

**EVALUACIÓN DEL DIRECCIONAMIENTO DE CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS A  
PARTIR DEL PATRONAMIENTO CON LUZ UV DE PROTEÍNAS SOBRE  
MEZCLAS DE PLA-PGA CON BIOCERÁMICOS**

**LESLY ALEJANDRA DELGADO SÁNCHEZ**

**NEMMA MARÍA MARTÍNEZ GUERRA**

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

**2011**

**EVALUACIÓN DEL DIRECCIONAMIENTO DE CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS A  
PARTIR DEL PATRONAMIENTO CON LUZ UV DE PROTEÍNAS SOBRE  
MEZCLAS DE PLA-PGA CON BIOCERÁMICOS**

**LESLY ALEJANDRA DELGADO SANCHÉZ**

**NEMMA MARÍA MARTÍNEZ GUERRA**

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

Director:

**HUGO ARMANDO ESTUPIÑAN DURÁN**

M.Sc. Ingeniero Metalúrgico

Codirector:

**NERLY DEYANIRA MONTAÑEZ SUPELANO**

Ingeniera Química

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

**2011**

*Las ideas que iluminan mi camino una y otra vez y me han dado coraje para enfrentar la vida con alegría han sido: la amabilidad, la belleza y la verdad.*

*Einstein*

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	13
1. MARCO TEÓRICO.....	15
1.1 INGENIERÍA DE TEJIDOS .....	15
1.2 BIOACTIVIDAD .....	16
1.3 INTERFACE CÉLULA-MATERIAL.....	16
1.3.1 Colágeno.....	17
1.4 BIOCERÁMICOS.....	18
1.5 POLÍMEROS BIOCOPATIBLES Y BIODEGRADABLES .....	19
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	21
2.1 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	21
2.1.1 Síntesis de Polímeros y Biocerámicos. ....	22
2.1.2 Obtención de los Recubrimientos.....	22
2.1.3 Mediciones Electroquímicas (EIS) y Gravimétricas (QCM). ....	23
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	25
3.1 ANÁLISIS DEL PROCESO DE ADHESIÓN POR EIS.....	25
3.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR EIS. ...	30
3.3.1 Análisis de la varianza para R cel-pol.....	31
3.3 ANÁLISIS DEL PROCESO DE ADHESIÓN POR QCM. ....	33
3.4. ANÁLISIS DE MICROSCOPIAS OPTICAS.....	36
4. CONCLUSIONES.....	38
5. RECOMENDACIONES .....	39
BIBLIOGRAFÍA .....	40
ANEXOS .....	42

## LISTA DE TABLAS

TABLA 1. SOLUCIONES DE POLÍMEROS Y BIOCERÁMICAS EMPLEADOS. ....	23
TABLA 2. VARIACIÓN DE LA MASA ADHERIDA POR UNIDAD DE ÁREA. ....	34

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	21
FIGURA 2. FOTOGRAFÍA Y ESQUEMA DEL MONTAJE EQCM.....	24
FIGURA 3. CIRCUITO EQUIVALENTE DEL PROCESO DE CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS SOBRE RECUBRIMIENTOS DE PLA-PGA Y BIOCERÁMICOS MODIFICADOS.....	25
FIGURA 4. REPRESENTACIÓN DEL AJUSTE DE LOS ESPECTROS DE BODE MEDIANTE SIMULACIÓN EN EL SOFTWARE ZVIEW.....	26
FIGURA 5. RESISTENCIA A LA TRANSFERENCIA DE LA CARGA ENTRE CÉLULAS RECUBRIMIENTO VS. TIEMPO. A) HIDROXIAPATITA B) FOSFATO TRICALCICO B.....	28
FIGURA 6. RESISTENCIA A LA TRANSFERENCIA DE CARGA ENTRE CÉLULAS Y MEDIO PARA LA HIDROXIAPATITA.....	30
FIGURA 7. DIAGRAMA DE PARETO PARA RCEL/POL.....	31
FIGURA 8. DIAGRAMA DE INTERACCIONES DE EFECTOS PRINCIPALES.....	32
FIGURA 9. RELACIÓN DE LA VARIACIÓN DE LA MASA POR UNIDAD DE ÁREA RESPECTO AL TIEMPO. A) FOSFATO TRICALCICO B, B) HIDROXIAPATITA.....	35
FIGURA 10. MICROGRAFÍA FOSFATO TRICALCICO B- 10MG/ML-CON IRRADIACIÓN 10X...	36
FIGURA 11. MICROGRAFÍA FOSFATO TRICALCICO B- 10MG/ML-CON IRRADIACIÓN 10X...	37

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. MÉTODOS PARA LA SÍNTESIS DE POLIMEROS Y BIOCERÁMICOS	43
ANEXO B. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES .....	44
ANEXO C. PARÁMETROS DE LOS CIRCUITOS EQUIVALENTES .....	48
ANEXO D. DIAGRAMAS DE ÁNGULO DE FASE OBTENIDOS POR LA TÉCNICA EIS .....	50
ANEXO E. DIAGRAMAS DE $\Delta F$ OBTENIDAS POR LA MICROBALANZA DE CRISTAL DE CUARZO.....	65
ANEXO F. TABLAS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	66
ANEXO G. MICROGRAFÍAS.....	67

**TÍTULO:** EVALUACIÓN DEL DIRECCIONAMIENTO DE CÉLULAS OSTEÓBLÁSTICAS A PARTIR DEL PATRONAMIENTO CON LUZ UV DE PROTEÍNAS SOBRE MEZCLAS DE PLA-PGA CON BIOCERÁMICOS.\*

**AUTORES:** LESLY ALEJANDRA DELGADO SÁNCHEZ  
NEMMA MARÍA MARTÍNEZ GUERRA\*\*

**PALABRAS CLAVES:** Ingeniería de tejidos, irradiación ultravioleta, adhesión celular, espectroscopia de impedancia electroquímica, microbalanza de cristal de cuarzo.

## RESUMEN

Las enfermedades relacionadas con el sistema musculoesquelético representan la causa más común de incapacidad física y afecta millones de personas en todo el mundo, dentro de este contexto, la ingeniería de tejidos junto con otras disciplinas juega un papel fundamental en el desarrollo de nuevos materiales para la regeneración de defectos óseos; evaluando cuantitativamente la afinidad de la interface material-célula determinada parcialmente por la adsorción de proteínas en la superficie.

Utilizando las técnicas de Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS) y Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM) simultáneas en una celda de tres electrodos a condiciones de bioseguridad adicionando una concentración de 60000 células/ml con 2ml de medio, se evaluó el direccionamiento y adhesión de células osteoblasticas sobre películas delgadas de polímeros (PLA, PGA) con 10% de biocerámicos (HAP, TCP- $\beta$ ), obtenidos por electrodeposición catódica, activados superficialmente variando la concentración de colágeno pipeteado (10 $\mu$ g/ml, 20 $\mu$ g/ml) e irradiando el recubrimiento con luz ultravioleta empleando un filtro de aluminio a tres marcas con 1mm de espesor durante 10min.

Pruebas de Microscopía Óptica se llevaron a cabo para estudiar la morfología de las superficies irradiadas y no irradiadas adecuadas para la adhesión y proliferación celular, dando mejores resultados de direccionamiento celular en las zonas irradiadas.

---

\* Trabajo de grado.

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ing. Química. Director. Hugo Armando Estupiñán Durán. Codirector. Nerly Deyanira Montañez. Universidad Industrial de Santander.

**TITLE:** EVALUATION OF ADDRESSING OSTEOBLASTIC CELLS PATTERNS FROM PROTEIN WITH UV LIGHT FOR MIXED WITH BIOCERAM AND PLA-PGA.\*

**AUTHORS:** LESLY ALEJANDRA DELGADO SÁNCHEZ  
NEMMA MARÍA MARTÍNEZ GUERRA\*\*

**KEYWORD:** Tissue Engineering, ultraviolet irradiation, cell adhesion, Electrochemical Impedance Spectroscopy, Quartz Crystal Microbalance.

### **ABSTRACT**

Diseases associated with musculoskeletal system represent most common cause of disability and affects millions of people around the world, in this context, tissue engineering with other disciplines plays a fundamental role in the development of new materials regeneration of bone defects, evaluating quantitatively the affinity of cell-material interface partially determined by the adsorption of proteins the surface.

Using the techniques of electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and Quartz crystal microbalance (QCM) simultaneously in a three electrode cell biosecurity conditions by adding a concentration of 60000 cells/ml and 2ml of medium, was evaluated routing and osteoblast cell adhesion thin films of polymers (PLA, PGA) with 10% of bioceramic (HAP,TCP- $\beta$ ), obtained by cathodic electrodeposition, surface activated by varying the pipette concentration of collagen (10 $\mu$ g/ml, 20 $\mu$ g/ml) and irradiating the coating with ultraviolet light using an aluminum filter to three brands with 1mm thickness during 10 min.

Light microscopic tests were conducted to study the morphology of irradiated and unirradiated surfaces suitable for adhesion and proliferation cell, giving better results in cell addressing areas irradiated.

---

\*Grade Work

\*\*Engineering Physical-Chemical Faculty, Chemical Engineering School. Director. Hugo Armando Estipiñan Durán. Codirector. Nerly Deyanira Montañez. Universidad Industrial de Santander.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, en el área de los biomateriales destinados a la fijación y regeneración ósea, existe un interés creciente en el desarrollo de materiales funcionales e inteligentes, capaces de estimular la respuesta biológica necesaria para restablecer las funciones que el tejido ha perdido. En el caso de los materiales para fijación ósea, la idea es crear un material que sea capaz de soportar las cargas iniciales y se degrade de forma gradual, transfiriendo las cargas de forma progresiva al nuevo hueso, de manera que su función es, por tanto temporal, ya que el material está llamado a reabsorberse una vez restablecida la función del tejido. En el caso de los materiales para regeneración ósea, el objetivo de estos materiales es interactuar con el tejido de forma específica, mediante estímulos a nivel celular y molecular, combinando bioreabsorbabilidad y bioactividad dentro del mismo material.

Los biomateriales utilizados en el campo ortopédico han tenido un papel fundamental en la restauración de la movilidad y calidad de vida de millones de personas. Hoy en día, las enfermedades relacionadas con el sistema músculo-esquelético representan la causa más común de incapacidad física y afectan a cientos de millones de personas en todo el mundo, por lo que se plantea la necesidad de desarrollar diferentes sistemas para la regeneración y reparación de defectos óseos. Dentro de este contexto, la medicina regenerativa juega un papel fundamental en el desarrollo de nuevos materiales para la elaboración de implantes y para la regeneración de tejidos.

La adhesividad celular es una característica importante de los biomateriales. Para el desarrollo de materiales con mejor biocompatibilidad, es necesario evaluar cuantitativamente la afinidad del material por las células. La adherencia de una

sustancia a un material, está parcialmente determinada por la adsorción de proteínas a la superficie del material, así como a la actividad de la propia célula.

En esta investigación se evaluó la adhesión e interacción de células osteoblásticas sobre películas delgadas de mezclas de polímeros de ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PLG) y biocerámicas de hidroxiapatita (HAP) y fosfato tricálcico beta (TCP- $\beta$ ), cuyas superficies fueron activadas con colágeno y con luz ultravioleta. Las técnicas de caracterización, se realizaron combinando los métodos no destructivos de Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS) y Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM).

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 INGENIERÍA DE TEJIDOS

La ingeniería de tejidos aplica principios biológicos, químicos para la reparación, restauración y regeneración de tejidos vivos utilizando biomateriales, células y señalizadores, sólo ó combinados. Se basa en la utilización de biomateriales bioactivos y bioabsorbibles, capaces de estimular la respuesta celular y molecular de forma controlada, para que actúen como soportes temporales en la reparación de defectos óseos; un material cuyos productos de degradación sean de fácil eliminación y no-tóxicos, y que sea osteoinductivo, es decir, induzca la formación de tejido óseo. Dentro de esta área existen dos tendencias principalmente; la primera consiste en el desarrollo de andamios tridimensionales acelulares, que sirvan para alojar las diferentes células una vez implantados in vivo; la segunda tendencia consiste en el desarrollo de andamios tridimensionales, que inicialmente son colonizados por las células progenitoras bajo condiciones in vitro, y luego son implantados en el paciente para reemplazar el tejido dañado.

En el caso del tejido óseo, los materiales más utilizados para el desarrollo de las estructuras tridimensionales, son las hidroxiapatitas, los polímeros biodegradables, y algunos polímeros de origen natural como el colágeno o la quitina. En muchos casos las superficies de los materiales son modificadas con diferentes proteínas y factores de crecimiento que estimulan la respuesta celular, y activan los genes responsables de la diferenciación y mineralización del tejido [1].

## 1.2 BIOACTIVIDAD

Un biomaterial es un dispositivo creado para reemplazar una parte o una función en el cuerpo humano de una manera segura, fiable, económica y fisiológica. El éxito de los biomateriales en el cuerpo depende de factores como las propiedades de los materiales, el diseño del implante y biocompatibilidad del material empleado, así como factores que el ingeniero no controla.

La biocompatibilidad es la capacidad de un material artificial de ser aceptado por los tejidos que lo rodean y por el cuerpo, mientras que la bioactividad, es la capacidad de un material de formar *in vivo*, una capa de apatita en la superficie, lo cual permite al material enlazarse con el hueso a través de esta capa debido a su similitud con la composición química y estructura con el hueso mineral. Por lo tanto, los osteoblastos pueden proliferar y diferenciarse sobre la capa formada para producir apatita y colágeno y como consecuencia, el hueso puede crecer en contacto directo con la capa superficial de apatita [11].

## 1.3 INTERFACE CÉLULA-MATERIAL

La interface tejido-material es de vital importancia para definir el funcionamiento de un biomaterial o dispositivo biomédico. Los estudios *in vitro* de la adhesión y proliferación celular sobre diferentes materiales han demostrado que los sistemas biológicos tienen la habilidad de reconocer cualquier detalle a nivel molecular. El reconocimiento está programado en las moléculas y células a través de la combinación de su arquitectura tridimensional, la arquitectura química y sus propiedades dinámicas. La energía superficial es uno de los factores superficiales más importantes en lo que respecta a la adhesión y proliferación celular y, sin embargo, tiene menos influencia en la orientación celular debido a que factores como la textura, morfología y rugosidad juegan un papel más relevante. Sin

embargo, la orientación celular, a su vez, puede afectar a la diferenciación celular y la rugosidad misma, puede modificar la correlación entre la energía superficial y proliferación celular. Aún no se han logrado establecer reglas generales para esto, ya que la respuesta celular depende del fenotipo celular; fibroblastos, osteoblastos, etc., y también depende de la adsorción de proteínas y su conformación en la superficie.

Los procesos de adsorción-desorción, están controlados por el efecto Vroman, que relaciona las propiedades de la superficie del material (energía y carga superficial) con la capa adsorbida de proteínas (concentración, conformación y tamaño). La capa de proteínas adsorbidas, será una mezcla de diferentes proteínas en diferentes estados de conformación cuya composición depende en gran parte de las propiedades superficiales, particularmente de la adsorción previa de las moléculas de agua. Al acercarse las células a la superficie, lo que se observa es una superficie cubierta de una capa de proteínas, cuya composición y conformación, varía según las propiedades físico-químicas superficiales. De modo que la respuesta implante-célula, dependerá en gran parte del tipo de proteínas y su conformación. El resultado de esta interacción puede ser la integración del implante o bien, el encapsulamiento de éste en una capa fibrosa.

Otros dos factores que influyen la respuesta celular ante las propiedades de la superficie, son la liberación de iones y la topografía. La liberación de iones puede ser un estímulo positivo, como en el caso de iones fosfato o calcio, hormonas de crecimiento o enzimas que favorecen algún proceso biológico. La topografía (curvatura, rugosidad, porosidad, protuberancias, etc.), afecta la interacción células-superficie y proteínas-superficie, aunque en diferentes escalas (1-10nm para las proteínas y 1-100  $\mu\text{m}$  para las células) [2].

### **1.3.1 Colágeno**

El hueso es un tejido vivo compuesto por minerales, proteínas, agua, células y otras macromoléculas. La fase inorgánica o mineral representa entre un 60 y un

70% en peso del tejido óseo, contiene además entre un 5 y un 8% de agua y el resto está constituido por la matriz orgánica que determina la estructura y las propiedades mecánicas y bioquímicas de éste. Aproximadamente el 90% de la fase orgánica está formada por colágeno tipo I, y el 10% restante está formado por otras proteínas que representan una pequeña cantidad en cuanto al volumen total del hueso, pero contribuyen enormemente a las funciones biológicas de éste.

El colágeno es una proteína de muy baja solubilidad y como componente estructural principal de la matriz extracelular ósea, puede ser un material de elección para su uso como almacén celular. Varios estudios han concluido que los almacenes de colágeno pueden tener propiedades bioactivas, promoviendo la migración celular hacia el almacén [3].

