

**DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DIELECTRICOS DE MEMBRANAS  
QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE CRECIMIENTO DE  
OSTEOBLASTOS**

**ALBA ROCÍO MANCILLA ROSAS  
EMMA VIANEY ROJAS SALAZAR**

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

**2011**

**DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DIELECTRICOS DE MEMBRANAS  
QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE CRECIMIENTO DE  
OSTEOBLASTOS**

**ALBA ROCÍO MANCILLA ROSAS  
EMMA VIANEY ROJAS SALAZAR**

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

**Director:**

**DIONISIO LAVERDE CATAÑO  
Ingeniero Metalúrgico, Ph.D en Corrosión**

**Codirector:**

**NERLY DEYANIRA MONTAÑEZ  
Ingeniera Química**

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

**2011**

***A Dios por la sabiduría que me ha dado, por la experiencia adquirida y la dicha de ser profesional.***

***A mis padres Margarita Rosas de Mancilla y José Natividad Mancilla Soto por su confianza y apoyo incondicional.***

***A mi hermana Nancy Mancilla Rosas por brindarme su cariño y gran ayuda.***

***A mis hermanos Yamile, José, Adriana, Liliana y Luz Elcy por sus consejos y fortaleza durante este logro.***

***A mi hermano Juan David por compartir mis alegrías y tristezas en una de las mejores etapas de mi vida.***

***A mi sobrina Valentina Lozada Mancilla por hacer parte de mi vida y llenarla de alegría y felicidad.***

***A mi cuñado Isnardo Gómez Rincón por sus sinceros consejos y ayuda desinteresada en los momentos difíciles.***

***A Emma Vianey Rojas Salazar por ser mi compañera y amiga incondicional.***

***A Diana Marcela Martínez porque desde el comienzo de la carrera ha sido una amiga sincera y leal.***

***A mis profesores en especial Victoriano Vargas Montaña por sus enseñanzas y su amistad.***

**Gracias**

**ALBA ROCÍO MANCILLA ROSAS**

***A Dios por regalarme la sabiduría y fortaleza para culminar esta carrera profesional.***

***A mis padres Emma Salazar de Rojas y LUCAS ROJAS por estar junto a mí en esta etapa de mi vida brindándome su amor, dedicación y formación a udes les debo lo que soy.***

***A mis hermanos Magda Alicia, Lucas Humberto y Fabian Emiro por ayudarme a seguir adelante y no dejarme desfallecer en los momentos difíciles.***

***A toda mi Familia (Tia Nelly, Aleida, Mayerly, Leandro, Esteban, Antonia, Patricia, Parmenio, Flormaria, Chavela) que siempre estuvieron pendientes de que esta meta se hiciera realidad.***

***A Fabio Alejandro, por estar siempre conmigo, por ser mi fortaleza y mi mayor alegría cada día.***

***A Karoll Julieth , Paula Mariana, Jsabella y Ronald Sebastihan por llegar a nuestras vidas y darnos felicidad***

***A mis amigos Edgar Armando, Argemiro Andres, Edison Alejandro, Adriana Maria, Laidy Esperanza, Lilian Andrea, Alba Patricia, Hugo Esteban, Edwin Javier, Elkin Bonilla, mis amigos de universidad, compañeros de clase, ... que me acompañaron en las alegrías y tristezas, de todos aprendí muchísimo.***

***A ALBA ROJO amiga y compañera de proyecto por todos los momentos que compartimos, los sacrificios, la dedicación, por creer en mí y trabajar juntas.***

***Gracias***

***EMMA VJANEY ROJAS SALAZAR.***

## **AGRADECIMIENTOS**

A DIONISIO LAVERDE CATAÑO, ingeniero químico Ph.D, Director de ésta investigación.

A NERLY DEYANIRA MONTAÑEZ, ingeniera química por su amistad y apoyo fundamental en la realización de este proyecto. Codirector de ésta investigación.

A CUSTODIO VÁSQUEZ, ingeniero metalúrgico M.Sc, Director del GRUPO DE INVESTIGACIONES EN CORROSIÓN, DARIO YESID PEÑA, ingeniero metalúrgico Ph.D.

A HUGO ARMANDO ESTUPIÑAN DURÁN, ingeniero metalúrgico M.Sc por su apoyo.

A compañeros y amigos del GRUPO DE INVESTIGACIONES EN CORROSIÓN GIC, en especial Adriana Mercedes Ribero Roa y Mayra Alejandra Molano Moreno y a todas las personas que de una u otra manera colaboraron en el desarrollo de ésta investigación.

Al centro de investigaciones en enfermedades tropicales, CINTROP.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>18</b>
<b>1. CONCEPTOS TEÓRICOS</b> .....	<b>20</b>
1.1 MEMBRANAS BIOLÓGICAS .....	20
1.2 TEJIDO ÓSEO .....	20
1.3 PROPIEDADES DIELECTRICAS .....	22
1.3.1 IMPEDANCIA ELÉCTRICA .....	22
1.3.2 CAPACITANCIA .....	22
1.3.3 PERMITIVIDAD .....	23
1.4 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA (EIS) .....	25
<b>2. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>26</b>
2.1 SÍNTESIS DE LOS MATERIALES .....	27
2.1.1 ÁCIDO POLI-LÁCTICO (PLA) .....	27
2.1.2 ÁCIDO POLIGLICÓLICO (PGA) .....	27
2.1.3 HIDROXIAPATITA (HA) .....	27
2.1.4 QUITOSANO .....	27
2.2 TRATAMIENTO DISCOS Ti6Al4V .....	28
2.3 PREPARACIÓN DE LA MATRIZ POLIMÉRICA .....	28
2.4 ELECTRODEPOSICIÓN .....	29
2.5 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA .....	29
2.5.1 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA .....	29
2.6 MEDICIÓN DE PERMITIVIDAD .....	31
<b>3. ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
3.1 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA EIS .....	32
3.1.1 CIRCUITO ELÉCTRICO .....	34
3.2 PERMITIVIDAD .....	35
3.3 ANÁLISIS DE LA IMPEDANCIA REAL .....	37
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR EIS .....	38
<b>4. CONCLUSIONES</b> .....	<b>42</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>43</b>
<b>CITAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	<b>44</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>47</b>

**ANEXOS.....49**

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición de las Soluciones. ....	28
Tabla 2. Circuitos equivalentes como modelos para cada solución con células y con media a 0 y 24 horas.....	54
Tabla 3. Valores de los Elementos de los modelos de circuitos equivalentes con medio a 0h .....	55
Tabla 4. Valores de los Elementos de los modelos de circuitos equivalentes con medio a 24h .....	55
Tabla 5. Valores de los Elementos de los modelos de circuitos equivalentes con células a 0h.....	56
Tabla 6. Valores de los Elementos de los modelos de circuitos equivalentes con células a 24h. ....	56
Tabla 7. Análisis de varianza a 0h .....	57
Tabla 8. Coeficientes de la Regresión para Rcel/rec 0h .....	57
Tabla 9. Análisis de varianza a 24h .....	58
Tabla 10. Coeficientes para Rcel 24h .....	58
Tabla 11. Optimización de respuesta múltiple. ....	60
Tabla 12. Medidas de deseabilidad estadística para respuestas múltiples.....	60
Tabla 13. Deseabilidad máxima.....	60
Tabla 14. Optimización de las variables de respuesta.....	61

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regiones de dispersión para tejidos biológicos.....	24
Figura 2. Esquema de etapas metodológicas .....	26
Figura 3. Montaje realizado en la Electrodeposición Catódica. ....	29
Figura 4. Diseño de la celda. ....	30
Figura 5. Espectroscopia de Impedancia (EIS). ....	31
Figura 6. Diagrama de Módulo de impedancia, 6a Ángulo de Fase y con y sin células a 0h de la matriz polimérica Hap 5%, Q3%.....	32
Figura 7. Diagrama de Módulo de impedancia, 7a Ángulo de Fase con y sin células a 24h de la matriz polimérica Hap 5%, Q3%.....	33
Figura 8. Diagrama de Nyquist con y sin células a 0h y 24h de la matriz polimérica Hap 5%, Q3%. ....	34
Figura 9. Espectros de Permitividad con células a la 24 h de la matriz polimérica Hap 5%, Q3% .....	36
Figura 10. Espectros de Permitividad con células a la 0 y 24 de la matriz polimérica Hap 5%, Q3%.....	37
Figura 11. Espectros de Z real con células a las 0 y 24h de la matriz polimérica Hap 5% Q 3%. ....	38
Figura 12. Diagrama de Pareto a 0h.....	39
Figura 13. Gráfica de efectos principales a 0h.....	39
Figura 14. Diagrama de interacción de los factores a 0h .....	40
Figura 15. Diagrama de Pareto a 24h.....	40
Figura 16. Gráfica de efectos principales a 24h. ....	41
Figura 17. Diagrama de Módulo de impedancia, 17a Ángulo de Fase con medio y células a 0h de la matriz polimérica 0%Hap 0%Q.....	49
Figura 18. Diagrama de Módulo de impedancia, 18a Ángulo de Fase con medio y células a 0h de la matriz polimérica 15%Hap 3%Q.....	50
Figura 19. Diagrama de Módulo de impedancia, 19a Ángulo de Fase con medio y células a 0h de la matriz polimérica 5%Hap 7%Q.....	50
Figura 20. Diagrama de Módulo de impedancia, 20a Ángulo de Fase con medio y células a 0h de la matriz polimérica 15%Hap 7%Q.....	51
Figura 21. Diagrama de Módulo de impedancia, 21a Ángulo de Fase con medio y células a 0h de la matriz polimérica 10%Hap 5%Q.....	51

Figura 22. Diagrama de Módulo de impedancia, 22a Ángulo de Fase con medio y células a 24h de la matriz polimérica 0%Hap 0%Q.....	52
Figura 23. Diagrama de Módulo de impedancia, 23a Ángulo de Fase con medio y células a 24h de la matriz polimérica 15%Hap 3%Q.....	52
Figura 24. Diagrama de Módulo de impedancia, 24a Ángulo de Fase con medio y células a 24h de la matriz polimérica 5%Hap 7%Q.....	53
Figura 25. Diagrama de Módulo de impedancia, 25a Ángulo de Fase con medio y células a 24h de la matriz polimérica 15%Hap 7%Q.....	53
Figura 26. a y b. Gráfica de superficie y Gráfica de contorno.....	59
Figura 27. Perfil infrarrojo ácido láctico reportado en base de datos.....	62
Figura 28. Perfil infrarrojo ácido glicólico reportado en base de datos.....	63
Figura 29. Perfil infrarrojo ácido láctico experimental.....	63
Figura 30. Perfil Infrarrojo ácido glicólico experimental.....	64
Figura 31. Perfil Infrarrojo Hidroxiapatita experimental.....	64
Figura 32. Espectros de permitividad con células a 24h de la matriz polimérica 0%Hap 0%Q.....	65
Figura 33. Espectros de permitividad con células a 24h de la matriz polimérica 15%Hap 3%Q.....	65
Figura 34. Espectros de permitividad con células a 24h de la matriz polimérica 5%Hap 7%Q.....	66
Figura 35. Espectros de permitividad con células a 24h de la matriz polimérica 15%Hap 7%Q.....	66
Figura 36. Espectros de permitividad con células a 24h de la matriz polimérica 10%Hap 5%Q.....	67

## LISTA DE ANEXOS

Anexo A. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUIMICA.....	49
Anexo B. CIRCUITOS EQUIVALENTES.....	54
Anexo C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ....	57
Anexo D. ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA (FT-IR) .....	62
Anexo E. PERMITIVIDAD.....	64

**TÍTULO:** DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DIELECTRICOS DE MEMBRANAS QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE CRECIMIENTO DE OSTEÓBLASTOS\*.

**AUTORES:** Mancilla Rosas Alba Rocío; Rojas Salazar Emma Vianey\*\*

**PALABRAS CLAVES:** Membranas celulares, propiedades dieléctricas, biomateriales, Ingeniería de tejidos, espectroscopía de impedancia eléctrica.

## **RESUMEN**

El estudio de las propiedades eléctricas de los tejidos biológicos se ha venido incrementando en los últimos tiempos debido a la comprobada aplicación clínica, estas son una consecuencia directa de la composición y estructura de esos tejidos.

En esta investigación se determinaron propiedades dieléctricas como la impedancia, resistencia y permitividad de las membranas celulares que intervienen en el proceso de crecimiento de osteoblastos sobre superficies compuestas de Ácido Poliláctico - Ácido Poliglicólico - Hidroxiapatita (HAP) - Quitosano para aplicaciones en implantes endo-óseos, utilizando métodos electroquímicos como la Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS), y caracterizando con la ayuda de un circuito equivalente obtenido del software Zview, comprobando la conformación de interfases entre monocapas diferentes, tales como: medio de cultivo RPMI/células osteoblásticas HOS, células osteoblásticas HOS/recubrimiento, recubrimiento/disco Ti6Al4V.

Con los resultados obtenidos se llegó a la conclusión que con el aumento de la frecuencia se presenta una disminución de la resistencia en el sistema osteoblastos-matriz polimérica, indicando el comportamiento capacitivo de la membrana que favorece el crecimiento celular. Se encontró como mejor matriz polimérica la que contenía menor porcentaje de HAP y Quitosano de acuerdo a los valores de resistencia encontrados a 24 horas. Este tipo de biomateriales sirven para aplicaciones en aparatos ortopédicos y proporcionan un campo de estudio para la ingeniería de tejidos.

---

\* Proyecto de Grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Director del proyecto: Ph.D. Dionisio Laverde Cataño. Codirector del proyecto: Ing. Nerly D. Montanez.

**TITLE:** DETERMINATION OF DIELECTRIC PARAMETERS OF MEMBRANES INVOLVED IN THE PROCESS OF OSTEOBLAST CELLS GROWTH.\*

**AUTHORS:** Mancilla Rosas Alba Rocío; Rojas Salazar Emma Vianey\*\*

**KEY WORDS:** Cell membranes, dielectric properties, biomaterials, tissue engineering, electric impedance spectroscopy.

### **ABSTRACT**

The study of electrical properties of biological tissues has come increasing in recent times due to the proven clinical application, these properties are a direct consequence of the composition and structure of the tissue.

In this research, dielectric properties were determined as the impedance, resistance and permittivity of the cell membranes involved in the process of osteoblast cells growth on surfaces made of polylactic acid - polyglycolic acid – Hydroxyapatite (HAP) – Chitosan for endo-osseous implants applications, using electrochemical methods such as electrochemical impedance spectroscopy (EIS), and characterized with the help of an equivalent circuit obtained from Zview software, proving the formation of interfaces between different monolayers, such as RPMI / HOS osteoblastic cells culture media, osteoblastic cells HOS / coating, coating / Ti6Al4V disc.

With the results it was concluded that a frequency increase shows a resistance decrease in the osteoblast-polymer matrix system, indicating the capacitive behavior of the membrane that promotes cell growth. It was found that the best polymer matrix was the one that contained a lower percentage of HAP and Chitosan according to the values of resistance found at 24 hours. This type of biomaterials is used for orthopedic applications and provides a field of study for tissue engineering.

---

\* Final Degree Project

\*\* Physical-Chemical Engineering Faculty. Chemical Engineering School. Project Director: Ph.D Dionisio Laverde Cataño. Project Codirector: Ing. Nerly D. Montanez.

## INTRODUCCIÓN

El estudio de las propiedades eléctricas de los tejidos biológicos data desde el siglo XIX. El desarrollo de esta línea de investigación y sus aplicaciones clínicas se ha visto incrementado en los últimos tiempos, debido a la comprobada aplicación del análisis de las propiedades dieléctricas de los tejidos biológicos.

Estudios posteriores proporcionaron las bases para el estudio de la impedancia del tejido (bioimpedancia) y demostraron su dependencia con la frecuencia y destacaron el movimiento de energía almacenada y disipación al nivel de la membrana del tejido.

Las propiedades eléctricas de los tejidos son una consecuencia directa de la composición y estructura de esos tejidos. En los tejidos biológicos las corrientes eléctricas influyen en las partes de los componentes que tienen una carga eléctrica neta y/o un momento dipolar eléctrico [1].

Los transportadores de carga son principalmente iones y la fuente más importante del momento dipolar yace en las moléculas polares de agua del tejido y en las estructuras proteínicas y lipídicas que constituyen las membranas o interfaces de las células. El movimiento de estas cargas que induce un fenómeno de conducción en el material, y la polarización de varios dipolos, resulta en un fenómeno de relajación dieléctrica [2].

La membrana celular limita el paso de la corriente de baja frecuencia a través de la célula, pero permite el paso de la corriente de alta frecuencia, lo que hace posible manifestar el aspecto capacitivo de la membrana implicado en los mecanismos de relajación al nivel de la interfase membrana-electrolito [3]. En este aspecto se ha dado un paso fundamental hacia el desarrollo de los estudios por bioimpedancia eléctrica. Este se efectúa mediante la aplicación de una corriente eléctrica al organismo, registrando una serie de parámetros físicos (resistencia, impedancia y ángulo de fase).

