

EVALUACIÓN DE LA ADSORCIÓN DE COLÁGENO SOBRE MATRICES DE PLA-PGA-BIOCERÁMICO-QUITOSANO MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA

N. D. Montañez¹, M. Gelves², H. A. Estupiñán³, C. Vásquez⁴, D.Y. Peña⁵.
Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia.
Recibido marzo 16, 2011 – Aceptado Agosto 10, 2011

<http://dx.doi.org/10.18566/puente.v5n2.a04>

Resumen— En este trabajo, mediciones de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE) han sido empleadas para evaluar la adsorción de la proteína de colágeno en una superficie polimérica PLA-PGA-Biocerámico-Quitósano. Se ha discutido de los resultados obtenidos que la resistencia a la transferencia de carga es directamente proporcional a la cantidad de proteína de colágeno adsorbida (concentración superficial) y que este proceso, depende en gran medida de la afinidad de la proteína a los sitios bioactivos en la superficie polimérica, aumentando esta afinidad con un sobrepotencial de electrodo en el sistema estudiado.

Palabras clave— Adsorción, colágeno, electroactivación, espectroscopía de impedancia electroquímica.

Abstract— In this paper, electrochemical impedance spectroscopy measurements (EIA) have been used to evaluate the adsorption of the protein collagen in a PLA-PGA polymer surface-bioceramic-Chitosan. From the results obtained, it has been discussed that the resistance to charge transfer is directly proportional to the amount of absorbed collagen protein (surface concentration) and that this process depends largely on the affinity of the protein to bioactive sites on the polymer surface, increasing the affinity with an electrode overpotential in the system studied.

¹Nerly D. Montañez, Ingeniera Química, Magister en Ingeniería de Materiales. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia (correo e.: ing_nerly.montanez@hotmail.com).

²Marcela Gelves, Ing. Química, Estudiante de Maestría en Ingeniería de Materiales. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia (correo e.: marcegelvez@hotmail.com).

³Hugo Estupiñán, Ingeniero Metalúrgico, M.Sc. Doctor en Ingeniería Química-UIS. Profesor Escuela de Materiales Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín, Colombia (correo e.: ugodoc@gmail.com).

⁴Custodio Vásquez, Ingeniero Metalúrgico, M.Sc. Director Grupo de Investigaciones en Corrosión, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia (correo e.: custodio@uis.edu.co).

⁵Dario Peña, Ingeniero Metalúrgico, M.Sc., Ph.D. Coordinador Grupo de Investigaciones en Corrosión, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia (correo e.: darioyesid@hotmail.com).

Keywords— Adsorption, collagen, electro-activation, electrochemical impedance spectroscopy.

I. INTRODUCCIÓN

Un elemento fundamental en la reparación de órganos o tejidos humanos, son los andamios o matrices para regeneración de tejidos (*scaffolds*). Una opción popular en la fabricación de andamios son los polímeros reabsorbibles, fundamentalmente porque los polímeros son fáciles de procesar en forma de una estructura tridimensional con una morfología de poro, particular para aplicaciones en la ingeniería de tejidos.

La biocompatibilidad de un material depende de la adherencia de biomoléculas de interés a la superficie. El contacto de un tejido vivo con un material implantado se hace compatible con el entorno fisiológico mediante la generación de una capa adsorbida compuesta de proteínas que están presentes en éste.

Los polímeros biodegradables y bioabsorbibles como el ácido Poliláctico PLA y ácido poliglicólico PGA son usados en diferentes aplicaciones biomédicas, como las suturas absorbibles, injertos de piel artificial, implantes ortopédicos y sistemas controlados de liberación de medicamentos [1]. Estos polímeros por sus propiedades de biodegradabilidad y atoxicidad, los hace aptos para fabricar andamios tridimensionales [2].

II. METODOLOGÍA

A. Materiales y Reactivos

La solución salina amortiguada por fosfatos PBS, empleada en la experimentación, simulando fluidos corporales, se obtuvo a partir de NaCl 8,06 g, KCl 0,22 g, Na₂HPO₄ 1,15 g, KH₂PO₄ 0,20 g y H₂O 1000 ml con un pH de 7,4.

