

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DIELECTRICA DE MEMBRANAS
BIOLÓGICAS SOBRE MATERIAL POLIMÉRICO PLA – PGA MODIFICADO,
BAJO POLARIZACIÓN AC Y DC**



Ing. NERLY DEYANIRA MONTAÑEZ SUPELANO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA METALÚRGICA Y CIENCIA DE MATERIALES
MAESTRÍA EN INGENIERÍA DE MATERIALES
BUCARAMANGA**

2011



**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DIELECTRICA DE MEMBRANAS
BIOLÓGICAS SOBRE MATERIAL POLIMÉRICO PLA – PGA MODIFICADO,
BAJO POLARIZACIÓN AC Y DC**

Ing. NERLY DEYANIRA MONTAÑEZ SUPELANO

Trabajo de Investigación para optar al título de
Magíster en Ingeniería de Materiales

Director:
Ph.D. DARÍO YESID PEÑA BALLESTEROS

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA METALÚRGICA Y CIENCIA DE MATERIALES
MAESTRÍA EN INGENIERÍA DE MATERIALES
BUCARAMANGA**

2011

AGRADECIMIENTOS

La autora extiende sus agradecimientos:

A COLCIENCIAS, al Grupo de Investigaciones en Corrosión, a la Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de Materiales, al Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales CINTROP de la Facultad de Salud, a la Empresa Quirúrgicos Especializados S.A., al Grupo de Óptica y Tratamiento de Señales de la Escuela de Física de la Universidad Industrial de Santander y al Grupo de Corrosión y Protección de la Universidad de Antioquia por su colaboración en los ensayos SEM.

Agradecimientos Especiales

A quienes fueron mis maestros durante toda la etapa de la investigación: a los profesores Ph.D. Darío Yesid Peña Ballesteros y M.Sc. Custodio Vásquez Quintero por todas sus enseñanzas, por la confianza en mí desde el inicio de mis estudios de posgrado, dedicación y apoyo incondicional.

A todos los miembros de la Escuela de Ingeniería Metalúrgica, al profesor Ph.D. Gustavo Neira, Director del posgrado en el programa de Maestría en Ingeniería de Materiales, a Ambrosio, técnico de los laboratorios, por estar siempre dispuesto a colaborar.

Al Centro de Enfermedades Tropicales CINTROP de la Universidad Industrial de Santander, especialmente a la Dra. Patricia Escobar y a la Bacterióloga Magda Flórez, por su invaluable colaboración.

A todos los miembros del Grupo de Investigaciones en Corrosión, profesores, estudiantes de pregrado en Ingeniería Metalúrgica e Ingeniería Química, a mis colegas y consejeras Ing. M.Sc. Paola Juliana Reyes, Qca. Laura Marcela Quiroz, Ing. Diana Parada e Ing. Marcela Gelves. Al estudiante de Doctorado Hugo Armando Estupiñán, por sus valiosos aportes. A “mis estudiantes” de pregrado de quienes aprendí mucho en esta gran tarea de la investigación y la enseñanza.

De todo corazón gracias por ser tan especiales conmigo, por recibir tanto de ustedes.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1 INTRODUCCIÓN	20
2 DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	22
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	23
1.3 HIPÓTESIS PLANTEADA.....	25
3 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GENERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4 FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	27
3.1 BIOMATERIALES Y BIOCOMPATIBILIDAD.....	27
3.2 MATERIALES POLIMÉRICOS DE ORIGEN NATURAL Y SINTÉTICO	28
3.2.1 Colágeno	28
3.2.2 Quitosano	28
3.2.3 Hidroxiapatita.....	29
3.2.4 Ácido Poliláctico (PLA).....	29
3.2.5 Ácido Poliglicólico (PGA)	30
3.2.6. Ácido Poli-láctico-co-glicólico (PLGA)	31
3.3 TEJIDO ÓSEO.....	31
3.4 CÉLULAS Y MEMBRANAS BIOLÓGICAS	32
3.5 PROPIEDADES ELÉCTRICAS DE LOS MATERIALES BIOLÓGICOS	34
3.5.1 Antecedentes.....	34
3.5.2 Permitividad y conductividad eléctrica.....	36
3.5.3 Propiedades eléctricas de las células	39
3.5.4 Modelos matemáticos de circuitos en tejido biológico	41
3.5.5 Propiedades eléctricas en un tejido isquémico.....	43
3.6 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE SISTEMAS HETEROGÉNEOS	45
3.6.1 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica.....	45
3.6.2 Voltametría	47
4 ESTADO DEL ARTE	48

5 METODOLOGÍA.....	54
5.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	55
5.2 PLANEAMIENTO Y ELECCIÓN DE PRINCIPALES PARÁMETROS	55
5.3 SÍNTESIS DE PLA, PGA E HIDROXIAPATITA.....	56
5.3.1 Síntesis de ácido poliláctico PLA	56
5.3.2 Síntesis de ácido poliglicólico PGA.....	56
5.3.3 Síntesis de hidroxiapatita (HAp).....	57
5.4 CARACTERIZACIÓN DE PLA, PGA, PLA – PGA, HAp Y COLÁGENO COMERCIAL.....	58
5.5 ENSAYOS PRELIMINARES: SELECCIÓN DE PARÁMETROS	58
5.6 OBTENCIÓN Y ELECTRODEPOSICIÓN DEL POLÍMERO PLA-PGA Y PLA-PGA MODIFICADO.....	60
5.6.1 Preparación de las soluciones	60
5.6.2 Electrodeposición catódica	61
5.7 CULTIVO CELULAR.....	62
5.8 DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA ENSAYOS BIOELECTROQUÍMICOS.....	63
5.9 DISEÑO DE LA CELDA PARA ENSAYOS BIOELECTROQUÍMICOS.....	64
5.10 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DIELECTRICA Y ACTIVIDAD DE OSTEÓBLASTOS SOBRE EL RECUBRIMIENTO DE MATRIZ POLIMÉRICA.....	65
5.11 ENSAYO DE ADHESIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR POR MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA.....	67
5.12 MODELAMIENTO DEL SISTEMA BIOLÓGICO BIOPOLÍMERO PLA - PGA MODIFICADO – OSTEÓBLASTOS	68
5.13 PROPIEDADES SUPERFICIALES Y MORFOLOGÍA DEL MATERIAL POLIMÉRICO MODIFICADO – HOS.	69
5.14 DISCUSIÓN GENERAL, ANÁLISIS DE RESULTADOS, PUBLICACIÓN Y SOCIALIZACIÓN DE RESULTADOS	70
6 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	71
6.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES	71
6.1.1 Caracterización de ácido poliláctico PLA	71
6.1.2 Caracterización del ácido poliglicólico.....	72
6.1.3 Caracterización del PLA-PGA.....	73
6.1.4 Caracterización del colágeno comercial.....	75
6.1.5 Caracterización de la hidroxiapatita (HAp)	76
6.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS: MICROSCOPIA ÓPTICA.....	77

6.3 EVALUACIÓN BIOELECTROQUÍMICA DE HOS SOBRE RECUBRIMIENTO DE MATRIZ POLIMÉRICA	80
6.3.1 Evolución del potencial de corrosión Ecorr vs tiempo	80
6.3.2 Análisis de Impedancia	83
6.3.3 Modelos de circuitos de impedancia electroquímica del sistema Rpmi – PLA-PGA y Rpmi – HOS – PLA-PGA modificado.	88
6.3.4 Análisis de permitividad y conductividad.....	91
6.3.5 Diagramas de Voltametría Cíclica.....	94
6.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE OSTEOBLASTOS POR MEDICIÓN DE FOSFATASA ALCALINA	96
6.5 ADHESIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR POR MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA.....	98
6.6 ANÁLISIS POR MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRÓNICO SEM Y MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA AFM.....	102
6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	107
7 CONCLUSIONES	111
8 RECOMENDACIONES.....	113
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
BIBLIOGRAFÍA.....	118
ANEXOS	122

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Micrografía electrónica de fibrillas de colágeno.....	28
Figura 2. Espectro Ideal de las propiedades dieléctricas de suspensiones celulares y tejidos en términos de la parte real ϵ_f' permitividad relativa y la parte imaginaria ϵ_f'' pérdida dieléctrica de la permitividad compleja relativa.....	39
Figura 3. Conductividad σ y permitividad ϵ' en función de la frecuencia.	39
Figura 4. Membrana celular y su equivalente circuito eléctrico.	42
Figura 5. Modelo de Cole – Cole.	43
Figura 6. Representación del paso de la corriente a baja y alta frecuencia, y el aumento de impedancia a baja frecuencia debido al hinchamiento celular causado por isquemia.	45
Figura 7. Rangos de frecuencias que abarcan las técnicas de caracterización dieléctrica, junto con los correspondientes a las dispersiones dieléctricas en biomateriales.....	46
Figura 8. Metodología.	54
Figura 9. Geometría de las probetas empleadas.	55
Figura 10. Rotoevaporador para la síntesis de PLA y PGA.....	57
Figura 11. Esquema general del montaje para la electrodeposición de los recubrimientos.	61
Figura 12. Recubrimiento con colágeno, a) agrietado y b) no agrietado.	62
Figura 13. Celda para ensayos bioelectroquímicos.....	65
Figura 14. a) Montaje para ensayos bioelectroquímicos, b) detalle de celda. Ensayo en ejecución.	66
Figura 15. Montaje para pruebas de fosfatasa alcalina y microscopía de epifluorescencia.	67
Figura 16. Montaje para ensayos de microscopía de fuerza atómicaFF, a) Microscopio, b) Sistema computacional.....	70
Figura 17. Espectro FTIR de ácido poliláctico.....	71
Figura 18. Espectro FTIR ácido poliglicólico	73
Figura 19. Espectro FTIR. A) PLGA y B) PLA–PGA obtenido.	74
Figura 20. Espectros FTIR comparativos de los polímeros obtenidos.....	75
Figura 21. Espectro FTIR experimental del colágeno comercial	76
Figura 22. Diagrama de difracción de rayos X de la hidroxapatita obtenida.....	77
Figura 23. Microscopía óptica del recubrimiento PLA-PGA/HAp. (a) 10X, (b) 50X.....	78

Figura 24. Microscopía óptica del recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.05%). (a) 10X, (b) 20X	78
Figura 25. Microscopía óptica del recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.05%). (a) 10X, (b) 20X.	78
Figura 26. Microscopía óptica del recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.075%). (a) 20X, (b) 50X.	79
Figura 27. Microscopía óptica del recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%). (a) 10X, (b) 20X.	79
Figura 28. Estabilización del potencial de corrosión para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%)-Rpmi+HOS (15000cel/mL)	81
Figura 29. Evolución del potencial de corrosión vs tiempo. (a) PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.05%), (b) PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.05%), (c) PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.075%), (d) PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%).....	81
Figura 30. Espectros de impedancia obtenidos para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.05%), para la concentración celular 30000 cel/mL, a los diferentes tiempos de medición. (a) diagrama de Bode, (b) diagrama de Nyquist.	84
Figura 31. Espectros de impedancia obtenidos para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.05%), concentración celular 30000 cel/mL, a los diferentes tiempos de medición. (a) diagrama de Bode, (b) diagrama de Nyquist.	84
Figura 32. Espectros de impedancia obtenidos para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.075%), concentración celular 30000 cel/mL, a los diferentes tiempos de medición. (a) diagrama de Bode, (b) diagrama de Nyquist.	85
Figura 33. Espectros de impedancia obtenidos para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/ Col(0.075%), concentración celular 30000 cel/mL, a los diferentes tiempos de medición. (a) diagrama de Bode, (b) diagrama de Nyquist.	85
Figura 34. Diagramas de Nyquist obtenidos para todos los recubrimientos, concentración celular de 15000 cel/mL, tiempo de cultivo de 5 días y para el blanco en Rpmi.....	87
Figura 35. Diagramas de Nyquist obtenidos para todos los recubrimientos, con una concentración celular de 30000 cel/mL, tiempo de cultivo de 5 días y para el blanco en Rpmi.	87
Figura 36. Circuitos equivalentes usados para el ajuste de los datos obtenidos de impedancia para los ensayos en medio de cultivo Rpmi. (a) Sin difusión y (b) con difusión.	88
Figura 37. Circuitos equivalentes usados para el ajuste de los datos obtenidos de impedancia para los ensayos en medio de cultivo Rpmi. (a) Sin difusión y (b) con difusión.	89
Figura 38. Representación del sistema biológico y su circuito equivalente.	90
Figura 39. Capacitancia celular vs tiempo de cultivo celular (15000 cel/mL).....	90
Figura 40. Variación de la permitividad con respecto a la frecuencia.....	92
Figura 41. Variación de la conductividad con respecto a la frecuencia.	93

Figura 42. Voltagrama obtenido para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%), concentración celular 30000 cel/mL a 72 horas de incubación celular.....	94
Figura 43. Voltagramas obtenidos para todos los recubrimientos, concentración celular de 15000 cel/mL, tiempo de cultivo de 5 días.....	95
Figura 44. Voltagramas obtenidos para todos los recubrimientos, concentración celular de 30000 cel/mL, tiempo de cultivo de 5 días.....	95
Figura 45. Producción de fosfatasa alcalina para los diferentes recubrimientos, a) sobrenadantes y b) en los lisados celulares.....	96
Figura 46. PLA-PGA/HAp-3. (a), (b) 10X, (c) 40X.....	98
Figura 47. PLA-PGA/HAp-5. (a), (b) 10X, (c) 40X.....	98
Figura 48. PLA-PGA/HAp/Q(0%)Col(0.05%)-3. (a), (b) 10X, (c) 40X.....	98
Figura 49. PLA-PGA/HAp/Q(0%)Col(0.05%)-5. (a), (b) 10X, (c) 40X.....	99
Figura 50. PLA-PGA/HAp/Q(3%)Col(0.05%)-3. (a), (b) 10X, (c) 40X.....	99
Figura 51. PLA-PGA/HAp/Q(3%)Col(0.05%)-5. (a), (b) 10X, (c) 40X.....	99
Figura 52. PLA-PGA/HAp/Q(0%)Col(0.075%)-3. (a), (b) 10X, (c) 40X.....	100
Figura 53. PLA-PGA/HAp/Q(0%)Col(0.075%)-5. (a), (b) 10X, (c) 40X.....	100
Figura 54. PLA-PGA/HAp/Q(3%)Col(0.075%)-3. (a), (b) 10X, (c) 40X.....	100
Figura 55. PLA-PGA/HAp/Q(3%)Col(0.075%)-5. (a), (b) 10X, (c) 40X.....	100
Figura 56. SEM para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(0%)Col(0.05%) y una concentración celular de 15000 cel/mL. a) 1500X y b) 5000X.....	102
Figura 57. SEM para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)Col(0.05%) y una concentración celular de 15000 cel/mL. a) 1500X y b) 10000X.....	102
Figura 58. SEM para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)Col(0.075%) y una concentración celular de 15000 cel/mL. a) 1000X y b) 5000X.....	103
Figura 59. SEM para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)Col(0.05%) y una concentración celular de 30000 cel/mL. a) 1000X y b) 5000X.....	103
Figura 60. SEM para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)Col(0.075%) y una concentración celular de 30000 cel/mL. a) 350X y b) 1500X.....	103
Figura 61. a) Micrografía por AFM en 3D y 2D, realizada sobre la muestra con recubrimiento PLA-PGA/Hap/Q(0%)Col(0.075%), sin incubación celular y b) histograma para el cálculo de la rugosidad.....	104
Figura 62. a) Micrografía por AFM en 3D y 2D, realizada sobre la muestra con recubrimiento PLA-PGA/Hap/Q(3%)Col(0.075%), sin incubación celular y b) histograma para el cálculo de la rugosidad.....	105
Figura 63. Micrografía por AFM en 3D y 2D, realizada en dos zonas sobre la muestra con recubrimiento PLA-PGA/Hap/Q(0%)Col(0.05%), una concentración celular de 30000 cel/mL y un tiempo de incubación de 120 horas.....	105

Figura 64. Micrografía por AFM en 3D y 2D, realizada en dos zonas sobre la muestra con recubrimiento PLA-PGA/Hap/Q(3%)/Col(0.05%), una concentración celular de 30000 cel/mL y un tiempo de incubación de 120 horas. 106

Figura 65. Micrografía por AFM en 3D y 2D, realizada en dos zonas sobre la muestra con recubrimiento PLA-PGA/Hap/Q(0%)/Col(0.075%), una concentración celular de 30000 cel/mL y un tiempo de incubación de 120 horas. 106

Figura 66. Micrografía por AFM en 3D y 2D, realizada en dos zonas a) y b) sobre la muestra con recubrimiento PLA-PGA/Hap/Q(3%)/Col(0.05%), una concentración celular de 30000 cel/mL y un tiempo de incubación de 120 horas, c) perfil de medición. 106

Figura 67. Diagramas de pareto, a) para Ccel y b) Rextra. 108

Figura 68. Diagramas de interacción para las variables de respuesta Ccel y Rextra. 109

Figura 69. Diagrama de pareto para Rpa..... 110

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Biomateriales para regeneración ósea.....	27
Tabla 2. Efectos de la isquemia sobre las regiones de dispersión.	44
Tabla 3. Niveles de concentración de PLA – PGA, hidroxiapatita, colágeno tipo I, colágeno comercial y quitosano.	59
Tabla 4. Factores y niveles para ensayos de electrodeposición de la mezcla polimérica.	59
Tabla 5. Formulación PBS	60
Tabla 6. Diseño de experimentos 2 ² para ensayos electroquímicos con medio de cultivo.	64
Tabla 7. Diseño de experimentos 2 ³ para ensayos electroquímicos con medio de cultivo y células HOS.....	64
Tabla 8. Descripción ensayos para ALP y microscopía de epifluorescencia.	68
Tabla 9. Grupos funcionales del ácido poliláctico obtenido y referenciado.....	72
Tabla 10. Grupos Funcionales del ácido poliglicólico obtenido y referenciado.	72
Tabla 11. Grupos funcionales del PLA-PGA obtenido y PLGA referenciado.	74
Tabla 12. Fases de la hidroxiapatita sintetizada.....	77

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A: Diagramas de Bode y Nyquist.....	119
Anexo B: Parámetros circuitos equivalentes.....	122
Anexo C: Voltametría cíclica.....	124
Anexo D: Fosfatasa alcalina.....	127
Anexo E: Análisis estadístico.....	128

RESÚMEN

TÍTULO:

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DIELECTRICA DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS SOBRE MATERIAL POLIMÉRICO PLA-PGA MODIFICADO, BAJO POLARIZACIÓN AC Y DC*

AUTOR:

ING. NERLY DEYANIRA MONTAÑEZ SUPELANO**

Palabras Clave:

Poliláctico, Poliglicólico, Hidroxiapatita, Quitosano, Colágeno, Células osteoblásticas, Técnicas electroquímicas.

Descripción

En el presente trabajo de investigación se evaluó la interacción de un biomaterial polimérico electrodepositado sobre Ti6Al4V compuesto por ácido poliláctico-ácido poliglicólico-hidroxiapatita, modificado con quitosano y colágeno en presencia de medio de cultivo celular y medio de cultivo-células osteoblásticas, mediante técnicas electroquímicas que incluyen potencial de corrosión con respecto al tiempo, espectroscopía de impedancia electroquímica y voltametría cíclica. Los resultados de impedancia fueron analizados usando modelos de circuitos equivalentes que describieron eléctricamente las interfases presentadas en el sistema biológico. Con los datos de impedancia se calculó la permitividad relativa plasmada en un espectro dieléctrico que permitió identificar las dispersiones alfa y beta, relacionadas con el intercambio iónico y la polarización de la membrana celular. La adhesión y proliferación celular se analizaron mediante microscopía de epifluorescencia, en donde fue posible observar al tercer día del cultivo celular el proceso de mitosis representado por la condensación del núcleo y la separación de los cromosomas. Morfología de la superficie del biomaterial se observó mediante SEM y AFM, adicionalmente se evaluó la actividad celular mediante la medición de fosfatasa alcalina. Finalmente se encontró la mejor superficie para la adhesión y crecimiento celular mediante análisis estadístico, que correspondió al recubrimiento con la mayor concentración de quitosano y colágeno.

* Trabajo de Grado.

** Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencias de los Materiales. Posgrado en Ingeniería de Materiales.

Director: Ph.D. Darío Yesid Peña Ballesteros.

ABSTRACT

TITLE:

ASSESSMENT OF DIELECTRIC RESPONSE OF BIOLOGICAL MEMBRANES ON POLYMERIC MATERIAL PLA-PGA MODIFIED, UNDER AC AND DC POLARIZATION*

AUTHOR:

ENG. NERLY DEYANIRA MONTAÑEZ SUPELANO**

Key Words:

Polylactic Polyglycolic, Hydroxyapatite, Chitosan, Collagen, Osteoblastic cells, Electrochemical techniques.

Description

In the present research it was evaluated the interaction of a polymeric biomaterial electrodeposited on Ti6Al4V compound of polylactic acid-polyglycolic acid-hydroxyapatite, modified with chitosan and collagen in the presence of cell culture medium and medium-osteoblastic cells, using electrochemical techniques including corrosion potential with time, electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry. The impedance results were analyzed using equivalent circuit models described electrically interfaces presented in the biological system. With the impedance data was calculated the relative permittivity reflected in a dielectric spectrum that identified the alpha and beta dispersions related to the cell membrane. Adhesion and cell proliferation was analyzed by fluorescence microscopy, where it was possible to observe the third day of cell culture the process of mitosis represented by the condensation of the nucleus and chromosome separation. Morphology of the biomaterial surface was observed by SEM and AFM, further cell activity was assessed by measuring alkaline phosphatase. Finally it was the best surface for adhesion and cell growth through statistical analysis, corresponding to coating with the highest concentration of chitosan and collagen.

* Thesis

** Engineering Physicochemical Faculty. School of Metallurgical Engineering and Materials Science. Materials Engineering Graduate.
Tutor: Ph.D. Darío Yesid Peña Ballesteros.

ESPECIFICACIONES DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	
Título	EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DIELECTRICA DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS SOBRE MATERIAL POLIMÉRICO PLA – PGA MODIFICADO, BAJO POLARIZACIÓN AC Y DC
Autor	Ing. NERLY DEYANIRA MONTAÑEZ SUPELANO
Director	Ph.D. DARÍO YESID PEÑA BALLESTEROS
Facultad	INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
Escuela	INGENIERÍA METALÚRGICA
Entidades Interesadas	COLCIENCIAS UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER GRUPO DE INVESTIGACIONES EN CORROSIÓN (GIC) QUIRÚRGICOS ESPECIALIZADOS S.A.
Modalidad	INVESTIGACIÓN MAESTRÍA
<p>PROYECTO ENMARCADO EN EL PROYECTO COLCIENCIAS “DESARROLLO DE SOPORTES Y PELÍCULAS DE PLGA/BIOCERÁMICO SOBRE Ti6Al4V PARA REGENERACIÓN ÓSEA COMO PRODUCTOS DE INNOVACIÓN TECNOLÓGICA DE LA EMPRESA QUIRÚRGICOS ESPECIALIZADOS S.A.” Responsable del proyecto en la entidad ejecutora: M.Sc. CUSTODIO VÁSQUEZ QUINTERO</p>	

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de materiales biocompatibles que pueden ser usados en dispositivos médicos para la reparación de defectos y enfermedades óseas ha aumentado recientemente. Estos materiales deben ser apropiados para que funcionen como soporte de las células regeneradoras de hueso para que puedan proliferar y diferenciarse.

El estudio de propiedades eléctricas en el tejido óseo nació con el descubrimiento del efecto piezoeléctrico en su estructura y de las implicaciones de dicho fenómeno en el proceso de consolidación y tratamiento de patologías óseas [1]. Algunos materiales biológicos como el colágeno y biopolímeros exhiben una orientación polar uniaxial de los dipolos en su estructura molecular y pueden ser considerados como bioeléctricos. El colágeno comprende el 90% de la matriz ósea y junto con la hidroxiapatita (HA), gobierna las propiedades biomecánicas y la integridad de este tejido.

La caracterización de la interfase creada entre la superficie del implante y las células llevan a entender los complejos procesos implicados en los mecanismos de interacción para desarrollar superficies que faciliten la incorporación del dispositivo médico. Esta caracterización de la interacción entre células y biomaterial se realiza generalmente mediante medios ópticos y microscópicos, o eliminando el biomaterial implantado en un animal. Estudios electroquímicos son menos frecuentes y todavía escasos en la literatura para medios con células vivas.

En este trabajo buscó modificar el biopolímero PLA – PGA con materiales como colágeno, hidroxiapatita y quitosano, para mejorar la respuesta inmune de células osteoblásticas y estudiar la interacción polímero – material biológico desde el punto de vista de la respuesta electroquímica de la superficie como consecuencia de la adsorción de proteínas, adhesión y crecimiento celular.

La presente investigación usó técnicas electroquímicas como potencial de corrosión, espectroscopía de impedancia electroquímica y voltametría cíclica para caracterizar las propiedades eléctricas de la interacción medio de cultivo y células de tipo osteoblástico sobre material polimérico PLA - PGA modificado con hidroxiapatita, quitosano y colágeno, en un amplio rango de frecuencia, mediante un espectro dieléctrico. Se modeló el barrido de frecuencias en un circuito de impedancia electroquímica, en el cual fue posible interpretar los fenómenos eléctricos ocurridos en la interfase PLA - PGA modificado – proteínas de adsorción – células osteoblásticas. Adicionalmente técnicas microscópicas sirvieron para identificar la presencia de las células, la proliferación y morfología en las superficies de estudio.

Este trabajo de investigación se realizó bajo el marco del proyecto financiado por Colciencias titulado: Desarrollo de soportes y películas de PLGA/biocerámico sobre Ti6Al4V para regeneración ósea como productos de innovación tecnológica de la empresa Quirúrgicos Especializados S.A.

1

DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La obtención de biomateriales que facilitan la osteointegración es uno de los objetivos claves en el desarrollo de la nueva generación de implantes ortopédicos y dentales. Más de cincuenta millones de personas en todo el mundo tienen implantado algún tipo de prótesis y es un hecho bien conocido en nuestra sociedad la utilidad y necesidad de todo tipo de implantes, así como el conocimiento de las complicaciones que pueden generar una vez implantados, con el fin de mejorar la respuesta biológica.

El complejo sistema fisiológico humano está constituido por sustancias de muy diferente naturaleza, como agua, lípidos, electrolitos, proteínas, enzimas, etc. El compuesto polimérico natural más común dentro del cuerpo humano es el Colágeno, otras proteínas incluyen elastina, queratina, reticulita, miosina y actina. En contraste con las proteínas estructurales, existe una gran cantidad de proteínas globulares o enzimas, que no tienen función mecánica, pero que actúan como biocatalizadores para mantener el proceso metabólico y con ello las funciones vitales. Ambos grupos de proteínas están constituidas por aminoácidos que forman la secuencia polimérica bajo el estricto control de los ácidos nucleicos DNA y RNA, dando lugar a macromoléculas con una función específica. Gracias a esta compleja organización el organismo humano tiene capacidad para identificar, rechazar o admitir cualquier cuerpo extraño (implante) introducido en él.

Es bien conocido que en el uso de biomateriales va asociado un cierto riesgo de infecciones. Para combatir y prevenir estas infecciones el sistema sanitario realiza una serie de protocolos y tratamientos que tienen un costo no despreciable en sus

presupuestos. Es por ello que los fabricantes de materiales quirúrgicos están implicados en la obtención de materiales cada vez más aptos para fabricar dispositivos biomédicos con características adecuadas y adaptación al ambiente biológico al que van a ser expuestos. El comportamiento de los biomateriales a nivel superficial, en contacto con el medio fisiológico puede desencadenar reacciones específicas que se sustentan en la aceptación del material por el organismo [2], materiales con un bajo riesgo de infección que los fabricantes denominan “biomateriales antiinfecciosos o antimicrobianos”, o por el contrario, en el rechazo del mismo con la correspondiente reacción a cuerpo extraño, debido principalmente a que al introducir un implante en el seno de un tejido, se produce la separación física de los perfiles en contacto con la prótesis, disminuyendo al menos a la mitad las vías de alimentación y oxigenación celular de la interfase tejido implante.

El análisis de las interacciones tejido biológico-implante se estudia usualmente por medio de la adhesión de células al material, métodos como el conteo de células, métodos microscópicos como microscopia electrónica de barrido y métodos microgravimétricos son frecuentemente usados. Algunos otros métodos se han estudiado solo en tejidos biológicos como las medidas de impedancia eléctrica, el cual puede determinar en general el estado de los tejidos y las células que lo constituyen. Sin embargo, este método no ha sido ampliamente estudiado en la interacción material-célula, específicamente en materiales poliméricos modificados, lo cual, fue el objetivo de la presente investigación.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Se han desarrollado varios materiales con el propósito de mejorar la respuesta biológica de la interacción implante-tejido biológico. Los polímeros no únicamente reemplazaron a otros materiales en aplicaciones médicas, sino que abrieron el campo a otras nuevas aplicaciones antes difícilmente asequibles.

El PLGA (ácido poliláctico - poliglicólico) es un biopolímero ampliamente usado en la fabricación de materiales quirúrgicos por sus buenas propiedades de biodegradación y biocompatibilidad, sin embargo, pese a su extenso uso, el PLGA presenta ciertos inconvenientes a la hora de encapsular y almacenar proteínas, péptidos y otros principios activos. La base de estos inconvenientes está relacionada con el mecanismo de degradación del polímero, lo que conlleva a reacciones no favorables en el tejido circundante al implante y por consiguiente a la no adaptación del ambiente biológico. Es por ello que se buscó modificar superficialmente este tipo de materiales con polímeros de origen natural como colágeno y quitosano y con hidroxiapatita con el fin de modular la interacción del biomaterial con entidades biológicas y disminuir una respuesta inmunológica en el organismo.

Uno de los objetivos principales de las investigaciones biofísicoquímicas es entender los procesos fundamentales de las células biológicas. El funcionamiento de las células está íntimamente relacionado con los procesos electroquímicos que suceden en y a través de sus membranas. Además, el análisis de los fenómenos que aparecen a nivel de interfase entre las prótesis y los tejidos biológicos es de vital importancia para predecir el grado de biocompatibilidad de un biomaterial, especialmente los materiales poliméricos modificados, debido a la amplia aplicación de estos materiales en el campo biomédico.

Se han caracterizado tejidos y células biológicas por medio de la respuesta a un estímulo eléctrico externo. Existen varios modelos que representan los principales mecanismos que determinan la impedancia y el comportamiento eléctrico en una suspensión celular. Sin embargo no se han elaborado prolijamente caracterizaciones eléctricas de células (osteoblastos) en contacto con un biopolímero modificado con hidroxiapatita, quitosano y colágeno. En este sentido la investigación hace un aporte importante en el estudio de la biocompatibilidad de materiales quirúrgicos por medio de propiedades eléctricas de la interacción

material-célula, que permite ampliar el campo de estudio de los biomateriales y sus interacciones con tejido biológico.

El estudio de la interfaz creada entre la superficie de los implantes y las células dará lugar a la comprensión de los complejos procesos implicados en los mecanismos de interacción y al desarrollo de superficies y materiales que faciliten la incorporación exitosa de un dispositivo en el tejido circundante. Una manera de entender los diferentes procesos que ocurren en la interfaz superficie del implante y células es el estudio de la respuesta electroquímica en el material polimérico como consecuencia de la adsorción de proteínas, el crecimiento y proliferación celular en la superficie del implante.

1.3 HIPÓTESIS PLANTEADA

El cultivo de osteoblastos sobre el biopolímero tipo PLA – PGA modificado presenta un comportamiento capacitivo alto a frecuencias relativamente altas, que favorece la actividad de osteoblastos, y por lo tanto la biocompatibilidad del material polimérico, debido principalmente a la presencia de quitosano en la matriz polimérica de PLA – PGA.

2 **OBJETIVOS**

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la respuesta dieléctrica de células de tipo osteoblástico sobre materiales poliméricos PLA – PGA modificados, bajo polarización AC y DC, por medio de técnicas electroquímicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar el comportamiento capacitivo y resistivo del sistema biológico, por medio de la técnica Espectroscopía de Impedancia Eléctrica (EIE), mediante un espectro dieléctrico, identificando las dispersiones que se presentan en dicho sistema.
- Caracterizar dieléctricamente el sistema material polimérico PLA–PGA modificado con hidroxiapatita, quitosano y colágeno - células osteoblásticas por medio de un modelo de circuito de impedancia electroquímica.
- Evaluar la actividad celular por medición de fosfatasa alcalina (ALP) a varios tiempos de cultivo y determinar el estado superficial del material polimérico PLA–PGA modificado, por medio de SEM y AFM.

3

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1 BIOMATERIALES Y BIOCAMPATIBILIDAD

Un biomaterial es un material no vivo utilizado en un aparato médico y concebido para interactuar con sistemas biológicos. Este biomaterial deberá satisfacer las diferentes propiedades requeridas para su buen comportamiento a corto y largo plazo, tales como la biocompatibilidad, la resistencia mecánica, la resistencia a la degradación, la disponibilidad [3]. La respuesta que el biomaterial causa en el tejido, dando por supuesta su biocompatibilidad, puede tener diferente carácter. Se puede definir un material *bioinerte* como un material que no es tóxico y que no es biológicamente activo; mientras que un material *bioactivo* es un material que no es tóxico y es biológicamente activo. El material bioactivo causa reacciones tisulares favorables, lo que lleva al establecimiento de enlaces químicos directos con los tejidos circundantes.

Las interacciones entre el implante o biomaterial y el medio fisiológico determinan el período de tiempo necesario para su reconocimiento y la intensidad de la reacción del organismo para rechazar o asimilarle, hasta restablecer el equilibrio interno. Existen varios tipos de sustancias utilizadas como biomateriales para regeneración ósea, dentro de las más importantes se encuentran algunos metales y aleaciones, cerámicas, vidrios biológicos, polímeros naturales y sintéticos, los cuales se muestra su aplicación en la Tabla 1 [4].

Tabla 1. Biomateriales para regeneración ósea.

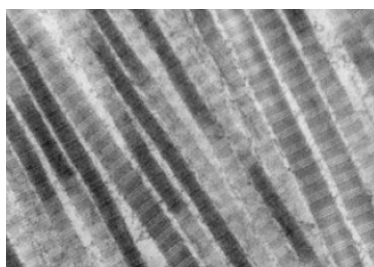
Materiales	Aplicaciones
Polímeros	Liberación de fármacos, ingeniería de tejidos
Metales	Placas de osteosíntesis, clavos y tornillos, implantes dentales
Cerámicas y Biovidrios	Relleno de cavidades y defectos óseos, prótesis de cadera.

3.2 MATERIALES POLIMÉRICOS DE ORIGEN NATURAL Y SINTÉTICO

3.2.1 Colágeno

El colágeno es un polímero natural usado como biomaterial en diversas aplicaciones biomédicas. Es una proteína fibrosa que forma el tejido conectivo, abundante en la naturaleza, ya que por ejemplo, constituye una cuarta parte de las proteínas totales en los mamíferos. En la Figura 1 [5] se muestra una micrografía electrónica de fibrillas de colágeno.

Figura 1. Micrografía electrónica de fibrillas de colágeno.



Existen varios tipos de colágeno, siendo el más abundante el denominado tipo I. Éste está constituido por tres cadenas polipeptídicas unidas entre sí por puentes de hidrógeno que se establecen entre los grupos amino y carboxilo de las unidades de glicina que suelen constituir un tercio de la composición [5].