## **1.4 BIOCERÁMICOS**

Los biocerámicos son compuestos químicos complejos que contienen elementos metálicos y no metálicos. Debido a sus enlaces iónicos o covalentes, son generalmente duros y frágiles. Además de tener un alto punto de fusión y una baja conductividad térmica y eléctrica, los cerámicos se consideran resistentes al desgaste. Los principales biocerámicos son alúmina, zirconia, hidroxiapatita, porcelanas, vidrios bioactivos, etcétera. Sus principales aplicaciones están en el sistema óseo, con todo tipo de implantes y recubrimientos en prótesis articulares; también se utilizan en aplicaciones dentales, en válvulas artificiales, cirugía de la espina dorsal y reparaciones craneales [4].

Los biocerámicos son compuestos de fosfato de calcio que han venido usándose en Ortopedia y Odontología desde los años 80. La Hidroxiapatita (HA), tiene una

estequiometría similar a la del mineral óseo. Las biocerámicas de hidroxiapatita y fosfato tricálcico beta, han sido utilizadas para el relleno de defectos óseos y son biocompatibles y osteoconductoras.

El fosfato tricálcico- $\beta$  no es un componente natural del tejido óseo, y es, al menos en parte, bioreabsorbible, pero no más que la hidroxiapatita, ya que al implantarse en el cuerpo, comienza a disolverse y lentamente se reemplaza por tejido circundante [5].

Las principales limitaciones de las cerámicas de fosfatos de calcio derivan de sus propiedades mecánicas. Como la mayoría de las cerámicas, son bastante frágiles, tienen una baja resistencia al impacto y resistencias a la tracción relativamente pequeñas. En general, se puede afirmar que las propiedades mecánicas de las cerámicas de fosfatos de calcio dependen de su porosidad. Los poros pueden ser clasificados como microporos, cuando tienen un tamaño del orden de 1  $\mu\text{m}$ , o macroporos, cuando tienen un diámetro superior a 100  $\mu\text{m}$ , que es el tamaño a partir del cual se puede producir crecimiento óseo en los intersticios del implante.

## **1.5 POLÍMEROS BIOCOMPATIBLES Y BIODEGRADABLES**

En el área de biomateriales, hay dos tipos de polímeros sintéticos: no absorbible, y absorbible. Los polímeros no absorbibles se han utilizado como materiales clave para la fabricación de órganos artificiales, implantes, y otros dispositivos médicos. En la mayoría de los casos, los polímeros absorbibles no son adecuados en la fabricación de dispositivos permanentes, ya que la absorción o la degradación de los materiales, implica deterioro de las propiedades del material [7].

Actualmente existen polímeros sintéticos bioabsorbibles utilizados en el campo biomédico, los cuales tienen la capacidad de degradarse debido a reacciones de

hidrólisis en condiciones fisiológicas dentro del cuerpo humano. Después de cierto tiempo de ser implantados dan lugar a productos que no son tóxicos y que pueden ser eliminados por el organismo o metabolizados por éste. Estos son materiales utilizados para formar matrices tridimensionales, que sirven como dispositivos que proporcionan a las células el apoyo necesario para su proliferación, manteniendo sus funciones diferenciadas y generando las señales biológicas requeridas para la conservación de la expresión génica específica; además, definen la arquitectura del tejido.

El ácido poli-láctico (PLA) es un polímero sintético absorbible de la familia de los alfa-hidroxiácidos o poliésteres alifáticos, el cual es biocompatible, biodegradable (produce la metabolización del ácido láctico que comienza con la actividad de la enzima Lactado Deshidrogenasa (LDH) sobre el lactato, transformándolo a piruvato, el cual sufre una reacción de descarboxilación oxidativa, generando Acetilco enzima A que se integra en el ciclo del ácido cítrico o Ciclo de Krebs mitocondrial. El resultado de cada ciclo es ATP debido a la fosforilación oxidativa, más H<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub>, que son posteriormente, eliminados por la respiración y por la orina), en un compuesto inmunológicamente inerte, atóxico y reabsorbible [10].

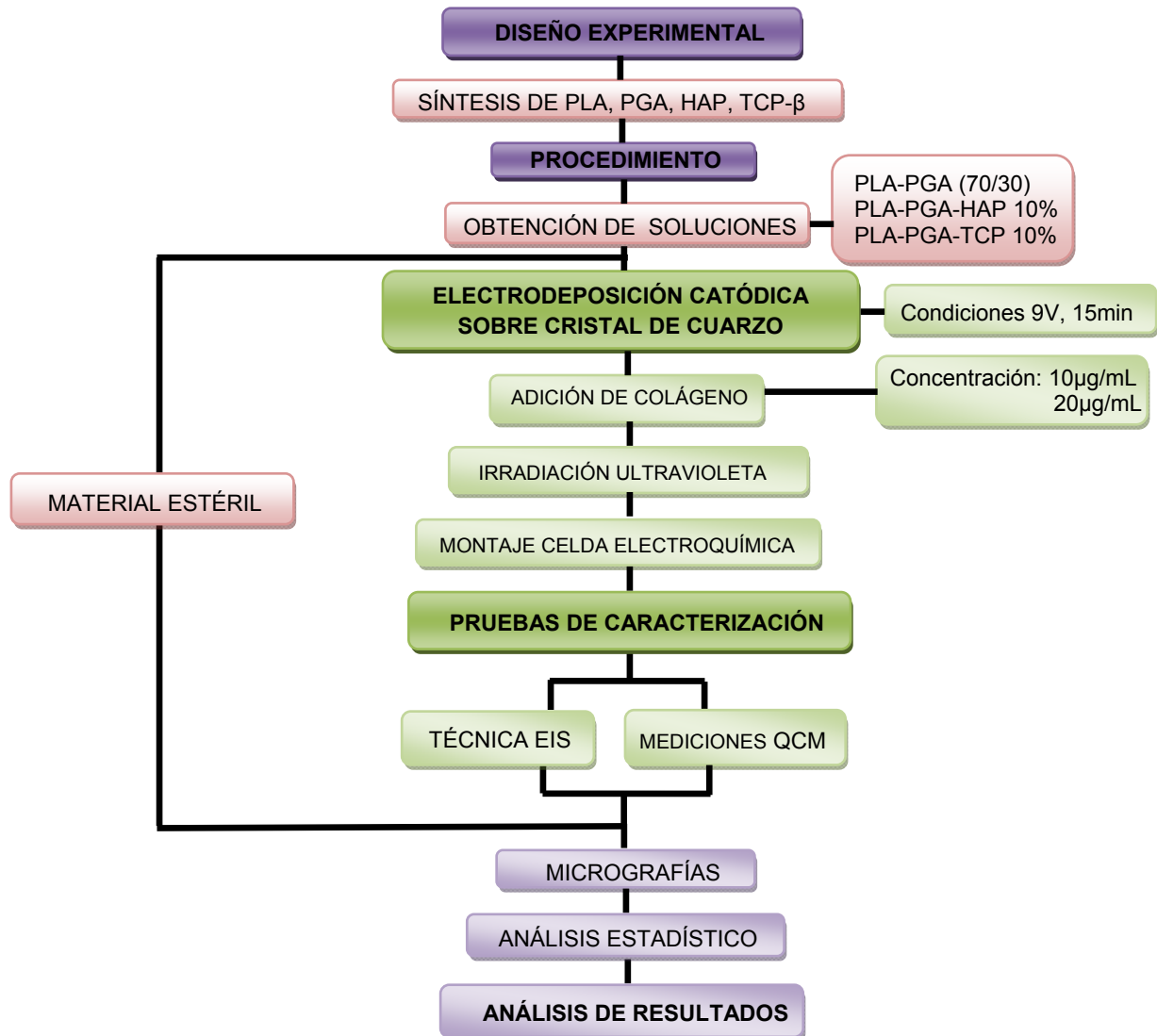
El ácido poliglicólico (PGA) es un poliéster lineal biodegradable de estructura muy simple. Las fibras obtenidas a partir de PGA se caracterizan por su alta fuerza y módulo de Young, pero son demasiado rígidas para ser usadas como suturas, excepto si se usan en forma de material trenzado. Puede emplearse como dispositivo de fijación ósea en forma de varillas, planchas o tornillos, y como implante para sustituir fragmentos óseos o como sistema de liberación de medicamentos [6].

## 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 2.1 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En la figura 1 se observa la síntesis del procedimiento experimental usada para esta investigación.

Figura 1. Esquema de la Metodología experimental.



Fuente: autores

### **2.1.1 Síntesis de Polímeros y Biocerámicos.**

La síntesis de los polímeros biodegradables PLA y PGA, se llevó a cabo a partir de la policondensación de los ácidos láctico y glicólico respectivamente, bajo las condiciones mostradas en el Anexo A, en la Tabla A1 y en la Tabla A2 [8]. Posteriormente, se realizó la caracterización del producto obtenido por la técnica infrarrojo FT-IR, cuyos resultados se presentan en el Anexo B.

Por otro lado, las biocerámicas bioactivas (Hidroxiapatita, Fosfato Tricalcico- $\beta$ ) se obtuvieron por la técnica de precipitación acuosa, en el cual se prepararon soluciones de nitrato de calcio y fosfato de amonio. Posteriormente dichas soluciones se basificaron a un pH de 10 y se mezclaron. La mezcla resultante se mantuvo en un proceso de envejecimiento por 144 horas y luego decantado a temperatura ambiente. Finalmente, se calentó a 60°C durante 24 horas en una mufla referencia WTB-BLINDER, y una calcinación a 1050°C por una hora en un horno referencia TERRIGENO.

### **2.1.2 Obtención de los Recubrimientos.**

En este trabajo, por el mecanismo de la electrodeposición catódica, se obtuvieron películas delgadas de las soluciones mostradas en tabla 1. Estas fueron inmovilizadas electroquímicamente en cristales de cuarzo Au-Ti, utilizando una fuente de potencia, marca Thermo electron Corporation EC570-90, un ánodo de acero inoxidable, para aplicar un voltaje de 9 Voltios en un tiempo de 15min (condiciones halladas en pruebas preliminares). Este procedimiento fue llevado a cabo en un ambiente de bioseguridad, dentro de una cámara de flujo laminar, con el fin de mantener la esterilidad en los materiales y recubrimiento obtenido.

Tabla 1. Soluciones de polímeros y biocerámicas empleados.

<b>Soluciones</b>	<b>PLA-PGA (P/V)</b>	<b>HAP (%P/V)</b>	<b>TCP-β (%P/V)</b>
<b>1</b>	<b>70/30</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>2</b>	<b>70/30</b>	<b>10</b>	<b>0</b>
<b>3</b>	<b>70/30</b>	<b>0</b>	<b>10</b>

Fuente: Autores

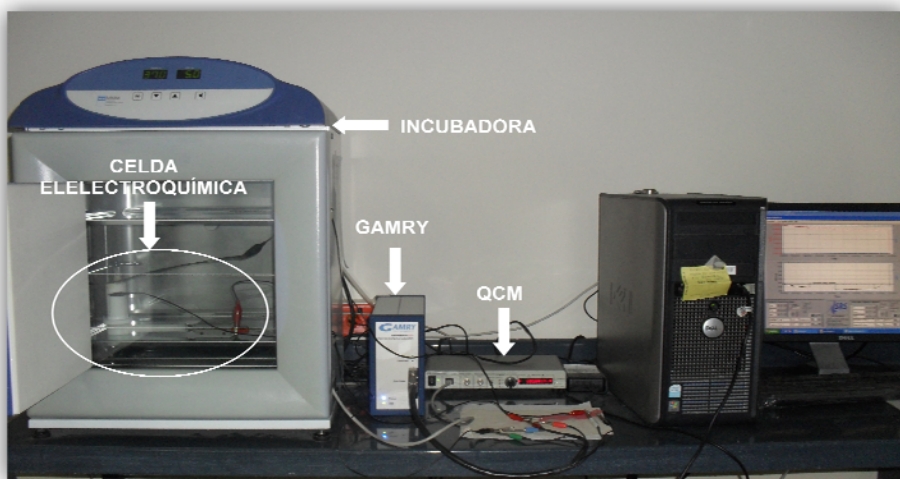
Obtenidos los recubrimientos, se realizó un tratamiento térmico en una mufla, WTB-BLINDER a 100°C durante 10 minutos manteniendo las condiciones de esterilidad, con el fin de mejorar: la morfología, adhesión, integración de los componentes de la mezcla y la eliminación del solvente de la electrodeposición. Seguidamente, para activar superficialmente el recubrimiento, se pipeteó colágeno (colágeno tipo C9879) sobre el mismo, variando dicha concentración como se muestra en el Anexo C en la tabla C1. Posteriormente se irradió la superficie con luz ultravioleta durante 10 min, cuya oxidación se realizó puntualmente sobre la superficie con un filtro de aluminio con tres marcas de 1mm y longitud de 250mm.

### **2.1.3 Mediciones Electroquímicas (EIS) y Gravimétricas (QCM).**

Para las mediciones electroquímicas y de la gravimétricas simultáneas, se empleó una celda estéril, de tres electrodos, donde el electrodo de trabajo fue el cristal de cuarzo recubierto, el contra-electrodo un alambre de platino y el electrodo de referencia un electrodo de calomel saturado en una solución 3M de KCL. Las curvas de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) fueron determinadas usando un potenciostato tipo GAMRY 600 con un rango de frecuencia de 0.01 Hz a 100 KHz, con una densidad de datos de 7 puntos de frecuencia por década. Para las mediciones con la Microbalanza de Cristal de

Cuarzo de empleo el modelo QCM 200 Stanford Research Systems, previamente calibrada (figura 2).

Figura 2. Fotografía y esquema del montaje EQCM.



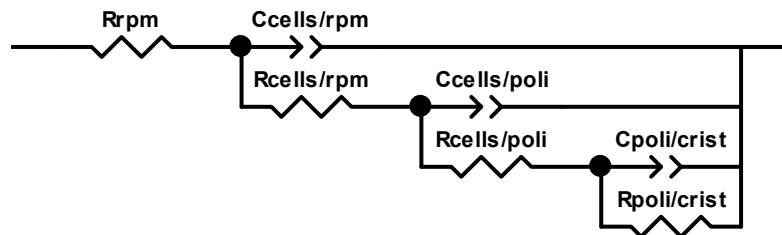
Fuente: Autores

### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1 ANÁLISIS DEL PROCESO DE ADHESIÓN POR EIS.

La técnica de Espectroscopía de Impedancia electroquímica fue utilizada para determinar la adhesión celular a partir de la orientación con luz ultravioleta de la proteína (Colágeno tipo C9879) sobre recubrimientos de PLA-PGA y mezclas con biocerámicos (HAP, TCP- $\beta$ ). Para asegurar la caracterización completa de la interface y los procesos superficiales, las mediciones de EIS fueron realizadas con siete puntos por década, desde 0.01Hz a 100 KHz, a un potencial natural de 0.0V.

Figura 3. Circuito equivalente del proceso de células osteoblásticas sobre recubrimientos de PLA-PGA y Biocerámicos modificados.

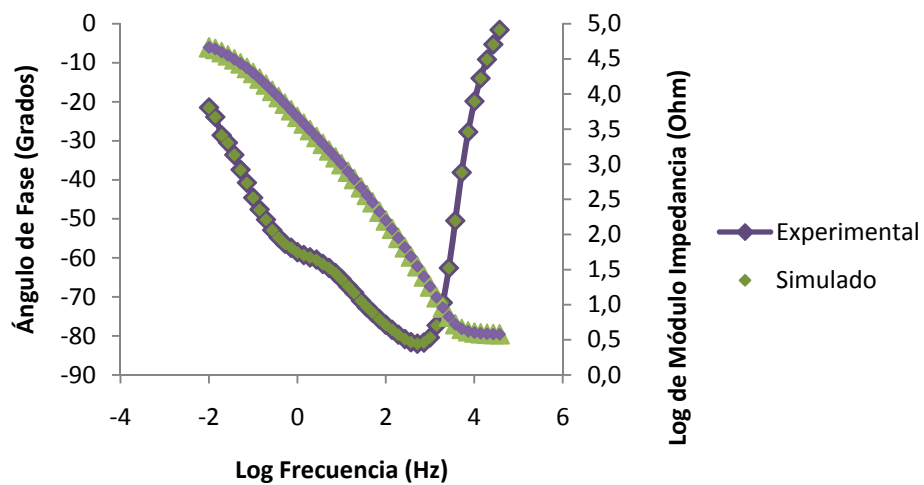


Fuente: Autores

Los espectros de impedancias obtenidos mostraron claramente la presencia de tres constantes de tiempo ( $\tau = R \times C$ ), donde R es la resistencia asociada al proceso electroquímico y C es la capacitancia, medida en segundos. Los espectros obtenidos, fueron ajustados a modelos de circuitos equivalentes, como se muestra en la figura 3 y simulados en el software Zview2 (los resultados de la simulación se presentan en el anexo C), el cual permitió describir la explicación física del fenómeno de adhesión de las células, en tres procesos electroquímicos

en interfaces fijas entre: cristal-recubrimiento, recubrimiento-células y células-electrolito (medio de cultivo: Rpmi). Estos procesos, se representan mediante constantes de relajación de la transferencia de carga, relacionadas por una capacitancia y una resistencia. Las constantes de tiempo están relacionadas entre sí, en paralelo, debido a la similitud en las constantes conductivas, mostrando que los espectros se traslapan. Esta configuración se relaciona con una resistencia en serie que representa la oposición a la transferencia de carga del electrolito.