El ácido poliláctico fue sintetizado por policondensación del ácido L-láctico (MERCK) al 98% con ZnCl₂ como catalizador al 1.5% en peso, el tiempo total de síntesis fue de 57 horas [3]. El ácido poliglicólico (PGA) se preparó por policondensación

a partir de ácido glicólico Carlo Erba al 70%, con 0,5% en peso de $ZnCl_2$ como catalizador y un tiempo total de 25 horas de síntesis [4]. Ambos procedimientos se llevaron a cabo en un rotoevaporador con control de temperatura y presión de vacío. El ácido Poliláctico y el ácido Poliglicólico se caracterizaron mediante Espectroscopía por Infrarrojo de Transformada de Fourier (FTIR).

El biocerámico, compuesto por dos tipos de fosfatos de calcio [5], se obtuvo por precipitación acuosa a partir de nitrato de calcio tetrahidratado ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$) y fosfato de Amonio dihidrogenado ($(NH_4)H_2PO_4$) en concentraciones 1M y 0.48M respectivamente, basificando la solución formada con hidróxido de amonio, la cual fue envejecida y calcinada hasta obtener el biocerámico requerido [6].

El material obtenido fue caracterizado cualitativa y cuantitativamente mediante Difracción de Rayos X en un difractor de polvo RIGAKU D/MAX IIIB a un voltaje de 40kV, corriente de 30 mA, muestreo de $0,02^\circ$ (2θ) y un rango de medición $2-70^\circ$ (2θ).

El quitosano empleado en la fabricación de la matriz de regeneración celular fue de Sigma Aldrich, referencia 417963-25G, con un grado de desacetilación de 85%. Este polímero es un polisacárido biodegradable y atóxico derivado de la quitina, la cual es una sustancia natural que presenta actividad antibacteriana y antifúngica [6-7].

B. Electrodeposición del Polímero sobre el Cristal de Cuarzo

Cristales de cuarzo se emplearon como electrodo soporte para electrodepositar el compuesto polimérico de ácido poliláctico-ácido poliglicólico (85.5%) - biocerámico (9.5%) y quitosano (5%), disueltos en acetona al 15% p/v. La electrodeposición fue catódica a 9V durante 15 minutos empleando como ánodo una lámina de acero inoxidable y como cátodo el cristal de cuarzo.

C. Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIE)

Las mediciones de EIE se llevaron a cabo en una celda plana con un volumen de 155 cm^3 , con un serpentín conectado a un baño termostatao y recirculación de agua. Se usó un electrodo de referencia de calomel saturado, una barra de grafito como contraelectrodo y un cristal de Au-T recubierto con el compuesto polimérico como electrodo de trabajo.

Las condiciones para las pruebas electroquímicas fueron: concentración de colágeno (12.5, 20 y 27.5 $\mu\text{g/ml}$) disuelto en PBS a pH 7.4, como electrolito,

temperatura de 37°C y 39.5°C , sobrepotenciales de -0.37, 0 y 0.56V, obtenidos según los picos de potencial mostrados en la prueba de voltametría cíclica realizada. En la Fig. 1 se muestra el montaje realizado para los ensayos de espectroscopía de impedancia electroquímica.



Fig. 1. Fotografía del montaje para las mediciones electroquímicas.

Se ha demostrado que la resistencia a la transferencia de carga es inversamente proporcional a la masa adsorbida específica en la superficie del electrodo. Una medida de la velocidad de reacción y de la cantidad de proteína adsorbida en una superficie es el inverso de la resistencia a la transferencia de carga R_{ct}^{-1} , que es directamente proporcional a la cantidad de proteína adsorbida Γ ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$) y a la densidad de carga superficial.