3.2.2 Quitosano

El quitosano es un polisacárido catiónico de origen natural, extraído por procesos químicos del caparazón de crustáceos. La velocidad de biodegradación de este polímero viene determinada por el contenido residual de acetilo, que es un parámetro fácilmente controlable. El quitosano tiene grupos reactivos amina e hidroxilo, que ofrecen posibilidades de modificación, reacciones de injerto e interacciones iónicas. Las prótesis cubiertas con estos polisacáridos son capaces de promover la colonización por células, ya que promueven la osteogénesis y la oseointegración.

Propiedades como la biocompatibilidad, la actividad antibacteriana, la posibilidad de uniones de factores de crecimiento y la posibilidad de procesado de diferentes formas hace que el quitosano tenga una amplia gama de posibles aplicaciones tanto en ingeniería de tejidos como en implantes ortopédicos [6].

3.2.3 Hidroxiapatita

La hidroxiapatita está formada por fosfato de calcio cristalino ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) y representa un depósito del 99% del calcio corporal y 80% del fósforo total. El uso de implantes cubiertos de hidroxiapatita o fosfato tricálcico ha sido ampliamente descrito para demostrar que existe un anclaje precoz entre la superficie de éstos y la del hueso, aproximadamente en un mes tras la inserción. También evidencian que la anatomía del tejido blando alrededor del implante es normal y que hay ausencia de inflamación.

La hidroxiapatita, obtenida de fuentes naturales o bien de fuentes sintéticas, se considera una sustancia bioactiva, ya que forma fuertes enlaces químicos con el tejido óseo huésped, y por ello, se la reconoce como un buen material para implantes óseos. La HAp es osteoconductiva, no tóxica, no inmunogénica, y su estructura y composición química son similares a la fase mineral del hueso humano. Sin embargo, las características sobresalientes de la HAp en términos de biocompatibilidad y bioactividad se ven gravemente obstaculizadas por sus propiedades mecánicas pobres, que impiden su uso en aplicaciones de carga elevada, asociadas tradicionalmente con implantes ortopédicos [7,8,9].

3.2.4 Ácido Poliláctico (PLA)

Es un polímero semicristalino, termoplástico y biodegradable basado en ácido láctico que como biomaterial ha demostrado su capacidad de permitir el crecimiento controlado del tejido biológico durante su biodegradación. Debido a que el ácido láctico es un intermediario común en el metabolismo de los

carbohidratos en nuestro organismo, el uso de este hidroxácido es generalmente visto como la situación ideal desde el punto de vista toxicológico.

El PLA puede hidrolizarse fácilmente a ácido láctico, mediante un proceso de degradación hidrolítica. Los poliésteres alfa, como el PLA, se degradan inicialmente por hidrólisis y su degradación puede ser acelerada in vivo por la presencia de enzimas, lo cual conlleva a la liberación de sus respectivos monómeros (ácido láctico en este caso). Estos monómeros son incorporados dentro de los procesos fisiológicos a nivel celular, donde continúa su degradación y da inicio a la ruta metabólica [4].

El punto de fusión del ácido poliláctico es de aproximadamente 180°C. Si el polímero consiste solo en el isómero L, se conoce como ácido poli (L-láctico), PLLA, que se usa comúnmente en los implantes ortopédicos y es un polímero semicristalino (grado de cristalinidad del 37%), debido principalmente a su estereoregularidad. El PLA es actualmente utilizado en aplicaciones que no requieran altas prestaciones mecánicas como clavos para la unión de ligamentos y reparación de meniscos, suturas, tornillos y clavos para la fijación de fracturas, liberación de fármacos y stents para cirugía cardiovascular [10].

3.2.5 Ácido Poliglicólico (PGA)

El ácido poliglicólico o poliglicolida es un poliéster lineal biodegradable, alifático, hidrofílico y de cristalinidad elevada (46-52%). Debido a su elevada cristalinidad es insoluble en la mayoría de solventes orgánicos. Se caracteriza por un punto de fusión elevado y una temperatura de transición vítrea relativamente baja. El ácido poliglicólico es de gran interés por su amplia gama de aplicaciones en el campo de la medicina, se utiliza principalmente como material de implantes o suturas biodegradables, como dispositivo de fijación ósea en forma de varillas, placas o tornillos, como implante para sustituir fragmentos óseos o como sistema de liberación de medicamentos.

La propiedad que hace más interesante la aplicación del PGA como polímero degradable es que su producto de degradación, el ácido glicólico, es un metabolito natural. El PGA es absorbido a los pocos meses de la implantación debido a su susceptibilidad a la hidrólisis [5].

3.2.6. Ácido Poli-láctico-co-glicólico (PLGA)

El PLGA es un polímero biodegradable y biocompatible ampliamente utilizado en la preparación de micro/nanopartículas transportadoras de diferentes principios activos tales como proteínas, péptidos o material genético entre otros. Actualmente existen diferentes formulaciones de PLGA que han sido aprobadas por la US Food and Drug Administration (US FDA). Sin embargo, el PLGA presenta ciertos inconvenientes debido al mecanismo de degradación del polímero. Al tratarse de un poliéster su degradación se debe a la hidrólisis de los enlaces éster, lo que genera un microclima ácido [11,12,13].

3.3 TEJIDO ÓSEO

El hueso está compuesto por dos estructuras arquitectónicas básicas que son hueso compacto o cortical y hueso trabecular o esponjoso.

El hueso cortical es denso, mientras que el hueso trabecular aparece como un entramado de fibras y láminas, descritas generalmente como trabeculas, separadas por espacios intercomunicados. En los humanos, aproximadamente el 80% de la masa esquelética está constituida por hueso cortical, que constituye las paredes del eje o diáfisis de los huesos largos. No obstante, dada su tridimensionalidad, el hueso trabecular supone el 60% de la superficie total.

La formación ósea resulta de una compleja cascada de eventos que incluyen proliferación de células mesenquimales primitivas, su posterior diferenciación a células precursoras osteoblásticas (osteoprogenitoras o preosteoblastos), maduración de osteoblastos, formación de matriz y finalmente mineralización. Los

osteoblastos son las células responsables de la síntesis y secreción de matriz ósea, o componente orgánico de la matriz extracelular del nuevo hueso, también conocida como osteoide. No obstante la familia osteoblástica también incluye el osteocito y la célula lining ósea, también llamada osteocito de superficie, osteoblasto inactivo, célula linear endóstica y célula mesenquimal plana. Esta línea celular probablemente puede diferenciarse a osteoblastos activos, por lo que algunos autores los consideran osteoblastos en reposo. Cuando no se requiere más síntesis de matriz ósea, al final de la secuencia de remodelación, los osteoblastos pierden su capacidad sintética y quedan como osteoblastos inactivos, células de la línea de formación ósea o bien resultan atrapados en el frente de calcificación, incluyéndose en el hueso como osteocitos, encargados de mantener la integridad estructural de la matriz mineralizada.

La matriz extracelular está formada por un 90% por colágeno, principalmente tipo I, y en un 10% por proteínas no colagénicas (NCPs). Los cristales de hidroxapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, constituyen la parte mineral del tejido óseo. Se ha sugerido que la mineralización es iniciada por la formación de cristales en vesículas que se forman en la matriz extracelular, a raíz de la desintegración de osteoblastos [3].

3.4 CÉLULAS Y MEMBRANAS BIOLÓGICAS

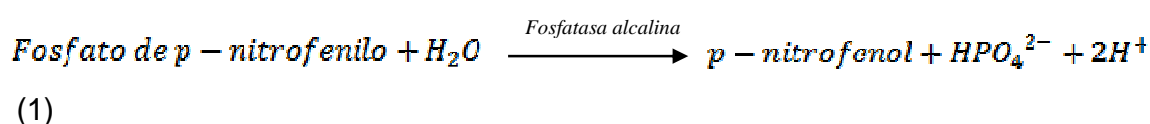
Un tejido vivo puede modelarse como la agrupación de células, que se encuentran en un medio iónico denominado medio extracelular. En el interior de la célula, medio intracelular, existe también una concentración de fluidos e iones, y es donde se realizan los procesos metabólicos del cuerpo. La división entre ambos medios es la membrana celular, la cual funciona como una barrera permeable selectiva. Esta protege el interior de la célula y permite el paso selectivo de iones. La membrana celular mantiene la presión osmótica y el gradiente de concentración iónico entre los medios intracelular y extracelular. Este gradiente crea una diferencia de potencial a través de la membrana, el cual es esencial para

que la célula viva. Las alteraciones más comunes entre los medios son las variaciones en el volumen de uno de ellos, por aumento o disminución de fluido, o de la concentración de iones disueltos en él. El daño de la membrana celular, y de sus funciones, mata la célula. Las características eléctricas de los tejidos y sus dispersiones están determinadas por tres efectos. El primero es por las características eléctricas de las células o su integridad y normalidad. El segundo es por variación de los volúmenes extra e intracelulares y el tercero es por los efectos de la bicapa celular que conforma los tejidos biológicos [14].

Identificación bioquímica y morfológica de células

Identificación bioquímica: Los estudios sobre células de aspecto osteoblástico han demostrado una serie de propiedades asociadas al fenotipo de estas células, como la secreción de osteocalcina, síntesis de colágeno tipo I, actividad de la fosfatasa alcalina y producción de matriz mineralizada, entre otros [15].

La fosfatasa alcalina (ALP), es un marcador de diferenciación temprana del hueso y es utilizada para evaluar la actividad celular de los osteoblastos. Ésta es una enzima que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos. Indica la formación de hueso o el inicio de la etapa de diferenciación [4]. Si la fosfatasa alcalina disminuye, puede ser un indicador de muerte celular [16]. La fosfatasa alcalina hidroliza el p-nitrophenyl phosphate disodium salt (p-NPP) o fosfato de p-nitrofenilo para formar el cromógeno amarillo p-nitrofenol de acuerdo con la siguiente ecuación.



En donde el incremento en la absorbancia de la mezcla de reacción a 450 nm debido a la formación del p-nitrofenol, es proporcional a la actividad de la fosfatasa alcalina.

Un gran porcentaje de fosfatasa alcalina se encuentra alojada en la membrana celular, por lo que en muchos casos se realiza el lisado celular (rotura de la membrana celular) para la determinación de fosfatasa alcalina.

Identificación morfológica: Los estudios morfológicos de células abarcan las microscopías ópticas y microscopías electrónicas.

La microscopía de epifluorescencia es una de las derivaciones de la microscopía óptica en donde una sustancia natural en las células o un colorante fluorescente aplicado es estimulado por un haz de luz, emitiendo parte de la energía absorbida como rayos luminosos. Uno de los métodos de marcado celular más usados es el marcaje nuclear con reactivo de Hoechst, que permite la visualización directa de los núcleos celulares con el microscopio de fluorescencia. Este reactivo penetra en el núcleo de una célula y se une a la adenina y la timina del ADN y el ARN, haciendo ver el núcleo celular con un color azul.

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es una técnica de microscopía electrónica que crea una imagen tridimensional ampliada de la superficie de un objeto. Permite incorporar sistemas de detección de energía dispersiva de rayos X y electrones lo cual es útil para la detección cualitativa y cuantitativa de distintos elementos químicos. Hay que mencionar que debido a que el SEM no ha sido ampliamente utilizado como técnica para la observación de tejidos, existe una carencia de protocolos para la fijación de las células, lo cual es de gran importancia.

3.5 PROPIEDADES ELÉCTRICAS DE LOS MATERIALES BIOLÓGICOS

3.5.1 Antecedentes

Extraer información de los sistemas biológicos con base en su respuesta a un estímulo eléctrico externo es el objetivo de los diversos métodos de

caracterización de tejidos y células biológicas desde hace casi una centuria. Entre los años 1910 y 1913, el médico alemán Höber, muy interesado en la fisiología de la membrana celular, llevó a cabo experimentos dieléctricos con eritrocitos (glóbulos rojos o hematíes) con el fin de estudiar sus propiedades eléctricas (1912). Pudo observar que a una frecuencia de 1kHz una suspensión de eritrocitos presentaba una resistividad de $1200 \Omega \text{ m}$, y que aumentando la frecuencia a 10 MHz, la resistividad disminuía hasta $200 \Omega \text{ m}$. Advirtió también que la resistividad que presentaban células hemolizadas rotas a bajas frecuencias era muy similar a la medida a altas frecuencias en las células íntegras. Llegó así a la conclusión de que en altas frecuencias no hay diferencia entre células íntegras y células destruidas, dado que en el primer caso se mide la resistividad de la solución interna y en el segundo la de la solución externa, siendo ambas electrolitos concentrados. De este modo se empezó a considerar que, eléctricamente, las células estaban caracterizadas por un citoplasma de baja resistividad, rodeado por una membrana muy poco conductora. Asimismo, se introdujeron los conceptos de capacidad específica de la membrana y la variación de su impedancia con la frecuencia de la señal eléctrica [17].

En 1921 Phillipson, estableció el circuito eléctrico equivalente para biomembranas, interpretó los resultados con el circuito de resistencia y capacidad en paralelo representando la membrana a la que añadió una resistencia en serie representando el citoplasma. En 1925 Rogers y Cole confirman las propiedades capacitivas de la membrana observadas por Höber en los eritrocitos, pero estudiando los huevecillos del erizo de mar *Arbacia punctulata*. Posteriormente Fricke (1933) aplicó el tratamiento teórico de Maxwell al cálculo de la capacitancia específica de la membrana, obteniendo un valor de $0.81 \mu\text{F}/\text{cm}^2$.

Cole hasta 1972 hizo grandes avances a la medida e interpretación del espectro dieléctrico en general, así como al de las suspensiones celulares y de tejidos. Fundamentó completamente el circuito equivalente usado para la interpretación de

las mediciones eléctricas en las membranas de muchas células. De esta forma se empezó a indagar más en las propiedades eléctricas de materiales biológicos.

3.5.2 Permitividad y conductividad eléctrica

La respuesta de toda materia a un campo electromagnético viene descrita por las ecuaciones de Maxwell. Según éstas, dicha respuesta depende de los parámetros eléctricos pasivos de la materia: la conductividad eléctrica σ , la permitividad eléctrica ϵ , y la permeabilidad magnética μ . La mayor parte de la materia biológica tiene una permeabilidad magnética similar a la del vacío, μ_0 , por lo que el análisis de su respuesta dieléctrica se centra en la conductividad y en la permitividad relativa a la del vacío. Estos parámetros constitutivos de la materia proporcionan, por un lado, su capacidad para permitir el movimiento de los portadores de carga en su seno y, por otro, una medida de su polarizabilidad.

Respecto a los materiales neutros, heterogéneos y dispersivos, características de la materia biológica, sus propiedades eléctricas, por propia definición, presentan una dependencia con la frecuencia del campo eléctrico.

Un análisis del comportamiento de un material neutro bajo el campo puede llevarse a cabo mediante un espectro dieléctrico, a través del cual se mide su permitividad compleja en un rango determinado de frecuencias. La permitividad compleja engloba los parámetros constitutivos permitividad y conductividad, por lo que un análisis del espectro junto con un correcto modelo de interpretación proporcionará valiosa información sobre la estructura y, en su caso, sobre las propiedades funcionales de la materia. La permitividad compleja $\tilde{\epsilon}$ está definida como:

$$\tilde{\epsilon}(\omega) = \epsilon - j \frac{\sigma}{\omega} \quad (2)$$

Donde ω es la frecuencia angular y $j = \sqrt{-1}$. Para la mayor parte de las sustancias, la permitividad y la conductividad son constantes solo en un rango

determinado de la frecuencia. La tendencia general es una caída escalonada de la permitividad al tiempo que la conductividad aumenta al recorrer en sentido creciente las frecuencias del espectro, característica de fenómenos dispersivos.

Cuando un campo eléctrico alterno débil se aplica a una suspensión coloidal, ocurre una serie de fenómenos: polarización, conducción iónica, formación de densidades de carga eléctrica cercanas a las interfases, cambios de la concentración electrolítica cerca de las interfases cargadas, flujo del fluido próximo a dichas interfases, movimiento de partículas cargadas. Todos estos fenómenos están relacionados con las propiedades dieléctricas de la suspensión.

Los espectros de permitividad y de conductividad están caracterizados por cuatro dispersiones principales:

- Relajación γ : frecuencias superiores al GHz, que está asociada con la relajación dipolar del agua (se origina por la alineación de dipolos permanentes e inducidos con respecto a un campo eléctrico) [17,19].
- Relajación δ o de alta frecuencia: (1 MHz a >100 MHz), relacionada con la relajación de Maxwell-Wagner, que está caracterizada por una pequeña amplitud (unas pocas unidades dieléctricas) y una frecuencia característica que depende sobre todo de la conductividad de la solución electrolítica, creciendo con ella. En esta región los cambios se asocian al contenido de agua, electrolitos y proteínas de los tejidos [17,19].
- Relajación β , en el orden del MHz, relacionada con el proceso de carga de las membranas presentes en el sistema. En esta región los cambios se relacionan principalmente con la polarización de la membrana celular, la cual actúa como barrera al flujo de iones entre los medio intra y extra celulares. Además, se produce una polarización de proteínas y macromoléculas orgánicas [17,19].

- Relajación α o de polarización de contraiones: baja frecuencia (10 Hz a unos pocos KHz), la que puede llegar a tener amplitudes extremadamente grandes: miles de unidades dieléctricas. Su frecuencia característica depende sobre todo del tamaño de las partículas decreciendo para partículas grandes. En esta región los cambios de impedancia son pequeños y se deben principalmente a procesos de difusión iónica a un lado de la membrana celular [17, 19].

Las distintas relajaciones o dispersiones se asocian con el paso de la corriente por las diferentes regiones que constituyen el tejido y las distintas frecuencias. Para frecuencias bajas se sugiere que el movimiento de cargas tiene lugar en la parte externa de la célula (líquido extracelular). El origen de la relajación α , la cual se ubica en frecuencias inferiores a 100 Hz, no está claramente definido. Teóricamente se asocia con la formación de una doble capa iónica alrededor de las células o con la formación de canales de comunicación entre las mismas [19].

A medida que la frecuencia aumenta se va venciendo la reactancia de la membrana (relajación β), lo que evidencia su carácter capacitivo, hasta alcanzar un estado en el cual el movimiento de cargas que ocurre en el líquido intracelular contribuye a la conducción, produciendo un aumento de la conductividad. Se observan las dispersiones de origen estructural, principalmente por la polarización en la interfase membrana-electrolito, o debidas a la dependencia frecuencial de la orientación de dipolos moleculares, llamadas entonces dispersiones Debye. Esto ocurre en la banda comprendida entre 1 KHz y aproximadamente 100 MHz. Alrededor de 10 GHz, aparece la relajación γ que en general se asocia con fenómenos de relajación dipolar de las moléculas de agua [20].

Las Figuras 2 [18] y 3 [20, 21] muestran la conducta general en función de la frecuencia tanto de la conductividad como de la permitividad eléctrica para tejido biológico.

Figura 2. Espectro Ideal de las propiedades dieléctricas de suspensiones celulares y tejidos en términos de la parte real ϵ_f' permitividad relativa y la parte imaginaria ϵ_f'' perdida dieléctrica de la permitividad compleja relativa.

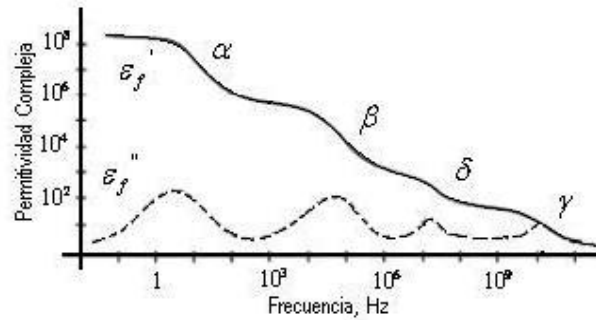
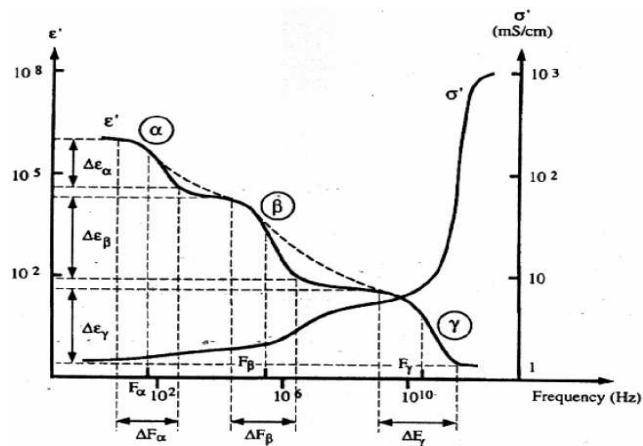


Figura 3. Conductividad σ y permitividad ϵ' en función de la frecuencia.



La respuesta dieléctrica se puede modelar a través de la conductividad σ y permitividad ϵ' . La dependencia funcional de cada una de estas magnitudes es de gran interés en el estudio y caracterización de los diferentes tejidos, dando información útil para aplicaciones médicas.

3.5.3 Propiedades eléctricas de las células

Se describen las diferentes estructuras celulares implicadas en el comportamiento celular frente a un campo eléctrico.

- Superficie Celular: La superficie más externa es el límite entre la célula y su entorno. La composición de dicho entorno es más o menos compleja dependiendo de la célula. En la capa superficial de prácticamente todas las células se encuentran grupos de carga negativa –como carboxilos o fosfatos–, los iones positivos del medio son atraídos a la superficie creando una doble capa iónica. La formación de esta doble capa explica el alto valor de la permitividad observado en bajas frecuencias, y los efectos dispersivos que en ella se producen se encuentran en el rango de la dispersión α .
- Pared Celular: Característica de las células vegetales y de algunos microorganismos. Consiste en largas cadenas de polisacáridos, aminoácidos y otros polímeros. Los grupos cargados de la pared hacen que ésta actúe como intercambiador iónico, por lo que sus propiedades eléctricas cambiarán en función de la concentración iónica del medio circundante.
- Membrana Celular: Membrana plasmática, componente principal de las células, consiste en una bicapa lipídica de entre 4 y 10 nm de espesor en la que se disponen diversas proteínas que, formando canales transmembrana, regulan el transporte de nutrientes entre el exterior y el interior celular. En condiciones normales, la membrana presenta baja permeabilidad iónica, por lo que es considerada como una capa de baja conductividad, permitiendo a la célula mantener una diferencia de potencial con el medio externo. Esta diferencia de potencial es lo que se conoce por potencial transmembrana (TMP), cuyo valor oscila entre 10 y 100 mV, y que mantiene el interior celular negativo respecto al exterior. El TMP juega un importante papel energético y de transporte en la actividad metabólica celular, y por tanto revela el buen estado fisiológico de la célula. La bicapa lipídica por su comportamiento y estructura es comparada con el espacio entre dos placas de un condensador.

El efecto de dispersión β que aparece en el rango de radiofrecuencias se ha atribuido al fenómeno de relajación que se da en las interfases entre los medios conductores intra y extracelular, y la membrana aislante.

- Citoplasma: Solución salina del interior de la célula altamente conductora con una gran concentración de material orgánico (proteínas, moléculas de agua libres o ligadas a proteínas, ácidos nucleicos etc). Las dispersiones en el citoplasma sólo pueden ocurrir una vez que la barrera membranosa ha sido superada por el campo eléctrico, por lo que se sitúa en el rango de altas frecuencias. Especialmente significativas a frecuencias mayores de 20 MHz son las dispersiones provocadas por la rotación de las moléculas de agua, tanto las ligadas a proteínas, como las que no lo están [17, 20, 21].

3.5.4 Modelos matemáticos de circuitos en tejido biológico

Las propiedades eléctricas de los circuitos eléctricos difieren de las propiedades eléctricas de tejidos biológicos, sin embargo, los modelos de circuitos pueden usarse para describir las propiedades eléctricas de los tejidos biológicos. Una de las formas de describir las propiedades eléctricas de un tejido biológico es a través de la impedancia compleja (Z), la cual se describe mediante la ecuación 3:

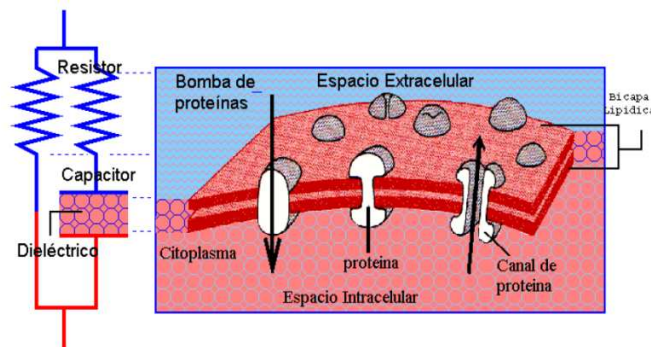
$$Z = R + jX \quad (3)$$

Donde $R = \text{Re}\{Z\}$, $X = \text{Im}\{Z\}$ y $j = \sqrt{-1}$. R es la resistencia del tejido y X es la reactancia tisular.

La impedancia de los tejidos biológicos es el resultado de la interacción de la corriente eléctrica con el tejido a nivel celular o molecular. El comportamiento eléctrico de un tejido puede modelarse mediante redes de circuitos RC. La resistencia eléctrica del espacio extracelular se modela como una resistencia en

paralelo con la resistencia y la capacitancia que modelan el espacio intracelular. (Ver Figura 4 [14]).

Figura 4. Membrana celular y su equivalente circuito eléctrico.



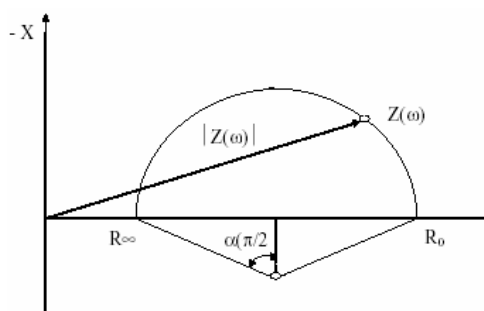
Si se inyecta una corriente de excitación de alta frecuencia se genera un efecto de cortocircuito en la membrana celular, y la corriente pasa por los medios extra e intracelulares. Si se inyecta una corriente de baja frecuencia, sólo atraviesa el medio extracelular y crece el valor de la impedancia a bajas frecuencias. Teóricamente, la reactancia mide el volumen de la capacitancia de la membrana celular y es una medida indirecta del volumen intracelular [14].

Una forma de observar la información de impedancia es mediante la gráfica de Nyquist en donde se grafica la resistencia vs la reactancia negativa. En esa gráfica se genera un semicírculo, a partir del cual el modelo *Cole-Cole* caracteriza la bioimpedancia tisular en 4 parámetros los cuales son R_0 (impedancia a frecuencia cero), R_∞ (impedancia a frecuencia infinita), τ (constante característica de tiempo), α (medida de la depresión del arco semicircular debajo del eje real, es una constante entre 0 y 1). La ecuación general del modelo se encuentra a continuación.

$$Z = R + jX = R_\omega + \frac{R_0 - R_\infty}{1 + (j\omega\tau)^{1-\alpha}} \quad (4)$$

El plano de impedancia complejo del modelo Cole-Cole para una sola constante de tiempo se muestra en la Figura 5.

Figura 5. Modelo de Cole – Cole.



Sin embargo, ya que los tejidos biológicos son medios heterogéneos que involucran diversas constantes de tiempo, la función más utilizada para representar esta situación es la denominada ecuación de permitividad de Cole – Cole.

$$\epsilon(\omega) = \epsilon_{\infty} + \frac{\epsilon_s - \epsilon_{\infty}}{1 + j\omega\tau^{1-\alpha}} \quad (5)$$

Donde α es un parámetro empírico característico de la distribución de la frecuencia de relajación ($\tau = 1/2\pi f$), dando una idea del grado de dispersión de las constantes de tiempo asociadas con el fenómeno de relajación. De esta forma se encuentra la expresión análoga para la impedancia mostrada en la ecuación 4 [22, 23].

3.5.5 Propiedades eléctricas en un tejido isquémico

Se denomina isquemia celular al sufrimiento celular causado por disminución del aporte de oxígeno y nutrientes. Si el sufrimiento es intenso puede llegar a la muerte celular (necrosis). El comportamiento de R_0 durante la isquemia se ha explicado teóricamente y se ha comprobado experimentalmente. A mayor isquemia en el tejido, aumenta el valor de R_0 [14].

El incremento se debe al movimiento de fluido dentro del tejido del medio extracelular al intracelular, alterando el volumen de los medios. El valor de R_0 a baja frecuencia es particularmente sensible a los cambios en volumen debido a que las capacitancias de las membranas celulares a baja frecuencia, actúan como circuitos abiertos para la corriente medida causando un incremento en la resistividad del tejido.

En la Tabla 2 se observan los efectos de la isquemia sobre los cambios en las diferentes regiones de dispersiones características del tejido biológico.

Tabla 2. Efectos de la isquemia sobre las regiones de dispersión.

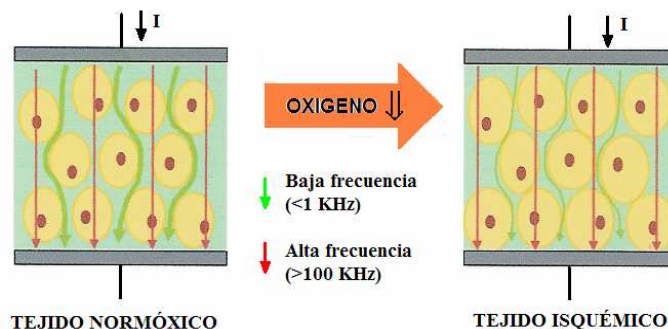
Región de dispersión	Cambios en la(s) regiones de dispersión o en la impedancia
α y β	Durante la isquemia hay un movimiento de fluido del espacio extracelular al intracelular. Aumenta en la impedancia a baja frecuencia debido a la naturaleza capacitiva de las membranas celulares. Incremento en la impedancia en estas regiones.
γ	La impedancia a altas frecuencias es poco afectada por la isquemia, degradación, y muerte del tejido. Esto se debe principalmente al hecho de que la existencia de las membranas celulares no afecta las mediciones de alta frecuencia. Los flujos intracelular y extracelular se igualan casi por completo debido a su fuerza iónica.
α , β	La dispersión α cae más rápido que la dispersión β , generalmente unas horas después de la aparición de la isquemia. La dispersión α reacciona a factores ambientales y a varios procesos fisiológicos como consecuencia de diferentes mecanismos de relajación.
β	La dispersión β mide la relación de volumen extracelular e intracelular, la cual cambia durante la isquemia.

Las propiedades dieléctricas de las membranas celulares y sus interacciones con los electrolitos extra e intracelulares pueden medirse en el rango de 1 kHz a 10 MHz. A nivel conceptual, el citoplasma celular y el espacio extracelular actúan como un medio conductivo aislado uno del otro por la membrana celular.

La conductividad de los espacios extra e intracelulares contribuye a la resistencia promedio del tejido mientras la membrana celular contribuye al efecto capacitivo.

La Figura 6 muestra cómo se monitoriza la isquemia a través de mediciones de impedancia.

Figura 6. Representación del paso de la corriente a baja y alta frecuencia, y el aumento de impedancia a baja frecuencia debido al hinchamiento celular causado por isquemia.



Durante la condición normóxica (condiciones adecuadas de O_2 , presión de oxígeno intracelular mayor de 15 mm Hg), una cantidad significativa de corriente de baja frecuencia es capaz de fluir a través del espacio extracelular; cuando ocurre disoxia (la presión de oxígeno intracelular es inferior a los 4 mm Hg), las células no son capaces de generar suficiente energía para alimentar las bombas iónicas y el agua extracelular penetra al interior de la célula. Como consecuencia, las células crecen e invaden el espacio extracelular y causan una reducción de la corriente en los fluidos extracelulares, causando un incremento en la impedancia a baja frecuencia.

3.6 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE SISTEMAS HETEROGÉNEOS

3.6.1 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica

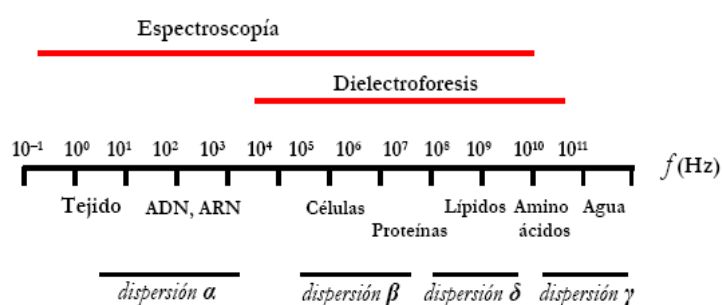
La caracterización de sistemas heterogéneos, entre los que se encuentran las células biológicas, requiere técnicas de medida que presenten bajo riesgo de desnaturalización de la partícula, o dicho de otro modo, de métodos no invasivos. El carácter no invasivo de una técnica en la cual la célula es expuesta a la acción

de un campo eléctrico, viene dado por el valor del potencial de membrana inducido por dicho campo. Para medidas dieléctricas con campos de intensidad $E_0 = 100$ V/m y frecuencia desde 1 Hz hasta 10 MHz, éste no supone más que un 0.05% del valor de potencial de membrana (Gheorghiu 1996).

Como método no invasivo, el empleo de medidas dieléctricas para el estudio de parámetros moleculares y celulares es, a día de hoy, una técnica establecida, cuya importancia sigue vigente alentada por la necesidad de posibles mejoras, tanto en la técnica como en su interpretación (Pethig y Markx 1997). Desde entonces, la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE), también conocida como espectroscopía dieléctrica, se ha venido aplicando reiterada y regularmente como método de caracterización.

En la Figura 7 [17] se presenta de forma esquemática las estructuras y propiedades dieléctricas de las células que responden en los distintos rangos de la frecuencia del campo aplicado, que pueden ser investigadas por la espectroscopía dieléctrica y la dielectroforesis.

Figura 7. Rangos de frecuencias que abarcan las técnicas de caracterización dieléctrica, junto con los correspondientes a las dispersiones dieléctricas en biomateriales.



La espectroscopía de impedancia consiste en la aplicación de una diferencia de potencial alterno entre los electrodos en contacto con la suspensión celular a investigar tomando como referencia la corriente alterna que pasa a través de la muestra y se compara con el voltaje de salida. De este modo, resulta una medida

directa de la impedancia que la suspensión celular ofrece al campo eléctrico y, barriendo un rango de frecuencias, permite obtener el espectro característico. Este espectro es caracterizado con la ayuda de un circuito equivalente cuyo comportamiento simule la respuesta de la suspensión celular al estímulo eléctrico como el modelo Cole-Cole, Davidson-Cole, etc., y con modelos del comportamiento eléctrico de la suspensión como los modelos de Maxwell, Bruggeman, Hanai, etc. (Takashima 1989).

3.6.2 Voltametría

Conjunto de técnicas de análisis electroquímico en corriente directa (DC) que permiten la detección de especies electroactivas contenidas en un electrolito. Se encuentran la *voltametría cíclica* y la *voltametría de barrido lineal*. La técnica voltametría lineal se ha usado para seguir el ciclo de vida de un material biológico [24].

Uno de los aspectos más interesantes de la voltametría cíclica es que permite distinguir entre los procesos relacionados con especies adsorbidas en la superficie del electrodo de trabajo (polímero modificado) y los debidos a las especies en disolución, proporcionando además acerca de la reversibilidad e irreversibilidad de los procesos de transferencia electrónica. Las curvas de densidad de corriente frente al potencial que se obtienen son los voltagramas, que se caracterizan por la existencia de máximos de corriente en un proceso faradáico, o picos, definidos por los correspondientes valores de máximo de densidad de corriente de pico y potencial de pico. Hay otra contribución a la curva voltamétrica que es de origen capacitivo producida por la introducción continua de carga sobre la superficie del electrodo que debe ser compensada por cargas de signo opuesto procedentes del electrolito (doble capa eléctrica) [25, 26].

