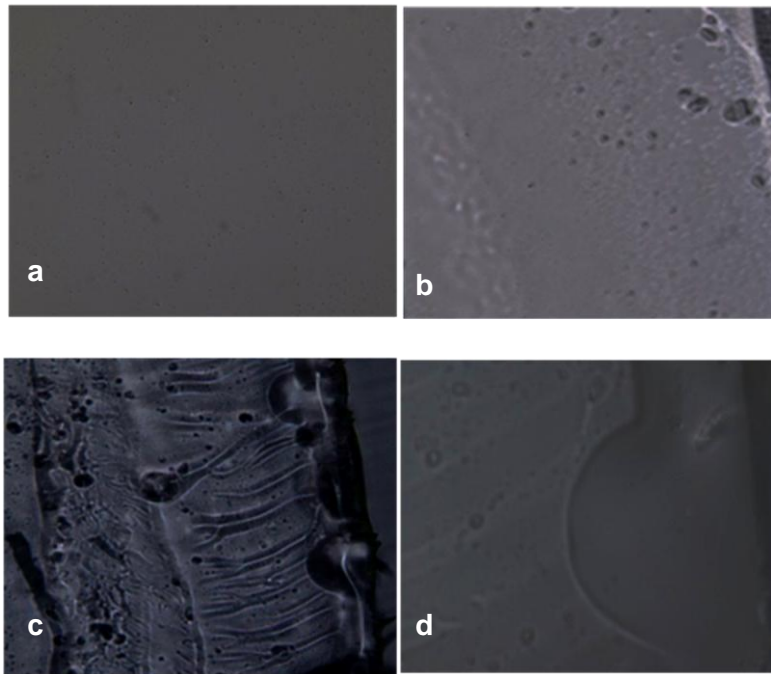


Figura 23. Microscopia óptica del recubrimiento PLA. (a) 5X, (b) 10X, (c) 20X, (d) 50X

La degradación de las películas de PLA se lleva a cabo mediante un proceso de hidrólisis de las cadenas de polímero, Mostrándose un hinchamiento inicial a causa de la absorción de agua, donde ocurre la degradación del recubrimiento. En la figura 24 se muestran las morfologías de estos materiales luego de permanecer sumergidas en solución PBS durante cinco horas.

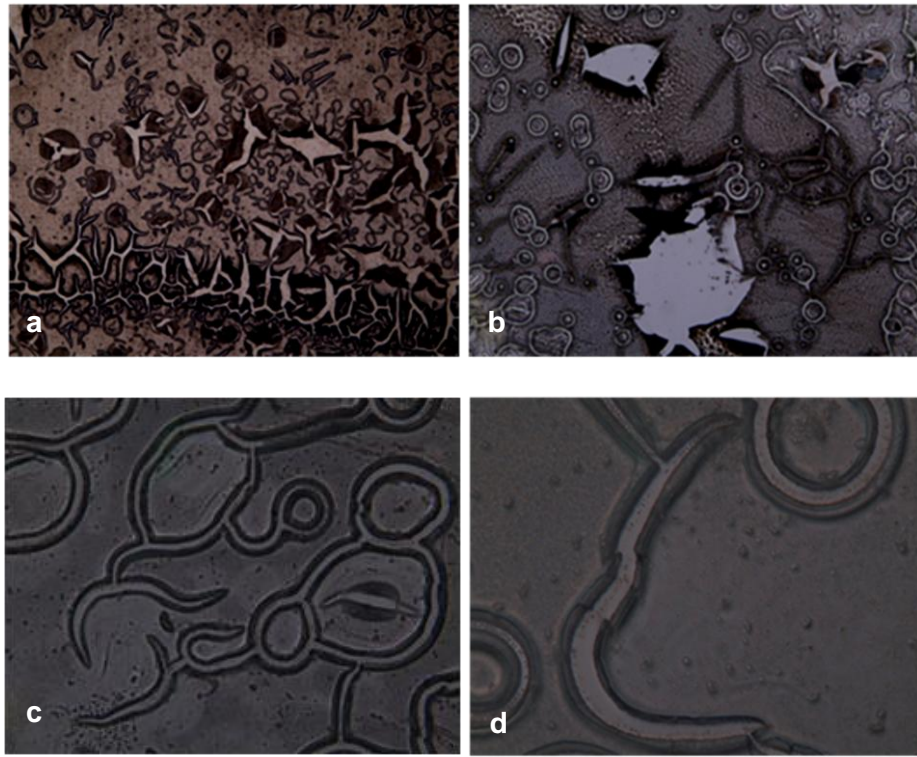


Figura 24. Microscopia óptica del recubrimiento PLA, en PBS por 5 horas, (a)5X, (b)20X, (c)50X, (d)100X.

Una ampliación a 100x aumentos de la superficie del material polimérico conformado por PLA/PLG se presenta en la figura 25, en la cual se observa la mezcla de dominios de la mezcla polimérica.

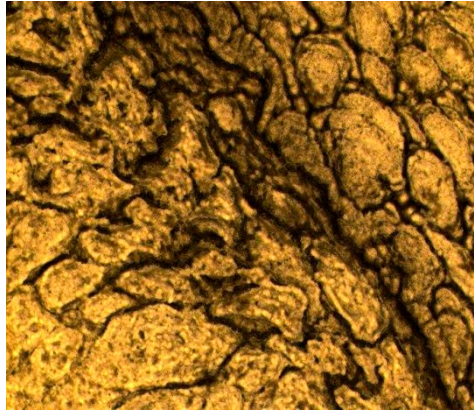


Figura 25. Microscopia óptica del recubrimiento PLA/PLG a 100x

Adición de la hidroxiapatita: Las micrografías de la superficie del recubrimiento del material compuesto PLA/PLG/HAP mostradas en la figura 26, revelan la presencia de micro poros en la superficie de la película. Esos microporos son formados por las interfases entre las partículas de HAP entrecruzadas con el polímero, estas partículas cerámicas forman agregados dispersos a lo largo de la matriz polimérica, formando además, grietas y poros mayores.

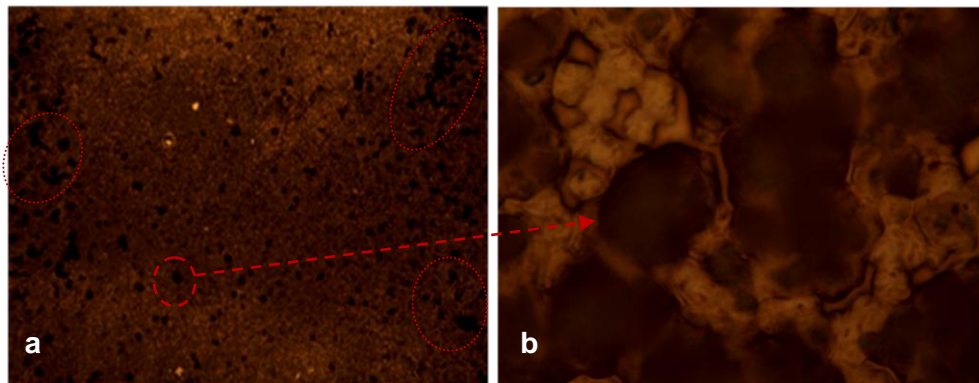


Figura 26. Microscopia óptica del recubrimiento PLA/PLG/HAP. (a) 5X. (b) 100X.

Una observación detallada de los recubrimientos en la figura 27, indica también la formación de aglomeraciones sobre la superficie, las cuales son atacadas

preferencialmente por las soluciones líquidas con las que están en contacto posteriormente.

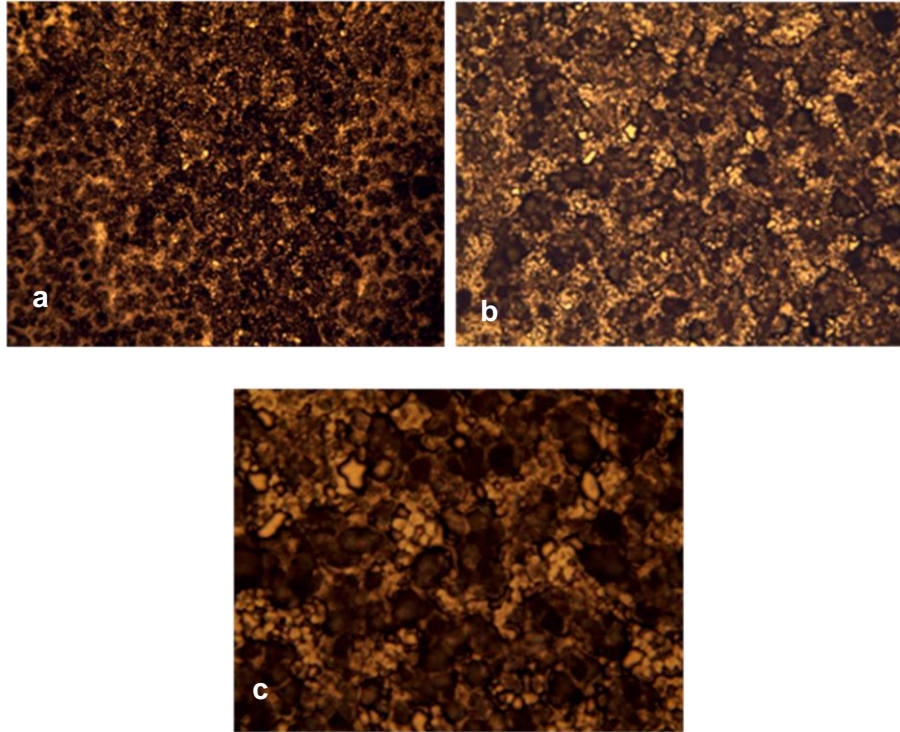
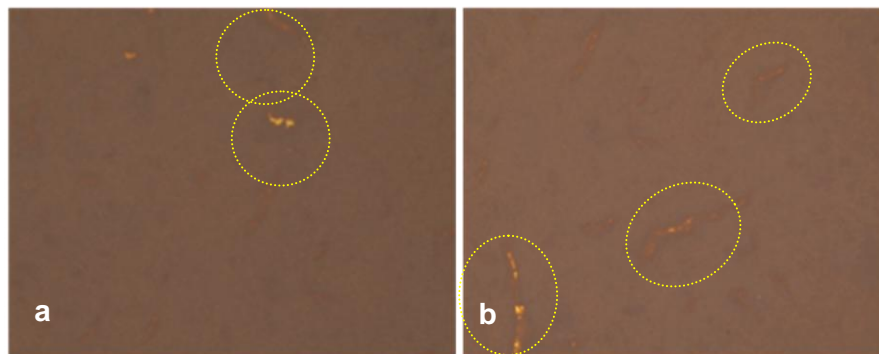


Figura 27. Microscopia óptica del recubrimiento PLA/PLG/HAP. (a) 10X. (b) 20X. (c) 50X
En la figura 27, se muestra los recubrimientos de PLA/PLG/HAP, luego de las pruebas en solución PBS durante 4 horas, observándose una degradación hidrolítica no homogénea, con el ataque específico de los aglomerados descritos anteriormente.



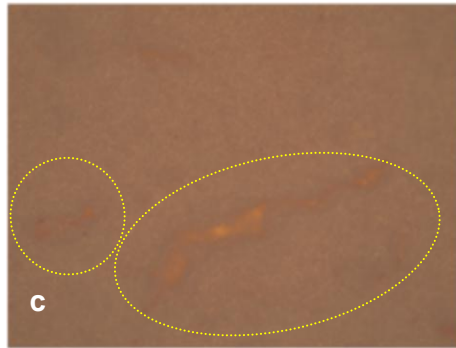


Figura 28. Microscopia óptica del recubrimiento PLA/PLG/HAP. 4 horas en PBS. (a) 10X. (b) 20X. (c) 50X .

La morfología superficial de los recubrimientos presentó cambios con el porcentaje de quitosano adicionado al material. Con un aumento en el contenido de quitosano la superficie se muestra más homogénea, sin embargo, a mayores concentraciones de quitosano, se presentan grietas profundas. Estos efectos se muestran en la figura 29.