La adsorción de proteínas puede ser descrita con las ecuaciones 1 y 2 que muestran el modelo de Langmuir, el cual permite relacionar la concentración de proteína de colágeno C y la cantidad de material adsorbido en la superficie [9-10-11].

$$\frac{C}{(R_{ct})^{-1}} = \frac{1}{(R_{ct})^{-1}_{\text{máx}}} + \frac{C}{(R_{ct})^{-1}_{\text{máx}} B_{ADS}} \quad (1)$$

$$\frac{C}{\Gamma} = \frac{1}{\Gamma_{\text{máx}} B_{ADS}} + \frac{C}{\Gamma_{\text{máx}}} \quad (2)$$

Donde B_{ADS} es el coeficiente de adsorción y $\Gamma_{\text{máx}}$ representa la máxima cantidad de proteína que se puede adsorber en la superficie. Estos valores fueron obtenidos del intercepto y la pendiente de la curva de C/Γ contra C. B_{ADS} está relacionado con la afinidad de la proteína de colágeno a ser adsorbida en la superficie del compuesto polimérico depositado sobre el electrodo a una temperatura dada.

La energía libre de adsorción se obtiene de la relación mostrada en la ecuación 3 [11], en donde M, es la concentración molar de la proteína en la solución acuosa de PBS.

$$\Delta G = -RT \ln(M B_{ADS}) \quad (3)$$

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Caracterización del Material Polimérico y Biocerámico Obtenidos

En la Fig. 2 se muestra el espectro FTIR para el ácido poliláctico sintetizado.

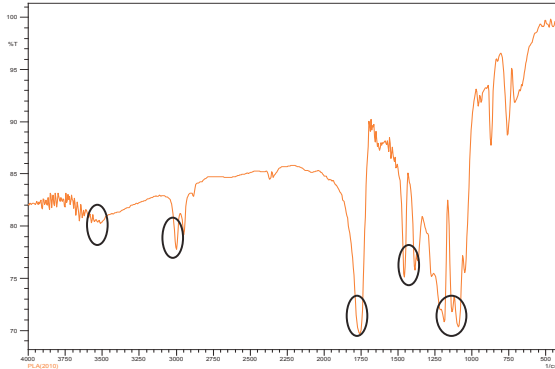


Fig. 2. Espectro Infrarrojo PLA

En este espectro se observan los picos característicos de los grupos funcionales de la estructura del ácido poliláctico. Los grupos funcionales O-H, C-H, C=O, CH₃, C-C, C-O, se ubican en las longitudes de onda de 3510, 3000, 1756, 1450, 1190 y 1086 respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios [12].

En la Fig. 3 se muestra el espectro FTIR para el ácido poliglicólico sintetizado.

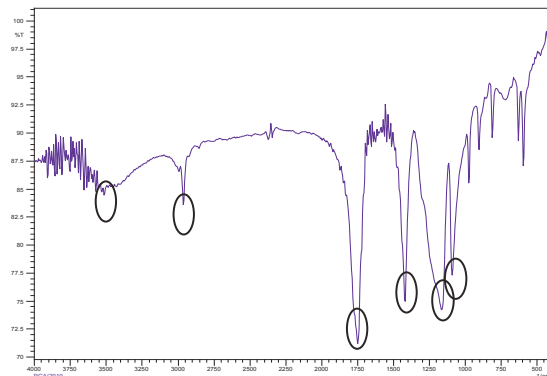


Fig. 3. Espectro Infrarrojo PGA

Los grupos funcionales O-H, C-H, C=O, CH₃, C-C, C-O, se ubican en las longitudes de onda: 3500, 2950, 1750, 1425, 1160 y 1090 respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros investigadores [13].

En la Fig. 4 se muestra el difractograma de rayos X obtenido de la muestra de hidroxiapatita sintetizada.

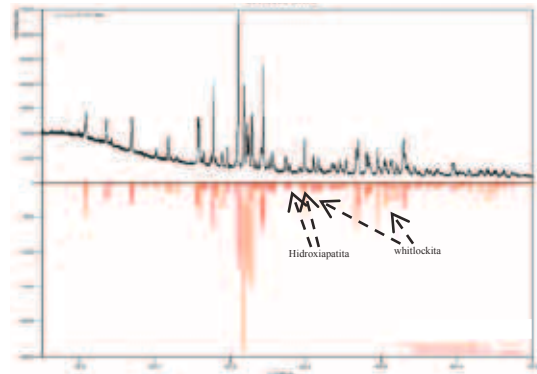


Fig. 4. Difracción de rayos X de la hidroxiapatita sintetizada

La caracterización de la hidroxiapatita por difracción de rayos X mostró la presencia de fases cristalinas de hidroxiapatita y fosfato tricálcico (whitlockita), este último en mayor proporción. No se presentaron fases amorfas, como lo muestra la Tabla I.