Figura 4. Representación del ajuste de los espectros de Bode mediante simulación en el software Zview.



Fuente: Autores

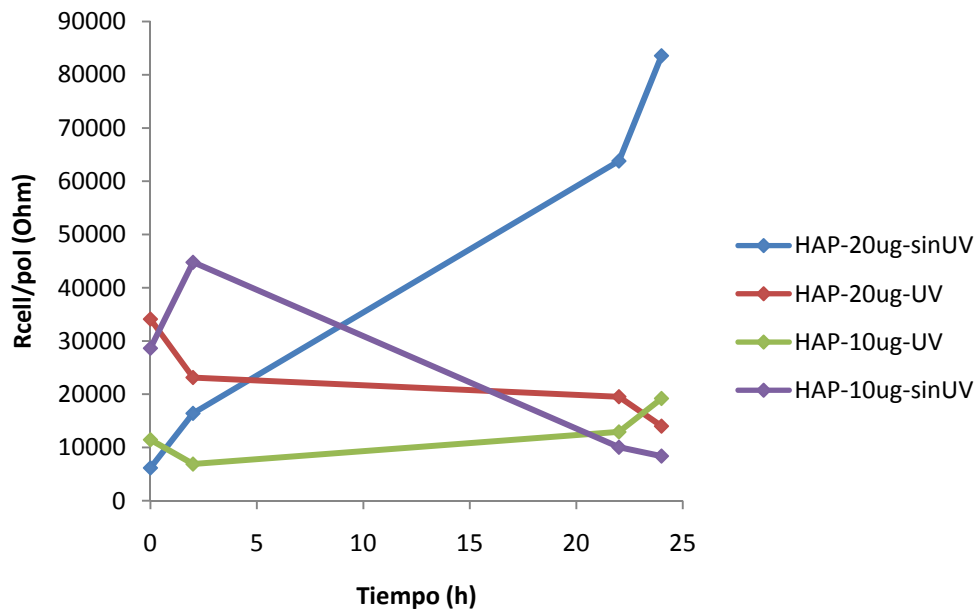
El error determinado en los ajustes realizados, en términos de  $\chi^2$ , fue menor de  $10^{-4}$  entre los datos obtenidos y los simulados. En la figura 4 se muestra un caso típico de los ajustes realizados.

El ángulo de fase es muy útil para aproximar las características de los elementos eléctricos a diferentes frecuencias. Cuando el ángulo de fase toma valores cercanos a cero, indica que la impedancia medida corresponde a una resistencia. Al disminuir la frecuencia, el capacitor tarda más en permitir el flujo de corriente y tendrá una caída de potencial. En los diagramas de ángulo de fase obtenidos se observa que para altas y bajas frecuencias el sistema se vuelve más resistivo (Anexo D). Si esa caída de potencial es menor que la resistencia a la transferencia de carga, la corriente circulará por el capacitor, iniciándose un decremento en el ángulo de fase, lo cual se observa para frecuencias intermedias. A medida que aumenta el tiempo, existe un aumento en la resistencia a la transferencia de carga células-polímero, lo que implica que con el tiempo, las células pasan a ser más resistivas, oponiéndose más al paso de la corriente.

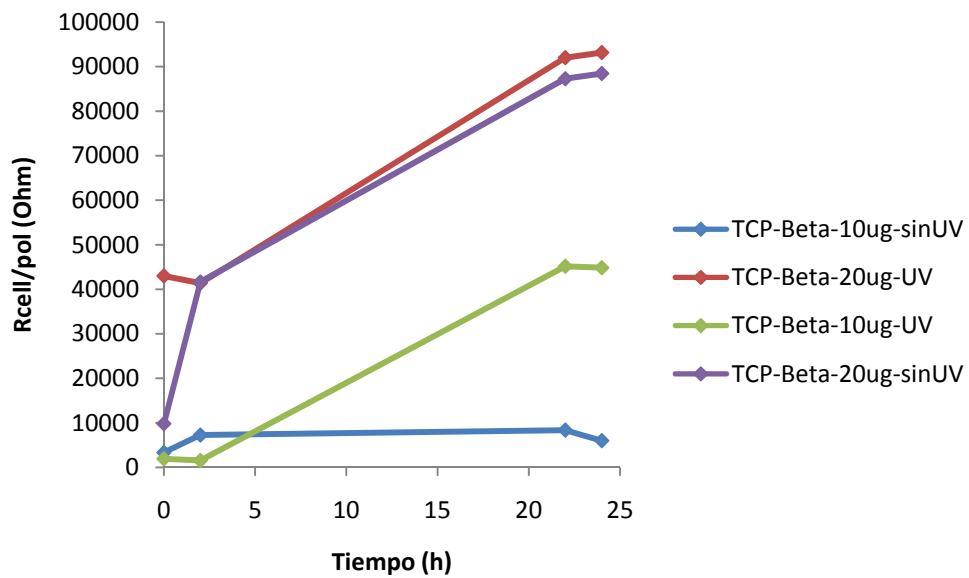
El aumento significativo en la resistencia indica que las células se encuentran en un estado de isquemia, debido probablemente a la muerte o estresamiento de las mismas, dicho comportamiento se observa de forma más relevante en el Fosfato Tricálcico- $\beta$  indicando que la Hidroxiapatita es más activa y tiene mejores propiedades de reabsorción lo cual permite la interacción favorable entre recubrimiento-células, que garantiza una disminución en la resistencia estimado en la figura 5a.

Figura 5. Resistencia a la transferencia de la carga entre células recubrimiento vs. Tiempo. a) Hidroxiapatita b) Fosfato Tricalcico  $\beta$ .

a)



b)

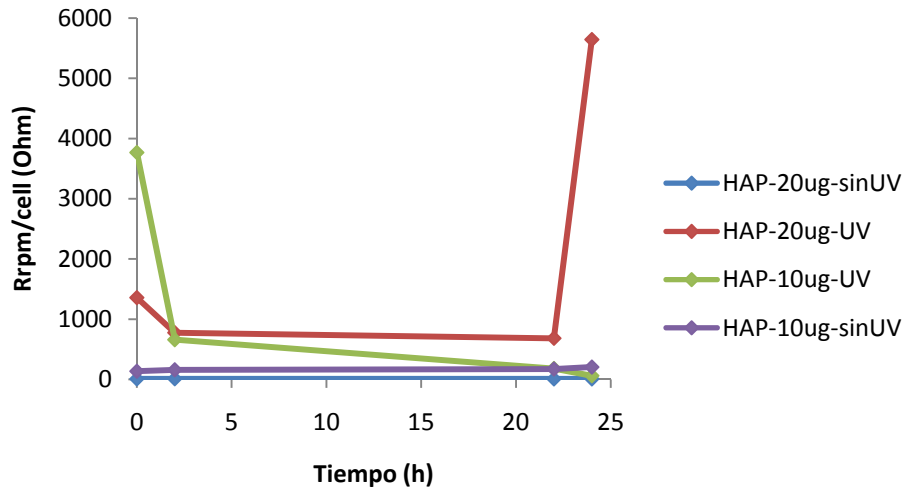


Fuente: Autores

El análisis de la resistencia a la transferencia de carga entre células-recubrimiento y células-electrolito permitió determinar el comportamiento interno y externo (contacto con el fluido extracelular), respectivamente (Anexo C). En la figura 6 se muestra el comportamiento de la transferencia de carga entre las células-recubrimiento en un periodo de tiempo de 24 horas para las mezclas de polímero PLA-PLG con los TCP y HAP empleados, teniendo en cuenta que en el periodo de tiempo de ensayo, esta resistencia presente el mínimo valor posible, lo cual indica, evolución celular, debido al incremento en el flujo e intercambio iónico a través de los conductos vascularizados celulares. Valores mayores de esta resistencia, indica estresamiento celular o isquemia.

El aumento en la resistencia de carga entre células y medio, no indica la restricción del intercambio iónico, sino, la conformación de la membrana celular que es un indicador de la adhesión y crecimiento celular, ya que esta membrana permite por difusión pasiva y por ósmosis, el transporte del fluido e iones, a través de ella. El recubrimiento con Hidroxiapatita, concentración de 20µg/ml de colágeno y con exposición a luz UV presentó los mejores resultados, especialmente después de 24 horas, respecto a la resistencia a la transferencia de carga entre células y medio, tal como se muestra en la figura 6.

Figura 6. Resistencia a la transferencia de carga entre células y medio para la Hidroxiapatita.



Fuente: Autores

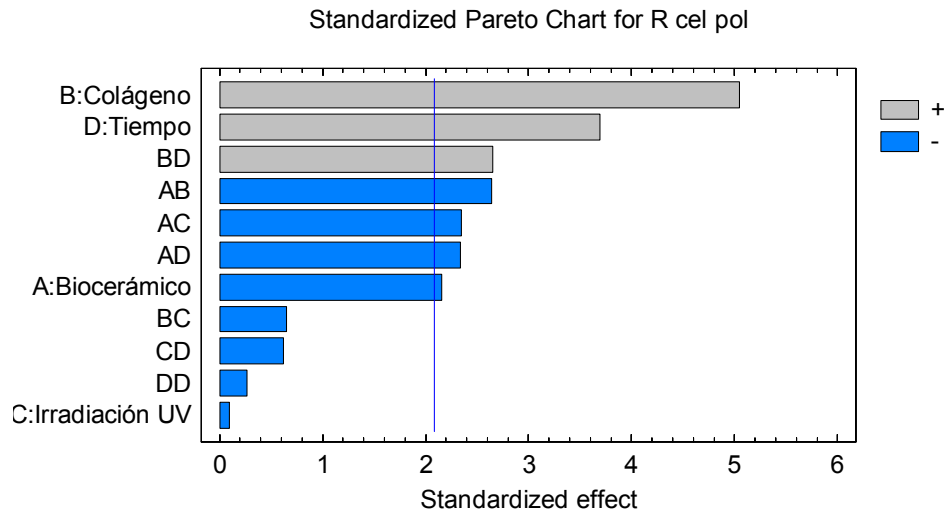
### 3.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR EIS

El análisis estadístico se realizó por medio del diagrama de Pareto, que es una representación gráfica de los datos obtenidos sobre un problema, que ayuda a identificar cuáles son los aspectos prioritarios. El diseño de experimentos tiene como variables independientes la clase de biocerámico, la concentración de colágeno, la irradiación y el tiempo (Anexo F, figura F); y como variable de respuesta se tomo la resistencia a la transferencia de carga células-polímero.

### 3.3.1 Análisis de la varianza para R cel-pol

En la tabla de análisis de varianza para resistencia cel/pol (Anexo F) se muestra la significancia estadística de cada uno de los efectos comparando el cuadrado medio contra una estimación del error experimental. En este caso, 7 factores de interacción han obtenido valores valores-p por inferiores a 0.05, lo que indica que son estadísticamente significativos. El coeficiente de determinación  $R^2$ , es de 77,85%, lo que demuestra que el modelo se ajusta muy bien a los datos experimentales. En el diagrama de pareto figura 8, se observa que existe efecto positivo del colágeno, y tiempo sobre la R, es decir, que entre mayor sea el nivel de los factores de interacción, la resistencia será mayor.

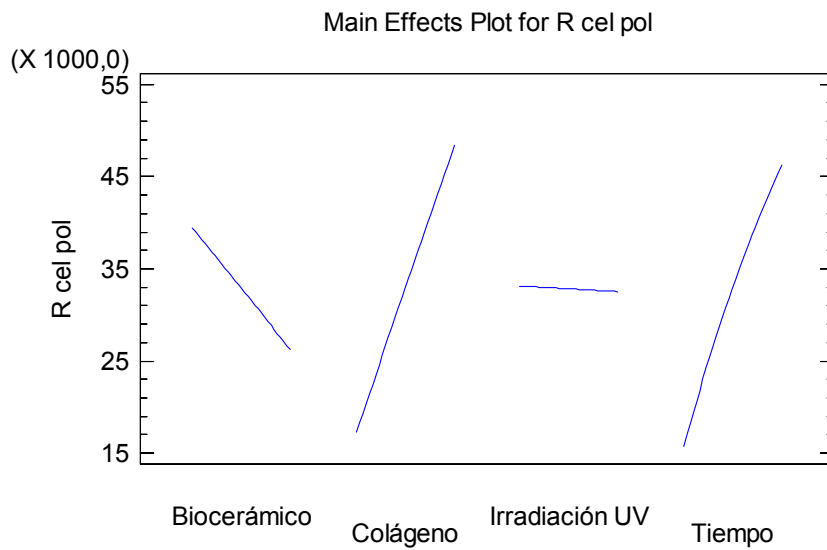
Figura 7. Diagrama de Pareto para Rcel/pol.



Fuente: Autores

En la figura 8 se observa el efecto que tienen los factores biocerámico, colágeno, irradiación y tiempo. A mayor concentración de colágeno, con Fosfato Tricalcico- $\beta$  y un tiempo mayor la resistencia toma los mayores valores.

Figura 8. Diagrama de interacciones de efectos principales.



### 3.3 ANÁLISIS DEL PROCESO DE ADHESIÓN POR QCM

La adhesividad celular es una característica importante de los biomateriales. Para el desarrollo de biomateriales con mejor biocompatibilidad es necesario evaluar cuantitativamente la afinidad del material por las células. La fuerza de adherencia a un material está particularmente determinada por la adsorción de proteínas a la superficie del material así como por la actividad de la propia célula. La QCM es una potente técnica para el seguimiento de la cinética de adsorción de diferentes sistemas, desde moléculas hasta células vivas.

Se considera el cristal y los electrodos depositados como un solo sistema, y como “capas simples” al material que se deposite sobre el electrodo. Esto implica suponer que las impedancias del electrodo y del otro material depositado sobre él son aditivas, esta condición se cumple cuando el electrodo es muy rígido y de pequeño espesor.

En la ecuación de Sauerbrey (2), para películas delgadas, la frecuencia de resonancia es inversamente proporcional al espesor de la película [12].

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

Donde  $\Delta F$  es la medición de cambio de frecuencia [Hz],  $F_0$  es la frecuencia de resonancia del modo fundamental microbalanza de cuarzo [Hz],  $A$  es el área geométrica activa del cristal piezoeléctrico,  $\rho_q$  es la densidad del cuarzo  $2.648 \text{ [g cm}^{-3}\text{]}$ ,  $\mu_q$  es el módulo de corte del cuarzo  $[2.947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}\text{]}$ ,  $\Delta m$  es el cambio de masa [ $\mu\text{g}$ ], por lo tanto agrupando todos los valores constantes, tenemos que:

$$\Delta F = -C_f\Delta m \quad (3)$$

El factor de sensibilidad para el cristal  $C_f$  tiene un valor  $56,6 \text{ Hz } \mu\text{g}^{-1} \text{ cm}^2$  para un cristal Au-Ti 5 MHz. La Tabla 3 muestra la variación de la masa adherida calculada por unidad de área, respecto al cambio en la frecuencia de resonancia medida a las 0 y 24 horas.

Tabla 2. Variación de la masa adherida por unidad de área.