4

ESTADO DEL ARTE

GHEORGHIU, Eugen. ASAMI, Koji (1998), usaron la técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica para observar la influencia de la forma de células de fermentación del whisky (considerada inicialmente esférica) sobre el comportamiento dieléctrico y la progresión del ciclo celular. La observación microscópica reveló la forma no esférica de las levaduras en ciernes y la presencia de la pared celular. La modelización teórica señaló que ambas características contribuyen claramente a un comportamiento dieléctrico pero que los efectos de la forma y de la pared celular se deben considerar por separado. El comportamiento dieléctrico es capaz de proveer una medición cuantitativa de la evolución del número de células y volumen celular. Los investigadores tomaron los espectros de permitividad y conductividad y lo ajustaron a un algoritmo matemático. Se concluyó que la espectroscopía de impedancia es capaz de proporcionar una herramienta cuantitativa de forma no invasiva para supervisar el ciclo celular, debido a la evolución de la polarizabilidad de células, debido a la contribución de forma de la célula. Al comparar las simulaciones con datos reales, se demostró que el ciclo de células de levaduras en ciernes es capaz de ser revelado por los cambios significativos de las gráficas de permitividad celular [27].

DOOP, Elke. JONAS, Ludwing y colaboradores (2000), evaluaron los cambios en las propiedades dieléctricas in vitro de las membranas de células mesoteliales luego de la exposición al asbesto/amianto, mineral determinado por los organismos médicos internacionales como cancerígeno. Usaron la técnica de electrorotación para determinar los cambios tempranos celulares de propiedades superficiales y dieléctricas. La técnica electrorotación es una técnica usada en biofísica celular para medir propiedades como conductividad y permitividad de

células y sus membranas. Los resultados mostraron un incremento ligero en la conductividad interna y un decrecimiento en la conductancia de la membrana en las células de estudio, durante las primeras 12 horas de exposición al amianto, probablemente debido a los cambios funcionales en los canales iónicos de la membrana celular. Sin embargo después de 30 horas de exposición la conductividad interna se reduce y se incrementa la conductancia de la membrana. Las propiedades dieléctricas marcaron diferencia durante las 50 horas de exposición. La técnica de electrorrotación muestra unos picos de rotación a frecuencias de 3 MHz debido a la no conducción en la membrana plasmática y un co-campo de rotación como resultado de las diferencias de las propiedades dieléctricas del medio que rodea la célula y el interior de la misma. Se concluyó que cuando la conductividad interna aumenta, la permitividad decrece posiblemente debido al incremento de la viscosidad y/o decrecimiento de la movilidad de las moléculas [28].

Z.G, Tang.J.T, Callaghan.J.A, Hunt (2005), evaluaron morfología, análisis dinámico de ángulo de contacto, propiedades térmicas y la respuesta de osteoblastos (proliferación y adhesión) en películas de policaprolactona (PCL) dopadas con poli (láctico-co-glicólico) (PLGA). Las películas de PCL dopadas registraron un bajo ángulo de contacto y el aumento en la hidrofiliidad. Las células osteoblásticas se adhirieron a todos los materiales dopados, los materiales dopados con 10, 20 (% peso) demostraron el mayor crecimiento de células. Se observó la microestructura por microscopía electrónica de barrido (SEM). El cultivo de osteoblastos fue puesto sobre discos de 10 mm de diámetro de PCL-PLGA incubando a 37°C y 5% de CO₂ en 1 mL de medio esencial mínimo modificado (DMEM) por 3 y 7 días [29].

PARK, Jin - Soo. CHOI, Jae – Hwan y colaboradores (2006), investigaron el intercambio iónico de membranas usando espectroscopía de impedancia electroquímica. Se realizaron diagramas de Nyquist que mostraron que la

impedancia describe el sistema de intercambio iónico de la membrana en tres aspectos. (i) El intercambio iónico de la membrana inmersa en solución, (ii) la doble capa eléctrica de la superficie de la membrana, (iii) capas de frontera de difusión derivada de la interfase entre el intercambio iónico de la membrana y el electrolito. La permitividad y conductividad se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación general: $\sigma^* = \sigma + j\omega\epsilon$. En una alta frecuencia, la permitividad dieléctrica domina sobre la conductividad compleja. Esto significa que la permitividad dieléctrica de la interfaz es mayor que la de la membrana, y la corriente puede pasar fácilmente a través de la membrana, sin obstáculos eléctricos significativos. Sin embargo, a bajas frecuencias la conductividad domina sobre la conductividad compleja resultando en alta impedancia a la corriente que pasa a través de la membrana de intercambio iónico. El circuito eléctrico equivalente fue similar al obtenido para membranas celulares, las cuales cumplen la misma función del intercambio iónico [30].

D. Llamosa P, E. Muñoz A, P. Cárdenas M, B. Segura G, A. Rosales R (2006), usaron la técnica de espectroscopía de impedancia bioeléctrica (EIB) para caracterizar sistemas biológicos. La caracterización se llevó a cabo en cultivos de levadura *Sacharomyce Cereviseae* spp y se analizaron propiedades estructurales, morfológicas y fisicoquímicas del sistema biológico. La técnica se aplicó en un rango de frecuencias entre 25 KHz y 30 MHz, por el cual se obtuvo información sobre las condiciones de la membrana celular. Usaron el modelo de Cole-Cole para la obtención del espectro de impedancia, la cual presenta una parte real y otra imaginaria, la parte real muestra el comportamiento resistivo del citoplasma celular y la parte compleja refleja el comportamiento capacitivo de la membrana celular.

$$Z(f) = R_{\infty} + \frac{R_0 - R_{\infty}}{1 + [j \frac{f}{f_c}]^{1-\alpha}}$$

Los resultados obtenidos mostraron un comportamiento altamente capacitivo en la membrana celular, se observó que la componente resistiva de la impedancia eléctrica presenta disminución a medida que la frecuencia aumenta, facilitando el

paso de la corriente desde el medio extracelular hasta la membrana; la componente capacitiva de la impedancia muestra un aumento a medida que la frecuencia se incrementa, por lo tanto se acumula energía en la membrana celular, lo cual es característico de membranas celulares integras [31].

DEAN D.A y colaboradores (2008), investigaron las propiedades de impedancia eléctrica de tejido de pulmón y corazón de rata ex vivo usando espectroscopía de impedancia electroquímica. Se analizó la resistencia (real Z , Ω) y la reactancia ($\text{Im } Z$, negativo Ω). Se usó el modelo Cole-Cole y el diagrama (real Z vs $\text{Im } Z$) para estudiar dichas propiedades. Los resultados mostraron la relación existente entre la estructura y las características funcionales. Los valores de impedancia fueron altos a baja frecuencia comparada con los valores de alta frecuencia. Se encontró que a bajas frecuencias de campo eléctrico aplicado, la membrana es altamente resistiva y una baja corriente eléctrica viajará a través del fluido extracelular circundante, y donde la impedancia es bastante alta. A medida que la frecuencia aumenta, la impedancia decrece debido a comportamiento capacitivo. Los autores concluyen que la impedancia eléctrica de tejidos biológicos es una compleja combinación de resistencia y capacitancia y esta depende de la frecuencia y del voltaje ac aplicado [32].

WILLOWS, Alison. FAN, Qiang y colaboradores (2008), estudiaron la degradación de un colágeno comercial con enlaces cruzados con glucosaminoglicanos (GAG-C) usado como andamio cutáneo. El tiempo de degradación fue de 30 días. Para mayor degradación, las muestras fueron irradiadas con rayos gamma, luego, inmersas en PBS a pH 7.4 e incubadas por periodos de 12, 24 y 48 horas a 37°C y 44°C (simulando posibles condiciones inflamatorias). Los especímenes se analizaron mediante SEM. Se realizó voltametría cíclica sobre los especímenes. Los autores muestran los picos de oxidación y reducción de los diagramas voltamétricos, y a partir de estos diagramas concluyen que cambian las condiciones de la estructura y

permeabilidad de las muestras irradiadas almacenadas en un pH ácido (pH 5). Los factores de almacenamiento e irradiación son factores importantes en el ciclo de esterilización de la matriz dérmica [26].

GARCÍA ALONSO, M.C. SALDAÑA y colaboradores (2009), estudiaron las interacciones in situ entre la aleación Ti-6Al-4V y células osteoblásticas humanas Saos-2, mediante técnicas electroquímicas. Se estudió la evolución del potencial de corrosión con el tiempo de exposición y por espectroscopía de impedancia electroquímica. Los autores analizaron diferentes modelos de circuitos equivalentes que simulan el estado interfacial de cada tiempo de prueba. El efecto de las células sobre la respuesta electroquímica de la aleación Ti-6Al-4V se ve claramente después de 4 días de pruebas, en la que dos aisladas constantes de tiempo bien diferenciadas se observan con claridad. Una de ellas está asociada con la presencia de las células y el otro con una película pasiva de la aleación. Después de 7 días de cultivo, el sistema se rige por un componente de resistencia sobre un amplio rango de frecuencias que se asocia con un aumento en la tasa de cobertura de células en la superficie debido a la matriz extracelular. El potencial de corrosión del medio de cultivo con y sin células sobre la aleación muestra una disminución con el tiempo, sin embargo el potencial de corrosión del medio con células sobre Ti-6Al-4V es menor registrando potenciales de -140 mV a 7 días de cultivo, con una concentración celular inicial de 26400 cel/mL. Los autores concluyen que hay una buena correlación entre los resultados electroquímicos y las imágenes obtenidas por SEM [33].

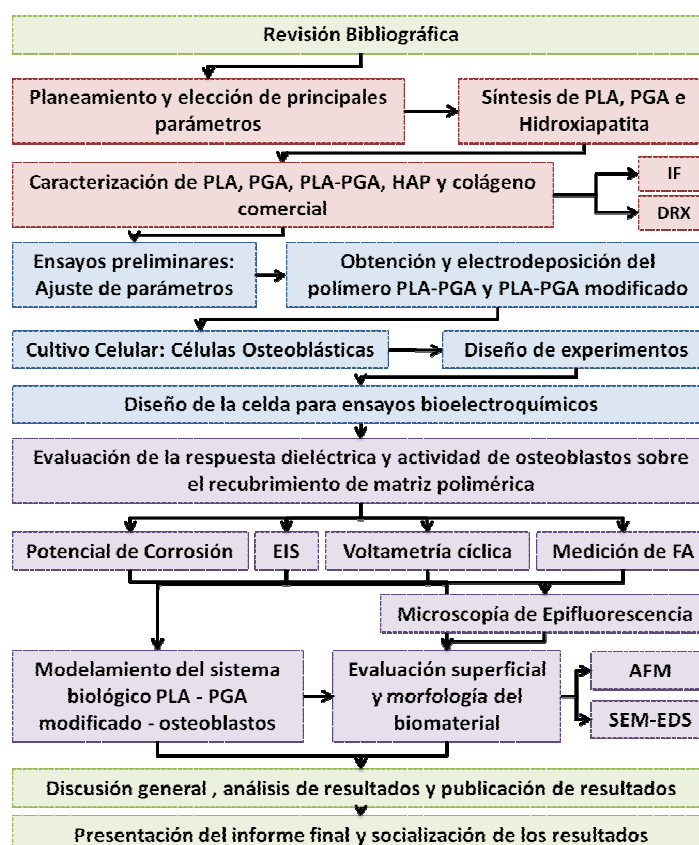
NGIAM, Michelle. LIAO, Susan y colaboradores (2009), usaron un material fabricado de nano-hidroxiapatita sobre PLGA y nanofibras de PLGA/colágeno tipo I, para evaluar el efecto que tiene sobre células osteoblásticas. La mineralización de las nanofibras de PLGA y PLGA/colágeno se hizo mediante tratamientos con calcio y fosfatos. El cultivo celular se hizo en nanofibras mineralizadas y no mineralizadas durante 1, 4 y 7 días. Para evaluar la actividad de los osteoblastos,

se midió fosfatasa alcalina (ALP). En comparación con las nanofibras de PLGA no mineralizado, no hubo diferencia significativa en el número de células de PLGA + n-HA en el día 1, pero el número de células disminuyeron después de los días 4 y 7 en las fibras de PLGA mineralizadas. Contrario al número de células, la actividad de ALP tuvo un incremento sobre el PLGA + n-HA a los días 4 y 7, comparado con ALP de PLGA puro. La actividad ALP en las nanofibras de PLGA/Col disminuyó, mientras que en las nanofibras de PLGA/Col + n-HA aumentó. Finalmente los autores concluyen que la adición de cristales de n-HA fue predominante sobre PLGA/Col, comparado con el PLGA, lo que sugiere que el colágeno es un buen material como plantilla para la nucleación de n-HA. La cantidad de n-HA parece tener un efecto significativo en las etapas iniciales de adhesión y proliferación de los osteoblastos, que en las etapas siguientes de proliferación y diferenciación, debido a que la actividad de ALP y proteína aumentaron [16].

5 METODOLOGÍA

La metodología experimental de la presente investigación se basó en la evaluación por medio de técnicas electroquímicas de recubrimientos de ácido poliláctico, ácido poliglicólico e hidroxiapatita, modificados con quitosano y colágeno, depositados sobre sustratos de Ti6Al4V durante varios tiempos de cultivo celular. Los resultados permitieron conocer la aplicación de las técnicas electroquímicas espectroscopía de impedancia electroquímica y voltametría cíclica sobre materiales biológicos. En la Figura 8 se muestran las diferentes etapas de la metodología.

Figura 8. Metodología.



Fuente: El autor.

5.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

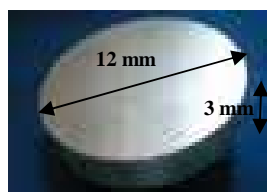
Se llevó a cabo una revisión y análisis de la información de la producción científica relacionada con el tema objeto de estudio, en tesis, patentes, memorias de congresos y normas técnicas, así como la información contenida en base de datos. Se tuvo en cuenta los conceptos teóricos de las técnicas a usar, membrana celular y sus propiedades eléctricas, cultivo celular, materiales biodegradables y modelamiento de sistemas biológicos con circuitos equivalentes. Esta etapa se realizó durante toda la investigación.

5.2 PLANEAMIENTO Y ELECCIÓN DE PRINCIPALES PARÁMETROS

Con la información obtenida de la revisión bibliográfica se realizó una descripción del plan de trabajo de forma detallada; se definieron las concentraciones de las soluciones poliméricas a preparar, las condiciones a evaluar del recubrimiento de matriz polimérica y colágeno, condiciones de cultivo celular y tiempo de evaluación bioelectroquímica del material polimérico sobre Ti6Al4V y células HOS ATCC (Human Osteoblastic Cells).

Los discos de trabajo a recubrir fueron discos de Ti6Al4V de 12 mm de diámetro y 3 mm de espesor, suministradas por la Empresa QUIRÚRGICOS ESPECIALIZADOS S.A (Figura 9).

Figura 9. Geometría de las probetas empleadas.



Fuente: El autor

5.3 SÍNTESIS DE PLA, PGA E HIDROXIAPATITA

5.3.1 Síntesis de ácido poliláctico PLA

Ácido poliláctico se obtuvo a partir de ácido L-láctico Carlo Erba al 98%, actuando como catalizador cloruro de cinc en una concentración de 1.5% en peso. El procedimiento se llevó a cabo en un rotoevaporador, con control de temperatura y presión de vacío. Se le suministró al sistema entrada de gas nitrógeno para mantener la reacción a atmosfera inerte. El tiempo total de síntesis fue de 57 horas aproximadamente.

La obtención del PLA constó de cuatro etapas de síntesis. La primera etapa fue la deshidratación a una temperatura de 100°C a presión atmosférica, la siguiente etapa fue la esterificación, a partir de esta reacción se mantiene condiciones de 180°C a presión de 133 mbar de 6 a 7 horas y entrada de N₂, la etapa posterior fue la oligomerización que trabaja a la misma temperatura a presión de 33 mbar y entrada de N₂ cada cierto tiempo para no perder condiciones de vacío. El tiempo de esta etapa fue de 40 horas. Se procedió a introducir el catalizador acompañado de agitación para dar inicio a la policondensación que ocurre a la misma temperatura pero a una presión de 13 mbar durante 5 horas [34].

5.3.2 Síntesis de ácido poliglicólico PGA

El PGA se obtuvo mediante policondensación a partir de ácido glicólico Carlo Erba al 70%, con un 0,5% de ZnCl₂ como catalizador, y un tiempo total de síntesis de 25 horas. La obtención de PGA constó de cuatro etapas, en la primera etapa se llevó a cabo la reacción entre el ácido y el catalizador con agitación a una temperatura de 190°C bajo vacío de 195 mbar por una hora, en la siguiente etapa se redujo la presión hasta 39 mbar manteniendo la temperatura y sin agitación durante 4 horas, posteriormente se aumentó la temperatura a 230°C hasta que el polímero se fundió totalmente y finalmente se mantuvo por 20 horas a 190°C en un crisol

[35]. En la Figura 10 se muestra el montaje en el que se llevó a cabo la síntesis de PLA y PGA.

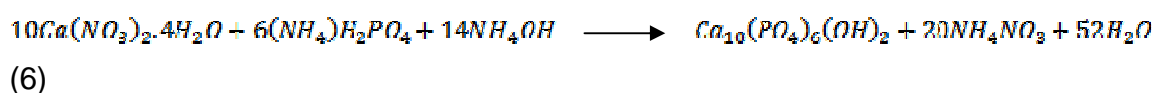
Figura 10. Rotoevaporador para la síntesis de PLA y PGA.



Fuente: El autor

5.3.3 Síntesis de hidroxiapatita (HAp)

Se usó el método de precipitación acuosa para obtener los cristales de hidroxiapatita, utilizando Nitrato de Calcio tetrahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y Fosfato de amonio dihidrogenado ($(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$) en concentraciones 1M y 0.48M respectivamente, adicionados en relación molar de 1,67. Se basificaron las soluciones antes de mezclar utilizando hidróxido de amonio con agitación continua durante 3 horas para obtener un pH entre 9.8-10. Se dejó la solución en envejecimiento por 144 horas a temperatura ambiente y luego se secó a 60°C por 24 horas. Por último se llevó a cabo la calcinación a 1050°C durante 1 hora [36]. El precipitado de fosfato de hidroxiapatita se obtuvo de acuerdo a la siguiente ecuación:



5.4 CARACTERIZACIÓN DE PLA, PGA, PLA – PGA, HAp Y COLÁGENO COMERCIAL

El ácido poliláctico y poliglicólico por separado se caracterizaron mediante espectroscopía por infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR). Los espectros de FTIR se hicieron usando un Espectrofotómetro 8400 Shimadzu, en un rango de 4000 a 500 cm^{-1} , con 1.5 gramos de muestra pulverizada.

Ambos polímeros pulverizados se mezclaron en seco en una proporción de 70% en peso de ácido poliláctico y 30% en peso de ácido poliglicólico, luego se fundió la mezcla a 220°C durante 20 minutos en un horno WT B-BLINDER, teniendo en cuenta que las temperaturas de descomposición de ambos polímeros se encuentran por encima de 250°C [37], la mezcla (PLA – PGA) se dejó secar y se pulverizó de nuevo para preparación de las soluciones. El PLA – PGA se caracterizó por FTIR en un rango de 4000 a 500 cm^{-1} , así como el colágeno comercial usado para los recubrimientos. La hidroxiapatita se caracterizó cualitativa y cuantitativamente mediante difracción de rayos X en un difractómetro de polvo marca RIGAKU modelo D/MAX IIIB a un voltaje de 40kV, corriente de 30 mA y muestreo de 0,02° (2θ). Los espectros se muestran y se analizan en el siguiente capítulo.

5.5 ENSAYOS PRELIMINARES: SELECCIÓN DE PARÁMETROS

Los ensayos preliminares se llevaron a cabo con medio de cultivo y células osteoblásticas con los respectivos protocolos de manipulación, esterilización y cultivo celular. En esta etapa se establecieron y validaron los rangos de trabajo tanto para la electrodeposición catódica como para los niveles de las variables hidroxiapatita, colágeno tipo I C9879 sigma (Bovine Achilles Tendon), colágeno comercial, quitosano y concentración celular (ver Tabla 3).

Tabla 3. Niveles de concentración de PLA – PGA, hidroxiapatita, colágeno tipo I, colágeno comercial y quitosano.

Factor	Niveles de concentración	
	Bajo	Alto
PLA – PGA (15% sln)	70/30	70/30
Hidroxiapatita (%p/v)	10	10
Colágeno comercial(%p/v-PBS)	0,05	0,075
Colágeno tipo I (%p/v-PBS)	0,1	0,1
Quitosano (%p/v)	0	3
Osteoblastos (cel/mL)	15000	30000

En la Tabla 4 se observan los parámetros empleados para encontrar las mejores condiciones en la electrodeposición de la mezcla polimérica. Los recubrimientos se evaluaron por microfografías de acuerdo a su homogeneidad y transparencia.

Tabla 4. Factores y niveles para ensayos de electrodeposición de la mezcla polimérica.

Factor	Niveles	
Voltaje (V)	3	9
Tiempo (min)	10	15
Agitación(rpm)	0	100

De acuerdo a los parámetros de la Tabla 4, las mejores condiciones de la electrodeposición fueron 3V, 10 minutos y sin agitación. Una vez encontradas las mejores condiciones para los recubrimientos de PLA–PGA, HAp y quitosano, se prosiguió a definir las mejores condiciones para la electrodeposición de colágeno comercial.

Las características deseadas de los recubrimientos de colágeno comercial disuelto en PBS (*Phosphate Buffered Solution*), pH=7,4, correspondieron a una aplicación de 1V, un tiempo de 3 minutos y con agitación de 100 rpm. Estos recubrimientos se evaluaron por microscopía óptica. No se electrodepositó colágeno tipo I, ya que éste no resultó ser completamente soluble en PBS, ni en solventes orgánicos. En la Tabla 5 se muestra la formulación para la preparación de PBS (pH=7,4).

Tabla 5. Formulación PBS

Reactivo	Composición g/L
NaCl	8
KCl	0,20
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,44
KH ₂ PO ₄	0,24

5.6 OBTENCIÓN Y ELECTRODEPOSICIÓN DEL POLÍMERO PLA-PGA Y PLA-PGA MODIFICADO

La composición del polímero PLA–PGA fue constante de 70% PLA – 30% PGA, la cual es reportada por otras investigaciones como una composición que tiene buena resistencia a la degradación, comparada con otras composiciones [38].

La obtención y electrodeposición del polímero y polímero modificado consta básicamente de dos etapas: la primera es la preparación de las diferentes soluciones y la segunda es la electrodeposición catódica.

5.6.1 Preparación de las soluciones

Se hizo una solución de PLA – PGA al 15% p/v, se usó acetona como disolvente principal. A esta solución se le agregó hidroxiapatita en una concentración de 10% p/v. Una solución más se hizo con hidroxiapatita al 10% y quitosano al 3% p/v.

Tres soluciones de colágeno comercial y tipo I, (en concentraciones, de acuerdo como se muestra en la Tabla 3) se prepararon en PBS para la electrodeposición y pipeteo del colágeno sobre los discos electrodepositados con la mezcla polimérica. Para la preparación de la solución de colágeno tipo I se llevó a cabo el siguiente procedimiento: Se irradiaron con luz UV las fibrillas de colágeno durante 30 minutos, seguido se mezclaron con PBS, se agitó la mezcla durante 30 minutos y se congeló a -80°C en un cuarto frío (Centro de enfermedades tropicales Cintrop-UIS), durante 24 horas. Este procedimiento proporciona un proceso controlado de hinchamiento uniforme de las fibras, lo que favorece la disolución

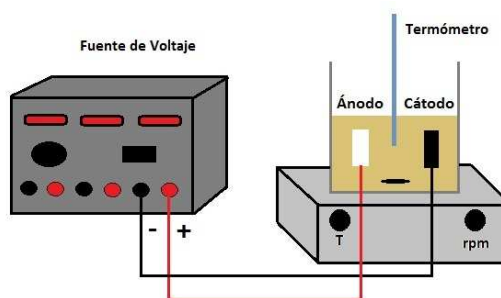
parcial del colágeno. Las fibrillas de colágeno se disponen dentro de una masa esponjosa y en suspensión en el PBS. El resto de fluido toma una coloración blancuzca, el cual se toma para pipetear sobre los discos recubiertos.

5.6.2 Electrodeposición catódica

Se realizó una electrodeposición catódica de los recubrimientos compuestos sobre discos de Ti6Al4V, este material metálico es empleado en ortopedia por tener varias características favorables en el uso de implantes como resistencia a la corrosión, biocompatibilidad y valores bajos de módulo de elasticidad (105 GPa) [39]. Las muestras de Ti6Al4V se prepararon superficialmente con papel abrasivo de SiC número 400 hasta 1500. Posteriormente los discos se lavaron con agua destilada y en baño ultrasónico con etanol durante 30 minutos.

La electrodeposición se llevó a cabo a temperatura ambiente, utilizando una fuente de voltaje Thermo Electron Corporation EC570-90, a las condiciones de tiempo, voltaje y agitación, establecidas en las pruebas preliminares. Se usó como electrodo de referencia una lámina de acero inoxidable y como electrodo de trabajo un soporte de Ti6Al4V que sostenía el disco de Ti6Al4V (cátodo). En la Figura 11 se observa un esquema del montaje usado para la electrodeposición.

Figura 11. Esquema general del montaje para la electrodeposición de los recubrimientos.



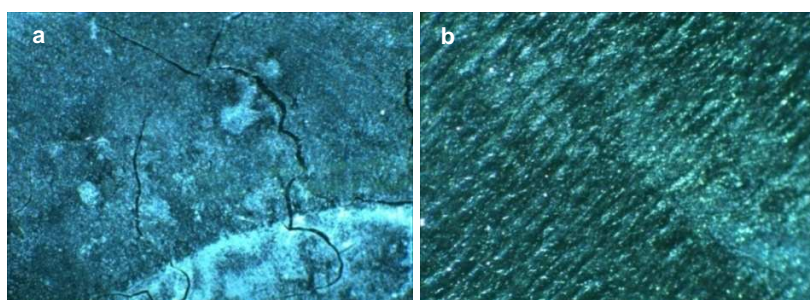
Fuente: El autor

Se electrodepositó colágeno comercial sobre los discos recubiertos con la mezcla polimérica, luego se dejaron secar durante 30 minutos bajo cámara de flujo

laminar y con luz ultravioleta para evitar que el secado por aire agrietara los recubrimientos, tal y como se muestra en la Figura 12. Posteriormente se pipeteó 40 μ L de colágeno tipo I sobre cada disco recubierto, igualmente se dejó secar durante 30 minutos bajo luz UV. Todas las soluciones se prepararon y usaron bajo cabina de bioseguridad para evitar impurezas y contaminación, así mismo, el PBS se preparó y se esterilizó por autoclaveado para mantener condiciones estériles.

Todos los recubrimientos se hicieron por triplicado antes de cada ensayo, con el fin de obtener microscopías ópticas de los diferentes recubrimientos, ya que la esterilidad se pierde al hacer la microscopía.

Figura 12. Recubrimiento con colágeno, a) agrietado y b) no agrietado.



Fuente: El autor

Los discos de Ti6Al4V se esterilizaron bajo luz UV durante 30 minutos, por lado y lado antes del recubrimiento. De igual manera, los discos recubiertos se lavaron con PBS y se esterilizaron bajo luz UV durante 30 minutos por ambas caras antes de ponerlos en contacto con el medio de cultivo celular.

5.7 CULTIVO CELULAR

Para este estudio se empleó la línea celular HOS (ATCC) obtenida de American Type Culture Collection, constituida por células osteoblásticas procedentes de un osteosarcoma humano.

Se llevó a cabo el cultivo celular en frascos de cultivo Falcon® bajo condiciones estériles a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y 5% de CO_2 , en medio de cultivo RPMI 1640, con 1% de L-glutamina, 1% de antibióticos (Penicilina/Estreptomicina) y suplementado con 10% de SBF (Suero Fetal Bovino), sin fenol rojo, $\text{pH}=7,2$. El medio de cultivo se cambió cada dos días para garantizar suministro adecuado de nutrientes presentes en la placa de cultivo y/o en la celda electroquímica [9,15,16]. El Suero Fetal Bovino se adquirió de Hyclone Laboratories¹.

5.8 DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA ENSAYOS BIOELECTROQUÍMICOS

Con base en los resultados obtenidos en los ensayos preliminares, se llevó a cabo dos diseños de experimentos factoriales, el primer diseño fue de $2^2 \times 3$ para las medidas de impedancia y de voltametría cíclica con medio de cultivo celular, y el segundo diseño fue de $2^3 \times 3$ para las medidas de impedancia y de voltametría cíclica con medio de cultivo y células osteoblásticas, con dos concentraciones celulares por mililitro de medio y tres tiempos de cultivo. Para ambos diseños se repitió un ensayo escogido al azar y se llevó a cabo un análisis estadístico de los resultados mediante diagramas y análisis de varianza con un software estadístico.

La variable de respuesta principal fue la impedancia; resistencia y capacitancia se encontraron por simulación; permitividad y conductividad AC, se encontraron por medio de tratamiento matemático. Las variables dependientes fueron la concentración de colágeno, quitosano y número de células por mililitro. Las variables fijas fueron: concentración de hidroxapatita, PLA – PGA, temperatura, concentración de dióxido de carbono, condiciones de tiempo y voltaje en la electrodeposición, encontradas mediante ensayos preliminares y volumen de solución. En las Tablas 6 y 7 se muestran los diseños experimentales para medio de cultivo y para medio – células HOS.

¹www.hyclone.com

Tabla 6. Diseño de experimentos 2² para ensayos electroquímicos con medio de cultivo.

Experimento ²	Quitosano (%p/v)	Colágeno (%p/v PBS)
P1	0	0
P2	0	0.05
P3	3	0.05
P4	0	0.075
P5	3	0.075
R3	3	0.05

Tabla 7. Diseño de experimentos 2³ para ensayos electroquímicos con medio de cultivo y células HOS.

Experimento ²	Quitosano (%p/v)	Colágeno (%p/v PBS)	HOS (No. cel/mL)
P6	0	0.05	15000
P7	3	0.05	15000
P8	0	0.075	15000
P9	3	0.075	15000
P10	0	0.05	30000
P11	3	0.05	30000
P12	0	0.075	30000
P13	3	0.075	30000
R11	3	0.05	30000

5.9 DISEÑO DE LA CELDA PARA ENSAYOS BIOELECTROQUÍMICOS

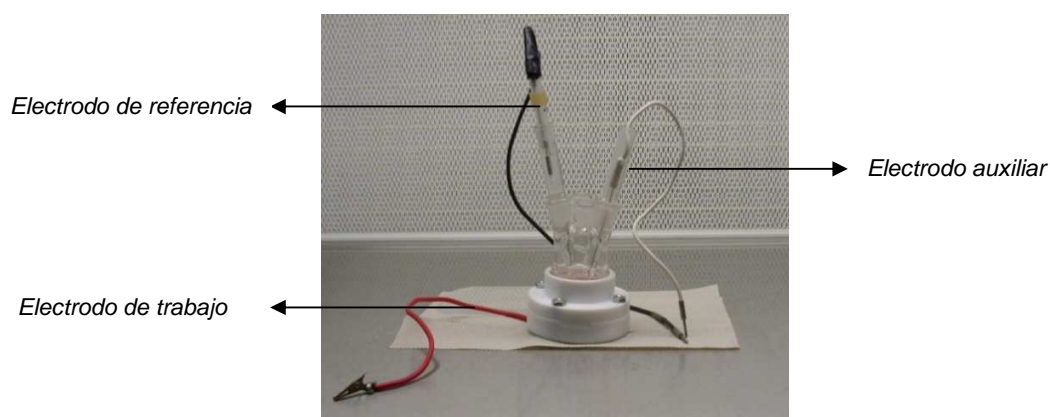
Para esta etapa, fue necesario realizar el diseño de una celda electroquímica adecuada para llevar a cabo el cultivo celular y evaluar electroquímicamente el sistema biológico células-recubrimiento. Esta celda es una celda balón de vidrio con tapas planas de teflón. Sus dimensiones fueron de 40 mm de diámetro por 40 mm de largo sin tapas, consta de rosca que encaja perfectamente en la tapa inferior de teflón y dos capilares Luggin de vidrio. La muestra se ubica dentro de las dos tapas inferiores dejando un área de exposición de 0,785 cm². Este diseño

²PLA-PGA (70-30, 15%p/v), HAP (10% p/v)

se basó en una celda hecha por M.C García-Alonso y sus colaboradores, sólo que con algunas modificaciones [33].

En la Figura 13 se muestra la celda para ensayos bioelectroquímicos, en donde el cultivo celular y las mediciones electroquímicas se llevaron a cabo. Se usó como electrodo auxiliar un electrodo de platino, como electrodo de referencia un electrodo de calomel saturado de 5 cm de largo y como electrodo de trabajo el disco de Ti6Al4V recubierto. Tanto el electrodo de referencia como el auxiliar, se introdujeron en los capilares Luggin ajustados en su extremo inferior con dos puntas vycor. Estos se llenaron con KCl 3M autoclaveado.

Figura 13. Celda para ensayos bioelectroquímicos



Fuente: El autor

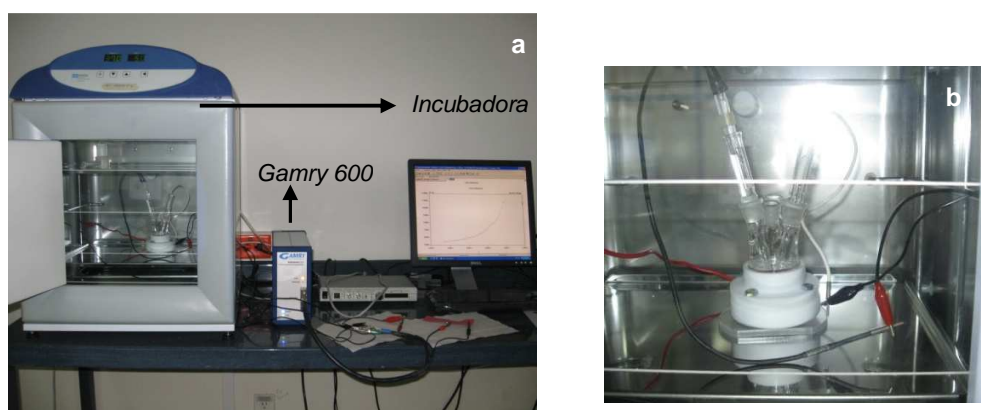
5.10 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DIELECTRICA Y ACTIVIDAD DE OSTEÓBLASTOS SOBRE EL RECUBRIMIENTO DE MATRIZ POLIMÉRICA

Se evaluó la respuesta electroquímica en el material polimérico como consecuencia de la actividad de osteoblastos en la superficie del implante.

