

**EVALUACIÓN DE LA ADHESIÓN Y ORIENTACIÓN DE COLÁGENO POR ELECTROACTIVACIÓN SUPERFICIAL EN PLA-PGA-HIDROXIAPATITA Y PLA-PGA-WHITLOCKITA MEDIANTE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS Y EQCM**



**SILVIA MARINA ARAUJO DAZA  
DAISSY MILENA CRUZ PARDO**



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA 2011**

**EVALUACIÓN DE LA ADHESIÓN Y ORIENTACIÓN DE COLÁGENO POR  
ELECTROACTIVACIÓN SUPERFICIAL EN PLA-PGA-HIDROXIAPATITA Y PLA-  
PGA-WHITLOCKITA MEDIANTE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS Y *EQCM***

**SILVIA MARINA ARAUJO DAZA  
DAISSY MILENA CRUZ PARDO**

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

**Director**

**HUGO ARMANDO ESTUPIÑÁN DURÁN  
Ingeniero Metalúrgico M.Sc.**

**Codirector**

**Ph.D Dionisio Laverde Cataño**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA 2011**

*A mis padres por su dedicación y apoyo durante todos estos años.*

*A mis hermanos por su compañía y todos los momentos compartidos.*

*A mis compañeros por su amistad, lealtad y firme convicción día tras día.*

*A ti por ser mi compañero incondicional y brindarme tanto amor.*

*Daisy Milena Cruz Rardo*

*A mis padres por su amor, su confianza y dedicación y por ser la fuerza que me impulsa a luchar cada día por mis sueños.*

*A mis hermanos por estar a mi lado en cada etapa de mi vida ayudándome a levantar en los momentos difíciles y a disfrutar los buenos.*

*A mi persona favorita por el amor de todos estos años, y por convertirse en esa luz que me acompaña en el continuo caminar de la vida.*

*A mis amigos y compañeros por haber aportado alegrías, risas y buenos momentos al incesante aprendizaje de esta hermosa profesión.*

*A todos de corazón muchas gracias*

*Silvia Marina Araujo Daza*

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores expresan sus más sinceros agradecimientos a las personas que de una u otra forma favorecieron el buen desarrollo de este trabajo de investigación:

Al director del proyecto Ingeniero M.Sc Hugo Armando Estupiñán Durán, por sus valiosos aportes y orientación en el desarrollo del proyecto.

Al codirector de este proyecto Ingeniero Ph.D Dionisio Laverde Cataño.

Al Ingeniero Ph.D Darío Yesid Peña Ballesteros, por su confianza

Al Ingeniero M.Sc Custodio Vásquez Quintero, por su colaboración.

A la Ingeniera Nerly D. Montañez, por sus enseñanzas, colaboración y soporte.

Al Grupo de Investigaciones en Corrosión, por permitirnos realizar esta investigación.

A todos nuestros compañeros del GIC por los buenos ratos.

## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	18
2. MARCO TEÓRICO .....	19
2.1. BIOMATERIALES Y BIOCOPATIBILIDAD .....	19
2.1.1. Biopolímeros. ....	19
2.1.3. Colágeno.....	21
2.2. ORIENTACIÓN DE COLÁGENO.....	21
2.3. TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS Y MICROGRAVIMÉTRICAS.....	22
2.3.1. Espectroscopía de impedancia electroquímica.....	22
2.3.2. Voltametría cíclica .....	22
2.3.3. Microbalanza de cristal de cuarzo .....	22
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	24
3.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	24
3.2. MATERIALES Y REACTIVOS.....	24
3.2.1. <i>PBS</i> .....	24
3.2.2. Ácido poliláctico y poliglicólico .....	24
3.2.3. Hidroxiapatita y whitlockita. ....	24
3.2.4. Colágeno.....	25
3.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	25
3.3.1. Pruebas Preliminares .....	25
3.3.1.1. Matrices de mezclas poliméricas para regeneración ósea. ....	25
3.3.1.2. Determinación de picos de potencial de adsorción .....	26
3.3.2. Preparación de soluciones .....	26
3.3.2.1. Mezcla de biopolímeros y biocerámicos.....	26
3.3.2.2. Solución de colágeno.....	26
3.3.3. Deposición de biomateriales sobre el cristal de cuarzo.....	27
3.3.3.1. Electrodeposición catódica del polímero sobre el Cristal de Cuarzo. ....	27
Electrodeposición del colágeno. ....	27
3.3.4. Morfología de los Recubrimientos .....	28
3.3.5. Prueba Electroquímica (EIE) y Microgravimétricas ( <i>QCM</i> ).....	29
3.3.5.1. Diseño Experimental.....	29

3.3.5.2. Mediciones de EIE y QCM. ....	29
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS .....	31
4.1. ANÁLISIS DEL PROCESO DE ADSORCIÓN POR EIE .....	31
4.2. ANÁLISIS DEL PROCESO DE ADSORCIÓN POR QCM.....	35
4.3. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE LA TÉCNICA EQCM 37	
4.4. ANÁLISIS DEL DIRECCIONAMIENTO DEL COLÁGENO.....	38
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LAS PRUEBAS DE EIE .....	39
4.5.1. Análisis para las pruebas de HAp.....	39
4.5.2. Análisis para las pruebas de whitlockita .....	39
4.5.3. Análisis global. ....	40
5. CONCLUSIONES.....	41
6. RECOMENDACIONES.....	42
CITAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	47

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 1 Composición salina del <i>PBS</i> .....	24
Tabla 2 Composición de las mezclas que conforma la matriz de regeneración ósea propuesta.....	26
Tabla 3 Condiciones del diseño de experimentos.....	29
Tabla 4 Datos calculados del cambio de energía libre de Gibbs de adsorción.....	37
Tabla 5 Matriz de las mejores condiciones de experimentación.....	40

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1 . Esquema de la metodología experimental.....	25
Figura 2 Voltagrama realizado para obtener los picos de óxido-reducción.....	26
Figura 3 Esquema representativo de la electrodeposición catódica..	27
Figura 4 Montaje para realización de recubrimientos a) Cristal de cuarzo. b) Ánodo y cátodo. c y d) Montaje. ....	28
Figura 5 a) Micrografía de un Cristal de cuarzo Au-Ti recubierto con solución polimérica PLA-PGA-Whitlockita (5 $\mu\text{m}$ ). b) Micrografía del mismo Cristal de cuarzo Au-Ti recubierto con solución polimérica y posterior recubrimiento de colágeno tipo I (5 $\mu\text{m}$ ). ....	28
Figura 6 Celda usada en el montaje para las pruebas de <i>EQCM</i> . ....	29
Figura 7 Montaje realizado para las mediciones <i>EQCM</i> . ....	30
Figura 8 . Interacción entre las interfaces del recubrimiento.....	31
Figura 9 Espectros de Nyquist y Bode de los ensayos de adsorción de 5 $\mu\text{g/ml}$ de colágeno sobre PLA-PAG-HAp a 36,5 °C a) -0,90 V y b) 0,47 V.....	32
Figura 10 Modelos de circuitos equivalentes propuesto para representar el proceso de adsorción de colágeno. a) Pruebas a -0,90 V b) Pruebas a 0,47 V. ....	32
Figura 11 Cambio en la energía libre de Gibbs de adsorción para datos obtenidos de EIE. a) Para soluciones con Hidroxiapatita. b) Para soluciones con Whitlockita..	34
.....	34
Figura 12 Variación de la frecuencia respecto al tiempo. ....	35
Figura 13 Cambio en la energía libre de Gibbs de adsorción para datos obtenidos de la <i>QCM</i> a) para recubrimientos con hidroxiapatita. b) para recubrimientos con Whitlockita.....	36
Figura 14. Micrografías del recubrimiento de HAp a) -0,90 V b) 0,47 V.....	38
Figura 15 <i>SEM</i> de la matriz de regeneración ósea.....	38
Figura 16 Diagrama de Pareto para las pruebas de HAp .....	39
Figura 17. Efectos principales para las pruebas de HAp .....	39

Figura 18 Diagrama de Pareto para las pruebas de whitlockita.....39  
Figura 19. Efectos principales para las pruebas de whitlockita.....40

## LISTADO DE ANEXOS

Anexo A Protocolos usados para la síntesis de los polímeros y biocerámicos .....	49
Anexo B. Caracterización de materiales .....	51
Anexo C Peso y volúmenes de las soluciones de biopolímero y biocerámico. ....	58
Anexo D Diseño experimental.....	59
Anexo E Micrografías de los cristales recubiertos antes y después de realizar las pruebas de <i>EQCM</i> .. .....	60
Anexo F Circuitos Equivalentes. ....	66
Anexo G Datos obtenidos de la simulación en Z-View. . ....	68
Anexo H Datos para el cálculo de las isothermas de Langmuir y la energía libre de Gibbs de adsorción.. .....	71
Anexo I Isothermas de adsorción de Langmuir a partir de mediciones electroquímicas y microbalanza de cristal de cuarzo.....	73
Anexo J Espectros experimentales de Nyquist y Bode para la solución con HAp. 75	
Anexo K Espectros experimentales de Nyquist y Bode para la solución con Whitlockita.....	80
Anexo L Análisis estadístico. ....	85

## RESUMEN

### TÍTULO:

**EVALUACIÓN DE LA ADHESIÓN Y ORIENTACIÓN DE COLÁGENO POR ELECTROACTIVACIÓN SUPERFICIAL EN PLA-PGA-HIDROXIAPATITA Y PLA-PGA-WHITLOCKITA MEDIANTE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS Y EQCM\***

### AUTORES:

SILVIA MARINA ARAUJO DAZA  
DAISSY MILENA CRUZ PARDO<sup>†</sup>

**PALABRAS CLAVES:** Biomateriales, adsorción de proteínas, colágeno, matriz de regeneración ósea, microbalanza de cristal de cuarzo, espectroscopia de impedancia electroquímica.

### DESCRIPCIÓN:

Los últimos avances en el área de biomateriales se basan en crear materiales que sean cada vez más tolerados por el cuerpo humano. El contacto de un cuerpo vivo con un material induce la adsorción de proteínas en su superficie, creando una interfase entre éstas y las células que se adsorben, el colágeno es una proteína que facilita la proliferación y la migración de estas células. Por tales motivos se realizaron matrices poliméricas compuestas por fosfatos de calcio y reforzadas con fibras de colágeno estas presentan alta biocompatibilidad, y propiedades de osteoconductividad, biodegradabilidad, y adsorción, lo que las hace aptas para la regeneración ósea.

En esta investigación se trabajó con dos tipos de matrices poliméricas, compuestas de PLA/PGA/HAp/Fibras de colágeno y PLA/PGA/Whitlockita/Fibras de colágeno respectivamente, las cuales se realizaron sobre cristales de cuarzo Au-Ti, inicialmente se hizo una electrodeposición de los polímeros, y luego una electrodeposición de fibrillas de colágeno, esto con el objetivo de evaluar la adhesión de moléculas de colágeno sobre superficies activadas con potenciales de polarización, para estas pruebas se utilizó como electrolito colágeno disuelto en PBS variando las concentraciones de colágeno en la solución y se usaron técnicas electroquímicas y microbalanza de cristal de cuarzo. Los resultados fueron analizados estadísticamente con el fin de conocer los factores significativos en la variable de respuesta, la resistencia a la transferencia de masa.

---

\*Proyecto de grado

<sup>†</sup> Facultad de ingenierías físico-químicas, Escuela de Ingeniería Química. Director del proyecto: M.Sc Hugo Estupiñan Durán. Codirector del proyecto: PhD Dionisio Laverde Cataño

## ABSTRACT

### TITLE

EVALUATION OF ADHESION AND ORIENTATION OF COLLAGEN BY SURFACE ELECTROACTIVATION IN PLA-PGA-HYDROXYAPATITE AND PLA-PGA-WHITLOCKITA BY ELECTROCHEMICAL TECHNIQUES AND EQCM<sup>‡</sup>

### AUTHOR

SILVIA MARINA ARAUJO DAZA  
DAISSY MILENA CRUZ PARDO<sup>§</sup>

**KEYWORDS:** Biomaterials, adsorption of proteins, collagen, bone regeneration matrix, quartz crystal microbalance, electrochemical impedance spectroscopy

### DESCRIPTION

Recent advances in the area of biomaterials are based on creating materials that are increasingly tolerated by the human body. The contact of a living body with a material induces the adsorption of proteins on their surface, creating an interface between these and the cells that are adsorbed, the collagen is a protein that facilitates the proliferation and migration of these cells.

For these reasons were made polymer matrices composite by calcium phosphate, reinforced with collagen fibers these exhibit high biocompatibility, and osteoconductive properties, biodegradability and adsorption making them suitable for bone regeneration.

In this research worked with polymer matrices composite of PLA/ PGA/ Hap /Collagen fibers and PLA/ PGA/ Whitlockita/ Collagen fibers respectively, which were performed on quartz crystals Au-Ti, initially made an electrodeposition of polymers, and then a electrodeposition of collagen fibrils, this with the objective to evaluate the adhesion of collagen molecules on activated surfaces with potential of polarization, for these test was used as electrolyte collagen dissolved in PBS varying concentrations of collagen in the solution and used electrochemical techniques and quartz crystal microbalance. The results were analyzed statistically with the purpose of knowing the significant factors in the response variable, the resistance to mass transfer.

---

<sup>‡</sup> Proyecto de grado

<sup>§</sup> Facultad de ingenierías físico-químicas, Escuela de Ingeniería Química. Director del proyecto: M.Sc Hugo Estupiñan Durán. Codirector del proyecto: PhD Dionisio Laverde Cataño

## 1. INTRODUCCIÓN

Las investigaciones en regeneración ósea han presentado un constante crecimiento, paralelo a la necesidad de desarrollar materiales capaces de reconstruir o reemplazar tejidos. El objetivo de este desarrollo es el diseño de materiales que estimulen respuestas celulares adecuadas, que sean capaces de soportar las cargas mecánicas y que se degraden de forma gradual para que sean reemplazados por el nuevo tejido.

La biocompatibilidad, definida como la capacidad de los biomateriales para realizar una función específica en el cuerpo humano sin que causen rechazo, depende de la interacción biológica con su entorno. Una de estas interacciones es la adsorción de proteínas, proceso que juega un papel importante en la aceptación del biomaterial por el organismo. La adsorción de proteínas está influenciada por las propiedades de la superficie de contacto, en donde la morfología superficial y una carga superficial opuesta a la de la proteína, favorece la adsorción [1].

Debido a la importancia que tiene la adsorción de proteínas en la biocompatibilidad de los biomateriales para regeneración ósea, se evaluó la adsorción polarizada de moléculas de colágeno sobre matrices poliméricas mezcladas con fibras de colágeno tipo I y biocerámicos bioactivos, por medio de técnicas electroquímicas y microgravimétricas. Con el fin de polarizar la superficie de la matriz se emplearon dos potenciales, uno a 0,47 voltios y otro a -0,90 voltios, valores definidos del ensayo de voltametría cíclica, que relaciona la afinidad de la proteína con la superficie de la matriz polimérica, según las reacciones redox a lugar.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. BIOMATERIALES Y BIOCMPATIBILIDAD

Un Biomaterial puede ser definido como “un material ideado para interaccionar con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o substituir cualquier tejido, órgano o función del cuerpo” según la *Second Consensus Conference on definitions in Biomaterials, Chester, U.K, 1992*. También son definidos como aquellos materiales de origen natural o sintético que se utilizan para dirigir, suplementar o reemplazar alguna función de un tejido vivo o como una sustancia sistemáticamente y farmacológicamente inerte diseñada para implantación dentro de un sistema vivo o su incorporación a éste [2].

Los biomateriales pueden ser de origen natural o sintético, dependiendo de la reacción bioquímica que se lleve a cabo estos biomateriales se subdividen en:

- Materiales casi inertes.
- Materiales bioactivos.
- Materiales reabsorbibles.

Un biomaterial debe cumplir una serie de requisitos, donde el principal se refiere a que el material no debe producir ninguna reacción de inflamación en los tejidos, además de [3]:

- No ser tóxico, ni carcinógeno.
- Ser químicamente estable, inerte o biodegradable.
- Tener una resistencia mecánica y a la fatiga adecuada.
- Tener una densidad y peso adecuados.
- Tener un diseño de ingeniería perfecto; referente al tamaño y la forma.

2.1.1. Biopolímeros. Las aplicaciones médicas y farmacéuticas de los biopolímeros constituyen actualmente uno de los campos de mayor interés por su utilización como dispositivos terapéuticos cardiovasculares, ortopédicos, oftalmológicos y dentales, etc. Una de las razones por la cual estos biomateriales

tienen varias aplicaciones es, porque al ser introducidos en el sistema biológico, son capaces de crear una interfase de unión debido a su alta biocompatibilidad [4]. También ofrecen la posibilidad de ser manipulados según las exigencias y su finalidad, con características físico-químicas bien definidas. Es así que se pueden encontrar como fibras, tejidos, películas o bloques [5]. La mayoría de estos materiales son reabsorbibles, los cuales mantienen la forma del tejido temporalmente y se degradan por procesos enzimáticos o hidrolíticos [3]. Su uso no es apropiado para dispositivos permanentes, ya que el material se deteriora rápidamente. Los polímeros no bioabsorbibles son aquellos que no son digeridos o hidrolizados por los tejidos; sin embargo, también se utilizan como implantes, dispositivos médicos y órganos artificiales.

Los biopolímeros más utilizados en regeneración de tejido son el ácido poliláctico (PLA) y el ácido poliglicólico (PGA), los cuales cuentan con una amplia variedad de aplicaciones médicas. El PLA es un polímero sintético reabsorbible de la familia de los alfa-hidroxiácidos o poliésteres alifáticos, termoplástico de alta resistencia, biocompatible, biodegradable, inmunológicamente inerte, atóxico y reabsorbible [6-7]. El ácido poliglicólico (PGA) es un polímero sintético biodegradable, termoplástico y cuenta con la estructura más simple de los poliésteres alifáticos lineales. Se han desarrollado numerosos estudios mezclando estos dos polímeros, dando resultados favorables, en los que se observa su capacidad como medio para la proliferación y diferenciación de tejidos [8].

2.1.2. Biocerámicos. Debido a sus propiedades fisicoquímicas, los biocerámicos cuentan con un amplio rango de aplicación en el campo de los biomateriales. Su dureza, resistencia e inercia química permiten que las reacciones en el organismo sean mínimas [9]. En el presente estudio se utilizaron biocerámicos basados en fosfatos de calcio, considerados similares a los minerales del hueso. La hidroxiapatita (HAp) es uno de los fosfatos más eficientes en regeneración de tejido óseo, debido a su alta bioactividad y estabilidad ante cambios de pH,

temperatura y composición del fluido fisiológico [10]. La HAp es un componente natural del hueso y puede obtenerse sintéticamente, teniendo la capacidad de unirse químicamente con el tejido óseo, como un elemento bioactivo [11]. La Whitlockita, presenta grandes propiedades de biocompatibilidad, adsorción y osteoconductividad y es usado con frecuencia en la regeneración ósea generando excelentes resultados.

2.1.3. Colágeno. La molécula de colágeno es la proteína estructural más frecuente en la matriz extracelular MEC [12], siendo su estructura la más común del reino animal. El colágeno tipo I (largo ~ 30nm, diámetro ~ 1.5nm) presenta una estructura helicoidal formada por tres polipéptidos. Las partes no helicoidales son llamadas telopéptidos, y se encuentran al final de cada molécula.

Las matrices conformadas con colágeno se usan como una aproximación de la MEC y se ha demostrado que su orientación en la matriz polimérica determina *in vivo*, propiedades como la resistencia a la tensión en los tendones. También juega un papel importante para dirigir la proliferación celular y la migración celular después de un trauma o lesión [13].

## 2.2. ORIENTACIÓN DE COLÁGENO

Se han desarrollado varias técnicas para promover la orientación de colágeno a nivel de laboratorio. La más común, es el uso de campos magnéticos con imanes superconductores [12]. Los campos eléctricos también se utilizan para promover la orientación; sin embargo es posible que se presente con esta técnica, modificaciones químicas [14]. Otras técnicas reportadas en la literatura son extrusión mecánica, canales microfluidizados y anisotropía química que tienen limitaciones en la densidad de formación, deformabilidad elástica y el tamaño final [15]. También se aplican procesos de electrospinning para la orientación de nanofibras de colágeno, pero su uso es limitado debido al uso de solventes tóxicos y corrosivos [13].

