

Estudio del Efecto de la Deposición Electroforética de Moléculas Funcionales sobre las
Propiedades Antimicrobianas de Superficies de Titanio.

Lady Marcela Quintero Peña y Dayanna Andrea Rojas Suárez

Trabajo de Grado para Optar al Título de Química

Director

Sergio Ismael Blanco Vásquez,

Doctor en Ingeniería

Co-directores

John Jairo Castillo León, Doctor en Química

Jorge Andrés Gutiérrez Cifuentes, Doctor en Ciencias Químicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2020

Dedicatoria

Dedico este libro a mi familia, por ser el motor de mi vida y mi fortaleza.

Lady M. Quintero.

Dedicatoria

A mi madre, padre, familia, Edson y en especial a mi nona Otilia

Por el apoyo incondicional.

Dayanna Rojas

Agradecimientos

A Dios, le doy gracias por su fortaleza, por todas las puertas que abrió, pero aún más, gracias por todas las que cerró para protegerme. Por ponerte a todas aquellas personas en cada momento y lugar para que me apoyaran. Por bendecirme con salud para luchar todos los días por mis sueños.

A mis padres Carmen Peña y Juan Quintero, por el amor, apoyo, y consejos brindados todos estos años, por ser mi motivación constante para el cumplimiento de mis metas. Gracias por el sacrificio que hacen día a día por nuestra familia. Gracias por enseñarme que a pesar de caer una y otra vez lo importante es levantarse y volver a comenzar, aprendiendo de cada uno de los errores. Gracias infinitas, los amo.

A mis hermanos, que desde que era una niña me han enseñado a soñar en grande, a que cada día debemos trazarnos metas nuevas y que lo más importante de la vida es la familia. A mi hermano Juan Gabriel por enseñarme aquella pasión por conocer el mundo. Gracias por su apoyo incondicional tanto económico como emocional. A mi sobrina Gabriela Quintero por ser la alegría de mi vida. También a mi familia (tíos, sobrinos, primos, cuñados) por su compañía, apoyo y amor durante toda mi vida.

A mis amigos de infancia por darme apoyo en momentos difíciles y tantas alegrías, por permitirme aprender más de la vida a su lado.

Al grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) por permitirme elaborar mi proyecto de grado en su laboratorio y aprender tanto de ellos. A cada uno de los profesores, estudiantes de posgrado y pregrado pertenecientes al grupo por su apoyo y amistad durante todo este proceso.

Al semillero de investigación recubrimientos multifuncionales por permitirme asistir y hacer parte de uds.

A mi director Sergio Blanco y co-director Jorge Gutiérrez, por guiarme para ser cada día mejor persona y profesional, gracias por ejercer tan bella profesión y sembrar siempre conocimiento, por compartir conmigo vivencias únicas y enseñanzas magníficas, quiero expresar mis más sinceros sentimientos de gratitud y mis infinitas gracias. A mi co-director John Castillo por los aportes brindados en la realización de mi proyecto de grado.

A Jennifer Ruiz por la orientación brindada en el desarrollo de mi proyecto. A Marlon Caceres, Estefanía Correa, Daniel Navas y Héctor Rueda por su amistad, apoyo y enseñanzas en este último tiempo en el laboratorio.

A mi compañera de tesis Dayanna Rojas por acompañarme durante todos estos años. A mis queridas Paula Guarín, Silvia Caballero, Paula Uribe y Alejandra Guerrero por tantos momentos compartidos, llenos de alegría y motivación.

A mis amigos con los que comencé esta aventura y que aún siguen a mi lado, por acompañarme en tantas alegrías y momentos únicos brindándome su valiosa amistad. Por enseñarme que a pesar de que cada uno tome rumbos diferentes, los verdaderos amigos perduran en el tiempo.

Lady Quintero

Agradecimientos

Agradezco a Dios por permitirme realizar este gran logro.

A mi madre Luz Marina y mi padre Bernardo que tanto los quiero, por el cariño, al ser incondicionales, el gran esfuerzo que hicieron para que pudiera cumplir esta meta, sobre todo el apoyo y la guía que he tenido de ellos a lo largo de este camino.

A mi hermano Yosney y mi familia (nonos, primos, tíos y demás), por la constante compañía, que nos mantiene unidos y el apoyo incondicional.

A Edson por el amor en estos 8 años, la compañía, las experiencias, el apoyo y al que le debo parte de este triunfo por ser mi complemento en esta travesía.

Al grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) y Grupo de Recubrimientos por permitir la realización del proyecto en su laboratorio y a los integrantes que con sus conocimientos y experiencias han aportado a este proyecto, sobre todo a Marlon Cáceres, Jenifer Ruiz, Estefanía Correa y Héctor.

A mi compañera Lady Quintero que con su paciencia y perseverancia realizamos este gran logro, también a María Alejandra, Silvia, Paula Uribe y Paula Guarín por los buenos momentos y experiencias compartidas.

Al profesor Sergio Blanco y Jorge Gutiérrez por la paciencia, la experiencia y los conocimientos compartidos en todo el procedimiento del proyecto y la ayuda dada para ser una buena profesional, al profesor John Castillo por la colaboración y ayuda dada para la realización del proyecto. A todos mis compañeros de carrera por los buenos momentos, las experiencias y ayudas adquiridas a lo largo de la carrera.

Dayanna Rojas

Tabla de Contenido

1.	Objetivos.....	18
1.1.	Objetivo general.....	18
1.2.	Objetivos específicos	18
2.	Marco teórico.....	18
2.1.	Nanotecnología	18
2.2.	Implantes Biomédicos.....	19
2.3.	Implantes de Titanio (Ti)	20
2.4.	Quitosano (Qs).....	21
2.5.	Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA)	22
2.6.	Polietilenimina (PEI)	24
2.7.	<i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.8.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	27
2.9.	Deposición electroforética (EPD).....	28
2.10.	Evaluación Electroquímica	30
2.11.	Técnicas de caracterización.....	32
3.	Estado del arte	33
4.	Metodología.....	37
4.1.	Síntesis de recubrimientos	38
4.1.1.	<i>Síntesis de nanopartículas de Quitosano (NpsQs)</i>	38
4.1.2.	<i>Síntesis de la solución de PLGA con las nanopartículas de Qs.</i>	39

4.1.3. <i>Síntesis de la solución PEI con las nanopartículas de Qs.</i>	39
4.2. Deposition electroforética	39
4.3. Análisis fisicoquímicos.....	41
4.4. Pruebas electroquímicas	42
4.5. Pruebas antimicrobianas	43
4.5.1. <i>Evaluación preliminar del efecto antimicrobiano de los recubrimientos.</i>	43
5. Resultados y Discusión.....	45
5.1. Síntesis de Recubrimientos	45
5.1.1. <i>Síntesis de Nanopartículas de Quitosano (Qs)</i>	45
5.1.2. <i>Síntesis de Nanopartículas de Quitosano- Poli (ácido láctico-co-glicólico) (NPsQs-PLGA)</i> 47	
5.1.3. <i>Síntesis de Nanopartículas de Quitosano-PEI (NPsQs-PEI)</i>	50
5.2. Deposition Electroforética de Recubrimientos	52
5.4. Pruebas antimicrobianas	64
6. Conclusiones.....	68
7. Recomendaciones	69
8. Divulgación de resultados	69
Referencias	70
Apéndices	79

Lista de Figuras

Figura 1 Reacción de Desacetilación de la quitina.	21
Figura 2 Estructura del PLGA.	23
Figura 3 Estructura de PEI.	24
Figura 4 Microscopía SEM de biofilm <i>S. aureus</i>	25
Figura 5 Microscopía SEM de biofilm <i>S. epidermidis</i>	26
Figura 6 Partes de la deposición electroforética.	29
Figura 7 Montaje celda electroquímica.	31
Figura 8 Metodología para el desarrollo del proyecto.	37
Figura 9 Diagrama de flujo de la síntesis de recubrimientos.	38
Figura 10 Lámina de Titanio	40
Figura 11 Montaje experimental para la deposición electroforética.	40
Figura 12 Montaje para pruebas electroquímicas.	42
Figura 13 Metodología de Kirby-Bauer.	44
Figura 14 Diagrama de la evaluación de la adhesión microbiana.	44
Figura 15 Espectroscopia IR de Qs comercial y NPsQs liofilizadas.	46
Figura 16 Espectroscopia FT-IR de PLGA comercial, Qs comercial y NPsQs-PLGA liofilizadas.	49
Figura 17 Espectroscopia FT-IR NPsQs y NPsQs-PLGA.	49
Figura 18 Espectroscopia IR de PEI comercial, Qs comercial y NPsQs-PEI.	51
Figura 19 Espectroscopia FT-IR de PLGA comercial, Qs comercial y NPsQs-PLGA.	52
Figura 20 Láminas de Titanio con deposición de NPsQs.	53
Figura 21 Láminas de Titanio depositadas a un potencial de 15v en 15 minutos.	55
Figura 22 Gráfica de Corriente vs tiempo de NPsQs, NPsQs-PEI y NPsQs-PLGA	56

Figura 23 Espectros FTIR de la solución de NPsQs y lámina de Ti con recubrimiento de NPsQs.	57
Figura 24 Micrografía SEM de láminas de Ti recubiertas con NPsQs.	57
Figura 25 Espectros FTIR de la solución de NPsQs-PLGA y lámina de Ti con recubrimiento de NPsQs-PLGA.	58
Figura 26 Micrografía SEM de láminas de Ti recubiertas con NPsQs-PLGA.	58
Figura 27 Espectros FTIR de la solución de NPsQs-PEI y lámina de Ti con recubrimiento de NPsQs-PEI.	60
Figura 28 Micrografía SEM de láminas de Ti recubiertas con NPsQs-PEI.	60
Figura 29 Espectroscopia de impedancia electroquímica. (Nyquist).	61
Figura 30 Gráficas de a) Bode y b) Phase de los recubrimientos.	62
Figura 31 Curva de polarización del Titanio y el recubrimiento obtenido y evaluados en solución de suero fisiológico.	63
Figura 32 Evaluación de actividad antimicrobiana por la metodología de Kirby-Bauer de las muestras frente a <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i>	65
Figura 33 Efecto del recubrimiento de NPsQs-PEI sobre los microorganismos evaluados A) <i>S. epidermidis</i> y B) <i>S. aureus</i>	66

Lista de Tablas

Tabla 1 Datos obtenidos por el DLS para las NPs de Qs.	45
Tabla 2 Datos obtenidos por el DLS para las NPsQs-PLGA.	47
Tabla 3 Datos obtenidos por el DLS para las NPsQs-PEI.	50
Tabla 4 Parámetros electroquímicos y resistencia de los recubrimientos evaluados en solución de suero fisiológico.	63
Tabla 5 Resultados obtenidos de la prueba de adhesión para cada una de las muestras.....	67

Lista de Apéndice

Apéndice A. Espectro FTIR. a) Qs comercial y NPsQs sintetizadas.....	79
Apéndice B. Espectro FTIR. a) PEI comercial, Qs comercial y NPsQs-PEI sintetizadas.....	80
Apéndice C. Espectro FTIR. a) PLGA comercial, Qs comercial y NPsQs-PLGA sintetizadas.	81
Apéndice D. Espectros FTIR. a) Lámina de Ti y lámina de Ti con recubrimientos de NPsQs. b) Solución de NPsQs y lámina de Ti con recubrimientos de NPsQs.	82
Apéndice E. Espectros IR. a) Lámina de Ti y lámina de Ti con recubrimientos de NPsQs-PEI. b) Solución de NPsQs-PEI y lámina de Ti con recubrimientos de NPsQs-PEI.....	83
Apéndice F. Espectros IR. a) Lámina de Ti y lámina de Ti con recubrimientos de NPsQs- PLGA. b) Solución de NPsQs-PLGA y lámina de Ti con recubrimientos de NPsQs-PLGA. 84	
Apéndice G. Imágenes SEM de la lámina de titanio con recubrimiento de NPsQs. a) 100x. b) 500x c) 5000x.	85
Apéndice H. Imágenes SEM de la lámina de titanio con recubrimiento de NPsQs-PEI. a) 100x. b) 500x c) 5000x.	87
Apéndice I. Imágenes SEM de la lámina de titanio con recubrimiento de NPsQs-PLGA. a) 100x. b) 500x c) 5000x.	89
Apéndice J. Láminas con recubrimientos de NPsQs a diferentes voltajes y tiempo.	91
Apéndice K. Graficas de LSV de los recubrimientos para la determinación de parámetros tales como i_{corr} , E_{corr} y $\beta\alpha$	92

Resumen

Título: Estudio del Efecto de la Deposición Electroforética de Moléculas Funcionales sobre las Propiedades Antimicrobianas de Superficies de Titanio. *

Autor: Lady Marcela Quintero Peña,

Dayanna Andrea Rojas Suárez. **

Palabras Claves: Deposición Electroforética, Quitosano (Qs), Polietilenimina (PEI), Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), Titanio.

Descripción:

Para reemplazar y restaurar tejidos se implantan biomateriales que están expuestos a fluidos corporales, lo cual requiere que sean biocompatibles. Para obtener recubrimientos biocompatibles con el cuerpo humano se forman nanoestructuras compuestas de Quitosano, las cuales son depositadas en la superficie de Titanio. El Quitosano es un polisacárido que proviene de la quitina obtenido por medio de una reacción de desacetilación, el cual se ha descrito como un polímero catiónico lineal, biodegradable, con alto peso molecular y de extracción ambientalmente amigable. Se ha demostrado en estudios previos la funcionalidad de las moléculas poliméricas como Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y Polietilenimina (PEI) en la regeneración de tejidos debido a sus propiedades de baja toxicidad, buena adherencia celular y características antimicrobianas.

El objetivo de este estudio fue sintetizar nanoestructuras de Quitosano funcionalizadas con polímeros como Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y Polietilenimina (PEI) para su posterior deposición electroforética y estudio antimicrobiano en superficies de titanio. Las nanoestructuras de Quitosano fueron sintetizadas mediante la técnica de gélicación iónica, añadiendo PLGA y PEI a la solución de nanoestructuras de Quitosano. Los sistemas se caracterizaron por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), dispersión de luz dinámica (DLS) y microscopia electrónica de barrido (SEM). Se obtuvo tamaños promedios de 150 nm para las nanopartículas, observando que estas se adherían a las láminas de titanio a un potencial de 15 V en 15 minutos. Se concluyó en las pruebas electroquímicas que el PLGA y PEI aportan estabilidad al recubrimiento de Quitosano añadiendo bioactividad. Se observó en las pruebas antimicrobianas que el recubrimiento de Quitosano con PEI tiene una mayor inhibición en comparación con los otros recubrimientos.

* Tesis de Grado.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: PhD Sergio Ismael Blanco Vásquez. Codirector: PhD John Jairo Castillo León. Codirector: PhD Jorge Andrés Gutiérrez.

Abstract

Title: Study of the Effect of Electrophoretic Deposition of Functional Molecules on the Antimicrobial Properties of Titanium Surfaces. *

Author: Lady Marcela Quintero Peña,

Dayanna Andrea Rojas Suarez. **

Key Words: Electrophoretic Deposition, Chitosan, Polyethylenelene (PEI), Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), Titanium.

Description:

To replace and restore tissues are implanted biomaterials that are exposed to body fluids, which requires they must be biocompatible. To obtain biocompatible covering with the human body, nanostructures composed of Chitosan are formed which are deposited on the surface of Titanium. Chitosan is a polysaccharide that comes from chitin obtained through a deacetylation reaction. It has been described as a linear cationic polymer, biodegradable, with high molecular weight and environmentally friendly extracted. In previous studies has been demonstrated the functionality of polymeric molecules such as Poly (lactic-coglycolic acid) (PLGA) and Polyethyleneimine (PEI) in tissue regeneration, due to their low toxicity properties, good cell adherence and antimicrobial characteristics.

The objective of this study was to synthesize Chitosan nanostructures functionalized with polymers such as Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and Polyethyleneimine (PEI) for their subsequent electrophoretic deposition and antimicrobial study on titanium surfaces. Chitosan nanostructures were synthesized using the ionic gelification technique, adding PLGA and PEI to the Chitosan nanostructures solution. Systems were characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), Dynamic light scattering (DLS), and Scanning electron microscope (SEM). Average sizes of 150 nm were obtained for the nanoparticles, observing that they had adhered to the titanium plates at a potential of 15 V in 15 minutes. It was concluded from electrochemical tests that PLGA and PEI provide stability to the chitosan covering, adding bioactivity. It was observed in the antimicrobial tests that the Chitosan with PEI covering has higher inhibition compared to the others coverings.

*Thesis work.

** Science Faculty. School of Chemistry. Director: PhD. Sergio Ismael Blanco Vásquez. Co-director: PhD John Jairo Castillo León. Co-director: PhD. Jorge Andrés Gutiérrez.

Introducción

En la actualidad, un gran número de personas posee alguna parte de su cuerpo reparada o reemplazada artificialmente por piezas denominadas “implantes”. Tradicionalmente los implantes metálicos se construyeron utilizando aceros inoxidables y aleaciones de cromo. Sin embargo, con el paso del tiempo, se implementó el titanio y sus aleaciones, debido a la posible toxicidad que generan los elementos aleantes del acero liberados en el proceso de corrosión, causado principalmente por los fluidos corporales.(Gil & Planell, 1993)

Debido a que cada ser humano posee un sistema inmune específico, los materiales unificados usados comúnmente actúan de manera diferente en cada persona, siendo en algunos casos rechazados. La causa más común de rechazo es la inadecuada cicatrización, debido a que en lugar de acercarse las células del hueso e integrarse con el titanio, se forma una barrera celular que impide esta unión, causando el crecimiento de un tejido blando alrededor del implante impidiendo así un buen ajuste.(Chen & Thouas, 2015)

Otro caso que podría suceder sería la tonalidad negra del tejido huésped que rodea un implante, un fenómeno conocido como metalosis, y es causada por la liberación de partículas del material del implante, lo que finalmente conduce a un “aflojamiento” aséptico.(Bauer, Schmuki, von der Mark, & Park, 2013)

Una de las consecuencias más comunes después de una cirugía que involucra implantes, es la infección que suele producirse en el quirófano o en el postoperatorio (nosocomiales), de las cuales el 60% de las infecciones son causadas por *Estafilococos*(Ariza, Euba, & Murillo, 2008), que puede llevar a procedimientos médicos prolongados, falla

general del implante y posteriormente a requerir una operación auxiliar para su retiro, aumentando el costo financiero y la tasa de mortalidad.(Madhan Kumar et al., 2019)

Algunos casos reportados en implantes dentales presentan inconvenientes relacionados con la acumulación de caries o sarro, causando infección bacteriana en la encía y la destrucción de hueso, fenómeno conocido como peri-implantitis.(Ariza et al., 2008)

Debido a lo casos comentados anteriormente y muchos otros que se presentan, cada año se realizan investigaciones de nuevos materiales y/o recubrimientos funcionales óptimos buscando brindar soluciones eficientes y facilitar su uso en pacientes.

Esta propuesta se fundamenta y justifica en la necesidad de superficies aplicables a implantes que proporcionen el mínimo estrés fisiológico en el sistema óseo reduciendo de manera significativa la problemática del contagio de infecciones en quirófanos y centros asistenciales, evitando así un segundo o tercer procedimiento quirúrgico para su extracción, lo cual acarrea costos en el sistema de la salud y posibles complicaciones en los pacientes.

La construcción de implantes metálicos requiere el uso de aleaciones con elementos inertes fundamentado en la hostilidad bioquímica que se genera en el interior del cuerpo humano; siendo los implantes de titanio (Ti) los más comunes en la actualidad por su biocompatibilidad y baja densidad comparada con otros metales.(Le Guéhennec, Soueidan, Layrolle, & Amouriq, 2007)

Sin embargo, su bioactividad se puede mejorar añadiendo compuestos con características antimicrobianas como el Quitosano (Qs), que disminuya la susceptibilidad a infecciones. El Quitosano es un polímero extraído por medio de una reacción de la N-desacetilación de la quitina, la cual se encuentra en el exoesqueleto de crustáceos. Este polímero es ampliamente interesante en medicina, ya que posee características antimicrobianas y baja toxicidad. (Sivakami et al., 2013)

Asimismo, es importante la funcionalidad que le pueden dar moléculas poliméricas como Poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), y Polietilenimina (PEI), enmarcados en la biocompatibilidad que pueden generar a los sistemas.(Zheng et al., 2009)

Teniendo en cuenta lo anterior, este trabajo se enfocó en determinar la posibilidad de incrementar la actividad antimicrobiana del titanio mediante la deposición electroforética de nanopartículas quitosano y otros sistemas de nanopartículas, además de estudiar como varia la síntesis de las nanopartículas agregando PLGA y PEI a las nanopartículas de quitosano.

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Estudiar el efecto antimicrobiano de moléculas poliméricas depositadas electroforéticamente sobre superficies de titanio.

1.2. Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de Quitosano (**NPsQs**) funcionalizadas con Poli (ácido láctico-co-glicólico) (**PLGA**), y Polietilenimina (**PEI**).
- Analizar la variación de los parámetros experimentales de los recubrimientos obtenidos mediante deposición electroforética.
- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de los nanocompuestos y recubrimientos.
- Determinar la mejor formulación en términos de propiedades antimicrobianas.

2. Marco teórico

2.1. Nanotecnología

La nanotecnología es el estudio y la manipulación de la materia a escala nanométrica, abarcando numerosos y diversos campos, que va desde la biomédica, biotecnología, farmacéutica, agricultura, materiales avanzados, catálisis, electrónica, entre otras.(Taylor et al., 2013) La síntesis, propiedades y aplicaciones de los materiales y dispositivos por debajo de los 100 nanómetro (nm) en alguna de sus dimensiones (nanomateriales), han contribuido considerablemente en la biomedicina, como agentes de imagen, transporte y administración de fármacos, herramientas de diagnóstico, entre otros.(Liu, Swierczewska, Lee, & Chen, 2010) Desde hace pocas décadas, el inmenso potencial de las nanopartículas, especialmente

el campo de la nanomedicina, ha conducido a un amplio interés y atención dado sus aplicaciones.

2.2. Implantes Biomédicos

Un implante es un material de uso médico creado para reemplazar, ayudar o mejorar alguna estructura biológica faltante del cuerpo humano. Este debe cumplir con características que ayuden de manera permanente a sustituir parcial o totalmente estructuras destruidas por alguna enfermedad o lesión.(Hjort, Mathisen, Alves, Clermont, & Boutrand, 2012)

Los implantes pueden actuar interfacialmente con sistemas biológicos, por lo que pueden estar hechos de biomateriales, los cuales están diseñados para ser implantados o incorporados dentro de un sistema vivo. Los biomateriales se implantan con el objeto de reemplazar y/o restaurar tejidos vivos y sus funciones, lo que implica que están expuestos de modo temporal o permanente a fluidos corporales. Sin embargo, algunos biomateriales pueden estar localizados fuera del cuerpo, incluyéndose en esta categoría a la mayor parte de los materiales dentales. Los biomateriales deben cumplir con las condiciones de biocompatibilidad y asegurar una determinada vida media. Además, tienen que aportar las características específicas que requiera la aplicación a la que vayan a ser destinados.

