

**ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE LA ELECTROACTIVACIÓN DE  
OSTEOBLASTOS INMOVILIZADOS EN COMPUESTOS POLIMÉRICOS  
SEMICONDUCTORES DE PLA-PLG-BIOCERÁMICO**

**HUGO ARMANDO ESTUPIÑÁN DURAN**

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

**2011**

**ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE LA ELECTROACTIVACIÓN DE  
OSTEOBLASTOS INMOVILIZADOS EN COMPUESTOS POLIMÉRICOS  
SEMICONDUCTORES DE PLA-PLG-BIOCERÁMICO**

**HUGO ARMANDO ESTUPIÑÁN DURAN**

**Tesis para optar al título de doctor en ingeniería química**

**Director**

**DARÍO YESID PEÑA BALLESTEROS**

**Ingeniero Metalúrgico, Ph.D**

**Co-director:**

**DIONÍSIO ANTONIO LAVERDE CATAÑO**

**Ingeniero Metalúrgico, Ph.D**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS**

**DOCTORADO EN INGENIERÍA QUÍMICA**

**ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**BUCARAMANGA**

**2011**

## AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a:

La Universidad Industrial de Santander, a la Escuela de Ingeniería Química y a la Escuela de Ingeniería Metalúrgica, por permitirme formar como ingeniero, como investigador y docente.

Las directivas y personal administrativo de la UIS, por permitirme crecer, tanto profesional como humanamente y por su valioso apoyo en mis proyectos de investigación.

Mis directores, Darío, Custodio y Dionisio, por su conocimiento y mucho más, por su amistad y guía en mi formación como investigador y ser humano.

A todos los que han sido y son mis estudiantes de proyecto en el Grupo de Investigaciones en Corrosión, por su paciencia, su amistad, camaradería y esfuerzo por culminar las investigaciones propuestas, así como su aporte para que el GIC sea cada vez mejor.

A los profesores y técnicos de la UIS que colaboraron en mi investigación.

A Dios por su bendición y amor.

A mis Padres y hermano, por todo lo que me han dado.

A mi abuela Rosa, que desde el cielo me acompaña.

A mis tíos y primos que creyeron en mí

A mis amigos

A Johanna, por darme amor y tranquilidad.

A mi perro Paul, por su cariño y valiosa compañía en las buenas y las malas.

HUGO ARMANDO ESTUPIÑAN DURAN

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
INTRODUCCION	15
1. ESTADO DEL CONOCIMIENTO	19
1.1 Breve reseña de los biomateriales para reparación ósea	20
1.2 Matrices de regeneración de tejidos óseos	22
1.2.1 Descripción del tejido óseo	23
1.2.2 Biocerámicos en matrices de regeneración celular	24
1.2.3. Materiales poliméricos en matrices de regeneración celular	25
1.2.3.1 Biopolímeros naturales	25
1.2.3.2 Biopolímeros no naturales	27
1.2.4 Adsorción de proteínas y adhesión celular en matrices de regeneración ósea	30
1.3 Respuesta eléctrica al crecimiento celular óseo en armazones poliméricos	32
1.3.1 Representación eléctrica de la respuesta celular por modelos de circuitos eléctricos equivalentes	33
1.3.2 Impedancia de las membranas celulares	34
1.4 Polímeros biodegradables semiconductores extrínsecos	36
1.5 Respuesta osteocelular en armazones poliméricos ante la aplicación de un sobre potencial eléctrico	37
1.6 Evaluación de la respuesta celular en matrices de regeneración mediante técnicas electroquímicas	38
1.7 Evaluación de la respuesta celular por Microbalanza de Cristal de Cuarzo (MCC)	42
1.8 Técnicas combinadas de QCM y electroquímica para la caracterización de la respuesta celular en armazones de regeneración celular	44
2. CAPÍTULO 1. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE UN ARMAZÓN PARA REGENERACIÓN ÓSEA DE ÁCIDO POLILÁCTICO, ÁCIDO POLIGLICÓLICO, BIOCERÁMICO, QUITOSANO Y ZINC.	52
2.1. Introducción de este capítulo	52
2.2. Experimentación	55
2.3. Resultados de este capítulo	61
2.3.1. Degradación del armazón de PLA-PLG-HAP a diferentes Concentraciones	61
2.3.2. Interacción de quitosano-HAP ante una solución buffer de fosfatos	67
2.3.3. Efecto de la adición de zinc en exceso en el PLA para la conformación de un armazón poli electrolítico de regeneración ósea.	72
2.4 Conclusiones de este capítulo	79
3. CAPÍTULO 2. ADSORCIÓN POLARIZADA DE FOSFATOS Y	

PROTEÍNAS SOBRE ARMAZONES DE PLA-PLG-BIOCERÁMICO-ZINC	87
3.1. Introducción de este capítulo	87
3.2 Experimentación	89
3.3. Resultados	92
3.3.1 Biomineralización del ácido poliláctico-biovidrio y ácido poliláctico-hidroxiapatita	92
3.3.2 Adsorción polarizada de proteínas de albúmina y amilasa sobre armazones polielectrolíticos biodegradables de PLA-PLG-HAP-ZINC	99
3.4 Conclusiones de este capítulo	106
4. Capítulo 3. ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE LA ADHESIÓN POLARIZADA DE CÉLULAS ÓSEAS SOBRE ARMAZONES DE PLA-PLG-HAP-QUITOSANO-ZINC	103
4.1 Introducción de este capítulo	112
4.2 Experimentación	113
4.3 Resultados y análisis	124
4.3.1 Adsorción electroactiva de colágeno sobre PLAG-quitosano-HAP-zinc	124
4.3.2 Adhesión de células osteoblásticas sobre armazones de PLGA-HAP-qo-zinc bajo polarización eléctrica.	129
4.4 Conclusiones de este capítulo	139
Referencias	132
5. Discusión final	147

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1.1	Esquema del proceso de adsorción sobre la superficie de un sustrato sólido	30
1.2	Membrana celular y su equivalente circuito eléctrico	39
1.3	Modelo de Cole – Cole	41
1.4	Esquema típico de un cristal de cuarzo piezoeléctrico	43
1.5	Representación del montaje para la Microbalanza de Cristal de Cuarzo Electroquímica (EQCM)	45
2.1	Estructura Química del PLGA	53
2.2	Reacción de copolimerización de PLA con el PLG	56
2.3	Preparación de las probetas de PLGA	57
2.4	% de masa perdida de PLA-PLG-HAP con diferentes concentraciones respecto al tiempo de degradación en SBF	61
2.5	Porcentaje PBS absorbido, respecto al tiempo de degradación de los dos copolímeros mezclados con HA	62
2.6	Cinéticas de Degradación PLA-PLG (50:50)/HAP y	
2.7	PLA-PLG (70:30)/HAP	64
2.7	Espectros FT-IR para mezclas PLA-PLG-HA, (a) 50-50/0% (b) 50-50/10% (c) 70-30/10%, sometidas a degradación hidrolítica por 8, 16 y 20 días	64
2.8	Temperaturas de transición vítrea de las mezclas con el tiempo de degradación	66
2.9	Reacción de hidrólisis del PLGA [18]	67
2.10	DRX de las muestras de HAP con concentraciones de quitosano entre 0,05 y 0,25g/l	68
2.11	Comparación de los anchos de picos medios de las curvas de difracción en las diferentes composiciones de quitosano empleadas, mezcladas con HAP	68
2.12	Espectro FT-IR del quitosano puro y los recubrimientos obtenidos a los diferentes porcentajes de quitosano	69
2.13	Espectros de Nyquist de los compuestos de HAP-qo, a 0,1 g/L y 0,2 g/L	71
2.14	SEM de las muestras obtenidas con 0,1 a) y 0,2 g/l b) de quitosano	73
2.15	FT-IR de PLA a diferentes concentraciones de Sulfato de zinc	74
2.16	Espectros de Bode obtenidos de las muestras de PLA con incorporación de sulfato de zinc a diferentes	

	concentraciones	65
2.17	Gráficas Mott-Schottky de PLA a diferentes porcentajes de dopado con zinc	77
3.1	Montaje para pruebas electroquímicas	91
3.2	Espectro DRX de la hidroxiapatita sintetizada	92
3.3	Espectro Infrarrojo del Vidrio Bioactivo	93
3.4	Espectros de bode: a) T = 45°C y b) T = 24°C con diferentes concentraciones de iones de Ca <sup>+2</sup> , para las mezclas trabajadas	94
3.5	Circuito equivalente para el proceso de adsorción de apatita	95
3.6	Comparación del efecto de biomineralización de PL-BV y PLA- HAP	98
3.7	Micrografías SEM de muestras sumergidas en SBF a 14 días de inmersión: (a) PLA-Biovidrio, (b) PLA-HAP	99
3.8	Espectros de bode. Comparación de las proteínas y la solución buffer	100
3.9	Espectros de EIE de la Albúmina a un voltaje aplicado de 0 a 0.4 V a 37°C	101
3.10	Isotermas de adsorción de de la Albúmina con voltaje aplicado de 0 y 0,4V, respectivamente, sobre la superficie del armazón de PLA-PLG-HAP-zinc	102
3.11	Isoterma de adsorción de Langmuir de la albúmina con voltaje aplicado de 0,4 V sobre la superficie del copolímero PLA-PLG-HAP-zinc	103
3.12	Grafica de la dependencia de la energía libre de Gibbs de adsorción con la temperatura, para la amilasa a) y albúmina b)	104
3.13	Micrografías SEM: a) PLA-PLG-HAP-zinc b) Monocapa Albúmina c) Monocapa Amilasa	105
4.1	Montaje para la fijación del armazón sobre los cristales de cuarzo. a) Cristal de cuarzo. b) Ánodo y cátodo. c y d) Montaje.	115
4.2	Montaje empleado en los ensayos de MECC de los armazones y los osteoblastos	116
4.3	Montaje de pruebas por MECC para la determinación de la capacitancia interfacial.	118
4.4	Contacto trifásico sólido-líquido-fluido	121
4.5	Montaje MCC para la determinación de ángulos de contacto.	123
4.6	Voltagrama del sistema PBS-colágeno -PLA-PLG-biocerámico-qq	124
4.7	Espectro de Bode del ensayo de adsorción de colágeno 27.5 µg/ml, 37°C, 0 V y su simulación	125
4.8	Cambio de ΔGads Vs T (°k) obtenido a partir de ensayos	



	de EIE con los diferentes sobrepotenciales de polarización sobre el armazón de PLA-PLG-HAP-qo	126
4.9	Gráfica de la tensión superficial obtenida para cada concentración de colágeno en SBF, en contacto con la superficie del armazón PLA-PLG-HAP-qo	128
4.10	Típico espectro de Bode obtenido del sistema electroquímico Células-armazón-ambiente fisiológico y ajuste a partir de un modelo de circuito equivalente	130
4.11	Modelos de circuitos equivalentes que representan los procesos para: a) sin adhesión celular, b) con adhesión celular y formación de matriz extracelular MEC	131
4.12	Mecanismo de adhesión celular al armazón	132
4.13	Cambios de la Resistencia intracelular con el tiempo, respecto a la concentración de quitosano y del potencial de polarización	133
4.14.	Cambios de la Resistencia extracelular con el tiempo, respecto a la concentración de quitosano y del potencial de polarización	133
4.15	Imágenes escaneadas por AFM	136
4.16	SEM del armazón de PLA-PLG -HAP-3% of quitosano, sin células a 5.000X y con células polarizadas con sobrepotencial de -50mV a 1.500X	137
4.17	Cobertura de las células HOS sobre el armazón de PLA-PLG-HAP-quitosano	139

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
2.1	Constantes dieléctricas relativas para cada % de dopado en el PLA	76
3.1	Parámetros termodinámicos de adsorción de apatita obtenidos	96
3.2	Concentración de calcio remanente en solución, Volumen 40ml T: 37 °C	97

## RESUMEN

**TITULO:** ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE LA ELECTROACTIVACIÓN DE OSTEÓBLASTOS INMOVILIZADOS EN COMPUESTOS POLIMÉRICOS SEMICONDUCTORES DE PLA-PLG-BIOCERÁMICO.\*

**AUTOR:** HUGO ARMANDO ESTUPIÑAN DURAN \*\*

**PALABRAS CLAVES:** Biomateriales, electroactivación, electroquímica, bioactividad, polímeros biodegradables, biocerámicos.

### DESCRIPCIÓN:

Este trabajo presenta los resultados del estudio del fenómeno de la electroactivación del sistema de células de ácido poliláctico (PLA) y el ácido poliglicólico (PLG), con la adición de elementos bioactivos de quitosano (q), biocerámico (bc) y zinc. El objetivo principal fue explicar el aumento de la adhesión de las células como resultado del cambio en la hidrofiliidad de la matriz de regeneración celular y la variación en el intercambio iónico celular, inducido por la aplicación de un sobre potencial eléctrico y la adición de elementos bioactivos a los polímeros.

De acuerdo con la respuesta electroquímica, bajas concentraciones de quitosano con PLA y polímeros de PLG, promovieron la funcionalización superficial, con un aumento de la adhesión celular. Las células tienen un espacio intracelular entre las paredes de la membrana bilipídica a través del cual los vasos vasculares permiten el intercambio de iones. Previas investigaciones han demostrado que las células responden a estímulos eléctricos de corta duración, provocando cambios físicos y químicos que aumentan la conductividad iónica, la capacidad de asociarse con otras células y la capacidad de formar enlaces dipolo-dipolo con superficies cargadas de polaridad opuesta. Se sabe que la polaridad de las membranas celulares es claramente negativa, con su mayor afinidad hacia los materiales de carga positiva.

En forma consistente con la propiedad eléctrica de las células, el tejido óseo tiene propiedades piezoeléctricas, de manera que las células óseas responden eléctricamente a las perturbaciones mecánicas, o bien, con respuestas mecánicas a partir de la estimulación eléctrica. Cuando una diferencia de potencial entre las células óseas y material de apoyo PLG PLA se genera, este sistema puede ser activado mediante la aplicación de un sobrepotencial de electrodo para inducir cambios a nivel vascular-dendrítico-celular, lo que aumenta la posibilidad de intercambio iónico.

---

\* Tesis Doctoral

\*\* Facultad de ingenierías fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director del proyecto: Darío Yesid Peña Ballesteros. Codirector del proyecto: Dionisio Antonio Laverde Cataño.

## SUMMARY

**TITLE:** ELECTROCHEMICAL STUDY OF ELECTROACTIVATION OF IMMOBILIZED OSTEOBLAST IN SEMICONDUCTORS POLYMERIC COMPOUNDS OF PLA-PLG-BIOCERAMIC.\*

**AUTHOR:** HUGO ARMANDO ESTUPIÑAN DURAN \*\*

**KEYWORDS:** Biomaterials, electroactivation, electrochemical, bioactivity, biodegradable polymers, bioceramic.

### DESCRIPTION:

This work presents results of the study of the phenomenon of electroactivation of system cell-poly(lactic acid) (PLA) and polyglycolic acid (PLG) with additions of bioactive elements of chitosan (q), bioceramic (bc) and zinc. The main purpose was to explain the increase in the adhesion of cells as a result of the change in the hydrophilicity of the matrix cell regeneration and the variation in intracellular ion exchange, induced by the application of electric overpotential and bioactive elements additions to the polymers.

According to the electrochemical response, low concentrations of chitosan with PLA and PLG polymers, promoted the surface functionalization by increasing the cell adhesion. The cells have an intracellular space between walls of bilipid membrane through which vascular vessels are located that allow ion exchange. Previous research has shown that cells respond to electrical stimuli of short duration, causing physical and chemical changes that increase the ionic conductivity, the ability to associate with other cells and the ability to form dipole-dipole bonds with charged surfaces of opposite polarity. It is known that the polarity of cell membranes is clearly negative, with its higher affinity toward positively charged materials.

Consistent with the electrical property of cells, bone tissue has piezoelectric properties, so that bone cells respond electrically to mechanical disturbances, or alternatively, mechanical responses from electrical stimulation. When a potential difference between bone cells and supporting material PLG PLA is generated, this system can be activated by applying electrode overpotential induce changes at the level and vascular dendritic cells and result in different transmembrane ion concentration, increasing the possibility of exchange.

---

\* Doctoral Thesis

\*\* Faculty of Engineering Physicochemical. School of Chemical Engineering. Project Director: Darío Yesid Peña Ballesteros. Project Co-director: Dionisio Antonio Laverde Cataño.

## INTRODUCCIÓN

En esta tesis doctoral, se ha estudiado el fenómeno de electroactivación del sistema célula - matriz extracelular (MEC) – armazón de regeneración celular de ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PLG) con adiciones de elementos bioactivos de quitosano (qo), biocerámico (bc) y zinc, con el propósito de entender las variaciones en el intercambio iónico intracelular y en la adhesión celular y de proteínas, como consecuencia de la aplicación de un sobrepotencial eléctrico y por las adiciones de los elementos bioactivos al armazón.

Para aumentar el efecto electródico del armazón de PLA-PLG-qo-bc, se ha propuesto un método para transformar este material en un polielectrolito biodegradable catódico, adicionando zinc en exceso. Esta modificación permitió la funcionalización superficial del armazón, aumentando la adhesión celular. Las células tienen un espacio intracelular entre paredes de membrana bilipídica a través de la cual se localizan vasos vasculares que permiten el intercambio iónico. Previa investigación han mostrado que las células responden a estímulos eléctricos de corta duración, generando cambios físicos y químicos que aumentan la conductividad iónica, la capacidad de asociarse con otras células y la capacidad de formar enlaces dipolo-dipolo con superficies cargadas de polaridad opuesta. Es sabido que la polaridad de las membranas celulares es netamente negativa, siendo su mayor afinidad hacia materiales con carga positiva. En coherencia con la propiedad eléctrica de las células, el tejido óseo presenta propiedades piezoeléctricas, por lo que las células óseas responden eléctricamente a

perturbaciones mecánicas, o a respuestas mecánicas a partir de estímulos eléctricos. Cuando se generó una diferencia de potencial entre las células óseas y el armazón catódico, fue posible activar este sistema, afectando la hidrofiliidad del armazón e induciendo transformaciones celulares a nivel dendrítico y vascular lo que generó diferencias de concentración de iones transmembrana, aumentando su posibilidad de intercambio.

Las transformaciones celulares inducidas se refieren a la afectación en las reacciones de hidroxilación y fosforilación de la membrana celular e incremento en el intercambio de iones di-calcio hacia el interior de la célula. Paralelamente, la reabsorción de calcio del bc interviene en el intercambio de iones a través de la transmembrana celular y hacia el fluido fisiológico, favoreciendo el crecimiento de tejido óseo.

Las variaciones en el intercambio iónico intracelular, así como en la adhesión celular y de proteínas, se ha podido estudiar mediante modelos de circuitos eléctricos equivalentes a estos procesos. Estos modelos basados en conceptos de resistencia y capacitancia de doble capa eléctrica, permitieron parametrizar y analizar la información electroquímica de cada interfase de intercambio para comprender los cambios fisicoquímicos en los armazones catódicos afectados por la aplicación de un potencial eléctrico. La información que se obtuvo de este estudio se relacionó con la conformación y adsorción sobre la superficie de compuestos orgánicos e inorgánicos, con procesos de transporte de masa y de carga a través de las interfaces de capas de proteínas y células ensambladas y

autoensambladas sobre la superficie y con la variación estructural del armazón propuesto.

Como aporte importante de esta tesis, la dificultad del análisis de los procesos electroquímicos que suceden en tiempos cortos de relajación en las interfases del sistema conformado por el armazón catódico, las células y el medio fisiológico, es solucionada por la obtención y análisis de modelos que permiten explicar los cambios fisicoquímicos generados por la evolución de los procesos de adhesión sobre el armazón.

En el primer capítulo se muestra la síntesis y caracterización del armazón, haciendo énfasis en los resultados de los ensayos de degradación en fluido fisiológico simulado. El efecto de las adiciones de zinc al armazón, es evaluado por las técnicas electroquímicas de Espectroscopía de Impedancia y Mott Schottky. Los resultados mostraron evidentes variaciones en la estabilidad estructural y características de semiconductividad extrínseca en el armazón.

En el segundo capítulo, son presentados los resultados y análisis relacionados con el efecto de la aplicación de un sobrepotencial eléctrico sobre el armazón catódico propuesto, para favorecer la adsorción de proteínas. En una primera parte de este capítulo, se evaluó electroquímicamente la hidrofiliidad de la superficie del armazón en contacto con una solución fisiológica simulada, variando la concentración de quitosano. Luego se realizaron ensayos electroquímicos y análisis sobre la adsorción de fosfatos de calcio sobre la superficie del armazón

bajo la aplicación de un sobrepotencial eléctrico, variando las concentraciones de hidroxiapatita en el armazón. Se empleó un método combinado de parámetros electroquímicos y de ajuste a la isoterma de Langmuir para obtener una cuantificación energética del proceso de adsorción. Luego, el mismo método fue empleado para analizar el fenómeno de adsorción de proteínas de amilasa, albúmina y colágeno sobre el armazón catódico con adiciones de bc y qo, incluyendo ensayos con microbalanza de cristal de cuarzo.

En el tercer capítulo de esta tesis, se han discutido las propiedades eléctricas del sistema heterogéneo células-armazón catódico-medio fisiológico, las cuales fueron evaluadas mediante la técnica de espectroscopía de Impedancia Electroquímica EIE, cuyos espectros fueron ajustados a modelos de circuitos equivalentes propuestos con la ayuda del software ZVIEW, los cuales fueron analizados. Con la técnica de microbalanza de cristal de cuarzo fueron medidos los cambios de masa del proceso de adhesión celular sobre la superficie del armazón para corroborar los resultados electroquímicos. Las técnicas de microscopía óptica, SEM y AFM fueron empleadas para evaluar también la adhesión celular.



## 1. ESTADO DEL CONOCIMIENTO

El avance tecnológico de los biomateriales se ha basado en alcanzar la más baja tolerancia del cuerpo humano para aceptar objetos o sustancias que le son extrañas. La principal característica de estos materiales es su naturaleza u origen diferente a la materia constituyente del cuerpo humano. La compatibilidad entre materiales, se mide por la capacidad de aceptación e integración de sustancias diferentes, unas con otras, donde se presente un mínimo nivel de reacción de rechazo [1-4].

Una de las mayores aplicaciones de los biomateriales ha sido en la traumatología ósea, donde el enfoque de desarrollo actual es en la regeneración de tejido y la posibilidad de generar crecimiento a nivel *in vitro* de partes óseas complejas, que con el tiempo y la necesidad, puedan ser reemplazadas en un paciente que lo requiera. En la traumatología ósea las prótesis de naturaleza metálica, polimérica o cerámica, han alcanzado un grado de desarrollo de biocompatibilidad limitado, reflejado esto, en inconvenientes de motricidad en los pacientes. Se ha reportado que el principal problema con estos materiales, ha sido que sus propiedades de densidad y módulo de rigidez no son similares a las del hueso, lo que ha ocasionado deficiencias en la adhesión del implante con la parte traumática y reacciones de rechazo del complejo sistema fisiológico del cuerpo humano, siendo estas principalmente: necrosis ósea, infecciones y encapsulamiento de partículas extrañas (osteólisis) [5-8]. Otros tipos de prótesis han sido fabricadas con materiales compuestos, combinando las propiedades de un metal con un

cerámico, de un polímero con un cerámico y de un polímero con un metal, sin embargo, también se han presentado reportes médicos negativos por aflojamiento y rechazo de los respectivos dispositivos, tanto por problemas mecánicos, rozamiento y desgaste, como por incompatibilidad de las superficies con el medio biológico. De acuerdo a estos antecedentes, se han encausado las investigaciones sobre biomateriales hacia la obtención de una mayor biocompatibilidad funcional sobre la base de las reacciones en la interfase de contacto, entre el biomaterial y el tejido óseo [9-12].

La creciente demanda mundial de sustituciones óseas, ha llevado a desarrollar nuevas tecnologías de regeneración e implantación para mejorar la calidad de vida de los pacientes con problemas traumatológicos de reemplazos, fracturas y enfermedades degenerativas de cadera y rodilla. Como contraparte a esta demanda, el aumento progresivo en la sobrecarga hospitalaria por requerimientos de prótesis de cadera, se espera que sea el doble en menos de 5 años y de prótesis de rodilla, se espera un incremento de un 600% en 10 años.

### **1.1 Breve reseña de los biomateriales para reparación ósea**

La traumatología ósea inició sus primeros avances hace más de 2.500 años desde la época de los egipcios, quienes desarrollaron sofisticados implantes con fines de distinción social. Sin embargo su verdadero progreso se da en el siglo XX como respuesta a la carencia de tratamientos de fracturas y enfermedades del hueso

que eran consideradas irrecuperables y se solucionaban con la amputación de la zona afectada. Con el desarrollo de nuevas técnicas de medición y el avance, tanto de la medicina, los materiales y de la ciencia biológica, no fue sino hasta 1915 que se implementaron técnicas de implantación con injertos de hueso provenientes del mismo cuerpo humano (autoinjertos) y provenientes de otro individuo; sin embargo, se presentaron inconvenientes por la disponibilidad y tamaño indicado del hueso a reparar y por la inmunogenicidad y riesgo de transmisión de enfermedades. En 1950 se introdujo el concepto y la técnica de osteogénesis por distracción, la cual es usada hoy en día para corregir defectos congénitos craneofaciales, funcionando como una deformación provocada del tejido óseo. En los años 70 se empezó a usar injertos vascularizados de hueso natural, cuyo inconveniente principal ha sido la descompensación del funcionamiento fisiológico normal del cuerpo humano [13-15].

Desde los años 90 aparecieron los primeros intentos de desarrollar la ingeniería de tejidos, con el propósito de crear nuevas estructuras de similitud biológica al hueso a nivel *in vitro*, bajo tres principios básicos que combinados adecuadamente, permiten solucionar problemas muy específicos de la traumatología ósea, siendo estos: el aislamiento y cultivo de células, el uso de sustancias biológicamente activas o osteoinductoras de crecimiento de tejidos y la ubicación de células en matrices adecuadas o armazones de naturaleza polimérica que induzca la osteoconducción o crecimiento tridimensional de tejido.

En los años 2.000 y actual, se han desarrollado nuevas combinaciones de materiales para la conformación de matrices de crecimiento celular, que con el avance en la obtención de líneas celulares especializadas en la producción de matriz extracelular y proliferación celular, han permitido perfeccionar métodos de regeneración con base en conceptos de osteogénesis.

## **1.2 Matrices de regeneración de tejidos óseos**

Una de las definiciones clásicas de la ingeniería de tejidos fue postulada por Langer y Vacant en 1993 como: "un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y ciencias de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de los tejidos" [16,17].

Como principio básico de la regeneración de tejidos se tiene, que la proliferación de las células en los armazones, puede resultar en la producción de sustitutos funcionales biológicos, útiles para restaurar tejidos, tanto óseos, como de otro tipo de órganos del cuerpo humano. A la luz de la posibilidad de estos desarrollos, se ha pretendido resolver, aparte de la funcionalidad biológica, problemas de resistencia a soportar cargas mecánicas y adecuadas velocidades de degradación. Sin embargo, ha sido necesario desarrollar otras propiedades de carácter netamente superficial para asegurar el éxito de las matrices de crecimiento celular, tales como: guiar la adhesión celular, señalización biológica de células específicas y la capacidad de proveer o entregar factores de crecimiento y

diferenciación por el tiempo suficiente para alcanzar la proliferación celular [19-22]. La formación de tejidos a partir de la unión de las células a estos materiales, requiere de una serie de reacciones interfaciales con ciertos procesos biológicos involucrados según la siguiente secuencia:

1. Adsorción de proteínas y demás constituyentes biológicos
2. Acción de los macrófagos
3. Adhesión de las células
4. Diferenciación de las células
5. Formación de la matriz extracelular MEC
6. Mineralización de la matriz

### **1.2.1 Descripción del tejido óseo**

El hueso puede describirse como un composite constituido por una matriz de apatita reforzada por fibras de colágeno, configurada para proporcionar la resistencia necesaria para sostener el resto del organismo. En semejanza a esta configuración de composite, las matrices de regeneración ósea son estructuras compatibles biológicamente, con una resistencia mecánica similar a la del hueso, necesario para acoplarse con éxito al tejido que se pretende reparar o sustituir. En este orden de ideas, las funciones biológicas óseas parten del funcionamiento de las células. Estas consisten de un compartimiento de membrana lípida pequeña ocupada por un concentrado químico de solución acuosa. 70% del peso de la célula es agua; las proteínas, los ácidos nucleicos y los polisacáridos contribuyen

con un 26% del peso; el resto son iones orgánicos, azúcares, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y otras moléculas pequeñas.

El tejido óseo conformado por el hueso cortical y el hueso trabecular, se compone de tejido conectivo especializado, constituido por células, colágeno y una fase mineral compuesta de hidroxiapatita, además de líquido de la matriz intracelular. Las células que componen el tejido óseo son: células osteoprogenitoras precursoras de los osteoblastos que se ubican en los canales del hueso, del endosito y del periostio. Las células de osteoblastos con núcleo único que se mantienen en la superficie ósea, cuando son estimuladas, forman matriz ósea orgánica, mineralizando también esa matriz.

Los osteoblastos una vez activados pueden, o mantenerse en la superficie ósea con una morfología aplanada o pueden rodearse de matriz ósea y convertirse en osteocitos. Las células de osteocitos son las más abundantes en el hueso (90%), cuya función es promover el contacto entre los osteoblastos y los demás tejidos y facilitar el intercambio de minerales entre el hueso y la sangre. Los osteoclastos son células que suministran energía para los procesos de reabsorción ósea.

### **1.2.2 Biocerámicos en matrices de regeneración celular**

Los biocerámicos bioinertes, bioactivos o bioreabsorbibles, son materiales similares a la fase inorgánica del hueso y permiten una función fisiológica específica. Su uso en la construcción de matrices de regeneración celular,

(armazones) ha sido limitado por su fragilidad y su baja resistencia mecánica. La hidroxiapatita, que esta presente en el esmalte, la dentina y principalmente en los huesos ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2=\text{HA}$ , Ca/P: 1,67), corresponde al mayor componente de la matriz ósea mineralizada, seguido por otros tipos de fosfato de calcio, como el fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2=\text{TCP}$ , Ca/P: 1,5). Estos materiales por ser cerámicos bioactivos y bioreabsorbibles respectivamente, se unen directamente al hueso sin formar tejido conectivo o se disuelven gradualmente para ser reemplazados por el hueso natural. También presentan carácter iónico y su disolución es parcial o total en medios acuosos neutros (7,4 es el pH fisiológico natural) o ligeramente ácidos, ambiente último, que puede ser generado en los bordes de los osteoblastos. Los productos de su disolución pueden ser aprovechados en el intercambio iónico por los osteoblastos a través de la membrana bilipídica para la conformación de la matriz extracelular. Por otra parte, los iones calcio se disuelven desde la superficie del biocerámico, incrementando la actividad iónica del apatito en el fluido fisiológico extracelular, mientras que la superficie hidroxilada, proporciona sitios favorables para la nucleación de la hidroxiapatita carbonatada, cuyo crecimiento espontaneo consume iones calcio y fósforo del fluido extracelular.

Es posible obtener hidroxiapatita sintética y fosfato tricálcico por métodos de precipitación acuosa, por hidrólisis, por reacciones hidrotermicas y por procesos sol-gel [19-22].

### **1.2.3. Materiales poliméricos en matrices de regeneración celular**

#### **1.2.3.1 Biopolímeros naturales**

El cuerpo humano está constituido por agua, electrolitos, lípidos y sustancias proteínicas de naturaleza polimérica. El polímero natural más común en el sistema fisiológico es el colágeno, el cual es un polisacárido producido por las células en la MEC y cumple funciones de soporte estructural para la micronucleación de los cristales de apatito, los cuales crecen orientados por las fibras de colágeno. El colágeno por si solo es capaz de estimular la formación de hueso, habiéndose usado satisfactoriamente con hueso liofilizado para rellenar defectos óseos. El colágeno tipo I contribuye en la conformación del hueso en un 90%, el resto lo constituyen proteoglicanos, otras proteínas y otros tipos de colágeno. La formación de hueso está regulada por los osteoblastos en dos etapas, la formación de la matriz extracelular y la mineralización en los espacios entre las fibras de colágeno. La MEC es principalmente colágeno tipo I organizada en una estructura de nanocomposite [23-25].

Otras proteínas no colágenas, importantes en la formación de hueso por los osteoblastos durante las etapas de mineralización, son la osteocalcina (también conocida como proteína Gla ósea), cuya distribución está restringida a los tejidos calcificados. La sialoproteína del hueso es una glicoproteína fosforilada que tiene una alta capacidad de fijar calcio. La Sialoproteína I (también conocida como la osteopontina) se encuentra típicamente en el frente de mineralización y sitios de calcificación ectópica. La osteonectina es otra glicoproteína que tiene una gran afinidad por el calcio y el colágeno tipo I, su función principal está en la orientación y el crecimiento de cristales de minerales [26].



Las proteínas son polímeros de aminoácidos unidos con ligandos entre sus monómeros por un enlace peptídico entre el grupo carboxílico de un aminoácido y el grupo amino del próximo monómero. Algunas proteínas poseen carga eléctrica, la cual está influenciada por el pH del medio. Las funciones de la proteína son: responsabilizarse de la estabilidad mecánica de órganos y tejidos, transportar moléculas de oxígeno y dióxido de carbono y encargarse de regular el sistema inmunológico. También algunas proteínas en forma de polielectrolitos, regulan y controlan el señalamiento bioquímico. Los polielectrolitos son moléculas de cadena larga que tienen muchos sitios ionizables y son dispuestos en una conformación lineal ya sea abierta o conformación plegada terciaria. Naturalmente, los polielectrolitos se encuentran en proteínas de hueso no colagenosas, como la osteocalcina, osteonectina y sialoproteína del hueso. Tanto los grupos ácidos y básicos en estas proteínas cumplen funciones de unión entre las proteínas a la hidroxiapatita.

### **1.2.3.2 Biopolímeros no naturales**

Como biomateriales poliméricos no naturales, se han empleado polímeros bioestables y biodegradables con características químicas y físicas que interesan en biomedicina, en los cuales, sus propiedades estructurales y morfológicas superficiales son responsables de los fenómenos de interfase biomaterial-tejido. Como biomateriales para regeneración celular, es posible obtener polielectrolitos sintéticos en estructuras poliméricas de poli L-aspártico, ácido poli L-glutámico, poliestireno sulfonato y otros. Otras investigaciones han evaluado los efectos de la

adición de hidroxiapatita HAP en diferentes concentraciones a una matriz polimérica de ácido poliláctico (PLA) sobre, las propiedades mecánicas, la velocidad de degradación y la biocompatibilidad. Se ha demostrado que la presencia de HAP en el PLA, determina un aumento en la proliferación celular [18].

