

**EVALUACIÓN INTERFACIAL DE LA ORIENTACIÓN Y ADHESIÓN DE  
CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS SOBRE PLGA-HAP Y QUITOSANO  
EXPUESTAS A POLARIZACIÓN**

**MARIA DELMAR VARGASQUINTERO**

**JOSE BERNARDO PEÑAS SERPA**

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

**2010**

**EVALUACIÓN INTERFACIAL DE LA ORIENTACIÓN Y ADHESIÓN DE  
CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS SOBRE PLGA-HAP Y QUITOSANO  
EXPUESTAS A POLARIZACIÓN**

**MARIA DELMAR VARGASQUINTERO  
JOSE BERNARDO PEÑAS SERPA**

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

Director:

**CUSTODIO VÁSQUEZ QUINTERO**

M.Sc Ingeniero Metalúrgico

Codirector:

**LEIDY MARCELA GELVES JEREZ**

Ingeniera Química

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

**2010**

## DEDICATORIA

*A Dios, por concederme la vida, la  
sabiduría y protección para alcanzar mis metas.*

*A mis padres, Ana Lucila y Marco Antonio,  
por su amor, esfuerzo, dedicación,  
formación y comprensión.*

*A mis abuelos que desde el cielo  
han sido mi guía a lo largo de la vida.*

*A mi hermana Melissa y a toda mi familia  
por su confianza, afecto y cariño.*

*A Alicia Quintero por su apoyo incondicional.*

*A Edwin Gómez, por su apoyo en los momentos difíciles  
y por estar siempre conmigo,*

*María Delmar Vargas Quintero*

*A Dios por darme la expectativa  
segura de las cosas aunque no las  
contemple.*

*A mi madre Reyes Serpa, Por el  
apoyo incondicional, el cariño,  
esfuerzo. Por siempre creer en mí  
aun en las circunstancias más  
difíciles*

*A mi Tía Rosario Serpa por ser  
como una madre*

*José Bernardo Peñas Serpa*

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores de este trabajo expresan sus sinceros agradecimientos:

A CUSTODIO VÁSQUEZ QUINTERO, ingeniero metalúrgico M.sc, Director de esta investigación y Director del grupo del Grupo de Investigaciones en Corrosión (GIC).

A LEIDY MARCELA GELVES, ingeniera química, Codirectora de esta investigación por su paciencia y orientación durante todo el desarrollo y ejecución de nuestro proyecto.

A NERLY DEYANIRA MONTAÑEZ, ingeniera química, por su amistad y apoyo incondicional.

A HUGO ARMANDO ESTUPIÑAN, ingeniero metalúrgico M.sc. por la asesoría brindada.

Al Grupo de Investigaciones en Corrosión GIC, por sus enseñanzas y acogida, en especial a los profesores DIONISIO LAVERDE CATAÑO, ingeniero metalúrgico PhD, DARÍO YESID PEÑA, ingeniero metalúrgico PhD,

Al centro de investigaciones en enfermedades tropicales, CINTROP.

A la Universidad Industrial de Santander por la oportunidad de formación como ingenieros químicos.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN.....	16
1. REVISIÓN DEL ESTADO DEL ARTE DEL CONOCIMIENTO. ....	18
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	23
2.1 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	23
2.1.1 Revisión bibliográfica.....	23
2.2 DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA.....	24
2.2.1 Síntesis de PLA, PGA e Hidroxiapatita (Caracterización por FT-IR).....	24
2.2.2 Obtención de las mezclas a evaluar de PLGA-HAP y Quitosano.....	24
2.2.3 Caracterización electroquímica y gravimétrica de las mezclas de materiales obtenidas .....	27
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS. ....	28
3.1 ANÁLISIS DEL PROCESO DE ADHESIÓN CELULAR POR EIS .....	28
3.3.1 Análisis estadístico de los resultados obtenidos por EIS. ....	33
3.2 ANÁLISIS DEL PROCESO DE ADHESIÓN POR QCM.....	35
3.3 ANÁLISIS DE LA ORIENTACIÓN DE LAS CÉLULAS.....	37
CONCLUSIONES.....	38
BIBLIOGRAFÍA.....	39

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Composición de las soluciones a evaluar. ....	25
Tabla 2. Condiciones de electrodeposición del recubrimiento de la mezcla sobre el cristal de cuarzo Au-Ti. ....	25
Tabla 3. Cobertura de las células sobre el material. ....	30
Tabla 4. Masa adherida por unidad de área QCM. ....	35

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Esquema de la metodología experimental.....	23
Figura 2. Electrodeposición y montaje para las pruebas electroquímicas y microgravimétricas. a) Cristal de cuarzo Au-Ti. b) Ánodo y cátodo c) Montaje de electrodeposición. d) Montaje celda de teflón.....	26
Figura 3. Equipos para la realización de pruebas microgravimétricas y electroquímicas. a) Microbalanza de cristal de cuarzo. b) Potenciostato GAMRY.	27
Figura 4. Representación del ajuste de los espectros de bode mediante simulación en el software Zview. ....	28
Figura 5. Circuito equivalente del proceso de células osteoblásticas sobre recubrimientos poliméricos modificados. ....	29
Figura 6. Relación entre la cobertura con el tiempo a 0,05V. ....	31
Figura 7. Relación entre la cobertura con el tiempo a -0,05V. ....	31
Figura 8. Diagrama del pareto para análisis EIS.....	33
Figura 9. Diagrama de interacción de efectos principales para el análisis EIS.....	33
Figura 10. Relación entre la cobertura con el tiempo a 0,05V usando QCM .....	36
Figura 11. Relación entre la cobertura con el tiempo a -0,05V usando QCM .....	36
Figura 12. AFM Cristal con recubrimiento con la Sn 3.....	37

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
ANEXO A PROCEDIMIENTOS PARA LA SÍNTESIS DE MATERIALES.....	43
ANEXO B ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA (FT-IR).....	44
ANEXO C PARÁMETROS DE LOS CIRCUITOS EQUIVALENTES.....	52
ANEXO D MICROSCOPIO DE FUERZA ATOMICA (AFM).....	54
ANEXO E MICROSCOPIA INTERFEROMÉTRICA.....	56
ANEXO F DIAGRAMAS DE LA MICROBALANZA DE CRISTAL DE CUARZO.....	57
ANEXO G DIAGRAMAS DE ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA.....	59

**TÍTULO:** EVALUACIÓN INTERFACIAL DE LA ORIENTACIÓN Y ADHESIÓN DE CÉLULAS OSTEOLÁSTICAS SOBRE PLGA-HAP Y QUITOSANO EXPUESTAS A POLARIZACIÓN.\*

**AUTORES:** MARÍA DELMAR VARGAS QUINTERO  
JOSE BERNARDO PEÑAS SERPA.\*\*

**PALABRAS CLAVES:** Ingeniería de tejidos, adhesión celular, biomateriales, espectroscopia de impedancia electroquímica.

### RESUMEN

Durante mucho tiempo se ha creído que los tejidos dañados solo pueden ser sustituidos por trasplante de órganos o por una total implantación de partes artificiales. En consecuencia la industria biomédica ha encaminado sus estudios a la producción de nuevos materiales, biomateriales que reemplacen total o parcialmente los tejidos y órganos dañados o deteriorados en el cuerpo humano.

La elección de quitosano como material de apoyo del tejido se rige por sus múltiples propiedades biológicas, físicas y químicas como biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad, notable afinidad a las proteínas, entre otras.

Las células para experimentación de siembra en matrices celulares empleadas en estudios óseos *in vitro*, son células fibroblásticas o células osteoblásticas. Las células osteoblásticas se han empleado para estudiar respuestas celulares en sus diferentes etapas de reconocimiento, diferenciación y adhesión celular en materiales diseñados con altas características bioactivas.

Los osteoblastos son las células responsables de la formación ósea y del mantenimiento de la arquitectura esquelética.

En esta investigación se evaluó la adhesión y actividad de células osteoblásticas sobre superficies utilizando métodos electroquímicos y microgravimétricos simultáneos, con los resultados obtenidos se llegó a la conclusión que con el aumento en la concentración de quitosano se incrementa la adhesión celular y que la influencia de la polarización superficial sobre la orientación celular mostró que las células responden a los estímulos de polarización en una organización irregular y no completamente orientada. Sin embargo se identificaron posibles zonas de crecimiento preferencial en el centro de los cristales.

---

\* Proyecto de Grado

\*\* Universidad industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físico – Química. Escuela de Ingeniería Química. Director. Custodio Vásquez Quintero. Codirector. Leidy Marcela Gelves Jerez

**TITLE:** EVALUATION INTERFACIAL OF ORIENTATION AND ADHESION OF OSTEOBLASTICS CELLS ON PLGA-HAP CHITOSAN EXPOSED TO POLARIZATION\*

**AUTHORS:** MARÍA DELMAR VARGAS QUINTERO  
JOSE BERNARDO PEÑAS SERPA\*\*

**KEYWORDS:** Tissue engineering, osteoblastic cells, cell adhesion biomaterials, electrochemical impedance spectroscopy.

### **ABSTRACT**

For long time it was believed that damaged tissues could only be replaced by organ transplantation or implantation of total artificial parts. Consequently, the biomedical industry has focused their studies an production of new materials, biomaterials to replace completely partly tissues and organs damaged or deteriorated in the human body.

The choice of chitosan as a support tissue is governed by its multiple biological properties, physical and chemical properties as biocompatibility, biodegradability, no toxicity, significant protein binding, among others.

Cells for experimental planting in cellular matrices used in bone studies in vitro are fibroblast cells or osteoblastic cells. Osteoblastic cells have been used to study cellular responses at different stages of recognition, differentiation and cell adhesion in engineered materials with high bioactive characteristics.

Osteoblasts are the cells responsible for bone formation and maintenance of skeletal architecture.

The present study the cell adhesion and activity osteoblastic surfaces was evaluated using electrochemical and microgravimetric methods simultaneous, I concluded that with increasing chitosan concentration increased adhesion cell and that the influence of surface polarization on cell orientation showed that cells further to polarization stimuli in an irregular organization and not fully orientated. However, it identified potential areas of preferential growth in the center of the crystals.

---

\* Grade Work

\*\* Engineering Physical-Chemical Faculty, Chemical Engineering School, Custodio Vásquez Quintero, Marcela Gelvez Jerez

## INTRODUCCIÓN

Los problemas específicos de salud que afectan la cotidianidad del ser humano, tales como fracturas en los huesos, ruptura de ligamentos, traumas como consecuencia de accidentes, cáncer, enfermedades congénitas, quemaduras, etc., han motivado el desarrollo de la ingeniería de tejidos como una solución efectiva y rápida para la recuperación o cambio total de tejidos y órganos dañados.

Es así, como en el contexto de la medicina, surge la necesidad de conocer el comportamiento del cuerpo humano ante los dispositivos biomédicos, así como sus efectos a corto, mediano y largo plazo [1].

La modificación superficial de materiales para aplicaciones biomédicas presenta la posibilidad de combinar las propiedades ideales (por ejemplo, resistencia a la tensión, rigidez de los implantes, propiedades electrónicas u ópticas para sensores), con las propiedades superficiales deseadas, como, biocompatibilidad o selectividad a una biomolécula en particular.

Por lo tanto, en este trabajo se ha realizado la evaluación de adhesión de células osteoblásticas sobre superficies polarizadas y no polarizadas, compuestas de ácido poliláctico-ácido poliglicólico (PLGA)-hidroxiapatita (HAP)-Quitósano para aplicaciones en implantes endo-óseos, utilizando métodos electroquímicos (EIS) *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, simultáneos con mediciones de cambios microgravimétricos (QCM) *Quartz Crystal Microbalance*. Evaluando además el efecto de la concentración de quitósano.

La técnica EIS permitió determinar las propiedades eléctricas de este sistema heterogéneo comprobando la conformación de interfases entre monocapas diferentes, tales como: medio de cultivo RPMI/células osteoblásticas HOS, células osteoblásticas HOS/recubrimiento, recubrimiento/cristal, usando modelos de circuitos equivalentes.

La microbalanza de cristal de cuarzo permitió medir los cambios de masa de la superficie del material compuesto, sobre la cual se realizó el proceso de adhesión celular. Se usaron técnicas de microscopía óptica y de fuerza atómica (AFM, *Atomic Force Microscopy*) para corroborar la presencia de células y observar la influencia del quitosano en la topografía del material.

Este proyecto se desarrolló en el marco del proyecto de Investigación titulado “Desarrollo de Soportes y Películas de PLA/Biocerámico sobre Ti6Al4V para regeneración ósea como producto de innovación tecnológica de la Empresa Quirúrgicos Especializados S.A” código 1102-403-20711, financiado por Colciencias y realizado por el grupo de investigación en corrosión UIS, y el proyecto interno financiado por la VIE-UIS: Evaluación del crecimiento y diferenciación de osteoblastos sobre colágeno direccionado electroquímicamente, mediante análisis nanogravimétrico.

## 1. REVISIÓN DEL ESTADO DEL ARTE DEL CONOCIMIENTO.

La creciente necesidad de mejorar la salud humana mediante el desarrollo de órganos sintéticos, ha llevado a los investigadores a plantear la posibilidad de utilizar simultáneamente células y materiales de diversa naturaleza para la reconstrucción de órganos y tejidos, dando así nacimiento a una disciplina conocida como ingeniería de tejidos [2].

La ingeniería de tejidos es la aplicación de principios biológicos, químicos y métodos de ingeniería para desarrollar sustitutos biológicos que mantengan o mejoren los tejidos vivos, utilizando materiales de diferente naturaleza como soporte de material biológico, proteínas, células, factores de crecimiento, que le permitan al huésped, reconocer y aceptar el implante. Los materiales de los soportes pueden ser cerámicos, poliméricos, metálicos o una mezcla de ellos [3].

Los polímeros son materiales muy aceptados en la ingeniería de tejidos. La función de los polímeros en esta rama de la ciencia es dirigir el crecimiento celular, ya sea, a partir de células provenientes de los tejidos adyacentes o células sembradas en los materiales previamente a la implantación. Por lo tanto, el polímero debe proveer una adecuada adhesión, favorecer la proliferación y diferenciación celular y en ciertos casos, favorecer la migración celular [4].

La conformación de la matriz extracelular (MEC) en la superficie de estos materiales, está relacionada con la funcionalidad de los mismos. Esta matriz es un sistema dinámico integrado por diversas moléculas como colágeno, glucoproteínas, ácido hialurónico, proteoglicanos, glucosaminoglicanos, elastina y fibrina, además de otras sustancias tales como factores de crecimiento, citosina y diversas enzimas.

La organización de los compuestos en la MEC varía con los diferentes tejidos, cada una de estas moléculas desempeña funciones de manera integrada con las demás, esto hace que la MEC sea calificada como un verdadero complejo funcional.

El colágeno y el sistema elástico constituyen la columna vertebral de la MEC. Las glucoproteínas actúan como moléculas de adhesión del sustrato intercelular, son importantes en las interacciones célula-célula y matriz-célula. Los glucosaminoglicanos y proteoglicanos tienen un papel fundamental en la adhesión celular ya que median con la superficie de la membrana celular y con otros componentes matriciales, transmitiendo señales a proteínas transmembranales, como las integrinas [5].

Estos componentes se localizan entre las células de un determinado tejido o en el lado externo de la membrana plasmática de cualquier célula y son generalmente producidos por las mismas células o los aporta la corriente sanguínea, en ambos casos forman el medio donde las células sobreviven, se multiplican y desempeñan sus funciones. La dinámica de interacción entre la célula y la matriz extracelular contribuye a la migración celular, proliferación, diferenciación, morfología, metabolismo y la consecuente muerte celular [6].

Los materiales más estudiados para la fabricación de matrices biológicas han sido principalmente poliésteres de cadena sencilla como el ácido poliláctico y el ácido poliglicólico cuya propiedad principal es la biodegradación y reemplazo por la estructura de las células sembradas. Los productos de degradación de estos materiales pueden ser metabolizados por el organismo y eliminados en forma de desechos no tóxicos y CO<sub>2</sub>.

La propiedad del ácido poliglicólico de tener una estructura lineal permite que la mezcla entre los dos polímeros presenten mejores propiedades tanto mecánicas como superficiales que los usados individualmente. Estos dos polímeros pueden ser copolimerizados para graduar diferentes velocidades de degradación y además, permitir ser permeable y biotolerable a las células óseas y ser reabsorbido a través del ciclo de Krebs [7, 8, 9,10].

Las reacciones fisiológicas entre las células y la MEC corresponden a un reconocimiento celular de grupos potencialmente funcionales en la superficie de los materiales. Se ha encontrado que la señalización bioquímica depende de ubicar en el material, grupos funcionales similares en composición a los que posee la MEC del tejido a remplazar o reparar.

Compuestos de hidroxiapatita, fosfatos tricálcicos y biovidrios se han empleado como núcleos de señalización y formación de MEC asegurando en cierta forma el éxito de la adhesión y diferenciación de células sembradas en un material. La hidroxiapatita por ser un material que compone el tejido óseo debe ser el elemento bioactivo más indicado para usar en la mezcla con los polímeros de poliláctico y poliglicólico como matriz de crecimiento celular. Sin embargo, se han detectado problemas en la estabilidad química de estas mezclas, cuya consecuencia se ha presentado por los cambios de pH superficiales de los polímeros involucrados, en donde la reacción de formación de apatita, en el proceso de interacción fisiológica entre las células y el material, decae por la degradación de los polímeros.

Para contrarrestar este inconveniente se ha mejorado la composición de estas mezclas, con la adición de quitosano, el cual es un polisacárido lineal con componentes de glucosamina, similar a los glucosaminoglicanos presentes en la MEC.

El quitosano mezclado con estos materiales ayuda a mantener estable la estructura entre los elementos bioactivosapatíticos, los polímeros y en cierta forma a las células. Por otra parte, la señalización celular se favorece por su similitud con los proteoglicanos y glucosaminoglicanos presentes en la MEC natural, además favorece la reacción hidroxílica sobre la superficie del material, promoviendo el aumento del pH local a niveles que aseguran la supervivencia de las células y sus procesos de crecimiento.

La elección de quitosano como material de apoyo del tejido se rige por sus múltiples propiedades biológicas, físicas y químicas como biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad, inercia fisiológica, notable afinidad a las proteínas, antimicrobiana, antibacteriana, hemostática, fungistático, entre otras. [11,12]

Las células para experimentación de siembra en matrices celulares empleadas en estudios óseos *in vitro*, son células fibroblásticas o células osteoblásticas. Las células osteoblásticas se han empleado para estudiar respuestas celulares en sus diferentes etapas de reconocimiento, diferenciación y adhesión celular en materiales diseñados con altas características bioactivas.

Los osteoblastos son las células responsables de la formación ósea y del mantenimiento de la arquitectura esquelética. La fase orgánica del tejido óseo, está compuesto en un 90% del colágeno tipo I y el restante 10% por proteínas no colagénicas. Su función principal es la síntesis y deposición de las proteínas de la matriz del hueso (osteóide). La adhesión celular de los osteoblastos se lleva a cabo por acoplamiento que se realiza a través de centros de contacto, donde la membrana plasmática se une a los componentes de la matriz extracelular que ha adsorbido la superficie sólida [13].

Las células llamadas osteosarcomas humanos (*Human Osteosarcoma*) son una línea celular de osteoblastos, consistente de células poligonales o fusiformes provenientes de células tumorales [14]. Esta línea es atractiva para estudios *invitro*, relacionados con la respuesta celular a diversos compuestos presentes en implantes endo-óseos.

Se ha estudiado un mejoramiento en las propiedades de adhesión y reacción celular con la superficie de los materiales, mediante la evaluación de las respuestas de potencial redox del proceso de interacción entre las células y el material. La selección adecuada de los potenciales redox, permite emplear métodos de estimulación por polarización, que consiste en aumentar controladamente la energía libre superficial de los materiales mediante procesos de electrodo. Las células polarizadas pueden presentar el núcleo celular en posición distal respecto a la superficie celular, disposición de regiones especializadas de la membrana plasmática modificada para el tráfico, la secreción vesicular y favorecer uniones con los osteoblastos adyacentes [15,16].

En términos generales, el hecho de aumentar la señalización y funcionalización celular hace parte de los componentes claves en la ingeniería de tejidos, el cual diseña un soporte que provea el cimiento para la adhesión celular y un marco estructural para que las células se organicen y ensamblen en un nuevo tejido funcional.

En consecuencia, el uso de materiales compuestos ha mostrado ser ideal para dispositivos biomédicos; las células normales responden a señales micro y nano ambientales relacionadas con la matriz extra celular, estas señales pueden afectar la función celular y la misma estructura del tejido.

## 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

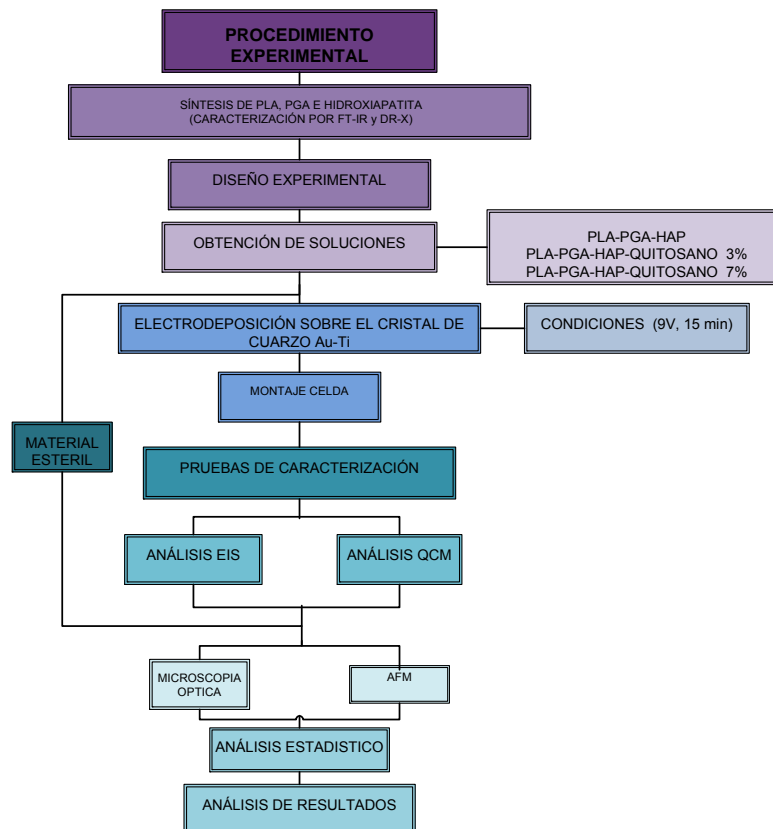
### 2.1 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### 2.1.1 Revisión bibliográfica

Se realizó la revisión bibliográfica, obteniéndose toda la información necesaria para dar inicio al proyecto.

En la figura 1 se observa de forma esquemática la metodología experimental usada para esta investigación.

Figura 1. Esquema de la metodología experimental



## **2.2 DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA**

Las etapas del desarrollo experimental fueron las siguientes.

### **2.2.1 Síntesis de PLA, PGA e Hidroxiapatita (Caracterización por FT-IR).**

La síntesis de PLA y PGA se llevo a cabo por medio policondensación de ácido láctico y ácido glicólicoanalítico respectivamente, bajo las condiciones mostradas en el Anexo A, en la Tabla A1 y en la Tabla A2 [17]. Posteriormente se realizó la caracterización del producto obtenido por la técnica de infrarojo FT-IR, cuyos resultados se presentan en el Anexo B.

Para la obtención del elemento bioactivo del compuesto final se siguió una ruta de síntesis para obtener la hidroxiapatita, por precipitación acuosa. En este método se prepararon dos soluciones una de nitrato de calcio y otra de fosfato de amonio. Se basificaron a un pH de 10 cada una. Posteriormente se mezclaron las dos soluciones. La mezcla resultante se mantuvo en un proceso de envejecimiento por 144 horas a temperatura ambiente, decantándose la mezcla posteriormente. Luego se realizó un calentamiento a 60°C durante 24 horas en una mufla WTB-BLINDER, y una calcinación a 1050°C por una hora en un horno TERRIGENO [18,19].

### **2.2.2 Obtención de las mezclas a evaluar de PLGA-HAP y Quitosano.**

Para obtener y evaluar por microbalanza de cristal de cuarzo y espectroscopia de impedancia electroquímica, los materiales compuestos fueron depositados catódicamente sobre cristales de cuarzo con electrodos de Au-Ti.

Para realizar la electrodeposición de estos materiales se prepararon tres soluciones de PLA-PGA a una concentración de 15% p/v en acetona, HAP y quitosano en las siguiente proporción (tabla 1) [20].

Tabla 1. Composición de las soluciones a evaluar.

SOLUCIÓN	PLA-PLG (15% P/V SLN)	HAP(% P/V)	QUITOSANO(% P/V)
1	70/30	10	0
2	70/30	10	3
3	70/30	10	7

Fuente los autores.

El método de fabricación del recubrimiento del cristal empleado fue por electroforesis, bajo condiciones halladas en anteriores trabajos realizados en el grupo de investigación en corrosión [21]. Para realizar los recubrimientos sobre los cristales de cuarzo Au-Ti con cada una de las soluciones, las condiciones empleadas se muestran en la tabla 2.

Se usó una fuente de potencia ThermoScientific EC570-90, un ánodo de acero inoxidable y una celda de vidrio con un soporte de teflón, adaptada para sostener el cristal, durante la electrodeposición catódica. Este proceso fue llevado a cabo en un ambiente de bioseguridad, dentro de una cámara de flujo laminar, con el fin de mantener la esterilidad en los materiales y los productos obtenidos.