En este sentido, el uso de los biomateriales exige que lleven a cabo una función adecuada sin ocasionar daño alguno al organismo, por lo que deben cumplir ciertas características:(Smith, Mancini, & Nie, 2009)

- Tener propiedades físicas y mecánicas apropiadas para efectuar la función para la cual es elegido, esto hace alusión a un largo tiempo de vida.
- No debe generar toxicidad o ser un potencial carcinogénico.

- No debe contener compuestos solubles en el sistema que pueda afectar algún tejido u órgano y/o tenga efectos secundarios.
- Debe ser esterilizable.

Aunque la gran mayoría de implantes cumplen con algunas de estas características, no satisfacen por completo estas condiciones. En este sentido, se han llevado a cabo estudios en busca de implantes biomédicos que puedan satisfacer las características mencionadas anteriormente, utilizando diferente tipos de materiales.(Sastre, de Aza, & San Roman, 2003)

2.3. Implantes de Titanio (Ti)

De los biomateriales metálicos, podría considerarse que el número de elementos metálicos que se utilizan en la fabricación de implantes es muy limitado. El primer requisito para su utilización sería la tolerancia en el organismo, por lo que es muy importante la cantidad que se ingrese a los tejidos vivos.(Rius, 1999) Otro requisito imprescindible es tener una buena resistencia a la corrosión.

La corrosión es un problema general de los metales, aún más si están inmersos en un medio hostil, como es el organismo humano, y a temperaturas mayores a 37 °C.(Li, Lee, Cui, & Choi, 2008) Algunos materiales poseen la propiedad de formar una capa pasiva de óxido en su superficie, protegiendo así el interior del metal al evitar que avance la corrosión, como ocurre en el titanio. La alta biocompatibilidad del Ti como material de implantología y en especial de fabricación de prótesis de hueso y placas dentales, está relacionada con las propiedades del óxido superficial (TiO_2) , ya que tanto en contacto con el aire como sumergido en soluciones acuosas este material rápidamente forma una capa protectora con un espesor de óxido de 3 a 5 nm a temperatura ambiente.(Metikoš-Huković, Tkalčec, Kwokal, & Piljac, 2003) Puede formar numerosos óxidos de diferente estequiometría, de los cuales TiO_2 es el más común, haciéndolo resistente al ataque químico. Esto hace que sea uno de los

metales más resistentes a la corrosión en medios acuosos. Otras propiedades que lo hace ideal como implante es su capacidad de fusionarse con el hueso, ya que permite la colonización de su superficie por parte de las células osteoprogenitoras, proceso que se conoce como osteointegración. Otra característica destacable es que no posee magnetismo, lo cual permite que se puedan realizar análisis de resonancia magnética nuclear en pacientes sin problemas.(Marmol et al., 2012)

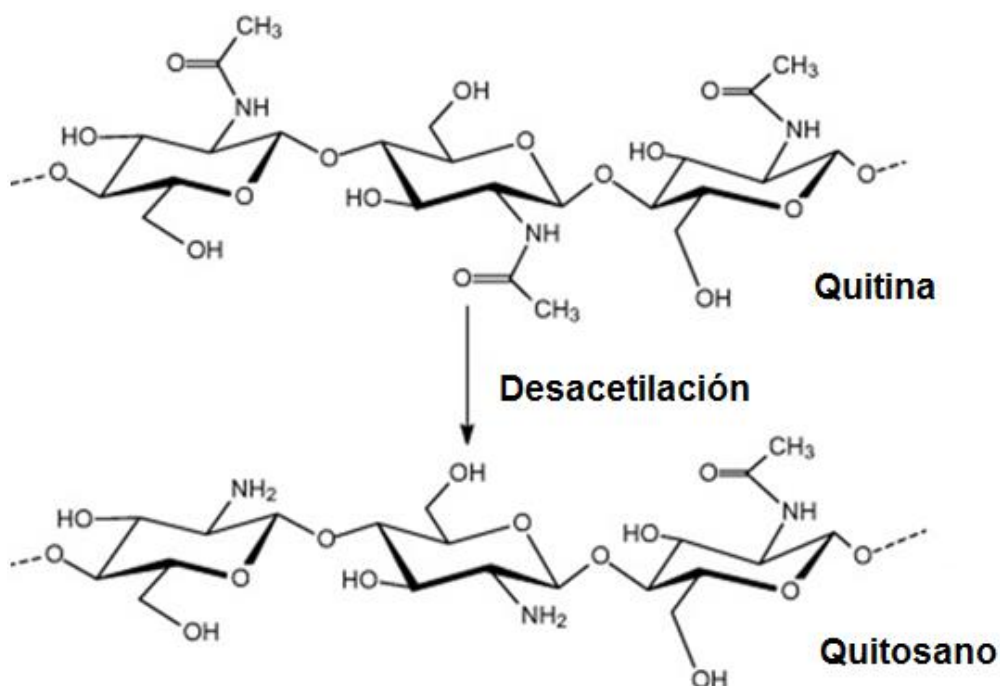
En este sentido, la biocompatibilidad del titanio ha hecho posible su aplicación en una gran cantidad de campos médicos.

2.4. Quitosano (Qs)

El Quitosano es un polisacárido que proviene de la quitina por medio de una reacción de desacetilación. En la reacción se sustituyen los grupos acetamido por grupos amino al tratar la quitina con álcalis fuertes, como se observa en la (*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*).

Figura 1

Reacción de Desacetilación de la quitina.



Nota: (Di Martino, Sittinger, & Risbud, 2005)

La quitina es un polisacárido compuesto por unidades de N-acetilglucosamina que se enlazan del mismo modo que la glucosa para dar lugar a la celulosa.(E.-J. Lee et al., 2009) Es muy común en la naturaleza, siendo el segundo polisacárido más abundante seguido de la celulosa, forma parte de las paredes celulares de los hongos, el exoesqueleto de los artrópodos y algunos órganos de otros muchos animales como las quetas de los anélidos.(Di Martino et al., 2005) Al ser un biopolímero lineal altamente insoluble en agua y de baja reactividad sus aplicaciones son limitadas. El Qs es la forma N-desacetilada de la quitina, el cual se ha descrito como un polímero catiónico lineal, biodegradable, de alto peso molecular y ambientalmente amigable al ser extraído de la naturaleza.

Este nuevo polisacárido es una sustancia no tóxica, biodegradable y biocompatible, con un gran poder emulsionante, absorbente, antifúngicas, antimicrobianas y antivirales.(Wang, Layrolle, Stigter, & de Groot, 2004) Es principalmente empleado en la ingeniería de tejidos al ser un polisacárido de origen natural conocido por inducir una mayor osteointegración de las prótesis.

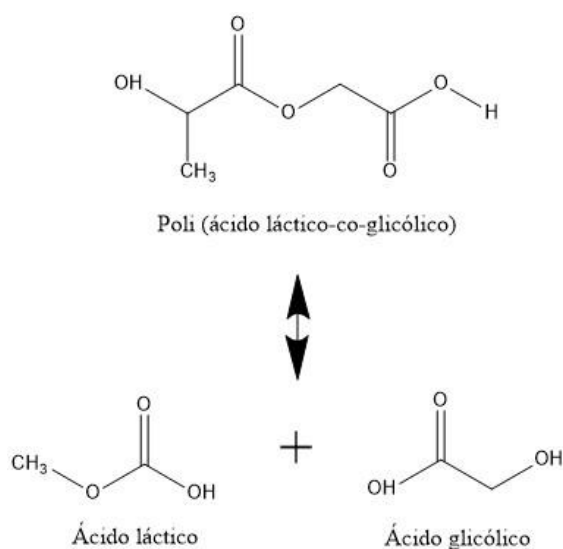
2.5. Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA)

El Poli (ácido láctico-co-glicólico) es un copolímero que se utiliza en una gran cantidad de dispositivos terapéuticos aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA), debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad . El PLGA se sintetiza por medio de la copolimerización de apertura de anillo de dos monómeros diferentes, los dímeros cíclicos (1,4-dioxano-2,5-diones) de ácido glicólico y ácido láctico (Figura 2). Los polímeros se pueden sintetizar como copolímeros aleatorios o de bloque, impartiendo propiedades poliméricas adicionales. Los catalizadores comunes usados en la preparación de este polímero incluyen 2-etilhexanoato de estaño (II), Alcóxidos de estaño

(II) o Isopropóxido de aluminio. Durante la polimerización las unidades monoméricas sucesivas (de ácido glicólico o láctico) se unen en PLGA mediante enlaces éster, produciendo así un poliéster lineal, alifático como producto. (Astete & Sabliov, 2012)

Figura 2

Estructura del PLGA.



Nota: (Astete & Sabliov, 2012)

PLGA se degrada por hidrólisis de sus enlaces éster en presencia de agua. Se ha demostrado que el tiempo requerido para la degradación de PLGA está relacionado con la proporción de monómeros utilizados en la producción: cuanto mayor es el contenido de unidades de glicólido menor es el tiempo requerido para la degradación en comparación con los materiales predominantemente lactidas. Esta flexibilidad en la degradación lo ha hecho conveniente para la fabricación de muchos dispositivos médicos, tales como, injertos, suturas, implantes, dispositivos protésicos, películas de sellado quirúrgico, micro y nanopartículas. (Legaz, Gilbert, & Paul, 2014)

Entre los diferentes polímeros desarrollados para formar nanopartículas poliméricas, el PLGA ha llamado la atención de la Agencia Europea de Medicina para usarlo en los

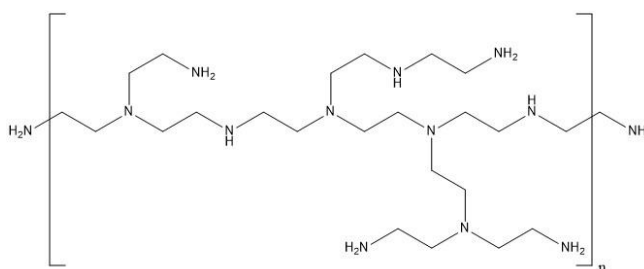
sistemas de administración de medicamentos para administración parenteral. Se han descrito formulaciones y métodos de producción adaptados a varios tipos de drogas, como moléculas pequeñas o macromoléculas hidrófilas o hidrófobas, protección del fármaco contra la degradación, posibilidad de liberación sostenida, posibilidad de modificar las propiedades de la superficie para proporcionar una mejor interacción con los materiales biológicos y posibilidad de dirigir nanopartículas a órganos o células específicos. (Bivas-benita, Romeijn, Junginger, & Borchard, 2004; Danhier et al., 2012; Panyam & Labhasetwar, 2003)

2.6. Polietilenimina (PEI)

El PEI es un polímero obtenido a partir de monómeros de etilenimina. Según su estructura molecular, este compuesto puede ser lineal o ramificado. En su estructura, el PEI contiene una gran cantidad de grupos amino, que pueden ser primarios, secundarios o terciarios, según si presentan dos, uno o ningún enlace con átomos de hidrógeno. El PEI lineal sólo presenta grupos aminos secundarios, a diferencia del PEI ramificado como se observar en la Figura 3 el cual contiene los tres tipos de grupos amino. (Pei, Demeneix, & Behr, n.d.)

Figura 3

Estructura de PEI.



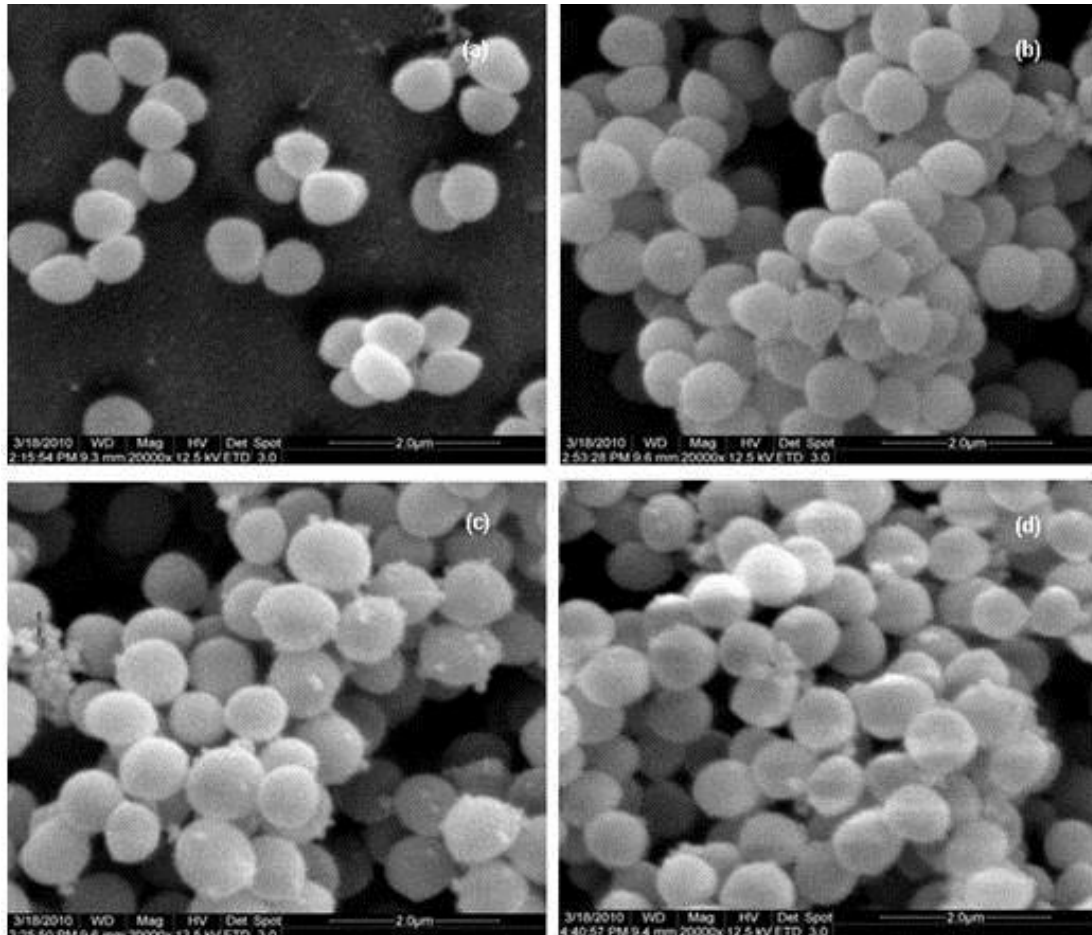
Nota: (Pei et al., n.d.)

El polímero catiónico PEI se caracteriza por su potencial de transporte de genes. Cada tercer átomo de PEI es un átomo de nitrógeno amino protonable, lo que hace que la red

polimérica sea una "esponja de protones" efectiva a prácticamente cualquier pH. (Schermant, Demeneix, & Behr, 1995)

Figura 4

Microscopía SEM de biofilm S. aureus.



Nota: Tomado por el laboratorio GIBIM

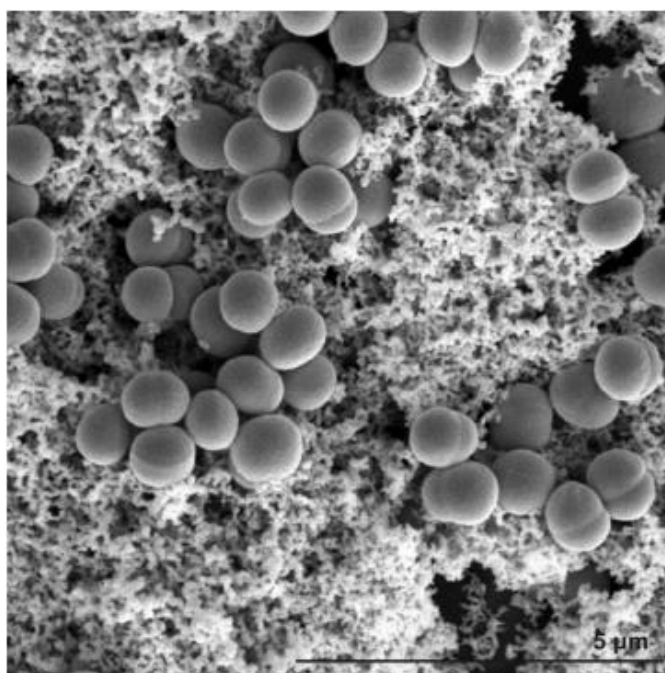
2.7. *Staphylococcus aureus*

Las *Staphylococcus* son un grupo de bacterias en la que hay más de 30 tipos. Un tipo llamado *Staphylococcus aureus* es una bacteria anaerobia facultativa, grampositiva, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulada que causa la mayoría de las infecciones por estafilococo. Las bacterias de estafilococos pueden causar muchos tipos

diferentes de problemas, incluyendo infecciones de la piel, infección del torrente sanguíneo, infección del revestimiento interno de las cámaras y válvulas del corazón, intoxicación por alimentos, neumonía, síndrome de shock tóxico. Algunas personas tienen estafilococos en la piel o en la nariz sin contraer una infección a menos que se corten o hieran, caso en el cual las bacterias podrían entrar al cuerpo y causarles una infección. Los *Staphylococcus* pueden propagarse de una persona a otra. También pueden encontrarse en objetos, como toallas, ropa, manijas de puertas, equipo deportivo y el control remoto. Las infecciones por estafilococos se tratan con antibióticos, los cuales puede variar en el tipo de presentación (crema, ungüento, tabletas o intravenosos) según la infección. Algunas infecciones por estafilococos, como el SARM (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina), son resistentes a muchos antibióticos. (A et al., 2015; Ileana, Lam, Ponce, & Ii, 2012; Togneri, Podestá, & Pérez, 2017)

Figura 5

Microscopia SEM de biofilm S. epidermidis.



Nota: Tomado por el laboratorio GIBIM

2.8. *Staphylococcus epidermidis*

Es una especie bacteriana del género *Staphylococcus*, consistente en cocos grampositivos arreglados en grupos. Es coagulasa-negativa, termonucleasa-negativo aunque a veces varia. Se presenta frecuentemente en la piel de humanos y de animales, así como en membranas mucosas. La *S. epidermidis* son las bacterias más comúnmente aisladas en los laboratorios microbiológicos. Entre ellas la *S. epidermidis*, que se caracteriza por ser novobiacina sensible, la cual fue considerada por mucho tiempo como un germen contaminante de cultivos. Sin embargo, ahora se le reconoce como un patógeno importante y es considerado el agente causal de diferentes infecciones, entre ellas: infecciones urinarias intrahospitalarias, osteomielitis, endocarditis de válvula nativa, bacteremia en pacientes inmunosuprimidos, endoftalmitis después de cirugía ocular, infecciones de dispositivos médicos o cuerpos extraños (catéteres endovenosos, fístulas para hemodiálisis, catéteres de diálisis peritoneal, marcapasos, articulaciones protésicas, injertos vasculares, válvulas cardíacas protésicas e implantes de mama).(Coralith, Juan, & Ramos, 2003)

Otra característica importante de las *S. epidermidis* es la susceptibilidad antimicrobiana que presenta. Han desarrollado resistencia a la meticilina de forma paralela que las *S. aureus*, pero mostrando tasas mucho más elevadas que esta última, la cual se ha ido incrementando de manera importante en los últimos 20 años. Mientras que a inicio de los 80s se indicaban tasas de resistencia a la meticilina del 20%, en 1999 estas llegaron al 80%. Esta es la razón por la cual en la actualidad se considera que la vancomicina es el tratamiento de elección para las infecciones causadas por este germen. El mayor número de infecciones del lecho operatorio fueron causadas por *S. epidermidis*. El 30% de los pacientes con estas infecciones no tenían una enfermedad simultanea ni presentaba factores predisponentes que

podían ser correlacionados estadísticamente con un riesgo incrementado de infección.(Coralith et al., 2003; J. Y. H. Lee et al., n.d.)

2.9. Deposición electroforética (EPD)

La técnica de deposición electroforética se basa en el fenómeno electrocinético de electroforesis, en el cual partículas cargadas en medio de suspensión líquido migran hacia el electrodo de carga contraria al de su superficie, al aplicar un campo eléctrico. El aumento del contenido de iones de carga contraria en el entorno del electrodo provoca la formación de una capa de partículas que forma el recubrimiento.(Castro, Ferrari, Moreno, & Durán, 2011) La EPD permite la fabricación de una amplia gama de estructuras desde materiales tradicionales hasta materiales avanzados, desde películas finas nanométricas de una fracción de 1 mm de espesor, andamios porosos hasta recubrimientos altamente compactos. Estas estructuras incluyen diferentes composiciones con formas y estructuras complejas que pueden formarse en un tiempo de experimentación relativamente corto mediante un aparato simple.(Amrollahi et al., 2015)

Una celda EPD contiene cuatro partes diferentes: electrodos de trabajo (sustrato y contraelectrodo), suspensión coloidal y fuente de alimentación (CA o CC) como se puede observar en la (Figura 6).

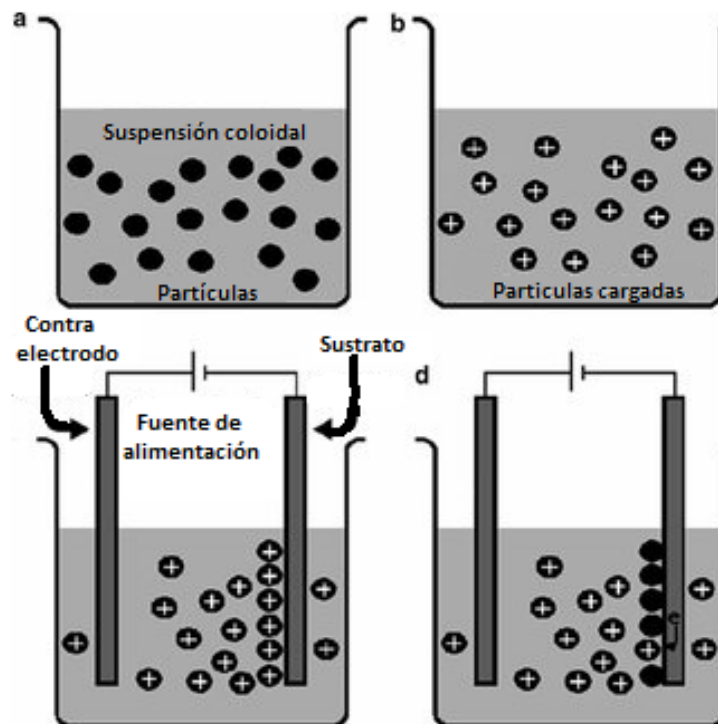
Las características para distinguir EPD de otras técnicas similares basadas en deposición son:

- Las partículas coloidales están bien dispersas y pueden moverse libremente.
- El equilibrio electroquímico del disolvente es responsable de la carga superficial de las partículas.
- Las partículas se mueven electroforéticamente en la mayor parte de la suspensión al electrodo con carga opuesta (sustrato)

- El sustrato está cubierto por una capa de partículas neutralizada y firmemente depositada.