Para los ensayos con medio de cultivo, se usaron 5 mL de medio RPMI, para los ensayos con células HOS se empleó 4 mL de RPMI y 1 mL más de medio con la concentración de células requerido para cada ensayo. Se depositó el medio de

cultivo celular RPMI y HOS sobre discos recubiertos de PLA–PGA modificado con hidroxiapatita, quitosano y colágeno en una cabina de bioseguridad, la cual hace que los osteoblastos estén libres de contaminación por algún agente biológico patógeno. Luego se conectó este sistema a un potenciostato Gamry ZRA 600, en donde se hizo el seguimiento electroquímico del comportamiento de los osteoblastos sobre el biomaterial por medio de las técnicas electroquímicas potencial de corrosión, espectroscopía de impedancia electroquímica y voltametría cíclica, a tiempos de cultivo de 1, 3 y 5 días. En la Figura 14 se muestra el montaje usado para la evaluación bioelectroquímica del sistema en estudio.

Figura 14. a) Montaje para ensayos bioelectroquímicos, b) detalle de celda. Ensayo en ejecución.



Fuente: El autor

Los parámetros empleados para las mediciones de impedancia fueron: barrido de frecuencia de 1 MHz a 0,01 Hz, siete puntos por década, voltaje AC 10 mV, voltaje DC 0 mV. Antes de realizar las mediciones de EIE, se registró el potencial de corrosión durante 300 segundos hasta que el potencial estabilizó. Para las mediciones de voltametría cíclica, se realizó un barrido de potencial de -1 a 1 V con respecto al electrodo de referencia, velocidad de barrido 50 mV/s, amplitud de 10 mV, corriente máxima de 0,1 mA y 4 ciclos.

Para observar la actividad de los osteoblastos, se realizó la medición de fosfatasa alcalina con una concentración celular de 30000 cel/mL. Se tomaron los discos recubiertos e irradiados con luz UV y se depositaron en una placa de cultivo de 24 pozos. Se tomaron las células en fase exponencial, posteriormente se colocaron en cada pozo y se dejaron a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂. Las mediciones se realizaron a 72 y 120 h. A cada tiempo de medición, se tomó tanto el sobrenadante como el lisado de las células adheridas. Para la lisis, se adicionó tripsina-EDTA por 10 min, se re-suspendió en PBS, se centrifugó a 2500 rpm por 5 min y se re-suspendió el pellet celular en Triton X-100 5%.

En una placa de cultivo de 96 pozos se adicionó 50µL de la muestra a analizar más 50µL de p-nitrophenyl phosphate disodium salt (p-NPP) 0,1M por 6 horas a 37°C. Se detuvo la reacción con NaOH 3N y se realizó la lectura en un lector de placa a una longitud de onda de 450 nm³. La Figura 15 muestra el montaje usado para los ensayos de medición de fosfatasa alcalina.

Figura 15. Montaje para pruebas de fosfatasa alcalina y microscopía de epifluorescencia.



Fuente: El autor

5.11 ENSAYO DE ADHESIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR POR MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA

Para identificar las células adheridas y la forma como se proliferan, se decidió realizar microscopía de epifluorescencia y complementar así los ensayos

³ Centro de Enfermedades Tropicales CINTOP-UIS.

bioelectroquímicos y morfológicos. Se hizo el siguiente procedimiento: se tomaron los discos recubiertos con el polímero modificado a evaluar, se irradiaron bajo luz UV durante 30 minutos y se depositaron en una placa de cultivo de 24 pozos.

La línea celular HOS (ATCC) fue cultivada en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF). De igual manera como en la evaluación de fosfatasa alcalina, se tomaron las células en fase exponencial, se colocaron en cada pozo y se dejaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Las mediciones se realizaron a 72 y 120 h. Posteriormente se retiró la probeta del pozo, se lavó y se fijó por 10 min. Se coloreó con Hoechst 1µg/mL por 10 min en oscuridad. La lectura se realizó en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E400, utilizando el filtro UV2A⁴.

Todos los ensayos se hicieron por duplicado, para cada tiempo de cultivo. En la Tabla 8 se observan en detalle los experimentos realizados tanto para la medición de fosfatasa alcalina como para microscopía de epifluorescencia, teniendo un total de 36 muestras.

Tabla 8. Descripción ensayos para ALP y microscopía de epifluorescencia.

Ensayo	Concentración de quitosano	Concentración de colágeno comercial	Tiempo de tratamiento celular (h)
Control-3, -5	0	0	72, 120
P10-3, -5	0	0,05	72, 120
P11-3, -5	3	0,05	72, 120
P12-3, -5	0	0,075	72, 120
P13-3, -5	3	0,075	72, 120

5.12 MODELAMIENTO DEL SISTEMA BIOLÓGICO BIOPOLÍMERO PLA - PGA MODIFICADO – OSTEÓBLASTOS

Una vez obtenidos y analizados los espectros de impedancia, se prosiguió a realizar la simulación de los circuitos equivalentes encontrados, mediante el

software Zview (Scribner Associates Incorporated). Dichos circuitos modelaron el sistema biológico en estudio, teniendo en cuenta las variables fijas y manipulables de esta investigación.

5.13 PROPIEDADES SUPERFICIALES Y MORFOLOGÍA DEL MATERIAL POLIMÉRICO MODIFICADO – HOS.

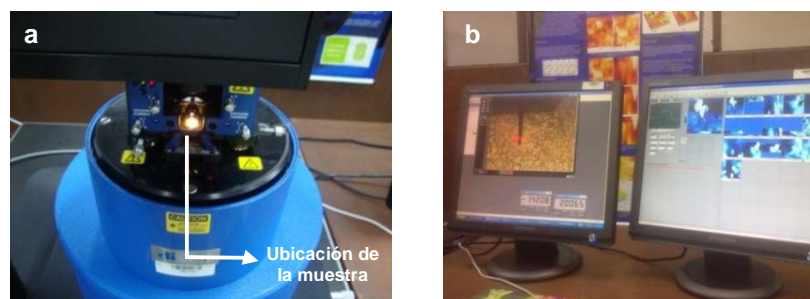
Se observaron los cambios morfológicos del recubrimiento de PLA – PGA modificado y osteoblastos luego del procedimiento experimental bioelectroquímico, por medio de las técnicas de caracterización SEM (espectroscopía electrónica de barrido) y AFM (microscopía de fuerza atómica).

Las muestras biológicas son por lo general, tejidos blandos que poseen un alto contenido de agua y son muy sensibles a los cambios de presión. Debido a esto, la preparación de las muestras en el caso de sistemas biológicos conlleva una serie de pasos especiales, como la fijación de las células, los lavados, la post fijación, la deshidratación, el punto crítico, el recubrimiento con oro y finalmente la observación. Se prepararon los discos para microscopía, fijando las células con 50 µl de metanol, se dejaron secar a -4°C durante 48 h horas. Seguido, se lavaron con PBS y se repitió el procedimiento anterior para la post fijación. El secado por punto crítico (método utilizado para pasar del estado líquido al gas seco, sin causar efectos nocivos en la muestra) se llevó a cabo siguiendo condiciones estándar (CO₂, 31.1°C y 1072 psi), este es un método adecuado para la deshidratación de especímenes biológicos. El anterior procedimiento se llevó a cabo en la Universidad de Antioquia.

Las muestras para AFM se llevaron hasta el punto de post fijación. La caracterización superficial por AFM se realizó en un equipo Auto Probe CP Park de la firma SCIENTIFIC INSTRUMENTS. El análisis de las microscopías se hizo

mediante el software WSxM Scanning Probe Microscopy. En la Figura 16 se muestra el microscopio de fuerza atómica usado y el sistema computacional.

Figura 16. Montaje para ensayos de microscopía de fuerza atómica⁴, a) Microscopio, b) Sistema computacional.



5.14 DISCUSIÓN GENERAL, ANÁLISIS DE RESULTADOS, PUBLICACIÓN Y SOCIALIZACIÓN DE RESULTADOS

A partir de las propiedades dieléctricas de la interacción biopolímero-células osteoblásticas, se determinó un modelo de circuito de impedancia electroquímica que simuló el comportamiento de material biológico en contacto con el biomaterial, ambos en medio de cultivo celular. Se llevó a cabo un análisis estadístico de los resultados obtenidos en donde se observaron posibles tendencias. Se encontró la influencia del biomaterial modificado sobre el comportamiento eléctrico de la interacción recubrimiento-material biológico. Adicionalmente se evaluó superficial y morfológicamente el recubrimiento luego de las pruebas experimentales por SEM y AFM, observando la relación existente con el comportamiento eléctrico y la actividad (ALP) del material biológico.

Se presentarán los resultados de esta investigación tanto a Colciencias como a la comunidad universitaria, así como se pretende publicar un artículo en una revista indexada por Colciencias.

⁴ Grupo de Óptica y Tratamiento de Señales. Escuela de Física-UIS.

6

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

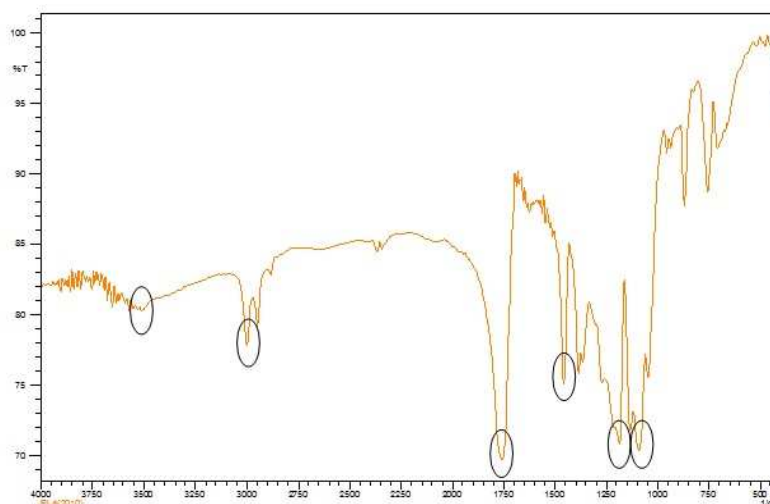
6.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES

En la caracterización de los diferentes materiales, se pudo evidenciar que, los materiales sintetizados en el laboratorio y los usados, en el caso del colágeno comercial, corresponden con las características químicas requeridas.

6.1.1 Caracterización de ácido poliláctico PLA

En la Figura 17 se presenta el espectro FTIR que muestra el porcentaje de transmitancia vs longitud de onda del PLA sintetizado en laboratorio. Este espectro se comparó con el espectro encontrado en la literatura y se presentó similitud de los picos de absorción.

Figura 17. Espectro FTIR de ácido poliláctico.



Se observa un pico característico en una banda ancha en la región de 3510 cm^{-1} , el cual está asociado a la vibración de alargamiento de un grupo -OH , un pico a 3000 cm^{-1} es debido a la vibración de alargamiento para un grupo C-H ,

característico de los alcanos. La señal del grupo carbonilo se encuentra bien definida (C=O), lo cual es característico del ácido poliláctico [40]. En la zona de 1300 a 1000 cm^{-1} , aparecen varias bandas, una más fuerte que las otras, asociada a la banda de estiramiento del grupo C-O. En la Tabla 9 se observan los picos que representan los diferentes grupos funcionales presentes en la estructura del ácido poliláctico obtenido y referenciado.

Tabla 9. Grupos funcionales del ácido poliláctico obtenido y referenciado.

Grupo	O-H	C-H	C=O	CH ₃	C-C	C-O
Señal (cm^{-1})	3510	3000	1756	1450	1190	1086
Señal (cm^{-1}) [40]	3508.2	2988.9	1738.2	1448.7	~1200	1080.7

Se evidencia la similitud de las bandas y los grupos funcionales presentes, lo que confirma que el polímero sintetizado en el laboratorio es similar al ácido poli (L-láctico) referenciado.

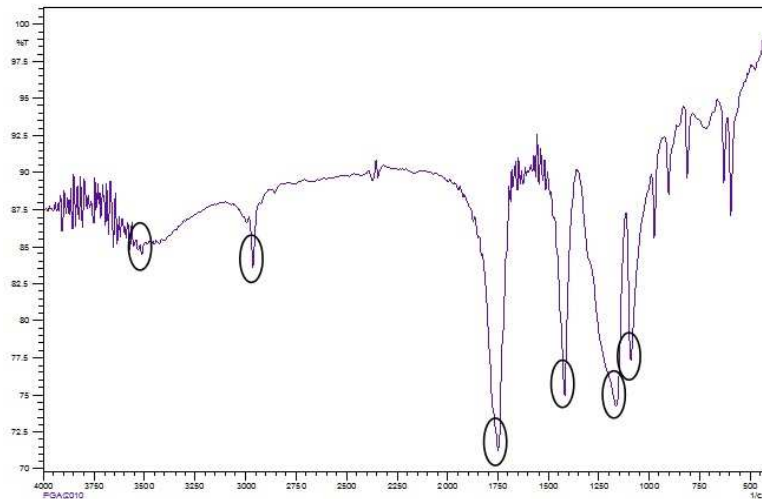
6.1.2 Caracterización del ácido poliglicólico.

En la Figura 18 se presenta el espectro FTIR que muestra la absorción del PGA sintetizado en laboratorio. En la Tabla 10 se muestran las bandas que representan los grupos funcionales del PGA sintetizado y de la literatura.

Tabla 10. Grupos Funcionales del ácido poliglicólico obtenido y referenciado.

Grupo	O-H	C-H	C=O	CH ₃	C-C	C-O
Señal (cm^{-1})	3500	2950	1750	1425	1160	1090
Señal (cm^{-1}) [41]	3500	2850-3000	1727-1750	1430	1200	1102

Figura 18. Espectro FTIR ácido poliglicólico



El espectro IR para el ácido poliglicólico sintetizado, muestra bandas características principalmente debido a las bandas de los grupos funcionales metilo y carboxílico. Según Pandey y sus colaboradores [41], para el PGA, las bandas típicas se encuentran alrededor de 2960 cm^{-1} (-CH), 1430 cm^{-1} (-CH₃), 1102 cm^{-1} (-C-O). Una señal de banda fuerte alrededor de 1727 cm^{-1} es característica del grupo [C=O]. Los grupos funcionales de las bandas que comprenden la región entre $1000\text{-}800\text{ cm}^{-1}$, se deben posiblemente a mezclas de modos vibracionales de unidades repetitivas [-C-C-]_n y C-H. Se confirma que el polímero cumple las características químicas requeridas.

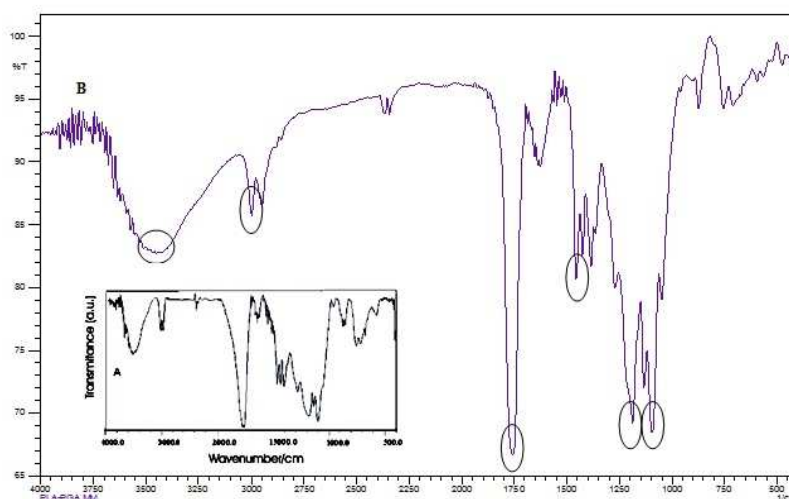
6.1.3 Caracterización del PLA-PGA

En la Figura 19 se muestra el espectro IR realizado a la mezcla PLA-PGA y un espectro del copolímero PLGA reportado en la literatura [42].

Según los autores Martel et al., [43] una banda entre $2851\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, corresponde al enlace C-H, otra banda con alta intensidad, está localizada a 1756 , que corresponde al doble enlace C=O. Las bandas a 1448 cm^{-1} , 1415 cm^{-1} y 1376 cm^{-1} son atribuidas a vibraciones del grupo CH₃. Las dos primeras corresponden al CH₃

asimétrico, y la última corresponde al CH₃ simétrico del copolímero PLGA, lo cual concuerda con las bandas encontradas para la mezcla PLA-PGA.

Figura 19. Espectro FTIR. A) PLGA y B) PLA-PGA obtenido.



El espectro FTIR del material PLA-PGA presentó las siguientes bandas mostradas en la Tabla 11, en donde se comparan las bandas correspondientes a los grupos funcionales encontrados para el copolímero PLGA.

Tabla 11. Grupos funcionales del PLA-PGA obtenido y PLGA referenciado.

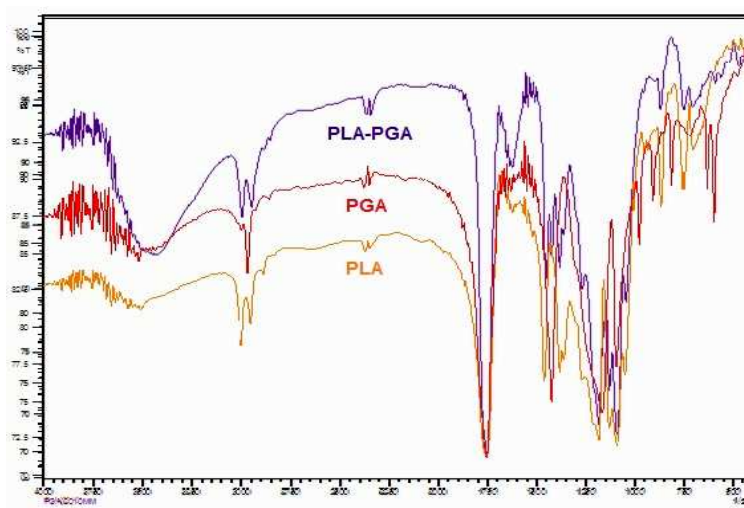
Grupo	O-H	C-H	C=O	CH ₃	C-C	C-O
Señal (cm ⁻¹)	3400-3500	3000	1750	1380-1452	1190	1086
Señal (cm ⁻¹) [42]	3200-3500	2850-3000	1700-1800	1376-1448	-	1050-1250

Adicionalmente la mezcla del ácido poliláctico y poliglicólico sintetizados, muestra una amplia similitud al copolímero PLGA de Sigma Chemical CO⁵ (Poly (DL-lactide-co-glycolide), lactide:glycolide (65:35), peso molecular 40000-75000 g/mol), reportado por Mainardes et al., [42]. En la Figura 20 se muestran los espectros

⁵www.sigmaaldrich.com

superpuestos de PLA, PGA y PLA-PGA en donde se observa que no hubo cambios de los grupos funcionales que caracterizan los polímeros.

Figura 20. Espectros FTIR comparativos de los polímeros obtenidos.



Fuente: El autor (Escuela de Ingeniería Química-UIS).

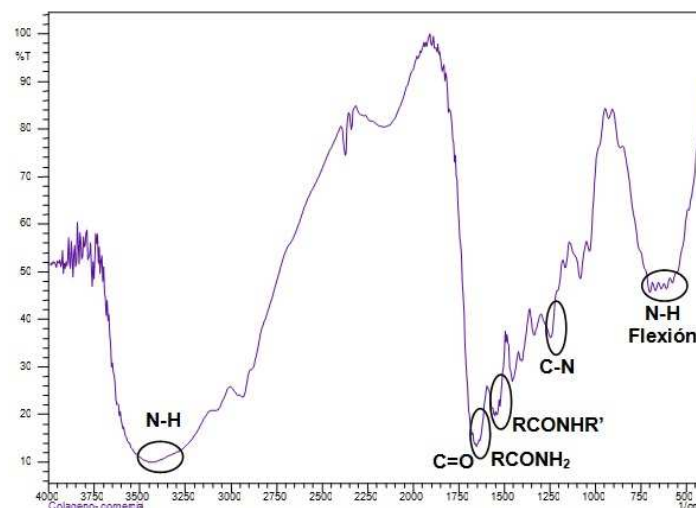
6.1.4 Caracterización del colágeno comercial

En la Figura 21 se muestra el espectro FTIR del colágeno comercial usado para los recubrimientos, en donde se observan las bandas de absorción de los grupos funcionales amida I (RCONH_2) a 1637 cm^{-1} , carbonilo a 1655 cm^{-1} . También muestra una banda ancha en la zona de 3404 cm^{-1} a 3547 cm^{-1} , que se atribuye a las bandas de alargamiento del grupo amina ($-\text{NH}_2$) primaria y secundaria, reportadas dentro de la zona de 3300 a 3500 cm^{-1} , y una banda a 700 cm^{-1} atribuida a la banda de flexión del grupo amina.

De acuerdo a Vidal y Mello [44], la banda de amida I resulta de la vibración de estiramiento del grupo carbonilo del péptido o polipéptido, y muestra tres componentes, a 1633 cm^{-1} , 1643 cm^{-1} y 1660 cm^{-1} , en donde el componente 1660 es el más intenso. El pico de amida I puede estar separado dentro de tres componentes 1651 cm^{-1} , 1642 cm^{-1} y el más intenso 1632 cm^{-1} . El pico de amida

II se encuentra aproximadamente a $\sim 1560\text{ cm}^{-1}$ y la vibración C-N de tensión de amida II está a $\sim 1245\text{ cm}^{-1}$, que en la Figura 21 se encuentra a 1542 cm^{-1} y 1244 cm^{-1} respectivamente.

Figura 21. Espectro FTIR experimental del colágeno comercial



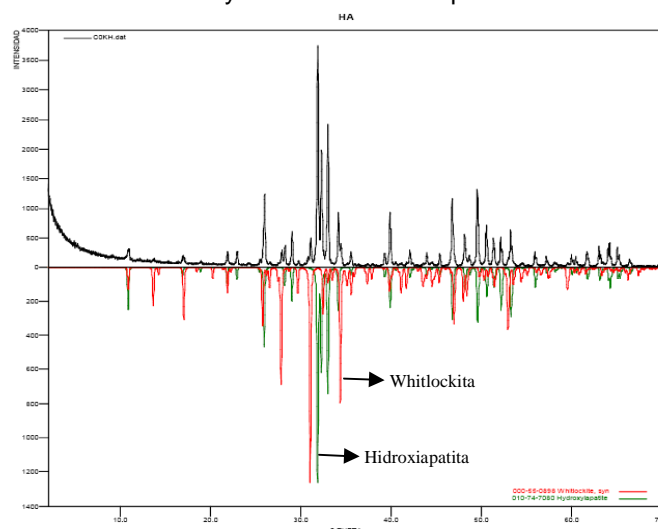
Fuente: El autor (Escuela de Ingeniería Química-UIS).

Con respecto a lo anterior, para el colágeno comercial, se encontraron similitudes en las bandas de los grupos funcionales reportados para el colágeno tipo I, lo cual hace que el colágeno comercial cumpla con las características requeridas.

6.1.5 Caracterización de la hidroxiapatita (HAp)

En la Figura 22 se muestra el diagrama de difracción de rayos X (DRX) para la HAp sintetizada. 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).

Figura 22. Diagrama de difracción de rayos X de la hidroxiapatita obtenida



Fuente: El autor (Laboratorio de Difracción de Rayos X-UIS).

La caracterización de la HAp por difracción de rayos X mostró la presencia de fases cristalinas de hidroxiapatita y fosfato tricálcico (whitlockita). Este último se presenta en menor proporción, reportándose como un precursor de la HAp [45]. En la Tabla 12 se muestra las fases encontradas en la HAp, correspondientes al análisis cuantitativo por DRX en la que no se presentan fases amorfas.

Tabla 12. Fases de la hidroxiapatita sintetizada.

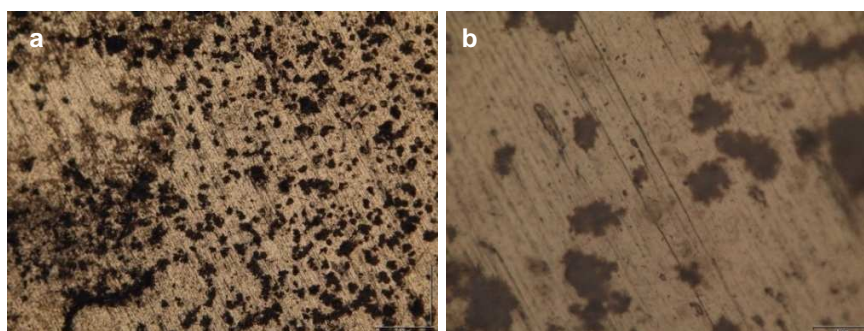
	FASE	No. TARJETA PDF-2	NOMBRE	CUANTITATIVO
Cristalinos	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	010-74-7080	Hidroxiapatita	84.9 % (D.E = 0.5)
	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	000-55-0898	Whitlockita	15.1 % (D.E = 0.4)

D.E = Desviación estándar

6.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS: MICROSCOPIA ÓPTICA

En las Figuras 23 a la 27, se observan las superficies de los recubrimientos obtenidos a las diferentes concentraciones de quitosano (Q) y colágeno (Col).

Figura 23. Microscopía óptica del recubrimiento PLA-PGA/HAp. (a) 10X, (b) 50X.



En el recubrimiento PLA-PGA/HAp hay aglomeraciones de partículas, una ampliación a 50X aumentos muestra espacios libres en el disco de Ti6Al4V, evidenciándose una superficie no uniforme.

Figura 24. Microscopía óptica del recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.05%). (a) 10X, (b) 20X.

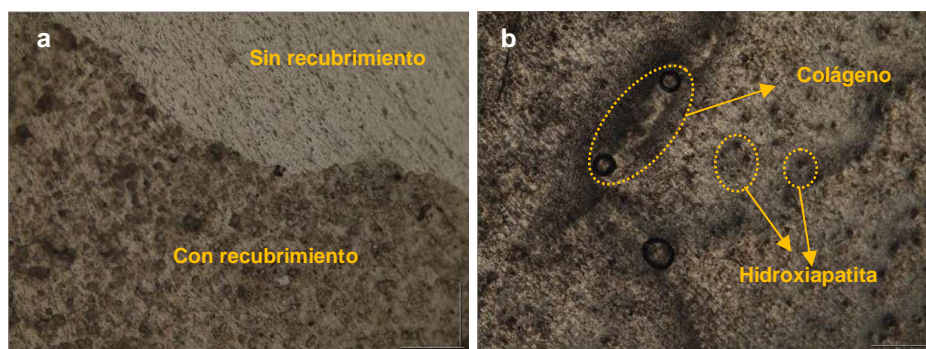
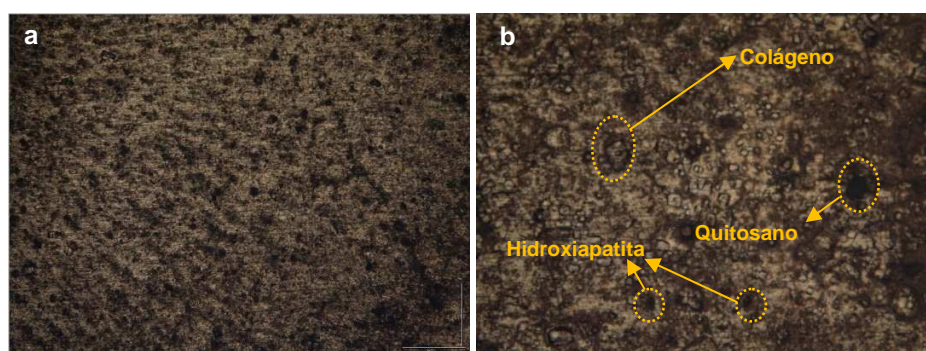


Figura 25. Microscopía óptica del recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.05%). (a) 10X, (b) 20X.



La morfología superficial de los recubrimientos presentó cambios con la adición de quitosano, el cual hace la superficie más uniforme. Superficies más irregulares se presentaron para los recubrimientos que tienen colágeno y no tienen quitosano. En la Figura 25 b) es posible diferenciar los diferentes compuestos del recubrimiento que tiene todos los componentes propuestos en esta investigación, las partículas más grandes son el quitosano, este muchas veces funciona como un integrador de las partículas de fosfato de calcio, o a veces entre sí, para formar redes [46], por lo que las partículas más pequeñas son la HAp. El colágeno se encuentra uniformemente en todo el recubrimiento, pero cuando éste se seca, aparecen los cristales de sal del soluto del colágeno, que contiene sales de PBS y colágeno. Esto se corroboró agregando uno a uno cada componente y observando la morfología.

Figura 26. Microscopía óptica del recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.075%). (a) 20X, (b) 50X.

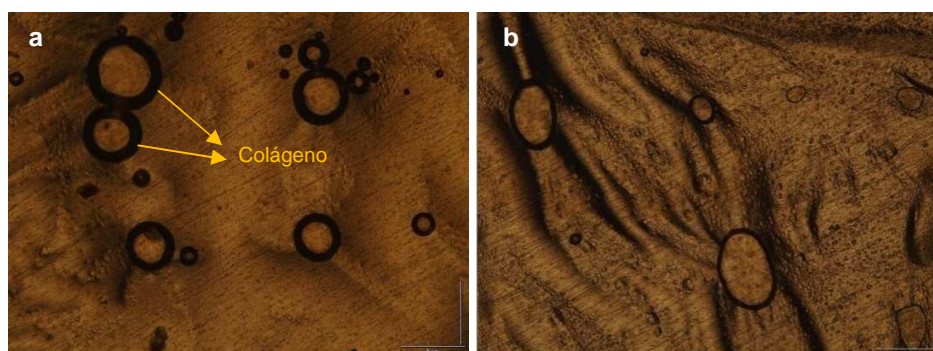
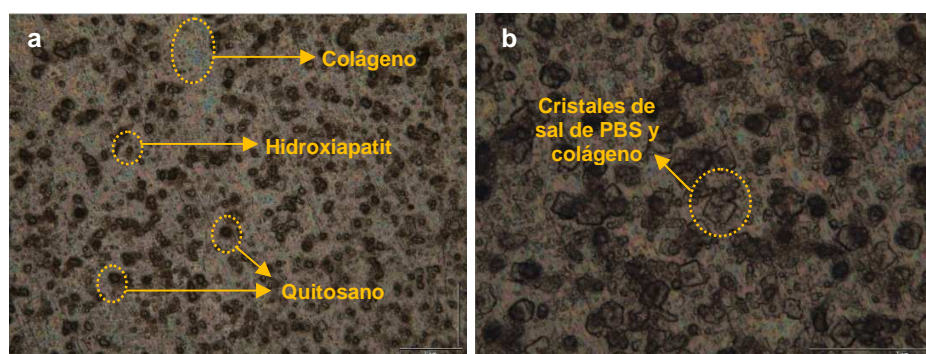


Figura 27. Microscopía óptica del recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%). (a) 10X, (b) 20X.



El aumento en la concentración de colágeno aparentemente no modifica la morfología de los recubrimientos. Sin embargo la adición de quitosano influye en las características superficiales del recubrimiento. Se sabe que los poros en la morfología de un composito de regeneración ósea, son de gran importancia para crear un microambiente estable de actividad enzimática y de proteínas, durante largos periodos de tiempo [43]. Aunque con la microscopías ópticas no se observan los poros, la pregunta es si la alta irregularidad de la superficie (rugosidad) es o no deseada para la adherencia y el desarrollo celular.

6.3 EVALUACIÓN BIOELECTROQUÍMICA DE HOS SOBRE RECUBRIMIENTO DE MATRIZ POLIMÉRICA

Se evaluaron bioelectroquímicamente las células HOS y el medio de cultivo sobre el recubrimiento polimérico modificado, mediante tres técnicas: potencial de corrosión, espectroscopía de impedancia electroquímica y voltametría cíclica. Para cada ensayo se realizó cada técnica a 1, 3 y 5 días con medio de cultivo con y sin células sobre el recubrimiento.

6.3.1 Evolución del potencial de corrosión E_{corr} vs tiempo

Antes de las mediciones de EIE, se registró el potencial de corrosión durante 300 segundos hasta que el potencial se estabilizó. En la Figura 28 se muestra un diagrama del potencial de corrosión a los diferentes tiempos de medición. En la Figura 29 se muestra la evolución del potencial de corrosión estable a los tres tiempos de medición de discos de Ti6Al4V recubiertos e inmersos en medio de cultivo sin y con células.

Figura 28. Estabilización del potencial de corrosión para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%)-Rpmi+HOS (15000cel/mL)

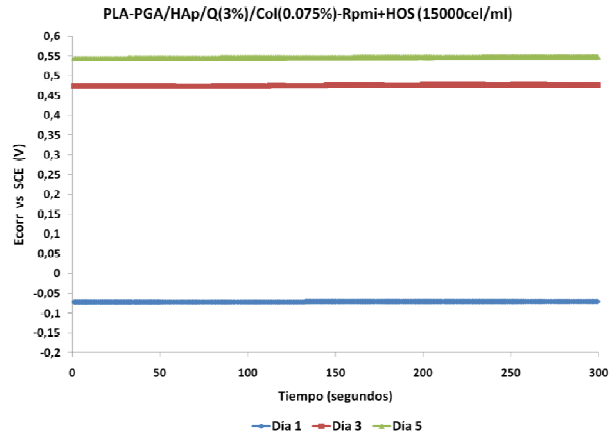
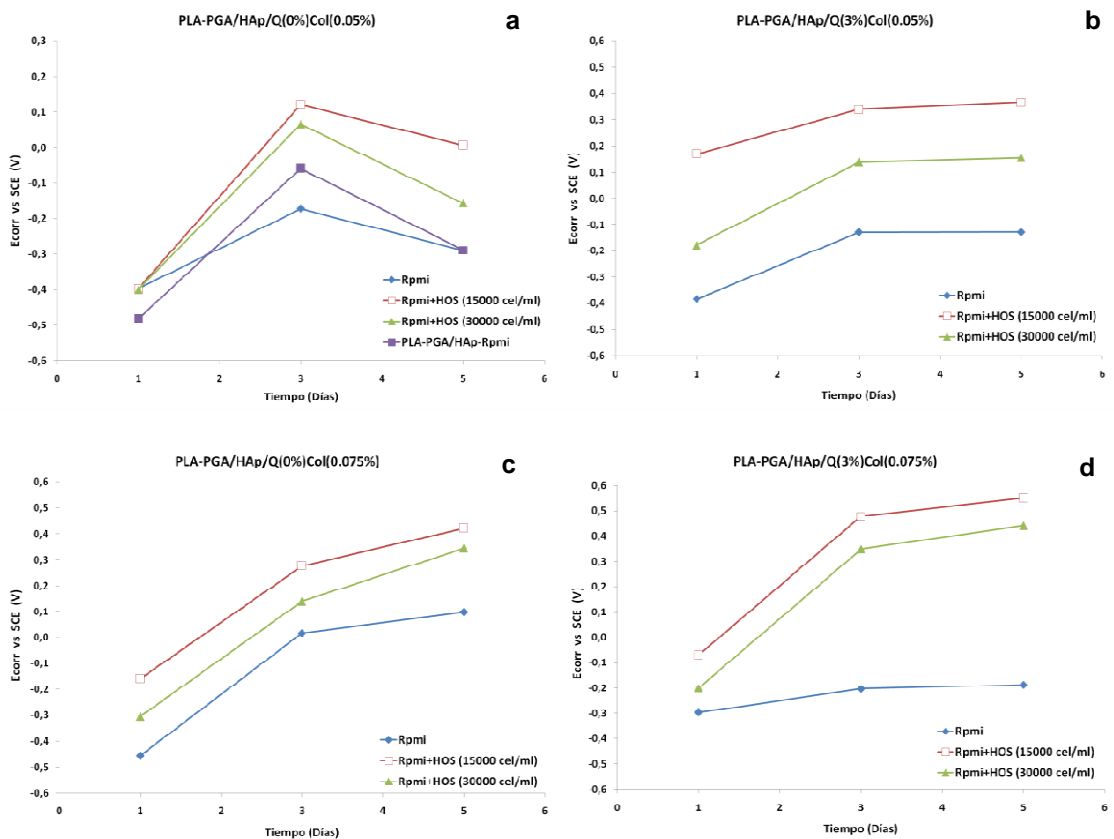


Figura 29. Evolución del potencial de corrosión vs tiempo. (a) PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.05%), (b) PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.05%), (c) PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.075%), (d) PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%).