TABLA I.
FASES DE LA HIDROXIAPATITA SINTETIZADA

FASE Cristalinos	No Tarjeta PDF-2	Nombre	Cuantitativo
Ca ₃ (PO ₄) ₂ OH	010-76-0694	Hidroxiapatita	31.2% (DE=0.4)
Ca ₃ (PO ₄) ₂	000-55-0898	Whitlockita	68.8% (DE=0.6)

D.E=Desviación Estándar

B. Espectroscopia de Impedancia Electroquímica EIE

La técnica de EIE fue empleada para hacer la caracterización de la interfase polímero-electrolito y de los procesos superficiales relacionados con la adsorción de la proteína de colágeno en el recubrimiento de PLA-PGA-biocerámico-quitosano.

Se obtuvieron los correspondientes espectros de Bode y de Nyquist mostrados en las Fig. 5 y 6. En la Fig. 5 se muestra el espectro de adsorción obtenido para colágeno 27.5 µg/ml, 39°C, y -0.37 V. La línea continua, muestra los datos simulados de este espectro.

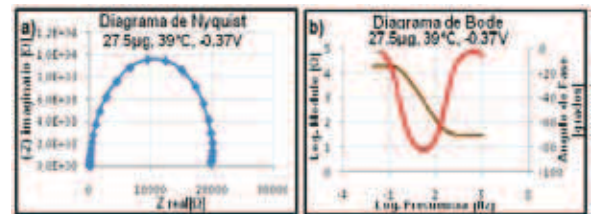


Fig. 5. Caracterización de la adsorción de colágeno sobre el compuesto polimérico a una concentración de 27.5 µg/ml de proteína en solución, 39°C y -0.37 V de sobrepotencial. a) Espectro de Nyquist, b) Espectro de Bode

En la Fig. 6 se muestra los espectros para colágeno en solución de PBS a concentración de 27.5 µg/ml, 37°C y 0 Voltios de sobrepotencial vs el electrodo de referencia, adsorbido sobre el compuesto polimérico. Los datos simulados mediante el software Zview 3.2 se muestran en esta figura (línea continua), los cuales fueron obtenidos a partir de un modelo planteado de circuitos equivalentes descrito más adelante que representa el proceso electrodo de adsorción de la proteína sobre el polímero.

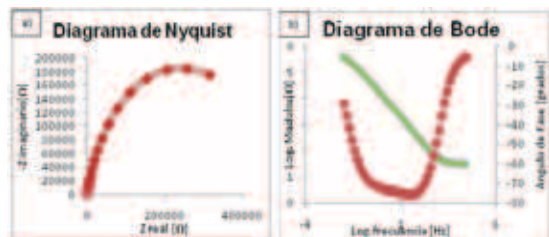


Fig. 6. Caracterización de la adsorción de colágeno 27.5 µg/ml, 37°C, 0 V de sobrepotencial y su simulación, puntos y línea continua respectivamente. a) Espectro de Nyquist, b) Espectro de Bode

Se muestra el comportamiento electroquímico en dos interfases compuestas de constantes de tiempo ($t = CxR$) traslapadas, una a altas frecuencias y otra a baja frecuencias, donde t es el tiempo de relajación del electrodo en la interfase, C es la capacitancia de la interfase respectiva y R es la resistencia a la transferencia de carga en la interfase. Con la presencia de estas dos constantes y con el uso de elementos de fase constante (CPE) en lugar de capacitores puros, se realizó un ajuste de los datos del espectro obtenido empleando el software Zview 3.2 [14], a partir de un modelo de circuitos equivalentes que relaciona estas dos constantes de tiempo con el proceso de adsorción sobre el compuesto polimérico. El modelo planteado se muestra en la Fig. 7.