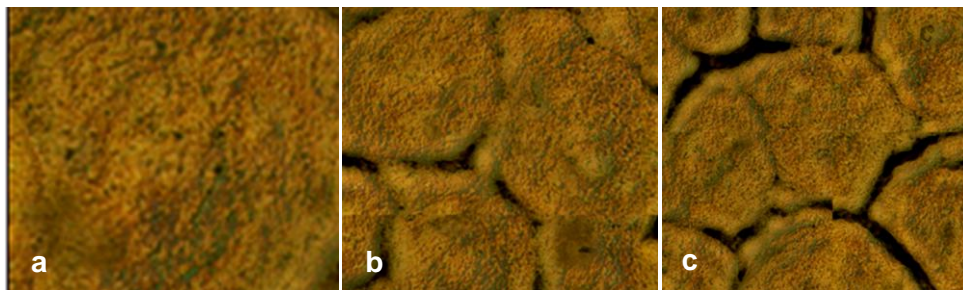


Figura 29. Microscopia óptica del recubrimiento PLA/PLG/HAP/Q a 10X. (a). 0,5% quitosano (b) 1% quitosano (c) 1,5% quitosano.

La presencia de quitosano influye en las características superficiales del recubrimiento afectando directamente, la adsorción de proteínas. En este orden de ideas, el aporte de los grupos amino por parte del quitosano, tienen un efecto positivo, tanto en la adsorción de proteínas como en la adhesión celular, ya que

provee sitios para la inmovilización de biomoléculas. Con la adición de quitosano, en cuya molécula están presentes estos grupos, se puede lograr estabilidad de las cargas superficiales ^[69].

6.2.3 Mediciones electroquímicas

La técnica de Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIE) fue aplicada, para la caracterización de la interfase electrodo/electrolito y los procesos superficiales en presencia de moléculas de proteína. Los ensayos realizados sobre el electrodo de trabajo sin recubrimiento, indicaron que durante el tiempo que la superficie estuvo en contacto con el electrolito a diferentes concentraciones de proteína ASB, las condiciones eléctricas superficiales variaron ratificando la formación de monocapas de ASB adsorbida sobre los electrodos de oro. La capacitancia calculada a partir de datos de impedancia y de frecuencia presentó una transición durante el proceso de adsorción, asociada a las variaciones en las propiedades eléctricas en la superficie del electrodo. En la figura 30 se presenta un espectro característico obtenido.

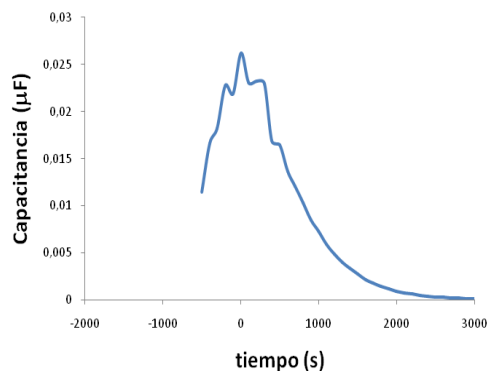


Figura 30. Variación de la capacitancia con el tiempo ($C = 1 / 2\pi f Z$)(Adición de ASB en $t=0$)

Ensayos de espectroscopia de impedancia electroquímica realizados, cada hora, usando como electrolito solución PBS a la cual se agregó pequeñas cantidades de proteína ASB hasta una concentración final de 0.05g/L, revelaron la formación de una monocapa en la superficie del sustrato. A frecuencias intermedias se observan interacciones entre el electrolito y el sustrato, relacionadas con la transferencia de carga y a la vez relacionadas con el inverso de la cantidad de proteína adsorbida. El desplazamiento de los espectros de ángulo de fase en el diagrama de bode hacia la derecha, como se observa en la figura 31, indica que a mayores tiempos en solución, este sistema tiende a ser más capacitivo.

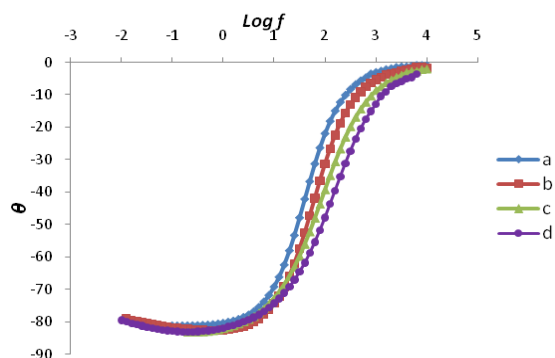


Figura 31. Espectro de Bode, cristal de cuarzo en solución PBS. a) Sin proteína. b) 0.05g/L de ASB, t = 0 s. c) 0.05g/L de ASB, t = 1800 s. d) 0.05g/L de ASB, t = 3600 s.

A partir de estos espectros y mediante simulación por circuitos equivalentes, se obtuvo la resistencia a la transferencia de carga relacionada con la interfase entre la proteína y la superficie del recubrimiento. En la figura 32 se muestran los ajustes obtenidos al graficar $\ln(R_{tc}/T)$ contra $1/T$, siendo T la temperatura del ensayo en el electrodo de oro usando como electrolito solución simulada de fosfatos (PBS) y (PBS+ASB). A partir de la pendiente de las rectas se obtuvo la energía de activación E_a , aplicando la siguiente ecuación:

$$\ln\left(\frac{R_{tc}}{T}\right) = \frac{E_a}{RT} + K \quad [21]$$

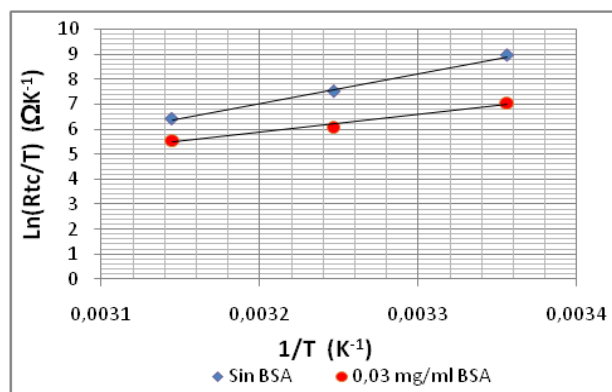


Figura 32. Graficas de Arrhenius para ASB usando un electrodo de oro en PBS, pH=7,4

Según estas graficas, la velocidad de adsorción, tanto en solución libre de proteína como en la solución que contiene 0,03 mg/ml de ASB, aumenta con la temperatura, adicionalmente las energías de activación obtenidas fueron de 99,85 KJ/mol para el electrolito libre de proteína ASB y 59,27 KJ/mol para el electrolito con adición de proteína. Según esta disminución en los valores de la energía de activación de corrosión (E_a) se puede determinar que el proceso de adsorción de moléculas de ASB en la solución PBS sobre el electrodo ocurre por un mecanismo de transferencia de carga relacionado con quimisorción^[72].

Luego de realizados los ensayos sobre electrodos sin recubrimiento, se realizaron ensayos de impedancia electroquímica sobre electrodos recubiertos con los diferentes materiales estudiados en el presente trabajo.

6.2.4 Determinación de los ángulos de contacto

Se midió el ángulo de contacto formado entre gotas de solución PBS y la superficie de los electrodos cubiertos con recubrimientos de PLA/PLG/HA y PLA/PLG/BV sin modificar y modificados con diferentes concentraciones de quitosano. La frecuencia de resonancia del cristal disminuyó abruptamente al caer la gota sobre el centro de la superficie del electrodo al realizar la prueba detallada en la metodología. Los ángulos de contacto para determinar los cambios en hidrofiliidad de la superficie de los materiales preparados, fueron determinados usando el método de Newton Raphson aplicando la siguiente ecuación:

$$\Delta f = C \frac{\left(\frac{3V_d}{\pi}\right)^{2/3} (1-\cos^2\theta)}{(2-3\cos\theta + \cos^3\theta)^{2/3}} \quad [22]$$

Los valores de Δf se obtuvieron por la medición de cambios en la frecuencia de resonancia de los cristales de cuarzo recubiertos, V_d es el volumen de la gota depositada sobre el centro del cristal, el valor de C utilizado fue calculado según la ecuación $C = \pi\alpha K\rho_{\text{PBS}}(\eta_2/\pi f_0\rho_{\text{PBS}})^{1/2}$, donde $\alpha = 0,5$; $f_0 = 5$ MHz, se determinó un valor de $K = 432,36 \text{ Hz}\cdot\text{cm}^2/\mu\text{g}$.

Para los ensayos realizados sobre los materiales sin adición de quitosano, el área de contacto observada entre la superficie sólida y la gota adicionada fue menor, en comparación con el área de contacto de los recubrimientos modificados con quitosano, en los cuales la gota se expandió sobre el material en un área mayor. Esto se corroboró ya que se obtuvieron menores valores de θ para las superficies con mayor contenido de quitosano (Tablas 8 y 9), en comparación con los valores de θ obtenidos sobre recubrimientos sin modificación (Tabla 7), lo cual indica que dicha modificación favoreció la mojabilidad superficial de los recubrimientos.

Tabla 7. Parámetros de mojabilidad para los materiales sin modificación de quitosano.

Material	θ_{SL}	γ_{SL} (dinas/cm)	γ_{LV} (dinas/cm)	W_c (dinas/cm)	W_a (dinas/cm)	W_s (dinas/cm)
PLA	92	19,48	-2,54	-5,08	-2,45	2,63
PLA/PLG	81	12,94	11,38	22,76	13,16	-9,60
PLA/PLG/BV	74,5	9,77	19,44	38,88	24,64	-14,25
PLA/PLG/HAP	71,5	8,48	23,08	46,17	30,41	-15,76

Tabla 8. Parámetros de mojabilidad para PLA/PLG/BV con quitosano.

Quitosano (g/l)	θ_{SL}	γ_{SL} (dinas/cm)	γ_{LV} (dinas/cm)	W_c (dinas/cm)	W_a (dinas/cm)	W_s (dinas/cm)
0,5	69	7,49	26,07	52,14	35,41	-16,73
1	65	6,06	30,75	61,49	43,74	-17,75
1,5	63	5,42	33,03	66,06	48,02	-18,03
2	60	4,55	36,38	72,75	54,56	-18,19

Tabla 9. Parámetros de mojabilidad para PLA/PLG/HAP modificado con de quitosano.

Quitosano (g/l)	θ_{SL}	γ_{SL} (dinas/cm)	γ_{LV} (dinas/cm)	W_c (dinas/cm)	W_a (dinas/cm)	W_s (dinas/cm)
0,5	59	4,28	37,47	74,94	56,77	-18,17
1	55	3,31	41,73	83,46	65,66	-17,79
1,5	47	1,84	49,62	99,23	83,45	-15,78
2	38	0,82	57,33	114,66	102,50	-12,15

De igual manera se puede observar que para los recubrimientos con contenido de biovidrio (Tabla 8), la diferencia en los valores de θ obtenidos luego de la modificación son menores comparados con los de los recubrimientos que contienen hidroxiapatita, lo cual indica que la modificación afecto en un mayor grado en este último caso, probablemente debido al carácter catiónico del quitosano compatible con el mayor carácter de hidroxilación de la hidroxiapatita. Adicional a esto se sabe que los polímeros que presentan grupos carboxilos e hidroxilos en su composición como es el caso de los materiales utilizados, presentan mejores comportamientos bioadhesivos. Sin embargo, los valores para el trabajo de adhesión obtenidos fueron ligeramente menores al trabajo de cohesión, lo cual evidencia una tendencia del fluido en contacto a adoptar una superficie mínima sobre la superficie. Para el PLA sin adición de quitosano ni

fases cerámicas se obtuvieron valores de negativos de W_a , indicando un comportamiento hidrofóbico de la superficie.

6.3 ADSORCIÓN SUPERFICIAL DE ASB Y COLÁGENO SOBRE RECUBRIMIENTOS COMPUESTOS Y MODIFICADOS.

El mecanismo de la formación de la estructura proteínica sobre el recubrimiento, es diferente para estos dos tipos de proteína, por un lado, el colágeno es una macromolécula de alto peso molecular que normalmente se mantiene en solución a bajos valores de pH, sin embargo, cuando este se eleva por encima de pH 7, las moléculas de colágeno se organizan en una red fibrosa formando un gel. Mientras que la albumina de suero Bovino, se mantiene en solución a pH neutro como el de la solución fisiológica simulada PBS. Por otro lado, el punto isoeléctrico de la ASB es 4.8, por lo tanto a pH=7,4 que es el pH del medio PBS empleado, las moléculas de ASB están cargadas negativamente.

Para determinar cualitativamente la adhesión de proteínas con los materiales empleados, se realizó un ensayo utilizando el método Bradford cuyo mecanismo de acción reside en la comparación de la absorción del tinte azul de Coomasie. Generalmente, las proteínas absorben luz a determinadas longitudes de onda en el espectro de luz ultravioleta. Para estas mediciones, se elaboró una curva de calibración a partir de las lecturas espectrofotométricas (Anexo I).