El potencial de corrosión para los recubrimientos correspondientes al blanco (PLA-PGA/HAp) y a PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.05%), en medio de cultivo con y sin células HOS, se incrementa al tercer día, y disminuye considerablemente al quinto día en un rango entre 120 a 230 mV. Para los demás recubrimientos, tanto en medio de cultivo, como en medio con células, hay un aumento de potencial de corrosión con el tiempo. Sin embargo, analizando las diferencias de potencial entre el tercer y quinto día, para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.075%), la diferencia de potencial de estabilización fue entre 82 y 205 mV, mientras que para los recubrimientos PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.05%) y PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%), la diferencia de potencial fue entre 0,1-27 mV y 15-92 mV, respectivamente.

Los cambios más grandes de potencial se deben a que al tercer día hay un desprendimiento total de la capa de colágeno tipo I y gran parte del recubrimiento de colágeno comercial en los recubrimientos sin quitosano, confirmando el efecto del quitosano de integrar las partículas de fosfato de calcio [46], lo cual hace que los recubrimientos con quitosano presenten cambios más pequeños en los potenciales de estabilización con el tiempo. Los grupos amino del quitosano interaccionan con los grupos carboxilo del PLA-PGA [43], creando un efecto positivo para la inmovilización de biomoléculas, obteniéndose superficies termodinámicamente más estables para la adhesión y proliferación celular.

Por otro lado, las células se adhieren a los materiales por medio de las proteínas de adhesión como las integrinas (familia de glicoproteínas) y el colágeno. Estas generan diversos tipos de proteínas, ácidos orgánicos y aminoácidos. Un espacio se forma entre las células y el material debido a que la membrana de la célula está rodeada de las proteínas de adhesión. De acuerdo con Hiromoto S. et al. [47], una capa de adsorción de biomoléculas que contienen proteínas de las células se forma sobre la superficie del material y esta capa posiblemente previene la interacción de iones y moléculas del medio de cultivo a través de la capa adhesiva

de células, haciendo los potenciales de corrosión más nobles. Con respecto a lo anterior, se observa en la Figura 29 que los potenciales correspondientes a células en todos los recubrimientos son más altos que en medio de cultivo, lo que indica la formación de la capa de proteínas de adhesión. Los potenciales de corrosión más altos de células HOS se obtuvieron para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%).

Es de gran importancia destacar que la biocompatibilidad de un material depende de la adherencia de biomoléculas de interés a la superficie. El contacto de un cuerpo vivo con un material implantado se hace compatible con el entorno mediante el desarrollo de una capa adsorbida compuesta de proteínas que están presentes en el tejido circundante.

6.3.2 Análisis de Impedancia

Los materiales biológicos presentan dos estructuras de compartimientos conductivos, espacios extra e intracelulares separados por membranas aislantes. La conducción de corriente eléctrica a través de las estructuras es altamente dependiente de la frecuencia [32]. Los espectros de impedancia en los rangos de frecuencia, reflejan las propiedades de las estructuras.

Se presentan los espectros correspondientes a los diagramas de Bode y Nyquist para los recubrimientos con diferentes concentraciones de quitosano y colágeno, inmersos en medio de cultivo Rpmi y HOS, para una concentración celular de 30000 cel/mL (ver Figuras 30 a la 33). En el Anexo A, se presentan los demás espectros para una concentración celular de 15000 cel/mL a diferentes tiempos de medición y para las mediciones con Rpmi.

Figura 30. Espectros de impedancia obtenidos para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.05%), para la concentración celular 30000 cel/mL, a los diferentes tiempos de medición. (a) diagrama de Bode, (b) diagrama de Nyquist.

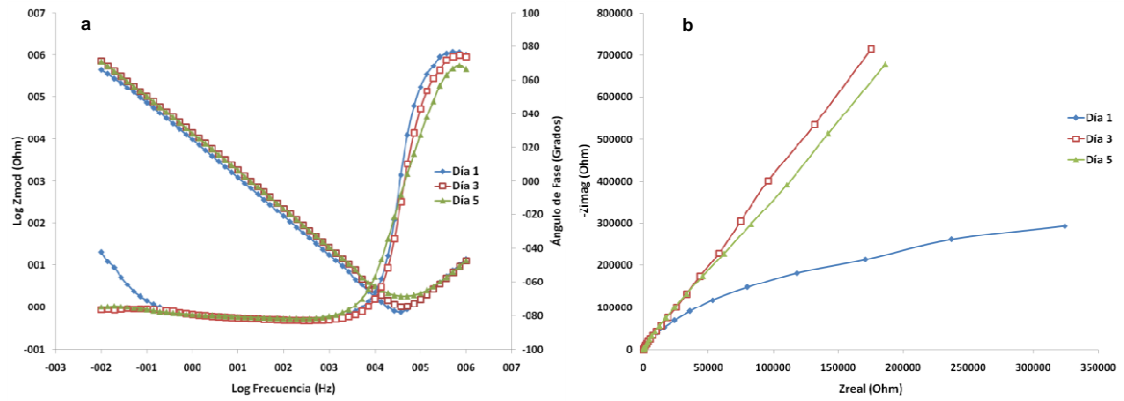


Figura 31. Espectros de impedancia obtenidos para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.05%), concentración celular 30000 cel/mL, a los diferentes tiempos de medición. (a) diagrama de Bode, (b) diagrama de Nyquist.

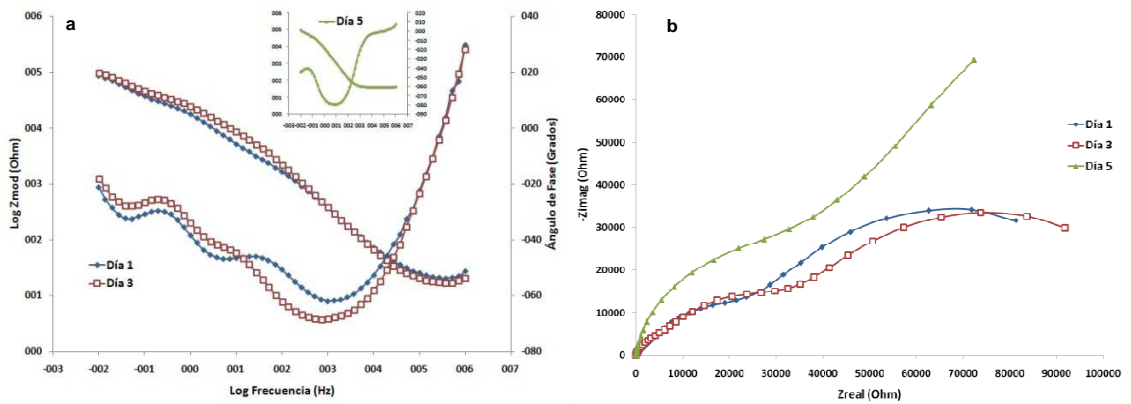


Figura 32. Espectros de impedancia obtenidos para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.075%), concentración celular 30000 cel/mL, a los diferentes tiempos de medición. (a) diagrama de Bode, (b) diagrama de Nyquist.

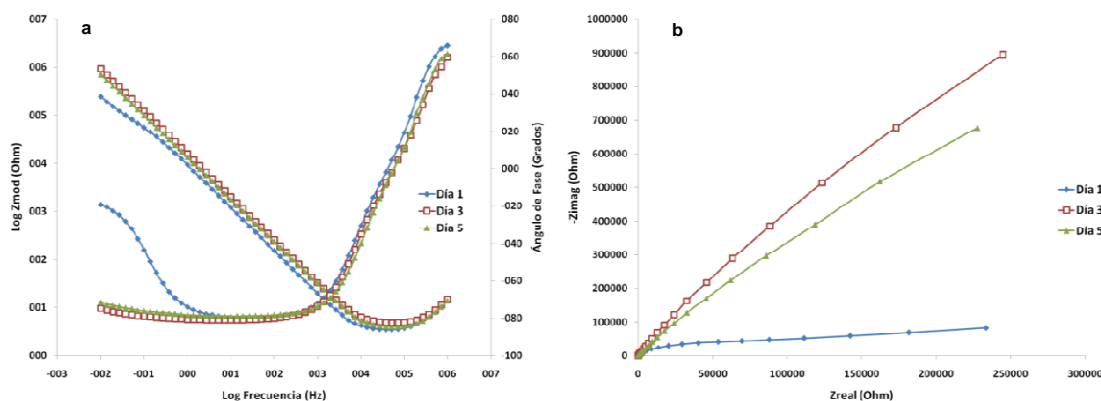
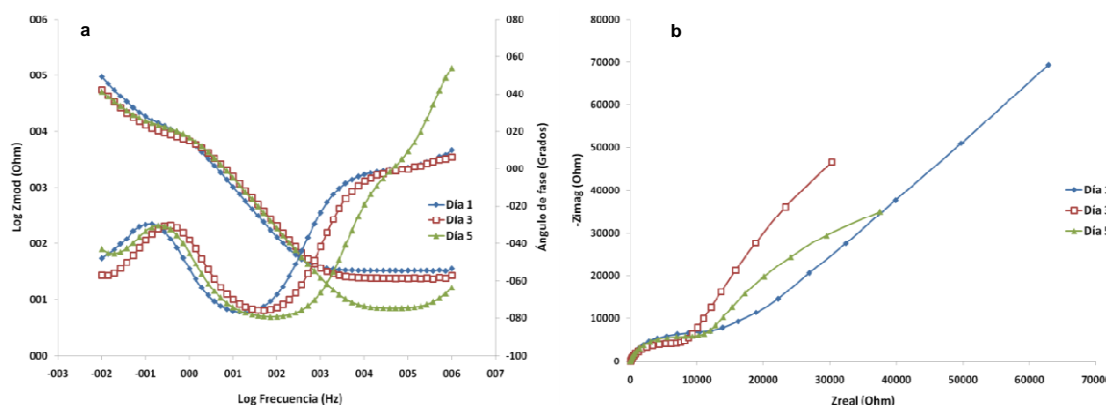


Figura 33. Espectros de impedancia obtenidos para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%), concentración celular 30000 cel/mL, a los diferentes tiempos de medición. (a) diagrama de Bode, (b) diagrama de Nyquist.



En la región de alta a media frecuencia, se encuentran los procesos que se llevan a cabo en la interfase medio de cultivo-células HOS. En la región de media a baja frecuencia se detectan los procesos de transferencia de carga y transferencia de masa que tienen lugar en la interfase proteínas o biomoléculas de adsorción-recubrimiento o al interior de los poros del recubrimiento. De acuerdo a los espectros de impedancia en las diferentes regiones de frecuencia, se observa la presencia de tres constantes de tiempo, atribuidas a los procesos en las interfases

medio de cultivo Rpmi-células HOS, capa de biomoléculas de adsorción-recubrimiento y recubrimiento-sustrato de Ti6Al4V.

En la mayoría de los espectros de Nyquist se observa un solo semicírculo parcial que se atribuye a una superficie porosa y conductiva [48], evidenciando la porosidad de los recubrimientos. Es importante destacar que las características de superficie tales como composición química, topografía y rugosidad en los implantes ortopédicos desempeñan un papel importante en la adhesión de los osteoblastos. La duración de la adhesión depende de la etapa de fijación que se produce rápidamente y afecta eventos a corto plazo tales como enlaces fisicoquímicos entre las células y materiales y está directamente relacionada con las características de superficie de los biomateriales [33].

La respuesta electroquímica del recubrimiento de matriz polimérica sin quitosano en presencia de células osteoblásticas revela ángulos de fase de frecuencias medias a bajas entre -70° a -80° . Esta respuesta es también asociada con el inicio de la adhesión celular a través de las proteínas y biomoléculas de adsorción que forman la matriz extracelular [33]. Los ángulos de fase para los recubrimientos con quitosano y con la mayor concentración de colágeno, en presencia de células, se mantienen entre -70° a -80° a medias frecuencias y aumentan a valores entre -40° a -50° a bajas frecuencias, asociados a procesos de control mixto en donde se llevan a cabo procesos de transferencia de carga y masa. Esa transferencia de masa se define como la difusión de las proteínas de adsorción al interior de los poros del recubrimiento.

El incremento no lineal del módulo de impedancia en el barrido de frecuencias, indica la presencia de más de una capacitancia, relacionadas con las constantes de tiempo. Estas capacitancias corresponden a la capacitancia de las células, la capa de adsorción de biomoléculas y el recubrimiento, mostrando las dos estructuras de compartimientos conductivos de los materiales biológicos.

En las Figuras 34 y 35, se muestran los espectros de Nyquist para todos los recubrimientos en medio de cultivo y células para un tiempo de incubación celular de 5 días.

Figura 34. Diagramas de Nyquist obtenidos para todos los recubrimientos, concentración celular de 15000 cel/mL, tiempo de cultivo de 5 días y para el blanco en Rpmi.

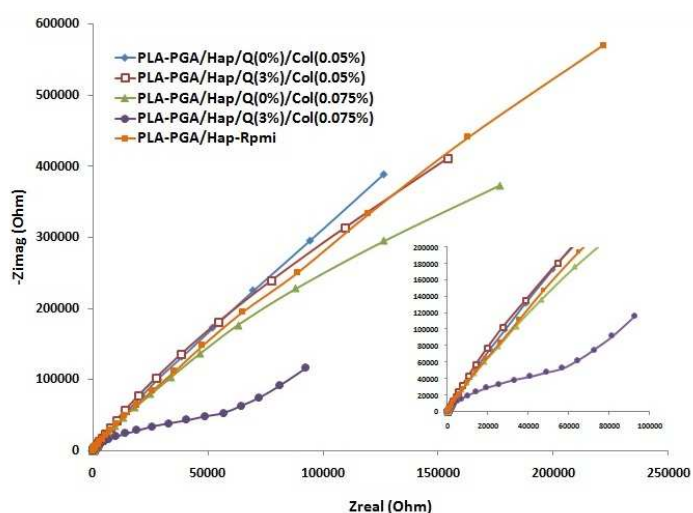
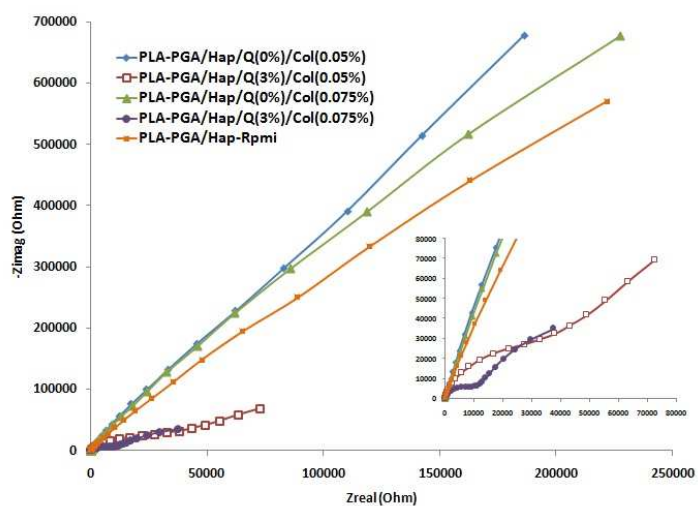


Figura 35. Diagramas de Nyquist obtenidos para todos los recubrimientos, con una concentración celular de 30000 cel/mL, tiempo de cultivo de 5 días y para el blanco en Rpmi.

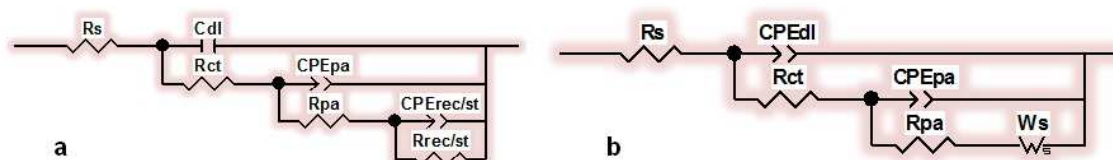


En la Figura 34, se hace una comparación de los recubrimientos para una concentración celular de 15000 cel/mL y el blanco en medio de cultivo en donde se muestra que hay una disminución en los valores de resistencia cuando hay presencia de quitosano o cuando la concentración de colágeno es mayor (ver Anexo B - tablas B3 y B4). Para el blanco (PLA-PGA/HAp) en Rpmi se presenta mayor impedancia. Para los ensayos con concentración celular de 30000 cel/mL los mejores resultados se presentaron para los recubrimientos PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.05%) y PLA-PGA/HAp/Q(3%)/ Col(0.075%) (ver Figura 35), lo cual se relaciona con las propiedades del quitosano de promover la adsorción de proteínas y biomoléculas de adhesión celular, y por tanto la proliferación de células.

6.3.3 Modelos de circuitos de impedancia electroquímica del sistema Rpmi – PLA-PGA y Rpmi – HOS – PLA-PGA modificado.

Mediante circuitos equivalentes se ajustaron los datos obtenidos de impedancia tanto de los ensayos con medio de cultivo como con medio y células. En la Figura 36 se muestran los modelos propuestos para los ensayos con medio de cultivo. La Figura 36 a) se obtuvo para todos los recubrimientos excepto el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%), en donde se evidenció difusión representado por los diagramas de Bode y Nyquist expuestos en el Anexo A. El circuito obtenido para este caso se muestra en la Figura 36 b).

Figura 36. Circuitos equivalentes usados para el ajuste de los datos obtenidos de impedancia para los ensayos en medio de cultivo Rpmi. (a) Sin difusión y (b) con difusión.

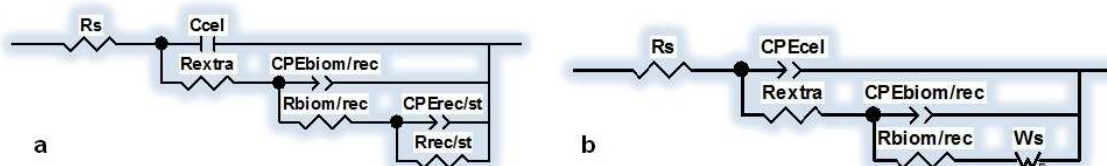


En donde R_s es la resistencia de la solución, C_{dl} es la capacitancia de la doble capa electroquímica, R_{ct} es la resistencia a la transferencia de carga en esa

interfase, CPE_{pa} es el elemento de fase constante debido a la capa de proteínas adsorbidas en la interfase proteínas-recubrimiento, R_{pa} es la resistencia asociada a la adsorción de proteínas en la interfase proteínas-recubrimiento, $CPE_{rec/st}$ es el elemento de fase constante de la interfase recubrimiento-sustrato, $R_{rec/st}$ es la resistencia de la interfase recubrimiento-sustrato y W_s es la impedancia de Warburg con fronteras transmisivas, asociada a la difusión de proteínas en la interfase recubrimiento-capas de proteínas.

En la Figura 37 se muestran los circuitos propuestos para los ensayos con medio de cultivo y células HOS a las dos concentraciones celulares. La Figura 37 a) se obtuvo para los ensayos en los que no hubo difusión y la Figura 37 b) para los ensayos en los que se presentó difusión: PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%) a 15000 y 30000 cel/mL y PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.05%) a 30000 cel/mL.

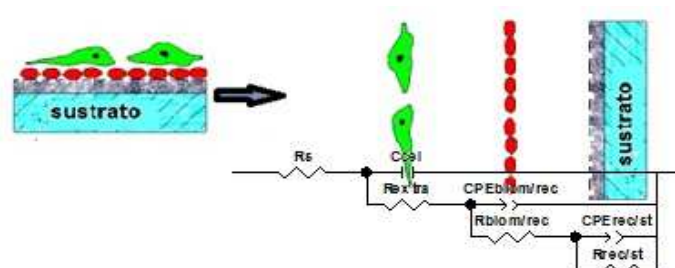
Figura 37. Circuitos equivalentes usados para el ajuste de los datos obtenidos de impedancia para los ensayos en medio de cultivo Rpmi. (a) Sin difusión y (b) con difusión.



En donde R_s es la resistencia a la solución, C_{cel} es la capacitancia de las células, R_{extra} es la resistencia asociada con la matriz extracelular excretada por las células en la interfase células-biomoléculas de adsorción, $CPE_{biom/rec}$ es el elemento de fase constante debido a la interfase capa de biomoléculas adsorbidas-recubrimiento, $R_{biom/rec}$ es la resistencia asociada a la interfase biomoléculas adsorbidas-recubrimiento, $CPE_{rec/st}$ es el elemento de fase constante de la interfase recubrimiento-sustrato, $R_{rec/st}$ es la resistencia de dicha interfase y W_s es la impedancia de warburg con fronteras transmisivas, asociada a la difusión de biomoléculas en la interfase recubrimiento-capas de biomoléculas. En

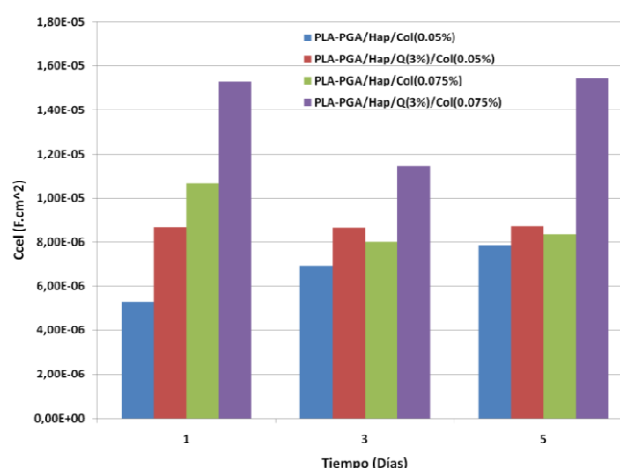
la Figura 38 se muestra una representación del sistema biológico en estudio, para el circuito equivalente de la Figura 37 a).

Figura 38. Representación del sistema biológico y su circuito equivalente.



A partir de la simulación de los circuitos equivalentes mediante el software Zview[®], se encontraron los valores de capacitancia, resistencia e impedancia de warburg, que describen eléctricamente las diferentes interfases presentadas en los diferentes sistemas biológicos. En el Anexo B, se listan estos valores para todos los ensayos a los tiempos de medición de 1, 3 y 5 días. En la Figura 39 se muestra los valores de Ccel para una concentración celular de 15000 cel/mL.

Figura 39. Capacitancia celular vs tiempo de cultivo celular (15000 cel/mL).



Se observa que con el quitosano en la matriz polimérica, se presenta un mayor valor de la capacitancia celular, esta capacitancia se encuentra dentro de un rango

de frecuencia entre 10 Hz a 100 KHz. Aunque en el recubrimiento sin quitosano y con la mayor concentración de colágeno se observaron altos valores de capacitancia celular ($7,99 - 10,6 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^2$), a los diferentes tiempos de incubación celular, se obtuvieron mayores valores de capacitancia celular respecto a la mayor concentración de quitosano y colágeno.

6.3.4 Análisis de permitividad y conductividad

Para determinar la permitividad de las mezclas poliméricas propuestas con medio de cultivo y células se empleó la ecuación 7 de permitividad compleja, análoga a la ecuación 5, donde la parte real corresponde a la permitividad relativa (ecuación 8) y la parte imaginaria (ecuación 9) es la pérdida dieléctrica [49], correspondiente a la pérdida disipativa asociada con el movimiento de cargas polarizables en fase con el campo eléctrico [23]. Como se observa en la Figura 3, la parte real de la permitividad es la que permite distinguir las diferentes relaciones:

$$\tilde{\epsilon}(\omega) = \epsilon'(\omega) - i\epsilon''(\omega) \quad (7)$$

$$\epsilon' = \frac{G}{(1+\omega^2 C^2 R^2) \cdot \epsilon_0} \quad (8)$$

$$\epsilon'' = \frac{G}{\omega} + \frac{\omega C^2 R}{(1+\omega^2 C^2 R^2) \cdot \epsilon_0} \quad (9)$$

Donde $\omega = 2\pi f$ es la frecuencia angular, $C = 1/2\pi f Z''$ es la capacitancia, $R - Z'$ es la resistencia, G es la conductancia (parte real de la admitancia) y $\epsilon_0 = 8,854 \times 10^{-12} \text{ F/m}$ es la permitividad del vacío.

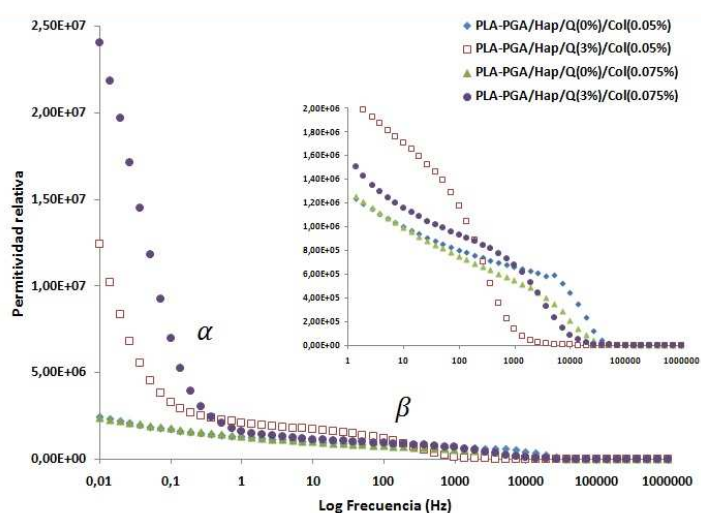
La parte real de la conductividad AC fue calculada usando la siguiente ecuación [50]:

$$\sigma' = G = \frac{Z'}{Z'^2 + Z''^2} \quad (10)$$

En donde Z' es la impedancia real y Z'' es la impedancia imaginaria.

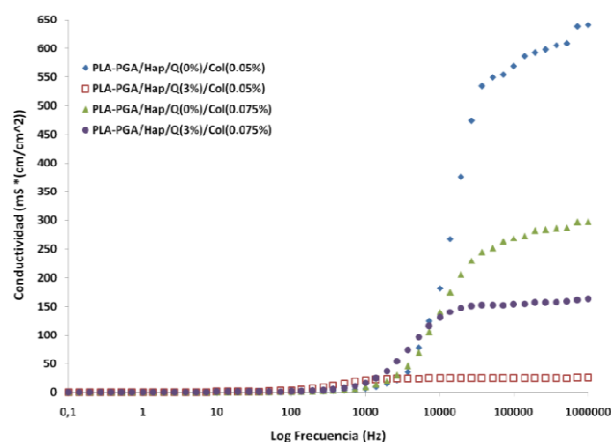
Una dispersión dieléctrica está asociada con los tejidos biológicos, en el que la permitividad relativa decrece con el aumento de la frecuencia. Sin embargo, la corriente de desplazamiento es proporcional a la frecuencia del campo aplicado, y estos dos factores conducen a un comportamiento complicado de la frecuencia [32]. En la Figura 40 se muestra la permitividad relativa vs log frecuencia para todos los recubrimientos a una concentración HOS de 30000 cel/mL y 5 días de incubación celular.

Figura 40. Variación de la permitividad con respecto a la frecuencia.



De acuerdo a los valores encontrados de permitividad relativa y el barrido de frecuencias, para el sistema células HOS-recubrimiento polimérico, se identificaron dos dispersiones alfa y beta en los rangos de frecuencia de 0,01 Hz a 100 Hz asociado con la interfase de los tejidos y de 100 Hz a 1 MHz asociado con la polarización de la membrana celular, proteínas y otras macromoléculas orgánicas. En la Figura 41 se muestra la conductividad AC vs frecuencia para todos los recubrimientos a una concentración HOS de 30000 cel/mL.

Figura 41. Variación de la conductividad con respecto a la frecuencia.



El alto valor de la permitividad a bajas frecuencias indican que los grupos de carga negativa como carboxilos ubicados en la superficie de las células forman una doble capa iónica con los iones positivos del medio, como se observa en la Figura 40, a baja frecuencia la permitividad es mayor para el sistema biológico con el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%). A medida que la frecuencia aumenta, la permitividad disminuye, mostrando la tendencia para un tejido normal, permitiendo identificar la integridad de las membranas celulares adheridas a la superficie del recubrimiento. Hasta aquí el mejor comportamiento ha sido para la superficie polimérica con mayor concentración de quitosano y colágeno, lo cual indica que los fenómenos de difusión iónica de los iones que envuelven la membrana celular (dispersión α) juegan un papel importante en la determinación del comportamiento de los sistemas biológicos [21], así como la polarización de la membrana celular.

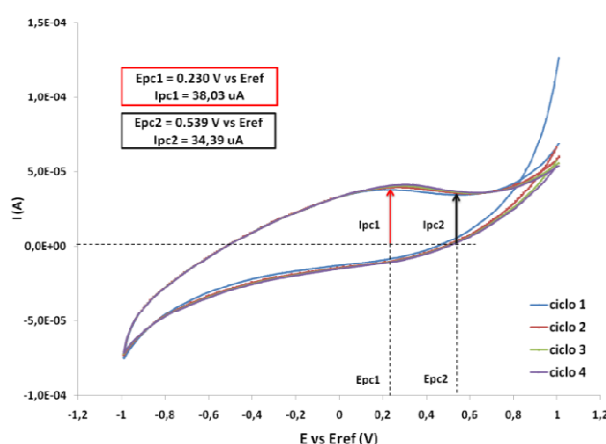
Por otra parte, el aumento en la conductividad para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.05%), probablemente se deba a la rotura de membranas celulares por estrés (desprendimiento de la capa de colágeno), lo cual contribuye a mayor cantidad de iones disueltos en el medio de cultivo y por lo tanto a mayor conductividad, adicionalmente, a alta frecuencia el flujo de corriente pasa tanto por el medio intra como extracelular, no se diferencia un tejido normal (células

integras) a un tejido isquémico (algunas células muertas) (Höber 1912) [17], evidenciado además por el aumento de la impedancia a baja frecuencia (ver Figura 35).

6.3.5 Diagramas de Voltametría Cíclica

La Figura 42 muestra un voltagrama de células HOS, adheridas sobre un sustrato de Ti6Al4V, recubierto con polímero modificado, a las 72 horas de incubación celular, en donde se evidencian los picos de corriente catódica, presentados en la mayoría de los sistemas en estudio. En el Anexo C, se presentan los voltagramas correspondientes a cada sistema a los diferentes tiempos de medición y los datos corriente y voltaje de los picos presentados.

Figura 42. Voltagrama obtenido para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%), concentración celular 30000 cel/mL a 72 horas de incubación celular.



La altura de pico de corriente es de importancia en el análisis de los voltagramas, de acuerdo al estudio de Cobas et al, la altura de pico determina las fases de crecimiento en cultivos de células bacterianas [24]. En ese contexto, los voltagramas con las mismas condiciones de concentración celular y comparando los diferentes recubrimientos, los picos de corriente mayores indican un mejor crecimiento celular en un sistema dado. Además, los picos de corriente se

presentaron todos en la curva de oxidación, asociado con los procesos de adsorción de biomoléculas sobre el electrodo de trabajo.

En la Figura 43 y 44, se muestran los voltagramas de los diferentes sistemas o recubrimientos correspondientes a 5 días de incubación, con una concentración HOS de 15000 cel/mL y 30000 cel/mL respectivamente, en donde se observa en ambos casos que el ancho de pico de corriente menor, se presentó para el recubrimiento sin quitosano y con la menor concentración de colágeno.

Figura 43. Voltagramas obtenidos para todos los recubrimientos, concentración celular de 15000 cel/mL, tiempo de cultivo de 5 días.

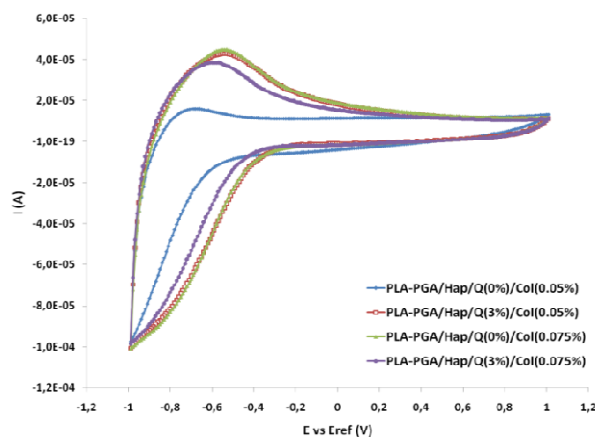
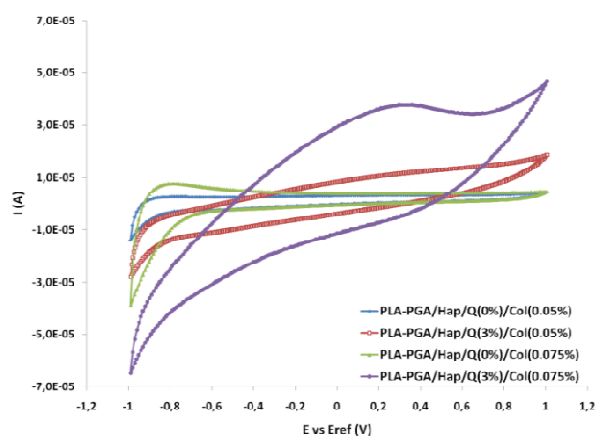


Figura 44. Voltagramas obtenidos para todos los recubrimientos, concentración celular de 30000 cel/mL, tiempo de cultivo de 5 días.

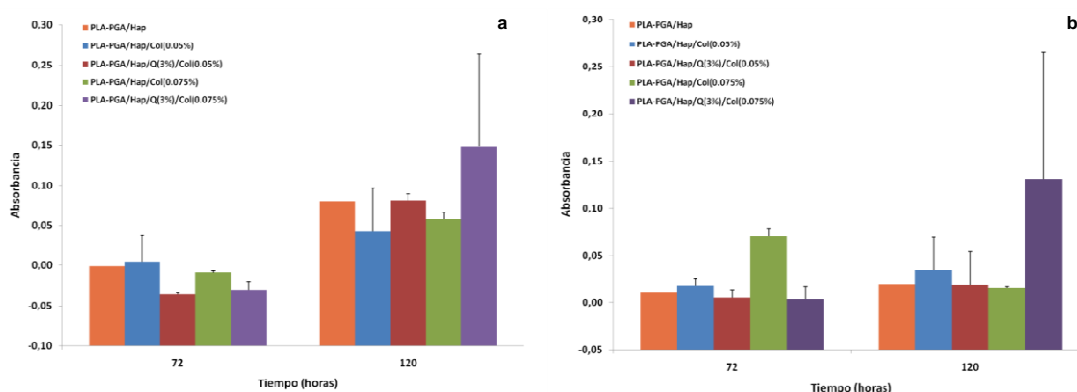


Para una concentración de 15000 cel/mL los recubrimientos se comportaron similarmente, excepto el de menor concentración de colágeno y quitosano, mientras que para 30000 cel/mL, el recubrimiento con la mayor concentración de quitosano y colágeno está muy por encima de los demás, debido a la mayor actividad celular y adsorción de biomoléculas en la superficie del recubrimiento. Observando los valores más altos de pico de corriente para cada ensayo y comparando contra el tiempo de incubación, hubo tendencia al aumento de altura de pico de corriente atribuido al crecimiento de células HOS.