Figura 6

Partes de la deposición electroforética.



Nota: Autor

La técnica de EPD consta de cuatro pasos: dispersión, carga electroquímica, electroforesis y deposición. (Amrollahi et al., 2015)

Generalmente, se prefiere usar líquidos orgánicos como medio de suspensión en una celda EPD aunque sean peligrosos, caros y poco amigables con el medio ambiente. Sin embargo, en EPD acuosa se necesitan voltajes mucho más bajo, se tiene más control sobre la temperatura y la deposición se lleva a cabo más rápido. La principal desventaja de la deposición en medio acuoso es la generación de burbujas de gas producto de la descomposición del agua, lo cual compromete drásticamente la calidad de la capa depositada.

Entre las ventajas de la técnica encontramos aplicación altamente versátil, aparatos y equipos simples, tiempo de procesamiento corto, rentabilidad, modificación fácil, empaque denso de partículas deseable en la pieza final, la alta calidad de las microestructuras producidas, la fácil producción de formas geométricamente complicadas y el control simple del grosor y la morfología. Esto ha hecho de EPD una técnica interesante tanto en la academia como en la industria.(Hanaor, Michelazzi, Veronesi, Leonelli, & Romagnoli, 2011)

2.10. Evaluación Electroquímica

Para determinar experimentalmente la calidad de los recubrimientos se requiere de instrumentación electroquímica, las cuales estudian las propiedades eléctricas de disoluciones o materiales. Estas mediciones se llevan a cabo dentro de una celda electroquímica (**Figura 7**) donde se realizan procesos mayoritariamente de reacciones redox.

La celda electroquímicas está conformada por el uso de un controlador de potencia (potencióstato / galvanostato) para pasar corriente a través de la muestra o electrodo de trabajo (W) y un electrodo auxiliar (AUX), mientras se controla el potencial del electrodo de trabajo con un electrodo de referencia, en este caso de Plata/Cloruro de Plata (Ag/AgCl)(Parker, 2006).

Los principales análisis electroquímicos que se realizan para evaluar la estabilidad de recubrimientos son:

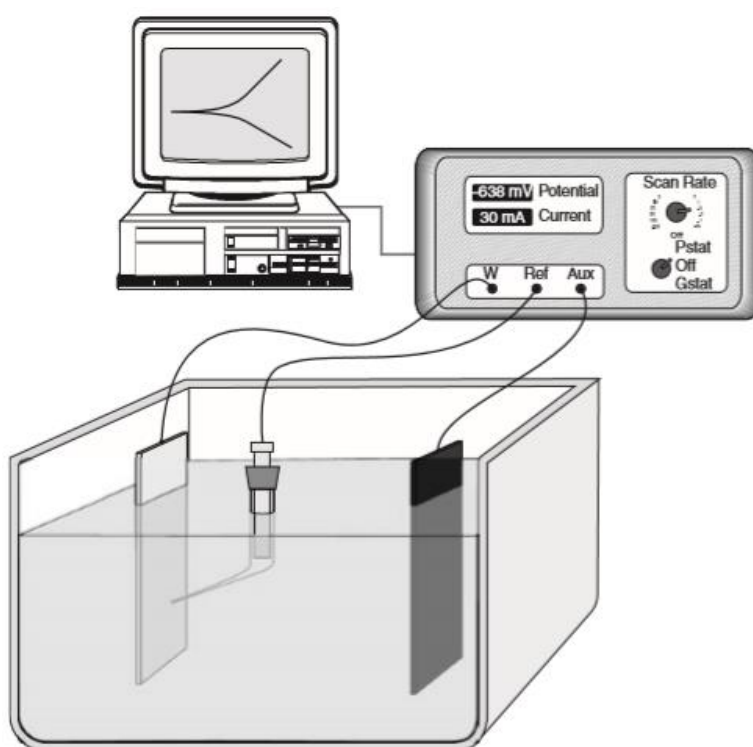
Potencial a circuito abierto (OCP): Con esta técnica se estudia la variación del potencial en función del tiempo sin aplicar ninguna carga o corriente externa. El valor del potencial registrado se relaciona con el equilibrio electroquímico de las posibles reacciones que ocurran en la superficie del electrodo y su correspondiente estabilidad termodinámica.

Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS): En esta técnica se genera una perturbación del potencial de electrodo a través de una onda sinusoidal con diferentes

frecuencias registrándose la corriente generada con lo que se calcula la impedancia. La variación de los valores de impedancia total, real e imaginaria y su variación en función de la frecuencia, se pueden relacionar con diferentes valores característicos como la resistencia del electrolito, la resistencia de transferencia de carga, la resistencia de poro de los recubrimientos y la capacitancia de la doble capa eléctrica. Este análisis es adecuado para el estudio de materiales de uso habitual como biomateriales, ya que permite evaluar la estabilidad electroquímica de los materiales y recubrimientos.

Figura 7

Montaje celda electroquímica.



Nota: (Parker, 2006)

Voltametría lineal o Curva de polarización: Permite la determinación del potencial y la corriente de corrosión por medio de la extrapolación de la pendiente Tafel, las cuales se

hallan de las curvas obtenidas. También se puede determinar la velocidad de corrosión realizando una aproximación con la ecuación Stern-Geary.

2.11. Técnicas de caracterización.

Para la caracterización de las nanoestructuras se utilizará espectroscopia IR, microscopia electrónica de barrido (SEM), dispersión dinámica de luz (DLS). A continuación, se muestra una breve descripción de cada técnica mencionada.

Espectroscopia IR: Es una técnica de análisis que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético. Se basa en las vibraciones moleculares que se producen en la región del infrarrojo del espectro, permite observar las frecuencias de los grupos funcionales en una molécula. Estas frecuencias dependen de la forma de la superficie, la geometría molecular, las masas atómicas y el acoplamiento vibracional. (*Diccionario de ciencias*, 2000)

Microscopia electrónica de barrido (SEM): en el microscopio electrónico de barrido se construyen imágenes y contrastes, aprovechando los electrones secundarios y retrodispersados de una muestra, cuando sobre ella incide un haz enfocado de electrones de alta energía. La muestra también emite rayos X, los cuales pueden ser analizados para obtener información sobre la composición del material. (Vázquez & Echeverría, 2000)

Dispersión dinámica de luz (DLS): tiene en cuenta la variación de la intensidad de dispersión respecto a la frecuencia, la viscosidad y el índice de refracción del medio. Se emplean estas variables para determinar el diámetro hidrodinámico en función al número de partículas en movimiento browniano. (Cuadros-Moreno, Pimentel, Martín-martínez, & Yañez Fernandez, 2014)

3. Estado del arte

Estudios arqueológicos muestran que los implantes se han empleado desde hace más de 3500 años, donde se utilizaban sustitutos a base de madera.(Rodas Rivera, 2014) Estos vienen cumpliendo su función de sustituir la parte del cuerpo faltante o dañada, así como hacer la vida del paciente más placentera. En la edad media cuando se caían uno o dos dientes, se podían reponer uniéndolos con hilos de oro para mantenerlos en su lugar. Durante este periodo, cirujanos del imperio romano, hacían trasplantes dentales para nobles, donde los donantes eran plebeyos o sirvientes.(Leticia María Lemus Cruz, Urrutia, & Castell, 2009)

Ya en el siglo XIX más exactamente en 1911, Strauss & Marrer patentaron la fórmula del acero inoxidable (FeCrNi 74, 18,8%), y en los siguientes años se realizaron avances en la calidad del materia y mecánica, añadiendo elementos como molibdeno y carbono. Aunque estos cumplían con eficiencia, causaban efectos secundarios como la toxicidad generada por la corrosión y/o la degradación del implante. La corrosión se genera debido a la liberación de iones metálicos hacia el medio corporal donde se encuentre, siendo un parámetro fundamental para definir si el implante es biocompatible o no.(Rodas Rivera, 2014)

Para que un material sea biocompatible debe contar con la capacidad para actuar de manera adecuada en el entorno biológico en el cual se encuentre en contacto directo. En 1940 Bothe y en 1951 Leventhal, ambos de EEUU, fueron los primeros en reportar las características biológicas del Ti, realizando sus pruebas en animales.(Lemus Cruz, Justo Díaz, Almagro Urrutia, Sáez Carriera, & Triana, 2009) Encontraron que no producía efectos inflamatorios causados por la corrosión y que la rápida acción de este con el oxígeno produce una fina capa superficial de óxido impermeable que forma una capa protectora. Aunque el aluminio también tiene esta característica, el Ti es más eficiente y pose capacidades de baja densidad y mayor resistencia, siendo biocompatible al no reaccionar de manera negativa con tejidos y tener la capacidad de buena adherencia al hueso en comparación a los otros aceros,

destacándose en la industria química como unos de los materiales más adecuados en implantes quirúrgicos.(Gil & Planell, 1993)

A pesar de su gran éxito en la aplicación clínica, todavía se encuentran desafíos para el diseño de implantes exitosos relacionados a la mala calidad del hueso y prevención de inflamación aguda alrededor del implante, debido a que las propiedades superficiales de los implantes de Ti juegan un papel importante en la osteointegración. Se han desarrollado superficies para inducir, guiar y controlar curaciones óseas rápida, incluida la alteración de las propiedades fisicoquímicas, morfológicas y bioquímicas de la superficie de implante de Ti.(Jiang et al., 2010)

El Qs es un polisacárido catiónico natural, al ser soluble en soluciones acuosas es más fácil de procesar que la quitina. Las principales investigaciones se enfocan en su preparación variando sus pesos moleculares, su grado de desacetilación, la distribución de los grupos acetilos, la longitud de la cadena y la estructura que influyen tanto en la solubilidad como en su biocompatibilidad y otras propiedades.(Devlieghere, Vermeulen, & Debevere, 2004)

Por su naturaleza de polímero natural ha sido tratado para métodos similares que la celulosa, en donde el Qs puede ser reticulado, fabricado para hidrogeles y nanotubos. La ventaja del Qs en tales materiales no es solo su biodegradabilidad y su actividad antibacteriana, sino también la hidrofilia introducida por la adición de los grupos polares capaces de formar interacciones secundarias ($-OH$ y $-NH_2$ grupos involucrados en enlaces H con otros polímeros).(Rinaudo, 2006)

Los esfuerzos de investigación y las aplicaciones que involucran Qs han aumentado significativamente en las últimas dos décadas(Abdul Khalil et al., 2016), lo que se hace evidente al trazar el número total de artículos que contienen la palabra "Quitosano" en el título publicado en los últimos 80 años. La deposición electroforética del Qs se remonta a

2002. El grupo de investigación dirigido por Payne lo depositó con éxito en el 2002(L. Q. Wu et al., 2002) y luego demostró la deposición de nanopartículas de Qs en el 2005 (L. Q. Wu et al., 2005; Yi et al., 2005). Propusieron que la carga positiva de que lleva su estructura en condiciones ligeramente ácidas permite el depósito en el cátodo bajo un voltaje aplicado(L. Q. Wu et al., 2005; Yi et al., 2005).

Los grupos de investigación liderados por Altomare (2014) y Benzoni (2016) (Benzoni et al., 2016) utilizaron láminas de aluminio y Ti como cátodos durante la EPD y finalmente introdujeron andamios compuestos porosos basados en Qs obtenidos a través de EPD(Avcu et al., 2019).

Aprovechado así en el campo de la medicina, el Qs se encuentra siendo útil para muchas aplicaciones entre ellas (geles, películas, fibras, floculantes para recuperación de proteínas, descontaminación, etc.). Siendo así un biomaterial de propiedades antimicrobianas y de bajo costo, por lo que ha ganado considerables atenciones como recubrimiento en implantes de Ti en los últimos años.(Rinaudo, 2006) Entre polímeros biodegradables como el Qs se encuentra el PLGA y el PEI. El PLGA al degradarse por metabolismo en poliglicólico ácido (PGA) y ácido poliláctico (PLA) le da la característica de biocompatibilidad, lo cual ha sido ampliamente estudiado para preparar nanopartículas cargadas de fármacos para producir la liberación de control de fármacos, principalmente antibióticos. (Dinarvand et al., 2012)(Dinarvand et al., 2012)(Dinarvand et al., 2012)(Dinarvand et al., 2012)(Dinarvand et al., 2012)El uso de biopelículas compuestas, que poseen propiedades antibacteriales, causan la inhibición de bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichiacoli*.(Dinarvand et al., 2012)

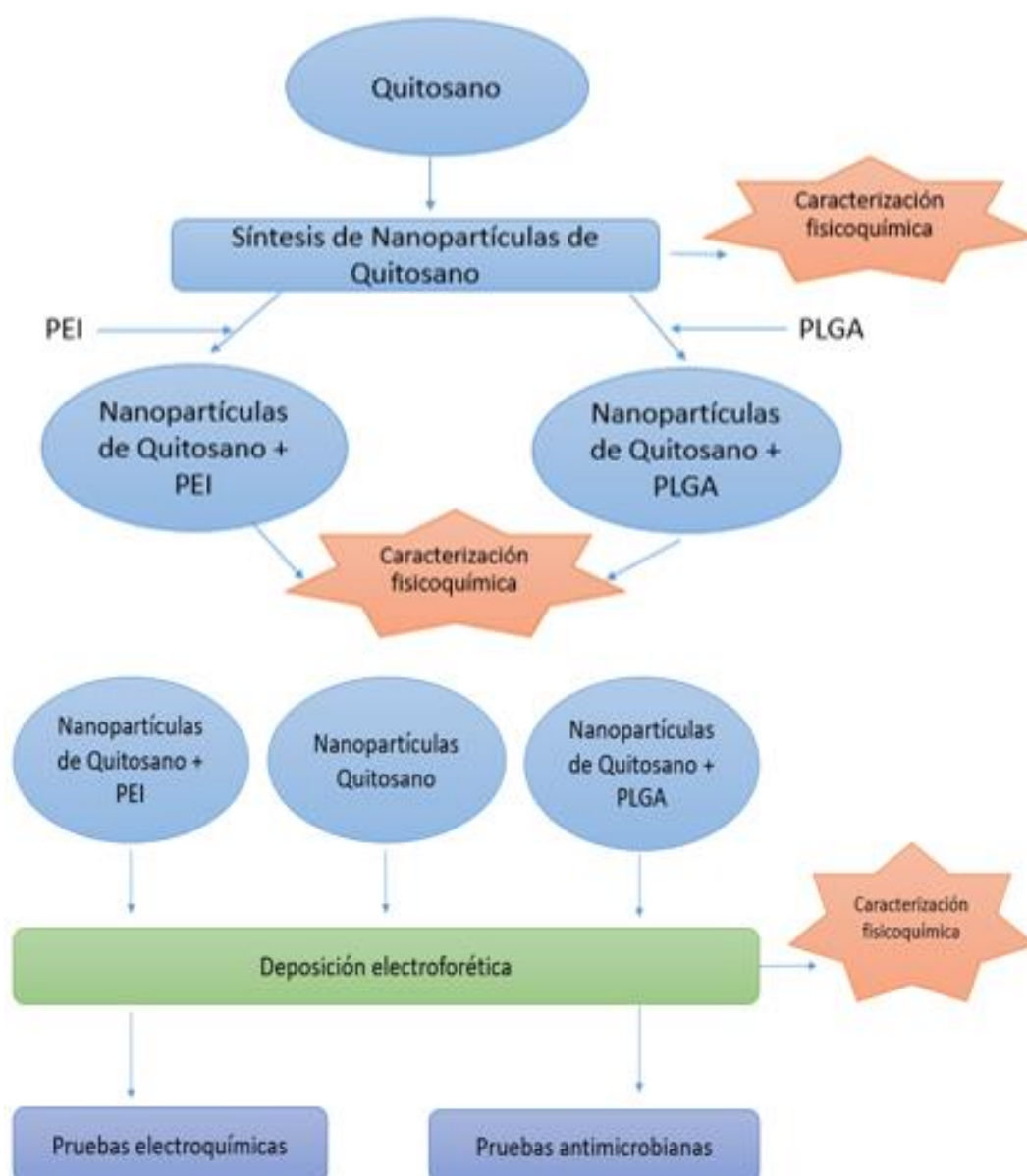
En cuanto al PEI, teniendo en cuenta la biocompatibilidad que presenta se ha empleado en el área biotecnología como vector no viral para llevar a cabo procesos de transfección de genes, estabilizador de proteínas y desarrollo de biosensores. Las

nanopartículas de PEI en varios estudios exhibieron un fuerte efecto antibacteriano contra todas las bacterias *S.aureus*, *S.epidermidis*, *E.faecalis* , *P.aeruginosa* y *E. coli*.(Beyth et al., 2008) La alta actividad de los agentes policationicos se refleja en la absorción de polímeros cargados positivamente sobre superficies celulares bacterianas cargadas negativamente, encontrando que la PEI alquilada en N era efectiva contra una variedad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.(Lin, Qiu, Lewis, & Klibanov, 2002)

4. Metodología

Figura 8

Metodología para el desarrollo del proyecto.

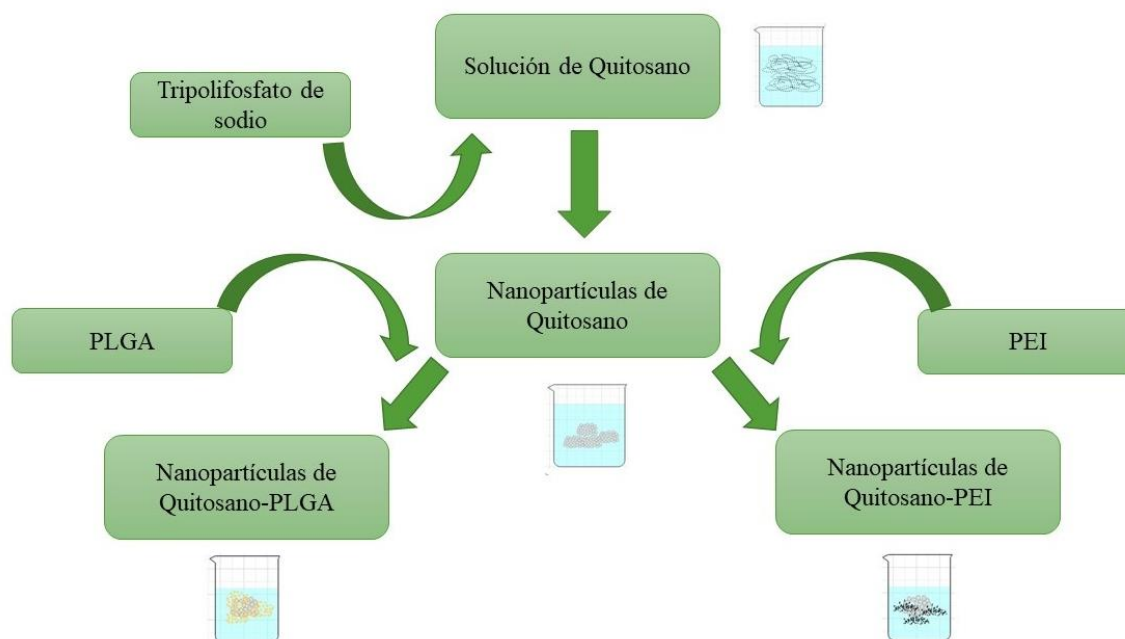


Nota: Autor

4.1. Síntesis de recubrimientos

Figura 9

Diagrama de flujo de la síntesis de recubrimientos.



Nota: Autor

4.1.1. Síntesis de nanopartículas de Quitosano (NpsQs)

La formación de nanopartículas de Qs se realizó mediante la técnica de gélicación iónica. El Qs se disolvió en una solución de ácido acético al 1%(v/v) para obtener una solución al 0,5% (p/v), luego se elevó el pH de 4.6-4.8 con hidróxido de amonio diluido. Las nanopartículas de Qs se formaron espontáneamente añadiendo un 1 mL de una solución acuosa de tripolifosfato (0.25% p / v, 4 °C) a 3 mL de solución de Qs bajo agitación magnética. Las nanopartículas se purificaron por centrifugación a 9000 g durante 30 min. El sobrenadante se descartó y las nanopartículas se lavaron con agua destilada para eliminar cualquier residuo de hidróxido de amonio, luego se resuspendieron en ácido acético al 2% para su posterior deposición.(Sivakami et al., 2013)

4.1.2. Síntesis de la solución de PLGA con las nanopartículas de Qs.

Las nanoesferas se prepararon mediante una técnica de emulsión, difusión y evaporación. Se disolvieron 200 mg de PLGA en 10 ml de acetato de etilo a temperatura ambiente, durante 2 horas de agitación magnética. La fase orgánica se agregó luego a la solución de nanopartículas de Qs sintetizadas anteriormente. La emulsión se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, después se homogenizó utilizando un ultrasonido de punto ULTRASONIC PROCESSOR 130 WATT 20 HZ durante 2 minutos con pulsos 20 segundos ON-10 segundos OFF y amplitud 80%. Para esta emulsión el agua se añadió bajo agitación dando como resultado nano-precipitación. La agitación continuó en un baño de agua mantenido a 40 °C para eliminar el solvente orgánico.⁴⁹

4.1.3. Síntesis de la solución PEI con las nanopartículas de Qs.

Se añadió una cantidad predeterminada 5 mg/mL de PEI a la solución de nanopartículas Qs, agitando la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente.(Fan, 2017)

4.2. Deposición electroforética

4.2.1. Deposición electroforética de las NPsQs

Se utilizaron láminas de Titanio de alta pureza (99,5%) (Alfa Aesar) de 1 cm de ancho por 4 cm de largo (**Figura 10**) como material para recubrir, las cuales se usaron como electrodos de trabajo. Las láminas son lavaron con etanol al 90% en un baño de ultrasonido durante 10 minutos para su posterior uso.

Para la deposición se realizó el montaje que se muestra en la (**Figura 11**), en el cual se tomó 10 mL de soluciones de **NPsQs**, se varió parámetros como voltaje (12, 15, 20 y 25 V) y tiempo de deposición (5, 10 y 15 minutos). Esto para elegir las condiciones que generaran recubrimientos con mejores características.

Figura 10

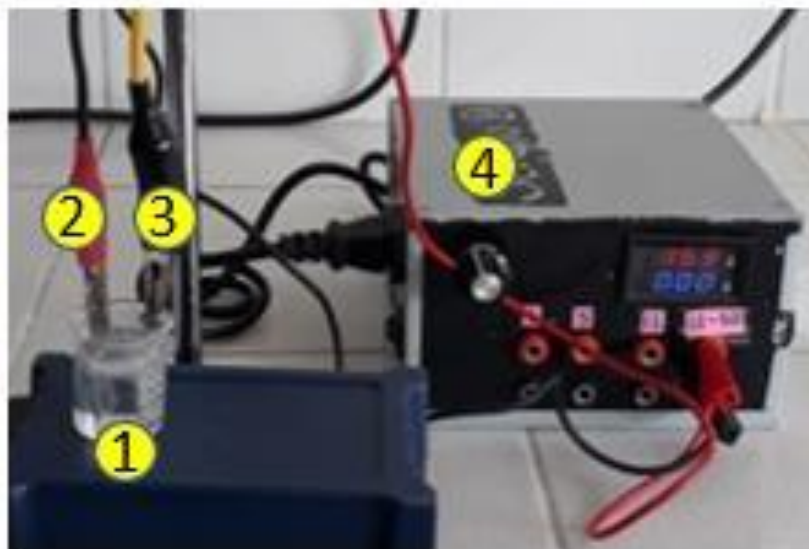
Lámina de Titanio



Nota: Lámina de Titanio de 1x5 cm de dimensión. Autor

Figura 11

Montaje experimental para la deposición electroforética.