El objetivo principal de esta investigación es determinar impedancia y permitividad de membranas que intervienen en el proceso de crecimiento de Osteoblastos sobre recubrimientos poliméricos modificados utilizando espectroscopía de Impedancia Electroquímica de la cual se obtiene un espectro característico caracterizado con la ayuda de un circuito equivalente cuyo comportamiento es simulado en el software Zview.

## 1. CONCEPTOS TEÓRICOS.

### 1.1 MEMBRANAS BIOLÓGICAS.

Son sistemas muy complejos. Conforman los límites de las células; están constituidas por una bicapa lipídica. El estudio de su respuesta al paso de corriente indica que la membrana se comporta como una asociación de elementos eléctricos de tipo resistivo y capacitivo. Una resistencia (o su inversa una conductancia) es un elemento eléctrico de tipo disipativo, pues las cargas que circulan por ella pierden energía potencial.

En un conductor metálico, las cargas que circulan son electrones. Por el contrario, en la resistencia equivalente de la membrana, como en las resistencias correspondientes al líquido intracelular y extracelular, las corrientes son llevadas por iones disueltos como  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  y  $Ca^{2+}$ . La resistencia de la membrana se expresa generalmente como una resistencia específica o resistividad llamada  $p_m$ , que se expresa en  $\Omega \cdot cm^2$  de membrana. La resistencia total en  $\Omega$  (ohm) de una célula es igual al cociente entre su  $p_m$  y su superficie de membrana (a mayor superficie de la membrana menor es la resistencia) [1].

El valor de  $p_m$  es variable según el tipo de célula. Por ej., puede ser tan baja como  $500 \Omega \cdot cm^2$  o tan elevada como  $8000 \Omega \cdot cm^2$ . Un valor común en mamíferos es  $2000 \Omega \cdot cm^2$ . Las diferencias de  $p_m$  entre diversas células se deben fundamentalmente al número de canales iónicos (conductancias) presentes por unidad de superficie de membrana [1].

### 1.2 TEJIDO ÓSEO

Es una variedad de tejido conectivo, está compuesto por células y componentes extracelulares que forman la matriz ósea, que se halla mineralizada en su mayor parte con compuestos de fosfato de calcio, principalmente Hidroxiapatita (HA), la responsable de las extraordinarias

propiedades biomecánicas del hueso; es un tipo de biocerámico compuesto de fosfato de calcio que ha venido usándose en ortopedia y odontología desde los años 80. La hidroxiapatita (HA), tiene una estequiometría similar a la del mineral óseo y se ha utilizado para el relleno de defectos óseos [2][3]; además es ideal para usar como un recubrimiento de implantes metálicos (como el titanio por ejemplo)[4].

La HA, obtenida de fuentes naturales o bien de fuentes sintéticas, se considera una sustancia bioactiva, ya que forma fuertes enlaces químicos con el tejido óseo huésped, y por ello, se la reconoce como un buen material para implantes óseos. La HA no es solo bioactiva, también es osteoconductiva, no tóxica, no inmunogénica, y su estructura es cristalográficamente similar a la de los minerales óseos con el nivel adecuado de carbonos sustituidos.

Las fibras colágenicas del tejido óseo le proporcionan flexibilidades y resistencia a la tensión mientras que las sales minerales le confieren dureza, rigidez, y resistencia a la compresión [5].

El tejido óseo se organiza de dos formas: tejido óseo esponjoso y tejido óseo compacto. El compacto se compone de una matriz extracelular (MEC) de tejido conectivo mineralizado y sus células son osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.

Los tejidos se pueden modelar utilizando un circuito eléctrico de dos terminales, cuya impedancia represente a la del tejido estudiado. Estos modelos eléctricos denominados “modelos de parámetros concentrados” permiten una interpretación física o fisiológica de la bioimpedancia.

### **1.2.1 CÉLULAS OSTEOSARCOMAS HOS**

Las células llamadas osteosarcomas humanos (Human Osteosarcoma) son una línea celular de osteoblastos, consistente de células poligonales o fusiforme provenientes de células tumorales [16]. Esta línea es atractiva para

estudios in vitro, relacionados con la respuesta celular a diversos compuestos presentes en implantes endo-óseos.

### **1.3 PROPIEDADES DIELECTRICAS**

Describen el comportamiento eléctrico, donde se analiza tanto la respuesta a una señal eléctrica, como el efecto de cargas mecánicas pueden originar en las propiedades eléctricas.

#### **1.3.1 IMPEDANCIA ELÉCTRICA**

Es la oposición que presenta un cuerpo al paso de una corriente a través de él. La impedancia a una frecuencia dada puede ser representada por un vector en el plano complejo, donde la parte imaginaria de la impedancia,  $Z''$  se representa como función de la parte real  $Z'$ .

Generalmente los datos de impedancia se representan en dos tipos de diagramas, diagramas de Nyquist y Bode.

Las medidas de impedancia determinan directamente la resistencia al electrolito y el comportamiento en sus capas superficiales. Para un objeto homogéneo e isótropo, la impedancia está en función de sus propiedades eléctricas (conductividad y permitividad), pero también depende de factores geométricos determinados por el factor de celda [6].

#### **1.3.2 CAPACITANCIA**

Corresponde a la propiedad de la membrana de separar cargas de signo opuesto [8]. Un capacitor consta de dos placas conductoras separadas por un material dieléctrico. Dado que, tanto el líquido extracelular como el citoplasma son conductores de electricidad y que la bicapa lipídica es aislante, se pueden representar estos elementos como un capacitor eléctrico. Cuando un capacitor se conecta a una batería, el movimiento de las cargas positivas según la

convención internacional tomada de Benjamín Franklin; viajan a una placa donde se acumulan. Estas partículas inducen en la placa contraria la movilización de las partículas positivas, por magnetismo, de tal manera que se produce una corriente que (ya que hay material aislante entre las placas) pasa a través del capacitor por lo que se llama a ésta, corriente capacitiva [9].

### 1.3.3 PERMITIVIDAD

Es una constante física que describe cómo un campo eléctrico afecta y es afectado por un medio. La permitividad es determinada por la habilidad de un material de polarizarse en respuesta a un campo eléctrico aplicado y de esa forma cancelar parcialmente el campo dentro del material. Está directamente relacionada con la susceptibilidad eléctrica [10].

Con los valores de impedancia (Z) real e imaginaria en cada tejido biológico y para las frecuencias de estudio la permitividad se calcula como sigue [18]:

Ecuación 1. Capacitancia a cada frecuencia:

$$C = 1 / (2 * \pi * f * X_c) \quad \text{con } Z'' = X_c$$

Ecuación 2. Resistencia específica a cada frecuencia:

$$R_{\text{especifica}} = R * A / d \quad Z' = R$$

Ecuación 3. Conductancia a cada frecuencia:

$$\sigma = 1 / R_{\text{especifica}}$$

Ecuación 4. Capacitancia específica:

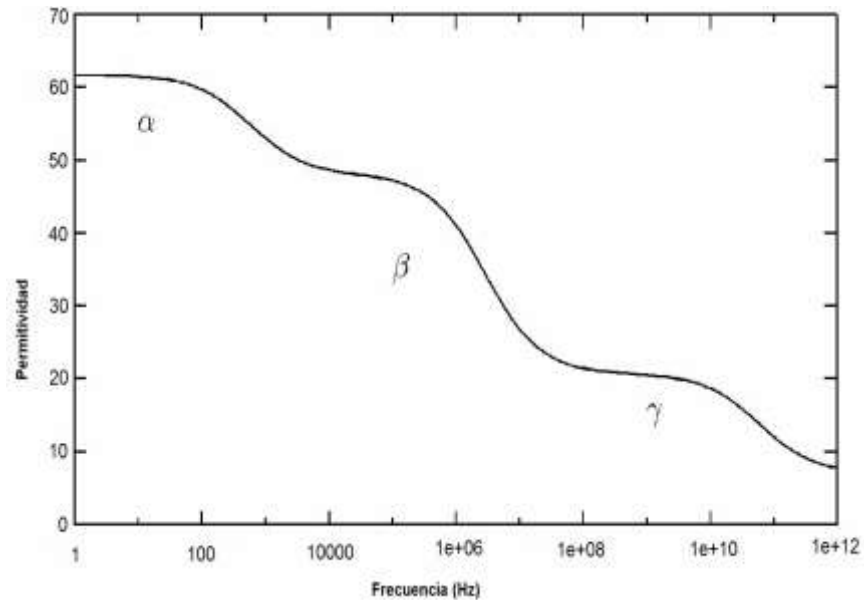
$$C_{\text{especifica}} = C * d / A$$

Ecuación 5. Permitividad dieléctrica:

$$\epsilon' = C_{\text{espec}} / \epsilon_0$$

En la figura 1 se muestran las diferentes regiones de dispersión para tejidos biológicos.

**Figura 1.** Regiones de dispersión para tejidos biológicos.



Fuente: Bibliografía 18

- Dispersión  $\alpha$ : (10 Hz a unos pocos kHz), asociadas con las interfaces de tejidos, tales como las membranas.
- Dispersión  $\beta$ : (1 kHz a varios MHz), asociadas a la polarización de las membranas celulares y proteínas y otras macromoléculas orgánicas.
- Dispersión  $\gamma$  y dispersión de rayos gamma: (410 GHz), asociada con la polarización de las moléculas de agua.

#### **1.4 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUIMICA (EIS)**

Es un método electroquímico basado en el uso de una señal de corriente alterna (CA) que es aplicada a un electrodo de trabajo determinando la respuesta correspondiente.

Presenta la ventaja de relacionar datos del desempeño de los recubrimientos, que pueden ser obtenidos in situ, de modo no destructivo, llevando a un entendimiento detallado de probables mecanismos de pérdida de adhesión en medios acuosos[11].

Es el procedimiento experimental más comúnmente usado para caracterizar las propiedades eléctricas de una película cerámica y su adhesión a la superficie metálica, se aplica una pequeña señal de potencial (E) a un electrodo y se mide su respuesta en corriente (I) a diferentes frecuencias.

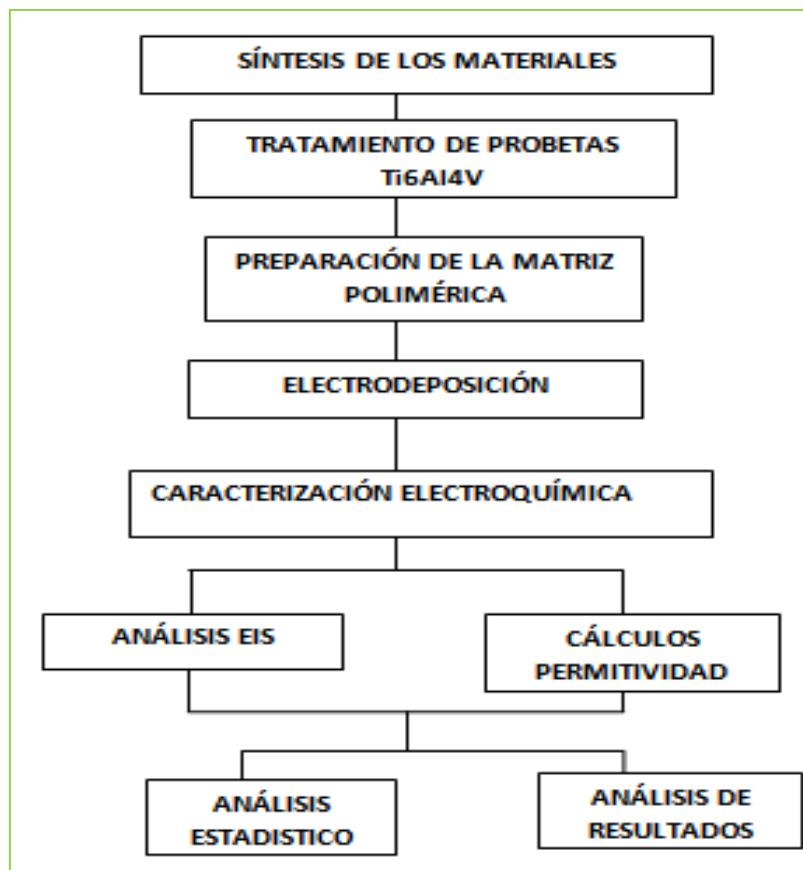
El equipo electrónico usado procesa las mediciones de potencial-tiempo y corriente-tiempo, dando como resultado una serie de valores de impedancia correspondiente a cada frecuencia estudiada. Esta relación de valores de impedancia y frecuencia se denomina “espectro de impedancias” [12].

## 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Inicialmente se llevó a cabo la síntesis de cada uno de los materiales Acido poli-láctico (PLA), Acido poli-glicólico (PGA), Hidroxiapatita (HA) y se adquirió el Quitosano. Luego se realizó un tratamiento de pulido a las probetas de Ti6Al4V necesarias para la electrodeposición en la cual se realizaron pruebas preliminares para encontrar las condiciones de tiempo y voltaje adecuadas para recubrimiento. Finalmente se realizaron pruebas electroquímicas para cada uno de los recubrimientos hechos a partir de diferentes soluciones poliméricas preparadas y se utilizó un tratamiento matemático de comportamiento eléctrico para calcular la permitividad.

En el siguiente esquema se presenta el procedimiento realizado.

**Figura 2.** Esquema de etapas metodológicas



Fuente: Autores

## **2.1 SÍNTESIS DE LOS MATERIALES**

### **2.1.1 ÁCIDO POLI-LÁCTICO (PLA)**

Se sintetizó por policondensación del ácido L-láctico ( $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ ) Carlo Erba, con cloruro de zinc como catalizador.

### **2.1.2 ÁCIDO POLIGLICÓLICO (PGA)**

Se sintetizó por policondensación a partir de dos reacciones principales sucesivas de equilibrio, la esterificación y Oligomerización.

### **2.1.3 HIDROXIAPATITA (HA)**

Fue sintetizada por el método de precipitación acuosa, haciendo reaccionar soluciones acuosas de fosfato dihidrogenado de amonio  $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$  y nitrato de calcio tetrahidratado  $(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ , en concentraciones 0.48 M y 1M respectivamente, con una relación molar de 1.67 Ca/P, un tiempo de envejecimiento de 144h a 25°C y secado de 24h a 60°C. Se calcinó la muestra a 1050°C por 1h. Posteriormente se realizó la caracterización del producto obtenido por la técnica de infrarrojo FT-IR, cuyos resultados se presentan en el Anexo D.

### **2.1.4 QUITOSANO**

Se adquirió de Sigma Aldrich. De fórmula  $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_9$ , referencia 417963-256 CAS9012-76-4, con grado de acetilación de 15%, Peso molecular: 190 a 275 g/mol.

## 2.2 TRATAMIENTO DISCOS TI6AL4V

Los discos con los cuales se trabajó fueron Ti6Al4V de 12mm de diámetro y 3mm de espesor. Estos se llevaron a pulido manual y mecánico con papel abrasivo de SiC de granos 400,600, 800, 1000, 1200 y 1500 hasta obtener superficies completamente homogéneas [21].

## 2.3 PREPARACIÓN DE LA MATRIZ POLIMÉRICA

Se realizó un diseño experimental factorial inicial de  $2^2$  con un punto en el centro y repitiendo 2 experimentos escogidos al azar; cada factor con dos variables Quitosano 3, 7% e Hidroxiapatita 5, 15 % y un punto al centro de 5 y 10% respectivamente. Se prepararon soluciones con la mezcla fundida de los polímeros PLA-PGA con una relación 70/30 respectivamente. Esta mezcla fue disuelta en acetona a una concentración de 15% p/v.

Tabla 1. Composición de las Soluciones.

SOLUCIONES P/V	15 % POLIMERO					VOLUMEN
	PLA + PGA 70/30	HA		QUITOSANO	ACETONA	
	Gramos	%	Gramos	%	Gramos	mL
Blanco	6	0	0	0	0	40
Solución 1	5,82	5	0,29	3	0,18	40
Solución 2	4,95	15	0,87	3	0,18	40
Solución 3	5,30	5	0,28	7	0,42	40
Solución 4	4,74	15	0,84	7	0,42	40
Solución 5	5,13	10	0,57	5	0,3	40

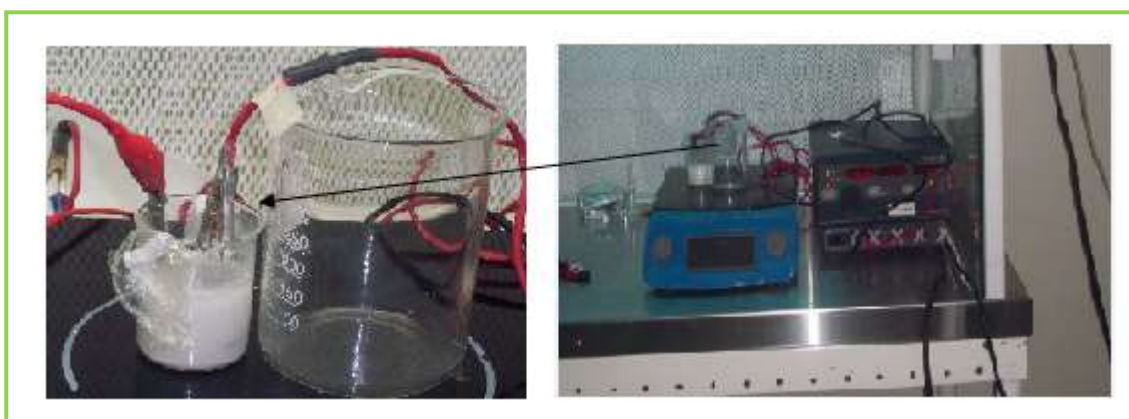
Fuente: Autores.