6.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE OSTEÓBLASTOS POR MEDICIÓN DE FOSFATASA ALCALINA

Se determinó la producción de fosfatasa alcalina tanto en los sobrenadantes como en los lisados celulares en diferentes tiempos de incubación de las células (72 y 120 h) sobre los discos de Ti6Al4V recubiertos. La Figura 45 muestra los valores promedio y correspondiente desviación estándar de las absorbancias registradas para los diferentes sistemas con una concentración celular de 30000 cel/mL. En el Anexo D se presentan las tablas de los valores correspondientes a la Figura 45 a) y b).

Figura 45. Producción de fosfatasa alcalina para los diferentes recubrimientos, a) sobrenadantes y b) en los lisados celulares.



Se llevaron a cabo dos ensayos previos en los cuales después de 1 y 2 horas de incubación de las muestras con el sustrato no se evidenció ninguna formación de color en los pozos, mientras que los controles positivos utilizados (datos no mostrados) si presentaban formación de color. Se decidió aumentar el tiempo de incubación a 6 horas para aumentar la sensibilidad de la prueba. Pasadas las 6 horas se evidenció la formación de color en algunos de los sobrenadantes, mientras que la formación de color en los lisados es casi indistinguible del blanco de reactivo.

La diferenciación de los osteoblastos se da a partir del tercer día [51], por lo que en ambos casos la absorbancia a 72 horas es menor que a 120 horas, incluso por debajo del control. Se evidenció la presencia de concentraciones de fosfatasa alcalina mayores en los sobrenadantes que en sus respectivos lisados celulares probablemente por el uso de EDTA, el cuál en ocasiones inhibe la acción de la fosfatasa alcalina por lo que debe evitarse su empleo [52]. De acuerdo a Setzer et al [53], quien realizó estudios de producción de fosfatasa alcalina con coloración para células de tipo osteoblástico, al día 7 de cultivo, las células alcanzan confluencia, empiezan a diferenciar y sólo algunas células son positivas para ALP. Con la iniciación de la producción de matriz (14 días) se puede observar muchas más células positivas para ALP. Las mediciones ALP para los polímeros modificados, mostraron una gran variabilidad representado por desviaciones estándar amplias probablemente debido a que a los cinco días de cultivo, no es posible obtener datos lo suficientemente positivos para fosfatasa alcalina. Sin embargo como se observa en las figuras anteriores el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%), indujo mayor diferenciación celular, apenas en su inicio, tanto en el sobrenadante como en el lisado de las células.

6.5 ADHESIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR POR MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA

Las microscopías se realizaron a 72 y 120 horas de incubación de células HOS, en diferentes sitios del disco con aumentos microscópicos de 10 y 40X. En las Figuras 46 y 47 se muestran las micrografías para el control (PLA-PGA/HAp) a 72 y 120 horas de incubación celular respectivamente.

Figura 46. PLA-PGA/HAp-3. (a), (b) 10X, (c) 40X.

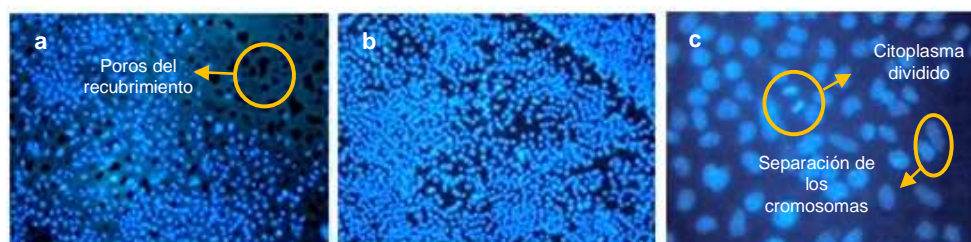


Figura 47. PLA-PGA/HAp-5. (a), (b) 10X, (c) 40X.



En las Figuras 48 y 49 se muestran las micrografías para el recubrimiento (PLA-PGA/HAp/Q(0%)Col(0.05%)) a 72 y 120 horas de incubación respectivamente.

Figura 48. PLA-PGA/HAp/Q(0%)Col(0.05%)-3. (a), (b) 10X, (c) 40X.

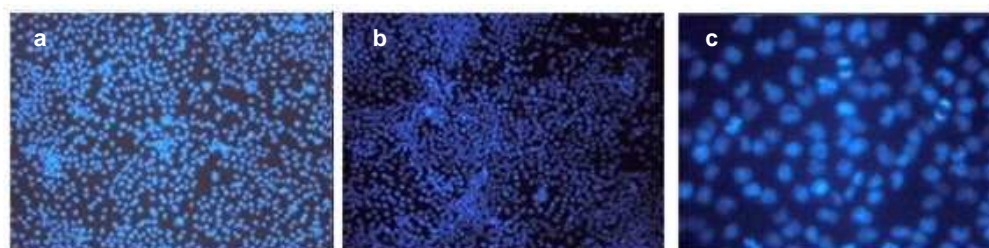
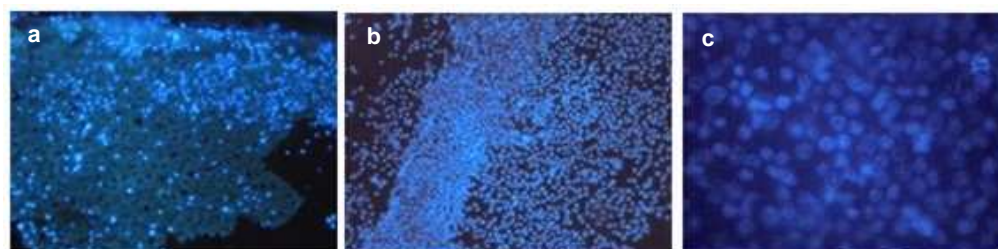


Figura 49. PLA-PGA/HAp/Q(0%)Col(0.05%)-5. (a), (b) 10X, (c) 40X.



En las Figuras 50 y 51 se muestran las micrografías para el recubrimiento (PLA-PGA/HAp/Q(3%)Col(0.05%)) a 72 y 120 horas de incubación celular respectivamente.

Figura 50. PLA-PGA/HAp/Q(3%)Col(0.05%)-3. (a), (b) 10X, (c) 40X.

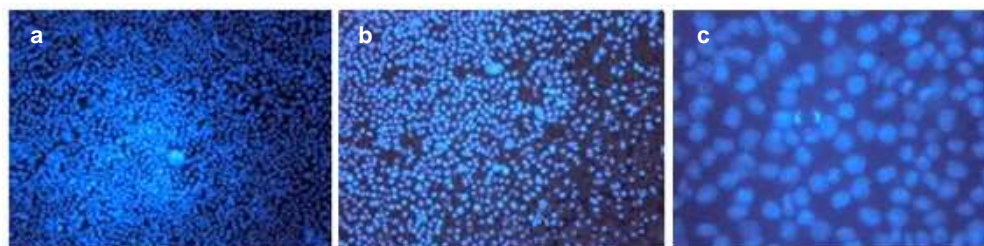
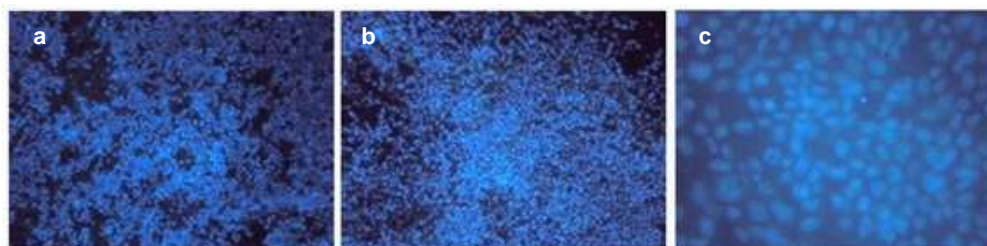


Figura 51. PLA-PGA/HAp/Q(3%)Col(0.05%)-5. (a), (b) 10X, (c) 40X.



En las Figuras 52 y 53 se muestran las micrografías para el recubrimiento (PLA-PGA/HAp/Q(0%)Col(0.075%)) a 72 y 120 horas de incubación celular respectivamente.

Figura 52. PLA-PGA/HAp/Q(0%)Col(0.075%)-3. (a), (b) 10X, (c) 40X.

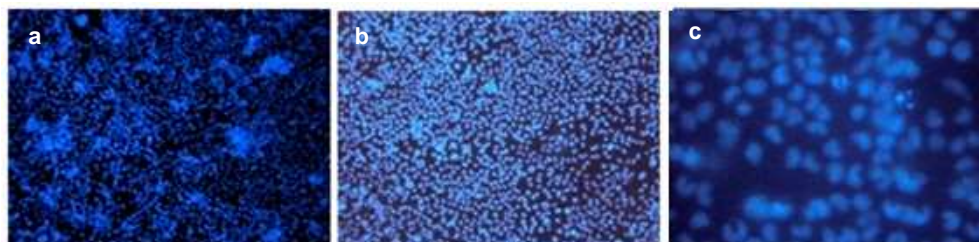
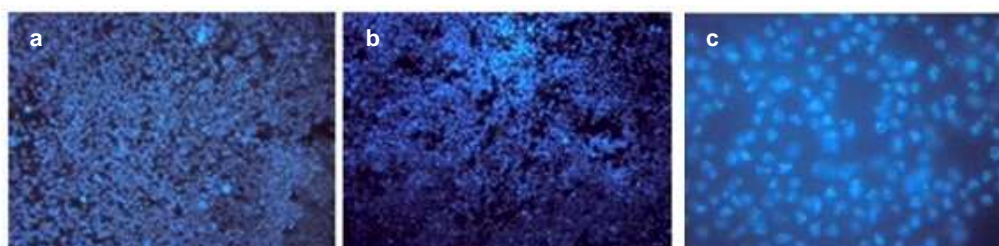


Figura 53. PLA-PGA/HAp/Q(0%)Col(0.075%)-5. (a), (b) 10X, (c) 40X.



En las Figuras 54 y 55 se muestran las micrografías para el recubrimiento (PLA-PGA/HAp/Q(3%)Col(0.075%)) a 72 y 120 horas de incubación celular.

Figura 54. PLA-PGA/HAp/Q(3%)Col(0.075%)-3. (a), (b) 10X, (c) 40X.

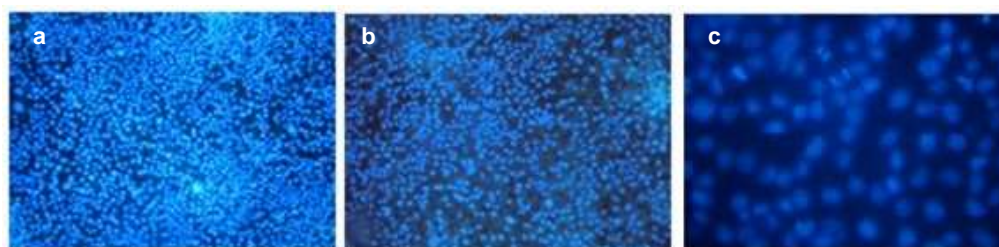


Figura 55. PLA-PGA/HAp/Q(3%)Col(0.075%)-5. (a), (b) 10X, (c) 40X.



Es evidente que en los ensayos realizados, las células HOS son capaces de adherirse a la superficie de los diversos recubrimientos poliméricos. Se observa el aumento de la población celular comparando la hora 72 con la hora 120 de incubación en todos los polímeros, evidenciando así que se lleva a cabo replicación de las células adheridas a la superficie del polímero. En todos los sistemas evaluados a las 72 horas, fue posible evidenciar la presencia de células en mitosis representado por la condensación del núcleo y la forma característica de la mitosis celular, primero duplicando el material genético (cromosomas), luego se separan los dos juegos de cromosomas, se divide el citoplasma y por último la célula duplica su tamaño. Esta etapa de la célula es visible en las fotos tomadas con el objetivo de 40X.

Los recubrimientos poliméricos presentan unos más que otros, un grado de degradación y desprendimiento a medida que pasa el tiempo de incubación. El recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.05%) presenta a las 72 horas un recubrimiento de casi la totalidad del disco, mientras que a las 120 horas un gran porcentaje del recubrimiento se ha desprendido. De igual manera pero en menor proporción presenta el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.075%).

El desprendimiento del recubrimiento a medida que transcurre el tiempo de ensayo, sugiere que el recubrimiento de colágeno no presenta buena adherencia en las superficies sin quitosano, debido principalmente a que durante el proceso electroquímico de deposición se presentaron burbujas probablemente de hidrogeno [54] alrededor de la superficie del electrodo. Lo anterior suma al hecho que se produce un aumento de la impedancia al tercer día de ensayo para las superficies sin quitosano (ver Figuras 30 y 32). Sin embargo el recubrimiento no fue del todo perjudicial para las células, evidenciado por la no turbidez, ni cambio de color o acidificación del medio de cultivo.

Los recubrimientos PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.05%) y PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%) presentan mayor crecimiento comparando la confluencia celular a las 72 y 120 horas de incubación sobre las superficies cubiertas por polímero. El recubrimiento que presentó mayor confluencia y menor desprendimiento del recubrimiento es el de mayor concentración de colágeno y quitosano, concordando estos resultados con los observados en ALP.

6.6 ANÁLISIS POR MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRÓNICO SEM Y MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA AFM

Se llevaron a cabo ensayos SEM sobre los discos de Ti6Al4V recubiertos, luego de los ensayos bioelectroquímicos y un tiempo de 120 horas de incubación celular. Estos ensayos se llevaron a cabo en cinco muestras equivalentes a tres para una concentración celular de 15000 cel/mL y dos para una concentración celular de 30000 cel/mL. En la Figuras 56 a la 60 se presentan las micrografías SEM.

Figura 56. SEM para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.05%) y una concentración celular de 15000 cel/mL. a) 1500X y b) 5000X.

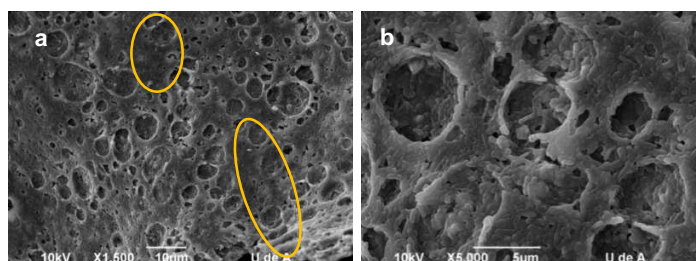


Figura 57. SEM para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.05%) y una concentración celular de 15000 cel/mL. a) 1500X y b) 10000X.

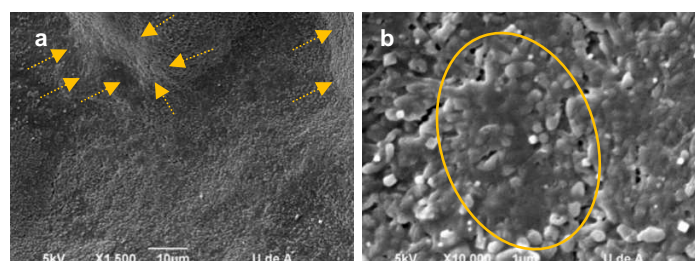


Figura 58. SEM para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%) y una concentración celular de 15000 cel/mL. a) 1000X y b) 5000X.

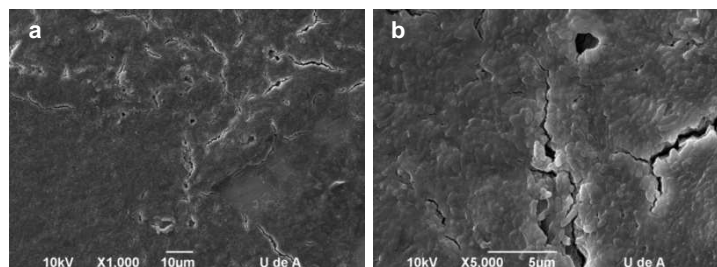


Figura 59. SEM para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.05%) y una concentración celular de 30000 cel/mL. a) 1000X y b) 5000X.

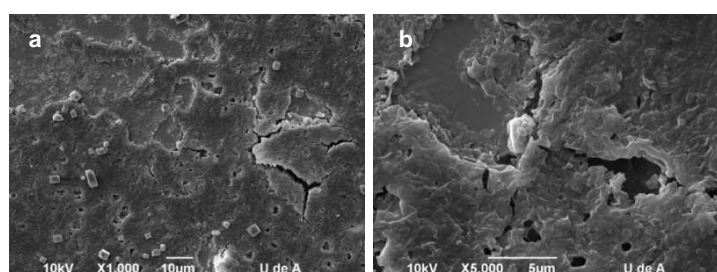
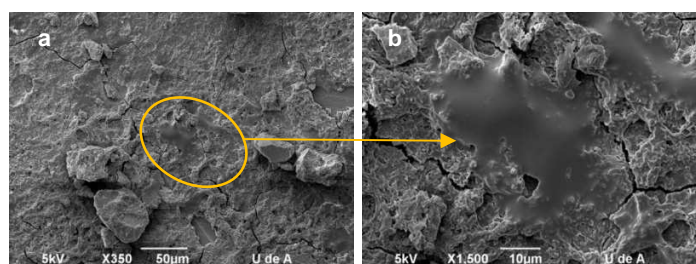


Figura 60. SEM para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%) y una concentración celular de 30000 cel/mL. a) 350X y b) 1500X.



Se pudo observar que la morfología celular cambió con el tiempo de cultivo, las células se mostraron extendidas sobre la superficie de los recubrimientos, presentaron una morfología alargada con extensiones (Figuras 57 y 60). Las células son completamente observadas a menos de 400X (Figura 60). Esta morfología no mostró diferencias significativas en los recubrimientos. Se observa

que hay sitios de Ti6Al4V desnudo, en donde el recubrimiento se desprendió por completo.

A más de 1500 X, Se observa una estructura en forma de panal con macroporos $\sim 5 \mu\text{m}$ (5000X), poros de importancia para el desarrollo celular [43] y una gran cantidad de microporos $\sim 1 \mu\text{m}$ (10000X), poros de importancia para la interacción con proteínas y enzimas [43] (ver Figura 56), como evidencia Zhang et al. [55], en la estructura de compuestos de PLGA/HAp insertados en conejos a 8 semanas luego de la cirugía. Adicionalmente esta estructura es similar a la que presenta el hueso trabecular.

Se llevaron a cabo ensayos de microscopía de fuerza atómica AFM. Estos ensayos se llevaron a cabo en seis muestras (Figuras 61 a la 66) equivalentes a dos para muestras con recubrimiento sin incubación celular sin quitosano y con quitosano 3%; y cuatro muestras equivalentes a las diferentes concentraciones de quitosano y colágeno, a una concentración celular de 30000 cel/mL y un tiempo de incubación de 120 horas.

Figura 61. a) Micrografía por AFM en 3D y 2D, realizada sobre la muestra con recubrimiento PLA-PGA/Hap/Q(0%)/Col(0.075%), sin incubación celular y b) histograma para el cálculo de la rugosidad.

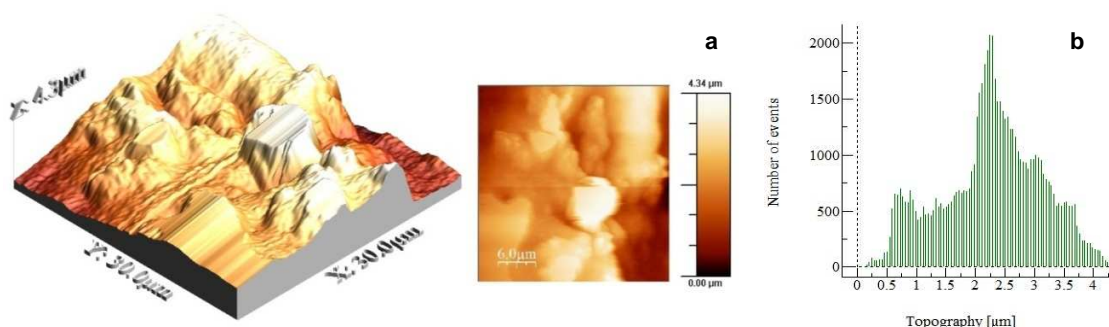
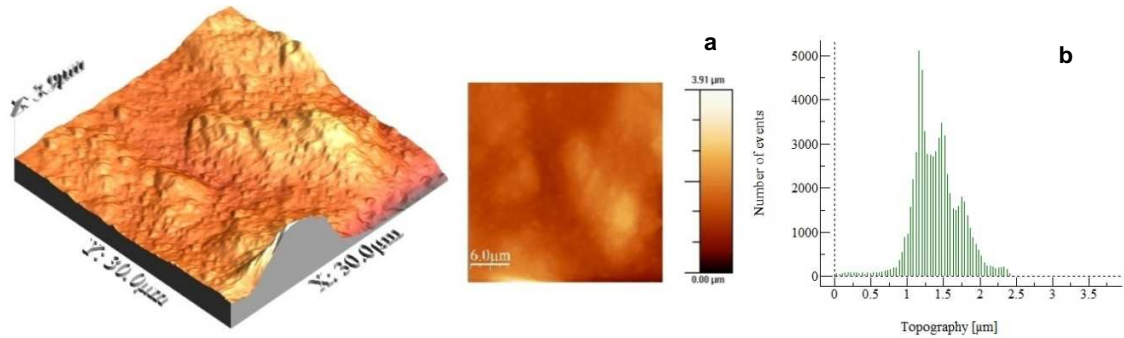


Figura 62. a) Micrografía por AFM en 3D y 2D, realizada sobre la muestra con recubrimiento PLA-PGA/Hap/Q(3%)/Col(0.075%), sin incubación celular y b) histograma para el cálculo de la rugosidad.



De acuerdo a las Figuras 61 y 62, los recubrimientos sin quitosano presentan una rugosidad de 0,8462 con una altura promedio de 2,31 μm y una altura máxima de 4,34 μm y el recubrimiento con quitosano presenta una rugosidad de 0,3806 con una altura promedio de 1,46 μm y una máxima altura máxima de 3,91 μm . Con respecto a los análisis electroquímicos, morfológicos y bioquímicos las células de tipo osteoblástico HOS prefieren superficies porosas y de rugosidades relativamente pequeñas, para la interacción de proteínas y biomoléculas, su fijación, proliferación y adherencia.

Figura 63. Micrografía por AFM en 3D y 2D, realizada en dos zonas sobre la muestra con recubrimiento PLA-PGA/Hap/Q(0%)/Col(0.05%), una concentración celular de 30000 cel/mL y un tiempo de incubación de 120 horas.

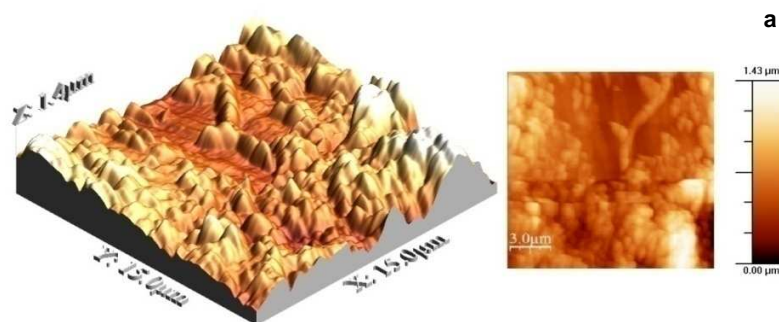


Figura 64. Micrografía por AFM en 3D y 2D, realizada en dos zonas sobre la muestra con recubrimiento PLA-PGA/Hap/Q(3%)/Col(0.05%), una concentración celular de 30000 cel/mL y un tiempo de incubación de 120 horas.

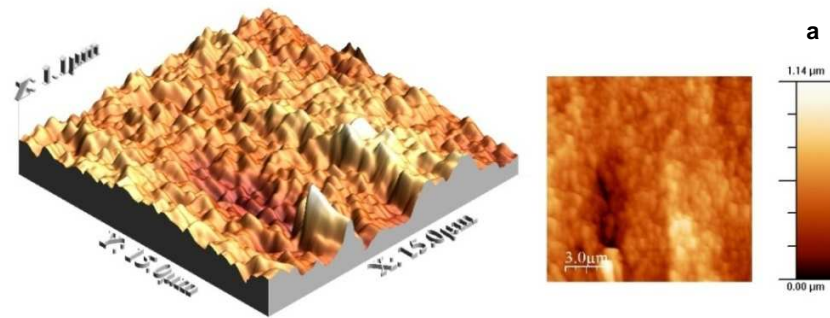


Figura 65. Micrografía por AFM en 3D y 2D, realizada en dos zonas sobre la muestra con recubrimiento PLA-PGA/Hap/Q(0%)/Col(0.075%), una concentración celular de 30000 cel/mL y un tiempo de incubación de 120 horas.

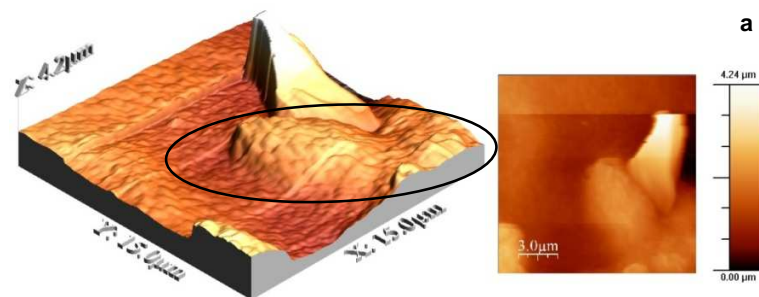
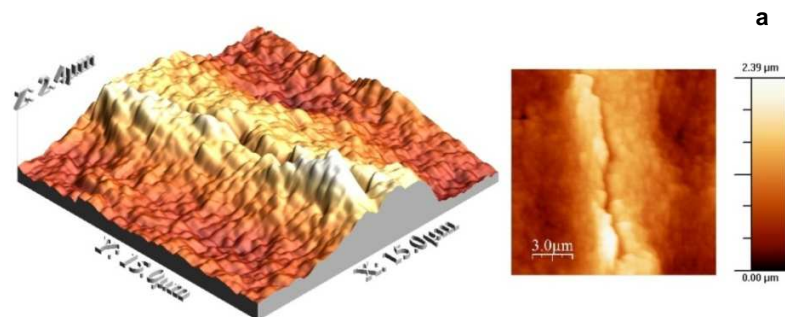
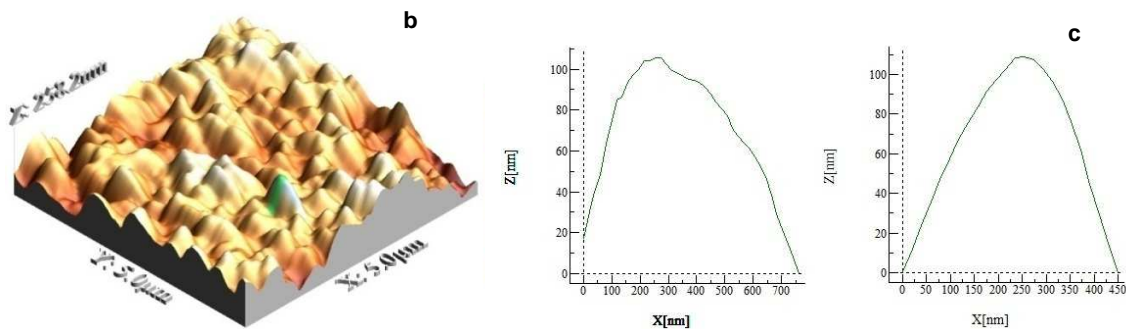


Figura 66. Micrografía por AFM en 3D y 2D, realizada en dos zonas a) y b) sobre la muestra con recubrimiento PLA-PGA/Hap/Q(3%)/Col(0.05%), una concentración celular de 30000 cel/mL y un tiempo de incubación de 120 horas, c) perfil de medición.





Nuevamente se encontraron las rugosidades para cada superficie a diferentes áreas y se encontró un promedio de $0,6402 \mu\text{m}$ para las superficies sin quitosano y de $0,3293 \mu\text{m}$, para las superficies con quitosano.

Se observa en todas las micrografías una aglomeración de partículas, las cuales fue posible medir con el software WSxM Scanning Probe Microscopy, sus dimensiones fueron aproximadamente de 700 nm de largas y 400 nm de anchas. Estas partículas son granos con forma redonda, su forma caracteriza los cristales de hidroxiapatita.

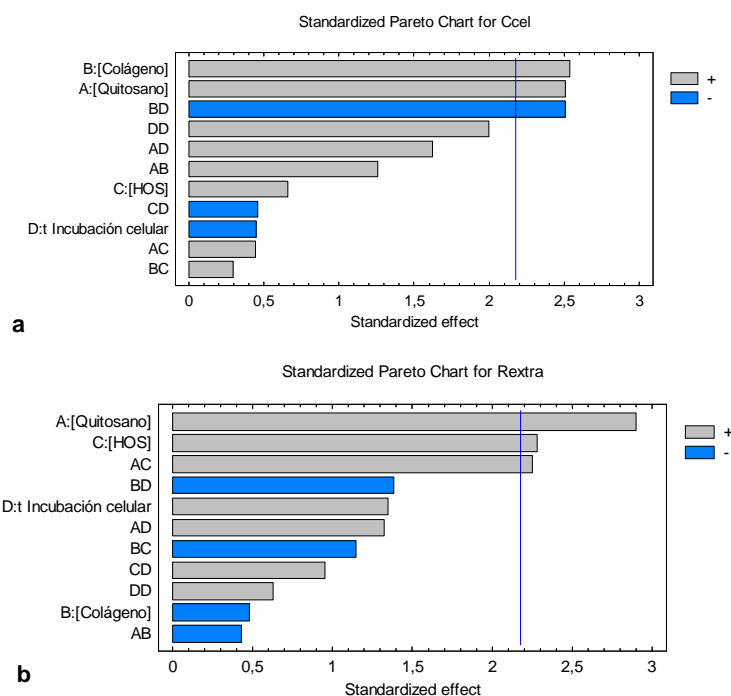
Es de importancia aclarar que no es posible distinguir claramente las células en las micrografías por AFM, debido al tamaño de la micrografía y a la misma rugosidad de los recubrimientos. Comparando con otros estudios [56], posiblemente se pueda ver la morfología de parte de una célula HOS sobre la superficie del recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.075%) (Ver Figura 65, zona limitada). Sin embargo, los ensayos de microscopía de epifluorescencia ayudaron a dilucidar acerca la presencia de células HOS y de la biocompatibilidad de las superficies.

6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

De acuerdo a los circuitos de impedancia modelados, se llevó a cabo un análisis estadístico con las variables de respuesta Rpa para medio de cultivo; Ccel y

Rextra para los ensayos con medio de cultivo y células HOS. En la Figura 67 se muestran los diagramas de pareto para las variables de respuesta Ccel y Rextra.

Figura 67. Diagramas de pareto, a) para Ccel y b) Rextra.

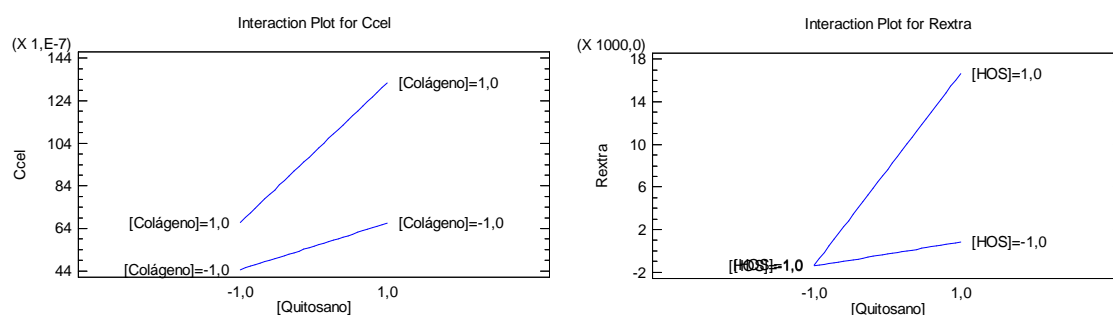


En los diagramas de pareto se observan los factores que son estadísticamente significativos a la variable de respuesta; para Ccel, los factores significativos son concentración de colágeno y quitosano, estos tienen un efecto positivo sobre la variable de respuesta, adicionalmente se presenta un factor significativo de interacción entre los factores colágeno- tiempo de incubación celular con un efecto negativo. Para Rextra, los factores significativos son concentración de quitosano, concentración celular y un efecto de interacción de los factores quitosano-concentración celular, todos con efecto positivo sobre la variable de respuesta Rextra. A mayor concentración de quitosano, mayor es Rextra, que es la resistencia asociada con la matriz extracelular excretada por las células, mientras más actividad celular haya, mayor será Rextra.

Cada una de las variables de respuesta Ccel y Rextra presentó tres factores significativos, los cuales obtuvieron valores-p inferiores a 0.05, lo que indica que son estadísticamente significativos en el 95,0% de nivel de confianza.

El coeficiente de determinación R^2 indica el ajuste de la ecuación matemática obtenida a los datos experimentales para cada variable de respuesta. Ccel obtuvo 70,25% y Rextra obtuvo un 69,37%. El efecto de los factores principales muestran que a mayor concentración de quitosano y colágeno, la capacitancia de la célula es mayor y a mayor concentración de quitosano y mayor concentración celular, la resistencia de la matriz extracelular es mayor, lo cual está asociado con un recubrimiento parcial de la superficie por células y matriz extracelular [36] (ver Figuras en Anexo E). En la Figura 68 se muestran los diagramas de los factores de interacción para cada variable de respuesta.

Figura 68. Diagramas de interacción para las variables de respuesta Ccel y Rextra.

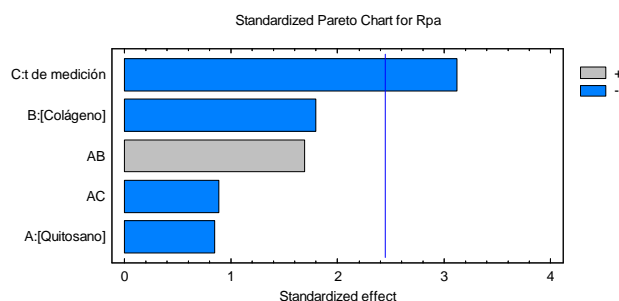


A medida que aumenta la concentración de quitosano, aumenta Ccel tanto para una concentración de colágeno de 0.05% como para 0.075%, y aumenta Rextra tanto para una concentración HOS de 15000 como para 30000 cel/mL. El quitosano es el factor común para las dos variables de respuesta, por lo tanto es el factor más influyente en el sistema biológico de estudio. Se realizó un análisis de optimización de múltiple respuesta a partir del método de deseabilidad global en donde se busca maximizar la deseabilidad (1) para obtener el punto óptimo (máximo Ccel y máximo Rcel). Las gráficas de superficie y contorno muestran que

hay un máximo dentro de la región experimental (Anexo E, Fig. E2), ese máximo corresponde a una concentración de quitosano de 3%, concentración de colágeno de 0.075% y tiempo de incubación de 5 días; en donde las membranas celulares se mostraron más capacitivas a una concentración de 30000 cel/mL.

En la Figura 69 se muestra el diagrama de pareto para el análisis de resistencia en la interfase recubrimiento-proteínas en los ensayos con medio de cultivo.

Figura 69. Diagrama de pareto para Rpa.