6.3.1 Mediciones de adhesión por microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo EQCM

Utilizando el montaje de la celda electroquímica en combinación con el montaje de la microbalanza electroquímica, se llevaron a cabo mediciones simultáneas de cambio de frecuencia, resistencia e impedancia electroquímica. La medición de los cambios de masa adherida en la superficie del material, mediante la microbalanza de cristal de cuarzo, resultó útil para la estimación de la cantidad de proteínas adsorbidas en la superficie.

El uso de la ecuación de Sauerbrey para la realización de los cálculos de ganancia de masa fue adecuada en este caso debido a que fue comprobado que sobre los datos de frecuencia y masa, no tuvieron efecto variables relacionadas con cambios viscoelásticos. Los cambios de frecuencia observados en el transcurso del proceso de adsorción de ASB sobre electrodos de otro sin recubrimiento se muestran en la figura 33.

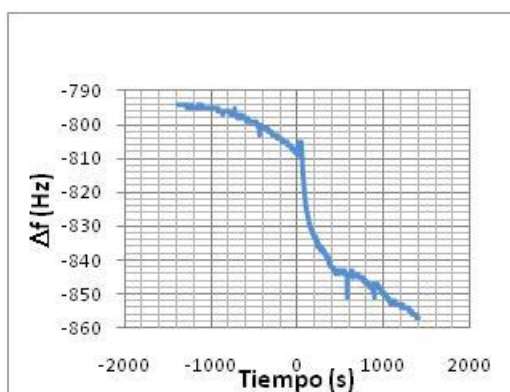


Figura 33. Variación de la frecuencia de resonancia del cristal de cuarzo piezoeléctrico con el tiempo (se adiciono ASB en $t=0$)

En el momento de la adición de proteína se observa una disminución abrupta de la frecuencia de resonancia fundamental del cristal de cuarzo, mostrando que se produce la adsorción de ASB sobre la superficie del electrodo. Mediante la realización de cálculos y utilizando la ecuación de Sauberbrey se obtuvo la cantidad de proteína depositada, relacionada directamente por la disminución de frecuencia. De igual manera se observa un aumento en la resistencia con el tiempo, justo en el momento en el que se adiciona la proteína a la solución PBS, relacionada directamente con la disminución de frecuencia.

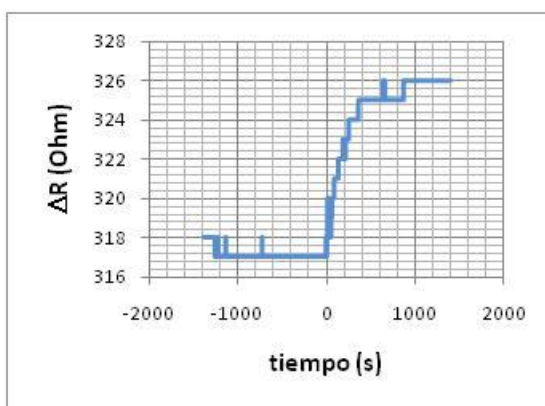


Figura 34. Variación de la resistencia con el tiempo (se adiciono ASB en t= 0)

El efecto de la concentración de la solución proteínica adicionada sobre la ganancia de masa en el electrodo se muestra en la figura 35 en la cual se observa el cambio de frecuencia para ensayos realizados a concentraciones de 0.05 g/L y 0.5 g/L respectivamente.

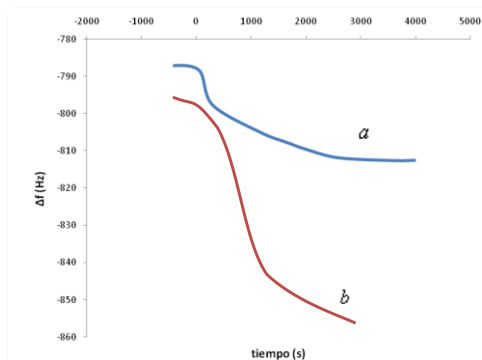


Figura 35. Δf para diferentes concentraciones de ASB. a) 0.05 g/L ASB, b) 0.5 g/L ASB

Como resultado de esta medición, se obtuvieron cambios de frecuencia del orden de 25 Hz, con cambios de masa de $0,44 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para 0,05 g/l de ASB y $\Delta f = 60\text{Hz}$, es decir que la ganancia de masa fue de $\Delta m = 1,06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

En la figura 36 se observa que la ganancia de masa total sobre el electrodo, en un ensayo realizado para un tiempo de 5 horas, es del orden de microgramos por unidad de área, estos pequeños cambios detectados por la gran sensibilidad de la técnica, indica la formación de una monocapa de moléculas de ASB adsorbida sobre la superficie metálica.

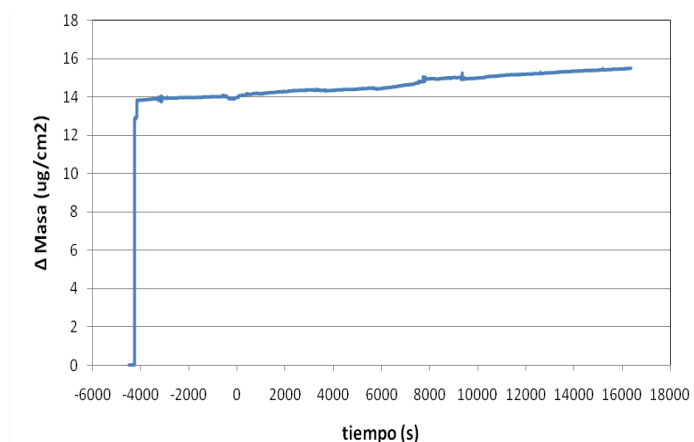


Figura 36. Ganancia de masa sobre el electrodo de oro durante el proceso de adsorción de ASB. Adición 0.5g/L de ASB en $t = 0\text{s}$

Para la adsorción de ASB sobre el material PLA/PLG/HAP/quitosano se obtuvo un cambio de frecuencia, por medio de la microbalanza de cristal de cuarzo, del orden de 10400 Hz (Figura 37), según la ecuación de Sauerbrey, este cambio de frecuencia corresponde a $\Delta m = 183,78 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

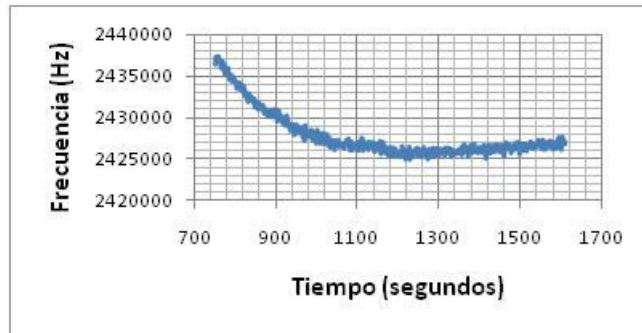


Figura 37. Δf para adsorción de ASB sobre PLA/PLG/HAP/Quitosano.

Teniendo en cuenta los ensayos realizados sin adición de proteína, se comprobó que debido a las propiedades hidrofílicas del recubrimiento polimérico, estos valores para el cambio de frecuencia obtenidos se deben principalmente a la absorción de agua por parte del material. Un valor corregido restando el Δf debido al agua dio como resultado cambios de frecuencia del orden de $\Delta f \approx 500$ Hz.

En trabajos anteriores se han caracterizado exitosamente las interacciones entre proteínas y superficies sólidas de electrodos por medio de ensayos de impedancia [56-61]. La figura 38 muestra los espectros de Nyquist para el sistema en una solución libre de proteína y con adición de ASB.

Se presenta la respuesta obtenida al graficar la impedancia real Vs impedancia imaginaria (Figura 38a) y el ángulo de fase Vs frecuencia (Figura 38b) para ensayos realizados con una concentración final de 0,05 g/l de ASB cada hora.

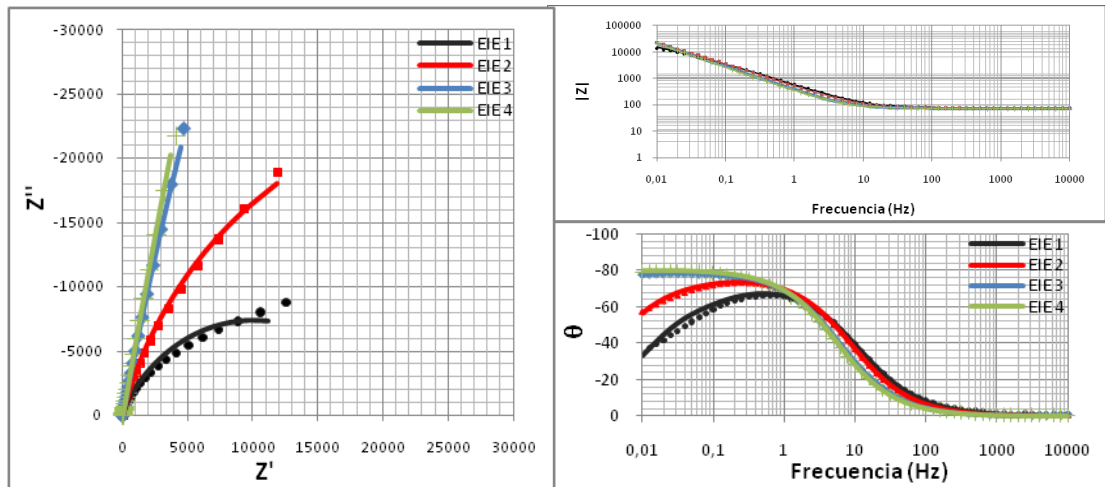


Figura 38. Espectros de impedancia realizados con concentración de 0,05 g/l ASB. (a) Diagrama de Nyquist. (b), Diagrama de Bode. Datos experimentales. (●)EIE 1(0 g/l ASB), (■) EIE 2, (1 hora después de adición de 0,05 g/l de BSA) (◆) EIE 3 (2 horas después de adición de 0,05 g/l de BSA), (+) EIE 4 (3 horas después de adición de 0,05 g/l de BSA)). Datos Ajustados (—EIE 1(0 g/l ASB), — EIE 2, — EIE 3, — EIE 4) En solución PBS, pH= 7,4.

En las graficas de Nyquist y Bode de los ensayos de espectroscopia de impedancia electroquímica, realizados para la de la adsorción de colágeno y BSA, se presentaron tres constantes de tiempo. De acuerdo con esto, se representó el sistema mediante un circuito eléctrico equivalente (figura 39), en el que la combinación de resistencias (R) y elementos de fase constante (EFC) representan los componentes físicos del sistema. Estos componentes eléctricos representan la pérdida de energía por medio de las resistencias y el almacenamiento de energía, por medio de los EFC [78].