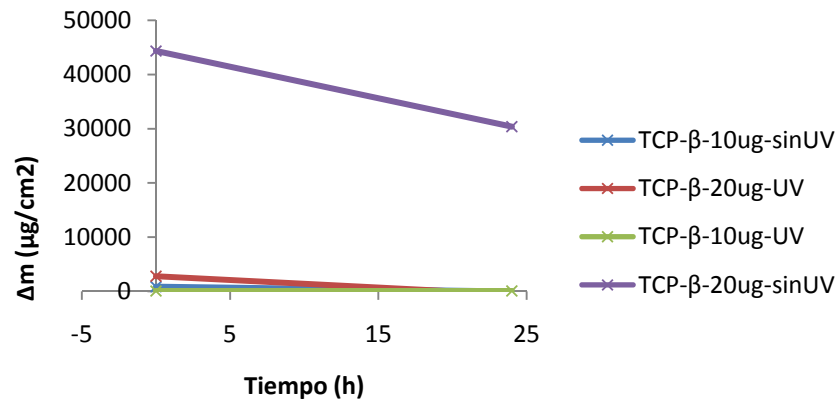
Biocerámico	Colágeno(ug/ml)	Irradiación	$\Delta f$		$\Delta m (\mu\text{g}/\text{cm}^2)$	
			0 Horas	24 Horas	0 Horas	24 Horas
TCP- $\beta$	10	Sin UV	-4,8E+04	3,9E+02	8,5E+02	-6,9E+00
TCP- $\beta$	20	UV	-1,5E+05	3,2E+04	2,7E+03	-5,5E+02
TCP- $\beta$	10	UV	-3,4E+03	-4,0E+03	6,0E+01	7,1E+01
TCP- $\beta$	20	Sin UV	-2,5E+06	-1,7E+06	4,4E+04	3,0E+04
HAP	20	Sin UV	-7,0E+04	2,6E+05	1,2E+03	-4,6E+03
HAP	20	UV	-2,4E+05	5,9E+01	4,3E+03	-1,0E+00
HAP	10	UV	-1,5E+02	-4,4E+04	2,7E+00	7,8E+02
HAP	10	Sin UV	-7,1E+05	-2,4E+06	1,2E+04	4,3E+04

Fuente: Autores

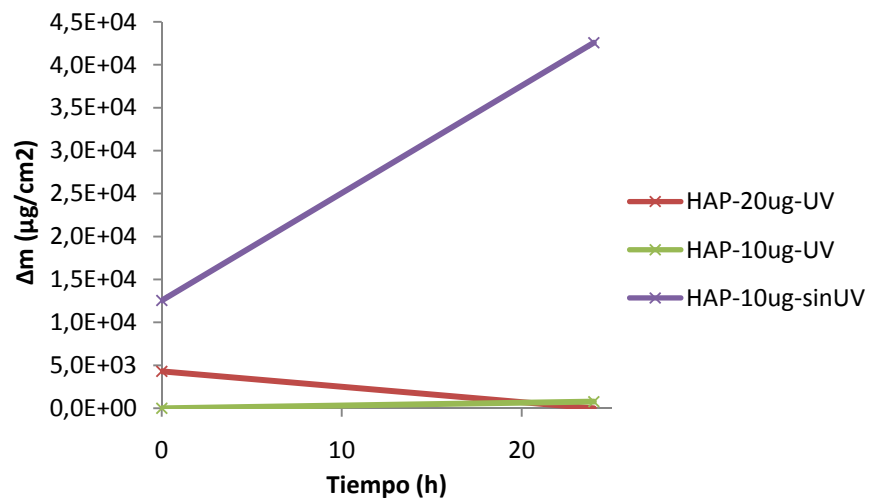
En la figura 7 se observa la variación de la masa por unidad de área respecto al tiempo para el Fosfato Tricálcico- $\beta$  y la Hidroxiapatita, respectivamente. La disminución significativa en la pendiente de las gráficas representan la pérdida de masa por área geométrica activa del recubrimiento, indicando una disminución de la adhesión celular. Un comportamiento constante en el delta de masa favorece significativamente la masa adherida por unidad de área e indica que la velocidad de degradación del recubrimiento es simultánea al proceso de adhesión celular, lo cual se presenta en los casos con una concentración de colágeno de  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  y tratamiento con UV para la HAP y el TCP- $\beta$ .

Figura 9. Relación de la variación de la masa por unidad de área respecto al tiempo. a) Fosfato Tricálcico  $\beta$ , b) Hidroxiapatita.

a)



b)

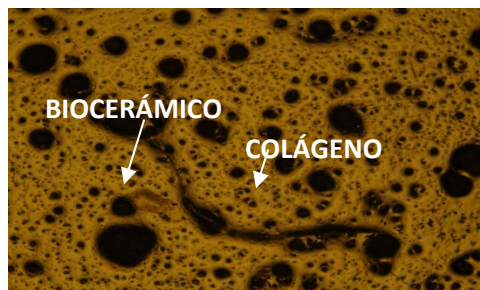


Fuente: Autores

### 3.4. ANÁLISIS DE MICROSCOPIAS ÓPTICAS

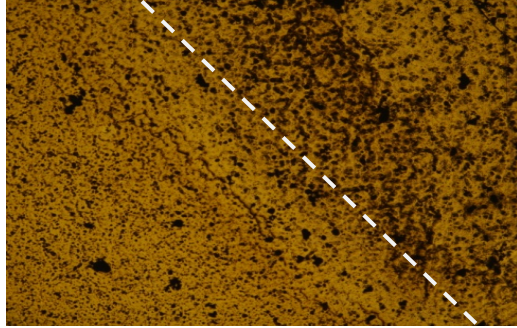
Las microscopías ópticas tomadas, demostraron la presencia de dos zonas que corresponden a las zonas irradiadas y no irradiadas del recubrimiento, para lo cual se usó un filtro de aluminio de tres marcas con 1mm de espesor. Observándose que en las zonas irradiadas cambia la morfología, favoreciéndose al proceso de adhesión celular debido a una mayor interacción en la interface células-recubrimiento. En la figura 10 se muestra una micrografía en la que identifica la presencia de fibrillas de colágeno y de los biocerámicos.

Figura 10. Micrografía Fosfato Tricálcico  $\beta$ - 10 $\mu$ g/ml-con irradiación 10x.



En la figura 11 se evidencian las dos zonas activadas y no activadas superficialmente por la luz ultravioleta indicadas por la línea punteada que representa la diferencia en la rugosidad del recubrimiento, donde la zona irradiada es la que posee mayores cambios en la topografía de la superficie favoreciendo la adhesión celular.

Figura 11. Micrografía Fosfato Tricálcico  $\beta$ - 10 $\mu$ g/ml-con irradiación 10x.



#### 4. CONCLUSIONES

Los recubrimientos de PLA-PGA e Hidroxiapatita favorecieron la adhesión de las células osteoblásticas, debido a la actividad que tiene dicho biocerámico al reabsorberse, lo cual permite un mayor intercambio iónico entre el recubrimiento y las células. Esto fue comprobado en la respuesta obtenida de los espectros y simulación de impedancia y de los resultados de la técnica de microbalanza de cristal de cuarzo.

Las mezclas de PLA-PLG y de Fosfato Tricalcico- $\beta$ , a concentraciones mayores de colágeno, mostraron un comportamiento resistivo en el proceso electroquímico medido entre las células y el fluido, lo cual indica un decrecimiento del proceso de adhesión; mientras, para las mezclas con Hidroxiapatita, se presentó un comportamiento capacitivo. A concentraciones menores de colágeno, se presentó una respuesta resistiva en este proceso.

El modelo de circuitos equivalentes propuesto, corresponde fielmente a la representación de las interacciones de las células con el material y el fluido o medio, cuya respuesta del proceso de intercambio iónico, fue representada mediante el balance de resistencias altas y bajas en paralelo de los procesos entre las células y el fluido y las células con el material, respectivamente.

La exposición a la luz ultravioleta a la misma concentración de colágeno favorece la adhesión celular para la Hidroxiapatita, debido a que mejora la morfología e interacción con el medio celular. Sin embargo, se determinó según el análisis estadístico, que entre la variable de porcentaje de colágeno y la irradiación ultravioleta, la variación de colágeno tuvo más significancia estadística y efecto, que el colágeno, sobre la respuesta celular.

## **5. RECOMENDACIONES**

Las técnicas electroquímica, microgravimétricas y el análisis estadístico mostraron que la adhesión celular para el Fosfato Tricalcico- $\beta$  a bajas concentraciones de colágeno y exposición a la luz ultravioleta disminuye, por esta razón, se debe cambiar las condiciones de estudio para dicho biocerámico con el fin de mejorar la adhesión, aumentando la concentración de colágeno y disminuyendo o anulando la irradiación UV que hace mas poroso el recubrimiento.

## BIBLIOGRAFÍA

[1] NAVARRO TORO, Melba Eugenia. Desarrollo y Caracterización de Materiales Biodegradables para Regeneración Ósea. Memoria de tesis presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias-Especialidad Ingeniería Química por la Universidad Politécnica de Catalunya. Abril 2005

[2] RODIL Sandra E. Modificación superficial de biomateriales metálicos. 29 (2): 67-83.

[3] CAUCERIO OTERO, José. Bioadhesividad celular sobre superficies de armazones o matrices tisulares. Tesis doctoral.

[4] GARCÍA GARCÍA, Claudia Patricia. Cálculo de variables termodinámicas de la difusión de especies iónicas dentro de los poros de un recubrimiento bioactivo mediante espectroscopia de impedancia electroquímica. Magíster en Materiales y Procesos. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.2010.

[5] GINEBRA MOLINS María Paola. Desarrollo y caracterización de un cemento óseo basado en Fosfato Tricalcico- $\alpha$  para aplicaciones quirúrgicas. Memoria de tesis para doctorado en la Univercidad Polténica de Catalunya. Diciembre de 1996.

[6] ARDILA Luisa F. (1), ESTUPIÑAN Hugo A. (2), VASQUEZ Custodio (2), PEÑA Darío Y. (2). Estudio de la biodegradación hidrolítica de películas delgadas de biopolímeros/cerámico mediante EQCM.2 al 5 de Noviembre de 2010, Viña del Mar, CHILE.

[7] YOSHITO IKADA. Tissue Engineering, Fundamentals and Applications. ELSEVIER 2006.

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

[9] IBARRA ARAUJO Mayra Alejandra. Evaluación de Aditivo Biodegradable para control de filtrado en gel de fracturas naturales en pozos petroleros. Tesis pregrado. Mérida, Abril 2008.

[10] RODRIGUEZ RUIZ, DANIEL. Obtención de capas de nitruro de titanio mediante tratamiento termoquímico en titanio y Ti6Al4V y caracterización de sus propiedades para aplicaciones biomédicas.

[11] KOKUBO Tadashi, TAKADAMA Hiroaki. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity. ELSEVIER 2006.

[12] ETCHENIQUE, Roberto. Aplicaciones analíticas de la balanza de cristal de cuarzo: Microgravimetría y Microrreología. Tesis presentada para optar al título de doctor de la Universidad de Buenos Aires. 1998.

[13] BOADA LÓPEZ, Jairo; ESTUPIÑAN, Hugo; LAVERDE, Dionisio. Estudio de la degradación electrolítica de recubrimientos de Ácido Poliláctico sobre sustratos Ti6Al4V, en SBF mediante Voltametría Cíclica y EIS. Scientia Et Technica 2007.

## **ANEXOS**

## ANEXO A. MÉTODOS PARA LA SÍNTESIS DE POLIMEROS Y BIOCERÁMICOS

Tabla A1. Etapas de la Síntesis del PLA.

ETAPA	Temperatura (°C)	Presión (mmHg)	Tiempo (h)
<b>Deshidratación</b>	100	760	2-3
<b>Esterificación</b>	180	100	6-7
<b>Oligomerización</b>	180	25	40
<b>Policondensación</b>	<b>180</b>	<b>10</b>	<b>5</b>

Fuente: Autores

Tabla A2. Etapas para la Síntesis del PGA.

ETAPA	Temperatura (°C)	Presión (mmHg)	Tiempo (h)	Agitación
<b>1</b>	190	150	1	Si
<b>2</b>	190	30	4	No
<b>3</b>	230	30	0.5	No
<b>4</b>	190	760	20	No

Fuente: Autores.

## ANEXO B. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES

Figura B1. Espectro IR teórico para el Ácido Láctico.

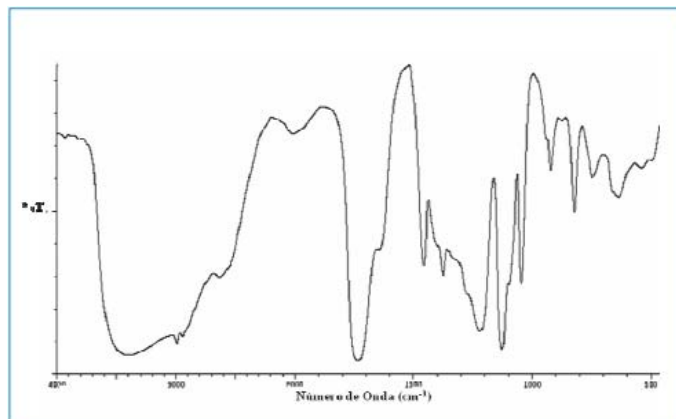
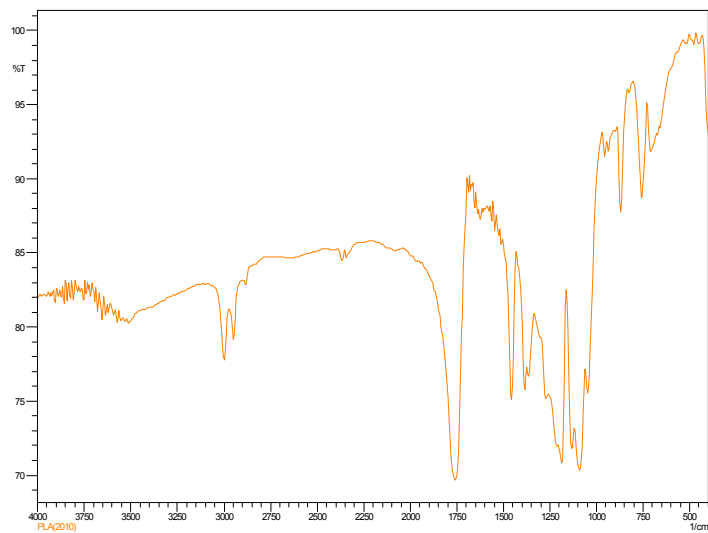
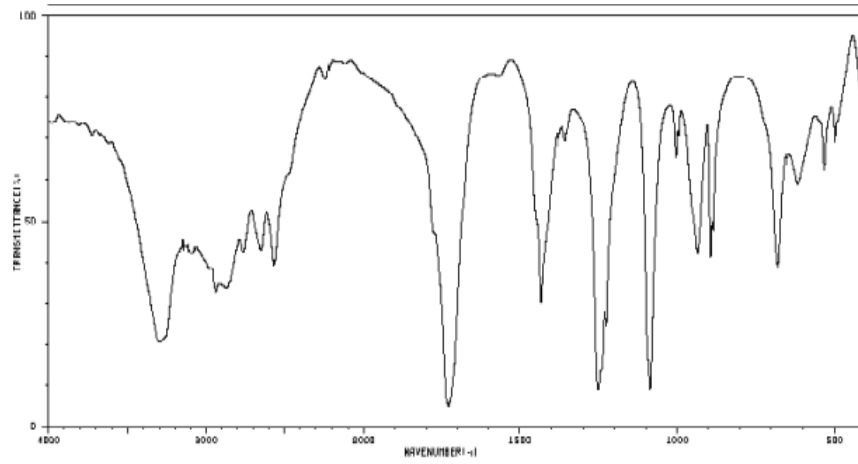


Figura B2. Espectro IR experimental para el Ácido Láctico.



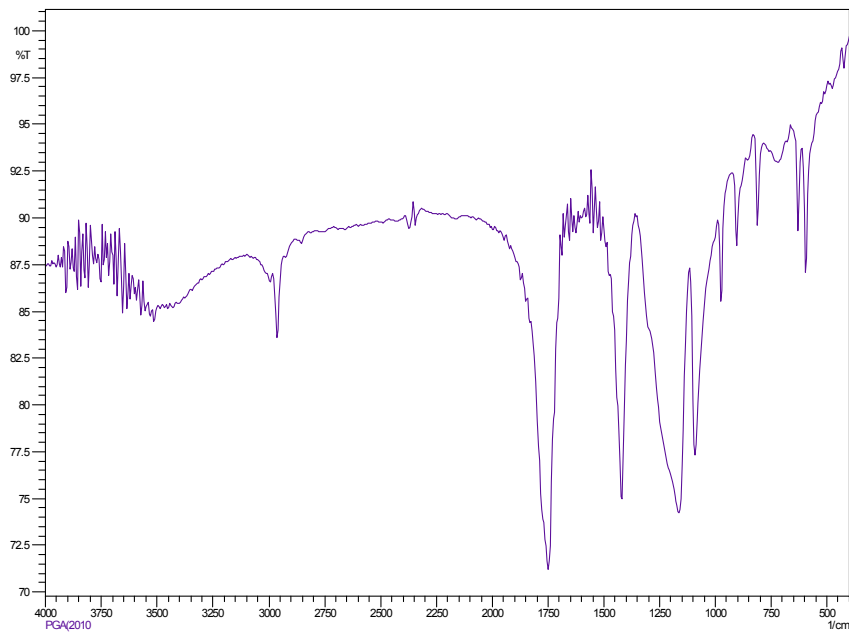
Fuente: Espectrómetro IR de Ingeniería Química.

Figura B3. Espectro IR teórico para el Ácido Gicólico.



Fuente base de datos UIS.