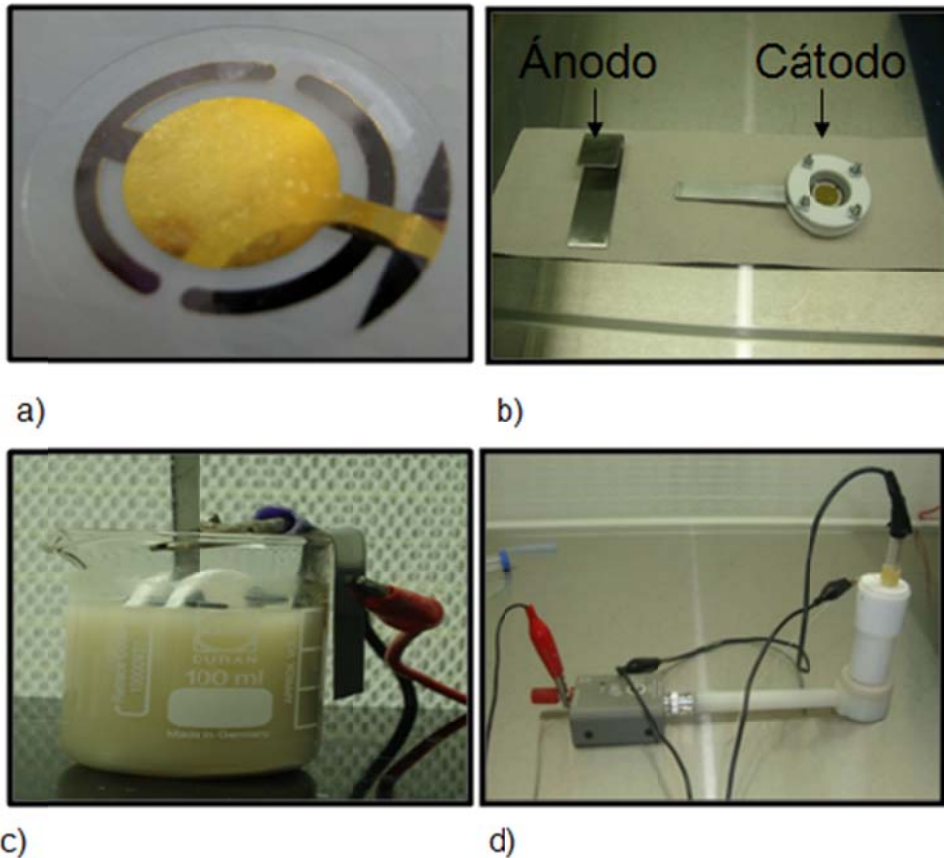
Tabla 2. Condiciones de electrodeposición del recubrimiento de la mezcla sobre el cristal de cuarzo Au-Ti.

SOLUCIÓN	TIEMPO (min)	TEMPERATURA (°C)	VOLTAJE (V)
1,2,3	15	25	9

Fuente los autores.

Obtenidos los recubrimientos, se realizó un tratamiento térmico en una mufla, WTB-BLINDER a 100°C durante 15 minutos, con el cual se mejoró la morfología y adhesión del mismo. Mediante este tratamiento, se logra mejorar la integración de los componentes de la mezcla y la eliminación del solvente del proceso de electrodeposición.

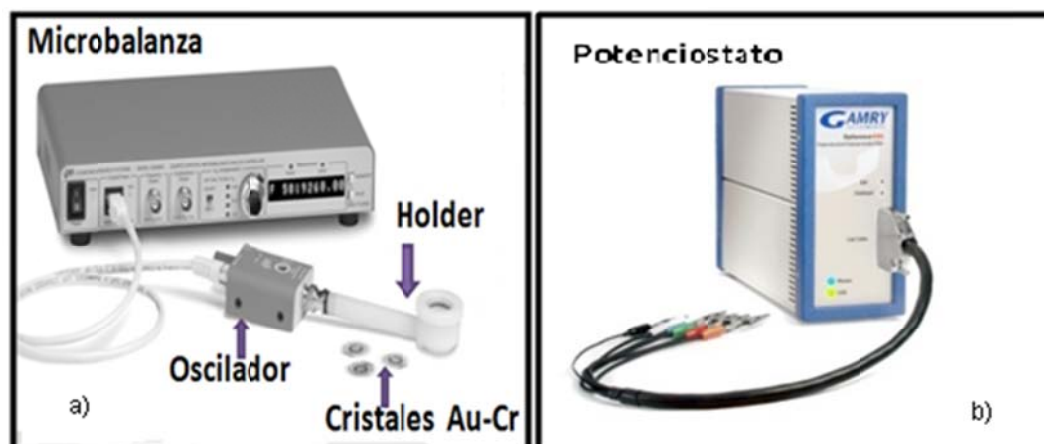
Figura 2. Electrodeposición y montaje para las pruebas electroquímicas y microgravimétricas. a) Cristal de cuarzo Au-Ti. b) Ánodo y cátodo c) Montaje de electrodeposición. d) Montaje celda de teflón.



### 2.2.3 Caracterización electroquímica y gravimétrica de las mezclas de materiales obtenidas

Esta caracterización se llevó a cabo por medio de las técnicas QCM y EIS simultáneamente, para lo cual se empleó una celda de tres electrodos, donde el electrodo de trabajo fue el cristal recubierto, el contra-electrodo un alambre de platino y el electrodo de referencia, fue un electrodo de calomel saturado 3M de KCl. Para las mediciones en la QCM se empleó el modelo QCM200. Las pruebas de EIS, fueron desarrolladas usando un potenciostato GAMRY 600 bajo las siguientes condiciones de experimentación: aplicación de un voltaje natural de 0V, 50mV y -50mV de potencial de corriente continua, los potenciales que fueron determinados mediante ensayos de voltametría cíclica en el material con las células y el medio. El rango de frecuencia en la prueba de EIS fue entre 0.01 y 100.000 Hz, con una toma de datos de 7 puntos por década[22].

Figura 3. Equipos para la realización de pruebas micrograviméticas y electroquímicas. a) Microbalanza de cristal de cuarzo. b) Potenciostato GAMRY.



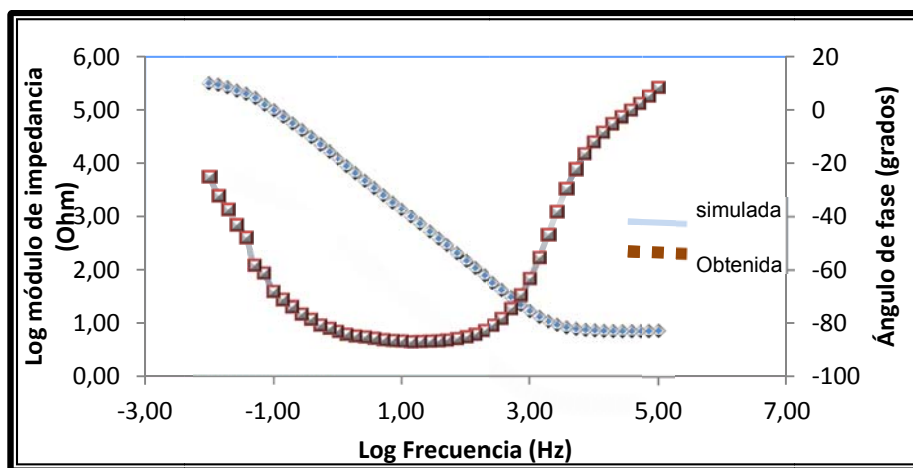
### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

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

El método electroquímico EIS fue utilizado para evaluar la adhesión de células osteoblásticas HOS en el recubrimiento. Las mediciones de EIS se realizaron bajo estímulos de potencial para polarizar a 0V, 50mV y -50mV. Los espectros de Bode y Nyquist obtenidos de estos ensayos, fueron ajustados a modelos de circuitos equivalentes propuestos, utilizando el software Zview (los resultados de la simulación se muestran en el anexo C).

El error obtenido de los ajustes realizados, en términos de  $\chi^2$ , fue menor de  $10^{-3}$  entre los datos experimentales y los datos simulados, el cual se consideró en términos estadísticos, como aceptable. En la figura 2 se muestra un caso típico de los ajustes realizados.

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

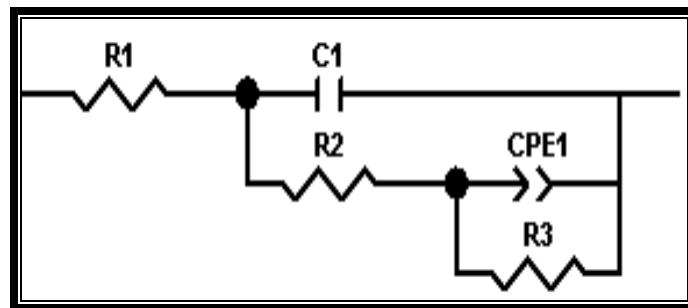


Fuente los autores.

En esta simulación, se asume un modelo o circuito equivalente de la representación de los procesos de electrodo entre los materiales, el medio y las células en la doble capa electroquímica. Este modelo, puede variar, dependiendo de los procesos que se quieran representar y del nivel de ajuste obtenido.

En la figura 5 se muestra un modelo para representar los procesos de doble capa de electrodo, asumiendo que suceden en dos interfaces fijas entre el cristal y el recubrimiento y el medio con células y el material en el recubrimiento. Estas interfaces, se representan mediante constantes de relajación de la transferencia de carga, relacionadas por una capacitancia y una resistencia. Las constantes de tiempo están relacionadas entre sí, en paralelo, debido a la similitud en las constantes conductivas, mostrando que los espectros se traslapan. Esta configuración se relaciona con una resistencia en serie que representa la caída óhmica u oposición a la transferencia de carga del electrolito o medio celular. De acuerdo con esto, se pudo representar el fenómeno de adhesión de células osteoblásticas HOS por medio de un circuito eléctrico equivalente.

Figura 5. Circuito equivalente del proceso de células osteoblásticas sobre recubrimientos poliméricos modificados.



Fuente los autores.

La interpretación de este modelo permite obtener información del proceso de adhesión celular, por medio del análisis de la resistencia a la transferencia de carga a medianas frecuencias, lo cual se observa en el Anexo C.

El inverso a la resistencia a la transferencia de carga  $R_{tc}$  representa la masa adherida por unidad de área. Por lo tanto, la adhesión celular se puede representar por el porcentaje de cobertura, el cual relaciona la resistencia a la transferencia de carga del cristal con el recubrimiento sin las células y la resistencia a la transferencia de carga del cristal con el recubrimiento con las células, lo cual se representa en la ecuación 1 [23].

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

Donde  $\theta$  representa la cobertura de las células sobre el material. Los valores se muestran en la siguiente tabla.

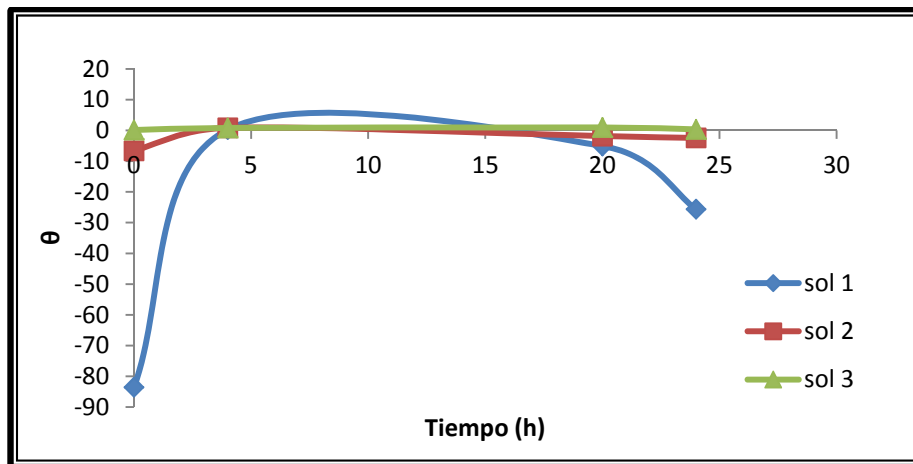
Tabla 3. Cobertura de las células sobre el material.

Solución	Voltaje (V)	PLGA(%)	HAP(%)	Q (%)	Cobertura			
					0 horas	4 horas	20 horas	24 horas
1	0.05	70-30	10	0	9,90E-01	-1,97E-01	8,99E-01	9,24E-01
2		70-30	10	3	6,47E-01	-1,36E-01	-1,96E+00	-1,40E+00
3		70-30	10	7	2,80E-01	2,94E-01	2,21E-01	2,32E-01
1	-0,05	70-30	10	0	1,42E-01	-3,79E-01	1,06E-01	7,35E-01
2		70-30	10	3	-5,43E-01	-5,86E+03	4,16E-02	-9,82E-01
3		70-30	10	7	5,39E-02	-6,31E+03	5,92E-01	-4,09E-01
1	0V	70-30	10	0	1,21E-01	1,81E-01	3,83E-01	-1,03E+00
2		70-30	10	3	-1,70E+00	-1,53E+05	-7,38E+00	-7,21E+00
3		70-30	10	7	3,99E-01	8,80E-01	9,87E-01	5,27E-01

Fuente los autores.

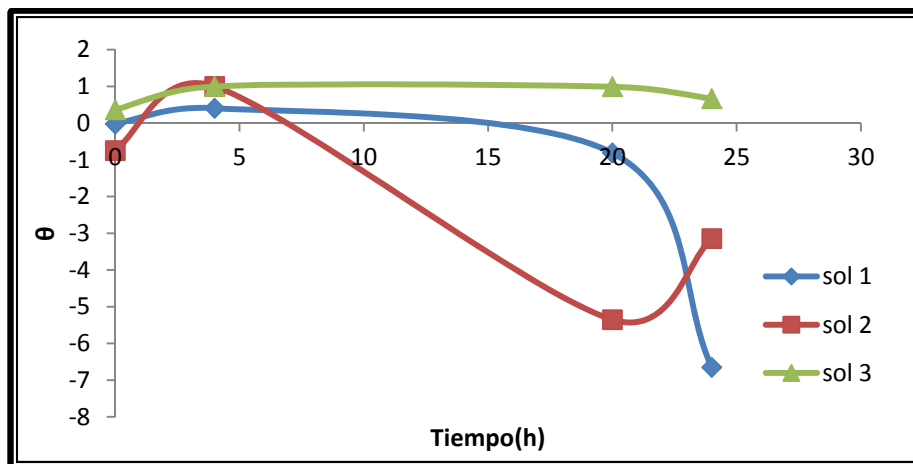
En las figuras 6 y 7 se muestra la adhesión en términos de la cobertura para los diferentes recubrimientos, a los diferentes voltajes aplicados.

Figura 6. Relación entre la cobertura con el tiempo a 0,05V.



Fuente los autores.

Figura 7. Relación entre la cobertura con el tiempo a -0,05V.



Fuente los autores

En la figura 7, se observa que los recubrimientos realizados con la solución 3 (7% p/v de quitosano), mantienen valores altos de adhesión durante las 24 horas. En figura 6, esta solución no tiene los mejores valores, pero mantiene la tendencia de la solución 3 a presentar mejor adhesión.

En las figuras anteriores, se aprecia que los mejores resultados de adhesión se presentaron a un voltaje de  $-0,05$ , con este valor, el material que contiene el quitosano se comporta de forma capacitiva, favoreciendo la adhesión de las células, al aplicar mayores potenciales, el material se comporta de forma resistiva mostrando una disminución de la adhesión.

Del análisis electroquímico se observa que al aumentar el voltaje se presenta menor adhesión y mayor concentración de quitosano mayor adhesión.

El comportamiento se debe a que forma estructuras que se interconectan entre los poros de los recubrimientos, lo que es muy importante, ya que numerosas células migran hacia el interior lo que optimiza la función del recubrimiento y ayuda a la regeneración.

La naturaleza catiónica del quitosano permite interacciones que ayudan a la adhesión y sirve como medio de retención y concentración de factores deseables secretadas por las células [24].

### 3.3.1 Análisis estadístico de los resultados obtenidos por EIS.

Para el análisis estadístico se tomaron los valores de resistencia a la transferencia de carga a frecuencias altas, obtenidas del ajuste de modelo del circuito equivalente para un tiempo de 24 horas.

Figura 8. Diagrama del pareto para análisis EIS.

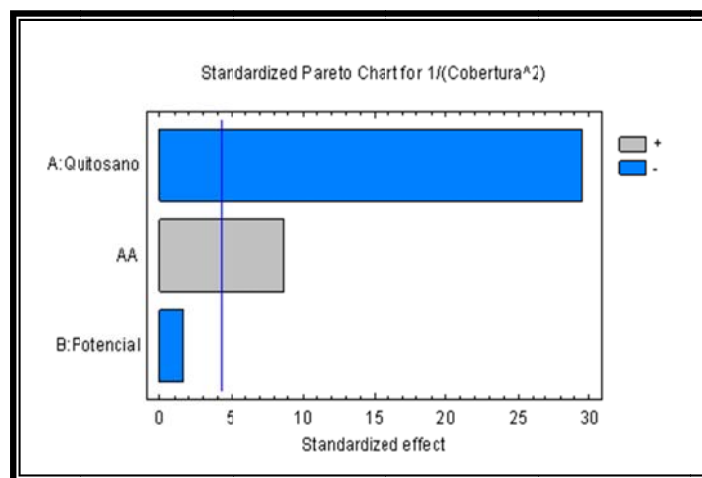
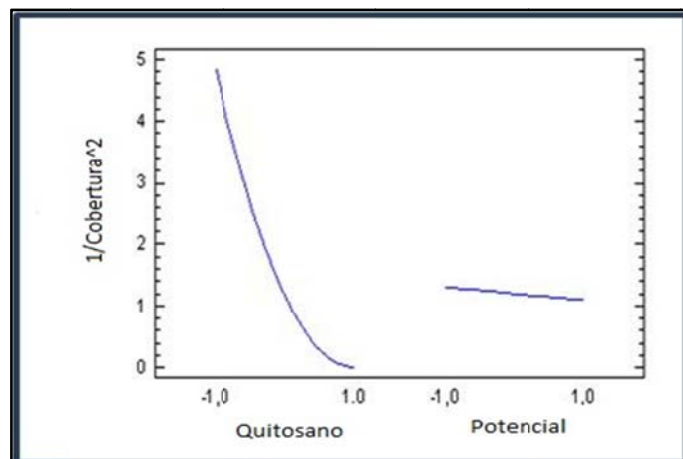


Figura 9. Diagrama de interacción de efectos principales para el análisis EIS.



Fuente los autores.

Se presenta el diagrama de Pareto, en donde se muestran dos factores significativos a la variable de respuesta, uno de los factores es un factor principal, el cual es la concentración de quitosano, el segundo es un factor secundario el cual es el factor quitosano al cuadrado. El tercer factor que aparece, es el potencial aplicado, el cual no es significativo estadísticamente a la variable de respuesta  $1/C^2$ , pero sí interviene en el modelo ajustado, lo que hace aumentar el coeficiente de regresión ajustado.

Cuando se observa el análisis de varianza o Anova, los factores que tienen valor-p por debajo de 0,05 son los factores significativos a la variable de respuesta  $1/C^2$  en el 95,0% de nivel de confianza, lo cual concuerda con el diagrama de Pareto. El modelo es un modelo cuadrático y no lineal, los valores experimentales se ajustan mejor a este modelo inverso del cuadrado.

Tanto el valor del coeficiente de regresión como el de regresión ajustado, es mayor de 99%, lo cual indica que el modelo se ajusta muy bien a los datos experimentales.

En el análisis estadístico se determinó que el quitosano tiene un mayor efecto de interacción con la adhesión, estos efectos se deben a cambios superficiales y químicos que están ocurriendo en la interface. Se observó que el mayor efecto del quitosano con la variable respuesta, se presenta cuando el quitosano se encuentra a concentraciones más altas.

Del análisis electroquímico se observó que a mayores voltajes, la adhesión disminuye y cuando se aumenta la concentración de quitosano, aumenta la adhesión, con lo cual se corrobora los resultados obtenidos a partir de los ensayos electroquímicos.

### 3.2 ANÁLISIS DEL PROCESO DE ADHESIÓN POR QCM

Para el análisis adhesión se utiliza la microbalanza de cuarzo que es una potente técnica para evaluar la adhesión celular, aprovechando que de el análisis obtenemos información del almacenamiento de energía en forma de oscilaciones, se tomó la información dada por los análisis de masa adherida por unidad de área, utilizando esta relación se obtuvo un procedimiento análogo al realizado para las pruebas electroquímicas.

$$\frac{1}{R_{CT}} = M_{ADS} \quad (2)$$

Esta relación se utilizó para obtener datos de cobertura utilizando la ecuación (1) Combinándolos para obtener una ecuación que relaciona la cobertura con la masa adherida. Reemplazando tenemos:

$$\theta = 1 - \frac{M_{ADS}}{M_{ADS}^0} \quad (4)$$

Los parámetros obtenidos por pruebas microgravimétricas se observan en la tabla 4.

Tabla 4. Masa adherida por unidad de área QCM

Solución	Voltaje (V)	PLGA(%)	HAP(%)	Q (%)	Masa Adherida por unidad de área. $\Delta m(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$			
					0 horas	4 horas	20 horas	24 horas
1	0.05	70-30	10	0	7,00E+03	6000	5,00E+03	2,00E+03
2		70-30	10	3	5,00E+03	6,00E+03	3,00E+03	4000
3		70-30	10	7	1,50E+03	2500	3,00E+03	4000
1	-0,05	70-30	10	0	60000	60000	6,00E+04	4,00E+04
2		70-30	10	3	4,50E+03	5,00E+03	3,35E+03	4,00E+03
3		70-30	10	7	6,00E+03	5,00E+03	4,50E+03	3,00E+03
1	0V	70-30	10	0	7,00E+03	5,00E+03	1,50E+04	10000
2		70-30	10	3	2,00E+03	2,50E+03	3,00E+03	6,00E+03
3		70-30	10	7	6,00E+10	2,00E+10	6,00E+09	-1,50E+10

Figura 10. Relación entre la cobertura con el tiempo a 0,05V usando QCM

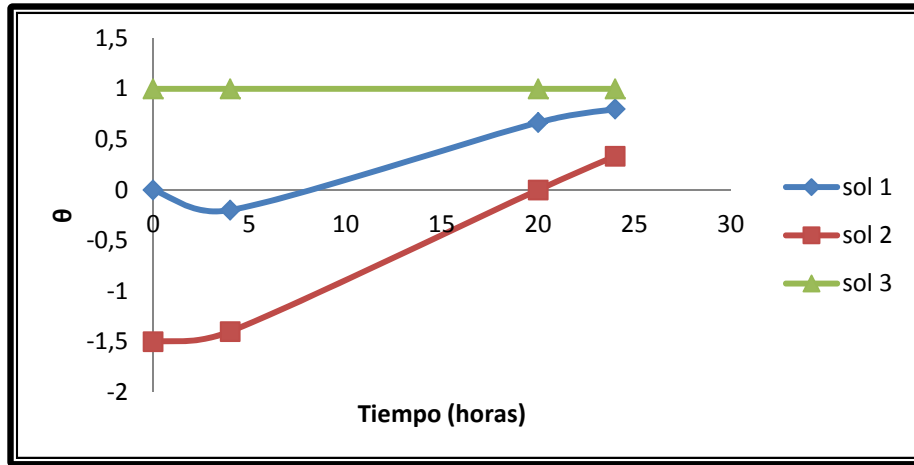
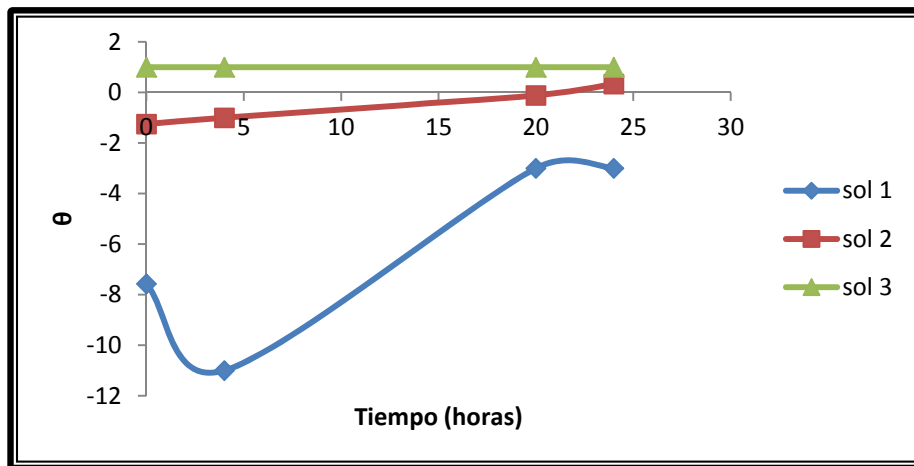


Figura 11. Relación entre la cobertura con el tiempo a -0,05V usando QCM



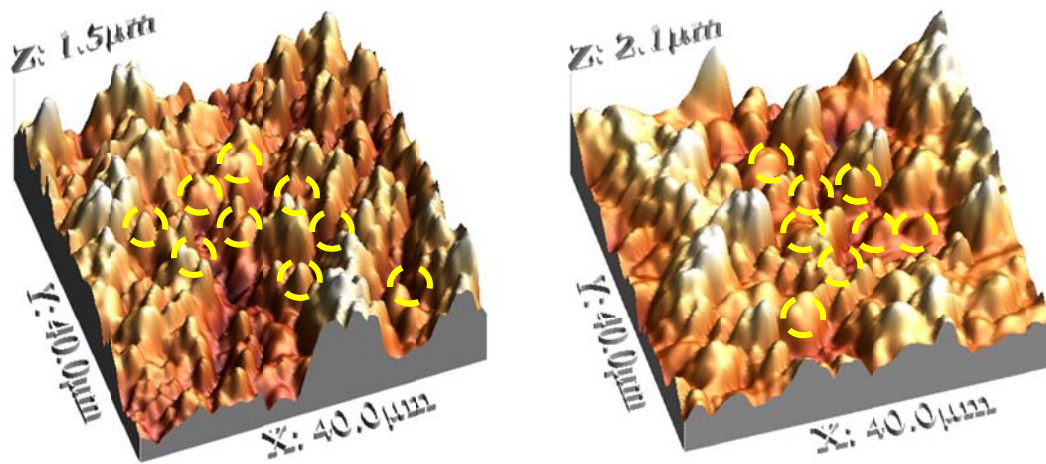
Fuente los autores.

Se presentan mejores resultados en la solución 3, corroborando los obtenidos en los ensayos electroquímicos. Sin embargo se observa un comportamiento particular en las soluciones 1 y 2, mostrando una tendencia ascendente de adhesión con el tiempo.

### 3.3 ANÁLISIS DE LA ORIENTACIÓN DE LAS CÉLULAS

En la figura 12 se observó la orientación de las células osteoblásticas en el microscopio de fuerza atómica (AFM) anexo D en la cual los resultados de mayor concentración de células se presentaron preferencialmente en el centro del cristal de cuarzo Au-Ti, tal como se señalan en las imágenes tomadas.

Figura 12. AFM Cristal con recubrimiento con la sin 3.



Fuente los autores.

Otra forma de observar la orientación de las células se hizo mediante microscopía interferométrica la cual presentó resultados similares a los obtenidos en AFM anexo E.

## CONCLUSIONES

Los resultados de espectroscopia de impedancia electroquímica mostraron una mayor adhesión celular en las mezclas con mayor porcentaje de Quitosano. Corroborado por los cambios microgravimétricos obtenidos en las pruebas simultaneas realizadas con la técnica de microbalanza de cristal de cuarzo.

La adhesión celular presentó mayores valores, a potenciales más catódicos, mostrando una incidencia directa con posibles procesos de hidroxilación superficial relacionados con la reacción del elemento bioactivo del material.

La aplicación de diferentes potenciales sobre las células, mostro que las células responden a estímulos de polarización, evidenciando una organización irregular y no orientada. Sin embargo, se identificaron posibles zonas de crecimiento preferencial en el centro de los recubrimientos de los cristales.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] YOSHITO IKADA. Tissue Engineering, Fundamentals and Applications. Yoshitokada. ELSEVIER 2006. P .300-320.
- [2] HARDINGHAM T.; TEW S. and MURDOCH A. Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. Arthritis Res 2002; 4 (Suppl 3):S63-S68.
- [3] COUCEIRO OTERO JOSÉ. Bioadhesividad celular sobre superficies de armazones o matrices tisulares. Tesis Doctoral 2008.p.1-37
- [4] FALKE G. F. Y ATALA A. Reconstrucción de Tejidos y Órganos Utilizando Ingeniería Tisular. Arch Argent Pediatric 2000; 98(2). P .103-105.
- [5] SILVERA LUZ ALBA. BARRIOS CARMEN. La Matriz Extracelular: El ecosistema de la Célula. "Revista Salud Uninorte".16-9-18.2006.p.10-15
- [6] ALBERTS, B.BRAY, D. Cell adhesión, Cell Junctions and the ExtracelularMatriz. "In molecular Biology of Cell, 2 ed: p.791-836.
- [7]. LUNT J. Large scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. PolymDeg Stab 1998; 59: 145–52
- [8]. GRIFFITH GL. HENCH LL. Bioceramics: From concept to clinic. Journal of the American Ceramic Society 1991. Polymer Biomaterial Acta Mater 2000; 48:263–77. 74(7):1487-1510.

- [9]. BUDDY RATNER, ALLAN HOFFMAN, SHOEN J., LEMONS E. Biomaterials Science, an Introduction to Materials in Medicine. Academic Press.California (1996).p. 38-40
- [10] RUIZ M MARÍN, BELARRA ARENAS C. SyntheticPolylactic and polyglycolic acid effects in bone regenerations. p. 1-35.
- [11] ELENA D. Utilización de Adsorbentes Basados En Quitosano y Aliganato Sódico. Revistalberoamericana de Polímeros. Enero 2007.V8 (1).p. 21-23.
- [12] IN-YONG KIM, SEOG-JIN SEO, HYUN-SEUK MOON, MI-KYONG YOO, IN-YOUNG PARK,BOM-CHOL KIM, CHONG-SU CHO.Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. Biotechnology Advances 26 (2008) 1–21.
- [13] K. ANSELME, “Review: Osteoblast adhesion on biomaterials”, Biomaterials 21 (2000) 667-681.
- [14]ROBERTM. MCALLISTER M, D, MURRAYB. GARDNERM, D. ARTHURE GREENE, DSc , CAROLB RADT, BS, WARRENW .N ICHOS M, D, PHD, AN DBENJAMIN H. LANDINMGD.Cijltivation in vitro of cells derived from a human osteosarcoma Cancer, Volume 27, Issue 2, Article first published online: 27 JUN 2006p.161-166
- [15] MESENGUER L. BERNABÉU A. Aislamiento y Cultivo de Células Osteoblasticas: Interés Para la Investigación en Cirugía Ortopédica y Traumatología. Rev Esp Cir Osteoart 1994. P. 235-234
- [16]HEUNGSOO SHIN.Fabrication methods of an engineered microenvironment foranalysis of cell–biomaterial interactions.Biomaterials 28 (2007) 126–133.

- [16] K. TAKAHASHI, I. TANIGUCHI, M. MIYAMOTO, Y. KIMURA. Melt/solid polycondensation of glycolic acid to obtain high-molecular-weight poly(glycolic acid). *Journal of Polymer* 41 ( 2000) 8725-8728.
- [17] T. ANEE KURIAKOSE, S. NARAYANA KALKURA, M. PALANICHAMI, D. ARIVUOLI, KARSTEN DIERKS, G. BOCELLI, C. BETZEL. Synthesis of stoichiometric nano crystalline hidroxyapatite by ethanol-based sol-gel technique at low temperature. *Journal of Crystal Growth* 263 (2004) 517-523.
- [18] SARAH E. PETRICCA, KACEY G. MARRA, PRASHANT N. KUMTA. Chemical synthesis of poly (lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite composites for orthopaedic applications. *Acta Biomaterialia* 2 (2006) 277-286.
- [19] ZHENG GUI TANG, JOHN ALAN HUNT. The effect of PLGA doping of polycaprolactone films on the control of osteoblast adhesion and proliferation in vitro. *Biomaterials* 27 (2006) 4409–4418.
- [20] ANAYA JAIMES YULEY KARINA. Evaluación del direccionamiento electroquímico de proteínas del colágeno y albumina bovina bsa sobre recubrimientos poliméricos de pla activados superficialmente por medio de QCM. (2005)1-38.
- [21] KERRY J. GILMORE, MAGDALENA KITA, YAO HAN, AMY GELMI, MICHAEL J. HIGGINS, SIMON E. MOULTON, GRAEME M. CLARK, ROBERT KAPSA, GORDON G. WALLACE. Skeletal muscle cell proliferation and differentiation on polypyrrole substrates doped with extracellular matrix components. *Biomaterials* 30 (2009) 5292–5304.

- [22] X.H. WANG, D.P. LI, W.J. WANG, Q.L. FENG, F.Z. CUI, Y.X. XU, X.H. SONG. Cocalent immobilization of chitosan and heparin on PLGA surface. International Journal of Biological Macromolecules 33 (2003) 95-100.
- [23] C. RIBAUT, K. REYBIER, B. TORBIERO, J. LAUNAY, A. VALENTIN, O. REYNES, P.-L. FABRE, F. NEPVEU. Strategy of red blood cells immobilisation onto a gold electrode: Characterization by electrochemical impedance spectroscopy and quartz crystal microbalance. ITBM-RBM 29 (2008) 141–148.
- [24] JUAN MENDOZA FLOREZ, RUBEN DURAN ROMERO, JOAN GENESCA LLONGUERAS; Espectroscopia de impedancia electrónica electroquímica en corrosión. P.250-255
- [25] CHERYL R. BLANCHARD; Atomic Force Microscopy; VOL 1; ISSN 1430-4171; 1996. P.1161-1165
- [26] GALLOWAY GROUP; Atomic Force Microscopy, A Guide to Understanding and using the AFM; 2004p.161-166

## ANEXO A PROCEDIMIENTOS PARA LA SÍNTESIS DE MATERIALES

Tabla A1. Procedimiento síntesis de PLA

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

Fuente los autores.

Tabla A2. Procedimiento síntesis de PLG

Etapa	Temperatura (°C)	Presión (mmHg)	Tiempo (horas)	Agitación
1	190	150	1	Si
2	190	30	4	No
3	230	30	0.5	No
4	190	atm	20	No

Fuente los autores.

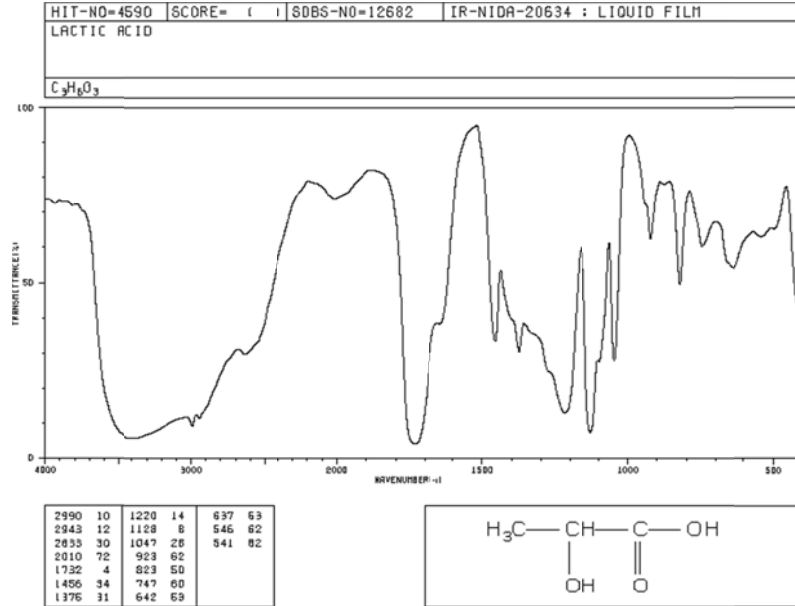
## **ANEXO B ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA (FT-IR)**

Esta técnica espectroscópica de absorción analiza la interacción de los niveles de energía vibracionales de los enlaces covalentes con la radiación infrarroja, se utiliza en su mayor parte para identificar la presencia de grupos funcionales en un compuesto. Cada grupo funcional puede dar una o varias absorciones a distintas longitudes de onda dependiendo del tipo de vibración (de tensión o flexión) de cada grupo de enlaces.

En general, 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.

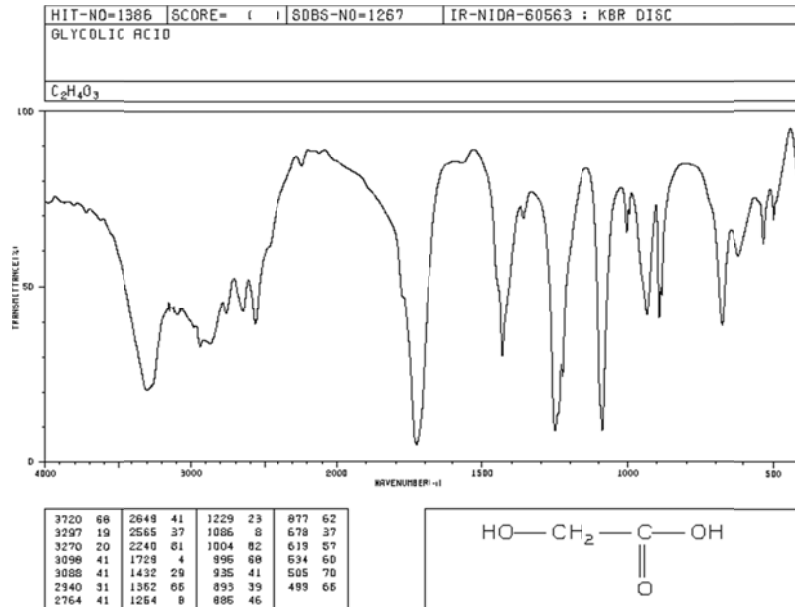
Las aplicaciones son múltiples: análisis de polímeros, aditivos, estudios forenses, identificación de contaminantes ambientales, medicina, diversas áreas de la química (organometálica, orgánica, inorgánica, agrícola, industrial, etc.). [25]

Figura B1. Perfil infrarrojo ácido láctico reportado en base de datos.



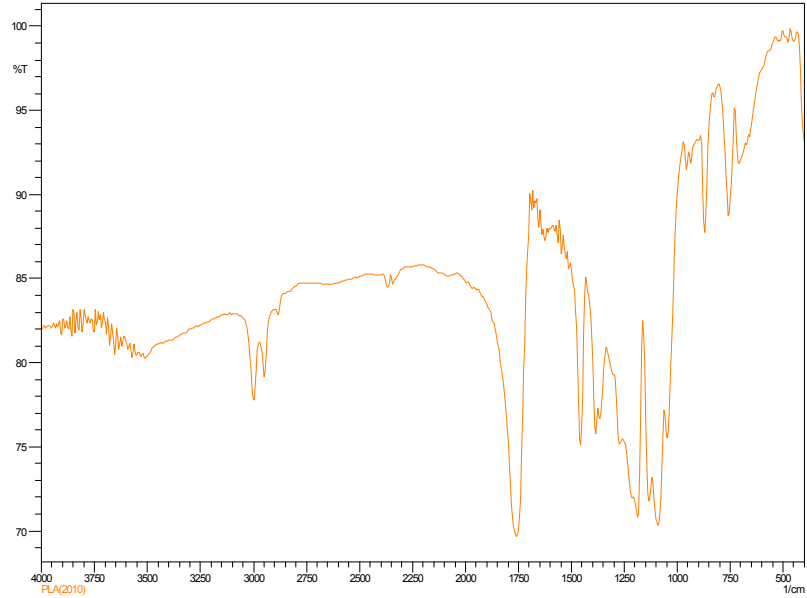
Fuente base de datos UIS.

Figura B2. Perfil infrarrojo ácido glicólico reportado en base de datos



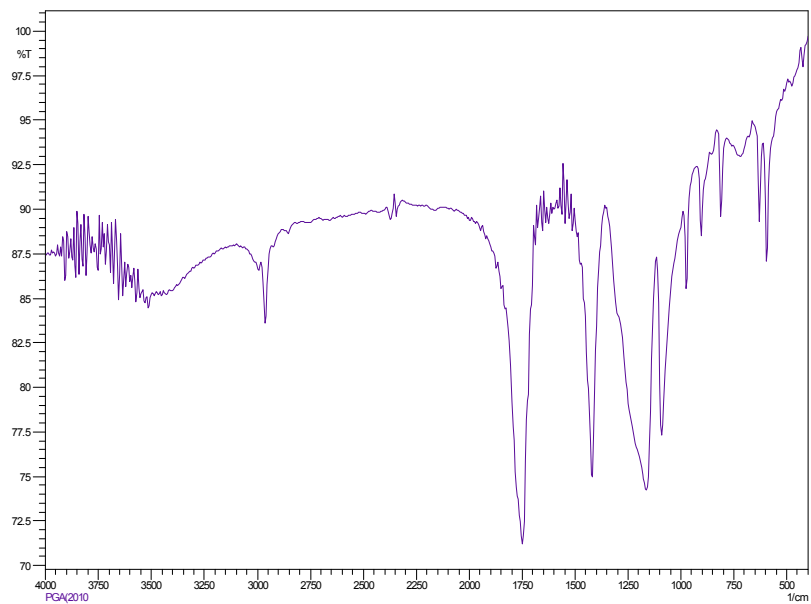
Fuente base de datos UIS.

Figura B4. Perfil infrarrojo ácido láctico experimental.



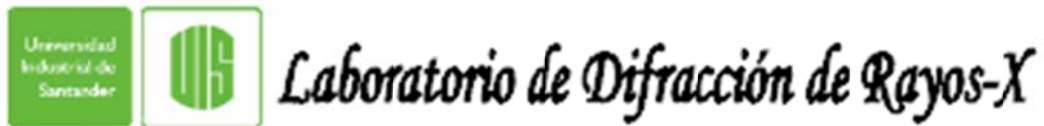
Fuente: espectrómetro infrarrojo Ingeniería Química.

Figura B5. Perfil infrarrojo ácido glicólico experimental.



Fuente: espectrómetro infrarrojo Ingeniería Química.

Figura B3. Difracción de rayos-x de la hidroxiapatita.



INF-083-10

Bucaramanga, Agosto 19 de 2010

**SEÑORES:**  
ESCUELA DE INGENIERÍA METALURGICA  
Atn: Ing. Custodio Vasquez  
Director del proyecto 8453  
UIQ/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 22 de Julio de 2010, identificadas como "HAP M y HAP N".

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, Teléfax 6347166  
Apartado Aéreo N° 678, Email: rayosx@uis.edu.co NTT 890. 201.213-4*

Página 1 de 5

## METODOLOGÍA

### 1. Preparación y Montaje de las muestras

Las muestras fueron pulverizadas en un mortero de ágata y llevada a un tamaño de 38  $\mu\text{m}$  (400 mesh). El espécimen seleccionado de cada 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 Góler	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

### 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.

---

\* Los resultados se relacionan únicamente con las muestras analizadas.

## RESULTADOS

### 1. HAP M (C2IP)

FASE		No. TARJETA PDF-2	NOMBRE	CUANTITATIVO
Cristalinos	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	010-89-6439	Hidroxiapatita	46.4 % (D.E = 0.4)
	$\text{Ca}_{10}\text{Mg}_{12}\text{H}_{18}(\text{PO}_4)_{30}$	010-79-2185	Hidrogeno Fosfato de Calcio y Magnesio	3.4 % (D.E = 0.2)
Total Cristalino				49.8 %
Amorfos y otros				50.2 %

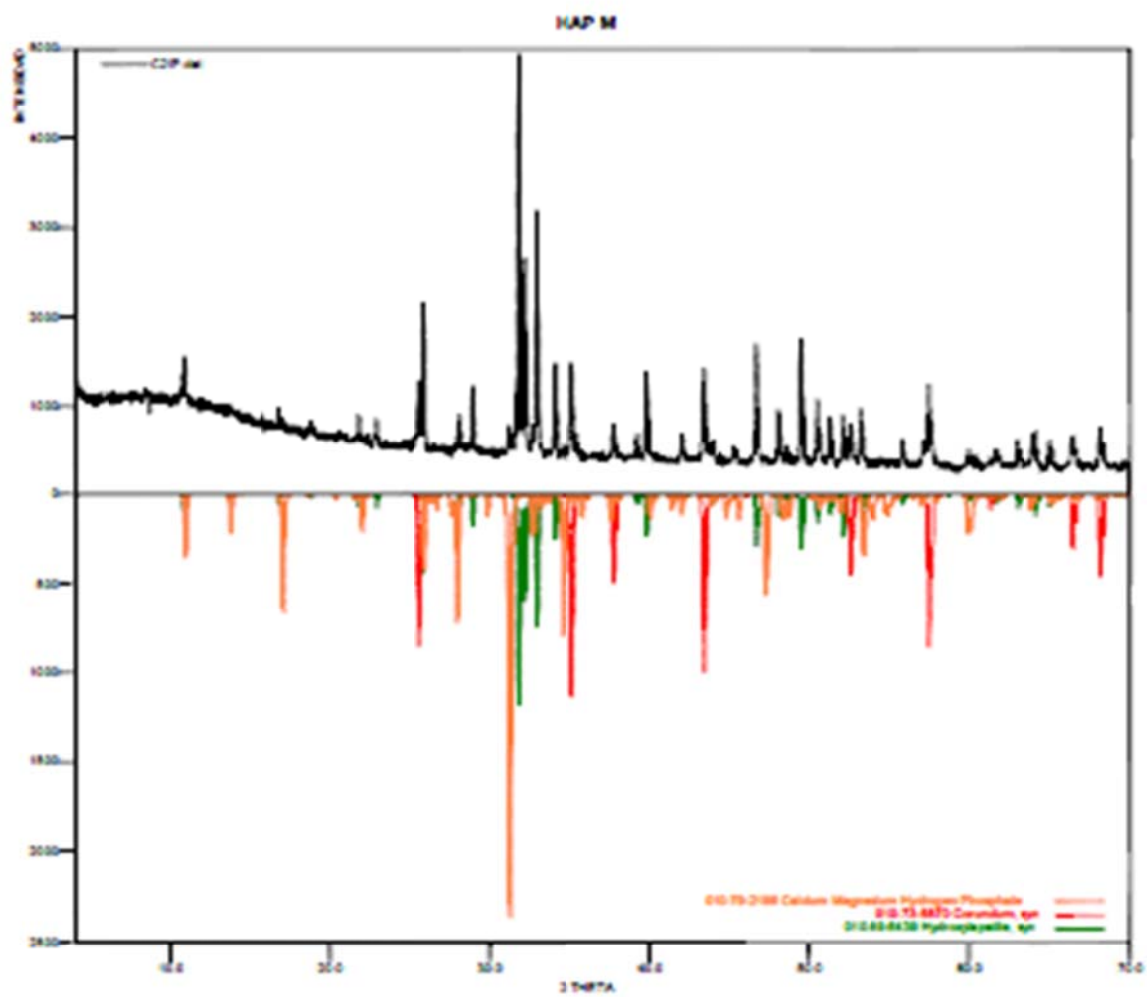
### 2. HAP N (C2IQ)

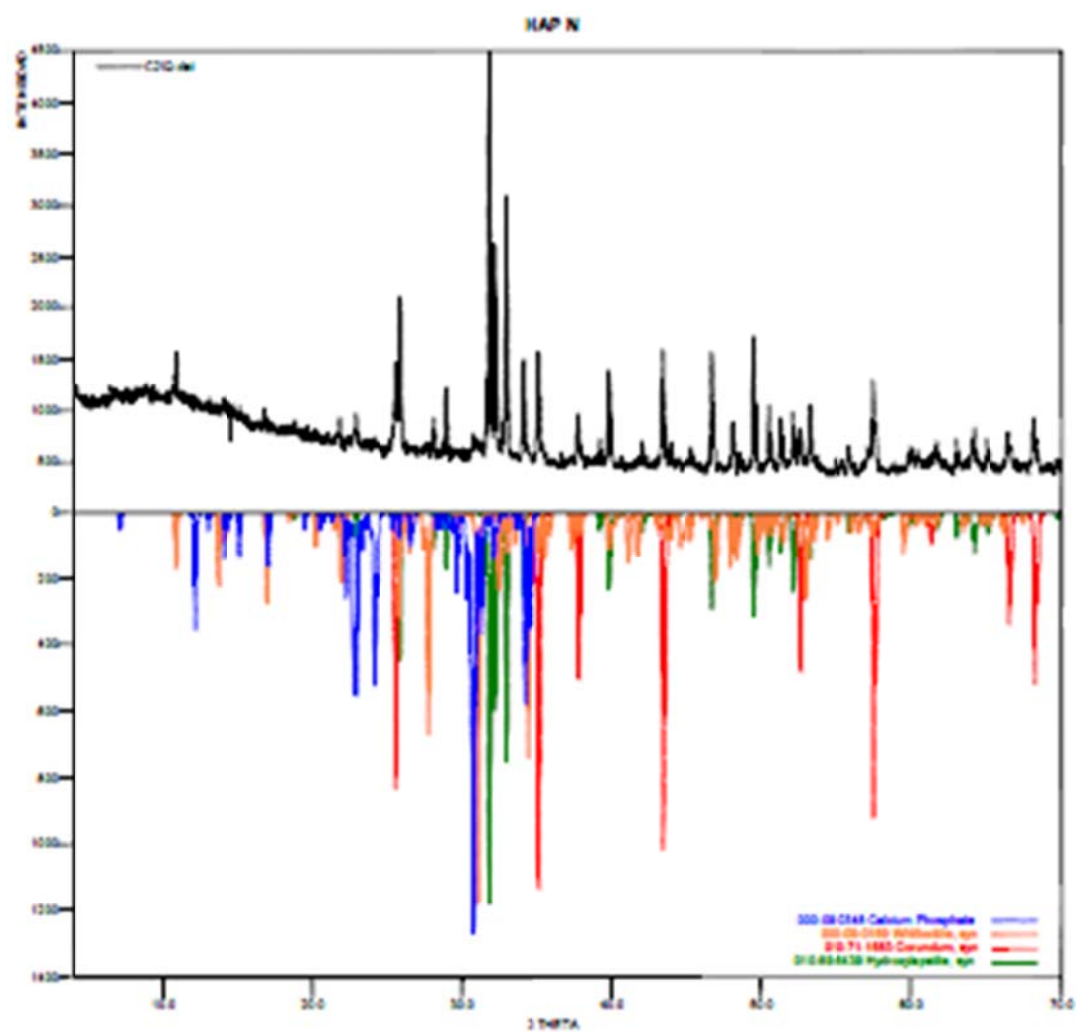
FASE		No. TARJETA PDF-2	NOMBRE	CUANTITATIVO
Cristalinos	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	010-89-6439	Hidroxiapatita	44.9 % (D.E = 0.4)
	$\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_2$	000-09-0169	Whitlockita	2.3 % (D.E = 0.2)
	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	000-09-0348	$\alpha$ -Fosfato de Calcio	2.7 % (D.E = 0.2)
Total Cristalino				49.9 %
Amorfos y otros				50.1 %

Nota:  
D.E = Desviación estándar

#### Observaciones:

- Se recomienda realizar análisis elemental para corroborar la presencia de las fases reportadas.
- En los perfiles de difracción se observa la fase de Corundum - Aluminum Oxide (estándar interno), el cual fue agregado a la muestra en una cantidad conocida para la respectiva cuantificación.





**Elaboró:**

Geo. José Luis Pinto C.  
 Profesional Analista  
 P.Q. 2009

**Revisó:**

Geo. MSc. Jesús Anselmo Pinilla A.  
 Director Técnico  
 P.Q. 1585

## ANEXO C PARÁMETROS DE LOS CIRCUITOS EQUIVALENTES

Valores obtenidos mediante la simulación de los circuitos equivalentes.

Tabla C1. Parámetros de circuitos equivalentes a 0 horas

Solución	Voltaje (V)	PLGA(%)	HAP(%)	Q (%)	0 Horas	
					CPE-T	CPE-P
1	0.05	70-30	10	0	1.67E-07	0.68308
2		70-30	10	3	1.98E-06	0.58598
3		70-30	10	7	8.61E-06	0.83769
1	-0,05	70-30	10	0	1.14E-05	0.82319
2		70-30	10	3	6.92E-06	0.7342
3		70-30	10	7	1.20E-05	0.78761
1	0V	70-30	10	0	1.24E-05	0.77577
2		70-30	10	3	1.10E-05	0.80706
3		70-30	10	7	9.33E-06	0.64448

Fuente: los autores

Tabla C2. Parámetros de circuitos equivalentes a 4 horas

Solución	Voltaje (v)	PLGA(%)	HAP(%)	Q (%)	4 horas	
					CPE-T	CPE-P
1	0.05	70-30	10	0	1.68E-05	0.68308
2		70-30	10	3	1.58E-05	6.24E-01
3		70-30	10	7	9.61E-06	8.28E-01
1	-0,05	70-30	10	0	1,36E-05	0,9726
2		70-30	10	3	6.91E-02	0,73385
3		70-30	10	7	8.67E-02	0,82067
1	0	70-30	10	0	1.09E-05	7.21E-01
2		70-30	10	3	1.43E-01	0,74905
3		70-30	10	7	2.80E-06	4.83E-01

Fuente: los autores

Tabla C3. Parámetros de circuitos equivalentes a 20 horas

iSolución	Voltaje (V)	PLGA(%)	HAP(%)	Q (%)	20 horas	
					CPE-T	CPE-P
1	0.05	70-30	10	0	1.70E-05	5.76E-02
2		70-30	10	3	1.56E-05	6.50E-01
3		70-30	10	7	1.16E-05	7.48E-01
1	-0,05	70-30	10	0	4.43E-06	7.42E-01
2		70-30	10	3	6.16E-06	7.35E-01
3		70-30	10	7	1.60E-05	0.91791
1	0	70-30	10	0	9.50E-06	6.28E-01
2		70-30	10	3	4.56E-05	6.31E-01
3		70-30	10	7	2.60E-07	5.54E-01

Fuente: los autores

Tabla C4. Parámetros de circuitos equivalentes a 24 horas

Solución	Voltaje (V)	PLGA(%)	HAP(%)	Q (%)	24 horas	
					CPE-T	CPE-P
1	0.05	70-30	10	0	1.62E-05	5.69E-02
2		70-30	10	3	1.29E-05	6.19E-01
3		70-30	10	7	1.07E-05	7.68E-01
1	-0,05	70-30	10	0	4.48E-06	7.16E-01
2		70-30	10	3	9.09E-06	7.24E-01
3		70-30	10	7	1.66E-05	9.11E-01
1	0	70-30	10	0	2.72E-05	9.01E-01
2		70-30	10	3	4.08E-05	6.69E-01
3		70-30	10	7	9.08E-06	5.58E-01

Fuente: los autores

## **ANEXO D MICROSCOPIO DE FUERZA ATOMICA (AFM)**

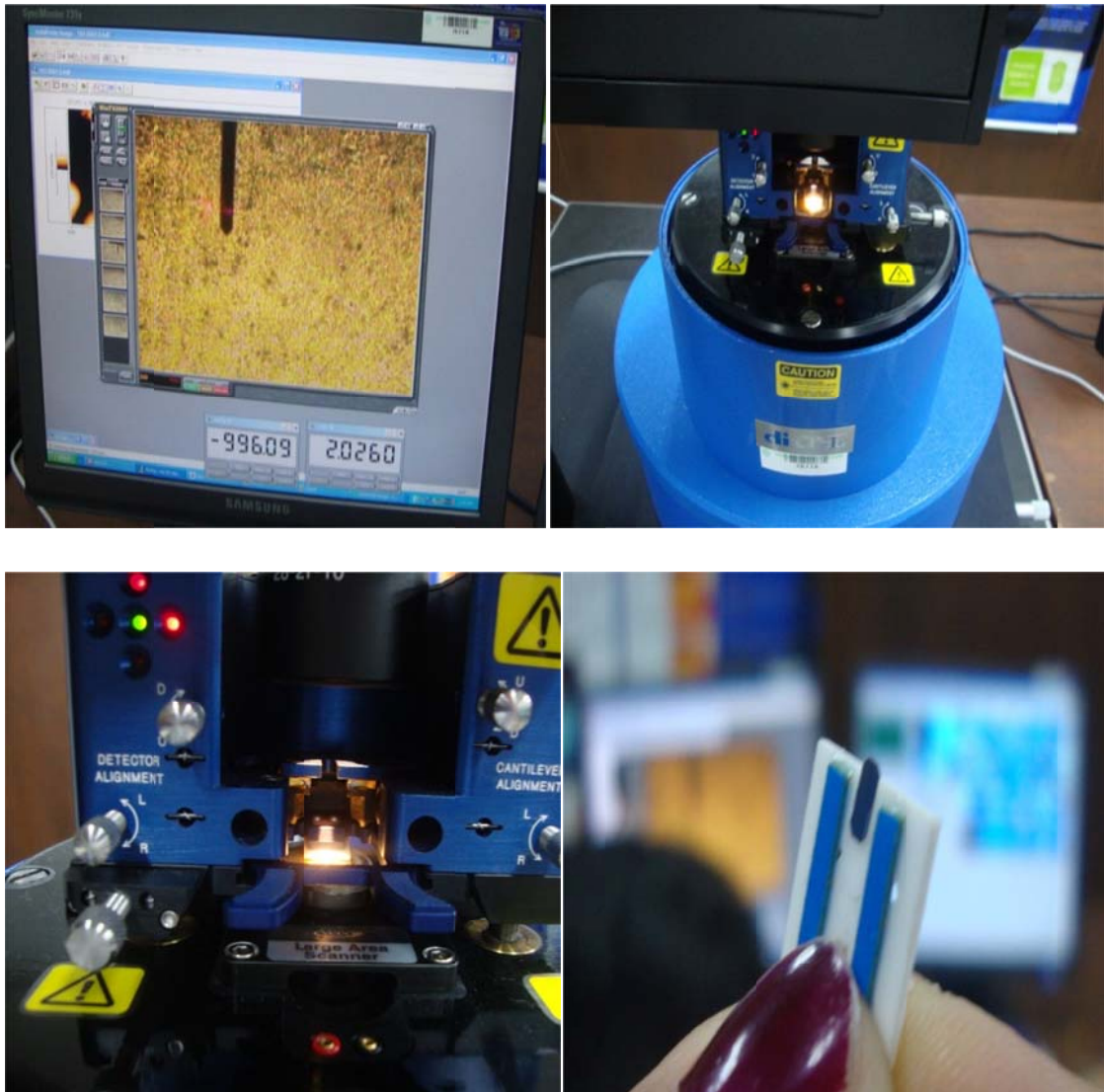
El microscopio de fuerza atómica, ha sido empleado para el estudio topológico de la superficie de los materiales, es una de las principales técnicas dentro de las técnicas de barrido de sonda por sus posibilidades de caracterización a escala nanométrica y micrométrica[26], en una AFM se distinguen tres modos básicos de operación que son el modo de contacto, contacto intermitente, y no contacto.

En el método de contacto, la punta barre la superficie de la muestra, aplicando una fuerza constante y sin levantar la punta de la superficie, la fuerza está relacionada con la deflexión que experimenta la punta mediante la constante de fuerza de cantiléver. Así se fija la deflexión de trabajo y a medida que se hace el barrido, el escáner sube o baja para mantener la deflexión constante. El movimiento vertical del tubo de barrido permite mantener una imagen topográfica que generalmente se llama imagen de alturas.

En el método de contacto intermitente se emite una señal sinusoidal, haciendo oscilar la punta a su frecuencia de resonancia. Los barridos se efectúan a una amplitud de oscilación constante, denominada amplitud de trabajo, el escáner efectúa movimientos parecidos al método de contacto generando una imagen de alturas, y el efecto de interacción de la punta con los distintos constituyentes de la muestra, se produce un cambio en la fase de la onda sinusoidal aplicada, esto es un desfase y la imagen es una imagen de fase.

En el método de no contacto también se aplica una onda sinusoidal, pero sin tocar la muestra. Es más complejo, ya que debido a la capa de contaminación de agua que recubre todas las muestras, podría en cualquier momento pasar a tocar la muestra, sus aplicaciones se limitan al caso de muestras planas [27].

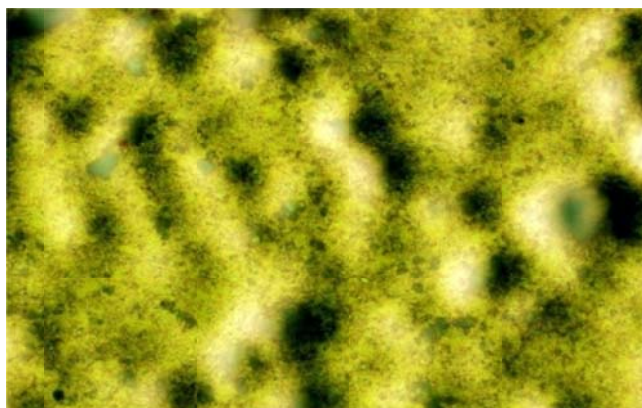
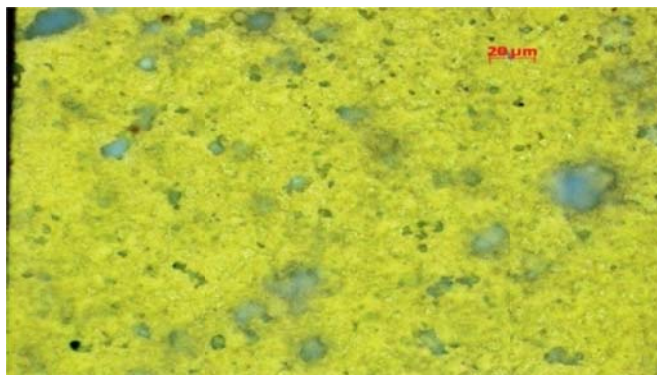
Figura C1. Equipo utilizado para la realización de AFM



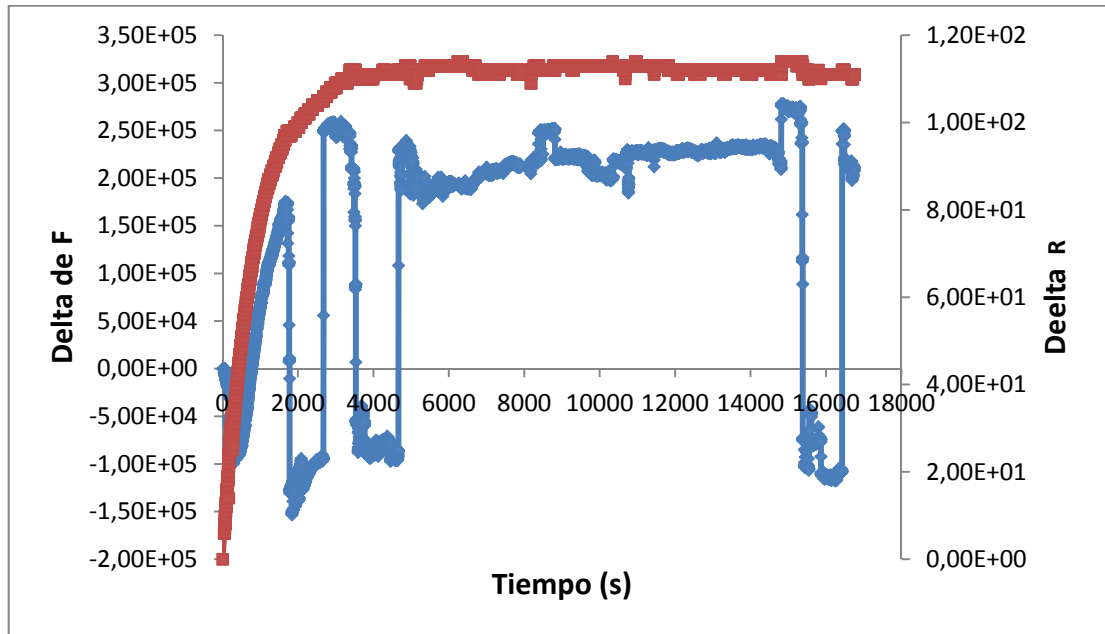
Fuente los autores

## ANEXO E MICROSCOPIA INTERFEROMÉTRICA

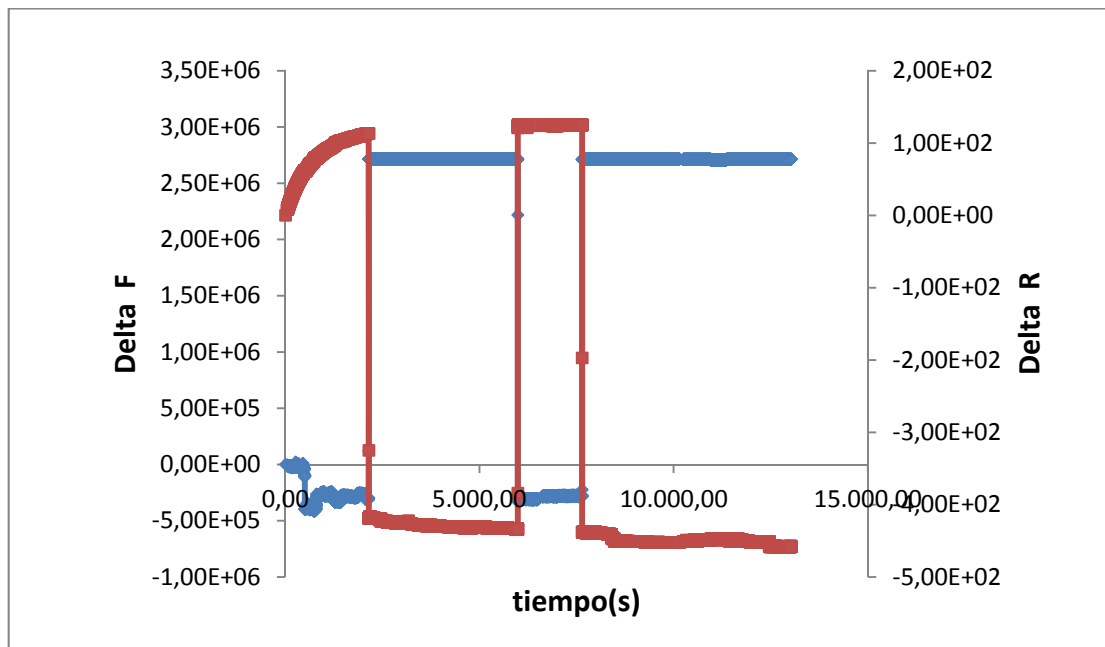
Figura E1. Imágenes microscopio interferométrico Cristal con recubrimiento PLGA 70/30 HAP 10% Q 3%



## ANEXO F IAGRAMAS DE LA MICROBALANZA DE CRISTAL DE CUARZO

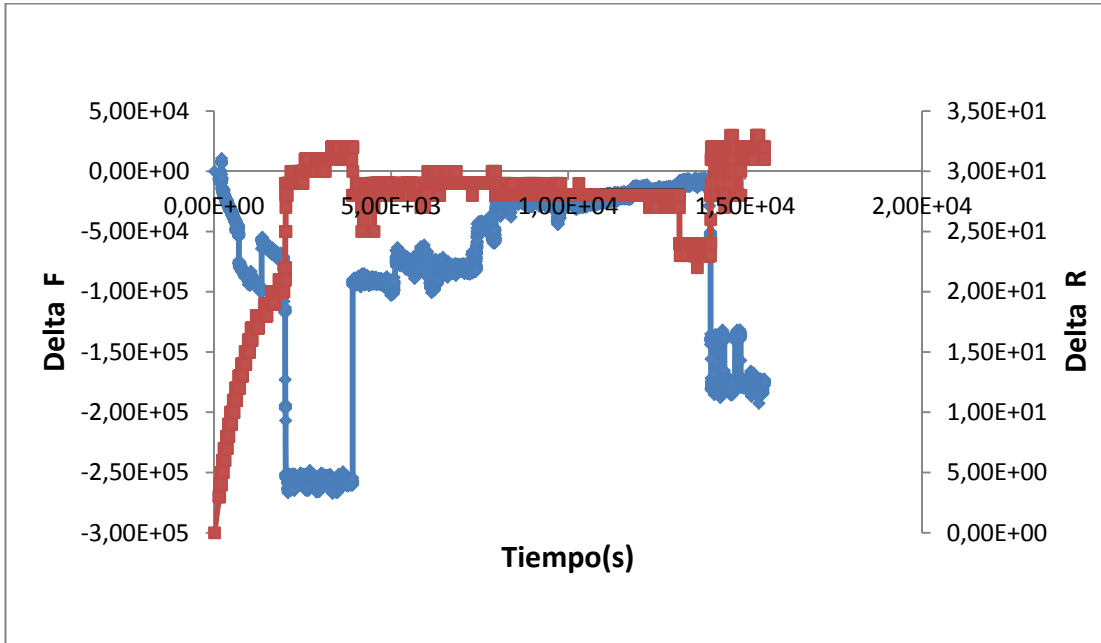


**BLANCO 2 SLN 3 0.05 V**



**PRUEBA 7 SLN 1 -0.05 V**

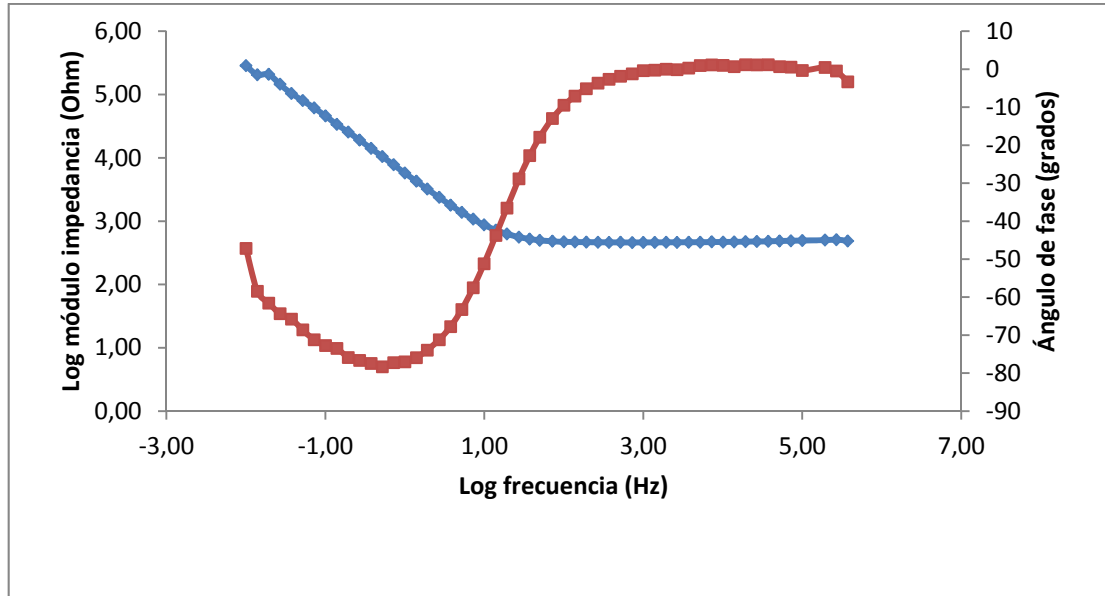
Fuente los autores.



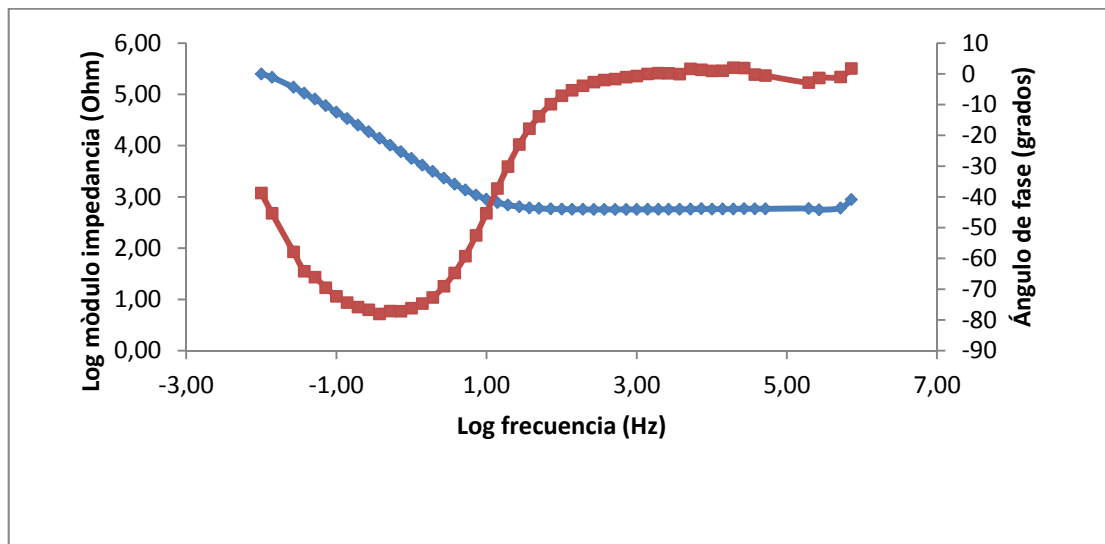
**PRUEBA 9 SLN 3 -0.05 V**

Fuente los autores.

## ANEXO G DIAGRAMAS DE ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA

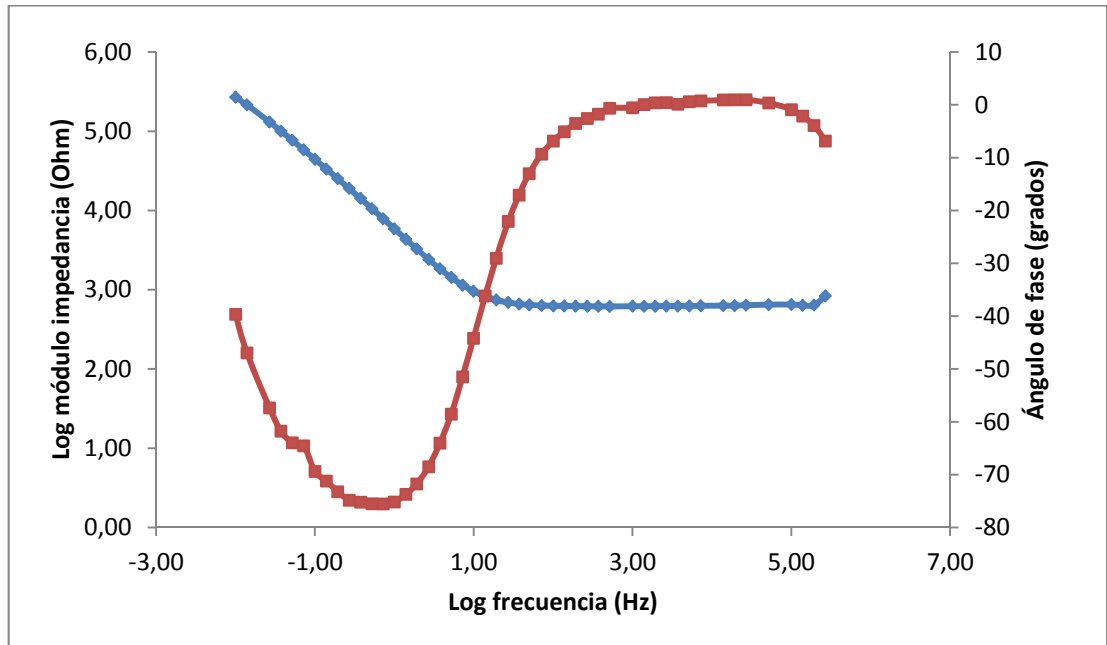


### EIS 0.05V RPMI PLGA 70/30 HAP 10% 0 HORAS

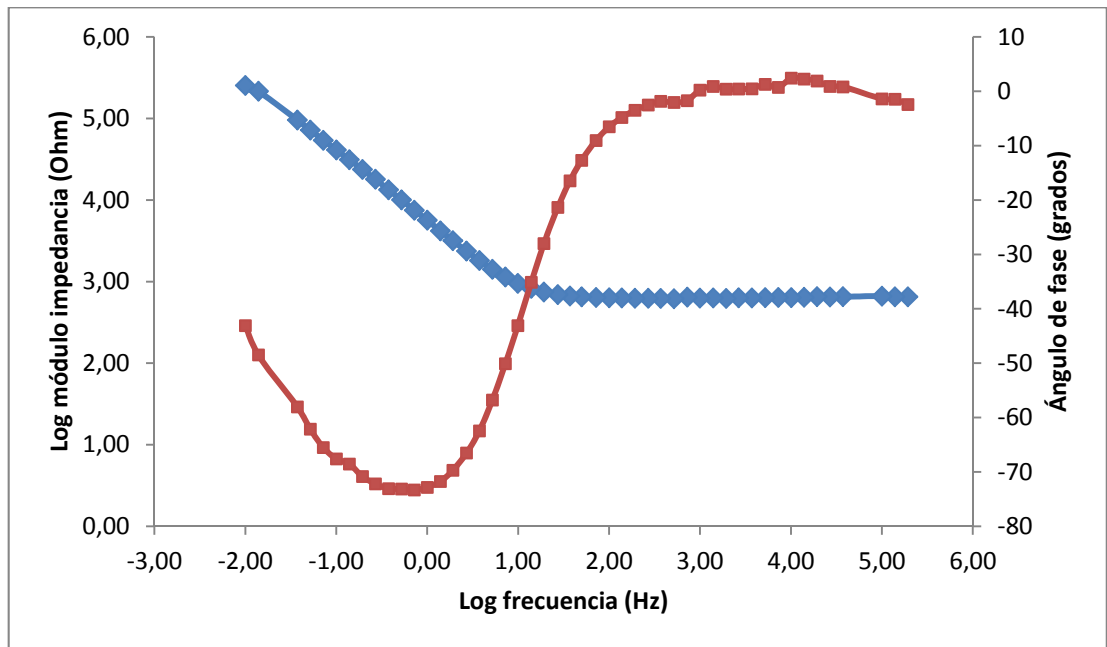


### EIS 0.05V RPMI PLGA 70/30 HAP 10% 4 HORAS

Fuente los autores

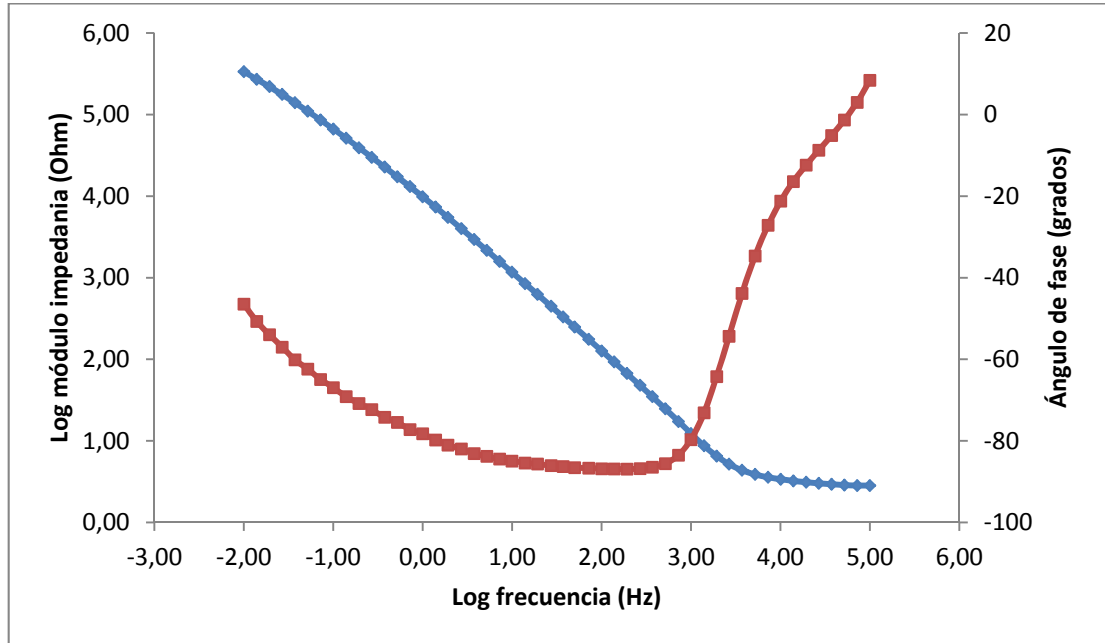


**EIS 0.05V RPMI PLGA 70/30 HAP 10% 20 HORAS**

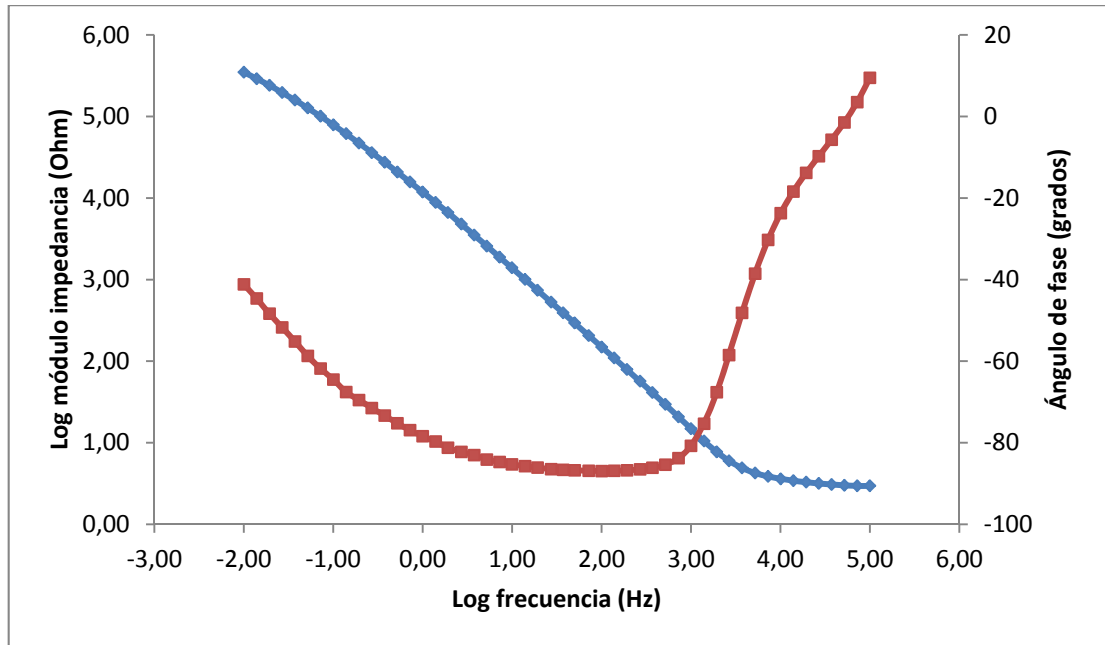


**EIS 0.05V RPMI PLGA 70/30 HAP 10% 24 HORAS**

Fuente los autores

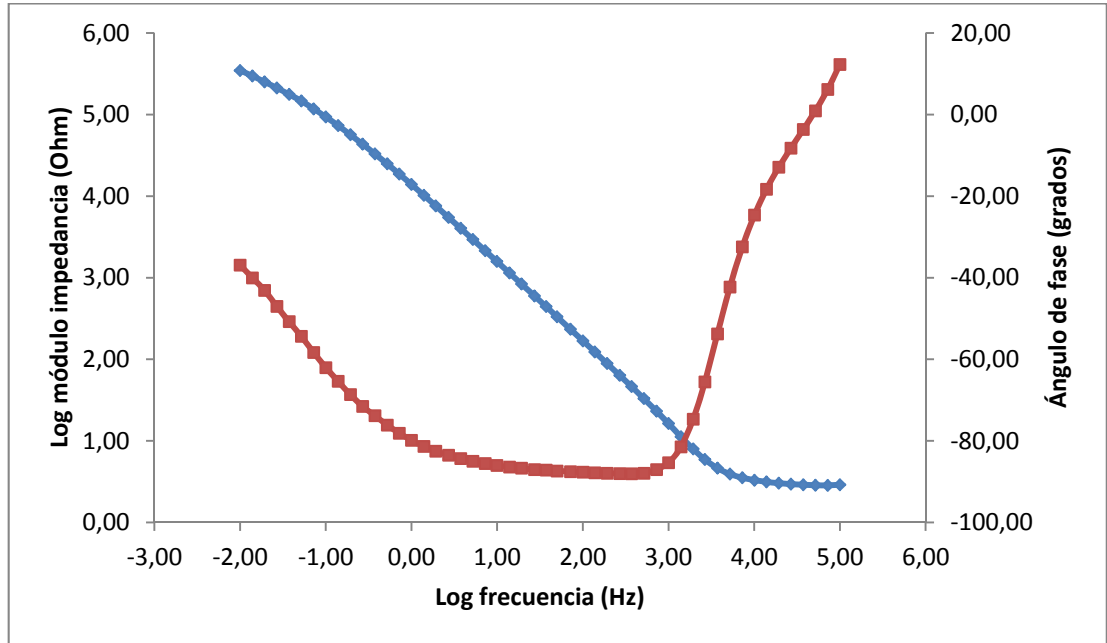


**EIS 0.05V RPMI PLGA 70/30 HAP 10% 3%Q 0 HORAS**

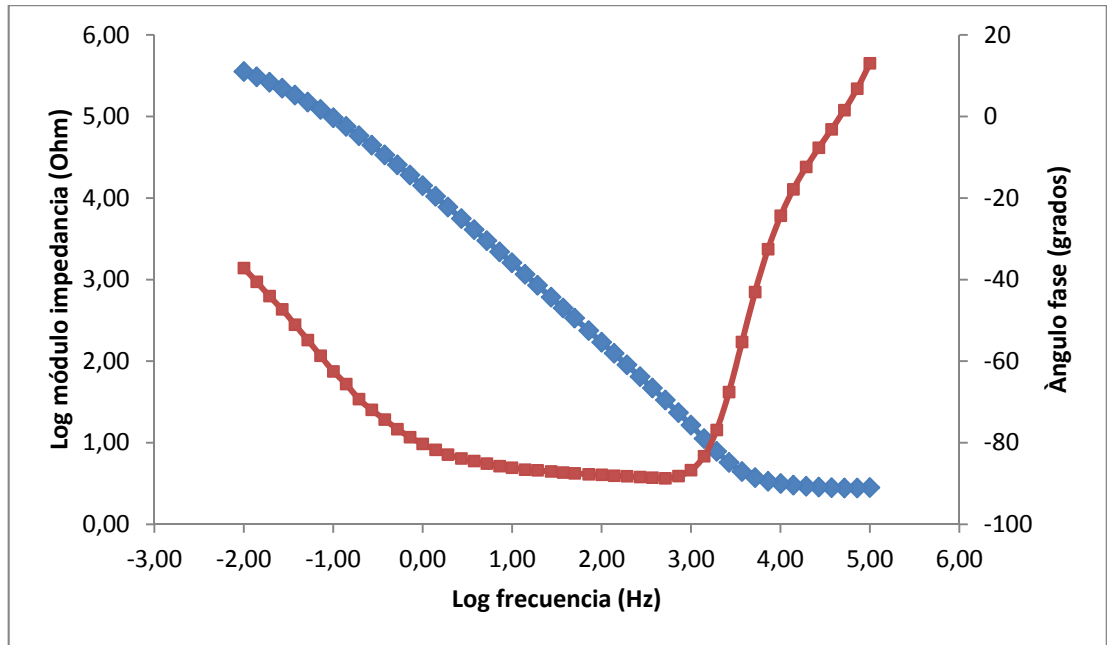


**EIS 0.05V RPMI PLGA 70/30 HAP 10% 3%Q 4 HORAS**

Fuente los autores

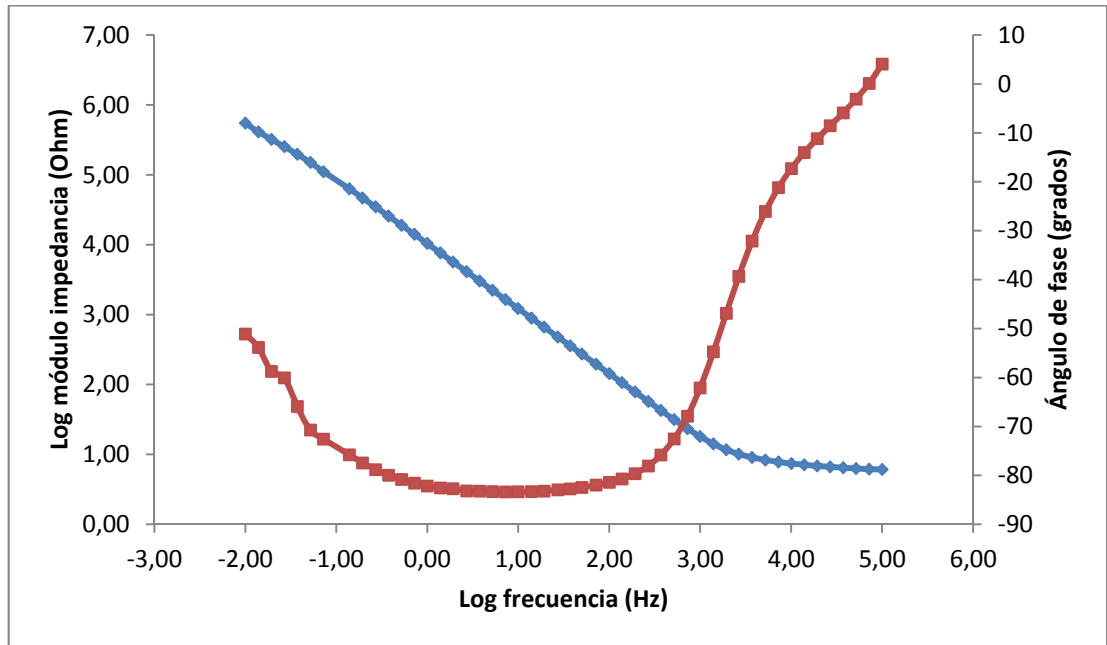


**EIS 0.05V RPMI PLGA 70/30 HAP 10% 3%Q 20 HORAS**

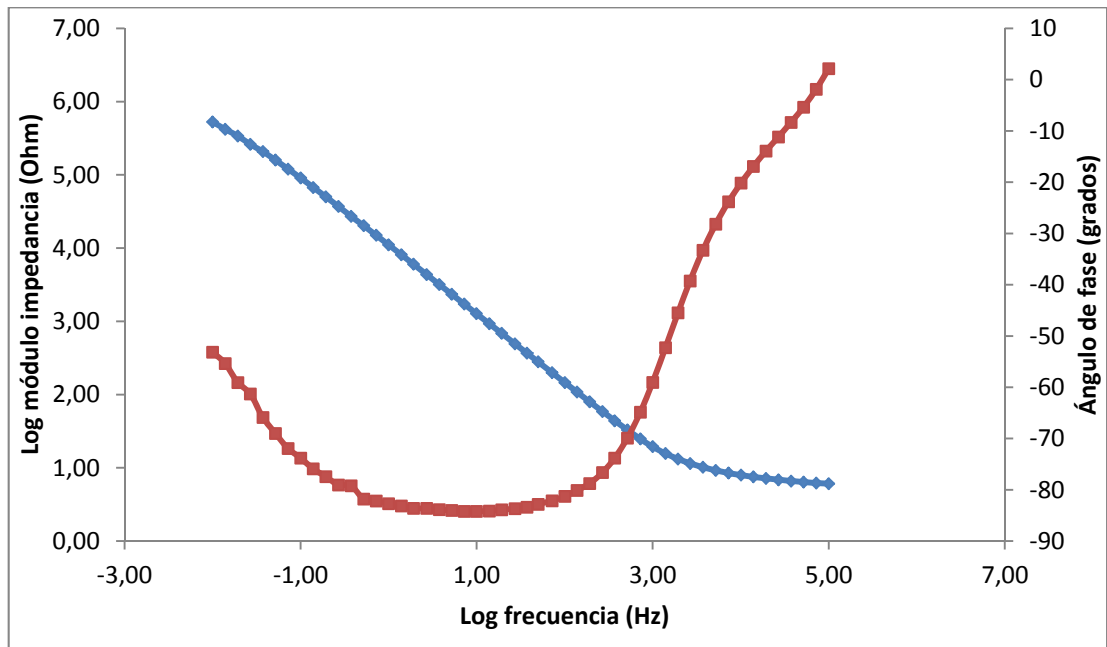


**EIS 0.05V RPMI PLGA 70/30 HAP 10% 3%Q 24 HORAS**

Fuente los autores

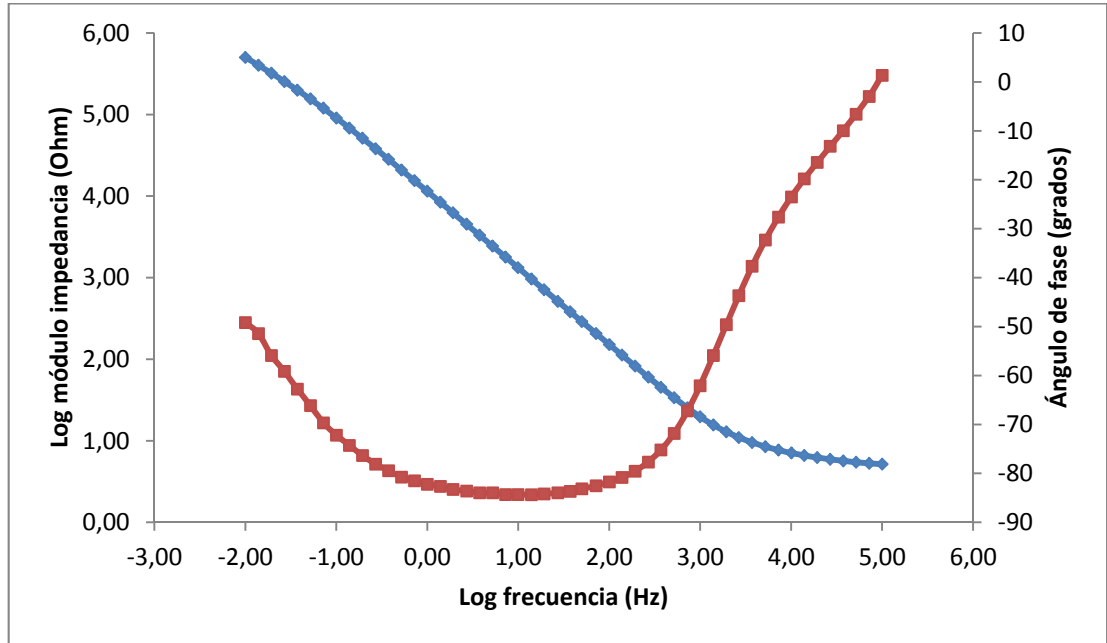


**EIS 0.05V RPMI PLGA 70/30 HAP 10% 7%Q 0 HORAS**

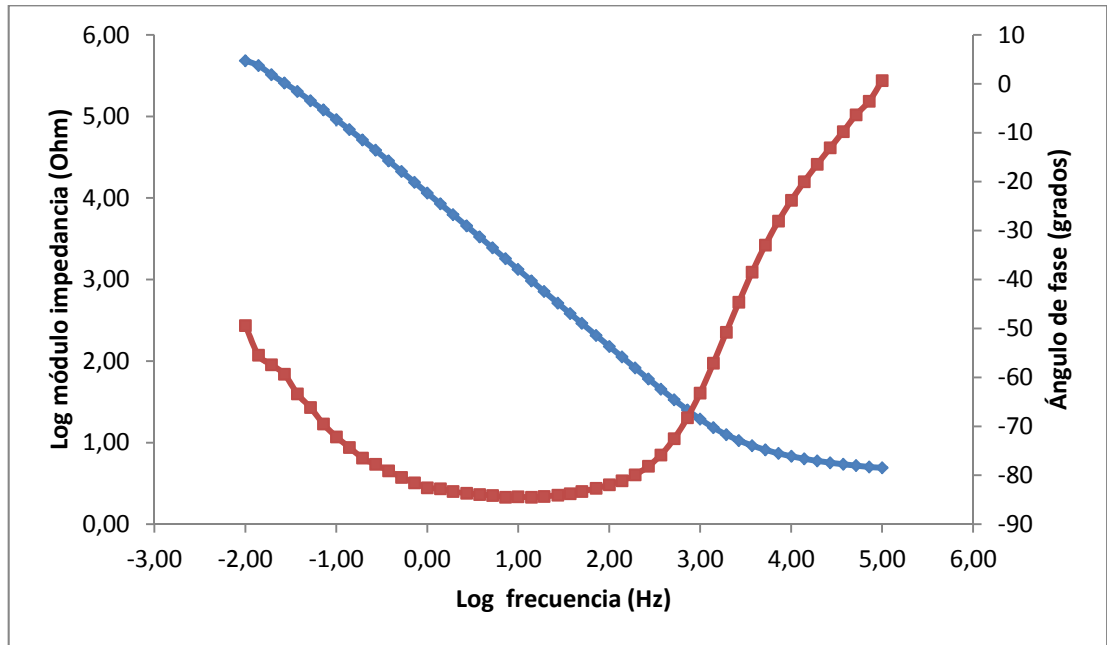


**EIS 0.05V RPMI PLGA 70/30 HAP 10% 7%Q 4 HORAS**

Fuente los autores

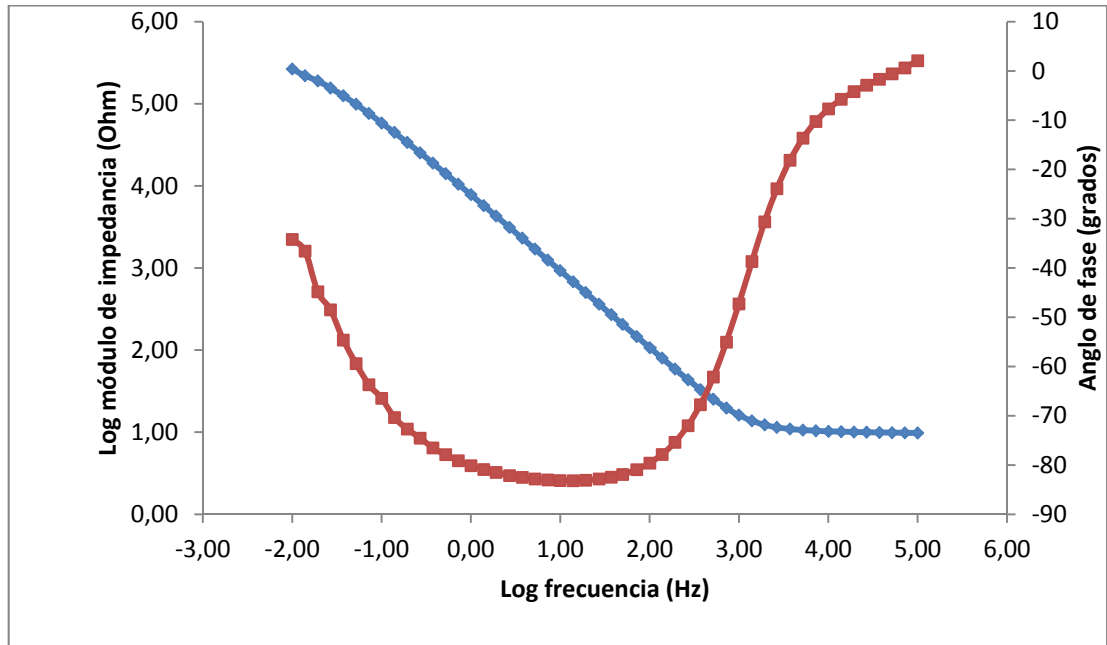


**EIS 0.05V RPMI PLGA 70/30 HAP 10% 7%Q 20 HORAS**

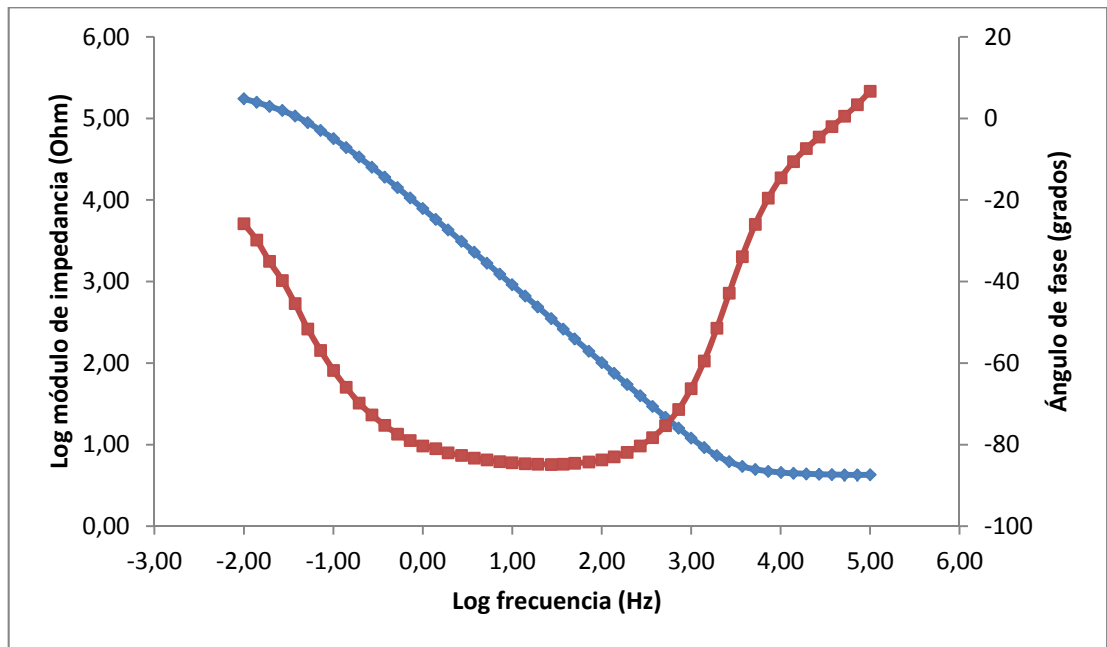


**EIS 0.05V RPMI PLGA 70/30 HAP 10% 7%Q 24 HORAS**

Fuente los autores

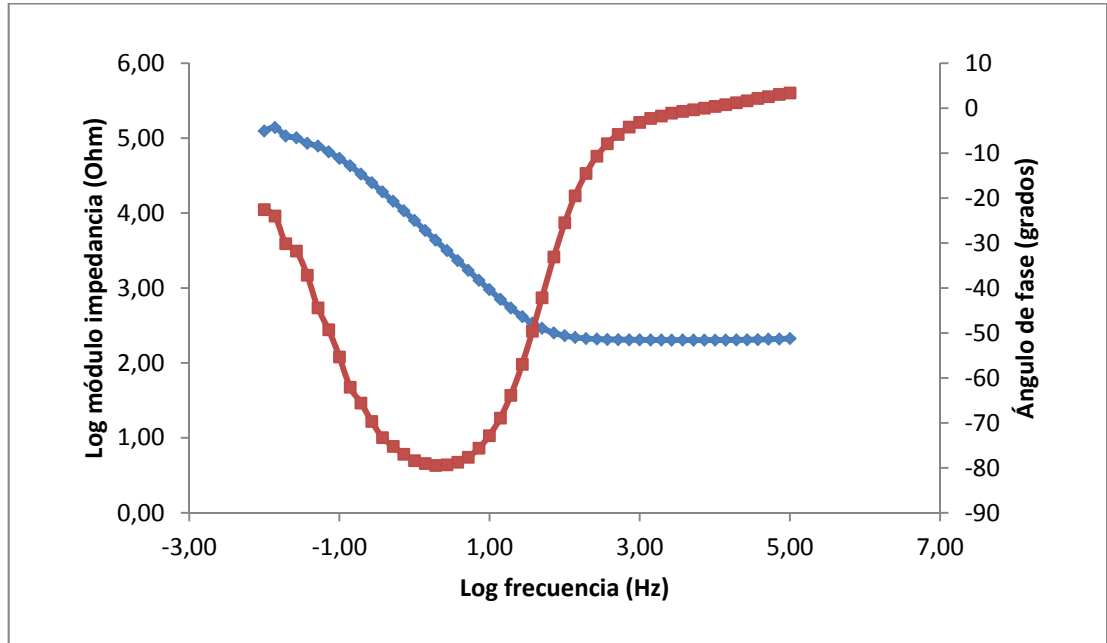


**EIS 0V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% 0 HORAS**

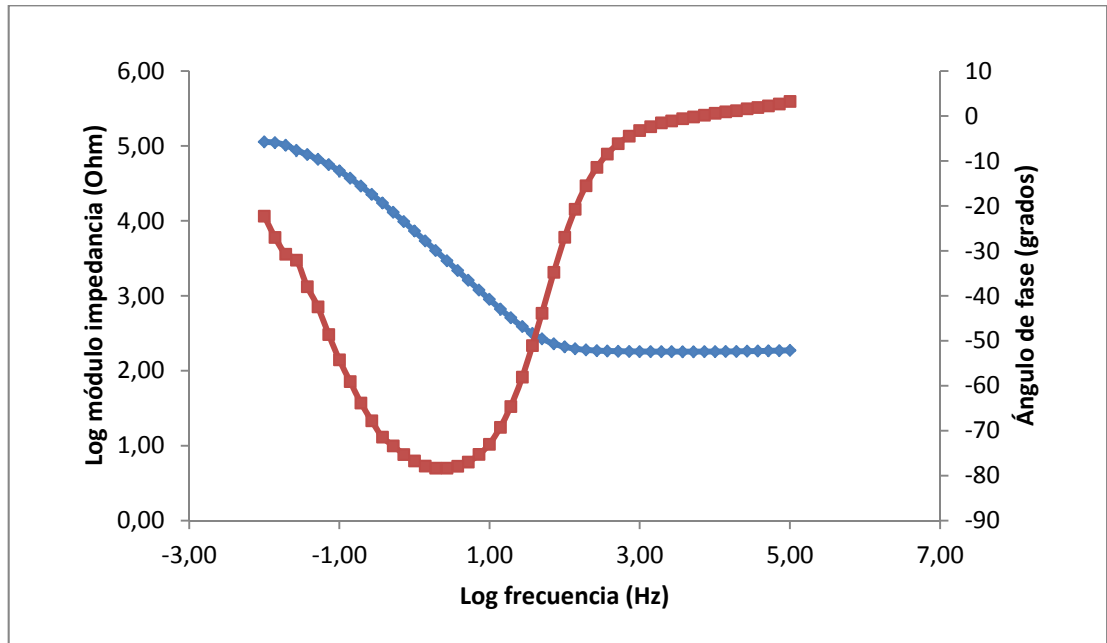


**EIS 0V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% 4 HORAS**

Fuente los autores

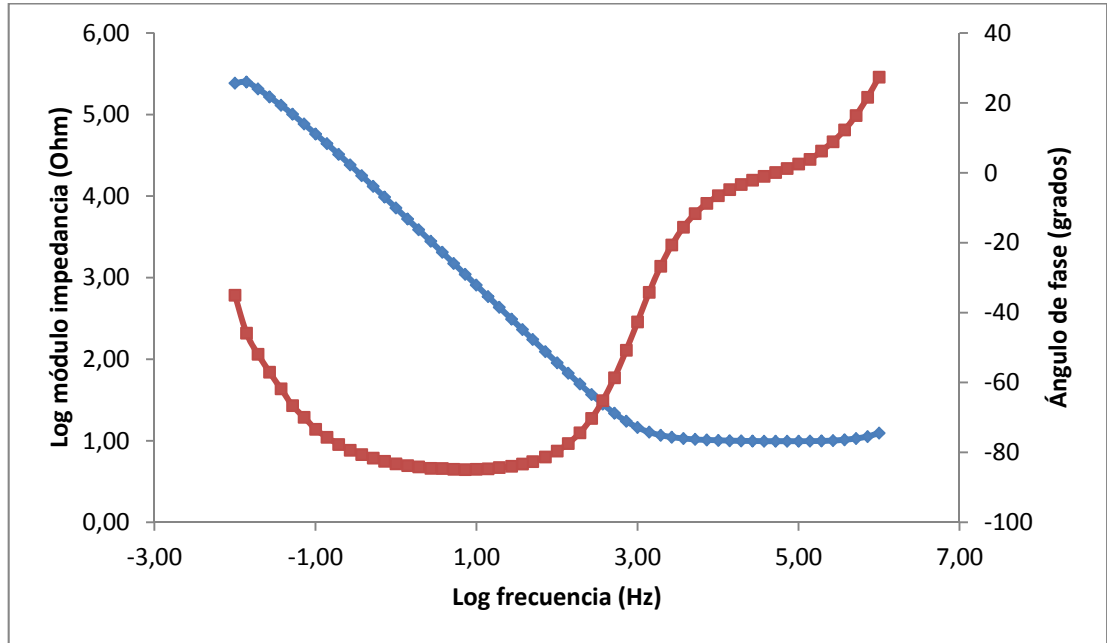


**EIS 0V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% 20 HORAS**

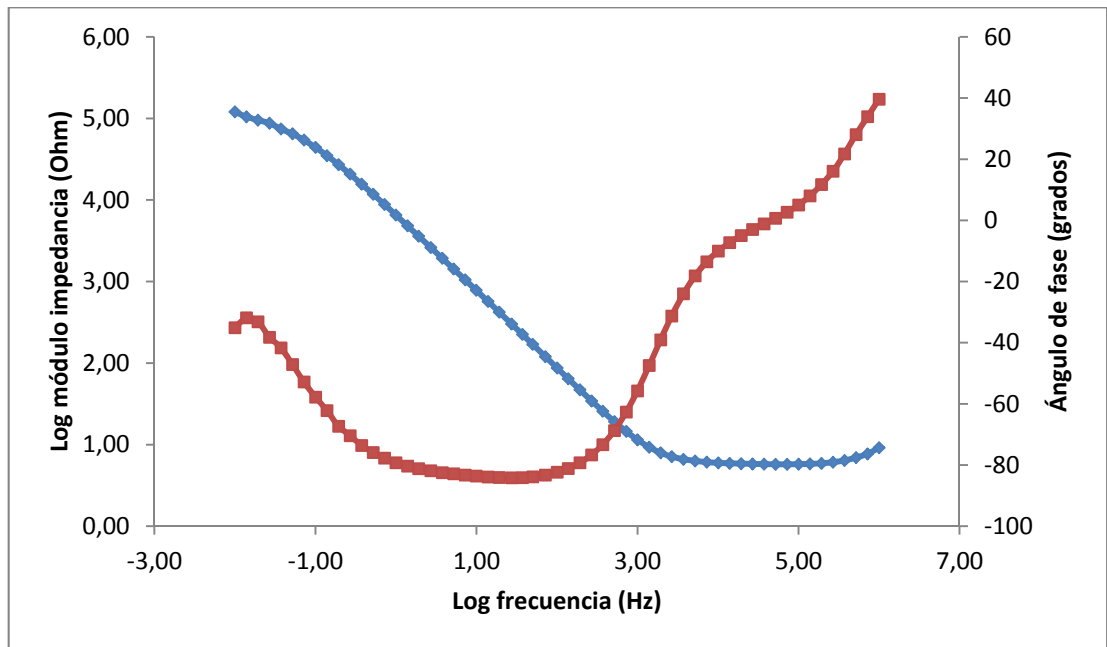


**EIS 0V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% 24 HORAS**

Fuente los autores

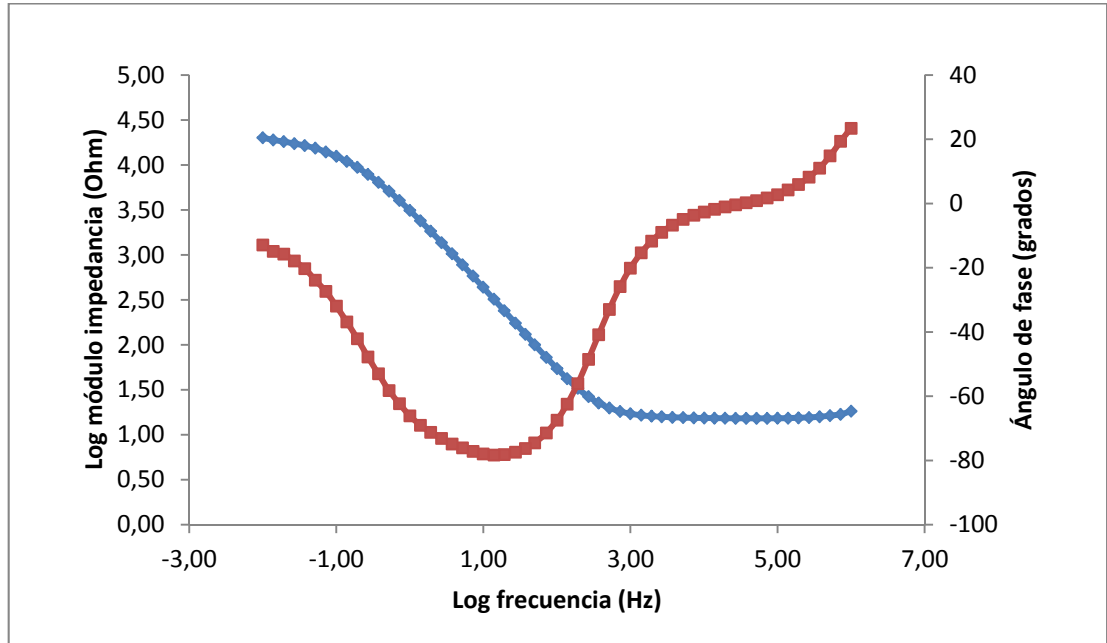


**EIS 0V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% Q 3% 0 HORAS**

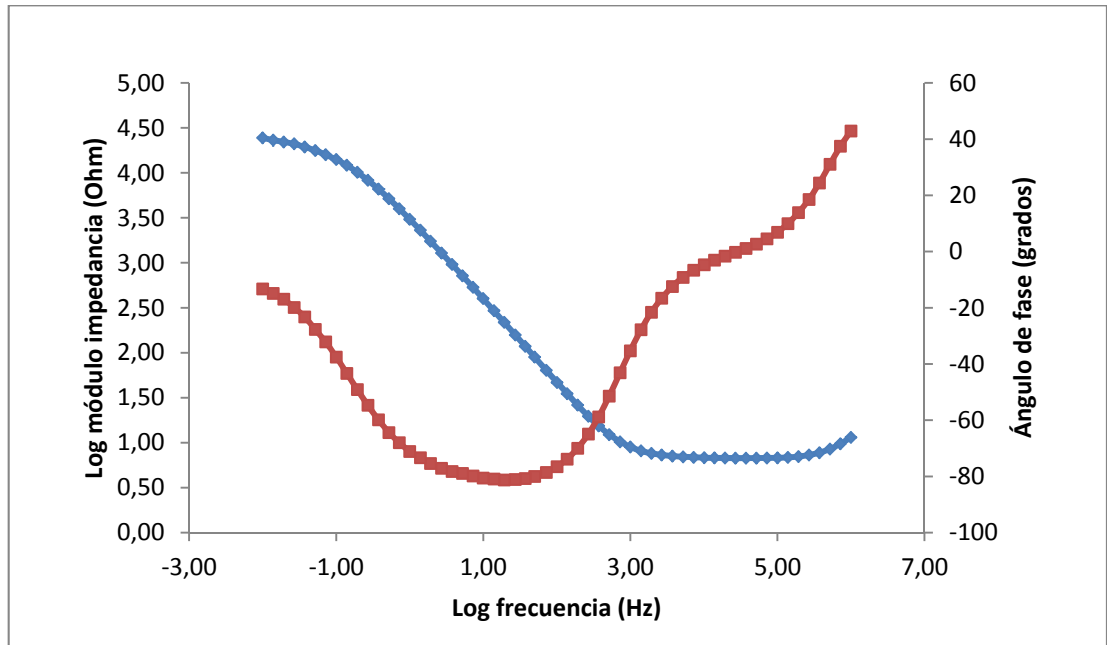


**EIS 0V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% Q 3% 4 HORAS**

Fuente los autores

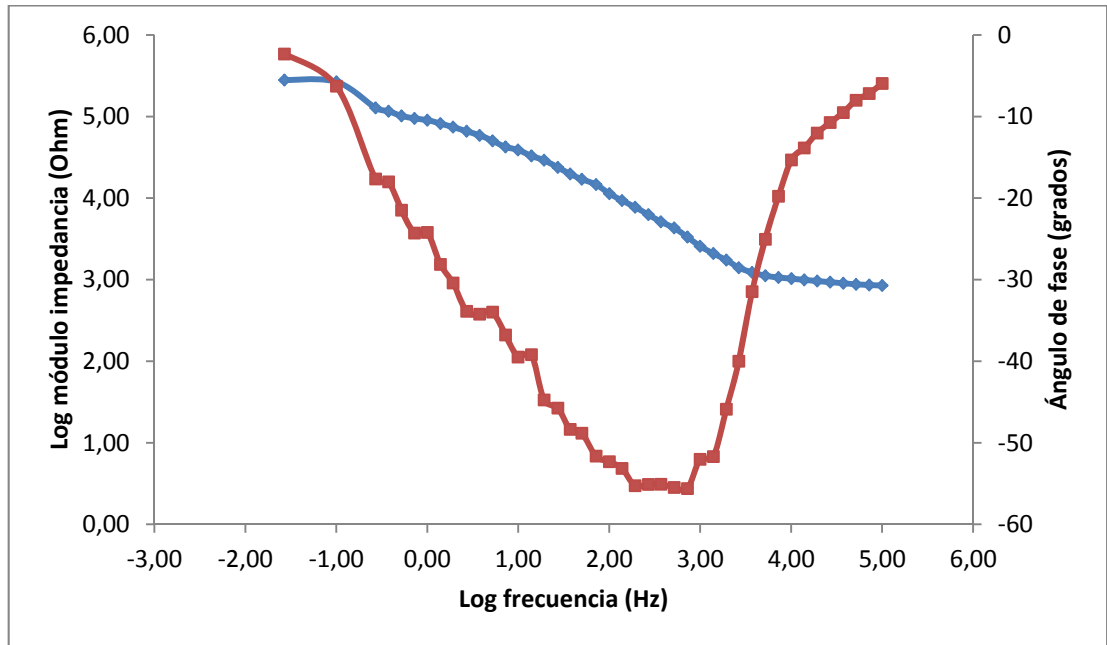


**EIS 0V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% Q 3% 20 HORAS**

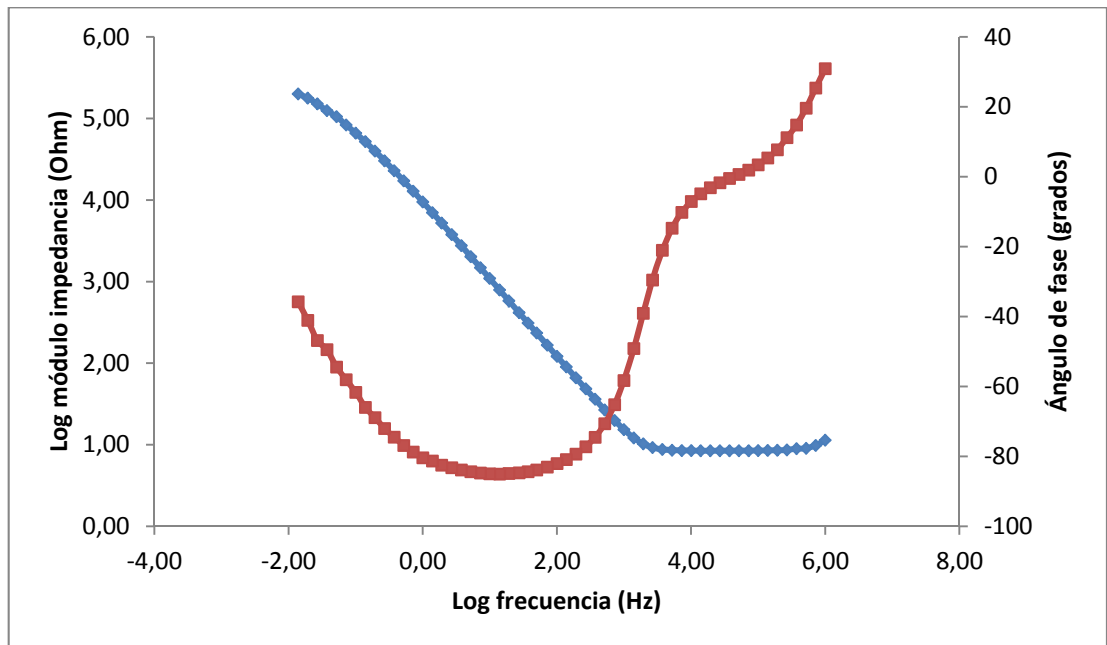


**EIS 0V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% Q 3% 24 HORAS**

Fuente los autores

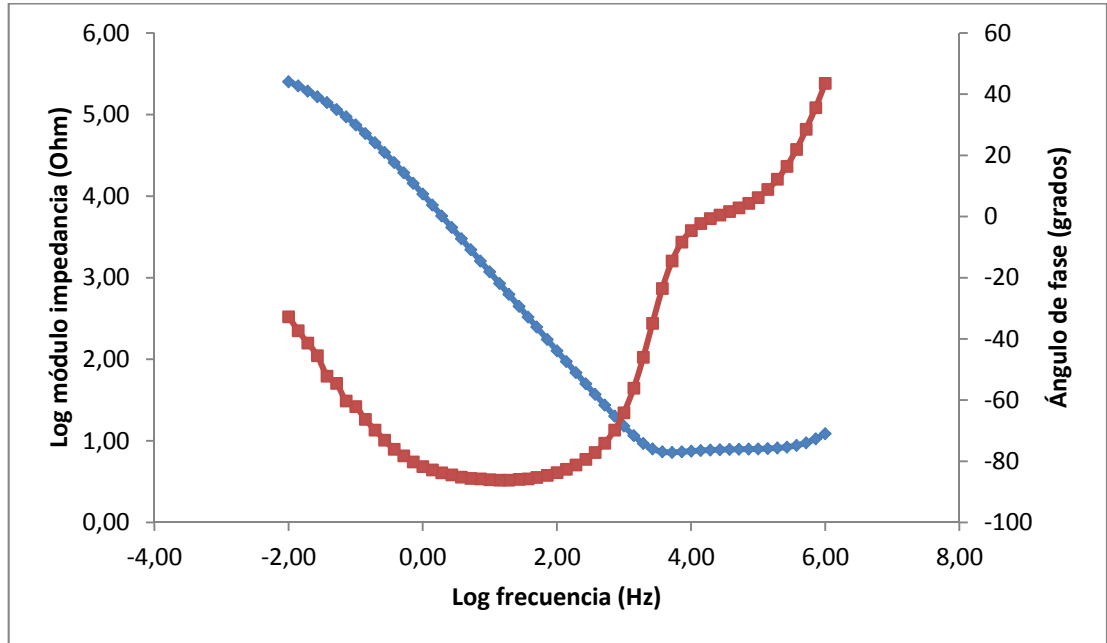


**EIS 0V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% Q 7% 0 HORAS**

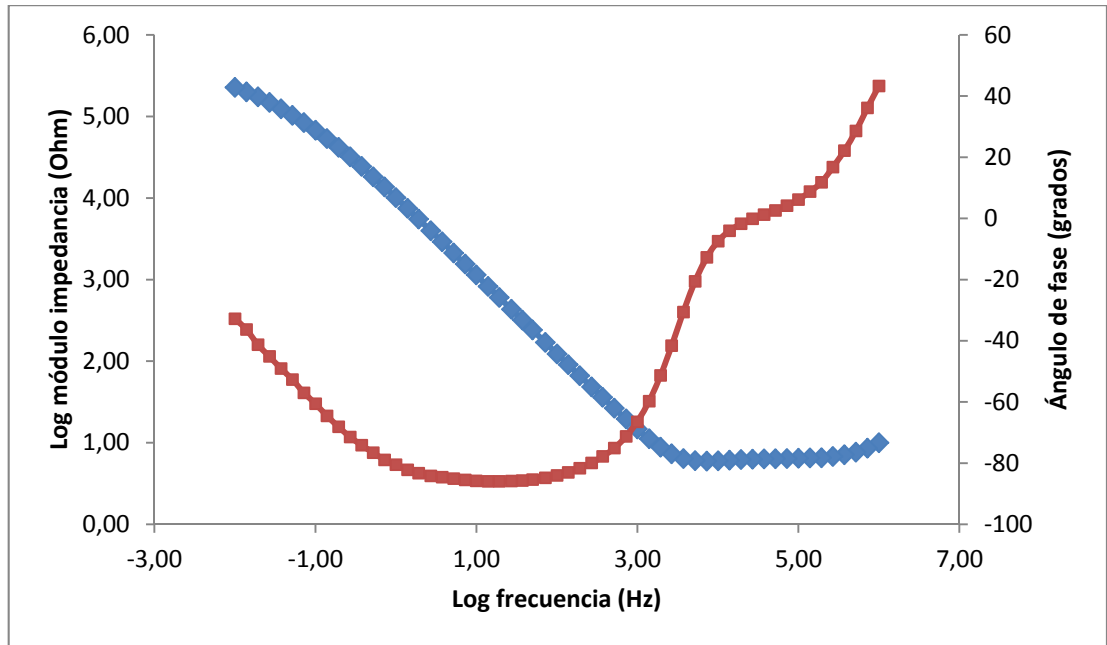


**EIS 0V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% Q 7% 4 HORAS**

Fuente los autores

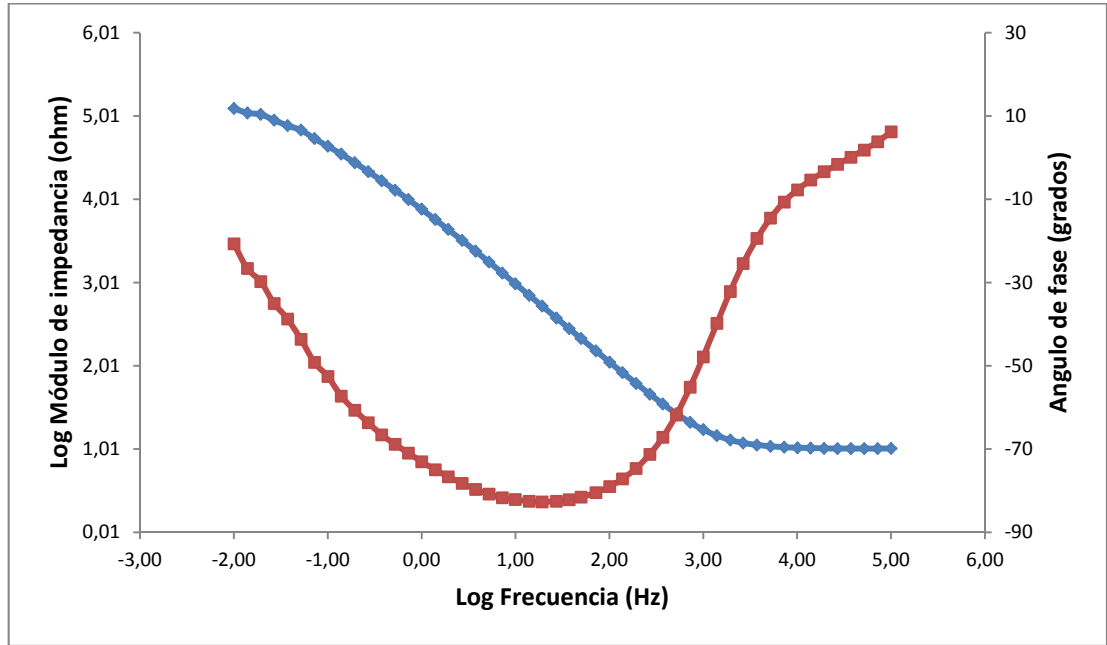


**EIS 0V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% Q 7% 20 HORAS**

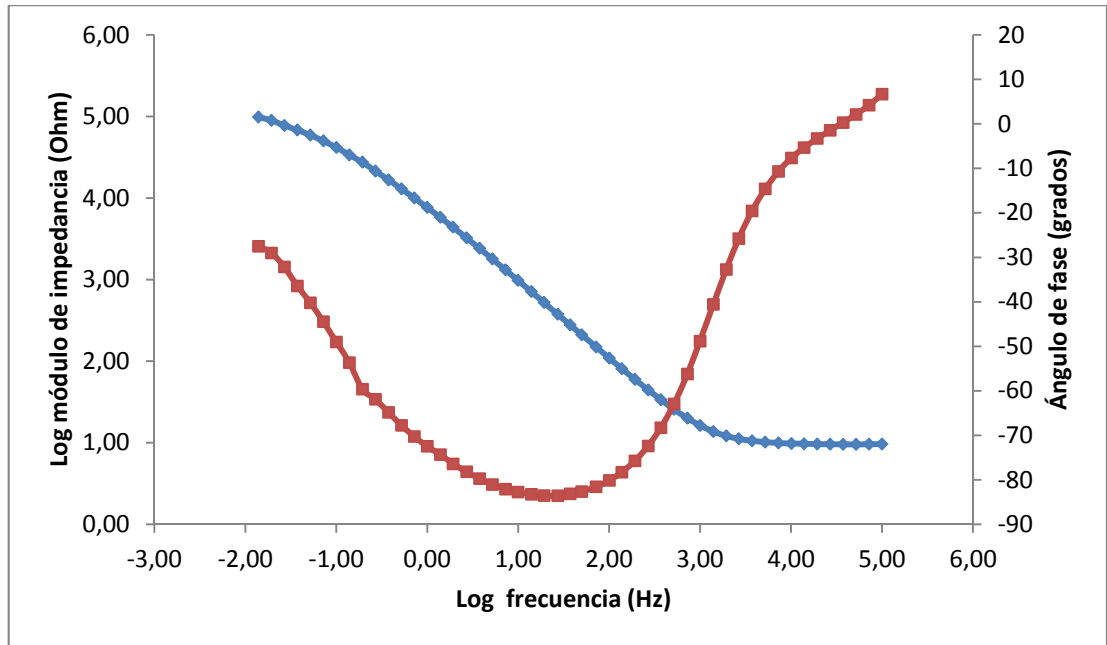


**EIS 0V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% Q 7% 24 HORAS**

Fuente los autores

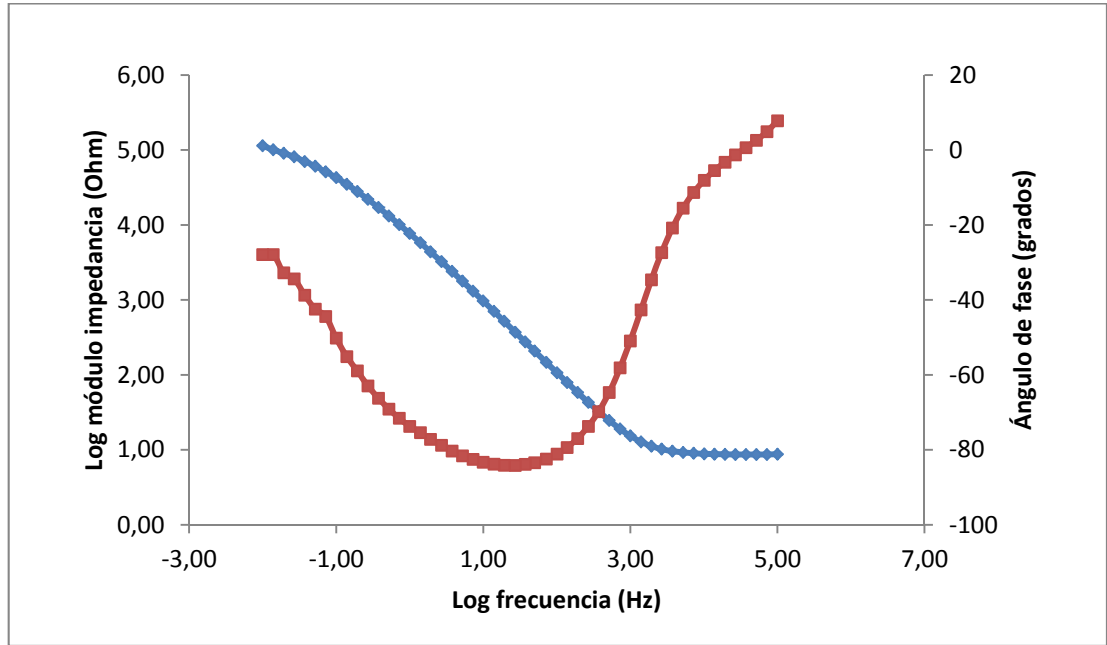