- biopolímero de quitosano en matrices de crecimiento celular óseo

El quitosano es un polisacárido catiónico lineal compuesto por unidades de D-glucosamina y N-Acetyl-D-glucosamina que se obtiene mediante desacetilación extensiva de la quitina. La quitina es un homopolímero presente en los exoesqueletos de crustáceos, moluscos, en las cutículas de los insectos y en las paredes celulares de muchos tipos de hongos. La quitina y el quitosano son considerados polímeros biocompatibles de carácter polielectrolito-catiónico. Estos son se biodegradados en el cuerpo humano en productos no-tóxicos, debido a su susceptibilidad a la hidrólisis enzimática de la lisozima y la lipasa. Estas enzimas están presentes en la saliva, los jugos gástricos y jugos pancreáticos. Sus productos de degradación son metabolitos naturales oligosacáridos o monosacáridos, que pueden ser incorporados a las rutas metabólicas. Se han realizado pruebas clínicas de implantación con quitosano en el cuerpo humano sin reportar reacciones inflamatorias o alérgicas luego de la implantación, inyección, aplicación tópica o ingestión [37]. La glucosamina del quitosano está presente en diferentes glicosaminoglicanos, de naturaleza heteropolisacárida y aniónica de las

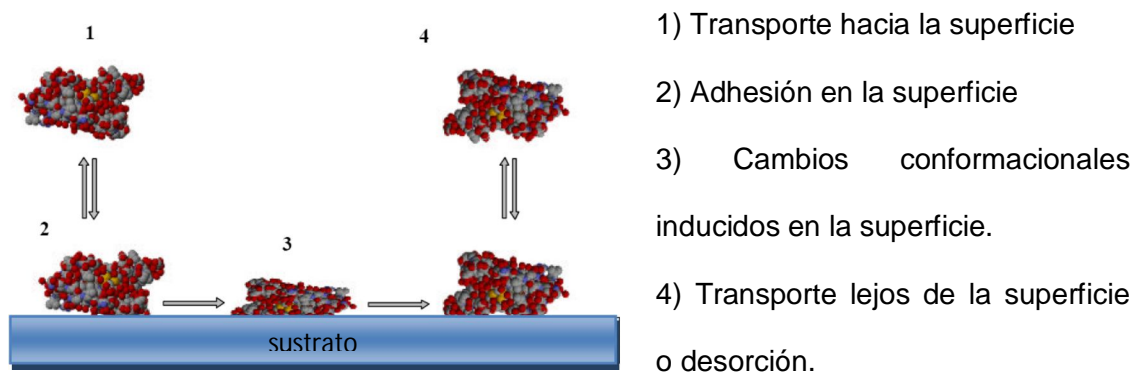
matrices extracelulares de los tejidos humanos. Esta propiedad es aprovechada por el quitosano en su configuración a pH básico y carga positiva a pH ácido, por lo que la interacción con células y proteínas con carga opuesta puede ser muy eficiente.

Se han desarrollado materiales compuestos con aumentada bioactividad y osteoconductividad, adicionando hidroxiapatita y adicionando quitosano a un polímero biodegradable de polimetilmetacrilato (PMMA), en donde la biocompatibilidad de este compuesto fue evaluada en conejos mediante pruebas en vivo, presentando un mayor grado de formación de nuevo hueso en comparación con lo observado para el PMMA puro. Por otra parte, se han obtenido láminas de quitosano (Qo), alginato (Alg) y el sistema qo-Alg, obteniendo las láminas de alginato, menores propiedades de bioadhesión que las de quitosano e intermedias con los complejos qo-Alg, atribuyéndose los mejores resultados, a la interacción entre los grupos catiónicos del qo con la superficie del tejido cargada negativamente. También se han fabricado armazones con polielectrolito de quitosano y poli ácido glutámico (g-PGA), siendo este último, un polímero biodegradable e hidrofílico encontrándose que la adhesión y proliferación de células aumento casi al triple en comparación con el material no modificado. También se ha empleado la técnica de preparación de multicapas de polielectrolitos (PEMs) compuestos de heparina, una glicosaminoglicana aniónica (GAG) y qo sobre superficies de un metal de titanio, resultando en un marcado efecto de la disminución del pH local, por la degradación del compuesto dsobre la adhesión celular. Otros investigadores han evaluado mediante cultivos celulares,

películas compuestas de polielectrolito de quitosano y ácido poliláctico (PLA) para estudiar las propiedades antifungosas de este compuesto y un material compuesto, hidroxiapatita/quitosano (HA/qo) sobre superficies de titanio, comprobando que la superficie de Ti pasó de ser hidrófoba en altamente hidrófila con estas películas [38-39].

#### 1.2.4 Adsorción de proteínas y adhesión celular en matrices de regeneración ósea

En la formación de tejido óseo a través armazones poliméricas, pueden intervenir algunas proteínas presentes en la matriz extracelular (fibronectina, laminina), las cuales se adsorben al exponerse a fluidos fisiológicos, cuya respuesta biológica depende de la fuerza de adhesión entre sustrato-proteína, de la concentración de proteínas adsorbidas y de la conformación que éstas adquieran. En la figura 1.1 se muestran las etapas que gobiernan el proceso de adsorción de proteínas sobre un sustrato sólido, siendo importantes también, las características superficiales del material (energía superficial, grupos funcionales, carga superficial, etc.) y el ambiente en donde tiene lugar la adsorción (electrolitos, concentración, etc.)



**Figura 1.1.** Esquema del proceso de adsorción sobre la superficie de un sustrato sólido.

El proceso de adsorción requiere que la energía superficial alcance un valor mínimo o que alcance el equilibrio físico, debido a que el empaquetamiento de las moléculas adsorbidas produce fuerzas contrarias en un equilibrio dinámico entre el proceso de adsorción y el proceso de desorción.

El estudio de las proteínas en interfases sólidos/líquidos han atraído la atención en el campo científico, debido a la tendencia natural de algunas proteínas para localizarse en una fase límite. Las uniones de las proteínas con las superficies son principalmente no covalentes, tales como enlaces hidrógeno y uniones electrostáticas. Se han utilizado varios modelos de adsorción de proteínas (Freundlich y de Langmuir) para cuantificar y predecir las velocidades de adsorción sobre superficies sólidas. El modelo de isoterma de Langmuir anunciado en 1916, se obtiene al igualar la velocidad de adsorción con la velocidad de desorción. Dicha isoterma presenta una correlación acertada para representar la adsorción de monocapas proteínicas sobre superficies sólidas [27]. La forma general de la ecuación para obtener las isotermas de Langmuir es:

$$\Gamma = \Gamma_{max} \frac{c_e * K_L}{1 + c_e * K_L} \quad (1.1)$$

Donde,  $c_e$  (mg/cm<sup>3</sup>) es la concentración de proteína en el equilibrio,  $\Gamma$  (mg/cm<sup>2</sup>) es la cantidad de proteína adsorbida en equilibrio o concentración superficial de proteína,  $\Gamma_{max}$  (mg/cm<sup>2</sup>) es la máxima capacidad de adsorción de proteína adsorbida o concentración superficial saturada, correspondiente a la formación de una monocapa que cubre completamente la superficie del adsorbente y  $K_L$  (cm<sup>3</sup>/mg) es la constante de Langmuir, el cual es un parámetro que refleja la

afinidad de las moléculas de proteína hacia los sitios de adsorción en la superficie. Los valores de  $r_{max}$  y  $K_L$  son evaluados de la pendiente y el intercepto de la forma lineal de la ecuación de Langmuir:

$$\frac{c_e}{r} = \frac{1}{r_{max} * K_L} + \frac{c_e}{r_{max}} \quad (1.2)$$

De igual manera, se relaciona el parámetro  $K_L$  con la energía libre de Gibbs de adsorción sobre la superficie del material para diferentes temperaturas con [28]:

$$\Delta G_{ads} = -RT \ln(55,5 * K_L) \quad (1.3)$$

Donde  $T$  es la temperatura (K),  $R$  la constante de los gases (J/mol\*K),  $\Delta G_{ads}$  (J/mol) la energía libre de Gibbs de adsorción y 55,5 (mol/dm<sup>3</sup>) es la concentración molar del agua, la cual es una aproximación válida de la solución fisiológica. La velocidad de fijación a la superficie es proporcional a las concentraciones y al área disponible para la adsorción. Las isotermas de adsorción relacionan la concentración de sustancia adsorbida y la concentración en el seno de la fase fluida a temperatura constante [29].

### **1.3 Respuesta eléctrica al crecimiento celular óseo en armazones poliméricos**

En un armazón de regeneración ósea, además de la adhesión de los componentes biológicos, las señales bioquímicas que las células emiten y reciben de su entorno determinan en gran parte el reconocimiento conveniente, migración localizada y adhesión sobre la superficie del armazón [30]. Estas señales son básicamente, señales eléctricas, las cuales han sido medidas en las células desde

1910, mediante experimentos dieléctricos de frecuencia modulada, que han mostrado, efectos significativos en la variación de la resistividad de las células en diferentes etapas de crecimiento, debido a que las células están conformadas por un citoplasma de baja resistividad rodeado por una membrana muy poco conductora, que en conjunto, presentan una capacitancia eléctrica específica y una variación de su impedancia con la frecuencia de la señal eléctrica [10].

### **1.3.1 Representación eléctrica de la respuesta celular por modelos de circuitos eléctricos equivalentes**

Se ha logrado representar membranas celulares, mediante circuitos eléctricos equivalentes, en el que una capacitancia y una resistencia en paralelo, representan a la membrana celular y una resistencia en serie a este representa el citoplasma o fase líquida que lo rodea. Se ha comprobado que la capacitancia específica de las membranas celulares, oscilan en un valor alrededor de  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ , por cada 1,3 nanómetros medidos. Respecto a esta última observación, se ha determinado también que el sistema electroquímico en una membrana biológica esta formado por una bicapa y por lípidos, cuyo espesor es cercano a 7,5 nm.

La respuesta dieléctrica de las membranas celulares se basa en la conductividad y la permitividad relativa a la del vacío. Estos parámetros, indican la capacidad de permitir el movimiento de las cargas eléctricas en su seno, así como una medida de su polarizabilidad. En otros tejidos de naturaleza biológica, sus propiedades eléctricas presentan también una dependencia con la frecuencia de la señal eléctrica. Cuando una diferencia de potencial o campo eléctrico alterno o débil, se

aplica a una suspensión coloidal de un sistema celular, ocurre una serie de fenómenos: polarización, conducción iónica, formación de densidades de carga eléctrica en las interfases, cambios en la concentración electrolítica y flujo de fluido cerca a las interfases cargadas y movimiento de partículas cargadas.

En este orden de ideas, el crecimiento celular puede modelarse como la agrupación de células que se encuentran en un medio iónico denominado medio extracelular, con un interior de la célula con el medio intracelular, donde al igual que en el medio extracelular, existe también una concentración de fluidos e iones donde ocurren procesos metabólicos celulares. La división entre ambos medios es la membrana celular, la cual funciona como una barrera permeable que protege el interior de la célula y permite el paso selectivo de iones, manteniendo la presión osmótica y el gradiente de concentración iónico entre los medios intracelular y extracelular, creando con este gradiente, una diferencia de potencial a través de la membrana, esencial para que la célula viva.

### **1.3.2 Impedancia de las membranas celulares**

El paso de la corriente eléctrica por las diferentes regiones que constituyen el tejido y las frecuencias relacionadas a esta corriente, están asociadas con las distintas relajaciones celulares. Una relajación está compuesta por una capacitancia multiplicada por una impedancia respectiva y la suspensión es el inverso de esta relajación. La impedancia de las membranas celulares, está caracterizada por cuatro suspensiones o relajaciones principales, según el rango de frecuencia:



- A frecuencias superiores al GHz, Relajación “ $\gamma$ ”, asociada con la relajación dipolar del agua (se origina por la alineación de dipolos permanentes e inducidos con respecto a un campo eléctrico).
- A frecuencias entre 1 MHz a 100 MHz, Relajación “ $\delta$ ”, relacionada con la relajación de Maxwell-Wagner, dependiente 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.
- En el orden del MHz, relajación “ $\beta$ ”, en donde 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.
- A baja frecuencia, (100 Hz a 100 KHz), relajación “ $\alpha$ ”, en donde los cambios de impedancia son pequeños y se deben principalmente a procesos de difusión iónica a un lado de la membrana celular [31-36].
- Para frecuencias más bajas aun, se sugiere que el movimiento de cargas tiene lugar en la parte externa de la célula (líquido extracelular). El origen de la relajación  $\alpha$ , la cual se ubica en frecuencias inferiores a 100 Hz no está claramente definido, asociándose con la formación de una doble capa iónica alrededor de las células o con la formación de canales de comunicación entre las mismas.

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 en bajas frecuencias con efectos dispersivos en el rango  $\alpha$ .

En la pared celular que consiste en largas cadenas de polisacáridos, aminoácidos y otros polímeros, los grupos cargados hacen que ésta actúe como intercambiador iónico, por lo que sus propiedades eléctricas cambian en función de la concentración iónica del medio circundante. Se ha demostrado que la conductividad de la pared celular permanece relativamente constante, cuando dicha concentración permanece baja, aumentando rápidamente, si la concentración iónica del medio excede a la propia de la pared.

#### **1.4 Polímeros biodegradables semiconductores extrínsecos**

El PLA, siendo un polímero muy usado en la fabricación de dispositivos biomédicos y de regeneración celular por sus propiedades de biodegradabilidad, normalmente no posee las propiedades de un polieléctrolito ni las propiedades superficiales adecuadas para promover la adhesión celular, por ser un polímero hidrofóbico, sin embargo, con el propósito de generar cambios en su hidrofiliidad, se puede combinar con otros polímeros de diferente peso molecular y velocidad de degradación; Aunque este factor no ha demostrado ser suficiente para aumentar la adhesión de células, pueden existir varias opciones para contrarrestar el problema superficial expuesto: combinarlos con polielectrolitos o convertirlos parcialmente en polielectrolitos mediante un proceso de dopado con pequeñas cantidades de agentes metálicos que no representen riesgo de toxicidad fisiológica

durante la biodegradación, polarizar el sistema adsorbato-adsorbente y combinar las anteriores opciones.

Varios investigadores han estudiado las propiedades de polímeros conductores usados en aplicaciones biomédicas y su modificación, para lograr tales propiedades, observando que la degradabilidad y la topografía de la superficie son parámetros importantes para las reacciones en la interfase de polímeros conductores con células [39].

### **1.5 Respuesta osteocelular en armazones poliméricos ante la aplicación de un sobrepotencial electrico**

Se ha analizado el efecto de la aplicación de un campo eléctrico en películas de quitosano (qo) y metilcelulosa (MC) sobre los cambios estructurales y otras propiedades macroscópicas, mostrando un mejor ordenamiento estructural, una superficie menos homogénea y una menor solubilidad en agua respecto a películas de control [40]. Partiendo de estudios como este, además de mejorar las propiedades de los componentes de la armazón celular, la aplicación del campo eléctrico, compromete a la célula propiamente. En la membrana plasmática celular (componente principal de las células que consiste en una bicapa lipídica de entre 4 y 10 nm de espesor en la que se disponen diversas proteínas formando canales transmembrana que regulan el transporte de nutrientes entre el exterior y el interior celular), en condiciones normales se presenta baja permeabilidad iónica, por lo que es considerada como una capa de baja conductividad que permite a la célula mantener una diferencia de potencial con el medio externo. Esta diferencia

de potencial es lo que se conoce por potencial transmembrana (PTM), cuyo valor oscila entre 10 y 100 mV, manteniendo el interior celular negativo respecto al exterior. El PTM juega un importante papel energético y de transporte en la actividad metabólica celular, mostrando el nivel de estado fisiológico de la célula. En el citoplasma, la solución salina del interior de la célula es altamente conductora con una gran concentración de material orgánico (proteínas, moléculas de agua libres o ligadas a proteínas, ácidos nucleicos etc). Las relajaciones en el citoplasma sólo pueden ocurrir una vez que la barrera de membrana ha sido superada por el campo eléctrico, por lo que se sitúa en el rango de altas frecuencias. Generalmente, es de suponer que es suficiente para inducir transformaciones celulares en la reparación y regeneración ósea, con la aplicación de un campo eléctrico igual en magnitud y con signo opuesto que el PTM, sin embargo pueden existir otros factores que generan pérdidas energéticas, lo que puede generar imprecisión.

### **1.6 Evaluación de la respuesta celular en matrices de regeneración mediante técnicas electroquímicas**

Para representar los procesos llevados a cabo por las células en su reconocimiento, adhesión y crecimiento, es posible usar modelos eléctricos que describan su comportamiento por medio de propiedades eléctricas del sistema biológico. La conductividad de los espacios extra e intracelulares contribuye a la resistencia promedio del tejido mientras la membrana celular contribuye al efecto

capacitivo [31]. Una de las formas de describir las propiedades eléctricas de un tejido biológico es por la impedancia compleja ( $Z$ ), la cual se describe mediante la ecuación 1.4.

$$Z = R + jX \quad (1.4)$$

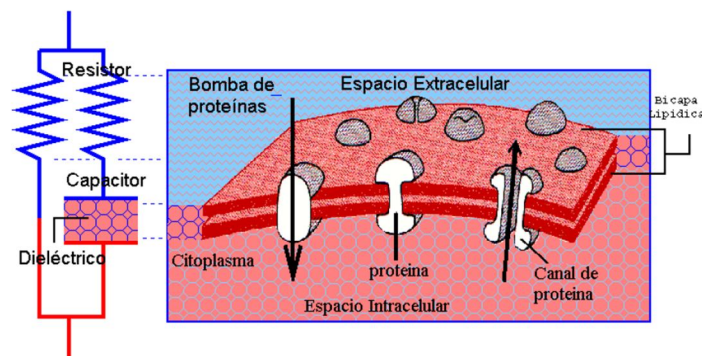
$$R = \text{Re}\{Z\} \quad (1.5)$$

$$X = \text{Imp.}\{Z\} \quad (1.6)$$

$$j = \sqrt{-1} \quad (1.7)$$

R: resistencia del tejido; X: Re, 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 (figura 1.2). La resistencia eléctrica del espacio extracelular se modela como una resistencia en paralelo con la resistencia y la capacitancia que modelan el espacio intracelular.



**Figura 1.2.** Membrana celular y su equivalente circuito eléctrico.

Si se aplica 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 [34].

Una forma de analizar la información de impedancia es mediante el espectro 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),  $R_\infty$  (impedancia a frecuencia infinita),  $\tau$  (constante característica de tiempo),  $\alpha$  (medida de la depresión del arco semicircular debajo del eje real, es una constante entre 0 y 1). La ecuación general del modelo y las ecuaciones de los 4 parámetros son:

$$Z = R + jX = R_\infty + \frac{R_0 - R_\infty}{1 + (j\omega\tau)^{1-\alpha}} \quad (1.8)$$

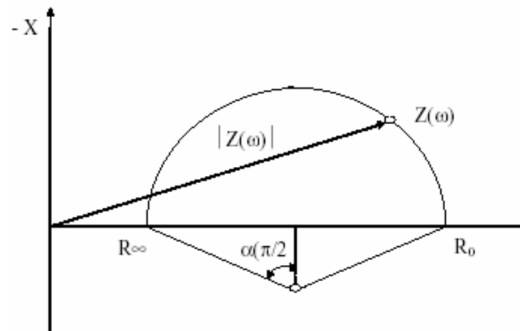
$$R_0 = x_0 + \sqrt{r^2 + y_0^2} \quad (1.9)$$

$$R_\infty = x_0 - \sqrt{r^2 + y_0^2} \quad (1.10)$$

$$\alpha = 1 - \frac{2}{\pi} \arcsen\left(\frac{|y_0|}{r}\right) \quad (1.11)$$

$$\tau = \frac{1}{\omega} \left( \frac{\sqrt{[(R_0 - R)(R - R_\infty) - x^2]^2 + [x(R_0 - R_\infty)]^2}}{(R - R_\infty)^2 + x^2} \right)^{\frac{1}{\alpha}} \quad (1.12)$$

$x_0$  y  $y_0$  son las coordenadas del centro del círculo aproximado, y  $r$  es el radio. El plano de impedancia complejo del modelo Cole-Cole se muestra en la Figura 1.3.



**Figura 1.3.** Modelo de Cole – Cole

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.

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, la cual se compara con el voltaje de salida, barriendo un rango de frecuencias para obtener el espectro característico. Este espectro es caracterizado con la ayuda de un circuito equivalente ajustado mediante simulaciones, que sirve de modelo para describir el comportamiento de la respuesta de la suspensión celular al estímulo eléctrico. Estos modelos, pueden ser variaciones de los modelos de Cole-Cole y Davidson-Cole y de modelos del comportamiento eléctrico de una suspensión celular de Maxwell, Bruggeman y Hanai. La isquemia celular se refiere al sufrimiento celular causado por la disminución del aporte de oxígeno y

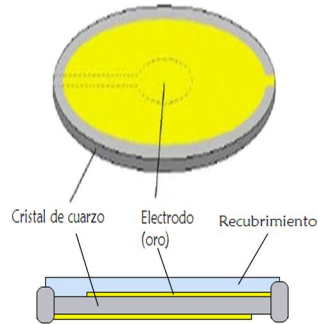
nutrientes. Si el sufrimiento es intenso puede llegar a la muerte celular (necrosis). A mayor isquemia en el tejido, aumenta el valor de  $R_0$  [35]. El valor de  $R_0$  a baja frecuencia es particularmente sensible a los cambios en volumen debido a que las capacitancias de las membranas celulares a esta frecuencia, actúan como circuitos abiertos para la corriente medida, causando un incremento en la resistividad del tejido. Durante la isquemia hay un movimiento de fluido del espacio extracelular al intracelular, donde aumenta la impedancia a baja frecuencia debido a la naturaleza capacitiva de las membranas celulares.

### **1.7 Evaluación de la respuesta celular por Microbalanza de Cristal de Cuarzo (MCC)**

La microbalanza de cristal de cuarzo (MCC) es un método establecido para la medición de pequeños cambios de masa de una sustancia sobre un cristal de cuarzo piezoeléctrico a partir de la medición de la frecuencia de oscilación del cristal. Este cristal consiste en un material de cuarzo en forma de disco muy fino, con corte cristalográfico AT sobre el que se depositan recubrimientos metálicos (oro, platino, cobre o plata), que actúan como electrodos. Al aplicar un potencial eléctrico al cristal, se experimenta una deformación en la dirección de cizalla, proporcional al potencial aplicado, generando una oscilación del cristal paralela a estas superficies (efecto piezo eléctrico). Si el espesor aumenta (por ejemplo por la deposición de material o la adsorción sobre una de las superficies del electrodo), la frecuencia disminuye. En la figura 1.4 se muestra una representación



del cristal de cuarzo.



**Figura 1.4.** Esquema típico de un cristal de cuarzo piezoeléctrico

Por medio de la ecuación de Sauerbrey se relaciona los cambios en masa por unidad de área en la superficie del electrodo del cristal ( $\Delta m$ ) y frecuencia de resonancia ( $\Delta f$ ) [41-45].

$$\Delta f = \frac{-2\Delta m n f_0^2}{A \sqrt{\mu_q \rho_q}} \quad (1.13)$$

Donde:

$\Delta f$ : Variación de la frecuencia de resonancia (Hz)

$\Delta m$ : Variación en la masa del material depositado ( $\mu\text{g}$ ),

$f_0$ : Frecuencia fundamental o de resonancia del cristal de cuarzo. (Hz)

$A$ : Área superficial del electrodo (área piezoeléctricamente activa) ( $\text{cm}^2$ )

$\mu_q$ : Modulo de cizalla del cuarzo ( $2.95 \times 10^{11}$  dina /  $\text{cm}^2$ )

$\rho_q$ : Densidad del cuarzo ( $2.65 \text{ g / cm}^3$ )

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

$$\Delta f = -C_f \Delta m \quad (1.14)$$

Donde  $C_f$ , es una constante que engloba tanto las propiedades de los materiales que funcionan como electrodo mencionados anteriormente y la frecuencia de oscilación del oscilador de la microbalanza antes de producirse el cambio de masa. Para cristales de 5 MHz, el valor de  $C_f$  es  $56.6 \text{ Hz cm}^2 \mu\text{g}^{-1}$ . Cuando la MCC se pone en contacto con una solución líquida, hay una disminución en la frecuencia que depende de la viscosidad y la densidad de la solución ( $\eta_s$  y  $\rho_s$ , respectivamente):

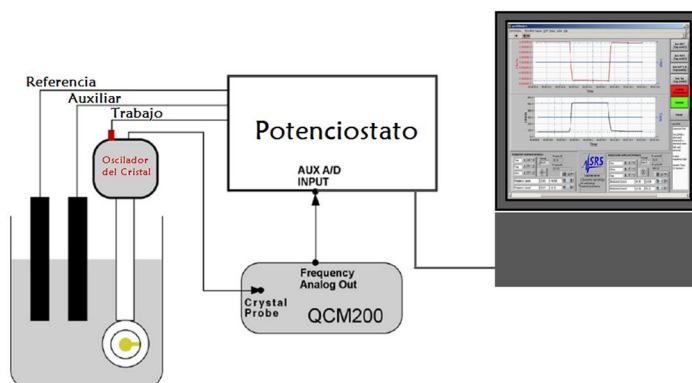
$$\Delta f = -f_0^{3/2} \left( \frac{\rho_s \eta_s}{\pi \rho_q \mu_q} \right)^{1/2} \quad [1.15]$$

Con esta técnica, es posible realizar mediciones de frecuencia con gran precisión, por tanto, es posible medir masas muy pequeñas como las de biomacromoléculas individuales [46-48].

### **1.8 Técnicas combinadas de QCM y electroquímica para la caracterización de la respuesta celular en armazones de regeneración celular**

Una aplicación reciente de la MCC es el acoplamiento con mediciones electroquímicas denominado microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo MECC. La técnica MECC puede ser utilizada para la medición de cambios de masa "in situ", asociados con procesos electroquímicos tales como, adsorción, electrodeposición, corrosión, y equilibrio redox de polímeros sometidos a reacciones de transferencia de carga. La aplicación de MCC a los cambios de masa que se producen durante procesos electroquímicos, se realiza mediante un

acoplamiento con un sistema electroquímico (figura 1.5). El electrodo MCC que está en contacto con la solución, sirve también como electrodo de trabajo en la celda electroquímica.



**Figura 1.5.** Representación del montaje para la Microbalanza de Cristal de Cuarzo Electroquímica (EQCM).

La interpretación Cuantitativa de los datos MECC se basa en la combinación de la ecuación de Sauerbrey y la Ley de Faraday. El primero se refiere a variaciones en la frecuencia con cambios en la masa, mientras que el segundo ( $Q = nFN$ ) relaciona la carga que pasa en un experimento electroquímico ( $Q$ ) con el número de moles de material electrolizado ( $N$ ) ( $n$  = número de electrones que participan en la reacción electroquímica). Por lo tanto, los cambios de frecuencia pueden estar relacionados con la carga total que pasa [49,50].

Trabajos relacionados con este tema han mostrado las mediciones de la adsorción de albúmina de suero humano, citocromo, fibrinogeno, hemoglobina, inmunoglobulina G y apo-transferrina sobre la superficie de dos organosiloxanos por medio de MECC con la adsorción de proteínas medida en forma irreversible. Las diferencias observadas para la adsorción en varios casos, han sido atribuidas al papel desempeñado por interacciones moleculares en la interfase líquido/sólido.

Varios modelos para la caracterización de materiales porosos han sido usados para el análisis de impedancia de cristal de cuarzo. Uno de estos modelos, describe la impedancia eléctrica y/o mecánica equivalente del cristal de cuarzo en contacto con una capa finita del material poroso rígido sumergido en un líquido, estableciendo una relación lineal entre la impedancia equivalente del cuarzo  $Z = R + XL$  ( $XL = iwL$   $w = 2\pi f$ ,  $f$  frecuencia de oscilación del resonador de cuarzo) y la relación: grosor de capa ( $d$ )/ longitud de poro ( $\xi$ ). El modelo permitió explicar por primera vez el comportamiento casi lineal de  $R$  contra  $XL$  [44].

Otro trabajo importante mostró que la adsorción de albúmina de suero bovino (ASB) sobre oro, fue determinada para diferentes concentraciones de proteína en solución acuosa, mediante mediciones de ángulo de contacto dinámico (DCA) y microbalanza de cristal de cuarzo (MCC) [51]. También se han reportado estudios de la adsorción de dos proteínas, albúmina de suero bovino (ASB) y fibrinogeno sobre recubrimientos de polímero conductor basados en polianilina (PAN), PAN dopada por iones ( $PAN + ClO_4^-$ ) o PAN, dopada con dodecil sulfato de sodio (SDS) ( $PAN + SDS$ ), los cuales fueron preparados por métodos electroquímicos. La adsorción fue monitoreada in situ usando, tanto por MCC, como por el método de impedancia electroquímica. Los resultados de adsorción máxima de proteínas en películas de PAN,  $PAN + ClO_4^-$  y  $PAN + SDS$ , fueron de 0.71, 0.65 y 0.99  $g/cm^2$  para ASB y 2.73, 1.85 y 4.07  $g/cm^2$  para fibrinogeno, respectivamente. Se encontró que la adsorción de proteínas en las películas de PAN se ajustaba correctamente a la isoterma de Langmuir y los resultados del estudio de la cinética

de adsorción mostraron dos pasos consecutivos en la adsorción de ASB y fibrinogeno [52].

## Referencias

- [1] TESSMAR Joerg, Matrices and scaffolds for protein delivery in tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 2007; 274-291.
- [2] MA Peter X., Biomimetic materials for tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60 2008, 184-198.
- [3] E.H. GROENEVELD and E.H. BURGER. Bone Morphogenetic Proteins in Human Bone Regeneration; *European Journal of Endocrinology* 142. 2000. 9–21.
- [4] PARK, Joon B. y BRONZINO, Joseph D. *Biomaterials. Principles and applications*. USA: CRC Press, 2003. ISBN 0-8493-1491-7.
- [5] YASZEMSKI, Michael. *Biomaterials in Orthopedics*. New York: Marcel Dekker, Inc, 2004. ISBN: 0-8247-4294-X.
- [6] RATNER, Buddy. y HOFFMAN Allan. *Biomaterials Science*. San Diego: Academic Press, 1996. ISBN 0-12-582460-2.
- [7] LABHASETWAR, Vinod y PELECKY, Diandra L. Leslie. *Biomedical Applications of Nanotechnology*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2007. ISBN 978-0-471-72242-7.
- [8] CHIELLINI, Emo. *Biomedical Polymers and Polymer Therapeutics*. New York: Kluwer Academic Publishers, 2002. ISBN: 0-306-46842-5.
- [9] HOLLANDER, Anthony P. y HATTON, Paul V. *Biopolymer Methods in Tissue Engineering*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2004. E-ISBN 1-59259-428-X.
- [10] ENDERLE, John D. *Introduction to Biomedical Engineering*. 2ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press. 2005. ISBN 0-12-238662-0.
- [11] COBELLI, Claudio y CARSON, Ewart. *Introduction to Modeling in Physiology and Medicine*. Amsterdam: Elsevier Academic Press. 2008. ISBN: 978-0-12-160240-6.
- [12] FERNÁNDEZ Isabel -TRESGUERRES HERNÁNDEZ-GIL, ALOBERA Miguel, CANTO Del Mariano, BLANCO Luis. Bases Fisiológicas de la Regeneración Ósea I. En: *Histología Y Fisiología del Tejido Óseo*. Medicina Oral S. L. Agosto 2004- Agosto 2005.
- [13] H. IWATA, Y. TERAMURA, Y. KANEDA, T. TOTANI. Behavior of Synthetic Polymers Immobilized on a Cell Membrane. En: *Biomaterials* August 2007- January 2008. Vol. 29 p. 1345-1355.

- [14] PANITCH, A., B. L. Seal, T. C. Otero. Polymeric biomaterials for tissues and organ regeneration. En: Materials Science and Engineering R, 2001, Vol. 34, p. 147-230.
- [15] ESTRADA Catalina, Ana Cristina Paz, Luis Ernesto López. INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO: Consideraciones Básicas; Revista EIA, 5. 2006, 93-100.
- [16] J. P. VACANT, R. LANGER; Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering; Biomateriales; 14. 5. 1993, 323-330.
- [17] J. P. VACANT, R. LANGER; Design of synthetic polymeric structures for cell transplantation and tissue engineering; Clinical Materials, 13, 4, 1993, 3-10.
- [18] KALITA S. y A., BHARDWAJ A. AND BHATT H; Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering. J, Materials Science and Engineering. 27. 3. 2007, 441-449
- [19] MAYERA, Eugene P., Brian B. Gowena, Thomas K. Borgb, Abdul Ghaffar. Selective adhesion of macrophages to denatured forms of type I collagen is mediated by scavenger receptors. En: Matrix Biology, 2000, Vol. 19, p. 61-71.
- [20] ROUXHET, P.G., V.M. De Cupere. Collagen films adsorbed on native and oxidized poly(ethylene terephthalate): morphology after drying. En: Surface Science, 2001, Vol. 491, p. 395-404.
- [21] SARAH E. PETRICCA, KACEY G. MARRA, PRASHANT N. KUMTA. Chemical synthesis of poly (lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite composites for orthopaedic applications. Acta Biomaterialia 2 (2006) 277-286.
- [22] Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T: Solutions Able to Reproduce In vivo Surface-Structure Changes in Bioactive Glass-Ceramic A-W3. Journal of Biomedical Materials Research 1990; vol 24:721-734.
- [23] KERRY J. GILMORE, MAGDALENA KITA, YAO HAN, AMY GELMI, MICHAEL J. HIGGINS, SIMON E. MOULTON, GRAEME M. CLARK, ROBERT KAPSA, GORDON G. WALLACE. Skeletal muscle cell proliferation and differentiation on polypyrrole substrates doped with extracellular matrix components. Biomaterials; 30. 2009. 5292–5304.
- [24] S.E. MOULTON, a J.N. BARISCI, A. BATH, R. STELLA, AND G.G. WALLACE. Investigation of Protein Adsorption and Electrochemical Behavior at a Gold Electrode. En: Journal of Colloid and Interface Science. August 2002- January 2003. Vol. 261 p. 312–319.
- [25] Y. ZHANG, M. LIU, M. WANG, CH. DENG, Q. XIE, S. YAO. Adsorption of Bovine Serum Albumin and Fibrinogen on Hydrophilicity-Controllable Surfaces of Polypyrrole Doped with Dodecyl Benzene Sulfonate- a Combined Piezoelectric Quartz Crystal Impedance and Electrochemical Impedance Study. En: Polymer. June 2005- April 2006. Vol. 47 p. 3372–3381.