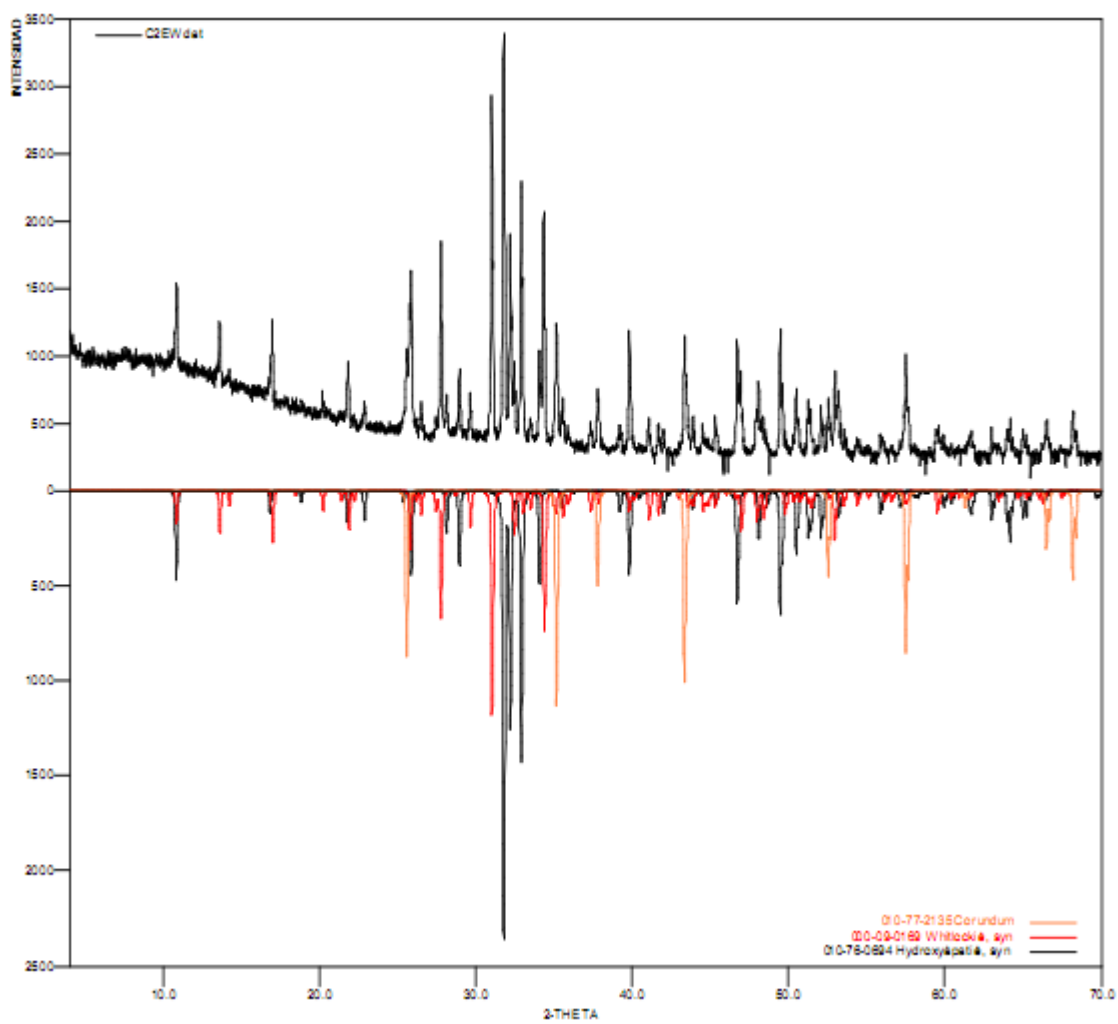
Figura B4. Espectro IR experimental para el Ácido Gicólico.



Fuente: Espectrómetro IR de Ingeniería Química.

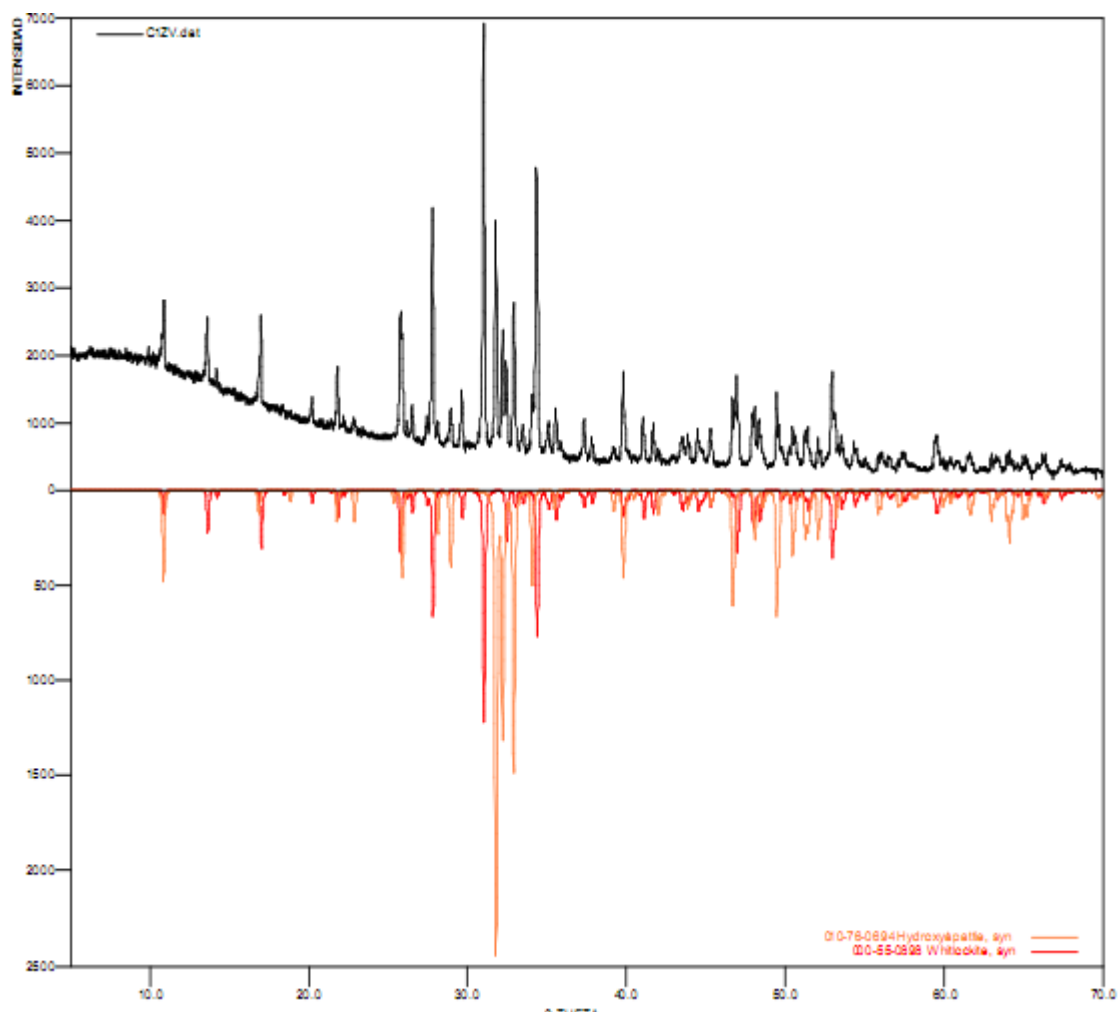
## DIFRACCIÓN DE RAYOS-X

Figura B5. Difracción de Rayos-X para la Hidroxiapatita.



Fuente: Laboratorio de Difracción de Rayos-X PQ 0321

Figura B6. Difracción de Rayos-X para el Fosfato Tricálcico- $\beta$ .



Fuente: Laboratorio de Difracción de Rayos-X PQ 0321

## ANEXO C. PARÁMETROS DE LOS CIRCUITOS EQUIVALENTES

Valores obtenidos mediante la simulación de los circuitos equivalentes.

Tabla C1. Parámetros de circuitos equivalentes a las 0 horas.

SIn	Biocerámico (10%)	Colágeno(ug/ml)	Irradiación	0 Horas		
				Ccell/pol T	Ccell/pol P	Rcell/pol
1	TCP-β	10	Sin UV	2,78E-07	7,30E-01	3,34E+03
2	TCP-β	20	UV	1,05E-05	8,64E-01	4,30E+04
3	TCP-β	10	UV	6,10E-06	9,27E-01	1,98E+03
4	TCP-β	20	Sin UV	1,58E-05	8,57E-01	9,80E+03
5	HAP	20	Sin UV	1,38E-05	9,09E-01	6,16E+03
6	HAP	20	UV	7,08E-07	5,83E-01	3,41E+04
7	HAP	10	UV	3,10E-05	7,80E-01	1,15E+04
8	HAP	10	Sin UV	2,62E-05	7,61E-01	2,86E+04
9	0	12	Sin UV	4,90E-09	8,24E-01	1,33E+05
10	0	12	UV	7,21E-06	8,08E-01	1,58E+04

Fuente: Autores

Tabla C2. Parámetros de circuitos equivalentes a las 2 horas.

SIn	Biocerámico (10%)	Colágeno(ug/ml)	Irradiación	2 Horas		
				Ccell/pol T	Ccell/pol P	Rcell/pol
1	TCP-β	10	Sin UV	1,84E-07	8,09E-01	7,25E+03
2	TCP-β	20	UV	1,48E-05	8,58E-01	4,14E+04
3	TCP-β	10	UV	1,46E-05	6,18E-01	1,55E+03
4	TCP-β	20	Sin UV	1,19E-05	8,64E-01	4,17E+04
5	HAP	20	Sin UV	1,69E-05	8,99E-01	1,64E+04
6	HAP	20	UV	8,82E-07	6,06E-01	2,31E+04
7	HAP	10	UV	3,29E-05	6,15E-01	6,90E+03
8	HAP	10	Sin UV	1,82E-05	7,48E-01	4,48E+04
10	0	12	UV	7,21E-06	8,08E-01	1,58E+04

Fuente: Autores

Tabla C3. Parámetros de circuitos equivalentes a las 22 horas.

SIn	Biocerámico (10%)	Colágeno(ug/ml)	Irradiación	22 Horas		
				Ccell/pol T	Ccell/pol P	Rcell/pol
1	TCP-β	10	Sin UV	3,45E-07	8,34E-01	8,36E+03
2	TCP-β	20	UV	4,41E-06	6,66E-01	9,20E+04
3	TCP-β	10	UV	4,72E-06	8,42E-01	4,51E+04
4	TCP-β	20	Sin UV	1,10E-06	8,76E-01	8,73E+04
5	HAP	20	Sin UV	1,51E-05	9,05E-01	6,38E+04
6	HAP	20	UV	8,81E-07	6,35E-01	1,95E+04
7	HAP	10	UV	4,77E-05	5,90E-01	1,17E+04
8	HAP	10	Sin UV	1,92E-05	7,75E-01	1,01E+04
9	0	12	Sin UV	1,02E-07	5,57E-01	2,13E+05
10	0	12	UV	9,50E-06	8,48E-01	1,28E+04

Fuente: Autores

Tabla C4. Parámetros de circuitos equivalentes a las 24 horas.

SIn	Biocerámico (10%)	Colágeno(ug/ml)	Irradiación	24 Horas		
				Ccell/pol T	Ccell/pol P	Rcell/pol
1	TCP-β	10	Sin UV	2,12E-07	8,93E-01	5,99E+03
2	TCP-β	20	UV	4,48E-06	6,42E-01	9,32E+04
3	TCP-β	10	UV	4,49E-06	8,50E-01	4,49E+04
4	TCP-β	20	Sin UV	1,05E-05	8,66E-01	8,85E+04
5	HAP	20	Sin UV	1,40E-05	8,97E-01	8,36E+04
6	HAP	20	UV	2,12E-08	9,69E-01	1,40E+04
7	HAP	10	UV	5,21E-05	6,54E-01	1,92E+04
8	HAP	10	Sin UV	1,69E-05	8,02E-01	8,38E+03
9	0	12	Sin UV	8,40E-07	5,71E-01	6,38E+04
10	0	12	UV	1,09E-05	8,37E-01	7,97E+03

Fuente: Autores

## ANEXO D. DIAGRAMAS DE ÁNGULO DE FASE OBTENIDOS POR LA TÉCNICA EIS

Figura D1. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para la concentración de colágeno de 10 $\mu$ g/ml a 0 horas.

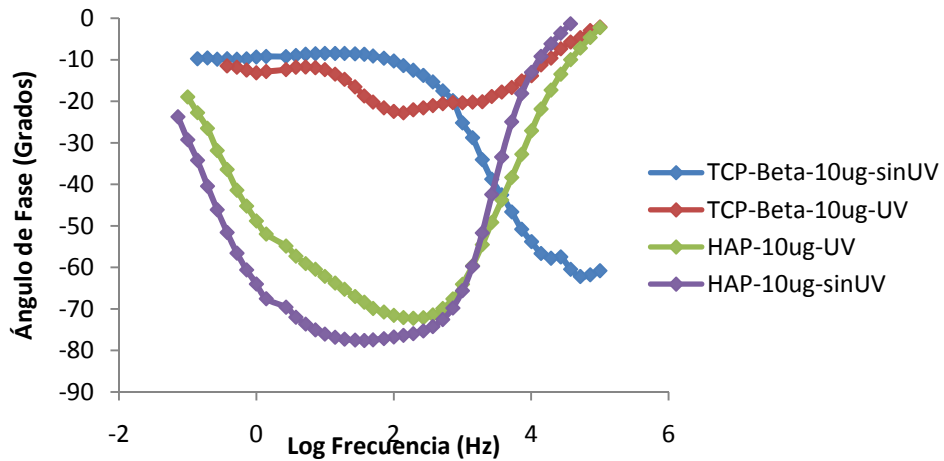
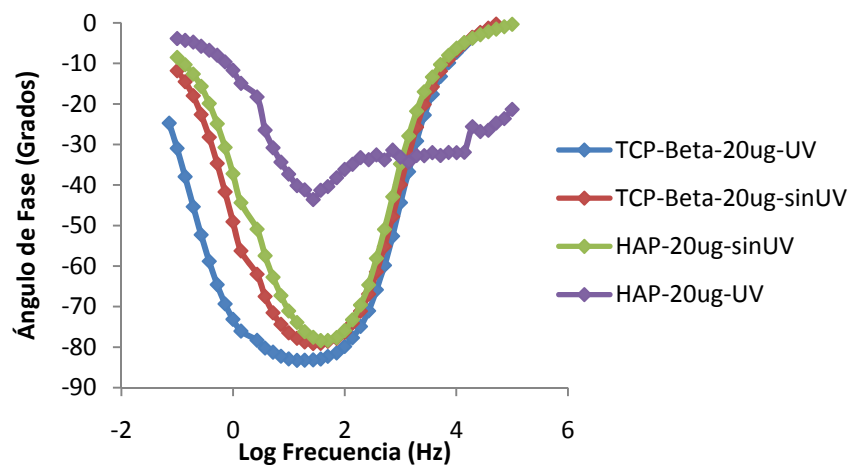


Figura D2. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para la concentración de colágeno de 20 $\mu$ g/ml a 0 horas.



Fuente: Autores

Figura D3. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para recubrimientos sin irradiación 0 horas.

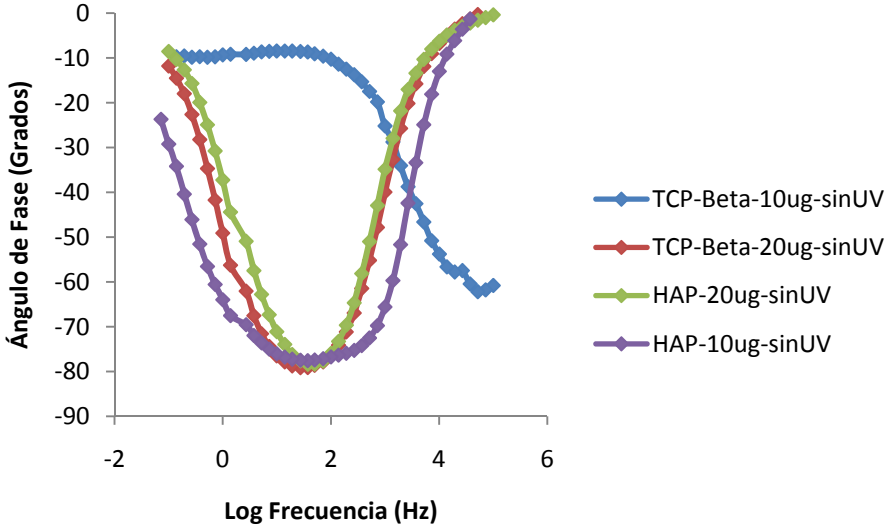
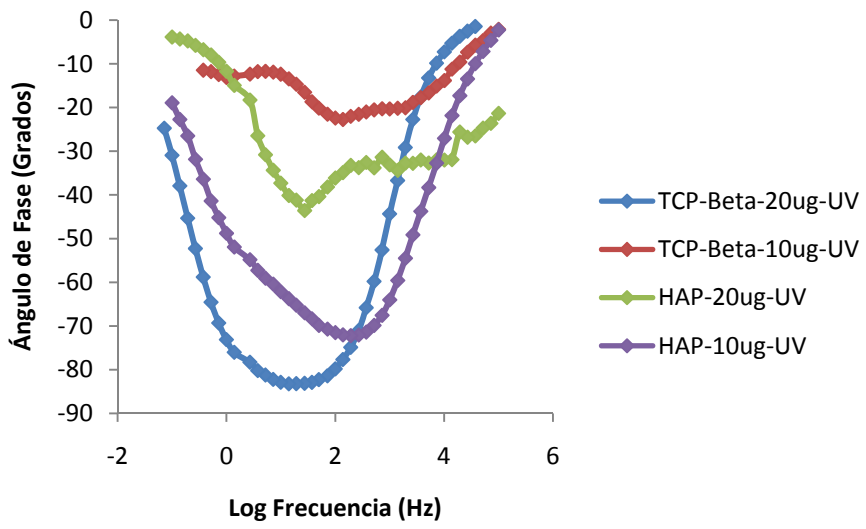


Figura D4. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para recubrimientos con irradiación 0 horas.