Solo el factor principal tiempo de medición es estadísticamente significativo a la variable de respuesta Resistencia a la adsorción de proteínas, teniendo un efecto negativo sobre la misma. Sin embargo si los demás factores se excluyen del modelo, el coeficiente de determinación disminuye drásticamente. El R^2 fue de 74,31%. La respuesta óptima se analizó minimizando Rpa, el mejor sistema resultó ser el de mayor concentración de colágeno, mayor concentración de quitosano y mayor tiempo de medición, para las mediciones con Rpmi.

7 CONCLUSIONES

- Las técnicas electroquímicas potencial de corrosión, espectroscopía de impedancia electroquímica y voltametría cíclica, permitieron identificar una interfase formada entre el recubrimiento de matriz polimérica y las células de tipo osteoblástico, asociada a una capa de adsorción de biomoléculas que contienen proteínas de las células, causando un aumento en los potenciales de corrosión a los tiempos de incubación celular, esa adsorción se presenta con la difusión de biomoléculas al interior de recubrimientos porosos que contienen quitosano y colágeno, los cuales proveen un ambiente estable de actividad proteínica.
- Los datos de impedancia se ajustaron a modelos de circuito electroquímico, que describen eléctricamente las interfases presentadas en los diferentes sistemas biológicos, en donde la capacitancia de las células, identificada como C_{cel} , fue mayor para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%) y a los cinco días de incubación celular.
- De acuerdo a los espectros de permitividad relativa, se identificaron dos dispersiones, alfa y beta, en donde se evidenciaron los fenómenos de difusión iónica de los iones que envuelven la membrana (dispersión α), asociada a mayor permitividad a baja frecuencia y la polarización de la membrana celular (dispersión β), los cuales permitieron identificar la integridad de las membranas celulares adheridas a la superficie de los recubrimientos.

- A partir de las microscopias de epifluorescencia, SEM y AFM, se concluye que las características superficiales de un implante como morfología, rugosidad y porosidad, intervienen directamente en la adhesión y proliferación de los osteoblastos, adicionalmente, fue posible mostrar el proceso de replicación de células mediante la mitosis celular a tres días de incubación en todas las superficies poliméricas en mayor proporción sobre el recubrimiento PLA-PGA /HAp/Q(3%)/Col(0.075%), concordando con la medición de fosfatasa alcalina.
- El análisis estadístico confirmó que la matriz polimérica con la mayor concentración de quitosano y colágeno fue la óptima para los procesos de adherencia, proliferación y diferenciación de osteoblastos (HOS), evidenciado por una alta capacitancia celular Ccel y Rextra, resistencia asociada con el recubrimiento parcial de la superficie por células y matriz extracelular excretada por las mismas, de acuerdo con lo observado electroquímicamente, morfológicamente y bioquímicamente.

8 RECOMENDACIONES

- Se recomienda que para futuros trabajos, el tiempo de cultivo sea mayor para observar formación de matriz extracelular, mineralización y obtener más cantidad de células positivas para fosfatasa alcalina.
- Realizar recubrimientos con colágeno soluble tipo I y mejorar la adherencia de los mismos.
- Ajustar la metodología para recubrir piezas de implante y validar el procedimiento industrialmente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. MONCADA, Elena; MARTÍNEZ, Alfredo; PINEDO, Carlos; CADAVID, Héctor. Desarrollo e implementación de una técnica para la medición de impedancia en muestras de hueso húmedo bovino. Revista. Fac. Ing. Univ. Antioquia, 2008. no. 44, p. 75-82.
- [2]. SABINO, Marcos. Modificación de superficies de biomateriales poliméricos y estudios de biocompatibilidad. Revista Iberoamericana de Polímeros, 2008. vol. 9, no. 3.
- [3]. MAZZAGLIA MARCO, María Giuseppe. Evaluación de la humectabilidad y de la rugosidad de superficies de titanio con diferentes tratamientos y su relación con la adhesión celular. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España. 2006.
- [4]. NAVARRO TORO, Melba Eugenia. Desarrollo y caracterización de materiales biodegradables para regeneración ósea. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Catalunya. 2005.
- [5]. MARTÍNEZ PALAU, Meritxell. Síntesis, estructura y aplicaciones de poliésteres secuenciales derivados de ácido glicólico y w-hidroxiácidos. Tesis Doctoral. Barcelona. 2008
- [6]. WANG, X.H *et al.* Covalent immobilization of chitosan and heparin on PLGA surface. International Journal of Biological Macromolecules, 2003. vol.33, p. 95–100.
- [7]. SATO, M; SLAMOVICH, E; WEBSTER, T. Enhanced osteoblast adhesion on hydrothermally treated hydroxyapatite/titania/poly(lactide-co-glicolide) sol-gel titanium coatings. Biomaterials, 2005. vol. 26, p. 1349-1357.
- [8]. PADILLA, S, *et al.* Hydroxyapatite/SiO₂-CaO-P₂O₅ glass materials: In vitro bioactivity and biocompatibility. Acta Biomaterialia 2, 2006, p. 331–342.
- [9]. IZQUIERDO-BARBA, I, *et al.* Vitreous SiO₂-CaO coatings on Ti6Al4V alloys: Reactivity in simulated body fluid versus osteoblast cell culture. Acta Biomaterialia 2, 2006, p. 445–455.
- [10]. BLANCO RAMOS, M^a de Guía. Liberación de Triclosan a partir de hilos de sutura monofilares. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Catalunya. Departamento de Ingeniería Química. España. 2007.
- [11]. SANTANDER ORTEGA, Manuel. Caracterización fisico-química de sistemas coloidales aplicados como transporte de fármacos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 2008
- [12]. ROSAS, Jaiver E; PEDRAZA, José L. Microesferas de PLGA: un sistema para la liberación controlada de moléculas con actividad inmunogénica. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm, 2007. vol. 36, no.2, p. 134-153.
- [13]. PETRICCA, Sarah; MARRA, Kacey G; KUMTA, Prashant N. Chemical synthesis of poly(lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite composites for orthopaedic applications. Acta Biomaterialia, 2006. vol. 2, p. 277–286.

- [14]. BELTRÁN VARGAS, Nohra Elsy. Caracterización y validación clínica de espectros de impedancia de la mucosa gástrica. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa. México, D.F. 2006.
- [15]. MARTÍNEZ, Olga. Efectos de distintas biomoléculas de utilidad clínica sobre cultivos primarios de osteoblastos humanos. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, 2007.
- [16]. NGIAM, Michelle, *et al.* The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. *Bone*, 2009. vol. 45, p. 4–16.
- [17]. OTERO SANCHIS, Aránzazu. Aplicación de la dielectroforesis a la caracterización dieléctrica de células. Tesis Doctoral. Universidad Complutense De Madrid Facultad De Ciencias Físicas. 2008.
- [18]. RAMÓN, Fidel; HERNÁNDEZ, Jesús. El potencial de acción. Historia, descubrimiento y estudio. División de posgrado e Investigación y Departamento de Fisiología. UNAM. México.
- [19]. TIRADO, Mónica. Comportamiento Dieléctrico de Suspensiones Electrolíticas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina. 2002. Premio J.J. Giambiagi.
- [20]. CASAÑAS, Roberto. Contribución a la Caracterización Dieléctrica y Magnética de Tejido Biológico Mediante Métodos Basados en Inducción Magnética. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cataluña. España. 2003.
- [21]. CASAS P, Oscar. Contribución a la obtención de imágenes paramétricas en tomografía de impedancia eléctrica para la caracterización de tejido biológicos. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Catalunya. España. 1999.
- [22]. SALAZAR MUÑOZ, Yolocuauhtli. Caracterización de tejidos cardiacos mediante métodos mínimamente invasivos y no invasivos basados en espectroscopía de impedancia eléctrica. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Catalunya. 2004.
- [23]. PETHIG, Ronald; KELL, Douglas; The passive electrical properties of biological systems: their significance in physiology, biophysics and biotechnology. *Phys. Med. Biol.* 1987, vol. 32, no. 8, p. 933-970.
- [24]. COBAS, H, *et al.* Aplicación de la Voltametría en el Análisis del Crecimiento Microbiológico. Artículo presentado en el VII Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería. Habana 2007.
- [25]. ARIAS PADILLA, Joaquín. Síntesis y caracterización de polímeros conductores basados en anilinas sustituidas y su aplicación en electrocatálisis. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante. España. 2007.
- [26]. WILLOWS, Alison *et al.* Assessment of tissue scaffold degradation using electrochemical techniques. *Acta Biomaterialia*, 2008. vol. 4, p. 686–696.
- [27]. GHEORGHIU, Eugen; ASAMI, Koji. Monitoring cell cycle by impedance spectroscopy: experimental and theoretical aspects. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1998. vol. 45, p.139–143.

- [28]. DOOP, E, *et al.* Dielectric changes in membrane properties and cell interiors of human mesothelial cells in vitro after crocidolite asbestos exposure. *Environmental Health Perspectives*, 2000. vol. 108, no. 2, p.153-158.
- [29]. Z.G, Tang; J.T, Callaghan; J.A, Hunt. The physical properties and response of osteoblasts to solution cast films of PLGA doped polycaprolactone. *Biomaterials*, 2006. vol. 26, p. 6618-6624.
- [30]. PARK, Jin – Soo *et al.* An electrical impedance spectroscopic (EIS) study on transport characteristics of ion-exchange membrane systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006. no. 300, p. 655–662
- [31]. LLAMOSAS P, *et al.* Caracterización de sistemas biológicos a través de la técnica de espectroscopia de impedancia bioeléctrica (EIB). Laboratorio de Magnetismo y Materiales Avanzados. Universidad Nacional de Colombia (Manizales). *Revista Colombiana de Física*, 2006. vol. 38, no. 1, p. 321-324.
- [32]. DEAN, D.A, *et al.* Electrical impedance spectroscopy study of biological tissues. *Journal of Electrostatics*, 2008. vol. 66, p. 165–177.
- [33]. GARCÍA A, *et al.* In situ cell culture monitoring on a Ti–6Al–4V surface by electrochemical techniques. *Acta Biomaterialia* 5, 2009, p. 1374–1384.
- [34]. PARADA QUINAYA, Diana Carolina; GONZÁLEZ BALAGUERA, Aurora del Pilar; LAVERDE, Dionisio. Obtención, electrodeposición y caracterización de un polímero bioabsorbible a partir de ácido L - láctico para aplicaciones biomédicas. Tesis Pregrado. Escuela de Ingeniería Química. Universidad Industrial de Santander. 2007.
- [35]. TAKAHASHI, K, *et al.* Melt/solid polycondensation of glycolic acid to obtain high-molecular-weight poly(glycolic acid). *Polymer*, 2000. vol. 41, p. 8725–8728.
- [36]. GARCÍA, C; PAUCAR, C; GAVIRIA, J. Estudio de algunos parámetros que determinan la síntesis de hidroxiapatita por la ruta de precipitación. *Revista Dyna*. Universidad Nacional de Colombia, 2006, vol. 73, no. 148, p. 9-15.
- [37]. PARADA, D; ESTUPIÑÁN, H; PEÑA, D; VÁSQUEZ, C; LAVERDE, D. Synthesis, electrodeposition and characterization of a bioabsorbable polymer coating from l-lactic acid for biomedical applications. *Ingeniare. Revista Chilena de Ingeniería*, 2009. vol.17 no. 3, p. 365-374.
- [38]. MOTTA, A.C; DUEK, E.A.R. Síntese, Caracterização e Degradação “*in vitro*” do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico). *Revista Matéria*, 2006. vol. 11, no. 3, p. 340–350.
- [39]. MARTÍNEZ PÉREZ, Manuel Ricardo. Electrodeposición y evaluación electroquímica de recubrimientos compuestos de fosfatos de calcio/chitosán sobre una aleación Ti6Al4V-ASTM F136. Tesis Maestría. Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de Materiales. Universidad Industrial de Santander. 2008.
- [40]. PERALES, M.E, *et al.* Síntesis de polímeros: Ácido Poliláctico. X Congreso Nacional de Microscopía-Morelia. 2010.
- [41]. PANDEY, Anurag; PANDEY, Girish; ASWATH, Pranesh. Synthesis of polylactic acid–polyglycolic acid blends using microwave radiation. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 2008. vol. 1, p. 227–233.

- [42]. MAINARDES, Rubiana; DAFLON, María; EVANGELISTA, Raul. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006. vol. 42 no. 4, p. 523-530.
- [43]. MARTEL, A; MARTÍNEZ, C; CHACÓN, J; GARCÍA, P; OLIVAS, I. Synthesis and thermo-physical properties of chitosan/poly(dl-lactide-co-glycolide) composites prepared by thermally induced phase separation, *Carbohydrate Polymers*. Article in Press 2010.
- [44]. VIDAL, Benedicto; MELLO, Maria Luisa. Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron*, 2011. vol. 42, p. 283-289.
- [45]. GARCÍA, Margarita; REYES, José. La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 2006. vol. 9, no. 2, p. 90-95.
- [46]. J. WANG, J; DE BOER; K. DE GROOT. Preparation and Characterization of Electrodeposited Calcium Phosphate/Chitosan Coating on Ti6Al4V Plates. *Journal of Dental Research*, 2004, p. 83-296.
- [47]. HIROMOTO, S; NODA, K; HANAWA, T. Development of electrolytic cell with cell-culture for metallic biomaterials. *Corrosion Science*, 2002. vol. 44, p. 955–965.
- [48]. COTTIS, Robert; TURGOOSE, Stephen. *Electrochemical Impedance and Noise*. Nace Publication. 1999. Chapter 4.
- [49]. GRIMES, S; MARTINSEN, O. *Bioimpedance and Bioelectricity basics*. Second Edition. Elsevier, 2008.
- [50]. GITTINGS, J, *et al.* Electrical characterization of hydroxyapatite-based bioceramics. *Acta Biomaterialia*, 2009. vol. 5, p. 743-754.
- [51]. SPENCER, Nicholas; TEXTOR, Marcus. *Surface modification, surface analysis and biomaterials*. Laboratory for Surface Science and Technology, Department of Materials. ETH Zürich. Research.
- [52]. Diagnostic Chemicals Limited. Determinación in vitro de Fosfatasa Alcalina en suero. Citado en: <http://www.dclmexico.com>.
- [53]. SETZER, Bernhard, *et al.* The gene-expression and phenotypic response of hFOB 1.19 osteoblasts to surface-modified titanium and zirconia. *Biomaterials*, 2009. vol. 30, p. 979-990.
- [54]. MANARA, S, *et al.* Electrochemically-assisted deposition of biomimetic hydroxyapatite–collagen coatings on titanium plate. *Inorganica Chimica Acta*, 2008. vol. 361, p. 1634–1645.
- [55]. ZHANG, Peibiao, *et al.* In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly (lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(L-lactide). *Biomaterials*, 2009. vol. 30, p. 58-70.
- [56]. LEHENKARI, P; HORTON, M. Single Integrin Molecule Adhesion Forces in Intact Cells Measured by Atomic Force Microscopy. *Biochemical and Biophysical Research*, 1999. 259, p. 645-650.

BIBLIOGRAFÍA

- ARIAS PADILLA, Joaquín. Síntesis y caracterización de polímeros conductores basados en anilinas sustituidas y su aplicación en electrocatálisis. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante. España. 2007.
- BELTRÁN VARGAS, Nohra Elsy. Caracterización y validación clínica de espectros de impedancia de la mucosa gástrica. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa. México, D.F. 2006.
- BLANCO RAMOS, M^a de Guía. Liberación de Triclosan a partir de hilos de sutura monofilares. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Catalunya. Departamento de Ingeniería Química. España. 2007.
- CASAÑAS, Roberto. Contribución a la Caracterización Dieléctrica y Magnética de Tejido Biológico Mediante Métodos Basados en Inducción Magnética. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cataluña. España. 2003.
- CASAS P, Oscar. Contribución a la obtención de imágenes paramétricas en tomografía de impedancia eléctrica para la caracterización de tejidos biológicos. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Catalunya. España. 1999.
- COBAS, H, *et al.* Aplicación de la Voltametría en el Análisis del Crecimiento Microbiológico. Artículo presentado en el VII Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería. Habana 2007.
- COTTIS, Robert; TURGOOSE, Stephen. Electrochemical Impedance and Noise. Nace Publication. 1999. Chapter 4.
- DEAN, D.A, *et al.* Electrical impedance spectroscopy study of biological tissues. Journal of Electrostatics, 2008. vol. 66, p. 165–177.
- Diagnostic Chemicals Limited. Determinación in vitro de Fosfatasa Alcalina en suero. Citado en: <http://www.dclmexico.com>.
- DOOP, E, *et al.* Dielectric changes in membrane properties and cell interiors of human mesothelial cells in vitro after crocidolite asbestos exposure. Environmental Health Perspectives, 2000. vol. 108, no. 2, p.153-158.
- GARCÍA A, *et al.* In situ cell culture monitoring on a Ti–6Al–4V surface by electrochemical techniques. Acta Biomaterialia 5, 2009, p. 1374–1384.
- GARCÍA, C; PAUCAR, C; GAVIRIA, J. Estudio de algunos parámetros que determinan la síntesis de hidroxiapatita por la ruta de precipitación. Revista Dyna. Universidad Nacional de Colombia, 2006, vol. 73, no. 148, p. 9-15.
- GARCÍA, Margarita; REYES, José. La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 2006. vol. 9, no. 2, p. 90-95.
- GHEORGHIU, Eugen; ASAMI, Koji. Monitoring cell cycle by impedance spectroscopy: experimental and theoretical aspects. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1998. vol. 45, p.139–143.
- GITTINGS, J, *et al.* Electrical characterization of hydroxyapatite-based bioceramics. Acta Biomaterialia, 2009. vol. 5, p. 743-754.

- GRIMES, S; MARTINSEN, O. Bioimpedance and Bioelectricity basics. Second Edition. Elsevier, 2008.
- HIROMOTO, S; NODA, K; HANAWA, T. Development of electrolytic cell with cell-culture for metallic biomaterials. Corrosion Science, 2002. vol. 44, p. 955–965.
- IZQUIERDO-BARBA, I, *et al.* Vitreous SiO₂–CaO coatings on Ti6Al4V alloys: Reactivity in simulated body fluid versus osteoblast cell culture. Acta Biomaterialia 2, 2006, p. 445–455.
- J. WANG, J; DE BOER; K. DE GROOT. Preparation and Characterization of Electrodeposited Calcium Phosphate/Chitosan Coating on Ti6Al4V Plates. Journal of Dental Research, 2004, p. 83-296.
- LEHENKARI, P; HORTON, M. Single Integrin Molecule Adhesion Forces in Intact Cells Measured by Atomic Force Microscopy. Biochemical and Biophysical Research, 1999. 259, p. 645-650.
- LLAMOSA P, *et al.* Caracterización de sistemas biológicos a través de la técnica de espectroscopia de impedancia bioeléctrica (EIB). Laboratorio de Magnetismo y Materiales Avanzados. Universidad Nacional de Colombia (Manizales). Revista Colombiana de Física, 2006. vol. 38, no. 1, p. 321-324.
- MAINARDES, Rubiana; DAFLON, María; EVANGELISTA, Raul. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006. vol. 42 no. 4, p. 523-530.
- MANARA, S, *et al.* Electrochemically-assisted deposition of biomimetic hydroxyapatite–collagen coatings on titanium plate. Inorganica Chimica Acta, 2008. vol. 361, p. 1634–1645.
- MARTEL, A; MARTÍNEZ, C; CHACÓN, J; GARCÍA, P; OLIVAS, I. Synthesis and thermo-physical properties of chitosan/poly(dl-lactide-co-glycolide) composites prepared by thermally induced phase separation, Carbohydrate Polymers. Article in Press 2010.
- MARTÍNEZ GARCÍA, Olga. Efectos de distintas biomoléculas de utilidad clínica sobre cultivos primarios de osteoblastos humanos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España. 2007.
- MARTÍNEZ PALAU, Meritxell. Síntesis, estructura y aplicaciones de poliésteres secuenciales derivados de ácido glicólico y w-hidroxiácidos. Tesis Doctoral. Barcelona. 2008
- MARTÍNEZ PÉREZ, Manuel Ricardo. Electrodeposición y evaluación electroquímica de recubrimientos compuestos de fosfatos de calcio/chitosán sobre una aleación Ti6Al4V-ASTM F136. Tesis Maestría. Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de Materiales. Universidad Industrial de Santander. 2008.
- MAZZAGLIA MARCO, María Giuseppe. Evaluación de la humectabilidad y de la rugosidad de superficies de titanio con diferentes tratamientos y su relación con la adhesión celular. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España. 2006.
- MONCADA, Elena; MARTÍNEZ, Alfredo; PINEDO, Carlos; CADAVID, Héctor. Desarrollo e implementación de una técnica para la medición de impedancia en

- muestras de hueso húmedo bovino. Revista. Fac. Ing. Univ. Antioquia, 2008. no. 44, p. 75-82.
- MOTTA, A.C; DUEK, E.A.R. Síntese, Caracterização e Degradação “*in vitro*” do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico). Revista Matéria, 2006. vol. 11, no. 3, p. 340–350.
 - NAVARRO TORO, Melba Eugenia. Desarrollo y caracterización de materiales biodegradables para regeneración ósea. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Catalunya. 2005.
 - NGIAM, Michelle, *et al.* The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. Bone, 2009. vol. 45, p. 4–16.
 - OTERO SANCHIS, Aránzazu. Aplicación de la dielectroforesis a la caracterización dieléctrica de células. Tesis Doctoral. Universidad Complutense De Madrid Facultad De Ciencias Físicas. 2008.
 - PADILLA, S, *et al.* Hydroxyapatite/SiO₂-CaO-P₂O₅ glass materials: In vitro bioactivity and biocompatibility. Acta Biomaterialia 2, 2006, p. 331–342.
 - PANDEY, Anurag; PANDEY, Girish; ASWATH, Pranesh. Synthesis of polylactic acid-polyglycolic acid blends using microwave radiation. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 2008. vol. 1, p. 227–233.
 - PARADA, D; ESTUPIÑÁN, H; PEÑA, D; VÁSQUEZ, C; LAVERDE, D. Synthesis, electrodeposition and characterization of a bioabsorbable polymer coating from l-lactic acid for biomedical applications. Ingeniare. Revista Chilena de Ingeniería, 2009. vol.17 no. 3, p. 365-374.
 - PARADA QUINAYA, Diana Carolina; GONZÁLEZ BALAGUERA, Aurora del Pilar; LAVERDE, Dionisio. Obtención, electrodeposición y caracterización de un polímero bioabsorbible a partir de ácido L - láctico para aplicaciones biomédicas. Tesis Pregrado. Escuela de Ingeniería Química. Universidad Industrial de Santander. 2007.
 - PARK, Jin – Soo *et al.* An electrical impedance spectroscopic (EIS) study on transport characteristics of ion-exchange membrane systems. Journal of Colloid and Interface Science, 2006. no. 300, p. 655–662
 - PERALES, M.E, *et al.* Síntesis de polímeros: Ácido Poliláctico. X Congreso Nacional de Microscopía-Morelia. 2010.
 - PETHIG, Ronald; KELL, Douglas; The passive electrical properties of biological systems: their significance in physiology, biophysics and biotechnology. Phys. Med. Biol. 1987, vol. 32, no. 8, p. 933-970.
 - PETRICCA, Sarah; MARRA, Kacey G; KUMTA, Prashant N. Chemical synthesis of poly(lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite composites for orthopaedic applications. Acta Biomaterialia, 2006. vol. 2, p. 277–286.
 - RAMÓN, Fidel; HERNÁNDEZ, Jesús. El potencial de acción. Historia, descubrimiento y estudio. División de posgrado e Investigación y Departamento de Fisiología. UNAM. México.

- ROSAS, Jaiver E; PEDRAZA, José L. Microesferas de PLGA: un sistema para la liberación controlada de moléculas con actividad inmunogénica. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm*, 2007. vol. 36, no.2, p. 134-153.
- SABINO, Marcos. Modificación de superficies de biomateriales poliméricos y estudios de biocompatibilidad. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 2008. vol. 9, no. 3.
- SALAZAR MUÑOZ, Yolocuauhtli. Caracterización de tejidos cardíacos mediante métodos mínimamente invasivos y no invasivos basados en espectroscopía de impedancia eléctrica. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Catalunya. 2004.
- SANTANDER ORTEGA, Manuel. Caracterización fisico-química de sistemas coloidales aplicados como transporte de fármacos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 2008
- SATO, M; SLAMOVICH, E; WEBSTER, T. Enhanced osteoblast adhesion on hydrothermally treated hydroxyapatite/titania/poly(lactide-co-glicolide) sol-gel titanium coatings. *Biomaterials*, 2005. vol. 26, p. 1349-1357.
- SETZER, Bernhard, *et al.* The gene-expression and phenotypic response of hFOB 1.19 osteoblasts to surface-modified titanium and zirconia. *Biomaterials*, 2009. vol. 30, p. 979-990.
- SPENCER, Nicholas; TEXTOR, Marcus. Surface modification, surface analysis and biomaterials. Laboratory for Surface Science and Technology, Department of Materials. ETH Zürich. Research.
- TAKAHASHI, K, *et al.* Melt/solid polycondensation of glycolic acid to obtain high-molecular-weight poly(glycolic acid). *Polymer*, 2000. vol. 41, p. 8725–8728.
- TIRADO, Mónica. Comportamiento Dieléctrico de Suspensiones Electrolíticas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina. 2002. Premio J.J. Giambiagi.
- VIDAL, Benedicto; MELLO, Maria Luisa. Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron*, 2011. vol. 42, p. 283-289.
- WANG, X.H *et al.* Covalent immobilization of chitosan and heparin on PLGA surface. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2003. vol.33, p. 95–100.
- WILLOWS, Alison *et al.* Assessment of tissue scaffold degradation using electrochemical techniques. *Acta Biomaterialia*, 2008. vol. 4, p. 686–696.
- ZHANG, Peibiao, *et al.* In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly (lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(L-lactide). *Biomaterials*, 2009. vol. 30, p. 58-70.
- Z.G, Tang; J.T, Callaghan; J.A, Hunt. The physical properties and response of osteoblasts to solution cast films of PLGA doped polycaprolactone. *Biomaterials*, 2006. vol. 26, p. 6618-6624.

ANEXOS

ANEXO A: DIAGRAMAS DE BODE Y NYQUIST

Figura A1: Espectros de impedancia obtenidos para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.05%), concentración celular 15000 cel/mL, a los diferentes tiempos de medición. (a) Diagrama de Bode, (b) Diagrama de Nyquist.

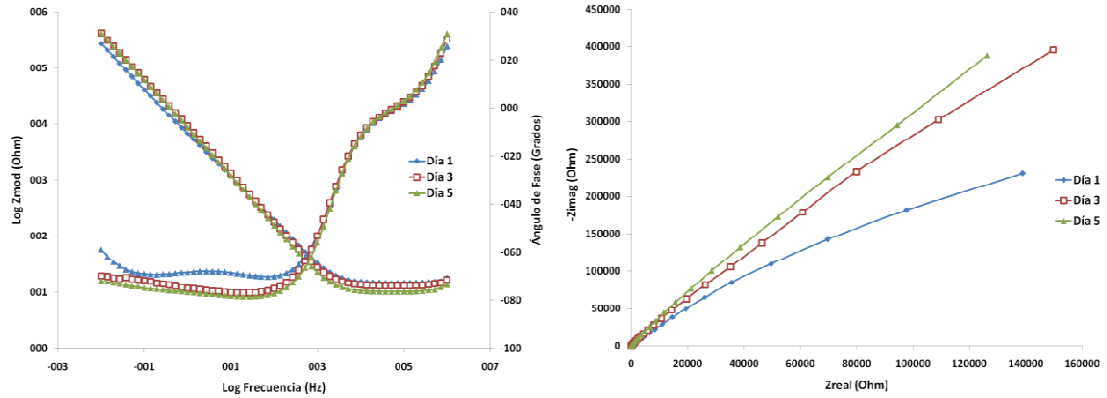


Figura A2: Espectros de impedancia obtenidos para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.05%), concentración celular 15000 cel/mL, a los diferentes tiempos de medición. (a) Diagrama de Bode, (b) Diagrama de Nyquist.

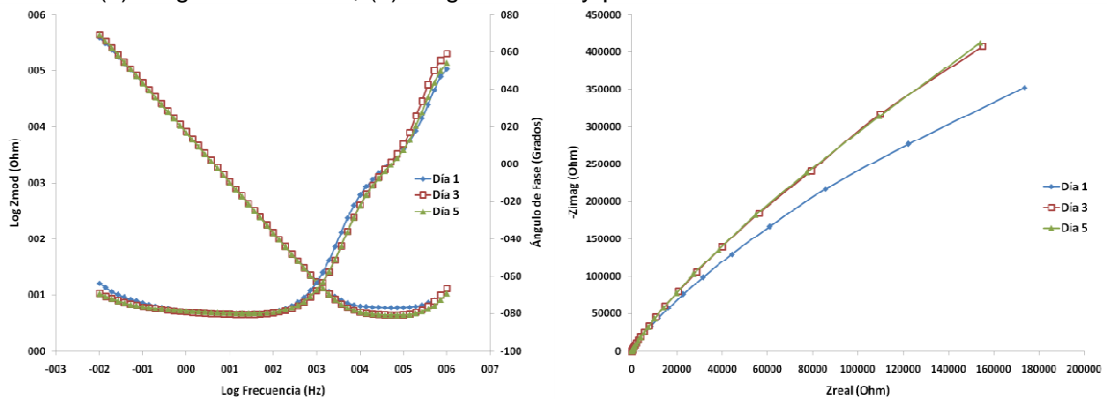


Figura A3: Espectros de impedancia obtenidos para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.075%), concentración celular 15000 cel/mL, a los diferentes tiempos de medición. (a) Diagrama de Bode, (b) Diagrama de Nyquist.

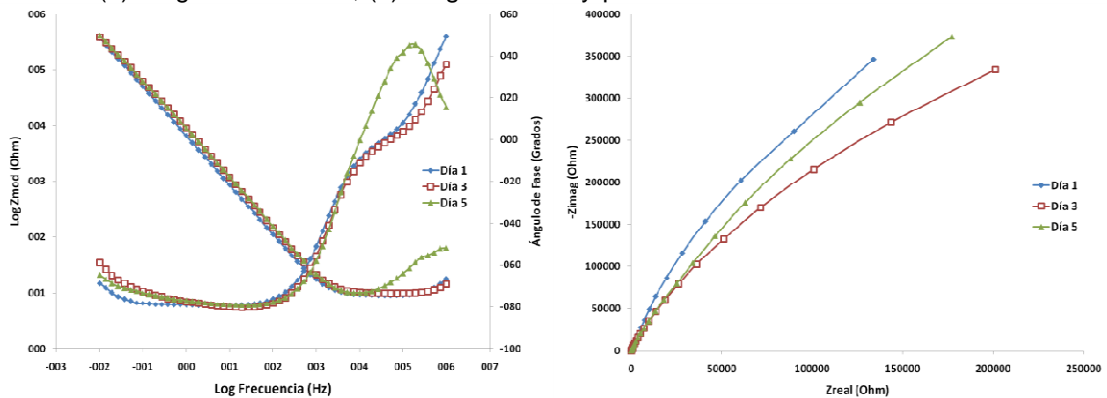


Figura A4: Espectros de impedancia obtenidos para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%), concentración celular 15000 cel/mL, a los diferentes tiempos de medición. (a) Diagrama de Bode, (b) Diagrama de Nyquist.

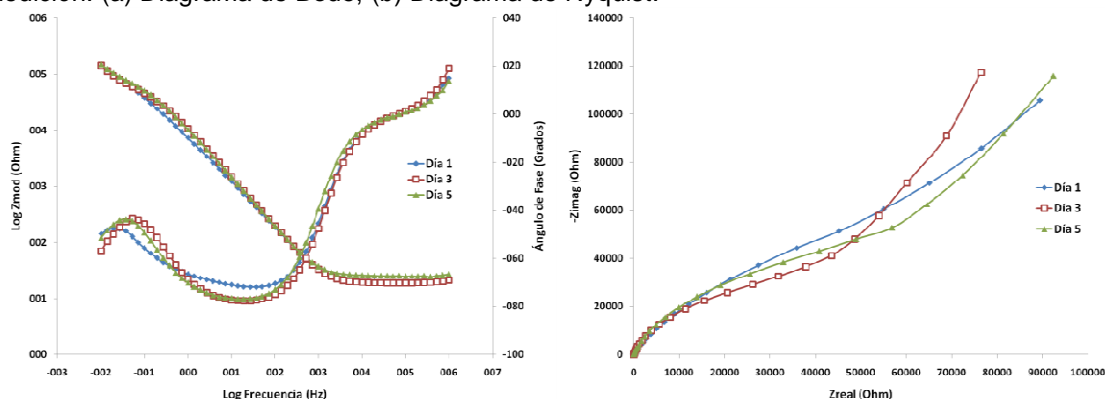


Figura A5: Espectros de impedancia obtenidos para el recubrimiento PLA-PGA/HAp en medio de cultivo Rpmi, a los diferentes tiempos de medición. (a) Diagrama de Bode, (b) Diagrama de Nyquist.

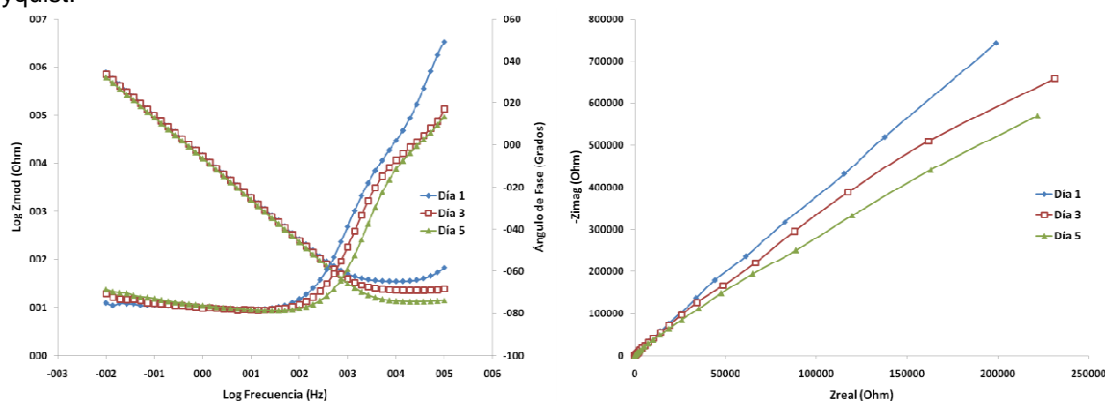


Figura A6: Espectros de impedancia obtenidos para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.05%), medio de cultivo rpmi, a los diferentes tiempos de medición. (a) Diagrama de Bode, (b) Diagrama de Nyquist.