## 2.4 ELECTRODEPOSICIÓN

En esta etapa se realizaron pruebas preliminares para determinar las condiciones de voltaje y tiempo. Se realizó el recubrimiento en las probetas de Ti6Al4V tratadas con anterioridad, aplicándose un voltaje de 3 Voltios, donde el cátodo fue conectado con la probeta de Ti6Al4V y el ánodo a una lámina de acero inoxidable, durante un tiempo de 10 minutos a condiciones estándar de presión y temperatura. Se utilizó una fuente de potencia, marca Thermo Electron Corporation EC570-90.

Luego se introdujeron los electrodos en la solución, previamente preparada en un vaso de precipitado de 50 ml (como se muestra en la figura 3). El proceso se llevó a cabo sin agitación.

**Figura 3.** Montaje realizado en la Electrodeposición Catódica.



Fuente: Autores.

## 2.5 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA

### 2.5.1 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA

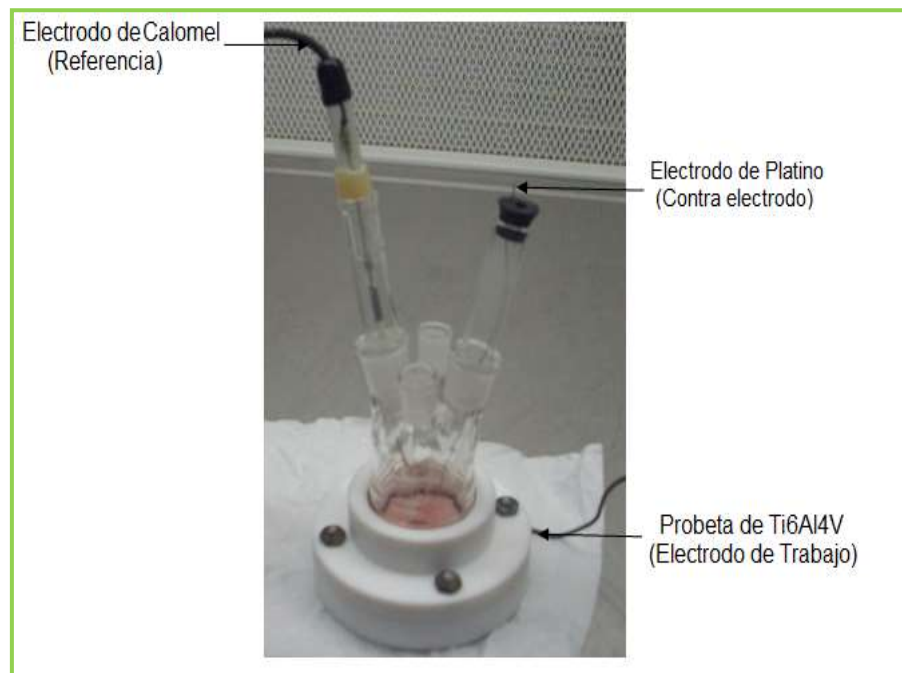
Los ensayos de impedancia se realizaron con el fin de caracterizar eléctricamente la membrana de las células HOS cultivadas sobre los recubrimientos poliméricos.

Antes de las mediciones de EIS, el potencial de corrosión se registró durante 10 minutos hasta que el potencial se estabilizó. Los experimentos de EIS se realizaron con valores de potenciales de corrosión menores a 5mV mediante la aplicación de una onda sinusoidal de 10 mV de amplitud a intervalos espaciados logarítmicamente (siete por década) con un barrido de frecuencia 100000-0,01Hz. Los tiempos de cultivo celular sobre los recubrimientos en las probetas de Ti6Al4V, fueron de 0 y 24h. La concentración celular fue de 30000cel/ml utilizándose 1ml de células y 4 ml de medio de cultivo en las pruebas con células.

En el diseño de la celda se tuvo en cuenta, que el electrodo de trabajo (probeta de Ti6Al4V) y el contra electrodo (alambre de Pt) estuvieran dispuestos simétricamente de tal forma que se obtiene una distribución de corriente uniforme.

El electrodo de referencia (Calomel) se colocó lo suficientemente cerca de la superficie del electrodo de trabajo mediante un capilar luggin, para que permitiera compensar la caída óhmica de la solución y no alterara la distribución de corriente uniforme como se muestra en la figura 4.

**Figura 4.** Diseño de la celda.



Fuente: Autores

En la figura 5 se muestra el montaje usado para llevar a cabo las pruebas electroquímicas.

**Figura 5.** Espectroscopia de Impedancia (EIS).



Fuente: Autores

## 2.6 MEDICIÓN DE PERMITIVIDAD

A partir de las gráficas de espectroscopía (Gráficos de Bode y de Nyquist) y con el tratamiento matemático presentado en la bibliografía [19], se calculó la permitividad para cada matriz polimérica.

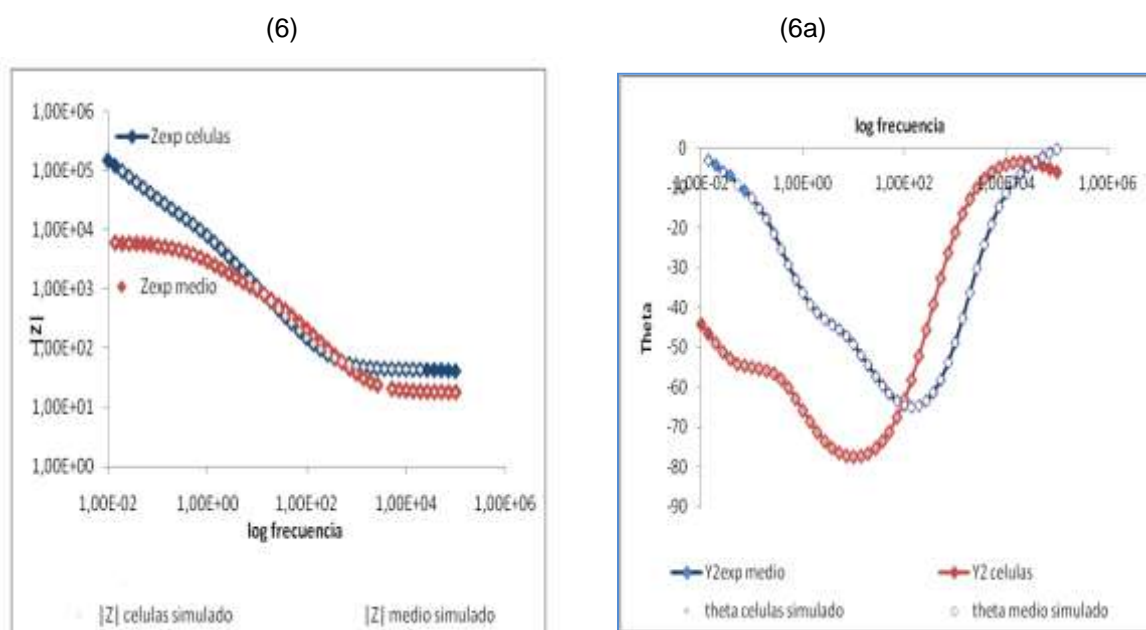
### 3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA EIS

De la aplicación de la técnica espectroscopia de impedancia electroquímica resulta una medida directa de la impedancia que la suspensión celular ofrece al campo eléctrico y, haciendo un barrido de frecuencias, permite obtener el espectro característico de Bode y Nyquist donde se determina parámetros eléctricos que ocurren en las interfases medio-recubrimiento-Ti6Al4V y en la interfases medio-celulas-recubrimiento-Ti6Al4V a tiempos de cultivo de 0 y 24 horas [20].

En la figura 6 se presentan los espectros de Bode superpuestos con las gráficas simuladas en el software Zview para comparar la respuesta de la impedancia y ángulo de fase con y sin células a 0h de la matriz polimérica Hap 5%, Q3%. Las unidades de  $|Z|$  módulo de impedancia en todas las gráficas están dadas en ohm y la frecuencia en Hz.

**Figura 6.** Diagrama de Módulo de impedancia, 6a Ángulo de Fase y con y sin células a 0h de la matriz polimérica Hap 5%, Q3%.

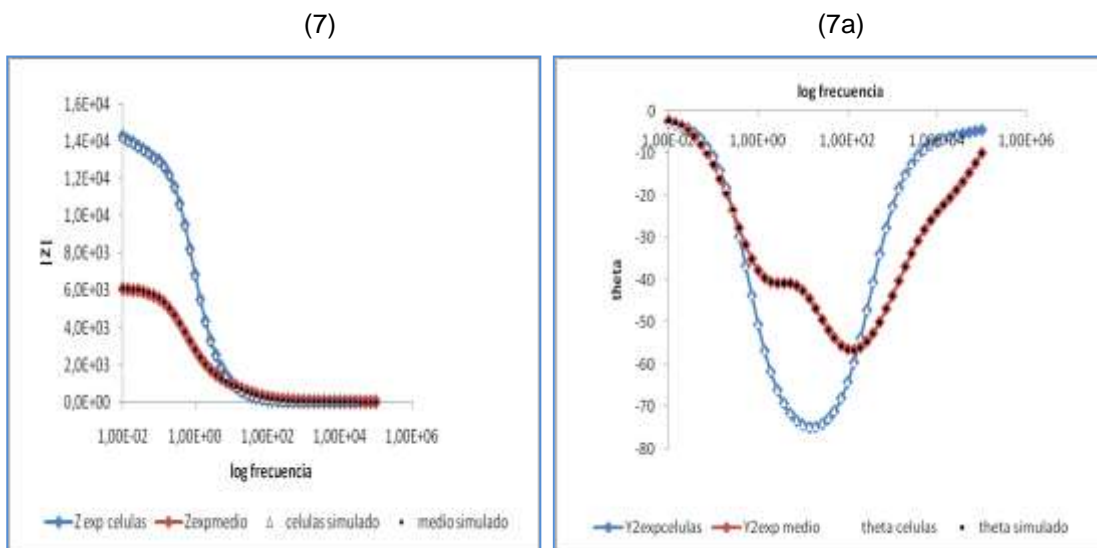


Fuente: Autores.

En este diagrama los resultados con medio de cultivo, en la región a altas frecuencias de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^3$  Hz, el módulo de la impedancia vs la frecuencia mostro un cambio significativo de pendiente; seguido en un aumento continuo en el módulo de impedancia de alrededor de  $30.95$  a  $3.51 \times 10^3 \Omega \cdot \text{cm}^2$  en las frecuencias medias de  $1 \times 10^3$  a  $2$  Hz; a frecuencias bajas de  $2$  a  $1 \times 10^{-2}$  Hz mostro otro cambio significativo de pendiente, lo que indica que a bajas frecuencias aparecen procesos faradaicos debido al intercambio de energía en esa zona y de medias a bajas se presenta una doble capa electroquímica .

El valor del ángulo de fase de altas a medias frecuencias disminuye ( $0^\circ$  a  $-60^\circ$  con medio de cultivo y  $-10^\circ$  a  $-80^\circ$  con células) y de medias a bajas frecuencias aumenta ( $-60^\circ$  a  $0^\circ$  con medio de cultivo y  $-80^\circ$  a  $-45^\circ$  con células). La disminución del ángulo de fase en presencia de células osteoblásticas se relaciona con la adhesión celular a través de las proteínas que forman la matriz extracelular y son absorbidas en la matriz polimérica, indicando que hay adhesión de las células HOS al recubrimiento polimérico [15].

**Figura 7.** Diagrama de Módulo de impedancia, 7a Ángulo de Fase con y sin células a 24h de la matriz polimérica Hap 5%, Q3%.



Fuente: Autores

La respuesta de impedancia obtenida después de 24h Figura 7 muestra la misma tendencia de las 0 horas aunque el ángulo de fase con células

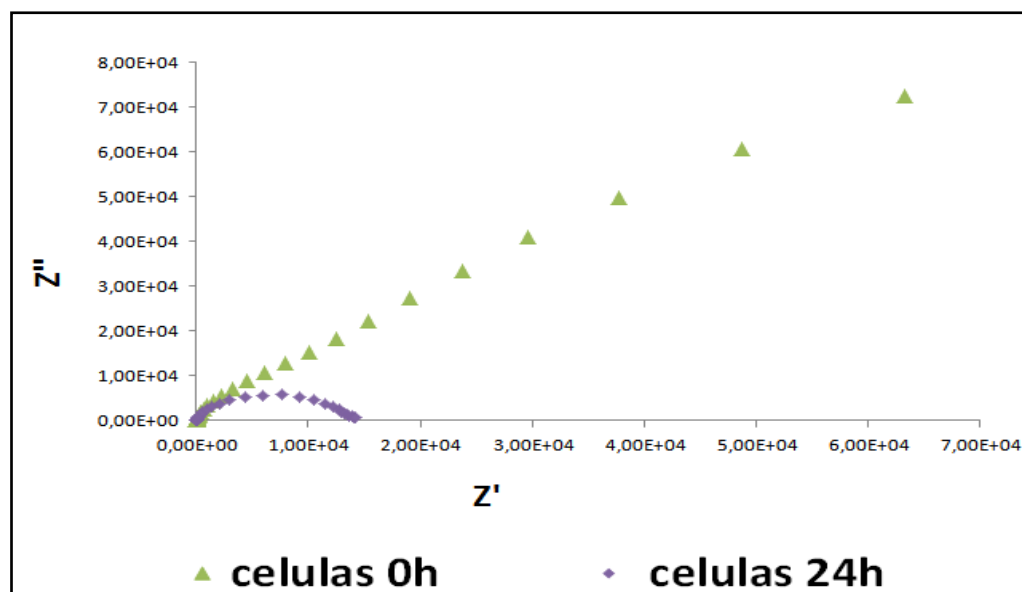
disminuye, lo cual significa que hay presencia de tejido biológico en integridad y que hay adhesión.

En el anexo A se presentan los espectros de Bode de las demás matrices poliméricas con los datos simulados a 0h y 24h, las cuales mostraron una misma tendencia de ángulo de fase.

### 3.1.1 CIRCUITO ELÉCTRICO

En la Figura 8 se presenta el Diagrama Nyquist con y sin células a 0 y 24h de la matriz polimérica Hap 5%, Q3%.

**Figura 8.** Diagrama de Nyquist con y sin células a 0h y 24h de la matriz polimérica Hap 5%, Q3%.



Fuente: Autores

En la figura 8 la línea verde muestra que las células a 0h tienen una impedancia real muy alta, al transcurrir un tiempo de 24h hay una disminución de la resistencia o impedancia real, lo cual indica que el sistema recubrimiento-célula es más capacitivo y por consiguiente se deduce que no hay células muertas, siendo la matriz polimérica soporte para crecimiento de las mismas.

Este tipo de gráfico, también conocido como gráfico en plano complejo corresponde a la gráfica  $-Z''$  vs  $Z'$  permite identificar parámetros mediante los espectros obtenidos con EIS, estos son caracterizados con la ayuda de diferentes circuitos equivalentes cuyo comportamiento es simulado en el software Zview. Los criterios utilizados en la estimación de la calidad de la simulación fueron evaluados en primer lugar con el menor valor de chi-cuadrado, y en segundo lugar con los errores más bajos (en tantos por ciento) para todos los componentes.

En la Tabla.2, (ver anexo B) se presentan los modelos utilizados para el montaje de los diagramas de impedancia, sin y con las células. Los parámetros obtenidos son  $R_{elec}$  (resistencia de electrolito o medio de cultivo celular);  $CPE_{elec/cel}$  (elemento de fase constante) o  $C_{ele/cel}$  (capacitor);  $CPE_{cel/rec}$  (elemento de fase constante de células osteoblásticas),  $R_{fcel/rec}$  (resistencia asociada a la matriz extracelular);  $R_{rec/Ti}$  (resistencia asociada a la superficie). De acuerdo con los resultados obtenidos de 0 a 24 h es interesante observar que la resistencia de la interfase medio-recubrimiento aumenta mientras en la interfase células-recubrimiento disminuye significativamente lo cual muestra que las membranas son capacitivas facilitando el paso de corriente desde el medio extracelular hasta la membrana y el medio intracelular.

De igual forma se presenta un análisis estadístico (análisis de varianza o anova) que revela la disminución de la resistencia a las 24h de cultivo celular y la significancia de las variables dependientes las cuales fueron en su mayor porcentaje hap 5%, Quitosano3%. Ver anexo C.

### **3.2 PERMITIVIDAD**

Cuando la frecuencia aumenta, la resistencia de la mayoría de los tejidos se disminuye desde un valor bajo en frecuencia que depende del volumen extracelular, hasta un nivel constante en el rango de frecuencia desde 10 a 100 MHz.