Nota: Montaje experimental para la deposición electroforética. 1) solución a depositar, 2) contraelectrodo (lámina de acero), 3) electrodo de trabajo (lámina de titanio) y 4) fuente de voltaje. Autor

Para depositar las soluciones de NPsQs-PEI y NPsQs-PLGA se tuvo en cuenta las condiciones de recubrimiento con mejores características seleccionados para las NPsQs.

4.3. Análisis fisicoquímicos

Se realizó análisis fisicoquímico a las nanopartículas de Qs, las soluciones de Qs-PLGA, Qs-PEI, las láminas de titanio con recubrimientos (nanopartículas de Qs, Qs-PLGA y Qs-PEI).

4.3.1. Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)

El equipo que se utilizó es el BRUKER Tensor 27. Se recolectaron un total de 32 medidas a una resolución de 0.5 cm⁻¹, las cuales se obtuvieron por absorción en una platina soporte de ATR. Se colocó un poco de muestra liofilizada de la solución en la que se encuentran las NPs de Qs y la solución del polímero. Las láminas depositadas se colocaron sobre el soporte de ATR.

4.3.2. Dispersión dinámica de Luz (DLS)

Se utilizó un equipo Zetasizer Nano S90 Malvern, realizando un total de 3 medidas cada una consistió en 10 scans para un total de 30 scans. Esto se realizó con el fin de promediar las medidas en un valor confiable. La medida se tomó en una celda de 4 caras transparente para la recolección de datos a 90°. Se tomaron los datos de diámetro hidrodinámico obtenidos por número y el índice de polidispersidad a temperatura constante.

4.3.3. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

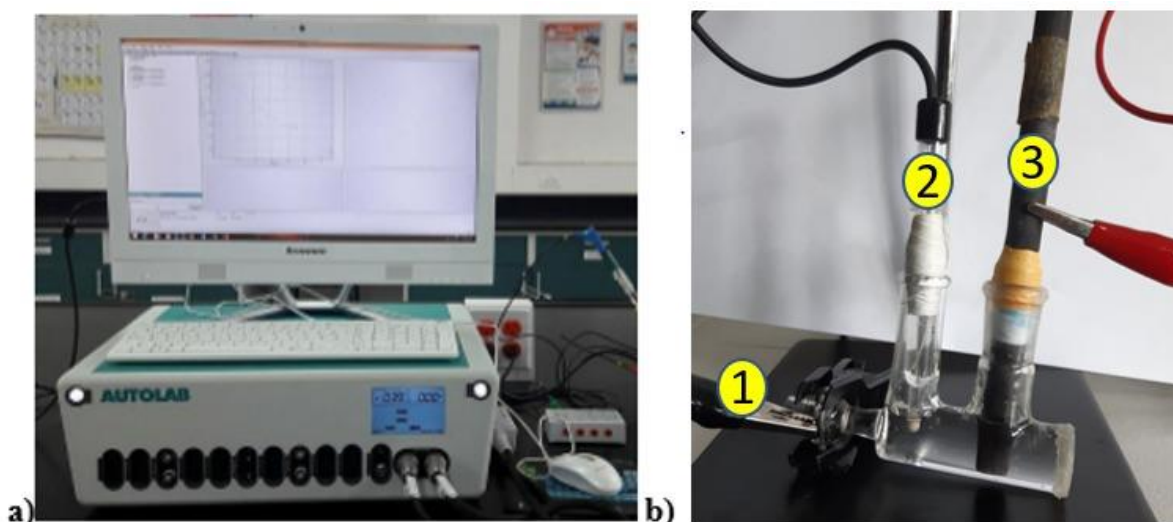
Las láminas de titanio se colocaron sobre stubs (discos metálicos con cinta adhesiva de carbón). Se realizó el análisis en el Microscopio Electrónico de Barrido FEG (Field Emission Gun) **QUANTA FEG 650**, tomando imágenes con alto vacío y voltaje de aceleración 5kV.

4.4. Pruebas electroquímicas

Para las pruebas electroquímicas se realizó el montaje de la (**Figura 12**). Constituida por una celda con 3 electrodos, usando las láminas con recubrimiento como electrodos de trabajo. Se usó como electrodo de referencia Ag/AgCl y como contra electrodo una barra de grafito. Se empleó suero fisiológico como medio para las pruebas. Todo lo anterior conectado al Potenciostato-Galvanostato Autolab 302.

Figura 12

Montaje para pruebas electroquímicas.



Nota: Montaje para pruebas electroquímicas. **a)** Potenciostato-Galvanostato Autolab 302, **b)** Celda electroquímica: 1) electrodo de trabajo, 2) electrodo de referencia y 3) contraelectrodo. Autor

Se establecieron los siguientes parámetros en las pruebas para evaluar la calidad del recubrimiento.

4.4.1 Potencial a circuito abierto (OCP)

Se realizó una lectura de potencial de 60 minutos establecido por la norma ASTM G3 (Conventions Applicable to Electrochemical Measurements in Corrosion Testing 1, 2004).

4.4.2 Espectroscopia de impedancia electroquímica

Un barrido de frecuencia de con la aplicación de un potencial periódico de ± 10 mV respecto al OCP, una frecuencia de 100000 hasta 0.01 Hz

4.4.3 Curva de polarización lineal

Se realizó la prueba de LSV con un potencial aplicado de -30 mV hasta 1200 mV con respecto al OCP.

4.5. Pruebas antimicrobianas

4.5.1. Evaluación preliminar del efecto antimicrobiano de los recubrimientos.

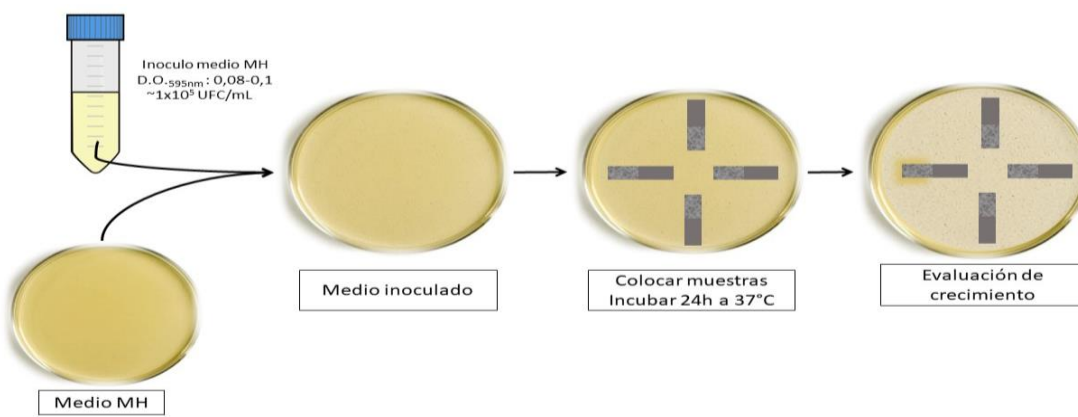
La actividad antimicrobiana de los recubrimientos en estudio fue evaluada frente a dos cepas Gram positivas, aerobias de importancia clínica, *S. epidermidis* ATCC 12228 y *S. aureus* ATCC 29213. La evaluación inicial se realizó mediante el ensayo de difusión en disco (Kirby-Bauer), permitiendo la observación de la inhibición del crecimiento microbiano por la formación de un halo alrededor de la muestra evaluada. Se utilizó un cultivo fresco (menor a 48h) para realizar un inóculo en medio Müeller-Hinton (MH) a una densidad óptica ($D.O_{595nm}$) entre 0.08 a 0.1 (equivalente a $\sim 1 \times 10^5$ UFC/mL). Con un hisopo se sembró cada una de las cepas en una placa de agar MH de forma homogénea. Una vez sembrada la placa se colocaron cada una de las muestras en su lugar correspondiente y se dejó incubar 24h a 37°C en aerobiosis (Hudzicki, 2016) (**Figura 13**).

Adicionalmente se verificó el efecto de cada uno de los recubrimientos de inhibir la adhesión de microorganismos a la lámina mediante la evaluación del número de microorganismos adheridos a la superficie. Se utilizó un cultivo fresco (menor a 48h) para realizar un inóculo en medio Müeller-Hinton (MH) a una concentración de 1×10^7 UFC/mL). Se introdujeron las láminas recubiertas y se incubó por 48h a 37°C. Se extrajeron las láminas

y se lavaron con PBS para remover células no adheridas. Luego se sonicaron en 1 mL de PBS en baño frío por 5 minutos para remover las células adheridas. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en medio solido MH para realizar conteo de unidades formadoras de colonias.

Figura 13

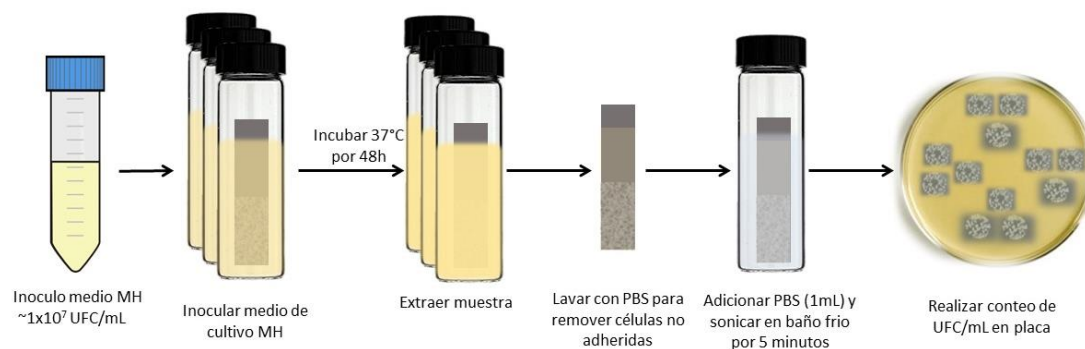
Metodología de Kirby-Bauer.



Nota: Diagrama de la evaluación de actividad antimicrobiana por la metodología de Kirby Bauer. Autor

Figura 14

Diagrama de la evaluación de la adhesión microbiana.



Nota: Autor

5. Resultados y Discusión

5.1. Síntesis de Recubrimientos

5.1.1. Síntesis de Nanopartículas de Quitosano (Qs)

Se realizaron ensayos preliminares para determinar la concentración de Qs, estudiando 2 concentraciones (0.5 y 1%) siendo la concentración de 0.5% de Qs disuelto en 1% de ácido acético la concentración en la cual se daba la formación de nanopartículas con los tamaños deseados y alta estabilidad.

Las nanopartículas en solución se analizaron por dispersión dinámica de luz (DLS) para determinar su tamaño y la polidispersidad. Se determinó la carga superficial de las partículas mediante la medición de potencial zeta. Para analizar las interacciones moleculares existentes se realizaron medidas de FT-IR.

Tabla 1

Datos obtenidos por el DLS para las NPs de Qs.

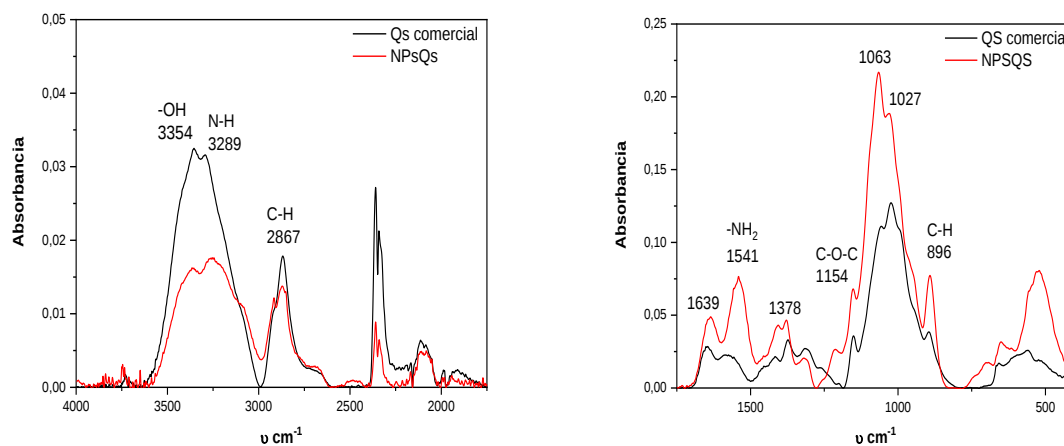
Count rate	PdI	Tamaño (nm)	Potencial zeta (mV)
167.6	0.4	70.2	53.6
168.0	0.4	309.2	54.4
160.8	0.3	109.0	53.7
Promedio		162.8	53.9

Según los datos obtenidos, se obtuvieron nanopartículas con tamaño promedio de 160 nm, con un índice de polidispersidad de 0.4 y potencial zeta ~54 mV, sugiriendo que las NPsQs presentan tamaños similares.(Goycoolea, Remuñán-López, & Alonso, 2009)(Kim & Kang, 2006) La variación de tamaño que presentan puede deberse a una aglomeración de las partículas en solución.

A continuación, se muestran los espectros FT-IR correspondiente al Qs y NPsQs (**Figura 15**).

Figura 15

Espectroscopia IR de Qs comercial y NPsQs liofilizadas.



Nota: Espectroscopia IR de Qs comercial y NPsQs liofilizadas. a) Espectro de 4000cm^{-1} a 1750cm^{-1} . b) Espectro de 1750cm^{-1} a 400cm^{-1} . Autor

En el espectro FTIR del Qs se observan tres bandas características, en 3354cm^{-1} correspondiente a la $\nu(\text{OH})$, 1154cm^{-1} para la $\nu(\text{COC})$ y 1578cm^{-1} para la $\nu(\text{NH}_2)$. Presentando también bandas de grupos funcionales como 3289cm^{-1} para N-H, 2867cm^{-1} para C-H, y $1063\text{-}1027\text{cm}^{-1}$ para vibraciones de su estructura piranosa.(Rodr, Negr, & Alarc, 2010) El espectro de las NPsQs (Figura 13) se muestra diferente al espectro del Qs en la banda correspondiente a la $\nu(\text{OH})$ (3354cm^{-1}), lo que sugiere la formación de puente de hidrogeno entre los oxígenos del tripolifosfato y los hidrógenos de los grupos amino del quitosano, dado por con un desplazamiento del máximo de absorción a menor frecuencia y un ensanchamiento de la banda.

En la vibración correspondiente a NH_2 (1578cm^{-1}), aparecen dos nuevas bandas a 1638cm^{-1} y 1700cm^{-1} ; esto probablemente es debido a la protonación de los grupos NH_2 y a la formación de puente de hidrógeno entre los O-TPP y amino libres.

5.1.2. Síntesis de Nanopartículas de Quitosano- Poli (ácido láctico-co-glicólico) (NPsQs-PLGA)

Las nanopartículas en solución se analizaron por dispersión dinámica de luz (DLS) para determinar el tamaño y la polidispersidad de las partículas. Se determinó la carga superficial de las partículas mediante la medición de potencial zeta. Para analizar las interacciones moleculares existentes se realizaron medidas de FT-IR.

Tabla 2

Datos obtenidos por el DLS para las NPsQs-PLGA.

Count rate	PdI	Tamaño (nm)	Potencial zeta (mV)
253.8	0.4	188.9	50.7
246.9	0.3	282.4	52.3
277.3	0.4	186.0	54.3
Promedio		219.1	52.4

Se obtuvieron nanopartículas con tamaño promedio de 220 nm, con un índice de polidispersidad de ~0.4 y potencial zeta ~53 mV, lo que sugiere que las NPsQs-PLGA presentan tamaños similares. El uso de polímeros confiere alta estabilidad electrodinámica al sistema de NPsQs.(Goycoolea et al., 2009)

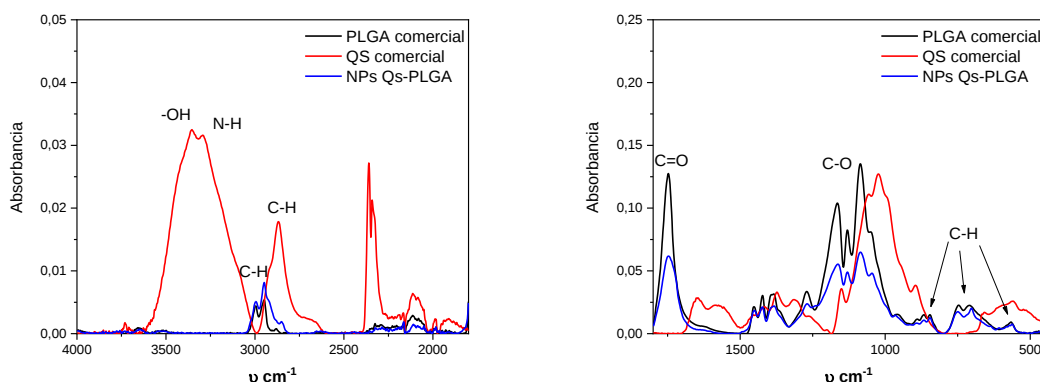
Para analizar las interacciones moleculares existentes entre las NPsQs y el NPsQs-PLGA, se realizaron medidas de espectroscopia infrarroja. (

Figura 16,

Figura 17).

Figura 16

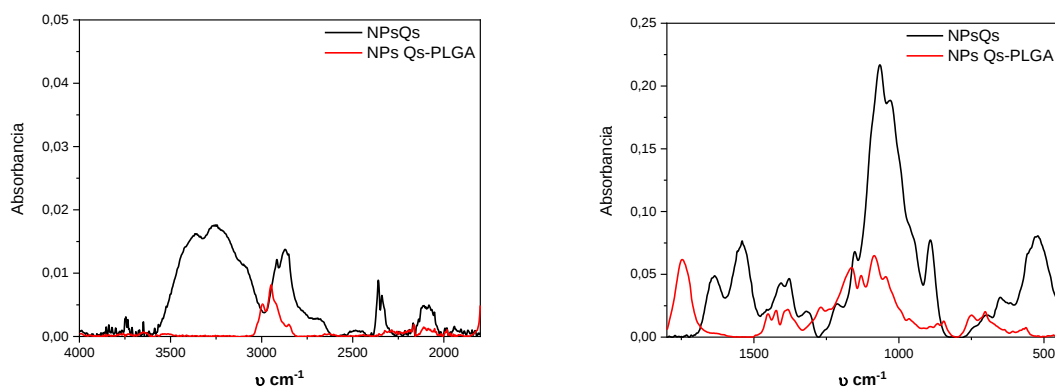
Espectroscopia FT-IR de PLGA comercial, Qs comercial y NPsQs-PLGA liofilizadas.



Nota: Espectroscopia FT-IR de PLGA comercial, Qs comercial y NPsQs-PLGA liofilizadas.
a) Espectro de 4000 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} . b) Espectro de 1800 cm^{-1} a 450 cm^{-1} . Autor

Figura 17

Espectroscopia FT-IR NPsQs y NPsQs-PLGA.



Nota: Espectroscopia FT-IR NPsQs y NPsQs-PLGA. a) Espectro de 4000 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} .
b) Espectro de 1800 cm^{-1} a 450 cm^{-1} . Autor

Se analizó el espectro de las NPsQs-PLGA, haciendo una comparación con los espectros de Qs y PLGA comercial, observando que en la región entre 2700- 3500 cm^{-1} solo presenta las bandas características del Qs atribuidas al estiramiento del enlace O-H del grupo hidroxilo y

protonación del grupo amino(N-H). En la región del 2800-3000 cm^{-1} se puede observar las bandas (2994,2948,2853 cm^{-1}) del PLGA que corresponden a señales de estiramiento C-H. La banda 1745 cm^{-1} está dada por el enlace C=O (estiramiento); también aparece la posible vibración del enlace C-O en 1050-1250 cm^{-1} , finalmente aparecen señales de los enlaces C-H en 870,693 y 569 cm^{-1} .(Taufiq Rohman, S.Pd.I, 2019) Se observó en los espectros de las NPsQs-PLGA y PLGA comercial que no presentan diferencias en corrimiento o ensanchamiento, lo cual sugiere que las NPsQs-PLGA pueden presentar una estructura tipo core-shell. En la (

Figura 17) se puede determinar que no se encuentra ninguna similitud con el espectro de las NPsQs.(Mainardes, Gremião, & Evangelista, 2006)

5.1.3. Síntesis de Nanopartículas de Quitosano-PEI (NPsQs-PEI)

Las nanopartículas en solución se analizaron por dispersión dinámica de luz (DLS) para determinar el tamaño y la polidispersidad de las partículas. Se determinó la carga superficial de las partículas mediante la medición de potencial zeta. Para analizar las interacciones moleculares existentes se realizaron medidas de FT-IR.

Tabla 3

Datos obtenidos por el DLS para las NPsQs-PEI.

Count rate	PdI	Tamaño (nm)	Potencial zeta
132.5	0.4	8.3	54.3
145.9	0.5	9.7	56.3
83.2	0.5	3.6	56.5
Promedio		7.2	55.7

Se obtuvieron nanopartículas con tamaño promedio de 7.2 nm con un índice de polidispersidad de ~ 0.5 y potencial zeta ~ 56 mV, lo cual sugiere que las NPs Qs-PEI presentan monodispersidad aceptable. Un ligero aumento en el valor del potencial zeta sugiere una alta estabilidad termodinámica en el sistema de las NPs Qs-PEI y un aumento en el tamaño de las nanopartículas.(Ali, Joshi, & Rajendran, 2011)

Para analizar las interacciones moleculares existentes entre las NPs Qs y el NPs Qs-PEI se realizaron medidas de espectroscopia infrarroja. (**Figura 18**,

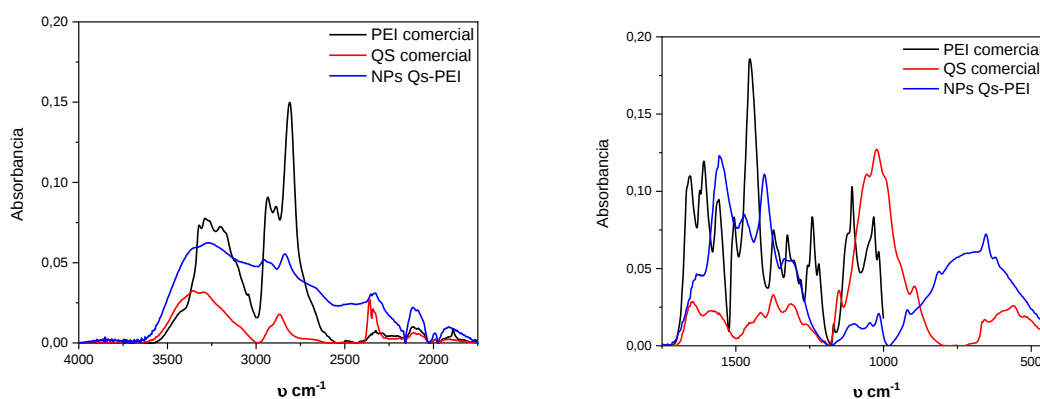
Se puede observar que el espectro NPsQs-PEI se asemeja al espectro NPsQs, esto sugiere que al adicionar el PEI comercial a las NPsQs la interacción entre las moléculas no presenta cambios significativos. Un ensanchamiento de bandas causando solapamiento se debe probablemente al incremento de grupos C-H del PEI. Un aumento de la banda del grupo N-H tanto del Qs como del PEI, sugiere que las moléculas si se encuentran en interacción y posiblemente no se observan cambios significativos debido a la baja concentración del PEI.

