

**EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA Y GRAVIMÉTRICA DE LA ADSORCIÓN DE  
COLÁGENO EN SUPERFÍCIES ELECTROACTIVAS DE PLA-PGA-  
BIOCERÁMICO-QUITOSANO**

**ANDREA MILENA CONTRERAS ARENAS**

**IVÁN DARÍO SOTOMONTE MOTTA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERIAS FÍSICO QUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2010**

**EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA Y GRAVIMÉTRICA DE LA ADSORCIÓN DE  
COLÁGENO EN SUPERFÍCIES ELECTROACTIVAS DE PLA-PGA-  
BIOCERÁMICO-QUITOSANO**

**ANDREA MILENA CONTRERAS ARENAS**

**IVÁN DARÍO SOTOMONTE MOTTA**

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

**Director:**

**CUSTODIO VÁSQUEZ QUINTERO**

**Ingeniero Metalúrgico, M.Sc.**

**Co-director:**

**NERLY DEYANIRA MONTAÑEZ SUPELANO**

**Ingeniera Química**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERIAS FÍSICO QUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2010**

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresamos sinceros agradecimientos a:

La Universidad Industrial de Santander y la Escuela de Ingeniería Química, por la oportunidad de formarnos como profesionales.

El profesor Custodio Vásquez Quintero, quién nos ha orientado con su valiosa experiencia en esta investigación.

La Ingeniera Nerly Deyanira Montañez, por su invaluable orientación en el desarrollo de nuestro proyecto.

El profesor Dario Yesid Peña, por el acompañamiento continuo y su excelente dirección en el GIC.

La Ingeniera Marcela Gelvez, por su valioso aporte durante el proceso.

El Ingeniero Hugo Estupiñan, por su oportuna colaboración en la realización de esta investigación.

*A Dios por darme esta grandiosa oportunidad y permitirme ser la profesional que hoy soy*

*A mi madre, María Isabel Arenas Fuentes, por su amor, esfuerzo y dedicación que han hecho de mi una persona íntegra, por darme fortaleza en los momentos difíciles y ser mi razón para luchar cada día.*

*A mis hermanos, Ricardo, Isabel y Rogerio, por creer siempre en mí, por su cariño y apoyo incondicional.*

*ANDREA MILENA CONTRERAS ARENAS*

*A Dios por su bendición y compañía.*

*A mis Padres, Federico y Rosalba, por depositar en mí su confianza e infinito amor.*

*A mis hermanos, Alirio y Yasmín, por su incondicional compañía.*

*A mis amigos y compañeros, por su enriquecedor aporte.*

*IVÁN DARÍO SOTOMONTE MOTTA*

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN.....	17
1 MARCO TEÓRICO.....	18
1.1 Biomateriales y Biocompatibilidad. ....	18
1.1.1 Colágeno. ....	18
1.1.2 Acido Poliláctico (PLA) y poliglicólico (PGA).....	19
1.1.3 Biocerámicos. ....	19
1.1.4 Quitosano.....	20
1.2 Espectroscopia de Impedancia Electroquímica. ....	20
1.3 Microbalanza de Cristal de Cuarzo ángulos de contacto. ....	20
1.3.1 Trabajo de Adherencia. ....	22
2 DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	25
2.1 Estado del arte. ....	25
2.2 Materiales y Reactivos. ....	25
2.2.1 PBS.....	25
2.2.2 PLA (Ácido Poliláctico) y PGA (Ácido Poliglicólico).....	25
2.2.3 Quitosano.....	25
2.3 Desarrollo Metodológico. ....	26
2.3.1 Preliminares. ....	26
2.3.2 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica. ....	27
2.3.3 Pruebas de Gravimetría. ....	28
3 RESULTADOS Y ANÁLISIS .....	30
3.1 Caracterización del Fosfato Tricálcico (Whitlockita).....	30
3.2 Análisis Pruebas Electroquímicas (EIS).....	30
3.3 Análisis Estadístico de Pruebas Electroquímicas.....	36

3.4	Análisis Gravimétrico. ....	37
3.5	Análisis Estadístico de las pruebas Gravimétricas. ....	41
4	CONCLUSIONES .....	42
5	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	43
6	ANEXOS .....	44

## LISTA DE TABLAS

	<b>pág.</b>
Tabla 1. Variables independientes para medición de ángulos de contacto.....	26
Tabla 2. Variables para las mediciones electroquímicas.....	27
Tabla 3. Datos calculados del cambio de energía libre de Gibbs de adsorción.....	31
Tabla 4. Parámetros termodinámicos calculados a partir de la curva de cambio de energía libre de Gibbs con la temperatura.....	32
Tabla 5. Cambios de frecuencia, radios, ángulos de contacto del sistema gota-superficie y tensión superficial del recubrimiento.....	36
Tabla 6. Trabajos de cohesión, adhesión y coeficiente de expansión para el sistema gota superficie del recubrimiento.....	37

## LISTA DE FIGURAS

	<b>pág.</b>
Figura 1. Diagrama de contacto trifásico sólido-líquido-fluido.....	20
Figura 2. Esquema deposición electroforética de PLA-PGA-Biocerámico- Quitosano.....	24
Figura 3. Montaje para determinación de ángulos de contacto con QCM.....	25
Figura 4. a) Montaje de celda para mediciones EIS. b) Montaje general pruebas electroquímicas.....	27
Figura 5. Espectro de adsorción de colágeno 27.5 µg/ml, 37°C, 0 V y su simulación, línea punteada y línea continua respectivamente. a) Diagrama de Nyquist y b) Diagrama de Bode.....	28
Figura 6. Circuito equivalente para la adsorción de proteína de colágeno.....	29
Figura 7. Cambio de energía libre de Gibbs de adsorción con la temperatura usando EIS. a) 0.00 V, b) -0.37 V y c) 0.56 V.....	31
Figura 8. Micrografías superficiales de los recubrimientos a 20x. a) y c) Cristales con recubrimientos previos a pruebas electroquímicas. b) Cristal con recubrimiento posterior a prueba electroquímica a 20 µg/ml, 37 °C, 0 V. d) Cristal con recubrimiento posterior a prueba electroquímica a 12,5 µg/ml, 37 °C, 0 V.....	33
Figura 9. Diagrama de Pareto para análisis EIS.....	34
Figura 10. Caracterización de la gota. a) Topografía. b) Panorámica de la base.....	35
Figura 11. Diagrama de Pareto para análisis de QCM.....	38

## LISTA DE ANEXOS

	<b>pág.</b>
Anexo A. Voltagrama para la determinación de la óxido-reducción.....	37
Anexo B. Micrografías de pruebas electroquímicas .....	38
Anexo C. Diseño de experimentos mediciones gravimétricas y electroquímicas.....	41
Anexo D. Gráficas pruebas gravimétricas.....	43
Anexo E. Espectros de Bode y Nyquist obtenidos de la simulación de los datos electroquímicos.....	45
Anexo F. Análisis cuantitativo del biocerámico.....	50
Anexo G. Parámetros circuito equivalente.....	52
Anexo H. Datos para el cálculo de las isothermas de Langmuir y parámetros termodinámicos.....	55
Anexo I. Isothermas de Langmuir a partir de mediciones electroquímicas.....	56
Anexo J. Graficas $\Delta G$ de adsorción de proteína de colágeno contra temperatura. Graficas $\Delta G$ contra temperatura a 0 V.....	59
Anexo K. Pasos para la síntesis de PLA (Ácido Poliláctico) y PGA (Ácido Poliglicólico).....	61
Anexo L. Diagramas de efectos principales y de efectos de interacción para pruebas de EIS y gravimétricas.....	62
Anexo M. Materiales y equipos.....	64

## RESUMEN

**TITULO:** EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA Y GRAVIMÉTRICA DE LA ADSORCIÓN DE COLÁGENO EN SUPERFÍCIES ELECTROACTIVAS DE PLA-PGA-BIOCERÁMICO-QUITOSANO.\*

**AUTOR:** ANDREA MILENA CONTRERAS ARENAS, IVÁN DARÍO SOTOMONTE MOTTA. \*\*

**PALABRAS CLAVES:** Adsorción; Mojabilidad; Biomateriales; Espectroscopía de Impedancia Electroquímica, Microbalanza de Cristal de Cuarzo.

### DESCRIPCIÓN:

El comportamiento de adsorción de proteínas en materiales artificiales y biocompatibles es importante en el área de biosensores y dispositivos de implante médico. La adsorción de proteínas ocurre cuando alguna proteína contenida en un fluido entra en contacto con la superficie exterior. Por tanto se tiene un interés considerable en el comportamiento interfacial de proteínas.

El colágeno es la principal proteína de la matriz extracelular y desempeña un papel crucial en la resistencia a la tracción de los tejidos, por tanto es buen componente de materiales para muchas aplicaciones médicas potenciales. Las propiedades superficiales de los biomateriales desempeñan un papel importante en la biomedicina y la mayoría de las reacciones biológicas se producen en la superficie de los materiales implantados.

En esta investigación se estudió el comportamiento interfacial de la proteína de colágeno en la superficie polimérica PLA-PLG- biocerámico-Quitósano, usando mediciones de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), la mojabilidad y tensión superficial en la superficie polimérica fueron analizadas usando mediciones de microbalanza de cristal de cuarzo (QCM).

Se demostró que la resistencia a la transferencia de carga es directamente proporcional a la cantidad de proteína de colágeno adsorbida (concentración superficial). El proceso de adsorción de proteína de colágeno fue descrito con isoterms de adsorción de Langmuir, la cuales revelaron una gran afinidad de la proteína de colágeno a los sitios de adsorción en la superficie polimérica. De los valores de la energía libre de Gibbs de adsorción se confirmó que la proteína de colágeno fue adsorbida en la superficie polimérica.

Las superficies poliméricas en contacto con altas concentraciones de proteína de colágeno exhibieron mayor hidrofiliidad, por ende mayor mojabilidad, como fue sugerido por las mediciones de ángulos de contacto.

---

\* Proyecto de Grado

\*\* Facultad de ingenierías fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director del proyecto: Custodio Vásquez Quintero. Codirector (a) del proyecto: Nerly Deyanira Montañez Supelano.

## SUMMARY

**TITLE:** ELECTROCHEMICAL ASSESSMENT AND GRAVIMETRIC OF THE COLLAGEN ADSORPTION ON ELECTROACTIVE PLA-PLG-BIOCERAMIC-CHITOSAN SURFACES.\*

**AUTHOR:** ANDREA MILENA CONTRERAS ARENAS, IVÁN DARÍO SOTOMONTE MOTTA\*\*

**KEYWORD:** Adsorption; Wettability; Biomaterials; Electrochemical Impedances Spectroscopy; Quartz Crystal Microbalance.

### DESCRIPTION:

The adsorption behavior of proteins to artificial and biocompatible materials is important in the area of biosensors and medical implant devices. Protein adsorption occurs when any protein-containing fluid comes into contact with a foreign surface. Therefore, there has considerable interest in the interfacial behavior of proteins.

Collagen is the main protein of extracellular matrix and plays a crucial role in tensile strength of tissues, because is good component of materials for many potential medical applications. The surface properties of biomaterials play an important role in biomedicine as the majority of biological reactions occur on the surface of implanted materials

In this investigation the interfacial behavior of collagen protein at a polymeric surface PLA-PLG-biocerámico-Quitosano was studied using electrochemical impedance spectroscopy (EIS) measurements, the wettability and surface tension on the polymeric surface were analyzed using quartz crystal microbalance (QCM) measurements. It was shown that the charge transfer resistance is directly proportional to the amount of adsorbed collagen protein (surface concentration).The adsorption process for collagen protein was described with the Langmuir adsorption isotherm, which revealed a very high affinity of the protein towards adsorption onto a polymeric surface. From the calculated Gibbs free energies of adsorption it was confirmed that collagen protein molecules adsorb onto the polymeric surface.

The polymeric surfaces in contact with high concentrations of collagen protein exhibited the greatest hydrophilicity, therefore high wettability, as suggested by contact angle measurement.

---

\* Project of grade

\*\* Physical-Chemical Engineering Faculty. School of Chemical Engineering. Project Director: Custodio Vásquez Quintero. Project Co-director(a): Nerly Deyanira Montañez Supelano.

## INTRODUCCIÓN

Los nuevos desarrollos tecnológicos en la industria biomédica están basados en la investigación y creación de biomateriales. Estos deben ser compatibles con el organismo humano y tener resistencia mecánica. Son especialmente útiles en la medicina regenerativa, permitiendo la reparación, regeneración o cambio total de órganos y tejidos.

Un elemento fundamental en la bioingeniería de órganos o tejidos son los andamios o matrices tridimensionales (scaffolds). Estas proporcionan a las células el apoyo necesario para su proliferación y el mantenimiento de sus funciones.<sup>1</sup>

En la ingeniería de tejidos, una opción popular en la fabricación de andamios son los polímeros reabsorbibles, ya que son fáciles de procesar en forma de andamio en 3-D, con una morfología de poro adecuada para aplicaciones en esta área. Además, tienen altas propiedades de tracción, alta dureza y las propiedades mecánicas de los polímeros. Por tanto, los polímeros degradables como el ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PGA) que se utilizan para aplicaciones de andamios, ya que además poseen como propiedad fundamental la interacción con proteínas.<sup>2</sup>

En sus estudios Wright, Cosman y Fatih mediante el uso de espectroscopía de impedancia electroquímica, desarrollaron técnicas para el examen del comportamiento de proteínas en superficies de materiales biocompatibles, demostrando que la adsorción de proteínas es afectada por factores tales como la temperatura, el pH, la conformación de la proteína en la solución entre otros.

Se sabe que el contacto de un cuerpo vivo con un material induce la adsorción de proteínas en su superficie, creando una interfase entre éstas y las células que se adsorben. Las propiedades de la monocapa adsorbida de proteína son de vital importancia en la integración del implante en el cuerpo. De ahí que se pretenda estudiar la adsorción de proteína de colágeno sobre superficies poliméricas mediante técnicas electroquímicas y gravimétricas.

---

<sup>1</sup> KIM B. S.; BAEZ C. E. and ATALA, A. Biomaterials for tissue engineering. World Journal of Urology. Vol. 18, No.1 (Feb 2000), p. 2-9.

<sup>2</sup> HENCH LARRY L. and JONES JULIAN R. Biomaterials, Artificial Organs and Tissue. Chapter 19: Scaffolds for tissue engineering. 2005.

# 1 MARCO TEÓRICO

## 1.1 Biomateriales y Biocompatibilidad.

Un biomaterial es un material no vivo utilizado en un aparato médico y concebido para interactuar con sistemas biológicos.<sup>3</sup> Así pues, el material con el que se fabrique el implante es un biomaterial y la propiedad más importante de este es que sea biocompatible. Esto significa que la presencia del biomaterial dentro de los tejidos biológicos provoca respuestas bioquímicas que no son perjudiciales ni para dichos tejidos ni para el buen desempeño de las funciones sustitutorias o de reparación del biomaterial.<sup>4</sup>

La biocompatibilidad de un material depende de la adherencia de biomoléculas de interés a la superficie. Cada vez que las superficies de metal o de polímero son introducidas en el tejido vivo, el material implantado se hace compatible con su entorno mediante el desarrollo de una capa adsorbida compuesta de proteínas que están presentes en el tejido circundante. El alojamiento en vivo por lo tanto requiere la formación de una capa de proteínas estables sobre la superficie del implante, que es bioquímicamente compatible con su alrededor. Por tal motivo existe un interés en mejorar la biocompatibilidad por el pre-revestimiento de las superficies de los materiales de prótesis con capas de proteína.<sup>5</sup>

### 1.1.1 Colágeno.

El colágeno es una proteína de la matriz extracelular. Contiene secuencias de aminoácidos, los cuales pueden ser reconocidos por células receptoras.<sup>6</sup> De esta manera, y debido a su forma, dimensiones y su propiedad de autoadherencia, el colágeno ofrece perspectivas promisorias para crear una capa de adsorbato, con un direccionamiento deseado.

---

<sup>3-4</sup> Williams DF(ed).Definitions in biomaterials: Proceeding of a consensus Conference of the European society for Biomaterials, Chester. Progress in Biomedical Engeneering, Elsevier, Amsterdam(1987).

<sup>5</sup> V.B.C. FIGUEIRA, J.P. JONES .Viscoelastic study of the adsorption of bovine serum albumin on gold and its dependence on pH.Journal of Colloid and Interface Science 325 ( 2008) 107-113

<sup>6</sup> R. GRINNELL, S. NAGAKAWA and C. H HO, Exp. Cell Res 182 (1989) 668.

### 1.1.2 Acido Poliláctico (PLA) y poliglicólico (PGA).

El PLA durante su biodegradación tiene la capacidad de formación controlada de tejidos biológicos, además otorga propiedades como biocompatibilidad, biodegradabilidad, alta resistencia a la tensión y baja elongación.

El PGA es un poliéster lineal biodegradable y se caracteriza por su tenacidad y baja flexibilidad. Estudios anteriores demuestran que las mezclas de estos polímeros presentan mejores propiedades que su uso individual.<sup>7</sup>

### 1.1.3 Biocerámicos.

La utilización de cerámicas para la reconstrucción ósea se basa en su semejanza estructural respecto a la fase mineral del hueso. En la actualidad la investigación está centrada en la línea de las cerámicas bioactivas. Estos materiales son totalmente biocompatibles y osteoconductores: proporcionan una estructura sobre la cual los osteoblastos pueden depositar hueso nuevo, y tienen la capacidad de formar enlaces directamente con el tejido óseo. Dentro de este grupo cabe destacar los biovidrios, y las cerámicas de fosfatos de calcio, como el fosfato tricálcico  $\beta$  ( $\beta$ -TCP) y la hidroxiapatita (HA).<sup>8</sup> Tanto en el caso de la hidroxiapatita como en el del  $\beta$ -TCP, diversos investigadores, utilizando distintos modelos animales, observaron que se formaba un enlace directo entre el implante y el tejido óseo, confirmándose el carácter bioactivo de estas cerámicas.<sup>9</sup>

---

<sup>7</sup> K. TAKAHASHI, I. TANIGUCHI, M. MIYAMOTO, Y. KIMURA. Melt/solid polycondensation of glycolic acid to obtain high-molecular-weight poly(glycolic acid). *Journal of Polymer* 41 (2000) 8725-8728.

<sup>8</sup> MARÍA PAU GINEBRA MOLINS. Desarrollo y caracterización de un cemento óseo basado en fosfato tricálcico-ot para aplicaciones quirúrgicas. Universitat Politècnica de Catalunya (1996).

<sup>9</sup> M. JARCHO, "Calcium Phosphate Ceramics as Hard Tissue Prosthetics", *Clin.*

*Orthop. Rel. Res.* 157 (1981), 259-278.

### 1.1.4 Quitosano.

El quitosano es un hidrato de carbono complejo, biodegradable y atóxico, derivado de la quitina, una sustancia natural. Este biopolímero presenta actividad antibacteriana y antifúngica.<sup>10 11</sup>

### 1.2 Espectroscopia de Impedancia Electroquímica.

La espectroscopia de impedancia electroquímica es una de las técnicas más modernas utilizadas para caracterizar las propiedades eléctricas de una interfase. Es una prueba no destructiva que permite observar fenómenos de adsorción, difusión, velocidades de corrosión y porosidad de la capa.

### 1.3 Microbalanza de Cristal de Cuarzo ángulos de contacto.

La microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) es un dispositivo eficaz para el seguimiento in situ de la interacción de biomoléculas, debido a su sensibilidad mayor en el aire, así como en solución acuosa.<sup>12</sup> Su sensor consta de un cristal de cuarzo delgado (generalmente AT-corte) intercalado entre dos electrodos de oro y al aplicar un voltaje alterno con una frecuencia similar a la del cuarzo de resonancia induce una oscilación en él.<sup>13</sup> Si el material extraño es de forma rígida elástica, la serie de frecuencia de resonancia proporciona una medición directa de los cambios de masa en la superficie de la QCM de acuerdo a la ecuación (1).

$$\Delta f = -2f_0 \Delta m / A \sqrt{\rho_q \mu_q} \quad (1)$$

Donde  $\Delta f$  es el cambio de frecuencia medido,  $f_0$  la frecuencia inicial de resonancia del cristal de cuarzo,  $\Delta m$  la variación de la masa,  $A$  el área activa piezoeléctrica definida por dos electrodos de oro,  $\rho_q$  la densidad de cuarzo y  $\mu_q$  módulo de corte.

<sup>10</sup> Clínicas Quirúrgicas de Norteamérica 2007. Volumen 87 no 1: Abordaje actual ..Maier, Ronald.V, 162

<sup>11</sup> Shahidi ,J.K.M; Jeon.Y:1999 Food applications of chitin and chitosans. Trends Food Sci.Technol.10,pp.37-51.

<sup>12</sup> FLAVIO SANTOS DAMOS, RENATA KELLY MENDES AND LAURO TATSUO KUBOTA. Applications of QCM, EIS and spr in the investigation of surfaces and interfaces for the development of (bio)sensors. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13084-971 Campinas – SP.

<sup>13</sup> XUEEN JIA, QINGJI XIE, YOUYU ZHANG, AND SHOUZHUO YAO. Simultaneous Quartz Crystal Microbalance – Electrochemical Impedance Spectroscopy Study on the Adsorption of Antihuman Immunoglobulin G and Its Immunoreaction at Nanomaterial-modified Au Electrode Surfaces. ANALYTICAL SCIENCES JUNE 2007, VOL. 23.

La frecuencia de resonancia también está influenciada por la viscosidad y la densidad del fluido en contacto con la superficie de la QCM.<sup>14</sup>

El cambio de frecuencia asociado con el área de una gota de líquido en contacto con el resonador puede ser descrito de acuerdo a la ecuación (2).

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

Donde S es diferencial de sensibilidad (df / dm) y m (r,θ) representa la parte radial y la distribución masiva angular de la QCM con respecto a la distancia desde el centro del resonador. En el caso de un fluido newtoniano, m (r, Θ) es descrito por la masa efectiva contenida en un decaimiento de longitud δ.

El valor de δ se determina por la frecuencia de resonancia, la viscosidad y la densidad del líquido. La dependencia radial del movimiento de cristal ha sido descrita por una función de Bessel modificada.<sup>1516</sup> Sin embargo, estudios han demostrado que para líquidos newtonianos la dependencia angular y sensibilidad radial, son descritas adecuadamente por una función Gaussiana, ver ecuación (3).

$$S(r, \theta) = S(r)_e = K \exp\left(-\beta r^2 / r_e^2\right) \quad (3)$$

Donde K representa la máxima sensibilidad en el centro del resonador (r = 0), β es una constante que define la sensibilidad de la dependencia en r, y r<sub>e</sub> es el radio del electrodo de la QCM. Esta relación indica que la frecuencia de resonancia dependerá del radio de la gota de PBS centrada en el cristal recubierto de la QCM. A partir de las ecuaciones anteriores y junto a la masa efectiva detectada y el cambio de frecuencia debido a la gota agregada sobre el centro del cristal recubierto, se obtiene una ecuación más generalizada, ecuación (4)

$$\Delta F = -(\pi \rho_L \delta \alpha k) r^2 \quad (4)$$

<sup>14</sup> K. MATSUURA, Y. EBARA, Y. OKAHATA, Gas phase molecular recognition on nucleobase monolayers immobilized on a highly sensitive quartzcrystal microbalance, Langmuir 13 (1997) 814–820.

<sup>15</sup> D. SALT, Handbook of quartz crystal devices, Van Nostrand Reinhold (UK) Co.Ltd, 1987.

<sup>16</sup> G. Sauerbrey, Z. Physik, 155 (1959) 206. 5 A. W. Warner and C. D. Stockbridge, Mass and thermal measurements with resonating crystal.

Si  $C = \pi \rho_L \delta \alpha k$  lo anterior se convierte en la ecuación (5).<sup>17</sup>

$$\Delta F = -(c)r^2 \quad (5)$$

Finalmente, la ecuación 6 relaciona el radio de interfase con el ángulo de contacto.

$$r^2 = \frac{\left(3V_d/\pi\right)^{2/3} (1 - (\cos \theta)^2)}{(2 - 3 \cos \theta + (\cos \theta)^3)^{2/3}}, \text{ donde } V_d \text{ es volumen de gota} \quad (6)$$

### 1.3.1 Trabajo de Adherencia.

Cuando se coloca una gota del líquido L sobre la superficie del sólido S, siendo el sistema sumergido en el fluido F, la gota se extiende hasta tanto el contacto trifásico presenta un equilibrio.

Figura 1. Diagrama de contacto trifásico solido-líquido-fluido.



En presencia de tres fases inmiscibles existe una línea de contacto trifásico; a lo largo de esta línea de contacto las tensiones ejercen fuerzas perpendicularmente a la línea de contacto y tangentes a las interfaces correspondientes. El equilibrio se expresa por lo tanto como un balance vectorial en un plano perpendicular a la línea de contacto trifásico (figura 1).

Proyectando los tres vectores sobre la superficie plana del sólido, se obtiene una fuerza neta horizontal nula donde se cumple la ecuación de Neuman:

$$\gamma_{SF} = \gamma_{LS} + \gamma_{FL} * \cos \theta_L \quad (7)$$

<sup>17</sup> Sekimoto, H. *IEEE Trans. Sonics Ultrasonics* 1984, 31, 664

O bien,

$$\gamma_{SF} + \gamma_{FL} * \cos\theta_F = \gamma_{LS} \quad (8)$$

$\theta_L$  es el ángulo de contacto entre el líquido L y el sólido S, el cual se denomina a veces  $\theta_{LS}$ . En cuanto a  $\theta_F$  ó  $\theta_{FS}$  es el ángulo de contacto entre el fluido F y el sólido S. En la relación anterior, la energía libre interfacial por unidad de área entre las fases L y F corresponde a la tensión superficial o interfacial, y se puede medir por varios métodos. Las dos otras superficies involucran un sólido y, por lo tanto, no se pueden medir sus tensiones interfaciales, pero se pueden relacionar con el trabajo de adhesión.

El trabajo de adhesión se define como el trabajo para separar una unidad de área de dos fases. En el caso real, al separar una unidad de área entre por ejemplo S y L, se formarán dos nuevas superficies S/F y L/F, y el trabajo de adhesión en el cambio estará dado por la ecuación de Dupré:

$$W_{SL} = \gamma_{SF} + \gamma_{LF} - \gamma_{LS} \quad (9)$$

Al sustituir el término  $\gamma_{SF} - \gamma_{LS}$  de la ecuación de Neuman se obtiene la ecuación de Young:

$$W_{SL} = \gamma_{FL} * (1 + \cos\theta_L) \quad (10)$$

El trabajo de adhesión de una sustancia con si misma se llama trabajo de cohesión; para el líquido se denotaría  $W_{LL}$  y para el sólido  $W_{ss}$ , y al separarse una unidad de área en el fluido F tendrá el valor:

$$W_{LL} = 2\gamma_{LF} \quad (11)$$

$$W_{SS} = 2\gamma_{SF} \quad (12)$$

La diferencia entre el trabajo de adhesión del líquido con el sólido, el trabajo de cohesión del líquido y el trabajo de adhesión del sólido se llama el coeficiente de expansión del líquido sobre el sólido  $S_{L/S}$  o  $S$ :

$$S = WSL - WLL = \gamma SF - \gamma LS - \gamma LF \quad (13)$$

Combinando la definición de este parámetro con la relación de Young, se obtiene la ecuación de Young-Dupré:

$$S = \gamma FL(\cos\theta - 1) \quad (14)$$

## 2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 2.1 Estado del arte.

Se realizó el estado del arte a partir de artículos, trabajos de grado e informes, obteniéndose toda la información necesaria para dar inicio al proyecto.

### 2.2 Materiales y Reactivos.

#### 2.2.1 PBS.

La solución salina amortiguada por fosfatos (abreviada PBS por sus siglas en ingles) utilizada en la simulación de fluidos corporales, se obtuvo a partir de NaCl 8,06 g, KCl 0,22 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,15 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,20 g y H<sub>2</sub>O 1000 ml con un pH de 7,4.<sup>18</sup>

#### 2.2.2 PLA (Ácido Poliláctico) y PGA (Ácido Poliglicólico)

El ácido poliláctico, se sintetizó por policondensación del ácido L-láctico (MERCK) al 98% con ZnCl<sub>2</sub> como catalizador al 1.5% en peso. El ácido poliglicólico (PGA) se preparó por policondensación a partir de ácido glicólico Carlo Erba al 70%, con 0,5% en peso de ZnCl<sub>2</sub> como catalizador.<sup>19</sup> Los pasos para la síntesis de PLA Y PGA se muestran en el anexo K.

#### 2.2.3 Quitosano.

El quitosano usado fue el Sigma Aldrich, referencia 417963-25G, con un grado de desacetilación de 85%.

---

<sup>18</sup> Dulbecco R, Vogt M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. J Exp Med. 1954 Feb;99(2):167-82.

<sup>19</sup> K. TAKAHASHI, I. TANIGUCHI, M. MIYAMOTO, Y. KIMURA. Melt/solid polycondensation of glycolic acid to obtain high-molecular-weight poly(glycolic acid). Journal of Polymer 41 (2000) 8725-8728.

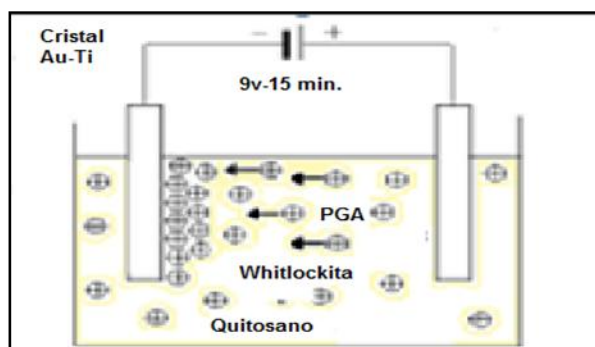
## 2.3 Desarrollo Metodológico.

### 2.3.1 Preliminares.

#### 2.3.1.1 Deposición Electroforética del Polímero Sobre el Cristal de Cuarzo.

Para realizar el recubrimiento de los cristales de cuarzo se utilizó una celda para electrólisis catódica como se muestra en la figura 2. Las condiciones de electrodeposición fueron 9V a 15 minutos. Tanto el cátodo como el ánodo itosano (5%) en acetona al 15% p/v. Estos valores se basan en los mejores resultados obtenidos en anteriores trabajos.

Figura 2. Esquema deposición electroforética de PLA-PGA-Biocerámico-Quitosano.



#### 2.3.1.2 Análisis de óxido reducción de la proteína en el medio sobre la superficie del polímero.

Con el uso de un Gamry 600 los cristales recubiertos fueron expuestos a la técnica de voltametría cíclica para observar los picos de oxidación-reducción, obteniéndose valores de potencial de -370mV, 0mV y 560mV. El voltagrama correspondiente se muestra en el Anexo A.

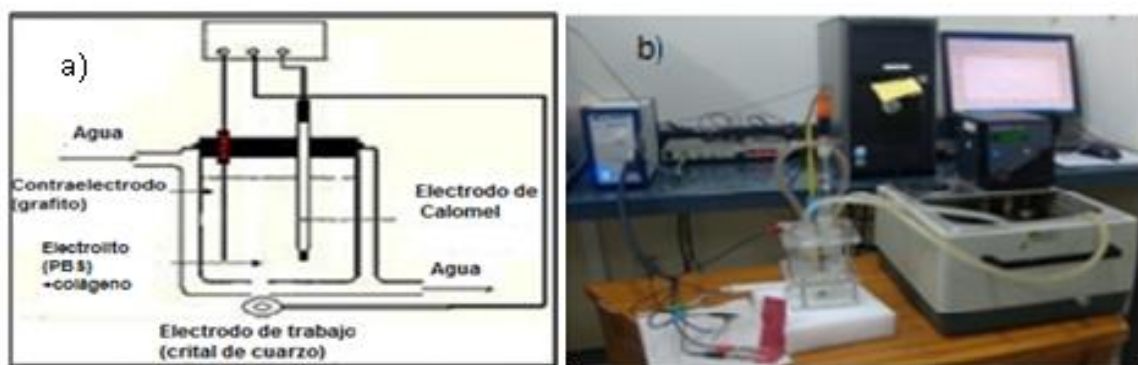
### 2.3.2 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica.

Este método permitió la medición de la capacitancia de la doble capa, de la interfase electrodo/solución, con lo cual fue posible generar modelos en forma de circuitos equivalentes que permitieron obtener información de la película modificada en la superficie del electrodo. Esta información proviene de relacionar las propiedades del líquido o sólido que se estudia, con las variaciones o cambios obtenidos en su impedancia característica. Estas variaciones obedecen a la estructura física del material, a los procesos químicos que ocurren en él o a la combinación de ambos.

Se usó una celda de base plana de capacidad de 155 cm<sup>3</sup> con un intercambiador de calor conectado a un baño termostatado con recirculación de agua (figura 4). Se utilizó un electrodo de referencia de calomel, un contraelectrodo de grafito y como electrodo de trabajo un cristal AT-Corte 5 MHz Au-Ti recubierto (figura 3). Las mediciones de EIS se llevaron a cabo a una frecuencia entre 100000 - 0.01 Hz, siete puntos por década, y a los diferentes voltajes encontrados con la aplicación de la técnica de voltametría cíclica, (ver tabla 3).

Mediante el microscopio Olympus Bx51 se obtuvieron micrográficas de los recubrimientos sobre los cristales, antes y después de las mediciones de EIS, para el posterior análisis morfológico (anexo B).

Figura 3. a) Montaje de celda para mediciones EIS. b) Montaje general pruebas electroquímicas.



### 2.3.2.1 Diseño de Experimentos.

Para el desarrollo de las mediciones electroquímicas se realizó un diseño de experimentos  $2 \times 3^2$  en donde 2 de los factores tienen 3 niveles y se hicieron 3 replicas escogidas aleatoriamente (Anexo E). Las variables independientes se muestran en la tabla 1. La variable de respuesta es la resistencia a la transferencia de carga de adsorción.

Tabla 1. Variables para las mediciones electroquímicas

Niveles	Concentración de proteína [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Voltaje [V]	Temperatura [ $^{\circ}\text{C}$ ]
Alto	12.5	-0.37	37
Medio	20.0	0	-----
Bajo	27.5	0.56	39.5

### 2.3.3 Pruebas de Gravimetría.

#### 2.3.3.1 Diseño de Experimentos.

Para la determinación de ángulos de contacto, el diseño de experimentos se basó en un diseño factorial  $3^2$ , donde se replicaron 3 ensayos escogidos aleatoriamente para completar el análisis estadístico (Anexo C). Las condiciones de trabajo constantes fueron presión, volumen de la gota de PBS y concentración de polímero. Las variables independientes se muestran en la tabla 2. La variable de respuesta fue el ángulo de contacto.

Tabla 2. Variables independientes para medición de ángulos de contacto

Niveles	Concentración de proteína [µg/ml]	Temperatura [°C]
Alto	27.5	39.5
Medio	20	37
Bajo	12.5	35.5

### 2.3.3.2 Determinación de Ángulos de Contacto y Tensión Superficial mediante mediciones en QCM.

El método para la determinación de ángulos de contacto consistió en medir el cambio de frecuencia que acompaña a la introducción de una pequeña gota de líquido en el centro de un resonador de cuarzo vibrante. Una gota de 10 µl de solución PBS fue agregada en el centro de la superficie del cristal recubierto con la mezclas, mediante la utilización de una micro pipeta de 0,5-10 µl cuya sensibilidad fue de +/- 0.5 µl (ver figura 4). Simultáneamente en la QCM se registraron los cambios de frecuencia producidos por el contacto de la gota con la superficie del recubrimiento (Anexo D). Después de cada medición la celda fue desmontada y el cristal lavado con acetona y secado al ambiente para su reutilización.

Figura 4. Montaje para determinación de ángulos de contacto con QCM.



### 3 RESULTADOS Y ANÁLISIS

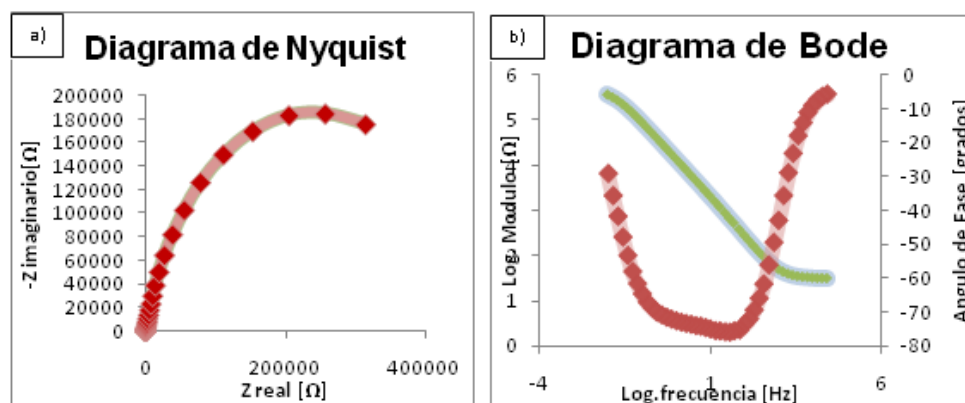
#### 3.1 Caracterización del Fosfato Tricálcico (Whitlockita).

La caracterización cuantitativa por medio de Difracción de rayos-x, del biocerámico obtenido, presentó fases cristalinas de  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  (hidroxiapatita) 31,2% y  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Whitlockita) 68,8% (Anexo F).

#### 3.2 Análisis Pruebas Electroquímicas (EIS)

La técnica de EIS fue empleada para hacer la caracterización de la interfase polímero-electrolito y de los procesos superficiales que permiten investigar la adsorción de la proteína de colágeno en el recubrimiento de PLA-PGA-Biocerámico-Quitano. Durante las diferentes pruebas se obtuvo los correspondientes espectros de Bode y de Nyquist similares a los mostrados en la figura 5.

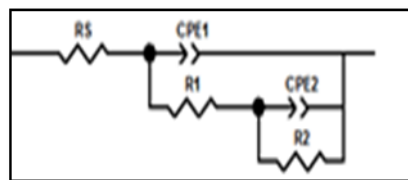
Figura 5. Espectro de adsorción de colágeno 27.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 37°C, 0 V y su simulación, diagrama de puntos y línea continua respectivamente. a) Diagrama de Nyquist y b) Diagrama de Bode.



En todos los casos se observó la presencia de una constante de tiempo a altas frecuencias y otra a baja frecuencias. Con la presencia de estas dos constantes y

con el uso de elementos de fase constante (CPE) en lugar de capacitores puros, se hizo el ajuste de los datos usando el software Z view 3.2 (Anexo G), presentando en el modelo, la representación del fenómeno de adsorción en polímeros biodegradables con un circuito eléctrico equivalente. Éste concordó con configuraciones propuestas para describir procesos de impedancia que se obtienen en metales con recubrimientos porosos, como el mostrado en la figura 6.

Figura 6. Circuito equivalente para la adsorción de proteína de colágeno



Los elementos eléctricos del circuito equivalente tienen los siguientes significados:  $R_s$  es la resistencia del electrolito (PBS + proteína) entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia,  $R_1$  es la resistencia de los procesos faradáicos de degradación en la interfase polímero-solución, la capacitancia representada como un elemento de fase constante a altas frecuencias  $CPE_1$ ,  $R_2$  es la suma en serie de la resistencia a la transferencia de carga de la interfase cristal-polímero y la resistencia a la transferencia de carga de adsorción entre el polímero y la proteína en la zona de altas frecuencias, debido a que entre el cristal y el recubrimiento polimérico no existe transferencia de masa,  $R_2$  se puede asumir como la resistencia total a la transferencia de carga de adsorción  $R_{ct}$ , y  $CPE_2$  es la capacitancia característica de los procesos de carga y de adsorción, que se evidencia a bajas frecuencias.

Se ha demostrado en trabajos anteriores que la resistencia a la transferencia de carga es inversamente proporcional a la masa adsorbida específica en la superficie del electrodo, de esta forma, se pudo asumir como una medida de la velocidad de reacción y de la cantidad de proteína adsorbida en la superficie. De

esta forma el inverso de la resistencia a la transferencia de carga  $R_{ct}^{-1}$ , es directamente proporcional a la cantidad de proteína adsorbida,  $\Gamma$  ( $\text{molcm}^{-2}$ ) y a la densidad de carga superficial.

La adsorción de proteínas puede ser descrita con la ecuación (15 y 16) de Langmuir, la cual expresa la relación entre la concentración de proteína de colágeno  $c$ , y la cantidad de material adsorbido en la superficie.

$$\frac{c}{(R_{ct})^{-1}} = \frac{1}{(R_{ct})^{-1}_{\text{máx}}} + \frac{c}{(R_{ct})^{-1}_{\text{máx}} B_{ADS}} \quad (15)$$

$$\frac{c}{\Gamma} = \frac{1}{\Gamma_{\text{máx}} * B_{ADS}} + \frac{c}{\Gamma_{\text{máx}}} \quad (16)$$

Donde  $B_{ADS}$  es el coeficiente de adsorción y  $\Gamma_{\text{máx}}$  representa la máxima cantidad de material que se puede adsorber en la superficie. Estos valores se obtuvieron del intercepto y la pendiente de la curva de  $c/\Gamma$  contra  $c$ , respectivamente (anexo H). El  $B_{ADS}$  está relacionado con la afinidad de la proteína de colágeno a ser adsorbida en la superficie del electrodo a una temperatura dada. Por lo tanto, se puede obtener la energía libre de adsorción como:

$$\Delta G = -RT \ln(MB_{ADS}) \quad (17)$$

Donde  $M$  es la concentración molar de la solución acuosa (PBS). Los cálculos se muestran en el anexo H e I.

Los valores de cambio en la energía de Gibbs se muestran en la tabla 3.

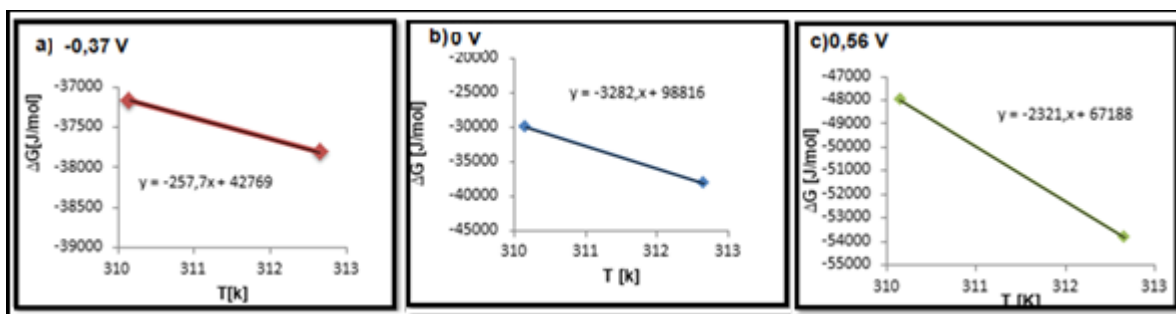
En la figura 7, se muestra el cambio de la energía libre de Gibbs con la temperatura. Los valores obtenidos para el cambio de la energía libre de Gibbs indican que la adsorción de la proteína de colágeno en recubrimientos de PGA-Biocerámico-Quitósano, es un proceso espontáneo para todas las condiciones evaluadas. La espontaneidad de los procesos concuerda con la disminución en el

valor de la resistencia a la transferencia de carga al aumentar la concentración de colágeno.

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

T[K]	-0,37 V	0,00 V	0,56 V
	$-\Delta G[\text{J/mol}]$	$-\Delta G[\text{J/mol}]$	$-\Delta G[\text{J/mol}]$
310,15	37164,89	29943,58	47998,53
312,65	37809,21	38150,13	53801,23

Figura 7. Cambio de energía libre de Gibbs de adsorción con la temperatura. a) - 0,37 V, b) 0 V y c) 0.56 V



Parámetros termodinámicos importantes como la entropía y la entalpía de adsorción, son obtenidos a partir de la pendiente y el punto de corte de la gráfica  $\Delta G$  vs  $T$  (Anexo J). Los datos de la entalpía y entropía del sistema se presentan en la tabla 4.

La variación de la Entalpia del sistema muestra que este es un proceso endotérmico resultado del exceso energético requerido para el rompimiento de interacciones intramoleculares implicados en la interacción proteína-polímero.

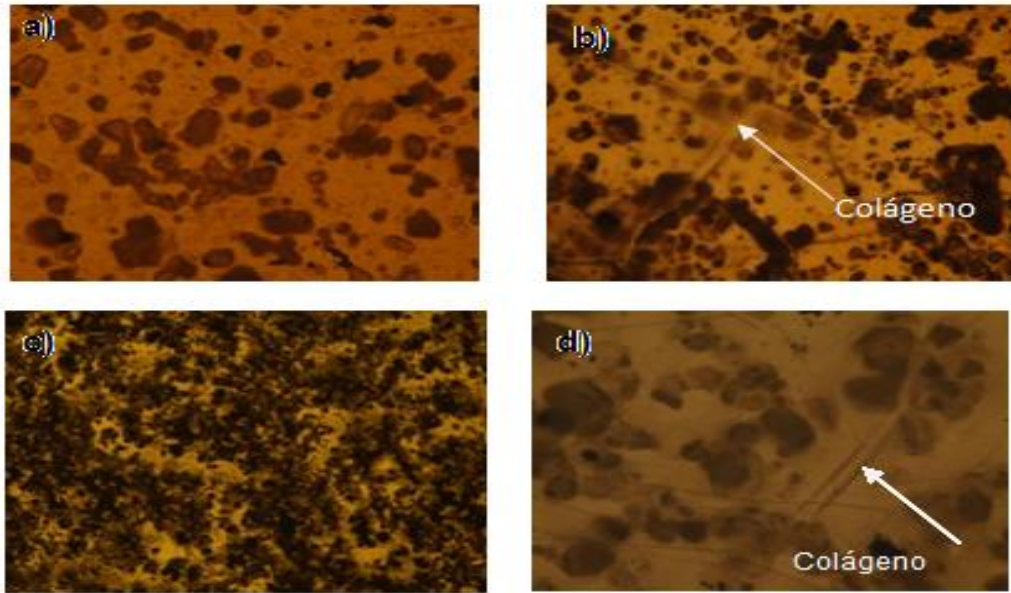
Tabla 4. Parámetros termodinámicos calculados a partir de la variación de la energía libre de Gibbs con la temperatura

Potencial (V)	$\Delta H$ [J/mol]	$\Delta S$ [J/mol*K]
<b>-0,37</b>	42769	257,7
<b>0,00</b>	98816	3282
<b>0,56</b>	67188	2321

A partir de los valores aproximados de los parámetros termodinámicos calculados, es evidente que el aumento de la entropía representa en realidad la conducción para la adsorción de proteína de colágeno en la superficie polimérica, desde rangos de los productos dependientes de la temperatura  $T \cdot \Delta S$  de 1017,912 kJ/mol a 1026,117 kJ/mol, para un potencial aplicado de 0 voltios, que son considerablemente mas altos que el valor de la entalpia  $\Delta H = 98,816$  kJ/mol. Los grandes valores positivos de la variación de la entropía de adsorción podrían surgir del desarrollo de moléculas de proteína en adsorción, a la vez que la adsorción es impulsada por el aumento de la entropía conformacional de la proteína. Se comprueba así la adsorción espontanea del colágeno en el recubrimiento.

En la figura 8 se muestran micrografías de los recubrimientos anterior y posterior a las pruebas electroquímicas, en donde se pudo evidenciar la adsorción de proteína de colágeno en forma de fibrillas en la superficie de los recubrimientos.

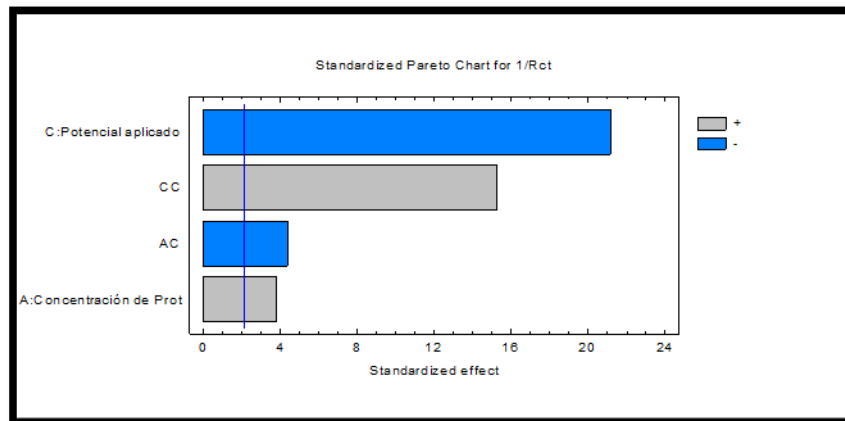
Figura 8. Micrografías de la superficie de los recubrimientos (20x). a) y c) Cristales con recubrimiento previos a pruebas electroquímicas. b) y d) Cristal con recubrimiento posterior a prueba electroquímica a 20  $\mu\text{g/ml}$ , 37°C, 0V. y 12,5  $\mu\text{g/ml}$ , 37°C, 0V, respectivamente.



### 3.3 Análisis Estadístico de Pruebas Electroquímicas.

En el diagrama de Pareto se observó cuatro efectos significativos en la variable de respuesta  $1/R_{ct}$  (figura 9). El potencial aplicado tiene un efecto negativo sobre la variable de respuesta, que se traduce que a mayor potencial aplicado, menor es la respuesta de  $1/R_{ct}$ . Igual pasa con el efecto de la interacción concentración de proteína – potencial aplicado. Los efectos de los factores principales y secundarios se observan en el anexo L.

Figura 9. Diagrama de Pareto para análisis EIS



Se determinó un modelo para correlacionar la cantidad de proteína adsorbida ( $1/R_{ct}$ ) con la concentración de proteína ( $C_p$ ), potencial aplicado ( $P_a$ ), interacción concentración de proteína- potencial aplicado. Así mismo, el error experimental obtenido fue de  $9,72025E-10$ .

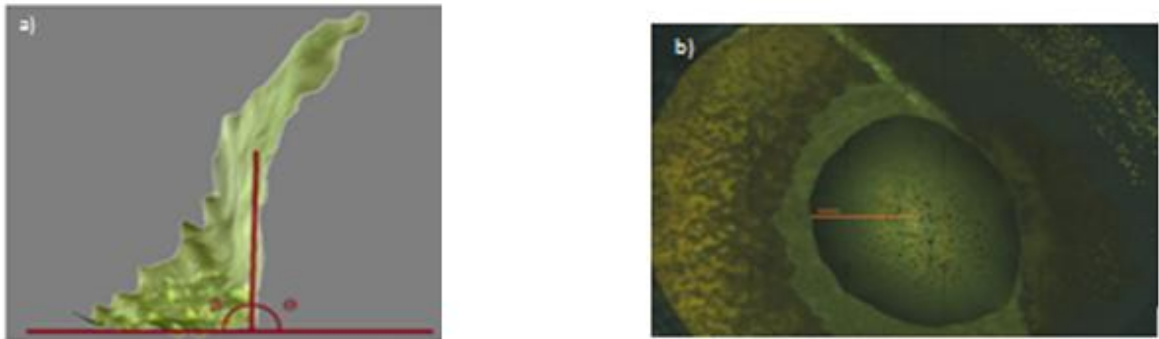
$$\Gamma = 1.89E - 06 + 9.50E - 06 * C_p - 5.28E - 05 * P_a - 1.34E - 05 * (C_p * P_a) + 6.60E - 05 * P_t^2 \quad (18)$$

### 3.4 Análisis Gravimétrico.

Los cambios de frecuencia se obtuvieron del análisis de las graficas de frecuencia  $v_s$  tiempo mostrados en el anexo D.

Por medio de topografías hechas al sistema gota–superficie a través de un microscopio interferométrico a las condiciones  $20\mu\text{l/ml}$  y  $35,5\text{ }^\circ\text{C}$ , se determinó un ángulo de contacto de  $92^\circ$  (figura 10 a). De vistas panorámicas a la superficie de la base de la agota (figura 10 b) a condiciones de  $27,5\ \mu\text{l/ml}$  y  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , se encontró un valor de radio de interface con el cual se calculó la constante de sensibilidad C, con un valor de  $\approx 24269,32\ \text{Hz}\cdot\text{cm}^2$ .

Figura 10. Caracterización de la gota. a) Topografía. b) Panorámica de la base.



Con el valor encontrado de la constante C se halló el ángulo de contacto para el sistema gota – superficie a las condiciones  $20\mu\text{l/ml}$  y  $35,5\text{ }^\circ\text{C}$ , con un valor de  $90,68^\circ$ , el cual tuvo una diferencia de  $\pm 2^\circ$  al hallado por las topografías. Los valores del radio de interface y el ángulo de contacto se presentan en la tabla 5.

Para los cálculos de los trabajos de adhesión y cohesión y del coeficiente de expansión, se utilizaron las ecuaciones 10, 12 y 14 respectivamente.

Los valores del coeficiente de expansión y los trabajos se muestran en la tabla 6.

Como las interacciones con el fluido F o vapor se consideran muy pequeñas,  $\gamma_{FL}$  es considerada como la tensión superficial del líquido  $\gamma_L$  y  $\gamma_{SF}$  es considerada como  $\gamma_S$ , la superficie de energía libre o tensión superficial del sólido analizado. Por tanto, la ecuación 7 puede ser considerada como:

$$\gamma_S = \gamma_{LS} + \gamma_L * \cos \theta_L \quad (19)$$

El valor de  $\gamma_L$  se tomo como 72,75 (mili newton/metro) y para la determinación de  $\gamma_{SL}$  se considero la teoría de Neuman, donde  $\gamma_{sl} = f(\gamma_{LS}, \gamma_S)$ . Posteriormente se aplicó la aproximación de Berthelot, que viene definida por la ecuación 20.<sup>20</sup>

$$\gamma_{sl} = \gamma_L + \gamma_S - 2\sqrt{\gamma_{LF}\gamma_S} \quad (20)$$

Substituyendo la ecuación 19 en la ecuación 20 se puede obtener la tensión superficial del sólido (recubrimiento):

$$\gamma_S = \frac{\gamma_L(1 + \cos(\theta))^2}{4} \quad (21)$$

---

<sup>20</sup> T. NOMURA, M. IJIMA. Anal. Chim. Acta 131 (1981) 97.

Tabla 5. Cambios de frecuencia, radios, ángulos de contacto del sistema gota-superficie y tensión superficial del recubrimiento.

T[°C]	Concentración de proteína [20µl/ml]	ΔF [Hz]	r [cm]	Angulo de Contacto [grados]	Y <sub>s</sub> [dinas/cm]
35.5	12.5	640	0,168	94.08	18. 28
37.0	12.5	598	0,157	97.74	18. 52
39.5	12.5	610	0,158	96.68	18. 43
35.5	20.0	680	0,167	90.68	18. 19
37.0	20.0	721	0,172	87.29	18. 23
39.5	20.0	738	0,174	85.92	18. 28
35.5	27.5	753	0,176	84.73	18. 34
37.0	27.5	781	0,179	82.53	18. 49
39.5	27.5	816	0,183	79.86	18. 75

La presencia de ángulos de contacto menores a 90° y de otros no mayores a 100° indican buena mojabilidad, por ende la gota se extiende fácilmente sobre la superficie, creando una mayor área de contacto, esto es corroborado por los altos valores en el trabajo de adhesión entre la gota y la superficie del recubrimiento.

A pesar de la presencia de ángulos de contacto pequeños, los valores negativos del coeficiente de expansión indican que la mojabilidad del recubrimiento es parcial.<sup>21</sup>

<sup>21</sup> YOUNG, T. «An Essay on the Cohesion of Fluids». Philosophical Transactions of the Royal Society 95: (1805). pp. 65–87.

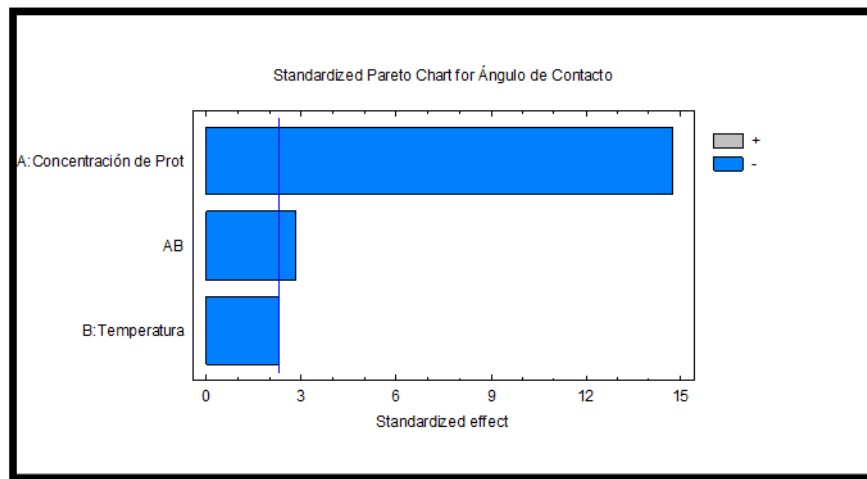
Tabla 6. Trabajos de cohesión, adhesión y coeficiente de expansión para el sistema gota superficie del recubrimiento.

<b>T[°C]</b>	<b>Concentración de proteína [20µl/ml]</b>	<b>WSL [dinas/cm]</b>	<b>Wss [dinas/cm]</b>	<b>S [dinas/cm]</b>
<b>35.5</b>	12.5	67.57	35.56	-77.92
<b>37.0</b>	12.5	62.95	37.03	-82.55
<b>39.5</b>	12.5	64.28	36.87	-81.21
<b>35.5</b>	20.0	71.88	36.38	-73.61
<b>37.0</b>	20.0	76.19	36.45	-69.31
<b>39.5</b>	20.0	77.92	36.56	-67.57
<b>35.5</b>	27.5	79.43	36.68	-66.07
<b>37.0</b>	27.5	82.21	36.99	-63.29
<b>39.5</b>	27.5	85.55	37.50	-59.94

### 3.5 Análisis Estadístico de las pruebas Gravimétricas.

A partir de un software se hizo el análisis estadístico a las pruebas nanogravimétricas. En el diagrama de Pareto se observó como efectos significativos en la variable de respuesta ángulo de contacto, la concentración de proteína, la temperatura y la interacción concentración temperatura (Figura 11). La concentración de proteína tiene un efecto negativo sobre la variable de respuesta, el cual se traduce que a mayor concentración, menor el ángulo de contacto. De igual forma, el efecto de la temperatura e interacción concentración proteína-temperatura muestran la misma respuesta. Los efectos de los factores principales y secundarios se observan en el anexo L.

Figura 11. Diagrama de Pareto para análisis de pruebas gravimétricas.



Mediante el Software estadístico se determinó un modelo para correlacionar el ángulo de contacto con la concentración de proteína, temperatura e interacción concentración-temperatura.

$$\theta = 89.0117 - 6.888125 * Cp - 1.15976 * T - 1.8675 * Cp * T \quad (22)$$

Donde,  $\theta$  es el ángulo de contacto,  $Cp$  es la concentración de proteína y  $T$  es la temperatura.

## 4 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos que relacionaron los ángulos de contacto con las variables de experimentación, se determinó que el factor concentración de proteína de colágeno, fue estadísticamente el más significativo sobre esta variable, mostrando que las superficies con mayor concentración de proteína, presentan comportamientos más hidrofílicos.

De los coeficientes de expansión calculados a partir de las pruebas nanogravimétricas, se determinó que a niveles superiores de concentración, se obtiene un mayor trabajo de esparcimiento de la proteína de colágeno, presentando además una mayor área de contacto, concordando con los bajos valores de los ángulos a las mismas concentraciones.

Basado en el análisis estadístico de las pruebas electroquímicas se concluyó que a menor potencial aplicado la cantidad de proteína de colágeno adsorbida fue mayor. Esto concuerda con los altos valores encontrados para el inverso de la resistencia a la transferencia de carga  $R_{ct}^{-1}$ , a un potencial aplicado de -0,37 V.

Por medio de las mediciones de espectroscopía de impedancia electroquímica se estableció que los parámetros de adsorción de cantidad de proteína adsorbida sobre la superficie polimérica de PGA-Biovidrio-quitosano, se ajustaron a isothermas de Langmuir. Los valores de la energía libre de Gibbs de adsorción mostraron que la proteína de colágeno presentó una gran afinidad por la superficie polimérica.

## 5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

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

ZUXUAN LIN AND MICHAEL D. WARD. Determination of Contact Angles and Surface Tensions with the Quartz Crystal Microbalance., *Anal. Chem* (1996), 1285–1291.

Jean Louis SALAGER. Adsorción y Mojabilidad. Universidad de los Andes, Facultad de ingeniería química. Laboratorio de formulación, interfaces, reología y procesos (1998).

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

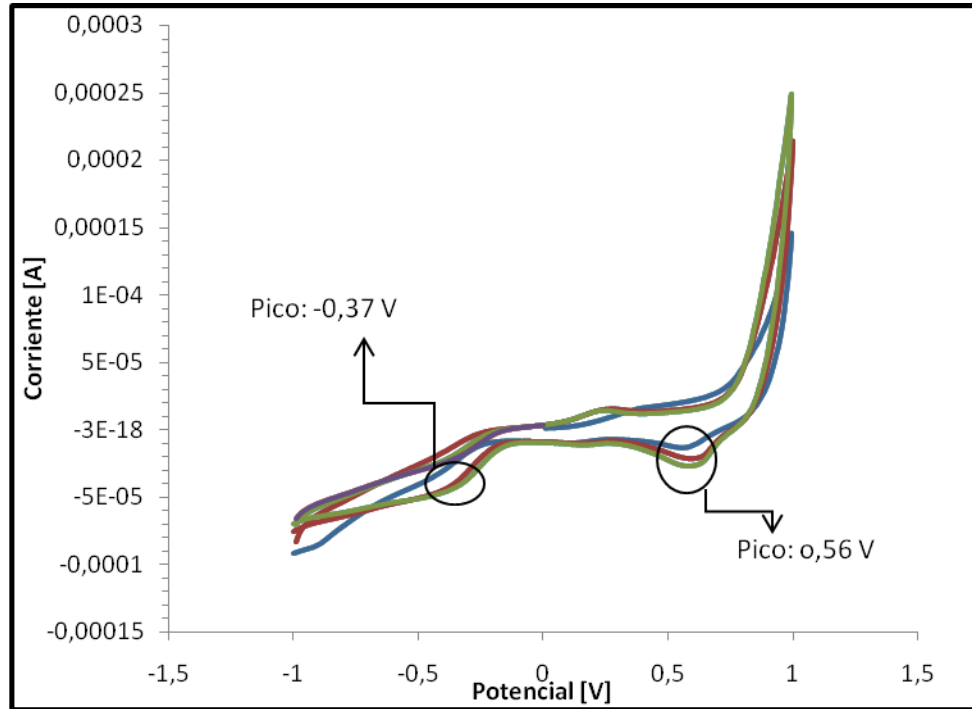
SASHA OMANOVIC and SHARON G. ROSCOE. Interfacial Behavior of  $\beta$ -Lactoglobulin at a Stainless Steel Surface: An Electrochemical Impedance Spectroscopy Study. *Journal of Colloid and Interface Science* 227, 452–460 (2000).

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

Q. BENARD, M. FOIS, M. GRISEL, *Applied Surface Science* 253 (2007) 4753–4758.

## 6 ANEXOS

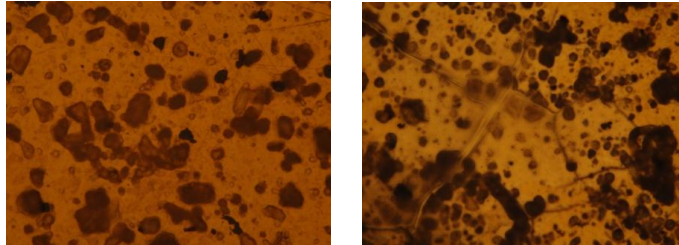
### Anexo A. Voltograma para determinación de oxido reducción.



**Anexo B.** Micrografías de pruebas electroquímicas.

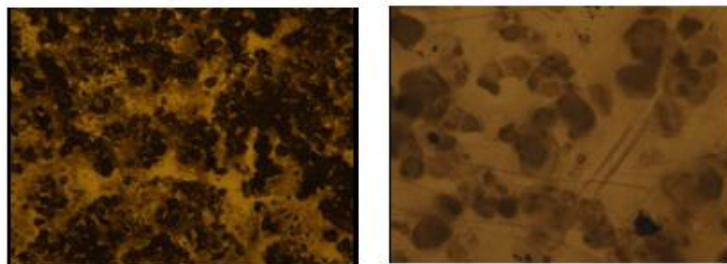
Micrografías recubrimientos. a) Anterior a prueba electroquímica (20x).

b) Posterior a la prueba electroquímica 20  $\mu\text{g/ml}$ , 37 °C, 0V (20x)



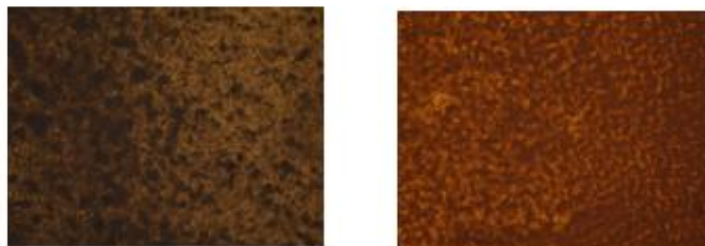
Micrografías recubrimientos. a) Anterior a prueba electroquímica (20x).

b) Posterior a la prueba electroquímica 12,5  $\mu\text{g/ml}$ , 39,5 °C, 0V (20x)



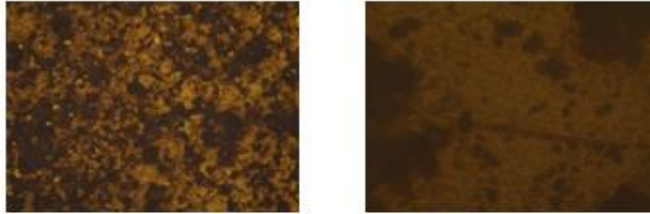
Micrografías recubrimientos. a) Anterior a prueba electroquímica (20x).

b) Posterior a la prueba electroquímica 20  $\mu\text{g/ml}$ , 37 °C, 56V (20x)



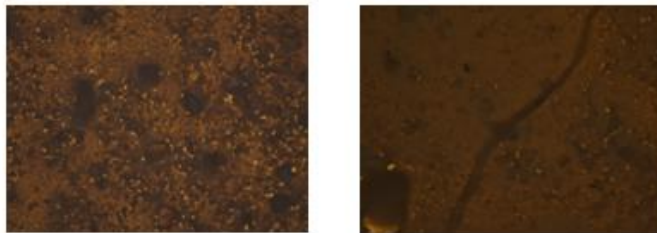
Micrografías recubrimientos. a) Anterior a prueba electroquímica (20x).

b) Posterior a la prueba electroquímica 20 $\mu$ g/ml, 39,5 °C, 0V (20x)



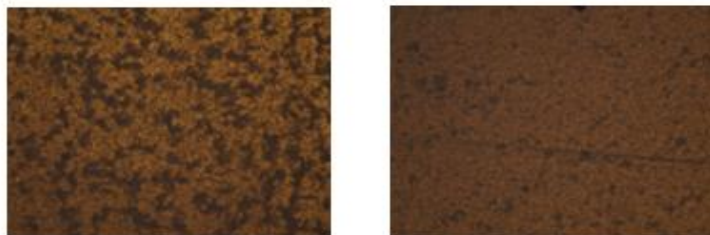
Micrografías recubrimientos. a) Anterior a prueba electroquímica (20x).b)

Posterior a la prueba electroquímica 27,5 $\mu$ g/ml, 37 °C,- 0.37V (20x)



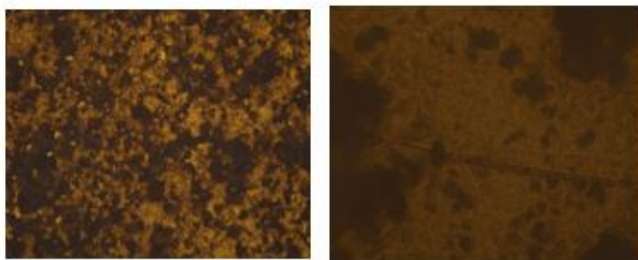
Micrografías recubrimientos. a) Anterior a prueba electroquímica (20x).

b) Posterior a la prueba electroquímica 12,5 $\mu$ g/ml, 39,5 °C, 0V (20x)



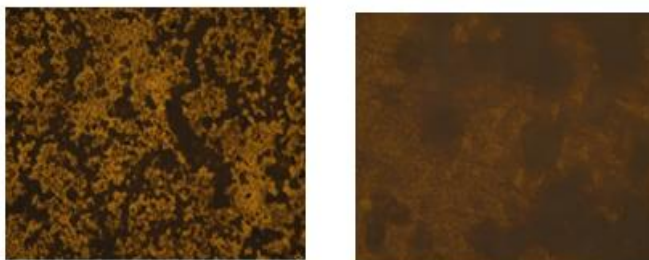
Micrografías recubrimientos. a) Anterior a prueba electroquímica (20x).

b) Posterior a la prueba electroquímica 27,5 $\mu$ g/ml, 37 °C, 0,56V (20x)



Micrografías recubrimientos. a) Anterior a prueba electroquímica (20x).

b) Posterior a la prueba electroquímica 20 $\mu$ g/ml, 39,5 °C, -0,37V (20x)



**Anexo C.** Diseño de experimentos mediciones gravimétricas y electroquímicas.

**Diseño de experimentos para mediciones gravimétricas.**

Para la determinación de ángulos de contacto se realizó un diseño factorial  $3^2$ , con 3 replicas de ensayos escogidos aleatoriamente para completar el análisis estadístico. Donde, -1 representa el nivel más bajo de cada factor, 0 representa el nivel medio y 1 representa el nivel más.

Las variables independientes o factores son la concentración de proteína y la temperatura.

Mediciones Gravimétricas

Concentración de proteína	Temperatura
-1	-1
0	-1
1	-1
-1	0
0	0
1	0
-1	1
0	1
1	1

## Diseño de experimentos para mediciones electroquímicas

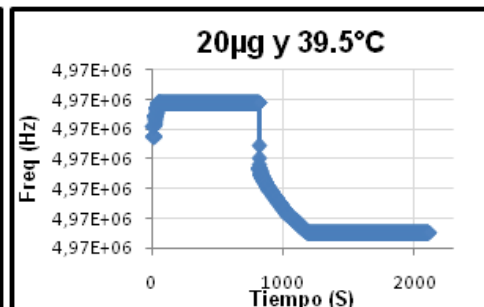
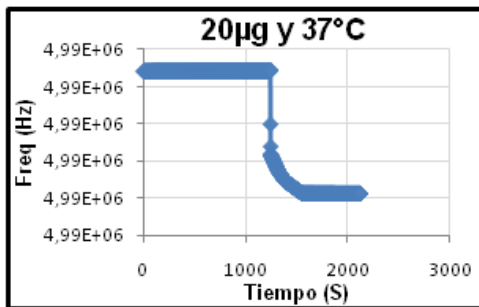
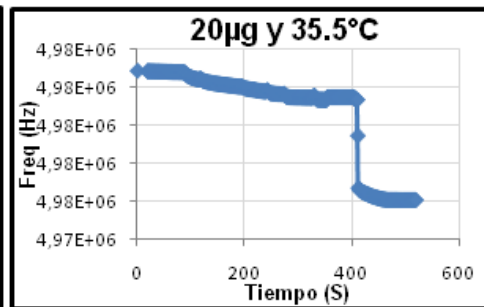
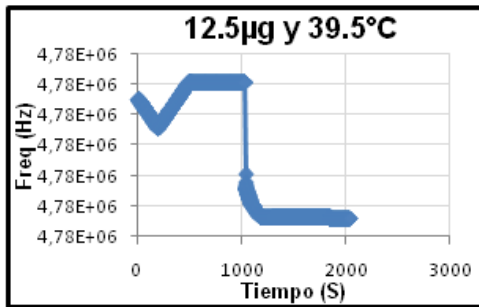
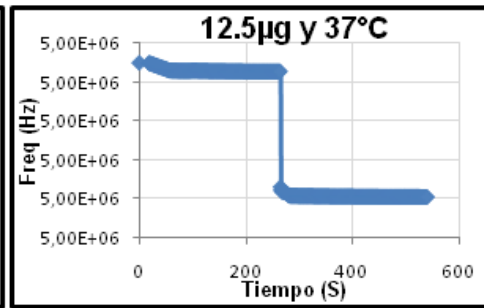
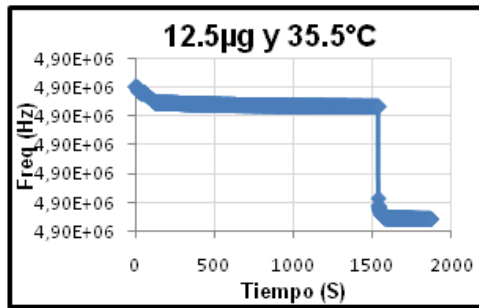
Para el desarrollo de las mediciones electroquímicas se realizó un diseño de experimentos  $2 \times 3^2$  en donde 2 de los factores tienen 3 niveles y se harán 3 repeticiones escogidas aleatoriamente. Donde, -1 representa el nivel más bajo de cada factor, 0 representa el nivel medio y 1 representa el nivel más alto.

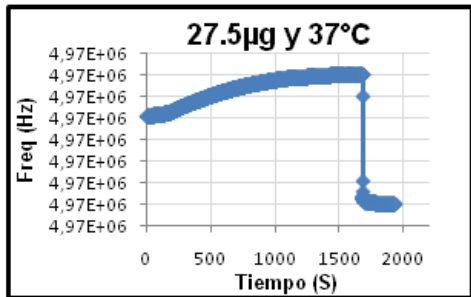
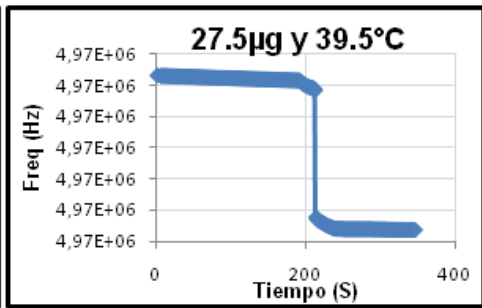
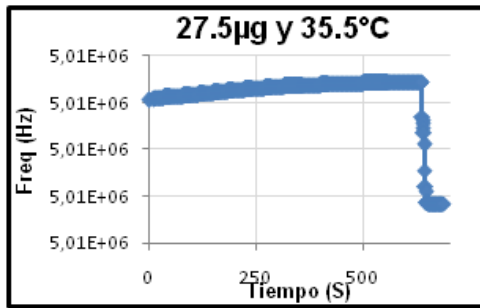
Los factores o variables independientes son la concentración de proteína, temperatura y potencial.

### Mediciones Electroquímicas

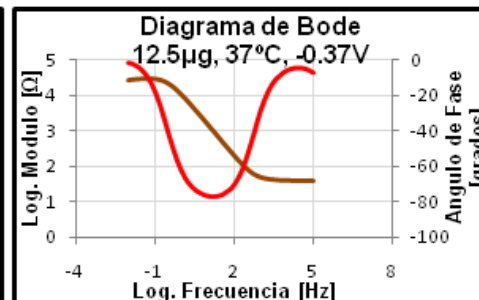
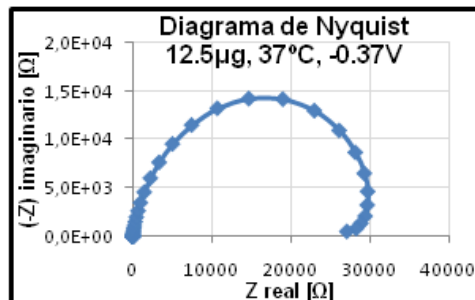
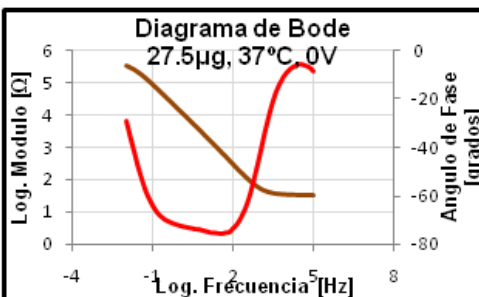
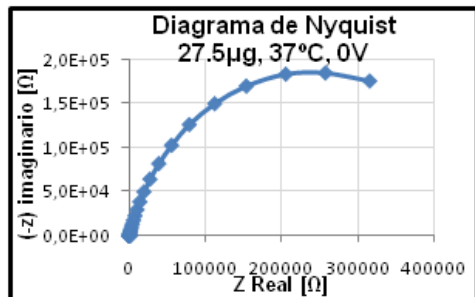
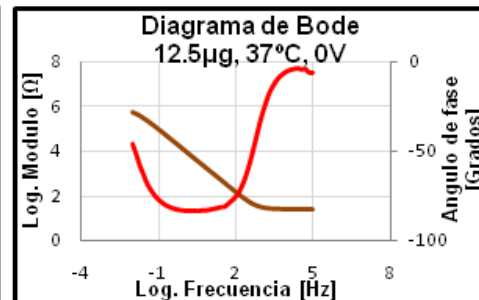
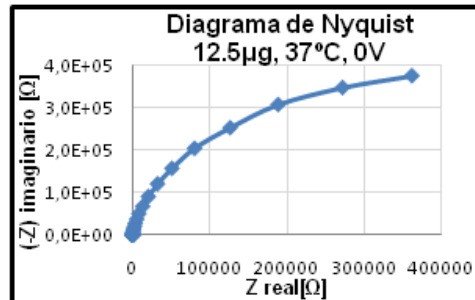
Concentración proteína	Temperatura	Voltaje
-1	1	-1
0	1	-1
1	1	-1
-1	-1	-1
0	-1	-1
1	-1	-1
-1	1	0
0	1	0
1	1	0
-1	-1	0
0	-1	0
1	-1	0
-1	1	1
0	1	1
1	1	1
-1	-1	1
0	-1	1
1	-1	1

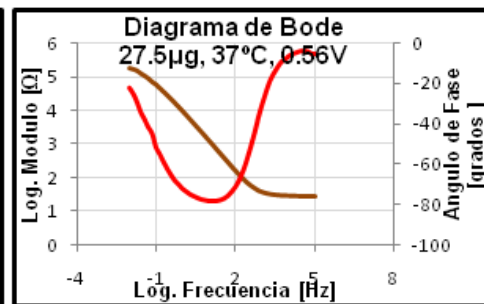
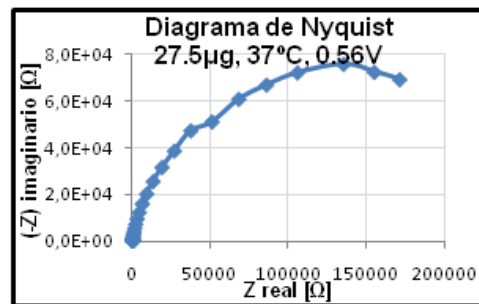
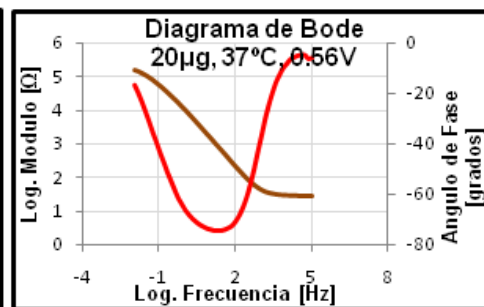
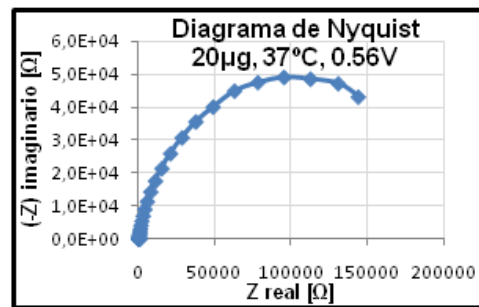
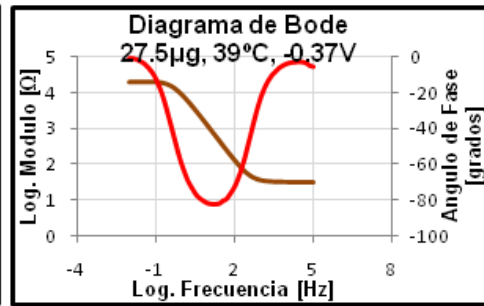
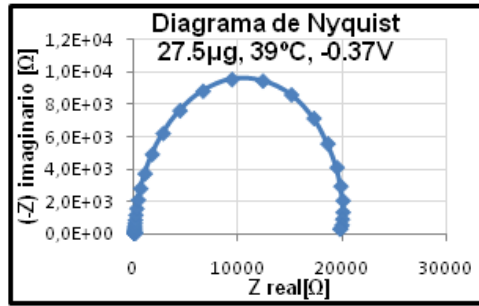
Anexo D. Gráficas pruebas gravimétricas.

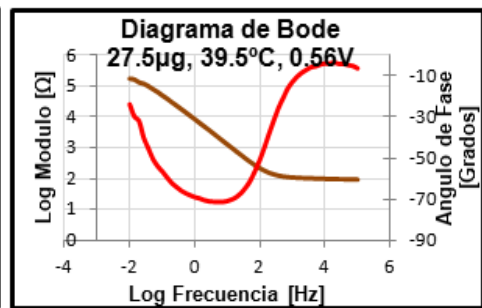
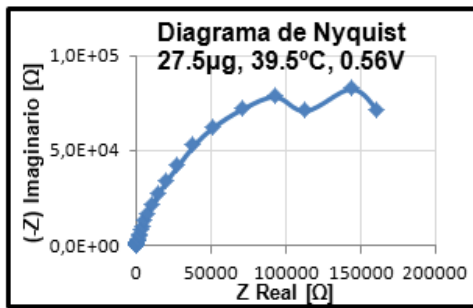
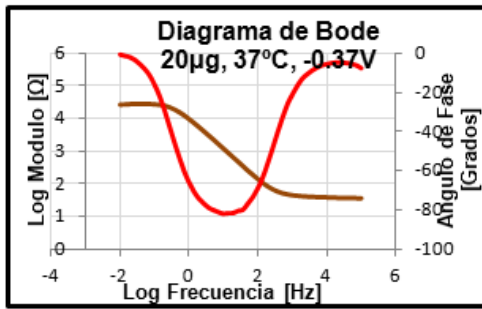
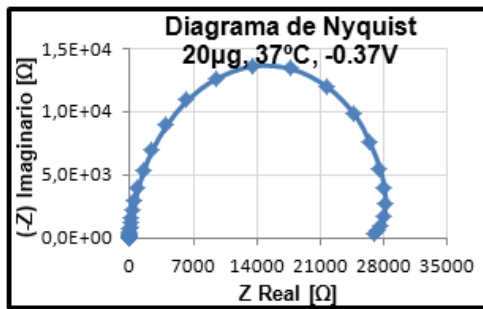
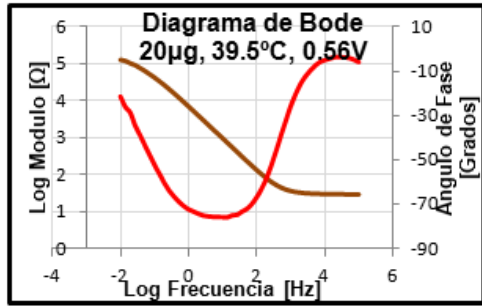
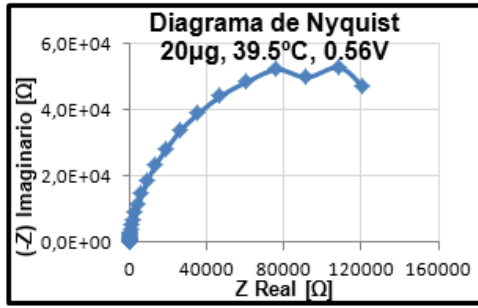


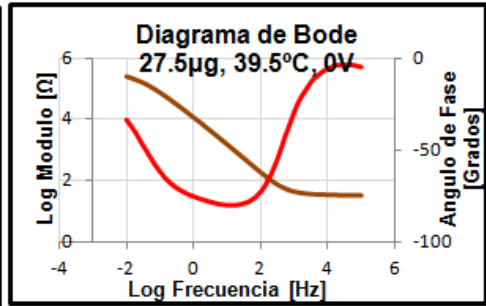
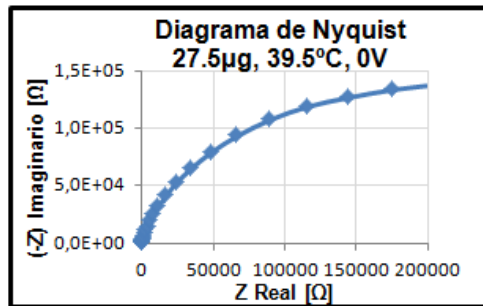
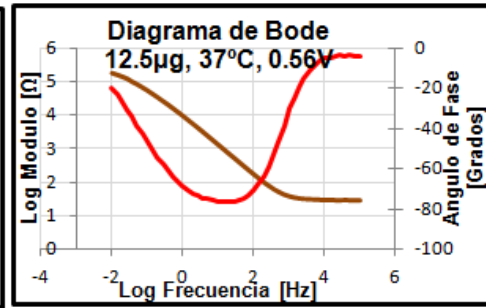
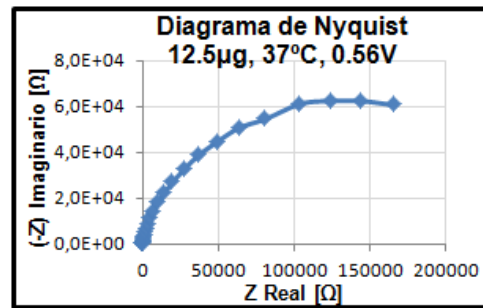
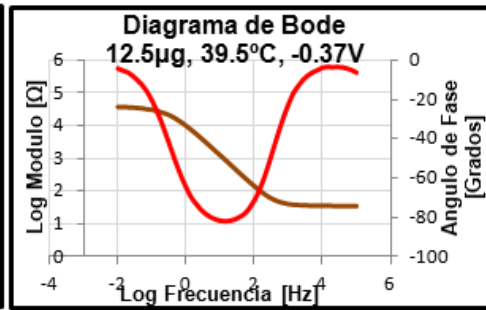
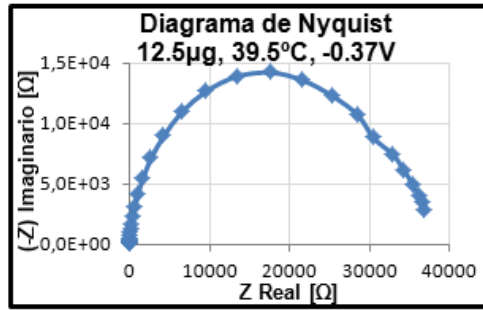


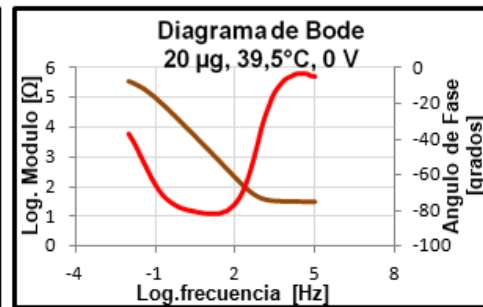
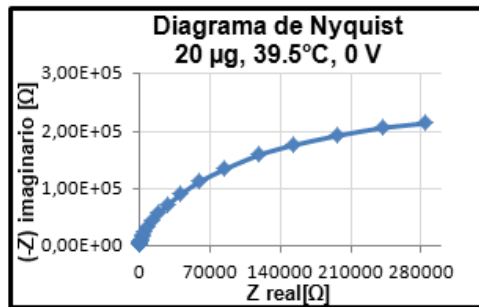
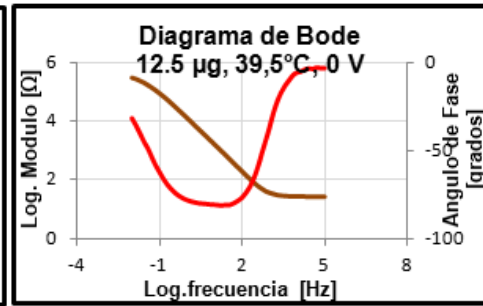
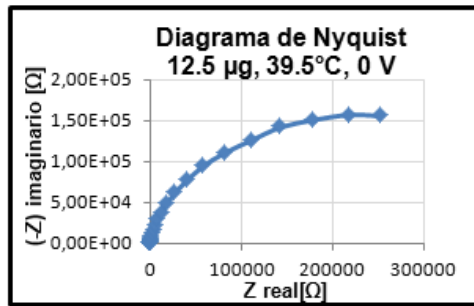
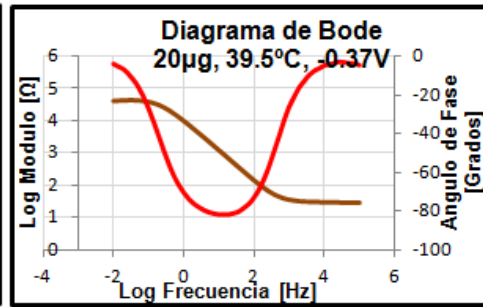
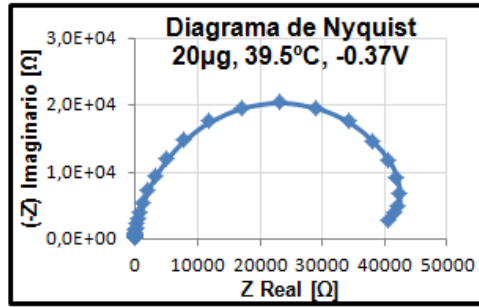
**Anexo E.** Espectros de Bode y Nyquist obtenidos de la simulación de los datos electroquímicos.











## Anexo F. Análisis cuantitativo del Biocerámico.



# Laboratorio de Difracción de Rayos-X

INF-050-10

Bucaramanga, Mayo 18 de 2010

SEÑORES:  
ESCUELA DE INGENIERÍA METALURGICA  
Atn: Ing. Custodio Vasquez  
Director del proyecto 8453  
UIS/Presente

Cordial saludo:

Por medio de la presente estoy haciendo entrega del resultado del análisis cuantitativo por Difracción de Rayos-X de una (1) muestra recibida el 10 de Mayo de 2010, identificada como "HIDROXILAPATITA".

Atentamente,

**JOSÉ ANTONIO HENAO MARTÍNEZ**  
Director  
Laboratorio de Difracción de Rayos-X  
PQ 0321

*Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química, Laboratorio de Postgrado 111  
Edificio Camilo Torres, Bucaramanga, PBX 6344000 Ext. 22 26, Telefax 6347166  
Apartado Aéreo N° 678, Email: rayox@uis.edu.co NIT 890. 201.213-4*

## METODOLOGÍA

### 1. Preparación y Montaje de las muestras

La muestra fue pulverizada en un mortero de ágata y llevada a un tamaño de 38  $\mu\text{m}$  (400 mesh). El espécimen seleccionado de la muestra fue montado en un portamuestra de aluminio mediante la técnica de llenado frontal.

### 2. Toma de datos de difracción

Se realizó en un difractómetro de polvo marca PANalytical modelo X'PERT PRO MPD bajo las siguientes condiciones:

Voltaje	45(kV)
Corriente	40(mA)
Rendijas Soller	0.04 rad (Incidencia y Difracción)
Rendijas Fijas	1/4 y 1/8 (Incidencia) y 1/4 (Difracción)
Muestreo	0.013° 2theta
Rango de Medición	5-70° 2theta
Radiación	CuK $\alpha$ 1
Filtro	Ni
Detector	de estado sólido referencia PIXcel con 255 canales activos
Tipo de barrido	Continuo
Tiempo por paso	59 segundos

### 3. Tipo de Análisis

#### Análisis Cualitativo

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).

#### Análisis Cuantitativo

El análisis cuantitativo de las fases encontradas se realizó mediante el refinamiento por el Método de Rietveld del perfil observado habiéndole agregado a la muestra una cantidad conocida de un estándar interno (*Aluminum oxide*, -100mesh, 99%. *Corundum*,  $\alpha$ -phase. Aldrich No. 23,474-5) correspondiente al 20%.

### 4. Información suministrada por el cliente

Análisis elemental: No.

Interés por alguna(s) fase(s) en particular: Identificación y cuantificación de fases cristalinas de compuestos de Ca y P.

\*Los resultados se relacionan únicamente con las muestras analizadas.

Página 2 de 4

## RESULTADOS

### 1. HIDROXIAPATITA (C1ZV)

	FASE	No. TARJETA PDF-2	NOMBRE	CUANTITATIVO
Cristalinos	Ca <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> OH	010-76-0894	Hidroxiapatita	31.2 % (D.E = 0.4)
	Ca <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	000-55-0898	Whitlockita	68.8 % (D.E = 0.6)

Nota:  
D.E = Desviación estándar

#### Observaciones:

- Se recomienda realizar análisis elemental para corroborar la presencia de las fases reportadas.

**Anexo G.** Parámetros circuito equivalente.

Parámetros del circuito equivalente a 0V

T[°C]	Concentración [µg/ml]	Rs[Ω]	CP1[F]	N1	R1[Ω]	CP2[F]	N2	R2[Ω]
<b>37</b>	12,5	25,37	1,64E-06	0,92	24864	3,54E-06	0,93	816270
	20	29,34	1,34E-05	0,93	23456	3,38E-06	0,81	543220
	27,5	32,71	1,11E-05	0,89	20176	4,72E-06	0,75	457880
<b>39,5</b>	12,5	26,57	1,24E-05	0,94	7973	4,42E-06	0,5	492720
	20	31,84	1,16E-05	0,93	26357	3,67E-06	0,87	540000
	27,5	34,08	1,44E-05	0,92	23476	6,61E-06	0,48	456490

Parámetros del circuito equivalente a -0,37 V

T[°C]	Concentración [µg/ml]	Rs[Ω]	CP1[F]	N1	R1[Ω]	CP2[F]	N2	R2[Ω]
<b>37</b>	12,5	40,64	1,44E-05	0,91	18660	4,68E-06	1	11277
	20	39,9	1,25E-05	0,93	16880	3,72E-05	0,96	7805
	27,5	31,68	1,64E-05	0,96	18561	5,52E-05	1	6875
<b>39,5</b>	12,5	36,33	1,52E-05	0,95	26013	7,78E-05	0,64	11505
	20	29,55	1,66E-05	0,94	36586	3,94E-05	1	7400
	27,5	32,41	1,47E-05	0,95	20253	1,79E-04	0,68	7127

Parámetros del circuito equivalente a 0.56V

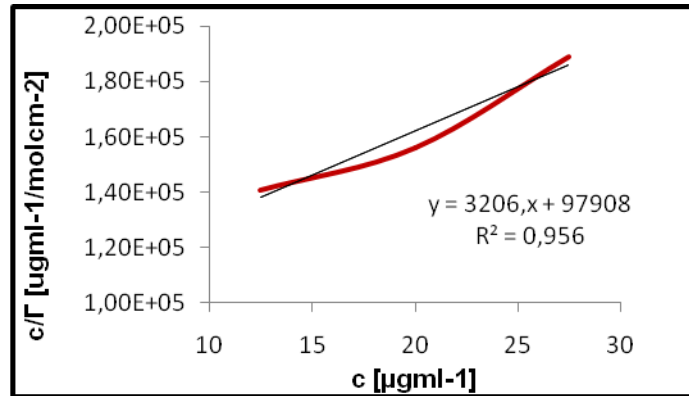
T[°C]	Concentración [µg/ml]	Rs[Ω]	CP1[F]	N1	R1[Ω]	CP2[F]	N2	R2[Ω]
<b>37</b>	12,5	29,29	1,86E-05	0,89	69135	2,36E+00	0,86	102040
	20	27,71	1,89E-05	0,87	72992	3,12E-05	0,91	71060
	27,5	29,56	1,82E-05	0,9	91773	2,57E-05	0,85	83280
<b>39,5</b>	12,5	38,47	2,20E-05	0,91	86119	1,60E-05	0,62	57607
	20	30,19	2,68E-05	0,88	87179	6,11E-05	0,93	51400
	27,5	98,74	2,27E-05	0,85	63753	9,49E-06	0,84	56000

**Anexo H.** Datos para el cálculo de las isothermas de Langmuir y parámetros termodinámicos.

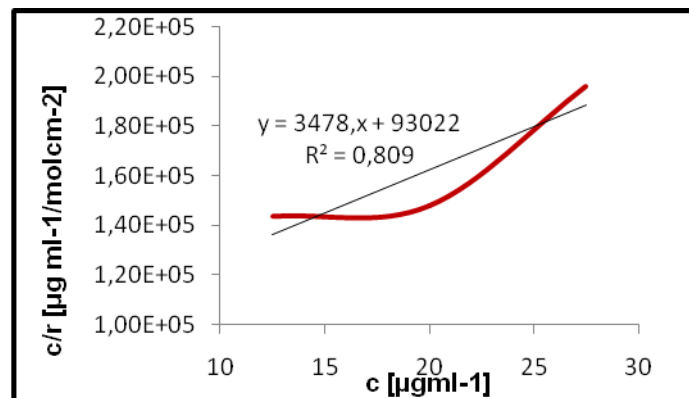
Potencial[V]	T[K]	$\Gamma_{\text{máx}}$ [mol/cm <sup>2</sup> ]	Bads [ml/ $\mu$ g]	$-\Delta G$ [J/mol]	$\Delta H$ [J/mol]	$\Delta S$ [J/mol*K]
<b>0,00</b>	310,15	6,28E-05	1,99E-03	29943,58	98816	3282
	312,65	2,34E-05	4,26E-02	38150,13		
<b>-0,37</b>	310,15	3,12E-04	3,27E-02	37164,89	42769	257,7
	312,65	2,87E-04	3,74E-02	37809,20		
<b>0,56</b>	310,15	1,48E-05	2,19	47998,53	67188	2321
	312,65	1,83E-05	17,56	53801,22		

**Anexo I.** Isotermas de Langmuir a partir de mediciones electroquímicas.

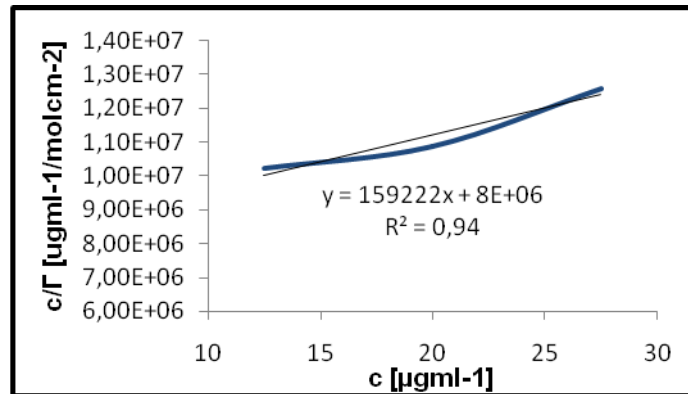
Isoterma de Langmuir para adsorción de colágeno -0.37 V y 37°C



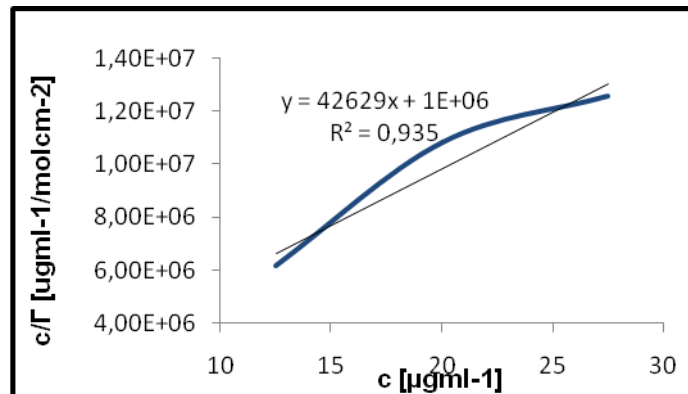
Isoterma de Langmuir para adsorción de colágeno -0.37 V y 39,5°C



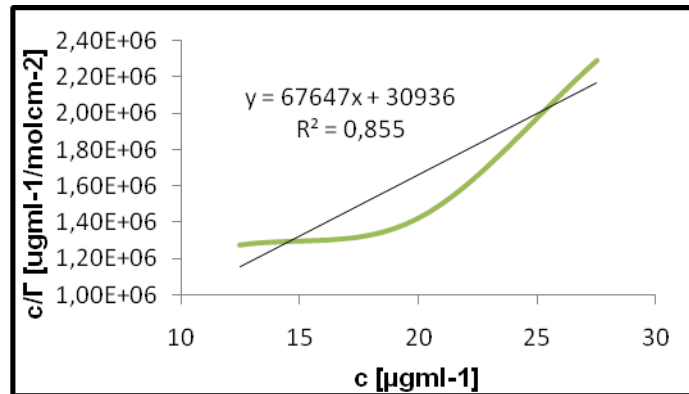
Isoterma de Langmuir para adsorción de colágeno a 0 V y 37°C.



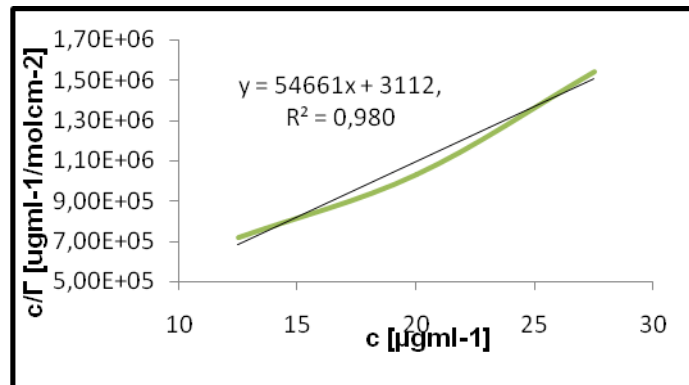
Isoterma de Langmuir para adsorción de colágeno a 0 V y 39,5°C.



Isoterma de Langmuir para adsorción de colágeno a 0.56V y 37°C

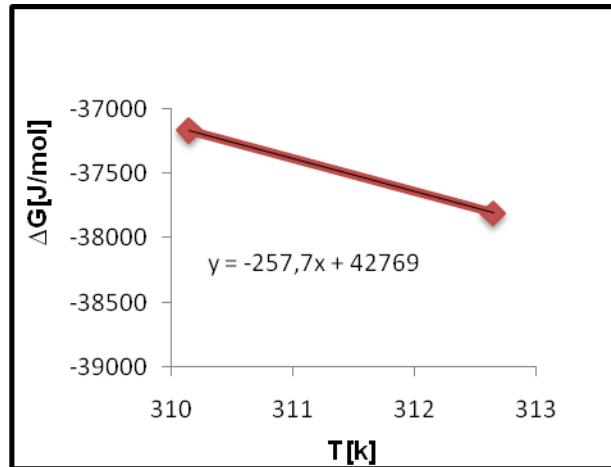


Isoterma de Langmuir para adsorción de colágeno a 0.56V y 39,5°C

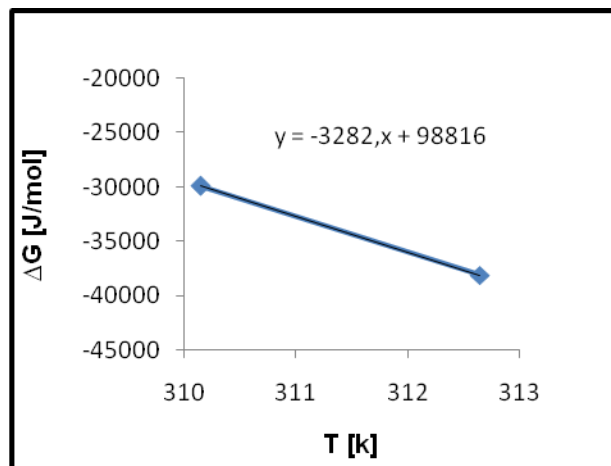


**Anexo J.** Graficas  $\Delta G$  de adsorción de proteína de colágeno contra temperatura.

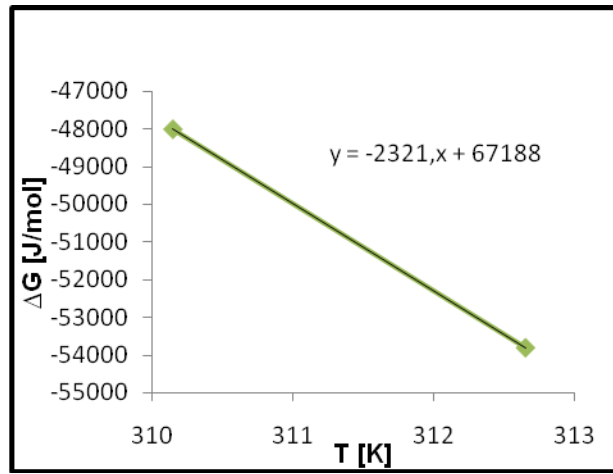
Graficas  $\Delta G$  contra temperatura a -0.37 V



Graficas  $\Delta G$  contra temperatura a 0 V



Graficas  $\Delta G$  contra temperatura a 0.56V



**Anexo K.** Pasos para la síntesis de PLA (Ácido Poliláctico) y PGA (Ácido Poliglicólico).

**Síntesis de PLA:**

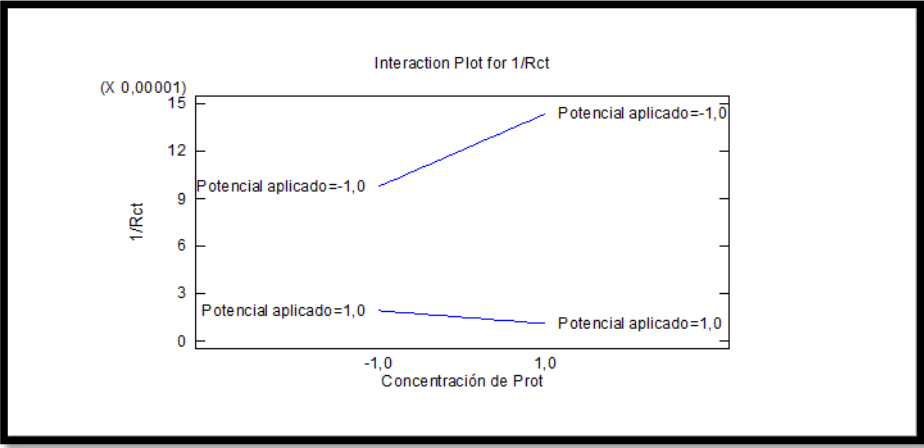
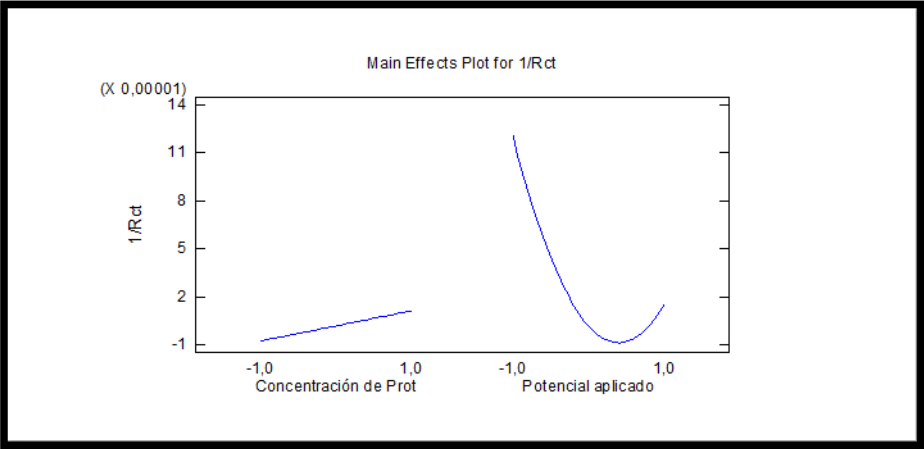
- Deshidratación:  $T=100^{\circ}\text{C}$  y  $P=1\text{atm}$ ,  $t = 1$  a  $2$  h.
- Esterificación:  $T = 180^{\circ}\text{C}$  y  $P = 100$  mmHg,  $t = 6$  a  $7$  h.
- Policondensación:  $T = 180^{\circ}\text{C}$  y  $P = 10$ mmHg,  $t = 5$  h, con 1.5% de catalizador.

**Síntesis de PGA:**

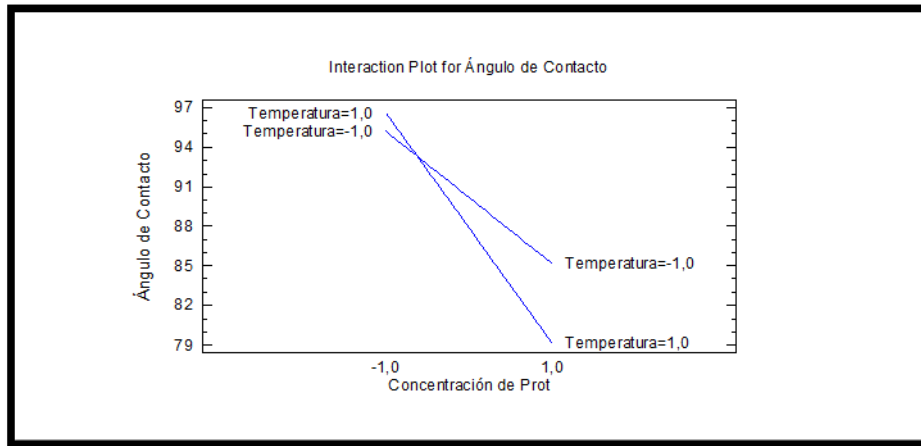
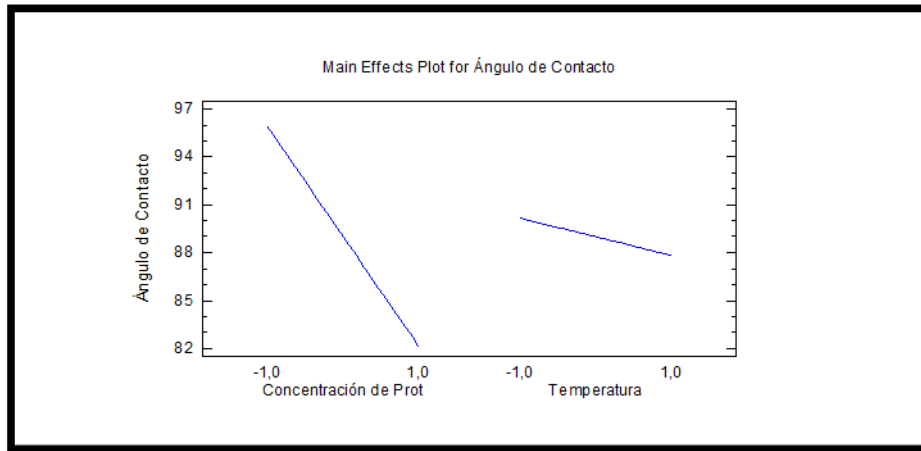
- Mezcla del ácido glicólico y el  $\text{ZnCl}_2$  a  $T = 190^{\circ}\text{C}$  y  $P = 150$ mmHg,  $t = 1$  h.
- Vacío a  $P = 30$ mmHg, a  $T = 190^{\circ}\text{C}$ , durante  $t = 4$ h.
- Calentamiento a  $T = 230^{\circ}\text{C}$  y se envasa el producto en un crisol sellado.
- Calentamiento a  $190^{\circ}\text{C}$  ,  $t = 20$  h

**Anexo L.** Diagramas de efectos principales y de efectos de interacción para pruebas de EIS y gravimétricas.

Diagramas pruebas EIS



## Diagramas pruebas gravimétricas



## **Anexo M.** Materiales y Equipos.

- Microbalanza de Cristal de cuarzo (QCM 200).
- Cristales de cuarzo AT-cut 5 MHz Au-Ti
- Gamry 600 (Potenciostato/Galvanostato/ZRA)
- QCM 200 (Microbalanza de Cristal de cuarzo).
- Electrodo de calomel y Contraelectrodo de fibra de carbón
- Microscopio Olympus BX51
- Celda electroquímica balón con tapas planas.
- Celda de teflón ajustada al holder de la microbalanza.