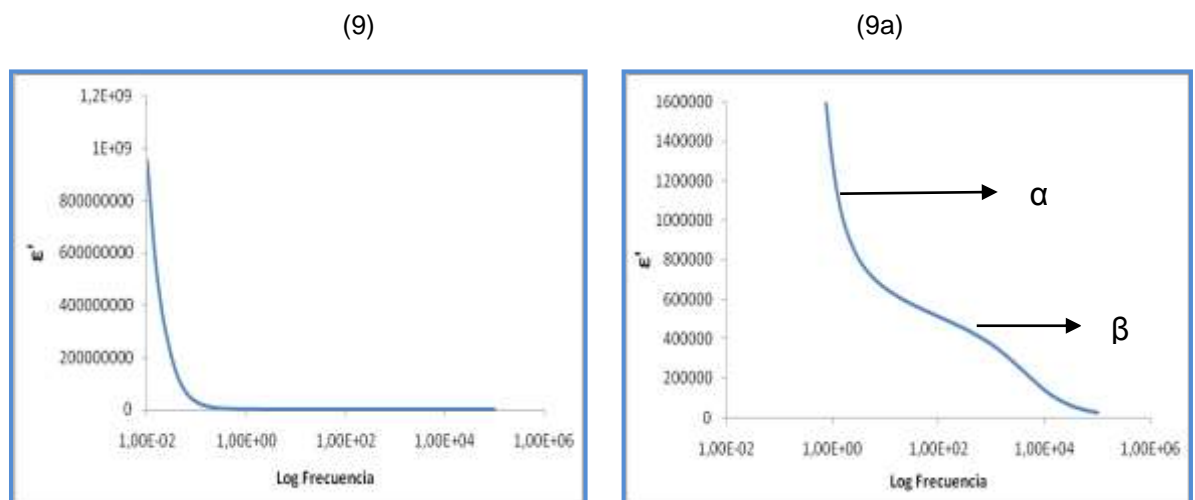
Esta disminución en resistencia está asociado a un decremento en permitividad desde un valor alto a baja frecuencia, en tres principales relajaciones:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , tal como se muestran en la Figura 1. Cada uno de estos pasos caracteriza un tipo de relajación que ocurre en un rango de frecuencia específico y es característico para cada tejido.

El presente estudio abarcará las relajaciones  $\alpha$  y  $\beta$ . La relación  $\alpha$  comprende el rango de frecuencia de 100 a 5000 Hz aproximadamente, su frecuencia característica depende del tamaño de las partículas. En esta región los cambios de impedancia son pequeños y se deben principalmente a procesos de difusión iónica a un lado de la membrana celular.

La relajación  $\beta$  comprende el rango en frecuencia de 5000 a 100000 Hz, ya que está más estrechamente ligada a las propiedades de la membrana celular y a la forma de agrupación de las células para formar los diferentes tejidos. Ver figura 9. En la figura 9a se observa mejor las dispersiones debido a los cambios de escala donde se muestra la tendencia para un tejido de función normal [17].

Las unidades de permitividad  $\epsilon$  F/cm y la frecuencia Hz.

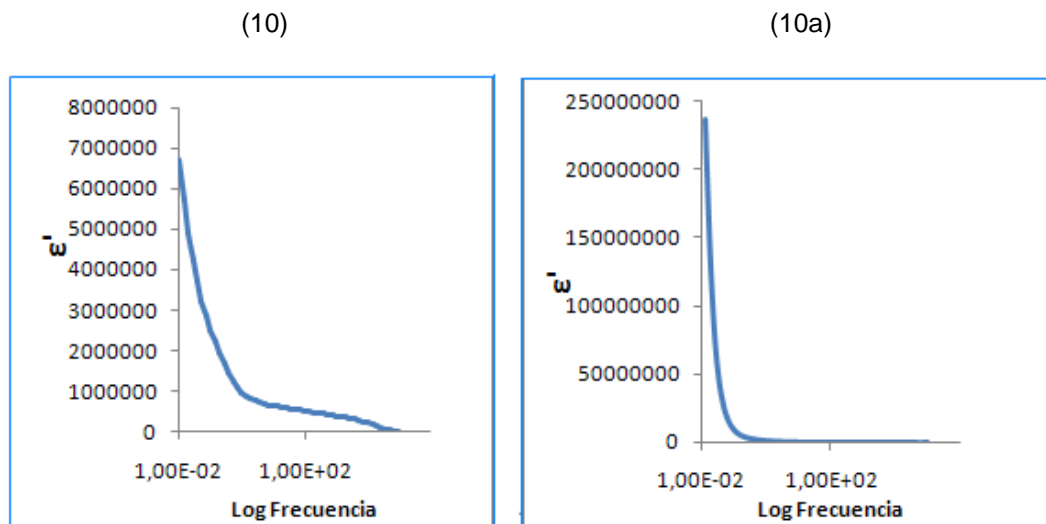
**Figura 9.** Espectro de Permitividad con células a la 24 h de la matriz polimérica Hap 5%,Q3%,  
**9a** Espectro de Permitividad con células a la 24 h de la matriz polimérica Hap 5%, Q3% con un cambio de escala.



Fuente: Autores.

En la figura 10 se comparó el cambio de permitividad de la matriz polimérica Hap 5%, Q 3% con células a 0 y 24h. Se observó un aumento de la permitividad a las 24h aunque en ambos casos la tendencia es la misma.

**Figura 10.** Espectro de Permitividad con células a las 0 horas de la matriz polimérica Hap 5%, Q3%, **10a.** Espectro de Permitividad con células a las 24horas de la matriz polimérica Hap 5%, Q3%.



Fuente: Autores.

### 3.3 ANÁLISIS DE LA IMPEDANCIA REAL

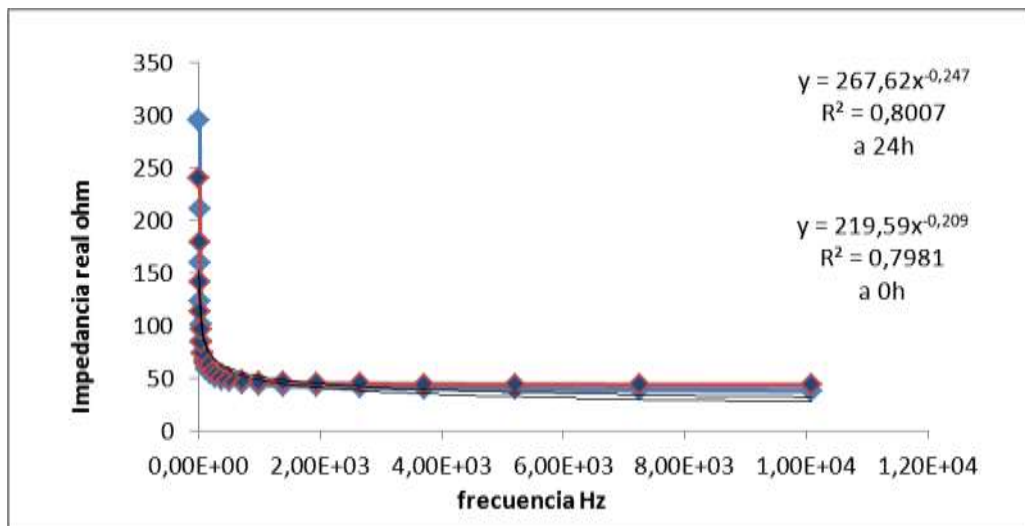
Se llevó a cabo un análisis de la parte real de la impedancia de acuerdo a la ley de la energía constante reportado en los estudios de Schwan [18], una forma de saber si las células están en una etapa de crecimiento normal, es cuando la potencia en la gráfica Z real vs frecuencia toma valores de -0,3 a -0,5. En este estudio se obtuvo una constante de -0,247 con  $R^2=0.8007$  para la matriz polimérica hidroxiapatita 5% y quitosano 3%; que ilustra una buena correlación con los valores reportados por Schwan. Se observó una dispersión  $\alpha$  en torno a 10 Hz y la dispersión  $\beta$  mayor a 5kHz.

En la figura 11 se muestra el cambio de la impedancia real en el barrido de frecuencias. A medida que la frecuencia aumenta, la impedancia real disminuye debido al comportamiento capacitivo de la membrana celular. A altas

frecuencias Z real es muy pequeña y se produce un efecto de corto circuito en la membrana celular, circulando dicha corriente tanto por el medio intra como por el extracelular. Sin embargo, si la frecuencia de la excitación es baja, sólo atraviesa el medio extracelular, siendo el valor de la impedancia medida mayor a estas frecuencias que a las altas. Es por tanto necesario que exista algún tipo de relajación, como en los materiales dieléctricos, que modele este comportamiento frecuencial de los tejidos [17].

De igual forma se evidencia en la figura 11 el comportamiento a 0 horas y a 24 horas es el mismo, con unos valores de potencia cercanos, y en donde Z real disminuye con el aumento de la frecuencia.

**Figura 11.** Espectro de Z real con células a las 0 y 24h de la matriz polimérica Hap 5% Q 3%.



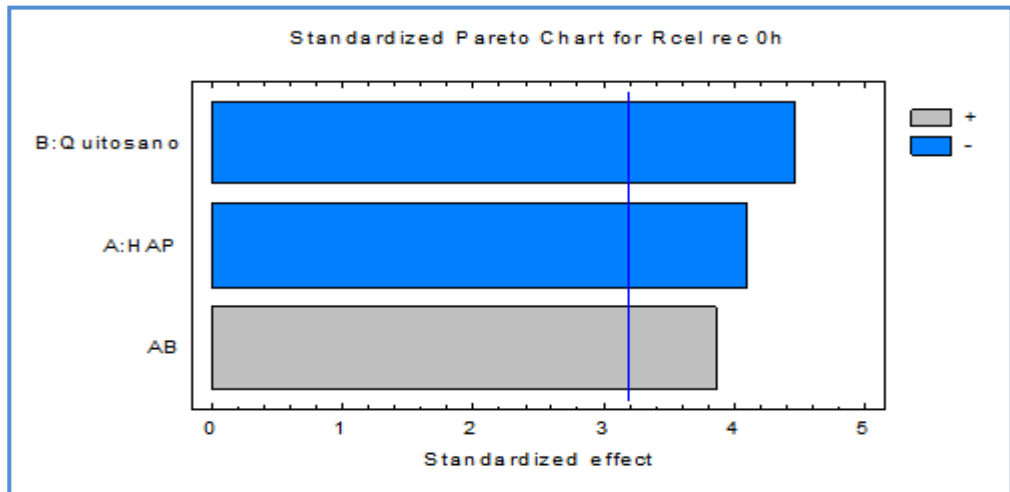
Fuente: Autores

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

En la figura 12 se presenta el diagrama de Pareto donde se observa que dos de los factores significativos tienen un efecto negativo sobre la variable de respuesta. Esto quiere decir, que entre mayor sea el porcentaje de Quitosano e Hidroxiapatita, la resistencia será menor. Un efecto contrario lo tiene el factor

de interacción doble AB o Quitosano\*Hap, en donde muestra que hay una sinergia entre los dos factores principales Quitosano-Hap.

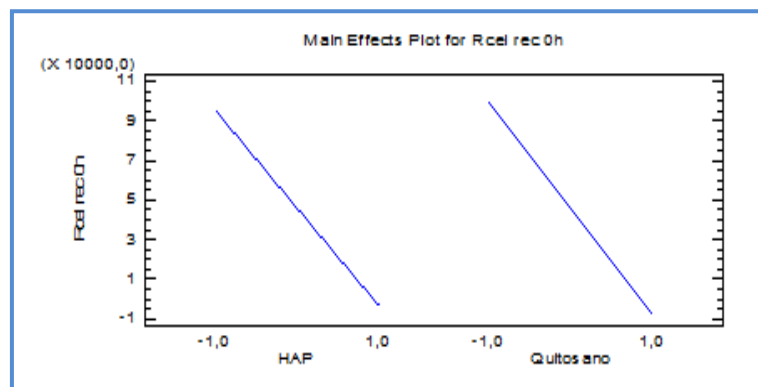
Figura 12. Diagrama de Pareto a 0h



Fuente: Autores

En la figura 13 se presenta la Gráfica de efectos principales, en la cual se observa el efecto que tienen los factores Q e HAp. A menor concentración de HAp y Q, la resistencia se hace mayor. Esto ocurre a 0 horas, en donde el proceso de crecimiento de los osteoblastos, se encuentra nulo.

Figura 13. Gráfica de efectos principales a 0h

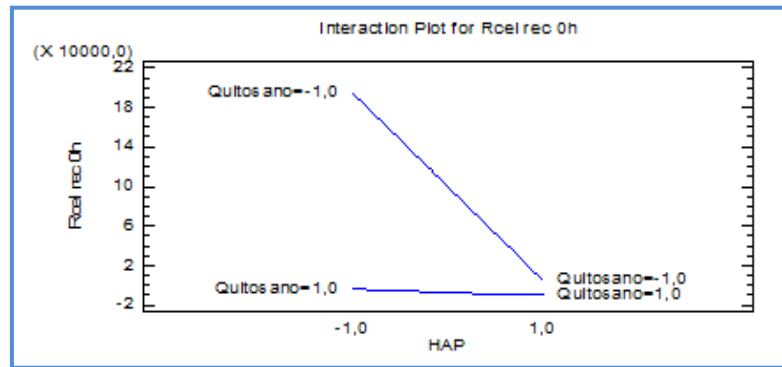


Fuente: Autores

En la figura 14 se presenta el diagrama de interacción de los factores, en él se observa que la resistencia mayor a 0 horas, se encuentra cuando la

concentración de Q e HAp es -1, es decir Q 3% e HAp 5%; y que a medida que se aumenta la concentración de hap a una concentración de Q=3%, el valor de resistencia disminuye.

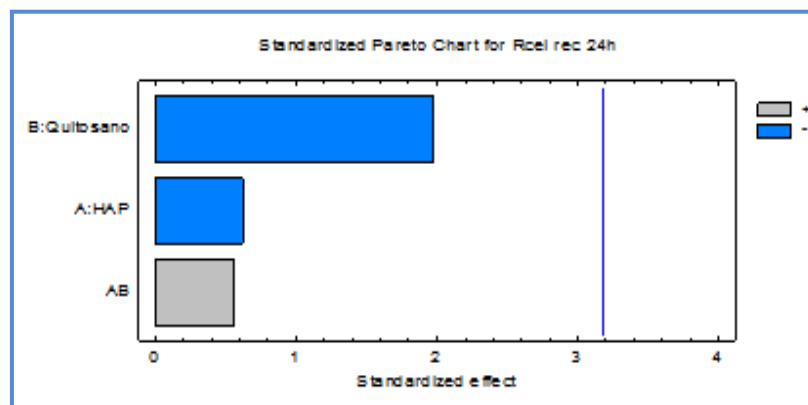
**Figura 14.** Diagrama de interacción de los factores a 0h



Fuente: Autores

En la figura 15 se presenta el diagrama de Pareto donde se observa la misma tendencia que a 0h, los factores principales Q e hap, tienen mayor efecto que los factores secundarios o de interacción, y estos, tienen efecto negativo sobre la variable de respuesta.

**Figura 15.** Diagrama de Pareto a 24h

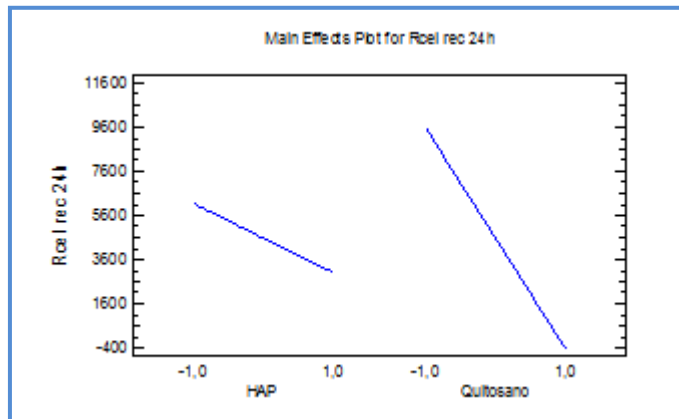


Fuente: Autores.

En la tabla 9 (ver anexo C) del análisis de varianza, se muestra valores p por encima de 0.05, aunque no muestra valores p por debajo de 0.05, si muestra la

misma tendencia de la significancia de los valores a 0 horas. El coeficiente de determinación  $R^2$ , no es muy alto, lo que indica que las matrices poliméricas son muy diferentes entre sí por los cambios de concentración.

**Figura 16.** Gráfica de efectos principales a 24h.



Fuente: Autores.

Se llevó a cabo un modelo estadístico de múltiples respuestas, en donde se encontró que la matriz polimérica más eficiente fue pla - pga (70-30%) hidroxapatita 5%, quitosano 3%, de acuerdo al máximo de delta de impedancia real (ver anexo C).