- [26] O. AKKUS, X. CHENG, U. A. GURKAN, C. J. DEHEN, M. P. TATE, H. W. HILLHOUSE, G. J. SIMPSON. An Electrochemical Fabrication Process for the Assembly of Anisotropically Oriented Collagen Bundles. En: Biomaterials. January-May 2008 Vol. 29 p. 3278–3288.
- [27] MACDONALD Stephanie and ROSCOE Sharon. Electrochemical Studies of the Interfacial Behavior of Insulin. En: Journal of Colloid and Interface Science, January-July 1996, Vol. 184, p. 449–455.
- [28] R. ROUHANA, S.M. BUDGE, S.M. MACDONALD & SHARON G. Roscoe Electrochemical Studies of the Interfacial Behaviour of A-Lactalbumin and Bovine Serum Albumin. Food Research International, 1997 Vol. 30, No. 1. p. 13-20.
- [29] M.F. SMIECHOWSKI, V.F. LVOVICH, SH. ROY, A. FLEISCHMAN, W.H. FISSELL, A.T. RIGA. Electrochemical Detection and Characterization of Proteins. En: Biosensors and Bioelectronics. October 2005 -April 2006, Vol. 22, p. 670–677.
- [30] WELLE Alexander, CHIUMIENTO Antonio, BARBUCCI Rolando. Competitive Protein Adsorption on Micro Patterned Polymeric Biomaterials, and Viscoelastic Properties of Tailor Made Extracellular Matrices. En: Biomolecular Engineering, 2007, Vol. 24, p.87–91.
- [31] U. PLIQUETT, R.P. JOSHI; High electrical field effects on cell membranes; Bioelectrochemistry, 70, 2, 2007, 275-282.
- [32] R.P. JOSHI, V. SRIDHARA; Microscopic calculations of local lipid membrane permittivities and diffusion coefficients for application to electroporation analyses; Biochemical and Biophysical Research Communications, 348, 2, 22 2006, 643-648.
- [33] SHUNICHI YAMAGISHI; Effect of intracellular Ca ion on the ion channel activities of squid axon membranes; Neuroscience Research Supplements, 9, 1989, 75
- [34] C.M. CORTEZ, F.A.O. CRUZ; Influence of fixed electric charges on potential profile across the squid axon membrane; Physica B: Condensed Matter, 403, 4, 1 2008, 644-652.
- [35] W.E. Morf, E. Pretsch; Theoretical treatment and numerical simulation of potential and concentration profiles in extremely thin non-electroneutral membranes used for ion-selective electrodes; Journal of Electroanalytical Chemistry, 641, 1-2, 15 2010, 45-56
- [36] HIROYUKI OHSHIMA; The Donnan potential–surface potential relationship for a cylindrical soft particle in an electrolyte solution; Journal of Colloid and Interface Science, 323, 2, 15 2008, 313-316.
- [37] CLAIRE CHATELET, ODILE DAMOUR; Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films; Biomaterials, Volume 22, Issue 3, February 2001, Pages 261-268

- [38] KRISTIN KIRCHHOF, THOMAS GROTH; Surface modification of biomaterials to control adhesion of cells; *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, volume 39 No 3-4, pages 247-251
- [39] F. AHIMOU, M. PAQUOT, P. JACQUES, P. THONART, PAUL G. ROUXHET. Influence of Electrical Properties on the Evaluation of the Surface Hydrophobicity of *Bacillus Subtilis*. En: *Journal of Microbiological Methods*. September 2000- February 2001, Vol.45 p. 119–126.
- [40] J. MERTA, T. TAMMELIN, P. STENIUS. Adsorption of Complexes Formed by Cationic Starch and Anionic Surfactants on Quartz Studied By QCM-D. *Colloids and Surfaces a: Physicochem. En: Eng. Aspects*. July- October 2004. Vol. 250 p. 103–114.
- [41] D. A. BEATTIE I.G. SEDEVA, R. FETZER, D. FORNASIERO, J. RALSTON. Adsorption of Modified Dextrins to a Hydrophobic Surface: QCM-D Studies, AFM Imaging, and Dynamic Contact Angle Measurements. En: *Journal of Colloid and Interface Science*. October 2009- February 2010. Vol. 345 p. 417–426.
- [42] G.G. WALLACE, S.E. MOULTON, J.N. BARISCI, A. BATH, R. STELLA. Studies of Double Layer Capacitance and Electron Transfer at a Gold Electrode Exposed to Protein Solutions. En: *Electrochimica Acta*. October 2003- May 2004. Vol. 49 p. 4223–4230.
- [43] R.L. Reis, J. Benesch, J. F. Mano. Analysing Protein Competition on Self-Assembled Mono-Layers Studied With Quartz Crystal Microbalance. En: *Acta Biomaterialia* September 2009- March 2010.
- [44] C.M. Pereira, M.C. Martins, H.A. Santos, R. Dabirian, F. Silva, V. Garcia-Morales, J.A. Manzanares. Analysis of Adsorption of Phospholipids at The 1,2-Dichloroethane/Water Interface by Electrochemical Impedance Spectroscopy: A Study of the Effect of the Saturated Alkyl Chain. En: *Journal of Electroanalytical Chemistry*. December 2005- September 2006. Vol. 599 p. 367–375.
- [45] M. D. Ward, and Z. Lin. Determination of Contact Angles and Surface Tensions with the Quartz Crystal Microbalance. En: *Analytical Chemistry*, Vol. 68, No. 8, April 1996. Vol. 68 p. 1285-1291.
- [46] WILLOWS, Q. FAN, F. ISMAIL, CLAUDIA M. VAZ, P. E. TOMLINS, L. I. MIKHALOVSKA, S. V. MIKHALOVSKY, S.L. JAMES, P. VADGAMA, J. WASIKIEWICZ. Assessment of Tissue Scaffold Degradation Using Electrochemical Techniques. En: *Acta Biomaterialia*. March 2007- October 2007 Vol. 4 p. 686–696.
- [47] Q. XIE, J. WANG, A. ZHOU, Y. ZHANG, H. LIU, Z. XU, Y. YUAN, M. DENG, and Y. SHOUZHUO. A Study of Depletion Layer Effects on Equivalent Circuit Parameters Using an Electrochemical Quartz Crystal Impedance System. En: *Anal. Chem.* 1999, Vol. 71, p. 4649-4656.



- [48] Y.H. KIMA, H. JUNGA, G. TAEA, D. JOHANNSMANN. Change of Viscoelastic Property and Morphology of Fibrin Affected by Antithrombin III and Heparin: QCM-Z And AFM Study. En: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. July-October 2008, Vol. 68, p. 111–119.
- [49] S. TADIGADAPA, P. KAOA, D. ALLARAB. Characterization of Viscoelastic Properties of Adsorbed Biomolecules and Biomolecular Assemblies with High Frequency Micromachined Quartz Resonators. En: Sensors and Actuators B. February 2009, Vol.142, p. 406–41.1
- [50] GUIMARDA Nathalie, GOMEZ Natalia, SCHMIDT Christine. Conducting Polymers in Biomedical Engineering. Prog. Polym. Sci. 2007, 32, 876–921.
- [51] N. ROVERI, S. MANARA , F. PAOLUCCI, B. PALAZZO, M. MARCACCIO, E. FORESTI, G. TOSI, S. SABBATINI, P. SABATINO, G. ALTANKOV. Electrochemically-Assisted Deposition of Biomimetic Hydroxyapatite–Collagen Coatings on Titanium Plate. En: Inorganica Chimica Acta. December 2006- April 2007, Vol. 361, p. 1634–1645.
- [52] KOOLE, Leo H., EDWIN J.P. Hydrophobicity as a design criterion for polymer scaffolds in bone tissue engineering. Biomaterials, 2005, 26, 4423–4431.
- [53] TSAI, Wei-Bor, Rita Pei-Yeh Chen, Kuang-Ling Wei, Yi-Ru Chen, Tai-Yan Liao, Hsuan-Liang Liu, Juin-Yih Lai. Polyelectrolyte multilayer films functionalized with peptides for promoting osteoblast functions. Acta Biomaterialia, 5. 2009, 3467–3477.

## **2. CAPÍTULO 1. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE UN ARMAZÓN PARA REGENERACIÓN ÓSEA DE ÁCIDO POLILÁCTICO, ÁCIDO POLIGLICÓLICO, BIOCERÁMICO, QUITOSANO Y ZINC.**

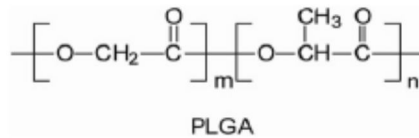
### **2.1. Introducción de este capítulo**

Los armazones para regeneración celular fabricados a partir de polímeros sintéticos bioreabsorbibles, cuya degradación y eliminación por vías metabólicas se produce por reacciones de hidrólisis en condiciones fisiológicas dentro del cuerpo, ofrecen la posibilidad de contener y regenerar tejidos sin los problemas de infección y formación de tejido fibroso que se han asociado a los implantes permanentes.

Hay dos tipos de polímeros biodegradables: los de base natural como los polisacáridos, algunas proteínas y algunas biofibras y los polímeros biodegradables sintéticos, producidos bajo condiciones controladas. La biodegradabilidad es un factor que se requiere para el buen funcionamiento de una matriz o armazón de generación de tejido, ya que la velocidad de degradación, debe coincidir adecuadamente con la velocidad de de formación de tejido nuevo.

En el caso de los poliésteres alifáticos lineales, como el PLA y el PLG y sus copolímeros PLAG, al ser hidrolizados por el cuerpo, pueden producir monómeros originales de ácido láctico y de ácido glicólico, que son metabolizados y eliminados naturalmente [1-4]. Es posible cambiar la velocidad de degradación y las propiedades mecánicas del PLGA, cambiando la proporción de los monómeros

utilizados durante su co-polimerización [5]. En la figura 2.1 se muestra la estructura química del PLGA.



**Figura 2.1.** Estructura Química del PLGA.

Al entrar en contacto el PLGA con un medio acuoso; la penetración del agua dentro de la matriz polimérica provoca el hinchamiento, rotura de los puentes de hidrogeno intermoleculares, hidratación de las moléculas y finalmente la hidrólisis de los enlaces estables. La ruptura por hidrólisis de los grupos funcionales puede ocurrir tanto en los grupos de la cadena principal como en los sustituyentes laterales.

Gracias a su excelente biocompatibilidad y a su semejanza química y cristalina con la fase mineral del hueso, los fosfatos de calcio se han usado como base para la fabricación de biomateriales, usándose efectivamente en combinación con otros materiales como el PLGA. La hidroxiapatita (HA) es uno de los fosfatos más estables ante cambios de pH, temperatura y composición del fluido fisiológico [6].

Otros materiales orgánicos, como vídrios silicatados y fosfatos de calcio, han sido usados con relativo éxito en aplicaciones de ingeniería de tejidos óseos, por ser bioactivos y reabsorbibles. Sin embargo, el mecanismo exacto de interacción entre los productos de disolución iónica de estos materiales y las células humanas, no

ha sido completamente entendido [6]. La baja toxicidad de la hidroxiapatita y de otros fosfatos de calcio produce cuatro efectos importantes cuando se combinan con materiales poliméricos: cambia la configuración hidrofóbica superficial del compuesto, porque promueven reacciones de hidroxilación en la disolución iónica, genera puntos de señalización y localización para las células, equilibra el pH local en la superficie del implante con el del medio fisiológico, ya que la disolución polimérica es ácida y la disolución o reacción hidrolítica del HAP o de los fosfatos o silicatos de calcio, es básica, siendo esto fundamental para la supervivencia celular y además, sus productos de disolución contribuyen con la formación de gradientes de concentración y paso de iones a través de la membrana celular, con lo cual se genera vascularización, rompimiento dendrítico, comunicación celular y consecuente formación de tejido [17].

Esta parte de la investigación se ha enfocado en la contribución científica y tecnológica para el desarrollo de biomateriales, basada en la experimentación de síntesis y análisis de armazones para regeneración celular de ácido poliláctico, ácido poliglicólico, Hidroxiapatita y quitosano. Las mezclas PLAG-HAP fueron sometidas a degradación hidrolítica en un fluido fisiológico simulado PBS (solución salina buffer de fosfatos) a una temperatura constante de 37° C durante diferentes tiempos. Se realizaron pruebas de caracterización por espectroscopia de infrarrojo de transformadas de Fourier (FTIR) para determinar los grupos funcionales característicos, ensayos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para obtener las temperaturas de transición y medir la evolución de la cristalinidad de las

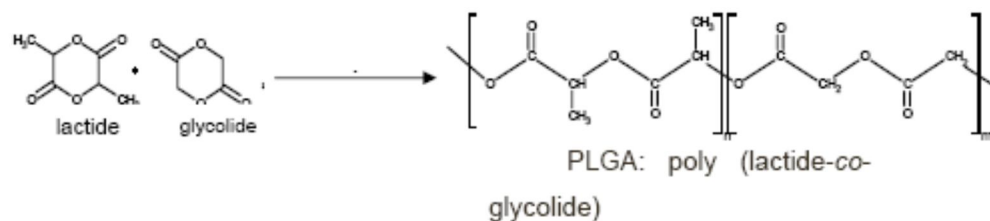
muestras sometidas a degradación hidrolítica y también fue realizado un análisis termogravimétrico (TGA) para evaluar la estabilidad térmica de las diferentes configuraciones del armazón. Las siguientes etapas experimentales fueron llevadas a cabo: Síntesis y obtención de materiales de ácido poli-láctico, ácido poli-glicólico, y co-polimerización de los mismos. Preparación de las mezclas de PLGA con HA, correlación entre las variables influyentes en el proceso de absorción acuosa y degradación hidrolítica, caracterización de las mezclas después de ser sometidas a degradación hidrolítica y determinación de la cinética de degradación de las mezclas. No se consideró relevante, mostrar el estudio de degradación del quitosano con el PLGA, debido a que se han realizado extensos estudios al respecto, sin embargo si se consideró relevante evaluar la respuesta electroquímica relacionada con la interacción entre el quitosano y la hidroxiapatita en contacto con un fluido fisiológico simulado, cuyos resultados son mostrados en este capítulo. Por último se evaluó el efecto del dopado del ácido poliláctico con exceso de zinc, mediante técnicas de Mott schotky y Espectroscopía de Impedancia. En el capítulo 3, se muestra la evaluación del armazón con diferentes cantidades de zinc con células osteoblásticas sembradas sobre su superficie.

## **2.2. Experimentación**

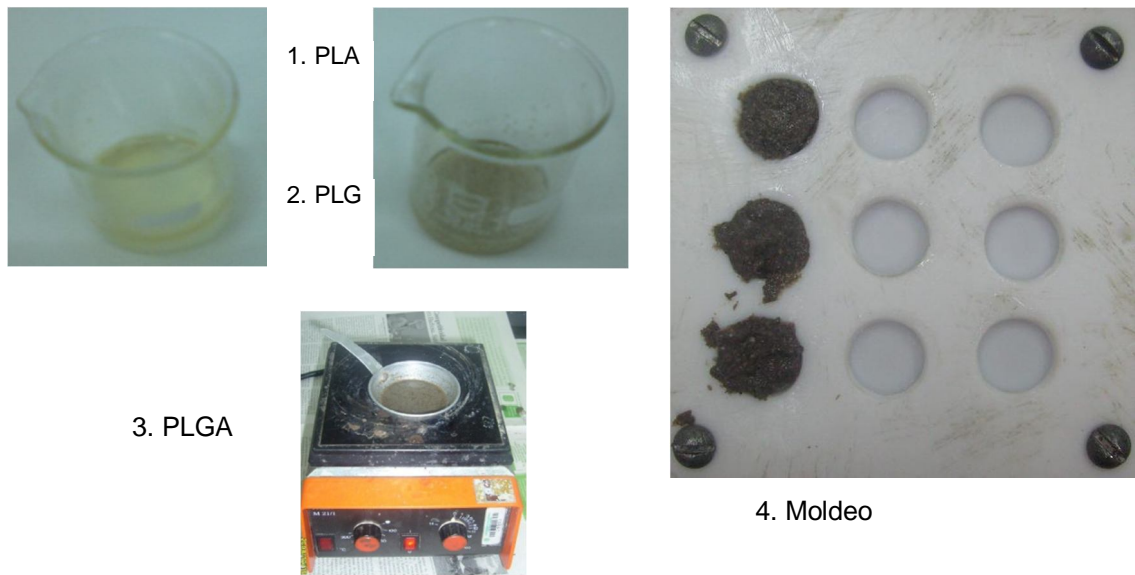
Para la obtención PLGA, se realizó una co-polimerización de ácido poliláctico y de ácido poliglicólico. Cada uno de estos polímeros se sintetizó por policondensación

utilizando como catalizador 1% de Zn con 40 horas para el PLA y 0.2 % de cloruro de estaño por 20 horas para el PLG [7-8]. Cada uno de los componentes anteriores, fue pulverizado y diluido en una relación de 10% w/v por espacio de 1 hora con cloroformo como solvente. En la figura 2.2 se muestra la reacción de copolimerización. Luego de eliminado el solvente, la mezcla fue moldeada y curada durante un día. En la figura 2.3 se muestran los pasos del proceso. Los copolímeros obtenidos tuvieron composiciones de 50:50 y 70:30 (PLA-PLG).

Esta mezcla fue pulverizada nuevamente y mezclada con hidroxiapatita en proporción de 0%, 5% y 10%; utilizando como solvente cloroformo, el cual fue eliminado a una  $T=150\text{ }^{\circ}\text{C}$  aproximadamente. Las muestras obtenidas fueron pesadas y sometidas a degradación, en cuyo proceso, se empleó como medio de hidrólisis, una solución salina de fosfatos PBS con  $\text{pH} = 7.4$  que simuló las condiciones fisiológicas humanas. La hidroxiapatita fue suministrada por Sigma-Aldrich, Hidroxiapatita, Tipo I. Suspensión en 0.001 M en solución buffer de fosfatos,  $\text{pH} 6,8$ . La solución salina buffer de fosfatos, con un  $\text{pH}$  entre 7.4-7.5, fue preparada con agua desionizada y los siguientes reactivos en un estricto orden: 8g de NaCl, 0,2 g de KCl, 0,14g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0,91g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ .



**Figura 2.2.** Reacción de copolimerización de PLA con el PLG.



**Figura 2.3.** Preparación de las probetas de PLGA

En los ensayos de degradación, las muestras de las diferentes mezclas, fueron introducidas en recipientes con el PBS, las cuales permanecieron durante 20 días en un baño termostático a una temperatura de 37° C (temperatura corporal), retirando las probetas regularmente del medio de hidrólisis, en los días 4, 8, 12, 16 y 20. Estas fueron pesadas en húmedo y en seco para calcular la cantidad de PBS absorbido y la pérdida de peso. La cinética de la degradación fue determinada a través de las variaciones del peso de la muestra en función del tiempo. Asumiendo una cinética de hidrólisis de primer orden [31], la ecuación que la expresa es la siguiente:

$$- \ln \frac{C_a}{C_{a_0}} = kt \quad (2.1)$$

Se empleó la conversión, como una variable que relacionó la concentración con el número de moles así:

$$Ca = Ca_o(1 - Xa) \quad Xa = \frac{Na_o - Na}{Na_o} = \frac{Wa_o - Wa}{Wa_o} \quad (2.2)$$

La ecuación que expresa la cinética de la degradación en términos del peso de la muestra es la siguiente:

$$-Ln(1 - (Wa_o - Wa)/Wa_o) = kt \quad (2.3)$$

Usando esta ecuación fue posible determinar el valor de k, el cual permitió determinar la velocidad de degradación de cada muestra analizada. El porcentaje de agua absorbida y el porcentaje de pérdida de peso, se determinó mediante las siguientes ecuaciones [19].

$$\begin{aligned} \text{absorción de agua (\%)} &= 100 \times (m_1 - m_2) / m_2 \\ \text{pérdida de peso (\%)} &= 100 \times (m_0 - m_2) / m_0 \end{aligned} \quad (2.4)$$

Las probetas sometidas a hidrólisis fueron evaluadas por FT-IR y Calorimetría Diferencial de Barrido. Los termogramas de DSC se obtuvieron a partir del primer ciclo de calentamiento con una rampa de de 10 grados/min en un intervalo de 0 a 200°C y un flujo de nitrógeno de 100 ml/min.

Para la evaluación de la interacción quitosano/HAP ante una solución buffer de fosfato de calcio, se usaron probetas de Ti6Al4V como sustratos para fijar las mezclas de quitosano/HAP. Quitosano con un porcentaje de desacetilación  $\geq 75\%$ , fue empleado para este fin. Las probetas de Ti6Al4V fueron pulidas hasta papel abrasivo # 600, limpiadas ultrasónicamente con acetona y atacadas químicamente



en una mezcla 1:1:1 de HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>O. El quitosano fue disuelto en 1% en volumen de ácido acético, adicionandolo posteriormente a soluciones supersaturadas de HAP con un control del pH entre 8,3 y 8,6 a una temperatura de 60°C y una agitación de 600 rpm. La fijación de estas mezclas sobre las probetas de Ti6Al4V fue llevada a cabo por electrodeposición catódica galvanostática, empleando un electrodo de grafito como ánodo y los sustratos de Ti6Al4V como cátodos, con una fuente de potencia regulada.

El proceso de electrodeposición de la hidroxiapatita a partir de soluciones supersaturadas de fosfatos de calcio, [38], consistió básicamente en cuatro etapas:

- *Reducción del O<sub>2</sub>*:  $O_2 + 2H_2O + 4e^- \rightarrow 4OH^-$
- *Reducción del H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> y el HPO<sub>4</sub><sup>-2</sup>*:  $2 H_2PO_4^- + 2e^- \rightarrow HPO_4^{-2} + H_2$ ;  $HPO_4^{-2} + 2e^- \rightarrow 2PO_4^{-3} + H_2$
- *Reducción del H<sub>2</sub>O* (incremento del pH en la superficie del compuesto):  $2H_2O + 2e^- \rightarrow 2OH^- + H_2$
- *Migración de los iones Ca<sup>+2</sup>* hacia la superficie del cátodo para reaccionar con los iones  $2PO_4^{-3}$  y  $OH^-$  para formar la HA (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub> (OH)<sub>2</sub>).

El proceso de electrodeposición del *quitosano* se basó en tres etapas:

- Protonación en solución ácida (el grupo amino del *quitosano* es cargado positivamente con los iones  $H^+$  presentes en la solución ácida en la cual se encuentra disuelto):  $quit-NH_2 + H_3O^+ \rightarrow quit-NH_3^+ + H_2O$
- Reacción catódica:  $2H_2O + 2e^- \rightarrow H_2 + 2OH^-$
- Neutralización del *quitosano* cargado positivamente y la formación de un depósito insoluble sobre el sustrato catódico:  $quit-NH_3^+ + OH^- \rightarrow quit-NH_2 + H_2O$

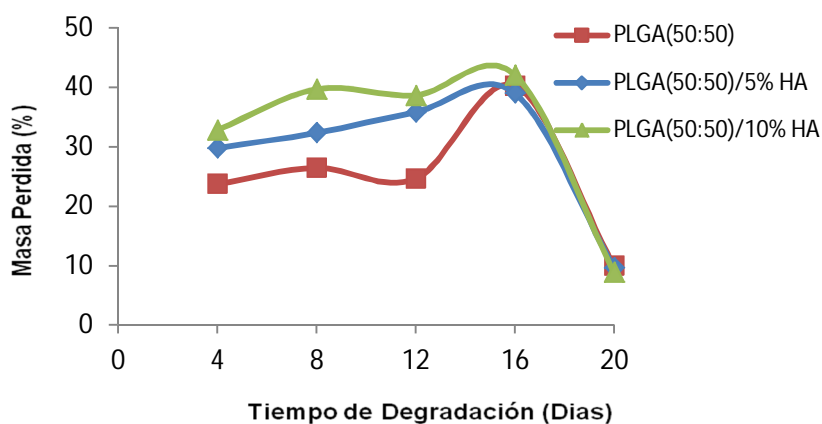
Se realizaron ensayos para evaluar la morfología, composición, estructura química, mediante SEM-EDX, FT-IR y DRX. Ensayos electroquímicos fueron realizados en un fluido corporal simulado.

El efecto de la adición de zinc en exceso para la conformación de un polielectrolito de ácido poliláctico que funcione como armazón en conjunción con el PLG, la HAP y el *quitosano*, se ha realizado mediante la adición de pequeñas concentraciones, entre 0,5 y 2% p/v, de sal de zinc. Para la caracterización, esta mezcla fue fijada sobre sustratos de Ti6Al4V ELI, mediante un método de electrodeposición catódica, aplicando un potencial de 100 Voltios, por un tiempo de 15 minutos y bajo agitación constante. Estas mezclas fueron evaluadas mediante las técnicas electroquímicas de Espectroscopia de impedancia electroquímica y la técnica potenciodinámica de Mott-Schottky en una solución rica en iones de fosfato y calcio, permitiendo determinar su funcionalidad como biomaterial polielectrolítico.

## 2.3. Resultados de este capítulo

### 2.3.1. Degradación del armazón de PLA-PLG-HAP a diferentes concentraciones

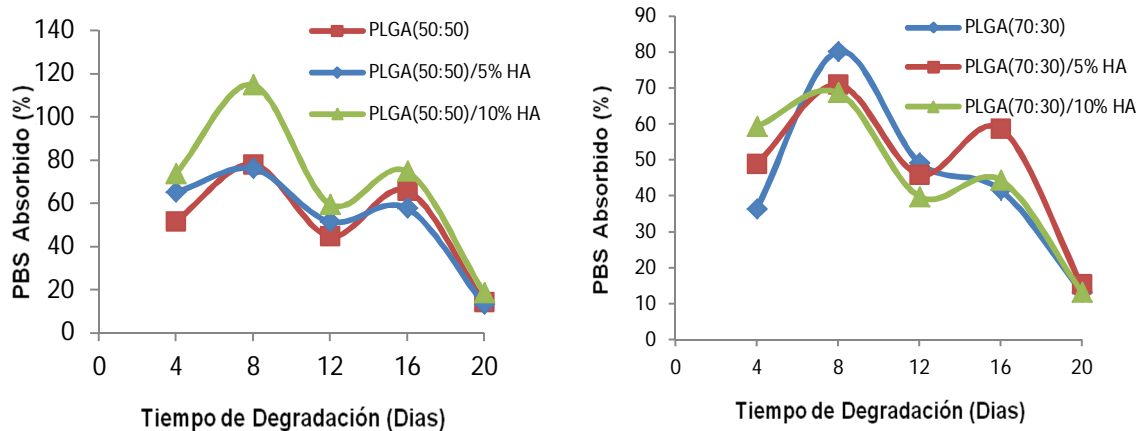
En la Figura 2.4 se muestran los resultados de las pruebas de degradación hidrolítica para el co-polímero 50-50 PLA-PLG, observándose que el porcentaje de peso perdido, incrementa con el tiempo hasta el día 16 y desciende hasta el día 20, atribuyéndose a que tanto en las mezclas de PLGA (50:50)/HA como en las mezclas de PLGA(70:30)/HA, se presenta una etapa de hidratación inicial y luego aparece una nueva fase de degradación posterior a esta hidratación, atribuida a una repolimerización a partir de los productos de degradación.



**Figura 2.4.** % de masa perdida de PLA-PLG-HAP con diferentes concentraciones respecto al tiempo de degradación en SBF.

Según la figura 2.4 y 2.5, los procesos de absorción de PBS y de pérdida de peso están ocurriendo simultáneamente, en donde a mayor concentración de HAP, se presentó una mayor pérdida de peso para el PLA-PLG 50-50 y una menor pérdida de peso para el PLA-PLG 70-30, correspondiendo esta tendencia con el

porcentaje de PBS absorbido, como se puede observar en la figura 2.5a y 2.5b. Para las dos concentraciones de PLA-PLG, el máximo de PBS absorbido se observó en el día 8.



**Figura 2.5.** Porcentaje PBS absorbido, respecto al tiempo de degradación de los dos copolímeros mezclados con HA.

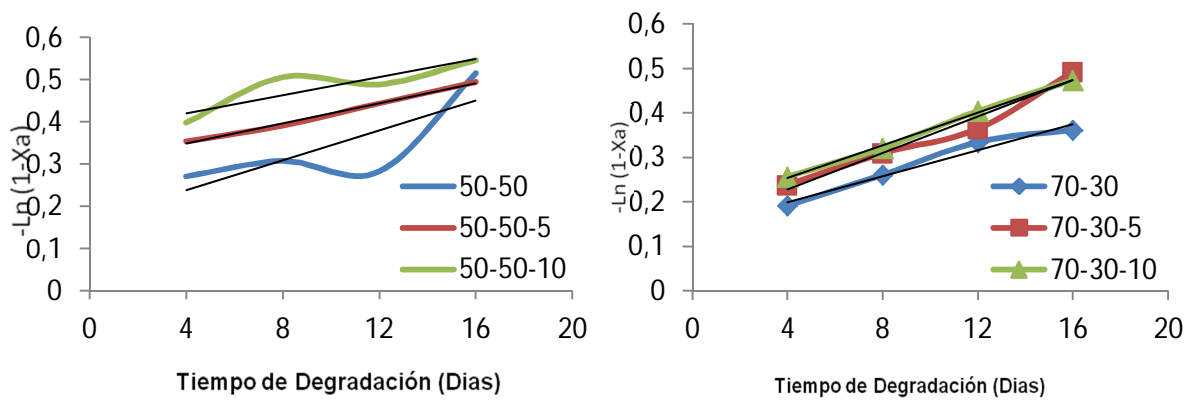
Al igual que en la gráfica de pérdida de masa, entre el día 0 y el día 16, se presentaron dos etapas de absorción acuosa, atribuibles netamente, a las características estructurales del PLA-PLG y al efecto de hidrólisis y repolimerización, debido a que la mezcla sin HAP, presentó el mismo comportamiento. El efecto de la HAP, tanto en la degradación, como en la absorción acuosa, se refleja en una mayor hidratación de esta fase orgánica y en la presencia de sitios de penetración de la fase acuosa en la interfase de contacto entre el polímero y la HAP.

Según las tendencias observadas y esperando que la mejor mezcla para construir un almacén de regeneración ósea que permita obtener una velocidad de degradación más controlada con el tiempo y que permita controlar la velocidad de

formación de tejido, el copolímero de PLA-PLG entre 5 y 10% de HAP, presentó el mejor comportamiento. También bajo el criterio de obtener una mayor cantidad de sitios específicos de reconocimiento celular sobre la superficie, un porcentaje de 10% en la mezcla con 70-30 de PLA-PLG, es más conveniente. Esta mezcla ya ha sido estudiada en cuanto a sus propiedades mecánicas, en otros trabajos.

Siendo la velocidad de degradación inversa al grado de cristalinidad de los polímeros, el mecanismo de degradación hidrolítica puede ser definido en dos fases: degradación superficial y degradación del “bulk” o interna del material [25-28]. La primera ocurre principalmente en las zonas amorfas cuyas estructuras se presentan esencialmente desordenadas, facilitando la difusión y el ataque del medio de hidrólisis. También ocurre, como se había mencionado anteriormente, penetración de la fase acuosa en la interfase de contacto entre el polímero y la HAP. Estos procesos dan paso a la segunda fase que es el ataque a las zonas cristalinas, siendo más lento, puesto que su mayor ordenamiento, ofrece mayor resistencia a la difusión de la solución de PBS. La unión de las diferentes estructuras de los homopolímeros, rompe la estereoregularidad y la simetría de las cadenas, lo que se refleja en un aumento de las zonas amorfas, facilitando la difusividad de medio hidrolítico, llevando a una degradación más rápida.

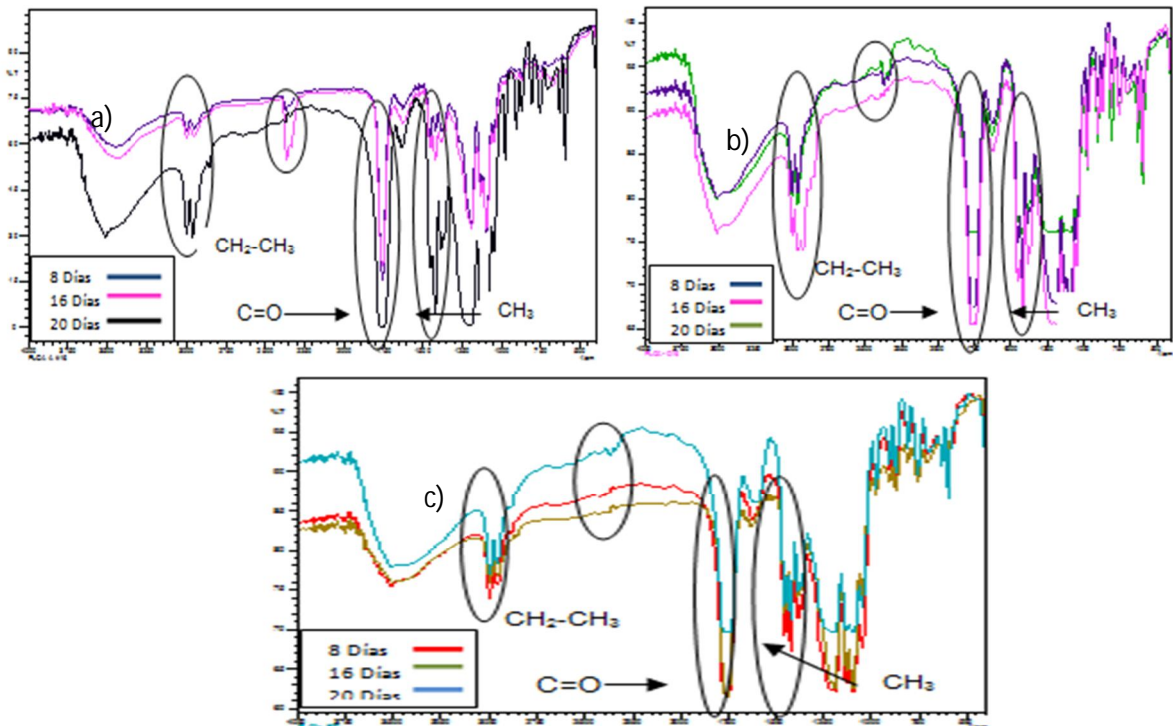
De acuerdo a la pérdida de masa de cada una de las mezclas evaluadas, se ha obtenido las gráficas de cinética de degradación, mostradas en la figura 2.6, para las mezclas de HAP con PLA-PLG 50-50 y HAP con PLA-PLG 70-30.



**Figura 2.6.** Cinéticas de Degradación PLA-PLG (50:50)/HAP y PLA-PLG (70:30)/HAP.

La mezcla de PLA-PLG (70-30)/5% HA, presentó una mayor degradación y la mezcla de PLA-PLG (50-50)/10% HA la menor degradación.

Los espectros de FT-IR son mostrados en la figura 2.7.



**Figura 2.7.** Espectros FT-IR para mezclas PLA-PLG-HA, (a) 50-50/0% (b) 50-50/10% (c) 70-30/10%, sometidas a degradación hidrolítica por 8, 16 y 20 días.

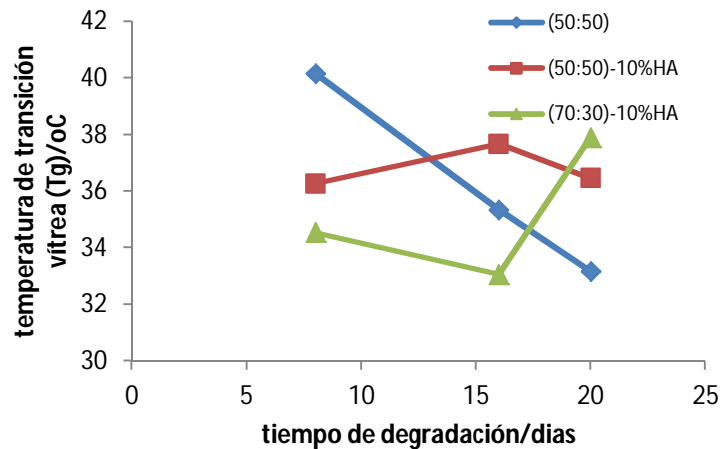
Estos espectros mostraron una gran similitud entre las bandas de absorción con las reportadas en la literatura [25]. Las principales bandas de absorción obtenidas fueron: 2997–2965 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>), 1759 (C=O), 1360–1450 (CH<sub>3</sub>), 750 (CH). Adicionalmente, se encontró entre 2270-2320, una banda de absorción relacionada con fosfinas, corresponde a compuestos presentes en la solución de PBS absorbidos por las muestras, durante el proceso de degradación.