La ausencia de la banda entre 900 a 1300 cm^{-1} característica del enlace éter (C-O-C) de Qs, es debido a la interacción de puente de hidrogeno entre los oxígenos del Qs y los hidrógenos del PEI. La banda ancha entre 500 a 1000 cm^{-1} característica del grupo -C-H₂ representa la formación de enlace C-H entre los carbonos del Qs y los de H del PEI.

Figura 19)

Figura 18

Espectroscopia IR de PEI comercial, Qs comercial y NPsQs-PEI.



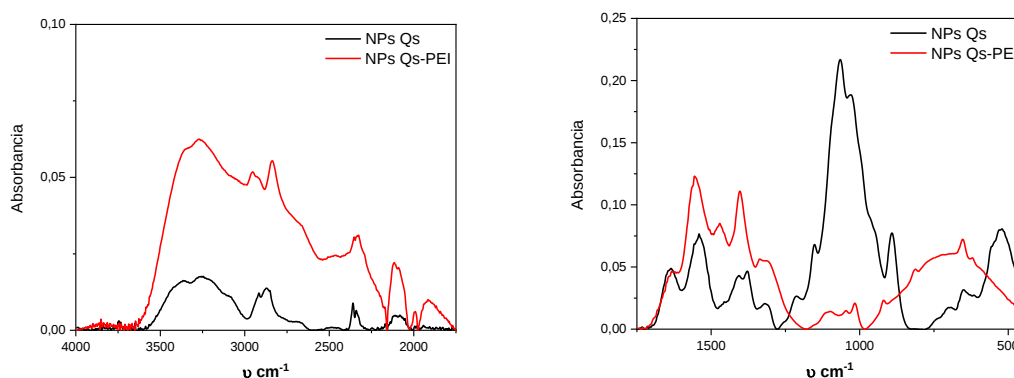
Nota: Espectroscopia IR de PEI comercial, Qs comercial y NPsQs-PEI. a) Espectro de 4000 cm^{-1} a 1750 cm^{-1} . b) Espectro de 1750 cm^{-1} a 450 cm^{-1} . Autor

Se puede observar que el espectro NPsQs-PEI se asemeja al espectro NPsQs, esto sugiere que al adicionar el PEI comercial a las NPsQs la interacción entre las moléculas no presenta cambios significativos. Un ensanchamiento de bandas causando solapamiento se debe probablemente al incremento de grupos C-H del PEI. Un aumento de la banda del grupo N-H tanto del Qs como del PEI, sugiere que las moléculas si se encuentran en interacción y posiblemente no se observan cambios significativos debido a la baja concentración del PEI.

La ausencia de la banda entre 900 a 1300 cm^{-1} característica del enlace éter (C-O-C) de Qs, es debido a la interacción de puente de hidrogeno entre los oxígenos del Qs y los hidrógenos del PEI. La banda ancha entre 500 a 1000 cm^{-1} característica del grupo -C-H₂ representa la formación de enlace C-H entre los carbonos del Qs y los de H del PEI.

Figura 19

Espectroscopia FT-IR de PLGA comercial, Qs comercial y NPsQs-PLGA.



Nota: Espectroscopia FT-IR de PLGA comercial, Qs comercial y NPsQs-PLGA. a) Espectro de 4000 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} . b) Espectro de 1800 cm^{-1} a 450 cm^{-1} . Autor

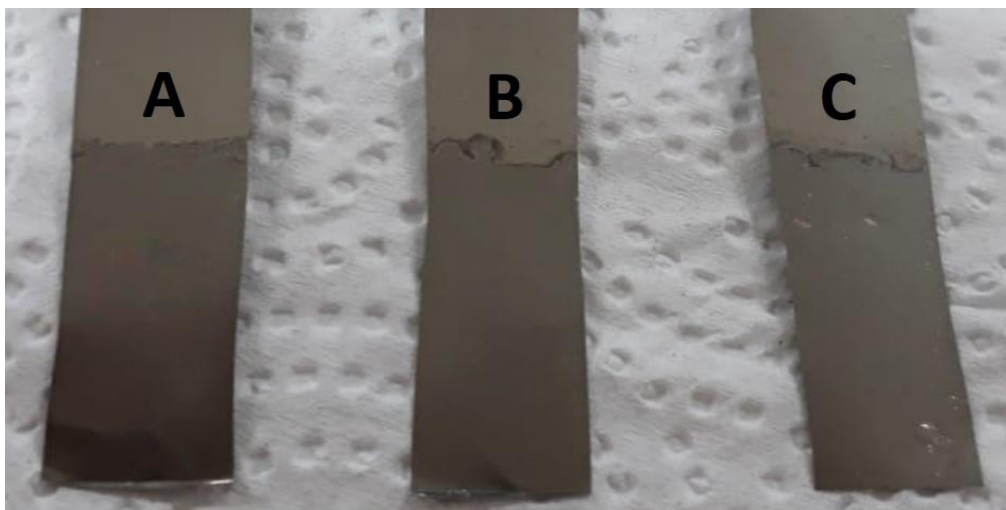
5.2. Deposición Electroforética de Recubrimientos

Al aplicar una diferencia de potencial de 15 V durante el mismo tiempo se obtuvo un depósito homogéneo sobre la superficie del electrodo de titanio con carga negativa, confirmando así el efecto del campo eléctrico sobre las partículas y que este potencial es

suficiente para vencer la fuerza de arrastre. Al aplicar una diferencia de 20 V entre los electrodos se observó una deposición masiva de las nanopartículas sobre el electrodo con alta rugosidad y porosidades macroscópicas. Estas porosidades se deben a la reacción de evolución de hidrógeno que bajo estas condiciones experimentales generan una gran cantidad de moléculas de H_2 que superan la concentración máxima en solución promoviendo la formación de burbujas en la superficie del electrodo, las cuales al formarse, crecer y desprenderse dejan gran cantidad de poros en el recubrimiento obtenido. Considerando estas observaciones se decidió mantener fija la diferencia de potencial en 15 voltios para estudiar el efecto de la variación del tiempo en las características del depósito. Entre los diferentes potenciales y tiempo se escogió como mejor depósito los parámetros de 15 voltios a tiempo de 15 minutos. Con los mismos parámetros anteriormente comentados se realizaron los recubrimientos de NPsQs-PEI y NPsQs-PLGA.

Figura 20

Láminas de Titanio con deposición de NPsQs.

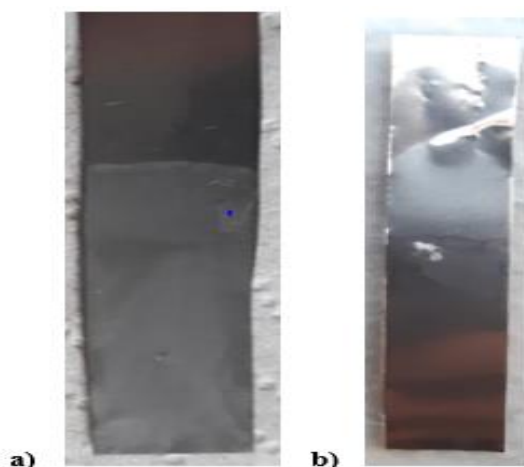


Nota: Láminas de Titanio con deposición de NPsQs aplicando una diferencia de potencial de 15 V. durante: a) 5 minutos, b) 10 minutos y c) 15 minutos.

En el proceso de deposición electroforética ocurren dos pasos consecutivos: primero se presenta el transporte de las nanopartículas a través de la solución y luego ocurre la deposición sobre la superficie del titanio. El transporte de las nanopartículas se encuentra controlado por migración y depende del potencial aplicado, la movilidad electroforética, la fuerza de arrastre y el tamaño de las partículas. Donde la fuerza electrostática debe ser mayor a la suma de las fuerzas de retardo electroforético y la fricción inducida por el medio. En la figura 24 se muestran las cronoamperometrías registradas durante la deposición electroforética de los tres sistemas coloidales estudiados: NPsQs, NPsQs-PEI y NPsQs-PLGA. Para los tres sistemas se presentó un incremento continuo de la corriente registrada en función del tiempo, lo cual se puede relacionar con la baja resistencia eléctrica de los recubrimientos permitiendo su deposición a lo largo del experimento. Adicionalmente, el aumento de la corriente puede estar relacionado con la rugosidad del depósito. Si este presenta un crecimiento tridimensional, el área electroquímicamente activa aumentará a lo largo del experimento y por lo tanto podrá aumentar la corriente registrada. Estas características de los recubrimientos fueron confirmadas al analizar las imágenes obtenidas por SEM.

Figura 21

Láminas de Titanio depositadas a un potencial de 15v en 15 minutos.



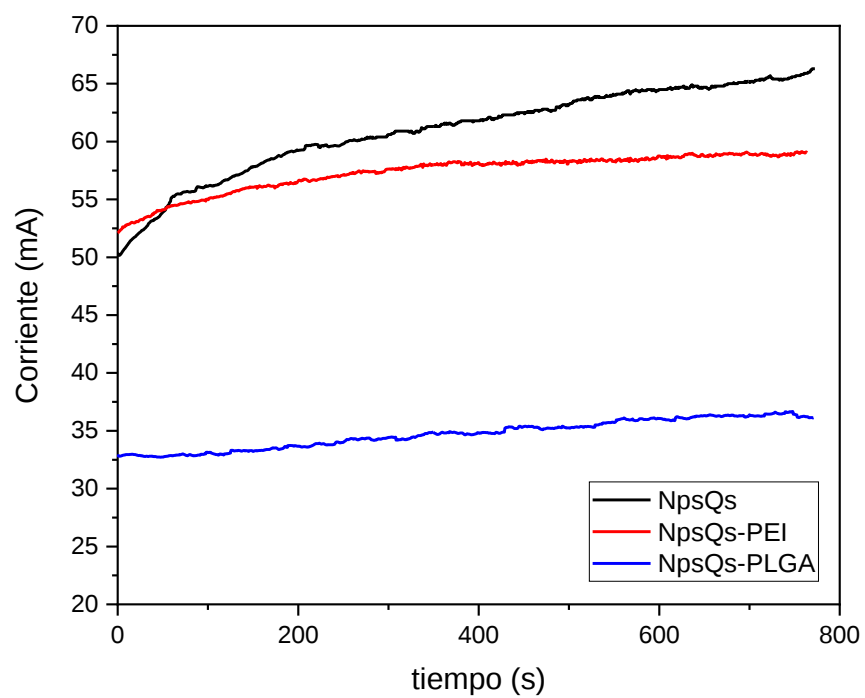
Nota: Láminas de Titanio depositadas a un potencial de 15v en 15 minutos. a) (NPsQs-PEI) y b) (NPsQs-PLGA). Autor

Se realizó espectroscopia FTIR y microscopia SEM a las láminas depositadas para confirmar que la capa observada corresponda a las nanopartículas sintetizadas.

En el apéndice D se graficó el espectro IR de la lámina de titanio y la lámina de titanio con el recubrimiento, sin embargo, la intensidad de los picos no permite determinar con claridad si las nanopartículas sintetizada se adhirieron a las láminas de titanio. Por tanto, el análisis de los recubrimientos se realizó con las gráficas de las NPsQs, NPsQs-PLGA, NPsQs-PEI y las gráficas de las láminas con los recubrimientos para cada uno de los sistemas.

Figura 22

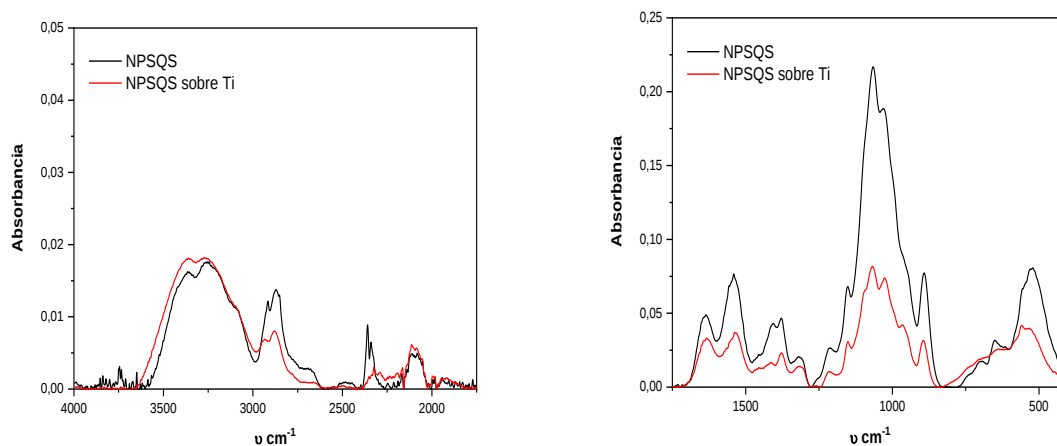
Gráfica de Corriente vs tiempo de NPsQs, NPsQs-PEI y NPsQs-PLGA



Nota: Autor

Figura 23

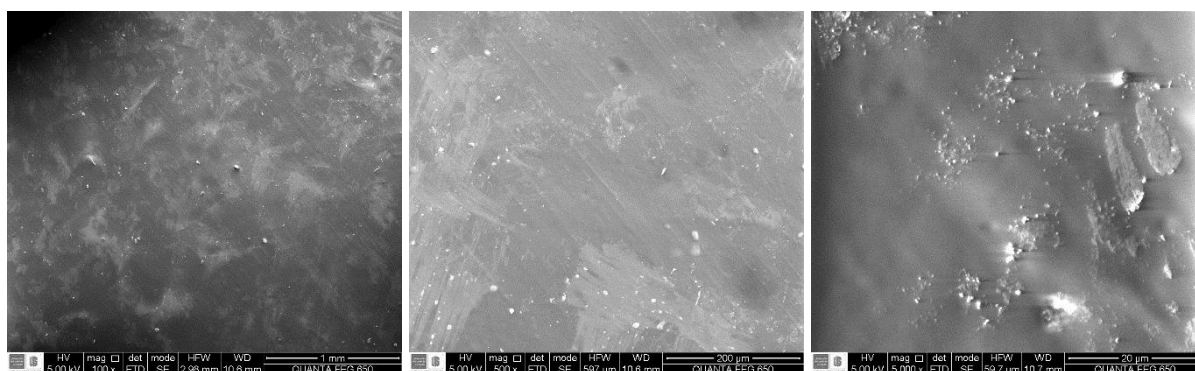
Espectros FTIR de la solución de NPsQs y lámina de Ti con recubrimiento de NPsQs.



Nota: Espectros FTIR de la solución de NPsQs y lámina de Ti con recubrimiento de NPsQs. a) Espectro de 4000 cm^{-1} a 1750 cm^{-1} . b) Espectro de 1750 cm^{-1} a 400 cm^{-1} . Autor

Figura 24

Micrografía SEM de láminas de Ti recubiertas con NPsQs.



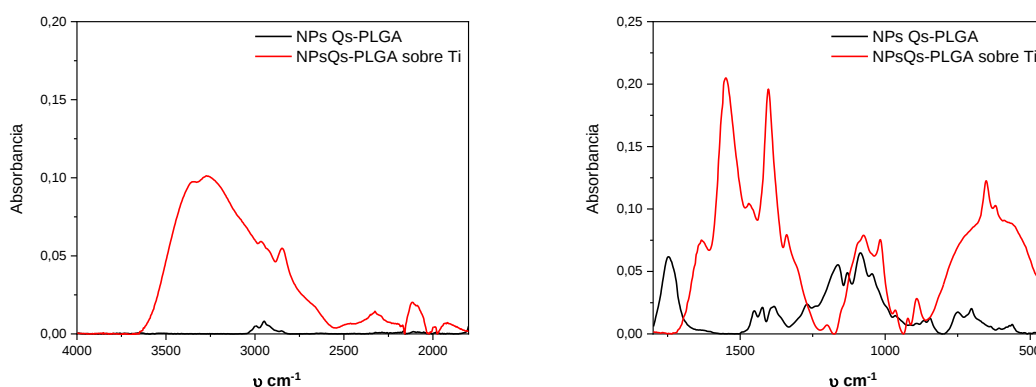
Nota: Autor

Como se puede observar en la figura 24, la lámina de titanio presenta un recubrimiento homogéneo de NPsQs con pequeñas acumulaciones en ciertas zonas, esto se correlaciona en la figura 23, donde los espectros FT-IR son similares. Por otro lado, se

pueden observar especies de diferentes tamaños promedio de 180 nm sobre el recubrimiento, de morfología esférica, baja monodispersidad y ciertas aglomeraciones de las nanopartículas.

Figura 25

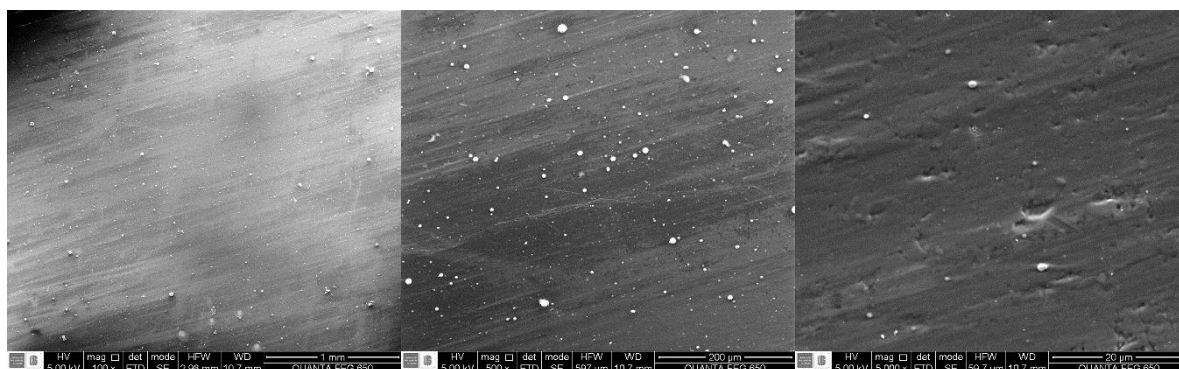
Espectros FTIR de la solución de NPsQs-PLGA y lámina de Ti con recubrimiento de NPsQs-PLGA.



Nota: Espectros FTIR de la solución de NPsQs-PLGA y lámina de Ti con recubrimiento de NPsQs-PLGA. a) Espectro de 4000 cm⁻¹ a 1750 cm⁻¹. b) Espectro de 1750 cm⁻¹ a 400cm⁻¹.
 Autor

Figura 26

Micrografía SEM de láminas de Ti recubiertas con NPsQs-PLGA.



Nota: Autor

En la Figura 26 se puede apreciar que la lámina de titanio presenta un recubrimiento homogéneo de NPsQs-PLGA con pequeñas acumulaciones en ciertas zonas y mayor rugosidad en la superficie del recubrimiento, lo cual se puede correlacionar en la figura 25 con el espectro FT-IR donde se observan diferencias significativas en las bandas de ambos espectros. Esto infiere que hubo un cambio significativo en las nanopartículas depositadas. Es probable que la deposición de la solución haya generado un cambio estructural en donde el producto de algún tipo de degradación genere nuevas especies, ya que el espectro es bastante diferente. Las partículas tienen un tamaño promedio de 200-100 nm, de morfología esférica y alta monodispersidad.

Como se puede observar en la

Figura 28 la lámina de titanio presenta un recubrimiento con una capa delgada y ligeramente homogénea de NPsQs-PEI con morfología de red irregular porosa. En el espectro FT-IR (**Figura 27**) no se identifican diferencias significativas en las bandas de ambos espectros, lo que sugiere que no hubo modificaciones en la molécula durante la deposición y que el recubrimiento corresponde a la solución depositada. Por otro lado, no se observan nanopartículas de menor tamaño por fuera de la red, lo que puede resultar favorable a un recubrimiento más homogéneo.

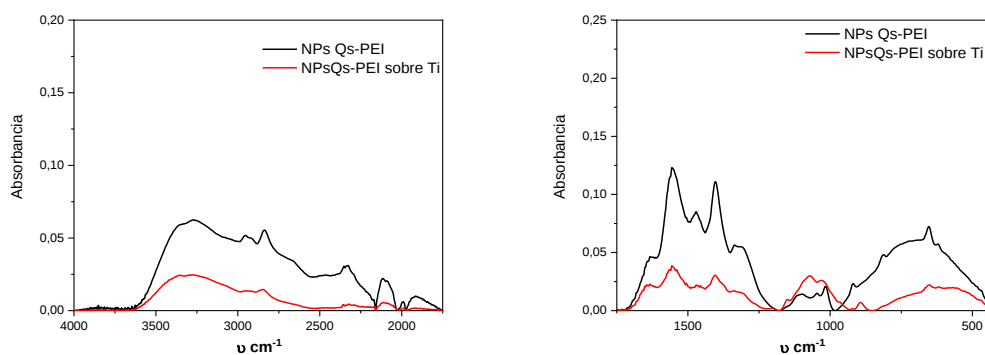
5.3. Evaluación de la estabilidad electroquímica de los recubrimientos.

Luego de determinar los mejores parámetros de deposición se procedió a analizar la calidad y estabilidad electroquímica de los recubrimientos empezando con la medición de potencial a circuito abierto (OCP). El potencial promedio en cual se estabilizó el titanio fue de 0,07 mV vs Ag/AgCl, el valor obtenido para el recubrimiento de NPsQs fue de -0,2 mV vs Ag/AgCl, el recubrimiento de NPsQs-PEI fue de 0,26 mV vs Ag/AgCl y el recubrimiento de NPsQs-PLGA de (0,28 mV vs Ag/AgCl)), lo que evidencia recubrimiento en la superficie

y que existe un cambio al incorporar el PEI y PLGA a las NPsQs siendo así recubrimientos más activos que el Ti por sí solo.