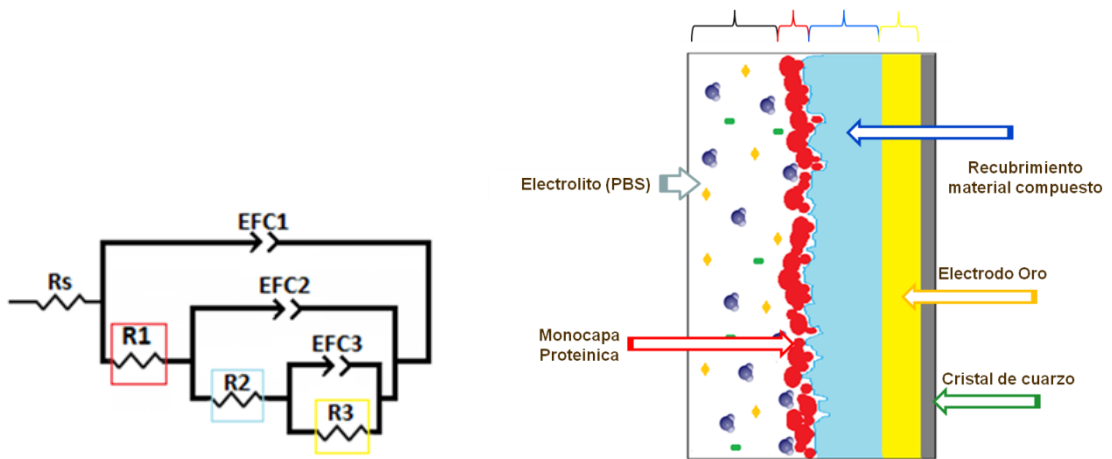


Figura 39. Modelo de circuito equivalente propuesto

Los datos ajustados de los elementos eléctricos de este circuito equivalente, el cual representa el sistema electrolito/proteína/recubrimiento/electrodo, permiten determinar las variaciones en la adsorción superficial de las dos proteínas utilizadas. Los elementos del circuito equivalente son: R_s es la resistencia del electrolito (solución PBS, pH=7,4) entre el electrodo de referencia de Ag/AgCl y el electrodo de trabajo, EFC1 representa el elemento de fase constante a altas frecuencias, R1 la resistencia a la transferencia de carga debida a la formación de la monocapa proteínica, EFC2 es el elemento de fase constante relacionado con la proteína adherida en la superficie del recubrimiento, R2 representa la resistencia producida por la presencia de poros en la superficie de los recubrimientos en la interfase recubrimiento/electrolito, EFC3 representa la capacitancia de doble capa eléctrica, y R3 es la resistencia en la interfase electrodo/recubrimiento. El modelo obtenido representa el mecanismo de adsorción que corresponde a la interacción en paralelo de las constantes de

tiempo que conforman la interfase $(EFC_1 \times R_1) / (EFC_2 \times R_2)$ ^[69]. El modelo de elementos eléctricos relacionados con las reacciones del electrodo y con los parámetros de adsorción, de acuerdo al modelo de ajuste de los espectros es:

$$Z = R_{\Omega} (EFC_1 [R_1 (EFC_2 \times R_2 (EFC_3 \times R_3))]) \quad [23]$$

Donde, $EFC = \alpha C$, siendo α , la fase del elemento de fase constante la capacitancia o el factor que representa el efecto de las heterogeneidades superficiales del electrodo sobre la transferencia de carga, o el factor de alejamiento de la idealidad de una capacitancia pura. Reemplazando αC en la ecuación 23.

$$Z = R_{\Omega} (\alpha_1 C_1 [R_1 (\alpha_2 C_2 \times R_2 (\alpha_3 C_3 \times R_3))]) \quad [24]$$

Siendo,

$$C_{ads} = \frac{F^2 A \Gamma}{4RT} \quad [25]$$

Donde: C_{ads} es la capacitancia de adsorción medida en la interfase proteína/recubrimiento (C_1), F es la constante de Faraday, A es el área superficial del electrodo, Γ es la cantidad de proteína adsorbida, R es la constante de los gases, T es la temperatura de la prueba.

$$Z = R_{\Omega} \left(\alpha_1 \frac{F^2 A \Gamma}{4RT} [R_1 (\alpha_2 C_2 \times R_2 (\alpha_3 C_3 \times R_3))]) \right) \quad [26]$$

Este modelo de elementos resistivos de impedancia, descrito a partir del modelo de circuitos equivalentes, permite describir el mecanismo de adsorción de

proteínas sobre recubrimientos depositados en sustratos de electrodo en función de la cantidad de proteína adsorbida.

6.3.2 Representación del proceso de adsorción proteínica a la isoterma de Langmuir

Los procesos de adsorción de proteínas sobre superficies sólidas han sido descritos en trabajos anteriores mediante isothermas de Langmuir ^[62-63]. En el presente trabajo se determinó que los procesos de adsorción de colágeno y ASB pueden ser ajustados y descritos según este modelo de isoterma. El valor de $1/R_{tc}$ fue corregido restando el valor del inverso de la resistencia obtenido para ensayos sin adición de proteína $(1/R_{tc})_0$.

$$(1/R_{tc})_c = (1/R_{tc}) - (1/R_{tc})_0 \quad [27]$$

Graficas de la resistencia a la transferencia de carga corregida, contra la concentración de proteína (anexo II, III), muestran una relación inversa entre la resistencia a la transferencia de carga y la concentración de proteína, de acuerdo con esto y en concordancia con trabajos anteriores ^[64], la magnitud del inverso de la resistencia a la transferencia de carga $1/R_{tc}$ puede ser correlacionado con la concentración superficial Γ .

$$\frac{c}{\Gamma} = \frac{1}{\Gamma_{max} * K_L} + \frac{c}{\Gamma_{max}} \quad [28]$$

$$\frac{c}{(1/R_{tc})_c} = \frac{1}{(1/R_{tc})_{max} * K_L} + \frac{c}{(1/R_{tc})_{max}} \quad [29]$$

A partir de las graficas cR_{tc} contra la concentración de colágeno y ASB, y aplicando el modelo para las isothermas de Langmuir, se obtuvieron las relaciones lineales mostradas en la figura 40.

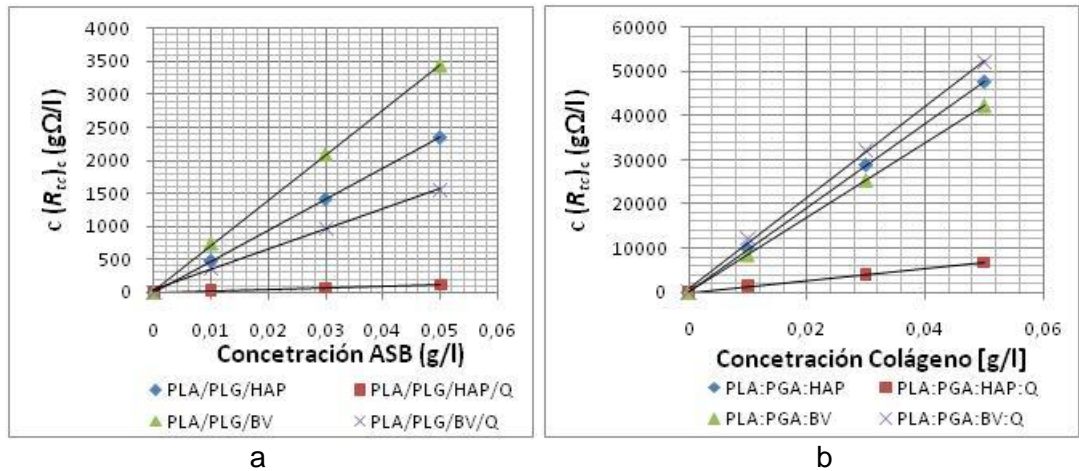


Figura 40. Dependencia de cR_{tc} con la concentración de proteína. Isothermas de Langmuir presentadas en su forma linealizada. $T= 308K$, (a) adsorción ASB, (b) adsorción colágeno

Los parámetros K_L y Γ_{max} fueron obtenidos a partir de la pendiente y del intercepto de las graficas anteriores, aplicando la ecuación 29, se calcularon los valores Γ las cuales permitieron graficar las isothermas para la adsorción de ASB y colágeno sobre las superficies de cada material. Por medio de la siguiente ecuación:

$$\Gamma = \frac{\Gamma_{max} * K_L * c}{1 + K_L * c} \quad [30]$$

El conveniente ajuste entre los valores experimentales obtenidos y los calculados, mostraron que las isotermas de Langmuir describen correctamente la formación de monocapas de proteína sobre los recubrimientos. Las isotermas obtenidas se muestran en las figuras 41 y 42.

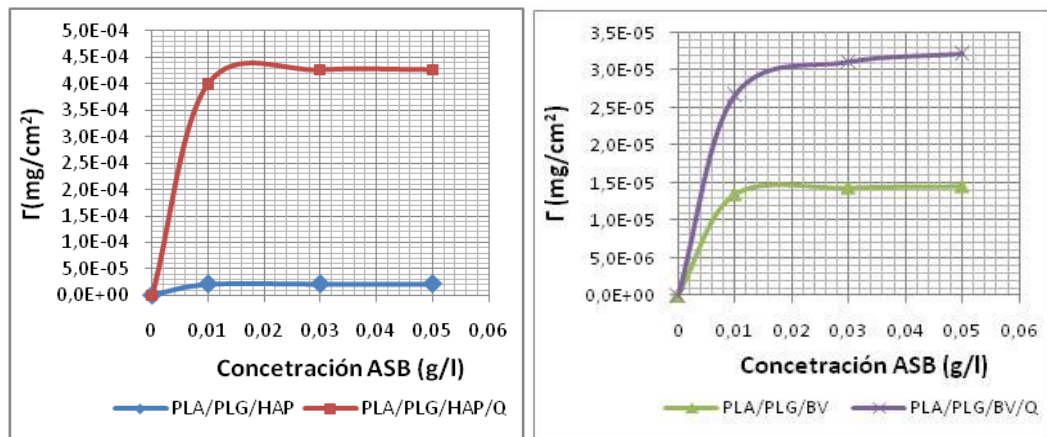


Figura 41. Isotermas de adsorción de ASB sobre recubrimientos poliméricos, en solución PBS. T=308K.

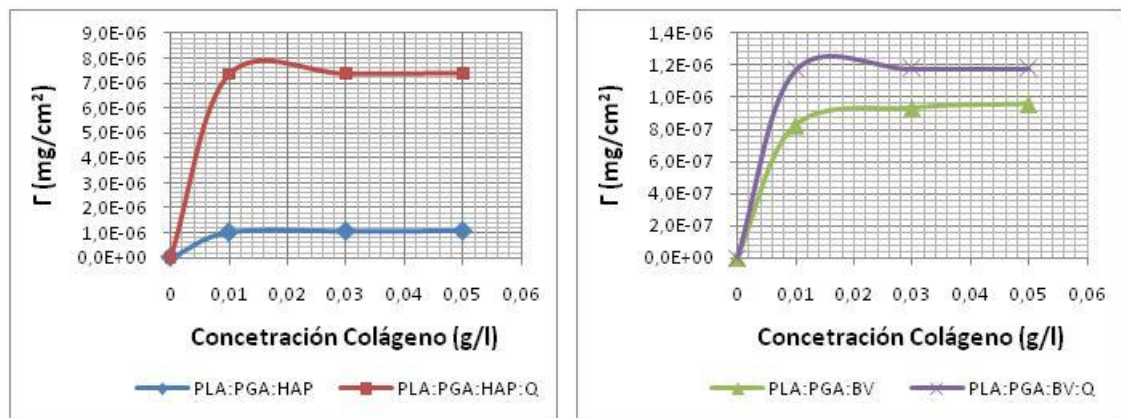


Figura 42. Isotermas de adsorción de colágeno sobre recubrimientos poliméricos, en solución PBS. T=308K.

Las isotermas de adsorción reflejan una gran afinidad tanto de ASB como de colágeno con las superficies modificadas con quitosano y un incremento de la adsorción en los recubrimientos con hidroxiapatita.

Las figuras 43 y 44 muestran la variación de la concentración de proteína adsorbida máxima con la temperatura. Se observa que la dependencia de r_{\max} con la temperatura es inversa en el caso de la adsorción de colágeno sobre el recubrimiento de PLA/PLG/BV y PLA/PLG/BV/Q obteniéndose la cantidad adsorbida de colágeno máxima a temperatura ambiente y mostrándose una desorción con el aumento de la temperatura; mientras que para los ensayos con ASB se presentó una mayor adsorción para temperaturas mayores a 298K.

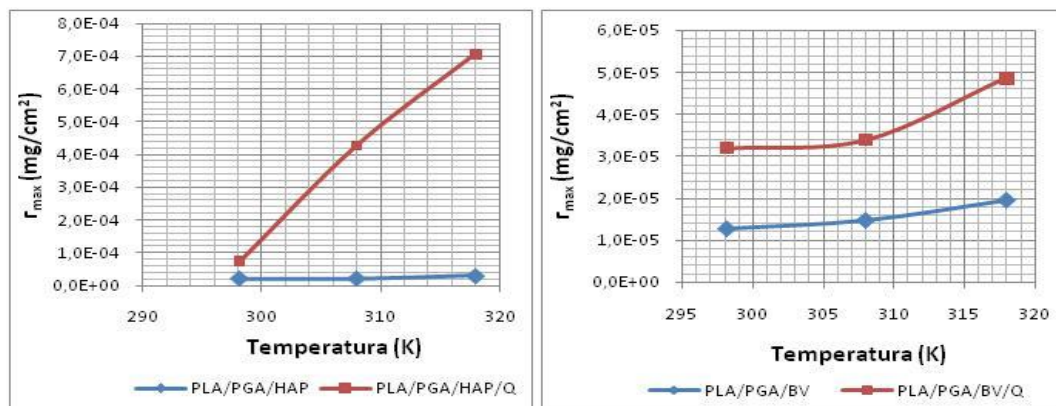


Figura 43. Dependencia de la cantidad adsorbida máxima de ASB sobre los materiales estudiados, con la temperatura.

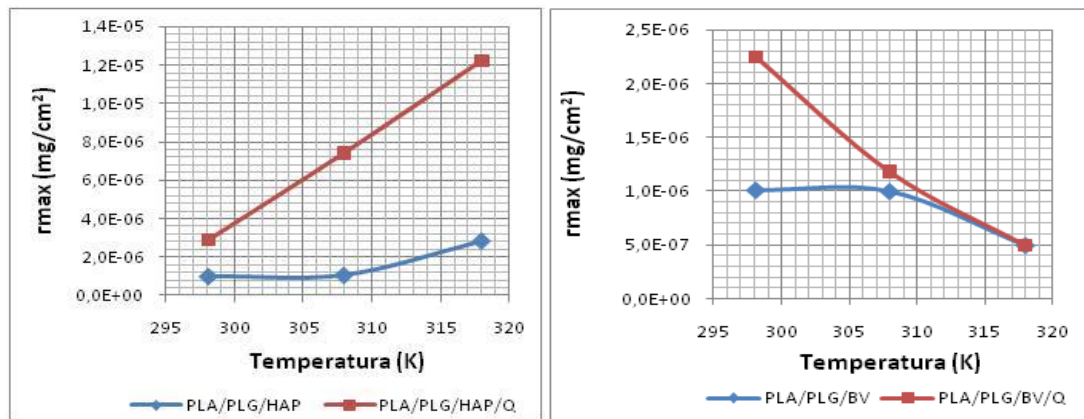


Figura 44. Dependencia de la cantidad adsorbida máxima de colágeno sobre los materiales estudiados, con la temperatura.

Los valores de r_{max} para la ASB adsorbida a temperatura ambiente fueron comparados con los valores promedio de r_{max} obtenidos por medio de diferentes técnicas a la misma temperatura, y se encontró que en el caso de ASB sobre PLA/PLG/HAP/Q los valores obtenidos fueron cercanos.

En cuanto a la dependencia de la concentración de proteína sobre la temperatura se pudo observar un mayor efecto en los ensayos realizados con ASB, para los materiales modificados con quitosano la cantidad de ASB adsorbida aumentó con el aumento en la concentración de proteína, mientras que en el caso de colágeno, la cantidad adsorbida se mantuvo casi constante con el aumento en su concentración. Esto corrobora la mayor afinidad de las moléculas de ASB con la superficie de los materiales estudiados.

6.3.3 Determinación de la energía de adsorción de Gibbs a partir de los parámetros electroquímicos obtenidos.

Los datos de impedancia obtenidos fueron utilizados para determinar los valores del cambio de energía de adsorción de Gibbs (ΔG_{ads}). Esta se relaciona con el parámetro K_L que refleja la afinidad de las moléculas de proteína adsorbidas sobre los sitios de adsorción a temperatura constante, mediante la siguiente ecuación^[77]:

$$\Delta G_{ads} = -RT \ln(55,5 * K_L) \quad [31]$$

Los valores negativos obtenidos para la energía de Gibbs de adsorción indican, adsorción espontánea sobre la superficie de los cuatro recubrimientos poliméricos evaluados, tanto para los ensayos realizados con ASB, como con colágeno.

En las figuras 41 y 42, se muestra las graficas que relaciona la dependencia de $-\Delta G_{ads}$ con el incremento de temperatura en un rango de valores entre 298 y 318K. Para la adsorción de ASB se observa que la adsorción se favorece a mayor temperatura para los recubrimientos de PLA/PLG/HAP y el recubrimiento de hidroxiapatita modificado con quitosano (PLA/PLG/HAP/Q); mientras que para los recubrimientos que contienen biovidrio la temperatura no afectó significativamente los valores de ΔG_{ads} .

Para los cuatro materiales se obtuvieron valores de ΔG_{ads} similares a temperatura ambiente, indicando un grado de afinidad similar de proteína sobre los recubrimientos. Adicionalmente se observó que la modificación con quitosano, resultó en una disminución en la energía libre de Gibbs de adsorción para el material compuesto con hidroxiapatita para temperaturas por encima de 298K, indicando una mayor afinidad de las proteínas sobre el recubrimiento con modificación química, mientras que para el material compuesto con biovidrio se observó un aumento en la energía libre de Gibbs de adsorción para el material modificado con quitosano.

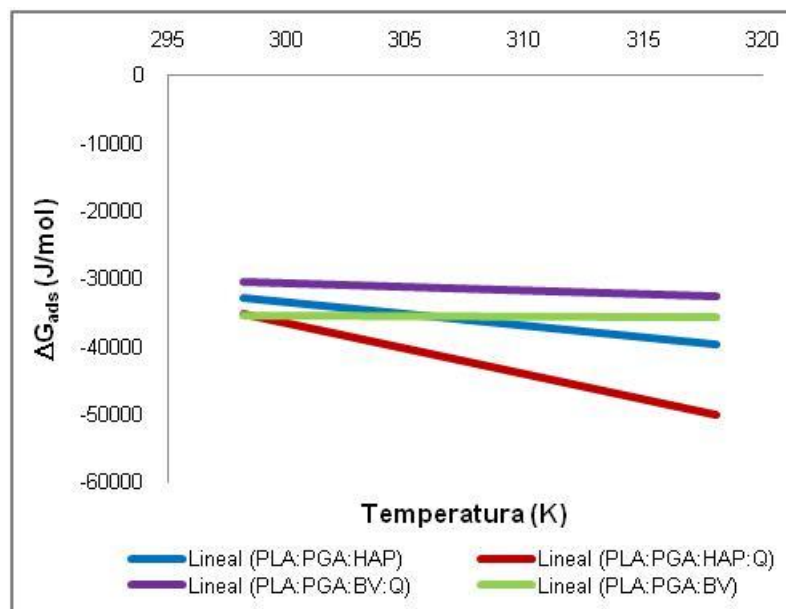


Figura 45. Energía de adsorción de Gibbs Vs Temperatura para adsorción de ASB. Solución de Fosfatos pH=7,4.

Los resultados de la dependencia de la energía de adsorción de Gibbs con la temperatura del colágeno sobre los cuatro recubrimientos, indican, al igual que

para la proteína ASB, que el proceso de adsorción es espontáneo. A temperatura ambiente, los valores de ΔG_{ads} para los ensayos realizados con colágeno se presentaron en un rango entre -41,93 y -33,22 KJ/mol, estos valores son menores a los obtenidos para los ensayos realizados con ASB a la misma temperatura, los cuales fueron entre -35,72 y -29,92 KJ/mol, lo cual indica procesos de adsorción más espontáneos para el colágeno sobre los diferentes recubrimientos con respecto a los ensayos con ASB. Sin embargo, a mayor temperatura (318 K), se determinó que para la adsorción de ASB los valores de ΔG_{ads} fueron entre -49,73 y -31,90 KJ/mol, mientras que para la adsorción de colágeno estos valores fueron entre -39,67 y -34,37 KJ/mol, indicando que a mayores temperaturas la adsorción de ASB ocurre más espontáneamente, mientras que la adsorción de colágeno es más espontánea a temperatura ambiente.

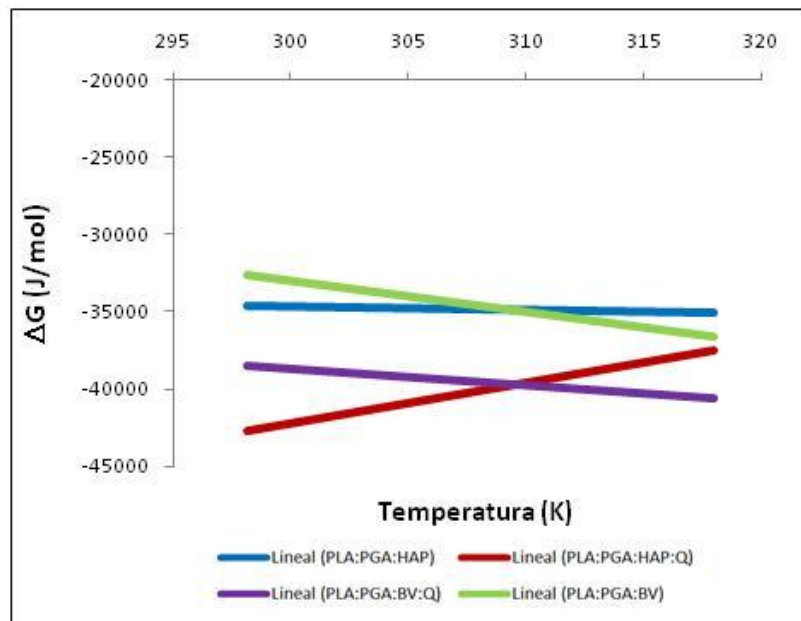


Figura 46. Energía de adsorción de Gibbs Vs Temperatura para adsorción de colágeno. Solución de Fosfatos pH=7,4.

Los valores de ΔG_{ads} indican que la modificación con quitosano favoreció la adsorción de colágeno sobre los recubrimientos. Se observa en todo el rango de temperaturas una disminución en los valores de ΔG_{ads} para PLA/PLG/HAP/Quitosano y PLA/PLG/BV/Quitosano, con lo cual se corrobora que la adsorción de la proteína aumenta con la incorporación de quitosano en el recubrimiento.

A partir del valor de la pendiente y el intercepto de las graficas anteriores se obtuvieron parámetros del cambio de entalpia y entropía (Anexos VI, VII) los cuales indican las reacciones exotérmicas o endotérmicas que se generan durante el proceso de adsorción.

7 CONCLUSIONES

1. La modificación de los recubrimientos dopados con zinc, de PLA/PLG/HAP y PLA/PLG/biovidrio con el aumento de la cantidad de quitosano, presentó un efecto de incremento en el trabajo de adhesión, el cual fue mayor en los recubrimientos con hidroxiapatita que en los recubrimientos con biovidrio. En este orden de ideas, la interacción hidroxiapatita-quitosano con recubrimientos biodegradables presenta mejores propiedades superficiales de adhesión que la de biovidrio-quitosano.
2. Se demostró que para la adsorción de colágeno los recubrimientos con mezclas de polímeros, tanto con hidroxiapatita como con biovidrio, presentaron mayor energía de adsorción a temperatura cercana a la corporal, posterior a la modificación con quitosano. Mientras que para la proteína de albúmina los procesos de adsorción fueron más espontáneos en las superficies de los polímeros con hidroxiapatita, independientemente del contenido de quitosano en el recubrimiento.

3. El comportamiento electroquímico de los recubrimientos observado en los diagramas de Bode y Nyquist son representados satisfactoriamente por medio de un modelo de elementos resistivos obtenido de un circuito equivalente, que representa y ajusta los parámetros obtenidos y las interfases (electrolito PBS / monocapa proteínica / recubrimiento poroso / Cristal de cuarzo), relacionando la impedancia total del sistema con la cantidad de proteína adsorbida.

4. El ajuste de los datos de cantidad de proteína adsorbida contra la concentración de proteína en un modelo de isoterma de Langmuir, concuerda correctamente con un modelo de monocapa adsorbida.

5. El material compuesto que presentó mejores propiedades superficiales y el mejor comportamiento en cuanto a adsorción de proteínas fue el material con relación matriz polimérica/ hidroxiapatita 70/30, modificado mediante la adición de 0,5% en peso de quitosano.