Los grupos funcionales de las mezclas PLA-PLG-HA presentaron aproximadamente, las mismas características químicas del copolímero PLA-PLG. Un espectro FT-IR típico de la HAP, muestra bandas en 3.600-3440 cm<sup>-1</sup> y 633 cm<sup>-1</sup>, correspondientes a grupos OH<sup>-</sup>, bandas en 1.080-1.090 cm<sup>-1</sup>, correspondientes a grupos PO<sup>-3</sup><sub>4</sub> y bandas entre 870, 1.420 y 1.480 cm<sup>-1</sup> correspondiente a CO<sup>-2</sup><sub>3</sub>. Los picos del espectro infrarrojo mostrados en todas las mezclas, corresponden a la superposición de cada uno de sus componentes.

El DSC fue empleado para determinar la temperatura de transición vítrea del PLA-PLG mezclados con 5 y 10% de hidroxiapatita, analizando las propiedades térmicas en función del tiempo de hidrólisis. Los termogramas obtenidos, mostraron sólo una temperatura, relacionada con la transición vítrea (T<sub>g</sub>) y no, con la temperatura de fusión, característico de la amorficidad de la mezcla.

Chu [13], afirma que la hidrólisis se realiza en dos etapas, un ataque inicial a las regiones amorfas de este tipo de polímeros, y una segunda etapa que corresponde a un ataque a las regiones cristalinas. Las temperaturas de transición

En la figura 2.8 se muestra las temperaturas de transición vítrea de las mezclas, variando con el tiempo de degradación.



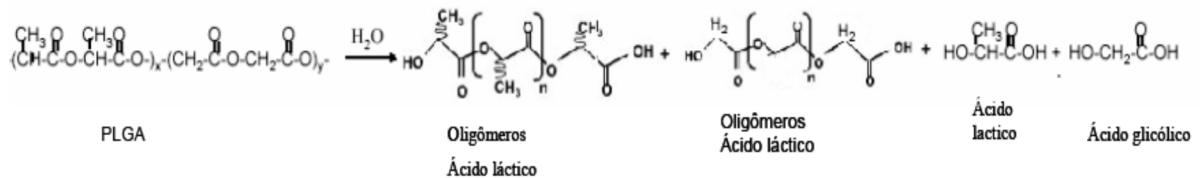
**Figura 2.8.** Temperaturas de transición vítrea de las mezclas con el tiempo de degradación.

Siendo la temperatura de transición vítrea del PLA-PLG sin proceso de degradación hidrolítica, entre 40-60°C, las temperaturas con degradación hidrolítica de las mezclas se encuentran lejos de este rango, atribuyéndose principalmente al efecto plastificante causado por la penetración de PBS en la matriz del polímero. La temperatura de transición vítrea disminuye constantemente con el tiempo de hidrólisis para el PLA-PLG (50-50) y presenta un comportamiento heterogéneo para el PLA-PLG (50-50)/10% de HA y 70-30 con 10% de HAP, lo cual puede significar una fuerte influencia de la HAP en las variaciones de cristalinidad del PLAG con el tiempo de hidrólisis, especialmente en las mezclas con 70-30 de PLA-PLG, significando que esta influencia es más significativa en la interacción entre el PLA con la HAP. También los espectros de DSC, mostraron picos adicionales entre 85-90° C, atribuibles a regiones cristalinas de diferente



tamaño formado a lo largo del proceso de degradación hidrolítica, por la reorganización de las cadenas resultantes de la hidrólisis en las zonas amorfas, las cuales, no son muy estables, ya que se componen de cristales más pequeños.

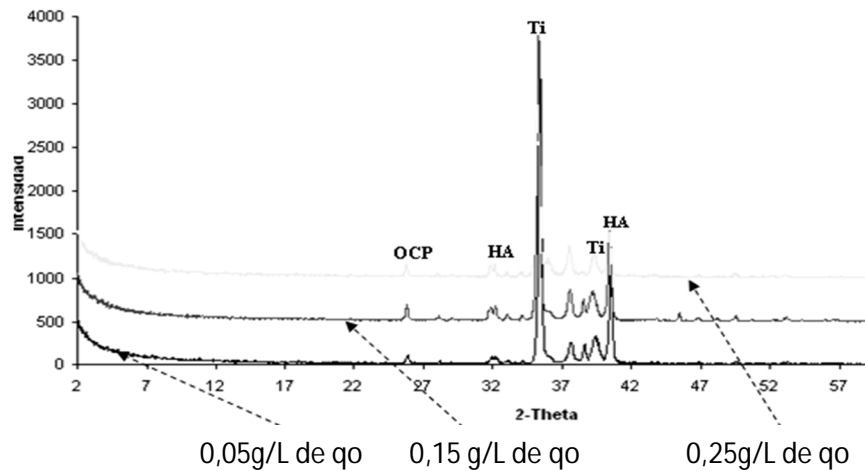
La degradación de PLA-PLG ocurre por hidrólisis no enzimática y genera como productos finales, ácido láctico y ácido glicólico, los cuales son posteriormente eliminados del cuerpo [13]. Como se muestra en la figura 2.9, durante el proceso de degradación de los polímeros, los enlaces soportan la hidrólisis, originando cadenas menores con terminaciones ácidas, los cuales son posteriormente eliminados del cuerpo por medio del ciclo Krebs [23].



**Figura 2.9.** Reacción de hidrólisis del PLGA [18].

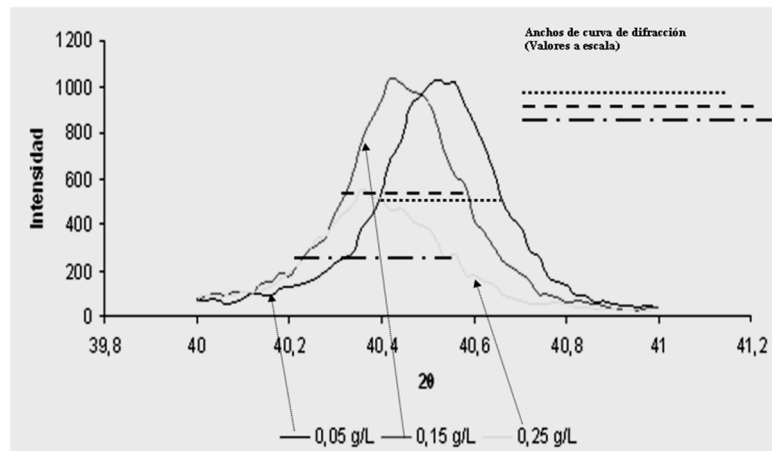
### 2.3.2. Interacción de quitosano-HAP ante una solución buffer de fosfatos

En la evaluación de la interacción entre la HAP, el quitosano qo y un fluido rico en fosfatos y calcio, se fijaron los componentes a las muestras de Ti6Al4V por electrodeposición por un tiempo de 4 horas y una densidad de corriente de corriente de 200mA/cm<sup>2</sup>, con variaciones de qo entre 0,05 y 0,25g/l. Los resultados de Difracción de Rayos X DRX, se muestran en la figura 2.10.



**Figura 2.10.** DRX de las muestras de HAP con concentraciones de quitosano entre 0,05 y 0,25g/l.

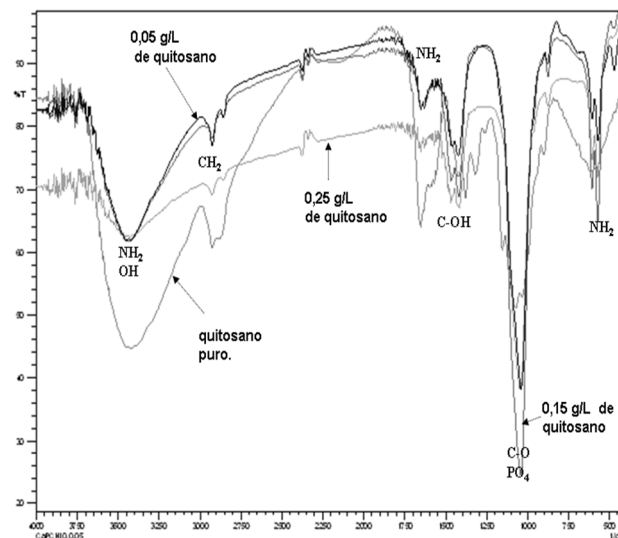
Se observan compuestos de hidroxiapatita y fosfato octacálcico en las tres condiciones evaluadas. Para determinar la cristalinidad de las mezclas de HAP y qo, se empleó el criterio de ancho del pico a la altura media de la curva de difracción, que relaciona el aumento de la cristalinidad con la disminución del tamaño de los cristales. A mayor ancho de la curva de difracción, menor es la cristalinidad de la mezcla. En la figura 2.11 se muestra este análisis.



**Figura 2.11.** Comparación de los anchos de picos medios de las curvas de difracción en las diferentes composiciones de quitosano empleadas, mezcladas con HAP

Utilizando la reflexión de la máxima intensidad de la hidroxiapatita en los difractogramas, entre  $40,2^\circ < 2\theta < 40,8^\circ$ , la cristalinidad de la mezcla disminuye al incrementar la cantidad de quitosano en la solución. Una posible explicación se puede dar por un aumento en el grado de amorfización de la HAP ante la presencia de quitosano. Las formas irregulares y porosas de las partículas agregadas de HAP son cubiertas por el quitosano, lo cual puede generar una disminución en la cristalinidad [24].

Un análisis por infrarrojo FT-IR a una muestra de quitosano pura y a muestras de HAP con fosfato de calcio y quitosano con porcentajes de 0.05, 0.15 y 0.25 g/l, fue realizado para determinar los grupos funcionales. Los resultados se muestran en la Figura 2.12.



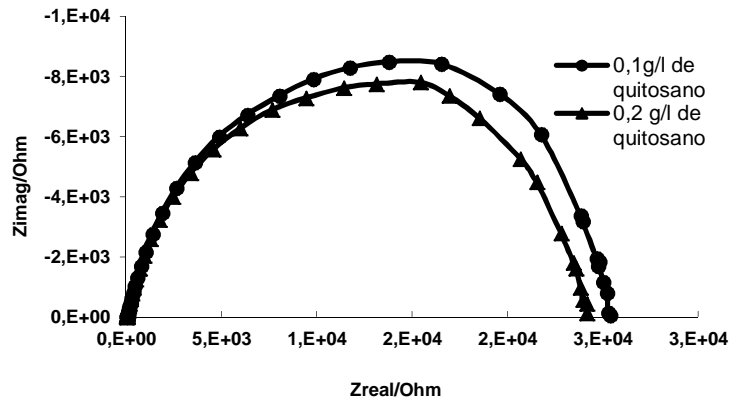
**Figura 2.12.** Espectro FT-IR del quitosano puro y los recubrimientos obtenidos a los diferentes porcentajes de quitosano

Para el quitosano puro, se observan bandas de intensidad media correspondientes a vibraciones de estiramiento de  $\text{NH}_2$  ubicadas en la región de  $3500\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ ,

traslapadas con las bandas de vibración de alargamiento del OH entre 3700 y 3000  $\text{cm}^{-1}$  y la banda de absorción de intensidad media a fuerte, relativas a las vibraciones de deformación del grupo amino a una frecuencia entre 1650-1580  $\text{cm}^{-1}$ , bandas de alargamiento del  $\text{CH}_2$  en la región de 3000 a 2800  $\text{cm}^{-1}$ , bandas de flexión del  $\text{NH}_2$  en la región de 1650 a 1580  $\text{cm}^{-1}$  y bandas de flexión del enlace C-OH en el rango de 1450-1300  $\text{cm}^{-1}$ , bandas de absorción de intensidad media a débil para el enlace C-N de las aminas alifáticas primarias en la región de 1250 a 1020  $\text{cm}^{-1}$ .

En los espectros de infrarrojo de los productos depositados de HAP con diferentes concentraciones de  $\text{qo}$ , se observan las bandas propias de las vibraciones correspondientes a los enlaces pertenecientes al  $\text{NH}_2$ , apreciándose también, el pico correspondiente al enlace  $\text{PO}_4$  a 1030  $\text{cm}^{-1}$  de los fosfatos de calcio presentes. La presencia del grupo amino y del grupo fosfato, evidencia que este compuesto presenta una alta bioactividad, debido a la similitud de estos grupos, con los compuestos apatíticos del tejido óseo y de los grupos aminos del colágeno, de los proteoglicanos y de los glicosaminoglicanos de la matriz extracelular.

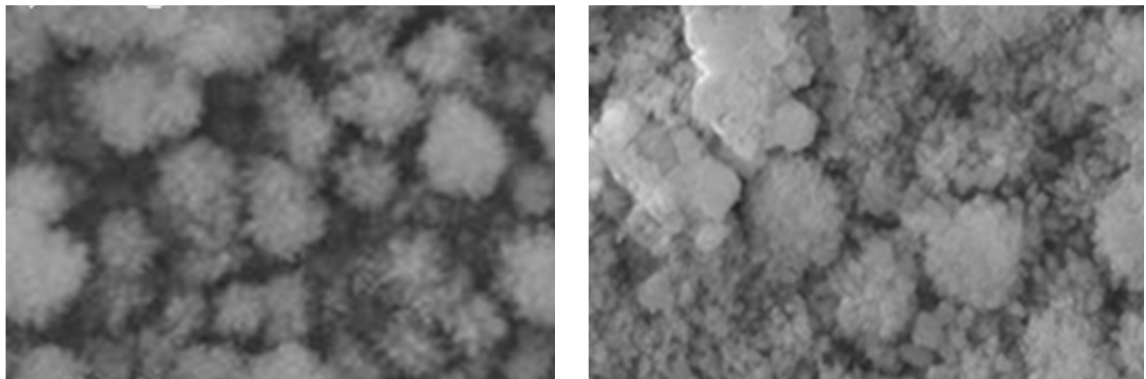
En la figura 2.13 se muestran los espectros de impedancia correspondientes a la caracterización electroquímica, la cual se ha realizado para evaluar la estabilidad de la HAP con las diferentes concentraciones de quitosano, determinando al mismo tiempo su correspondiente bioactividad, siendo esta, la capacidad de generar crecimiento biológico.



**Figura 2.13.** Espectros de Nyquist de los compuestos de HAP-qs, a 0,1 g/L y 0,2 g/L.

En los dos espectros, se observa una similitud en los comportamientos electroquímicos, con dos constantes de tiempo características, las cuales disminuyen, al aumentar la concentración de quitosano, corroborándose el resultado obtenido por DRX, en el cual, a mayores cantidades de quitosano en la mezcla, se presentó una menor cristalinidad. Materiales más cristalinos, suelen presentar un mejor ordenamiento atómico-estructural, presentando una energía libre superficial más baja, implicando que el material más cristalino presenta una menor tendencia a degradarse y una menor actividad [39-42].

En la figura 2.14, se muestra el análisis morfológico realizado por SEM en las muestras de HAP con 0,1g/L y 0,2g/L de quitosano.



**Figura 2.14.** SEM de las muestras obtenidas con 0,1 a) y 0,2 g/l b) de quitosano a 500X

Se observa un aumento en la irregularidad superficial al aumentar la cantidad de quitosano, corroborando la inestabilidad superficial observada en los ensayos de DRX y en los ensayos electroquímicos. La bioactividad de un biomaterial está influenciada por la superficie específica. A mayor cantidad de quitosano, se presenta una estructura esponjosa con una mayor superficie específica, incrementando la bioactividad.

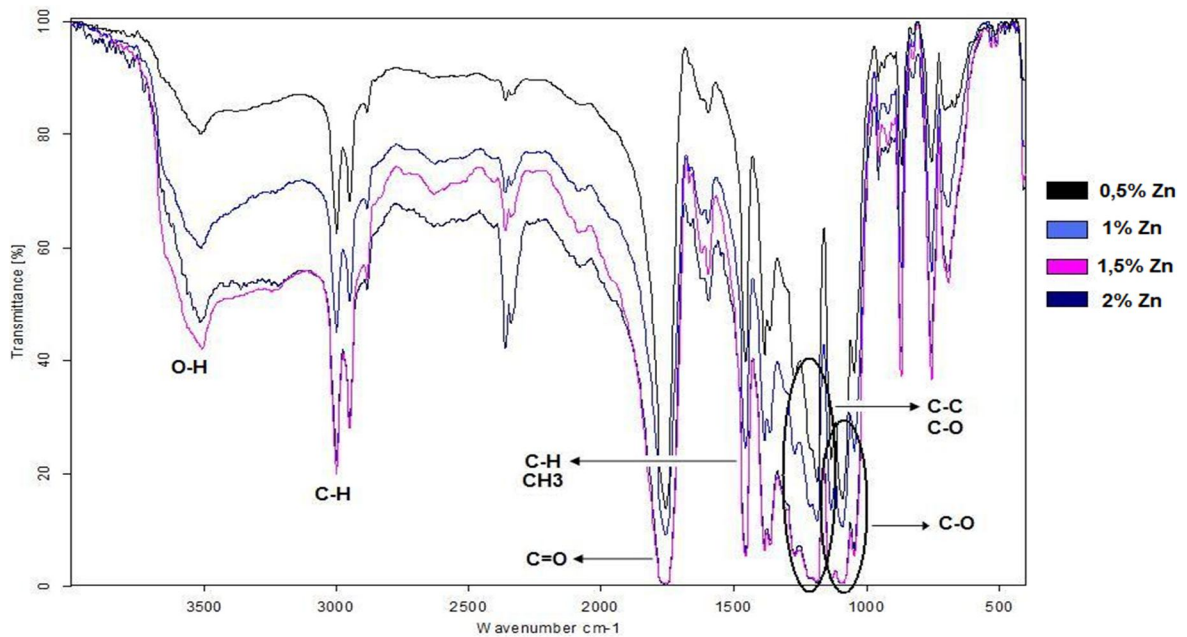
### **2.3.3. Efecto de la adición de zinc en exceso en el PLA para la conformación de un armazón polielectrolítico de regeneración ósea.**

En este aparte se muestran los resultados del estudio electroquímico del efecto de dopado del ácido poliláctico PLA empleando sulfato de zinc, así como las propiedades conductoras de la superficie del material y su comportamiento electródico bajo condiciones fisiológicas simuladas. Las técnicas empleadas fueron la Espectroscopia de impedancia electroquímica y Mott-Schottky.

Avances recientes en la investigación sobre biomateriales han mostrado que las propiedades fisicoquímicas superficiales de hidrofiliidad, ángulo de contacto, carga superficial, tensión superficial y energía libre superficial, son fundamentales en la intención de alcanzar mayores interacciones positivas entre un biomaterial y el tejido celular [43-48]. Experimentos *in vitro*, han demostrado que casi todas las células del cuerpo humano responden a impulsos de naturaleza eléctrica, cuya respuesta está relacionada con la actividad celular. En este orden de ideas, un

impulso eléctrico aplicado por una fuente externa, puede ser válido para generar crecimiento celular. Sin embargo, dada la carga eléctrica de las células (negativa) se requiere de un material para construir armazones de regeneración celular, con carga eléctrica opuesta, para generar atracción y transporte iónico a través de la célula. La optimización de las propiedades biológicas de un polímero, se puede realizar mediante la incorporación de moléculas bioactivas, como la HAP y el quitosano y por la incorporación de iones metálicos en naturaleza y concentraciones no tóxicas, que incrementen su conductividad y provean un tipo de carga eléctrica. Esta incorporación, se puede lograr por medio de la adsorción física, atrapamiento, dopado, y acoplamiento covalente de biomoléculas deseables [49].

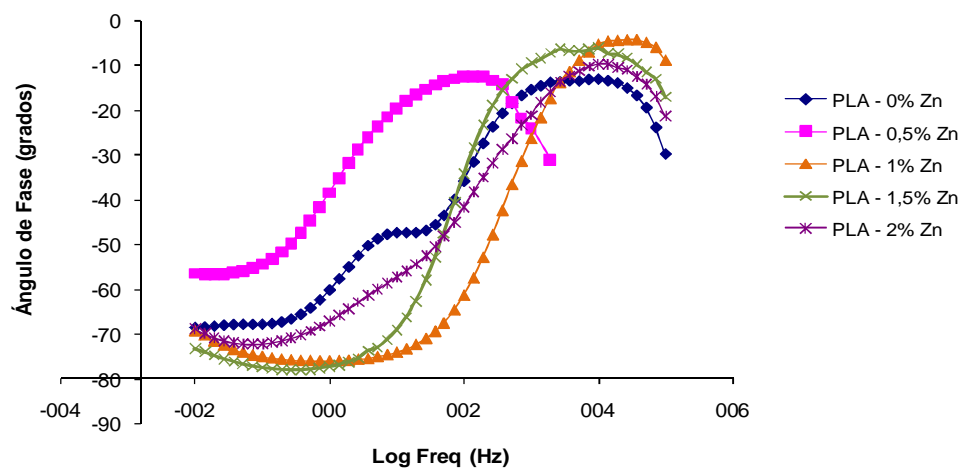
En la figura 2.15 se observa los espectros de infrarrojo para las muestras de PLA con concentración de agente dopante (sal de zinc) de 0.5, 1, 1.5 y 2%.



**Figura 2.15.** FT-IR de PLA a diferentes concentraciones de sulfato de zinc

Se presentaron picos primarios vibracionales correspondientes al ácido poliláctico. Los picos anchos cercanos a  $3500\text{ cm}^{-1}$  se deben al estrechamiento de O-H del agua adsorbida molecular. Los picos a frecuencias entre los  $1090$  y  $1130\text{ cm}^{-1}$  se deben a la presencia del grupo  $\text{SO}_4^{-2}$ , por la presencia del Sulfato de zinc.

La caracterización electroquímica mediante EIE de las mezclas de PLA dopadas con sulfato de zinc a diferentes concentraciones, se presenta en los espectros de Bode de la figura 2.16. Estos ensayos fueron realizados después de un tiempo de inmersión en SBF de 3 horas, para asegurar la estabilización del sistema.



**Figura 2.16.** Espectros de Bode obtenidos de las muestras de PLA con incorporación de sulfato de zinc a diferentes concentraciones.

Los espectros de Bode a altas y medianas frecuencias, presentaron una constante de tiempo que representa un comportamiento de la doble capa electroquímica de la interfase polímero/electrolito, con máximos en el ángulo de fase de hasta  $60^\circ$ . A más bajas frecuencias, la segunda constante de tiempo, puede ser atribuida al comportamiento capacitivo de la interfase entre el sustrato



metálico con el polímero depositado con una fase de hasta 80°, observándose, el efecto de la disminución de la resistencia a la transferencia de carga con el aumento del porcentaje de zinc hasta 2%. A partir de las gráficas de Bode, se calculó la capacitancia  $C_R$  para la interfase polímero/metal, con la siguiente ecuación [56-59]:

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_R} + \frac{1}{C_H} \quad (2.5)$$

Donde  $C_H$  es la capacitancia de la doble capa eléctrica, asumida a un valor constante de  $15 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  para un polímero de baja conductividad o a 1 KHz, según lo reportado en la literatura [59]. La capacitancia  $C$  es la medida a la respuesta capacitiva no lineal a partir de los espectros de Bode representada por el elemento de fase constante EFC y dada por la siguiente ecuación:

$$EFC = \frac{1}{2\pi fZ} \quad (2.6)$$

Donde  $f$  es la frecuencia para el valor mínimo del ángulo de fase de la constante de tiempo a medias frecuencias (interfase polímero/electrolito) y  $Z$  representa la impedancia de la doble capa medida de los procesos fisicoquímicos que ocurren en el polímero.

La capacitancia de un material es la medida de su capacidad de almacenar carga y energía potencial eléctrica. Cuanto mayor sea la capacidad de almacenamiento de carga, menor es el valor numérico de la capacitancia y mayor es la constante dieléctrica del material [59]. Los valores de las constantes dieléctricas relativas

para cada % de dopado  $\epsilon_r$  y las respectivas capacitancias  $C_R$ , se muestran en la tabla 2.1, representando las variaciones dieléctricas de un polielectrolito biodegradable de PLA. Estos valores son calculados a partir de la ecuación 2.8, donde  $e$  es el espesor del recubrimiento,  $C_R$  la capacitancia del recubrimiento, y  $\epsilon_0$  la permitividad en el vacío ( $8,8542 \cdot 10^{-12}$  F/m). Las medidas fueron tomadas a tiempos  $t_1=3$  horas y  $t_2= 6$  horas.

$$\epsilon_r = \frac{e \cdot C_R}{\epsilon_0} \quad (2.7)$$

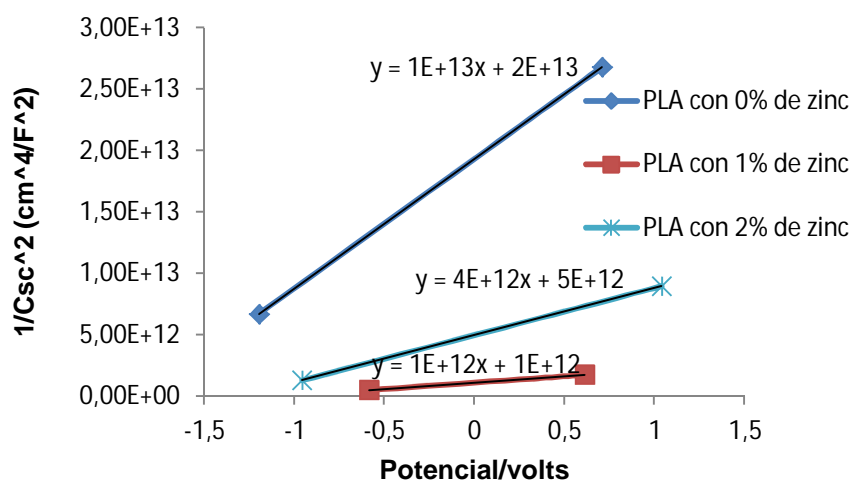
**Tabla 2.1.** Constantes dieléctricas relativas para cada % de dopado en el PLA

% dopado	$\epsilon_r (t_1)$	$\epsilon_r (t_2)$	$C_R (\mu F/cm^2)$
<b>0</b>	17,20	18,78	5,2385
<b>0,5</b>	1,92	8,78	1,3606
<b>1,0</b>	4,14	7,35	1,2807
<b>1,5</b>	35,19	14,00	3,2539
<b>2,0</b>	19,68	11,70	3,2790

Para porcentajes de dopado entre 0 y 1%,  $\epsilon_r$  aumenta con el tiempo, mientras para concentraciones entre 1,5 y 2%,  $\epsilon_r$  disminuye. Estos valores se relacionan directamente con los datos de capacitancias obtenidos, indicando que para concentraciones de sal de zinc entre 0 y 1%, aumenta la capacitancia a mayor tiempo de exposición a la solución. Pequeñas variaciones en la cinética de degradación producidas por diferencias estructurales en la red polimérica, pudieron influir en estos comportamientos.

Mediante análisis Mott-Schottky M-S, se determinaron las propiedades semiconductoras (densidad de donadores  $N_d$ , y potencial de banda plana,  $E_{fb}$ ) de las muestras de PLA con diferentes concentraciones de zinc. Se obtuvieron gráficas (Resistencia/Capacitancia) Vs. Voltaje, a un barrido de potencial constante entre -1 y 1 V, durante un periodo de tres horas para evaluar la variación de la conductividad de las muestras con el tiempo de exposición del material a un fluido fisiológico simulado.

En la figura 2.17 se muestran las gráficas M-S obtenidas. Los resultados mostraron pendientes de ajuste lineal positivas, lo cual corresponde a un comportamiento similar al del un semiconductor tipo  $n$ , donde los portadores de carga dominantes son electrones. Para un electrodo semiconductor tipo  $n$ , los electrones son transferidos desde el electrodo hacia la solución, por tanto, hay una carga positiva asociada con la región de espacios de carga, estableciendo un comportamiento catódico del PLA dopado.



**Figura 2.17.** Gráficas Mott-Schottky de PLA a diferentes porcentajes de dopado con zinc.

Para este tipo de semiconductores, la relación Mott-Schottky está dada por la siguiente ecuación [30]:

$$\frac{1}{C_{SC}^2} = \frac{2N_A}{N_d F \epsilon_r \epsilon_0} \cdot \left( E - E_{fb} - \frac{RT}{F} \right) \quad (2.9)$$

Donde  $C_{SC}$  es la capacitancia de la región de espacios de carga,  $N_A$  es el número de Avogadro ( $6,02 \times 10^{23}$  1/mol),  $N_d$  la densidad de donadores,  $F$  la constante de Faraday ( $\sim 9,65 \times 10^4$  C/mol),  $\epsilon_r$  la constante dieléctrica relativa (calculada para cada porcentaje de dopado, a partir de los resultados de EIS),  $\epsilon_0$  la permitividad en el vacío ( $8,8542 \times 10^{-12}$  F/m),  $E$  el potencial aplicado en el experimento,  $E_{fb}$  el potencial de banda plana,  $R$  la constante de los gases ( $8,314$  J/K·mol), y  $T$  la temperatura absoluta ( $310,5$  Kelvin). La capacitancia del espacio de carga  $C_{SC}$  se calculó mediante la ecuación 2.5. A partir del ajuste de las gráficas M-S se obtuvo el potencial de banda plana con el corte en la ordenada y la densidad de donadores, de la pendiente de la línea recta.

Se encontró que entre 0 y 0,5% de zinc,  $N_d$  es estable con el tiempo, indicando que la conductividad es independiente del porcentaje de sal de zinc a bajas concentraciones. Para un porcentaje de 1 y 2% de zinc, se observan pequeñas variaciones en  $N_d$  con el tiempo. El mejor comportamiento conductor y de potencial de banda plana en el PLA, se obtuvo con concentraciones de zinc de 1%. Sin embargo, el  $E_{fb}$  es muy sensible a cambios en la estructura de los polímeros [50]. A tiempos cortos de exposición en la solución fisiológica, el potencial de banda plana del PLA es mayor que a tiempos de exposición más largos, indicando, que la energía inicial necesaria para que los electrones logren

pasar de la banda de valencia a la banda de conducción es alta. Al aumentar el tiempo de exposición en el fluido fisiológico con la consecuente degradación del PLA, la resistencia al transporte de carga disminuye, incrementando la conductividad del PLA.

## **2.4 Conclusiones de este capítulo**

- Armazones poliméricos de PLA-PLG reforzados con HAP, fueron sintetizados mediante la técnica de evaporación/extracción de solvente. Los resultados de las pruebas de FT-IR presentaron los picos característicos del copolímero y además los correspondientes a la HAP, indicando una distribución homogénea de las partículas de HAP dentro de la matriz polimérica de PLA-PLG.
- Mediante el ensayo de degradación y mediciones de pérdida de peso, se demostró, que el armazón polimérico de PLA-PLG reforzado con HAP, se degrada por un proceso que inicialmente presentó una absorción de la solución de PBS al interior de la matriz polimérica, alcanzando solo los sectores amorfos, en los cuales comenzó a producirse la hidrólisis de los enlaces éster. Los segmentos de cadena de estos sectores, se fragmentaron como consecuencia del ataque hidrolítico y son precisamente estas rupturas, las que suponen el aumento de la cristalinidad de las muestras observado en el DSC. La absorción de agua y la pérdida de peso de las muestras, depende en gran medida, de la cantidad de HAP presente en la matriz polimérica, así mismo la temperatura de transición vítrea de las muestras, depende del tiempo de degradación. Los resultados de DSC

mostraron un significativo efecto de la interacción de la HAP con el PLA, sobre la variación estructural con el tiempo de degradación.

- Compuestos de Hidroxiapatita-quitosano fijados sobre sustratos de Ti6Al4V, fueron evaluados en función de los cambios de cristalinidad con la variación de la concentración de quitosano mezclado con HAP. Estos compuestos presentaron un comportamiento cristalino, el cual disminuyó al aumentar la cantidad de quitosano. La bioactividad de estos compuestos fue evaluada por ensayos electroquímicos, determinándose un incremento energético superficial, a mayor cantidad de quitosano en la mezcla; sin embargo, pequeñas diferencias en los resultados electroquímicos y de acuerdo a la evaluación por SEM, hace suponer que la mayor activación mostrada en el HAP con mayor cantidad de quitosano, corresponde a un aumento en la superficie específica, implicando un aumento en la bioactividad en la HAP con el uso de quitosano.

- Se obtuvieron polielectrolitos de ácido poliláctico dopado con sulfato de zinc, los cuales fueron evaluados electroquímicamente, permitiendo determinar las variaciones en la composición del material y sus propiedades semiconductoras respecto a una solución rica en iones de fosfato y de calcio. Los polímeros analizados, mostraron un comportamiento Mott-Schottky de un semiconductor tipo n, en los cuales los electrones son transferidos desde el electrodo hacia la solución, catódicamente. Este tipo de semiconductividad, puede permitir el desarrollo celular de tejido al ser inducido en el medio fisiológico. El mejor comportamiento semiconductor se presentó en el PLA con 1% de adición de sulfato de zinc.

## Referencias capítulo 1

- [1] ROJAS CORTÉS, Manuel G.; VALLEJO DÍAZ, Bibiana M. y PERILLA, Jairo E.; Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico. *Revista Ingeniería e Investigación*. 28. 1, 2008 57-71.
- [2] Marcos A. Sabino G. *Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen 9*, Mayo de 2008. Modificación química de biomateriales poliméricos. XII Coloquio Venezolano de Polímeros, Universidad de Oriente, Cumana 2007. 206-210.
- [3] PANDEY ANURAG, PANDEY GIRISH C., ASWATH PRANESH B. Synthesis of Poly(lactic- acid-polyglycolic acid blends using microwave radiation. *Journal of the Mechanical behavior of biomedical materials*: 2008. 227-233.
- [4] MIDDLETON, J., Tipton, A.J., “Synthetic Biodegradable Polymers as Orthopedic Devices”, *Biomaterials*. 20. 2000. 2335-2346.
- [5] TAIYO YOSHIOKA, NAOKI KAWAZOE, TETSUYA TATEISHI Y GUOPING CHEN. In Vitro Evaluation of Biodegradation of Poly (lactic-co-glycolic acid) Sponges. *J Biomaterials*; 29. 2008; 3438-3443.
- [6] BOSKEY Adele L. Amorphous calcium phosphate: the contention of bone. *Journal of Dental Research*; Houston; 76, 8. 1997. 1433-1439.
- [7] ALEXANDER HOPPE, NUSRET S. GULDAL. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* 32, 2011; 2757-2774
- [8] D. C. Parada Quinaya, P. González, H. Estupiñán, D. Peña; Trabajo de Grado “Obtención, Electrodeposición y Caracterización de un polímero bioabsorbible a partir de ácido l – láctico para aplicaciones biomédicas”. 2007
- [9] MOTTA, A.C., DUEK, E.A.R. Síntese, Caracterização e Degradação “in vitro” do poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico). *Revista Materia*, 11, 3, Sorocaba, Brasil. 2006. 340–350.
- [10] D. Lewis, Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers, in: *Biodegradable polymers as drug delivery systems*, Marcel Dekker, New York, 1990, 1-41.