Figura 27

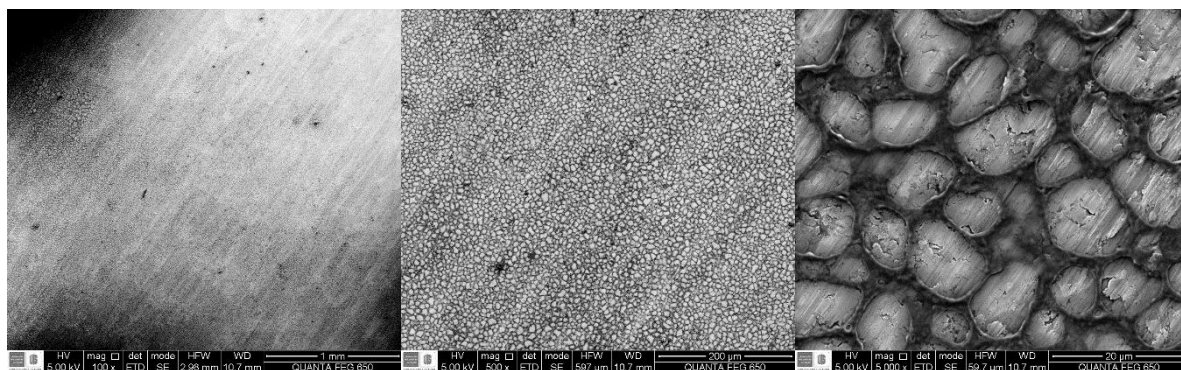
Espectros FTIR de la solución de NPsQs-PEI y lámina de Ti con recubrimiento de NPsQs-PEI.



Nota: Espectros FTIR de la solución de NPsQs-PEI y lámina de Ti con recubrimiento de NPsQs-PEI. a) Espectro de 4000 cm^{-1} a 1750 cm^{-1} . b) Espectro de 1750 cm^{-1} a 400 cm^{-1} .

Figura 28

Micrografía SEM de láminas de Ti recubiertas con NPsQs-PEI.

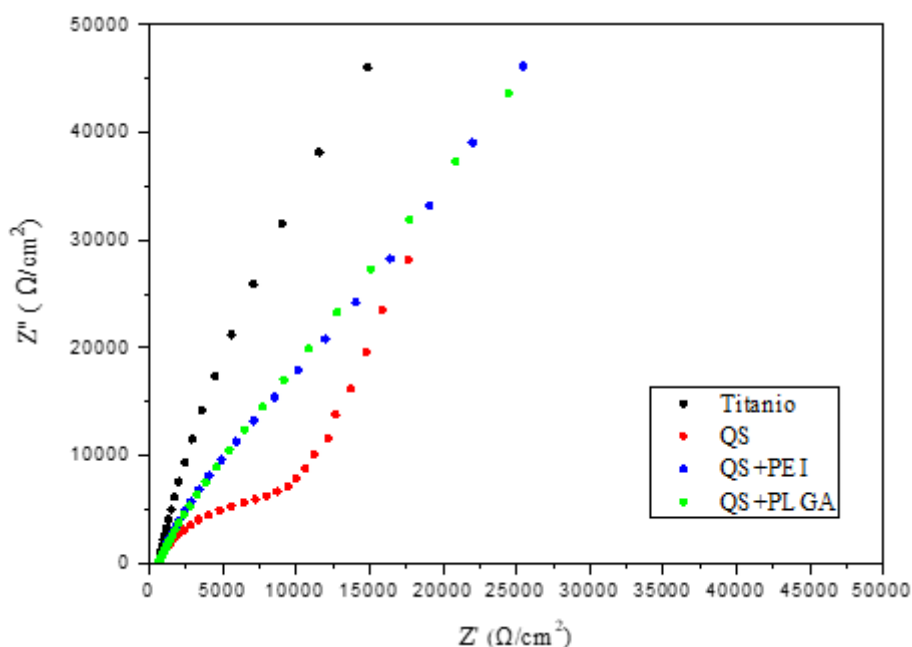


Nota: Autor

El diagrama Nyquist de la (Figura 29), calculada por espectroscopia de impedancia electroquímica, muestra que para el titanio y los diferentes recubrimientos inicia en el eje y desde 550 (Ω/cm^2) debido a la alta resistencia que presenta la solución electrolítica, también por las gráficas se observa que cumple con un proceso por control de difusión (Bard, A. J et al 2001).

Figura 29

Espectroscopia de impedancia electroquímica. (Nyquist).

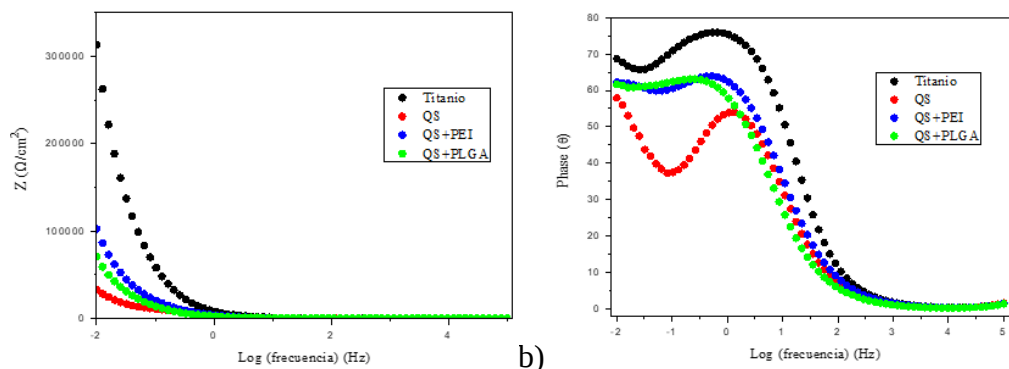


Nota: Autor

En cuanto a la gráfica de Bode de la figura 30, se observa la transferencia de carga del Ti y de los recubrimientos sobre Ti donde se observa que cuando se añade el PEI y PLGA al Qs, por lo que daría mayor resistencia a la degradación dando así estabilidad al quitosano y agregando bioactividad a este. Para la gráfica de phase por la curvatura se observa un control por activación ya que no termina en 45° como debería para un control por difusión (Bard, A. J et al 2001).

Figura 30

Gráficas de a) Bode y b) Phase de los recubrimientos.



Nota: Autor

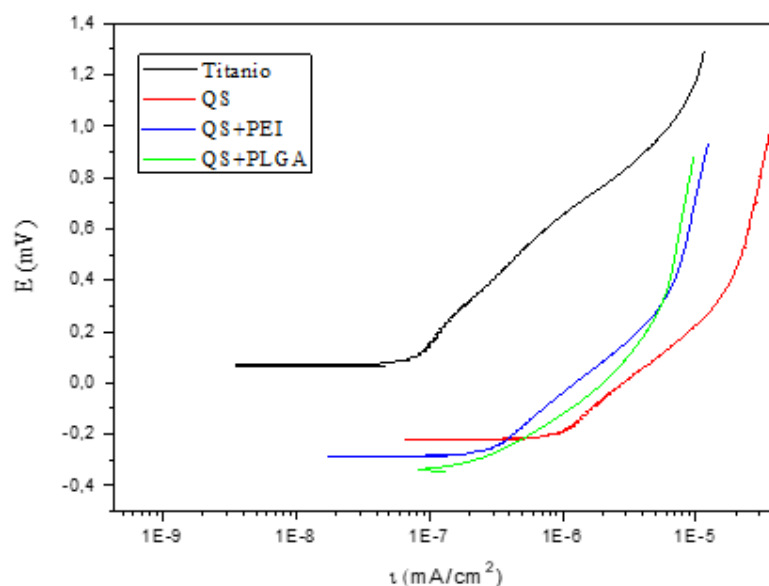
Se analizó la curva de polarización (LSV) como se observa en la (**Figura 31**), donde gráficamente se aprecia una diferencia del Ti con los recubrimientos. Se graficó separadamente cada curva (ver Apéndice K) para hallar los parámetros de i_{corr} , E_{corr} y $\beta\alpha$ que se encuentra en la (**Tabla 4**) (Bard, A. J et al 2001).

Al realizar las mediciones se obtuvieron las pendientes de las curvas de cada recubrimiento dando valores experimentales más altos a $\beta\alpha > 118$. De acuerdo con la ecuación de Butler-Volmer (Bard, A. J et al 2001) se podría decir que se aleja un control cinético. No se podría decir que en su totalidad es control por transporte puro ya que la corriente es independiente al potencial por lo que se diría que se tiene un control mixto.

Al observar que los valores i_{corr} del NPsQs son mayores a los valores i_{corr} de NPsQs-PEI y NPsQs-PLGA se muestra que tanto el PEI como PLGA le dan gran estabilidad a las NPsQs, disolviéndolo en el medio casi 10 veces más lento. Por los resultados de los espectros IR y SEM se puede afirmar que las láminas con recubrimientos de NPsQs y NPsQs-PLGA tienen mejor cobertura y mejores respuestas electroquímicas.

Figura 31

Curva de polarización del Titanio y el recubrimiento obtenido y evaluados en solución de suero fisiológico.



Nota: Autor

Tabla 4

Parámetros electroquímicos y resistencia de los recubrimientos evaluados en solución de suero fisiológico.

Muestra	OCP (mV)	I_{corr} (mA/cm ²)	E_{corr} (mV)	β_a (mV/dec)
Titanio	0,07	$7,22 \cdot 10^{-8}$	0,068	478
NPsQs	-0,2	$8,88 \cdot 10^{-7}$	-0,22	417
NPsQs-PEI	-0,26	$1,31 \cdot 10^{-7}$	-0,28	394
NPsQs-PLGA	-0,28	$2,34 \cdot 10^{-7}$	-0,33	342

5.4. Pruebas antimicrobianas

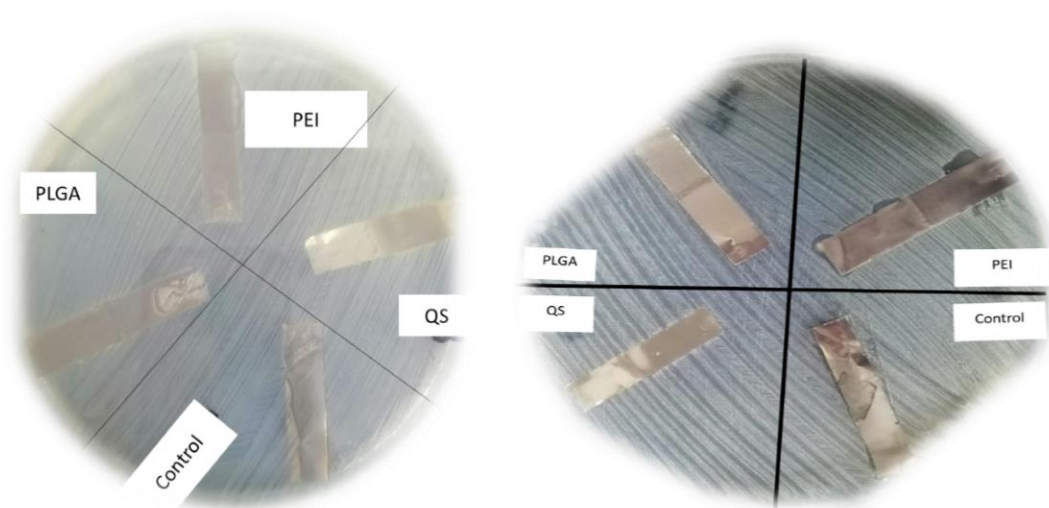
Se realizó la evaluación de la actividad antimicrobiana mediante el ensayo de difusión en disco (Kirby-Bauer) frente a las cepas de *S. epidermidis* ATCC 12228 y *S. aureus* ATCC 29213. El efecto de las muestras en cada una de las cepas fue similar. Para el control y los recubrimientos de NPsQs-PLGA y NPsQs no se observaron halos de inhibición o disminución del crecimiento alrededor o debajo de las muestras (**Figura 32**). Por el contrario, para el recubrimiento de NPsQs-PEI se observaron áreas de inhibición pequeñas alrededor de la muestra de forma discontinua, evidenciando que no hay una concentración uniforme en el recubrimiento, presentándose zonas con diferente inhibición (

Figura 33). Lo anterior puede ser debido a que el recubrimiento se depositó en una capa muy fina sobre la lámina en proceso de deposición como se puede observar en la

Figura 28, lo cual no garantiza un recubrimiento homogéneo de la misma concentración del material.

Figura 32

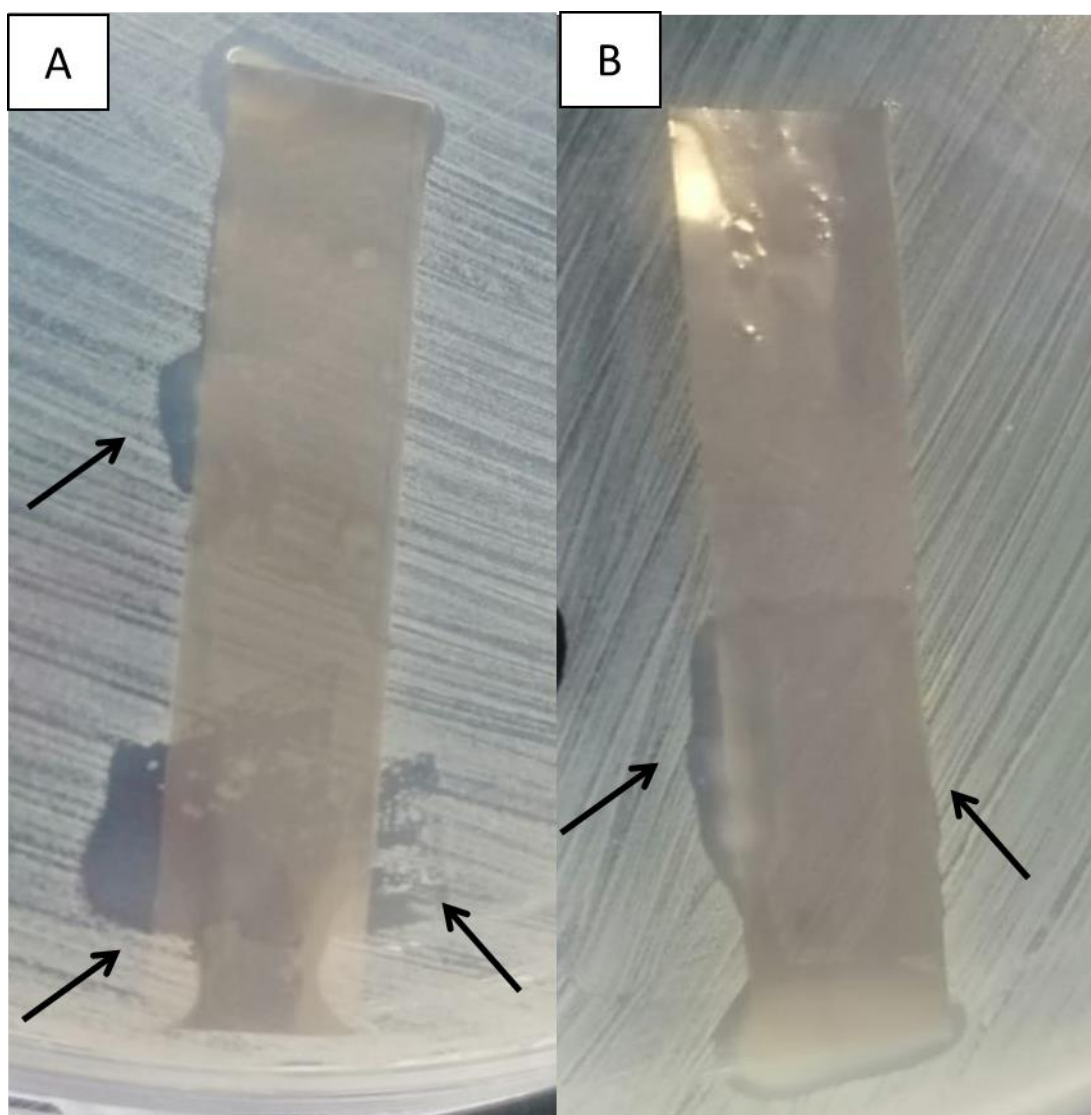
*Evaluación de actividad antimicrobiana por la metodología de Kirby-Bauer de las muestras frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*.*



Nota: Autor

Figura 33

Efecto del recubrimiento de NPsQs-PEI sobre los microorganismos evaluados A) S. epidermidis y B) S. aureus.



Nota: Autor

Se verificó el efecto de cada uno de los recubrimientos de inhibir la adhesión de microorganismos al material mediante la evaluación del número de microorganismos adheridos a la superficie. En este proceso se observó que ninguno de los recubrimientos presento una inhibición de la adhesión de los microorganismos significativa (**Tabla 5**). El

recubrimiento con NPsQs-PEI presentó una pequeña disminución de 10^6 a 10^5 y de 10^5 a 10^4 para *S. aureus* ATCC 29213 y *S. epidermidis* ATCC 12228, respectivamente. Adicionalmente es de resaltar que incluso en algunos de los recubrimientos como el de NPsQs presentó un aumento en la adhesión de microorganismos a la superficie del material. Esto puede ser ocasionado por el aumento de rugosidad en la superficie, lo cual puede incrementar el área superficial a la cual puede adherirse con mayor facilidad los microorganismos (Costa de Medeiros Dantas et al., 2016) (S. Wu, Zhang, Liu, Suo, & Li, 2018).

Tabla 5

Resultados obtenidos de la prueba de adhesión para cada una de las muestras

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Muestra	Promedio en UFC/mL	Promedio en UFC/mL
Control	1,12E+06	2,53E+05
NPsQs	2,38E+06	3,83E+06
NPsQs-PLGA	1,57E+06	5,68E+05
NPsQs-PEI	1,55E+05	6,33E+04

Para mejorar los resultados favorables en el recubrimiento del PEI, se puede considerar aumentar la concentración del PEI que recubre la superficie del material sin alcanzar concentraciones que puedan ser tóxicas para las células humanas. Adicionalmente se recomienda mejorar la homogeneidad del recubrimiento para que las diferentes zonas de la muestra presenten la misma cantidad del agente a evaluar.

6. Conclusiones

Se sintetizaron NPsQs monodispersas, esféricas con tamaños promedios de 54 nm mediante gelificación iónica con TPP. Las NPsQs se funcionalizaron con PLGA por el método de emulsión, difusión y evaporación, exhibiendo un aumento de tamaño promedio de 220 nm y una posible morfología tipo core-shell. La funcionalización de NPsQs con PEI y agitación magnética dieron como resultado nanopartículas de tamaño promedio de 7.2 nm y baja concentración.

Variaciones en el tiempo y voltaje de las deposiciones electroforéticas, generaron cambios con recubrimientos visiblemente homogéneos. Los recubrimientos óptimos fueron los 15 voltios y tiempo de 15 minutos.

Las soluciones de NPsQs Y NPsQs-PEI se depositaron sobre la superficie de titanio sin modificaciones significativas en su estructura, por el contrario, la solución de NPsQs-PLGA presentó diferencias en los espectros FT-IR de los recubrimientos, infiriendo aparición de especies.

Los resultados electroquímicos sugieren que la adición de PLGA Y PEI a las NPsQs aportan estabilidad a los recubrimientos.

Los resultados de la evaluación del número de microorganismos adheridos a la superficie sugieren que el recubrimiento de NPsQs-PEI presentó una pequeña disminución de 10^6 a 10^5 UFC/mL para *S. aureus* ATCC 29213 y de 10^5 a 10^4 UFC/mL para *S. epidermidis* ATCC 12228. Por el contrario, los recubrimientos de NPsQs y NPsQs-PLGA presentaron un aumento en la adhesión de microorganismos a la superficie del material.

7. Recomendaciones

Se recomienda evaluar la superficie de los recubrimientos antes y después de los ensayos electroquímicos para observar la degradación del recubrimiento.

Analiza y evaluar la actividad citotóxica de las nanopartículas sintetizadas y los recubrimientos para determinar las concentraciones mínimas de aplicación para el desarrollo de implantes o instrumentos quirúrgicos.

8. Divulgación de resultados

Los resultados se publicarán en eventos científicos nacionales e internacionales. Adicionalmente se elaborará un artículo científico, el cual será publicado en una revista internacional de alto impacto. Los resultados de este proyecto quedan soportados en un documento escrito en la biblioteca de la Universidad Industrial de Santander.

Referencias

- A, F. H., B, J. S., Profesora, P. D., Universidad, T., Básicas, F. D. C., & De, D. (2015). PRESENCIA DE *Staphylococcus aureus* METICILINA- RESISTENTES EN QUESO DOBLE CREMA ARTESANAL PRESENCE OF METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* INARTISAN DOUBLE CREAM CHEESE, 29–37.
- Abdul Khalil, H. P. S., Saurabh, C. K., Adnan, A. S., Nurul Fazita, M. R., Syakir, M. I., Davoudpour, Y., ... Dungani, R. (2016). A review on chitosan-cellulose blends and nanocellulose reinforced chitosan biocomposites: Properties and their applications. *Carbohydrate Polymers*, 150, 216–226. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.028>
- Ali, S. W., Joshi, M., & Rajendran, S. (2011). Synthesis and characterization of chitosan nanoparticles with enhanced antimicrobial activity. *International Journal of Nanoscience*, 10(4–5), 979–984. <https://doi.org/10.1142/S0219581X1100868X>
- Amrollahi, P., Krasinski, J. S., Vaidyanathan, R., Tayebi, L., Vashae, D., Advanced, H., ... State, O. (2015). Electrophoretic Deposition (EPD): Fundamentals and Applications from Nano- to Micro-Scale Structures, 1–27. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-15207-3>
- Ariza, J., Euba, G., & Murillo, Ó. (2008). Infecciones relacionadas con las prótesis articulares. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clinica*, 26(6), 380–390. <https://doi.org/10.1157/13123843>
- Astete, C. E., & Sabliov, C. M. (2012). Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles, 5063. <https://doi.org/10.1163/156856206775997322>
- Avcu, E., Baştan, F. E., Abdullah, H. Z., Rehman, M. A. U., Avcu, Y. Y., & Boccaccini, A. R. (2019). Electrophoretic deposition of chitosan-based composite coatings for biomedical applications: A review. *Progress in Materials Science*, 103, 69–108.

<https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2019.01.001>

Bauer, S., Schmuki, P., von der Mark, K., & Park, J. (2013). Engineering biocompatible implant surfaces: Part I: Materials and surfaces. *Progress in Materials Science*, 58(3), 261–326. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2012.09.001>

Benzoni, P., Ginestra, P., Altomare, L., Fiorentino, A., De Nardo, L., Ceretti, E., & Dell'Era, P. (2016). Biomanufacturing of a Chitosan/Collagen Scaffold to Drive Adhesion and Alignment of Human Cardiomyocyte Derived from Stem Cells. *Procedia CIRP*, 49, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.procir.2015.09.004>

Beyth, N., Houri-Haddad, Y., Baraness-Hadar, L., Yudovin-Farber, I., Domb, A. J., & Weiss, E. I. (2008). Surface antimicrobial activity and biocompatibility of incorporated polyethylenimine nanoparticles. *Biomaterials*, 29(31), 4157–4163. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.07.003>

Bivas-benita, M., Romeijn, S., Junginger, H. E., & Borchard, G. (2004). PLGA – PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium, 58, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.03.008>

Castro, Y., Ferrari, B., Moreno, R., & Durán, A. (2011). Recubrimientos sol-gel obtenidos por deposición electroforética (EPD) sobre metales. *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica Y Vidrio*, 39(6), 705–710. <https://doi.org/10.3989/cyv.2000.v39.i6.769>

Chen, Q., & Thouas, G. A. (2015). Metallic implant biomaterials. *Materials Science and Engineering R: Reports*, 87, 1–57. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2014.10.001>

Coralith, G. A., Juan, P. V., & Ramos, S. (2003). Bacteremia por *Staphylococcus epidermidis* y absceso de partes blandas en un paciente post- operado : Reporte de un caso ., 14(4), 221–223.