#### 4. CONCLUSIONES

- De acuerdo con los resultados de las resistencias célula-recubrimiento obtenidas con el software Zview a las 0 y 24 horas, se muestra que al disminuir esta resistencia la membrana celular está en condiciones de integridad, mostrando que el crecimiento celular será más favorable.
- A partir de los espectros de permitividad para todos los casos hubo una disminución de la permitividad lográndose observar las relajaciones alfa y beta de acuerdo al barrido de frecuencia correspondiente a estas relaciones. Se encontró que estas relajaciones corresponden a las relajaciones de un tejido sano.
- Los resultados de la espectroscopia de impedancia electroquímica mostraron una disminución de la impedancia real con el aumento de la frecuencia indicando el comportamiento capacitivo de la membrana celular.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda que para futuros trabajos, los tiempos de cultivos sean mayores para observar mejores resultados.
- Realizar un barrido de frecuencias mayor para observar más tipos de relajación.
- Adicionar otro tipo de materiales como el Colágeno que mejoren las propiedades dieléctricas de la membrana celular.

## CITAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] SARAVÍ, Fernando D. “Modelo eléctrico de la membrana y fenómenos electrotónicos”, Funcionamiento del Organismo 2008
- [2] De Long JrW.G..et al: Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. JBJS am. 2007; 89: 649-658
- [3] Einhorn T.A.; Tissue engineering of fracture repair. In Tissue engineering in musculoskeletal clinical practice, AAOS 107-122
- [4] Soto-Bubert, “Introducción a los Biominerales y Biomateriales”, A., Vol.22, Educación, Tesis Doctorado en Ciencias de la Ingeniería Mención en Ciencia de los Materiales, universidad de chile.
- [5] Bostrom MPG, Yang X, Koutrans I. Biologics in bone healing. Curr Op Orthp 2000; 11: 403-412.
- [6] Bard. A. J. y Faulkner. L. R., Electrochemical methods fundamentals and applications, 2da edicion. New Cork, Estados Unidos, 2001, 833p.
- [7] Morucci J.P. and Grimnes S, and KarlsenJ., “Bioelectrical impedance techniques in medicine”, Thrid section: Medical applications, Critical Reviews in Biomedical Engineering, 1996, 24,655-677.
- [8] Martínez B. Jorge, Delgado-Coello B, Ortíz S. Hugo, Hernandez L.E.; Propiedades pasivas de la membrana, Universidad Nacional Autónoma de México y Instituto de Fisiología Celular. Mexico.
- [9] Jordi J. Mallorquí Franquet, Antoni Broquetas Ibars, “métodos numéricos para aplicaciones biomédicas problemas directo e inverso electromagnéticos”

tesis doctoral , Universidad Politècnica de Catalunya, Barcelona, Febrery 1995, 2.5-2.6.

[10] Cottis R., Turgoose S.; “Electrochemical Impedance and Noise, serie Corrosion Testing Made Easy; Syrett B editor; NACE International; USA 1999

[11] Flórez Mendoza Juan, Romero Duran Rubén, Llongueras Joan Genesca; “Espectroscopia de impedancia electroquímica en corrosión” Instituto Mexicano del Petroleo y Facultad de química, UNAM.

[12] J.M. Albella y J.M. Martínez, Física de los dieléctricos, Ed. Marcombo, Barcelona 1984.

[13] L. Eckertová, Physics of thin films, Plenum Press, New York, 1986.

[14] Robert MCallister, MD Murrayb, Gardnerm D, Arthure Greene, DSC Carolb Radt, BS Warrenw , and Benjamin H. Landinmgd. Cijltivation in vitro of cells derived from a human osteosarcoma Cancer, Volumen 27, Issue 2, Article first published online: 27 JUN 2006 p.161-166]

[15] García Alonso, MC; Saldana, L; Alonso, C; Barranco, V; Munoz Morris, M.A.; Escudero, M.L. In situ monitring on a Ti-6Al-4V sufarce by electrochemical techiques.[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com). 2008; 5 Diciembre 2010.

[16] Cheryl R. Blanchar; Atomic Force Microscopy; VOL 1; ISSN 1430-4171; 1996. P.1161-1165

[17] H.P. SCHWAN, Linear and nonlinear electrode polarization and biological materials, ann. biomed. ENG. 20 (1992) 269-288.

[18] H.P. Schwan, Electrical properties of tissues and cell suspensions, Adv. Biol. Med. Phys. 5 (1957) 147–209

[19] Saha S and P. Williams. "Electric and dielectric properties of wet human cortical bone as a function of frequency".IEEE Transaction on Biomedical Engineering. Vol. 39. 1992. pp. 1298-1304.

[20] MONTAÑEZ Nerly Deyanira; Evaluación de la corrosión de alambre de nitinol y minitornillos de aleación de titanio empleados como aparatos de ortodoncia, en suero fisiológico simulado, saliva artificial y enjuague bucal mediante técnicas electroquímicas; trabajo de grado, escuela de ingeniería química, universidad industrial de Santander, Bucaramanga 2008.

[21] ANDRADE R. Manuel, ESTUPIÑAN Hugo. Comportamiento Electroquímico de Aleación de Ti6Al4V Anodizada. Scientia Et Technica, Colombia 2007.

## BIBLIOGRAFÍA

ANDRADE R. Manuel, ESTUPIÑAN Hugo. Comportamiento Electroquímico de Aleación de Ti6Al4V Anodizada. Scientia Et Technica, Colombia 2007.

Cottis R., Turgoose S.; "Electrochemical Impedance and Noise, serie Corrosion Testing Made Easy; Syrett B editor; NACE International; USA 1999.

Cheryl R. Blanchar; Atomic Force Microscopy; VOL 1; ISSN 1430-4171; 1996. P.1161-1165

Flórez Mendoza Juan, Romero Duran Rubén, Llongueras Joan Genesca; "Espectroscopia de impedancia electroquímica en corrosión" Instituto Mexicano del Petroleo y Facultad de química, UNAM.

García Alonso, MC; Saldana, L; Alonso, C; Barranco, V; Munoz Morris, M.A.; Escudero, M.L. In situ monitring on a Ti-6Al-4V sufarce by electrochemical techiques. www.sciencedirect.com. 2008; 5 Diciembre 2010.

H.P. Schwan, Electrical properties of tissues and cell suspensions, Adv. Biol. Med. Phys. 5 (1957) 147–209.

H.P. SCHWAN, Linear and nonlinear electrode polarization and biological materials, ann. biomed. ENG. 20 (1992) 269-288.

Martínez B. Jorge, Delgado-Coello B, Ortíz S. Hugo, Hernandez L.E.; Propiedades pasivas de la membrana, Universidad Nacional Autónoma de México y Instituto de Fisiología Celular. Mexico.

Morucci J.P. and Grimnes S, and KarlsenJ., "Bioelectrical impedance techniques in medicine", Thrid section: Medical applications, Critical Reviews in Biomedical Engineering, 1996, 24,655-677.

Robert MCallister, MD Murrayb, Gardnerm D, Arthure Greene, DSC Carolb Radt, BS Warrenw , and Benjamin H. Landinmgd. Cijltivation in vitro of cells derived from a human osteosarcoma Cancer, Volumen 27, Issue 2, Article first published online: 27 JUN 2006 p.161-166]

Saha S and P. Williams. "Electric and dielectric properties of wet human cortical bone as a function of frequency".IEEE Transaction on Biomedical Engineering. Vol. 39. 1992. pp. 1298-1304.

SARAVÍ, Fernando D. "Modelo eléctrico de la membrana y fenómenos electrotónicos", Funcionamiento del Organismo 2008

Soto-Bubert, "Introducción a los Biominerales y Biomateriales", A., Vol.22, Educación, Tesis Doctorado en Ciencias de la Ingeniería Mención en Ciencia de los Materiales, universidad de chile.

## ANEXOS

### Anexo A. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA

Es un método electroquímico basado en el uso de una señal de corriente alterna (CA) que es aplicada a un electrodo (material en corrosión) determinando la respuesta correspondiente. La corriente alterna tiene como ventaja ser función del tiempo y de la frecuencia; a través de un medio como si estuviese en corto circuito.

Como ventajas de EIS, son de mencionar la capacidad para eliminar errores de medición debidos a la resistencia del electrolito e información para aproximar mecanismos de reacción, además de no ser destructiva y factibles de usar para realizar seguimientos en el tiempo. Las desventajas principales, son el alto costo del equipo y el tiempo relativamente largo de experimentación.

#### Diagramas de Bode a 0h

Figura 17. Diagrama de Módulo de impedancia, 17a Ángulo de Fase con medio y células a 0h de la matriz polimérica 0%Hap 0%Q.

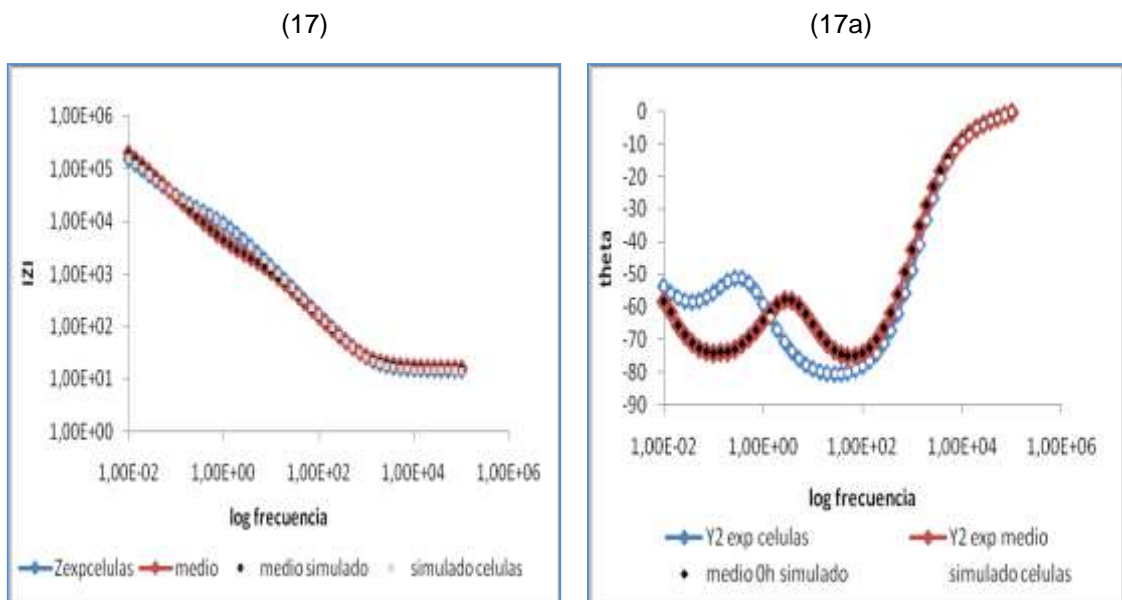
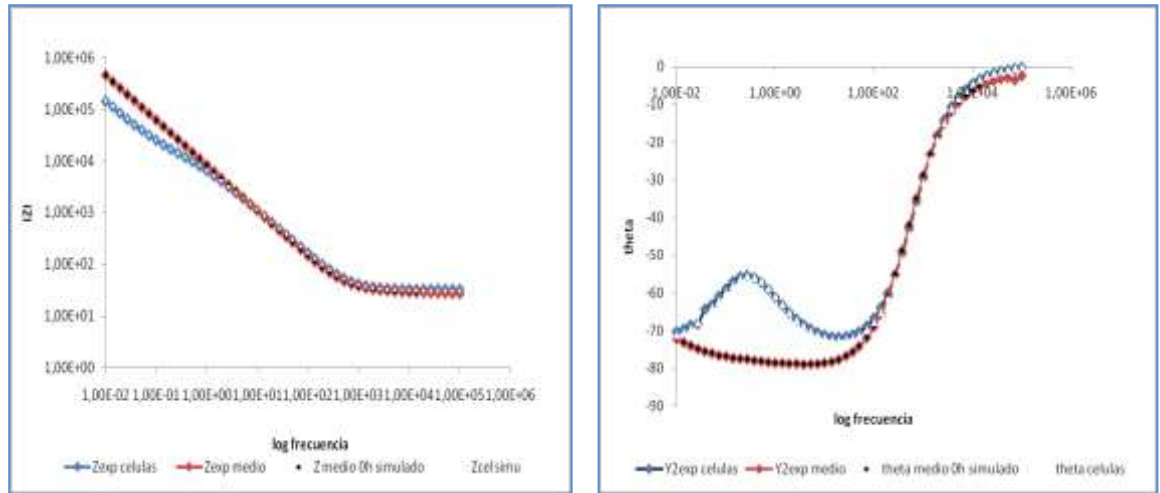


Figura 18. Diagrama de Módulo de impedancia, 18a Ángulo de Fase con medio y células a 0h de la matriz polimérica 15%Hap 3%Q.

(18)

(18a)

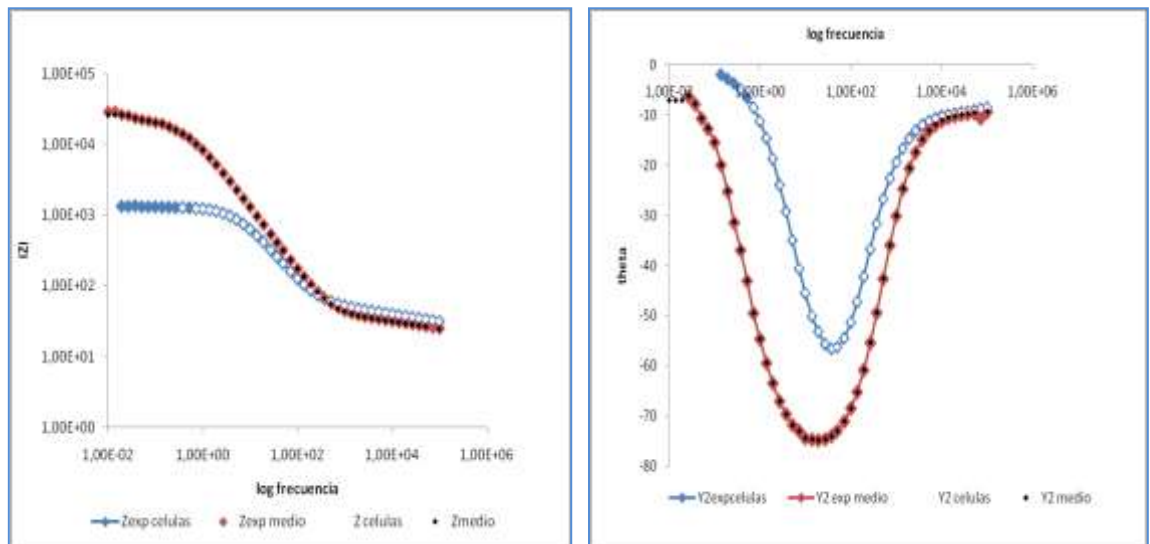


Fuente Autores

Figura 19. Diagrama de Módulo de impedancia, 19a Ángulo de Fase con medio y células a 0h de la matriz polimérica 5%Hap 7%Q.

(19)

(19a)

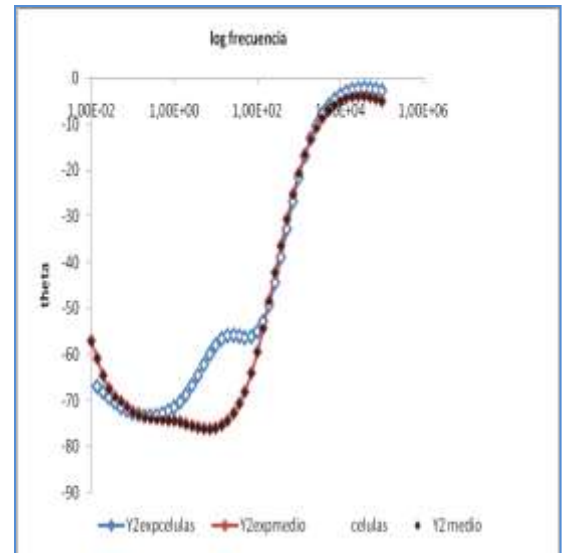
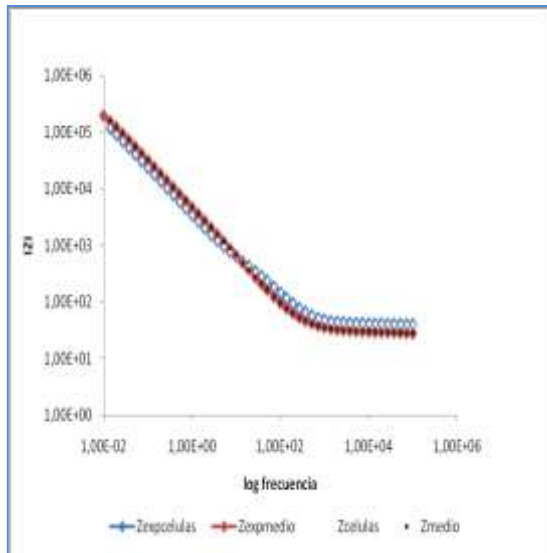


Fuente Autores

Figura 20. Diagrama de Módulo de impedancia, 20a Ángulo de Fase con medio y células a 0h de la matriz polimérica 15%Hap 7%Q.