Fuente: Autores

Figura D5. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para Fosfato Tricalcico- $\beta$  a 0 horas.

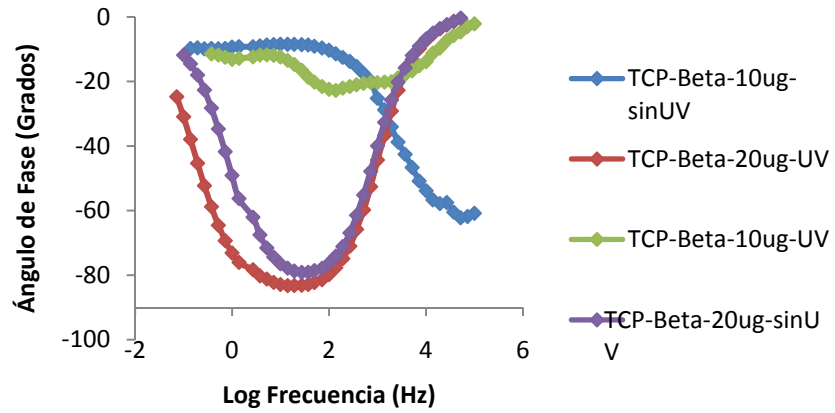
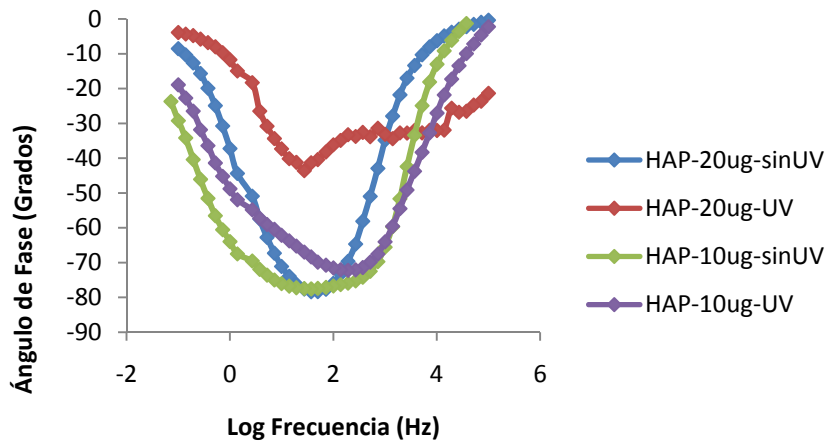


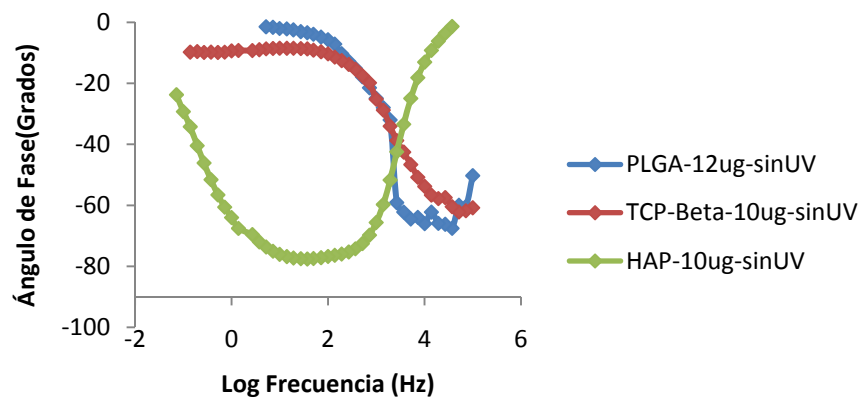
Figura D6. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para Hidroxiapatita 0 horas.



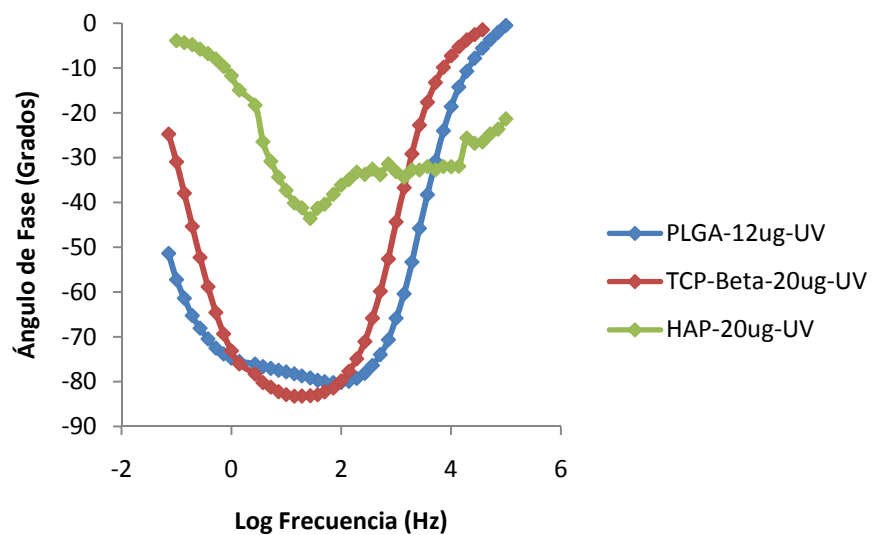
Fuente: Autores

Figura D7. Comparación de los diagramas de ángulo de fase vs. Log frecuencia de las soluciones de biocerámicos respecto a la solución 15% PLGA y 12 $\mu$ g/ml de colágeno a 0 horas. a) Colágeno 10 $\mu$ g/ml sin irradiación. b) Colágeno 20 $\mu$ g con irradiación.

a)



b)



Fuente: Autores

Figura D8. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para la concentración de colágeno de 10µg/ml a 2 horas.

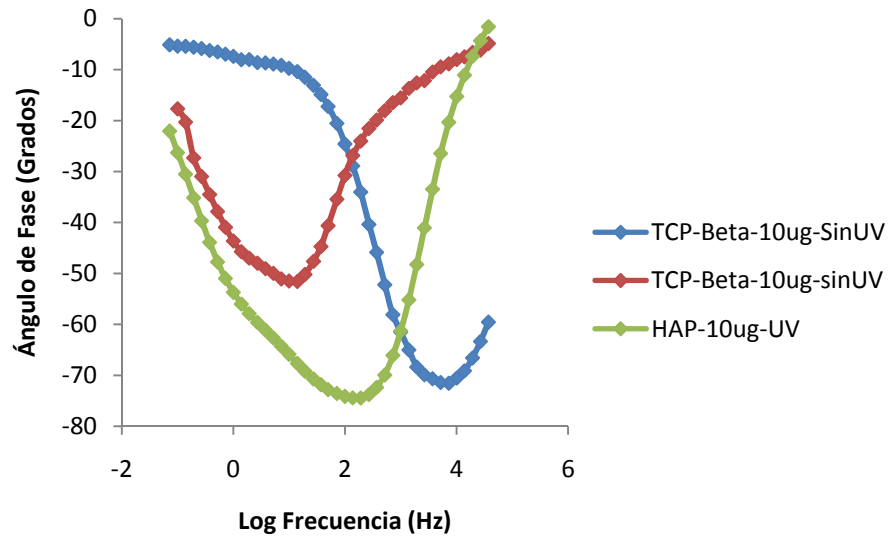
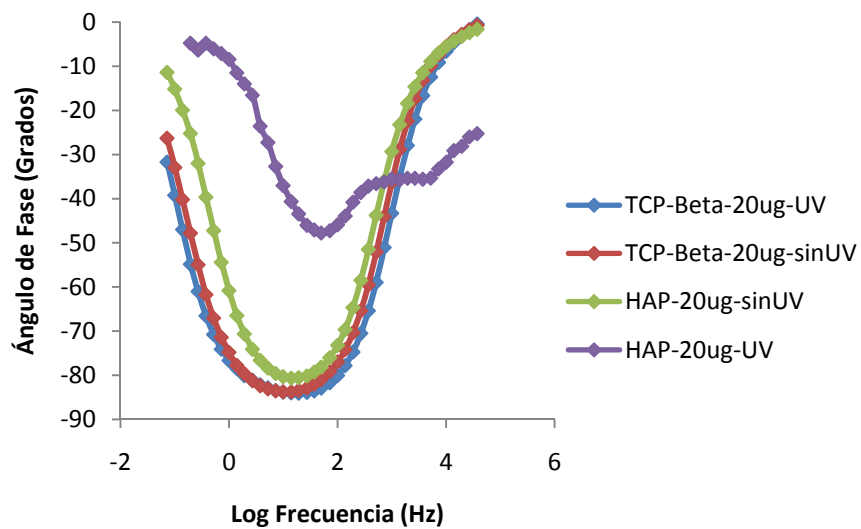


Figura D9. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para la concentración de colágeno de 20µg/ml a 2 horas.



Fuente: Autores

Figura D10. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para recubrimientos sin irradiación 2 horas.

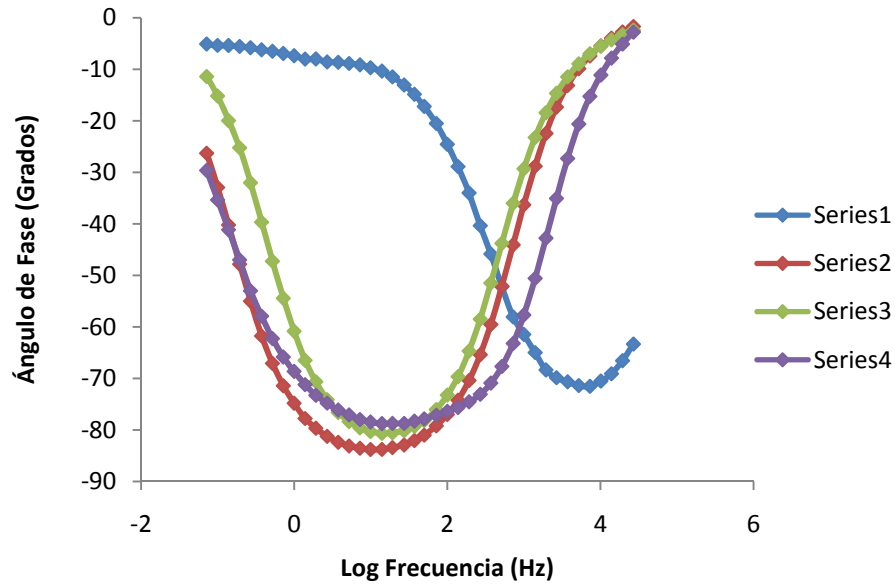
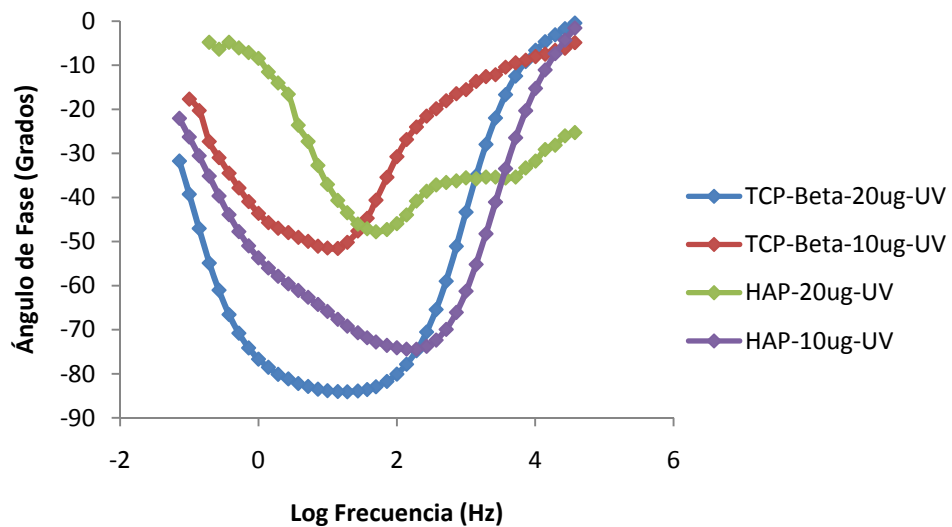


Figura D11. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para recubrimientos con irradiación 2 horas



Fuente: Autores

Figura D12. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para Fosfato Tricalcico- $\beta$  2 horas.

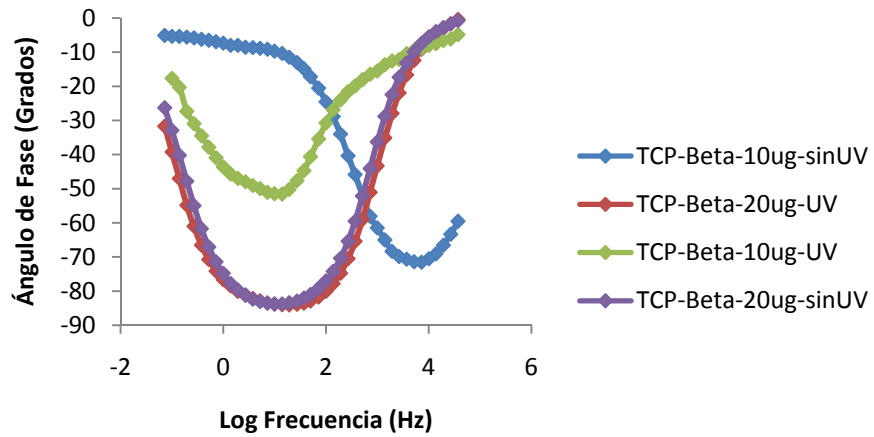
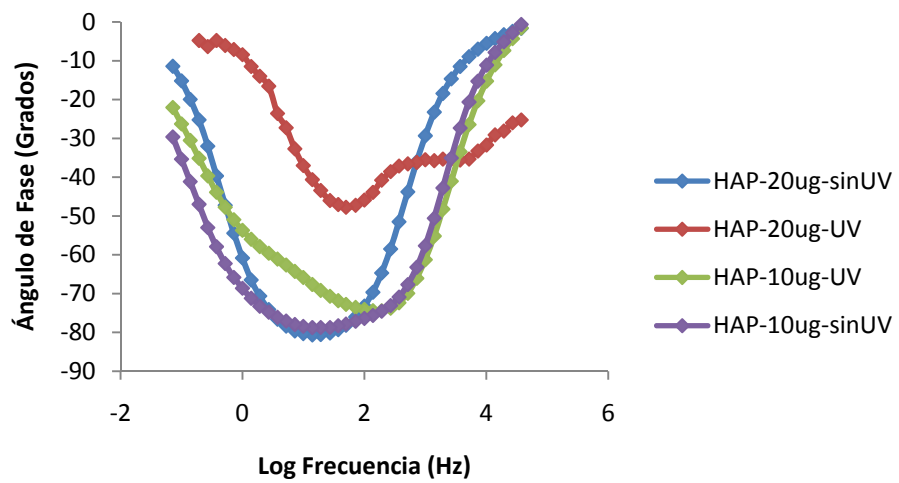


Figura D13. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para Hidroxiapatita 2 horas.



Fuente: Autores

Figura D14. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para la concentración de colágeno de 10µg/ml a 22 horas.

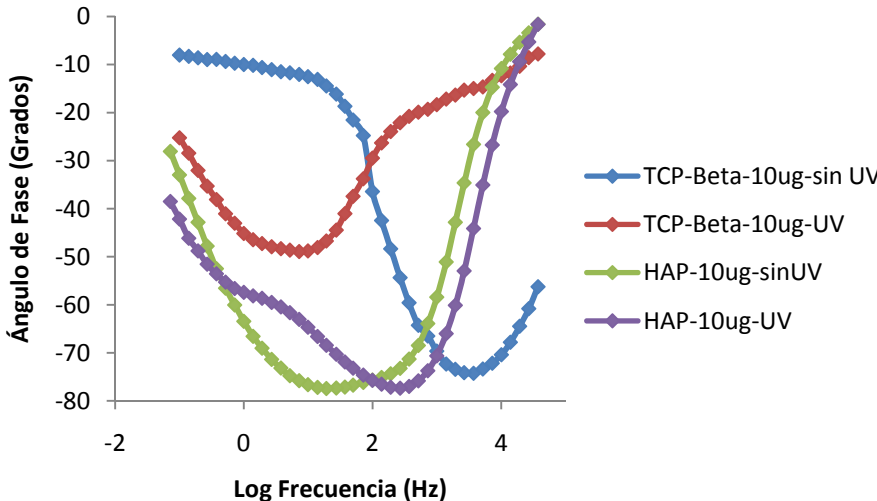
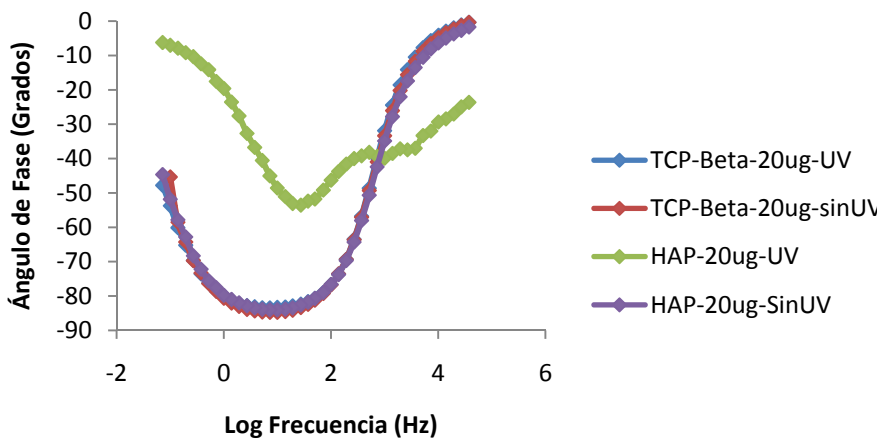


Figura D15. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para la concentración de colágeno de 20µg/ml a 22 horas.



Fuente: Autores

Figura D16. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para recubrimientos sin irradiación 22horas.

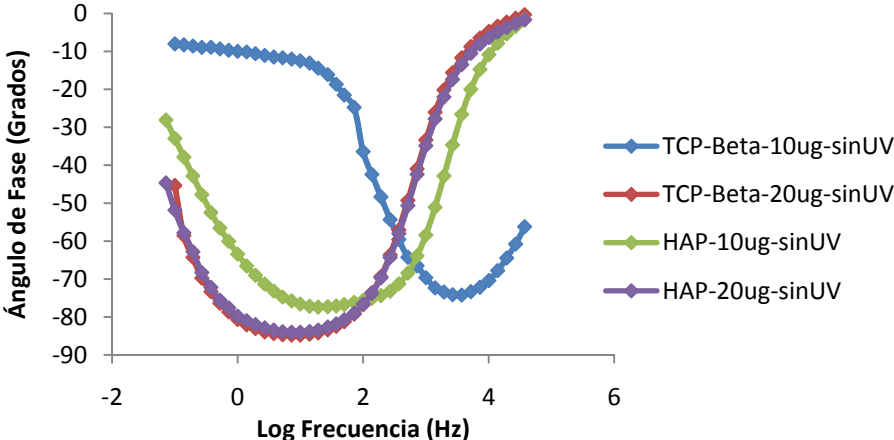
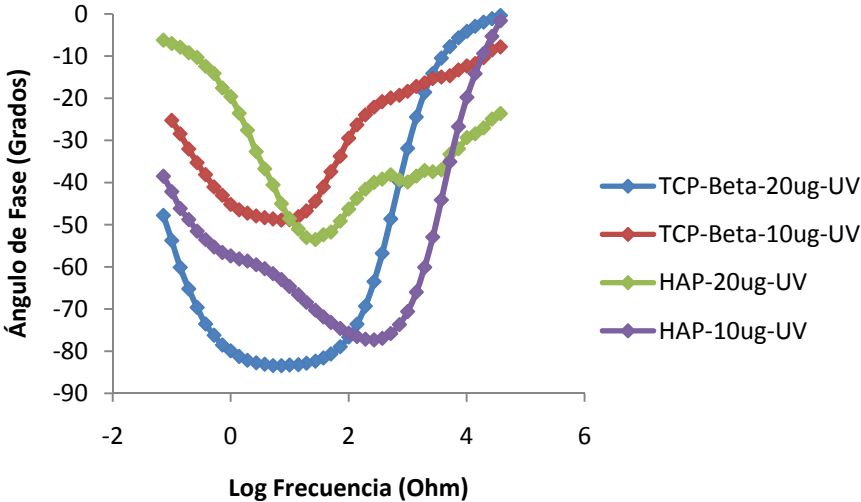


Figura D17. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para recubrimientos con irradiación 22 horas



Fuente: Autores

Figura D18. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para Fosfato Tricalcico- $\beta$  22 horas.

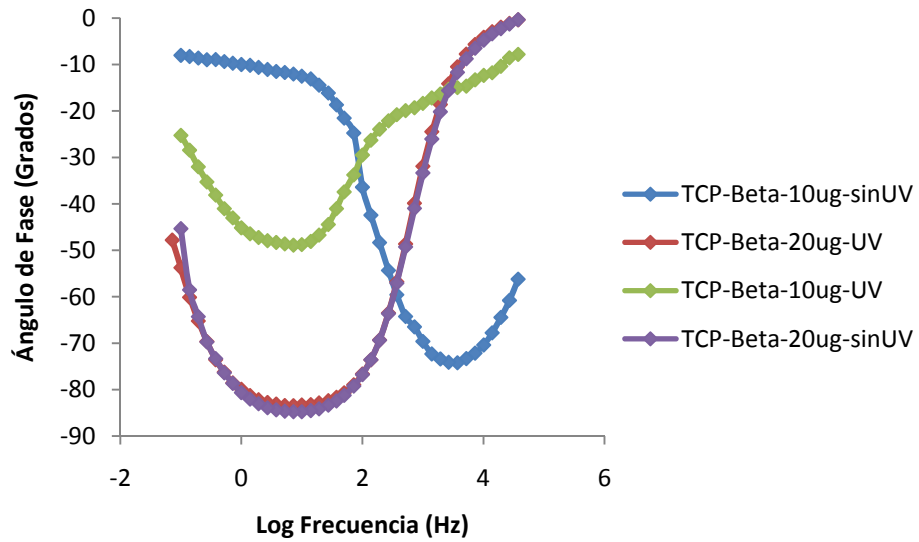
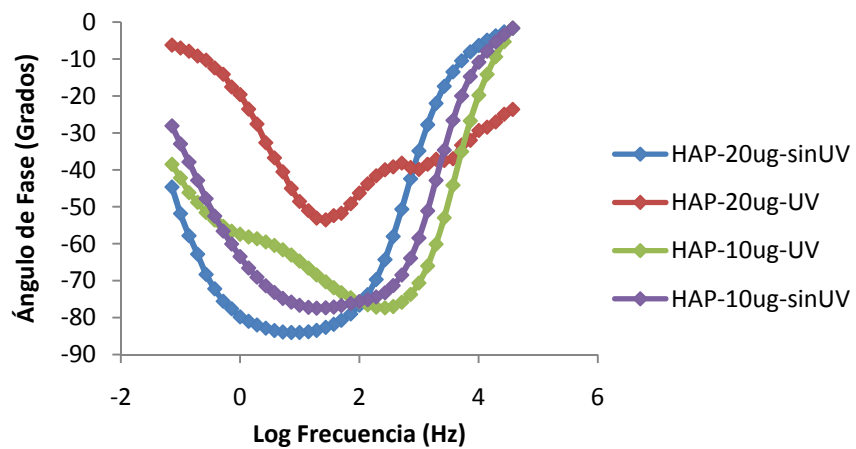


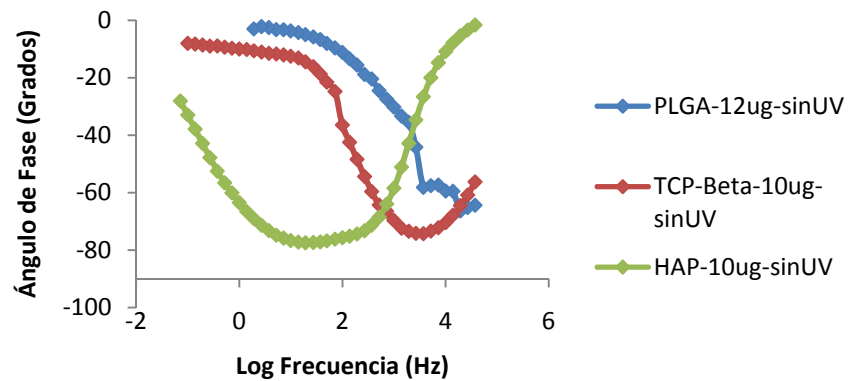
Figura D19. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para Hidroxiapatita 22 horas.



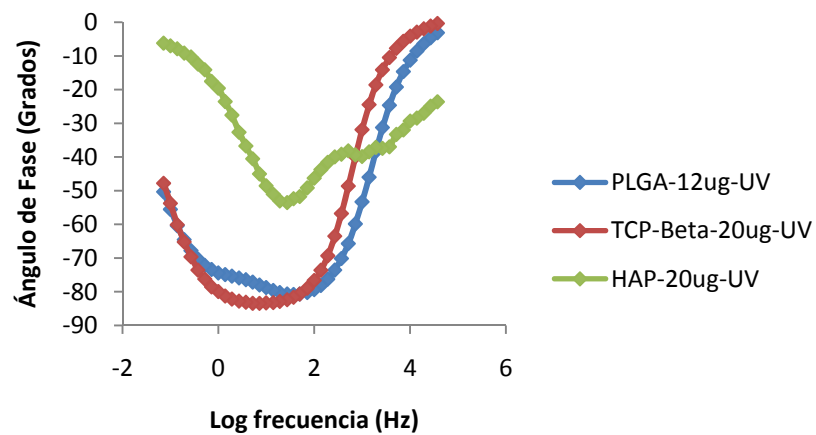
Fuente: Autores

Figura D20. Comparación de los diagramas de ángulo de fase vs. Log frecuencia de las soluciones de biocerámicos respecto a la solución 15% PLGA y 12 $\mu$ g/ml de colágeno a 0 horas. a) Colágeno 10 $\mu$ g/ml sin irradiación. b) Colágeno 20 $\mu$ g con irradiación.

a)



b)



Fuente: Autores

Figura D22. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para la concentración de colágeno de 10µg/ml a 24 horas.

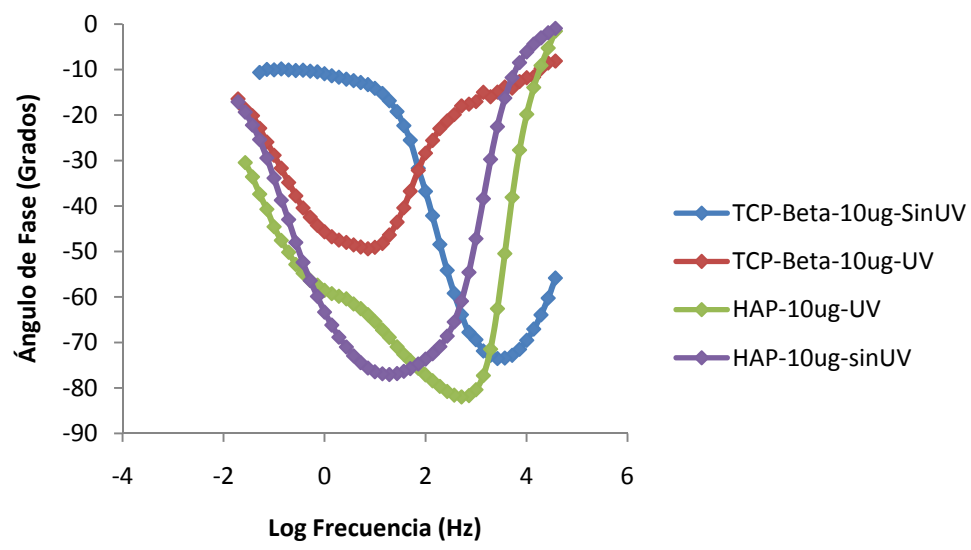
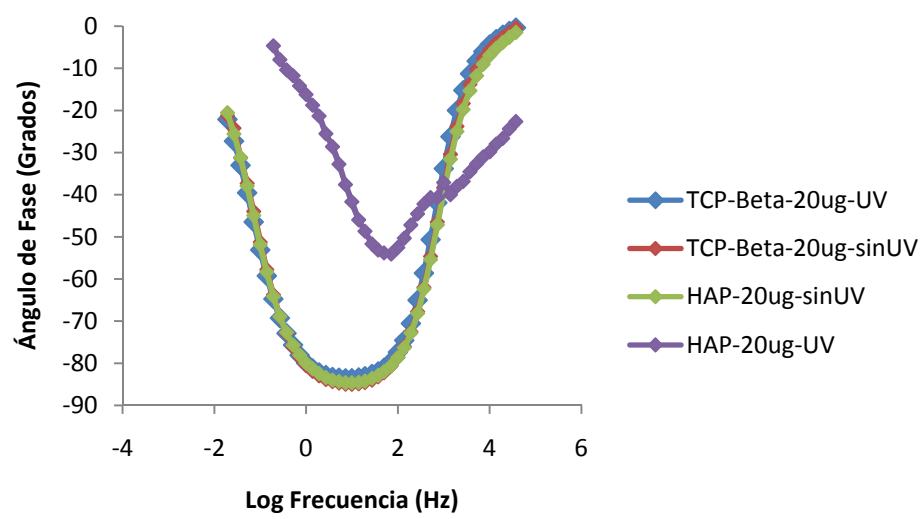


Figura D23. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para la concentración de colágeno de 20µg/ml a 24 horas.



Fuente: Autores

Figura D24. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para recubrimientos sin irradiación 24 horas.

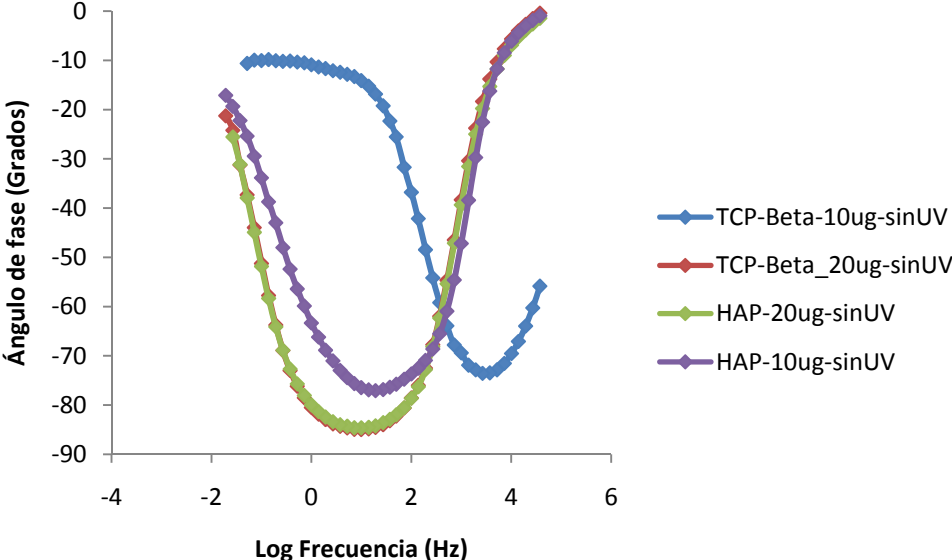
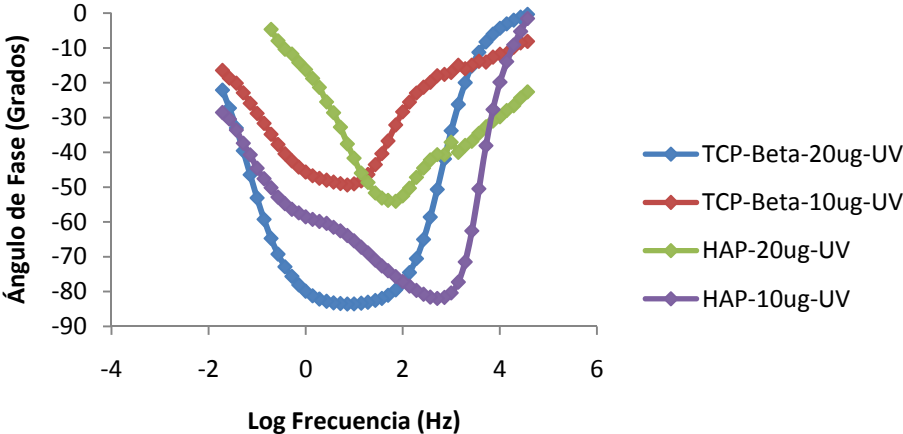


Figura D25. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para recubrimientos con irradiación 24 horas



Fuente: Autores

Figura D26. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para Fosfato Tricalcico-β 24 horas.