- Costa de Medeiros Dantas, L., Paulo da Silva-Neto, J., Souza Dantas, T., Zago Naves, L., Domingues das Neves, F., & Soares da Mota, A. (2016). Bacterial adhesion and surface roughness for different clinical techniques for acrylic polymethyl methacrylate. *International Journal of Dentistry*, 2016, 1–6.
- Cuadros-Moreno, A., Pimentel, R. C., Martín-martínez, E. S., & Yañez Fernandez, J. (2014). Light scattering dynamics in determining size of polymeric nanoparticles. *Lat. Am. J. Phys. Educ.*, 8(4), 4314-1-4314–4315.
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le, A., & Préat, V. (2012). PLGA-based nanoparticles : An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 505–522. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J. (2004). Chitosan: Antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21(6), 703–714. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.02.008>
- Di Martino, A., Sittering, M., & Risbud, M. V. (2005). Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, 26, 5983–5990.
- Diccionario de ciencias*. (2000). completense.
- Dinarvand, R., Jafarzadeh Kashi, T., Eskandarion, Esfandyari-Manesh, Samadi, Atyabi, F., & Eshraghi. (2012). Improved drug loading and antibacterial activity of minocycline-loaded PLGA nanoparticles prepared by solid/oil/water ion pairing method. *International Journal of Nanomedicine*, 221. <https://doi.org/10.2147/ijn.s27709>
- Fan, J. (2017). RSC Advances. *RSC Advances*, 7, 32786–32794. <https://doi.org/10.1039/C7RA04908K>
- Gil, F. J., & Planell, Y. J. A. (1993). B I O M E C A N I C A -O R I G I N A L E S

- Aplicaciones biomédicas del titanio y sus aleaciones. *RIOMECANICA-ORIGINALES*, 1, 34–42. Retrieved from <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/6814/Article04.pdf>
- Goycoolea, F. M., Remuñán-López, C., & Alonso, M. J. (2009). Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. *Universidad de Santiago de Compostela*, 103–131. Retrieved from <https://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/990/1024>
- Hanaor, D., Michelazzi, M., Veronesi, P., Leonelli, C., & Romagnoli, M. (2011). Anodic Aqueous Electrophoretic Deposition of Titanium Dioxide Using Carboxylic Acids as Dispersing Agents, *31*(6), 1041–1047.
- Hjort, H., Mathisen, T., Alves, A., Clermont, G., & Boutrand, J. P. (2012). Three-year results from a preclinical implantation study of a long-term resorbable surgical mesh with time-dependent mechanical characteristics. *Hernia*, *16*(2), 191–197. <https://doi.org/10.1007/s10029-011-0885-y>
- Hudzicki, J. (2016). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol Author Information. *American Society For Microbiology*, (December 2009), 1–13. Retrieved from <https://www.asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro>
- Ileana, D., Lam, Á., Ponce, I. J., & Li, B. (2012). Staphylococcus aureus , evolución de un viejo patógeno The evolution of an old pathogen called Staphylococcus aureus, *84*(2), 383–391.
- Jiang, T., Zhang, Z., Zhou, Y., Liu, Y., Wang, Z., Tong, H., ... Wang, Y. (2010). Surface functionalization of titanium with chitosan/gelatin via electrophoretic deposition: Characterization and cell behavior. *Biomacromolecules*, *11*(5), 1254–1260.

<https://doi.org/10.1021/bm100050d>

Kim, B. G., & Kang, I. J. (2006). Chitosan Nanoparticles for the Effective Vaccine Delivery System Preparation of chitosan nanoparticles Purification of chitosan, 2, 1–4.

Le Guéhennec, L., Soueidan, A., Layrolle, P., & Amouriq, Y. (2007). Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental Materials*, 23(7), 844–854.

<https://doi.org/10.1016/j.dental.2006.06.025>

Lee, E.-J., Shin, D.-S., Kim, H.-E., Kim, H.-W., Koh, Y.-H., & Jang, J.-H. (2009). Membrane of hybrid chitosan–silica xerogel for guided bone regeneration. *Biomaterials*, 30(5),

743–750. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.025>

Lee, J. Y. H., Monk, I. R., Gonçalves, A., Seemann, T., Chua, K. Y. L., Kearns, A., ...

Larsen, A. R. (n.d.). lineages of *Staphylococcus epidermidis*.

<https://doi.org/10.1038/s41564-018-0230-7>

Legaz, S., Gilbert, S. C., & Paul, S. (2014). Poly (lactic acid) and poly (lactic- co -glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery, 9, 2703–2718.

Lemus Cruz, L. M., Justo Díaz, M., Almagro Urrutia, Z., Sáez Carriera, R., & Triana, K.

(2009). Rehabilitación sobre implantes oseointegrados. *Revista Cubana de*

Estomatología, 46(1), 1–7.

Leticia María Lemus Cruz, C. E., Urrutia, Z. A., & Castell, A. C. L. (2009). Origen y

evolucion de los implantes dentales. *Revista Habanera de Ciencias Medicas*, 8(4).

Li, Y., Lee, I.-S., Cui, F.-Z., & Choi, S.-H. (2008). The biocompatibility of nanostructured

calcium phosphate coated on micro-arc oxidized titanium. *Biomaterials*, 29(13), 2025–

2032. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.01.009>

Lin, J., Qiu, S., Lewis, K., & Klibanov, A. M. (2002). Bactericidal properties of flat surfaces

- and nanoparticles derivatized with alkylated polyethylenimines. *Biotechnology Progress*, 18(5), 1082–1086. <https://doi.org/10.1021/bp025597w>
- Liu, G., Swierczewska, M., Lee, S., & Chen, X. (2010). Functional nanoparticles for molecular imaging guided gene delivery. *Nano Today*, 5(6), 524–539. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2010.10.005>
- Madhan Kumar, A., Adesina, A. Y., Hussein, M. A., Ramakrishna, S., Al-Aqeeli, N., Akhtar, S., & Saravanan, S. (2019). PEDOT/FHA nanocomposite coatings on newly developed Ti-Nb-Zr implants: Biocompatibility and surface protection against corrosion and bacterial infections. *Materials Science and Engineering: C*, 98, 482–495. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.012>
- Mainardes, R. M., Gremião, M. P. D., & Evangelista, R. C. (2006). Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. *Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(4), 523–530. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000400007>
- Marmol, Z., Paez, G., Rincon, M., Araujo, K., Aiello-Mazzarri, C., Chandler, C., & Gutierrez, E. (2012). Quitina y Quitosano, polimeros amigables. Una revision de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientifica URU*.
- Metikoš-Huković, M., Tkalčec, E., Kwokal, A., & Piljac, J. (2003). An in vitro study of Ti and Ti-alloys coated with sol–gel derived hydroxyapatite coatings. *Surface and Coatings Technology*, 165(1), 40–50. [https://doi.org/10.1016/S0257-8972\(02\)00732-6](https://doi.org/10.1016/S0257-8972(02)00732-6)
- Panyam, J., & Labhasetwar, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, 55, 329–347. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00228-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00228-4)

Parker, S. (2006). *Principles and Practice. IFLA Journal* (Vol. 32).

<https://doi.org/10.1177/0340035206070163>

Pei, P., Demeneix, B., & Behr, J. (n.d.). Polyethylenimine (PEI), 53(5).

[https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(05\)53008-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(05)53008-6)

Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 31(7), 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>

Rius, D. R. (1999). mediante tratamiento termoquímico en titanio y Ti6Al4V y caracterización de sus propiedades para aplicaciones biomédicas, 1999.

Rodas Rivera, R. (2014). Historia de la implantología y la oseointegración, antes y después de Branemark. *Revista Estomatológica Herediana*, 23(1), 39.

<https://doi.org/10.20453/reh.v23i1.46>

Rodr, N., Negr, A. V., & Alarc, H. (2010). Preparación De Partículas De Quitosano Reticuladas Con Tripolifosfato Y Modificadas Con Polietilenglicol. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 76(4), 336–354.

Sastre, R., de Aza, S., & San Roman, J. (2003). *Biomateriales*. Faenza editrice iberica.

Schermant, D., Demeneix, B., & Behr, J. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine, 92(August), 7297–7301.

Sivakami, M. S., Gomathi, T., Venkatesan, J., Jeong, H. S., Kim, S. K., & Sudha, P. N. (2013). Preparation and characterization of nano chitosan for treatment wastewaters. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 204–212.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.005>

Smith, A. M., Mancini, M. C., & Nie, S. (2009). Second window for in vivo imaging. *Nature*

Nanotechnology, 4(11), 710–711. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.326>

Taufiq Rohman, S.Pd.I, M. P. (2019). SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MICROPARTÍCULAS Y NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS BIODEGRADABLES PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE ANTIOXIDANTES Y BIOMOLÉCULAS POR VÍA ORAL. *Psikologi Perkembangan*, (October 2013), 1–224. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Taylor, R., Coulombe, S., Otanicar, T., Phelan, P., Gunawan, A., Lv, W., ... Tyagi, H. (2013). Small particles, big impacts: A review of the diverse applications of nanofluids. *Journal of Applied Physics*, 113(1). <https://doi.org/10.1063/1.4754271>

Togneri, A. M., Podestá, L. B., & Pérez, M. P. (2017). Estudio de las infecciones por *Staphylococcus aureus* en un hospital general de agudos (2002-2013), 49(1), 24–31.

Vázquez, G., & Echeverría, O. (2000). *Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas*. (F. de C. : F. de C. E. México : UNAM, Ed.). Mexico.

Wang, J., Layrolle, P., Stigter, M., & de Groot, K. (2004). Biomimetic and electrolytic calcium phosphate coatings on titanium alloy: physicochemical characteristics and cell attachment. *Biomaterials*, 25(4), 583–592. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00559-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00559-3)

Wu, L. Q., Gadre, A. P., Yi, H., Kastantin, M. J., Rubloff, G. W., Bentley, W. E., ... Ghodssi, R. (2002). Voltage-dependent assembly of the polysaccharide chitosan onto an electrode surface. *Langmuir*, 18(22), 8620–8625. <https://doi.org/10.1021/la020381p>

Wu, L. Q., Lee, K., Wang, X., English, D. S., Losert, W., & Payne, G. F. (2005). Chitosan-mediated and spatially selective electrodeposition of nanoscale particles. *Langmuir*, 21(8), 3641–3646. <https://doi.org/10.1021/la047420c>

Wu, S., Zhang, B., Liu, Y., Suo, X., & Li, H. (2018). Influence of surface topography on bacterial adhesion: A review (Review). *Biointerphases*, 13(6), 60801.

<https://doi.org/10.1116/1.5054057>

Yi, H., Wu, L. Q., Bentley, W. E., Ghodssi, R., Rubloff, G. W., Culver, J. N., & Payne, G. F. (2005). Biofabrication with chitosan. *Biomacromolecules*, 6(6), 2881–2894.

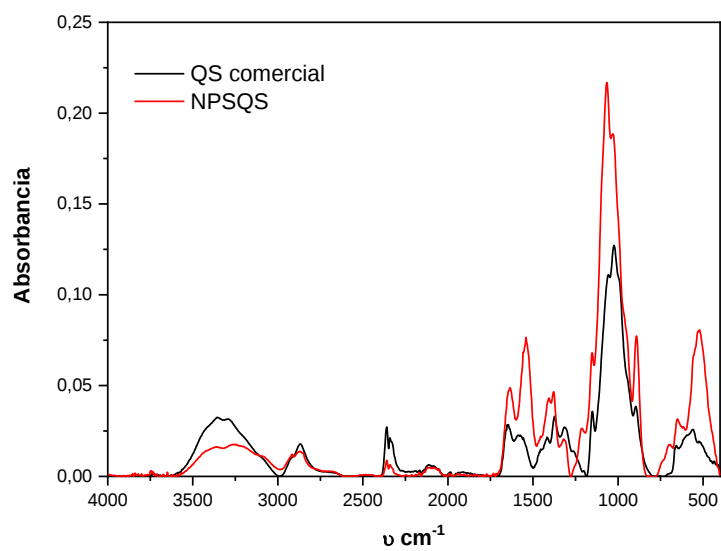
<https://doi.org/10.1021/bm050410l>

Zheng, Z., Wei, Y., Wang, G., Wang, A., Ao, Q., Gong, Y., & Zhang, X. (2009). Surface properties of chitosan films modified with polycations and their effects on the behavior of PC12 cells. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 24(1), 63–82.

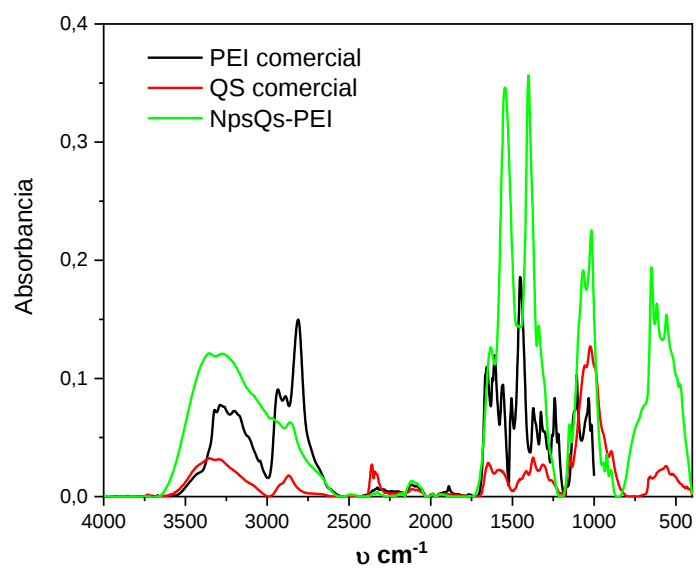
<https://doi.org/10.1177/0883911508099653>

Apéndices

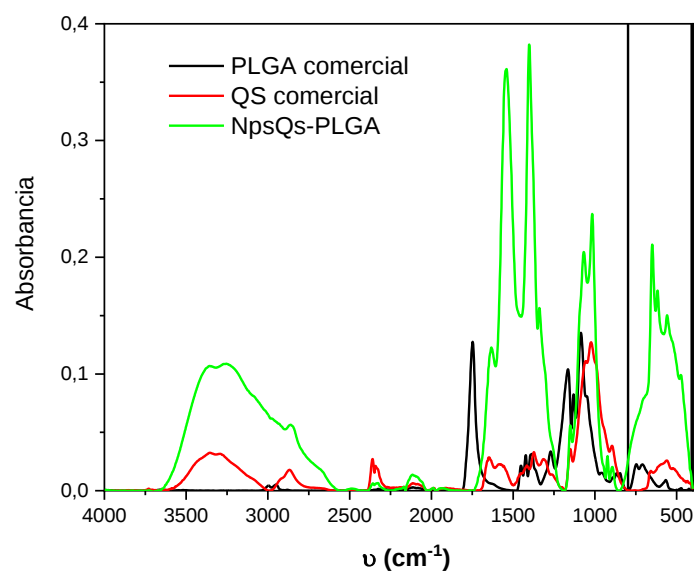
Apéndice A. Espectro FTIR. a) Qs comercial y NPsQs sintetizadas.



Apéndice B. Espectro FTIR. a) PEI comercial, Qs comercial y NPsQs-PEI sintetizadas.

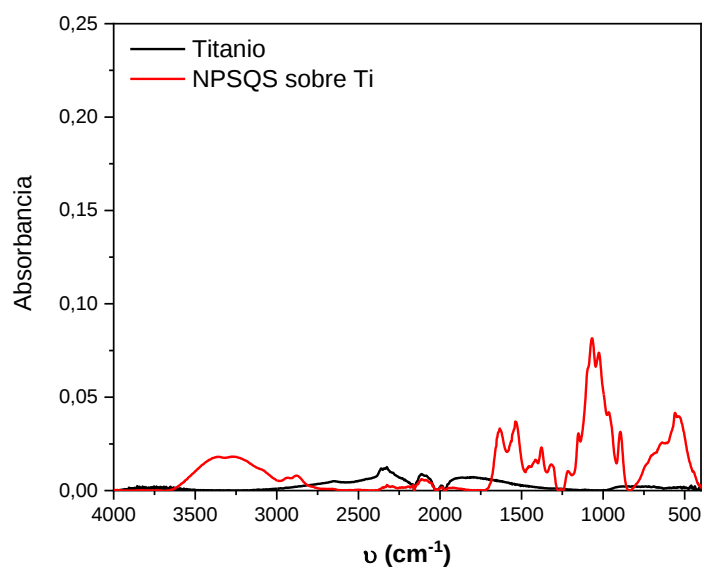


Apéndice C. Espectro FTIR. a) PLGA comercial, Qs comercial y NPsQs-PLGA sintetizadas.

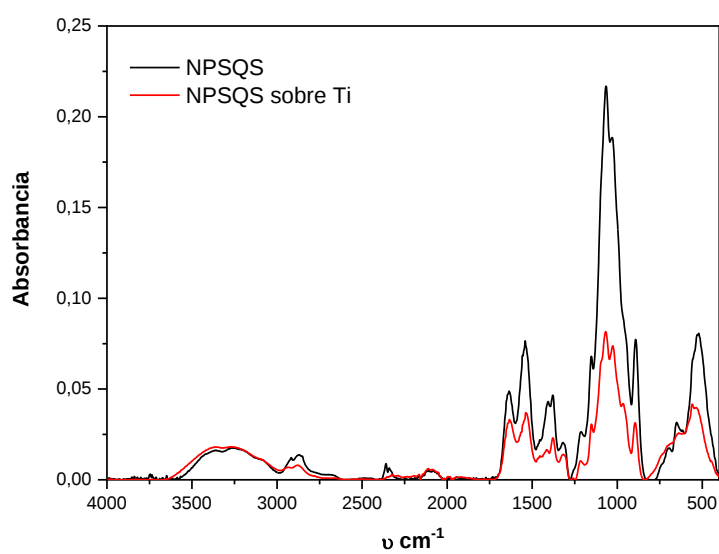


Apéndice D. Espectros FTIR. a) Lámina de Ti y lámina de Ti con recubrimientos de NPsQs.

b) Solución de NPsQs y lámina de Ti con recubrimientos de NPsQs.



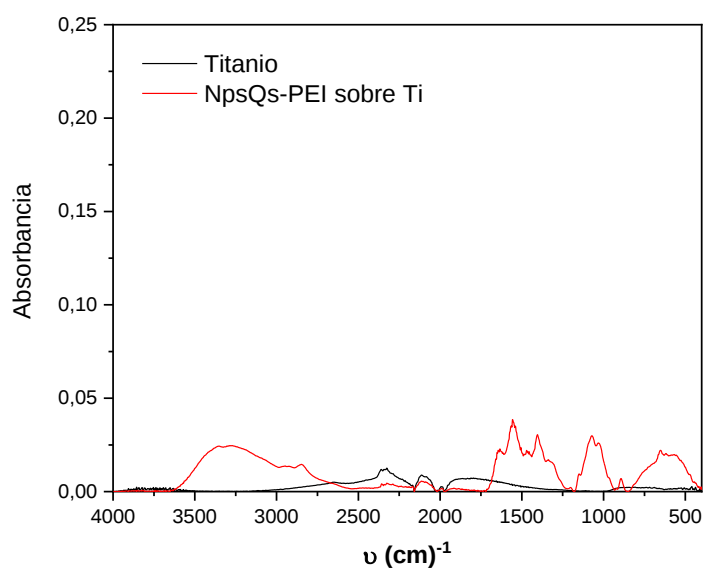
a)



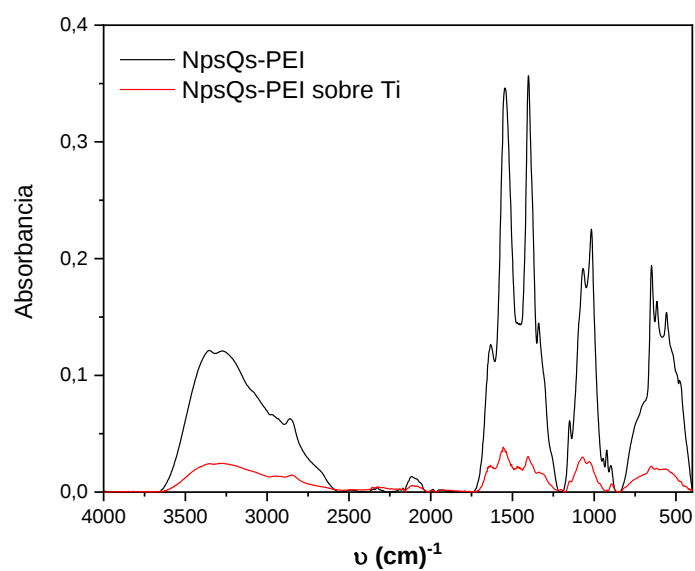
b)

Apéndice E. Espectros IR. a) Lámina de Ti y lámina de Ti con recubrimientos de NPsQs-PEI.

b) Solución de NPsQs-PEI y lámina de Ti con recubrimientos de NPsQs-PEI.