- [11] Linbo Wu, Jiandong Ding, In Vitro of Three-Dimensional Porous Poly(D,L-lactide-co-glycolide) Scaffolds for Tissue Engineering, J Biomaterials; 25. 2004. 5821-5830.
- [12] D. Lewis, Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers, in: Biodegradable polymers as drug delivery systems, Marcel Dekker, New York, 1990, 1-41.
- [13] Eeva Orava, Joni Korventausta. In vitro degradation of porous poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA)/bioactive glass composite foams with a polar structure. Polymer Degradation and Stability 92 2007. 14-23.
- [14] Chu, C. Hydrolytic degradation of poly (glycolic acid): tensile strength and crystallinity study. J. Appl. Polym. Sci. 26: 1981. 1727-1734.
- [15] Rubiana Mara Mainardes, María Palmira Daflon Gremião, Raul Cesar Evangelista. Estudio termoanalítico de nanopartículas de PLGA contendo praziquantel. Rev. Bras. Cienc. Farm. 42.4 São Paulo 2006.
- [16] Patronidou C., Karageorgiou V., PLGA nanocarriers for systemic and lymphatic oral delivery of proteins and peptides, Journal of controlled release; 132, 3 18, 2008, e5-e6
- [17] REZWAN K., CHEN Q. Z., Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, Biomaterials 27, 2006, 3413-3431.
- [18] PANDEY ANURAG, PANDEY GIRISH C., ASWATH PRANESH B. Synthesis of Polylactic- acid-polyglycolic acid blends using microwave radiation. Journal of the Mechanical behavior of biomedical materials: 4. 1. 2008. 227-233,
- [19] MORA CAMPOS Y. Msc. Gastón Fuentes Estévez. Preparación y caracterización de composites cargados con HAP. La Habana, 2005. 1.
- [20] LONDOÑO MARTA ELENA, ECHAVARRIA ALEJANDRO, De la Calle Francenith. Características Cristaloquímica de la Hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas. Revista EIA, 5. 2006.109-118..
- [21] BARBERO ALFREDO, Cesar. Polímeros conductores y semiconductores de la biología a la nanotecnología. Universidad Nacional de Río Cuarto. Asociación Argentina de Materiales, 2005. 1-7.



- [22] MIDDLETON, J., Tipton, A.J., "Synthetic Biodegradable Polymers as Orthopedic Devices", *Biomaterials*; 20. 2000. 2335-2346.
- [23] D. LEWIS, Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers, in: *Biodegradable polymers as drug delivery systems*, Marcel Dekker, New York, 1990. 1-41.
- [24] LEI SONG, LU GAN YAN FENG XIAO. Antibacterial hydroxyapatite/chitosan complex coatings with superior osteoblastic cell response. *Materials Letters*; 65. 2011. 974-977.
- [25] LINBO WU, JIANDONG DING, In Vitro of Three-Dimensional Porous Poly(D,L-lactide-co-glycolide) Scaffolds for Tissue Engineering, *J Biomaterials* 2004; 25: 5821-5830.
- [26] D. LEWIS, Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers, in: *Biodegradable polymers as drug delivery systems*, Marcel Dekker, New York, 1990, 1-41.
- [27] MOTTA, A.C., DUEK, E.A.R. Síntese, Caracterização e Degradação "in vitro" do poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico). *Revista Materia*, 11. 3, Sorocaba, Brasil. 2006. 340 – 350.
- [28] EEVA ORAVA, JONI KORVENTAUSTA. In vitro degradation of porous poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA)/bioactive glass composite foams with a polar structure. *Polymer Degradation and Stability* 92 2007 14-23.
- [29] TAIYO YOSHIOKA, NAOKI KAWAZOE, TETSUYA TATEISHI Y GUOPING CHEN. In Vitro Evaluation of Biodegradation of Poly (lactic-co-glycolic acid) Sponges. *J Biomaterials* 2008; 29: 3438-3443.
- [30] CHU, C. Hydrolytic degradation of poly (glycolic acid): tensile strength and crystallinity study. *J. Appl. Polym. Sci.* 26: 1727-1734, 1981.
- [31] RUBIANA MARA MAINARDES, María Palmira Daflon Gremião, Raul Cesar Evangelista. Estudo termoanalítico de nanopartículas de PLGA contendo praziquantel. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* Vol.42 no.4 São Paulo Oct. /Dec. 2006.
- [32] CONDE A., DE DAMBORENEA J.J. "Electrochemical impedance spectroscopy for studying the degradation of enamel coatings". *Corrosion Science*. Vol. 44 Sep. 2001. 155-1567

- [33]ALVAREZ, N., MANTILLA, J. Trabajo de Grado “Evolución de la cristalinidad de copolímeros de PLGA (70:30 y 50:50) mezclados con hidroxiapatita al 5% y al 10%, sometidos a degradación hidrolítica en fluido fisiológico simulado a 37°C” 2009.
- [34]GINEBRA, Maria Pau. Desarrollo y caracterización de un cemento óseo basado en fosfatos tricálcico- $\alpha$  para aplicaciones quirúrgicas. tesis, Universitat Politècnica de Catalunya. 1996.
- [35]GONZÁLEZ, R. J. et al. Caracterización mediante FTIR y DSC de la interacción Colágeno – Hidroxiapatita. IFMBE Proceedings. 18, 20. 2008. 1246-1249
- [36]SABOT, Andrea; KRAUSE, Steffi. Simultaneous quartz crystal microbalance impedance and electrochemical impedance measurements. investigation into the degradation of thin polymer films. Department Of Chemistry, The University Of Sheffield. Analytical Chemistry, 74, 14, 2002. 3304 - 3311
- [37]RÁMILA, A. et al. Drug release and in vitro assays of bioactive polymers/glass mixtures. Journal of Sol-Gel Science and Technology; 26, 1-3, 1195-1198.
- [38]SANTOS, Flavio; MENDEZ, Renata; TATSUO, Lauro. Applications of QCM, EIS and SPR in the investigation of surfaces and interfaces for the development of biosensors. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Quim. Nova, 27, 6. 2004. 970-979,.
- [39]Yang, Jiafeng; Qiu, Liping; Preparation of CNTs/HAp/Chitosan Hydrogel and Its Cellular Compatibility, Journal of Scientific Conference Proceedings; 1, 3, June 2009, 141-145.
- [40]Londoño marta ELENA, echavarria Alejandro, De la Calle Francenith. Características Cristaloquímica de la Hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas. Revista EIA, 5. 2006. 109-118.
- [41]Hyeong-Ho Jin, Chang-Hun Lee; In-situ formation of the hydroxyapatite/chitosan-alginate composite scaffolds; Materials Letters Volume 62, Issues 10-11, 15 April 2008, 1630-1633

- [42] Hyeon Ho Jin et al., Preparation of Macroporous Hydroxyapatite/Chitosan-Alginate Composite Scaffolds for Bone Implants; *Key Engineering Materials*, 342-343, 2007, 217-220
- [43] Otto Carl Wilsosn, Joanna Rae hull; Surface modification of nanophase hydroxyapatite with chitosan; *Materials Science and Engineering: C*; 28, 3, April 2008, 434-437
- [44] R. Jayakumar, M. Prabakaran; Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications; *Biotechnology Advances* 28, 2010. 142–150
- [45] GUIMARD, Nathalie K., GOMEZ, Natalia and SCHMIDT, Christine E. Conducting polymers in biomedical engineering. *Progress in Polymer Science* 32. 2007. 876-921.
- [46] HEEGER A.J. Semiconducting and metallic polymers: the fourth generation of polymeric materials. *Angew Chem Int. Ed* 2001; 40:2591-611.
- [47] ZHOU, Haojie., LIN, Yuqing., YU, Ping., SU, Lei and MAO, Lanqun. Doping polyaniline with pristine carbon nanotubes into electroactive nanocomposite in neutral and alkaline media. *Electrochemistry Communications* 11. 2009. 965-968.
- [48] SHIRAKAWA H, Louis EJ, MacDiarmid AG, Chiang CK, Heeger AJ. Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH<sub>x</sub>). *J Chem Soc Chem Commun* 1977: 578-80.
- [49] LEE, Jae Y., BASHUR, Chris A., GOLDSTEIN, Aaron S. and SCHMIDT, Christine E. Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications. *Biomaterials* 30. 2009. 4325-4335.
- [50] GARCÍA SERRANO, J., GÓMEZ HERNÁNDEZ, E., OCAMPO FERNÁNDEZ, M. and PAL, U. Effect of Ag doping on the crystallization and phase transition of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Current applied Physics*. 9 2009 1097-1105.
- [51] SINHA RAY, Suprakas; BOUSMINA, Mosto. Biodegradable polymers and they layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. *Progress in Materials Science* 50 2005 962-1079.
- [52] BONZANI, Ian C.; GEORGE, Julian H., and STEVENS, Molly M. Novel materials for bone and cartilage regeneration. *Current Opinion in Chemical Biology* 2006, 10:568-575.

- [53] ZUWEI, Ma; ZHENGWEI Mao y CHANGYOU, Gao. Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 60 2007. 137-157.
- [54] SCHULER, Martin., TRENTIN, Diana., TEXTOR, Marcus and TOSATTI, Samuele. Biomedical Interfaces: titanium surface technology for implants and cell carriers. *Future Medicine, Nanomedicine*. 1.2006, 449-463.
- [55] Y. IKADA. Surface modification of polymers for biomedical applications. *Biomaterials*. 1994.
- [56] CATLEDGE, Shane A.; FRIES, Marc and VOHRA, Yogesh K. Nanostructured Surface Modifications for Biomedical Implants. Department of physics, University of Alabama at Birmingham. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* 2001, 1-22.
- [57] BARBERO ALFREDO, Cesar. Polímeros conductores y semiconductores de la biología a la nanotecnología. Universidad Nacional de Río Cuarto. Asociación Argentina de Materiales, 2005. 1-7.
- [58] ROSSINI, P., COLPO P., CECCONE G., JANDT K.D., ROSSI F. Surfaces engineering of polymeric films for biomedical applications. *Materials Science and Engineering*. C 23 2003. 353-358.
- [59] ACCIARI, Heloisa; VERCIK, Luci C.; SANTOS, Márcio L. y GUASTALDI, Antonio C. Determinación de la adhesión de hidroxapatita sobre Ti cp utilizando impedancia electroquímica. Universidad Estadual Paulista, Instituto de Química de Araraquara. Departamento de Físico-Química. *Revista CENIC Ciencias Químicas*. 2006.
- [60] COTTIS R., Turgoose S.; *Electrochemical Impedance and Noise*, Syrett B.C editor; NACE International; USA; 1999.
- [61] ACEVEDO PEÑA, Próspero. Preparación de electrodos semiconductores sobre vidrio conductor (ITO) por deposición electroforética y su caracterización electroquímica. Tesis de Maestría, Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, 2008.

### **3. CAPÍTULO 2. ADSORCIÓN POLARIZADA DE FOSFATOS Y PROTEÍNAS SOBRE ARMAZONES DE PLA-PLG-BIOCERÁMICO-ZINC**

#### **3.1. Introducción de este capítulo**

Los biominerales se encuentran depositados en los sistemas biológicos constituyendo parte del endo y exoesqueletos, dientes, sensores ópticos, sistemas de protección, o bien son la causa de diversas patologías en seres humanos, como cálculos renales, biliares y calcificación en la pared arterial [1-8]. En el ser humano las concentraciones de iones calcio y fosfato en el líquido extracelular son considerablemente mayores que las necesarias para causar la precipitación de la Hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ .

El grado de biomineralización es el factor más importante para determinar las capacidades mecánicas del hueso. Los minerales están ligados a través de las proteínas no colágenas y estas conforman entre 3 % y 5 % de la composición del hueso, las cuales proveen emplazamientos activos para la biomineralización y unión celular [9-14].

Un proceso adyacente a la biomineralización es la adsorción, en el cual se extrae materia de una fase y se concentra sobre la superficie de otra fase (generalmente sólida). La sustancia que se concentra en la superficie o se adsorbe, "adsorbato" y la fase adsorbente, "adsorbente". La adsorción desde una disolución a un sólido es por consecuencia del carácter liofóbico (no afinidad) del soluto respecto al disolvente particular, o debido a una afinidad elevada del soluto por el sólido o por una acción combinada de estas dos fuerzas.

En este aparte de la tesis, se analiza la regeneración celular en etapas importantes como lo es: la biomineralización y la adsorción proteínica. Estas etapas son fundamentales durante el intercambio iónico celular para el crecimiento de la matriz extracelular MEC. El intercambio iónico se realiza a partir del transporte de minerales y proteínas con carga iónica a través de la membrana celular.

Como parte de la hipótesis de esta investigación, se asume un modelo de celda electroquímica para la regeneración celular ósea bajo la aplicación de potenciales eléctricos externos, donde un armazón polimérico biodegradable de PLA-PLG modificado con HAP y zinc funciona como cátodo junto a hueso sano, el tejido del hueso dañado funciona como ánodo y el electrolito, la fase líquida rica en nutrientes del plasma sanguíneo que aporta minerales y proteínas. Este modelo describe el intercambio iónico de minerales y proteínas que llevan al crecimiento celular a partir del uso de armazones poliméricas biodegradables semiconductoras como matrices de regeneración ósea [15].

El proceso por el cual el copolímero PLA-PGA (adsorbente) liga moléculas se debe principalmente a la naturaleza de la superficie en la cual el PLA a pesar de ser hidrofóbico, es ayudado por el PLG, el cual posee una naturaleza superficial hidrofílica, atrayendo a la proteína [16-19]. Las moléculas del adsorbato (proteína) pueden ser móviles o fijas en una posición debido a la intensidad de las fuerza de los enlaces, dando a lugar a la quimisorción y fisisorción, sin embargo, la alta complejidad de las superficies sólidas, hace que la mayor parte de los fenómenos de adsorción sean combinaciones de los dos tipos.

La fisisorción o adsorción física está asociada con una entalpía de adsorción numéricamente inferior a  $-40 \text{ KJ mol}^{-1}$ , mientras que valores mayores a  $-80 \text{ KJ mol}^{-1}$ , son característicos de la quimisorción o adsorción química. La entalpía de fisisorción es comparable a la entalpía de condensación, mientras que la entalpía de quimisorción es comparable a la entalpía de las reacciones químicas [20-21].

### **3.2 Experimentación**

En una primera parte y teniendo en cuenta el grado de reabsorbabilidad de la hidroxiapatita comparada con un biovidrio, se realizaron evaluaciones electroquímicas mediante EIE, relacionadas con la capacidad de adsorber fosfatos de mezclas de PLA-HAP y PLA-biovidrio, las cuales fueron usadas en los siguientes porcentajes: PLA/HAP 95/5, 90/10 y PLA/BV 90/10, 70/30 (concentración determinada a partir de ensayos preliminares). El PLA se ha empleado sin el PLG, con el propósito de aislar el efecto de los refuerzos bioactivos en el armazón sobre la biomineralización. Las muestras obtenidas fueron sumergidas en medio fisiológico simulado, preparado con diferentes relaciones calcio/fósforo. Estas concentraciones fueron: 2.5mmol/L, 3.08mmol/L y 4.63mmol/L.

La HAP y el biovidrio empleado, fueron caracterizados mediante DRX y FT-IR, respectivamente.

Los espectros electroquímicos obtenidos fueron ajustados a un modelo de circuitos equivalentes propuesto para describir el mecanismo de adsorción de fosfatos.

Los elementos resistivos obtenidos de las variaciones en la resistencia a la transferencia de carga en los ensayos de adsorción, fueron relacionados con parámetros termodinámicos. Pruebas de absorción atómica para la determinación de iones en solución, después de los ensayos de adsorción, permitió corroborar los resultados electroquímicos obtenidos. La biomineralización se realizó a 0, 7, 14, 21 días, con el fin de reconocer la mejor respuesta del armazón a la formación superficial de apatita en presencia de fluidos similares a los del cuerpo humano.

En una segunda parte, se ha evaluado la adsorción de proteínas de amilasa y albúmina a diferentes concentraciones en solución buffer de fosfatos bajo polarización eléctrica, sobre copolímeros modificados de PLA-PLG-zinc mediante Espectroscopia de Impedancia Electroquímica EIE. La evaluación se basó en el empleo del mismo método usado en los ensayos de biomineralización que relaciona parámetros electroquímicos con parámetros termodinámicos, variando la temperatura y el potencial eléctrico aplicado.

Los resultados mostraron, que a mayor concentración de proteína en solución, disminuye la resistencia a la transferencia de carga, incrementando la adsorción sobre la superficie del armazón. También se presentó un incremento en la adsorción de proteínas con la aplicación de un sobrepotencial eléctrico. Los análisis termodinámicos indicaron que la adsorción de proteínas en la superficie del material polielectrolítico de PLA-PLG se presentó espontáneamente. Finalmente se encontró que el fenómeno de adsorción para las proteínas de amilasa y albúmina empleadas en este estudio, presentaron importantes



similitudes; sin embargo, es posible que factores de tamaño y carga eléctrica de las proteínas, hayan influido en la mayor adsorción de amilasa.

Para estos ensayos, se usó un potenciostato *ACM Instruments Versión 5; Gill AC*. Como electrolito se empleó una solución salina buffer de fosfatos (PBS) con un PH entre 7,4 -7,5 [24], con agua desionizada y los siguientes reactivos: NaCl, KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ . El montaje para esta prueba se realizó con una celda vertical plana con tres electrodos, como se muestra en la figura 3.1.



**Figura 3.1.** Montaje para pruebas electroquímicas

Como contra electrodo se empleó grafito de alta pureza, como electrodo de referencia se usó un electrodo de plata/cloruro de plata ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ , en 3M de NaCl), usando como contacto con el electrolito un *luggin*. El electrodo de trabajo fueron las muestras del polielectrolito de PLA-PLG-zinc. La temperatura corporal de  $37,5^\circ\text{C}$  y otras variaciones de temperatura, fue controladas durante los ensayos mediante calentamiento con un baño termostatado por recirculación de agua a través del serpentín de la celda.

La albúmina se encuentra en gran proporción en el plasma sanguíneo, siendo la principal proteína de la sangre y a su vez la más abundante del cuerpo humano. Por su parte la amilasa, se encuentra en la saliva y en el páncreas. En este orden de ideas, se empleó  $\beta$ -Amilasa Tipo I-B y Albúmina de suero bovino, pH ~7 (1% in 0.15 M NaCl),  $\geq 98\%$ . La concentración de proteínas en PBS fue de 5, 10 y 15  $\mu\text{g/ml}$ , las temperaturas de prueba fueron 25°C, 30°C y 37°C y los potenciales contra el electrodo de referencia, para electroactivar el proceso de adsorción, fueron de 0, 0,2 y 0,4 voltios, hallados por la técnica de voltametría cíclica.

### 3.3. Resultados

#### 3.3.1 Biomineralización del ácido poliláctico-biovidrio y ácido poliláctico-hidroxiapatita

En la figura 3.2 se muestra el difractograma de rayos X de la hidroxiapatita sintetizada.

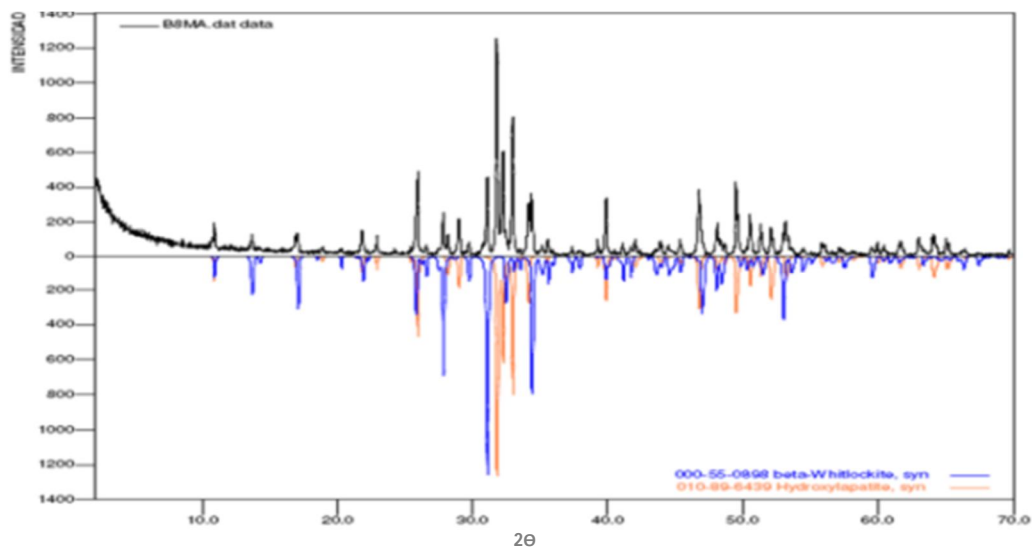
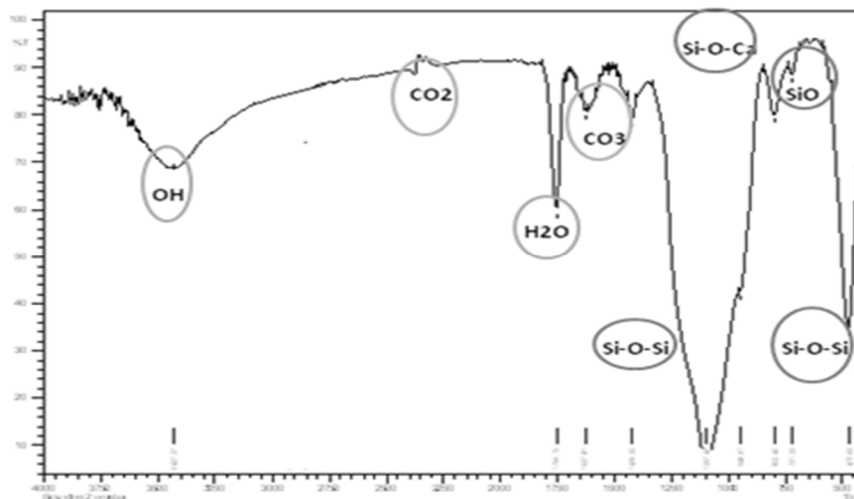


Figura 3.2. Espectro DRX de la hidroxiapatita sintetizada.

Este difractograma muestra el patrón de DRX para HAP sintética y whitlockita; siendo esta última un precursor importante en la formación de HAP.

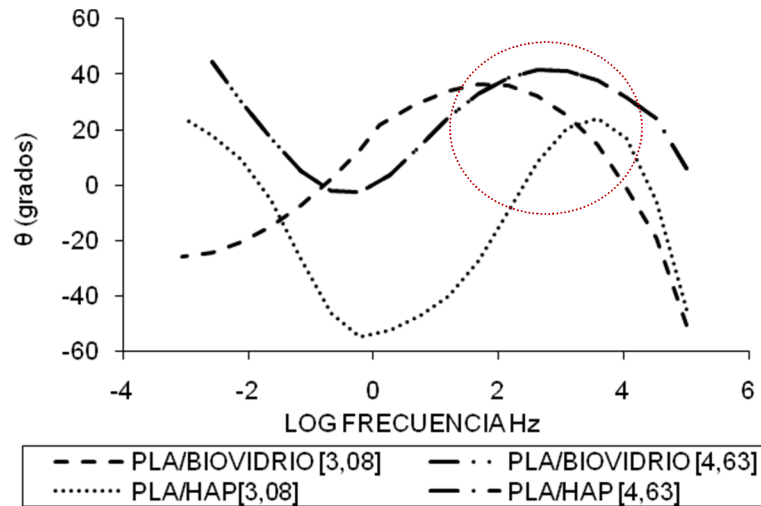
La Identificación del BV se realizó mediante espectroscopia de infrarrojo, encontrando picos de absorción característicos de En la figura 3.3 se muestra la Identificación del biovidrio mediante espectroscopia de infrarrojo.



**Figura 3.3.** Espectro Infrarrojo del Vidrio Bioactivo

Los grupos funcionales de este compuesto corresponden a los reportados en la literatura [25-26]. el pico en el rango de  $1000 - 1100 \text{ cm}^{-1}$  corresponde a la tensión vibracional del enlace asimétrico Si-O-Si, en el rango de  $750 - 850 \text{ cm}^{-1}$  a la tensión vibracional del enlace Si-O, y entre  $450 - 550 \text{ cm}^{-1}$  al modo vibracional de flexión del enlace simétrico Si - O - Si. El pico de absorción alrededor de  $950 \text{ cm}^{-1}$  puede atribuirse a los enlaces Si-O-Ca. La banda del ion carbonato entre  $1500 - 1750 \text{ cm}^{-1}$  está relacionada con la presencia de Calcio. Los picos a  $3500$  y  $1750 \text{ cm}^{-1}$  pueden asignarse a la tensión de los enlaces -OH del agua. Los picos dobles entre  $2250$  y  $2500 \text{ cm}^{-1}$  a la absorción del  $\text{CO}_2$ .

En la figura 3.4 se muestra un espectro de impedancia característico que muestra la adsorción de fosfatos sobre la superficie del PLA a diferentes concentraciones de Ca en SBF.



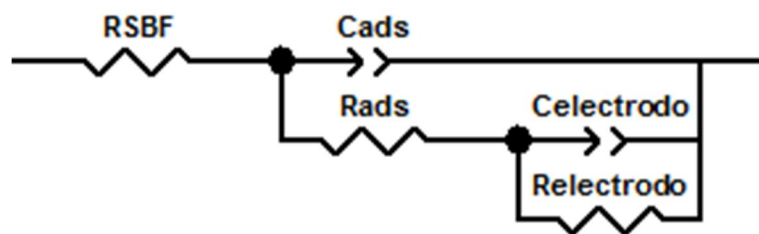
**Figura 3.4.** Espectros de bode: T = 45°C con diferentes concentraciones de iones de  $Ca^{+2}$ , para las mezclas trabajadas.

Se encontró que las muestras de PLA-HAP, no presentaron un comportamiento de mineralización superficial con el incremento de la concentración de Ca en la solución. Un máximo en el ángulo de fase a frecuencias entre 100 y 10.000 (figura 3.4, círculo rojo punteado), muestra la relajación de carga relacionada con la adsorción de fosfatos de calcio sobre la superficie. Comportamientos más resistivos en esta zona, indican una mayor adsorción. La mezcla PLA-HAP a una concentración de 3,08 mmol/L de iones de  $Ca^{+2}$  en solución, mostró el comportamiento más resistivo, indicando la formación de una monocapa de apatita sobre la superficie del material. La mezcla PLA-Vidrio Bioactivo a una concentración de 4,63mmol/L de iones de  $Ca^{+2}$ , mostró mayor biomineralización

que a menor concentración de calcio en solución. Las variaciones de temperatura no influyeron en este comportamiento.

La explicación de estas diferencias se basa en la estabilidad hidrolítica de la HAP y del biovidrio. En el primer caso, la adsorción se basa en interacciones o enlaces de tipo electrostático sobre la superficie. Dada la baja solubilidad de la HAP, en donde un incremento en la concentración de calcio, puede desnaturalizar la apatita formada. Contrario a la HAP, el biovidrio posee la propiedad de reabsorberse en un medio fisiológico, generando intercambio iónico mediante procesos de hidroxilación superficial a partir de la formación de grupos silanol, por lo que es posible que al incrementar la carga de calcio, se aumente la cantidad de apatita sobre la superficie. Sin embargo pueden intervenir factores relacionados con la degradación hidrolítica.

Un modelo de circuito equivalente propuesto, mostrado en la figura 3.5, con dos constantes de tiempo ( $\tau = CR$ ) en paralelo, representó el proceso de adsorción de apatita en las mezclas de PLA-HAP y PLA-biovidrio.



**Figura 3.5.** Circuito equivalente para el proceso de adsorción de apatita

El elemento de fase constante que reemplaza a una capacitancia pura, permite determinar la desviación de la idealidad del capacitor.

A partir de la proporcionalidad entre la concentración superficial saturada de apatita  $\Gamma$  y  $1/\text{Resistencia a la transferencia de carga } R_{tc}$ , los valores de resistencia a la transferencia de carga obtenidos de la simulación del modelo de circuitos equivalentes propuesto, se ajustaron a la isoterma de Langmuir (ecuación 1.1), válida para describir la adsorción de mono capa. Se graficó la concentración de iones de  $\text{Ca}^{+2}$  (C) vs  $R_{ct} * C$ . Los valores de  $\Gamma$  son obtenidos por la pendiente y el valor de la capacidad de adsorción  $B_{ads}$ , corresponde al intercepto con el eje de las abscisas. En la tabla 3.1, se muestran los parámetros termodinámicos de las mezclas de PLA-HAP y PLA-biovidrio, derivados de las isotermas.

**Tabla 3.1.** Parámetros termodinámicos de adsorción de apatita obtenidos

Mezcla	T ( °C)	$\Gamma_{\text{máx}}$	$B_{\text{ads}}$ (L/mol)	$\Delta G$ (KJ/mol)	$\Delta S$ (KJ/mol <sup>°k</sup> )	$\Delta H$ (KJ/mol <sup>°k</sup> )
<b>PLA /BV</b>	24	0,000174	455,6	-25,01	0,0386	-13,54
	45	0.029	172.32	-24.20		-11.92
<b>PLA/HAP</b>	24	0.00019	372.07	-24.55	-0.0781	-51.02
	45	0.000037	365.39	- 26.19		-47.19

El  $\Delta G$  y  $\Delta H$  negativo indica una adsorción espontánea sobre la superficie de la mezcla polimérica y una reacción exotérmica respecto a la adsorción. El aumento de la temperatura desfavorece la adsorción en la mezcla PLA-BV, contrario a lo que se presentó en la mezcla PLA-HAP, mostrando esta mezcla una mayor capacidad de activación ante la generación de cambios energéticos externos.

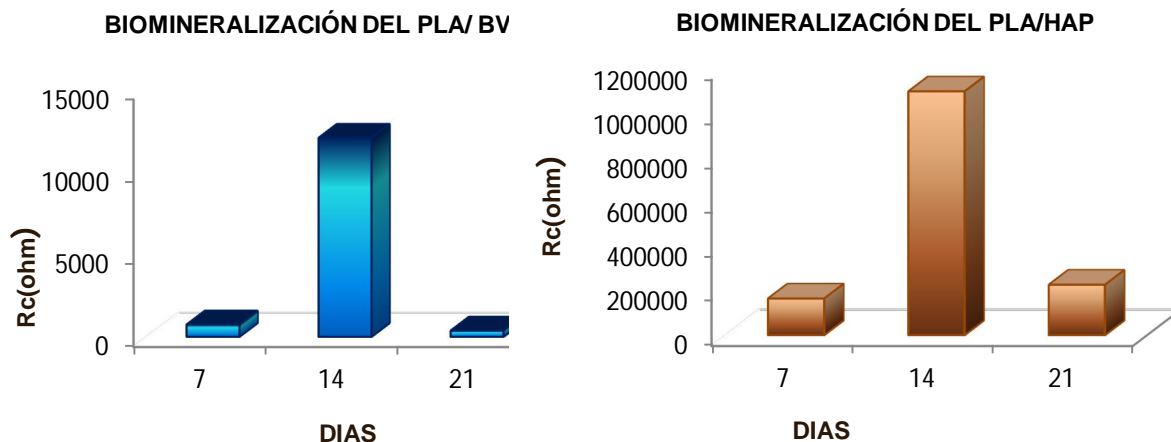
La Tabla 3.2 muestra los valores de concentración de iones de Calcio obtenidos por absorción atómica del medio SBF antes y después de la inmersión de las probetas de PLA-HAP y PLA-VB.

**Tabla 3.2.** Concentración de calcio remanente en solución, volumen 40ml T: 37 °C.

Concentración de Ca <sup>+2</sup> en SBF	Antes de la Inmersión en SBF (ppm)	PLA-HAP (ppm)	PLA-BV (ppm)
<b>3,08mmol/L</b>	2,829	2,238	2,631
<b>% ERROR</b>	2,7	1,96	1,28
<b>4,63mmol/L</b>	2,963	2,200	2,945
<b>% ERROR</b>	0,53	0,6	1,49

La concentración obtenida, fue menor para las mezclas con HAP, lo cual sugiere que en los resultados electroquímicos intervinieron factores relacionados con la degradación hidrolítica de cada una de las mezclas. La mezcla PLA-HAP, presenta una gran estabilidad hidrolítica, demostrada en los resultados obtenidos del capítulo 2 de esta investigación. La mezcla PLA-biovidrio, por sus propiedades de reabsorción, puede presentar una mayor degradación hidrolítica. A pesar de que los productos de degradación del biovidrio pueden aumentar el pH local, no es suficiente para compensar la disminución del pH producido por la erosión del PLA en la interfase de contacto con el biovidrio.

La biomineralización o la capacidad de las mezclas obtenidas de formar una capa de fosfato de calcio sobre la superficie de las muestras de PLA-BV y PLA/HAP o incrementar la cantidad de los ya presentes con el tiempo, fue evaluada mediante análisis por EIE y SEM, con ensayos de inmersión en SBF a 0, 7, 14 y 21 días a una temperatura de 37 °C. Los valores de resistencia de la capa adsorbida con el tiempo son mostrados en la figura 3.6.



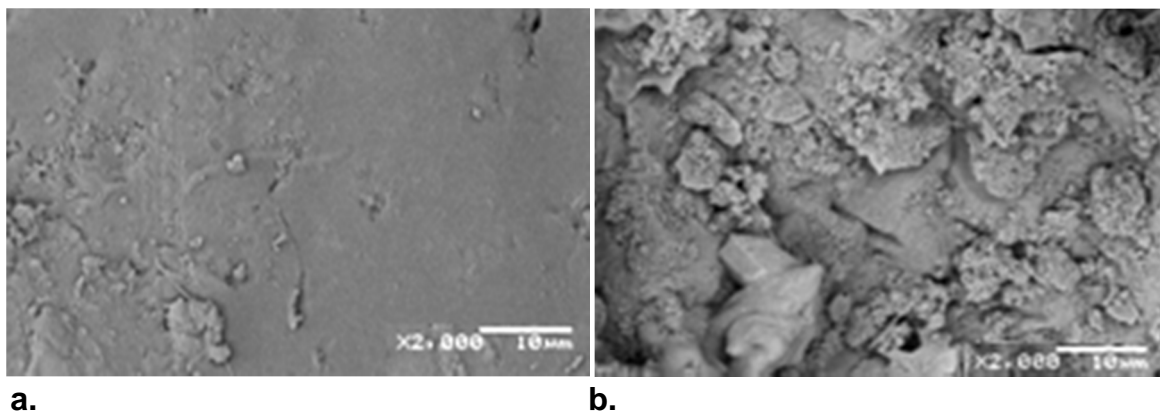
**Figura 3.6.** Comparación del efecto de biomineralización de PL-BV y PLA- HAP

Se observa que la  $R_{tc}$  es la más baja a los 7 días de inmersión en las mezclas de PLA/HAP y PLA/Biovidrio, indicando una disolución de iones de calcio en la mezcla PLA/Biovidrio y de iones de Fosfato de calcio en la mezcla PLA/HAP, con mayor incidencia en la mezcla con biovidrio durante este tiempo. A los 14 días se observa un máximo en el valor de la  $R_{tc}$  en las dos mezclas, indicando adsorción de los iones de calcio y fósforo del fluido simulado para formar la capa de apatita. A los 21 días decrece la resistencia de la capa adsorbida al degradarse esta capa formada, probablemente, debido a procesos de hidratación y rompimiento de enlaces influenciados, tanto por el electrolito, como por el PLA [27-33].

Los grupos silanol formados en la mezcla PLA-BV, son iónicos y de alta energía, razón que contribuye en la disminución del potencial y la resistencia, formando un compuesto bioactivo. En el caso de PLA-HAP, los compuestos formados son fosfatos de calcio iónicos y amorfos que atraen cationes de calcio para formar Hidroxiapatita o a algún fosfato estequiométrico [41].