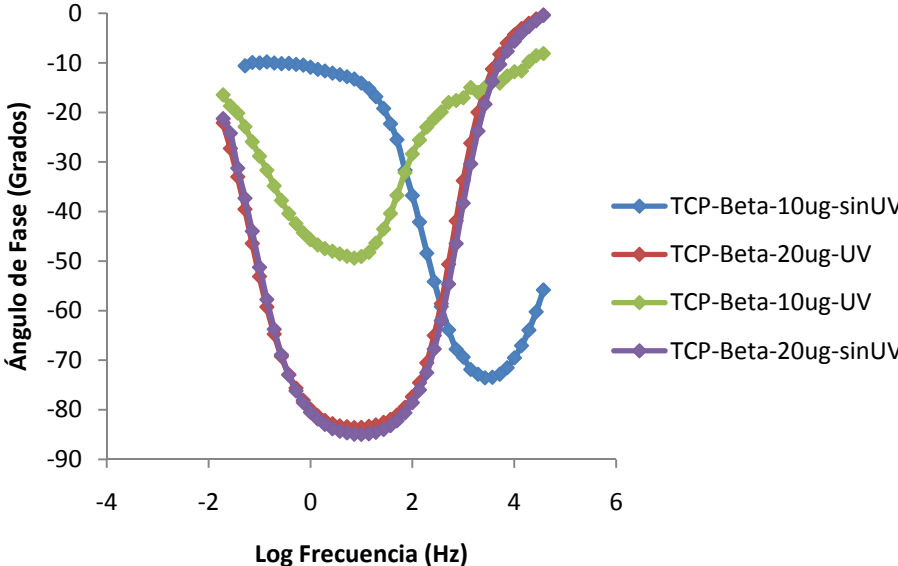
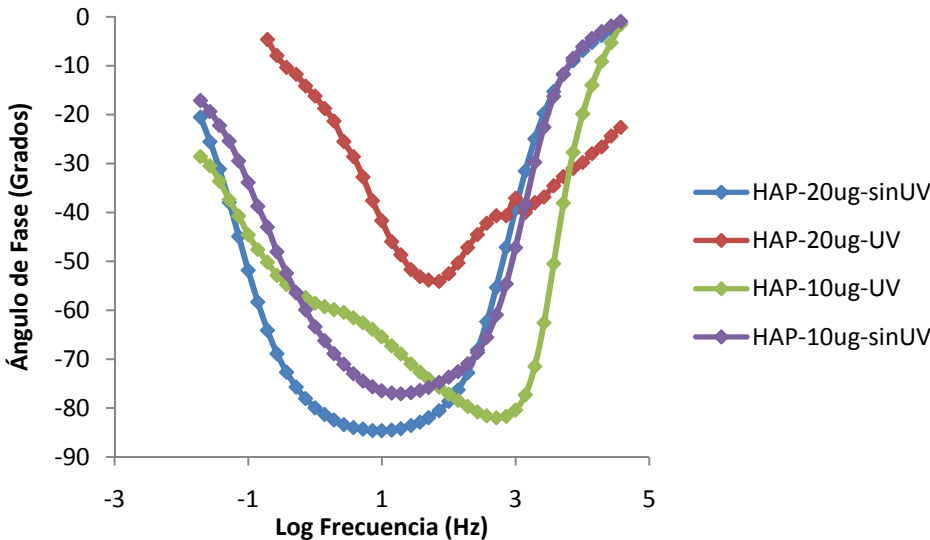


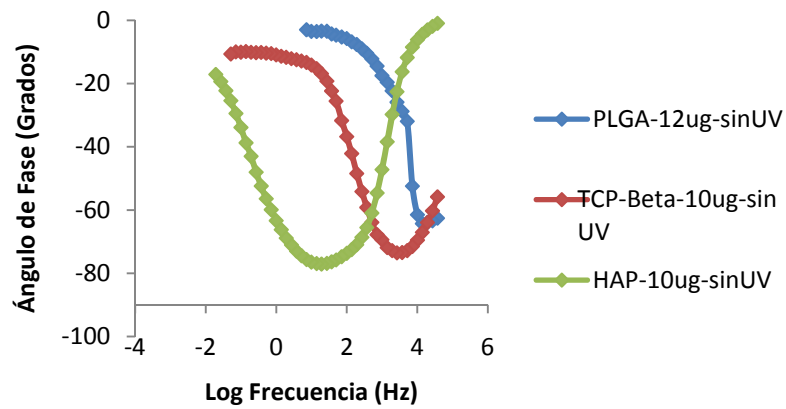
Figura D27. Diagrama de ángulo de fase vs. Log frecuencia para Hidroxiapatita 24 horas.



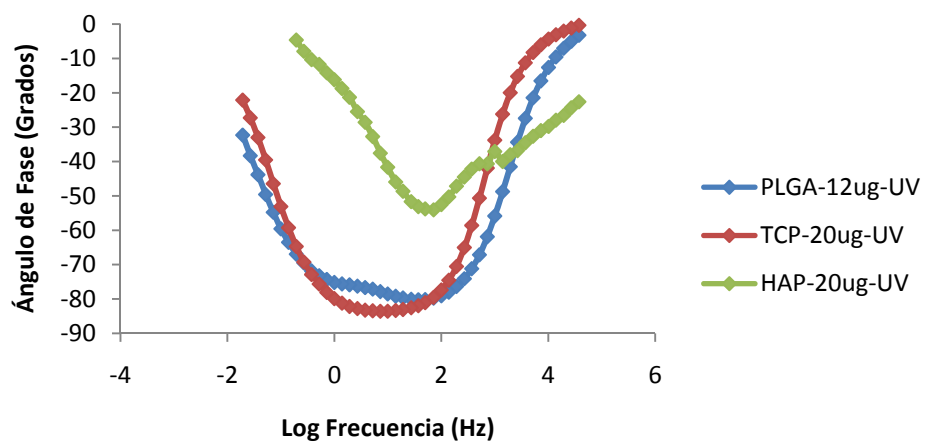
Fuente: Autores

Figura D28. Comparación de los diagramas de ángulo de fase vs. Log frecuencia de las soluciones de biocerámicos respecto a la solución 15% PLGA y 12 $\mu$ g/ml de colágeno a 24 horas. a) Colágeno 10 $\mu$ g/ml sin irradiación. b) Colágeno 20 $\mu$ g con irradiación.

a)



b)



Fuente: Autores

## ANEXO E. DIAGRAMAS DE $\Delta f$ OBTENIDAS POR LA MICROBALANZA DE CRISTAL DE CUARZO

Figura E1. Diagrama de  $\Delta f$  vs. Tiempo para la solución de PLGA- 10%TCP- $\beta$  - 20 $\mu\text{g/ml}$  de colágeno y con irradiación en el tiempo inicial.

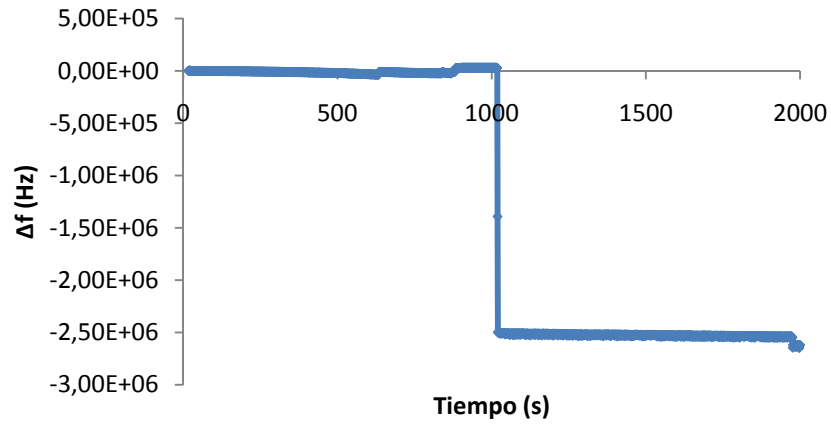
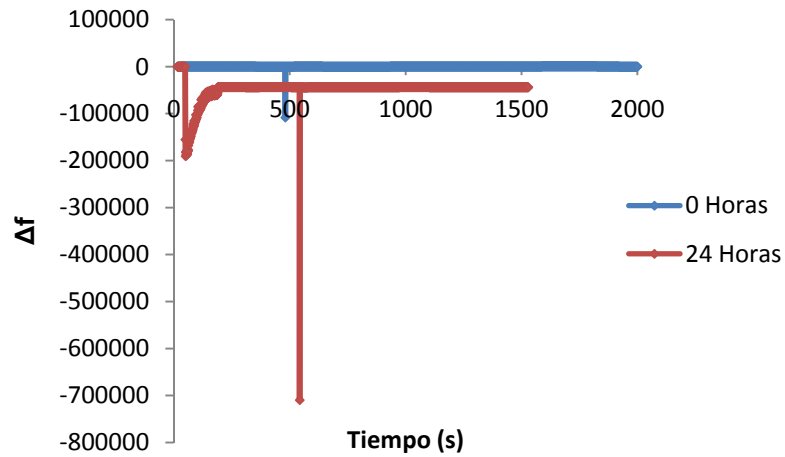


Figura E2. Diagrama de  $\Delta f$  vs. Tiempo para la solución de PLGA- 10%HAP - 10 $\mu\text{g/ml}$  de colágeno y con irradiación en el tiempo inicial y final.



Fuente: Autores

## ANEXO F. TABLAS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla F1. Análisis de la varianza Rcel/pol.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Biocerámico	1,40462E9	1	1,40462E9	4,63	0,0438
B:Colágeno	7,71248E9	1	7,71248E9	25,41	0,0001
C:Irradiación UV	2,90465E6	1	2,90465E6	0,01	0,9230
D:Tiempo	4,13851E9	1	4,13851E9	13,64	0,0014
AB	2,11096E9	1	2,11096E9	6,96	0,0158
AC	1,67301E9	1	1,67301E9	5,51	0,0293
AD	1,65545E9	1	1,65545E9	5,46	0,0300
BC	1,27908E8	1	1,27908E8	0,42	0,5236
BD	2,12673E9	1	2,12673E9	7,01	0,0155
CD	1,15609E8	1	1,15609E8	0,38	0,5441
DD	2,13744E7	1	2,13744E7	0,07	0,7934
Total error	6,06925E9	20	3,03462E8		
Total (corr.)	2,71588E10	31			

R-squared = 77,6527 percent

Fuente: Autores

## ANEXO G. MICROGRAFÍAS

Figura G1. Fosfato Tricalcico  $\beta$ - 20 $\mu$ g/ml-con Irradiación 10x.

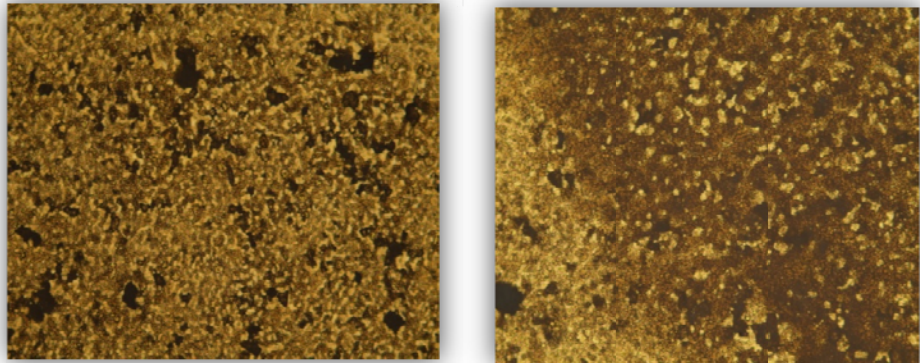


Figura G2. Fosfato Tricalcico  $\beta$ - 20 $\mu$ g/ml-sin Irradiación 10x.

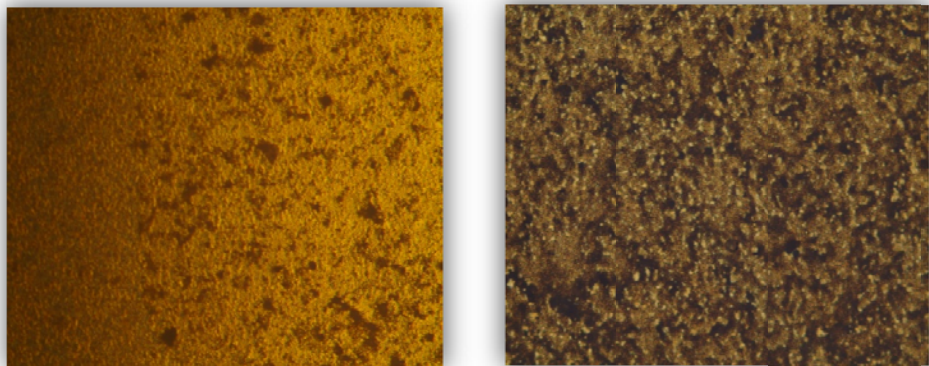


Figura G3. Fosfato Tricalcico  $\beta$ - 10 $\mu$ g/ml-sin Irradiación 10x.

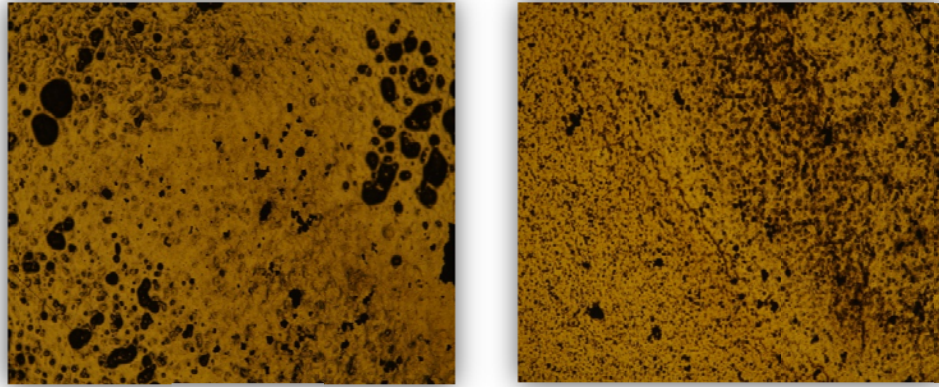


Figura G4. Hidroxiapatita-20 $\mu$ g/ml-sin Irradiación 10x.

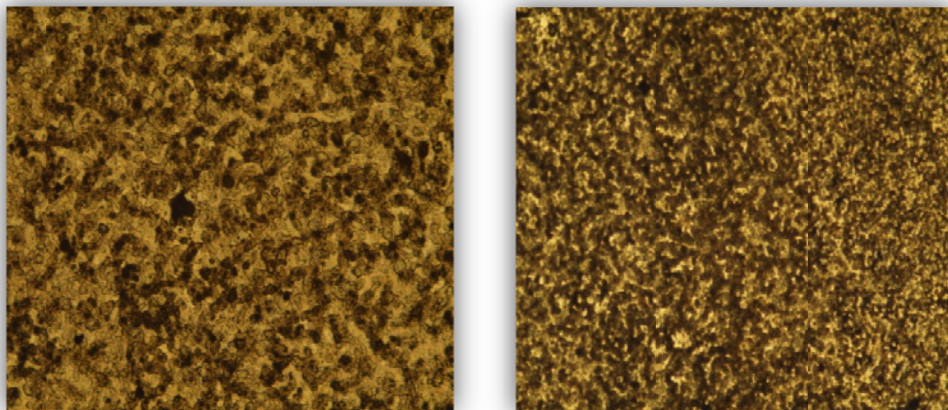


Figura G5. Hidroxiapatita-20 $\mu$ g/ml-con Irradiación 10x.

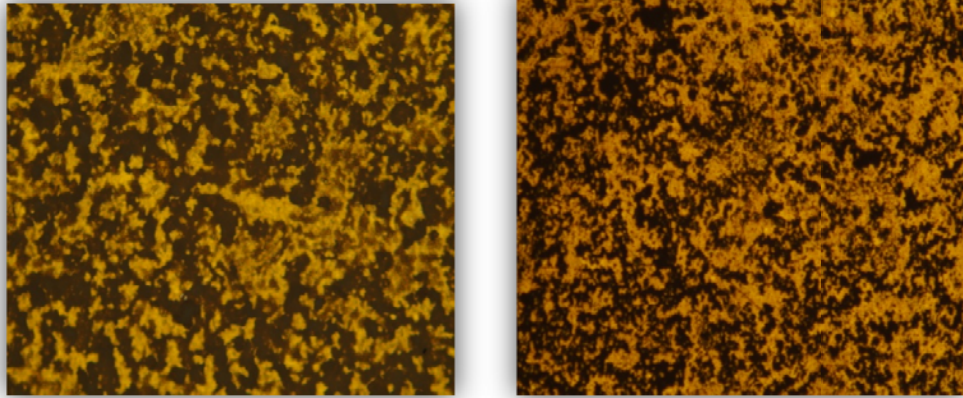


Figura G6. Hidroxiapatita- 10 $\mu$ g/ml-con Irradiación 10x.

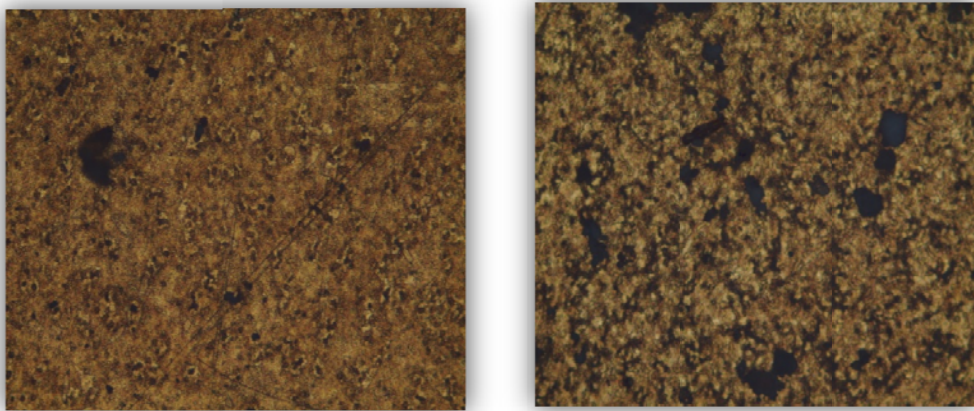


Figura G7. Hidroxiapatita -10 $\mu$ g/ml – sin irradiación