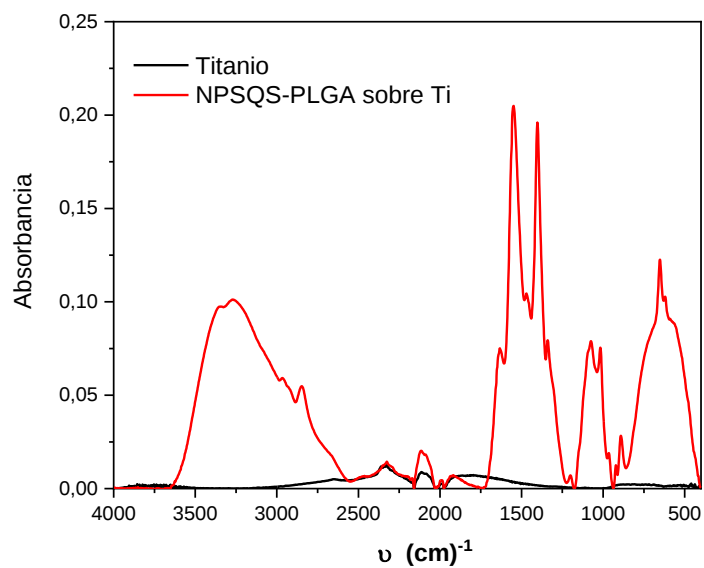


a)

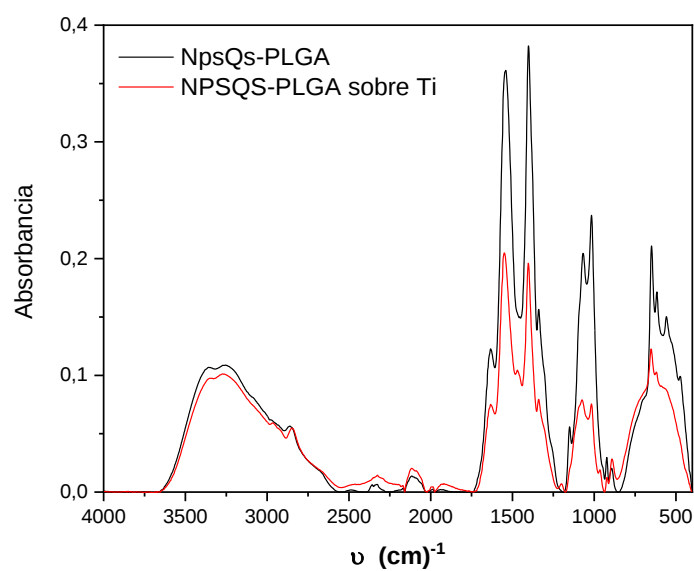


b)

Apéndice F. Espectros IR. a) Lámina de Ti y lámina de Ti con recubrimientos de NPsQs-PLGA. b) Solución de NPsQs-PLGA y lámina de Ti con recubrimientos de NPsQs-PLGA.

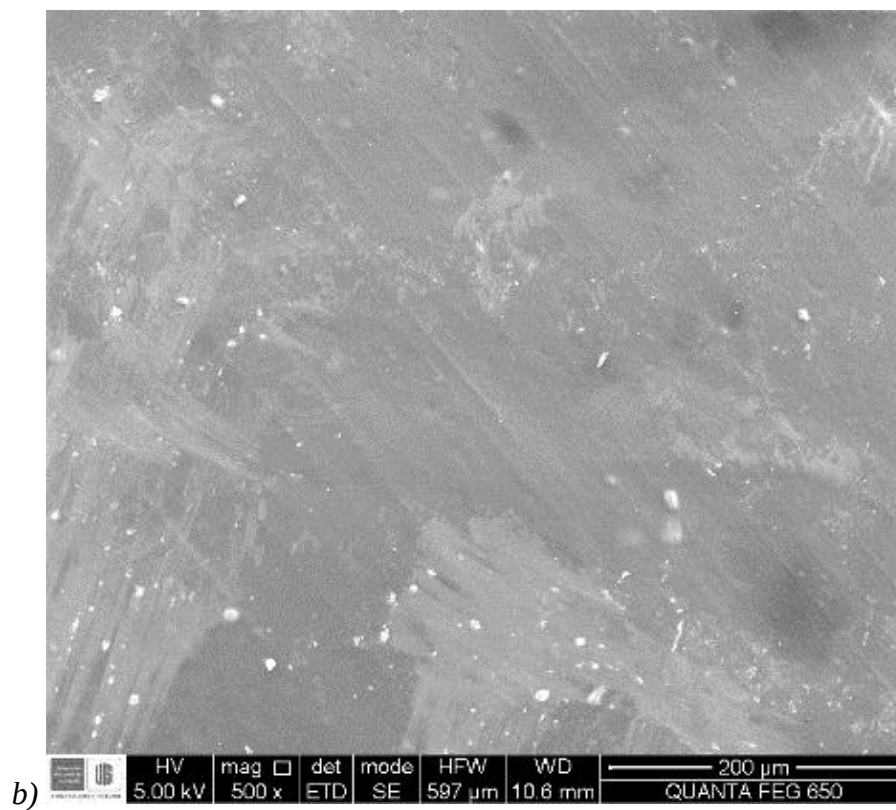
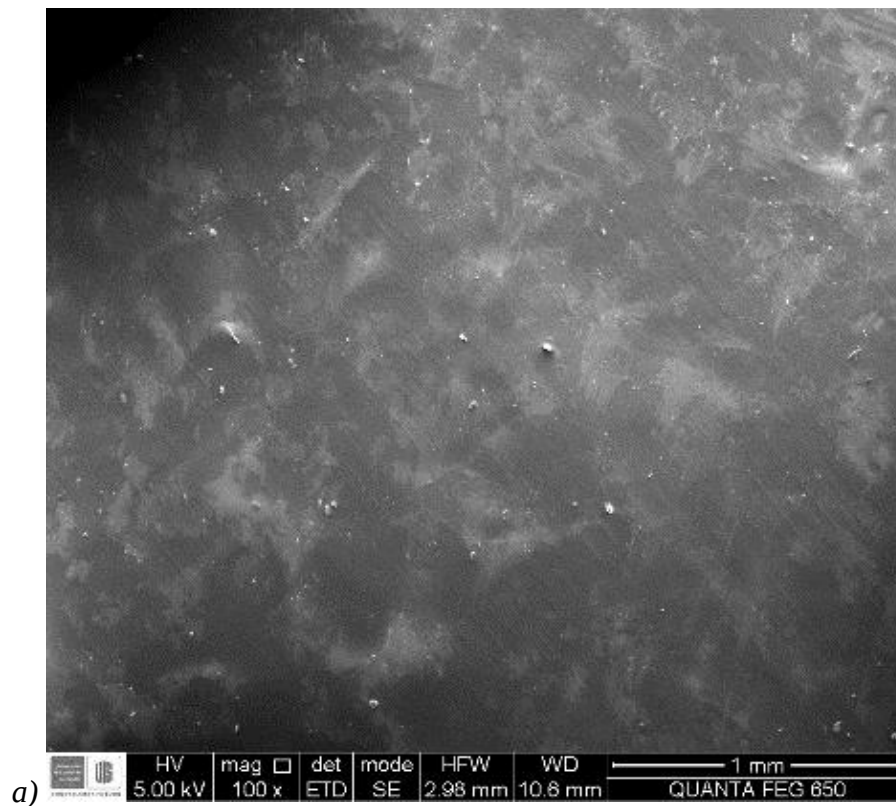


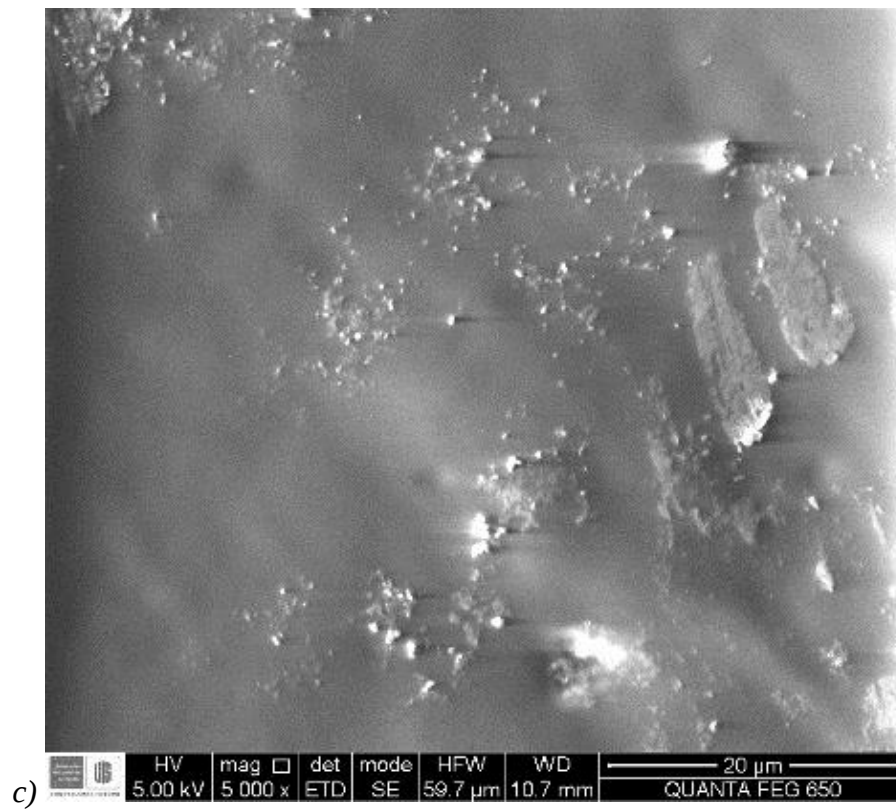
a)



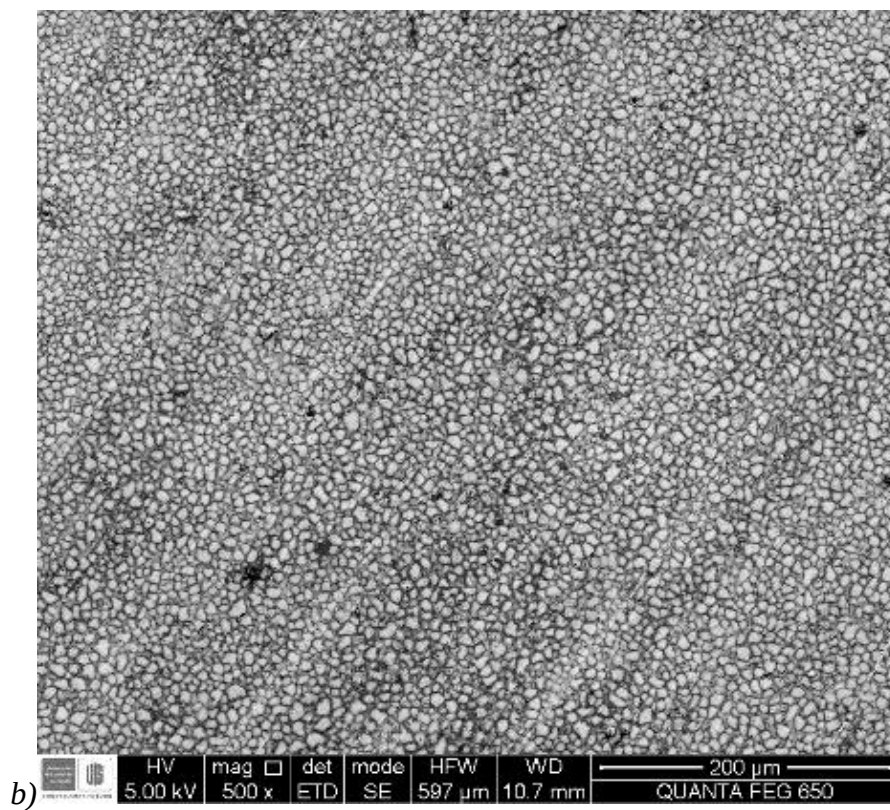
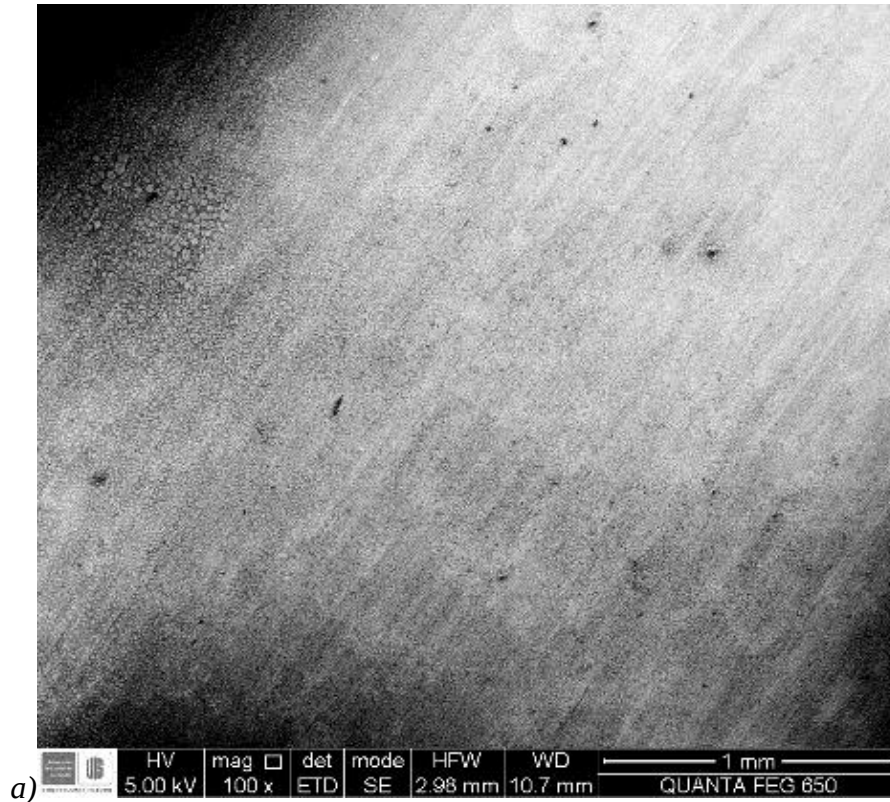
b)

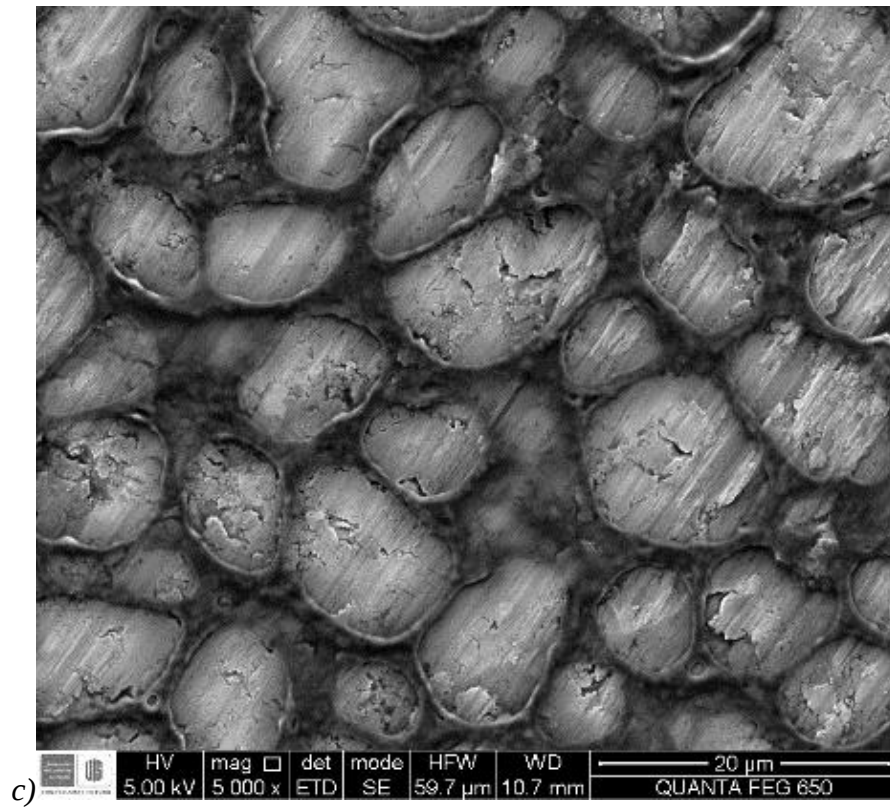
Apéndice G. Imágenes SEM de la lámina de titanio con recubrimiento de NPsQs. a) 100x. b) 500x c) 5000x.



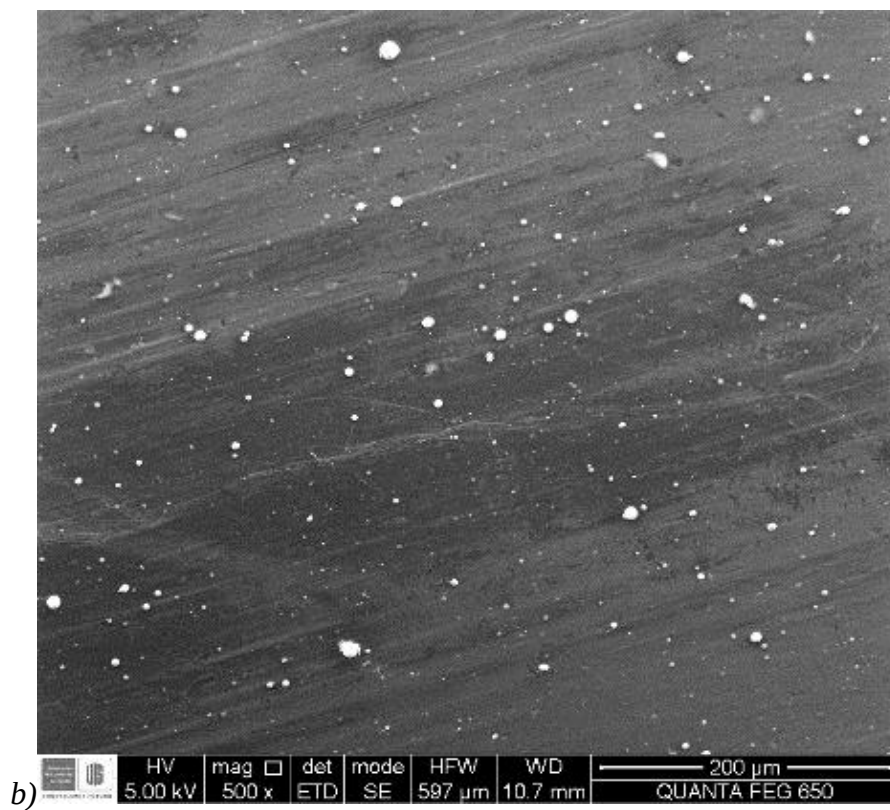
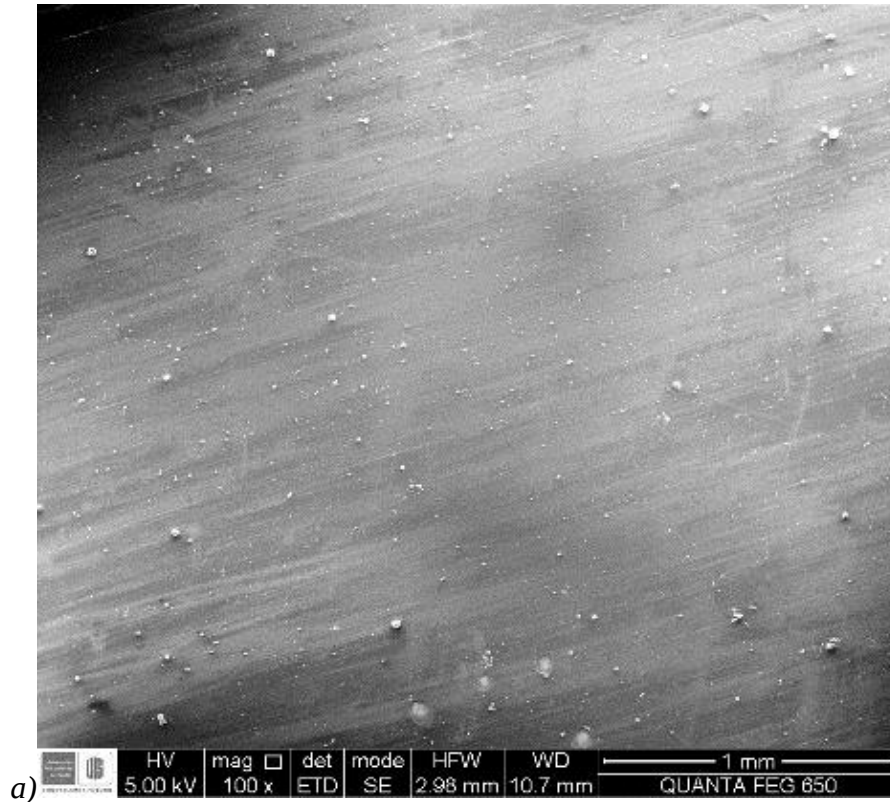


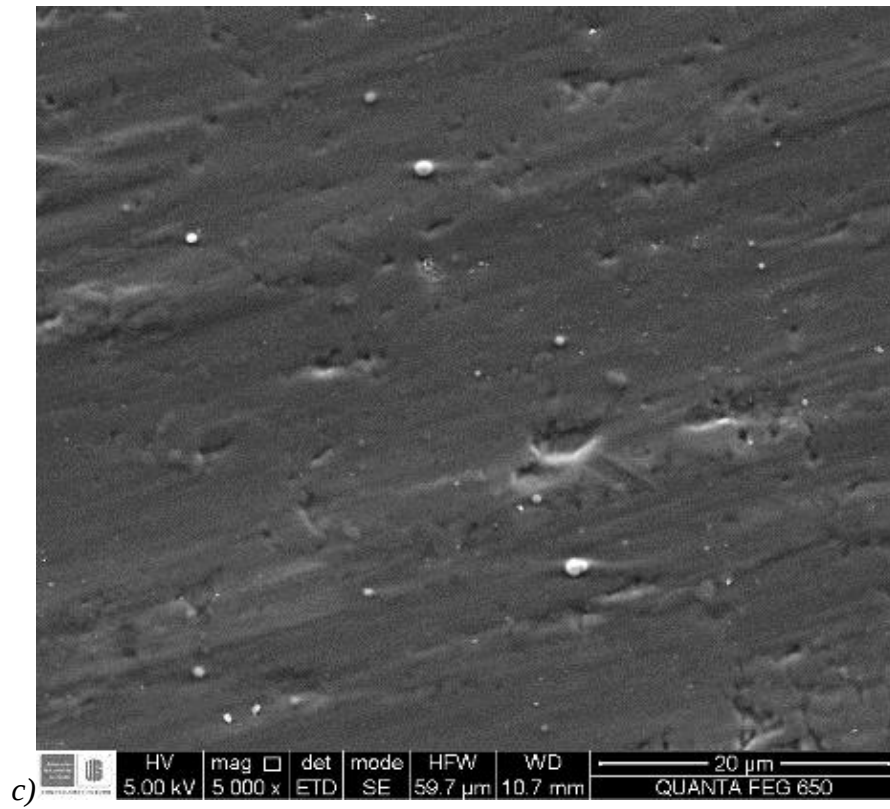
Apéndice H. Imágenes SEM de la lámina de titanio con recubrimiento de NPsQs-PEI. a) 100x. b) 500x c) 5000x.





Apéndice I. Imágenes SEM de la lámina de titanio con recubrimiento de NPsQs-PLGA. a) 100x. b) 500x c) 5000x.





Apéndice J. Láminas con recubrimientos de NPsQs a diferentes voltajes y tiempo.



Láminas depositadas a 12 voltios variando el tiempo de 5, 10 y 15 minutos de izquierda a derecha.



Láminas depositadas a 20 voltios variando el tiempo de 5, 10 y 15 minutos de izquierda a derecha.



Láminas depositadas a 25 voltios variando el tiempo de 5, 10 y 15 minutos de izquierda a derecha

Apéndice K. Graficas de LSV de los recubrimientos para la determinación de parámetros tales como i_{corr} , E_{corr} y $\beta\alpha$.