Una técnica alternativa con la cual se logre una mayor densidad de formación sin afectar la estructura química es el empleo de procesos electroquímicos a partir de una solución de colágeno donde, al aplicarse un sobrepotencial, es posible lograr el direccionamiento de la proteína [15].

### **2.3. TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS Y MICROGRAVIMÉTRICAS**

2.3.1. Espectroscopía de impedancia electroquímica. La espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE) es una de las técnicas más modernas utilizadas para caracterizar las propiedades eléctricas de materiales en contacto con medios acuosos electrolíticos, logrando obtener datos del desempeño *in situ*, de modo no destructivo, llevando a un entendimiento detallado de probables mecanismos de pérdida de adhesión de recubrimientos, degradación, adsorción y regeneración [16]. Los resultados de EIE son explicados por medio de modelos de circuitos equivalentes que permiten obtener información de la superficie del electrodo [17].

2.3.2. Voltametría cíclica. La voltametría cíclica es una de las técnicas de caracterización electroquímica que puede aportar más información utilizando un dispositivo experimental relativamente sencillo. Esta técnica se basa en aplicar un barrido de potencial al electrodo de trabajo tanto en el sentido directo como en el inverso, es decir un barrido triangular de potencial. Con la voltametría cíclica se logra evaluar las reacciones redox de los procesos relacionados con especies adsorbidas en la superficie de materiales.

2.3.3. Microbalanza de cristal de cuarzo. La microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) es una técnica de gran alcance para la investigación *in situ* de procesos interfaciales de diferentes sistemas, tales como los átomos, moléculas, proteínas e incluso células vivas [18]. Las mediciones se fundamentan en la excitación mediante un campo de corriente alterna de un elemento piezoeléctrico, en este caso, un cristal de cuarzo, produciéndose una onda acústica. La frecuencia y la

amplitud de la onda son función de la composición y las propiedades del medio en contacto [19].

El cristal de cuarzo se caracteriza porque vibra a una frecuencia determinada cuando sobre él se deposita alguna masa, disminuyendo la frecuencia de resonancia proporcionalmente a la masa depositada, usándose este cambio de frecuencia para monitorear la variación de masa de películas finas y rígidas de polímeros electrodepositados sobre el cristal de cuarzo. La relación entre frecuencia y masa se da mediante la ecuación de Sauerbrey [20].

$$\Delta F = \frac{-2F_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}} \Delta m \quad (1)$$

Donde  $\Delta F$  es la medición de cambio de frecuencia [Hz],  $F_0$  es la frecuencia de resonancia del modo fundamental de la microbalanza de cuarzo [Hz],  $A$  es el área efectiva del electrodo,  $\rho_q$  es la densidad del cuarzo  $2.648 \text{ [g cm}^{-3}\text{]}$ ,  $\mu_q$  es el módulo de corte del cuarzo  $2.947 \times 10^{11} \text{ [g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}\text{]}$ ,  $\Delta m$  es el cambio de masa [ $\mu\text{g}$ ]. La ecuación 2 muestra los anteriores términos agrupados en una constante  $C_f$ .

$$\Delta F = -C_f \Delta m \quad (2)$$

Donde  $C_f$  es un factor de sensibilidad que tiene un valor  $56,6 \text{ Hz } \mu\text{g}^{-1} \text{ cm}^2$  para un cristal AT-cut 5 MHz.

### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

#### 3.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Inicialmente se realizó una búsqueda de información del tema, revisando artículos, tesis, libros con trabajos realizados previamente, con el fin de tener el estado de conocimiento adecuado y las bases para realizar el proyecto.

#### 3.2. MATERIALES Y REACTIVOS

3.2.1. *PBS*. La solución salina amortiguada por fosfatos (*PBS*) utilizada en la simulación de fluidos corporales, se obtuvo a partir de NaCl (MERCK), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (CarloErba), KCl (MERCK), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (CarloErba) y tamponada a un pH de 7,4.

Tabla 1. Composición salina del *PBS*.

SALES	CANTIDAD
NaCl	8,06 g
KCl	0,22 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g
H <sub>2</sub> O	Aforar 1 L

3.2.2. Ácido poliláctico y poliglicólico. La síntesis de los biopolímeros se llevó a cabo por medio de policondensación del ácido L-láctico (MERCK) y ácido glicólico (MERCK) respectivamente, siguiendo las condiciones que se muestran en el (Anexo A). En el anexo B se presenta la caracterización.

3.2.3. Hidroxiapatita y whitlockita. Los biocerámicos fueron sintetizados por precipitación acuosa de fosfatos de calcio y fosfato de amónico según el procedimiento del anexo A. Los materiales se caracterizaron por medio de difracción de rayos X (Anexo B).

3.2.4. Colágeno. Se utilizaron fibrillas de Colágeno Tipo I (Sigma Aldrich), para su deposición electroquímica. Para las pruebas electroquímicas (*EQCM*) se usó colágeno comercial en polvo liofilizado (RSAD08I25201). Los dos tipos de colágeno se caracterizaron por medio de FT IR (Anexo B).

### 3.3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

En la figura 1 se muestra la metodología experimental empleada.

Figura 1. Esquema de la metodología experimental.



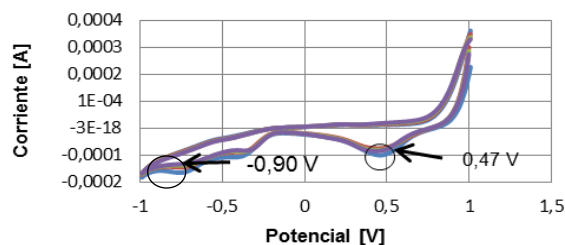
Fuente. Autores

#### 3.3.1. Pruebas Preliminares

3.3.1.1. Matrices de mezclas poliméricas para regeneración ósea. Para las pruebas de *EQCM*, se obtuvieron recubrimientos con las matrices compuestas por los polímeros PLA, PGA, biocerámicos y el colágeno tipo I. En una primera deposición, se usó una solución 15% de la mezcla p/v en acetona, empleando un proceso electrolítico. Para lograr el recubrimiento de colágeno se realizó una segunda deposición según la bibliografía consultada [21].

3.3.1.2. Determinación de picos de potencial de adsorción. Se empleó la técnica de Voltametría Cíclica usando un Potenciostato Gamry 600, con el fin de determinar los picos de óxido-reducción. En el barrido de reducción se encontraron dos picos principales, uno anódico a 0,47 V vs Eref y otro catódico a -0,90 V vs Eref, según la figura 2.

Figura 2. Voltagrama realizado para obtener los picos de óxido-reducción.



Fuente. Autores

Estos picos son usados para las pruebas de *EQCM* con el fin de activar la superficie mediante polarización.

### 3.3.2. Preparación de soluciones

3.3.2.1. Mezcla de biopolímeros y biocerámicos. Se prepararon dos mezclas con las condiciones presentadas en la Tabla 2, los pesos y volúmenes son presentados en el anexo C.

Tabla 2. Composición de las mezclas que conforma la matriz de regeneración ósea propuestas.

Solución	PLA (%)	PGA (%)	HAP (%)	Whitlockita (%)
1	70	30	10	-----
2	70	30	----	10

Fuente. Autores

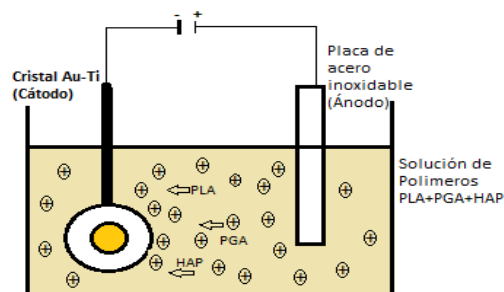
3.3.2.2. Solución de colágeno. La solución consistió en mezclar 8 mg de colágeno Tipo I, con 80 ml de *PBS*, está fue congelada por 24 horas con el fin de

expandir las fibras. Luego esta solución fue usada para la respectiva electrodeposición sobre la matriz depositada sobre el cristal, compuesta por la mezcla de PLA, PGA y el biocerámico.

### 3.3.3. Deposición de biomateriales sobre el cristal de cuarzo

3.3.3.1. Electrodeposición catódica del polímero sobre el Cristal de Cuarzo. Para fijar el material compuesto sobre el cristal de cuarzo se empleó un método de electrolisis catódica. El montaje consistió de una celda de teflón adaptada para sostener el cristal (cátodo), un ánodo de acero inoxidable 316 y un electrolito compuesto por cada solución mostrada en la tabla 2. Este sistema fue conectado a una fuente de potencia Thermo Scientific EC570-90 para aplicar un potencial de 9 voltios durante 15 minutos. En la figura 3 y 4 se muestra una representación del montaje empleado y fotografías de los elementos de este montaje en laboratorio. Los cristales recubiertos fueron curados en una mufla WTB-BLINDER a una temperatura de 100°C por un tiempo de 10 minutos, logrando con este tratamiento mejorar la morfología, la adhesión e integración de los componentes de la mezcla y la eliminación del solvente.

Figura 3. Esquema representativo de la electrodeposición catódica.

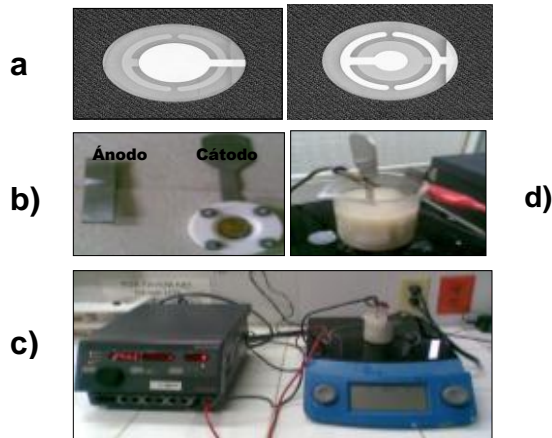


Fuente. Autores

3.3.3.2. Electrodeposición del colágeno. Luego de realizar la deposición de los biopolímeros y biocerámicos sobre los cristales, se procedió a electrodepositar sobre esta mezcla, las fibrillas de colágeno tipo I para funcionalizar biomiméticamente la superficie. Esta proteína presenta una carga neta positiva

que al ser sometidas a un campo eléctrico, son adheridas a la superficie de la mezcla polimérica mediante fuerzas de Vander Walls y electrostáticas. Las condiciones para esta deposición fueron 34 mA y 3 minutos [21].

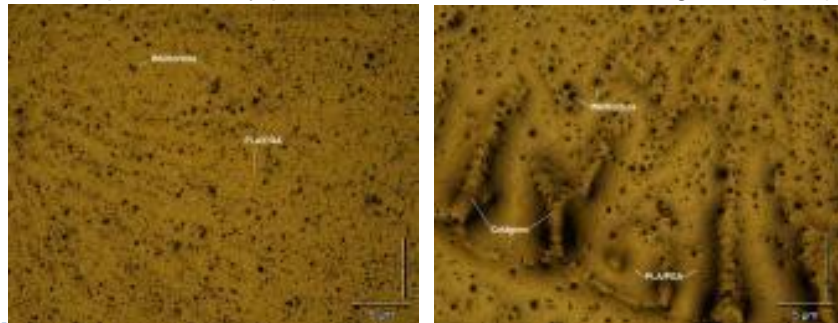
Figura 4. Montaje para realización de recubrimientos a) Cristal de cuarzo. b) Ánodo y cátodo. c y d) Montaje..



Fuente. Autores

3.3.4. Morfología de los Recubrimientos. Para realizar un análisis morfológico, se obtuvieron micrografías de los cristales recubiertos con la matriz de mezcla de polímeros y biocerámicos, con y sin colágeno Tipo I, usando un microscopio OLYMPUS BX41. Otras micrografías fueron obtenidas después de las pruebas de EQCM. En la figura 5 se muestran algunas de estas micrografías.

Figura 5a) Micrografía de un Cristal de cuarzo Au-Ti recubierto con solución polimérica PLA-PGA-Whitlockita (5  $\mu\text{m}$ ). b) Micrografía del mismo Cristal de cuarzo Au-Ti recubierto con solución polimérica y posterior recubrimiento de colágeno tipo I (5  $\mu\text{m}$ ).



Fuente. Autores

### 3.3.5. Prueba Electroquímica (EIE) y Microgravimétricas (QCM)

3.3.5.1. Diseño Experimental. En la tabla 3 se muestra las condiciones del diseño de experimentos factorial  $2^3$  empleado, con un nivel alto (+1), uno bajo (-1) y un punto al centro (0). Este diseño constó de dos bloques uno para la HAp y otro para la whitlockita. Las variables fijas son PLA+PGA 70/30%, HAp 10%, whitlockita 10%. Las variables independientes voltaje (V), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) y concentración de colágeno ( $\mu\text{g/ml}$ ) y la variable de respuesta es la resistencia a la transferencia de carga.

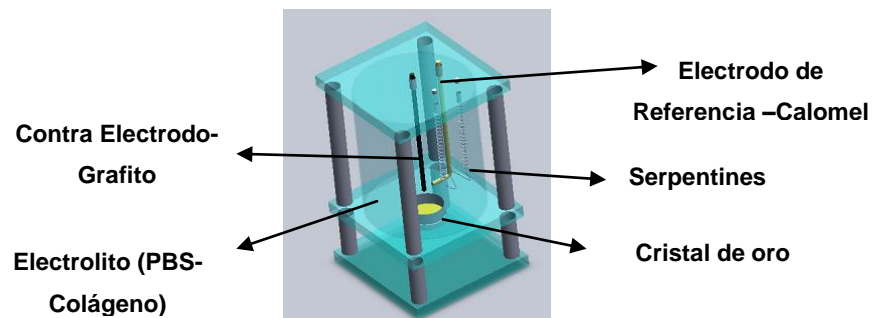
Tabla 3. Condiciones del diseño de experimentos.

Nivel	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Colágeno ( $\mu\text{g/ml}$ )	Voltaje (V)
Bajo	36,5	5	-0,90
Punto al centro	37,5	12,5	0
Alto	38,5	20	0,47

Fuente. Autores

3.3.5.2. Mediciones de EIE y QCM. Para la realización de las mediciones simultáneas de EQCM, se utilizó una celda plana de tres electrodos con capacidad de 200 ml, con intercambiador de calor. La celda se conectó a un baño termostático con recirculación de agua. El electrodo de trabajo usado fue un cristal AT-Cut 5 MHz Au-Ti recubierto; como contra-electrodo se usó grafito de alta pureza y un electrodo de referencia de calomel saturado.

Figura 6 Celda usada en el montaje para las pruebas de EQCM.



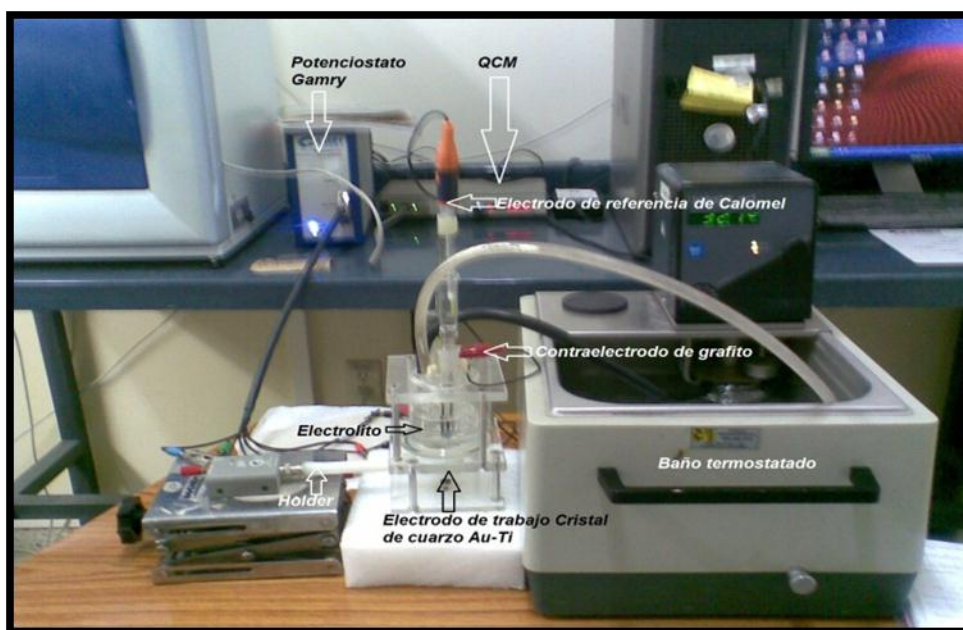
Fuente. Autores

Las mediciones microgravimétricas se realizaron con una microbalanza QCM200 *Stanford Research Systems*.

Las mediciones de espectroscopía de impedancia fueron realizadas en un potencióstato GAMRY 600, con un rango de frecuencia de 0,01 a 100000 Hz usando tres valores de voltaje 0 V, 0,47 V y -0,90 V, los cuales fueron obtenidos por medio de voltametría cíclica. El electrolito usado para las mediciones consistió en una solución de 100 ml de PBS con colágeno disuelto según las concentraciones mostradas en la tabla 3.

En la figura 7 se muestra la fotografía del montaje usado para los ensayos de EQCM.

Figura 7. Montaje realizado para las mediciones EQCM.



Fuente. Autores

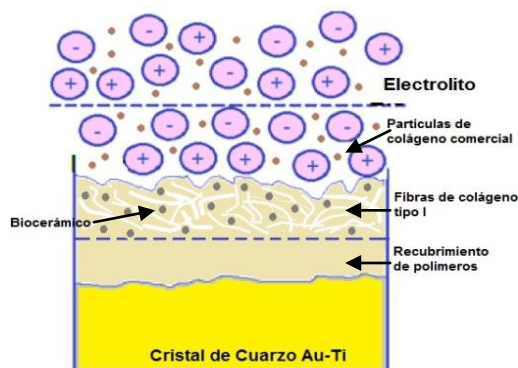
## 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Con el propósito de obtener información más detallada sobre los procesos fisicoquímicos que se llevan a cabo *in situ* sobre biomateriales interaccionando con proteínas, se ha empleado la técnica de microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo *EQCM*, conjugando las técnicas de EIE y *QCM*; también se puede obtener información sobre características interfaciales, cambios inducidos por propiedades viscoelásticas, procesos de degradación, cambios de masa muy pequeños en la superficie del electrodo y la capacitancia interfacial.

### 4.1. ANÁLISIS DEL PROCESO DE ADSORCIÓN POR EIE

La técnica de EIE fue utilizada con el fin de estudiar el comportamiento interfacial de las matrices de mezclas de PLA-PGA-HAp-Fibras de Colágeno y PLA-PGA-Whitlockita-Fibras de Colágeno y el proceso de adsorción de moléculas de colágeno disueltas en *PBS* al entrar en contacto con este material. Para el análisis de resultados de estos ensayos, se obtuvo los correspondientes espectros de Bode y de Nyquist, estableciéndose las siguientes interfaces mostradas en la figura 8: PBS/Colágeno, Colágeno/Biocerámico, Colágeno-Biocerámico/Fibras de colágeno–Biopolímero y Recubrimiento/Cristal.

Figura 8. Interacción entre las interfaces del recubrimiento.



Fuente. Autores

El proceso de adsorción del colágeno fue ajustado por medio del software Z-View 3.2 y representando por medio de circuitos equivalentes propuestos (Los circuitos equivalentes y sus parámetros se presentan en los anexos F y G), encontrando buenos ajustes en la simulación de los ensayos electroquímicos con  $\chi^2$  menores de  $10^{-4}$  entre los datos experimentales y simulados. Espectros característicos de Bode y Nyquist, obtenidos y simulados, se muestra en la figura 9. Los modelos empleados en la simulación y ajuste de los espectros obtenidos, son mostrados en la figura 10.

Figura 9. Espectros de Nyquist y Bode de los ensayos de adsorción de 5  $\mu\text{g/ml}$  de colágeno sobre PLA-PAG-HAp a 36,5 °C a) -0,90 V y b) 0,47 V.