En la figura 3.7 se presenta la morfología a 2.000 X de las muestras de PLA-biovidrio y PLA-HAP, sumergidas en SBF.



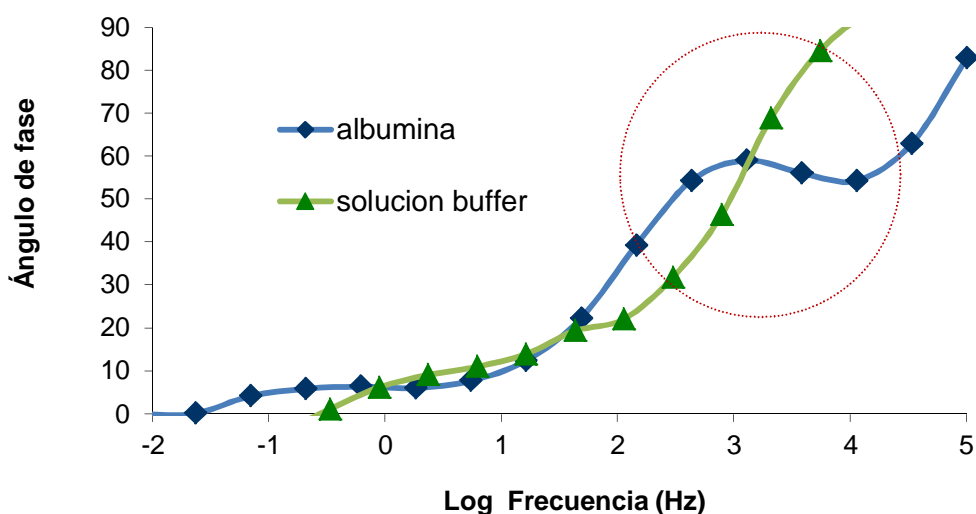
**Figura 3.7.** Micrografías SEM de muestras sumergidas en SBF a 14 días de inmersión: (a) PLA-Biovidrio, (b) PLA-HAP.

Se observa de estas micrografías, una mayor formación de fosfato de calcio en las muestras de PLA-HAP, lo cual corrobora los resultados obtenidos de los ensayos electroquímicos.

### **3.3.2 Adsorción polarizada de proteínas de albúmina y amilasa sobre armazones polielectrolíticos biodegradables de PLA-PLG-HAP-ZINC**

Los espectros de EIE de PLA-PLG (70-30)-HAP-1% de zinc en las soluciones con proteínas, mostraron dos constantes de relajación de la transferencia de carga. Estos espectros fueron ajustados a un modelo con dos circuitos RC en paralelo entre sí y en serie con la resistencia del electrolito, similar al modelo propuesto en la adsorción de fosfatos de calcio. Por medio de la simulación de este modelo, se obtuvieron parámetros electroquímicos que describieron las variaciones en la transferencia de carga entre 100 y 10.000 Hertz (círculo rojo punteado),

relacionadas con la formación de compuestos sobre la superficie. Este modelo presentó un mejor ajuste a los espectros obtenidos con la solución buffer con proteínas (figura 3.8), que con la solución buffer sin proteínas, cuyos resultados fueron mostrados en la primera parte de este capítulo. Es posible que la carga eléctrica asociada a las proteínas, además de factores de forma y área superficial de estas, influyan en la adsorción.

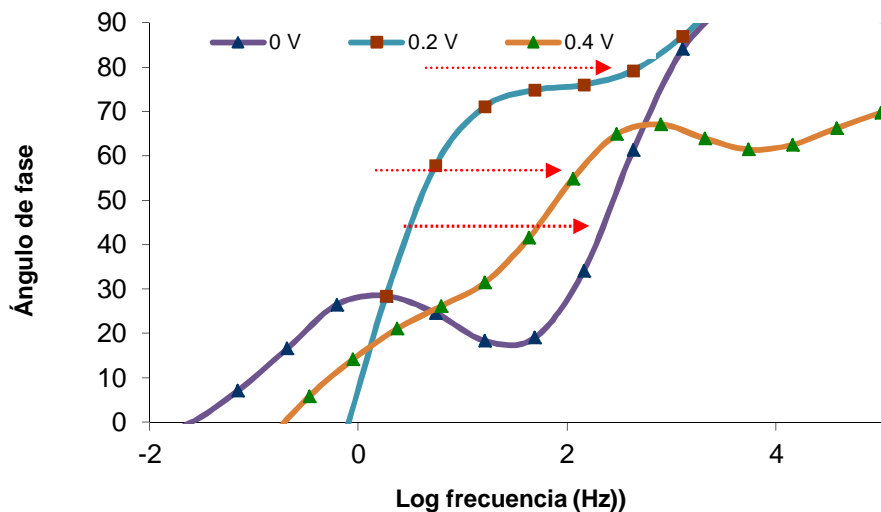


**Figura 3.8.** Espectros de bode. Comparación de las proteínas y la solución buffer.

La interacción interfacial entre el electrodo de PLA-PLG y las proteínas, es originada por las reacciones de los constituyentes de estas con la superficie polimérica mediante enlaces débiles. Un modelo de circuitos equivalentes, similar al mostrado para explicar el mecanismo de adsorción de fosfatos de calcio (figura 3.5), permite describir el comportamiento interfacial entre el copolímero PLA-PLG y el electrolito [42, 43].

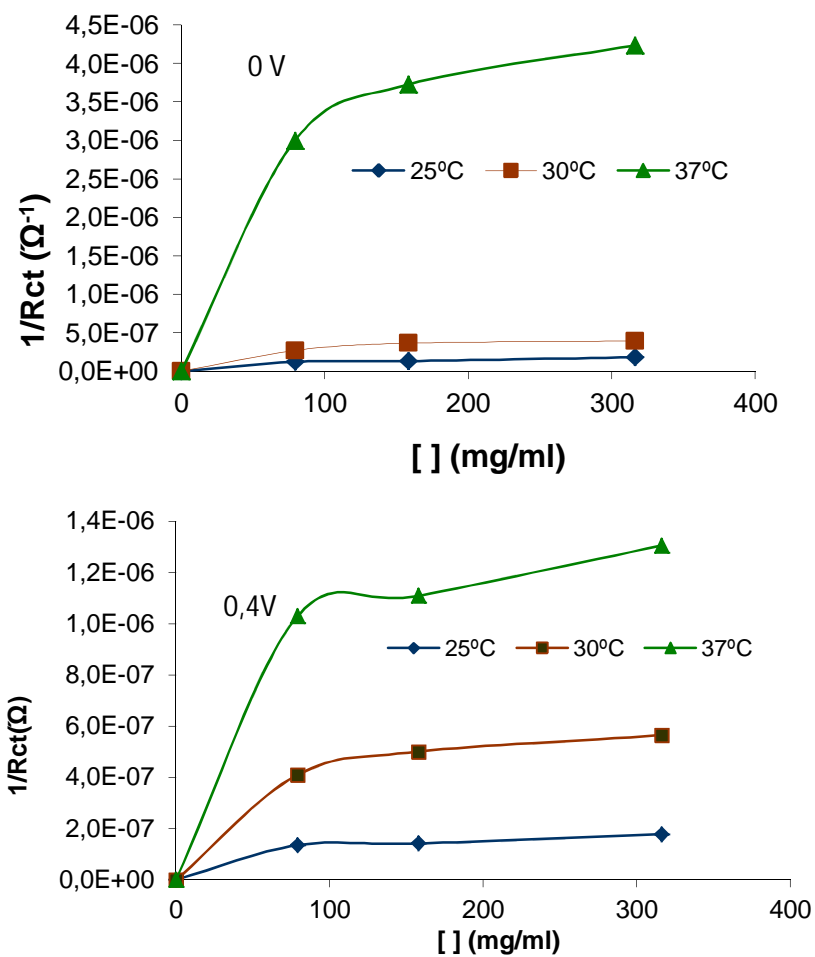
El subcircuito exterior representa una relajación rápida medida a altas frecuencias, relacionada con los procesos de carga y descarga de la interfase electrodo/electrolito. La relajación a bajas frecuencias, representa un proceso más

lento, asociado con la degradación o el transporte de masa de las especies del electrolito hacia el interior del polímero y del polímero hacia el electrolito. Para las proteínas de amilasa y albúmina, disminuyó la  $R_{tc}$  relacionada con la adsorción al aumentar su concentración en la solución buffer de fosfato. Efectos similares fueron obtenidos al aplicar una diferencia de potencial, como se muestra en el espectro de Bode de la figura 3.9.



**Figura 3.9.** Espectros de EIE de la Albúmina a un voltaje aplicado de 0 a 0.4 V a 37°C

Se muestra en la Figura 3.10 la dependencia del inverso de la resistencia a la transferencia de carga con la concentración de la albúmina  $r$  respecto a la variación de temperatura. El incremento en la temperatura y la aplicación de un sobrepotencial eléctrico (hallado preliminarmente por ensayos de voltametría cíclica para cada proteína), incrementó la cantidad de proteína adsorbida sobre la superficie del armazón de PLA-PLG-HAP-zinc. Al aumentar la temperatura, la adsorción aumenta por el incremento en la energía libre superficial. Este comportamiento fue similar para ambas proteínas, sin embargo, la amilasa presentó una mayor cantidad de proteína adsorbida.

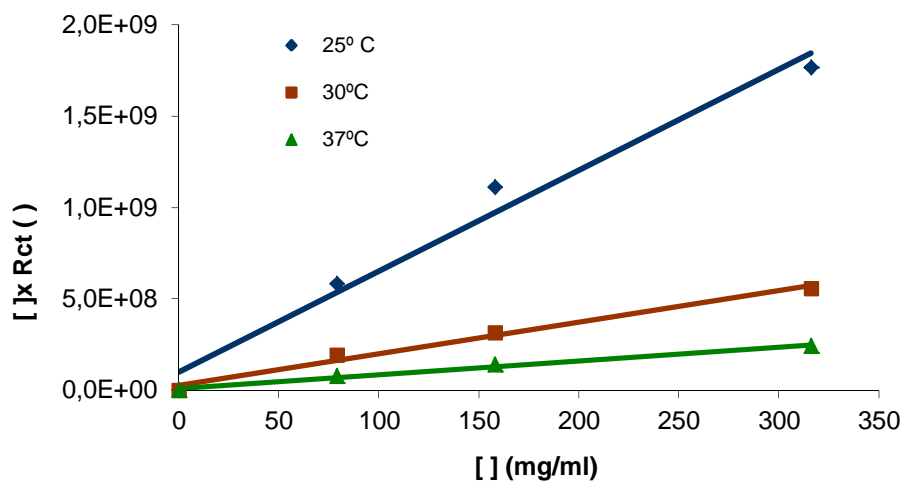


**Figura 3.10.** Isotermas de adsorción de de la Albúmina con voltaje aplicado de 0 y 0,4V, respectivamente, sobre la superficie del armazón de PLA-PLG-HAP-zinc

La aplicación de un sobrepotencial, puede afectar las propiedades fisicoquímicas superficiales, tal como, carga superficial, ángulo de contacto sólido-líquido y tensión superficial. También puede incrementar la movilidad de especies del bulk de la solución hasta la superficie del material.

El proceso de adsorción de proteínas en la superficie del copolímero de PLGA se ajusto a la isoterma de Langmuir.

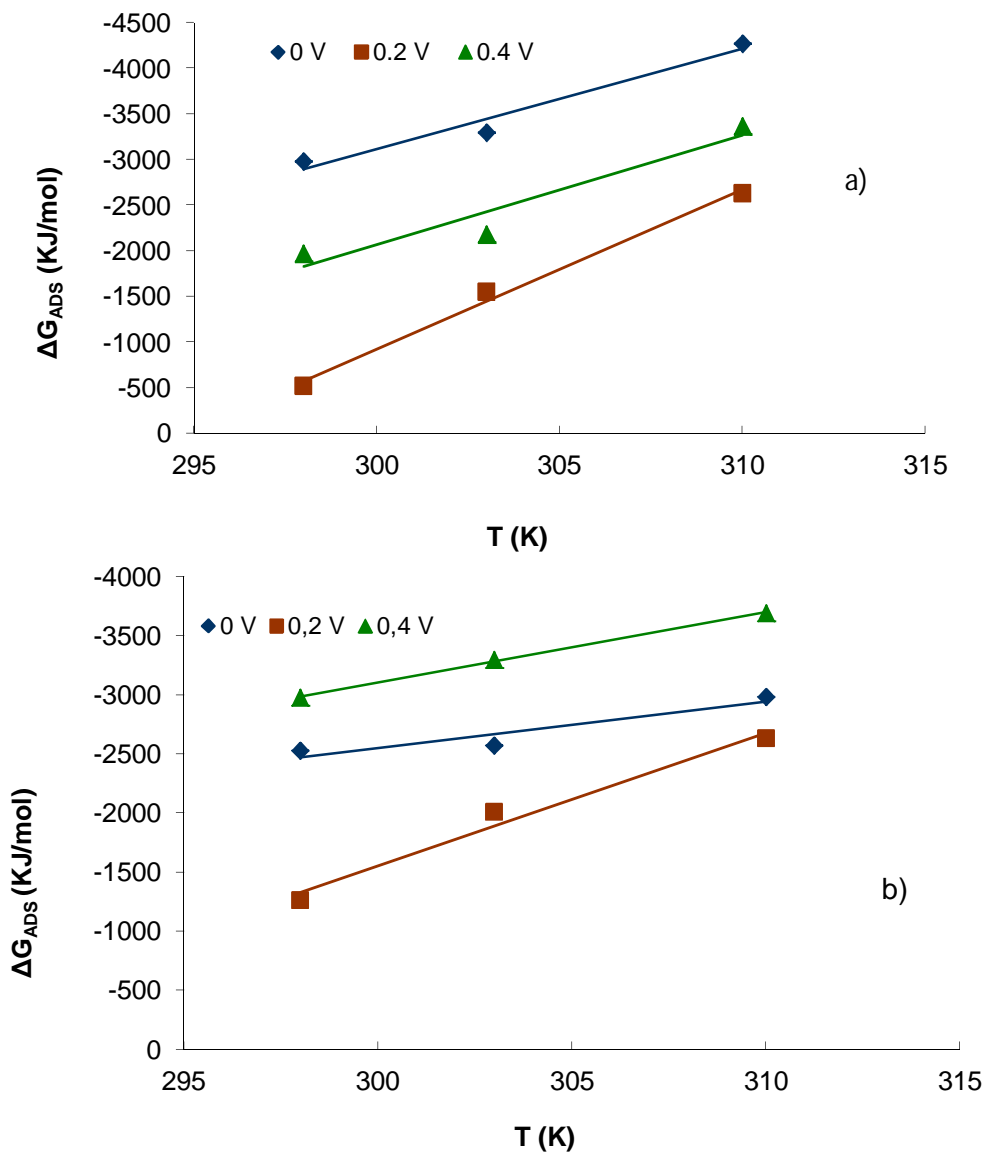
La figura 3.11 muestra los resultados del ajuste a la isoterma de Langmuir para la proteína de albúmina. Estos mostraron que el proceso de interacción de esta proteína con el armazón de PLA-PLG-HAP-zinc, es de monocapa adsorbida.



**Figura 3.11.** Isoterma de adsorción de Langmuir de la albúmina con voltaje aplicado de 0,4 V sobre la superficie del copolimero PLA-PLG-HAP-zinc.

Los parámetros de energía del proceso de adsorción  $\Delta G_{ADS}$ , fueron obtenidos de la ecuación 1.3. Esta energía está relacionada con el trabajo necesario para nuclear y crecer cierta cantidad de proteína sobre la superficie.

En la figura 3.12 se muestran las gráficas que relacionan los cambios de la energía libre de Gibbs con la temperatura para ambas proteínas. El cambio en la entalpía de adsorción se obtuvo a partir de relaciones termodinámicas.

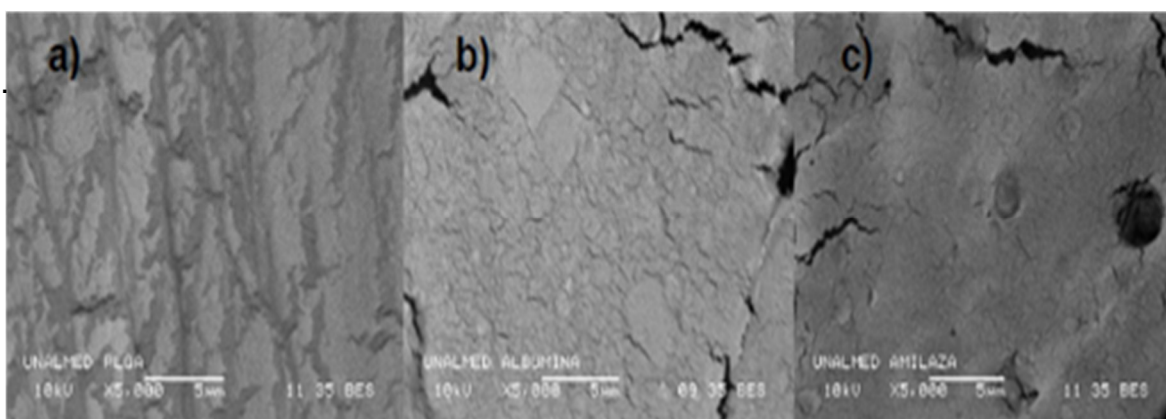


**Figura 3.12.** Grafica de la dependencia de la energía libre de Gibbs de adsorción con la temperatura, para la amilasa a) y albúmina b)

Los resultados mostraron un comportamiento de adsorción espontánea de ambas proteínas sobre la superficie del armazón. El proceso de adsorción fue ligeramente endotérmico, siendo el resultado del exceso de energía requerido para el rompimiento de interacciones intramoleculares proteína/solvente y de la energía involucrada en la formación de interacciones de proteína-polímero. También se

encontró que fue un proceso entrópico, sugiriendo que algún desdoblamiento estructural o desnaturalización de la proteína ocurrió durante el ensayo. En el caso de la amilasa se observó mayor adsorción a 0,2 voltios de polarización, disminuyendo a 0,4. Un comportamiento similar se encontró para la proteína de albúmina, sin embargo, la desnaturalización de proteína fue mayor a este potencial que en la amilasa.

La morfología de las muestras de PLA-PLG-HAP-zinc sin proteínas y con Albúmina y Amilasa, se muestra en la Figura 3.13a, 3.13b y 3.13c, respectivamente.



**Figura 3.13.** Micrografías SEM: a) PLA-PLG-HAP-zinc b) Monocapa Albúmina c) Monocapa Amilasa

Se observa una morfología más irregular en la muestra con adsorción de albúmina, corroborando los resultados obtenidos de los ensayos electroquímicos.

### **3.4 Conclusiones de este capítulo**

Los ensayos electroquímicos permitieron obtener información relacionada con la adsorción de fosfatos de calcio y de proteínas sobre armazones de PLA-HAP, PLA-biovidrio y PLA-PLG-HAP-zinc. Un método electroquímico que relaciona las variaciones de la resistencia a la transferencia de carga con variables termodinámica de adsorción en la región de frecuencia entre 100 y 10.000 Hertz, fue empleado para entender la funcionalidad de los armazones de estudio.

Las muestras del armazón de PLA-HAP presentaron una mayor biomineralización apatítica que las muestras de PLA-biovidrio, mostrando esta mezcla una mejor respuesta de activación ante la generación de cambios energéticos externos.

Un modelo de circuitos eléctricos equivalentes fue usado para determinar el mecanismo de adsorción, tanto de fosfatos de calcio, como de proteínas de albúmina y amilasa sobre la superficie de los armazones propuestos.

Los ensayos de adsorción de proteínas mostraron que el incremento en la temperatura genera un aumento en la adsorción proteínica por el aumento en la energía libre superficial.

Un sobrepotencial de 200 y 400mV encontrado por la técnica de voltametría cíclica, fue aplicado al sistema electroquímico compuesto del armazón de PLA-PLG-HAP-zinc (cátodo), un electrodo de referencia (ánodo) y un electrolito conformado por una solución buffer de fosfatos con diferentes concentraciones de albúmina y amilasa, encontrándose que este potencial además de incrementar la movilidad de especies del bulk de la solución hasta la superficie del material,



afecta las propiedades fisicoquímicas superficiales (carga superficial, ángulo de contacto y tensión superficial), incrementando la adsorción proteínica.

Los análisis termodinámicos mostraron que la adsorción de proteínas, además de ser afectada por factores energéticos superficiales, es afectada por la energía involucrada en la degradación del almacén.

## Referencias capítulo 2

- [1] G. H. Nancollas\*, W. Wu "Biomineralization mechanisms: a kinetics and interfacial energy approach"; Department of Chemistry, Natural Sciences Complex, State University of New York at Buwalo, Suny, Buwalo, NY 14260-3000, USA
- [2] Mann, S. (2001). "Biomineralization, principles and concepts in Bioinorganic Materials Chemistry, Oxford University Press".
- [3] W. Suchanek, M. Yoshimura, "Processing and Properties of Hydroxyapatite based Biomaterials for use as Hard Tissue Replacement Implants", J. Mater. Res. Vol. 13, 1 pp. 94-117 (1998).
- [4] P. N. De Aza, A. H. De Aza, S. De Aza, "Crystalline Bioceramic Materials", Bol. Soc. Esp. Ceram. V. 44, 3, pp. 135-145, (2005).
- [5] P. Saravanapavan, J.R. Jones, R S. Pryce, L L Hench "Biactivity of gel-glass powders in the cao-sio<sub>2</sub> system: a comparison with ternary(cao-p<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-sio<sub>2</sub>) and quaternary glasses(sio<sub>2</sub> -cao-p<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-na<sub>2</sub>O)"(2002)
- [6] A.Helebrant, L. Jonasova L. and L. Sanda. "The influence of simulated body fluid composition on carbonate hydroxyapatite formation", Ceramics Silikaty, vol. 1, pp.9-14, 2003.
- [7] M. Vallet-Regí, A.I. Martín, A.J. Salinas, N. Olmo, J. Turnay and M.A. Lizarbe: "In vitro behaviour of bioactive sol-gel glasses." p.p. 93, 328-329. (2001)
- [8] J. Gil-Albarova, A. Salinas, A. L. Bueno-Lozano, J. Román, N. Aldini-nicolo, A. García-Barea, G. Giavaresi, M. Fini, R. GIARDINI and M. Vallet-Regí: "The in vivo

behaviour of a sol-gel glass and a glass-ceramic during critical diaphyseal bone defects healing. *Biomaterials*,” pp.26. (2005)

[9] M. Vallet-Regí, A.M. Romero, V. Ragel, R.Z. Legeros:” XRD, SEMEDS and FTIR studies of in vitro growth of an apatite-like layer on sol-gel glasses.” *J. Biomed. Mater. Res.* 44,p.p 416-421. (1999)

[10]M. Vallet-Regí, C.V. Ragel, A.J. Salinas: “Glasses with medical applications. Microreview.” *Eur. J. Inor. Chem.* 6,p.p 1029-1042. (2003)

[11]F. Balas, D. Arcos, J. Pérez-Pariente, M. Vallet-Regí: “Textural properties of SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glasses prepared by the sol-gel method”. *J. Mater. Res.*16 (5), p.p1345-1348. (2001)

[12]15 X. Yan, C. Yu, X. Zhou, J. Tang and D. Zhao:” Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone-forming bioactives.” *Angew. Chem. Int. Ed.* 43, p.p5980-5984. (2004)

[13]V.J. Shurtleff, L.L. Hench: “Bioactive materials for tissue engineering, regeneration and repair”. *J. Mater. Sci.* 38, 4697. (2003)

[14]M. Vallet-Regí: “Ceramics for medical applications. Perspective Article”. *J. Chem.* p.p 97-108. (2001)

[15]GUIMARD, Nathalie k. GOMEZ, Natalia. SHMIDT CHRISTINE F. Conducting polymers in biomedical engineering. *Prog Polym Sci.* Vol. 32. 2007. p.885-893.

[16]H. Dong a, B. Meng b, N. Zhu b, F. Cui b, “Biom mineralization of five polymers in human bile a Department of Materials Science and Engineering”, Tsinghua University, Beijing 100084, China b Institute of Biomedical Engineering, Dalian University, Dalian 116010, China.

[17]DOUILLARD, Roger. DAOUH, Mohamed. AGUIE´-BE´GHIN, Ve´ronique. Polymer thermodynamics of adsorbed protein layers. France bService de Physique de l’Etat Condense´, *Colloid and Interface Science* 8. 2003. p. 380–386.

[18]SABINO G, Marcos A. Modificaci3n de superficies de biomateriales polim3ricos y estudio de biocompatibilidad. *Revista Iberoamericana de Pol3meros.*Vol 9, no 3. 2008.

[19]J.M. KARP, M.S. SHOICHET, J.E. DAVIES. Bone Formation on Two-Dimensional Poly(DL-Lactide-Co-Glycolide) (PLGA) Films and Three-Dimensional

PLGA Tissue Engineering Scaffolds in Vitro. December 2001- May 2002. p. 388-396.

[20]S. Omanovic and S. G. Roscoe. "Interfacial Behavior of  $\gamma$ -Lactoglobulin at a Stainless Steel Surface:An Electrochemical Impedance Spectroscopy Study". Department of Chemistry, Acadia University, Wolfville, Nova Scotia, B0P 1X0, Canada.

[21]47. S. G. Roscoe, K. L. Fuller, and G. J Robitaille. "Influence of electrostatic interaction on fibrinogen adsorption on gold studied by imaging ellipsometry combined with electrochemical methods, Colloid Interface Sci". 160, 243 (1993).

[22]C. A. Haynes, and W. Norde, "Globular proteins at solid/liquid interfaces Colloids Sur. B: Biointerfaces". 2, 517 (1994).

[23]Layne, Métodos Spectrophotometric y Turbidimetric del E. para medir las proteínas. Métodos en enzimología 3.1957.p. 447 – 455

[24]Fernandez REYES, Emilio. CEJUDO glaván Aurora. Métodos para la cuantificación de proteínas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales.14071-Cordoba. 2006.

[25]M. E. Londoño, A Echavarría, F. de la calle, "Características cristaloquímicas de la Hidroxiapatita sintética tratada a Diferentes temperaturas", Revista EIA, Número 5 p. 109-118. 2006.

[26]RODRIGUEZ LARA, Laura M. Evaluación electroquímica de recubrimientos bioactivos de hidroxiapatita obtenidos por electrodeposición anódica sobre acero inoxidable 316 LVM. Universidad Industrial de Santander. Tesis de grado. 2007. p.3-4.

[27]MIDDLETON, J., Tipton, A.J., "Synthetic Biodegradable Polymers as Orthopedic Devices", Biomaterials. Vol 20. 2000.p. 2335-2346.

[28]MOTTA, A.C., DUEK, E.A.R. Síntese, Caracterização e Degradação "in vitro" do poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico). Revista Matéria, v. 11, n.3, Sorocaba, Brasil.2006.p.340 – 350

[29]Ritto, Korrodi a. tornillos reabsorbibles para anclaje ortodóncico.The orthodontic Cyber Journal. 2007. p.4-10.

- [30]M. E. Navarro. "Desarrollo y Caracterización de Materiales Biodegradables para Regeneración Ósea". Memoria de tesis presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias. Especialidad Ingeniería Química por la Universitat Politècnica de Catalunya. 2005.
- [31]G.Xin, chen. Hun-Sik, K. Eung-Soo, K. Jin-San, Yoon. "Synthesis of high-molecular-weight poly (L-lactic acid) through the direct condensation polymerization of L-lactic acid in bulk state. European Polymer journal" (2006).
- [32]H, S. Jamshidi, K. Ikada, Y. "Synthesis of polylactides with different molecular weights. Biomaterials" (1997).
- [33]M, S. Lee, .Taniguchi, I. Miyamoto, M. Kimura, Y. "Melt/solid polycondensation of L-lactic acid: an alternative route to poly (L-lactic acid) with high molecular weight. Polymer" (2001).
- [34]Mendoza, J. Duran, R. Genescá. "Notas Espectroscopia de Impedancia Electroquímica en corrosión". Instituto mexicano del petróleo.
- [35]A. J. Bard, L. R. Faulkner, "Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications". Wiley, New York, 2nd Edition.
- [36]Kelly, R. Scully, J. "Electrochemical techniques in corrosion science and engineering. Editorial Marcel Dekker. Nueva York 2002.
- [37]M Bastidas. "Técnicas electroquímicas de corriente alterna. Centro nacional de investigaciones metalúrgicas". 2003.
- [38]CORTES M.T, OTERO T.F, MÉNDEZ M.A, SUAREZ M. F, DÍAZ M, VERA E. Desarrollo de sensores electroquímicos. Revista Colombiana de Física, vol. 38, no.4. 2006.p.1355-1357.
- [39]COTTIS Robert, TURGOOSE, Stephen. Electrochemical Impedance and Noise.B.C Syrett, Series Editor. Manchester .1999.
- [40]VALENZUELA, Raúl. Caracterización de Materiales Por Espectroscopia de Impedancias. Instituto de Investigaciones en Materiales, Revista Cubana de Física, Vol. 19, no 2. 2002.
- [41]FERNÁNDEZ Isabel. HERNÁNDEZ GIL T, GRACIA ALOBERA Miguel ANGEL, PINGARRON Mariano del Canto, JEREZ BLANCO Luis. Bases

fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo. Universidad Complutense, Facultad de Ciencias de la Salud. Madrid. 2004.

[42] Smiechowski, Matthew F. Lvovich, Vadim F. ROY, Shuvo. Fleischman, Aaron. Fissell, William H. Riga, Alan t. Electrochemical detection and characterization of proteins. Biosensors and Bioelectronics. Vol. 22. 2006. p.670–677.

[43] Cosman Nicholas P, FATIH, Khalid. Rosco, Sharon G. Electrochemical impedance spectroscopy study of the adsorption behaviour of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -caseinat stainless steel. Journal of Electroanalytical Chemistry 574. 2005.p.262

[44] BARBERO ALFREDO, Cesar. Polímeros Conductores y Semiconductores. De la Biología a la Nanotecnología. Universidad Nacional de Rio Cuarto. Asociación Argentina de materiales. 2005. p.1-7.

## **4. Capítulo 3. ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE LA ADHESIÓN POLARIZADA DE CÉLULAS ÓSEAS Y COLÁGENO SOBRE ARMAZONES DE PLA-PLG-HAP-QUITOSANO-ZINC**

### **4.1 Introducción de este capítulo**

En este aparte se muestran los resultados y análisis del fenómeno de electroactivación del sistema célula - matriz extracelular (MEC) – armazón de ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PLG) con adiciones de elementos bioactivos de quitosano, biocerámico (HAP) y zinc. El propósito principal fue mejorar el intercambio iónico intracelular y explicar el aumento en la adhesión de células y proteínas como consecuencia de la variación de la hidrofiliidad del armazón inducida por la aplicación de un sobrepotencial eléctrico y por las adiciones de elementos bioactivos. Previamente a esta evaluación, se muestran los resultados y análisis del estudio de la electroactivación de la proteína de colágeno en solución buffer de fosfatos con el armazón de PLA-PLG-HAP-quitosano-zinc. Este estudio permite predecir el comportamiento de la matriz extracelular MEC sobre la superficie del armazón propuesto, debido a que la MEC está compuesta esencialmente de proteína de colágeno.

Los resultados obtenidos plantean un mejoramiento en los procesos de adhesión y reacción celular con la superficie de los armazones de regeneración ósea a partir de la selección adecuada de los potenciales redox que intervienen en la interacción entre las células, las proteínas y el armazón. La aplicación de estos potenciales redox con igual magnitud mediante fuentes externas, permite estimular

por polarización eléctrica a las células, aumentar controladamente la energía libre superficial de los armazones mediante procesos de electrodo e incrementar el transporte iónico a través de la membrana celular. Las células polarizadas pueden presentar el núcleo celular en posición distal respecto a la superficie celular, disposición de regiones especializadas de la membrana plasmática modificada para el tráfico, la secreción vesicular y favorecer, uniones con los osteoblastos adyacentes [11].

En términos generales, el hecho de aumentar la señalización y funcionalización celular hace parte de los propósitos claves de la ingeniería de tejidos, el cual es diseñar un soporte que provea el cimiento para la adhesión celular y un marco estructural para que las células se organicen y ensamblen en un nuevo tejido funcional [24]. Otro aspecto a tener en cuenta es que las células responden a señales micro y nano ambientales relacionadas con la matriz extra celular, estas señales pueden afectar la función celular y la misma estructura del tejido. Sobre este tema, se ha demostrado que elementos bioactivos de HAP y quitosano, favorecen la señalización celular, al ser elementos biomiméticos a la MEC formada por las células.

## **4.2 Experimentación**

Al igual que se describió en el capítulo 1, para la obtención de las probetas del armazón, se realizó una co-polimerización empleando 1% de Zn como catalizador con 40 horas de poli-condensación para el PLA y 0.2 % de cloruro de estaño con

20 horas de poli-condensación para el PLG [7-8]. La síntesis del copolímero de PLGA se realizó mediante el método de evaporación/extracción de solvente, utilizando como solvente cloroformo

La composición del armazón fue de 70:30 (PLA-PGA), según los resultados obtenidos anteriormente. Este material fue mezclado con hidroxiapatita al 10% p/v; con solvente de cloroformo, siendo este eliminado a  $T=150\text{ }^{\circ}\text{C}$  aproximadamente.

Para la transformación del copolímero de (PLA-PGA) en un polielectrolito, se le adicionó como agente dopante para modificar la conductividad del armazón, exceso de sal de zinc en concentraciones entre 0,5 y 1% p/v.

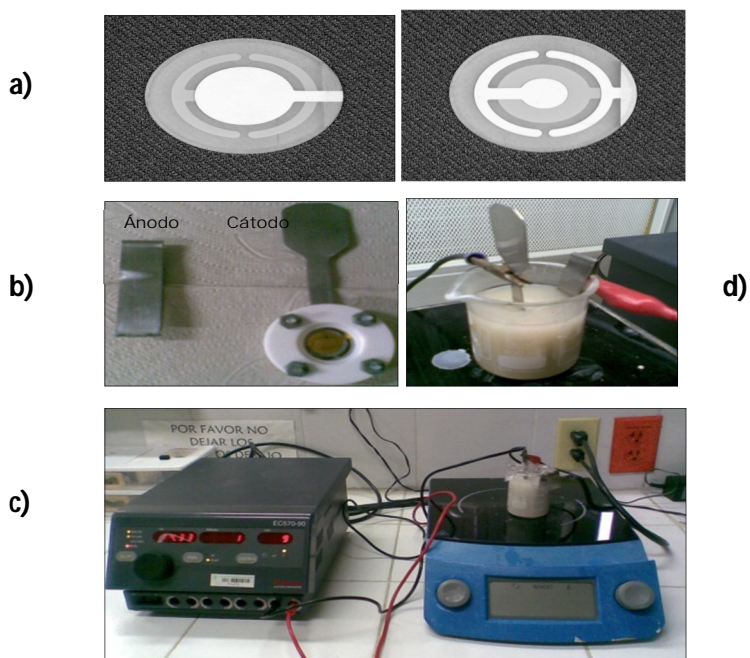
El quitosano como componente de un armazón, influye en la estabilización de la estructura entre los elementos apatíticos bioactivos, los polímeros y las células. Por otra parte la señalización celular se favorece por su similitud con los proteoglicanos y glucosaminoglicanos presentes en la MEC natural, además favorece la reacción hidroxílica sobre la superficie del material, promoviendo el aumento del pH local a niveles que aseguran la supervivencia de las células y sus procesos de crecimiento. La elección de quitosano como material de apoyo para la formación de tejido se rige por sus múltiples propiedades biológicas, físicas y químicas como biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad, inercia fisiológica, notable afinidad a las proteínas, antimicrobiana, antibacteriana, hemostática, fungistático, entre otras [7,8].

Cambios de masa, de la capacitancia interfacial y de la impedancia relacionada con la adhesión y crecimiento de células osteoblásticas, fueron evaluados



mediante microbalanza de cristal de cuarzo (MCC) y Espectroscopia de Impedancia Electroquímica.

Se obtuvieron tres muestras del armazón, las cuales fueron fijadas sobre cristales de cuarzo a partir de soluciones de PLA-PLG disueltos en acetona al 15% p/v, HAP al 10% p/v y quitosano al 0, 3 y 7% p/v, durante un tiempo de 5 minutos y bajo la aplicación de un potencial de 3 voltios con un montaje con una Fuente de potencia regulada, donde el cátodo fue el cristal de cuarzo de Au-Cr y una lámina de acero austenítico fue el ánodo. Posteriormente el cristal fue irradiado con luz UV. En la figura 4.1 se muestra el montaje realizado.

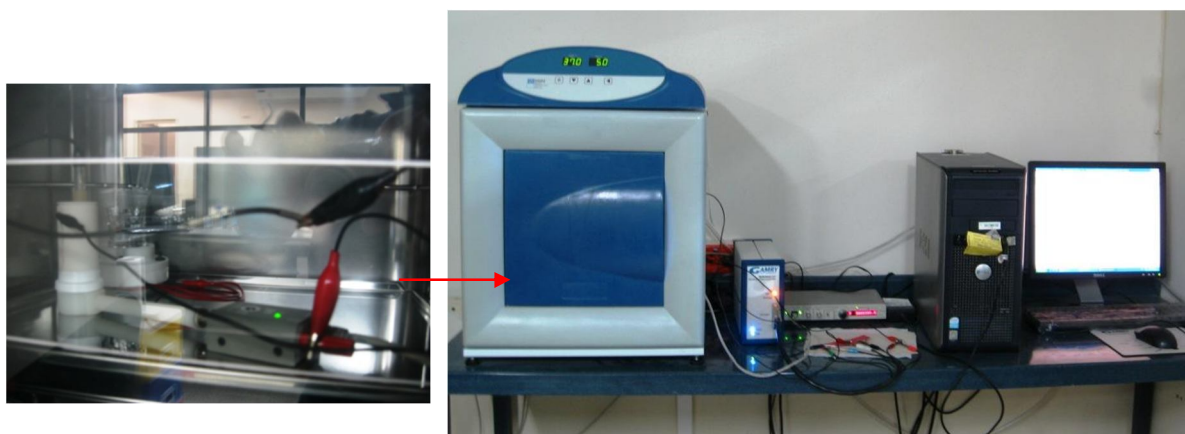


**Figura 4.1.** Montaje para la fijación del armazón sobre los cristales de cuarzo. a) Cristal de cuarzo. b) Ánodo y cátodo. c y d) Montaje.

Este proceso fue llevado a cabo en un ambiente de bioseguridad, dentro de una cámara de flujo laminar, con el fin de mantener la esterilidad. Obtenidos los

electrodos, se realizó un tratamiento térmico en un horno, a 100°C durante 15 minutos, para mejorar la morfología y adhesión del armazón al cristal. Además, mediante este tratamiento se logra mejorar la integración de los componentes de la mezcla y la eliminación del solvente.

Para las mediciones electroquímicas y de microbalanza de cristal de cuarzo, se utilizó una celda plana vertical para tres electrodos de 200 mL, en donde el electrodo de trabajo fue el cristal de cuarzo con el armazón fijado, platino como contra-electrodo y un electrodo de referencia Ag-AgCl. Las mediciones electroquímicas se realizaron usando un potenciostato GAMRY 600 y las mediciones de la MCC se realizaron con una QCM200. Las mediciones de espectroscopia de impedancia se realizaron en un rango de frecuencia de 0.01 a 100000 Hz con una amplitud de la señal de corriente alterna de 10mV. Las mediciones de EIS se realizaron bajo estímulos de potencial de 0V, 50mV y -50mV (valores obtenidos por voltametría cíclica en el material con las células y el medio). En la figura 4.2 se observa el montaje empleado.

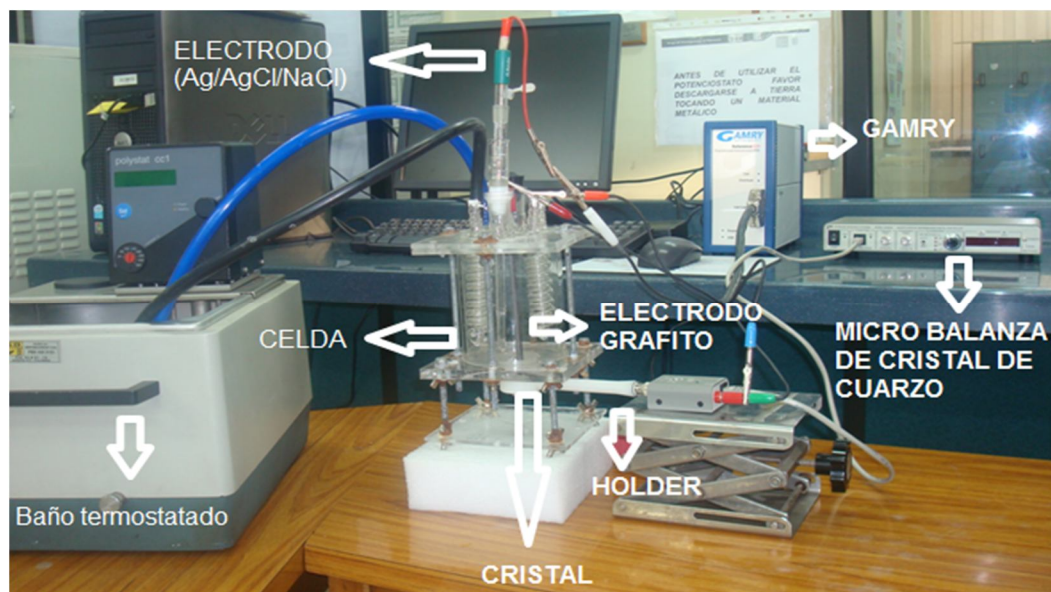


**Figura 4.2.** Montaje empleado en los ensayos de MECC de los armazones y los osteoblastos

Las propiedades eléctricas del sistema heterogéneo células-armazón-medio fisiológico fueron evaluadas por modelos de circuitos equivalentes propuestos en el software ZVIEW, permitiendo obtener información sobre las siguientes interfases: medio de cultivo RPMI/células osteoblásticas HOS, células osteoblásticas HOS/armazón, armazón/cristal de cuarzo. Con la técnica de microbalanza de cristal de cuarzo fueron medidos los cambios de masa del proceso de adhesión celular sobre la superficie del armazón. Técnicas de microscopía óptica, SEM y AFM, fueron empleadas para evaluar la adhesión celular.

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  $\text{CO}_2$ , 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 Laboratories. Una concentración de osteoblastos entre 15000 y 30000 células por mililitro de medio de cultivo fue usada para las pruebas de adhesión.

Para estudiar la adsorción y crecimiento de monocapas de colágeno mediante activación eléctrica sobre los armazones de PLA-PLH-HAP-quitosano-zinc, se empleó un método que combina técnicas electroquímicas y técnicas de microbalanza de cristal de cuarzo MECC. En la figura 4.3 se muestra el montaje empleado.



**Figura 4.3.** Montaje de pruebas por MECC para la determinación de la capacitancia interfacial.

Concentraciones del colágeno de 12,5, 20 y 27,5  $\mu\text{g/ml}$  de PBS fueron usadas. El voltaje aplicado para la electroactivación fue de -0,37, 0 y 0,56 Voltios y temperaturas entre 37 y 39,5 $^{\circ}\text{C}$ . La variable de respuesta fue la resistencia a la transferencia de carga. Para mantener la temperatura constante, se empleó un intercambiador de calor conectado a un baño termostático con recirculación de agua.

Para la determinación de los ángulos de contacto en las superficies de los armazones propuestos, se empleó un método que consistió en medir el cambio de

frecuencia que acompaña a la introducción de una pequeña gota de líquido en el centro del cristal de cuarzo Au-Cr. La serie de frecuencia de resonancia proporciona una medición directa de los cambios de masa en la superficie de la QCM de acuerdo a la ecuación 4.1 [20].

$$\Delta f = \frac{-2f_0 \Delta m}{A \sqrt{\rho_q \mu_q}} \quad (4.1)$$

Donde  $\Delta f$  es el cambio de frecuencia medido,  $f_0$  la frecuencia inicial de resonancia del cristal de cuarzo,  $\Delta m$  la variación de la masa,  $A$  el área activa piezoeléctrica definida por dos electrodos de oro de excitación,  $\rho_q$  la densidad de cuarzo ( $2,648 \text{ g cm}^{-3}$ ), y  $\mu_q$  el módulo de corte ( $2,947 \text{ 1,011 dinas cm}^{-2}$  para el cuarzo) [21].

El cambio de frecuencia asociado con el área de una gota de líquido en contacto con el resonador puede ser descrito de acuerdo a la ecuación 4.2.

$$\Delta f = \int_0^{2\pi} \int_0^{r_e} S(r, \theta) m(r, \theta) r dr d\theta \quad (4.2)$$

Donde  $S$  es diferencial de sensibilidad ( $df / dm$ ) y  $m(r, \theta)$  representa la parte radial y la distribución masiva angular de la MCC, respecto a la distancia desde el centro del resonador. En el caso de un fluido newtoniano,  $m(r, \theta)$  es descrito por la masa efectiva contenida en un decaimiento de longitud  $\delta$ . El valor de  $\delta$  se determina por la frecuencia de resonancia, la viscosidad y la densidad del líquido.

La dependencia radial del movimiento de cristal ha sido descrita por una función de Bessel modificada [22, 23]. Sin embargo, se ha demostrado que para líquidos

newtonianos la dependencia angular y sensibilidad radial, son descritas adecuadamente por una función Gaussiana (ecuación 4.3).

$$S(r, \theta) = S(r)_e = K \exp\left(-\beta_r^2 / r_e^2\right) \quad (4.3)$$

Donde K representa la máxima sensibilidad en el centro del resonador ( $r = 0$ ),  $\beta$  es una constante que define la sensibilidad de la dependencia en  $r$  y  $r_e$  es el radio del cristal expuesto a la gota [24]. Esta relación indica que la frecuencia de resonancia dependerá del radio de la gota de PBS con colágeno, centrado en el cristal con el armazón fijado en su superficie. A partir de las ecuaciones anteriores y junto a la masa efectiva detectada y el cambio de frecuencia debido a la gota agregada sobre el centro del cristal recubierto, se obtiene una ecuación más generalizada:

$$\Delta F = -(\pi \rho_L \delta \alpha k) r^2 \quad (4.4)$$

Si  $C = \pi \rho_L \delta \alpha k$ , lo anterior se convierte en la ecuación 4.5 [21].

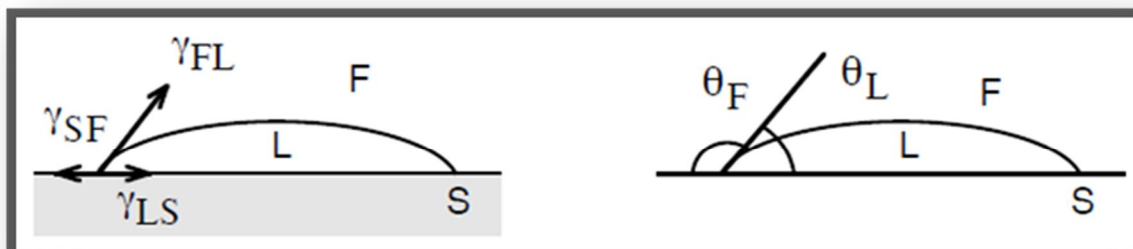
$$\Delta F = -(c) r^2 \quad (4.5)$$

Finalmente, la ecuación 4.6 relaciona el radio de interfase con el ángulo de contacto.

$$r^2 = \frac{\left(3V_d/\pi\right)^{2/3} (1 - (\cos \theta)^2)}{(2 - 3 \cos \theta + (\cos \theta)^3)^{2/3}}, \text{ Donde } V_d \text{ es volumen de gota} \quad (4.6)$$

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

En presencia de tres fases inmiscibles existe una línea de contacto trifásico; a lo largo de esta línea de contacto las tensiones ejercen fuerzas perpendicularmente a la línea de contacto y tangentes a las interfaces correspondientes. El equilibrio se expresa por lo tanto como un balance vectorial en un plano perpendicular a la línea de contacto trifásico (figura 4.4) [25].



**Figura 4.4.** Contacto trifásico sólido-líquido-fluido [25].

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

$$\gamma_{SF} = \gamma_{LS} + \gamma_{FL} * \cos \theta_L \quad (4.7)$$

O bien,

$$\gamma_{SF} + \gamma_{FL} * \cos \theta_F = \gamma_{LS} \quad (4.8)$$

$\theta_L$  es el ángulo de contacto entre el líquido L y el sólido S, el cual se denomina a veces  $\theta_{LS}$ . En cuanto a  $\theta_F$  ó  $\theta_{FS}$  es el ángulo de contacto entre el fluido F y el sólido S. En la relación anterior, la energía libre interfacial por unidad de área entre

las fases L y F corresponde a la tensión superficial o interfacial, y se puede medir por varios métodos. Las dos otras superficies involucran un sólido y por lo tanto no se pueden medir sus tensiones interfaciales, pero se pueden relacionar con el trabajo de adhesión.

El trabajo de adhesión se define como el trabajo para separar una unidad de área de dos fases. En el caso real, al separar una unidad de área entre por ejemplo S y L, se formarán dos nuevas superficies S/F y L/F y el trabajo de adhesión en el cambio estará dado por la ecuación de Dupré [25]:

$$W_{SL} = \gamma_{SF} + \gamma_{LF} - \gamma_{LS} \quad (4.9)$$

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

$$W_{SL} = \gamma_{FL} * (1 + \cos\theta_L) \quad (4.10)$$

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

$$W_{LL} = 2\gamma_{LF} \quad (4.11)$$

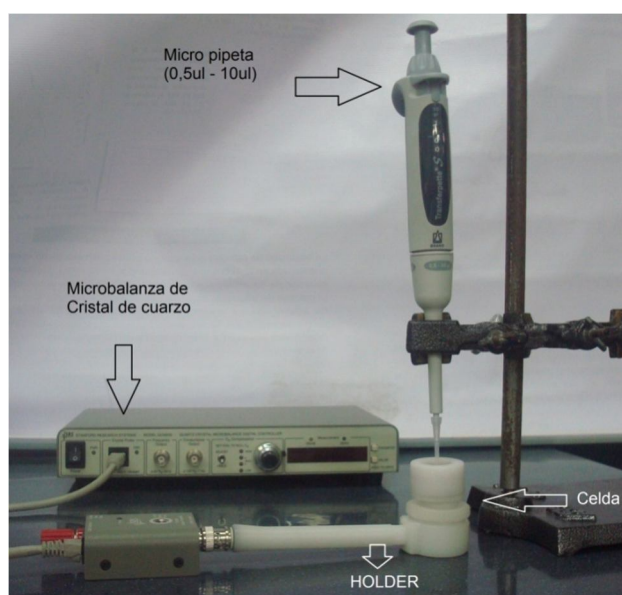
$$W_{SS} = 2\gamma_{SF} \quad (4.12)$$

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



$$S = WSL - WLL = \gamma_{SF} - \gamma_{LS} - \gamma_{LF} \quad (4.13)$$

Para estos ensayos, se diseñó una celda cilíndrica de teflón con rosca interna su parte superior translúcida y orificio circular concéntrico a su base, (figura 4.5), para insertar una micropipeta alineada perpendicularmente al centro del cristal con una distancia fija, para minimizar la contribución longitudinal de las ondas estáticas y electro estáticas.



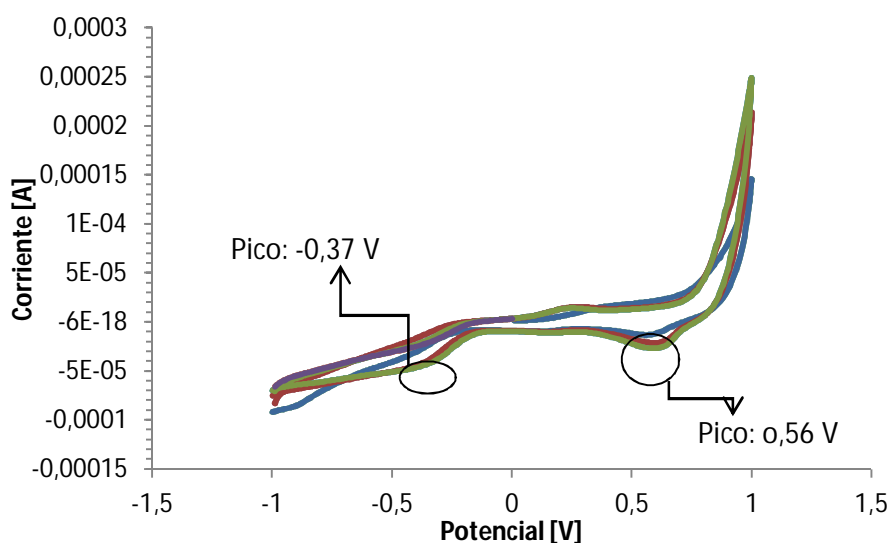
**Figura 4.5.** Montaje MCC para la determinación de ángulos de contacto.

Para la determinación del ángulo de contacto se agregó una gota de 10  $\mu$ l de PBS con colágeno en el centro de la superficie del cristal recubierto con las combinaciones de PLG-PLA mezclado con HAP y quitosano, mediante la utilización de una micro pipeta de 0,5-10  $\mu$ l cuya sensibilidad fue de +/- 0.5  $\mu$ l, mientras con la MCC, se registraron los cambios de frecuencia producidos por el contacto de la gota con la superficie del recubrimiento.

### 4.3. Resultados y análisis

#### 4.3.1 adsorción electroactiva de colágeno sobre PLAG-quitosano-HAP-zinc

En la figura 4.6 se muestra el voltagrama obtenido del sistema colágeno en PBS-PLA-PLG-HAP-quitosano



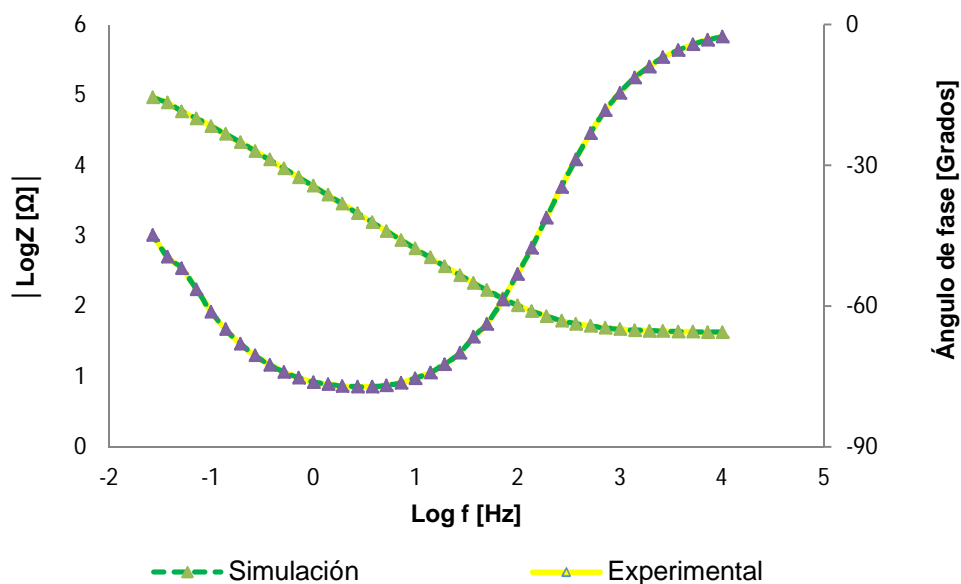
**Figura 4.6.** Voltagrama del sistema PBS-colágeno-PLAG-biocerámico-qo

Se observan dos picos principales en reducción, uno catódico a -0,37 voltios y uno anódico de 0,56 voltios. El pico catódico está asociado a la reacción de hidroxilación del material y el anódico a la reducción de compuestos de fosfatos en el material.

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

Los espectros de EIE, mostraron una constante de tiempo a altas frecuencias y otra a baja frecuencias. Con la presencia de estas dos constantes y con el uso de

elementos de fase constante (CPE) en lugar de capacitores puros, se realizó el ajuste de los datos usando el software Z view 3.2. Un espectro característico se muestra en la figura 4.7. El circuito eléctrico equivalente, ajustado a estos espectros correspondió a a dos circuitos RC en paralelo y en serie con la resistencia de la solución líquida.



**Figura 4.7.** Espectro de Bode del ensayo de adsorción de colágeno 27.5 µg/ml, 37°C, 0 V y su simulación, línea punteada y línea continua respectivamente.

Siendo la resistencia a la transferencia de carga inversamente proporcional a la masa adsorbida específica en la superficie del electrodo [28] [29] [30], la adsorción de colágeno puede ser descrita con la ecuación (14 y 15) de Langmuir, la cual expresa la relación entre la concentración de proteína de colágeno  $c$ , y la cantidad de material adsorbido en la superficie [28-31].

$$\frac{c}{(R_{ct})^{-1}} = \frac{1}{(R_{ct})^{-1}_{m\acute{a}x}} + \frac{c}{(R_{ct})^{-1}_{m\acute{a}x} B_{ADS}} \quad (4.14)$$

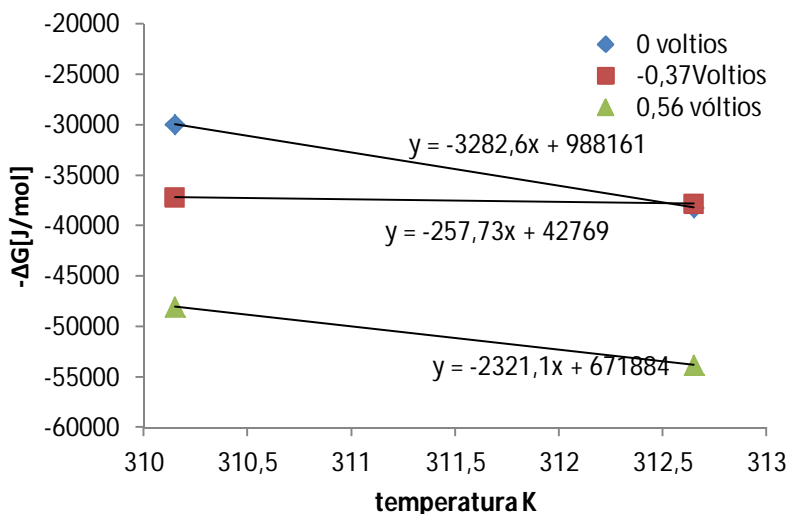
$$\frac{c}{\Gamma} = \frac{1}{\Gamma_{m\acute{a}x} * B_{ADS}} + \frac{c}{\Gamma_{m\acute{a}x}} \quad (4.15)$$

Donde  $B_{ADS}$  es el coeficiente de adsorción y  $\Gamma_{m\acute{a}x}$  representa la máxima cantidad de material que se puede adsorber en la superficie. Estos valores se obtuvieron del intercepto y la pendiente de la curva de  $c/\Gamma$  contra  $c$ , respectivamente. El  $B_{ADS}$  está relacionado con la afinidad de la proteína de colágeno a ser adsorbida en la superficie del electrodo a una temperatura dada. Por lo tanto se puede obtener la energía libre de adsorción como [31]:

$$\Delta G = -RT \ln(MB_{ADS}) \quad (4.16)$$

Donde  $M$  es la concentración molar del colágeno en la solución acuosa de PBS.

En la figura 4.8 se muestra la dependencia de la energía libre de Gibbs con la temperatura a los diferentes potenciales de polarización.



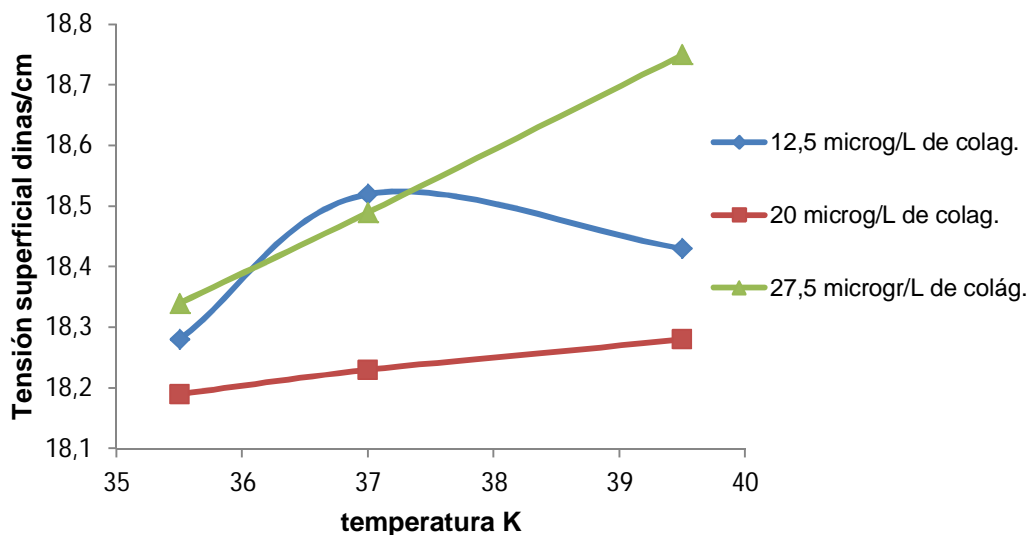
**Figura 4.8.** Cambio de  $\Delta G_{ads}$  Vs  $T$  ( $^{\circ}k$ ) obtenido a partir de ensayos de EIE con los diferentes sobrepotenciales de polarización sobre el armazón de PLA-PLG-HAP-qo

Los cambios de la energía libre de Gibbs indican que la adsorción de la proteína de colágeno en recubrimientos de PLA-PLG-Biocerámico-Quitósano, es un proceso espontáneo para todas las condiciones de ensayo.

La entropía y la entalpía, son obtenidas a partir de la pendiente y el punto de corte de la gráfica  $\Delta G$  vs  $T$ . La variación de la Entalpía muestra que este es un proceso endotérmico, resultado del exceso energético requerido para el rompimiento de interacciones intramoleculares implicados en la interacción colágeno-armazón [32].

De acuerdo a los resultados obtenidos, con un potencial más catódico se obtiene una mejor respuesta en  $1/R_{tc}$ , lo cual implica una fuerte incidencia en el grado de hidroxilación de la superficie, para que ocurra la adsorción.

Por medio de un microscopio interferométrico a las condiciones 20 $\mu$ l/ml y 35,5 °C, se determinó un ángulo de contacto de 92° al sistema gota de PBS con colágeno-superficie del armazón de PLA-PLG-HAP-quitósano, hallándose el radio de interface con el cual se calculó la constante de sensibilidad C con un valor de  $\approx 24269,32$  Hz\*cm<sup>2</sup>. Con la constante C, se hallaron los valores del radio de interface y ángulo de contacto para las demás combinaciones. Los resultados obtenidos para cada temperatura, se muestran en la figura 4.9.



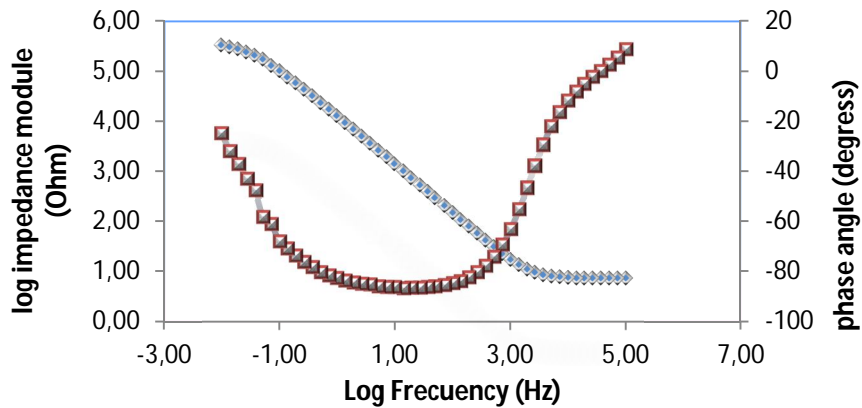
**Figura 4.9.** Gráfica de la tensión superficial obtenida para cada concentración de colágeno en SBF, en contacto con la superficie del armazón PLA-PLG-HAP-qo

La hidrofiliidad de la superficie del armazón de PLA-PLG-HAP-qo, ha sido determinada mediante mediciones de la tensión superficial. los cambios de temperatura se relacionan con la susceptibilidad a presentar pequeñas variaciones en esta propiedad ante cambios energéticos. Algunos autores sugieren que superficies con tensión superficial mayor que 30 dinas/cm, son hidrofílicas y menores a este valor, son hidrofóbicas, sin embargo se ha demostrado que debe haber un equilibrio entre la hidrofiliidad y la hidrofobicidad, superficies muy hidrofóbicas pueden favorecer la adsorción de proteínas termodinámicamente, pero puede inducir a la desnaturalización de la proteína. A la vez, una superficie muy hidrofóbica, puede rechazar las proteínas e inhibir la adsorción. Esto ha sugerido que materiales con menos de 30 dinas/cm presentan mejor adhesión que materiales más hidrofóbicos [41].

De acuerdo a esto, los resultados obtenidos son satisfactorios por dos razones: incrementos energéticos, como el cambio de temperatura, incrementan la tensión superficial en un rango pequeño, aumentando el grado hidrofílico de la superficie, además se presentó que modificando la superficie con una cantidad de colágeno, aproximadamente de 27,5 microgramos/L, es posible incrementar el carácter hidrofílico de la superficie. Estos incrementos pueden favorecer la interacción con otras moléculas diferentes a las proteínas sin llevar a la desnaturalización de estas. También es importante resaltar que la superficie del armazón ensayado presenta una buena afinidad por la proteína de colágeno. Una conformación natural de este tipo de proteína sobre la superficie del armazón, es un prerrequisito para su bioactividad ya que refleja la capacidad a permitir formar matriz extracelular a partir del intercambio iónico con las células.

#### **4.3.2 Adhesión de células osteoblásticas sobre armazones de PLGA-HAP-qo-zinc bajo polarización eléctrica.**

Los espectros de bode y Nyquist obtenidos mediante ensayos electroquímicos de adhesión de células HOS sobre los armazones de PLA-PLG-quitosano-hidroxiapatita-zinc, fueron ajustados a modelos de circuitos equivalentes propuestos utilizando el software Zview 32. El error obtenido de estos ajustes en términos de  $\chi^2$ , fue menor de  $10^{-4}$  entre los datos experimentales y los datos simulados, lo cual fue considerado aceptable en términos estadísticos. En la figura 4.10 se muestra un caso típico de los espectros de Bode obtenidos y sus respectivos ajustes.



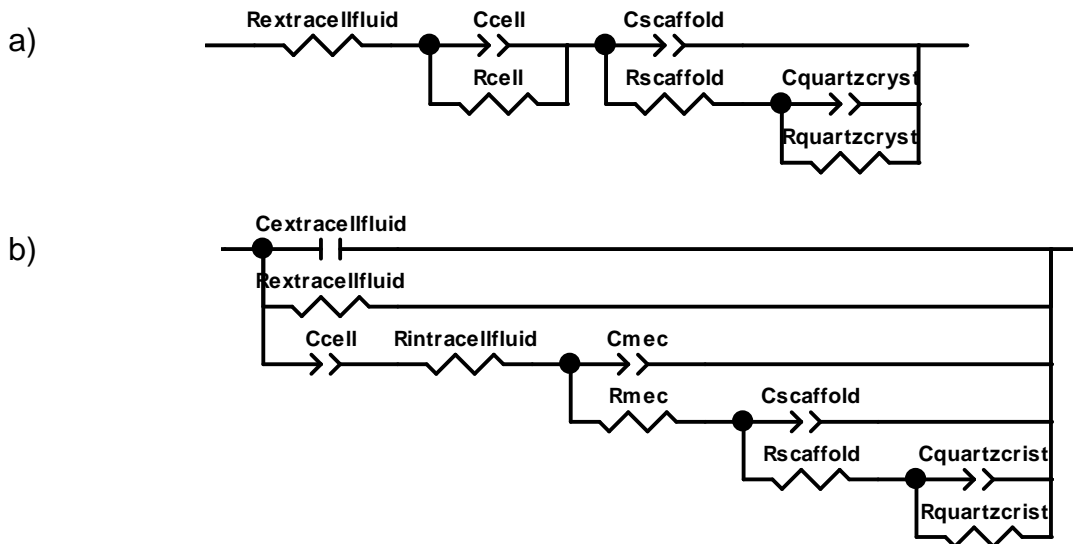
**Figura 4.10.** Típico espectro de Bode obtenido del sistema electroquímico células-armazón-ambiente fisiológico y ajuste a partir de un modelo de circuito equivalente.

Para representar los procesos de electrodo medidos en la doble capa electroquímica entre el armazón, el medio fisiológico y las células, se han propuesto modelos de circuito equivalente con dos variaciones fundamentales según el ajuste al espectro obtenido en cada caso y según el nivel de adhesión celular a la superficie del armazón.

En la figura 4.11 se muestran los modelos que se ajustaron a los diferentes comportamientos de las células en los armazones, en los cuales se ha asumido dos procesos de electrodo fijos que suceden entre el cristal de cuarzo y el armazón y entre las células y el armazón. Estas interfaces se han representado mediante constantes de relajación de la transferencia de carga, relacionadas por una capacitancia y una resistencia. Las relajaciones de transferencia de los dos procesos de electrodos descritos anteriormente, se relacionan mediante un circuito en paralelo, debido a la similitud en las constantes conductivas (intercambio iónico), mostrada en la superposición de estos en los respectivos espectros. Esta



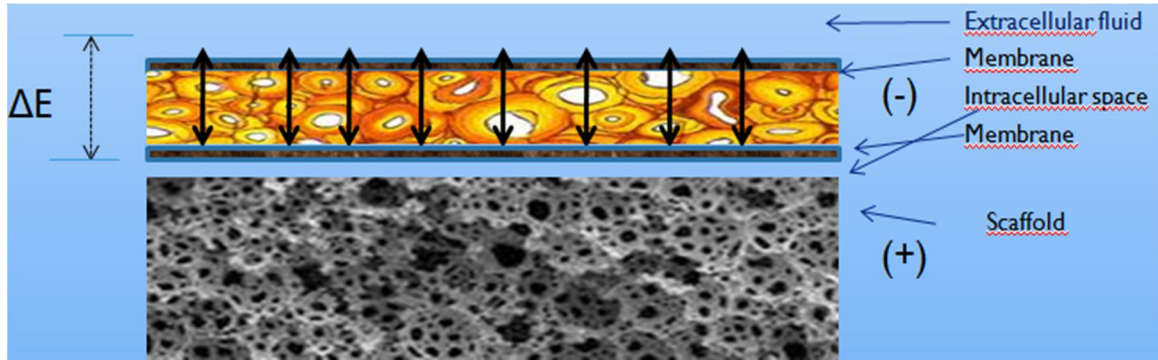
configuración se relaciona con una resistencia en serie que representa la caída óhmica u oposición a la transferencia de carga del electrolito o medio celular.



**Figura 4.11.** Modelos de circuitos equivalentes que representan los procesos para: a) sin adhesión celular, b) con adhesión celular y formación de matriz extracelular MEC

El primer modelo (a), representa una situación en donde las células no se desarrollan sobre la superficie del armazón, en el cual, un tiempo de relajación relacionado con las células, está en serie con dos relajaciones en paralelo relacionadas con la interacción entre el armazón, el medio fisiológico y el cristal de cuarzo. El segundo modelo (b), corresponde a la situación en la cual las células presentan una adhesión al sustrato del armazón en adición a la formación de matriz extracelular MEC producida por el intercambio iónico desde el armazón hasta el medio fisiológico a través de las células. En la figura 4.12 se presenta un esquema gráfico donde se muestra el mecanismo de adhesión celular al armazón.

En el segundo modelo se representa un solapamiento de las constantes de relajación, mostrando una total asociación del sistema.

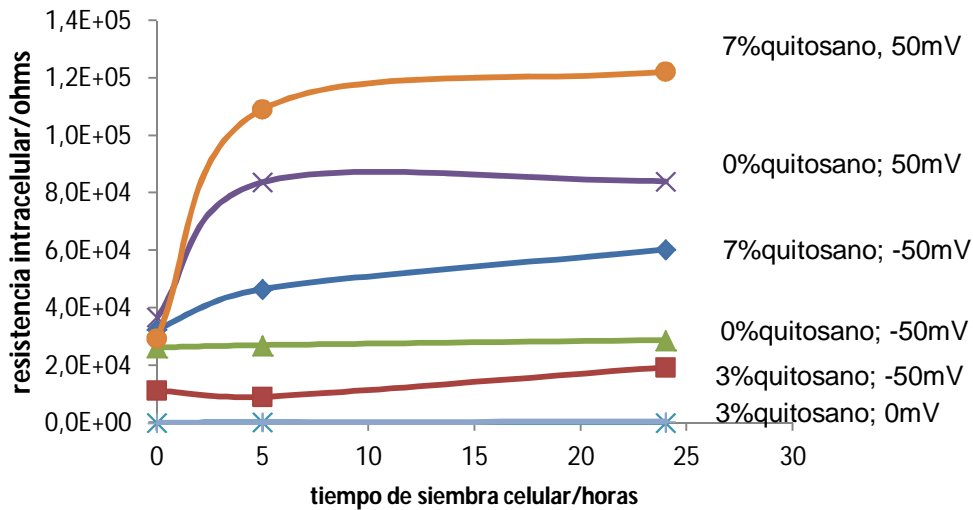


**Figura 4.12.** Mecanismo de adhesión celular al armazón de regeneración.

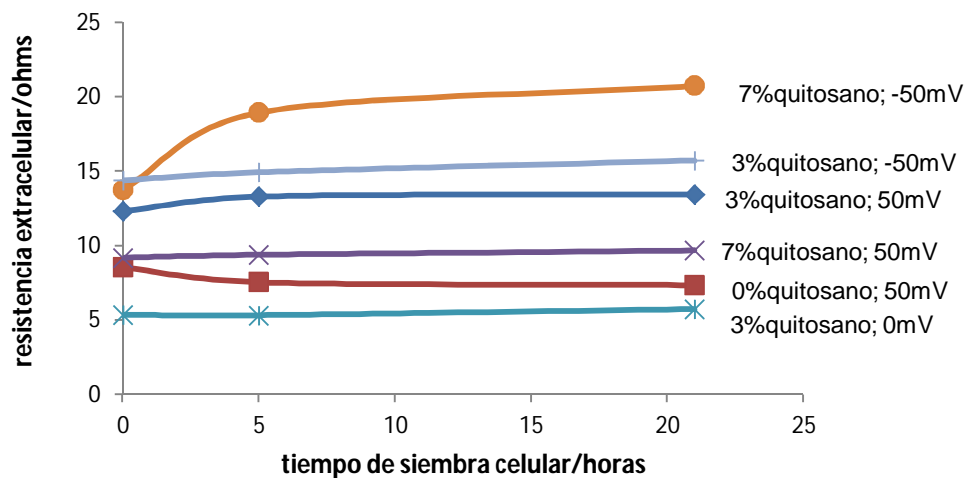
Este modelo permite representar las diferentes variaciones de los elementos resistivos relacionados con la efectividad de la adhesión celular sobre la superficie del armazón bajo un gradiente de polarización, cuyo principal argumento se ha basado en un acertado ajuste del comportamiento electroquímico del sistema polarizado.

El fluido extracelular en contacto con las células y el armazón son representados por una capacitancia y una resistencia en paralelo. Un incremento en esta resistencia, equivale a una evolución celular satisfactoria. La capacitancia de la célula, corresponde a la evolución de la membrana endo-plasmática. La resistencia del fluido intracelular representa los procesos de transformación, adhesión y rompimiento dendrítico-celular, además de un incremento en el transporte iónico a través de la membrana celular. Un menor valor de esta resistencia indica una evolución positiva de la adhesión celular sobre el armazón.

La figura 4.13 y 4.14 muestran el efecto del porcentaje de quitosano y del sobrepotencial de polarización respecto a las variaciones de la resistencia intracelular y resistencia extracelular con el tiempo, respectivamente.



**Figura 4.13.** Cambios de la Resistencia intracelular con el tiempo, respecto a la concentración de quitosano y del potencial de polarización.



**Figura 4.14.** Cambios de la Resistencia extracelular con el tiempo, respecto a la concentración de quitosano y del potencial de polarización.

Se han detectado campos eléctricos en la sanación de heridas y tejidos dañados. El papel que desempeña un campo eléctrico en la reparación o regeneración de tejidos, continúa siendo un tema intrigante hasta el día de hoy. Es de suponer que un campo eléctrico aplicado equivalente en magnitud a un campo eléctrico medido en un proceso de regeneración celular en vivo o de recuperación de tejido, activa

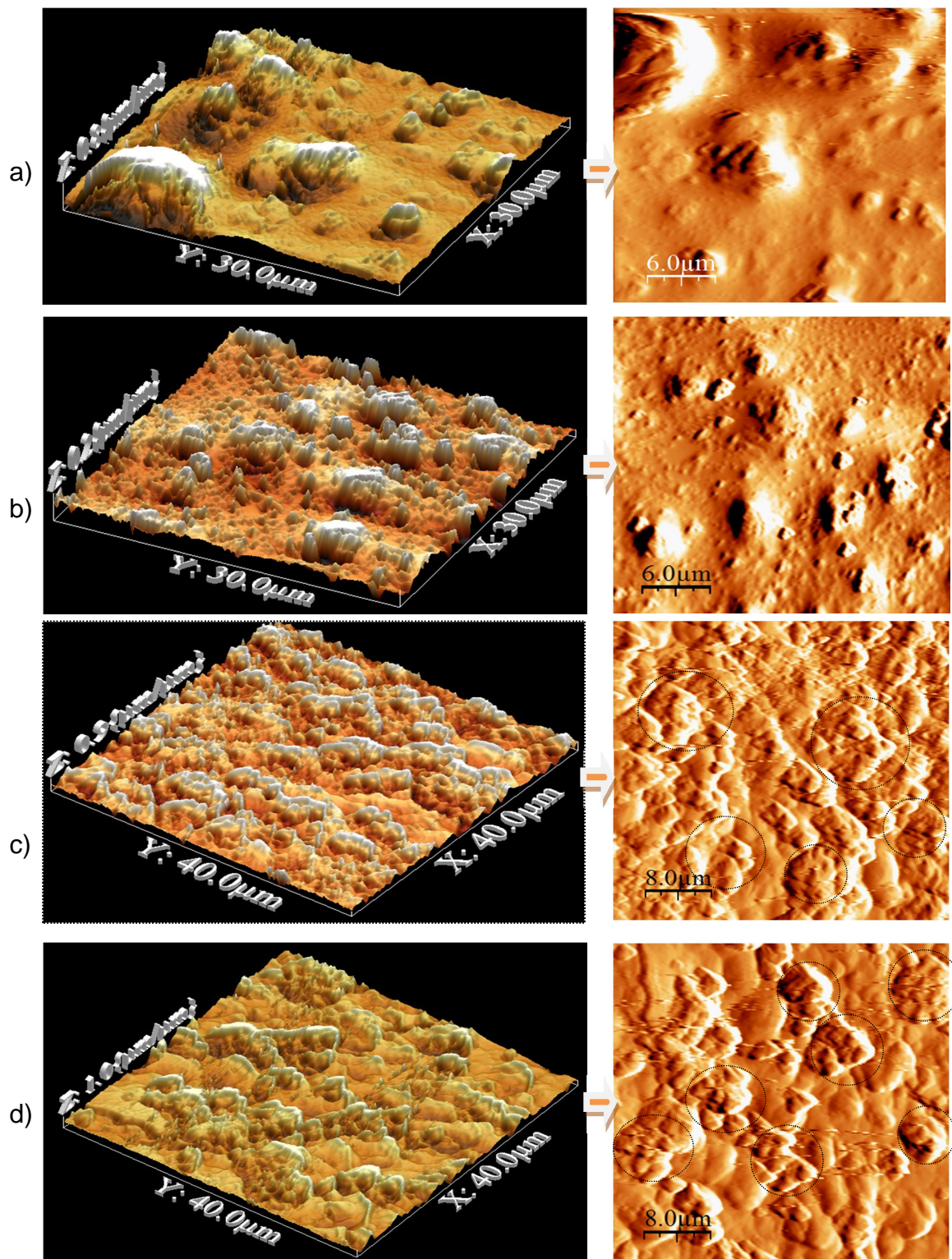
muchas vías de señalización intracelular, posiblemente en una forma direccional o patronada. En el caso de células osteoblásticas [47-48].

La medición de la resistencia intracelular es una propiedad de la célula que indica que la interfase celular se divide y la membrana endoplasmática se rompe permitiendo el paso del fluido extracelular hacia el interior, aumentando la transferencia de carga eléctrica por el paso de los minerales del fluido hacia el interior de las células. Bajo estos conceptos, se ha observado que la variable sobrepotencial eléctrico, tuvo una mayor influencia sobre el valor de resistencia intracelular, comparado con la variable de concentración de quitosano. Valores de sobrepotencial negativos, presentaron una menor resistencia intracelular, lo cual puede indicar que se presenta una mayor proliferación y adhesión celular. Sin embargo es de considerar que valores muy bajos de Resistencia intracelular (resultados del armazón con 3% de quitosano sin polarización), puede indicar isquemia o muerte celular.

El efecto sinérgico entre el potencial de polarización y el porcentaje de quitosano, puede ser mejor analizado de los resultados de resistencia del fluido extracelular. En la figura 4.14 se observa que a sobrepotenciales más negativos, se presentan los mayores valores de resistencia. Valores por debajo de 10 ohmios, podrían considerarse indicadores de isquemia celular. En cuanto a la concentración de quitosano, se observa que a menor concentración de quitosano, las células presentaron una mayor rigidez dieléctrica, lo cual equivale a una menor evolución celular en adhesión y división celular [47].

El microscopio de fuerza atómica permite evaluar la adhesión celular a materiales a partir de la visualización morfológica. Se ha referenciado que la forma que adquiere las células sobre la superficie de un implante, permite dar una fuerte indicación de la calidad de la adhesión. Células en estado aplanado está directamente asociado con una buena adhesión [49]. En la figura 4.15 se muestran imágenes tomadas por AFM en las superficies de los armazones de PLA-PLG-HAP-quitosano3% y PLA-PLG-HAP-quitosano 7% a una concentración celular de 30000 cel/mL y un tiempo de incubación de 120 horas, con polarización de -50mV de sobrepotencial contra el electrodo de referencia.

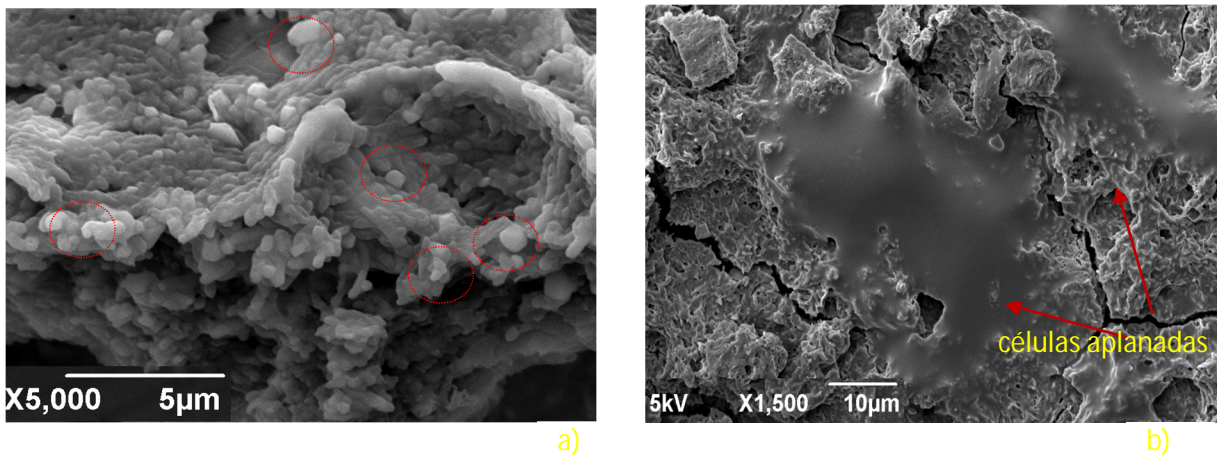
Los círculos muestran la localización o confluencia de las células HOS sobre la superficie de los armazones. Las rugosidades encontradas fueron en promedio de 0,8566 para el armazón de PLA-PLG-HAP, de 0,4212 para el armazón de PLA-PLG-HAP-3% quitosano, 0,6320 para el armazón de PLA-PLG-HAP-3% quitosano-células HOS con polarización de -50mV y de 0,2936 para el armazón de PLA-PLG-HAP-7% quitosano-células HOS con polarización de -50mV. Mediante este método se ha comprobado que el armazón con 7% de quitosano con células y polarizado con un sobrepotencial de -50mV, presentó la mejor adhesión, corroborando los resultados obtenidos a partir del análisis de los modelos electroquímicos propuestos.



**Figura 4.15.** Imágenes escaneadas por AFM: a) PLA-PLG-HAP, b) PLA-PLG-quitosano-HAP 3% c) PLA-PLG-quitosano-HAP-HOS 3% polarización a -50mV, d) PLA-PLG-quitosano-HAP-HOS 7% polarización a -50mV.



Para los análisis por microscopía electrónica de barrido SEM se prepararon discos de vidrio para fijar los armazones por inmersión en soluciones con PLA-PLG-HAP- quitosano disuelto en acetona, posteriormente se evaporó este solvente para proceder a fijar las células con 50  $\mu$ L de metanol, el cual se dejó secar a  $-4^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Seguidamente, se lavaron las muestras con PBS repitiendo 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 ( $\text{CO}_2$ ,  $31.1^{\circ}\text{C}$  y 1072 psi). En la figura 4.16 se muestran las imágenes de SEM del armazón de PLA-PLG-HAP-3% de quitosano, sin células y con células, polarizado con un sobrepotencial de  $-50\text{mV}$ .



**Figura 4.16.** SEM del armazón de PLA-PLG -HAP-3% of quitosano, sin células a 5.000X y con células polarizadas con sobrepotencial de  $-50\text{mV}$  a 1.500X.

El armazón de PLA-PLG-HAP-quitosano presentó una estructura con una porosidad interconectada y una topografía irregular, característica de este tipo de materiales empleados para regeneración celular, donde estas propiedades superficiales son esenciales para generar adhesión y proliferación celular. La

figura 4.16a muestra el almac3n sin c3lulas con la presencia particular de hidroxiapatita (c3rculos) en la superficie, lo cual mejora la adhesi3n celular. En la figura 4.16b se muestra la superficie del almac3n despu3s de un tiempo de siembra de 24 horas, con c3lulas aplanadas y alargadas con extensiones dendr3ticas, caracter3sticas de las c3lulas proliferadas.

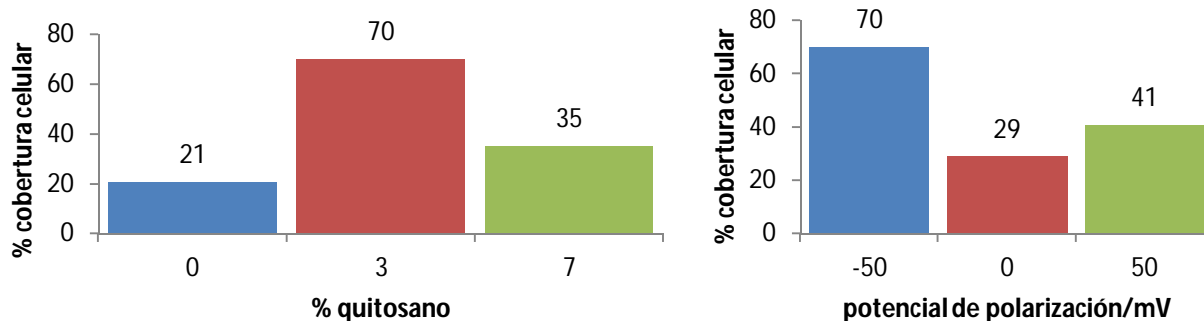
La resistencia mec-material, representa la interfase formada a partir de los iones del medio reaccionando con la fase mineral del material y su superficie. Valores de -50mV de polarizaci3n y 3% de quitosano en el material, mostraron los m3s altos valores de  $R_{mec-material}$ , lo cual concuerda con el an3lisis realizado anteriormente y concuerda con la selecci3n del potencial cat3dico en la adsorci3n de prote3nas sin c3lulas.

El inverso a la resistencia a la transferencia de carga  $R_{tc}$  representa la masa adherida por unidad de 3rea. Por lo tanto, la adhesi3n celular se puede representar por el porcentaje de cobertura, el cual relaciona la resistencia a la transferencia de carga del cristal con el almac3n sin las c3lulas y la resistencia a la transferencia de carga del cristal con el almac3n con las c3lulas, representada en la ecuaci3n 4.17 [23, 24].

$$1 - \theta = \frac{R_{tc_0}}{R_{tc_{C3lulas-Material}}} \quad (4.17)$$

Donde  $\theta$  representa la cobertura de las c3lulas sobre el material. En la figura 4.17 se muestra la adhesi3n en t3rminos de la cobertura para los diferentes recubrimientos, a -50 mV y a 3% de quitosano.





**Figura 4.17.** Cobertura de las células HOS sobre el armazón de PLA-PLG-HAP-quitosano

Se observa que a 3% de quitosano y aplicando un potencial catódico de -50Mv, se presentó una cobertura celular de aproximadamente 70%. Aplicando una polarización anódica de 50 mV, la cobertura celular disminuye aproximadamente a la mitad y a casi una tercera parte si no se aplica polarización, comprobando de esta forma, un aumento en la adhesión celular de más de un 200%, al aplicar polarización al sistema.

#### 4. 4. Conclusiones de este capítulo

Un método para incrementar la adhesión celular en armazones poliméricos se ha evaluado. Un armazón de ácido poliláctico, ácido poliglicólico con adiciones de elementos bioactivos de quitosano (q), biocerámico (bc) y zinc ha sido sometido a experimentos de siembra celular bajo la aplicación de un sobrepotencial. Se ha encontrado que un potencial catódico aplicado sobre este sistema produce una variación en la hidrofiliidad superficial e incrementa el intercambio iónico intracelular.

El carácter catiónico adquirido por la adición de zinc a los armazones y por la naturaleza catiónica de los grupos aminos del quitosano en el armazón, no fueron los efectos predominantes en el incremento en la adhesión celular en estos experimentos. Sin embargo, una mayor cantidad de quitosano en el armazón propuesto promueve una mayor adhesión celular, lo cual es posible por la capacidad del quitosano de modular el pH ácido, producido por la degradación del polímero y la reabsorción del biocerámico a pH más básico.

Se obtuvieron mayores ángulos de contacto más hidrofílicos a mayor concentración de proteína de colágeno, evidenciando que el armazón presenta una gran capacidad para generar matriz extracelular. De acuerdo a la buena afinidad por la proteína de colágeno presentada, los valores de tensión superficial están en un rango acorde para la configuración superficial de un biomaterial para adhesión y crecimiento celular.

Basado en el análisis estadístico de las pruebas electroquímicas se concluyó que a menor potencial aplicado la cantidad de proteína de colágeno adsorbida es mayor. Esto concuerda con los altos valores encontrados para el inverso de la resistencia a la transferencia de carga  $R_{ct}^{-1}$ , a un potencial aplicado de -0,37 V. Para la adhesión celular polarizada, se encontró un potencial de -50mV, concordando cercanamente con los potenciales para las pruebas con proteína.

Las mediciones de espectroscopía de impedancia electroquímica permitieron establecer que la adsorción de proteína de colágeno en superficies poliméricas de PGA-Biovidrio-quitosano fue descrito por isothermas de Langmuir, en donde del

cálculo de las energías libres de Gibbs de adsorción se concluyó que la proteína de colágeno tiene gran afinidad por la superficie polimérica.

La modificación de los recubrimientos dopados con zinc, de PLA/PLG/HAP, con el aumento de la cantidad de quitosano, presentó un efecto de incremento en el trabajo de adhesión. En este orden de ideas, la interacción hidroxiapatita-quitosano con recubrimientos biodegradables presentó mejores propiedades superficiales de adhesión que la de biovidrio-quitosano.

El comportamiento electroquímico de los recubrimientos observado en los diagramas de Bode y Nyquist son representados satisfactoriamente por medio de un modelo de elementos resistivos obtenido de un circuito equivalente, que representa y ajusta los parámetros obtenidos y las interfases (medio fisiológico/células/matriz extracelular o monocapa proteínica/armazón/Cristal de cuarzo), relacionando la impedancia total del sistema con la cantidad de proteína adsorbida o con la adhesión celular.

## Referencias de este capítulo

- [1]. Segunda conferencia de consenso sobre definiciones en el campo de Biomateriales. Chester (Reino Unido) : s.n., 1991.
- [2]. GUIMARD, NATHALIE K., GOMEZ, NATALIA AND SCHMIDT, CHRISTINE E. Conducting polymers in biomedical engineering. 32, 2007, Progress in Polymer Science, págs. 876-921.
- [3]. BUDDY RATNER, ALLAN HOFFMAN, SHOEN J., LEMONS E. Biomaterials Science, an Introduction to Materials in Medicine. Academic Press. California (1996).
- [4] J., KALITA S. y A., BHARDWAJ A. AND BHATT H. Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering. 2006, Materials Science and Engineering.
- [5]. Stanford Research Systems, Inc. QCM200 Quartz Crystal Microbalance Operation and Service Manual. 2004
- [6]. Impedance spectroscopy theory experiment and applications wiley 2004.
- [7]. GRIFFITH GL. Polymer Biomaterial Acta Mater 2000; 48:263–77.
- HENCH LL. Bioceramics: From concept to clinic. Journal of the American Ceramic Society 1991; 74(7):1487-1510.
- [8]. LUNT J. Large scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. Polym Deg Stab 1998; 59: 145–52
- [9] Ficha 24-33,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  (hydroxylapatite), International Centre for Diffraction Data 1994. □
- [10]. D. F. Williams en The Williams Dictionary of Biomaterials, Ed: D. F. Williams, Liverpool University Press, Liverpool, (1998), p. 318
- [11]. KOKUBO T, KUSHITANI H, SAKKA S, KITSUGI T, YAMAMURO T: Solutions Able to Reproduce In vivo Surface-Structure Changes in Bioactive Glass-Ceramic A-W3. Journal of Biomedical Materials Research 1990; vol 24:721-734.
- [12]. GIL MUR FRANCISCO. Liberación de Fármacos a partir de Recubrimientos Biocerámicos sobre Metales. Monografía: Liberación de Fármacos en Matrices Biocerámicas. Real Academia de Farmacia. España 2000.

- [13], ZISMAN, W. A., Ed. Contact Angles, Wettability and Adhesion; ACS Advances in Chemistry Series 43; American Chemical Society: Washington, DC, 1964.
- [14] WARD, ZUXUAN LIN AND MICHAEL D. Determination of Contact Angles and Surface Tensions with the Quartz Crystal Microbalance.. 1996, Anal. Chem., Vol. 68, págs. 1285-1291.
- [15] B.Z.PEVZNER.S.G.DZHAVUKTSYAN.V.E. MISHEL. Glass Ceramics.29 (1972) 245
- [16] LIN, Z.; HILL, R. M.; DAVIS, H. T.; WARD, M. D. Langmuir 1994, 10, 4060. (b) Lin, Z.; Stoebe, T.; Hill, R. M.; Davis, H. T.; Ward, M. D. Langmuir, in press.
- [17] SCHRADER, M. E., LOEB, G. I., Eds. Modern Approaches to Wettability, Theory and Applications; Plenum Press: New York, 1992
- [18] Adamson, A. W. Physical Chemistry of Surfaces, 1st ed.; Interscience Publishers, Inc.: New York, 1960
- [19] COTTIS, ROBERT; TURGOOSE, STEPHEN; Electrochemical impedance and noise. Nace international 1999, pag: 1-48.
- [20] González Pilar, Parada Diana. Obtención, electrodeposición y caracterización de un polímero bioreabsorbible a partir de ácido L-láctico para aplicaciones biomédicas. Trabajo de pre-grado, Escuela de Ingeniería Química, Universidad Industrial de Santander; Bucaramanga 2007.
- [21] Weast, R. C.; Astle, M. J. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 63rd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1982.
- [22] Davies, J. T.; Rideal, E. K. Interfacial Phenomena, 1st ed.; Academic Press: New York, 1961.
- [23]KOPCEK, J. ULBRICH, K. Biodegradation of biomedical polymers, Progress in polymer science 9:1-58
- [24]. M.S. Cortizo, D.O. Larsen, H. Bianchetto, J.L. Alessandrini. "Effect of the thermal degradation of SBS copolymers during the ageing of modified asphalt". Polymer Degradation and Stability, 86(2), 275-282 (2004).

- [25] LUNT J, SHAFER A L. Polylactic acid polymers from corn: applications in the textiles industry. *J Ind Text* 2000; 29: 191–205
- [26] ML Williams, RF Lander, JD Ferry. *J. Am. Chem. Soc.* (1955); 77, 3701-3707.
- [27] Nakabayashi N, Kojima D, Masuhara E. 1982. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrate. *J Biomed Mater Res*; 16: 265.
- [28] YOSHITO IKADA. *Tissue Engineering, Fundamentals and Applications*. Yoshitokada. ELSEVIER 2006.
- [29] HARDINGHAM T.; TEW S. and MURDOCH A. Tissue engineering: hondrocytes and cartilage. *Arthritis Res* 2002; 4 (Suppl 3):S63-S68.
- [30] COUCEIRO OTERO JOSÉ. Bioadhesividad celular sobre superficies de armazones o matrices tisulares.
- [31] FALKE G. F. Y ATALA A. Reconstrucción de Tejidos y Órganos Utilizando Ingeniería Tisular. *Arch Argent Pediatric* 2000; 98(2). P .103-105.
- [32] SILVERA LUZ ALBA. BARRIOS CARMEN. La Matriz Extracelular: El ecosistema de la Célula. “*Revista Salud Uninorte*”.16-9-18.2006.
- [33] ALBERTS, B.BRAY, D. Cell adhesión, Cell Junctions and the Extracelular Matriz. “*In molecular Biology of Cell*, 2 ed: p.791-836.
- [34] ELENA D. Utilización de Adsorbentes Basados En Quitosano y Aliganato Sódico. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. Enero 2007.V8 (1).p. 21-23.
- [35] IN-YONG KIM, SEOG-JIN SEO, HYUN-SEUK MOON, MI-KYONG YOO, IN-YOUNG PARK, BOM-CHOL KIM, CHONG-SU CHO. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances* 26 (2008) 1–21.
- [36] ROBERT M. MCALLISTER M, D, MURRAY B. GARDNER M, D. ARTHUR GREENE, DSc , CAROL B RADT, BS, WARREN W .N ICHOS M, D, PHD, AND BENJAMIN H. LANDIN MGD. Cijltivation in vitro of cells derived from a human osteosarcoma *Cancer*, Volume 27, Issue 2, Article first published online: 27 JUN 2006
- [37] K. ANSELME, “Review: Osteoblast adhesion on biomaterials”, *Biomaterials* 21 (2000) 667-681.

- [38] MESENGUER L. BERNABÉU A. Aislamiento y Cultivo de Células Osteoblasticas: Interés Para la Investigación en Cirugía Ortopédica y Traumatología. *Rev Esp Cir Osteoart* 1994. P. 235-234
- [39]. LUNT J. Large scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. *PolymDeg Stab* 1998; 59: 145–52
- [40]. GRIFFITH GL. *Polymer Biomaterial Acta Mater* 2000; 48:263–77. HENCH LL. Bioceramics: From concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society* 1991; 74(7):1487-1510.
- [41]. BUDDY RATNER, ALLAN HOFFMAN, SHOEN J., LEMONS E. *Biomaterials Science, an Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press. California (1996).
- [42] RUIZ M MARÍN, BELARRA ARENAS C. Synthetic Polylactic and polyglycolic acid effects in bone regenerations.
- [43] HEUNGSOO SHIN. Fabrication methods of an engineered microenvironment for analysis of cell–biomaterial interactions. *Biomaterials* 28 (2007) 126–133.
- [44] K. TAKAHASHI, I. TANIGUCHI, M. MIYAMOTO, Y. KIMURA. Melt/solid polycondensation of glycolic acid to obtain high-molecular-weight poly(glycolic acid). *Journal of Polymer* 41 ( 2000) 8725-8728.
- [45] T. ANEE KURIAKOSE, S. NARAYANA KALKURA, M. PALANICHAMI, D. ARIVUOLI, KARSTEN DIERKS, G. BOCELLI, C. BETZEL. Synthesis of stoichiometric nano crystalline hidroxyapatite by ethanol-based sol-gel technique at low temperature. *Journal of Crystal Growth* 263 (2004) 517-523.
- [46] SARAH E. PETRICCA, KACEY G. MARRA, PRASHANT N. KUMTA. Chemical synthesis of poly (lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite composites for orthopaedic applications. *Acta Biomaterialia* 2 (2006) 277-286.
- [47] ZHENG GUI TANG, JOHN ALAN HUNT. The effect of PLGA doping of polycaprolactone films on the control of osteoblast adhesion and proliferation in vitro. *Biomaterials* 27 (2006) 4409–4418.
- [48] X.H. WANG, D.P. LI, W.J. WANG, Q.L. FENG, F.Z. CUI, Y.X. XU, X.H. SONG. Cocalent immobilization of chitosan and heparin on PLGA surface. *International Journal of Biological Macromolecules* 33 (2003) 95-100.

- [49] KERRY J. GILMORE, MAGDALENA KITA, YAO HAN, AMY GELMI, MICHAEL J. HIGGINS, SIMON E. MOULTON, GRAEME M. CLARK, ROBERT KAPSA, GORDON G. WALLACE. Skeletal muscle cell proliferation and differentiation on polypyrrole substrates doped with extracellular matrix components. *Biomaterials* 30 (2009) 5292–5304.
- [50] C. RIBAUT, K. REYBIER, B. TORBIERO, J. LAUNAY, A. VALENTIN, O. REYNES, P.-L. FABRE, F. NEPVEU. Strategy of red blood cells immobilisation onto a gold electrode: Characterization by electrochemical impedance spectroscopy and quartz crystal microbalance. *ITBM-RBM* 29 (2008) 141–148.
- [51] JUAN MENDOZA FLOREZ, RUBEN DURAN ROMERO, JOAN GENESCA LLONGUERAS; Espectroscopia de impedancia electrónica electroquímica en corrosión.
- [52] CHERYL R. BLANCHAR; *Atomic Force Microscopy*; VOL 1; ISSN 1430-4171; 1996
- [53] GALLOWAY GROUP; *Atomic Force Microscopy, A Guide to Understanding and using the AFM*; 2004
- [54] C. Ribaut a, K. Reybier, Strategy of red blood cells immobilisation onto a gold electrode: Characterization by electrochemical impedance spectroscopy and quartz crystal microbalance, *ITBM-RBM* 29 (2008) 141–148



## 5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

Siendo la hidroxiapatita y el quitosano similares en constitución química a la mayoría de componentes orgánicos e inorgánicos del hueso, se convierten en excelentes candidatos para mejorar la osteoconductividad y reconocimiento celular en un armazón composite. Un armazón de PLA-PLG-HAP-quitosano permite el crecimiento de tejido óseo tal como se ha demostrado en este trabajo. La biodegradabilidad del armazón propuesto se refleja en una configuración estructural de poros interconectados y una topografía irregular, favoreciendo la proliferación y adhesión, permitiendo soportar el crecimiento tridimensional celular.

Una alternativa eficiente para promover la osteogénesis y el sanado de fracturas de hueso es la estimulación eléctrica. Sobrepotenciales con una dimensión similar al potencial eléctrico natural medido entre las células, el medio fisiológico y el armazón y de carga eléctrica opuesta a la carga eléctrica natural de este sistema, puede estimular la adhesión celular por un aumento en el transporte iónico y un aumento en la hidrofiliidad superficial del armazón.

Un potencial catódico relacionado con los procesos de hidroxilación del armazón en contacto con fluidos y relacionado con el transporte iónico de minerales entre el armazón, las células y el medio fisiológico, ha sido eficiente para promover la adhesión celular. Un modelo propuesto en este trabajo en el que se tiene en cuenta la resistencia relacionada con la membrana celular en contacto con el fluido extracelular y la resistencia relacionada con el transporte de iones a través de los canales vasculares de la célula y las transformaciones morfogénicas de

esta, permitió el correcto ajuste de los espectros de impedancia obtenidos de los ensayos de siembra celular bajo polarización eléctrica sobre los armazones de PLA-PLG-HAP-quitosano.

Un polielectrolítico del co-polímero de PLA y PLG ha sido obtenido por el empleo de zinc en exceso. A parte de su efecto antiinflamatorio, el zinc es conocido por jugar un papel importante en el metabolismo del hueso, por la activación de proteínas en la osteogénesis y por el incremento en la producción de fosfatasa alcalina. Sin embargo, el zinc puede tener cierto efecto inhibitorio sobre la formación de osteoclastos, los cuales se encargan de la resorción del hueso, pero no deja de ser importante como regulador de colágeno, ALP, osteopontina y osteocalcina. El quitosano, usado con éxito como almacén para regeneración ósea junto con la hidroxiapatita y otros polímeros, interviene en el proceso de adhesión celular por sus grupos aminos catiónicos característicos que interaccionan con moléculas cargadas negativamente del medio fisiológico y con las mismas células.