(20)

(20a)

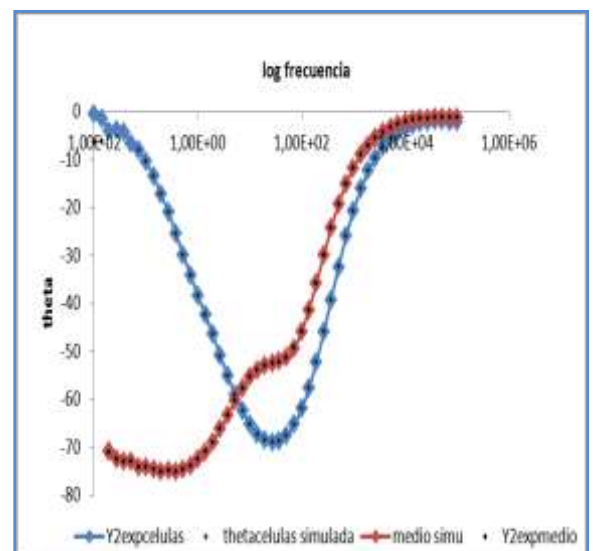
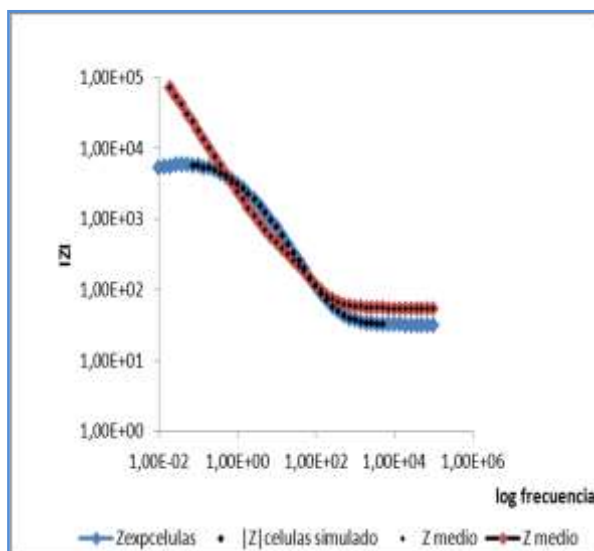


Fuente Autores

Figura 21. Diagrama de Módulo de impedancia, 21a Ángulo de Fase con medio y células a 0h de la matriz polimérica 10%Hap 5%Q.

(21)

(21a)



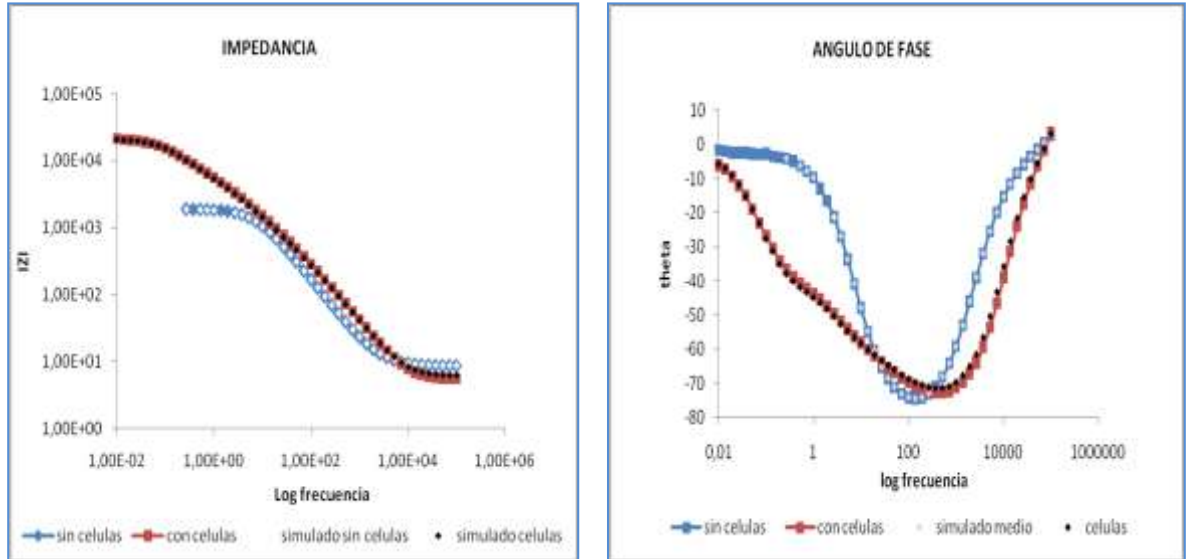
Fuente: Autores

**Diagramas de Bode a 24h**

Figura 22. Diagrama de Módulo de impedancia, 22a Ángulo de Fase con medio y células a 24h de la matriz polimérica 0%Hap 0%Q.

(22)

(22a)

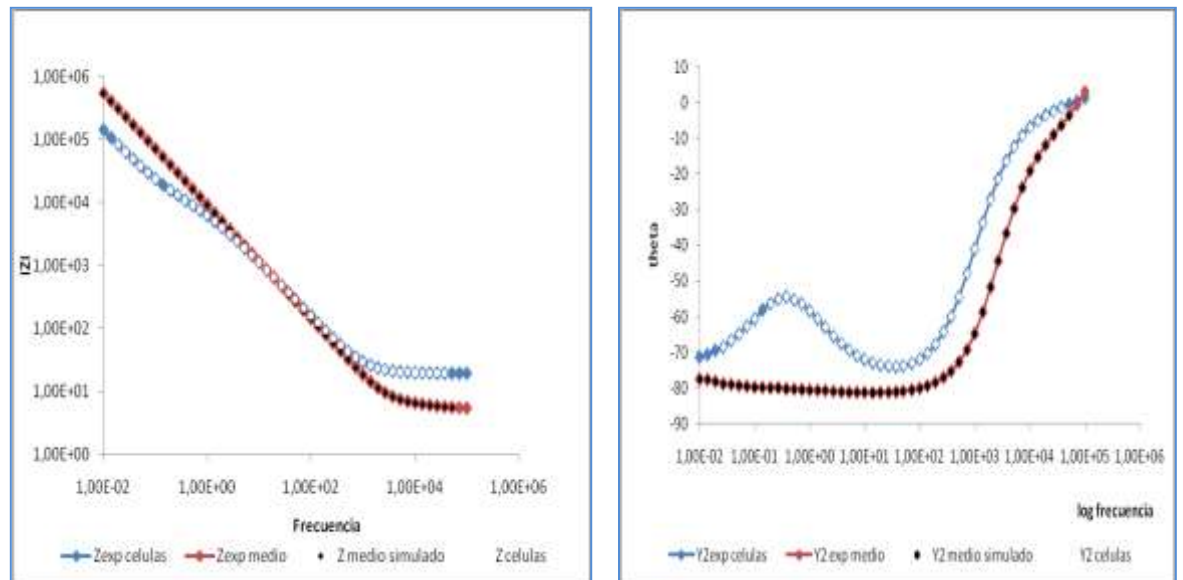


Fuente: Autores

Figura 23. Diagrama de Módulo de impedancia, 23a Ángulo de Fase con medio y células a 24h de la matriz polimérica 15%Hap 3%Q.

(23)

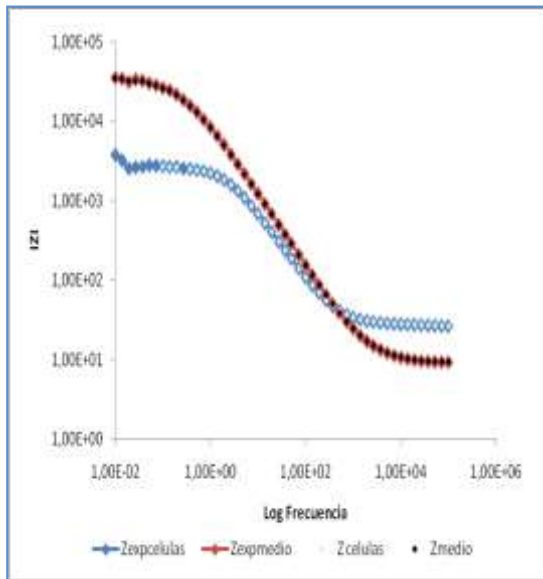
(23a)



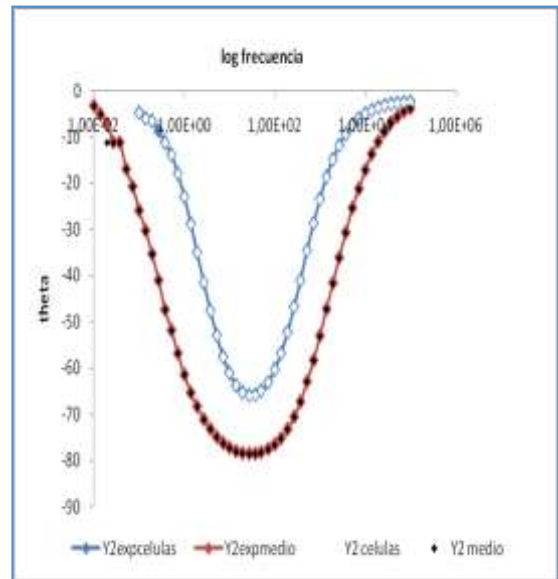
Fuente: Autores

Figura 24. Diagrama de Módulo de impedancia, 24a Ángulo de Fase con medio y células a 24h de la matriz polimérica 5%Hap 7%Q.

(24)



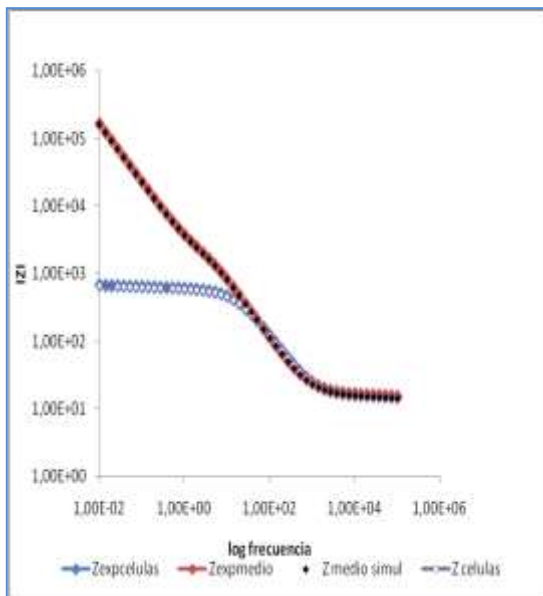
(24a)



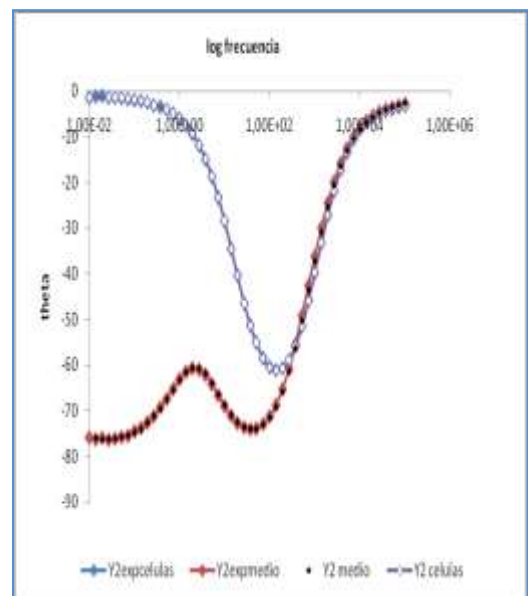
Fuente: Autores

Figura 25. Diagrama de Módulo de impedancia, 25a Ángulo de Fase con medio y células a 24h de la matriz polimérica 15%Hap 7%Q.

(25)



(25a)



Fuente: Autores



En las tablas 3, 4, 5, 6, se muestran los valores de los elementos de los modelos de los circuitos equivalentes obtenidos con medio y con células a 0 y 24 horas.

**Tabla 3.**Valores de los Elementos de los modelos de circuitos equivalentes con medio a 0h

Soluciones Parametros	PLA-PGA 70/30 HAP 0%, Q0%	PLA-PGA 70/30 HAP 5%, Q3%	PLA-PGA 70/30 HAP 15%, Q3%	PLA-PGA 70/30 HAP 5%, Q7%	PLA-PGA 70/30 HAP 15%, Q7%	PLA-PGA 70/30 HAP 10%, Q5%
Relec (Ohm)	16,25	18,02	27,47	15,38	3,57	51,9
CPEelec/med-T (F)	1,40E-04	3,60E-05	0,00082385	3,93E-04	0,00012759	2,64E-03
CPEelec/med-P	0,79601	0,84279	1,08	0,38435	0,77517	0,41868
Cele/med (F)	-	-	-	-	-	-
Relec/med (Ohm)	1,955	616,9	387,2	26,92	3952	3,945
CPEmed/rec-T (F)	1,70E-05	2,36E-05	2,17E-05	1,10E-05	9,49E-06	3,28E-05
CPEmed/rec-P	0,92704	0,93599	0,86232	9,66E-01	0,4758	0,90224
Rmed/rec (Ohm)	3214	164,20	34,44	493,1	27,19	570,4
CPErec/Ti-T (F)	3,45E-05	6,19E-05	-	1,27E-05	-	5,30E-05
CPErec/Ti-P	0,88074	0,63112	-	0,67778	-	0,84998
Crec/Ti (F)	-	-	2,6097E-06	-	4,34E-05	-
Rrec/Ti (Ohm)	4,97E+05	5439	3,1825E+06	22291	1,13E+06	5,34E+05
Chi-Squared	1,41E-04	6,996E-05	0,0001911	0,00031426	0,00029996	0,00015605

Fuente: Autores

**Tabla 4.**Valores de los Elementos de los modelos de circuitos equivalentes con medio a 24h

Soluciones Parametros	PLA-PGA 70/30 HAP0%, Q0%	PLA-PGA 70/30 HAP 5%, Q3%	PLA-PGA 70/30 HAP 15%, Q3%	PLA-PGA 70/30 HAP 5%, Q7%	PLA-PGA 70/30 HAP 15%, Q7%	PLA-PGA 70/30 HAP 10%, Q5%
Relec (Ohm)	8,846	10,97	5,679	9,366	15,95	57,99
CPEelec/med-T (F)	-	6,13E-06	-	-	-	-
CPEelec/med-P	-	0,9164	-	-	-	-
Cele/med (F)	5,87E-06	-	5,61E-06	4,10E-06	7,80E-06	1,89E-07
Relec/med (Ohm)	16,56	7,395	5,054	11,01	11,39	14,72
CPEmed/rec-T (F)	1,29E-05	1,2709E-05	1,15E-05	1,706E-05	3,397E-05	2,68E-05
CPEmed/rec-P	0,80901	0,87999	0,88142	0,84783	0,75326	0,74151
Rmed/rec (Ohm)	1.720,00	2752	1942	27395	7602	68,86
CPErec/Ti-T (F)	-	5,82E-05	4,25E-05	-	-	-
CPErec/Ti-P	-	0,86785	0,75373	-	-	-
Crec/Ti (F)	1,13E-05	-	-	0,00018668	2,48E-05	4,418E-06
Rrec/Ti (Ohm)	165,1	1904	7,81E+19	6679	1,00E+20	366,1
Chi-Squared	0,00011432	0,00088821	0,00018056	0,00073214	0,0021516	0,00040428

Fuente: Autores

**Tabla 5.** Valores de los Elementos de los modelos de circuitos equivalentes con células a 0h.

Soluciones Parametros	PLA-PGA 70/30 HAP 0%, Q0%	PLA-PGA 70/30 HAP 5%, Q3%	PLA-PGA 70/30 HAP 15%, Q3%	PLA-PGA 70/30 HAP 5%, Q7%	PLA-PGA 70/30 HAP 15%, Q7%	PLA-PGA 70/30 HAP 10%, Q5%
Relec (Ohm)	14,34	43,37	30,34	20,96	40,51	30,31
CPEelec/cel-T (F)	2,60E-05	3,73E-05	0,00013406	0,00048436	5,27E-05	-
CPEelec/cel-P	1,034	0,95607	0,85304	0,36736	0,86233	-
Cele/cel (F)	-	-	-	-	-	1,48E-06
Relec/cel (Ohm)	0,36743	8825	308,5	37,31	244,3	1,62
CPEcel/rec-T (F)	1,52E-05	5,25E-05	2,52E-05	3,11E-05	5,6995E-05	3,12E-05
CPEcel/rec-P	0,93023	0,84571	0,89148	0,89204	0,8262	0,89113
Rcel/rec (Ohm)	18356	2,05E+05	17960	1020	4,461	3245
CPErec/Ti-T (F)	4,47E-05	-	4,57E-05	0,00015617	-	0,00012175
CPErec/Ti-P	0,80557	-	0,80245	0,86766	-	0,79947
Crec/Ti (F)	-	-	-	-	6,517E-06	-
Rrec/Ti (Ohm)	4,41E+05	-	1,00E+20	208,8	6,51E+05	2629
Chi-Squared	9,46E-05	0,00073745	0,00010082	2,00E-05	5,09E-05	0,000430338

Fuente: Autores

**Tabla 6.** Valores de los Elementos de los modelos de circuitos equivalentes con células a 24h.

Soluciones Parametros	PLA-PGA 70/30 HAP 0%, Q0%	PLA-PGA 70/30 HAP 5%, Q3%	PLA-PGA 70/30 HAP 15%, Q3%	PLA-PGA 70/30 HAP 5%, Q7%	PLA-PGA 70/30 HAP 15%, Q7%	PLA-PGA 70/30 HAP 10%, Q5%
Relec (Ohm)	6,037	34,72	19,34	26,25	14,3	31,08
CPEelec/cel-T (F)	8,00E-06	-	0,00011837	-	-	-
CPEelec/cel-P	0,91855	-	0,86172	-	-	-
Cele/cel (F)	-	1,73E-06	-	1,9985E-06	1,57E-06	5,5856E-06
Relec/cel (Ohm)	502,4	10,43	309,3	3,176	1,675	3,946
CPEcel/rec-T (F)	2,59E-05	2,0542E-05	2,41E-05	3,808E-05	2,938E-05	3,08E-05
CPEcel/rec-P	0,64764	0,88666	0,90302	0,84549	0,85558	0,77544
Rcel/rec (Ohm)	8634	13598	13330	2645	583,9	39,33
CPErec/Ti-T (F)	4,240E-05	-	4,93E-05	-	-	-
CPErec/Ti-P	0,88593	-	0,79197	-	-	-
Crec/Ti (F)	-	0,012503	-	0,026024	0,0068625	2,47E-06
Rrec/Ti (Ohm)	13416	690,1	1,00E+20	55,15	40,02	5611
Chi-Squared	0,00057626	0,0002451	9,77E-05	0,00025022	0,00013512	0,0012509

Fuente: Autores

## Anexo C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

- **Análisis de Varianza Rcel a 0h**

En la tabla 7 de análisis de varianza o anova. En ella se muestra la significancia estadística de cada uno de los efectos comparando el cuadrado medio contra una estimación del error experimental. En este caso, 3 efectos han obtenido valores-p inferiores a 0,05, lo que indica que son estadísticamente significativos en el 95,0% de nivel de confianza.

El coeficiente de determinación  $R^2$  indica que el modelo obtenido explica el 93,39% de la variabilidad de los datos para la variable de respuesta resistencia de células-recubrimiento, lo que indica un ajuste muy bueno del modelo obtenido a los datos.

**Tabla 7.** Análisis de varianza a 0h

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:HAP	1,28474E10	1	1,28474E10	16,76	0,0264
B:Qitosano	1,52182E10	1	1,52182E10	19,85	0,0210
AB	1,14368E10	1	1,14368E10	14,92	0,0307
<b>Total error</b>	2,30006E9	3	7,66687E8		
<b>Total (corr.)</b>	3,48237E10	6			

Fuente: Autores

- $R^2 = 93,3951 \%$
- **Regression coeffs. for Rcel rec 0h**

**Tabla 8.** Coeficientes de la Regresión para Rcel/rec 0h

Coefficient	Estimate
Constante	45931,0
A:HAP	-49080,4
B:Qitosano	-53417,4
AB	45899,7

Fuente: Autores

La siguiente ecuación es la que describe la variabilidad de los datos experimentales obtenidos a 0 horas.

Ecuación 6. Variabilidad de datos experimentales a 0h

$$\text{Rcelula-recubrimiento } 0h = 45931,0 - 49080,4 * \text{HAP} - 53417,4 * \text{Quitoso} + 45899,7 * \text{HAP} * \text{Quitoso}$$

- **Análisis de Varianza Rcel a 24h**

En la tabla 9 se presenta el de análisis de varianza para 24 horas, que aunque no muestra valores p por debajo de 0.05, si muestra la misma tendencia de la significancia de los valores a 24 horas. El coeficiente de determinación  $R^2$ , no es muy alto, lo que indica que las matrices poliméricas son muy diferentes entre si por los cambios de concentración.

**Tabla 9.** Análisis de varianza a 24h

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:HAP	1,27638E7	1	1,27638E7	0,38	0,5807
B:Quitoso	1,31211E8	1	1,31211E8	3,92	0,1422
AB	1,04595E7	1	1,04595E7	0,31	0,6153
Total error	1,00497E8	3	3,34989E7		
Total (corr.)	2,42235E8	6			

Fuente: Autores

- $R^2 = 58,5128 \%$
- **Regression coeffs. for Rcel rec 24h**

**Tabla 10.** Coeficientes para Rcel 24h

Coefficient	Estimate
Constante	4570,17
A:HAP	-1547,0
B:Quitoso	-4960,05
AB	1388,07

Fuente: Autores

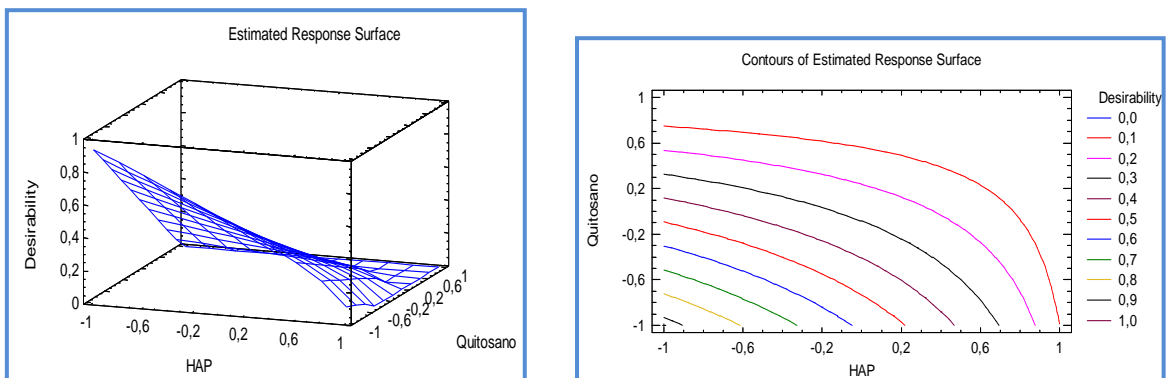
La ecuación 7 es la que describe la variabilidad de los datos experimentales obtenidos a 24 horas.

Ecuación 7. Variabilidad de datos experimentales a 24h

$$\text{Rcelulas-recubrimiento } 24\text{h} = 4570,17 - 1547,0 \cdot \text{HAP} - 4960,05 \cdot \text{Quitosano} + 1388,07 \cdot \text{HAP} \cdot \text{Quitosano}$$

Pero lo más importante es el análisis de las dos respuestas en conjunto, en donde lo que se busca es que el delta de R de 0 h a 24 h sea mayor, es decir, que el R disminuya a 24 h, lo que demuestra una membrana mas capacitiva. Para este análisis se hizo un análisis estadístico de optimización de múltiples respuestas, en este caso R0h y R24h, el software estadístico mostro lo siguiente.

Figura 26. a y b. Gráfica de superficie y Gráfica de contorno



Fuente: Autores

Figuras 26, a y b llamadas Gráfica de superficie y contorno respectivamente, muestran que hay un máximo dentro de la región experimental. El presente análisis se realizó a partir del método de deseabilidad global. Basta maximizar la deseabilidad global para obtener el punto óptimo que busca (maximizar delta R). Lo anterior se obtuvo mediante un software estadístico. En ambas Gráficas se observa que una deseabilidad mayor de 1 se encuentra en los niveles de Q (-1) e hap (-1).

Datos variables:  
 Rcelrec 0h  
 Rcelrec 24h

**Tabla 11.** Optimización de respuesta múltiple.

	<b>Observed</b>	<b>Observed</b>
Response	Minimum	Maximum
Rcelrec 0h	4,461	205000,
Rcelrec 24h	39,33	13598,0

**Tabla 12.** Medidas de deseabilidad estadística para respuestas múltiples.

	<b>Desirability</b>	<b>Desirability</b>		<b>Weig hts</b>	<b>Weigh ts</b>	
Response	Low	High	Goal	First	Seco nd	Impact
Rcel rec 0h	4,0	205000,	Maxi mize	1,0		3,0
Rcelrec 24h	39,0	13598,0	Maxi mize	1,0		3,0

Fuente: Autores

**Tabla 13.** Deseabilidad máxima.

			<b>Predicted</b>	<b>Observed</b>
<b>Row</b>	<b>Rcel rec 0h</b>	<b>Rcel rec 24h</b>	<b>Desirability</b>	<b>Desirability</b>
1	205000,	13598,0	0,932069	1,0
2	17960,0	13330,0	0,101459	0,29302
3	1020,0	430,8	0,0	0,0119672
4	4,461	583,9	0,0	0,000300623
5	3245,0	39,33	0,273623	0,000620312
6	1448,0	993,0	0,101459	0,0222624
7	1040,0	240,0	0,0	0,00865548

Fuente: Autores

**Tabla 14.** Optimización de las variables de respuesta

Factor	Low	High	Optimum
HAP	-1,0	1,0	-1,0
Quitosa no	-1,0	1,0	-1,0

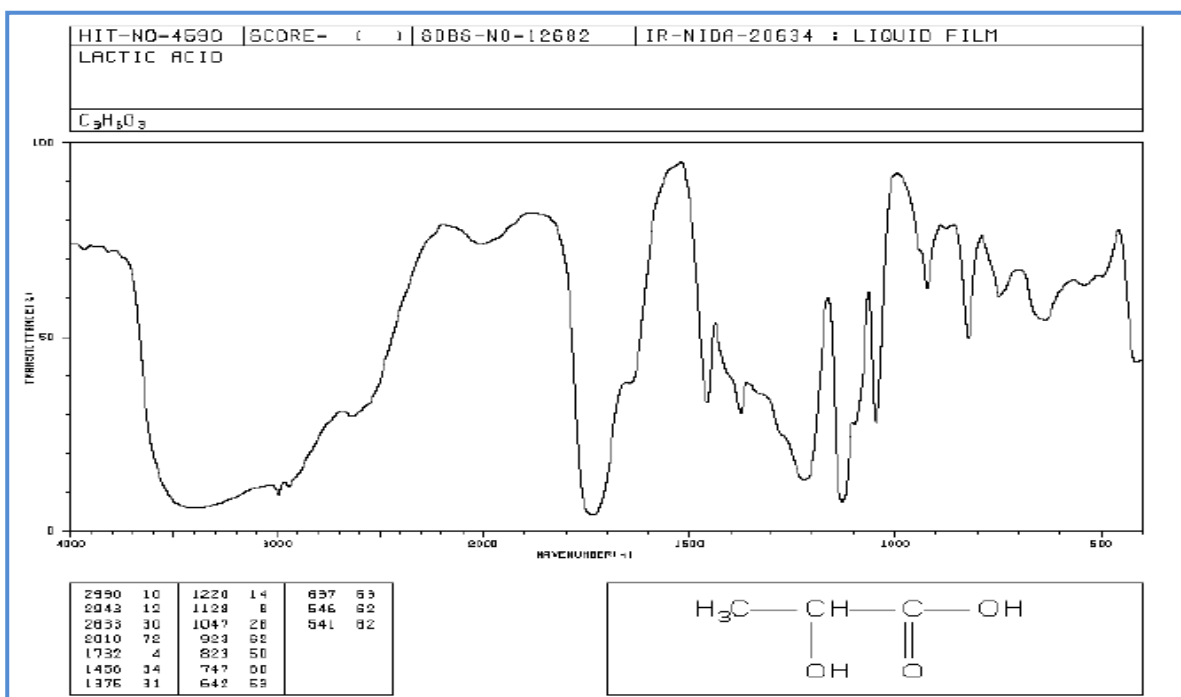
Fuente: Autores

## Anexo D. ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA (FT-IR)

El espectro infrarrojo de un compuesto proporciona gran información sobre sus propiedades internas (composición química, impurezas, interacción entre sustituyentes, análisis de grupos funcionales, etc.), por lo que es de gran importancia en análisis cualitativo. La técnica también es útil para análisis cuantitativo, dado que por su gran selectividad se puede cuantificar una sustancia en una mezcla compleja sin la realización de mucho trabajo previo de preparación.

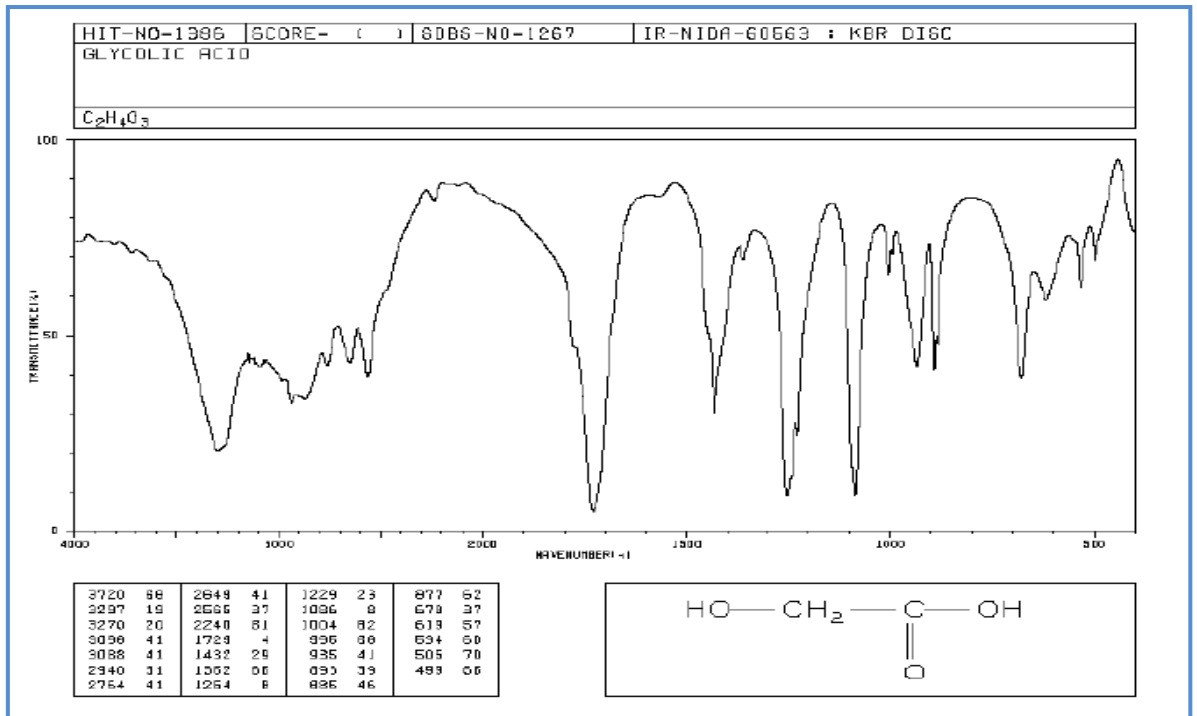
Las aplicaciones son múltiples: análisis de polímeros, aditivos, estudios forenses, identificación de contaminantes ambientales, medicina, diversas áreas de la química (órgano metálica, orgánica, inorgánica, agrícola, industrial, etc.). [19]

**Figura 27.** Perfil infrarrojo ácido láctico reportado en base de datos



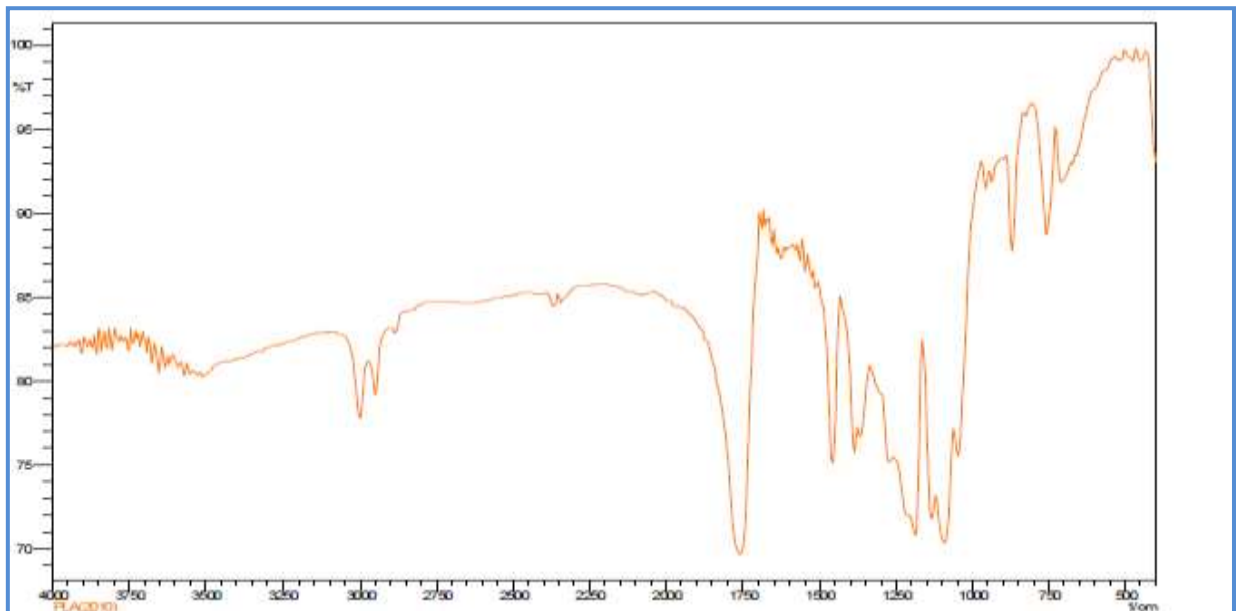
Fuente: Base de datos UIS.