8 RECOMENDACIONES

Para complementar los resultados obtenidos en el presente en este trabajo, se recomienda evaluar el desempeño del material compuesto modificado con quitosano mediante ensayos de citocompatibilidad in vivo y realizar estudios para valuar el efecto del quitosano sobre la velocidad de degradación del material en contacto con fluidos fisiológicos, en futuras investigaciones.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Ratner, Buddy; Hoffman, Allan; Schoen, Frederick; Lemons, Jack. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Elsevier Academic Press; 2004.
2. San Roman, J. Sastre, S. *Biomateriales*. CYTED Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Faenza Editorial Iberica. Italia 2004.
3. Rojas, Manuel. Vallejo, Bibiana. Perilla, Jairo E. *Biopolymers as materials for developing products in pharmaceutical applications and biomedical uses*.
4. Sabino, Marcos A. *Modificación de Superficies de Biomateriales Poliméricos y Estudios de Biocompatibilidad*. Rev. Iberoam. Polim., 9(3), 2008. 206-210
5. K. Rezwana, Q.Z. Chena, J.J. Blakera, Aldo Roberto Boccaccinia. *Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering*. *Biomaterials*. 27 (2006) 3413–3431
6. Böstman O. Current concepts review. *Absorbable implants for fracture fixation*. Journal of bone joint surgery 1991; 73A:148-153.
7. Cayron, Mélissa. *Nuevas formulaciones de cementos de fosfato de calcio macroporosos para la regeneración ósea*. Memorias ETSEIB Barcelona, 2005.
8. Rokkanen P. *Bioabsorbable fixation in orthopaedic surgery and traumatology*. *Biomaterials* 2000; 21:2607-2613.
9. Nurhan, Onar. *Usage of Biopolymers In Medical Applications*., Pamukkale University. Turkey.
10. Törmälä P, Pohjonen T, Rokkanen P. *Bioabsorbable Polymers: materials technology and surgical applications*. Proc Inst Mech Engrs 1998; 212(H):101-111.
11. M. Vert, G. Schwach, R. Engel, J. Coudane. *Something New in the Field of PLA/GA Bioresorbable Polymers?* Journal of Controlled Release 53 (1998) 85–92
12. Athanasiou KA, Agrawal CM, Barber FA, Burkhart S. *Orthopaedic applications for PLA-PGA biodegradable polymers*. Arthroscopy 1998; 14(7):726-737.
13. Motta, A.C., Duek, E.A.R. Síntese, Caracterização e Degradação “in vitro” do poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico). Revista Matéria, v. 11, n.3, Sorocaba, Brasil. 2006. p.340 – 350

14. Gong, Q. Wang, Li-Qun Tua, K. In situ polymerization of starch with lactic acid in aqueous solution and the microstructure characterization. *Carbohydrate Polymers*. 64:501-509 (2006).
15. Kulkarni R., Moore R. G., Hegyeli A. F.; Biodegradable Poly(lactic acid) Polymers. *Journal of Biomedical Materials Research*, 5:169-181 (1971)
16. Navarro, Melba Eugenia. *Desarrollo y Caracterización de Materiales Biodegradables para Regeneración Ósea*. Memoria de tesis de Doctorado en Ingeniería Química. Universitat Politècnica de Catalunya. 2005
17. Bornstein, P., and Sage, H., Structurally distinct collagen types. *Ann. Rev. Biochem.*, 49, (1980) 957-1003
18. Lárez Velásquez, Cristóbal. *Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro*. *Avances en Química*, 1(2), 15-21 (2006)
19. K. Francis Suh, Howard W.T. Matthew. *Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering*. *Biomaterials*. 21 (2000) 2589-2598
20. In-Yong Kim, et. al. *Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications*. *Biotechnology Advances* 26 (2008) 1–21
21. Martínez, Ricardo. Estupiñán, Hugo. Córdoba, Elcy. Peña, Darío Y. Mohan, Paul A. *Efecto del Chitosán en el Comportamiento Electroquímico de Recubrimientos de Fosfatos de Calcio*. *Scientia Et Technica*, septiembre, año/vol. XIII, número 036 Universidad Tecnológica de Pereira Pereira, 2007 pp. 221-225
22. Yan Wu, Yongli Zheng, et. al. *Synthesis and characterization of a novel amphiphilic chitosan–polylactide graft copolymer*. *Carbohydrate Polymers* 59 (2005) 165–171
23. *Surfaces and Interfaces for Biomaterials*. Edited by Pankaj Vadgama. Published by Woodhead Publishing Limited Abington Hall, Abington Cambridge England
24. Spencer, Nicholas D. and Textor, Marcus. *Surface Modification, Surface Analysis, and Biomaterials*. Laboratory for Surface Science and Technology. Department of Materials, ETH Zürich
25. Bard, Allen J. Faulkner, Larry R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. Department of Chemistry and Biochemistry University of Texas. 2001
26. Ward, M. D.; Delawski, E. J. *Anal. Chem.* 1991, 63, 886.
27. Zuxuan Lin and Michael D. Ward. Determination of Contact Angles and Surface Tensions with the Quartz Crystal Microbalance. *Anal. Chem.* 1996, 68, 1285-1291

28. David S. Salloum. *Surfaces Modified With Polyelectrolyte Multilayers For Bio-Interface Applications*. Tesis Doctoral. 2004
29. Rodríguez, José. González, Cristina. Gómez, José L. Monleón, Manuel. Salmerón, Manuel. *Conformación de proteínas sobre materiales soporte para terapias regenerativas*. 2008, Segovia-España
30. Adamson, A.W. *Physical chemistry of surfaces*. Fifth edition. John Wiley & Sonc, Inc.
31. Salager, Jean-Louis. *Adsorción y Mojabilidad*. Cuaderno FIRP S160A. Modulo de Enseñanza en Fenómenos Interfaciales. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela. Versión # 2 (1988)
32. S., K. Milonjić. *A consideration of the correct calculation of thermodynamic parameters of adsorption*. J. Serb. Chem. Soc. 72 (12) 1363–1367 (2007)
33. Straumann et al. *Prótesis que pueden implantarse por vía quirúrgica*. N° 219318. (1980)Oficina española de patentes y marcas.
34. D. Buser et al. *Influencia de las características de la superficie en la integración en el hueso de los implantes de titanio*. Journal of Biomedical Materials research, Vol. 25, 889-902 (1992)
35. Po-Liang Lin, Hsu-Wei Fang, Tiffany Tseng, Wun-Hsing Lee. *Effects of hydroxyapatite dosage on mechanical and biological behaviors of polylactic acid composite materials*. Materials. Letters 61 3009–3013
36. Majeti N.V Ravi .Kumar *A review of chitin and chitosan applications*. Reactive and Functional Polymers. Volume 46, Issue 1, November 2000, Pages 1-27
37. Chatelet, C., O. Damour and A. Domard, 2001. *Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films*. Biomaterials, 22: 261-268.
38. Varawut Tangpasuthadol, Noppong Pongchaisirikul, Vipavee P. Hoven. *Surface modification of chitosan films. Effects of hydrophobicity on protein adsorption*. Carbohydrate Research 338 (2003) 937–942.
39. Luminita Balau, Gabriela Lisa, M.I. Popa, V. Tura, V. Melnig. *Physico Chemical properties of Chitosan films*. CEJC 2(4) 2004 638–647.
40. Kim SB, Kim YJ, Yoon TL, et al. *The characteristics of a hydroxyapatite-chitosan-PMMA bone cement*. Biomaterials 2004;25:5715–23
41. Cárcamo, Carla. *Preparación de Films de Complejo Polielectrolito Quitosano-Alginato y Comparación de sus Propiedades Mecánicas y Biológicas con Films de Quitosano*. Memoria Para Optar al Título de Químico Farmacéutico. Universidad de Chile. 2005

42. Hsieh, Chien-Yang. Tsaia, Sung-Pei. Wang, Da-Ming. Changb, Yaw-Nan. Hsieha, Hsyue-Jen. *Preparation of g-PGA/chitosan composite tissue engineering matrices Biomaterials*. 26 (2005) 5617–5623
43. Peniche, Carlos Andrés. *Estudios sobre Quinina y Quitosana*. Tesis en opción del Grado Doctor en Ciencias. Ciudad de La Habana: Editorial Universitaria, 2006.
44. Fimbeau Sebastien, Grelier Stephane, Alain Copinet, Veronique Coma. Novel biodegradable films made from chitosan and poly(lactic acid) with antifungal properties against mycotoxinogen strains. *Carbohydrate Polymers* 65 (2006) 185–193
45. Xiong Lu et al. *Preparation of HA/chitosan composite coatings on alkali treated titanium surfaces through sol-gel techniques*. *Materials Letters* 61 (2007) 3970–3973
46. Kirchhof, Kristin (K); Groth, Thomas (T). *Surface modification of biomaterials to control adhesion of cells*. vol 39 (issue 1-4) : pp 247-51
47. M. García, A. Pinotti, M. Martino, N. Zartzky. *Electrically treated composite films based on chitosan and methylcellulose blends*. *Food Hydrocolloids* 23 (2009) 722–728
48. Biljana A. Cavic and Michael Thompson. Protein adsorption to organosiloxane surfaces studied by acoustic wave sensor. *Analyst*, 1998, 123, 2191–2196.
49. H. Stadler, M. Mondon, C. Ziegler. *Protein Adsorption on Surfaces: Dynamic Contact-Angle (DCA) and Quartz Crystal Microbalance (QCM) Measurements*. *Anal Bioanal Chem* (2003) 375:53–61.
50. Massood Z. Atashbar, Bruce Bejcek, Aditya Vijn, Srikanth Singamaneni. *QCM biosensor with ultra thin polymer film*. *Sensors and Actuators B* 107 (2005) 945–951
51. Youyu Zhang, Yingsing Fung, Hui Sun, Derong Zhu, Shouzhuo Yao. *Study of protein adsorption on polymer coatings surface by combining quartz crystal microbalance with electrochemical impedance methods*. *Sensors and Actuators B* 108 (2005) 933–942
52. R. Etchenique, V. L. Brudny. Characterization of Porous Thin Films Using Quartz Crystal Shear Resonators. *Langmuir* 2000, 16, 5064-5071
53. Shi, Guixin. Rouabhiab, Mahmoud. Zhaoxu, Wanga. Zhanga, Ze. Dao, Le H. *A novel electrically conductive and biodegradable composite made of polypyrrole nanoparticles and polylactide*. *Biomaterials* 25 (2004) 2477–2488
54. Guimarda, Nathalie K. Gomez, Natalia. Schmidt, Christine E. *Conducting polymers in biomedical engineering*. *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 876–921
55. Parada Q. Diana, Gonzalez B. Aurora. *Obtención, electrodeposición y caracterización de un polímero bioabsorbible a partir de ácido L- láctico para aplicaciones biomédicas*.

- Trabajo de Grado, Escuela de Ingeniería Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga (2007).
56. B. Menz, R. Knerr, A. Göpferich, C. Steinem, *Biomaterials*, 26 (2005) 4237.
 57. P. Cosman, K. Fatih, S. Omanovic, S.G. Roscoe, *J. Electroanal. Chem.* 547 (2005).
 58. Moulton, S.E., Barisci, J.N., Bath, A., Stella, R., Wallace, G.G., 2004. *Electrochim. Acta* 49, 4223–4230.
 59. S. Omanovic, S.G. Roscoe. *Electrochemical Studies of the Adsorption Behavior of Bovine Serum Albumin on Stainless Steel*. *Langmuir* 1999, 15, 8315-8321
 60. M. F. Smiechowski, V. F. Lvovich, S. Roy, A. Fleischman, W. H. Fissell, A. T. Riga. *Electrochemical detection and characterization of proteins*. *Biosensors and Bioelectronics*, Vol 22, Issue 5, 2006, Pages 670-677.
 61. J.E.I. Wright, N.P. Cosman, K. Fatih, S. Omanovic, S.G. Roscoe, *J. Electroanal. Chem.* 564 (2004) 185.
 62. N. P. Cosman and Sharon G. Roscoe. *Electrochemical Quartz Crystal Nanobalance (EQCN) Studies of Protein Interfacial Behavior at Pt*. *Langmuir* 2004, 20, 1711-1720
 63. J. E.I. Wright, N. P. Cosman, K. Fatih, S. Omanovic, S. G. Roscoe. *Electrochemical impedance spectroscopy and quartz crystal nanobalance (EQCN) studies of insulin adsorption on Pt*. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 564 (2004) 185–197
 64. S. Omanovic, S.G. Roscoe. *Interfacial Behavior of Lactoglobulin at a Stainless Steel Surface: An Electrochemical Impedance Spectroscopy Study*. *Journal of Colloid and Interface Science* 227, 452–460 (2000)
 65. K. A. Marx. *Quartz Crystal Microbalance: A Useful Tool for Studying Thin Polymer Films and Biomolecular Systems at the Solution–Surface Interface*. *Biomacromolecules*, 2003, 4 (5), 1099-1120
 66. A.W. Bott. *Characterization of Films Immobilized on an Electrode Surface Using the Electrochemical Quartz Crystal Microbalance*. *Current Separations* 18:3 (1999)
 67. K. A. Marx. *The QCM and the EQCM: Applications to Studies of Thin Polymer Films, Biological Macromolecules and Cells*. *Chem Sens Biosens* (2007) 5: 371–424
 68. D.A. Buttry. M. D. Ward. *Measurement of Interfacial Processes at Electrode Surfaces with the EQCM*. *Rev.* 1902, 92, 1355-1379
 69. J.F. Suh, W.T. Matthew. *Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review*. *Biomaterials* 21 (2000) 2589-2598

70. Gómez Ariza, Laura Patricia. Modificación superficial de biopolímeros semiconductores para aplicaciones biomédicas. Trabajo de Grado, Escuela de Ingeniería Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga (2007).
71. Bueno Vera, 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 (2007).
72. Iñaki Tuñón. Tema 7. Superficies sólidas: adsorción y catálisis heterogénea. Curso de Química Física Avanzada. Universitat de València.
73. K. Takahashi, I. Taniguchi, M. Miyamoto, Y. Kimura. Melt/Solid polycondensation of Glycolic acid to obtain high – molecular-weight pol(glycolic acid). *Polymer*, 41, 8725 (2000).
74. Chien-YangHsieh, Sung-Pei Tsai, Da-MingWang, Yaw-Nan Chang, Hsyue-Jen Hsieh. Preparation of g-PGA/chitosan composite tissue engineering matrices. *Biomaterials* 26 (2005) 5617–5623
75. Yu-Chi Wang, Mei-Chiao Lin, Da-Ming Wang, Hsyue-Jen Hsieh. Fabrication of a novel porous PGA-chitosan hybrid matrix for tissue engineering. *Biomaterials* 24 (2003) 1047–1057
76. Matthew F. Smiechowski, Vadim F. Lvovich, Shuvo Roy, Aaron Fleischman, William H. Fissell, Alan T. Riga. Electrochemical detection and characterization of proteins. *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2006) 670–677
77. Slobodan K. Milonjić. A consideration of the correct calculation of thermodynamic parameters of adsorption. *J. Serb. Chem. Soc.* 72 (12) 1363–1367 (2007)
78. Nicholas P. Cosman, Khalid Fatih, Sharon G. Roscoe. Electrochemical impedance spectroscopy study of the adsorption behaviour of a-lactalbumin and b-casein at stainless steel. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 574 (2005) 261–271

10 LISTA DE PUBLICACIONES

Diana Carolina Parada, Darío Yesid Peña, Custodio Vásquez, Pilar González, Hugo Armando Estupiñan.

Obtención de recubrimientos de ácido poli (L-láctico) por electrodeposición catódica sobre sustratos de Ti6Al4V. (Póster)

II Encuentro Nacional de Materiales "Módulo Metales", II Jornada de Corrosión y Protección. Medellín, Noviembre de 2006.

Diana Carolina Parada, Darío Yesid Peña, Custodio Vásquez, Hugo Armando Estupiñan.

Obtención de ácido poli (L-láctico) mediante policondensación con catalizador de cinc metálico.

Scientia et Técnica. Año XIII N°36. Universidad Tecnológica de Pereira. ISSN 0122-1701 255. Septiembre de 2007.

Diana C. Parada, Darío Y. Peña, Custodio Vásquez, Hugo Estupiñán.

Efecto de la cristalinidad sobre la biocompatibilidad electroquímica de recubrimientos de fosfato de calcio obtenidos mediante anodizado por plasma químico, tratados térmicamente.

IV Encuentro Nacional de Materiales. Modulo Compuestos y Recubrimientos. Medellín. 19-21 de Noviembre 2008.

Diana Carolina Parada Q, Darío Yesid Peña B, Custodio Vásquez Q, Dionisio Laverde C, Hugo Armando Estupiñán.

Synthesis, electrodeposition and characterization of a bioabsorbable polymer coating from l-lactic acid for biomedical applications.

Ingeniare. Revista chilena de ingeniería. vol.17, n.3, pp. 365-374. ISSN 0718-3305
2009.

Diana Carolina Parada, Darío Yesid Peña, Custodio Vásquez, Hugo Estupiñán,
Juan C. Jaimes.

Adsorción de proteínas sobre electrodos de oro, mediante microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo (EQCM). ISBN 978-958-8338-68-2

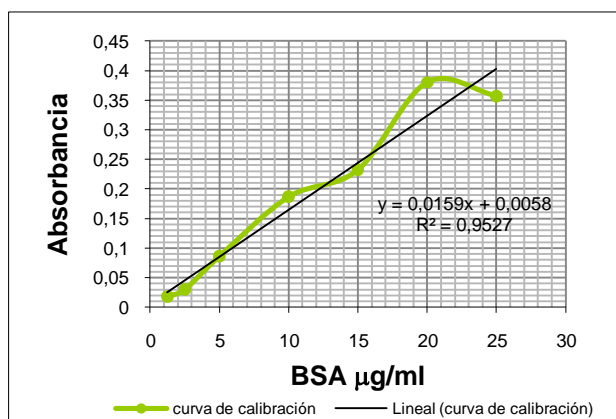
V Congreso Internacional de Materiales. Santiago de Cali. 12-16 de Octubre de
2009.

ANEXOS

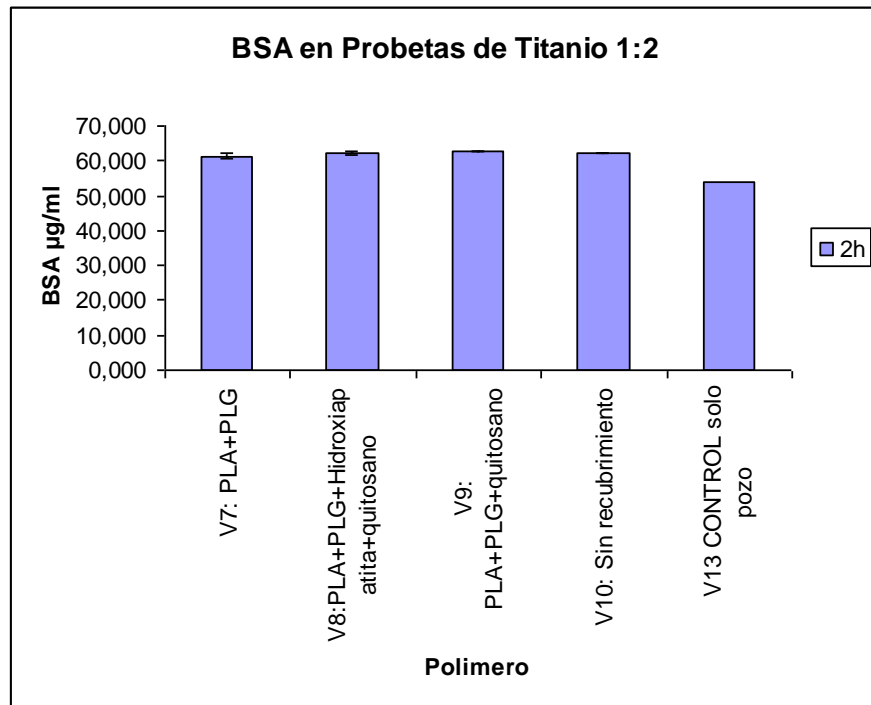
ANEXO I.

Curva de Calibración BSA

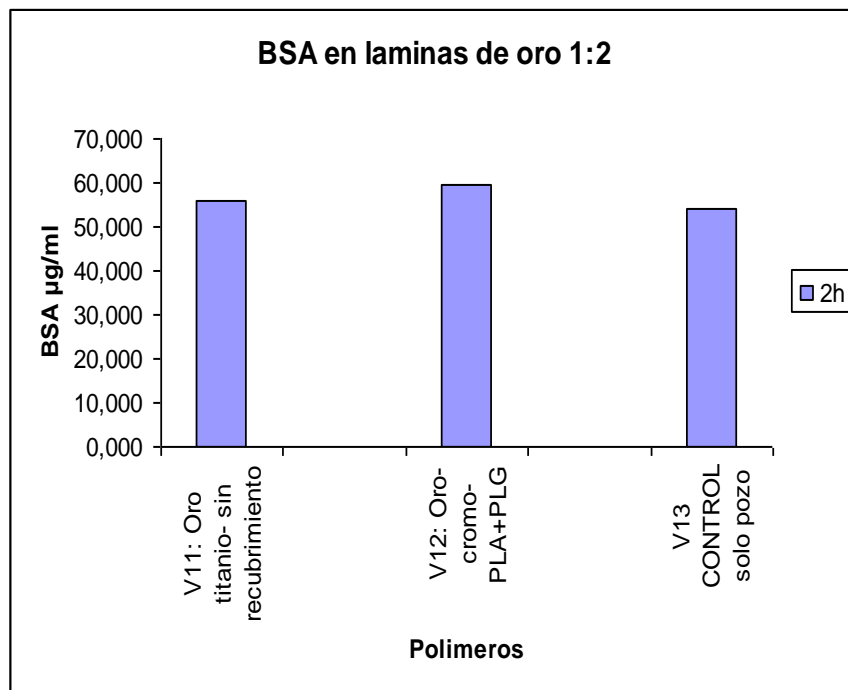
Concentración µg/ml	Absorbancia				Prom	D. estandar	prom- blanco
	1	2	3	4			
25	0,656	0,655	0,655	0,651	0,65425	0,00221736	0,356875
20	0,668	0,669	0,686	0,686	0,67725	0,01011187	0,379875
15	0,54	0,539	0,52	0,519	0,5295	0,01156143	0,232125
10	0,48	0,478	0,49	0,488	0,484	0,00588784	0,186625
5	0,382	0,383	0,385	0,384	0,3835	0,00129099	0,086125
2,5	0,33	0,329	0,326	0,325	0,3275	0,00238048	0,030125
1,25	0,317	0,317	0,315	0,314	0,31575	0,0015	0,018375



ASB sobre recubrimientos en probetas de Ti6Al4V



ASB sobre recubrimientos en Láminas de Oro



ANEXO II

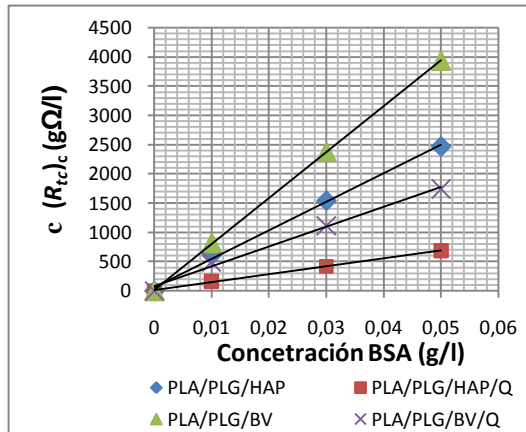
Caracterización Biovidrio (BV)

Resultados Difracción de Rayos X (DRX) Biovidrio

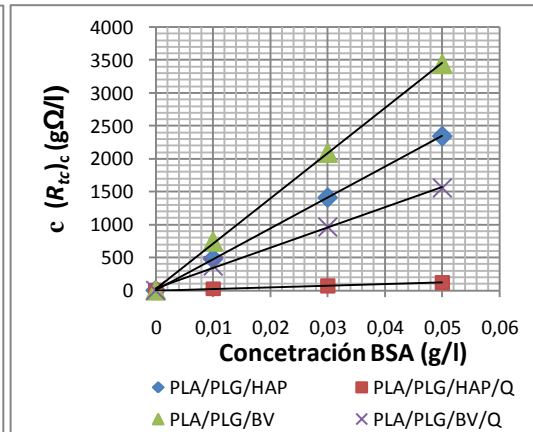
Fase cristalina	Nombre	Cuantitativo %	Desviación estándar
$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hidroxiapatita	31,2	0.4
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Whitlockita	68,8	0.6

ANEXO III.

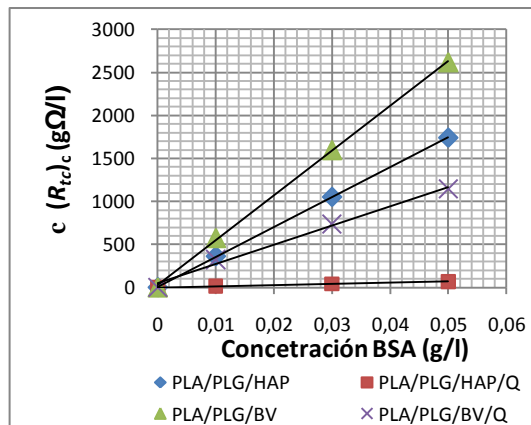
Isotermas de Langmuir para adsorción de ASB presentadas en su forma linealizada.