**EIS 0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% 0 HORAS**

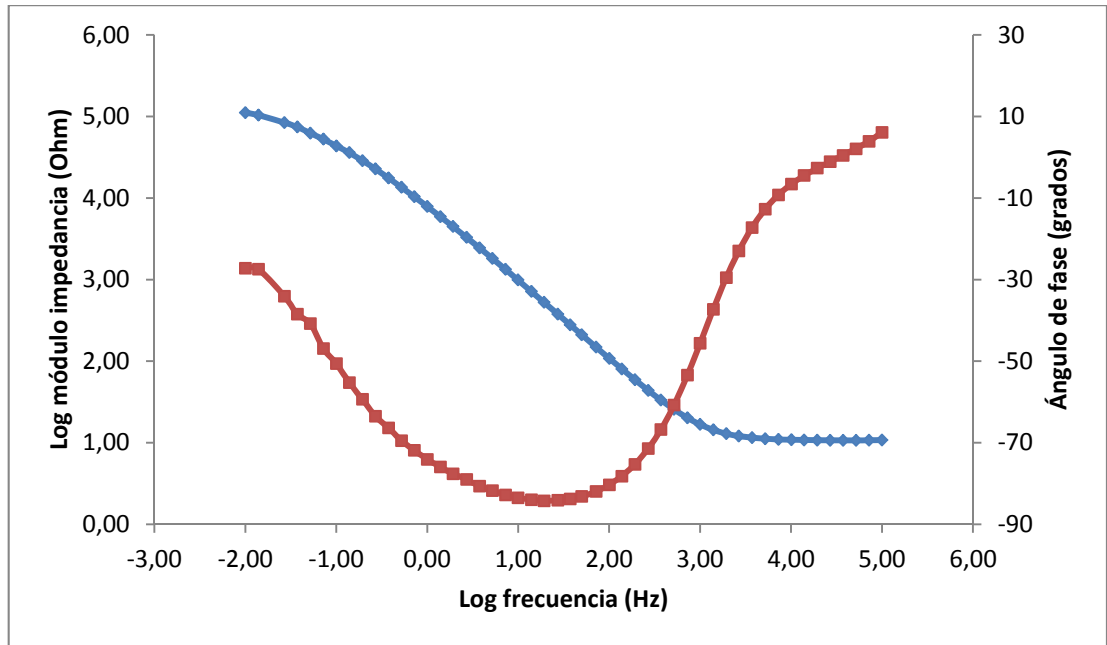


**EIS 0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% 4 HORAS**

Fuente los autores

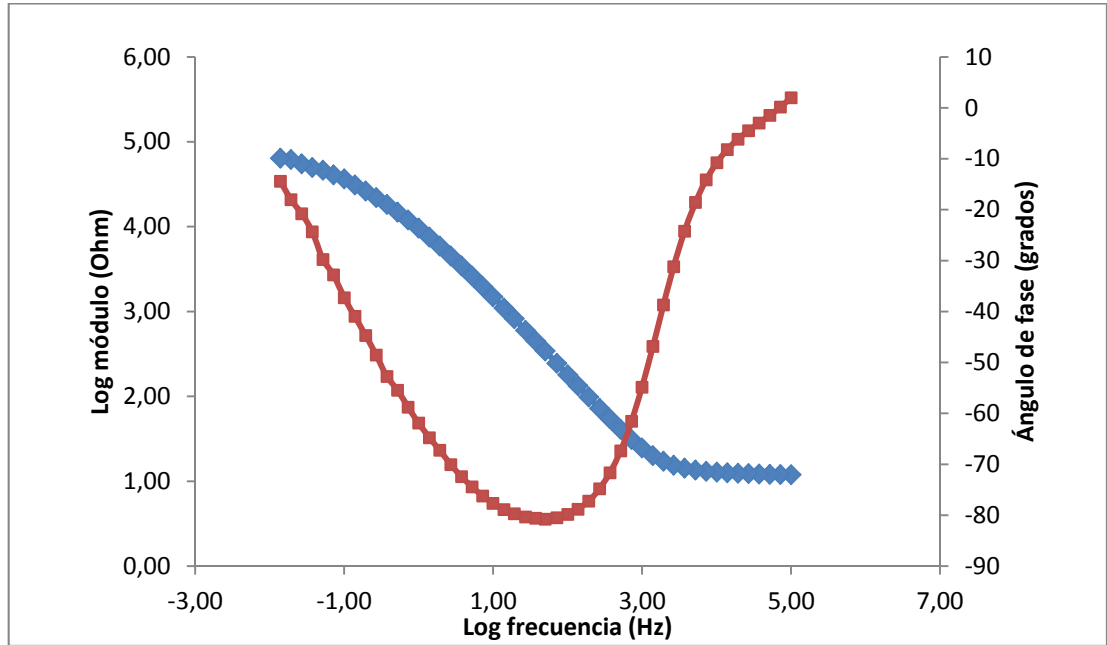


**EIS 0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% 20 HORAS**

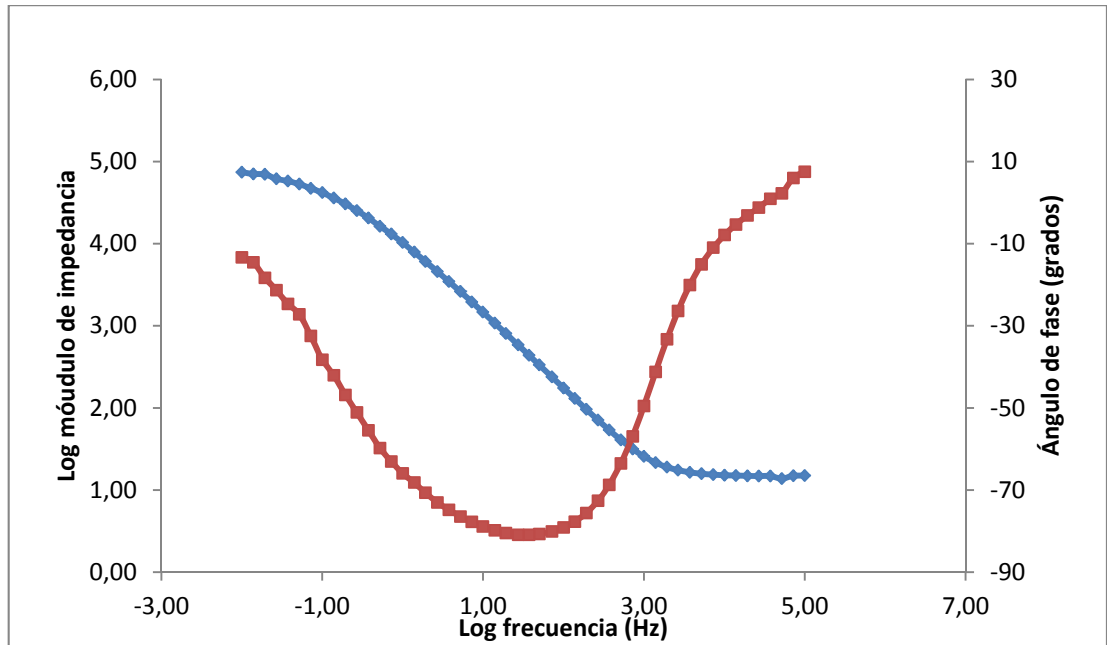


**EIS 0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% 24 HORAS**

Fuente los autores

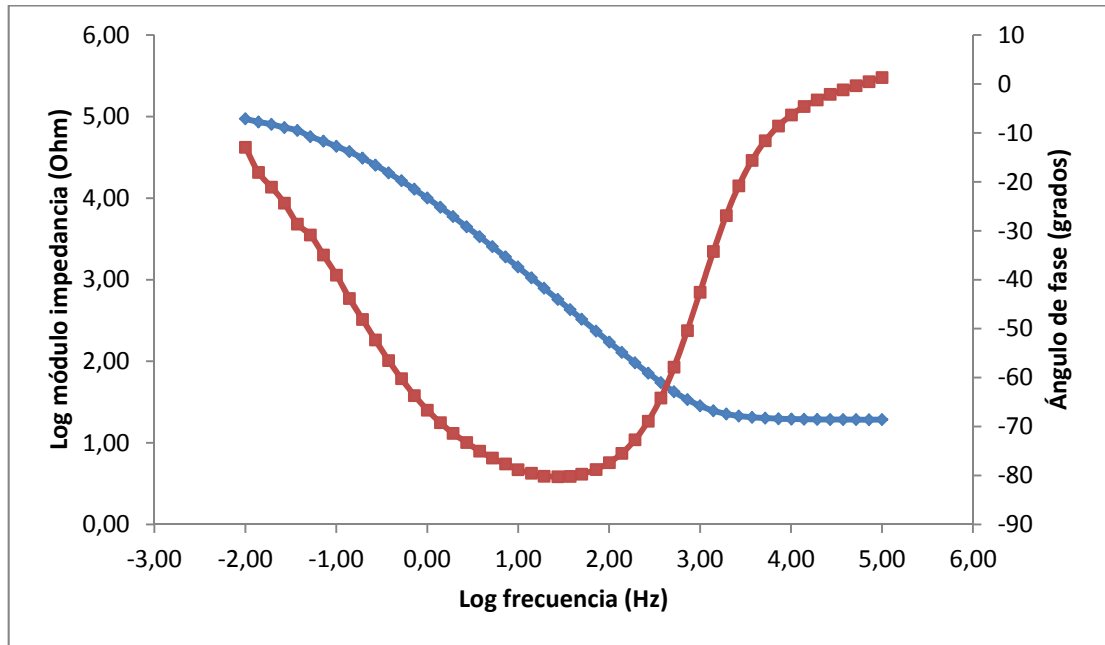


**EIS 0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% 3%Q 0 HORAS**

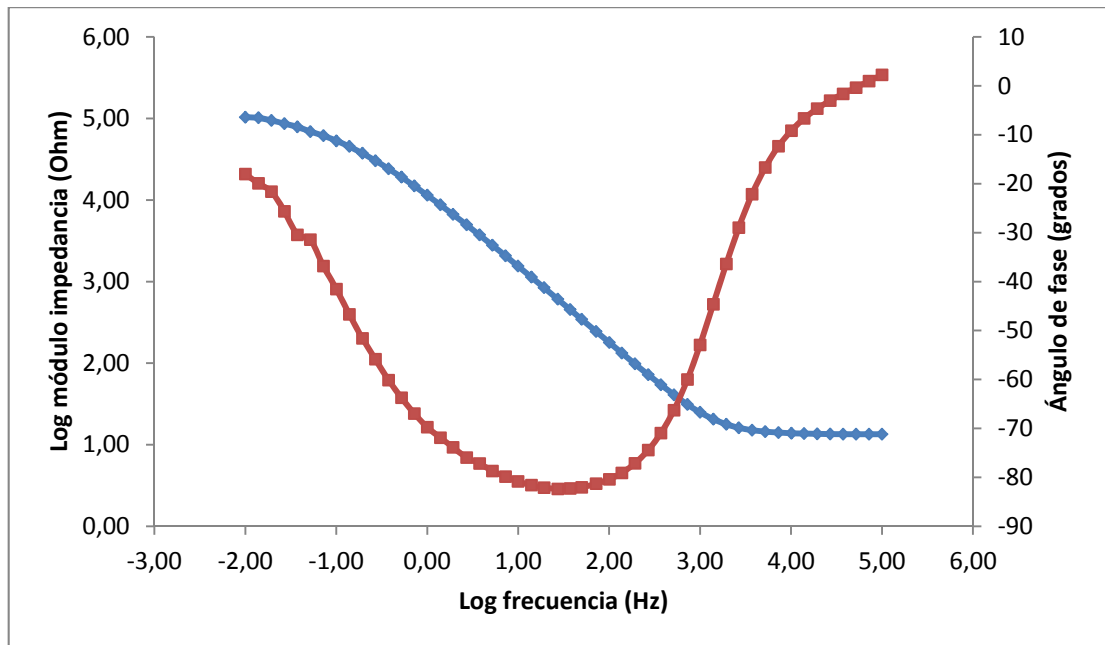


**EIS 0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% 3%Q 4 HORAS**

Fuente los autores

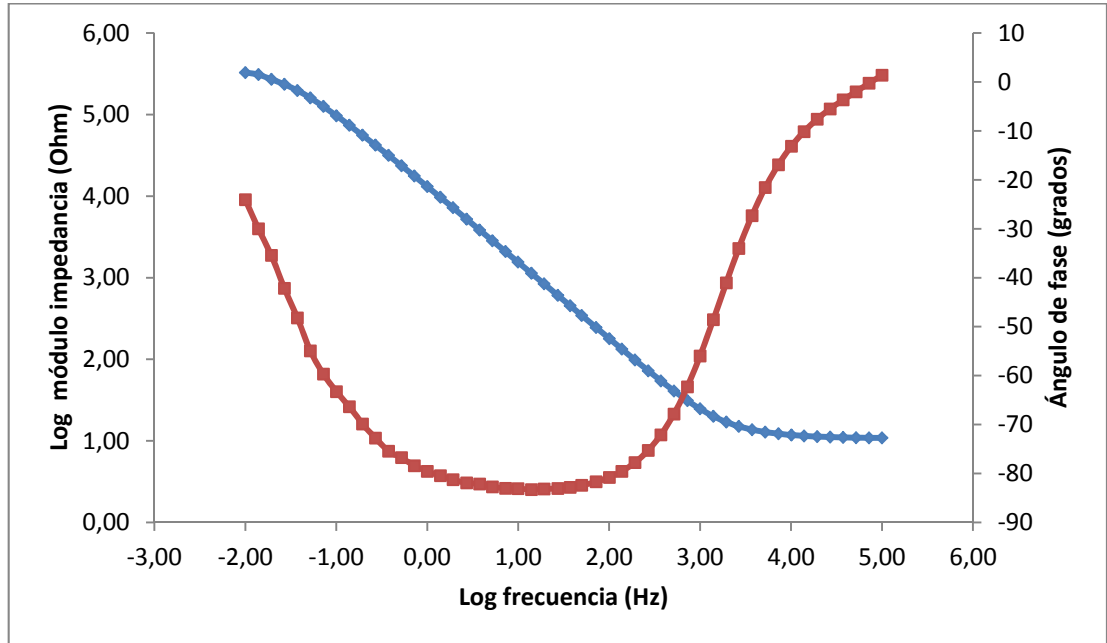


**EIS 0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% 3%Q 20 HORAS**

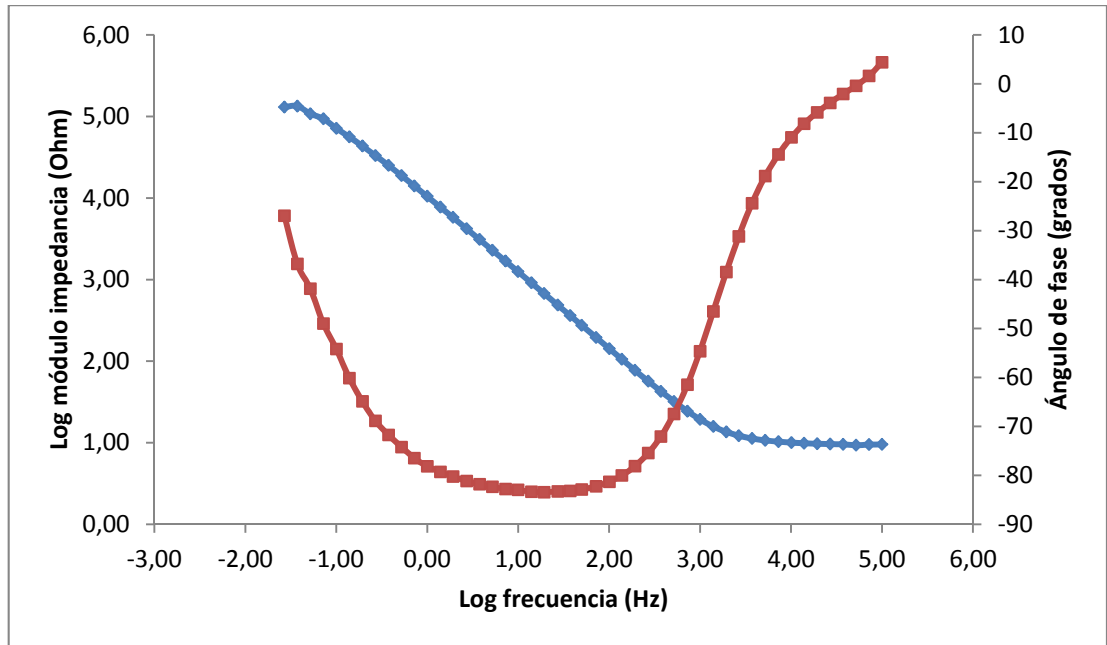


**EIS 0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% 3%Q 24 HORAS**

Fuente los autores

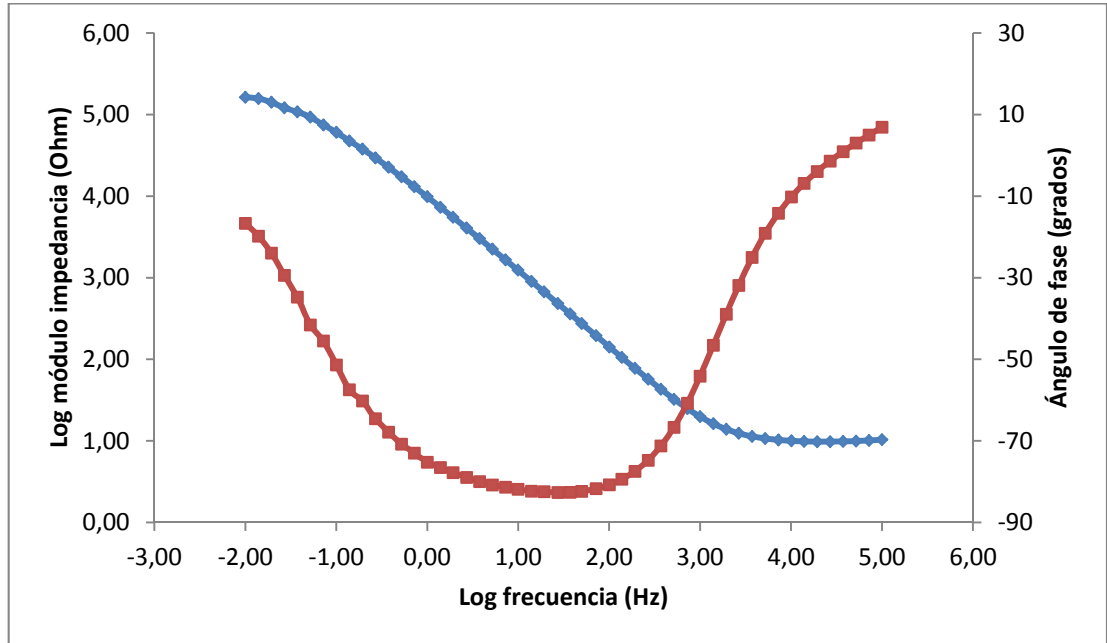


**EIS 0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% 7%Q 0 HORAS**

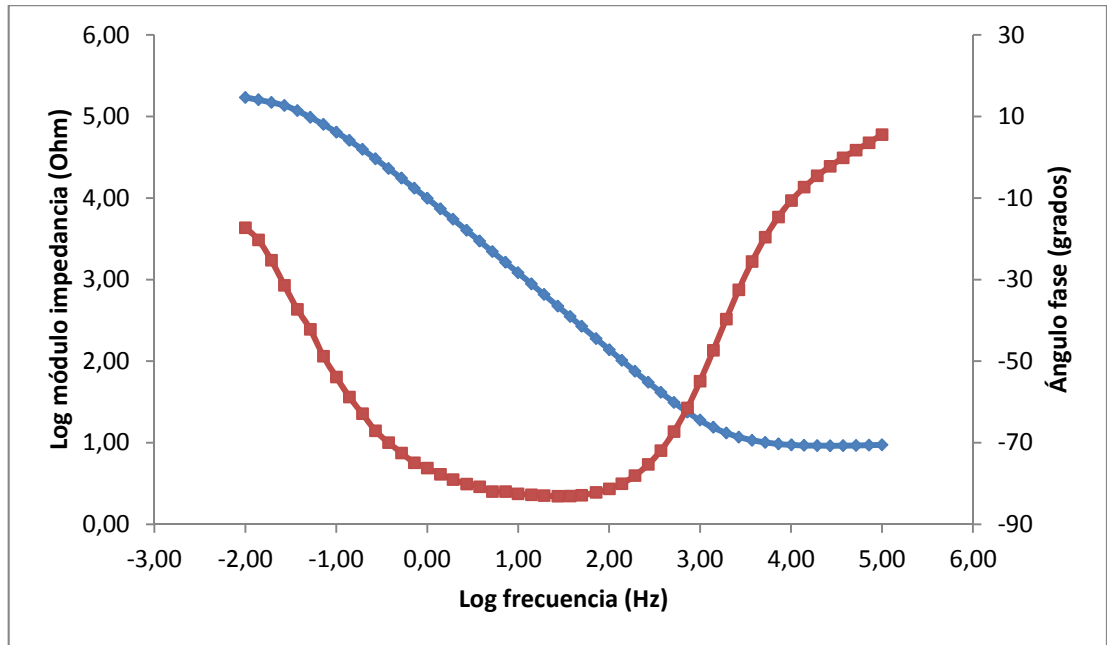


**EIS 0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% 3%Q 4 HORAS**

Fuente los autores

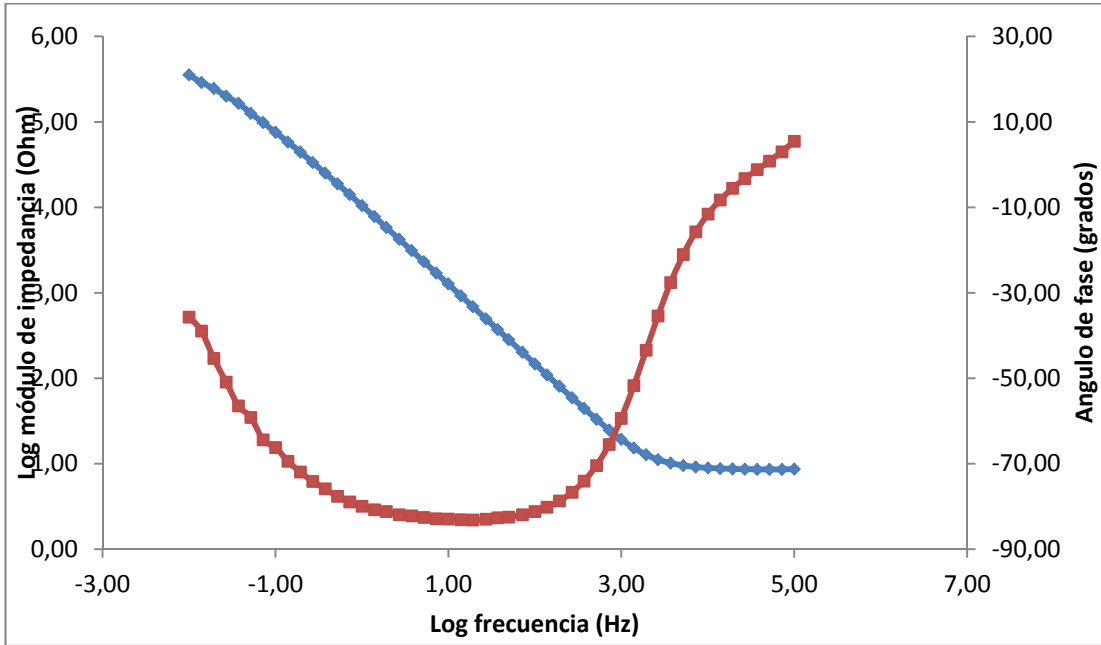


**EIS 0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% 7%Q 20 HORAS**

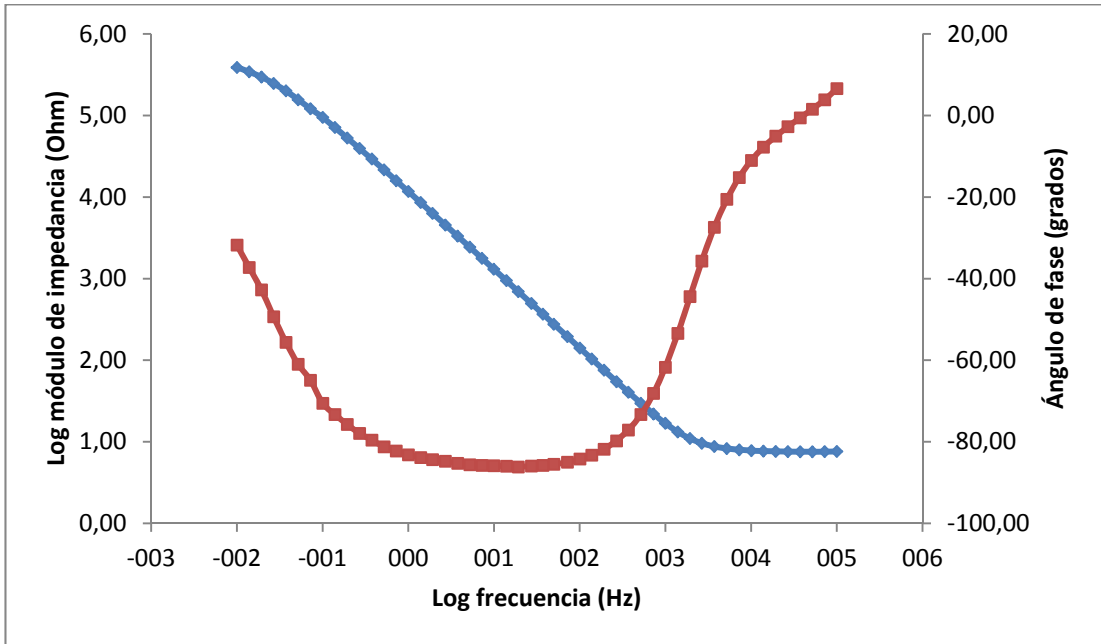


**EIS 0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% 7%Q 24 HORAS**

Fuente los autores

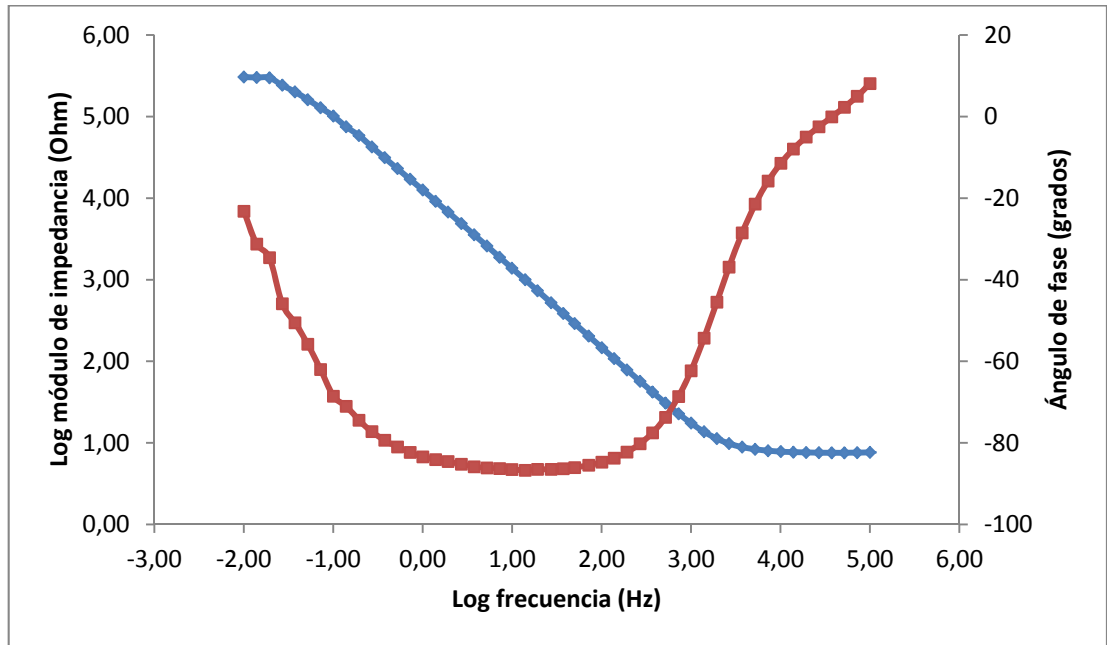


**EIS -0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% 0 HORAS**

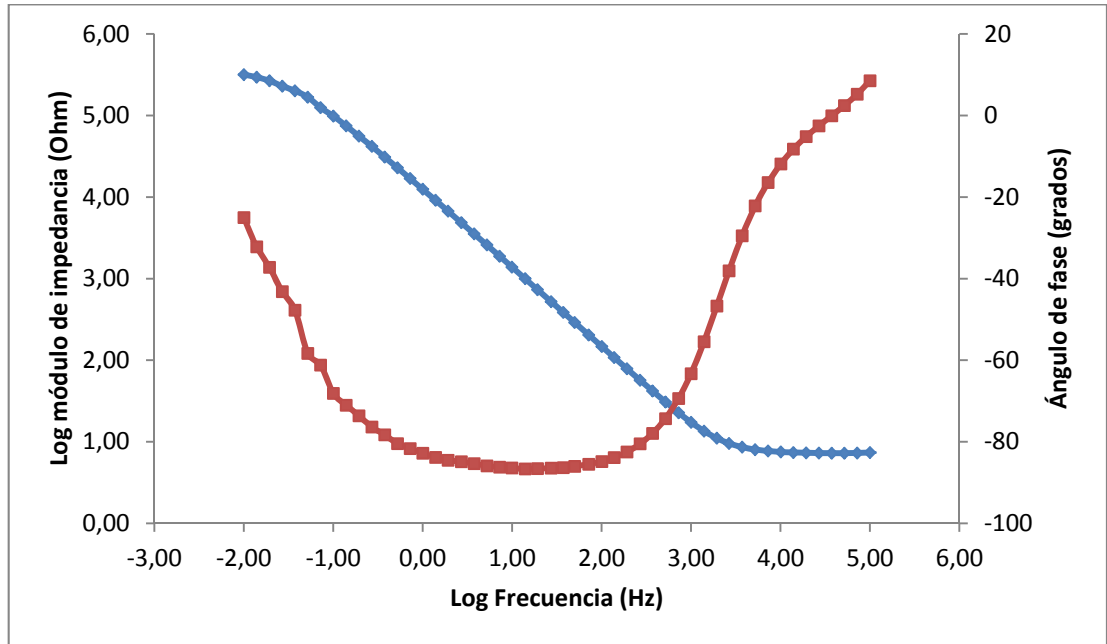


**EIS -0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% 4 HORAS**

Fuente los autores

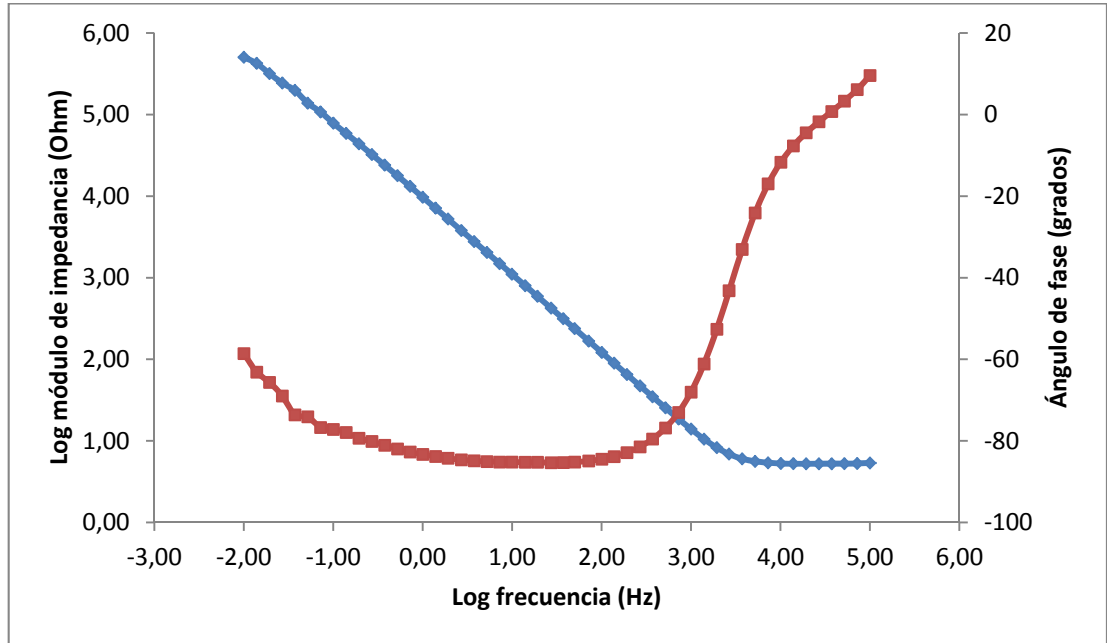


**EIS -0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% 20 HORAS**

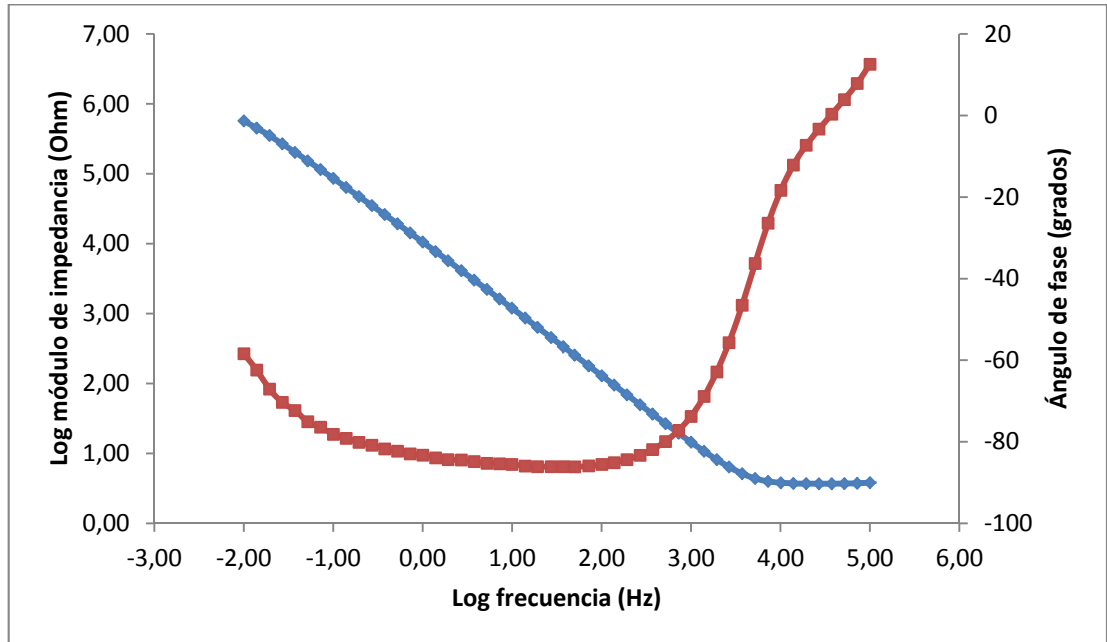


**EIS -0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% 24 HORAS**

Fuente los autores

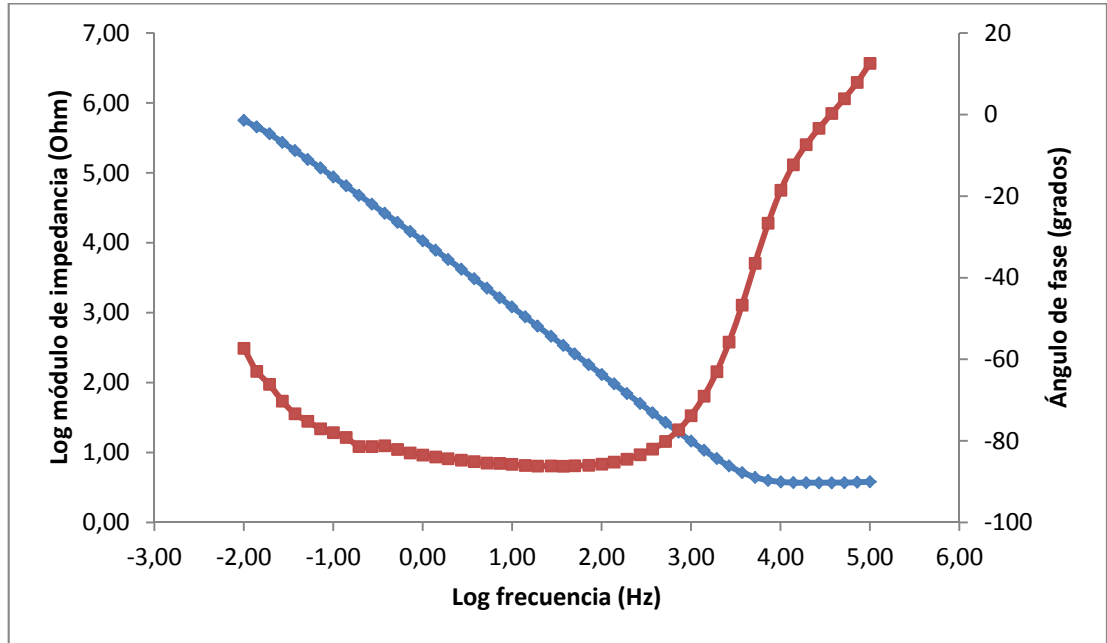


**EIS -0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% Q 3% 0 HORAS**

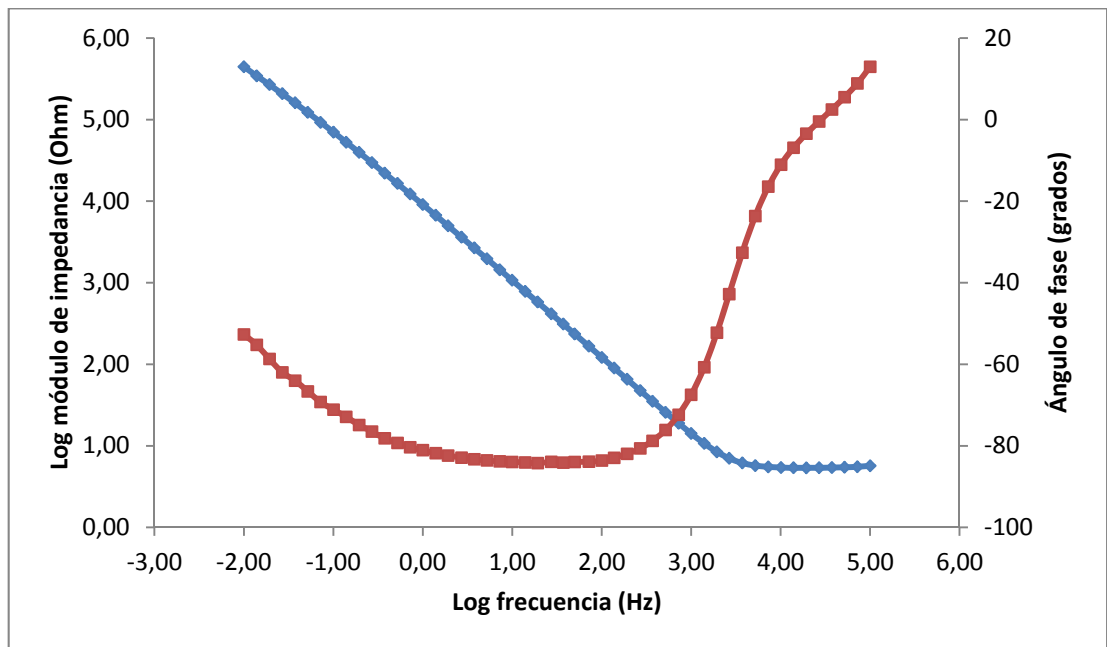


**EIS -0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% Q 3% 4 HORAS**

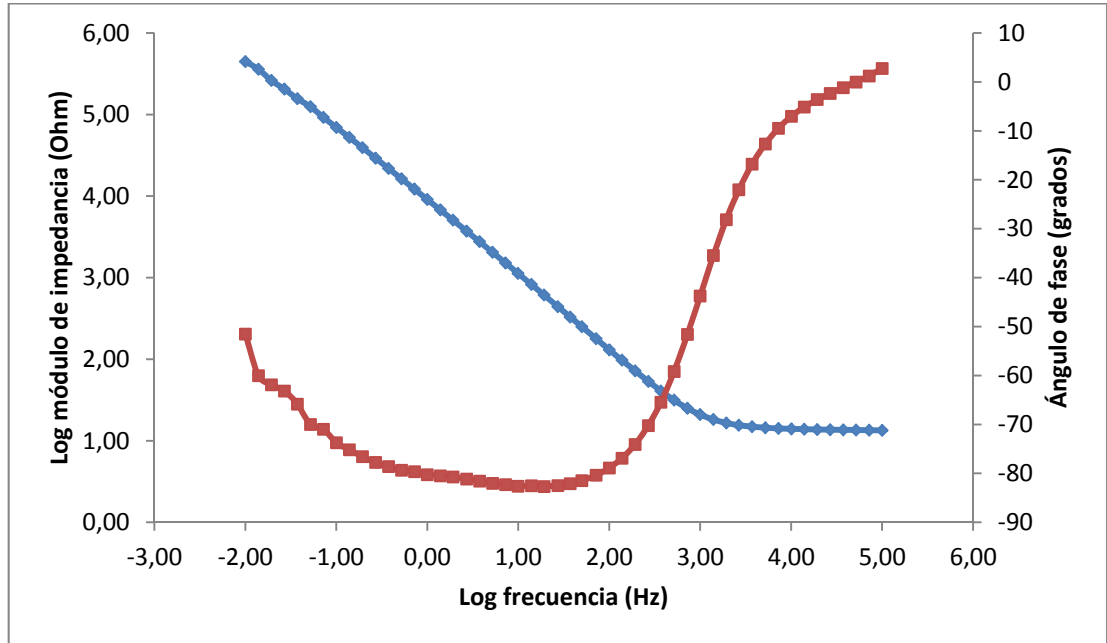
Fuente los autores



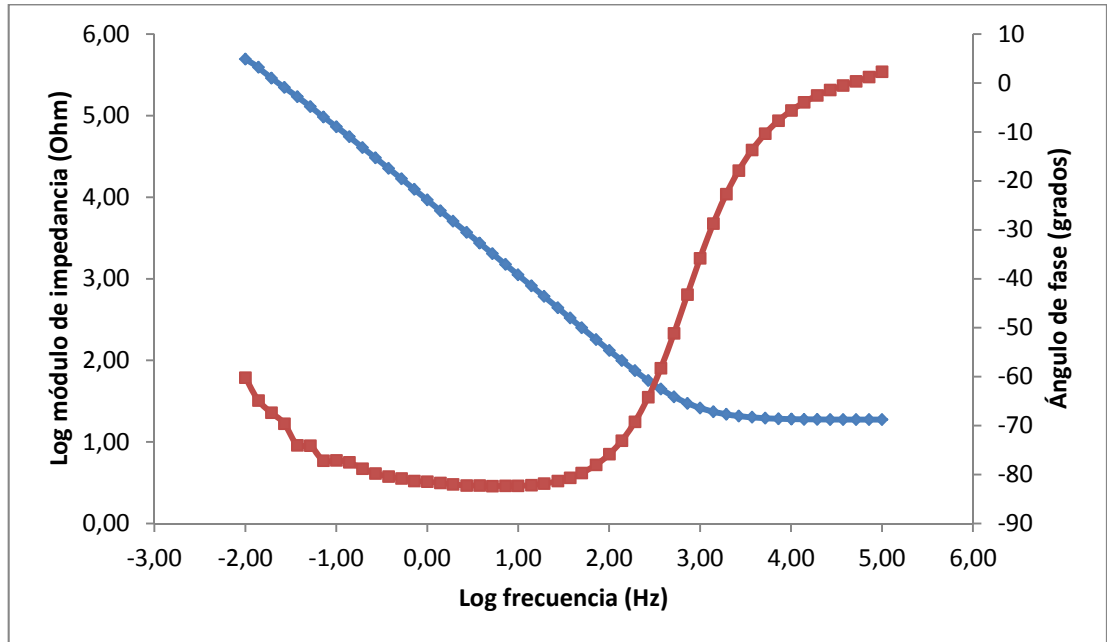
**EIS -0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% Q 3% 20 HORAS**



**EIS -0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% Q 3% 24 HORAS**

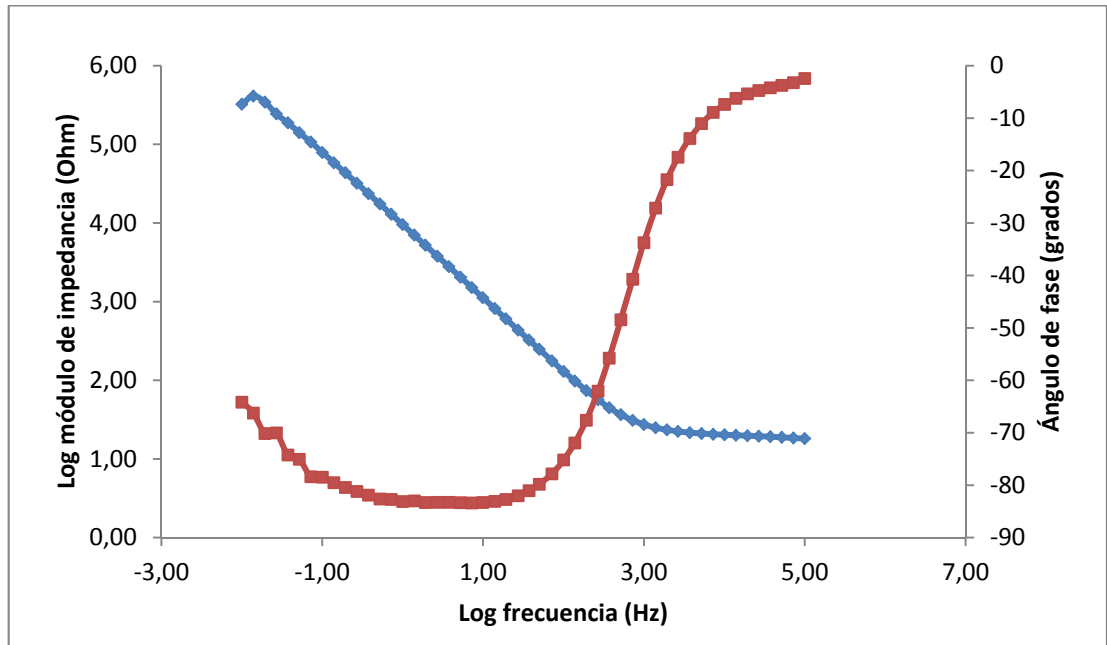


**EIS -0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% Q 7% 0 HORAS**

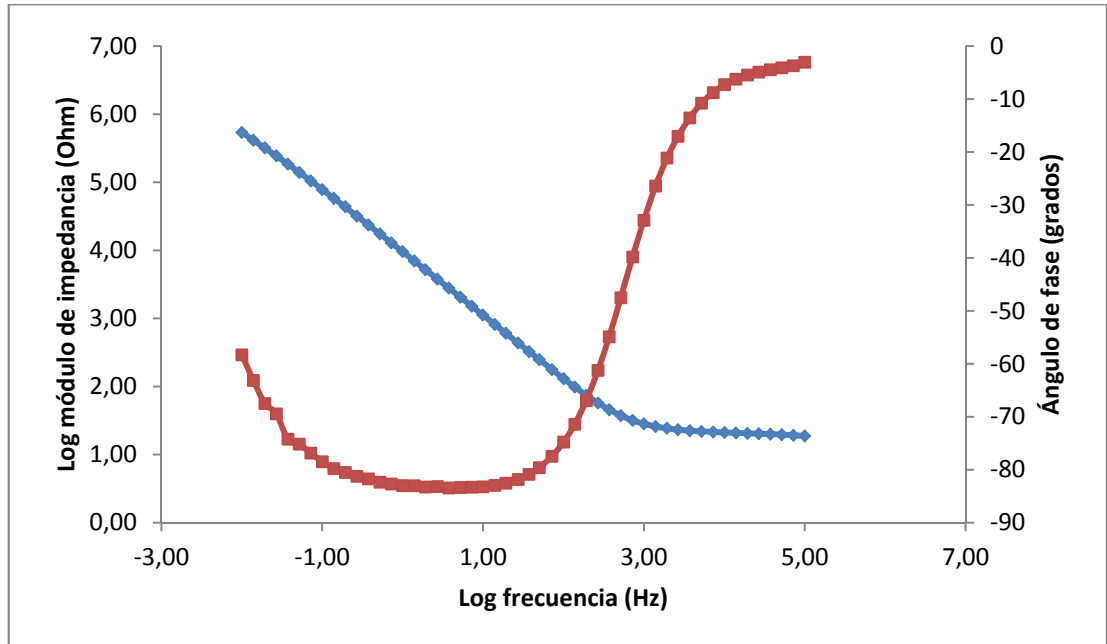


**EIS -0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% Q 7% 4 HORAS**

Fuente los autores



**EIS -0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% Q 7% 20 HORAS**



**EIS -0.05V RPMI-HOS PLGA 70/30 HAP 10% Q 7% 24 HORAS**

Fuente los autores