**Figura 28.** Perfil infrarrojo ácido glicólico reportado en base de datos



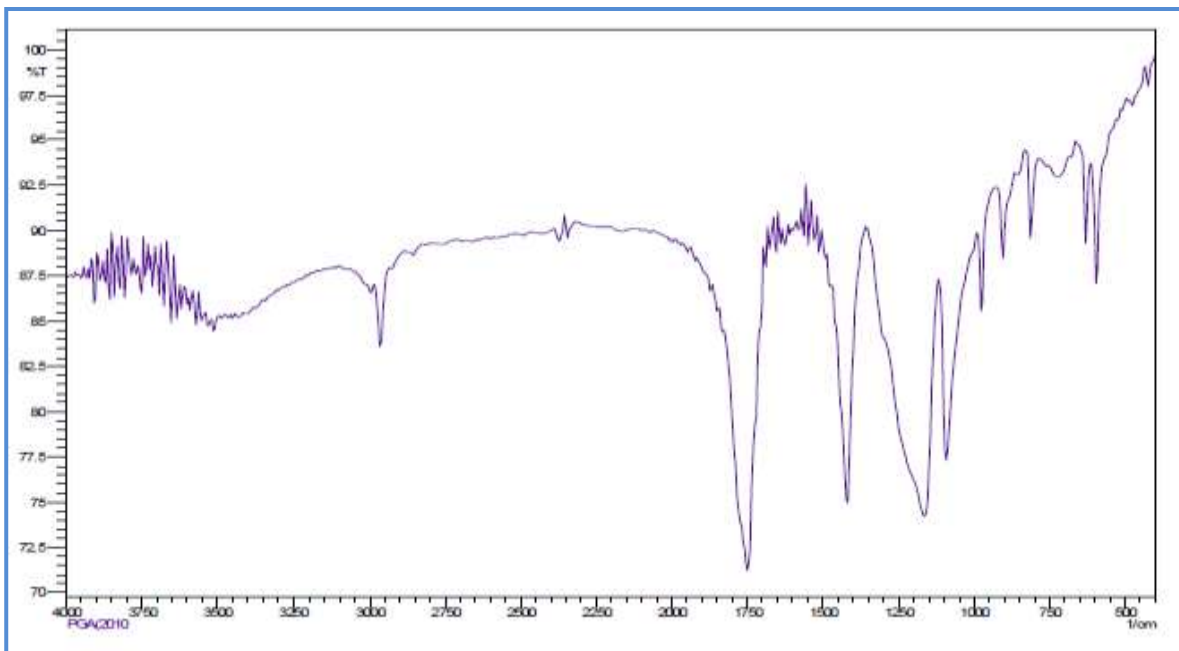
Fuente: Base de datos UIS

**Figura 29.** Perfil infrarrojo ácido láctico experimental



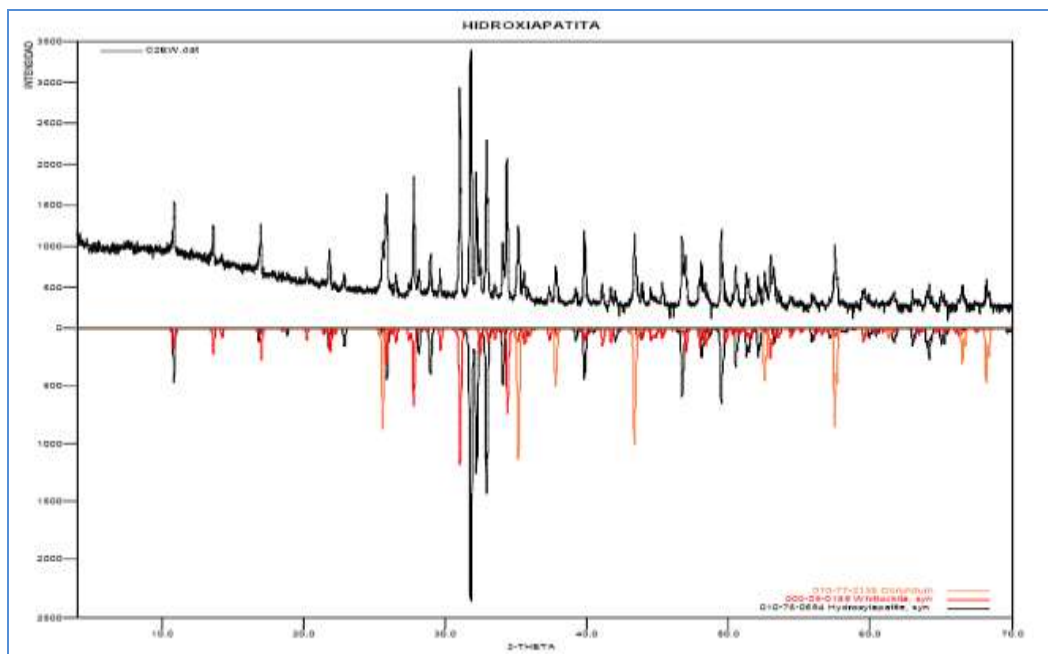
Fuente: Espectrómetro infrarrojo Ingeniería Química

**Figura 30.** Perfil Infrarrojo ácido glicólico experimental



Fuente: Espectrómetro infrarrojo Ingeniería Química

**Figura 31.** Perfil Infrarrojo Hidroxiapatita experimental

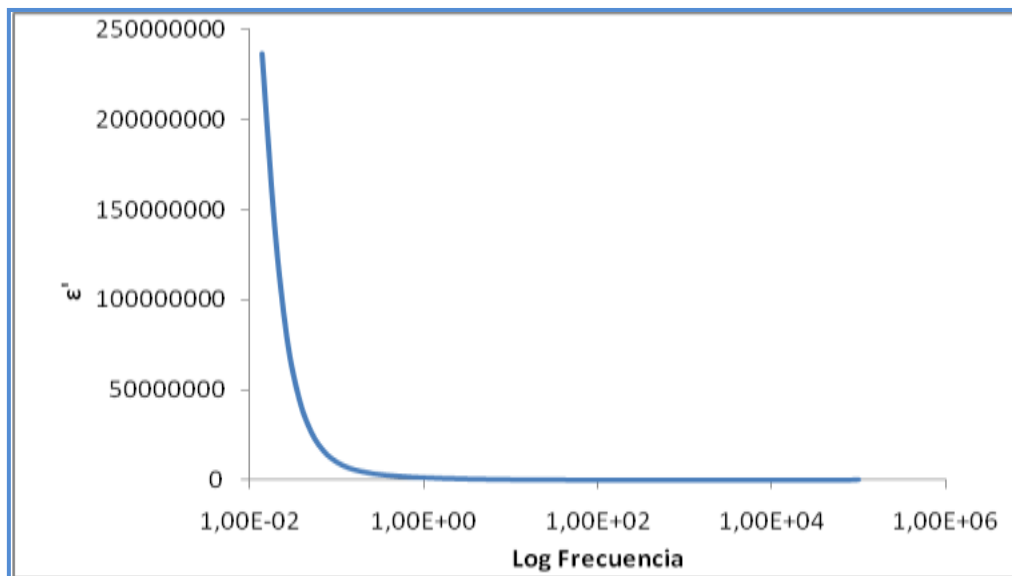


Fuente: Laboratorio de Difracción de rayos X UIS.

## Anexo E. PERMITIVIDAD

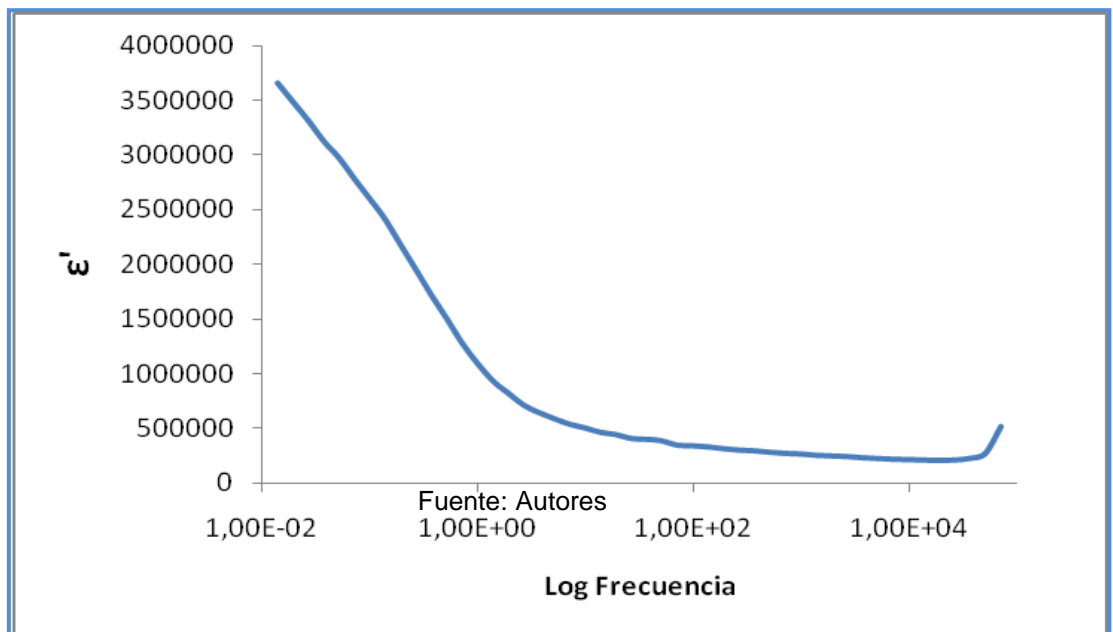
En las siguientes figuras se presenta los espectros de permitividad

**Figura 32.** Espectro de permitividad con células a 24h de la matriz polimérica 0%Hap 0%Q.



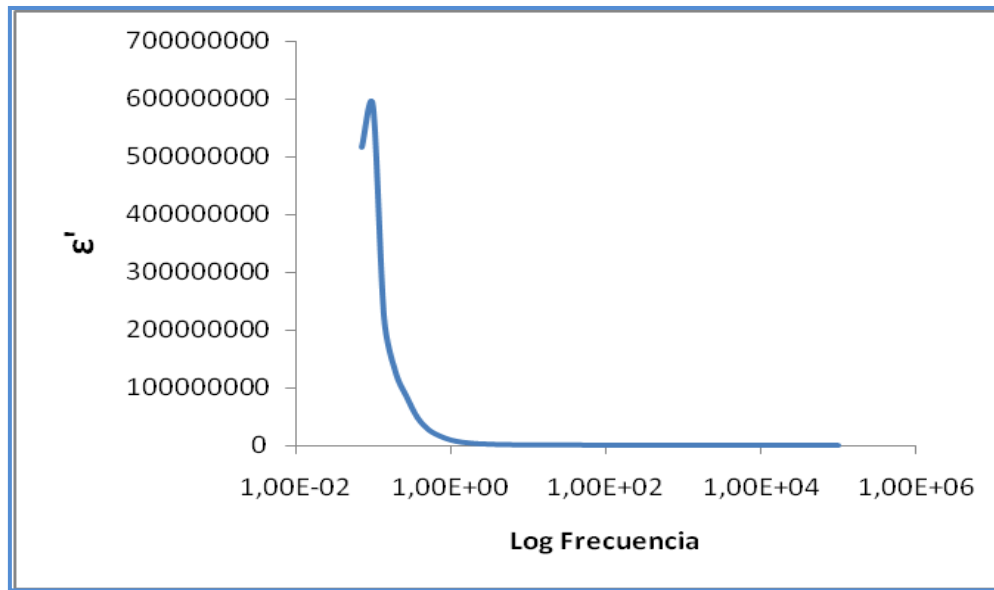
Fuente: Autores

**Figura 33.** Espectro de permitividad con células a 24h de la matriz polimérica 15%Hap 3%Q.



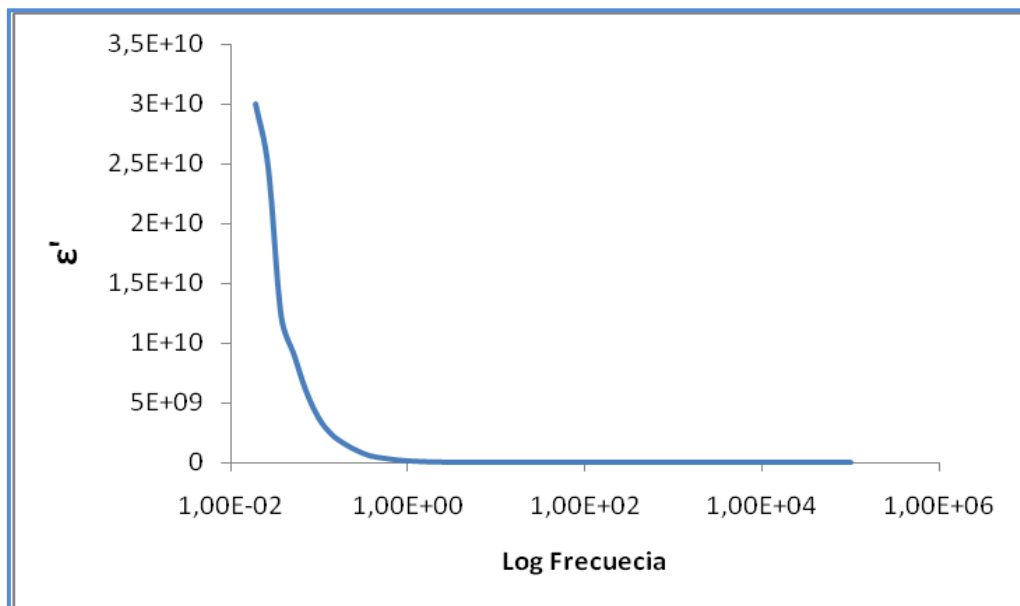
Fuente: Autores

**Figura 34.** Espectro de permitividad con células a 24h de la matriz polimérica 5%Hap 7%Q.



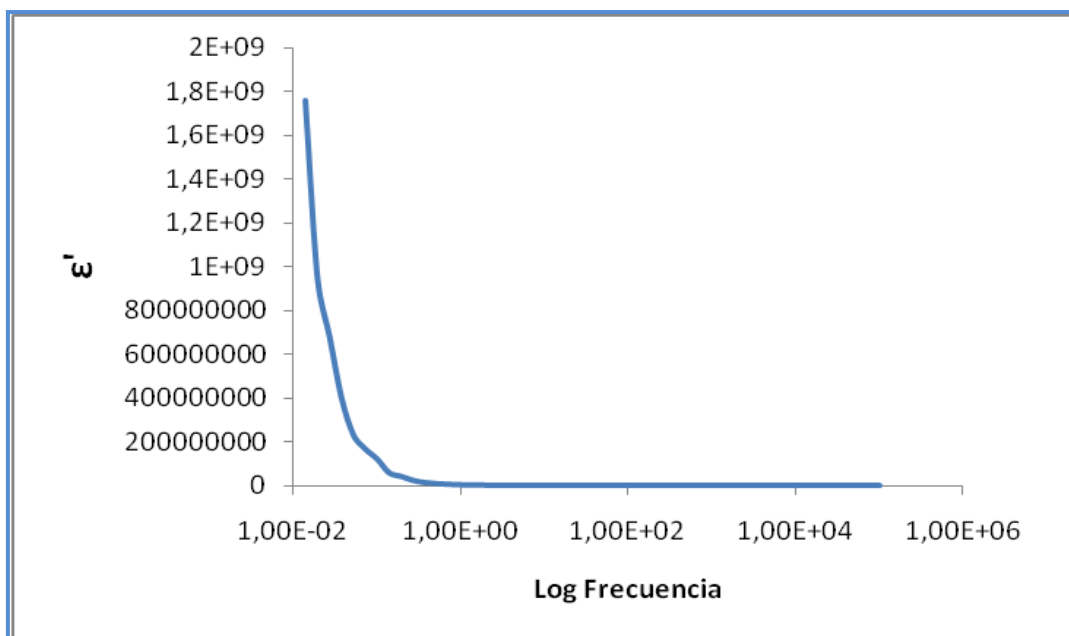
Fuente: Autores

**Figura 35.** Espectro de permitividad con células a 24h de la matriz polimérica 15%Hap 7%Q.



Fuente: Autores

**Figura 36.** Espectro de permitividad con células a 24h de la matriz polimérica 10%Hap 5%Q.



Fuente: Autores