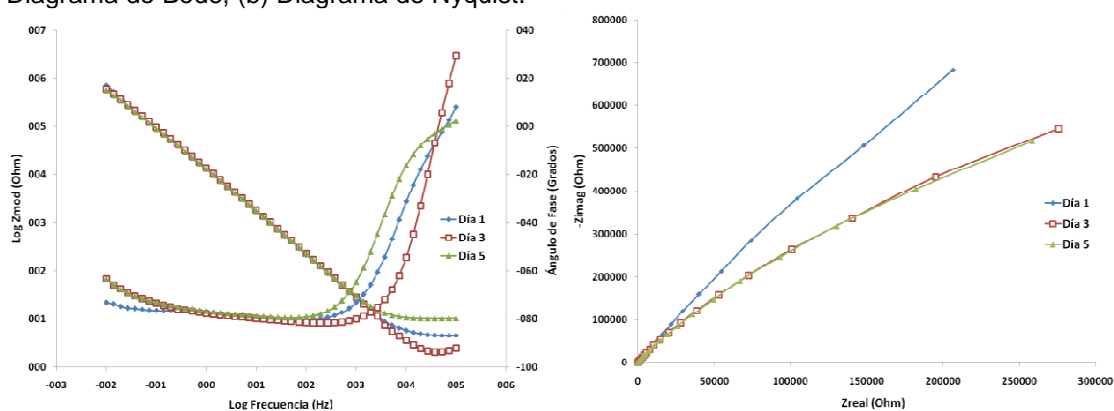


Figura A7: Espectros de impedancia obtenidos para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.05%), medio de cultivo Rpmi, a los diferentes tiempos de medición. (a) Diagrama de Bode, (b) Diagrama de Nyquist.

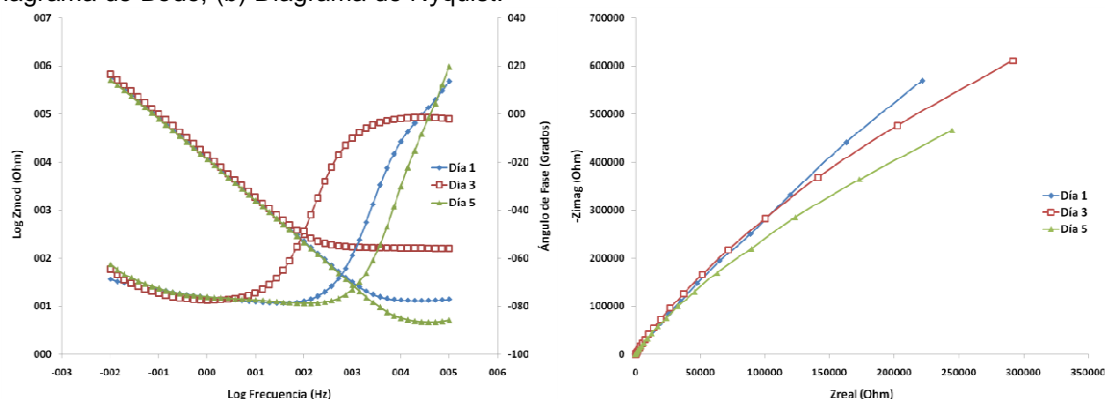


Figura A8: Espectros de impedancia obtenidos para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.075%), medio de cultivo Rpmi, a los diferentes tiempos de medición. (a) Diagrama de Bode, (b) Diagrama de Nyquist.

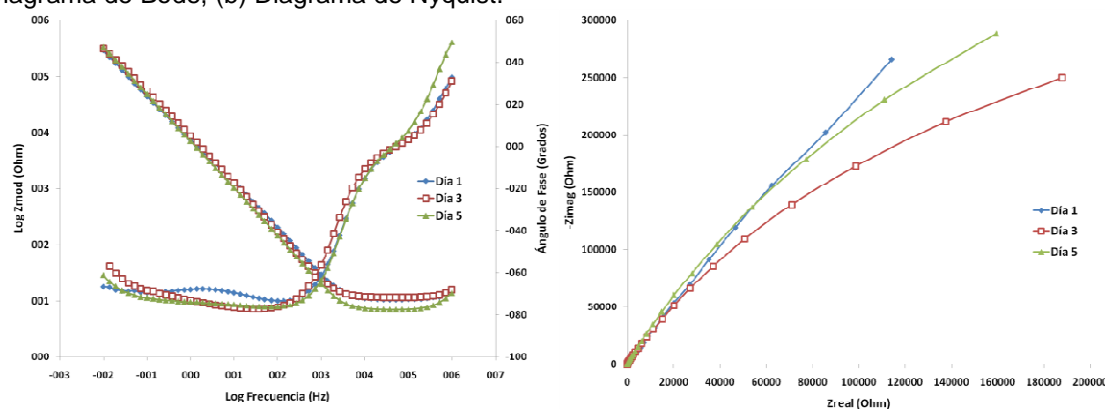
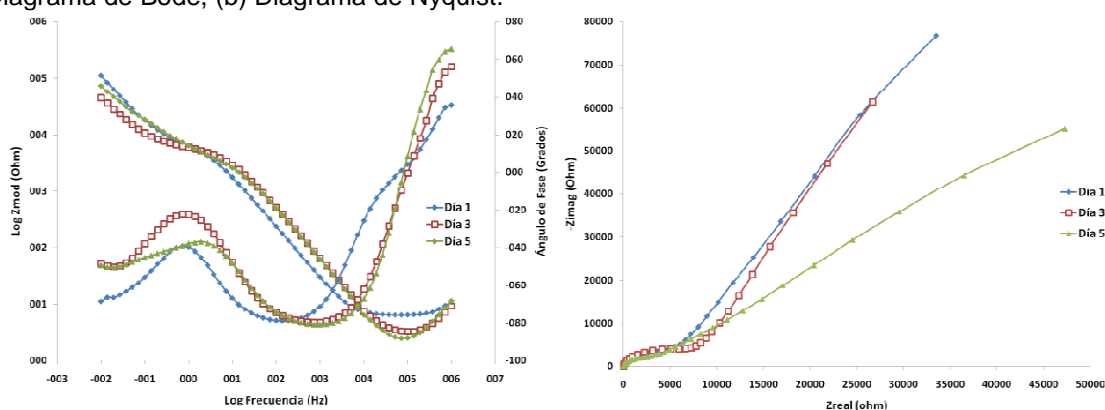


Figura A9: Espectros de impedancia obtenidos para el recubrimiento PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%), medio de cultivo Rpmi, a los diferentes tiempos de medición. (a) Diagrama de Bode, (b) Diagrama de Nyquist.



ANEXO B: PARÁMETROS CIRCUITOS EQUIVALENTES

Tabla B1. Datos obtenidos a partir de simulación de los circuitos equivalentes correspondientes a las mediciones de impedancia en medio de cultivo Rpmi, a los diferentes tiempos de medición (circuito correspondiente a la Figura 40.a).

Ensayo PLA-PGA/HAp+			Rs	Cdl	Rct	CPEpa	n	Rpa	CPErec/st	n	Rrec/st	Chi-Squared
Q (%)	Col(%)	Día	($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	($\text{F} \cdot \text{cm}^2$)	($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	($\text{F} \cdot \text{cm}^2$)		($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	($\text{F} \cdot \text{cm}^2$)		($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	
0	0	1	36,67	4,984E-06	394,0	6,709E-06	0,797	21272	2,592E-06	0,766	8,333E07	0,000723
0	0	3	22,66	5,128E-06	237,5	7,171E-06	0,796	12194	2,725E-06	0,759	9,072E06	0,000653
0	0	5	13,38	5,391E-06	145,9	8,512E-06	0,781	9560	2,806E-06	0,756	5,475E06	0,000875
0	0,05	1	4,71	5,880E-06	237,1	7,252E-06	0,805	20978	3,724E-06	0,804	8,581E06	0,005867
0	0,05	3	2,04	5,742E-06	264,1	8,527E-06	0,740	13758	1,093E-06	0,809	3,657E06	0,002689
0	0,05	5	10,22	5,307E-06	114,7	8,533E-06	0,769	7860	2,557E-06	0,743	3,392E06	0,000150
3	0,05	1	13,5	5,441E-06	164,3	8,458E-06	0,781	10379	2,821E-06	0,755	5,453E06	0,000884
3	0,05	3	164,8	4,536E-06	105,5	8,198E-06	0,814	9986	2,187E-06	0,750	3,259E06	0,000596
3	0,05	5	4,90	5,361E-06	107,1	8,753E-06	0,791	4847	4,326E-06	0,770	2,298E06	0,000824
0	0,075	1	10,65	5,676E-06	163,7	1,569E-05	0,760	6035	1,159E-05	0,779	3,383E06	0,001057
0	0,075	3	11,57	7,615E-06	222,5	9,835E-06	0,810	6019	9,098E-06	0,686	1,003E06	0,000688
0	0,075	5	7,08	8,690E-06	201,6	1,382E-05	0,806	6612	8,165E-06	0,793	1,236E06	0,001475

Tabla B2. Datos obtenidos a partir de simulación de los circuitos equivalentes correspondientes a las mediciones de impedancia en medio de cultivo Rpmi, a los diferentes tiempos de medición (circuito correspondiente a la Figura 40.b).

Ensayo PLA-PGA/HAp+			Rs	CPEdl	n	Rct	CPEpa	n	Rpa	Ws-R	Ws	Ws-n	Chi-Squared
Q (%)	Col(%)	Día	($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	($\text{F} \cdot \text{cm}^2$)		($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	($\text{F} \cdot \text{cm}^2$)		($\Omega \cdot \text{cm}^2$)				
3	0,075	1	6,13	1,128E-05	0,921	6617	7,194E-05	0,798	17950	5,820E05	14,9	0,693	0,001129
3	0,075	3	6,72	8,721E-06	0,945	3024	3,885E-06	0,898	5504	5,814E05	235,9	0,798	0,002755
3	0,075	5	2,40	3,734E-06	0,964	2123	1,022E-06	1	1042	1,205E05	51,55	0,565	0,005507

Tabla B3. Datos obtenidos a partir de simulación de los circuitos equivalentes correspondientes a las mediciones de impedancia en medio de cultivo Rpmi con células HOS en una concentración de 15000 cel/mL, a los diferentes tiempos de medición (circuito correspondiente a la Figura 41.a).

Ensayo PLA-PGA/HAp+			Rs	Ccel	Rextra	CPEbiom	n	Rbiom	CPErec/st	n	Rrec/st	Chi-Squared
Q (%)	Col(%)	Día	($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	($\text{F} \cdot \text{cm}^2$)	($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	($\text{F} \cdot \text{cm}^2$)		($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	($\text{F} \cdot \text{cm}^2$)		($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	
0	0,05	1	15,07	5,297E-06	100,8	1,687E-05	0,776	4286	1,268E-05	0,795	1,113E06	0,001636
0	0,05	3	15,08	6,931E-06	197,4	1,377E-05	0,748	6725	1,947E-06	0,714	1,577E07	0,007842
0	0,05	5	10,32	7,867E-06	104,2	1,333E-05	0,775	9760	3,548E-06	0,754	1,475E07	0,000292
3	0,05	1	6,10	8,685E-06	53,0	1,577E-05	0,775	7754	5,472E-07	1	1,895E06	0,000354
3	0,05	3	4,51	8,652E-06	55,0	1,228E-05	0,819	7345	3,495E-06	0,761	3,015E06	0,000627
3	0,05	5	4,52	8,724E-06	51,2	1,377E-05	0,811	7712	2,475E-06	0,845	2,712E05	0,001272
0	0,075	1	9,24	1,065E-05	70,7	1,379E-05	0,828	4531	5,778E-06	0,818	2,278E06	0,000365
0	0,075	3	10,05	7,998E-06	52,2	1,453E-05	0,764	4474	7,757E-07	0,763	1,480E06	0,000148
0	0,075	5	9,99	8,339E-06	218	1,214E-05	0,773	4520	2,918E-06	0,676	3,082E06	0,001361

Tabla B4. Datos obtenidos a partir de simulación de los circuitos equivalentes correspondientes a las mediciones de impedancia en medio de cultivo Rpmi con células HOS en una concentración de 15000 cel/mL, a los diferentes tiempos de medición (circuito correspondiente a la Figura 41.b).

Ensayo PLA-PGA/HAp+			Rs ($\Omega.cm^2$)	CPEcel (F.cm ²)	n	Rextra ($\Omega.cm^2$)	CPEbiom/rec (F.cm ²)	n	Rbiom/rec ($\Omega.cm^2$)	Ws-R	Ws	Ws-n	Chi-Squared
Q (%)	Col(%)	Día											
3	0.075	1	19,37	1,529E-05	0,903	1031	1,959E-05	0,616	202360	211710	33,58	0,665	0,000422
3	0.075	3	18,64	1,144E-05	0,909	5608	3,144E-06	0,760	45162	299980	55,10	0,653	0,000487
3	0.075	5	25,11	1,544E-05	0,904	7548	4,834E-06	0,714	64215	298560	56,53	0,629	0,000213

Tabla B5. Datos obtenidos a partir de simulación de los circuitos equivalentes correspondientes a las mediciones de impedancia en medio de cultivo Rpmi con células HOS en una concentración de 30000 cel/mL, a los diferentes tiempos de medición (circuito correspondiente a la Figura 41.a).

Ensayo PLA-PGA/HAp+			Rs ($\Omega.cm^2$)	Ccel (F.cm ²)	Rextra ($\Omega.cm^2$)	CPEbiom (F.cm ²)	n	Rbiom ($\Omega.cm^2$)	CPErec/st (F.cm ²)	n	Rrec/st ($\Omega.cm^2$)	Chi-Squared
Q (%)	Col(%)	Día										
0	0.05	1	0,75	9,286E-06	279,4	1,009E-05	0,794	72733	6,577E-07	0,680	6,023E05	0,001359
0	0.05	3	1,14	6,199E-06	493,0	1,139E-07	1	521,7	8,183E-06	0,748	1,00E20	0,001914
0	0.05	5	1,79	5,955E-06	416,5	7,636E-07	1	233,9	8,074E-06	0,739	1,00E12	0,006546
0	0.075	1	3,32	1,919E-05	23,5	7,683E-06	1	21134	5,667E-05	0,861	1,211E06	0,003409
0	0.075	3	4,99	4,074E-06	44,7	5,259E-06	0,832	1109	2,868E-06	0,817	1,561E07	0,001418
0	0.075	5	4,06	4,635E-06	118,5	7,509E-06	0,821	4163	2,933E-06	0,776	7,422E06	0,001014

Tabla B6. Datos obtenidos a partir de simulación de los circuitos equivalentes correspondientes a las mediciones de impedancia en medio de cultivo Rpmi con células HOS en una concentración de 30000 cel/mL, a los diferentes tiempos de medición (circuito correspondiente a la Figura 41.b).

Ensayo PLA-PGA/HAp+			Rs ($\Omega.cm^2$)	CPEcel (F.cm ²)	n	Rextra ($\Omega.cm^2$)	CPEbiom/rec (F.cm ²)	n	Rbiom/rec ($\Omega.cm^2$)	Ws-R	Ws	Ws-n	Chi-Squared
Q (%)	Col(%)	Día											
3	0.05	1	19,55	3,831E-06	0,753	5101	4,938E-06	0,866	18351	81194	21,97	0,478	0,000278
3	0.05	3	15,92	2,617E-06	0,794	14438	3,626E-06	1	14812	84180	22,00	0,458	0,000558
3	0.05	5	40,42	2,205E-05	0,913	51489	8,654E-05	0,732	18987	546980	4,88	0,690	0,000050
3	0.075	1	32,55	2,272E-05	0,910	18441	9,390E-05	0,732	18567	536001	24,25	0,598	0,003362
3	0.075	3	23,75	1,422E-05	0,909	8530	1,382E-04	0,807	6277	191510	21,59	0,613	0,000468
3	0.075	5	6,95	1,466E-05	0,917	11082	1,235E-04	0,709	9026	132440	13,05	0,645	0,001216

ANEXO C: VOLTAMETRÍA CÍCLICA

Figura C1. Voltagrama para 15000 cel/mL a diferentes tiempos de medición. (a) PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.05%) y (b) PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.05%).

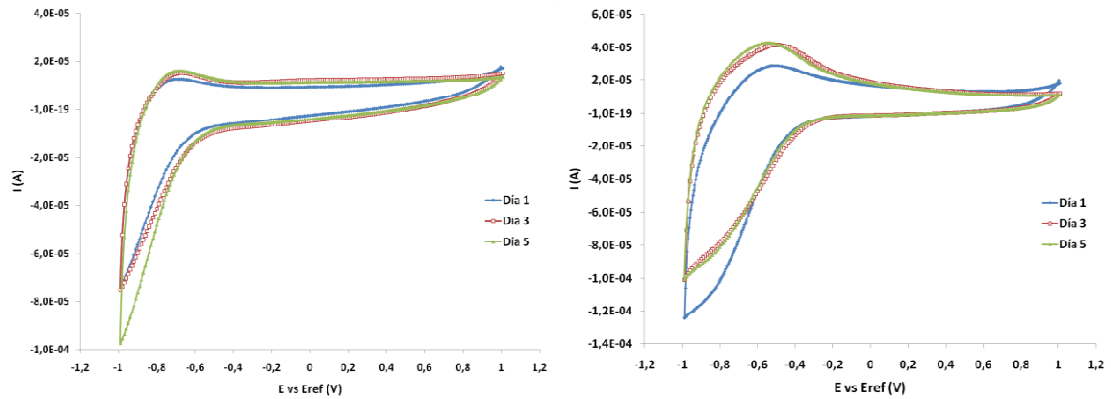


Figura C2. Voltagrama para 15000 cel/mL a diferentes tiempos de medición. (a) PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.075%) y (b) PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%).

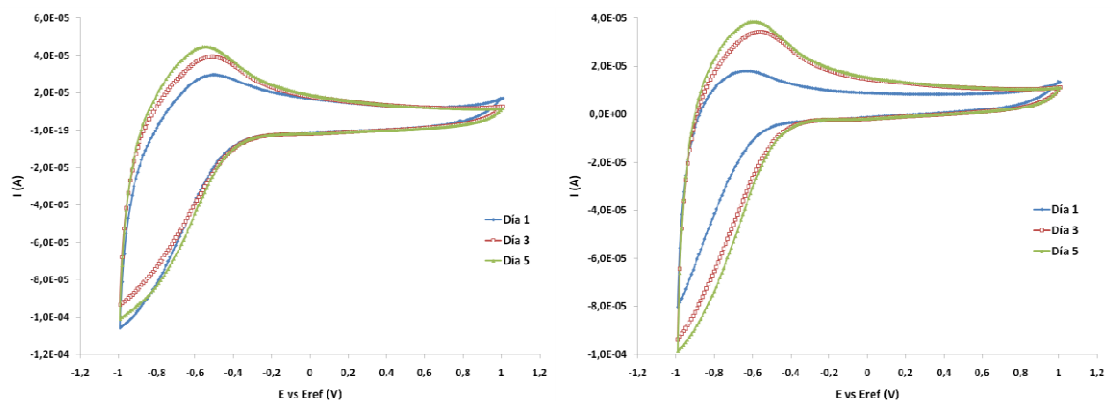


Figura C3. Voltagrama para 30000 cel/mL a diferentes tiempos de medición. (a) PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.05%) y (b) PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.05%).

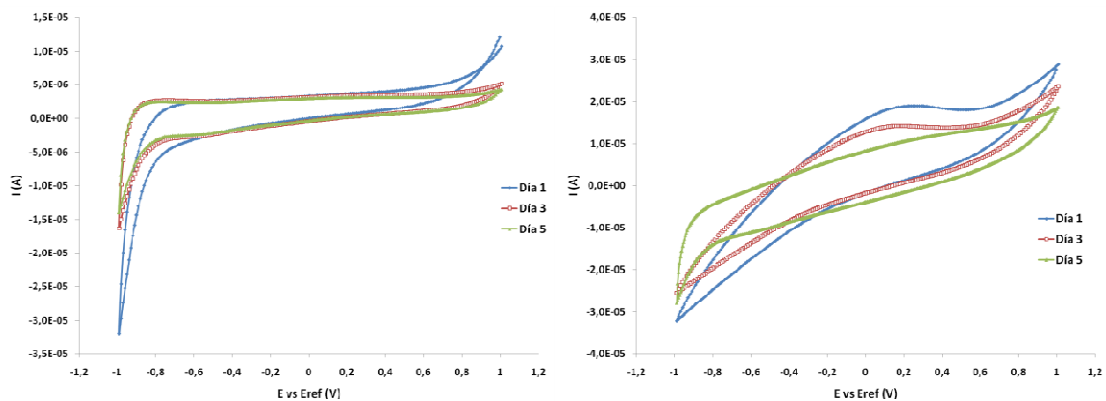


Figura C4. Voltagrama para 30000 cel/mL a diferentes tiempos de medición. (a) PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.075%) y (b) PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%).

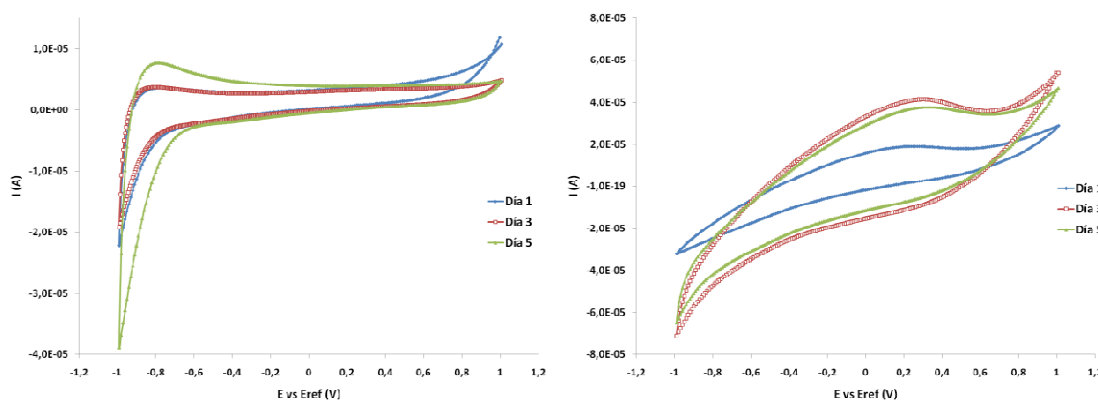


Figura C5. Voltagrama para medio de cultivo Rpmi a diferentes tiempos de medición. (a) PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.05%) y (b) PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.05%).

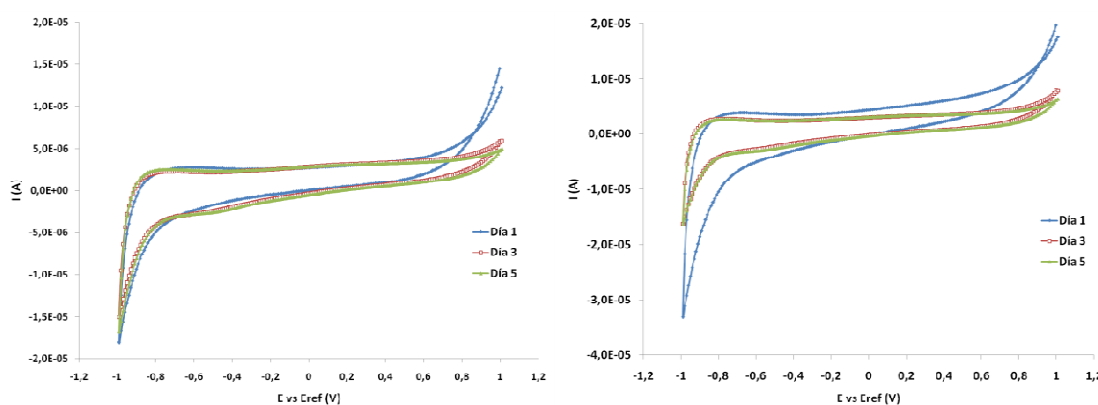


Figura C6. Voltagrama para medio de cultivo Rpmi a diferentes tiempos de medición. (a) PLA-PGA/HAp/Q(0%)/Col(0.075%) y (b) PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.075%).

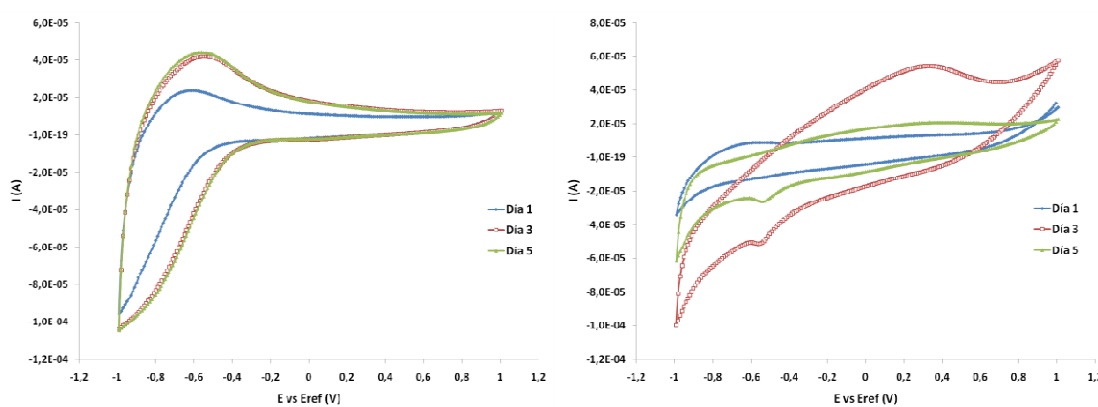


Figura C7. Voltagrama para medio de cultivo Rpmi a diferentes tiempos de medición para PLA-PGA/HAp.

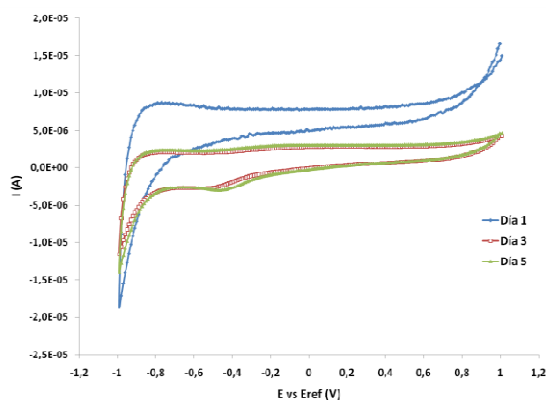


Tabla C1. Picos de corriente y voltaje para los diferentes sistemas en Rpmi-HOS y Rpmi, a los tres tiempos de medición. Corriente en μA y potencial en mV vs SCE.

Ensayo PLA-PGA/HAp+		Concentración celular/mL o Rpmi	Día 1		Día 3		Día 5	
Q(%)	Col(%)		Ipc	Epc	Ipc	Epc	Ipc	Epc
0	0.05	15000	8,92	-230,3	8,05	-399,6	7,82	-329,3
			11,89	-669,4	11,65	-689,2	12,37	-698,8
3	0.05	15000	14,34	574,0	12,75	798,9	12,07	927,7
			22,52	-459,3	32,63	-499,3	30,88	-549,9
0	0.075	15000	14,15	488,9	12,38	768,5	12,19	928,4
			24,63	-459,6	30,19	-519,3	33,00	-549,2
3	0.075	15000	8,51	199,7	10,43	738,3	10,85	778,3
			11,89	-619,0	11,65	-569,7	12,37	-599,6
0	0.05	30000	---	---	2,39	-579,2	2,282	-479,6
			---	---	---	---	2,336	-729,2
3	0.05	30000	16,35	429,7	12,44	359,8	11,68	340,2
			17,10	210,0	12,63	150,1	12,01	134,0
0	0.075	30000	3,03	-280,0	2,64	9,572	3,49	189,7
			3,97	-759,2	3,23	-759,3	6,74	-778,7
3	0.075	30000	18,54	527,0	34,39	539,2	32,35	558,7
			19,13	220,4	38,03	229,7	34,48	259,7
0	0.05	Rpmi	2,76	-230,3	2,08	-578,9	2,13	-458,8
			3,16	-609,8	---	---	2,20	-658,5
3	0.05	Rpmi	4,13	-329,5	2,30	-409,2	2,22	-469,1
			4,75	-669,0	2,56	-758,7	2,42	-758,6
0	0.075	Rpmi	10,06	299,7	12,40	599,0	12,16	808,4
			22,94	-608,9	34,62	-549,2	35,23	-569,4
3	0.075	Rpmi	9,01	-409,3	43,47	667,7	19,83	658,9
			9,24	-529,0	52,25	318,2	19,96	489,3
----	----	Rpmi	7,82	-509,6	1,912	-549,3	2,18	-579,2
			8,08	-749,4	1,934	-729,2	2,21	-689,0

ANEXO D: FOSFATASA ALCALINA Y MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA

Tabla D1. Producción de fosfatasa alcalina en los sobrenadantes.

Ensayo	Tiempo de incubación celular (h)	Absorbancias ⁶ (promedio)	Desviación estándar
Control-3	72	-0,001	----
Control-5	120	0,080	----
P10-3	72	0,004	0,034
P10-5	120	0,043	0,054
P11-3	72	-0,036	0,002
P11-5	120	0,081	0,008
P12-3	72	-0,009	0,018
P12-5	120	0,058	0,016
P13-3	72	-0,031	0,011
P13-5	120	0,148	0,116

Tabla D2. Producción de fosfatasa alcalina en los lisados celulares.

Ensayo	Tiempo de incubación celular (h)	Absorbancias (promedio)	Desviación estándar
Control-3	72	0,010	----
Control-5	120	0,020	----
P10-3	72	0,017	0,008
P10-5	120	0,034	0,035
P11-3	72	0,005	0,008
P11-5	120	0,019	0,001
P12-3	72	0,070	0,098
P12-5	120	0,015	0,001
P13-3	72	0,004	0,012
P13-5	120	0,131	0,134

⁶ Absorbancia registrada menos la absorbancia del blanco de reactivo.

ANEXO E: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Figura E1. Diagramas de efectos principales para Ccel y Rextra

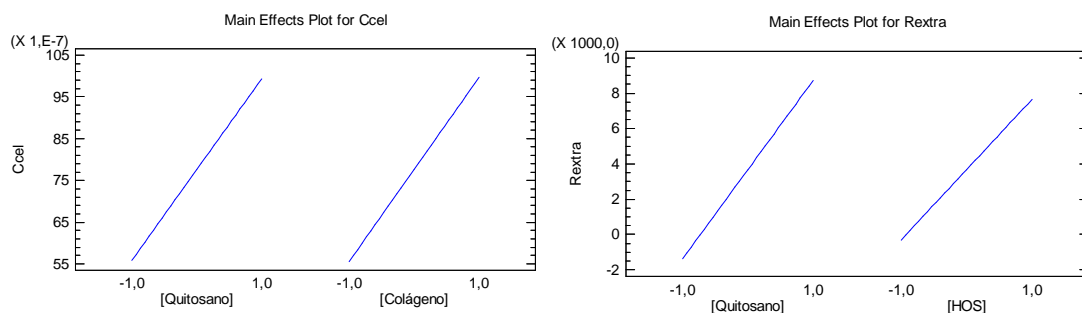


Figura E2. Diagramas de superficie de respuesta y contorno para el análisis de múltiple respuesta de Ccel y Rextra.

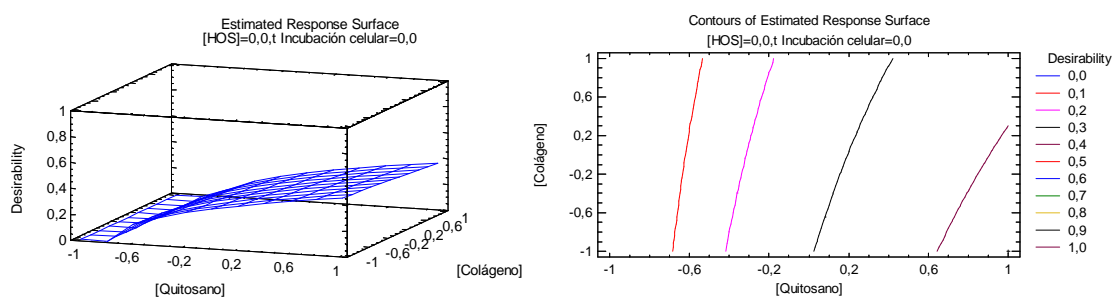


Tabla E1. Optimización por el método de deseabilidad global.

Factor	Low	High	Optimum
[Quitosano]	-1,0	1,0	1,0
[Colágeno]	-1,0	1,0	1,0
[HOS]	-1,0	1,0	1,0
t Incubación celular	-1,0	1,0	1,0

Ecuaciones que modelan las variables de respuesta Ccel y Rextra

$$\begin{aligned}
 Ccel = & 7,76E - 6 + 2,18E - 6 * [Q] + 2,22E - 6 * [Col] + 5,72E - 7 * [HOS] - 4,76E - 7 * t.inc \\
 & + 1,09E - 6 * [Q] * [Col] + 3,86E - 7 * [Col] * [HOS] - 2,66E - 6 * [Col] * t.inc \\
 & - 4,87E - 7 * [HOS] * t.inc + 3,67E - 6 * t.inc^2
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 Rextra = & 3677,3 + 5054,5 * [Q] - 833,8 * [Col] + 3973,6 * [HOS] + 2870,4 * t. inc - 745,1 * [Q] \\
 & * [Col] + 3920,9 * [Q] * [HOS] + 2822,6 * [Q] * t. inc - 1997,6 * [Col] * [HOS] \\
 & - 2945,4 * [Col] * t. inc + 2037,2 * [HOS] * t. inc + 2330,7 * t. inc^2
 \end{aligned}$$

Figura E3. Diagramas de efectos principales y de interacción para Rpa

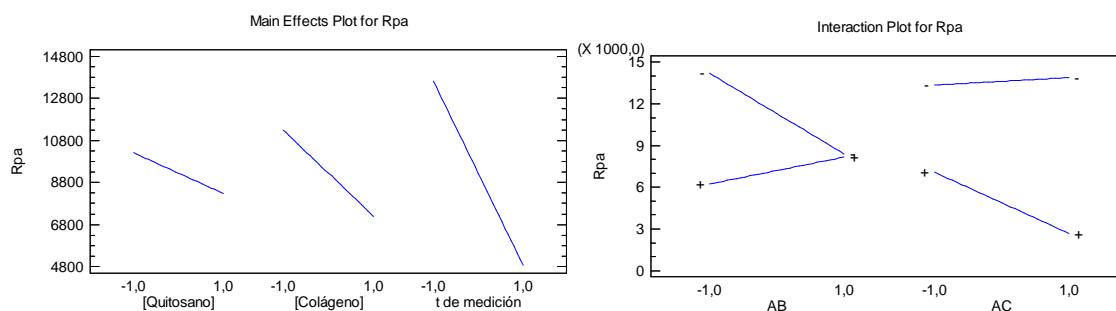


Figura E4. Diagrama de superficie de respuesta para Rpa

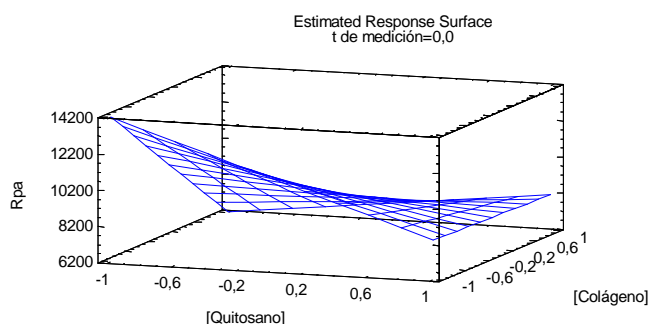


Tabla E2. Respuesta óptima para Rpa

Optimize Response
Goal: minimize Rpa

Factor	Low	High	Optimum
[Quitosano]	-1,0	1,0	1,0
[Colágeno]	-1,0	1,0	1,0
t de medición	-1,0	1,0	1,0

Ecuación que modela la variable de respuesta Rpa.

$$\begin{aligned}
 Rpa = & 9247,5 - 962,833 * [Q] - 2053,8 * [Col] - 4372,6 * t. medición + 1943,5 * [Q] * [Col] - 1237,4 \\
 & * [Q] * t. medición
 \end{aligned}$$