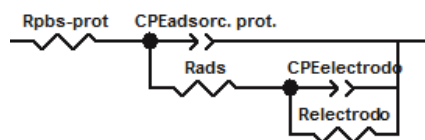


Fig. 7. Modelo de circuito equivalente que representa el proceso de adsorción de proteína de colágeno sobre el compuesto polimérico

En este modelo, $R_{pbs-prot}$ es la resistencia del electrolito (PBS + proteína), R_{ads} y $CPE_{adsorc. prot}$ es la resistencia de la transferencia de carga y la capacitancia relacionada con la adsorción de la proteína polímero-solución medida en la doble capa electroquímica a altas frecuencias. La resistencia y la

capacitancia medida a bajas frecuencias, representa la suma en serie de la de los procesos de electrodo de la interfase cristal-polímero y de los procesos de degradación del polímero. La resistencia a la transferencia de carga relacionada con la adsorción de proteína-polímero-sln, es inversamente proporcional a la masa adsorbida específica en la superficie del electrodo, $R_{adsorc-prot}^{-1} \propto \Gamma$ (molcm⁻²) y proporcional a la densidad de carga superficial.

Los valores de cambio en la energía libre de Gibbs, variando el sobrepotencial aplicado y la temperatura, se muestran en la Tabla II.

TABLA II.
 DATOS CALCULADOS DEL CAMBIO DE ENERGÍA LIBRE DE GIBBS RELACIONADOS CON LA ADSORCIÓN DE PROTEÍNA DE COLÁGENO

T[K]	-0,37 V	0,00 V	0,56 V
	-ΔG[J/mol]	-ΔG[J/mol]	-ΔG[J/mol]
310,15	37164,89	29943,58	47998,53
312,65	37809,21	38150,13	53801,23

En la Fig. 8 se muestra el cambio de la energía libre de Gibbs con la temperatura. Los valores obtenidos para el cambio de la energía libre de Gibbs indican que la adsorción de la proteína de colágeno en el compuesto polimérico de PGA-biocerámico-quitosano, es un proceso espontáneo para todas las condiciones evaluadas. La espontaneidad de los procesos concuerda con la disminución en el valor de la resistencia a la transferencia de carga al aumentar la concentración de colágeno.

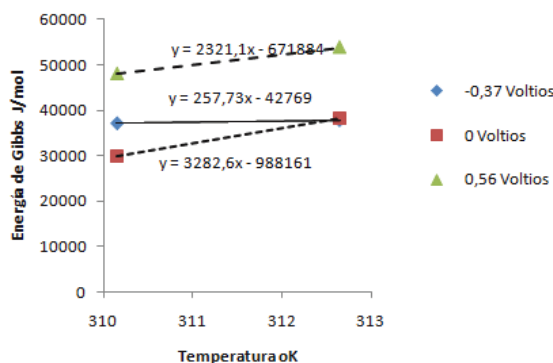


Fig. 8. Cambio de energía libre de Gibbs de adsorción con la temperatura y sobrepotencial de -0,37 V, 0 V y 0,56 V

Parámetros termodinámicos importantes como la entropía y la entalpía de adsorción, son obtenidos a partir de la pendiente y el punto de corte de la gráfica $\Delta G V_s T$. Los datos de entalpía y entropía correspondientes a los ensayos de adsorción de colágeno sobre el compuesto polimérico, se muestran en la Tabla III.

TABLA III.
PARÁMETROS TERMODINÁMICOS CALCULADOS A PARTIR DE LA VARIACIÓN DE LA ENERGÍA LIBRE DE GIBBS CON LA TEMPERATURA RELACIONADOS CON LA ADSORCIÓN DE PROTEÍNA DE COLÁGENO

Potencial (V)	ΔH [J/mol]	ΔS [J/mol*K]
-0,37	42769	257,7
0,00	98816	3282
0,56	67188	2321

La variación de la entalpía del sistema muestra que este es un proceso endotérmico resultado del exceso energético requerido para el rompimiento de interacciones intramoleculares implicados en la interacción proteína-polímero. Para un sobrepotencial de 0 Voltios y 0,56 Voltios, hay una disminución en la espontaneidad del proceso de adsorción. Un mejor comportamiento se presenta con un sobrepotencial de -0,37 Voltios.