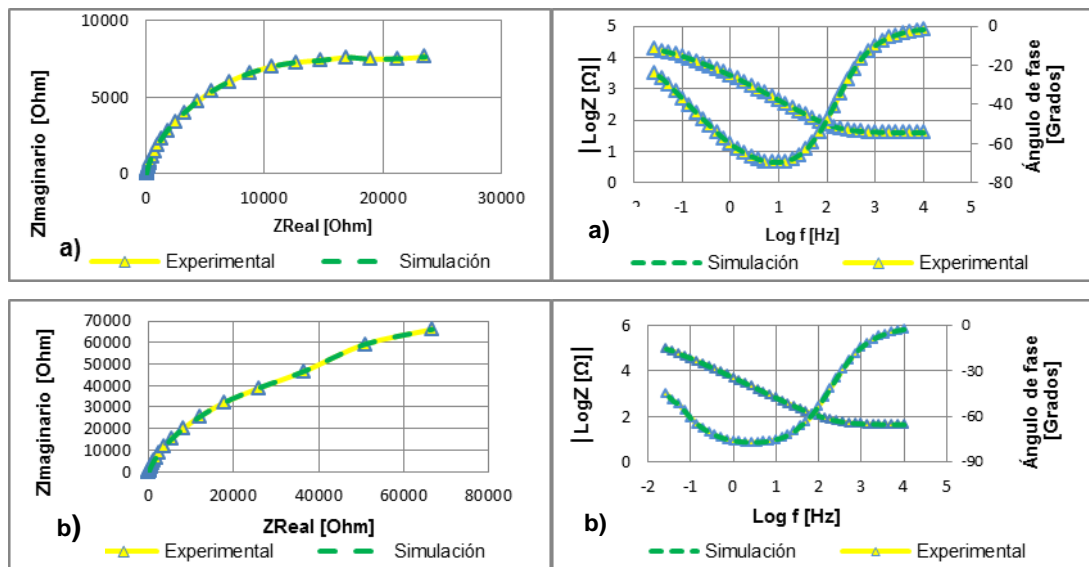
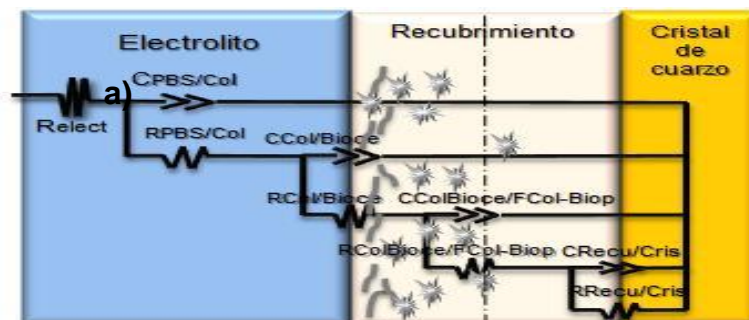


Figura 10. Modelos de circuitos equivalentes propuesto para representar el proceso de adsorción de colágeno. a) Pruebas a -0,90 V b) Pruebas a 0,47 V.





El modelo de la figura 10a se caracteriza por la presencia de cuatro interfaces con sus constantes de tiempo características, relacionadas por una capacitancia y una resistencia en paralelo respectivamente. La primera interfaz hace referencia a la interacción electroquímica entre el *PBS* y las moléculas de colágeno en la solución; La segunda interfaz se relaciona con la interacción electroquímica influenciada por la bioactividad de los cristales de biocerámico con las moléculas de colágeno cuyo efecto se manifiesta en la adsorción y posterior adhesión del colágeno sobre el material; en esta interfaz se obtuvo la resistencia a la transferencia de carga relacionada con la cantidad de proteína adsorbida. La siguiente fase representa la transferencia de carga del proceso de interacción del colágeno-biocerámico con los biopolímeros y las fibras de colágeno. La interfaz a más bajas frecuencias corresponde a la interacción del recubrimiento con el cristal. Se asume el anterior modelo para las pruebas en las cuales se aplica un voltaje de -0,90 V.

La figura 10b, corresponde al sistema en el cual las moléculas de colágeno no se adsorbieron completamente sobre el material, debido posiblemente a que bajo el sobrepotencial aplicado de 0,47 V, se presenta una desnaturalización de la proteína.

De acuerdo a la literatura, la resistencia a la transferencia de carga puede ser utilizada como una medida de la velocidad de reacción y de la cantidad de proteína adsorbida en la superficie, debido a que es inversamente proporcional a la masa adsorbida en la superficie del electrodo  $\Gamma(\text{molcm}^{-2})$  [22-23]. La adsorción

de proteínas en superficies sólidas puede ser descrita por la isoterma de Langmuir. La forma lineal de la ecuación de Langmuir puede ser expresada como:

$$\frac{C}{\Gamma} = \frac{C}{\Gamma_{max}} + \frac{1}{\Gamma_{max} B_{ads}} \quad (3)$$

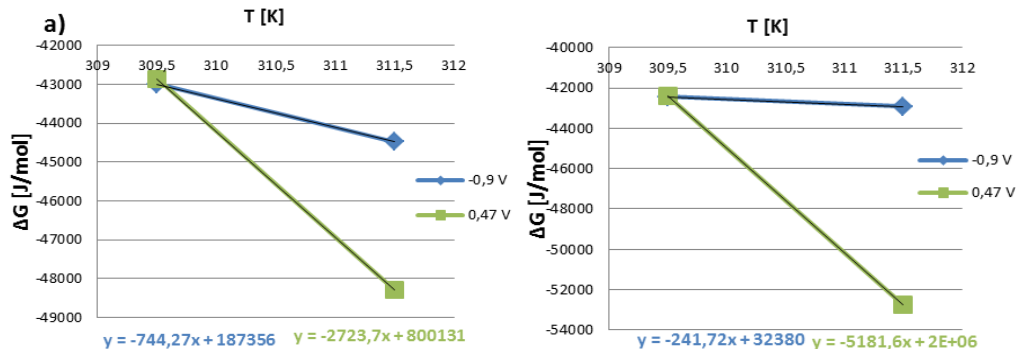
Donde  $\Gamma$  ( $molcm^{-2}$ ) es la cantidad adsorbida,  $\Gamma_{max}$  ( $molcm^{-2}$ ) es la cantidad máxima que se puede adsorber en la superficie y  $B_{ads}$  ( $cm^3 mol^{-1}$ ) es el coeficiente de adsorción, el cual refleja la afinidad de las moléculas de adsorbato hacia los sitios de adsorción a una temperatura dada [24]. Los parámetros  $\Gamma_{max}$  y  $B_{ads}$  son calculados a partir de la pendiente y el punto de corte respectivamente, de la curva obtenida al graficar  $C/\Gamma$  vs  $C$ . (En el anexo H e I, se presentan los datos obtenidos para la realización de las isotermas de Langmuir y sus correspondientes gráficas).

Después de hallar los parámetros anteriores es posible obtener la energía libre de adsorción, según:

$$\Delta G_{ads} = -RT \ln(MB_{ADS}) \quad (4)$$

Donde  $M$  ( $dm^3 mol^{-1}$ ) es la concentración molar de la solución acuosa (PBS). En la figura 11 se presenta la gráfica de  $\Delta G_{ads}$  vs  $T$  (Anexo H presenta los cálculos).

Figura 11. Cambio en la energía libre de Gibbs de adsorción para datos obtenidos de EIE. a) Para soluciones con Hidroxiapatita. b) Para soluciones con Whitlockita.

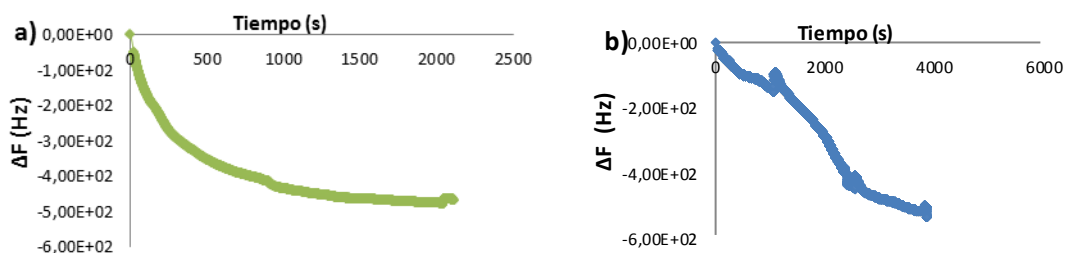


## 4.2. ANÁLISIS DEL PROCESO DE ADSORCIÓN POR QCM

La técnica de microbalanza de cristal de cuarzo *QCM* es usada en este caso para determinar en un tiempo real la cinética de adsorción de la proteína sobre la superficie del cristal previamente recubierto con los polímeros y las fibras de colágeno. La relación de Sauerbrey predice una relación lineal entre la masa adsorbida y el cambio de frecuencia de resonancia [20]. Por medio de la ecuación 1 los datos obtenidos de la *QCM* fueron ajustados para realizar los cálculos de la cantidad de colágeno adsorbido por la superficie de los recubrimientos.

La figura 12a muestra la respuesta del cambio de frecuencia vs tiempo, para una prueba de *EQCM* realizada a 38,5 °C, con una concentración de colágeno de 5 ug/ml, un voltaje de 0,47 V y cristal recubierto por PLA+PGA+HAp+ Fibras de colágeno; la figura 12b se realizó a 36,5°C, 20 ug/ml de concentración de colágeno, -0,90 V para un recubrimiento de PLA+PGA+Whitlockita+ Fibras de colágeno. Respuestas equivalentes se obtuvieron para las demás pruebas donde se observó disminución de la pendiente.

Figura 12. Variación de la frecuencia respecto al tiempo.



Cuando se realizan ensayos usando la *QCM* con líquidos, la ecuación de Sauerbrey (Ecuación 1) no es válida, debido a que las mediciones en medio líquido son más complejas ya que se puede presentar que algunas moléculas de agua sean atrapadas en la proteína adsorbida, a su vez las propiedades del líquido (densidad, viscosidad) también influyen en la medición de la frecuencia de resonancia [24]. Sin embargo, se conoce que la ecuación de Sauerbrey puede ser usada en condiciones específicas, donde la influencia de los cambios viscoelásticos es despreciable. En los resultados de los ensayos realizados, se

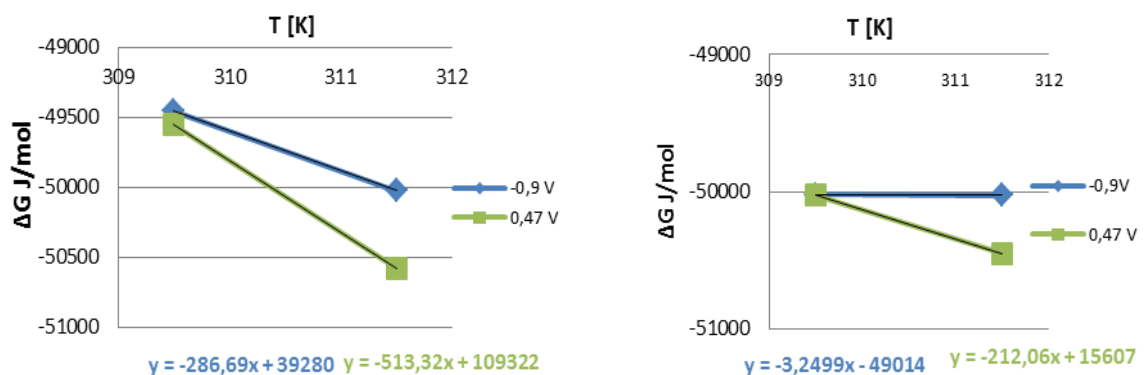
observó una relación lineal entre el cambio de masa y el cambio de frecuencia de la QCM, lo cual significa, que la ecuación de Sauerbrey puede ser aplicada en el sistema planteado.

Los datos calculados de cantidad de masa adsorbida en el recubrimiento,  $\Delta m$  (ug/ml), fueron útiles para obtener la isoterma de adsorción de Langmuir, la cual fue posible graficar simultáneamente con los ensayos electroquímicos realizados. En este caso se sustituye  $\Gamma$  por  $\Delta m$ , representando así la cantidad de proteína adsorbida por unidad de área. La ecuación de Langmuir se expresa de la siguiente manera:

$$\frac{C}{|\Delta m|} = \frac{1}{|\Delta m_{m\acute{a}x}|} + \frac{C}{|\Delta m_{m\acute{a}x}| B_{ADS}} \quad (5)$$

Al representar  $C/|\Delta m|$  vs C se obtuvo una relación lineal y se calcularon los valores de  $|\Delta m_{m\acute{a}x}|$  y  $B_{ADS}$  de la pendiente y el punto de corte, respectivamente. Como resultado de esto se puede calcular el cambio de la energía libre de Gibbs de adsorción usando la ecuación 4. La gráfica obtenida se representa en la figura 13.

Figura 13. Cambio en la energía libre de Gibbs de adsorción para datos obtenidos de la QCM a) para recubrimientos con hidroxiapatita. b) para recubrimientos con Whitlockita.



### 4.3. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE LA TÉCNICA EQCM

Para el proceso de adsorción del colágeno sobre los dos tipos de compuestos con potenciales de activación de -0,90 V y 0,47 V, tanto para EIE como QCM se concluyó según los valores negativos de la energía de adsorción de Gibbs ( $\Delta G_{ads}$ ), que se presenta un proceso más espontáneo. En la tabla 4 se comparan las  $\Delta G_{ads}$ , encontrándose que los datos de QCM son más altos, esto ocurre debido a que esta técnica es más sensible y menos selectiva, por lo cual sus resultados pueden ser afectados por la adsorción de especies no electroactivadas.

Tabla 4. Datos calculados del cambio de energía libre de Gibbs de adsorción.

T [K]	Hidroxiapatita				Whitlockita			
	- $\Delta G$ [J/mol]							
	EIS -0,90 V	EIS 0,47 V	QCM -0,90 V	QCM 0,47 V	EIS -0,90 V	EIS 0,47 V	QCM -0,90 V	QCM 0,47 V
309,5	42993,91	42855,21	49451,91	49551,57	42432,36	42410,94	50019,60	50025,30
311,5	44482,442	48302,62	50025,30	50578,22	42915,80	52774,07	50026,10	53019,73

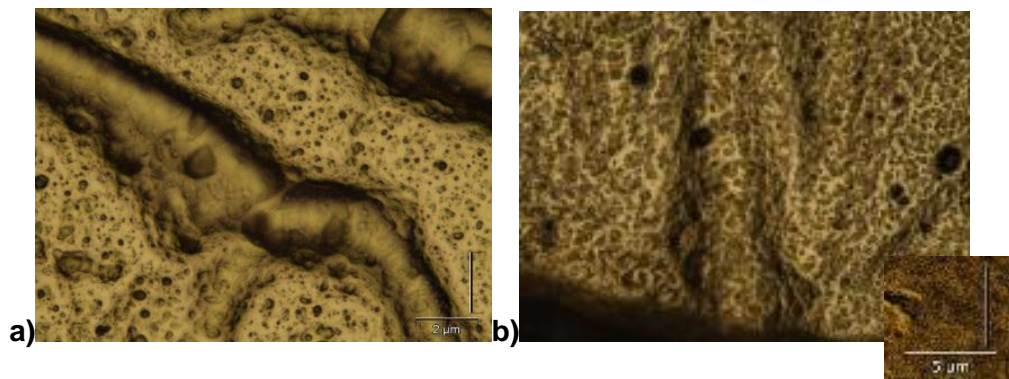
Al analizar los datos se encuentra que a una temperatura de 311,5 K, se presenta un valor alto de  $\Delta G_{ads}$  lo cual indica una buena adsorción de proteína para un potencial de activación de -0,90 V; esto se puede evidenciar en las figura 11 de  $\Delta G_{ads}$  Vs T. A su vez se encontraron altos valores para el inverso de la resistencia a la transferencia de carga  $R_{ct}^{-1}$  al mismo potencial, lo cual confirma que se presenta una mayor adsorción de colágeno.

Durante el desarrollo de la investigación se corroboró que factores como la temperatura y la concentración de colágeno en el electrolito y las características superficiales del recubrimiento tuvieron gran incidencia en el proceso de adsorción [22].

#### 4.4. ANÁLISIS DEL DIRECCIONAMIENTO DEL COLÁGENO

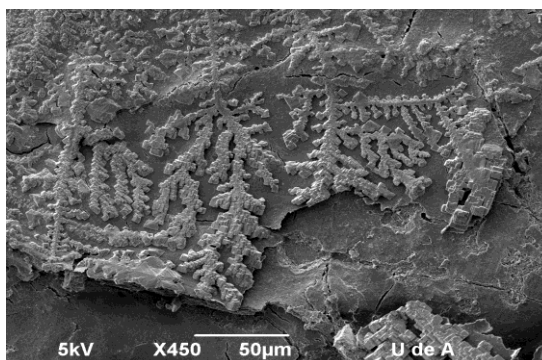
Por medio de la observación de las micrografías se evidenció que las moléculas de colágeno presentaron una orientación alargada debido a su forma helicoidal y tienden a formar redes lo cual es característico de este tipo de proteína. Las moléculas de colágeno se adhieren y orientan sobre los puntos activos de la superficie. Para el potencial de activación de  $-0,90\text{ V}$  se encontraron micrografías con una orientación de colágeno más definido, lo cual coincide con una mayor adsorción a este potencial. En la figura 14 se presenta dos de las micrografías realizadas al cristal recubierto después de las pruebas de *EQCM* (Anexo E)

Figura 14. Micrografías del recubrimiento de HAp a)  $-0,90\text{ V}$  b)  $0,47\text{ V}$



En la figura 15 se presenta una imagen tomada por microscopio electrónico de barrido (*SEM*), donde se puede evidenciar la orientación del colágeno y la red formada por éste.

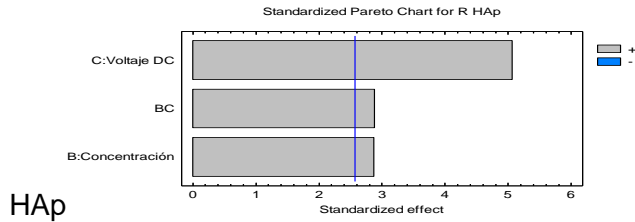
Figura 15. *SEM* de la matriz de regeneración ósea.



## 4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LAS PRUEBAS DE EIE

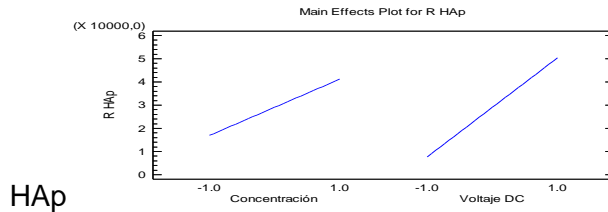
4.5.1. Análisis para las pruebas de HAp. En el gráfico de Pareto de la figura 16, se observan tres factores significativos que tienen un efecto positivo sobre la variable de respuesta. En este orden de ideas, entre mayor sea el voltaje, la concentración y el efecto de interacción entre la concentración-voltaje, mayor será la resistencia.

Figura 16 Diagrama de Pareto para las pruebas de



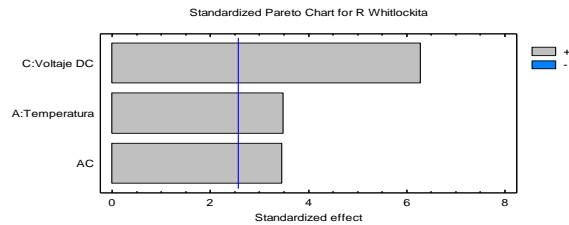
En la figura 17, se presenta la gráfica de los efectos principales, observándose que a menor concentración y voltaje, la resistencia es menor. Este es un efecto positivo de la adsorción de la proteína

Figura 17. Efectos principales para las pruebas de



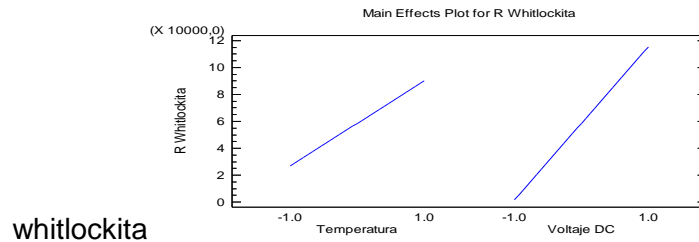
4.5.2. Análisis para las pruebas de whitlockita. En la figura 18, se muestran tres factores significativos, los cuales tienen un efecto positivo sobre la resistencia a la transferencia de carga.

Figura 18 Diagrama de Pareto para las pruebas de whitlockita.



Del diagrama de los efectos principales de la figura 19, se observa que a menor temperatura y menor voltaje, la resistencia tiende a ser menor, lo cual es un efecto positivo sobre la adsorción de la proteína.

Figura 19. Efectos principales para las pruebas de



4.5.3. Análisis global. Se realizó un análisis global para los dos tipos de matrices de regeneración ósea, con el fin de obtener las condiciones de la mejor combinación de variables. Los valores óptimos se calcularon de acuerdo al concepto de minimizar la resistencia a la transferencia de carga, encontrándose que las mejores condiciones son: una temperatura de 36,5 °C, una concentración de colágeno de 20 ug/ml y un voltaje de activación de -0,90 V

Tabla 5 Matriz de las mejores condiciones de experimentación.

Factor	Bajo	Alto	Optimo
Temperatura	-1	1	-1
Concentración	-1	1	1
Voltaje DC	-1	1	-1

El análisis estadístico se encuentra en el anexo L.

## 5. CONCLUSIONES

- Con base en los resultados obtenidos de las pruebas electroquímicas y microgravimétricas y el análisis estadístico, se determinó que la mayor cantidad de proteína adsorbida se presentó cuando la superficie es activada con un potencial catódico, coincidiendo con los altos valores del inverso de la resistencia a la transferencia de carga  $R_{ct}^{-1}$  para un potencial de -0,90 V.
- Se comprobó que el colágeno es más afín a las superficies electroactivadas con polarización en comparación con las no activadas ya que se determinó que las pruebas realizadas a 0 V no presentaron una buena adsorción, de esta manera con la electroactivación se genera un ambiente más propicio para que la proteína se adhiera.
- El análisis óptico mostró que las moléculas de colágeno se orientaron en forma alargada, formando redes y direccionándose de acuerdo a la localización de las partículas bioactivas de cerámico ubicadas en la superficie, lo cual fue confirmado mediante microscopía electrónica de barrido (*SEM*). La matriz de regeneración ósea compuesta por PLA/PGA/HAp/Fibras de colágeno, presentó una mayor adsorción debido a la mayor bioactividad de la hidroxiapatita, en comparación con la matriz polimérica con Whitlockita.

## 6. RECOMENDACIONES

- Para posteriores trabajos de investigación en el área de la ingeniería de tejidos, se recomienda usar potenciales de polarización catódicos con el fin de favorecer la adsorción de las proteínas.
- Para la electrodeposición del colágeno se recomienda usar valores de corriente eléctrica menores a 34 mA, ya que la proteína se degrada rápidamente y los cristales de cuarzo pierden sus características iniciales.

## CITAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] W, Norde. Driving forces for protein adsorption at solid surfaces. En: Macromolecular Symposium. 1996, vol. 102, p. 5–81.

[2]. RUBIO E., GASPARIANO-OCOTITLA B., MENDOZA-ANAYA D., RODRIGUEZ-LUGO V., Crecimiento biomimético de hidroxiapatita sobre colágeno, Universidad Autónoma de Puebla, México.

[3] NAVARRO TORO, Melba Eugenia. Desarrollo y caracterización de materiales biodegradables para regeneración ósea. Catalunya, 2005. Trabajo de grado (Doctorado en Ciencias-Especialidad Ingeniería Química). Universidad de Catalunya. Capítulo 1, p 19-31.

[4] GUILLERMO ROJAS CORTÉS, Manuel; VALLEJO DÍAZ, Bibiana; PERILLA, Jairo Ernesto. Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico. En: Revista Ingeniería e Investigación. Abril, 2008, vol. 28 N° 1, p. 57-71.

[5] SORIA, J M; BARCIA-GONZALES, J; ANDRADES, J A; ROMERO, J; MONLEÓN PRADAS, M; GARCÍA-VERDUGO, J M. Uso de biomateriales en medicina regenerativa, aspectos básicos y aplicaciones en el sistema nervioso. En: Revista Trauma Fund. MAPFRE. Enero-Marzo, 2009, vol. 20 N° 1, p. 15-22.

[6] GARLOTTA, Donald. A Literature Review of Poly (Lactic Acid). En: Journal of Polymers and the Environment. Abril, 2001, vol. 9, N° 2, p. 63-84

[7] ESTUPIÑAN DURAN, Hugo A.; LAVERDE CATAÑO, Dionisio; PEÑA B., Dario Yesid; VÁSQUEZ Q., Custodio. Comportamiento electroquímico de un

recubrimiento: Ácido poli L-láctico – Biovidrio, en suero ringer. En: Scientia et Technica. Universidad Tecnológica de Pereira, Año XIII N° 36, Septiembre, 2007; ISSN 0122-1701.

[8] BERNABÉU MARTÍNEZ, E., LÓPEZ-OLIVA MUÑOZ, F., LARENA PELLEJERO, A., TUR GIL, A., DE LA PIEDRA GORDO, M<sup>a</sup> C., MONTERO ESCOBAR; Estudio de la composición ósea para su apropiada regeneración con materiales implantados. En: Patología del aparato locomotor Fundación MAPHRE. Abril 2006, vol. 4 N° 2, p. 202-207

[9] BOCH, Philippe; NIÈPCE, Jean-Claude. Ceramic Materials, Processes, Properties and Applications. Londres.: ISTE Ltd, 2007. p 493-495. ISBN-13: 978-1-905209-23-1

[10] RINCON, Marce; RODRÍGUEZ, Alejandra; LONDOÑO, Marta Elena; ECHAVARRÍA, Alejandro. Fabricación y caracterización de una matriz tridimensional de hidroxiapatita macroporosa para aplicación en ingeniería de tejidos óseos. En: Revista EIA. Junio, 2007, ISSN 1794-1237 N° 7, p. 87-95.

[11] PAREJA MARÍN, Nathalia, ESCOBAR, Diana Marcela, OSSA, Claudia Patricia, ECHAVARRIA, Alejandro. Síntesis y Caracterización de hidroxiapatita microporosa, comparación con un producto comercial. En: Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia. Marzo 2008, vol. 43, p. 67-76.

[12] GUO, Cheng; KAUFMAN, Laura J. Flow and magnetic field induced collagen alignment. Department of Chemistry, Columbia University. En: Biomaterials. 2007, vol. 28, p. 1105-1114.

- [13] FERRER, Montse Charles-Harris. Development and characterisation of completely degradable composite tissue engineering scaffolds. Tesis de Doctorado. Barcelona (Julio, 2007).
- [14] TORBET, Jim; RONZIÈRE Marie- Claire. Magnetic alignment of collagen during self-assembly. En: Biochem Journal, 1984, vol 219, p. 1057-1059.
- [15] CHENG, Xingguo; GURKAN, Umut A.; DEHEN, Christopher J.; TATE, Michael P.; HILLHOUSE, Hugh W.; SIMPSON Garth J; AKKUS, Ozan. An electrochemical fabrication process for the assembly of anisotropically oriented collagen bundles. En: Biomaterials. Mayo, 2008, vol 29, p. 3278-3288.
- [16] ACCIARI, Heloisa A.; OLIVEIRA VERCIK, Luci C.; SANTOS, Márcio L.; GUSTALDY, Antonio. Determinación de la adhesión de hidroxapatita sobre Ti cp utilizando impedancia electroquímica. En: Revista CENIC Ciencias Químicas. 2006, vol 37 N° 2, p. 75-79.
- [17] JIA, Xueen; XIE, Qingji; ZHANG, Youyu; YAO Shouzhuo. Simultaneous quartz crystal microbalance–electrochemical impedance spectroscopy study on the adsorption of anti-human Immunoglobulin G and Its immunoreaction at nanomaterial-modified Au electrode surfaces. En: Analytical Sciences. Junio, 2007, vol 23, p. 689-696.
- [18] Stadler, H; Mondon, M; Ziegler, C. Protein adsorption on surfaces: dynamic contact-angle (DCA) and quartz-crystal microbalance (QCM) measurements. En: Anal Bional Chem. 2003, vol. 375, p. 53-61.
- [19] ARIAS PARDILLA, Joaquín. Síntesis y caracterización de polímeros conductores basados en anilinas sustituidas y su aplicación en electrocatálisis. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante. España.

- [20] ARNAU, Antonio; SOGORB, Tomas; JIMÉNEZ, Yolanda; GÓMEZ, Juan Camilo. Cristales piezoeléctricos de cuarzo en aplicaciones como microbalanza QCM. En: Revista CES MEDICINA. Abril-Septiembre, 2002, vol 16 N° 2, p. 27-37.
- [21] S. Manara, F. Paolucci, B. Palazzo, M. Marcaccio, E. Foresti, G. Tosi, S. Sabbatini, P. Sabatino, G. Altankov, N. Roveri. Electrochemically-assisted deposition of biomimetic hydroxyapatite–collagen coatings on titanium plate. En: Inorganica Chimica Acta. 2008, vol 361, p. 1634 – 1645.
- [22] OMANOVIC, Sasha; ROSCOE, Sharon G. Interfacial Behavior of  $\beta$ -Lactoglobulin at a Stainless Steel Surface An Electrochemical Impedance Spectroscopy Study. En: Journal of Colloid and Interface. 2000, vol. 227, p. 452–460.
- [23] MILONJIĆ, Slobodan K. A consideration of the correct calculation of thermodynamic parameters of adsorption. En: Journal Serb. Chem. Soc. 2007, vol.72, p. 1363–1367
- [24] GALLI MARXER, Carine. Protein and cell adsorption: topographical dependency and layer viscoelastic properties determined with oscillation amplitude of quartz resonator. Tesis doctoral, University of Fribourg. Faculty of Science. Departement of Physical, Switzerland 2002.

## BIBLIOGRAFÍA

- ARNAU, Antonio; SOGORB, Tomas; JIMÉNEZ, Yolanda; GÓMEZ, Juan Camilo. Cristales piezoeléctricos de cuarzo en aplicaciones como microbalanza QCM. En: Revista CES MEDICINA. Abril-Septiembre, 2002, vol 16 N° 2, p. 27-37.
- CHENG, Xingguo; GURKAN, Umut A.; DEHEN, Christopher J.; TATE, Michael P.; HILLHOUSE, Hugh W.; SIMPSON Garth J; AKKUS, Ozan. An electrochemical fabrication process for the assembly of anisotropically oriented collagen bundles. En: Biomaterials. Mayo, 2008, vol 29, p. 3278-3288.
- OMANOVIC, Sasha; ROSCOE, Sharon G. Interfacial Behavior of  $\beta$ -Lactoglobulin at a Stainless Steel Surface An Electrochemical Impedance Spectroscopy Study. En: Journal of Colloid and Interface. 2000, vol. 227, p. 452–460.
- S. Manara, F. Paolucci, B. Palazzo, M. Marcaccio, E. Foresti, G. Tosi, S. Sabbatini, P. Sabatino, G. Altankov, N. Roveri. Electrochemically-assisted deposition of biomimetic hydroxyapatite–collagen coatings on titanium plate. En: Inorganica Chimica Acta. 2008, vol 361, p. 1634 – 1645.

## **ANEXOS**

**Anexo A. Protocolos usados para la síntesis de los polímeros y biocerámicos**

Tabla A1. Ácido Poliláctico.

Etapa	Temperatura (°C)	Presión (mmHg)	Tiempo (horas)
<b>Deshidratación</b>	100	Atmosférica	2-3
<b>Esterificación</b>	180	100	6-7
<b>Oligomeración</b>	180	25	40
<b>Policondensación</b>	180	10	5

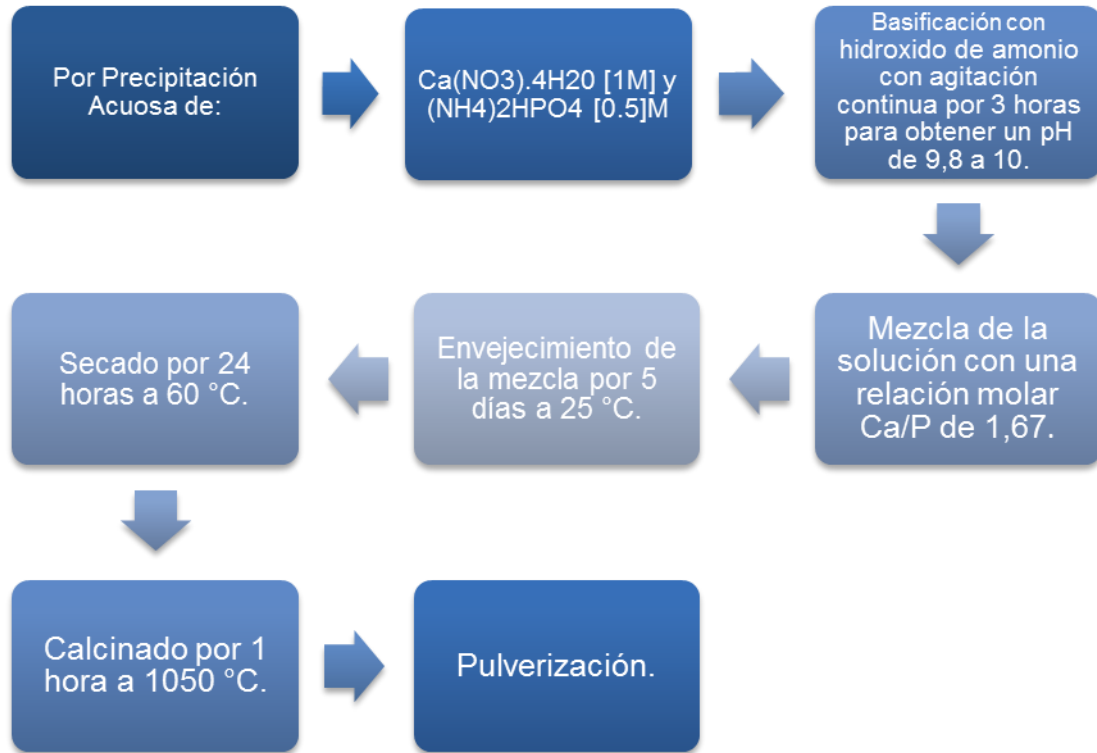
Fuente. Autores

Tabla A2. Ácido Poliglicólico.

Etapa	Temperatura(°C)	Presión (mmHG)	Tiempo (horas)	Agitación
<b>1</b>	190	150	1	Si
<b>2</b>	190	30	4	No
<b>3</b>	230	30	0.5	No
<b>4</b>	190	Atmosférica	20	No

Fuente. Autores

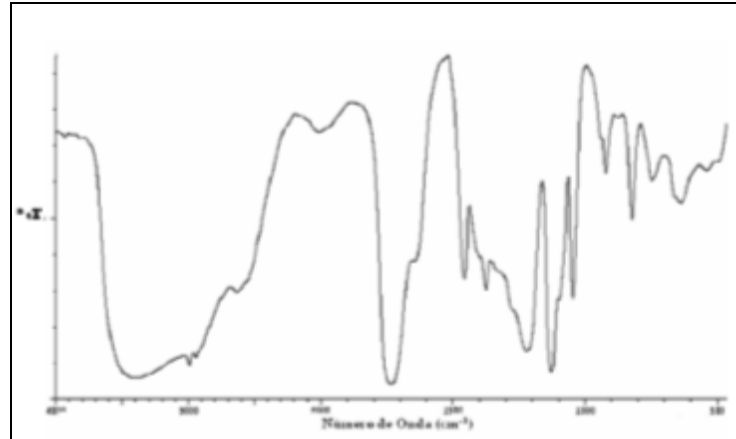
Figura A1. Síntesis de hidroxiapatita.



Fuente. Autores

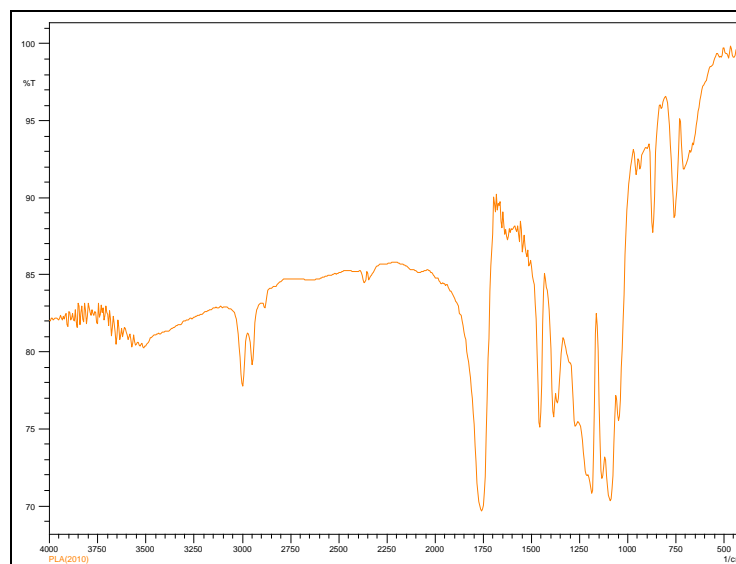
## Anexo B. Caracterización de materiales

Figura B1. Espectro IR teórico para el Ácido Láctico.



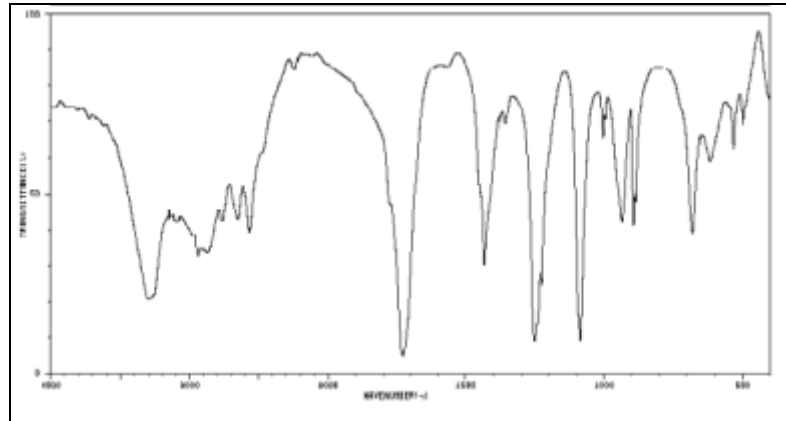
Fuente. Base de datos de la UIS.

Figura B2. Espectro IR experimental para el Ácido Láctico.



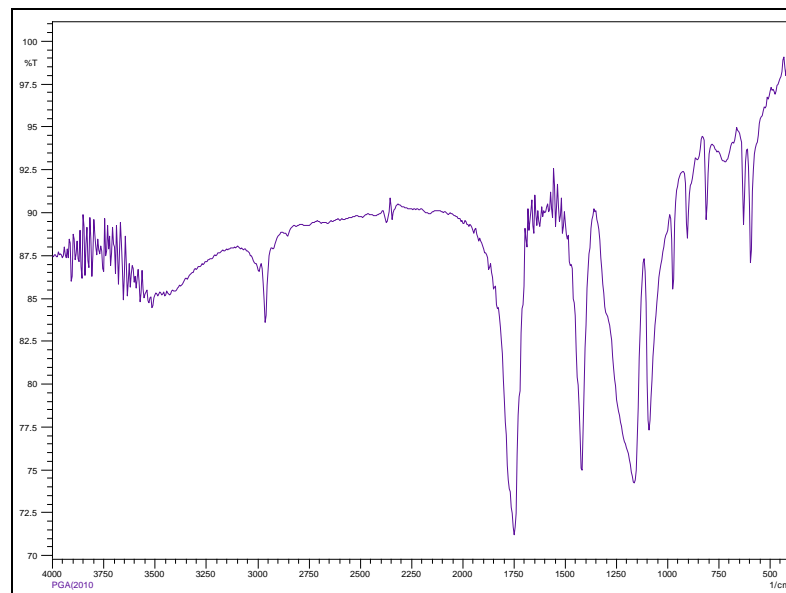
Fuente. Espectrómetro IR de Ingeniería Química.

Figura B3. Espectro IR teórico para el Ácido Poliglicólico.



Fuente. Base de datos de la UIS.

Figura B4. Espectro IR experimental para el Ácido Poliglicólico.



Fuente. Espectrómetro IR de Ingeniería Química.

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



INF-062-10

Bucaramanga, Junio 30 de 2010

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

Cordial saludo:

Por medio de la presente estoy haciendo entrega del resultado de los análisis cuantitativos por Difracción de Rayos-X de dos (2) muestras recibidas el 16 de Junio de 2010, identificadas como "HIDROXIAPATITA y BIOVIDRIO".

Atentamente,

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

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

## METODOLOGÍA

### 1. Preparación y Montaje de las muestras

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

### 2. Toma de datos de difracción

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

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

### 3. Tipo de Análisis

#### Análisis Cualitativo

El análisis cualitativo de las fases presentes en la muestra se realizó mediante comparación del perfil observado con los perfiles de difracción reportados en la base de datos PDF-2 del *International Centre for Diffraction Data* (ICDD).

#### Análisis Cuantitativo

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

### 4. Información suministrada por el cliente

Análisis elemental: No.

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

## RESULTADOS

### 1. HIDROXIAPATITA (C1ZV)

	FASE	No. TARJETA PDF-2	NOMBRE	CUANTITATIVO
Cristalinos	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	010-76-0694	Hidroxiapatita	31.2 % (D.E = 0.4)
	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	000-55-0898	Whitlockita	68.8 % (D.E = 0.6)

Nota:  
D.E = Desviación estándar

Fuente. Laboratorio de Difracción de Rayo-X de la UIS.

Figura B6. Difracción de Rayos-X para la Hidroxiapatita.



INF-050-10

Bucaramanga, Mayo 18 de 2010

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

Cordial saludo:

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

Atentamente,

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

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

## METODOLOGÍA

### 1. Preparación y Montaje de las muestras

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

### 2. Toma de datos de difracción

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

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

### 3. Tipo de Análisis

#### Análisis Cualitativo

El análisis cualitativo de las fases presentes en la muestra se realizó mediante comparación del perfil observado con los perfiles de difracción reportados en la base de datos PDF-2 del *International Centre for Diffraction Data* (ICDD).

#### Análisis Cuantitativo

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

### 4. Información suministrada por el cliente

**Análisis elemental:** No.

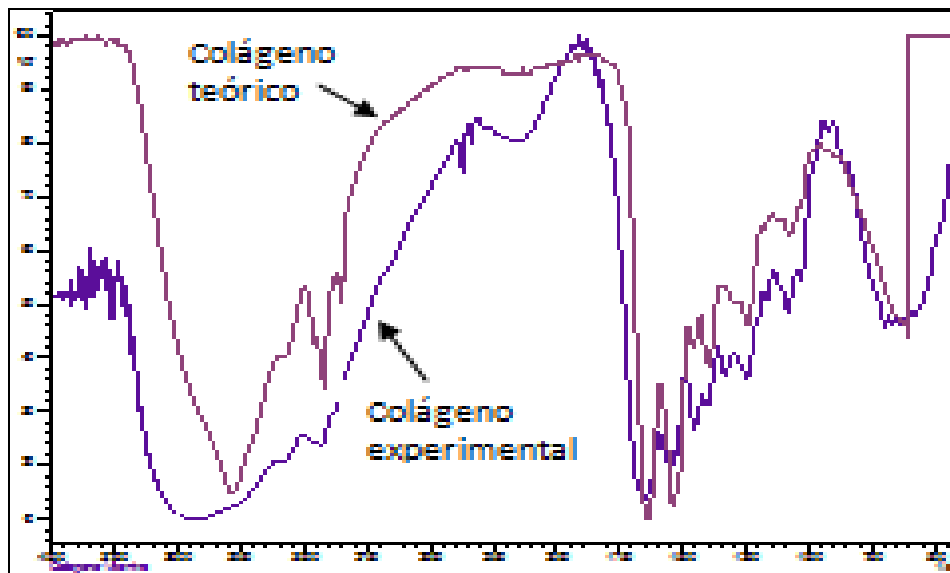
**Interés por alguna(s) fase(s) en particular:** Identificación y cuantificación de fases cristalinas de compuestos de Ca y P.

#### 1. HIDROXIAPATITA (C2EW)

FASE		No. TARJETA PDF-2	NOMBRE	CUANTITATIVO
Cristalinos	$\text{Ca}_5 (\text{PO}_4)_3 \text{OH}$	010-76-0694	Hidroxiapatita	43.7 % (D.E = 0.5)
	$\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2$	000-09-0169	Whitlockita	38.2 % (D.E = 0.5)
Total Cristalino				81.9 %
Amorfos y otros				18.1 %

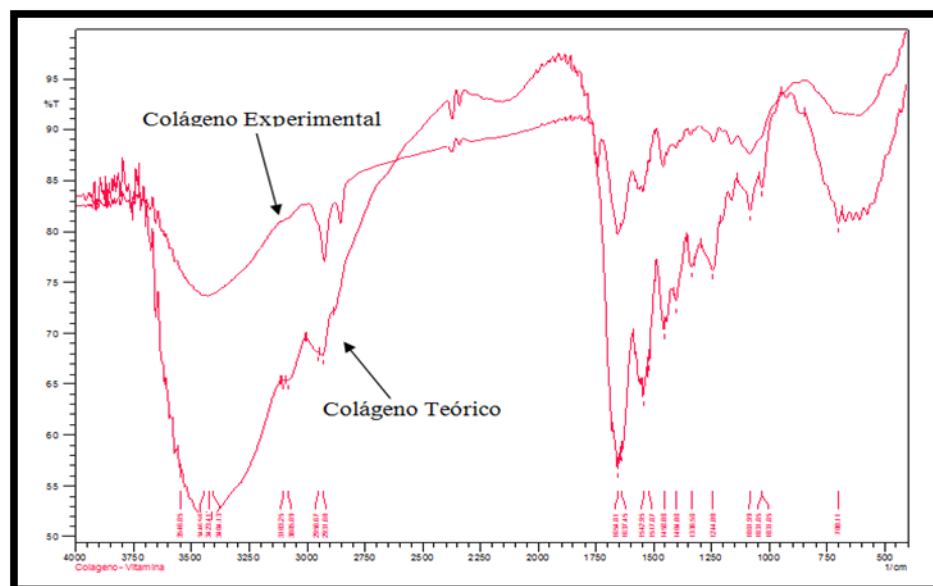
Fuente. Laboratorio de Difracción de Rayo-X de la UIS

Figura B7. FT-IR Teórico y experimental del colágeno comercial.



Fuente. Base de datos y Espectrómetro FT-IR de Ingeniería Química.

Figura B8. FT-IR Teórico y experimental del Colágeno tipo I en fibras.



Fuente. Base de datos y Espectrómetro FT-IR de Ingeniería Química.

### **Anexo C. Peso y volúmenes de las soluciones de biopolímero y biocerámico.**

La relación porcentual de PLA/PGA fue del 70/30 y de los biocerámicos del 10%, disolviéndose en acetona al 15 % p/v.

Tabla E1. Pesos y Volúmenes de las soluciones.

<b>Solución</b>	<b>PLA/PGA (g)</b>	<b>HAp (g)</b>	<b>Whitlockita (g)</b>	<b>Acetona (ml)</b>
<b>1</b>	10,8	1,2	–	80
<b>2</b>	10,8	–	1,2	80

Fuente. Autores

### Anexo D. Diseño experimental.

Se realizó un diseño de experimentos factorial  $2^3$ , con dos bloques y un punto al centro para cada uno de los biocerámicos. En este diseño se contará con tres factores A, B y C, con dos niveles cada uno; -1 para el nivel de cada factor más bajo, 1 para el nivel más alto y como se trabajara con un punto al centro se tendrá la notación 0.

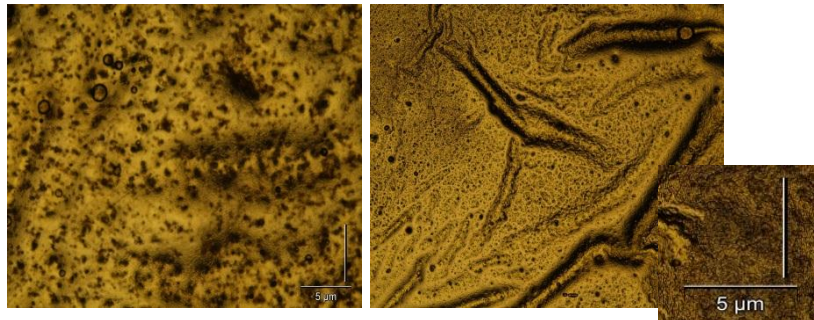
Experimento	Temperatura (°C)	Concentración (ug/ml)	Voltaje (V)
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>1</b>	<b>- 1</b>	<b>- 1</b>	<b>- 1</b>
<b>2</b>	<b>+ 1</b>	<b>- 1</b>	<b>- 1</b>
<b>3</b>	<b>- 1</b>	<b>+ 1</b>	<b>- 1</b>
<b>4</b>	<b>+ 1</b>	<b>+ 1</b>	<b>- 1</b>
<b>5</b>	<b>- 1</b>	<b>- 1</b>	<b>+ 1</b>
<b>6</b>	<b>+ 1</b>	<b>- 1</b>	<b>+ 1</b>
<b>7</b>	<b>- 1</b>	<b>+ 1</b>	<b>+ 1</b>
<b>8</b>	<b>+ 1</b>	<b>+ 1</b>	<b>+ 1</b>
<b>9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Fuente. Autores

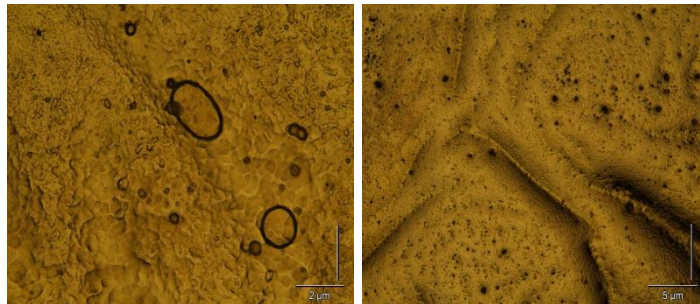
**Anexo E. Micrografías de los cristales recubiertos antes y después de realizar las pruebas de EQCM..**

**Cristales recubiertos con solución de PLA+ PGA+ Whitlockita+Fibras de Colágeno.**

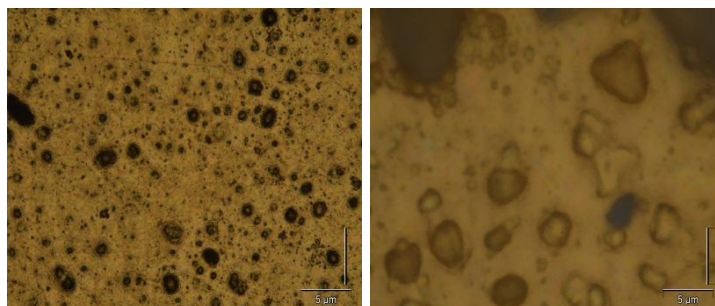
Prueba 1: Temperatura 36,5 °C; Concentración 5  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje -0,90 V. 40x escala 5  $\mu\text{m}$



Prueba 2: Temperatura 38,5 °C; Concentración 5  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje -0,90 V. a. 100x escala 2  $\mu\text{m}$ . b. 40x escala 5  $\mu\text{m}$

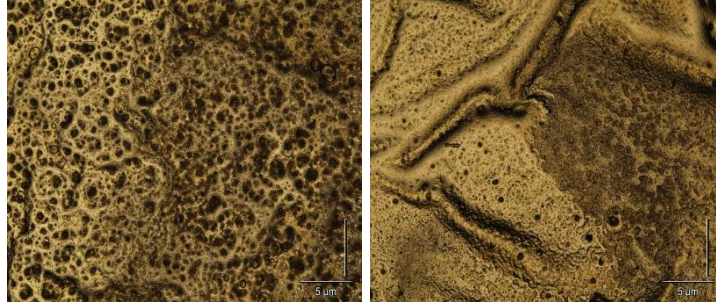


Prueba 3: Temperatura 36,5°C; Concentración 20 $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje -0,90 V. a y b. 40x escala 5  $\mu\text{m}$



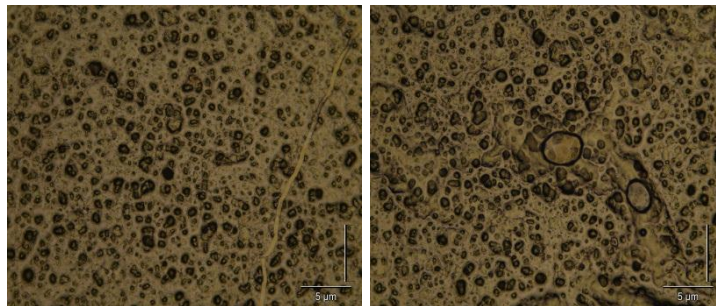
Prueba 4: Temperatura 38,5°C; Concentración 20  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje -0,90 V. a y b.

40x escala 5  $\mu\text{m}$



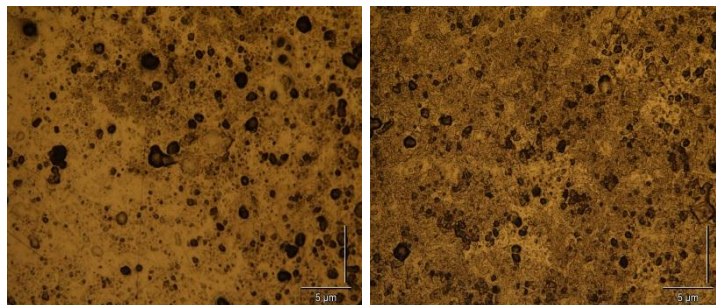
Prueba 5: Temperatura 36,5 °C; Concentración 5  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje 0,47 V. 40x escala

5  $\mu\text{m}$

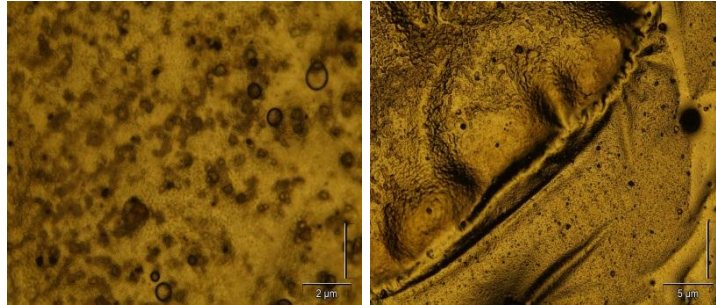


Prueba 6: Temperatura 38,5 °C; Concentración 5  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje 0,47 V. a y b. 40x

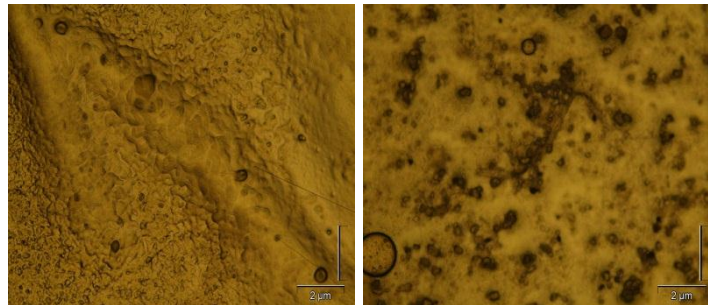
escala 5  $\mu\text{m}$



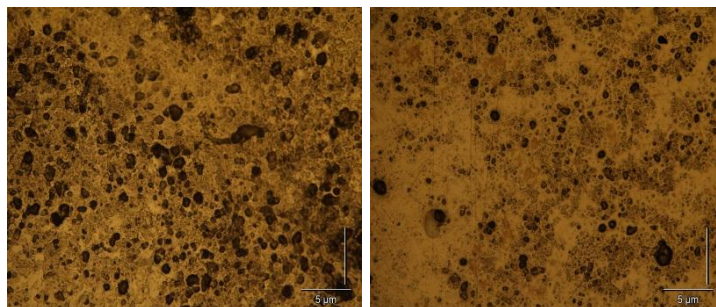
Prueba 7: Temperatura 36,5°C; Concentración 20 $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje 0,47 V. a. 100x escala 2  $\mu\text{m}$ . b) 40x escala 5  $\mu\text{m}$



Prueba 8: Temperatura 38,5°C; Concentración 20 $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje 0,47 V a y b. 100x escala 2  $\mu\text{m}$

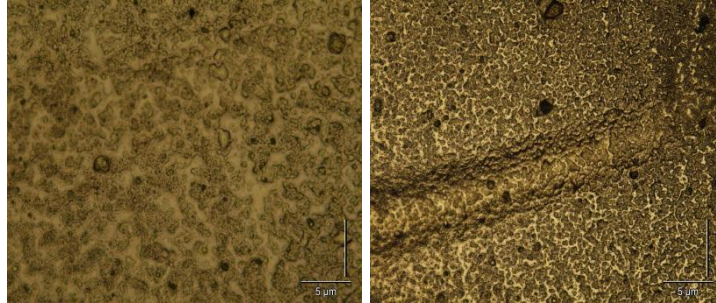


Prueba 9: Temperatura 37,5°C; Concentración 12,5 $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje 0 V. a y b. 40x escala 5  $\mu\text{m}$

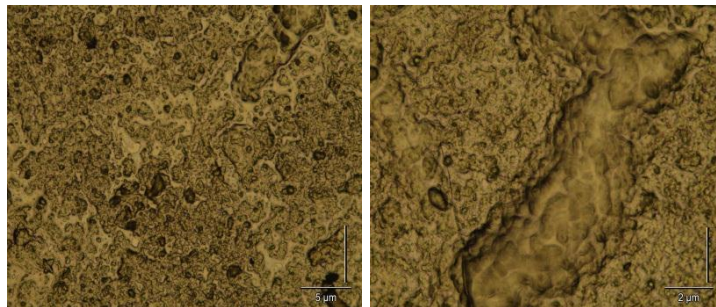


## Cristales recubiertos con solución de PLA+PGA+Hidroxiapatita+Fibras de Colágeno

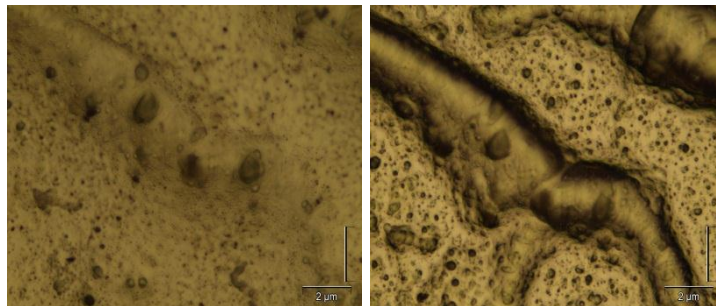
Prueba 1: Temperatura 36,5 °C; Concentración 5  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje -0,90 V. a y b.  
40x escala 5 $\mu\text{m}$



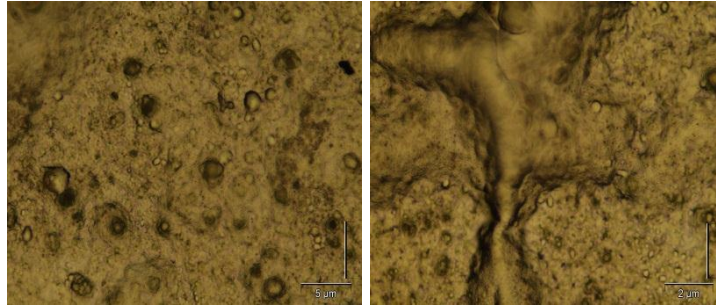
Prueba 2: Temperatura 38,5 °C; Concentración 5  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje -0,90 V a.40x  
escala 5 $\mu\text{m}$  b. 100x escala 2 $\mu\text{m}$



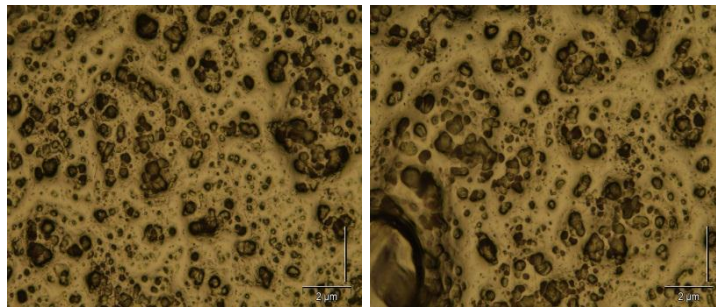
Prueba 3: Temperatura 36,5°C; Concentración 20 $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje -0,90 V a y b.  
100x escala 2 $\mu\text{m}$ .



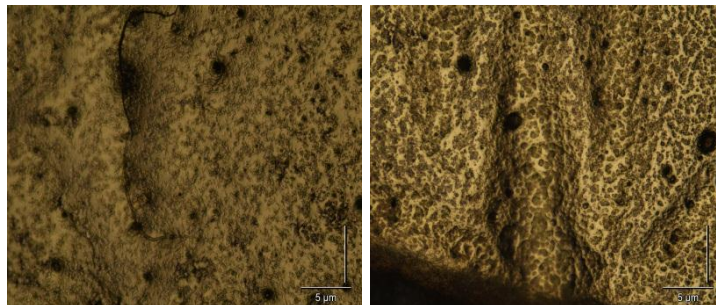
Prueba 4: Temperatura 38,5 °C; Concentración 20  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje -0,90 V a. 40x escala 5  $\mu\text{m}$ . b. 100x escala 2  $\mu\text{m}$ .



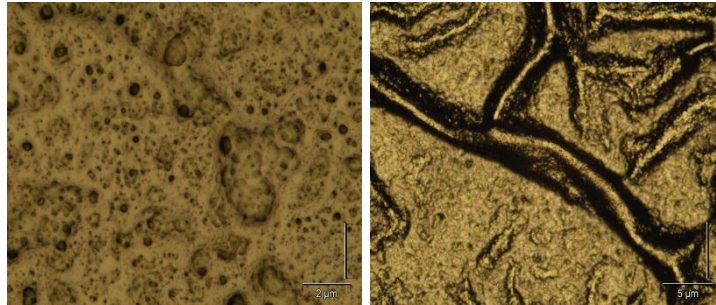
Prueba 5: Temperatura 36,5 °C; Concentración 5  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje 0,47 V. a y b. 100x escala 5  $\mu\text{m}$



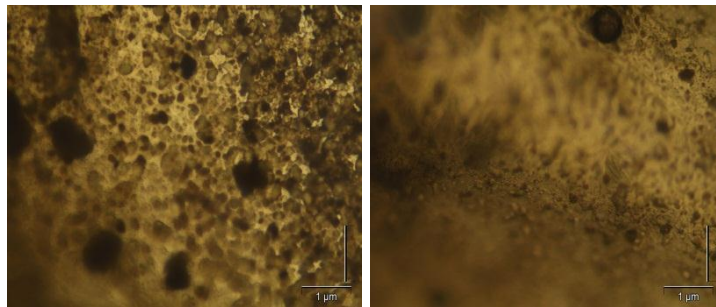
Prueba 6: Temperatura 38,5 °C; Concentración 5  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje 0,47 V. a y b. 40x escala 5  $\mu\text{m}$



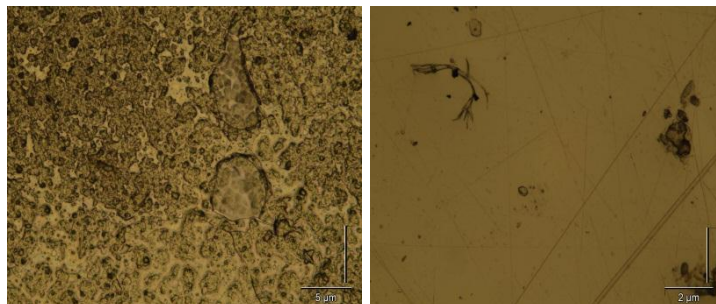
Prueba 7: Temperatura 36,5 °C; Concentración 20  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje 0,47 V.a. 100x  
escala 2  $\mu\text{m}$  b. 40x escala 5  $\mu\text{m}$



Prueba 8: Temperatura 38,5 °C; Concentración 20  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje 0,47 V.a y b.  
400x escala 1  $\mu\text{m}$

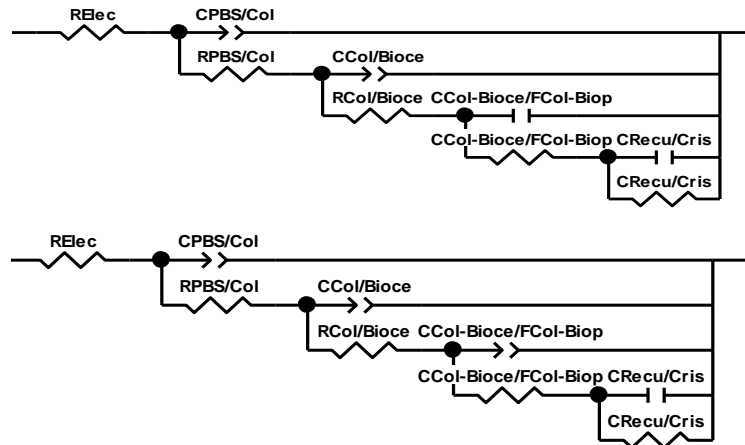


Prueba 9: Temperatura 37,5°C; Concentración 12,5  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje 0 V.a. 40x  
escala 5  $\mu\text{m}$  b. 100x escala 2  $\mu\text{m}$

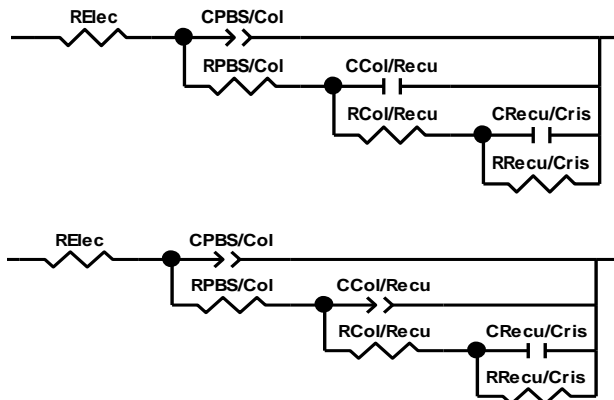


## Anexo F. Circuitos Equivalentes.

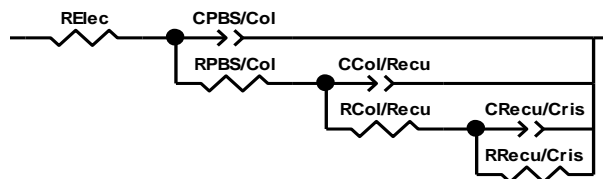
Pruebas a -0,90 V.



Pruebas a 0,47 V.



Pruebas a 0 V.



Donde:

R Elec: Resistencia del PBS.

C PBS/Col: Capacitancia del PBS sobre el colágeno.

R PBS/Col: Resistencia del PBS sobre el colágeno.

C Col/Bioce: Capacitancia del colágeno sobre el biocerámico.

R Col/Bioce: Resistencia del colágeno sobre el biocerámico.

C Col-Bioce/FCol-Biopo: Capacitancia del colágeno-biocerámico sobre las fibras de colágeno y los polímeros.

R Col-Bioce/FCol-Biopo: Resistencia del colágeno-biocerámico sobre las fibras de colágeno y los polímeros.

C Recu/Cris: Capacitancia del recubrimiento sobre el cristal.

R Recu/Cris: Resistencia del recubrimiento sobre el cristal.

C Col/Recu: Capacitancia del colágeno sobre el recubrimiento.

R Col/Recu: Resistencia del colágeno sobre el recubrimiento.

C Recu /Cris: Capacitancia del recubrimiento sobre el cristal.

R Recu /Cris: Resistencia del recubrimiento sobre el cristal.

### Anexo G. Datos obtenidos de la simulación en Z-View.

Solución de HAp a -0,90V.				
ELEMENTO	T (°C) 36,5		T (°C) 38,5	
	Exp 1	Exp 3	Exp 2	Exp 4
RElec	39,1	40,46	36,29	39
C PBS/Col-T	5,7470E-05	6,3199E-05	5,2403E-05	5,7231E-05
C PBS/Col-P	0,89038	0,88469	0,89918	0,8889
R PBS/Col	3995	10521	7049	5993
C Col/Bioce-T	4,8979E-05	9,4707E-05	2,0708E-05	2,8982E-05
C Col/Bioce-P	0,71909	0,70817	1,021	0,86299
R Col/Bioce	6834	4882	4490	6263
C Col-Bioce/FCol-BBiopo	N	3,5171E-05	N	N
C Col-Bioce/FCol-Biopo-T	2,9710E-04	N	1,0552E-04	2,8768E-04
C Col-Bioce/FCol-Biopo -P	0,85475	N	0,70222	0,89198
R Col-Bioce/FCol-Biopo	702,50	581,1	6353	489,70
C Recu/Cris	3,4731E-04	1,9633E-04	1,4391E-04	3,1531E-04
R Recu/Cris	14326	13135	18951	15004
Chi-Squared	1,6521E-04	1,8648E-04	9,6758E-05	1,1501E-04
Solución de HAp a -0,90 V.				
ELEMENTO	T (°C) 36,5		T (°C) 38,5	
	Exp 5	Exp 7	Exp 6	Exp 8
RElec	43,79	37,54	41,18	35,2
C PBS/Col-T	3,8543E-05	2,7097E-05	2,5784E-05	1,2096E-02
C PBS/Col-P	0,88603	0,90119	0,90552	0,27699
R PBS/Col	97961	20363	78392	111,4
C Col/Scaffold	8,2345E-05	N	N	N
C Col/Recu-T	N	6,6261E-06	1,7337E-01	6,3646E-05
C Col/Recu-P	N	0,8221	0,99691	0,91175
R Col/Recu	24576	58678	23466	86380
C Recu /Cris-T	N	5,7575E-05	N	N
C Recu /Cris-P	N	1,142	N	N
C Recu /Cris	1,4652E-04	N	1,7502E-03	4,7594E-05
R Recu /Cris	79328	58268	73531	72026
Chi-Squared	9,1060E-04	1,8900E-04	7,2850E-04	7,9957E-04

Solución de HAp a 0 V.	
	T (°C) 37,5
<b>ELEMENTO</b>	Exp 9
<b>RElec</b>	33,77
<b>C PBS/Col-T</b>	3,2296E-05
<b>C PBS/Col-P</b>	0,89948
<b>R PBS/Col</b>	140600
<b>C Col/Recu-T</b>	8,8395E-05
<b>C Col/ Recu -P</b>	0,84736
<b>R Col/ Recu</b>	45985
<b>C Recu /Cris-T</b>	2,3519E-03
<b>C Recu /Cris-P</b>	1,211
<b>R Recu /Cris</b>	11180
<b>Chi-Squared</b>	1,7894E-04

Solución de Whitlockita a -0,9 V.				
ELEMENTO	T (°C) 36,5		T (°C) 38,5	
	Exp 1	Exp 3	Exp 2	Exp 4
<b>RElec</b>	37,95	41,69	39,8	34,6
<b>C PBS/Col-T</b>	5,7126E-05	1,3641E-04	5,9858E-05	9,8762E-05
<b>C PBS/Col-P</b>	0,89327	0,85911	0,91674	0,87339
<b>R PBS/Col</b>	2744	17829	7290	2776
<b>C Col/Bioce-T</b>	3,2083E-05	1,4888E-02	2,9025E-05	6,0835E-05
<b>C Col/Bioce-P</b>	0,66278	0,36209	0,9538	0,78855
<b>R Col/Bioce</b>	6509	4393	7058	5004
<b>C Col-Bioce/FCol-Biopo</b>	N	N	N	6,2168E-04
<b>C ol-Bioce/FCol-Biopo-T</b>	1,2060E-04	1,5375E-02	1,3739E-04	N
<b>C Col-Bioce/FCol-Biopo-P</b>	0,36248	0,39318	0,8928	N
<b>R Col-Bioce/FCol-Biopo</b>	25214	1788	2216	528,1
<b>C Recu/Cris-T</b>	8,5062E-06	N	N	N
<b>C Recu/Cris -P</b>	0,4398	N	N	N
<b>C Recu/Cris</b>	N	3,0517E-02	1,5201E-04	6,2386E-04
<b>R Recu/Cris</b>	25508	620	37324	12587
<b>Chi-Squared</b>	4,6233E-04	1,2822E-04	2,6144E-04	1,8129E-04

Solución de Whitlockita a 0,47 V.				
ELEMENTO	T (°C) 36,5		T (°C) 38,5	
	Exp 5	Exp 7	Exp 6	Exp 8
<b>RElec</b>	38,92	37,83	37,9	40
<b>C PBS/Col</b>	N	N	N	1,6239E-05
<b>C PBS/Col-T</b>	4,3914E-05	2,2629E-04	5,9379E-05	N
<b>C PBS/Col-P</b>	0,87943	0,78117	0,8122	N
<b>R Elec/Col</b>	4615	17947	226240	28,99
<b>C Col/Recu</b>	9,2162E-05	1,1923E-04	N	N
<b>C Col/Recu -T</b>	N	N	1,2305E-06	4,1775E-05
<b>C Col/Recu -P</b>	N	N	0,65174	0,84795
<b>R Col/Recu</b>	25008	88327	181730	183630
<b>C Recu /Cris-T</b>	N	N	1,3175E-05	N
<b>CRecu /Cris-P</b>	N	N	1,124	N
<b>C Recu /Cris</b>	1,4317E-04	3,9898E-05	N	5,9354E-05
<b>R Recu /Cris</b>	24351	175620	46377	760480
<b>Chi-Squared</b>	1,6518E-04	5,7640E-04	9,9867E-05	8,2995E-04

Solución de Whitlockita a 0 V.	
ELEMENTO	T (°C) 37,5
<b>RElec</b>	Exp 9
<b>RElec</b>	33,23
<b>C PBS/Col-T</b>	4,1296E-05
<b>C PBS/Col-P</b>	0,89948
<b>R PBS/Col</b>	120300
<b>C Col/Recu-T</b>	8,6256E-05
<b>C Col/ Recu -P</b>	0,8843
<b>R Col/ Recu</b>	45670
<b>C Recu /Cris-T</b>	2,9001E-03
<b>C Recu /Cris-P</b>	1,102
<b>R Recu /Cris</b>	10977
<b>Chi-Squared</b>	1,8900E-04

**Anexo H. Datos para el cálculo de las isothermas de Langmuir y la energía libre de Gibbs de adsorción..**

Datos obtenidos de mediciones con EIE para solución con Hidroxiapatita

Voltaje V	T [K]	C[ug/ml]	Rct [ $\Omega$ ]	$\Gamma_{\text{máx}}$ [mol/cm <sup>2</sup> ]	Bads [ml/ug]	(-)ΔG [J/mol]
<b>-0,90</b>	309,5	5	6834	0,0002	0,3251	42993,9098
		20	4882			
	311,5	5	4490	0,00014	0,5798	44482,4421
		20	6263			
<b>0,47</b>	309,5	5	24576	0,00001428	0,3080	42855,2152
		20	58678			
	311,5	5	23466	0,00000093	2,5590	48302,6202
		20	86380			

Datos obtenidos de mediciones con EIE para solución con Whitlockita

Voltaje	[K]	C[ug/ml]	Rct [ $\Omega$ ]	$\Gamma_{\text{máx}}$ [mol/cm <sup>2</sup> ]	Bads [ml/ug]	(-)ΔG [J/mol]
<b>-0,90</b>	309,5	5	6509	0,000271	0,2614	42432,367
		20	4393			
	311,5	5	7058	0,0002315	0,3154	42915,809
		20	5004			
<b>0,47</b>	309,5	5	25008	9,1381E-06	0,2592	42410,94451
		20	88327			
	311,5	5	181730	5,4270E-06	14,5466	52774,07268
		20	183630			

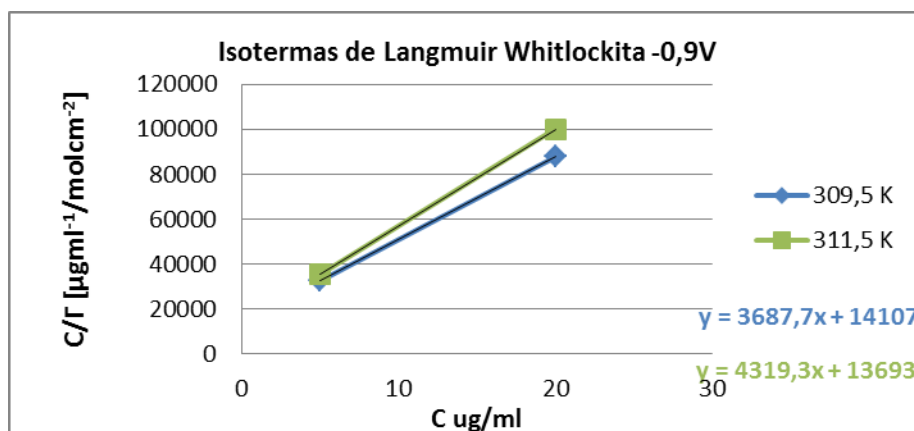
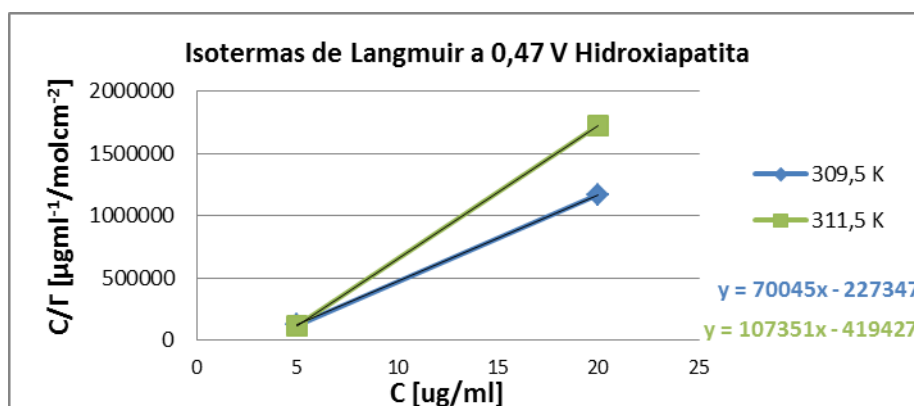
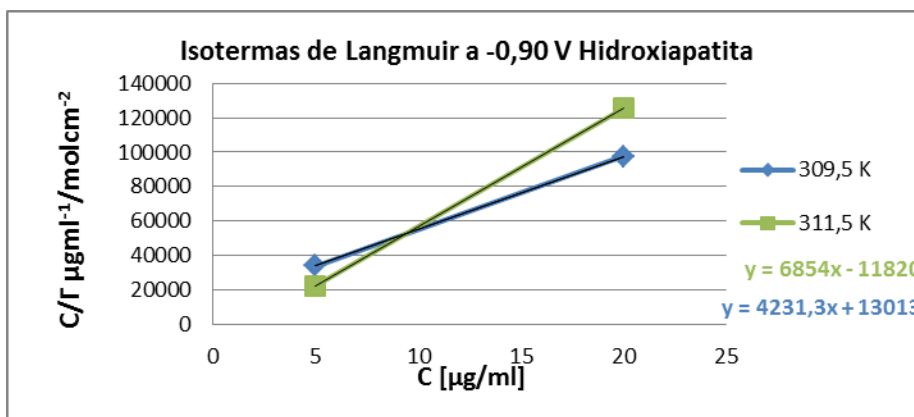
Datos obtenidos de mediciones con la QCM para solución con Hidroxiapatita

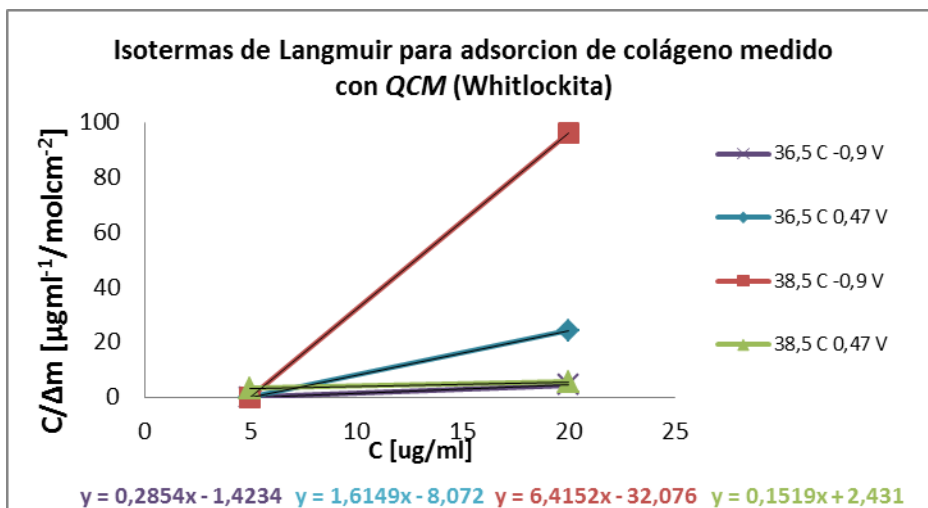
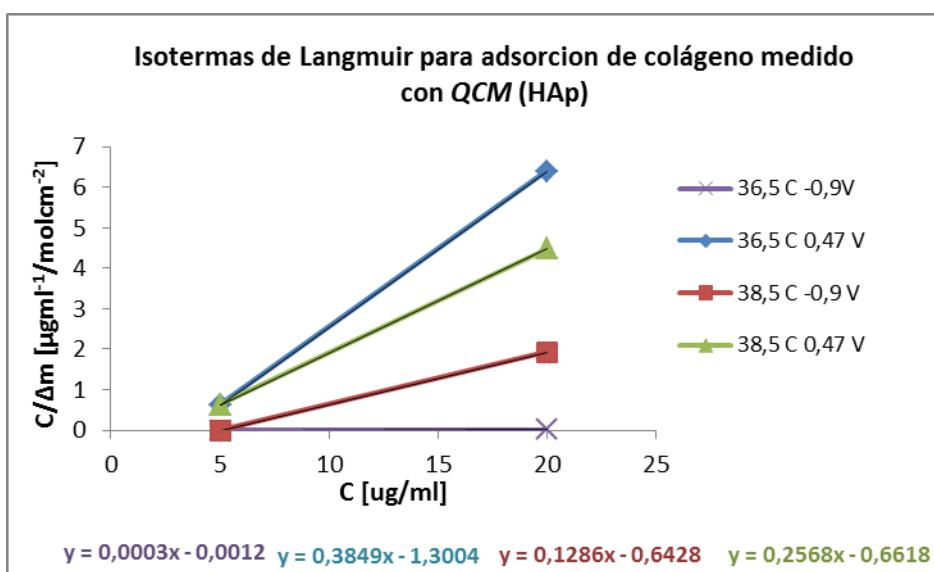
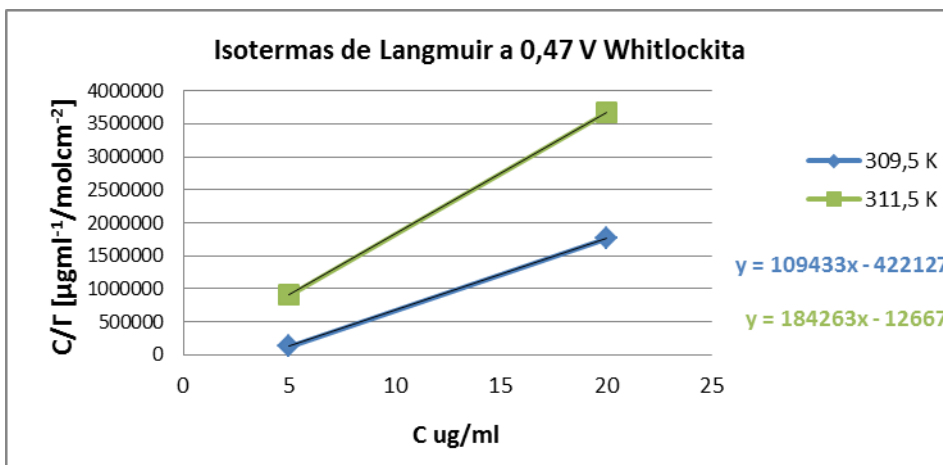
Voltaje (V)	T °C	C ug/ml	$\Delta$ mprom	C/ $\Delta$ m	$\Delta$ mmax	Bads (ml/ug)	(-) $\Delta$ G
<b>-0,90</b>	36,5	5	48361,04	0,00010	833,3333	4	49451,91
		20	4866,6891	0,0041			
	38,5	5	37924,1283	0,00013	0,6248	4,159	49551,57
		20	10,3688	1,9288			
<b>0,47</b>	36,5	5	8,0089	0,6243	1,5556	4,9984	50025,30
		20	3,1258	6,3982			
	38,5	5	8,0355	0,6222	1,5110	6,1966	50578,22
		20	4,4699	4,4743			

Datos obtenidos de mediciones con la QCM para solución con Whitlockita

Voltaje (V)	T °C	C ug/ml	$\Delta$ mprom	C/ $\Delta$ m	$\Delta$ mmax	Bads	(-) $\Delta$ G
<b>-0,90</b>	36,5	5	1432,38	0,0034	0,7025	4,9873	50019,6
		20	4,67	4,2842			
	38,5	5	35956,77	0,00013	0,1238	4,9984	50025,3
		20	0,21	96,2274			
<b>0,47</b>	36,5	5	1868,96	0,0026	0,0311	5	50026,1
		20	0,83	24,2266			
	38,5	5	1,57	3,1903	0,1612	5,8940	50449,43
		20	3,66	5,4683			

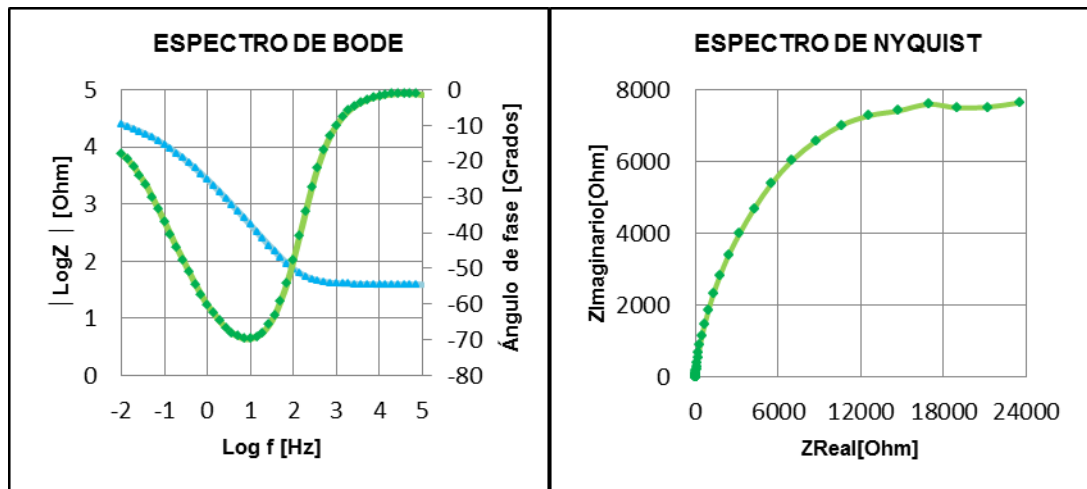
Anexo I. Isotermas de adsorción de Langmuir a partir de mediciones electroquímicas y microbalanza de cristal de cuarzo.



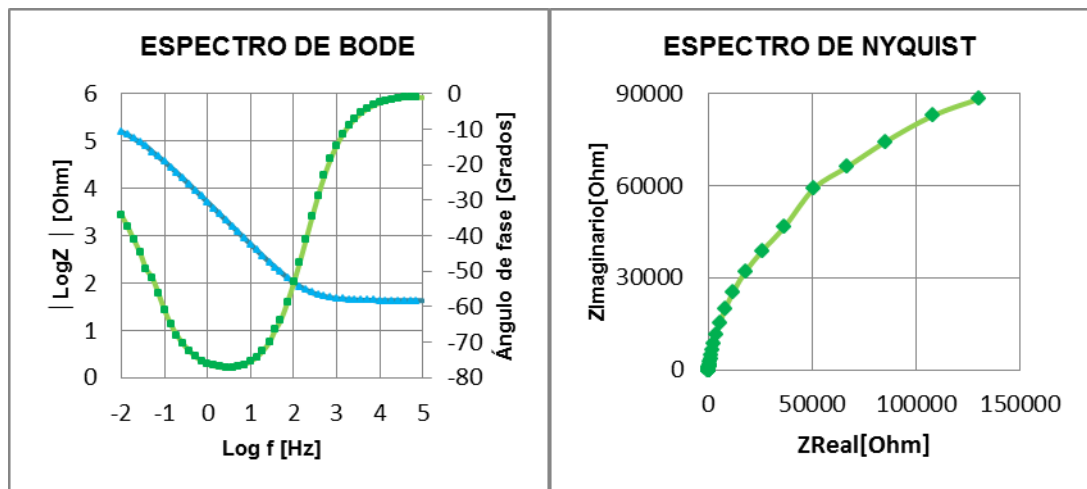


## Anexo J. Espectros experimentales de Nyquist y Bode para la solución con HAp.

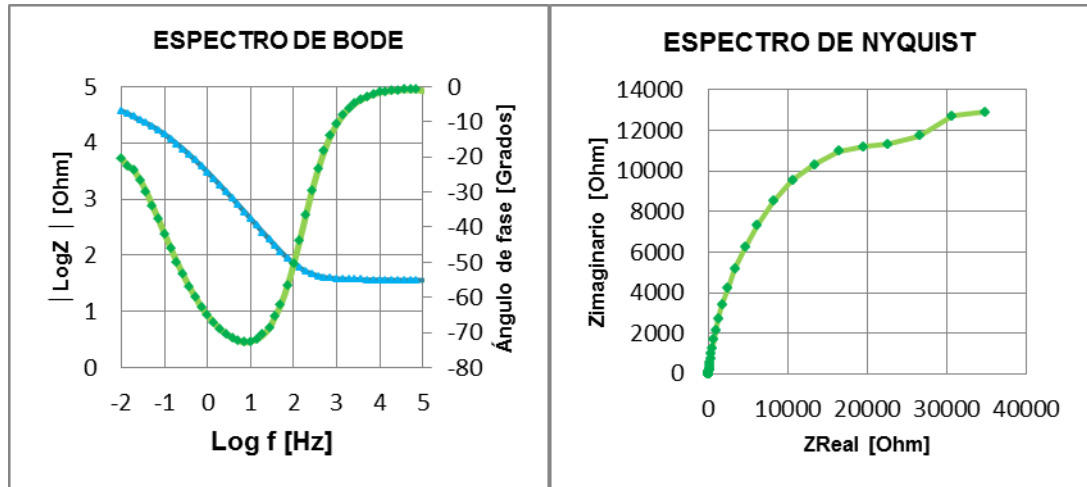
Prueba 1: Temperatura 36,5 °C; Concentración 5  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje -0,90 V.



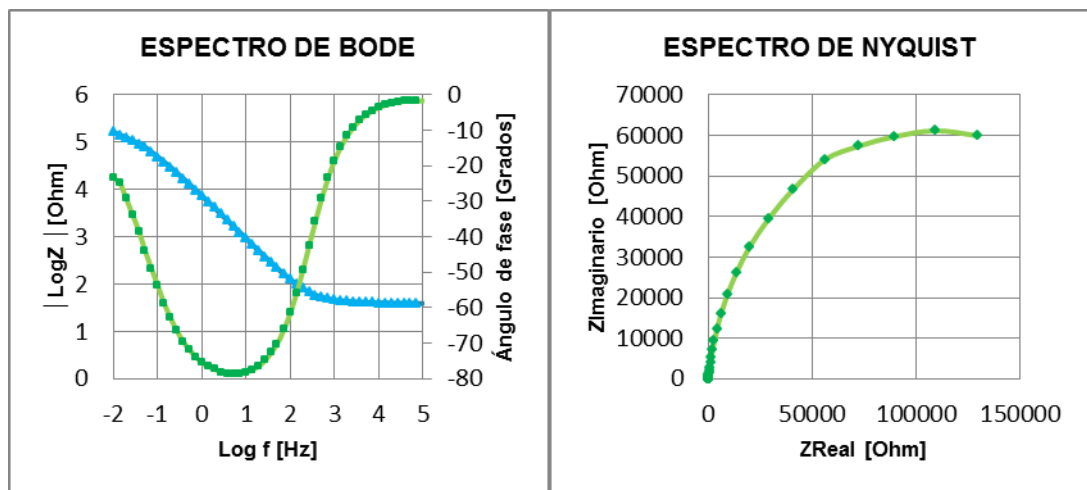
Prueba 5: Temperatura 36,5 °C; Concentración 5  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje 0,47 V.



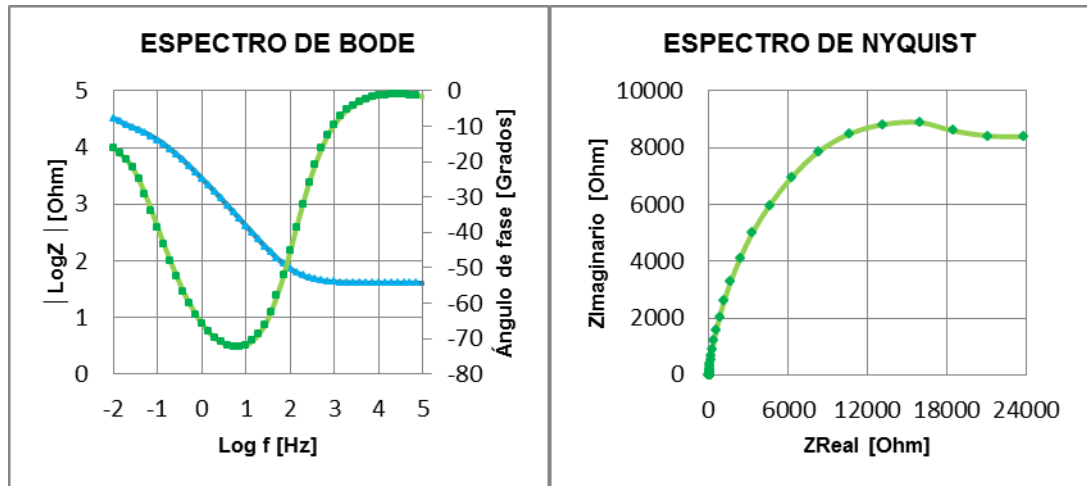
Prueba 2: Temperatura 38,5 °C; Concentración 5  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje -0,90 V.



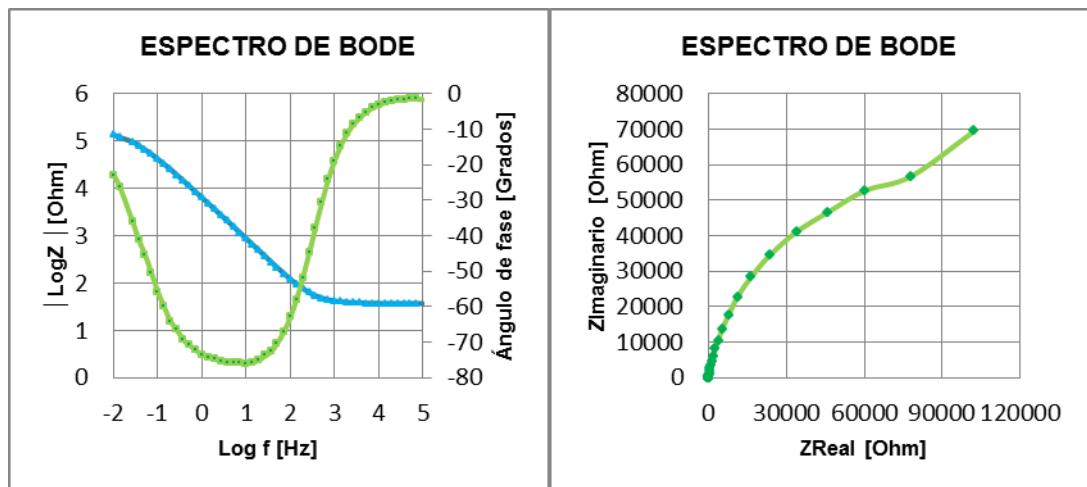
Prueba 6: Temperatura 38,5 °C; Concentración 5  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje 0,47 V.



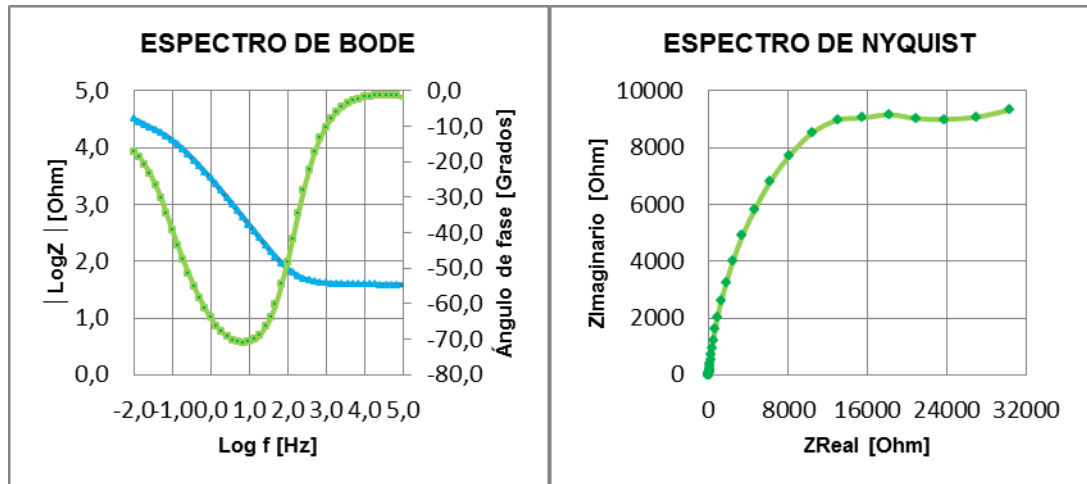
Prueba 3: Temperatura 36,5 °C; Concentración 20  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje -0,9° V.



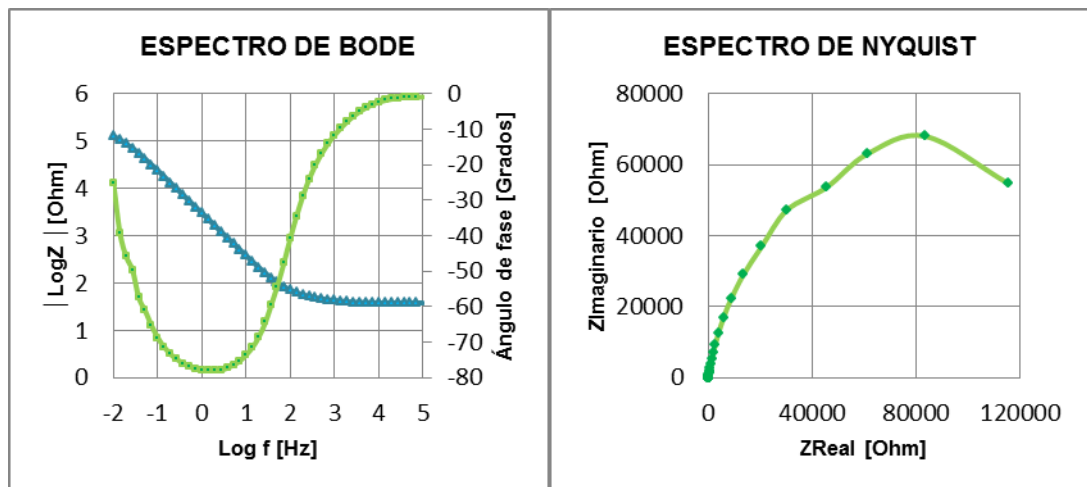
Prueba 7: Temperatura 36,5 °C; Concentración 20  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje 0,47 V.



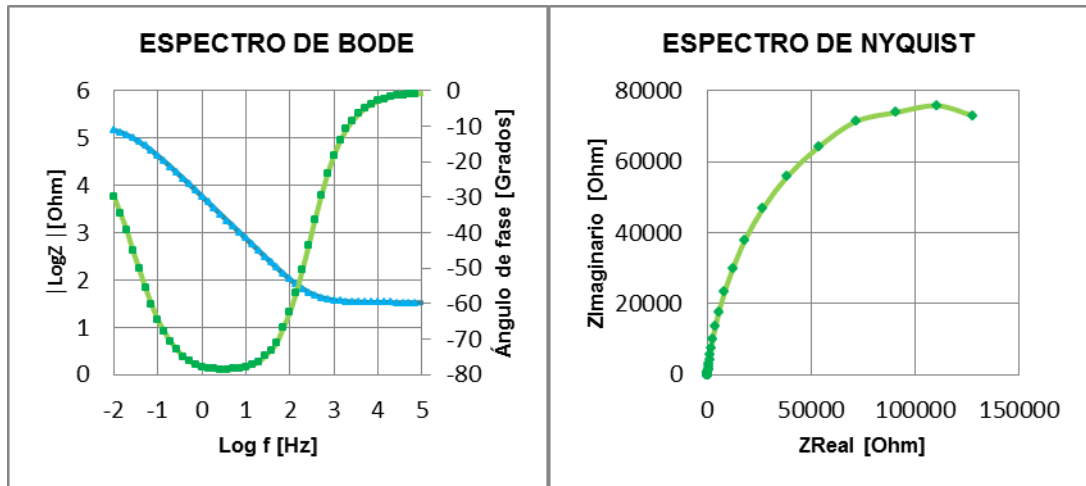
Prueba 4: Temperatura 38,5 °C; Concentración 20  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje -0,90 V.



Prueba 8: Temperatura 38,5 °C; Concentración 20  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje 0,47 V.

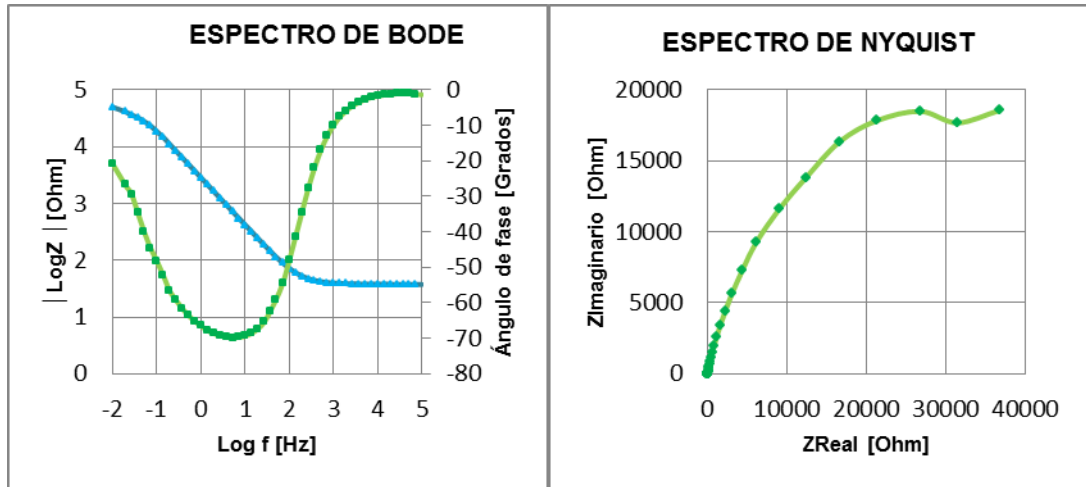


Prueba 9: Temperatura 37,5 °C; Concentración 12,5  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje 0 V.

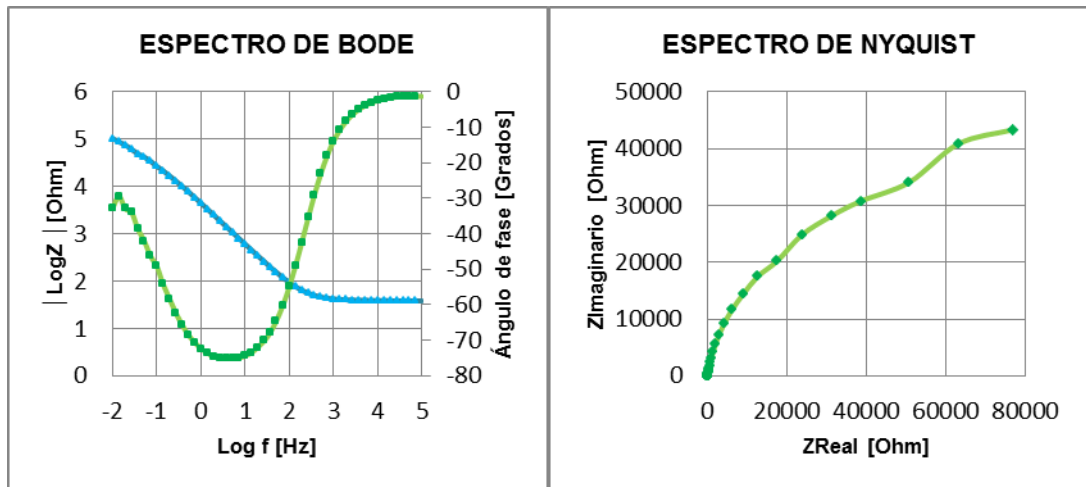


## Anexo K. Espectros experimentales de Nyquist y Bode para la solución con Whitlockita

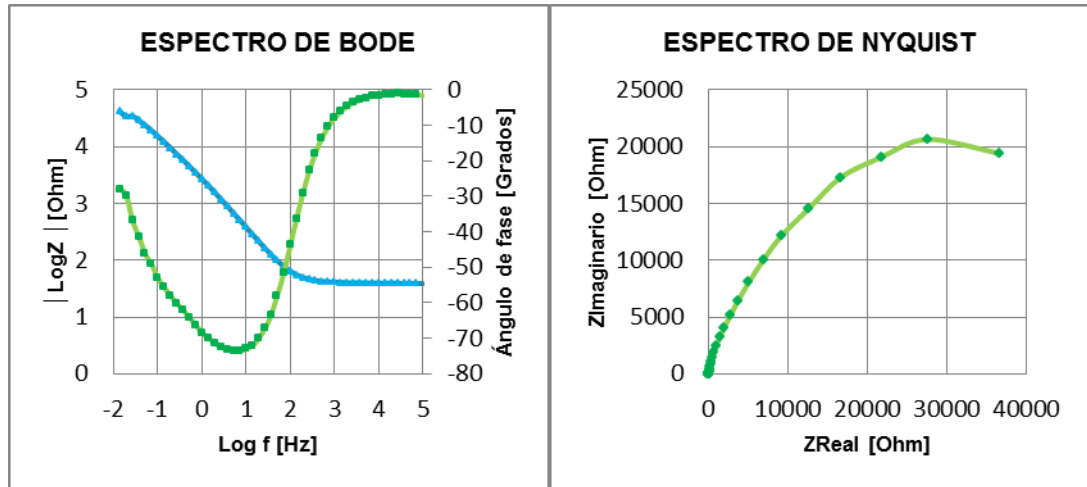
Prueba 1: Temperatura 36,5 °C; Concentración 5  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje -0,90 V.



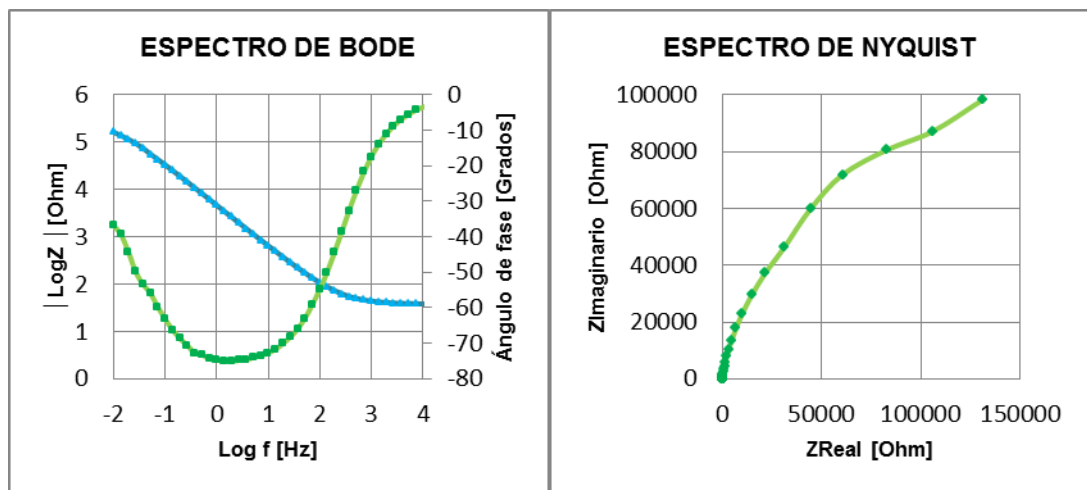
Prueba 5: Temperatura 36,5 °C; Concentración 5  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje 0,47 V.



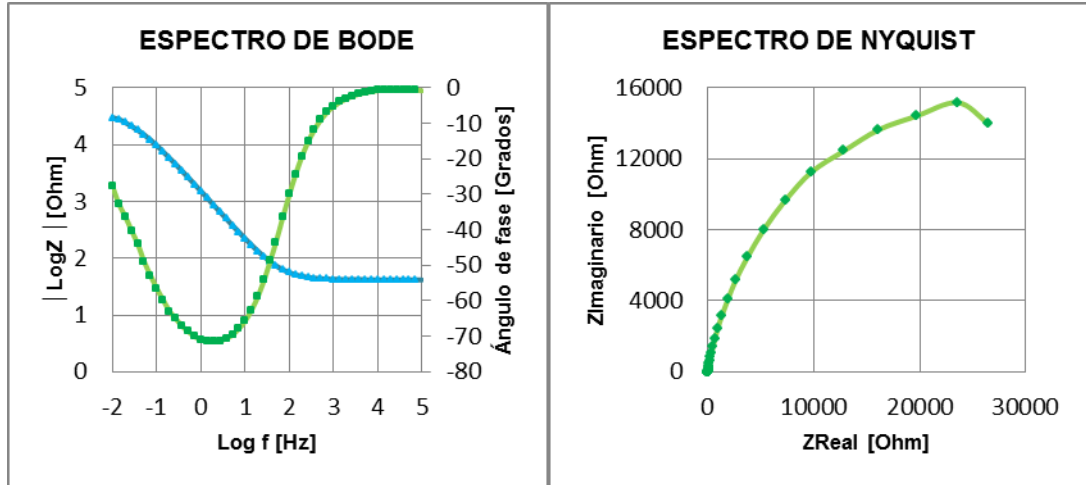
Prueba 2: Temperatura 38,5 °C; Concentración 5  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje -0,90 V.



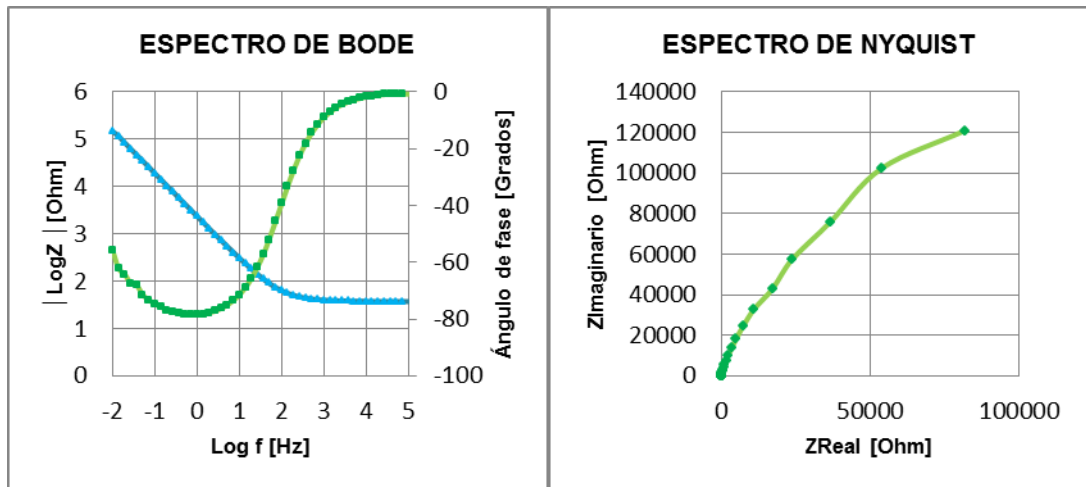
Prueba 6: Temperatura 38,5 °C; Concentración 5  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje 0,47 V.



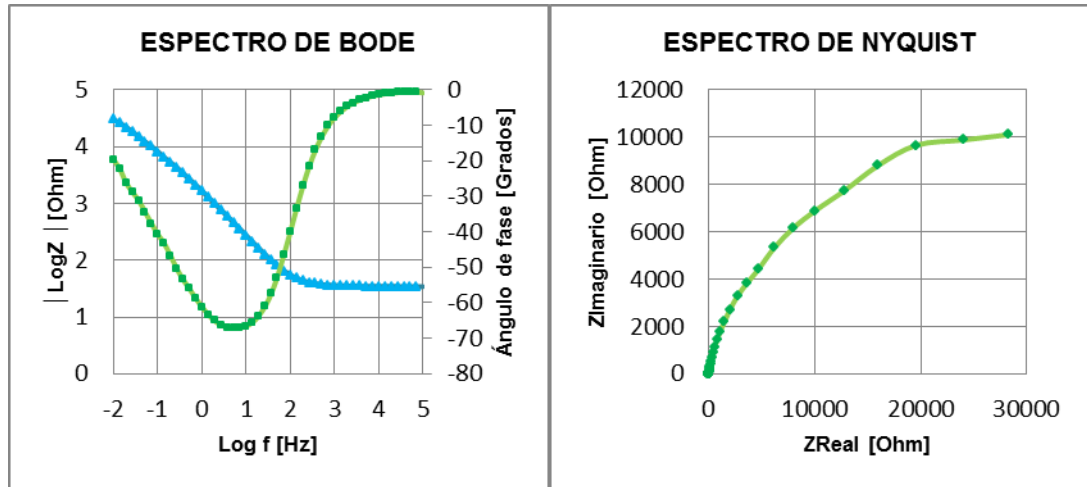
Prueba 3: Temperatura 36,5 °C; Concentración 20  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje -0,90 V.



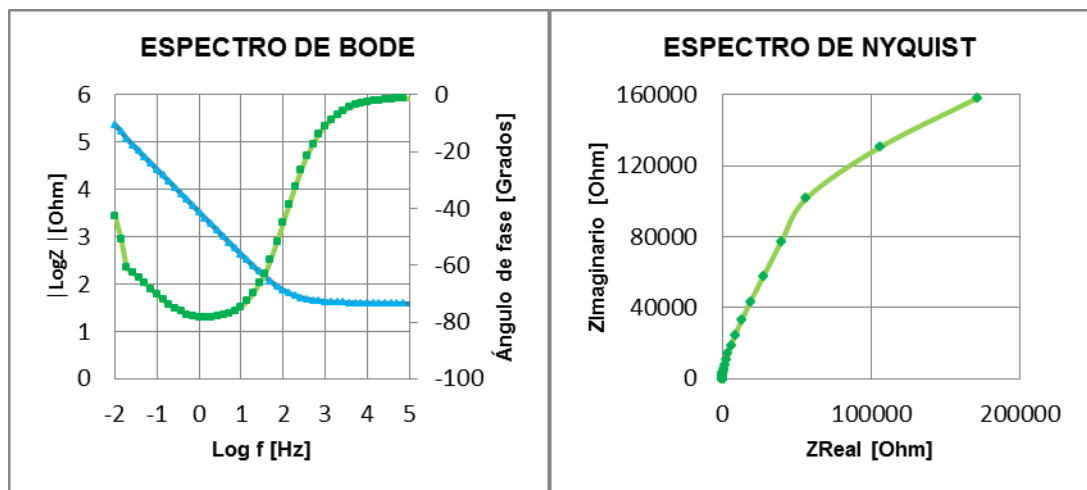
Prueba 7: Temperatura 36,5 °C; Concentración 20  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje 0,47 V.



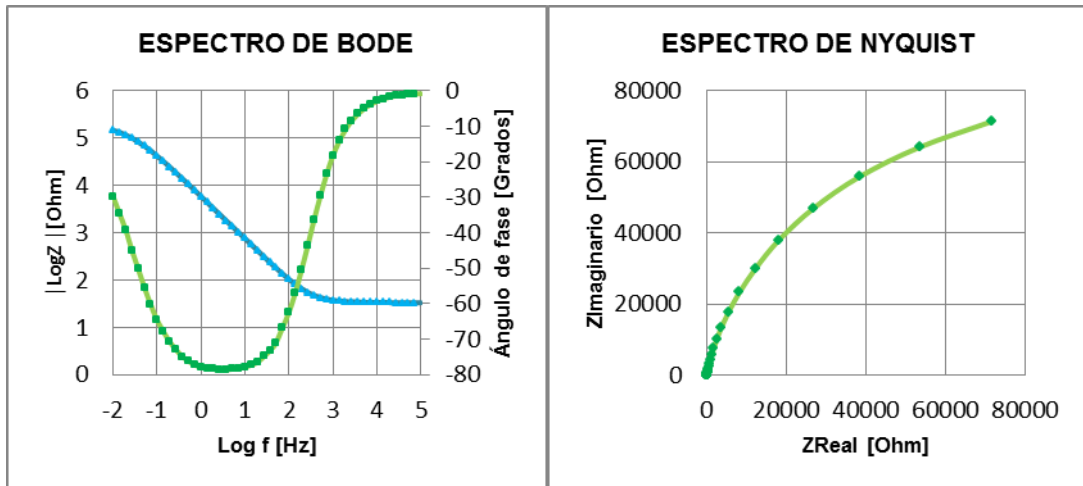
Prueba 4: Temperatura 38,5 °C; Concentración 20  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje -0,90 V.



Prueba 8: Temperatura 38,5 °C; Concentración 20  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje 0,47 V.



Prueba 9: Temperatura 37,5 °C; Concentración 12,5  $\mu\text{g/ml}$ ; Voltaje 0 V.



## Anexo L. Análisis estadístico.

**Tabla L1. Análisis de varianza para las pruebas con HAp**

<i>Factor</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrado medido</i>	<i>F-Radio</i>	<i>P-Valor</i>
<b>B:Concentración</b>	1,17E+14	1	1,17E+14	8,25	0,0349
<b>C:Voltaje DC</b>	3,64E+14	1	3,64E+14	25,62	0,0039
<b>BC</b>	1,18E+14	1	1,18E+14	8,31	0,0345
<b>Total error</b>	7,10E+13	5	1,42E+13		
<b>Total (corr.)</b>	6,70E+14	8			

**R<sup>2</sup> = 89,40%**

En la tabla de análisis de varianza o anova, se muestra la significancia estadística de cada uno de los efectos encontrados, comparando el cuadrado medio contra una estimación del error experimental. En este caso los 3 efectos han obtenido un valor-P inferior a 0,05, lo que indica que son estadísticamente significativos en el 95% de nivel de confianza.

El coeficiente de determinación R<sup>2</sup> indica que el modelo obtenido explica el 89,40% de la variabilidad de los datos para la variable de respuesta, resistencia a la transferencia de carga, lo que indica un ajuste muy bueno del modelo obtenido de los datos.

La ecuación que describe la variabilidad de los datos experimentales para RHAp, es:

$$R \text{ HAp} = 29061,6 + 12104,6 * \text{Concentración} + 21328,9 * \text{Voltaje DC} + 12149,4 * \text{Concentración} * \text{Voltaje DC}$$

Para la matriz de regeneración ósea con Whitlockita se realizó el mismo análisis que para con HAp. En este caso el análisis de varianza indica que el modelo obtenido explica el 99,72% de la variabilidad de los datos para la variable de respuesta. En la tabla L2 se presenta los datos obtenidos para el análisis de varianza.

Tabla L2. Análisis de varianza para las pruebas con Whitlockita

<i>Factor</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrado medido</i>	<i>F-Radio</i>	<i>P-Valor</i>
<b>A:Temperatura</b>	8,01E+14	1	8,01E+14	12,20	0,0174
<b>C:Voltaje DC</b>	2,60E+15	1	2,60E+15	39,53	0,0015
<b>AC</b>	7,87E+14	1	7,87E+14	11,98	0,0180
<b>Total error</b>	3,28E+13	5	6,57E+12		
<b>Total (corr.)</b>	4,51E+15	8			

**R<sup>2</sup> =99,72%**

La ecuación que describe la variabilidad de los datos experimentales para RWhitlockita, es:

$$R \text{ Whitlockita} = 58502,6 + 31648,1 * \text{Temperatura} + 56966,4 * \text{Voltaje DC} + 31358,1 * \text{Temperatura} * \text{Voltaje DC}$$