(a) 298K



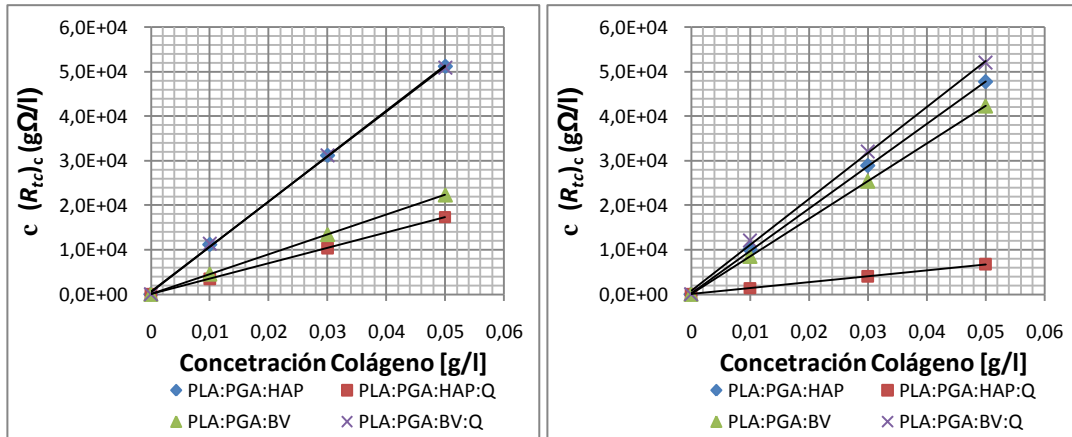
(b) 308K



(c) 318K

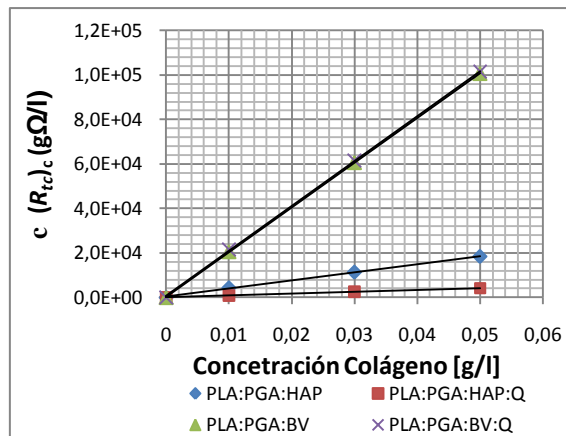
ANEXO IV.

Isotermas de Langmuir para adsorción de colágeno presentadas en su forma linealizada.



(a) 298K

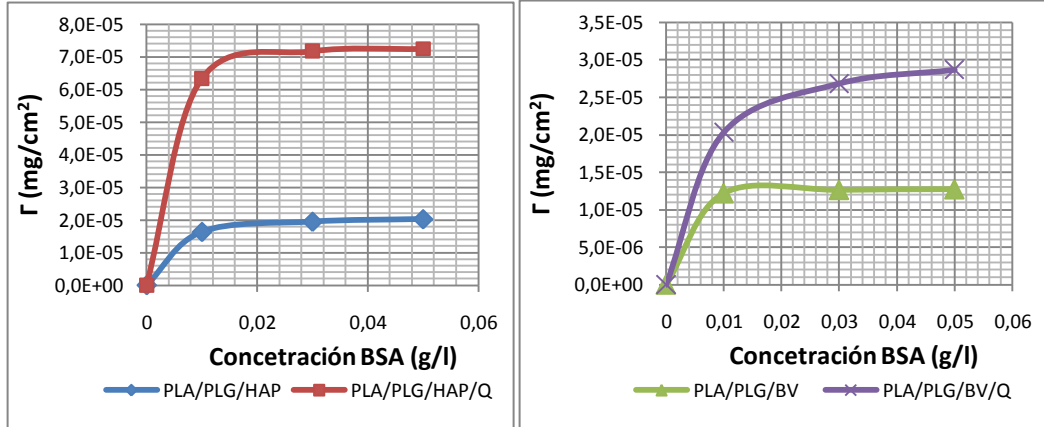
(b) 308K



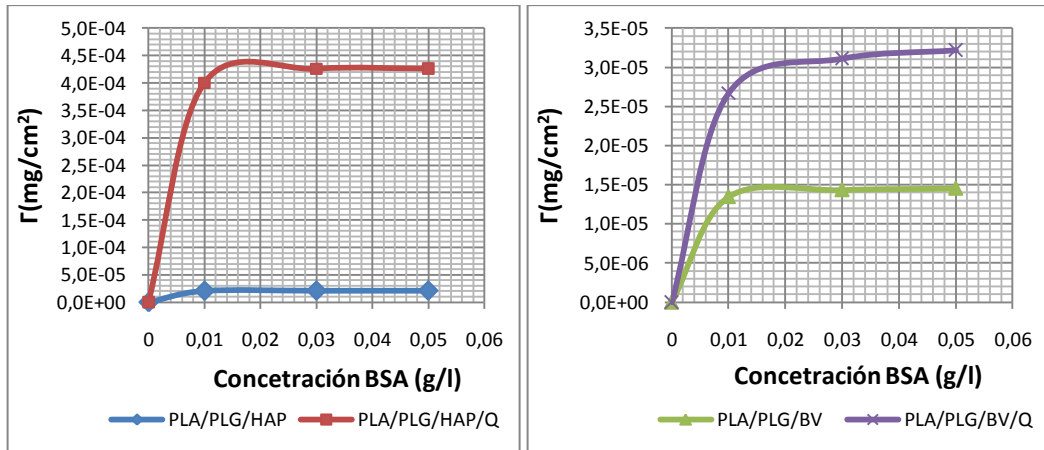
(c) 318K

ANEXO V.

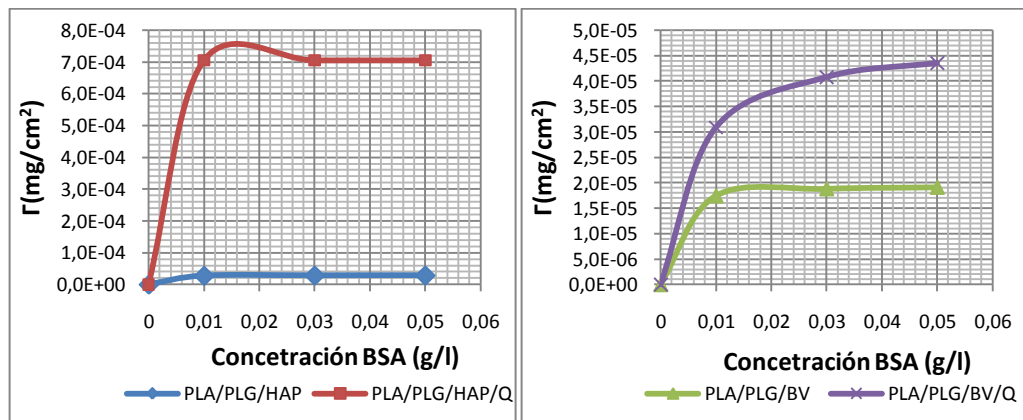
Isotermas de adsorción de ASB adsorbida sobre recubrimientos poliméricos, en solución PBS.



(a) 298K



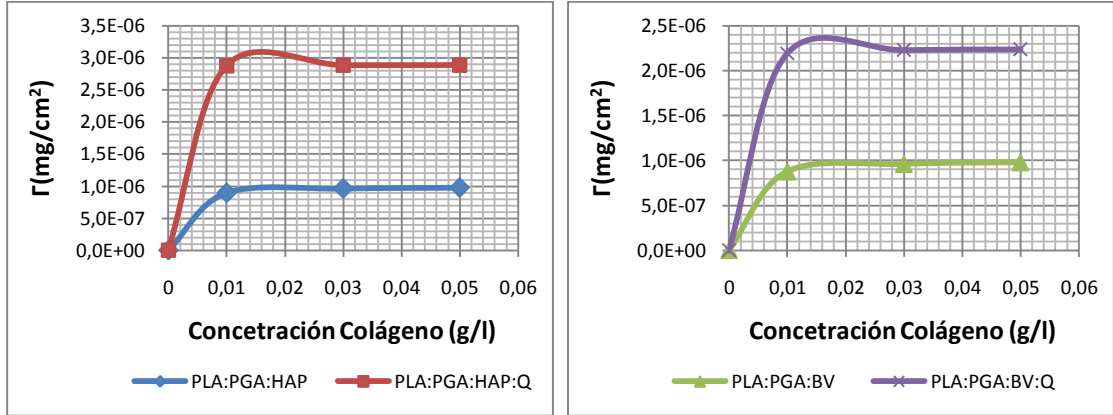
(b) 308K



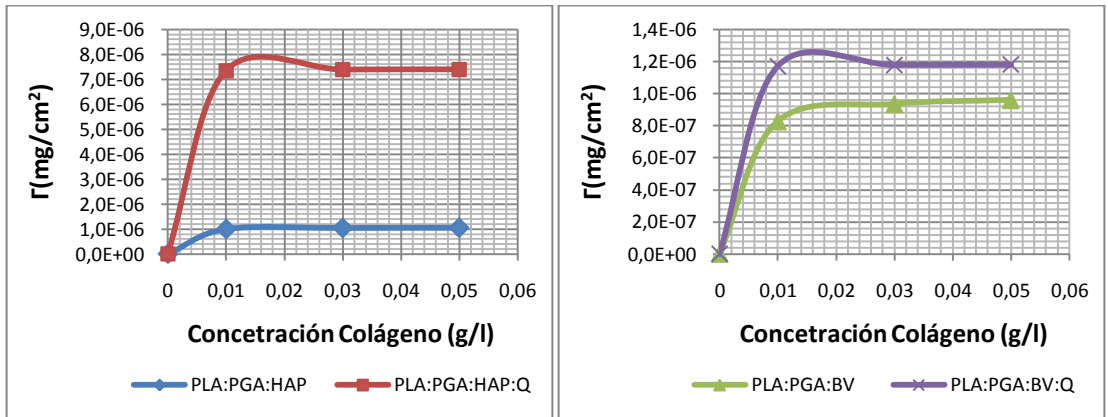
(c) 318K

ANEXO VI.

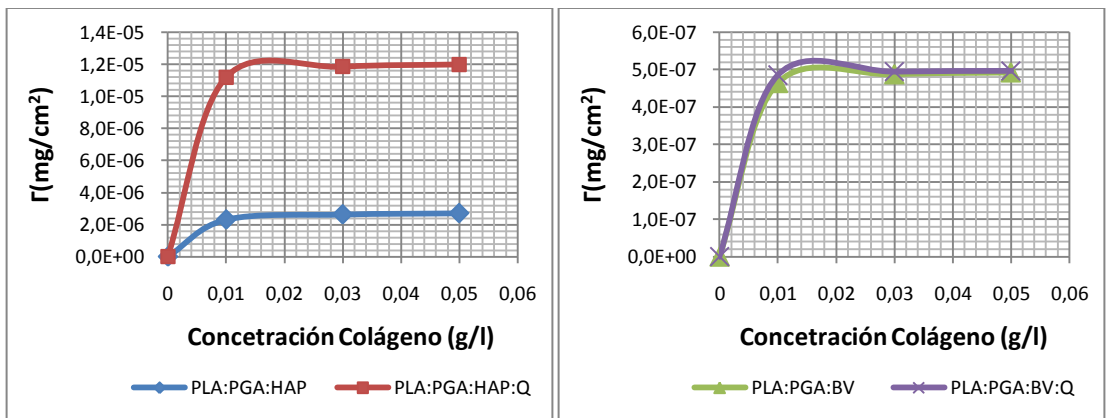
Isotermas de adsorción de colágeno adsorbida sobre recubrimientos poliméricos, en solución PBS.



(a) 298K



(c) 308K



(d) 318K

ANEXO VII.

Parámetros termodinámicos Adsorción de Colágeno.

Recubrimiento	T [K]	ΔG [KJ/mol]	ΔH [KJ/mol]	ΔS [J/molK]
PLA/PLG/HAP	298	-37,59	-26,91	25,78
	308	-41,26		
	318	-39,67		
PLA/PLG/HAP/Q	298	-41,93	-120,67	-261,55
	308	-41,60		
	318	-36,75		
PLA/PLG/BV	298	-33,22	-7,45	104,05
	308	-33,49		
	318	-37,19		
PLA/PLG/BV/Q	298	-33,85	27,15	200,55
	308	-36,32		
	318	-34,37		

Parámetros termodinámicos Adsorción de ASB.

Recubrimiento	T [K]	ΔG [KJ/mol]	ΔH [KJ/mol]	ΔS [J/mol]
PLA/PLG/HAP	298	-31,38	71,19	348,68
	308	-38,96		
	318	-38,32		
PLA/PLG/HAP/Q	298	-34,89	187,61	747,34
	308	-43,20		
	318	-49,73		
PLA/PLG/BV	298	-35,73	-31,90	12,26
	308	-35,35		
	318	-35,96		
PLA/PLG/BV/Q	298	-29,92	-0,93	99,40
	308	-32,82		
	318	-31,90		