El aumento de la entropía representa la variación de la entropía de adsorción a partir del desarrollo de moléculas de proteína, a la vez que la adsorción es impulsada por el aumento de la entropía conformacional de la proteína.

En la Fig. 9 se muestran micrografías de los recubrimientos antes y después de la adsorción, en donde la morfología correspondiente a la adsorción de proteína de colágeno, presenta forma de fibrillas en la superficie de los recubrimientos (fig. 9 b) y d)).

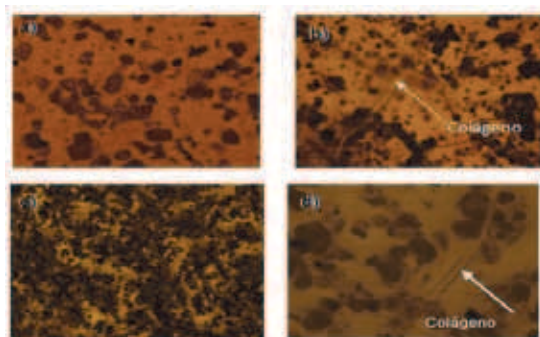


Fig. 9. Micrografías de la superficie de los compuestos poliméricos a (20x). a) y c) Cristales con compuesto polimérico antes de adsorción. b) Cristal con compuesto polimérico con adsorción a 20 µg/ml, 37°C, 0V. d) Cristal con recubrimiento con adsorción a 12,5 µg/ml, 37°C, 0V

Se realizó un análisis estadístico que mostró cuatro efectos significativos en la variable de respuesta $1/R_{ct}$ (Fig. 10). El potencial aplicado presentó un efecto negativo sobre la variable de respuesta, con el cual, a mayor sobrepotencial aplicado, menor es la respuesta de $1/R_{ct}$. Igual efecto se presentó con la interacción entre la concentración de proteína y el potencial aplicado.

Se determinó un modelo para correlacionar la cantidad de proteína adsorbida ($1/R_{ct}$) con la concentración de proteína (C_{prot}), potencial aplicado (Pa), interacción concentración de proteína-potencial aplicado (ecuación 4). Así mismo, el error experimental obtenido fue de $9,72025E-10$.

$$\Gamma = 1.89E - 06 * C_{prot} - 5.28E - 05 * Pa - 1.34E - 05 * (C_{prot} * Pa) + 6.60E - 05 * Pa^2 \quad (4)$$

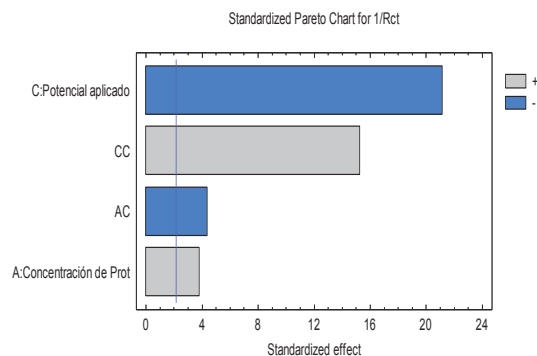


Fig. 10. Diagrama de Pareto para análisis de las interacciones entre las variables

IV. CONCLUSIONES

La resistencia a la transferencia de carga es directamente proporcional a la cantidad de proteína de colágeno adsorbida (concentración superficial). El proceso de adsorción depende en gran medida de la afinidad de la proteína a los sitios bioactivos en la superficie polimérica, aumentando esta afinidad con un sobrepotencial de electrodo en el sistema estudiado.

La adsorción de la proteína de colágeno en el compuesto polimérico de PGA-biocerámico-quitosano, es un proceso espontáneo para todas las condiciones evaluadas, presentándose una adsorción más espontánea con el sobrepotencial aplicado de -0,37 Voltios.

AGRADECIMIENTOS

Los autores extienden sus agradecimientos a COLCIENCIAS y a la Vicerrectoría de Investigaciones y extensión de la UIS por la financiación de esta investigación y a los Ingenieros Iván Sotomonte y Andrea Contreras por su valiosa colaboración.

REFERENCIAS

- [1] THANKI, Paragkumar N. DELLACHENE, Edith. SIX JEAN, Luc. Surface characteristics of PLA and PLGA films. Applied Surface Science 25. 2006, p. 2758-2764.
- [2] HENCH, L and JONES, J. Biomaterials, Artificial Organs and Tissue. Chapter 19: Scaffolds for tissue engineering. 2005.

- [3] PARADA QUINAYA, Diana Carolina. GONZÁLEZ BALAGUERA, Aurora del Pilar. LAVERDE, Dionisio. Obtención, electrodeposición y caracterización de un polímero bioabsorbible a partir de ácido L - láctico para aplicaciones biomédicas. Tesis Pregrado. Escuela de Ingeniería Química. Universidad Industrial de Santander. 2007.
- [4] TAKAHASHI, K. TANIGUCHI, I. MIYAMOTO, M. KIMURA, Y. Melt/solid polycondensation of glycolic acid to obtain high-molecular-weight poly(glycolic acid). *Polymer*, vol 41 (2000), p. 8725–8728.
- [5] BANDYOPADHYAY-GHOSH, S. Bone as a Collagen-hydroxyapatite composite and its Repair. *Trends Biomater. Artif. Organs*, vol. 22, n. 2, (2008), p. 116-124.
- [6] GARCÍA, C. PAUCAR, C. GAVIRIA, J. Estudio de algunos parámetros que determinan la síntesis de hidroxiapatita por la ruta de precipitación. *Revista Dyna*. Universidad Nacional de Colombia, vol. 73, n. 148, (2006), p. 9-15.
- [7] MAIER, Ronald. *Clínicas Quirúrgicas de Norteamérica*, vol. 87, n. 01, (2007).
- [8] SHAHIDI, J. JEON, Y. Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food. Sci.Technol*, vol.10 (1999), p. 37-51.
- [9] JENNIFER E.I. WRIGHT, SHARON G. ROSCOE. Electrochemical impedance spectroscopy and quartz crystal nanobalance (EQCN) studies of insulin adsorption on Pt. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 564 (2004), p. 185–197.
- [10] SMIECHOWSKI, M. F. Electrochemical detection and characterization of proteins. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22 (2006), p. 670-677.
- [11] SMIECHOWSKI, M. F. Electrochemical detection and characterization of proteins. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22 (2006), p. 670-677.
- [12] PERALES, M.E et al. Síntesis de polímeros: Ácido Poliláctico. X Congreso Nacional de Microscopía-Morelia. 2010.
- [13] PANDEY, Anurag. PANDEY, Girish. ASWATH, Pranesh. Synthesis of polylactic acid–polyglycolic acid blends using microwave radiation. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, vol. 1 (2008), p. 227–233.
- [14] Scribner Associates Incorporated. Citado en <http://www.scribner.com>.



Custodio Vásquez Q. M.Sc Ingeniería Metalúrgica Universidad Industrial de Santander, profesor titular laureado. Grupo de Investigaciones en Corrosión – GIC, UIS.



Darío Yesid Peña. Especialista en Docencia Universitaria. Ingeniero Metalúrgico, M.Sc Ingeniería Metalúrgica, Universidad Industrial de Santander, Ph.D en Corrosión UMIST, profesor asociado Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de Materiales, Grupo de Investigaciones en Corrosión – GIC, UIS.

BIOGRAFÍA



Marcela Gelves, Ing. Química, Estudiante de Maestría en Ingeniería de Materiales, Grupo de Investigaciones en Corrosión - GIC, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia.



Nerly Deyanira Montañez S. Ingeniera Química, Magister en Ingeniería de Materiales, Grupo de Investigaciones en Corrosión – GIC, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia.



Hugo A. Estupiñán D. M.Sc Ingeniería Metalúrgica, Doctor en Ingeniería Química, Grupo de Investigaciones en Corrosión – GIC, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia.