

**COMPUESTO POLIMÉRICO CON CAPACIDADES ANTIMICROBIANAS  
USANDO NANOPARTÍCULAS DE PLATA PARA LA INTERFAZ EN ÓRTESIS Y  
PRÓTESIS EXTERNAS DE MIEMBRO INFERIOR**

**CATALINA QUINTERO QUIROZ**

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA**

**ESCUELA DE INGENIERÍAS**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**MAESTRÍA EN INGENIERÍA**

**MEDELLÍN**

**2018**

**COMPUESTO POLIMÉRICO CON CAPACIDADES ANTIMICROBIANAS  
USANDO NANOPARTÍCULAS DE PLATA PARA LA INTERFAZ EN ÓRTESIS Y  
PRÓTESIS EXTERNAS DE MIEMBRO INFERIOR**

**CATALINA QUINTERO QUIROZ**

**Trabajo de grado para optar por el título de Magister en Ingeniería**

**Directora**

**VERA ZASÚLICH PÉREZ ARIZA, PhD**

**Asesora**

**LUZ ELENA BOTERO PALACIO, PhD**

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA**

**ESCUELA DE INGENIERÍAS**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**MAESTRÍA EN INGENIERÍA**

**MEDELLÍN**

**2018**

## **GRUPO INVESTIGADOR**

### **ESTUDIANTE**

**Nombre:** Catalina Quintero Quiroz

**Cédula:** 1.017.193.372 de Medellín

**ID:** 000217761

**Teléfono:** 448 83 88 – Ext. 12400

**E-mail:** catalina.quinteroq@upb.edu.co

### **DIRECTORA**

**Nombre:** Vera Zasúlich Pérez Ariza

**Cédula:** 43.266.979 de Medellín

**E-mail:** vera.perez@upb.edu.co

**Institución:** Universidad Pontificia Bolivariana

### **ASESORA**

**Nombre:** Luz Elena Botero Palacio

**Cédula:** 43.569.887

**E-mail:** luz.boterop@upb.edu.co

**Institución:** Universidad Pontificia Bolivariana

### **GRUPO DE INVESTIGACIÓN**

Grupo de Investigación en Bioingeniería, Centro de Bioingeniería, Universidad Pontificia Bolivariana.

**Teléfono:** 448 83 88 – Ext. 12400

Nota de aceptación

---

---

---

---

---

Firma

Nombre:

Jurado

---

Firma

Nombre:

Jurado

Medellín, Noviembre 17 de 2018

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Noviembre 17 de 2018

Catalina Quintero Quiroz

“Declaro que este trabajo de grado no ha sido presentado para optar a un título, ya sea en igual forma o con variaciones, en esta o cualquier otra universidad”.

Art. 82 Régimen Discente de Formación Avanzada, Universidad Pontificia Bolivariana.

Firma autor:

Catalina Quintero Q

*Dedico este trabajo de grado a mi familia, a mis  
amigos y a todos quienes me ayudaron en la  
obtención de los resultados aquí presentados.  
A todos, muchas gracias.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios y a mi familia por el acompañamiento y el apoyo que siempre he recibido para realizar mis planes personales y profesionales. A mi padre José David, mi madre Alba Cecilia, mis hermanos Juan José y a Julián, quién se convirtió en mi asesor personal de este trabajo, con el cual logré alcanzar los objetivos que me propuse y pude acudir en cualquier momento de duda o impaciencia.

Agradezco a mi tutora Vera Zasúlich Pérez y mi asesora Luz Elena Botero quienes me apoyaron en esta idea y me acompañaron en todo mi proceso formativo y de ejecución del presente trabajo, desde el ámbito profesional y personal, ya que gracias a su experiencia y conocimiento, fue posible el desarrollo de este estudio. Igualmente, a los docentes que también me orientaron en el proceso de elaboración de este trabajo: Jorge Enrique Saldarriaga Escobar, Diana Ginette Zarate Triviño, Luis Javier Cruz Riaño, Andrés Torres Velásquez, Lina Marcela Hoyos Palacio y Piedad Felisinda Gañán Rojo.

Agradezco a mis amigos y compañeros de vida y de trabajo. De forma especial a Juan Camilo Vanegas Serna, por su apoyo y acompañamiento permanente. A Natalia Acevedo Yepes quién ha sido una excelente compañera de trabajo y un gran apoyo personal. A Paula Andrea Agredo Orozco y Flor Ángela Suarez Lopera por siempre estar presentes. A Yeixon Quintero Martinez y Jenny Geovanna Ordonez Benavidez, mis compañeros y amigos del Centro de Bioingeniería de la Universidad Pontificia Bolivariana, Jenniffer Zapata Giraldo por sus enseñanzas y a mis compañeros de la Facultad de Medicina.

Agradezco a quienes de alguna forma han contribuido a la obtención de los resultados aquí presentados. A grandes personas que tuve la oportunidad de conocer y aprender de ellos en mi pasantía en el laboratorio de bionanotecnología de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en Monterey, México. Maggie, Raúl, Juan José, Paulina, Teo, Edelin, Mayra y Sara. A las auxiliares de medicina, especialmente a Marysol, a los trabajadores de los laboratorios del bloque 8 y 11, A Rosa Elena del laboratorio de análisis de suelos de la Universidad Nacional y a los compañeros de la SIU del laboratorio de Ofidismo y Escorpionismo.

Agradezco al Centro de Bioingeniería, al Grupo de Investigaciones en Bioingeniería y al Centro Integrado para el Desarrollo de la Investigación (CIDI) de la Universidad Pontificia Bolivariana, así como al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias).

A todos, muchas gracias.

## CONTENIDO

LISTA DE ABREVIACIONES.....	12
RESUMEN.....	14
ABSTRACT.....	16
1.....INTRODUCCIÓN.....	17
1.1... Planteamiento del problema .....	18
1.2... Aportes y alcances.....	21
1.3... Objetivos .....	22
1.4... Descripción general de la tesis .....	23
2.....MARCO TEÓRICO.....	25
2.1... Prótesis y Órtesis externas .....	25
2.2... Requerimientos básicos de los materiales empleados en revestimientos protésicos e interfaces para órtesis de miembros inferiores.....	27
2.3... Materiales empleados para la fabricación de revestimientos protésicos e interfaces para órtesis .....	28
2.4... Técnicas de caracterización mecánica de materiales para <i>liners</i> ortoprotésicos.....	29
2.4.1. Ensayo de compresión .....	29
2.4.2. Ensayo de dureza .....	31
2.5... Nanotecnología y AgNPs .....	31
2.5.1. Síntesis de AgNPs.....	33
2.5.2. Caracterización de AgNPs.....	34
2.5.2.1. Caracterización por espectroscopía ultravioleta-visible .....	34
2.5.2.2. Caracterización por espectroscopía de absorción atómica.....	34
2.5.2.3. Caracterización por dispersión dinámica de luz.....	35
2.5.2.4. Caracterización por microscopía electrónica de transmisión ....	35
2.5.2.5. Análisis de rastreo de nanopartículas .....	35
2.5.2.6. Potencial zeta .....	36
3.....ESTADO DEL ARTE .....	37
4.....SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	46
4.1... METODOLOGÍA .....	46
4.1.1. Síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) .....	46



4.1.2.	Caracterización fisicoquímica de algunas propiedades de las AgNPs	47
4.1.3.	Evaluación del efecto antimicrobiano de las AgNPs	48
4.2...	RESULTADOS	51
4.2.1.	Síntesis y caracterización fisicoquímica de AgNPs	51
4.2.2.	Evaluación del efecto antimicrobiano de las AgNPs	53
4.3...	DISCUSIÓN	54
5.....	OBTENCIÓN DE UN MATERIAL ESTRUCTURADO CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA	58
5.1...	METODOLOGÍA	58
5.1.1.	Identificación de la naturaleza química de la matriz Ecoflex 00-50 ®: ....	58
5.1.2.	Definición del proceso de curado del elastómero de silicona Ecoflex 00- 50 ®: .....	59
5.1.3.	Evaluación de la dureza del material al variar la concentración de las AgNPs y la velocidad de mezclado de la matriz polimérica con las AgNPs:	60
5.2...	RESULTADOS	62
5.2.1.	Identificación de la naturaleza química de la matriz Ecoflex 00-50 ®: ....	62
5.2.2.	Definición del proceso de curado del elastómero de silicona Ecoflex 00- 50 ®: .....	63
5.2.3.	Evaluación de la dureza del material al variar la concentración de las AgNPs y la velocidad de mezclado de la matriz polimérica con las AgNPs:	64
5.3...	DISCUSIÓN	66
6.....	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y PROPIEDADES MECÁNICAS DEL MATERIAL NANOESTRUCTURADO	70
6.1...	METODOLOGÍA	70
6.1.1.	Evaluación de la actividad antimicrobiana del material compuesto con AgNPs	71
6.1.1.1.	Obtención de muestras del material:	72
6.1.1.2.	Limpieza y esterilización de las muestras:	72
6.1.1.3.	Preparación y obtención de los microorganismos:	72

6.1.1.4.Inoculación de las muestras y controles: .....	72
6.1.1.5.Incubación de todas las muestras: .....	73
6.1.1.6.Recuperación de los microorganismos de las muestras del material: .....	73
6.1.1.7.Determinación del recuento de microorganismos viables mediante el método de cultivo de vertido en placa: .....	73
6.1.2. Evaluación de la resistencia a la compresión del material compuesto con AgNPs.....	75
6.1.2.1.Análisis estadístico .....	76
6.2... RESULTADOS.....	76
6.2.1. Evaluación de la actividad antimicrobiana del material compuesto con AgNPs .....	76
6.2.2. Evaluación de la resistencia a la compresión del material compuesto con AgNPs.....	79
6.3... DISCUSIÓN .....	81
7.....CONCLUSIONES.....	86
8..... TRABAJOS FUTUROS .....	88
REFERENCIAS .....	89
ANEXOS .....	103
ANEXO 1: MATERIALES DE INTERFACES PROTÉSICAS COMERCIALES ....	103

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Materiales poliméricos empleados en dispositivos ortoprotésicos externos de miembro inferior. ....	30
Figura 2. Metodología de síntesis foto-química de AgNPs. ....	47
Figura 3. Representación de la evaluación antibacterial de las AgNPs. ....	49
Figura 4. Representación de la evaluación antifúngica de las AgNPs. ....	51
Figura 5. Espectroscopía UV-Vis de AgNPs reducida con quitosano ....	52
Figura 6. Gráfico de distribución de tamaño por porcentaje de intensidad de AgNPs al 0.1 % (v/v) en agua tipo 1. Tomado del reporte de software.....	52
Figura 7. Gráfico de la distribución aparente del potencial zeta de AgNPs diluidas al 1%(v/v) en agua tipo 1. Tomado del reporte de software.....	52
Figura 8. A. Micrografía de AgNPs tomada con TEM a una magnificación de 50 nm; B. Histograma de distribución de tamaño de AgNPs. ....	53
Figura 9. Espectros infrarrojos superpuestos de Ecoflex 00-50 ® (línea roja) y polidimetilsiloxano (línea morada).Tomado del reporte de software ....	62
Figura 10. Gráficos de barras representativas de la dureza Shore A promedio obtenidos de las muestras preparadas por los tres procesos de curado descritos en la Tabla 7. ....	63
Figura 11. Gráficas de intervalos de confianza del 95 % para las medias de dureza Shore A de las muestras del material variando la velocidad de mezcla del material (RPM), la concentración de solución diluyente de AgNPs (%) y la concentración de AgNPs (µg/mL) como se describe en la Tabla 9.A. Medias de dureza Shore A según la velocidad de mezcla del material (RPM); B. Medias de dureza Shore A según la concentración de solución diluyente de AgNPs (%); C. Medias de dureza Shore A según la concentración de AgNPs(µg/mL). ....	66
Figura 12. Diagrama de proceso de evaluación de la actividad antimicrobiana del compuesto de acuerdo con la norma ISO 22196:2011.....	74
Figura 13. Probetas de compresión, (A) Molde para probeta (B) probeta, (C) dispositivo de prueba empleado entre platos de compresión, fabricado con láminas metálicas y cuatro prensas tipo C de 2 pulgadas.....	76
Figura 14. Imágenes de placas respectivas de los compuestos con AgNPs y controles del ensayo de actividad antibacteriana de acuerdo con la norma ISO 22196: 2011 después de 24 h incubación. Fuente: Elaboración propia.....	78
Figura 15. Actividad antimicrobiana de muestras del material con concentraciones ascendentes de AgNPs contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923. ....	79

Figura 16. Actividad antimicrobiana de muestras del material con concentraciones ascendentes de AgNPs contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). .....79

Figura 17. Gráficas de intervalos de confianza del 95 % para las medias de deformación por compresión de las muestras del material variando la concentración de solución diluyente de AgNPs (%) y la concentración de AgNPs ( $\mu\text{g/mL}$ ) como se describe en la Tabla 11. A. Medias de densidad según la concentración de AgNPs ( $\mu\text{g/mL}$ ); B. Medias de densidad según la concentración de solución diluyente de AgNPs (%). .....81

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Nomenclatura para prótesis y órtesis de miembro inferior .....	25
Tabla 2. Interfaces y encajes ortoprotésicos de miembro inferior. ....	26
Tabla 3. Concentración Mínima Bactericida de AgNPs contra <i>Staphylococcus aureus</i> .....	42
Tabla 4. Concentración Mínima Fungicida de AgNPs contra <i>Candida</i> .....	42
Tabla 5. Caracterización de algunas propiedades físicoquímicas de las AgNPs	52
Tabla 6. Concentración Mínima Bactericida (CMB) y Concentración Mínima Fungicida (CMF) AgNPs a las 24 h de incubación.....	53
Tabla 7. Condiciones de preparación de elastómero de silicona Ecoflex 00- 50 ® para tres proceso diferentes. ....	59
Tabla 8. Condiciones de preparación del elastómero de silicona Ecoflex 00- 50 ® variando la velocidad de mezclado, las concentraciones de AgNPs y la concentración de solución diluyente de AgNPs. ....	61
Tabla 9. Valores de dureza Shore A para cada muestra de elastómero de silicona Ecoflex 00- 50 ® variando la velocidad de mezclado, la concentración de AgNPs y la concentración de solución diluyente de AgNPs. ....	65
Tabla 10. Muestras del material obtenido con diferentes concentraciones de AgNPs ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ y %) y solución diluyente de AgNPs (%).....	71
Tabla 11. Porcentaje de deformación por compresión de muestras de material preparados como fue descrito en la introducción de la metodología del presente capítulo y variando la concentración de AgNPs ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ y %) y concentración de solución diluyente de AgNPs (%).....	80
Tabla 12. Materiales de interfaces protésicas comerciales de miembro inferior . .....	103

## LISTA DE ABREVIACIONES

AAS	Espectroscopía de absorción atómica
AB	Prótesis por debajo de la rodilla
ADN	Ácido desoxirribunocleico
AFO	Órtesis de tobillo y pie
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de plata
AgNPs	Nanopartículas de plata
AK	Prótesis por encima de la rodilla
ATCC	Colección Americana de Tipos de Cultivos
ATP	Adenosina trifosfato
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CMB	Concentración mínima bactericida
CMF	Concentración mínima fungicida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DLS	Dispersión dinámica de luz
Espectroscopía IR	Espectroscopía infrarroja
Espectroscopía FTIR	Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier
FPS	Fotogramas por segundo
FO	Órtesis de pie
HpO	Órtesis de cadera
HKO	Órtesis de cadera y rodilla
HKAFO	Órtesis de cadera, rodilla y tobillo
KAFO	Órtesis de rodilla, tobillo y pie
KO	Órtesis de rodilla
LSPR	Resonancia de plasmón superficial
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
NTA	Análisis de rastreo de nanopartículas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PDDA	Poli-dialildimetilamonio
PET	Polietilentereftalato
PE	Polietileno de alta y baja densidad
PEG	Polietilenglicol
PVP	Polivinilpirrolidona
PDMS	Polidimetilsiloxano
PP	Polipropileno
R	Actividad antimicrobiana de materiales
ROS	Especies reactivas del oxígeno

RPM	Revoluciones por minuto
RPS	Resonancia plasmónica de superficie
RSM	Metodología de Superficie de Respuesta
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
SDS	Dodecilsulfato sódico
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
TF	Prótesis trasfemoral
TPE	Elastómeros termoplásticos
TT	Prótesis transtibial
tween 80	Polisorbato 80
UFC	Unidades formadoras de colonia
UV-Vis	Espectroscopía ultravioleta-visible

## RESUMEN

Las altas temperaturas y la humedad en los sitios de contacto entre los dispositivos ortoprotésicos de miembros inferiores y la piel de las extremidades afectadas, proporcionan un ambiente ideal para la proliferación de hongos y bacterias, los cuales generan trastornos, afecciones y dolencias de la piel. En el presente trabajo de grado de maestría, se desarrolló y se evaluó un compuesto polimérico nanoestructurado con partículas nanométricas de plata para reducir el crecimiento de algunos microorganismos para su posible aplicación en interfaces de encajes para prótesis y órtesis externas de miembros inferiores.

Inicialmente se sintetizaron nanopartículas de plata (AgNPs) mediante reducción fotoquímica. Se caracterizaron sus propiedades fisicoquímicas y se evaluaron sus propiedades antimicrobianas mediante ensayos *in vitro* empleando *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y *Candida albicans* ATCC 14053. Los efectos antibacteriales y antifúngicos de las AgNPs se determinaron por los métodos de macrodilución y microdilución con el fin de obtener la Concentración Mínima Bactericida (CMB) y la Concentración Mínima Fungicida (CMF) de la población medida. Se obtuvieron AgNPs con forma esféricas y semiesféricas, con una CMB contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) a 16.49 µg/mL y una CMF de 6.18 µg/mL contra *Candida albicans* ATCC 140553.

Con las nanopartículas de plata obtenidas y un elastómero de silicona comercial Ecoflex 00-50 ® se obtuvo un compuesto polimérico nanoestructurado. Por último, se evaluó la actividad antimicrobiana, la densidad y resistencia a la compresión de muestras del material obtenido variando las concentraciones de AgNPs y de solución diluyente de AgNPs. La máxima actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 del material obtenido se encontró en  $41.58 \pm 2.97$  % con muestras que incluyeron AgNPs y solución diluyente de AgNPs a concentraciones de 32.98 µg/mL y 25.55 % respectivamente. No se encontró diferencias estadísticamente significativas en la actividad antimicrobiana entre todas las muestras que incluyeron AgNPs y solución diluyente de AgNPs contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). Por otro lado, se obtuvo un material con dureza y resistencia a la compresión dentro del rango satisfactorio para el uso en interfaces ortoprotésicas externas de miembros inferiores.

Estos resultados indican que el material obtenido puede contribuir a la disminución de la proliferación de microorganismos, reduciendo los riesgos de infección en piel, por lo cual podría ser implementado en la fabricación de interfaces ortoprotésicas de miembro inferior.



**Palabras clave:** Compuesto polimérico, nanopartículas de plata, órtesis, prótesis, interfaces, antibacterial, miembro inferior.

## ABSTRACT

The high temperatures and humidity at the contact sites between the ortho-prosthetic devices of lower limbs and the skin of the affected limbs, provides an ideal environment for the proliferation of fungus and bacterias, which generate disorders, affections and skin ailments. In the present master's degree work, a nano-structured polymeric composite with nano-metric silver particles was developed and evaluated to reduce the growth of some microorganisms for its possible application in socket interfaces for external prosthetics and orthoses of lower limbs.

Initially, silver nanoparticles (AgNPs) were synthesized by photochemistry reduction. Its physicochemical properties were characterized and its antimicrobial properties were evaluated by *in vitro* tests using *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), and *Candida albicans* ATCC 14053. The antibacterial and antifungal effects of the AgNPs were determined by the macrodilution and microdilution method to obtain the Minimum Bactericidal Concentration (CMB), and the Minimum Fungicide Concentration (CMF) of the population measured. Semi-spherical and spherical-shaped AgNPs were obtained, with a CMB against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at 16.49  $\mu\text{g/mL}$  and a CMF of 6.18  $\mu\text{g/mL}$  against *Candida albicans* ATCC 140553.

With the silver nanoparticles obtained and a commercial silicone elastomer Ecoflex 00-50  $\text{\textcircled{R}}$ , a nanostructured polymeric compound was obtained. Finally, the antimicrobial activity and the density and resistance to compression of samples of the material obtained were evaluated by varying the concentrations of AgNPs and diluent solution of AgNPs. The maximum antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 of the material obtained was found in 41.58%  $\pm$  2.97 with samples that included AgNPs and diluent solution of AgNPs at concentrations of 32.98  $\mu\text{g/mL}$  and 25.55 % respectively. No statistically significant differences were found in the antimicrobial activity among all the samples that included AgNPs and diluent solution of AgNPs against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). On the other hand, a material with hardness and compressive strength was obtained within the satisfactory range for use in external orthoprosthetic interfaces of lower limbs.

These results indicate that the material obtained can contribute to the decrease of the proliferation of microorganisms, reducing the risks of skin infection, which could be implemented in the manufacture of orthoprosthetic lower limb interfaces.

**Keywords:** Polymeric composite, silver nanoparticles, orthoses, prosthesis, interfaces, antibacterial, lower limb.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los problemas en las funciones corporales son deficiencias tales como las limitaciones en la actividad física, problemas en las funciones o estructuras corporales y la pérdida o ausencia de partes anatómicas del cuerpo [1]. Aproximadamente 200 millones de personas a nivel mundial presentan dificultades motoras funcionales. En Colombia el 29 % de las personas con discapacidad presentan limitaciones para moverse o caminar y entre el 5 y 10 % presentan amputación de alguna extremidad [2]. Estadísticamente las amputaciones de miembro inferior son mucho más frecuentes que las de miembro superior [3]. Como solución a esta problemática los dispositivos ortoprotésicos representan una alternativa útil para rehabilitar una persona que ha sufrido un trauma o pérdida de alguna extremidad [4]. Sin embargo, existen problemas relacionados con el uso de órtesis y prótesis de miembro inferior [5].

Uno de los mayores problemas asociados al uso de los dispositivos ortoprotésicos, son las afecciones dermatológicas, generadas por el acoplamiento del dispositivo con la extremidad, las fuerzas generadas al interior de los dispositivos al realizar el ejercicio de la marcha que favorece la presencia y la proliferación de hongos y bacterias en la piel de los pacientes. Estos microorganismos son los causantes de grandes afecciones, infecciones e irritaciones que suscitan una tendencia de los pacientes a abandonar estos dispositivos, lo que interfiere con sus actividades cotidianas, de participación en la sociedad, relaciones interpersonales y desempeño laboral. Se estima que entre el 32 % y 90.90 % de la población con amputación de miembros inferiores que hacen uso de dispositivos ortoprotésicos, presentan al menos un problema de la piel del muñón del miembro amputado o extremidad afectada [6]–[12].

De esta forma, el presente trabajo muestra el desarrollo un material compuesto por nanopartículas de plata (AgNPs) que posee la capacidad funcional de reducir la proliferación de algunas bacterias y puede ser empleado en un futuro como interfaz de dispositivos ortoprotésicos de miembro inferior. Este objetivo general se ejecutó a través de la síntesis de AgNPs, las cuales fueron caracterizadas e incorporadas en una matriz polimérica. Se desarrolló un compuesto nanoestructurado, al cual se le evaluó su capacidad antimicrobiana y algunas propiedades mecánicas para la implementación en dispositivos ortoprotésicos de miembro inferior. Así, se obtuvo un material con la capacidad de reducir la proliferación microbiana por contacto y con propiedades mecánicas aceptables para el uso como interfaz de dispositivos ortoprotésicos, con el cual se espera fortalecer el campo de aplicación de nuevos materiales nanoestructurados a nivel regional y nacional, específicamente en el sector salud.

## 1.1. Planteamiento del problema

Según estimativos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el año 2011, más de mil millones de personas en todo el mundo poseían alguna forma de discapacidad, de las cuales aproximadamente 200 millones contaban con dificultades en su funcionamiento motor. Además, se estima que el número de personas con discapacidad seguirá aumentando durante los próximos años [13]. En Colombia se ha registrado que el 6.4 % de la población posee algún tipo de discapacidad, de los cuales el 29 % presenta limitaciones para moverse o caminar [2]. Igualmente, entre el 5-10 % de las personas con discapacidad en nuestro país presentan amputación de alguna extremidad [14].

Los problemas de funciones corporales son generados por diversas circunstancias, dentro de las cuales se encuentran las lesiones traumáticas como los accidentes de tránsito y la violencia [15]–[17]. Según estimaciones de la OMS, a nivel mundial, anualmente cerca de 50 millones de personas quedan lesionadas por accidentes de tránsito, donde más del 90 % de los casos ocurren en países de ingresos bajos y medianos [18]. En Colombia, durante el 2013 se registraron 48.042 casos atendidos por este tipo de accidentes, de los cuales el 87.06 % corresponde a lesiones no fatales [14]. Por otra parte, Colombia ocupa los primeros lugares en víctimas de guerra a nivel mundial, donde el conflicto armado es una de las principales causas de limitaciones físicas y amputaciones de miembros inferiores [19]. Hasta el 30 de abril de 2018 se han reportado un total de 11.567 víctimas de Minas Antipersonal (MAP) y Municiones sin Explotar (MUSE), de los cuales el 80 % han resultado heridas, que en gran medida requieren procesos de rehabilitación [19]. De esta forma, las lesiones traumáticas son las principales causas de problemas funcionales y de amputación de extremidades inferiores que en la mayoría de los casos, requieren el uso de prótesis u órtesis externas [20]. Se estima que por lo menos más de 100 millones de personas a nivel mundial requieren órtesis o prótesis externas (cerca del 1.5 % de la población) [21] y se espera que para el 2020 el número de personas que utilicen prótesis aumente a 2.4 millones, mientras que de órtesis sea de 7.3 millones [22].

El uso de dispositivos ortoprotésicos representa una alternativa útil para modificar las características estructurales o funcionales del sistema neuro-músculo-esquelético de una persona que ha sufrido traumas o pérdida de miembro inferior [4]. De esta forma, se espera que las órtesis y prótesis puedan mejorar, mantener o recuperar parte de las funciones normales, mientras que brindan comodidad y buena apariencia a quienes posean dificultades en el movimiento de sus extremidades, permitiéndoles retornar a un estilo de vida funcional [23]. Sin embargo, existen problemas relacionados con la interacción directa entre la piel de

los usuarios y las órtesis o prótesis, los cuales limitan los objetivos técnicos de los dispositivos y afectan directamente la salud y bienestar de los pacientes [5].

El correcto uso de los dispositivos ortoprotésicos requiere un ajuste adecuado con el usuario y durante un largo periodo de tiempo. Sin embargo, se estima que entre el 32 % y 90.90 % de la población con amputación de miembros inferiores que hacen uso de prótesis, presentan al menos un problema de la piel del muñón del miembro amputado o extremidad afectada [6]–[12].

Los problemas dermatológicos se pueden producir a lo largo de todo el ciclo de vida de los dispositivos y son generados por diversas circunstancias. Debido al ajuste apretado y el calor generado por el encaje de la prótesis u órtesis, existe una tendencia de la piel a transpirar, lo que genera un aumento en la humedad provocando lesiones e infecciones en la piel. Esto es sumado a las reacciones alérgicas causadas por ungüentos empleados en el cuidado de la piel y a los trastornos inducidos mecánicamente debido a las fuerzas de cizallamiento y estrés que resultan en la destrucción de la dermis, lesiones que estimulan la proliferación de tejidos como ampollas, úlceras, callosidades, edemas en el muñón o miembro inferior, ampollas, liquenificación, hiperqueratosis verruciforme, quistes epidermoides, acro-angiodermatitis, hiperplasia verrugosa, celulitis, edemas y eczemas atópicos [24]. Estos problemas se pueden incrementar por el tiempo de uso del dispositivo [24].

Hall y colaboradores [8], al estudiar la prevalencia de problemas dermatológicos en amputados transtibiales, reportaron que el 78 % de los pacientes evaluados presentaba sudoración excesiva, picazón y enrojecimiento de la piel. De igual forma, Dillingham y colaboradores [9], encontraron que alrededor de una cuarta parte de las personas encuestadas amputadas por lesiones, reportaban problemas de irritación en la piel, heridas o dolor constante en el miembro residual, al estudiar la satisfacción en el uso de las prótesis y salud relacionada con la calidad de vida de las personas. Asimismo, K. Hagberg y R. Branemark, al estudiar individuos que hacían uso de prótesis transtibial, amputados por razones no vasculares, en su mayoría traumas, encontraron que los problemas más frecuentes que condujeron a la reducción en la calidad de vida fueron el calor y la sudoración en el encaje protésico (72 %) [25].

Estas condiciones de humedad, acompañados de los trastornos generados mecánicamente por el uso de los dispositivos ortoprotésicos, favorecen el crecimiento de hongos y bacterias que producen frecuentemente afecciones como foliculitis, forunculosis, pioderma, hidradenitis, erupciones e infecciones, sarpullido, enrojecimiento e irritación en la piel de la extremidad afectada [10]. Entre las especies de bacterias que comúnmente colonizan esta zona, se encuentra

*Staphylococcus aureus*, causante de forúnculos, impétigo, celulitis y síndrome estafilocócico de la piel escaldada entre otras afecciones [26], [27]. La interacción constante de la piel con los dispositivos ortoprotésicos también proporciona un ambiente ideal para el crecimiento del hongo *Candida albicans*, que genera erupciones rojizas, infecciones de los folículos pilosos, abrasiones en la piel, dolor en las articulaciones y picazón entre otras afecciones [24], [28]–[30]. Las infecciones cutáneas son más frecuentes en pacientes inmunocomprometidos y debido a la presencia de microorganismos, los trastornos de la piel pre-existentes pueden reaparecer [31].

Estas infecciones fúngicas y bacterianas pueden ser difíciles de erradicar por completo a causa del ambiente húmedo, calor y maceración de las zonas implicadas. Las terapias pueden incluir la aplicación de fungistáticos o cremas fungicidas si las condiciones no son graves, o de agentes anti-fúngicos orales. Sin embargo, estos tratamientos que se desarrollan durante largos periodos de tiempo, requieren de disciplina, motivación de los pacientes y son limitados por los posibles efectos secundarios además de la correcta dosificación de los medicamentos [32], [30]. Igualmente, la creciente resistencia bacteriana como resultado de la evolución natural, el abuso de antibióticos en seres humanos, animales y prácticas agrícolas, son situaciones que incrementan la necesidad de desarrollar alternativas eficientes para el control del crecimiento microbiano [33], [34].

Para evitar estos problemas, algunas personas optan por lavar frecuentemente el muñón de la extremidad amputada, usar productos para la limpieza y antibacteriales comunes. No obstante, estas medidas pueden incrementar las posibilidades de presentar trastornos, afecciones y dolencias de la piel en contacto con el dispositivo [12]. En consecuencia, la mayoría de los usuarios deciden restringir el uso de los dispositivos ortoprotésicos, primordialmente por las consecuencias de uso que estos pueden generar, lo cual interfiere con sus procesos de rehabilitación, actividades cotidianas, desempeño social y deterioran significativamente la capacidad para trabajar de las personas [7], [12].

Dada la alta prevalencia de los problemas relacionados con las afecciones generadas en la piel de los usuarios, por el uso de los dispositivos ortoprotésicos externos, y las fuerzas aplicadas sobre los dispositivos, que desgastan las interfaces ortoprotésicas, se debe considerar el desarrollo de materiales que posean la capacidad funcional de controlar la proliferación de bacterias y hongos en los sitios de contacto entre los dispositivos y la piel de los usuarios [7]. Así, se plantea en este trabajo la siguiente pregunta de investigación: ¿Cómo se puede desarrollar y evaluar un material compuesto con capacidades antimicrobianas para su aplicación en interfaces de órtesis y prótesis de miembro inferior?

## 1.2. Aportes y alcances

En Colombia existen dos causas traumáticas importantes en torno a la discapacidad relativa al movimiento de miembros inferiores: los accidentes de tránsito y el conflicto armado. Estadísticamente las amputaciones de miembro inferior son mucho más frecuentes que las de miembro superior. De acuerdo con Ramos [3], esta relación es aproximadamente de 3 a 10. Esta problemática se trata con dispositivos ortoprotésicos externos que facilitan el reintegro social de los afectados, sin embargo, el uso de estas ayudas puede generar reacciones adversas en la piel de los usuarios, las cuales están asociadas a la compresión de los tejidos durante largos periodos de tiempo, esfuerzos y concentraciones de tensiones, al aumento de la temperatura y la humedad; factores que favorecen la aparición de bacterias y hongos que producen complicaciones dermatológicas. Como consecuencia de estos problemas, es común que los pacientes abandonen el uso de estos dispositivos, lo que dificulta el desarrollo de sus actividades cotidianas [7]. Debido a esto, se hace pertinente el desarrollo de nuevos materiales para futuras aplicaciones ortoprotésicas.

El alcance del presente trabajo de grado consiste en obtener un material compuesto nanoestructurado con capacidades antimicrobianas que permita en un futuro, la obtención de interfaces y *liners* ortoprotésicos externos de miembros inferiores. Para esto se sintetizaron AgNPs, se caracterizaron y se incorporaron en una matriz polimérica. Finalmente, se evaluó algunas de sus propiedades mecánicas y la capacidad antimicrobiana del material obtenido. El desarrollo de estos objetivos no contempla la obtención de prototipos funcionales ni su evaluación en pacientes.

En el presente trabajo de grado no se realizaron evaluaciones de biocompatibilidad del compuesto polimérico obtenido. Sin embargo, a pesar de que se ha considerado que las AgNPs en bajas concentraciones no son tóxicas para los seres humanos [31], [35], [36], es necesario identificar los daños citotóxicos y genotóxicos que el material desarrollado pueden ocasionar. Además, pese a que la matriz empleada para el material desarrollado es considerada segura para el uso en la piel por el fabricante, la incorporación de AgNPs puede generar cambios fisicoquímicos del material compuesto que afecten los tejidos humanos. Es así como la evaluación la inocuidad del material obtenido para el uso en personas, que permitan conocer los efectos de las AgNPs en las células humanas se plantea como trabajo futuro derivado del presente trabajo de grado.

Por otro lado, los resultados de este trabajo contribuirán en el mejoramiento de los diseños de las interfaces actuales para desarrollar dispositivos que posean la capacidad de reducir la proliferación de hongos y bacterias y propiedades

mecánicas requeridas por los entes reguladores. De esta forma, se fortalecerá el campo de aplicación de nuevos biomateriales nanoestructurados a nivel regional y nacional.

Este trabajo pretende apoyar El Plan Nacional de Desarrollo de Colombia 2014-2018 del Gobierno nacional en los esfuerzos por asistir integralmente a la población en discapacidad física a través de la implementación de procesos y medios para rehabilitar a este tipo de población y así permitirles desempeñar un rol en condiciones de normalidad frente a la comunidad y el contexto laboral [37].

Por último, gracias al desarrollo del presente trabajo de grado, la Universidad Pontificia Bolivariana fortalecerá su área de trabajo en los campos relacionados con nuevos materiales, nanotecnología aplicados a la ingeniería y a la salud, en investigaciones encaminadas a la rehabilitación física de miembros inferiores, relacionadas con el desarrollo de dispositivos médicos orto-protésicos que beneficien el reingreso social y calidad de vida de las personas con discapacidad.

### **1.3. Objetivos**

#### **Objetivo general**

Desarrollar un compuesto polimérico con capacidades antimicrobianas, mediante el uso de nanopartículas de plata, para su aplicación en órtesis y prótesis externas de miembro inferior.

#### **Objetivos específicos**

- Sintetizar nanopartículas de plata para su aplicación en un compuesto polimérico
- Caracterizar las propiedades físicas y funcionales de las nanopartículas de plata sintetizadas.
- Obtener un material estructurado con nanopartículas de plata.
- Evaluar la actividad antimicrobiana y propiedades mecánicas del material nanoestructurado.



#### 1.4. Descripción general de la tesis

En general, el desarrollo de esta tesis se divide en ocho capítulos, donde los tres primeros corresponden a la introducción, marco teórico y estado de arte. El capítulo 4, 5 y 6 desarrollan los cuatro objetivos específicos planteados en la sección 1.3 de este apartado, los cuales contienen metodología, resultados y discusión. Para finalizar, los capítulos 7 y 8 presentan las conclusiones y el trabajo futuro. A continuación, se describen los capítulos:

El capítulo 1 presenta una introducción general del trabajo, un planteamiento del problema que se desea abordar, los aportes y alcances obtenidos en el desarrollo de la tesis. Igualmente, presenta un objetivo general y cuatro específicos que permiten alcanzar la meta propuesta, así como la descripción general de la tesis aquí planteada.

El capítulo 2 contiene un marco teórico, que incluye una descripción de las definiciones básicas requeridas para el desarrollo de este trabajo de grado, como los conceptos asociados con prótesis y órtesis externas, los materiales, técnicas y requerimientos de uso para estos dispositivos, las técnicas de caracterización mecánicas que se emplean en este trabajo y un acercamiento a las nanopartículas de plata (AgNPs) y sus métodos de caracterización.

El capítulo 3 describe un estado del arte relacionado con el uso de interfaces ortoprotésicas para miembros inferiores, los materiales más empleados en esta aplicación y la necesidad que ha surgido para investigar nuevas alternativas que permitan reducir la presencia de microorganismos al hacer uso de estos dispositivos. De esta forma, en este capítulo también se realiza una revisión de las capacidades antimicrobianas de las AgNPs y su aplicación en polímeros.

El capítulo 4 describe el desarrollo del objetivo específico 1 y 2, en los cuales se sintetizan AgNPs por el método de reducción foto-química de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) empleando quitosano y radiación ultravioleta. Las AgNPs se caracterizaron fisicoquímicamente y se evaluó su capacidad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y *Candida albicans* ATCC 14053.

El capítulo 5 presenta el desarrollo del tercer objetivo específico, el cual consistió en obtener un material compuesto por elastómero de silicona y AgNPs sintetizadas bajo las condiciones descritas en el capítulo 4. Para esto, se definió el proceso de curado del material. Por último se evalúa la dureza del compuesto polimérico al variar las revoluciones por minuto del proceso de mezclado, la concentración de AgNPs y de solución diluyente de AgNPs.

El capítulo 6 desarrolla el último objetivo específico que consiste en realizar la evaluación de la actividad antimicrobiana de muestras del material obtenido y, por otro lado, se presenta la caracterización de la resistencia a la compresión del material compuesto con diferentes concentraciones de AgNPs y de solución diluyente de AgNPs.

El capítulo 7 presenta las conclusiones para cada uno de los objetivos específicos planteados para lograr el cumplimiento del objetivo general de este trabajo de grado. Por último, el capítulo 8 presenta los trabajos a futuros que se podrían seguir desarrollando gracias a los resultados aquí presentados.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Prótesis y Órtesis externas

Según la norma ISO 8549-1, las prótesis ortopédicas son dispositivos que se utilizan para reemplazar de forma parcial o total un segmento de una extremidad ausente o deficiente. El objetivo principal de las prótesis es proporcionar a las personas con amputaciones la posibilidad de recuperar sus capacidades funcionales, e idealmente, deben convertirse en extensiones del cuerpo del usuario [4], [38]. Las prótesis de miembro inferior se pueden categorizar de acuerdo al nivel de amputación como se detalla en la Tabla 1. Las prótesis transtibiales son las más comunes y están compuestas por un encaje protésico, un pilar y un pie protésico, mientras que las transfemorales adicionalmente poseen una articulación protésica de rodilla [38]. Las órtesis son dispositivos aplicados externamente que se utilizan para modificar las características estructurales y funcionales del sistema neuromuscular y esquelético [4]. Estos dispositivos se clasifican en un sistema de nomenclatura en inglés según los segmentos anatómicos y las articulaciones que abarcan [39], [4], [40], [41].








Tabla 1. Nomenclatura para prótesis y órtesis de miembro inferior

Prótesis		Órtesis	
AK	Prótesis por encima de la rodilla	FO	Órtesis de pie
AB	Prótesis por debajo de la rodilla	AFO	Órtesis de tobillo y pie
TT	Prótesis transtibial	KO	Órtesis de rodilla
TF	Prótesis trasfemoral	KAFO	Órtesis de rodilla, tobillo y pie
		HpO	Órtesis de cadera
		HKO	Órtesis de cadera y rodilla
		HKAFO	Órtesis de cadera, rodilla y tobillo
		SIO	Órtesis sacroilíaca

Los encajes y sus revestimientos representan algunos de los principales componentes de las órtesis y prótesis, siendo estos los elementos de interés para el presente estudio. En el caso de las prótesis, existen encajes rígidos de estructura cóncava que cubren el muñón y deben distribuir las cargas que se generan durante el ejercicio de la marcha sobre el miembro residual [42]. Por otro lado, los encajes blandos, revestimientos o *liners* protésicos son sistemas diseñados para lograr un ajuste adecuado del muñón, lograr una mayor libertad de movimiento, control y

transferencia apropiada de las fuerzas, al igual que la difusión de la presión uniforme sobre toda la superficie del miembro afectado [43]–[46]. Estos dispositivos han permitido la eliminación de sistemas externos de fijación adicional [44]. En el caso de las órtesis, éstas pueden estar compuestas por un encaje rígido que permita alcanzar los objetivos clínicos de cada paciente y una interfaz blanda para amortiguar y distribuir las fuerzas y presiones generadas en el ejercicio de la marcha [41]. En todos los casos, los revestimientos deben fabricarse de acuerdo al grado de movilidad requerido y la forma de cada paciente [46]. Los revestimientos blandos para prótesis y las interfaces de las órtesis, se encuentran en contacto permanente con la piel del miembro afectado, son cruciales para la comodidad de los pacientes y el logro de los objetivos clínicos de los dispositivos ortoprotésicos [42]. En la Tabla 2 se ilustran los revestimientos.

Tabla 2. Interfaces y encajes ortoprotésicos de miembro inferior.

Prótesis		Rígidos	Blandos
	Transtibial		
	Transfemoral		
	Mixta	AFO	KO
Órtesis			

## **2.2. Requerimientos básicos de los materiales empleados en revestimientos protésicos e interfaces para órtesis de miembros inferiores**

Entre los objetivos clínicos de los dispositivos ortoprotésicos se encuentran: aliviar el dolor, controlar deformidades, prevenir un rango excesivo de movimiento articular o incrementarlo, compensar anormalidades, proteger tejidos, promover la cicatrización y para el caso específico de las prótesis, reemplazar un miembro ausente o deficiente. Estos objetivos se logran gracias a requerimientos funcionales, tales como prevenir, reducir o estabilizar una deformidad, así como limitar la movilidad de una articulación, reducir o redistribuir una carga sobre tejidos concretos. De esta forma, algunos materiales empleados para la construcción de los dispositivos ortoprotésicos son flexibles para adaptarse al cuerpo o absorber energía generada durante el ciclo de la marcha, mientras que otros son rígidos para controlar las flexiones generadas por las cargas [39], [47], [48].

Entre los criterios de funcionamiento generales para encajes, *liners* e interfaces ortoprotésicos se encuentran: durabilidad, seguridad y discreción, mínimo peso, realización de la función requerida por el tiempo que sea necesario y un bajo costo de fabricación [41], [49]. Estos dispositivos deben poseer la resistencia suficiente para soportar las tensiones máximas esperadas por encontrarse sujetos a fuerzas normales de presión por la acción del peso y el ejercicio de la marcha, que generan tensiones de tracción y compresión [50], [51]. Los esfuerzos por cargas de fatiga y las concentraciones de tensiones, reducen la resistencia mecánica del material y son generalmente responsables de la aparición de las fallas y rupturas estructurales [41]. Para prevenir estas fallas, las tensiones internas no deben superar los límites máximos soportados por el material.

Estas piezas deben permitir la variabilidad de la forma y adaptarse a las fluctuaciones en el volumen de los miembros inferiores, mientras mantienen su estructura general, grosor, contacto total con la piel y tolerancia a las presiones generadas durante el ciclo de la marcha [44], [52]. Estas se encuentran sometidas a fuerzas de compresión constantes generadas por el miembro afectado y el dispositivo, las cuales dependen del peso del usuario, la extremidad afectada y las dimensiones de los dispositivos [52].

Materiales con elevada resistencia a la tracción y compresión mejoran la suspensión y el ajuste de los dispositivos al disminuir el pistoneo o deslizamiento durante la marcha [43], [44], [53]. Es importante la rigidez y dureza de estos materiales por estar en contacto con los tejidos blandos en la extremidad afectada. Los individuos que presentan poco recubrimiento del extremo óseo, requieren recubrimientos con baja rigidez a la compresión para proporcionar mayor amortiguación de fuerzas e

individuos con abundante tejido blando pueden obtener una mejor sensación de control a partir de interfaces con un poco más de rigidez [43].

Por otro lado, se ha reportado que los encajes ortoprotésicos deben resistir tensiones tangenciales cercanas a 4.5 MPa para evitar fallas y poseer un módulo de elasticidad aproximado a 3 GPa. Estos cálculos se han realizado a partir de valores variables del radio de la región poplítea y considerando un espesor de 3 mm en las paredes de encajes convencionales [50], [51], [54]. De forma similar otros estudios han calculado que en una persona que pese 79 Kg se pueden generar fuerzas internas de compresión en encajes protésicos aproximadas de 23.16 KPa durante condiciones estáticas y presiones entre 41 a 118.6 KPa durante el contacto inicial de la fase de apoyo en la ambulación normal [52]. Por otro lado, se ha establecido que la densidad de las interfaces ortoprotésicas deben encontrarse entre 1 y 2.5 g/cm<sup>3</sup> mientras que el porcentaje de deformación por compresión aceptados se encuentran entre 8 y 59 % [55], [56].

Finalmente, el uso de estos dispositivos debe evitar problemas en la piel de los usuarios que sean inducidos mecánicamente y que resulten en lesiones o destrucción de la dermis. Igualmente no debe generar reacciones alérgicas sobre los pacientes y debe controlar variables como la temperatura y humedad en el miembro residual o extremidad inferior [6], [7], [24].

### **2.3. Materiales empleados para la fabricación de revestimientos protésicos e interfaces para órtesis**

Las interfaces blandas de los dispositivos ortoprotésicos se han desarrollado a partir de espumas amortiguadoras y sistemas de interfaz diseñados para proporcionar relleno y amortiguación de los miembros afectados. Las espumas de amortiguación pueden diseñarse a partir de uretano, éstas pueden ser rígidas, suaves o elásticas y variar extremadamente su densidad de acuerdo a su celdas, por lo cual son ampliamente utilizadas como recubrimientos internos de órtesis y prótesis con propiedades hipoalérgicas [57]. Igualmente, las espumas amortiguadoras de látex y poliuretano como el Plastazote® y Pelite son de bajo peso, y poseen buenas capacidades para recuperarse y soportar cargas de compresión. Estas espumas son utilizadas generalmente en combinación con otras más densas para alcanzar interfaces más suaves y la compresión de cargas más lenta [41]. Sin embargo, las espumas en general pierden la elasticidad con el tiempo y son afectadas por la humedad, por lo que deben ser reemplazadas con regularidad [41]. Además, aíslan el calor corporal, lo que aumenta la transpiración contribuyendo en la presencia de problemas dermatológicos.

Específicamente para prótesis de miembros inferiores, es común encontrar *liners* o revestimientos para el muñón de los pacientes. Éstos, en su mayoría están elaborados a partir de geles de silicona, elastómeros termoplásticos (TPE), silicona y algunos aditivos como aceites minerales, extractos Aloe Vera y mentol [43], [52]. Las interfaces de gel de silicona contienen redes de polisiloxano ligeramente reticuladas, con alto contenido de fluido libre de polidimetilsiloxano (PDMS) por lo que permiten la extensión del líquido bajo carga [43]. Sin embargo, presentan una menor resistencia a la compresión, cizalladura y rigidez a la tracción que los *liners* elastoméricos de silicona, los cuales son altamente reticulados lo cual les permite mantener sus líquidos bajo presión [43]. De esta forma, los *liners* elastoméricos de silicona otorgan una mayor comodidad, poseen ventajas relacionadas con la suavidad al tacto, mejoran la interfaz con el encaje protésico por presentar buena absorción al impacto y características de amortiguación, disminuyen el dolor y brindan una mayor protección de la piel [43]. Además, la naturaleza viscoelástica del material, permite el flujo de presiones altas a zonas de baja presión al someterse a cargas importantes y ha permitido aumentar el rendimiento para caminar al reducir el uso de ayudas adicionales y mejorar la suspensión de las prótesis [57]–[59]. En la Figura 1 se representa un resumen de polímeros empleados en dispositivos ortoprotésicos externos de miembro inferior [11], [41], [52], [57], [59]–[63].

Estos *liners* también se han desarrollado a partir de materiales compuestos, los cuales son materiales elaborados a partir de dos o más componentes, generalmente por una matriz y un agente reforzante, cada uno con diferentes propiedades físicas y químicas [63], [64]. Los agentes reforzantes pueden ser fibras o partículas que definen fundamentalmente las propiedades mecánicas y funcionales de los compuestos.

## **2.4. Técnicas de caracterización mecánica de materiales para *liners* ortoprotésicos**

Existen un gran número de técnicas para caracterizar y evaluar las propiedades mecánicas de los materiales. A continuación se describen algunas de las más comunes que son importantes para el desarrollo del presente trabajo.

### **2.4.1. Ensayo de compresión**

El esfuerzo de compresión se presenta sobre los materiales cuando se generan dos fuerzas axiales centrales de igual magnitud y sentido contrario que tienden a comprimir una pieza del material [65].

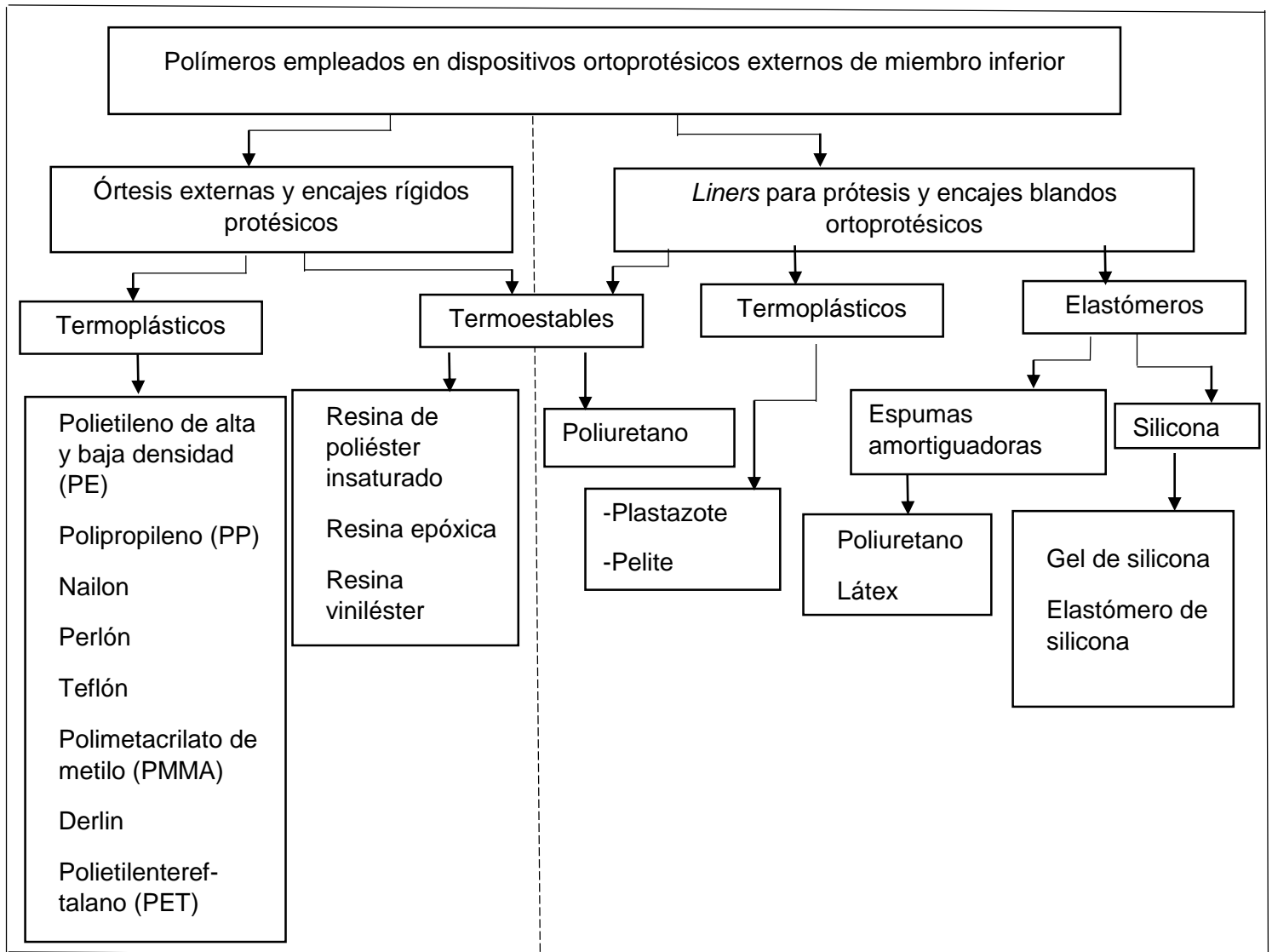


Figura 1. Materiales poliméricos empleados en dispositivos ortoprotésicos externos de miembro inferior.

El ensayo de compresión determina la capacidad del material para retener su elasticidad luego de ser sometido a una carga prolongada. Para los materiales elásticos como el caucho y silicona, se ha empleado la norma internacional ASTM D395 – 16<sup>E1</sup> (2016) [66]. Para este ensayo, una muestra del material de interés se comprime por una deflexión o una fuerza determinada para mantener esta condición durante un tiempo y temperatura específica. Finalmente, se mide la deformación residual y se calcula el esfuerzo de compresión expresado como un porcentaje de la deflexión original.



La evaluación de esta propiedad en materiales empleados para la fabricación de encajes para prótesis es necesaria debido a los esfuerzos de compresión que permiten la suspensión de estos dispositivos. Igualmente, las órtesis deben generar compresión en puntos estratégicos para cumplir con los objetivos clínicos, como por ejemplo, la compresión anteroposterior, con una alineación discretamente retrasada del fémur, respecto a la tibia, que ayude a la hiperextensión de la cadera en las KAFO y la compresión femoral en el triángulo de Scarpa, para lograr estabilidad en la marcha [67].

#### **2.4.2. Ensayo de dureza**

Se define como la resistencia de un material a la deformación plástica localizada. Es útil para evaluar los componentes microestructurales del material y se correlaciona con la resistencia al desgaste. Igualmente, la dureza de los materiales depende de las fuerzas de enlace entre sus átomos [68].

La dureza se puede medir de diferentes formas, como lo es a través de la resistencia al corte, la dureza elástica y la resistencia a la indentación. Esta última, es una técnica cuantitativa que consiste en penetrar un indentador sobre la superficie del material a evaluar, controlando la carga y la velocidad de aplicación de la carga. Así, se mide el tamaño y la profundidad de la huella generada, expresándose en términos de un número de dureza [69]. Los materiales más blandos, son indentados a mayor profundidad por lo que presentan un número de dureza menor.

Esta propiedad es importante en materiales empleados en la fabricación de piezas para órtesis o prótesis de miembro inferior dado que estas son sometidas a esfuerzos y cargas generados por la marcha y las condiciones de uso de cada paciente [49]. La evaluación de esta propiedad proporciona información valiosa de la resistencia a la deformación plástica de las interfaces orto-protésicas y los resultados de este ensayo pueden permitir la estimación de otras propiedades mecánicas como la resistencia a la tracción o compresión de una forma sencilla, rápida y con una pequeña cantidad de material.

### **2.5. Nanotecnología y AgNPs**

El término nanotecnología se emplea para describir la fabricación precisa de materiales nanométricos, entre los que se encuentran las nanopartículas [70]. Las nanopartículas son agregados de átomos o materiales con un rango de tamaño de 1 a 100 nm que, debido a su gran área de superficie con relación al volumen,

presentan propiedades químicas y físicas únicas. Algunas nanopartículas metálicas por su parte han demostrado tener propiedades antibacterianas, el cual es un campo de gran interés en investigación [70]. Se han estudiado nanopartículas de magnesio, zinc, titanio, oro, y más aún, las de plata (AgNPs) que han demostrado buena eficacia antimicrobiana frente a bacterias, virus y microorganismos eucariotas. Adicionalmente, las AgNPs tienen una alta estabilidad térmica, baja volatilidad y baja toxicidad para las células humanas [70]. Esta última característica se debe a que las AgNPs interactúan con los peptidoglicanos de la pared celular, estructuras ausentes en las células de mamíferos [71].

Las AgNPs poseen un gran potencial para resolver el problema de las bacterias resistentes a múltiples fármacos, ya que estas nanopartículas interfieren en varios aspectos fisiológicos y reproductivos de los microorganismos, lo que dificulta a las bacterias desarrollar resistencia, sin embargo los investigadores han sugerido estudiar la evolución adaptativa de la resistencia a las AgNPs [71].

Las AgNPs poseen una potente actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas además de demostrar capacidad para interrumpir la formación de biopelículas, las cuales se forman debido a la aglomeración de bacterias y su unión a superficies sólidas [72]. Igualmente, las AgNPs han demostrado poseer actividad antimicrobiana contra una amplia gama de bacterias y hongos patógenos humanos [72].

Tres posibles mecanismos de toxicidad de las AgNPs han sido estudiados recientemente. El primero establece que gracias a las interacciones electroestáticas, es posible la unión de la membrana celular de los microorganismos cargados negativamente a los iones positivos de plata [73]. En este caso, el daño se efectúa directamente en la membrana celular de bacterias o la membrana plasmática de los hongos, provocando cambios estructurales y permitiendo la permeabilidad celular que conduce a un efecto tóxico relacionado con el transporte no controlado de la membrana citoplasmática y a la pérdida de los componentes celulares [35], [71]. El segundo mecanismo, relaciona los iones de plata presentes en las nanopartículas con la interrupción de la cadena respiratoria de las mitocondrias celulares y de la síntesis de ATP [70]. Las AgNPs pueden interrumpir la fuente de energía celular, afectando reacciones como la adhesión y proliferación celular, ocasionando la muerte del microorganismo [73], [71]. Por último, las AgNPs dentro de las células de microorganismos, pueden afectar el ADN y su replicación, al interactuar particularmente con el nitrógeno exocíclico presente en las bases de adenina, guanina y citosina del ADN, conduciendo a la inhibición del crecimiento microbiano y a su degradación [71]. Estas interacciones y sus efectos sobre la integridad de la membrana celular depende directamente del tamaño, forma,

distribución y concentración de las AgNPs [72]. Además, la actividad antimicrobiana también depende de la especie del microorganismo blanco [71].

### 2.5.1. Síntesis de AgNPs

Existe un gran número de rutas para la síntesis de AgNPs. Sin embargo, de forma general, los métodos de obtención de las NPs se dividen en *top-down*, los cuales emplean procesos físicos para obtener estructuras pequeñas con base en estructuras más grandes; y *bottom-up*, método de reducción química de iones de Ag<sup>+</sup> en solución acuosa, que es el más utilizado en la actualidad. Se cree que la generación de un átomo de plata neutro que forma precursores cargados positivamente Ag<sub>2</sub><sup>+</sup>, Ag<sub>4</sub><sup>2+</sup>, y cúmulos más grandes, que se van agregando, es el paso elemental en la formación de las nanopartículas [72].

El método *bottom-up* emplea un agente para reducir iones metálicos, entre los que se encuentran el citrato, d-glucosa, ácido ascórbico, aldehídos, aminas y polisacáridos (incluyendo el quitosano) [72]. Luego de la reducción, las nanopartículas sintetizadas se estabilizan mediante el recubrimiento con agentes niveladores y su estabilidad puede ser proporcionada por efectos estéricos o de repulsión electrostática. Además, la estabilización estérica puede mejorarse por agentes activos de superficie como polímeros o tensioactivos no-iónicos y lograrse en simultánea a la estabilización electrostática por medio de la absorción de polielectrolitos en la superficie de la nanopartícula [74]–[76].

Entre los métodos *bottom-up* para la síntesis de nanopartículas también se encuentran el método coloidal, irradiación con microondas, utilización de dendrímeros, síntesis solvotermal, sol-gel y reducción fotoquímica. Este último, se caracteriza por la disminución de impurezas generadas durante el proceso de síntesis, comparado con otros métodos [77]. En este, se presenta una reacción química de estados electrónicos para producir reacciones de transferencia de electrones en una sustancia determinada, es decir, se modifica el sistema químico empleando altas energías para generar reductores fuertes como lo son los electrones [77], [78]. Dentro de este grupo, se encuentran las reducciones fotosensibilizadas, en las cuales interfieren agentes sensibilizadores orgánicos o inorgánicos como algunos tensioactivos y polímeros. Estos agentes son fotoexcitados, generando productos intermedios que reducen los iones metálicos a M<sup>0</sup> [78]. Por otro lado, se ha encontrado que las ventajas de la reducción de la fotoquímica UV de metales está en la posibilidad de reducir los iones metálicos sin requerir grandes cantidades de agentes reductores y la reducción se produce uniformemente en toda la solución [79].

## **2.5.2. Caracterización de AgNPs**

Debido a los avances en la producción de AgNPs con diferentes formas y tamaños, y a los efectos que estas variables pueden generar sobre los microorganismos, se han desarrollado técnicas de caracterización que permiten analizar su estructura, morfología, composición y comportamiento mediante tecnologías empleadas en este trabajo como UV-Vis, AAS, DLS, TEM, NTA y potencial zeta [72].

### **2.5.2.1. Caracterización por espectroscopía ultravioleta-visible**

La espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis) es un tipo de espectroscopía de absorción donde las moléculas absorben luz en la región de 100 a 400 nm. Como consecuencia, se generan procesos de transferencia de electrones en iones de moléculas inorgánicas, orgánicas y metales de transición [80]. La espectroscopía UV-Vis es la principal técnica empleada para evaluar las nanopartículas metálicas donde la resonancia de plasmón superficial (LSPR) es característica para cada metal [81]. Así, la LSPR brinda información del tamaño, forma y constante dieléctrica de nanoestructuras metálicas dada la relación de resonancia con la radiación incidente [82].

Esta técnica se basa en la Ley Beer Lambert, la cual establece que al hacer pasar un haz de luz monocromática a través de una sustancia absorbente, la disminución de la intensidad de radiación y el espesor de esa sustancia es proporcional a radiación incidente y a la concentración de la solución [80].

### **2.5.2.2. Caracterización por espectroscopía de absorción atómica**

La caracterización por absorción atómica (AAS) es un procedimiento que permite detectar y determinar cuantitativamente elementos químicos en una muestra por medio de la absorción de radiación a una longitud de onda determinada. Esta absorción se determina por la Ley de Beer-Lambert. En esta técnica se miden las especies atómicas de las muestras, las cuales se logran por medio de su atomización. Para llegar a esto, se usa comúnmente las técnicas de AAS con flama o llama, donde las muestras son nebulizadas y diseminadas en forma de aerosol dentro de una llama. La AAS permite medir hasta partes por billón de un gramo de gran variedad de materiales, incluyendo metálicos como calcio, cesio, cromo, cobalto, oro, plomo, níquel, plata entre otros [80].

### **2.5.2.3. Caracterización por dispersión dinámica de luz**

La caracterización por dispersión dinámica de luz (DLS) de materiales es una técnica de dispersión de radiación que permite medir la distribución de partículas y moléculas desde tamaños submicrométricos hasta nanométricos empleando fuente de luz láser u otra fuente monocromática. El método de DLS consiste en controlar la fluctuación de la intensidad de dispersión elástica de la luz, en un ángulo de dispersión fijo. Dicha intensidad es temporal y generada por el movimiento browniano de las partículas a evaluar, las cuales deben ser más pequeñas que la longitud de onda de la luz incidente para ser medidas. Dada la fluctuación de la luz dispersa, se analiza la función de autocorrelación empleando la ecuación de Stokes-Einstein para medir el tamaño hidrodinámico de las muestras [83], [84].

Características como la forma, estructura y estado de agregación de nanomateriales pueden determinarse con esta técnica. Entre las ventajas que sobresalen del DLS se encuentra su forma no invasiva y el corto tiempo para la medición de muestras, la capacidad de medir diluciones y de detectar pequeñas cantidades de especies de mayor peso molecular, así como menores costos de equipos comparados con otros métodos [83], [85]. Sin embargo, se ha encontrado también dificultades al correlacionar tamaños de partículas cuando se presentan agregados, una utilidad limitada en muestras con distribuciones de tamaños heterogéneos y en geometrías no esféricas dado que la técnica supone esta forma en los análisis [83], [85], [86].

### **2.5.2.4. Caracterización por microscopía electrónica de transmisión**

La técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) permiten la obtención de imágenes que pueden alcanzar una resolución de 0.1 nm, esto gracias a la generación de iluminación que se da por cañón de electrones con longitudes de ondas muy cortas que son acelerados por un potencial negativo y focalizados mediante lentes condensadoras para traspasar muestras de materiales. Los electrones son difractados por un lente objetivo magnético en una imagen que son magnificados por lentes proyectores. Así, es posible observar micro y nanoestructuras [87].

### **2.5.2.5. Análisis de rastreo de nanopartículas**

El análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) es un método que permite visualizar partículas en líquido y determinar su concentración y tamaño en un rango de 2 nm

a 2  $\mu\text{m}$ . Esta técnica relaciona la dispersión de luz y la velocidad del movimiento browniano de las partículas con su tamaño. En el NTA se hace pasar un rayo láser a través de una muestra, el cual se dispersa al entrar en contacto con las partículas en suspensión para visualizarse por un microscopio aumentado 20 veces, equipado con una cámara de video. Así, se obtiene un video que es analizado por un software que sigue las partículas de forma individual y calcula sus diámetros hidrodinámicos utilizando la ecuación Stokes-Einstein. Esta técnica ha sido empleada para caracterizar proteínas y nanopartículas para aplicaciones médicas [80].

#### **2.5.2.6. Potencial zeta**

El potencial zeta de una solución coloidal es un potencial eléctrico que permite medir la capacidad de atracción o repulsión electrostática entre partículas. En soluciones coloidales, la superficie de cada partícula se encuentra unida fuertemente a iones con cargas opuestas, lo que forma una capa fina denominada capa de Stern. Sobre esta, a su vez se unen iones opuestos pero más débiles denominada capa difusa externa [88]. El potencial zeta indica el potencial necesario para penetrar estas capas de iones alrededor de la partícula y afectar su estabilidad. Para medirlo, se determina la velocidad del movimiento de las partículas hacia un electrodo en presencia de un campo eléctrico externo [84]

Para medir el potencial zeta se utiliza la técnica de dispersión de luz electroforética (ELS), la cual permite medir simultáneamente la velocidad de varias partículas relacionado con su potencial zeta al aplicar un campo eléctrico. Esta velocidad se mide por interferometría de láser, sin embargo, esta técnica puede sufrir del efecto electroosmótico, el cual reduce la precisión y la reproducibilidad de la medición. Además, esta propiedad es sensible al pH y cambios ambientales [89], [90].

El potencial zeta es un parámetro fundamental para conocer la estabilidad de una solución coloidal. Se ha encontrado que una magnitud mayor a 20 mV indica mayor estabilidad, mientras que valores menores pueden indicar inestabilidad y agregación [74], [91].

### 3. ESTADO DEL ARTE

Algunos de los avances más significativos en el diseño de las prótesis y órtesis se han logrado gracias a los encajes e interfaces [44]. Los diseños de las interfaces, encajes protésicos y órtesis dependen de los objetivos clínicos y requisitos funcionales de cada paciente, los cuales han sido influenciados por la innovación de materiales y nuevas técnicas de fabricación [67]. Datta y colaboradores [92], han reportado que el uso de interfaces de silicona mejoran el control de las prótesis y órtesis. Los efectos positivos del uso de *liners* de silicona pueden ser atribuidos a la forma en que el material se adhiere al muñón y las propiedades del material [58]. Los *liners* de este material poseen una excelente memoria de forma, además que no requieren un gran espesor para absorber las fuerzas de un encaje protésico y es posible obtenerlos a partir de un catalizador y una resina, aunque la reacción de curado es irreversible [58].

Las propiedades mecánicas de las interfaces ortoprotésicas son propensas a ser afectadas por el uso y el desgaste, generando incomodidad y lesiones en los tejidos blandos, por lo que es importante determinar su resistencia mecánica [44], [53]. Sanders y colaboradores [93], sometieron 15 tipos de *liners* comerciales a ensayos de compresión, fricción, cortadura y tensión. Los *liners* de gel de silicona mostraron ser los más suaves durante los ensayos de compresión, lo cual sugiere que pueden ser apropiados para amortiguar prominencias óseas, pero presentaron menor resistencia a la compresión, cizalladura, tracción y rigidez que los *liners* de elastómero de silicona, los cuales, al ser altamente reticulados, presentan mayor capacidad para soportar cargas aplicadas y esfuerzos internos. Los *liners* de elastómero de silicona poseen mayor recuperación de forma y espesor al ser sometidos a pruebas de compresión, en comparación con *liners* de gel de silicona y de espumas. La explicación física de este fenómeno se asocia a la capacidad de los elastómeros de silicona de deformarse, al ser impactados por las cargas, y alinear sus cadenas poliméricas de forma perpendicular a la dirección de la carga, para luego endurecerse a medida que soportan los esfuerzos [93]. De esta forma, las interfaces de elastómero de silicona pueden reducir el impacto de movimientos verticales entre el dispositivo y la extremidad afectada de los pacientes producidos en el ejercicio de la marcha. Este estudio, además, demostró que la diferencia entre la rigidez a la tracción de revestimientos con y sin refuerzos de tela era mínima. Sin embargo, los refuerzos de tela podrían aumentar la carga a la cual falla el revestimiento y reducir la tensión cortante aplicada sobre la piel, al favorecer el deslizamiento en la interfaz *liner*-encaje [93].

Por otro lado, la fricción de la piel con los encajes rígidos se puede disminuir con los encajes blandos y el vacío que genera entre la extremidad afectada con el

dispositivo [58], sin embargo, dado que las interfaces requieren un ajuste apretado de contacto directo con la piel para lograr un buen sistema de suspensión, la ventilación y la circulación del aire se ve afectada. El material de los *liners* protésicos y el espesor de los encajes aumentan significativamente la temperatura de la piel, en consecuencia, favorecen la transpiración, humedad, irritación, maceración, ampollas por fricción e infecciones en la piel que favorecen un entorno para la invasión bacteriana y fúngica, al igual que olores desagradables. Es así como se afecta negativamente la calidad de vida de las personas y el uso de los dispositivos ortoprotésicos.

A mediados de 1980 Össur Kristinsson desarrolló un encaje *Roll-On* de silicona (ICEROSS) con el objetivo de ofrecer encajes más cómodos, que brindaran mayor suspensión y aliviaran los problemas dermatológicos presentes en los diseños anteriores. Este tipo de encaje se ha convertido en un estándar para el tratamiento de amputados transtibiales y hoy en día, se desarrollan de diferentes materiales como el uretano o silicona, con y sin pasador de suspensión distal [8]. Sin embargo, Hall y colaboradores [8], realizaron un estudio para determinar la prevalencia de problemas dermatológicos de personas que usaban este tipo de revestimiento. Se encontró que el 90.9 % de los sujetos reportaron problemas de piel en su historia clínica y 78 % durante el estudio, sin importar la causa de amputación. Entre los problemas más comunes se encontró la sudoración excesiva, picazón de la piel y enrojecimiento.

Para hidratar la piel y evitar los problemas dermatológicos presentes al hacer uso de dispositivos ortoprotésicos, se han fabricado *liners* con matrices estabilizadoras, las cuales reducen el riesgo de lesión de los tejidos al aumentar la estabilidad en el interior de la interfaz [94]. Además, recientemente se han diseñado revestimientos con aditivos para ayudar al cuidado de la piel [8]. Revestimientos con vaselina y aceites minerales pueden contribuir a la hidratación de la piel, mientras que aditivos como el mentol y *Aloe vera* reducen la irritación de la piel y brindan un efecto refrescante y anestésico en personas con piel sensible; además de proporcionar propiedades elásticas a los materiales elastoméricos [94]–[98]. En el Anexo 1 se exponen algunas de las interfaces protésicas comerciales de las marcas más reconocidas a nivel mundial.

A pesar de los grandes avances tecnológicos e investigativos, los problemas dermatológicos antes mencionados siguen presentándose, muchos de ellos ocasionados por la generación de hongos y bacterias en las zonas cubiertas [7], [24], [30], [99]. Para reducir y eliminar el crecimiento de *Staphylococcus aureus* se emplean comúnmente antibióticos como aminoglucósidos, oxacilina sódica o la nafcilina [34]. Por otro lado, para tratar infecciones generadas por hongos se emplean agentes antimicóticos que se basan en polienos (anfotericina B), triazoles



(fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol) o equinocandinas (caspofungina, micafungina y anidulafungina) [100]. Sin embargo, la administración de estos antimicrobianos suelen generar toxicidad por anfotericina, azoles y toxicidad por interacciones farmacológicas [100]. El uso generalizado de medicamentos antimicrobianos en humanos, veterinaria y medicina agrícola ha producido un aumento de la resistencia a los antibióticos para muchos patógenos humanos [101]. Además, la capacidad limitada de la terapia con antibióticos de penetración del microorganismo o en el sitio de infección y los posibles efectos secundarios han aumentado la necesidad de innovación en agentes o sustancias químicas que destruyan o inhiben el crecimiento de microorganismos en tejidos vivos [102]. Las AgNPs se consideran una alternativa viable a los antibióticos y poseen un alto potencial para resolver el problema del surgimiento de la resistencia a múltiples fármacos [103].

En 1940, se conoció por primera vez la aplicación de plata en tratamientos antibacterianos infecciosos e inicialmente, se introdujo para control de bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* presentes en quemaduras [70]. Se ha indicado que las AgNPs presentan una mejor eficacia antimicrobiana comparada con iones de plata y nitrato de plata [31].

De esta forma, se ha profundizado en la actividad antimicrobiana de AgNPs contra patógenos fúngicos como *Aspergillus*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Sclerotium rolfsii*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium solani*, *Sporothrix schenckii*, y patógenos bacterianos como *Staphylococcus epidermidis*, *Kpneumonia*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* entre otros [35], [104], [105]. Autores como George y colaboradores [106], han estudiado la actividad de AgNPs contra patógenos oportunistas, concluyendo que éstas son efectivas debido a la liberación lenta y durante largos periodos de tiempo, sin embargo, en otras aplicaciones como la actividad antiviral de AgNPs, las investigaciones se encuentran en las primeras etapas.

La capacidad de las AgNPs de inhibir el crecimiento de algunos hongos y bacterias, se relaciona con su capacidad de adherirse a la superficie de la pared celular de los microorganismos alterar sus funciones vitales [31]. Además, debido a que la interacción entre las partículas y las células se presenta gracias a los peptidoglicanos presentes únicamente en la pared celular de las bacterias y en las proteínas de hongos, estudios han demostrado que las AgNPs en bajas concentraciones no son tóxicas para los seres humanos [31], [35], [36].

Debido a que las nanopartículas más pequeñas poseen mayor área superficial en relación con su volumen, el tamaño es determinante para lograr una mayor interacción con los microorganismos y por consiguiente, es importante para determinar su actividad antimicrobiana [31], [70]. Se ha encontrado que el nivel tóxico para *Escherichia coli* de AgNPs con 10 nm de tamaño, es más alto que con AgNPs de entre 20 y 80 nm [71]. Además, al disminuir el tamaño, aumenta la biodisponibilidad de plata al interior de la célula. Igualmente, la forma de las AgNPs también se relaciona con el área de contacto e interacción con las células [72]. Las nanopartículas esféricas han sido ampliamente estudiadas, siendo éstas menos complejas que las nanopartículas triangulares, cilíndricas o cúbicas, y por lo tanto, empleadas con mayor frecuencia. Gracias a estas capacidades, las AgNPs se han utilizado en lociones de protección solar, tratamiento de quemaduras, apósitos para heridas, textiles, materiales dentales, implantes óseos y recubrimiento de dispositivos médicos entre otras aplicaciones [70], [35].

La obtención de AgNPs se ha logrado gracias a una gran variedad de técnicas, pero los métodos químicos y fotoquímicos son los más comunes por no requerir instrumentos complejos para su realización, lo que permite producir nanopartículas en grandes cantidades y a bajo costo [31]. Brown y colaboradores [107], sintetizaron AgNPs por un método químico sencillo. Las AgNPs se obtuvieron por la reducción de  $\text{AgNO}_3$  usando  $\text{NaBH}_4$ . La mezcla contenía 18.50 mL de agua desionizada, 0.50 mL de citrato de sodio a 0.01 M y 0.50 mL de  $\text{AgNO}_3$  a 0.01 M, el cual fue agitado por 3 min a 10 °C. Finalmente, 0.50 mL de  $\text{NaBH}_4$  a 0.01 M se añadió lentamente a la mezcla. Las AgNPs mostraron actividad antimicrobiana frente a cepas tanto patógenas como no patógenas de *Escherichia coli*, así como cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes* y *Pseudomonas aeruginosa* con una concentración bactericida mínima (MBC) de 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [107].

En los grupos de investigación Biología de Sistemas y Bioingeniería de la Universidad Pontificia Bolivariana, Zapata-Giraldo y colaboradores emplearon la metodología de Brown sin obtener los mismos resultados [108]. En consecuencia, los autores cambiaron la formulación inicial, aumentando cinco veces la concentración de los reactivos y ajustaron el pH de la solución final a 11 goteando  $\text{NaOH}$  a 1.25 M basándose en Ajitha y colaboradores [109], con el propósito de controlar el tamaño de las nanopartículas. Los autores obtuvieron una solución coloidal de AgNPs con una concentración de plata total de 112.59  $\mu\text{g}/\text{mL}$  evaluado por AAS y una resonancia plasmónica de superficie (RPS) entre los 380 – 410 nm con una sola banda. Además, se evaluó la capacidad antimicrobiana de las AgNPs frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y *Candida albicans* ATCC 14053 y se obtuvieron una CMI de 10.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para *Escherichia coli* y una

concentración letal contra *Candida albicans* ATCC 14053 a 2.4 µg/mL [110], Sin embargo, no se observó efecto bactericida o bacterioestático para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM).

Estos métodos de síntesis emplean reactivos químicos nocivos que pueden afectar la salud de las personas y producir contaminación en el ambiente. Es por esto que se han estudiado procesos para la obtención de AgNPs por procesos verdes que empleen productos extraídos de fuentes naturales como el quitosano. Lou y colaboradores [111], sintetizaron AgNPs por reducción de nitrato de plata empleando quitosano como agente dispersante y estabilizador, e irradiación con rayos UV para mejorar su eficiencia de la reacción. Los autores lograron inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* a concentraciones bajas de nanopartículas. El quitosano encapsula los iones de plata para formar las nanopartículas gracias al grupo funcional amino que posee para reaccionar por un efecto quelante con los iones de plata. Además, la absorbancia de las AgNPs mejoran con la radiación UV debido al efecto de resonancia de plasmón superficial (SPR) que promueven la generación de enlaces quelante. mejoran la absorbancia de la luz UV-Visible y generan electrones que inducen a una reducción de  $Ag^+ \rightarrow Ag^0$  [111].

Gabriel y colaboradores [112], sintetizaron AgNPs en películas nanocompuestas de quitosano y montmorillonita por el método fotoquímico. Se empleó una cámara de irradiación con luz ultravioleta para generar una emisión a 254 nm con una potencia de 18.603 mW/m<sup>2</sup>. Se prepararon dispersiones de montmorillonita con variación en peso, las cuales fueron dispersadas en ácido acético, nitrato de plata y quitosano variando la concentración, grados de desacetilación y su composición. Se encontró que este polisacárido puede controlar el tamaño y forma de las AgNPs, logrando obtener nanoestructuras de entre 2.70 y 6.30 nm de diámetro, las cuales inhibieron el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* al ser evaluadas por el método de difusión en disco. La Tabla 3 y Tabla 4 muestran otros estudios que relacionan la Concentración Mínima Bactericida y Concentración Mínima Fungicida de AgNPs contra *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* bajo diferentes agentes reductores.

Actualmente, los polímeros con AgNPs están llamando la atención no sólo por las capacidades biocidas de larga duración, sino también por la estabilidad a altas temperaturas, baja volatilidad y el fortalecimiento de las propiedades mecánicas de material polimérico otorgadas por las nanopartículas como reforzante [36], [113]. Además, una de las ventajas que surgen al emplear AgNPs embebidas en matrices poliméricas, es la posibilidad de recubrir el material interna y externamente, favoreciendo una liberación continua de iones de plata por parte de las nanopartículas y proporcionando una mejor eficiencia de las propiedades antimicrobianas generadas por las nanopartículas [70].

Tabla 3. Concentración Mínima Bactericida de AgNPs contra *Staphylococcus aureus*

Agente reductor	Cepa referencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	CMB ( $\mu\text{g/mL}$ )	Referencia
Quitosano	Sin descripción	2.71	[114]
Quitosano	ATCC 26003	200.00	[115]
Quitosano	ATCC 27661	10.00	[116]
Quitosano	ATCC 6538	9.92	[117]
Sulfato de sodio	ATCC 25923	19000	[118]
Borohidruro de sodio	Sin descripción	1.39	[31]

Tabla 4. Concentración Mínima Fungicida de AgNPs contra *Candida*

Agente reductor	Especie de <i>Candida</i>	CMF ( $\mu\text{g/mL}$ )	Referencia
Quitosano	<i>Candida albicans</i>	2.71	[119]
Quitosano	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	4.96	[120]
Citrato de sodio	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0.80 – 1.60	[121]
Citrato de sodio	<i>Candida albicans</i> 324LA/94	0.40 – 0.80	[121]
Citrato de sodio	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	0.40 – 0.80	[121]
Citrato de sodio	<i>Candida glabrata</i> D1	1.60 – 3.30	[121]
Maltosa	<i>Candida albicans</i>	0.05 – 0.42	[100]
Sulfato de sodio	<i>Candida albicans</i> ATTC 2091	16000	[118]
Borohidruro de sodio	<i>Candida albicans</i>	5500	[31]

Es así como polímeros reforzados por AgNPs permiten crear compuestos con características poco usuales en sus propiedades que de forma independiente no se podrían lograr. Para esto, es importante controlar las concentraciones de las AgNPs para evitar la aglomeración generada por sus cargas superficiales y reactividad química. Estas acumulaciones indeseadas pueden afectar las propiedades

mecánicas de la matriz al convertirse en puntos que centralizan el estrés mecánico [122]. Es por esto que se usan métodos mecánicos de mezclado para incorporar los materiales del compuesto y tensioactivos para los casos en los cuales se requiera emulsificar las partes debido a su naturaleza. Hasta el momento se han incorporado algunos tensioactivos como el dodecilsulfato sódico (SDS) y el polisorbato 80 (tween 80) para dispersar AgNPs [123], [124]. El SDS es un emulgente de carácter iónico que adquiere cargas negativas al ionizar su grupo polar. Por otro lado, el tween 80 es no iónico, hidrófilo que ha demostrado mayor estabilidad en el tiempo gracias a que permite emulsiones de fase externa acuosa que no se afectan por cambios de pH [124].

L. Kvítek y colaboradores [123] evaluaron la influencia de varios tensioactivos y polímeros en la estabilidad de la agregación de AgNPs sintetizados mediante un proceso denominado Tollens modificado. El efecto estabilizador fue controlado mediante una titulación de una dispersión acuosa de AgNPs con una de cloruro de poli (dialildimetilamonio) (PDDA) y encontraron que el SDS, tween 80 y un polímero (polivinilpirrolidona-PVP 360) proporcionaron la mayor estabilidad de las AgNPs. En su caso, las nanopartículas poseían un potencial zeta cercano a 21.60 mV, con lo cual, se presentó una estabilidad electrostática.

Otros estudios han desarrollado resinas dentales modificadas con AgNPs [125]. Kasraei y colaboradores, estudiaron las propiedades antibacterianas para *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* en compuestos de resina dentales contenidas de AgNPs y óxido de zinc, mediante ensayos de contacto directo entre los microorganismos y muestras del material, encontrando que ambas nanopartículas por separado exhibían alta actividad antibacteriana frente a los microorganismos estudiados en comparación al grupo control [126]. Neves y colaboradores, evaluaron la actividad antibacteriana de un compuesto modificado con AgNPs *in vitro*, activado por luz, obteniendo resinas nanoestructuradas capaces de mantener sus propiedades mecánicas y capacidades funcionales incluso al ser incorporadas en medios biológicos simulados [125].

Meran y colaboradores [127], desarrollaron una prótesis facial de silicona comercial cubierta con AgNPs. Para agregar las AgNPs a la matriz, inicialmente prepararon el elastómero de silicona como les indicó el fabricante (A-2186, Factor II, Lakeside, AZ, USA) y se mezcló con un agente reticulante (*poly-methyl hydrogen siloxane*) en una proporción de 10:1 en peso. Las partes fueron mezcladas con un pigmento y fueron vertidas sobre moldes, para someterse a vacío durante 15 min y eliminar el aire atrapado. El material fue curado durante 24 h a temperatura ambiente, fue esterilizado con digluconato de clorhexidina al 0.5% y con solución salina tamponada con fosfato (PBS). La superficie del material fue recubierto con AgNPs en agua tipo 1, agregando 2 mL de la solución de plata por 24 h para garantizar la

precipitación de partículas en la superficie. Por último, el exceso de solución fue aspirado para dejar un recubrimiento fino de plata en la superficie. Además, los autores evaluaron la biocompatibilidad con fibroblastos dérmicos humanos (Hs68) y la eficacia antifúngica contra *Candida albicans* del material nanoestructurado, encontrando biocompatibilidad con las células *in vitro* y propiedades antifúngicas.

Los materiales con efectos antimicrobianos en el área de textiles ortopédicos poseen ventajas especiales que permiten estar en contacto directo y permanente con la piel controlando la actividad antimicrobiana. Pohle y colaboradores [128], han recubierto medias ortopédicas de algodón y poliamida con AgNPs por un proceso simple de inmersión, obteniendo textiles liberadores de iones de plata y AgNPs durante al menos 28 días y demostrando actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*. Sin embargo, estos procesos de impregnación de nanopartículas pueden limitar el tiempo de liberación de las AgNPs al recubrir externamente el material y por consiguiente, se puede reducir las capacidades antimicrobianas dadas por las nanopartículas. De modo que es necesario continuar con estudios que permitan recubrir y mantener las AgNPs sobre las matrices de los materiales compuestos orto-protésicos.

Sin embargo, no hemos encontrado estudios centrados en desarrollar y evaluar la actividad antimicrobiana y propiedades mecánicas de elastómeros de siliconas reforzados con AgNPs para su implementación como interfaz entre dispositivos ortoprotésicos externos y las extremidades de los pacientes. La incorporación de AgNPs como agente antimicrobiano en estos materiales podría inhibir efectivamente el crecimiento de microorganismos generados en la piel, sin embargo, las propiedades mecánicas de matriz podrían cambiar. Algunos compuestos poliméricos con AgNPs han reportado un aumento de su capacidad de controlar el crecimiento de ciertos microorganismos. Gabriel y colaboradores [112], desarrollaron películas de nanocompuestos de quitosano y montmorillonita con AgNPs por método fotoquímico. Los nanocompuestos fueron fabricados con quitosanos a diferentes masas molares y grados de desacetilación, así como también fueron modificados con grupos dietilaminoetilo (DEAE) y dodecilo. Ellos encontraron que todas las películas de nanocompuestos con AgNPs inhibieron el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.

La actividad antimicrobiana de las AgNPs puede ser asistida por el tipo de matriz polimérica en la cual se encuentren incorporadas. Se ha reportado liberación de iones de plata como mecanismo de acción, alterando la interacciones entre las AgNPs y el polímero [129], así como también una actividad antimicrobiana producida por contacto de superficies [130]. Igualmente, se ha encontrado que la incorporación de nanopartículas en matrices poliméricas altera las propiedades mecánicas de los compuestos obtenidos. Zayed y colaboradores [131], el cambio

de las propiedades mecánicas de un elastómero de silicona para prótesis maxilofaciales al incorporar nanopartículas de dióxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ) en la superficie. Los autores encontraron una mejora de la resistencia a la rotura y a la tracción, así como alargamiento porcentual y dureza Shore A al aumentar la concentración de nanopartículas. Sin embargo, estos cambios dependen no sólo de matriz y método de agregación, sino también de las condiciones y características fisicoquímicas de las nanopartículas incorporadas, por lo que su evaluación mecánica para cada caso es necesaria.

Acorde con lo antes mencionado, los efectos en el desarrollo nanotecnológico de compuestos nanoestructurados tienen un gran impacto en todos los campos de la ciencia y la tecnología, especialmente, en el diseño y desarrollo de dispositivos médicos sobre medida. En este orden de ideas, es pertinente profundizar en la aplicación de AgNPs en polímeros empleados en medicina, debido a la evidente necesidad actual de desarrollar polímeros nanoestructurados que resistan y controlen la colonización bacteriana y fúngica. El desarrollo de una tecnología que resuelva una necesidad del medio como lo es controlar la proliferación de hongos y bacterias por el uso de dispositivos ortoprotésicos externos sobre medida y que causan problemas dermatológicos, empleando técnicas que resulten en dispositivos competitivos técnica y económicamente, permitiría contribuir al éxito de la rehabilitación física de miembros inferiores.

## 4. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

En este capítulo se desarrollaron los dos primeros objetivos del trabajo de grado. A continuación se presenta la metodología y resultados de síntesis de AgNPs empleando quitosano como agente reductor por un método foto-químico. Las AgNPs obtenidas se caracterizaron mediante espectroscopía UV-Vis, AAS, DLS, NTA y TEM. Finalmente se presenta la evaluación de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y el hongo *Candida albicans* ATCC 14053.

### 4.1. METODOLOGÍA

#### 4.1.1. Síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs)

El método de obtención de AgNPs desarrollado en este trabajo de grado es de reducción fotoquímica con radiación UV dado que se encuentra entre los más empleados por no requerir instrumentos complejos para su realización y producir nanopartículas en grandes cantidades y a bajo costo [31]. Además, se ha encontrado que entre las ventajas de esta técnica se encuentra la posibilidad de reducir iones metálicos sin requerir grandes cantidades de agentes reductores y de obtener una reducción del agente precursor, en este caso plata, de forma uniforme en toda la solución [79].

El proceso de síntesis consistió en mezclar 100 mL de  $\text{AgNO}_3$  (a concentración de 2 mM) con 200  $\mu\text{L}$  de NaOH (a concentración de 1M). La solución se agitó a 400 RPM por 5 min. Posteriormente, se incorporaron 33.30 mL de la solución de quitosano al 0.5 % por goteo. Finalmente, la solución se vertió en un cristalizador y fue sometido a luz ultravioleta por 20 min a  $300 \text{ mJ/cm}^2$ .

Por otro lado, se determinó emplear quitosano como el agente reductor de la síntesis como una alternativa a los métodos más comunes que emplean reactivos químicos nocivos que afectan la salud de las personas y producen contaminación en el ambiente. Es por esto que se han determinó estudiar la obtención de AgNPs por un proceso verde que emplea productos extraídos de fuentes naturales como el quitosano. La Figura 2 muestra el proceso desarrollado.



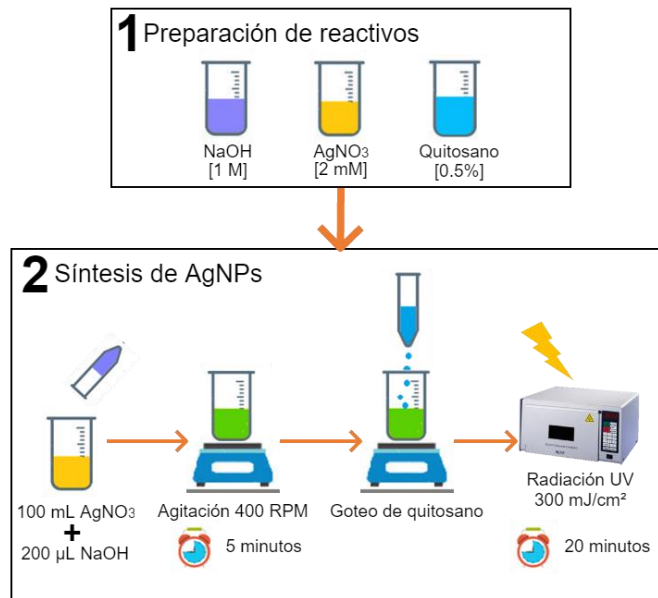


Figura 2. Metodología de síntesis foto-química de AgNPs.

#### 4.1.2. Caracterización fisicoquímica de algunas propiedades de las AgNPs

Se realizaron caracterizaciones de tamaño, morfología y concentración de las AgNPs obtenidas. Se empleó UV-Vis para conocer la Resonancia Plasmónica de la Superficie (RPS) entre longitudes de onda de 300 nm a 700 nm en un espectrofotómetro de microplacas Multiskan™ GO. El propósito de esta técnica fue observar bandas de absorción en el espectro alrededor de 420 nm de longitud de onda, las cuales indican la presencia de AgNPs. Para esto, no fue necesario realizar diluciones de la solución coloidal de nanopartículas.

La concentración de plata total de la síntesis, se determinó por la técnica AAS (Thermo Scientific ICE 3000, USA). El tamaño hidrodinámico de las nanopartículas fue determinado por el método de DLS empleando un Zetasizer Nano ZS. Para esto se diluyeron las nanopartículas en agua tipo 1 a temperatura controlada (23 °C) para obtener concentraciones al 0.10 % en volumen, se realizaron 3 mediciones, cada una con 30 segundos de equilibrio y 15 corridas de 10 segundos de duración. Empleando el mismo equipo, las mismas concentraciones y condiciones de medición, se evaluó el potencial zeta de las AgNPs.

Además, para conocer la concentración de nanopartículas de plata por mL, se sometieron muestras a NTA empleando un instrumento NS300 Nanosight (Malvern) equipado con una cámara CCD y un haz láser de 532 nm. Se utilizó el software NTA 3.2 build 3.2.16 para adquirir y procesar los datos. Se diluyó 2 mL de las muestras

en 50 mL de agua destilada y se realizaron cinco videos de 60 segundos a 30 fotogramas por segundo (FPS) que fueron promediados. Las mediciones se realizaron a una temperatura controlada de aproximadamente 25 °C.

Por último, se determinó el tamaño y morfología mediante TEM. Para la preparación de las muestras, se depositó una gota de aproximadamente 60 nm de espesor de cada suspensión sobre una membrana de carbono. Para esto se utilizó un TEM Tecnai F20 Super Twin TMP, FEI.

#### **4.1.3. Evaluación del efecto antimicrobiano de las AgNPs**

Se evaluó el efecto antimicrobiano de las AgNPs obtenidas por el método fotoquímico (apartado 4.1.1 síntesis de AgNPs). Para esto, se evaluó la actividad antibacteriana de las nanopartículas obtenidas por el método de macrodilución para bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y se evaluó la actividad antifúngica de las nanopartículas por el método de microdilución contra *Candida albicans* ATCC 14053.

Para la evaluación antimicrobiana, se realizó el repique de una cepa de cada especie bacteria en agar Müller Hinton (BD, REF 211438) incubando por 24 h a 37 °C en un ambiente de aerobiosis para garantizar su activación. Posteriormente, se tomó una muestra de cada microorganismo y se cultivó entre 12 y 24 h en medio líquido Brain Heart Infusion (BHI, BD REF 211065) a 37 °C.

Cada bacteria fue ajustada a un valor de turbidez McFarland 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL) en un medio limpio BHI con el propósito de establecer la cantidad de microorganismos en la solución. Esto se obtuvo agregando pequeñas gotas del microorganismo en el medio nuevo de BHI y midiendo la absorbancia hasta alcanzar una densidad óptica de 0.08-0.1 con una longitud de onda de 600 nm. Se utilizó un espectrofotómetro Genesys 20, Thermo Scientific USA. Para finalizar la preparación de las bacterias, se realizó una dilución del medio ajustado al valor de turbidez McFarland 0.5 en medio BHI que permitió obtener microorganismos con concentraciones de  $5 \times 10^4$  UFC/mL en 15 mL.

Paralelamente, en tubos de ensayo de vidrio con tapa rosca, se obtuvieron diferentes concentraciones de la solución de plata desde 2.50 a 82.45 µg/mL empleando las soluciones de AgNPs con agua tipo 1 y se adicionó 150 µl de citrato de sodio a 0.02 molar a cada solución de nanopartículas. A 1.00 mL de cada dilución, se incorporó 1.00 mL de medio de cultivo con bacteria a  $5.0 \times 10^4$  UFC/mL para obtener una concentración final de  $2.5 \times 10^4$  UFC/mL. Cada tubo se almacenó

a 37 °C en una incubadora con agitación (Rosy 1000, Thermolyne USA) a 75 RPM por 24 h cubierto de la luz. La CMB fue evaluada para establecer la capacidad bactericida de las AgNPs. Dicha actividad se evaluó a las 24 h desde la incubación de las muestras para las diferentes concentraciones establecidas.

El análisis consistió en tomar 10 µL de cada dilución una vez transcurrido cada tiempo establecido y luego sembrarlos en cajas Petri con agar Müeller-Hinton, extendiendo la solución uniformemente por toda la superficie. Cada caja fue incubada a 37 °C por 24 h y se realizó el conteo de las UFC observadas y luego se hizo la conversión a UFC/mL. Para cada ensayo se realizaron controles de crecimiento del microorganismo sobre la solución diluyente de las AgNPs (agua tipo 1), los cultivos de bacteria a  $2.5 \times 10^4$  UFC/mL, y controles de esterilidad de las AgNPs. La actividad antimicrobiana se evaluó por triplicado para obtener la mediana de UFC/mL. La Figura 3 representa el proceso de evaluación antibacteriana.

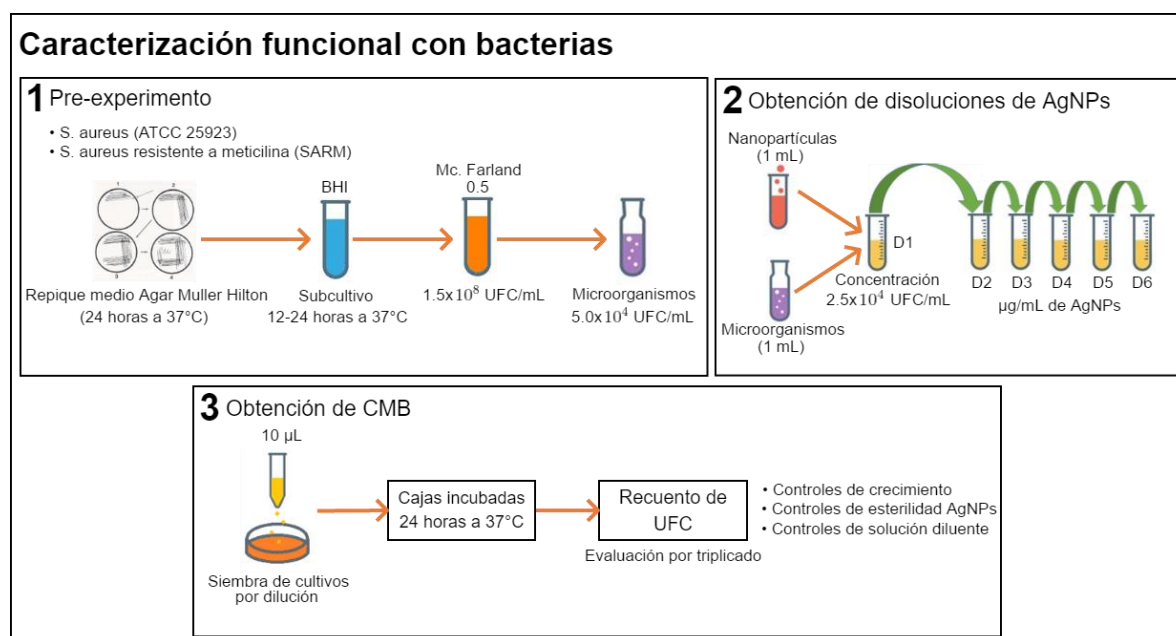


Figura 3. Representación de la evaluación antibacterial de las AgNPs.

Por otro lado, la evaluación del efecto antifúngico de las AgNPs sobre *Candida albicans* ATCC 14053 se realizó con el método de microdilución por triplicado. Para este, se realizó el repique de una cepa del microorganismo en agar Sabouraud (BD, REF 210950) durante 48 h a 37 °C en un ambiente de aerobiosis para garantizar su activación. Posteriormente, se tomó una muestra del microorganismo y se subcultivó por 48 h en medio líquido BHI a 37 °C. Se obtuvieron concentraciones diferentes de plata desde 2.50 a 82.45 µg/mL en un volumen final de 500 µL a partir de solución madre de AgNPs obtenidas y diluyendo con agua tipo 1.

Al igual que para analizar el efecto antibacteriano, se ajustó la suspensión del hongo a un valor de turbidez McFarland 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL) en un medio limpio BHI con el propósito de determinar la cantidad de microorganismos en la solución. Para esto, se midió la absorbancia del medio hasta alcanzar una densidad óptica de 0.08-0.10 en una longitud de onda de 625 nm. Para finalizar la preparación del medio de cultivo con el hongo, se realizó una dilución del medio ajustado al valor de turbidez McFarland 0.50 en medio BHI para obtener una concentración de *Candida albicans* de  $2.5 \times 10^3$  UFC/mL en 5.00 mL de medio de cultivo.

Sobre un microplato de 96 pozos fondo plano (Costar REF 3599), se incorporó 20  $\mu$ L de cada una de las seis diluciones de nanopartícula de forma aleatoria empleando un programa de generación de números, se adicionaron luego 220  $\mu$ L de medio de cultivo BHI y 10  $\mu$ L del cultivo diluido para *Candida albicans* ATCC 14053 en los pozos en los que se encontraban las soluciones diluidas. Posteriormente, se cultivaron los siguientes controles: control de esterilidad para la solución diluyente con medio de cultivo y medio de cultivo solo, controles de sensibilidad del microorganismo empleando fluconazol 99 % (Pfizer, lote 04821) a 10 y 5  $\mu$ g/mL, dos controles de viabilidad, uno de ellos con solución diluyente sin nanopartículas y el cultivo de *Candida albicans* a  $2,5 \times 10^3$  células/mL y el segundo, con solución diluyente sin nanopartículas y el cultivo de *Candida albicans* con un valor de turbidez McFarland 0.5. En cada pozo se obtuvo una mezcla final de 250  $\mu$ L. Cada ensayo con cada microorganismo se realizó por triplicado con las diferentes diluciones de las nanopartículas definidas.

El microplato se incubó a 37 °C y se mantuvo en agitación a 60 RPM por 24 h en un incubador-agitador (Rosy 1000, Thermolyne USA). Pasadas las 24 h, se leyó la absorbancia de cada micropozo a una longitud de onda de 530 nm y se sembró 10  $\mu$ L de cada pozo en cajas de Petri con agar Sabouraud asegurándose de distribuir uniformemente cada volumen sobre toda la superficie. Los discos fueron incubados por 48 h a 37 °C.

Finalmente, la CMF de las AgNPs se evaluó empleando la regresión Probit para determinar la probabilidad de muerte de *Candida albicans* y se empleó el software IBM SPSS Statistics 24.0 para el análisis estadístico. La Figura 4 representa la evaluación antifúngica de las AgNPs.

## Caracterización funcional con hongos

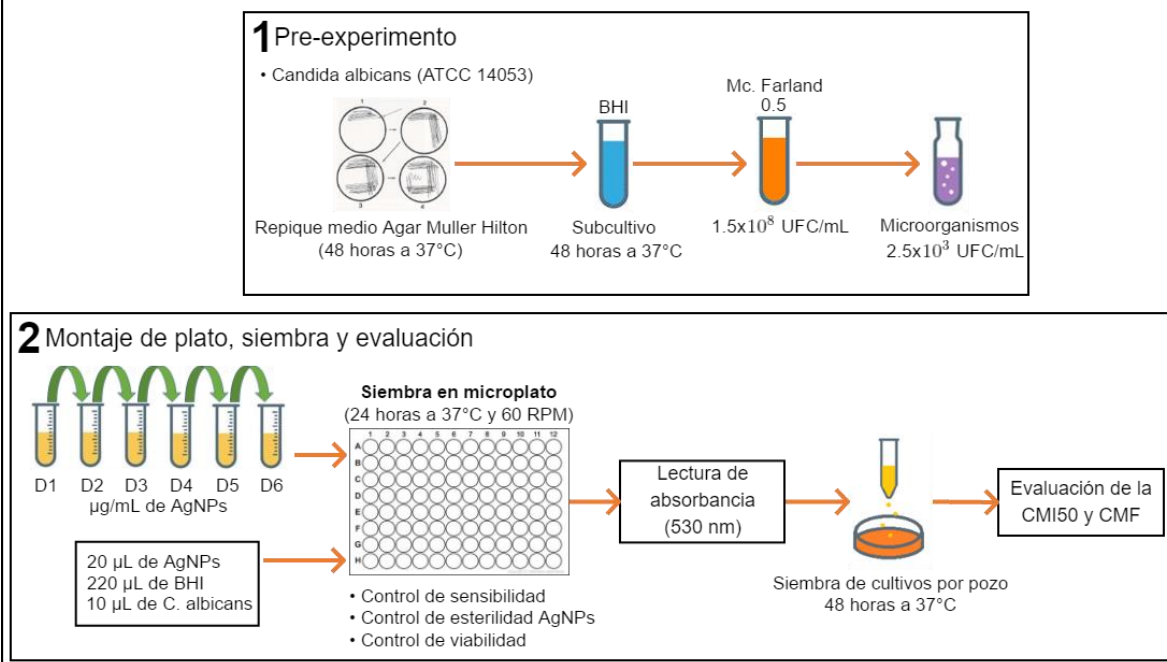


Figura 4. Representación de la evaluación antifúngica de las AgNPs.

## 4.2. RESULTADOS

### 4.2.1. Síntesis y caracterización fisicoquímica de AgNPs

Se obtuvo una solución coloidal de AgNPs de color gris claro. Se encontró por Uv- Vis una Resonancia de Plasmón de Superficie (RPS) en el rango de 320 - 420 nm y un pico pronunciado con una máxima absorbancia en 390 nm, indicando la formación de AgNPs con tamaños entre 5 y 50 nm que se podría inferir por el ancho de la longitud de onda [132]. La Figura 5 muestra el espectro de absorbancia de las AgNPs.

Los resultados de la caracterización fisicoquímica se muestran en Tabla 5.

La Figura 6 y Figura 7 presentan el gráfico de distribución de tamaño por porcentaje de intensidad de AgNPs y el gráfico de la distribución aparente del potencial zeta de AgNPs a una concentración de 0.1 % (v/v) medidos por triplicado respectivamente.

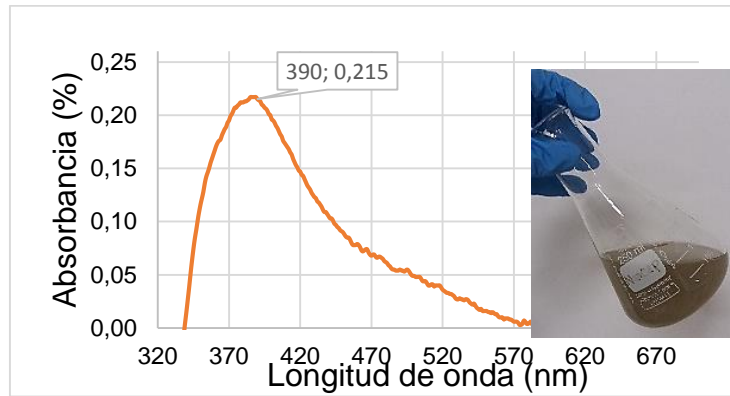


Figura 5. Espectroscopía UV-Vis de AgNPs reducida con quitosano

Tabla 5. Caracterización de algunas propiedades físicoquímicas de las AgNPs

Característica	Valor
Concentración de Ag (AAS)	129 $\mu\text{g/mL}$
Concentración de AgNPs (NTA)	$4.45 \times 10^8 \pm 3.07 \times 10^7$ AgNPs/mL
Tamaño hidrodinámico promedio (DLS)	209.80 nm con polidispersidad de 0.42
Potencial Zeta	21.6 mV

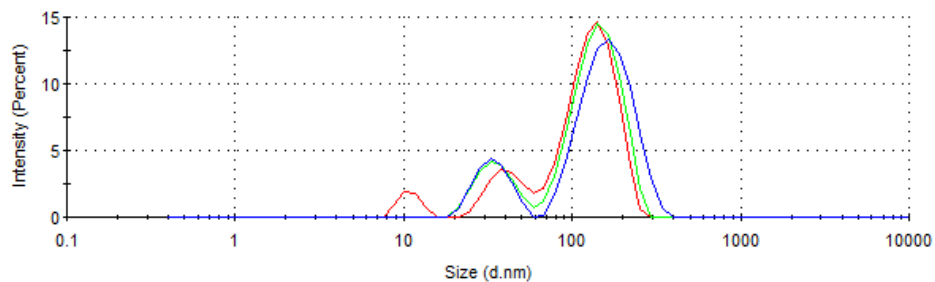


Figura 6. Gráfico de distribución de tamaño por porcentaje de intensidad de AgNPs al 0.1 % (v/v) en agua tipo 1. Tomado del reporte de software.

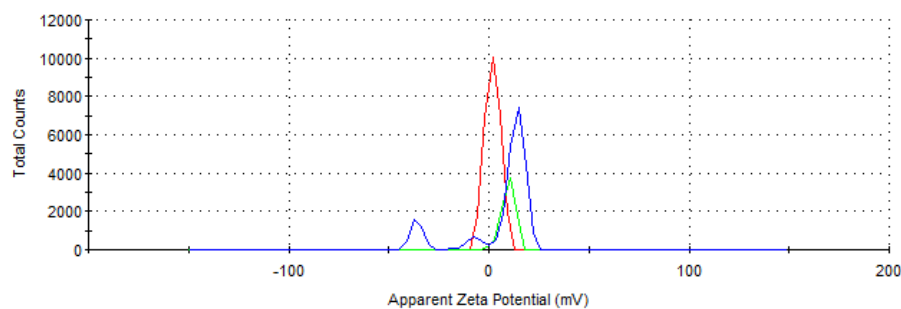


Figura 7. Gráfico de la distribución aparente del potencial zeta de AgNPs diluidas al 1%(v/v) en agua tipo 1. Tomado del reporte de software.

Además, se encontraron AgNPs con tendencia esférica al observar las micrografías del TEM y medir 172 nanopartículas. Se observó que el 86.71 % de las nanopartículas fueron menores a 11.60 nm. Una micrografía tomada con TEM y el histograma de distribución de tamaño de AgNPs se muestran en la Figura 8.

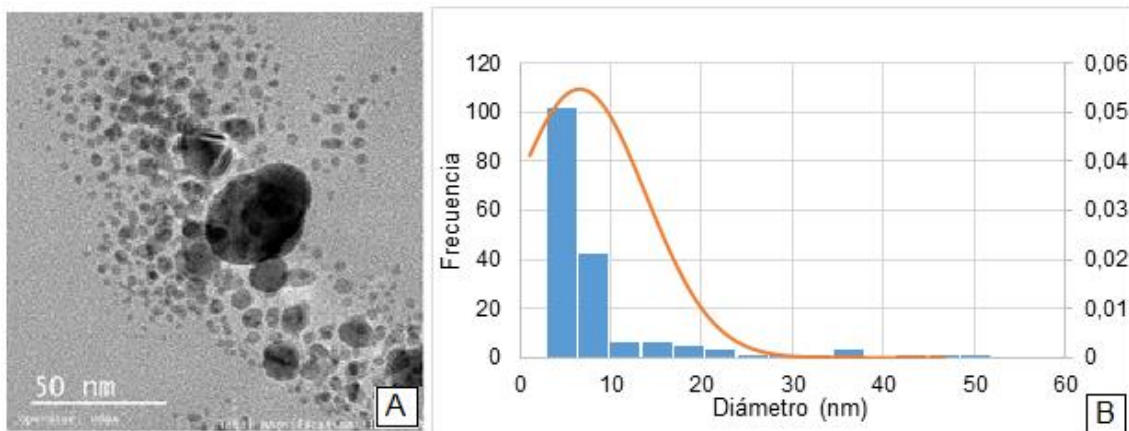


Figura 8. A. Micrografía de AgNPs tomada con TEM a una magnificación de 50 nm; B. Histograma de distribución de tamaño de AgNPs.

#### 4.2.2. Evaluación del efecto antimicrobiano de las AgNPs

Se realizaron tres ensayos para evaluar el efecto antimicrobiano de las AgNPs sintetizadas sobre cada uno de los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y *Candida albicans* ATCC 14053. Se logró un efecto bactericida y fungicida de las AgNPs, que representa el 99.9 % de mortalidad del microorganismo a las 24 h de incubación y a las concentraciones de plata, en  $\mu\text{g}$  por cada mL, descritas en la Tabla 6.

Tabla 6. Concentración Mínima Bactericida (CMB) y Concentración Mínima Fungicida (CMF) AgNPs a las 24 h de incubación.

Microorganismo	AgNPs ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	
	CMB	CMF
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	16.49	NA
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina (SARM)	16.49	NA
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	NA	6.18

### 4.3. DISCUSIÓN

Se desarrolló una metodología de síntesis fotoquímica empleando quitosano como agente reductor, para obtener AgNPs por métodos verdes que permitiera conocer sus propiedades fisicoquímicas y su actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y el hongo *Candida albicans* ATCC 14053.

Se pudo verificar que las nanopartículas obtenidas correspondían a nanopartículas de plata al evaluar el Plasmón de Resonancia Superficial (RPS) por UV-Vis. Las bandas observadas presentaron un ensanchamiento que sugiere una distribución de diferentes tamaños de nanopartículas. Se encontró que la banda del espectro UV-Vis se encontró acotada entre 320 y 420 nm, lo que indica una presencia de AgNPs entre 5-50 nm [132]. Además, se observa un solo pico de absorción que sugiere nanopartículas con tendencia esférica y no se encontraron picos que indicaran trazas de sedimentos presentes en la suspensión de las nanopartículas entre las longitudes evaluadas.

En el método de síntesis desarrollado se indujo radiación UV para romper los enlaces del agente reductor, que en este caso fue quitosano. Las nanopartículas se formaron por la capacidad del par de electrones de átomos de nitrógeno  $-NH_2$  presentes en el quitosano para formar complejos con iones de plata, generando un efecto de quelación [111]. La formulación de síntesis fotoquímica por UV fue influida por la longitud de onda, potencia, energía y tiempo de irradiación, además de la presencia de quitosano en la reducción de  $AgNO_3$  [133]. Este polisacárido ha demostrado ser un reductor eficiente en la producción de AgNPs asistido por radiación UV [134].

Se encontró una alta concentración de plata total en la solución obtenida, al evaluar la síntesis por AAS, al compararlo con la síntesis desarrollada por Zapata y colaboradores [108]. Esto puede deberse a que a pesar que la concentración inicial de  $AgNO_3$  empleada en el presente trabajo de grado es menor, la solución final de nanopartículas presenta un factor de dilución menor al compararlo con la síntesis de Zapata. Por otro lado, la concentración de AgNPs arrojada por NTA indica una formación de  $4.45 \times 10^8$  nanopartículas por cada mL de solución pero con una desviación estándar alta de  $\pm 3.07 \times 10^7$  AgNPs/mL lo que indica una gran dispersión de los resultados. La técnica de NTA para cuantificar las nanopartículas de plata no es tan común como la de AAS para conocer la plata total en una solución y es por esto que es la forma más empleada para denotar la concentración de plata [80], [135].

Por otro lado, el potencial zeta superficial de las AgNPs se encontró positivo no sólo por la carga propia de las nanopartículas, sino también por la interacción con el



quitosano empleado como agente reductor, el cual posee moléculas cargadas positivamente [136], [137]. Además, se ha considerado que una suspensión es inestable cuando presenta un potencial zeta absoluto menor a 20 mV y estable cuando el potencial zeta absoluto es superior a 20 mV [74], [91]. En este estudio, el potencial zeta de las AgNPs fue de 21.6 mV lo que da una idea de poca estabilidad y posible precipitación de partículas en corto tiempo debido a que las cargas superficiales no son lo suficientemente altas para asegurar la estabilización electrostática en suspensión.

En este estudio, se encontró que las AgNPs presentaban mayor tamaño por el método de DLS que en las micrografías obtenidas por TEM. Mahl y colaboradores [138], también encontraron que diferentes métodos de caracterización de nanopartículas metálicas arrojaban resultados diferentes, esto debido a la que todos los métodos se basan en diferentes principios físicos o de detección. Además, se ha encontrado que el DLS puede producir artefactos debido a la capacidad de las partículas grandes de dispersar la luz más intensamente que las partículas pequeñas [138]. Igualmente, esta técnica arroja una medida aproximada para el tamaño promedio, que en general se detecta con un tamaño considerablemente más alto que las nanopartículas individuales debido a la presencia del estabilizante y a las capas de hidratación que puedan rodearlas [138].

Se ha encontrado, sin embargo, que el DLS es adecuado para medir el tamaño de nanopartículas si se conoce que la distribución es estrecha [139]. En este caso, los resultados obtenidos indican que la solución de nanopartículas no fue monodispersa, dado que las partículas no se obtuvieron de un tamaño uniforme. Varios factores pueden generar estos resultados, entre los que se encuentran las condiciones de preparación y reacción del método de síntesis empleado. Se ha encontrado que la velocidad de incorporación de los reactivos, la agitación de la mezcla y la velocidad de reacción determinan la distribución del tamaño de AgNPs obtenidas [140]. Es por esto que se sugiere emplear otras técnicas para obtener datos más precisos. Landsiedel, Lange y colaboradores recomiendan emplear una combinación de métodos para medir el tamaño de nanopartículas, entre los que destaca la centrifugación de disco y ultracentrifugación analítica [139], [141]. Es así como se deben realizar diferentes caracterizaciones del tamaño de AgNPs para obtener conclusiones adecuadas.

Se pudo observar además, AgNPs esféricas y semiesféricas por TEM, como también las han obtenido otros autores [31], [100], [121]. Estudios previos han encontrado actividad antimicrobiana en nanopartículas esféricas, relativo al tamaño, a la capacidad de oxidación y a la liberación de iones de plata de las nanopartículas

[104], [105], [118]. Así, las AgNPs presentaron actividad antimicrobiana posiblemente debido a su tamaño y a su capacidad de liberación de iones.

Por otro lado, los efectos tóxicos de las AgNPs sobre los microorganismos evaluados, pudo aumentar por la presencia de quitosano como agente reductor, aunque en este estudio no se evaluó la permanencia de esta macromolécula en la solución final. Un punto de vista diferente lo presentan C.W. Lou y colaboradores [111] sobre el efecto del quitosano, quienes han reportado baja actividad antimicrobiana del quitosano por sí solo comparada con la de las AgNPs. A partir del presente trabajo de grado, sería necesario realizar una caracterización de las muestras finales obtenidas con técnicas como espectroscopía infrarroja que permita investigar la composición final de la síntesis e identificar los compuestos presentes.

Los resultados relacionados con los efectos antimicrobianos de las AgNPs contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y *Candida albicans* ATCC 14053 fueron consistentes con los resultados encontrados por otros estudios previos (Tabla 3 y Tabla 4), los cuales pueden atribuirse al método de reducción empleado, a la composición de las AgNPs y a sus propiedades fisicoquímicas que permitieron la interacción electrostática de las nanopartículas con las células de los microorganismos para permear la pared celular de las bacterias y hongos estudiados, y producir daños que desencadenaron en la muerte de los microorganismos.

En este trabajo de grado se encontró que el mismo lote de síntesis de AgNPs presentó mayor actividad antimicrobiana frente a *Candida albicans* que con *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). Biao y colaboradores [117] también encontraron que las AgNPs presentaban una actividad más fuerte sobre *Candida albicans* que sobre *Staphylococcus aureus*. La explicación a este fenómeno puede atribuirse a la gran cantidad de grupos funcionales presentes en la superficie de las bacterias con respecto a la de los hongos [117]. Específicamente, las bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* presentan una capa más gruesa de la pared celular (30 a 100 nm de grosor) que otros microorganismos, debido a los peptidoglucanos que contiene, además poseen ácido lipoteicoico que las protegen contra agentes externos, lo que dificulta la entrada de AgNPs al interior de sus células, y por ende, los efectos tóxicos que estas nanopartículas puedan ocasionar en estos microorganismo [142].

Así, en este capítulo se presentó la síntesis de AgNPs por un método fotoquímico de reducción de  $\text{AgNO}_3$  a partir de quitosano y radiación ultravioleta. Algunas propiedades fisicoquímicas de las AgNPs obtenidas fueron caracterizadas, pero no fue posible determinar un tamaño preciso de las nanopartículas obtenidas con los

métodos empleados, pero de acuerdo a los resultados obtenidos, se estima que estas pueden encontrarse en tamaños entre 1 y 1000 nm. Se evaluó su actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y *Candida albicans* ATCC 14053 por métodos de macro y microdilución para conocer las concentraciones mínimas de las AgNPs para inhibir el crecimiento visible de los microorganismos. Se encontró que la solución obtenida presentó nanopartículas de plata al medir la Resonancia de Plasmón de Superficie. Estas nanopartículas se obtuvieron a una concentración de  $4.45 \times 10^8 \pm 3.07 \times 10^7$  AgNPs/mL y la concentración de plata total en la solución coloidal obtenida fue de 129  $\mu\text{g/mL}$ . Además, se encontró que el potencial zeta de las AgNPs presentaron un valor absoluto muy cercano a 20 mV, que no evidencia grandes cargas superficiales para asegurar la estabilidad por largo tiempo de las nanopartículas. Por otro lado, se observaron nanopartículas con formas esféricas y semiesféricas. Finalmente, fue posible inhibir por completo el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y *Candida albicans* ATCC 14053 a concentraciones de 16.40  $\mu\text{g/mL}$ , 16.40  $\mu\text{g/mL}$  y 6.18  $\mu\text{g/mL}$  de AgNPs respectivamente. De esta forma, los dos primeros objetivos del presente trabajo de grado fueron alcanzados, además, las AgNPs obtenidas en este capítulo fueron empleadas para la siguiente fase en la que se desarrolló un material estructurado con efecto antimicrobiano que se espera emplear como interfaz de órtesis y prótesis externo de miembro inferior.

## 5. OBTENCIÓN DE UN MATERIAL ESTRUCTURADO CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA

En el capítulo 5 del presente trabajo de grado se desarrolla el tercer objetivo planteado. El propósito consistió en obtener un material estructurado con nanopartículas de plata (AgNPs). Para alcanzar el propósito se describe una metodología con la que inicialmente se identifica la naturaleza química de la matriz seleccionada para el compuesto desarrollado, que en este caso es el elastómero de silicona comercial Ecoflex 00-50®, dado que su fabricante no informa la formulación química del polímero. Posteriormente, se describen los procedimientos empleados para elaborar un compuesto polimérico incorporando a la matriz una solución de AgNPs sintetizadas como fue descrito en el capítulo anterior. Para esto, se definió el proceso de curado del material a partir de tres procesos diferentes sugeridos por el fabricante del polímero y se evaluó la dureza del compuesto polimérico al variar las revoluciones por minuto del proceso de mezclado, la concentración de AgNPs y la concentración de la solución diluyente de las AgNPs (agua tipo 1). Finalmente, se describen los resultados obtenidos y la discusión relacionada con los resultados presentados.

### 5.1. METODOLOGÍA

Las nanopartículas de plata obtenidas y caracterizadas durante el primer y segundo objetivo, se emplearon para desarrollar un compuesto nanoestructurado a partir de una matriz de elastómero de silicona comercial Ecoflex 00-50®, que es un material empleado para fabricar interfaces ortoprotésicas, seguro para la piel y certificado bajo la norma ISO 10993-10, "*Evaluación biológica de dispositivos médicos, Parte 10: Pruebas de irritación y sensibilización de la piel*".

La metodología de este capítulo se divide en cuatro partes:

#### 5.1.1. Identificación de la naturaleza química de la matriz Ecoflex 00-50®:

Inicialmente, fue necesario conocer la naturaleza química del Ecoflex 00-50® dado que el fabricante no presenta la formulación química del material. Para esto, se midió el espectro infrarrojo (IR) de muestras del material curado a temperatura ambiente empleando un espectrofotómetro de infrarrojo (FT-IR) Nicolet 6700-THERMO SCIENTIFIC con reflectancia total atenuada (ATR) y se comparó con los

espectros de la base de datos HR Spectra Polymers and Plasticizers de ATR. La naturaleza química se confirmó al correlacionar los datos obtenidos del elastómero de silicona Ecoflex 00-50 ®.

### 5.1.2. Definición del proceso de curado del elastómero de silicona Ecoflex 00- 50 ®:

Posteriormente fue necesario definir el proceso de curado del elastómero de silicona Ecoflex 00-50 ® dado que el fabricante propone tres procedimientos diferentes para curar el material. Para esto, cada proceso sugerido se realizó tres veces para obtener nueve muestras finales. La Tabla 7 presenta las condiciones de preparación para los tres procesos realizados.

Tabla 7. Condiciones de preparación de elastómero de silicona Ecoflex 00- 50 ® para tres proceso diferentes.

<b>Procesos Condiciones</b>	<b>Proceso 1</b>	<b>Proceso 2</b>	<b>Proceso 3</b>
Volumen del monómero (mL)	25	25	25
Volumen del catalizador (mL)	25	25	25
Tiempo de mezclado (min)	3	3	3
Velocidad de mezclado* (RPM)	250	250	250
Presión y tiempo de desgasificación al vacío ** (mbar/min)	70/5	70/5	70/5
Tiempo de curado a temperatura ambiente (h)	3	3	3
Tiempo de curado a 80 °C *** (h)	0	2	2
Tiempo de curado a 100 °C *** (h)	0	0	1

\* Se utilizó un agitador mecánico (IKA, RW 20 digital. Serie RW 20)

\*\* Se utilizó un desecador y una bomba de vacío (VACUUBRAND, ME 2C NT) para extraer el aire

\*\*\* Se utilizó una estufa universal (UN55 marca Memmert)

Todas las muestras obtenidas fueron sometidas a una prueba estándar para evaluar la dureza siguiendo la norma internacional ASTM D 2240-5 empleando un durómetro portátil Shore A (0-100 HA, REF.MDT 10 A) y realizando cinco medidas de dureza en diferentes posiciones de la muestra. La evaluación de esta propiedad mecánica se relaciona con la necesidad de conocer la resistencia del material a la deformación por penetración, abrasión o rayado, debido a la aplicación que a futuro se espera tener como interfaz ortoprotésica.

El procedimiento de prueba se realizó inmediatamente después de la última condición de curado de cada proceso. De acuerdo con los resultados obtenidos de la evaluación de dureza, se seleccionó el proceso de curado que permitiera obtener mayor dureza o en el caso de no presentar diferencias significativas, se seleccionó el proceso que requirió menos equipos y tiempo a fin de facilitar la fabricación del material, para seguir esa metodología en adelante.

### **5.1.3. Evaluación de la dureza del material al variar la concentración de las AgNPs y la velocidad de mezclado de la matriz polimérica con las AgNPs:**

Finalmente, fue necesario conocer el efecto de la velocidad de mezclado de la matriz polimérica con las AgNPs y el tensioactivo seleccionado, empleando un agitador mecánico (IKA,RW 20 digital. Serie RW 20) y el efecto de la concentración de las AgNPs sintetizadas bajo las condiciones detalladas en el capítulo anterior, sobre la dureza del material polimérico

Para esto, se prepararon 18 especímenes con las instrucciones de manufactura, el tipo de curado, 1% en volumen de tween 80 y variando: la velocidad de mezclado de la matriz polimérica con las AgNPs empleando un agitador mecánico (IKA,RW 20 digital. Serie RW 20), la concentración de la solución diluyente de AgNPs (agua tipo 1) y la concentración de AgNPs. La Tabla 8 muestra las condiciones de preparación de todas las muestras.

Las velocidades de mezclado evaluadas fueron 250, 450 y 650 RPM y las concentraciones de AgNPs se establecieron 8.25, 16.49 y 24.73  $\mu\text{g/mL}$  dado que 16.49  $\mu\text{g/mL}$  fue la Concentración Mínima Bactericida (CMB) encontrado contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina (SARM) en el capítulo anterior. Este valor se estableció como un valor medio de concentración dado por AAS, y las concentraciones de AgNPs a 8.25  $\mu\text{g/mL}$  y 24.73  $\mu\text{g/mL}$  fueron los valores bajos y medios conservando la misma diferencia, además, las concentraciones evaluadas fueron mayores a CMF de las AgNPs encontrado contra *Candida albicans* ATCC 14053 en el

capítulo anterior. Igualmente, las concentraciones de solución diluyente de AgNPs fueron los porcentajes de agua tipo 1 en las que se encontraron suspendidas las nanopartículas sintetizadas como fue descrito en el capítulo anterior. Las muestras obtenidas fueron vaciadas sobre moldes con forma cilíndrica y curadas a temperatura ambiente durante 24 h para medir la dureza Shore A como se especifica en la norma ASTM D2240- 5.

Tabla 8. Condiciones de preparación del elastómero de silicona Ecoflex 00- 50 ® variando la velocidad de mezclado, las concentraciones de AgNPs y la concentración de solución diluyente de AgNPs.

Tipo de muestra	Nombre de la Muestra	Velocidad de mezcla (RPM)	Concentración de AgNPs ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración de solución diluyente (%)
Muestras con AgNPs	M1	250	8.25	6.38
	M2	250	16.49	12.77
	M3	250	24.73	19.16
	M4	450	8.25	6.38
	M5	450	16.49	12.77
	M6	450	24.73	19.16
	M7	650	8.25	6.38
	M8	650	16.49	12.77
	M9	650	24.73	19.16
Muestras sin AgNPs (controles)	M10	250	0	6.38
	M11	250	0	12.77
	M12	250	0	19.16
	M13	450	0	6.38
	M14	450	0	12.77
	M15	450	0	19.16
	M16	650	0	6.38
	M17	650	0	12.77
	M18	650	0	19.16

Los datos obtenidos de la evaluación de dureza Shore A de las muestras fabricadas bajo las condiciones descritas en la Tabla 8 se compararon por medio del análisis de varianza (ANOVA) multifactorial utilizando el programa Statgraphics Centurion XV, donde la dureza se determinó como la variable dependiente y la velocidad de mezclado, concentración de AgNPs y la concentración de la solución diluyente (agua tipo 1) fueron los factores independientes. Los valores de  $P < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos (95 % de confianza).

## 5.2. RESULTADOS

En esta sección se presentan los resultados obtenidos de los diferentes procesos de fabricación de un elastómero de silicona comercial Ecoflex 00-50<sup>®</sup> que contiene AgNPs sintetizadas bajo las condiciones descritas en la metodología del capítulo anterior. Estos se presentan en cuatro secciones como fueron detalladas en la metodología del presente capítulo:

### 5.2.1. Identificación de la naturaleza química de la matriz Ecoflex 00-50<sup>®</sup>:

Inicialmente, para medir el espectro infrarrojo del Ecoflex 00-50<sup>®</sup>, se preparó el material mezclando en partes iguales el catalizador y el monómero que componen el material como el fabricante indica. Las muestras fueron curadas a temperatura ambiente por 24 h. Se realizaron tres medidas sobre la misma muestra, como se describe en la metodología y se obtuvo la media del espectro IR que se observa en la Figura 9. Se correlacionaron estos datos obtenidos con la base de datos HR Spectra Polymers and Plasticizers de ATR y se encontró una correlación del elastómero de silicona Ecoflex 00-50<sup>®</sup> con Polidimetilsiloxano (PDMS) del 97.34 %. De esta forma, se pudo conocer que la naturaleza química de la matriz que se empleó para desarrollar el material.

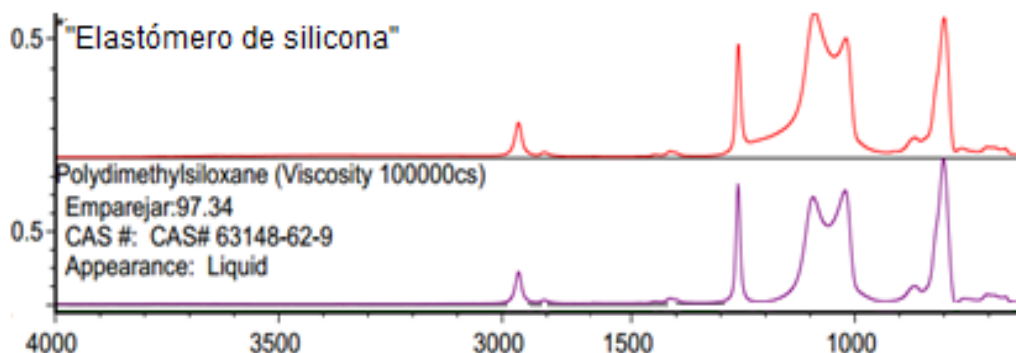


Figura 9. Espectros infrarrojos superpuestos de Ecoflex 00-50<sup>®</sup> (línea roja) y polidimetilsiloxano (línea morada). Tomado del reporte de software



### 5.2.2. Definición del proceso de curado del elastómero de silicona Ecoflex 00- 50 ®:

Para definir el proceso de curado del elastómero de silicona Ecoflex 00- 50 ® se midió la dureza shore A de cada muestra preparada como se describe en la Tabla 7, siguiendo la norma ASTM D2240-5, bajo condiciones de humedad de 57 % y una temperatura 24.8 °C aproximadamente. El método de prueba empleado fue manual de tipo 2, es decir, de indentador al espécimen, los cuales poseían espesores de  $1.00 \pm 0.10$  cm y el intervalo de tiempo de indentación de dureza para cada medición fue de 10 segundos. Los valores de dureza Shore A promedio obtenidos de las muestras preparadas por cada proceso de curado se presentan en la Figura 10.

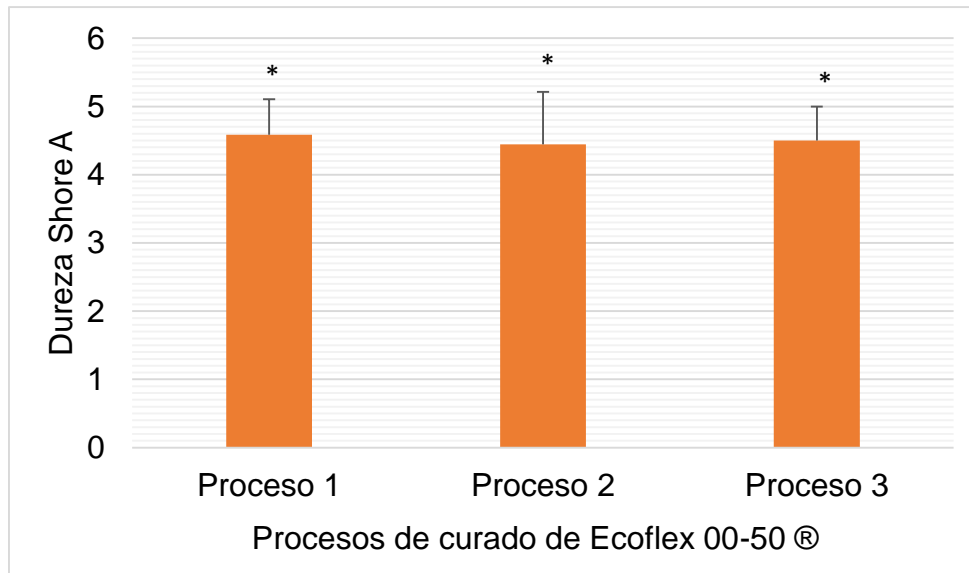


Figura 10. Gráficos de barras representativas de la dureza Shore A promedio obtenidos de las muestras preparadas por los tres procesos de curado descritos en la Tabla 7.

La dureza shore A para las muestras preparadas bajo las condiciones del proceso 1, proceso 2 y proceso 3 fue en promedio A/4.58/10, A/4.44/10 y A/4.5/10 respectivamente, donde A es el tipo de durómetro, 4.58, 4.44 y 4.5 el valor de la dureza media y 10, el tiempo de medición. No se encontró diferencias significativas en los resultados de la dureza Shore A de los tres procesos de curado evaluados sobre Ecoflex 00- 50 ®, sin embargo, dado que el primero proceso no requirió el uso de una estufa para el curado y se realizó en menos tiempo comparado con los otros procesos, se decidió curar el material con temperatura ambiente por 3 h en adelante

para todas las preparaciones del material a fin de facilitar el proceso de fabricación del compuesto.

### **5.2.3. Evaluación de la dureza del material al variar la concentración de las AgNPs y la velocidad de mezclado de la matriz polimérica con las AgNPs:**

En la tabla 10 se presentan los valores en promedio de dureza Shore A de las muestra preparada como se describió en la Tabla 8.

La Figura 11 muestra las gráficas de intervalos de confianza del 95 % para las medias de dureza Shore A de las muestras del material variando la velocidad de mezcla del material (RPM), la concentración de solución diluyente de AgNPs (%) y la concentración de AgNPs ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) como se describe en la Tabla 8, al comparar los resultados obtenidos por medio del análisis de varianza (ANOVA) multifactorial.

La Figura 11 A presenta las medias de dureza Shore A de las muestras según la velocidad de mezcla del material en RPM de las muestras preparadas como se describen en la Tabla 8. No se encontró diferencias estadísticamente significativas ( $P>0.05$ ) entre la dureza Shore A de las muestras preparadas a 250 y 450 RPM, y entre 450 y 650 RPM, sin embargo, si se encontró diferencias estadísticamente significativas ( $P<0.05$ ) entre la dureza Shore A de las muestras preparadas a 250 y 650 RPM.

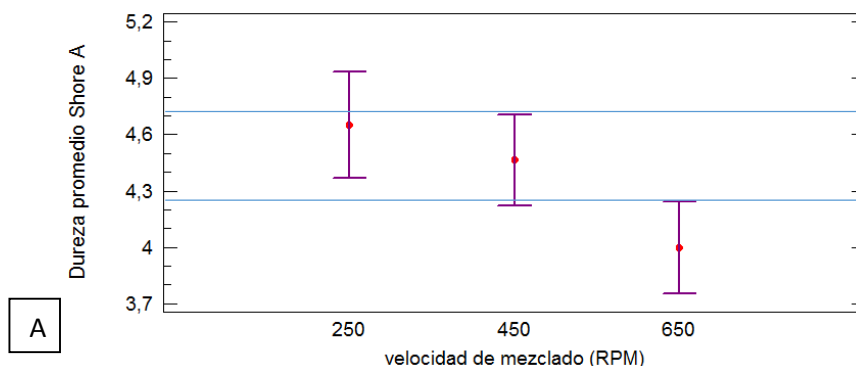
La Figura 11 B presenta las medias de dureza Shore A relacionada con la concentración de solución diluyente de AgNPs de las muestras preparadas como se describen en la Tabla 8. No se encontró diferencias estadísticamente significativas ( $P>0.05$ ) entre la dureza Shore A de las muestras preparadas con concentraciones de 12.77 y 19.16 % de solución diluyente de AgNPs. Sin embargo, si se presentó diferencias estadísticamente significativas ( $P<0.05$ ) entre la dureza Shore A de las muestras preparadas con concentraciones de 6.38 y 12.77 % y entre las preparadas con 6.38 y 19.16 %. Se encontró que las muestras preparadas con 6.38% de solución diluyente de AgNPs presentaron mayor dureza Shore A.

Finalmente, las medias de dureza Shore A de las muestras preparadas como se describen en la Tabla 8 de acuerdo a la concentración de AgNPs se muestra en la Figura 11 C. No se encontró diferencias estadísticamente significativas entre las muestras con concentraciones de 0, 8.25, 16.49 y 24.73  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AgNPs.

Tabla 9. Valores de dureza Shore A para cada muestra de elastómero de silicona Ecoflex 00- 50 ® variando la velocidad de mezclado, la concentración de AgNPs y la concentración de solución diluyente de AgNPs.

Tipo de muestra	Nombre de la Muestra	Velocidad de mezcla (RPM)	Concentración de AgNPs (µg/mL)	Concentración de solución diluyente (%)	Dureza promedio Shore A
Muestras con AgNPs	M1	250	8.25	6.38	4.1
	M2	250	16.49	12.77	4.8
	M3	250	24.73	19.16	3.2
	M4	450	8.25	6.38	5.6
	M5	450	16.49	12.77	4.8
	M6	450	24.73	19.16	3.6
	M7	650	8.25	6.38	5.2
	M8	650	16.49	12.77	3.7
	M9	650	24.73	19.16	2.3
Muestras sin AgNPs	M10	250	0	6.38	5.8
	M11	250	0	12.77	4.6
	M12	250	0	19.16	3.9
	M13	450	0	6.38	5.8
	M14	450	0	12.77	3.8
	M15	450	0	19.16	3.4
	M16	650	0	6.38	5.3
	M17	650	0	12.77	4.1
	M18	650	0	19.16	3.6

Con estos resultados se concluyó que no se presentó una diferencia estadísticamente significativa al variar las condiciones de mezclado de las muestras preparadas como se describió en la Tabla 8 entre 250, 450 y 650 RPM y al variar las concentraciones de AgNPs entre 0, 8.25, 16.49 y 24.73 µg/mL, pero si se encontró un aumento de la dureza Shore A de las muestras preparadas con 6.38 % en volumen de solución diluyente de AgNPs respecto a las preparadas con una concentración de 12.77 y 19.16 % de esta solución.



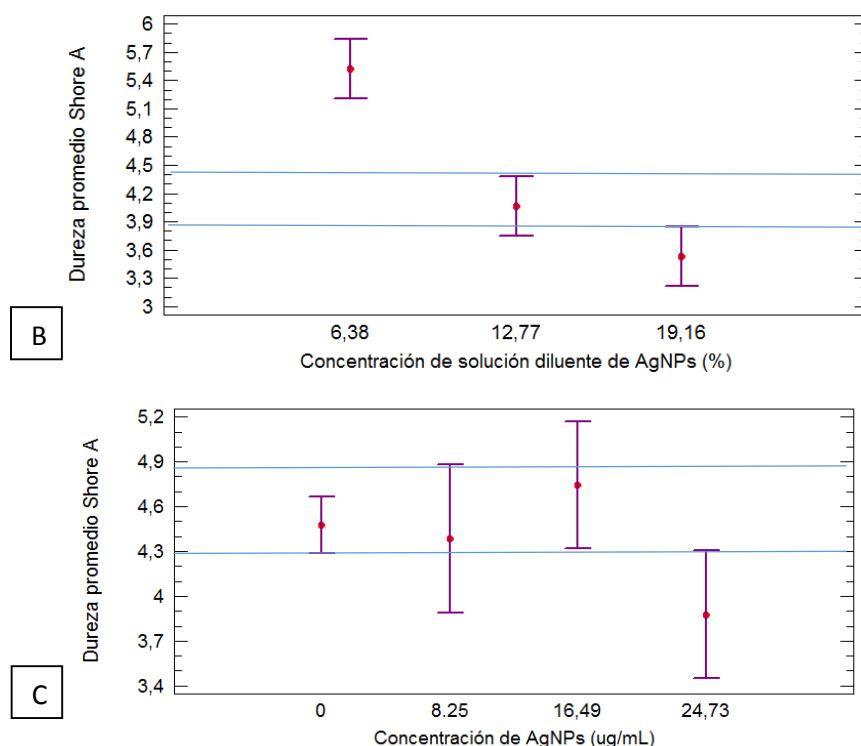


Figura 11. Gráficas de intervalos de confianza del 95 % para las medias de dureza Shore A de las muestras del material variando la velocidad de mezcla del material (RPM), la concentración de solución diluyente de AgNPs (%) y la concentración de AgNPs ( $\mu\text{g/mL}$ ) como se describe en la Tabla 8.A. Medias de dureza Shore A según la velocidad de mezcla del material (RPM); B. Medias de dureza Shore A según la concentración de solución diluyente de AgNPs (%); C. Medias de dureza Shore A según la concentración de AgNPs( $\mu\text{g/mL}$ ).

### 5.3. DISCUSIÓN

En el presente capítulo se describe procedimientos empleados para alcanzar el tercer objetivo del trabajo de grado que consistió en obtener un material estructurado con nanopartículas de plata. El material seleccionado como matriz del compuesto polimérico fue el elastómero de silicona comercial Ecoflex 00-50 ® utilizado para fabricar interfaces ortoprotésicas y las nanopartículas de plata (AgNPs) empleadas fueron sintetizadas bajo los procedimientos detallados en la metodología del capítulo anterior.

Inicialmente se conoció por medio de un espectro infrarrojo (IR) en el material Ecoflex 00-50 ®, que su naturaleza química era polidimetilsiloxano (PDMS) con una correlación del 97.34 %. La identificación del material permite conocer el tipo de

polímero y el proceso de polimerización de la matriz seleccionada. Así, el PDMS es un polímero lineal del dimetilsiloxano perteneciente al grupo de los compuestos de organo-silicio [143]. Para curar esta matriz, se debe hacer reaccionar un agente reticulante, en este caso un monómero (parte A del Ecoflex 00-50®) con un catalizador (parte B del Ecoflex 00-50) al mismo volumen o peso a temperatura ambiente. El PDMS posee una cadena de átomos alternados de silicio, oxígeno, y dos grupos unidos de átomos CH<sub>3</sub> [143]. Su proceso de polimerización se realiza por adición mediante el catalizador, con lo cual se crean cadenas a través de la adición de monómeros activados, los cuales pasan a conformar el polímero, sin generar subproductos [143]. De esto, se obtiene el polímero lineal con enlaces entrecruzados.

Debido a que la reticulación del polímero se realiza por medio del catalizador, no se requiere el sometimiento del PDMS a altas temperaturas. Es así como no se evidenció diferencias significativas en la dureza Shore A del Ecoflex 00-50® entre los tres procesos de curado presentados en la Tabla 7, donde cada proceso implicó una exposición inicial de 3 h a temperatura ambiente, y la posterior exposición al calor no fue representativas para la dureza Shore A.

Por otro lado, debido a que los PDMS son polímeros hidrofóbicos, las AgNPs suspendidas en agua tipo 1 sintetizadas bajo los procedimientos detallados en el capítulo anterior, no se dispersan solubles en la matriz Ecoflex 00-50®. Para esto, fue necesario emplear una sustancia que influyera en la superficie de contacto entre las nanopartículas con el polímero, y que permitiera integrar de la mejor forma todas las partes, para el cual se empleó 1% en volumen por muestra de tween 80.

Por otro lado, los resultados relacionados con los efectos de la velocidad de mezclado de la matriz con las AgNPs, el tensioactivo y las concentraciones de las nanopartículas, mostraron que las muestras mezcladas a una velocidad de 250 RPM con el agitador mecánico presentaron una mayor dureza que las mezcladas a 650 RPM, mientras que no se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los resultados mezclados con velocidades de 250 RPM y 450 RPM. La alta velocidad de agitación del elastómero de silicona pudo alterar el proceso de polimerización al modificar la estructura de entrecruzamiento de los monómeros que componen el polímero como lo describe Kozakiewicz [144]. Así, se sugiere emplear velocidades de 250 RPM sobre 650 RPM, para mezclar el material obtenido por lograr muestras con mayor resistencia a la deformación plástica.

Por otro lado, la literatura ha descrito que las nanopartículas pueden cambiar las propiedades mecánicas de los materiales sobre los cuales son incorporadas. Algunos autores han encontrado que al aumentar la concentración de nanopartículas sobre una matriz, se puede generar un aumento en la dureza del

material. Por ejemplo, Zayed y colaboradores [131] encontraron un aumento pequeño pero significativo en la dureza de silicona elastomérica maxilofacial a medida que aumentaban la concentración de nanopartículas de dióxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ) de 0.5 a 3.0 %. La explicación a este fenómeno se relaciona con el rol que pueden tener las nanopartículas como nanoreforzantes para mejorar las propiedades mecánicas de los nuevos materiales, sin embargo, otros estudios han encontrado una disminución de la dureza en materiales compuestos por nanopartículas. Autores como S.A Nobrega y colaboradores [145], encontraron que la adición de nanopartículas óxido de zinc ( $\text{ZnO}$ ), sulfato de bario ( $\text{BaSO}_4$ ) y óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) en una matriz de silicona disminuyó la dureza del material. Esto puede deberse a la reducción de la velocidad de polimerización del material generado por la dificultad de entrecruzamiento de las cadenas poliméricas por la presencia de las nanopartículas [145], [146]. Es de notar que en este trabajo de grado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la dureza Shore A entre las muestras preparadas sin AgNPs y con concentraciones de 8.25, 16.49 y 24.73  $\mu\text{g/mL}$  de AgNPs. Esto ocurrió posiblemente porque las concentraciones de nanopartículas evaluadas fueron muy bajas al compararlas con la concentración del polímero en el cual fueron incorporadas. Estas concentraciones no alteraron significativamente la unión de las moléculas de la matriz al conservarse la dureza, pero tampoco reforzaron la resistencia a la deformación plástica del material.

Por otro lado, se encontró que las muestras preparadas con la menor concentración de solución diluyente de AgNPs evaluada (6.38 %) presentaron las durezas shore A más altas al compararlas con las preparadas con 12.77 % y 19.16 %. Estos resultados son generados por la disminución en la concentración del polímero de los materiales debido al volumen de agua requerido para cada concentración, donde a medida que aumenta la concentración de la solución diluyente de AgNPs, que en nuestro caso fue agua tipo 1, la concentración de la matriz disminuye [147], [148].

Igualmente, Mancuso ha encontrado que aditivos en siliconas pueden reducir su dureza por la presencia de agua [149]. La presencia de agua en una solución polimérica puede reducir las fuerzas de unión de los monómeros en el proceso de polimerización, lo que se refleja en cambios estructurales y en la resistencia a la deformación plástica del polímero [150]. Además, la inmiscibilidad de la matriz Ecoflex 00-50® con el agua tipo 1 en el cual se encontraban las AgNPs pudo ser una razón de la alteración de la dureza Shore A de las muestras, sin embargo es importante señalar que la dureza Shore A de todas las muestras evaluadas se encontraron entre los rangos aceptables para interfaces ortoprotésicas, las cuales típicamente tienen una dureza aproximadamente de 35 - 65 en la escala Shore 00. (Entre 0 y 20 de la escala Shore A) [151], [152].

Es así como para alcanzar el tercer objetivo planteado del presente trabajo de grado, obteniendo un material estructurado con nanopartículas de plata, se determinó su fabricación mezclando, a 250 o 450 RPM con un agitador mecánico y por 3 min, 25 mL del monómero y 25 mL del catalizador del elastómero comercial de silicona Ecoflex 00-50 ® con tween 80 al 1% en volumen y una concentración definida de AgNPs entre 8.25 µg/mL y 24.73 µg/mL suspendidas en agua tipo 1 con concentraciones entre 6.38% y 19.16% en volumen, las cuales fueron sintetizadas con los parámetros descritos en la metodología del capítulo anterior. La mezcla obtenida se desgasificó al vacío empleando un desecador y una bomba de vacío para extraer el aire con una presión de 70 mbar por 5 min. Finalmente, se curó el material por 3 h a temperatura ambiente.

## 6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y PROPIEDADES MECÁNICAS DEL MATERIAL NANOESTRUCTURADO

En el capítulo 6 se presenta el desarrollo del cuarto objetivo del presente trabajo de grado. El objetivo consiste en evaluar la actividad antimicrobiana y algunas propiedades mecánicas del material nanoestructurado obtenido con el tercer objetivo específico, el cual fue desarrollado en el capítulo 5. Para alcanzar el propósito planteado se describe una metodología con la que inicialmente, se evaluó la actividad antimicrobiana de muestras del material compuesto por elastómero de silicona Ecoflex 00-50 ® con diferentes concentraciones de AgNPs y de solución diluyente de AgNPs, obtenidas bajo las indicaciones definidas en el capítulo anterior. Para esto, se siguieron las indicaciones dadas por la norma internacional ISO 22196:2011 para la medición de actividad antibacteriana en superficies plásticas sobre las especies de bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). Posteriormente, se presenta la metodología empleada para evaluar la densidad y la resistencia a la compresión de muestras del material obtenido bajo los mismos parámetros del ensayo antimicrobiano. Finalmente, se describen los resultados obtenidos y una discusión.

### 6.1. METODOLOGÍA

A continuación se describe la metodología empleada para evaluar la actividad antimicrobiana y algunas propiedades mecánicas del material nanoestructurado obtenido del tercer objetivo específico. La evaluación se realizó en muestras con o sin AgNPs obtenidas siguiendo la metodología de síntesis foto-química descrita en el capítulo 4 del presente trabajo de grado.

Para esto, se obtuvieron muestras del material compuesto por el elastómero de silicona Ecoflex 00-50 ® con las diferentes concentraciones de AgNPs y de solución diluyente de AgNPs que se describen en la Tabla 10. Cada muestra fue preparada por triplicado para verificar la reproducibilidad de los resultados.

Todas las muestras, incluyendo las de control, fueron mezclada con 25 mL del monómero y 25 mL del catalizador del elastómero comercial de silicona Ecoflex 00-50 ® y tween 80 al 1% en volumen a una velocidad de 450 RPM con un agitador mecánico (IKA, RW 20 digital. Serie RW 20) por 3 min. Las mezclas obtenidas se desgasificaron al vacío empleando un desecador y una bomba de vacío



(VACUUBRAND, ME 2C NT) para extraer el aire con una presión de 70 mbar por 5 min. Finalmente, se curó el material por 3 h a temperatura ambiente (23.1 °C).

Tabla 10. Muestras del material obtenido con diferentes concentraciones de AgNPs ( $\mu\text{g/mL}$  y %) y solución diluyente de AgNPs (%)

Tipo de muestra	Nombre de la muestra	Concentración de AgNPs ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración de AgNPs (%)	Concentración de solución diluyente de AgNPs (%)
Muestras con AgNPs (muestra de prueba)	M1	16.49	0.001	12.77
	M2	24.73	0.002	19.16
	M3	32.98	0.003	25.55
Muestras sin AgNPs (controles)	M4	0	0	12.77
	M5	0	0	19.16
	M6	0	0	25.55

Las concentraciones de AgNPs evaluadas se determinaron porque la Concentración Mínima Bactericida (CMB) encontrada contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) fue de 16.49  $\mu\text{g/mL}$  obtenidas de la medición con AAS en la evaluación antimicrobiana de las AgNPs del capítulo cuatro. A partir de este, se evaluaron dos concentraciones más altas, dado que es posible que la matriz reduzca la interacción directa de las nanopartículas con los microorganismos. Así, se determinó evaluar el material a 32.98  $\mu\text{g/mL}$  de AgNPs para conocer los efectos en el doble de la CMB y 24.73  $\mu\text{g/mL}$  como un valor intermedio entre las demás concentraciones evaluadas.

### 6.1.1. Evaluación de la actividad antimicrobiana del material compuesto con AgNPs

,Para la evaluación de la actividad antimicrobiana del material, se siguieron las indicaciones dadas por la norma internacional ISO 22196:2011 con algunas modificaciones para la medición de actividad antimicrobiana en superficies plásticas (Equivalente a la norma JIS Z 2801:2000) [153]. La evaluación se realizó con especies de bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). Cada evaluación se realizó siguiendo los siguientes pasos:

#### **6.1.1.1. Obtención de muestras del material:**

Se obtuvieron 3 muestras planas del material para cada concentración evaluada descrita en la Tabla 10 con dimensiones de 50x50 mm de lado y 3 mm de grosor. Las muestras con AgNPs se establecieron como “muestras de prueba” y las que no incluyeron AgNPs se establecieron como “muestras control”.

#### **6.1.1.2. Limpieza y esterilización de las muestras:**

Todas las muestras y películas planas de polipropileno de alta densidad para cubrir las muestras fueron limpiadas y esterilizadas con etanol al 70 % y sometidas a radiación UV por 20 min. Este proceso se realiza sólo para este ensayo y sobre las muestras curadas para la evaluación antimicrobiana que fueron descartadas al finalizar la prueba.

#### **6.1.1.3. Preparación y obtención de los microorganismos:**

Se realizó el repique de cada cepa de bacteria en agar Müller Hinton por 24 h a 37 °C en un ambiente de aerobiosis para garantizar su activación. Posteriormente, se tomó una muestra de cada microorganismo y se cultivó por 24 h en medio líquido BHI a 37 °C. La suspensión de cada microorganismo fue ajustada a un valor de turbidez McFarland 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL) en BHI con el propósito de asegurar la cantidad de células en la solución. Esto se obtuvo agregando pequeñas gotas del microorganismo en un medio BHI limpio y midiendo la absorbancia hasta alcanzar una densidad óptica de 0.08 - 0.10 en una longitud de onda de 600 nm para las bacterias y 625 nm para el hongo. Se realizó una dilución del medio ajustado al valor de turbidez McFarland 0.5 en BHI para obtener  $1 \times 10^4$  UFC/mL en 15 mL.

#### **6.1.1.4. Inoculación de las muestras y controles:**

Cada muestra de prueba y muestras de control fueron ubicados sobre una caja Petri estéril con la superficie de prueba expuesta en la parte superior. Se inoculó 100 µL del microorganismo de prueba preparado en el paso 3 sobre los materiales. Cada muestra fue cubierta una película cuadrada de 40x40 mm de polipropileno de alta densidad.

#### **6.1.1.5.** Incubación de todas las muestras:

Las placas de Petri que contenían las muestras del material fueron incubadas a una temperatura de  $37 \pm 1$  ° C y una humedad relativa de no menos del 90 % durante  $24 \pm 1$  h.

#### **6.1.1.6.** Recuperación de los microorganismos de las muestras del material:

Después de la incubación, todas las muestras evaluadas con las bacterias fueron lavadas con 50 mL de solución salina isotónica. Este volumen se empleó para determinar el número de microorganismos viables recuperados en cada muestra de prueba (ecuación 1).

#### **6.1.1.7.** Determinación del recuento de microorganismos viables mediante el método de cultivo de vertido en placa:

Se realizaron 10 diluciones en serie en 500 µL de BHI a partir de una primera dilución con 500 µL del lavado del microorganismo con solución salina isotónica del punto anterior y 500 µL de BHI. Se tomó 10 µL de la última dilución para ser sembradas en cajas Petri con Agar Müller Hinton y se incubaron por 24 h a una temperatura de 37 °C y una humedad relativa de no menos del 90 %. Después de la incubación, se contó el número de colonias en las placas de Petri. La Figura 12 muestra un diagrama del proceso.

El número de microorganismos viables recuperados para cada muestra de prueba se calculó con la ecuación (1):

$$N = (100 \times C \times D \times V) / A \quad (1)$$

Donde N es el número de microorganismos viables recuperados por cm<sup>2</sup> en las muestras que incluyeron AgNPs (UFC/cm<sup>2</sup>); C es el recuento promedio de UFC en las cajas Petri en 10 µL; D es el factor de dilución empleado al sembrar en las cajas de Petri (20 mL ); V es el volumen de solución salina utilizada para lavar las muestras (50 mL) y A es el área superficial de la muestra cubierta por la película (1600 mm<sup>2</sup>).

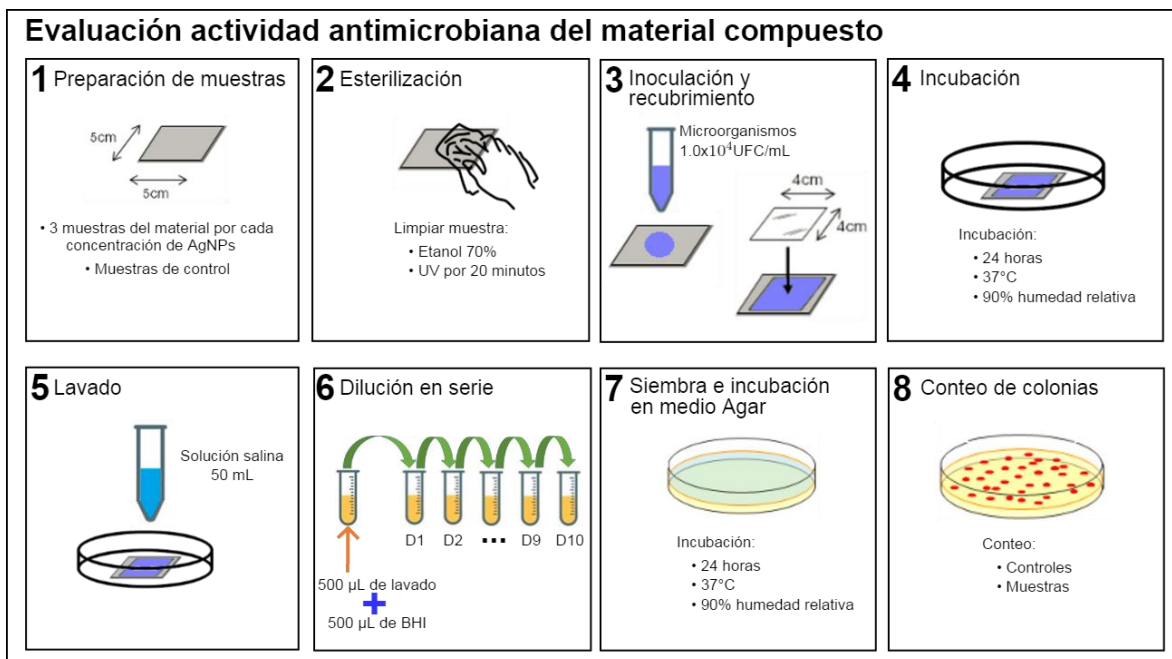


Figura 12. Diagrama de proceso de evaluación de la actividad antimicrobiana del compuesto de acuerdo con la norma ISO 22196:2011.

Posteriormente se evaluó la validez de las pruebas realizadas, verificando que el valor logarítmico del número de microorganismos viables recuperados inmediatamente después de la inoculación de las muestras que no incluyeron AgNPs debía cumplir el requisito de la ecuación (2):

$$(L_{\max} - L_{\min}) / (L_{\text{mean}}) \leq 0.2 \quad (2)$$

Donde  $L_{\max}$  es el logaritmo decimal del número máximo de microorganismos viables encontrados en una muestra;  $L_{\min}$  es el logaritmo decimal del número mínimo de microorganismos viables encontrados en una muestra y  $L_{\text{mean}}$  es el logaritmo decimal del número medio de microorganismos viables encontrados en los especímenes.

Posteriormente se calculó la actividad antimicrobiana (R) usando la ecuación (3):

$$R = U_t - A_t \quad (3)$$

Dónde R: es la actividad antimicrobiana del material;  $U_t$ : es el promedio del logaritmo decimal del número de microorganismos viables, en células/cm<sup>2</sup>, recuperadas de las muestras que no incluyeron AgNPs después de 24 h;  $A_t$ : es el promedio del logaritmo decimal del número de microorganismos viables, en células/cm<sup>2</sup>, recuperadas de las muestras que incluyeron AgNPs después de 24 h.

La actividad antimicrobiana (R) de muestras del material que incluyeron AgNPs se calculó porcentualmente al determinar que un valor R mayor o igual a 2.00 equivale a una eliminación del 99 % de los microorganismos [154].

### **6.1.2. Evaluación de la resistencia a la compresión del material compuesto con AgNPs**

Se realizaron ensayos para evaluar la resistencia a la compresión en muestras del material obtenido como se describió en la introducción de esta metodología y sobre el elastómero de silicona Ecoflex 00-50 ® sin AgNPs ni solución diluyente de AgNPs.

Se siguió la norma internacional ASTM D395-16<sup>a</sup> (2016), “*Métodos de prueba estándar para propiedades de cauchos*”, método B: “*compresión bajo deflexión constante en aire*” [66].

Se obtuvieron 3 probetas cilíndricas de cada muestra a partir de un molde de acrílico (Figura 13 A). Las dimensiones de las probetas fueron de  $29 \pm 0.1$  mm de diámetro y  $11.6 \pm 0.5$  mm de espesor (Figura 13 B). Todas las muestras fueron ubicadas entre dos placas de compresión rígidas de acero de forma que la carga aplicada se distribuyera uniformemente para no deformar las placas y de forma que las muestras no entraran en contacto entre ellas en ningún momento del ensayo. Las muestras fueron sometidas a compresión gradual hasta obtener una compresión del 25 % del espesor original para cada muestra (espesor final de 8.7 mm) empleando una máquina universal de ensayos marca INSTRON modelo 5582 y un par de platos de compresión. La carga total aplicada sobre todas las muestras fue de 800 N. Las placas fueron sujetadas por 4 prensas en “C” de 2 pulgadas ubicadas en las cuatro esquinas de las placas (Figura 13 C).

El dispositivo de compresión con las muestras fue almacenado en una estufa universal UN55 marca memmert a 70 °C durante 22 h.

Al finalizar el tiempo de calentamiento, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 30 min y su espesor final fue medido con un calibrador digital con precisión de 0.01 mm. La compresión se calculó empleando la fórmula (4):

$$C\% = ((t_0 - t_f) / (t_0 - t_s)) \times 100 \quad (4)$$

Donde  $t_0$  es el espesor original de la muestra;  $t_f$  es el espesor de la muestra final y  $t_s$  es el espesor entre las láminas de compresión.

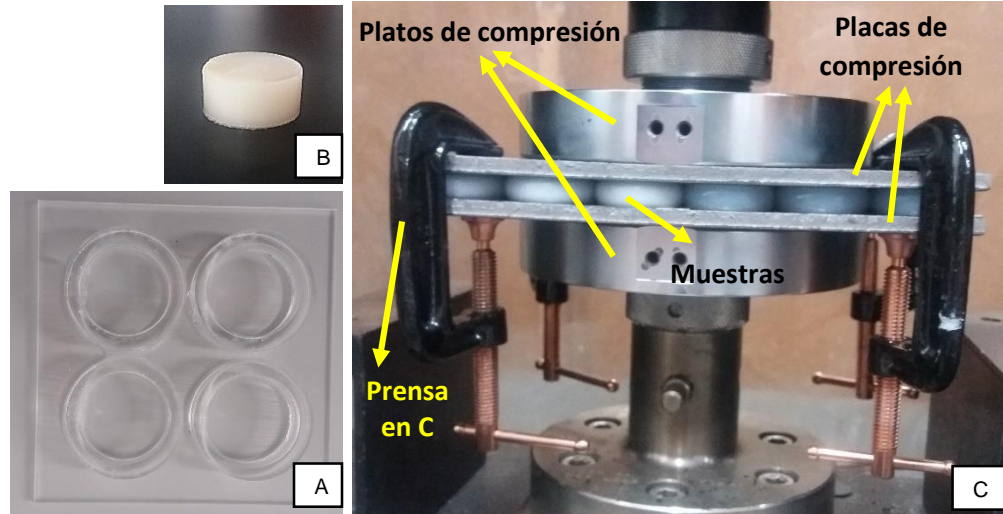


Figura 13. Probetas de compresión, (A) Molde para probeta (B) probeta, (C) dispositivo de prueba empleado entre platos de compresión, fabricado con láminas metálicas y cuatro prensas tipo C de 2 pulgadas.

#### 6.1.2.1. Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos de los ensayos mecánicos de las muestras de prueba evaluadas se compararon con las muestras de control por medio del análisis de varianza (ANOVA) multifactorial, donde cada propiedad mecánica se determinó como la variable dependiente, mientras que la presencia y concentración de AgNPs fueron los factores independientes. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Statgraphics Centurion XV donde los valores de  $P < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos (con 95% de confianza).

## 6.2. RESULTADOS

### 6.2.1. Evaluación de la actividad antimicrobiana del material compuesto con AgNPs

La Figura 14 muestra las imágenes de los respectivos platos Petri para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y *Candida albicans* ATCC 14053 después de 24 h de acuerdo con la norma ISO 22196: 2011 para las muestras del material preparado como se describe en la Tabla 10 y en la introducción de la metodología del presente capítulo.

Se calculó con la ecuación 1 el número de microorganismos viables recuperados por  $\text{cm}^2$  en cada una de las muestras y se validó la prueba realizada con la ecuación 2. Se encontró que el valor logarítmico del número de microorganismos viables recuperados inmediatamente después de la inoculación de cada muestra sin AgNPs para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) fue menor que 0.2 (0.13, 0.07 respectivamente) pero no fue posible contar el número de UFC en las muestras evaluadas con *Candida albicans* ATCC 14053, debido al gran número de microorganismos hallados en todas las muestras.

Por último, se calculó la actividad antimicrobiana de las muestras que incluyeron AgNPs respecto a las muestras sin AgNPs empleando la ecuación 3. La Figura 15 y la Figura 16 muestran la actividad antimicrobiana de muestras del material con concentraciones ascendentes de AgNPs contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) respectivamente. Los resultados obtenidos no permitieron determinar la actividad antimicrobiana con el hongo *Candida albicans* ATCC 14053, de muestras del material que incluían AgNPs al no ser posible comparar el número de microorganismos viables recuperados de estos especímenes de prueba con los que no contenían AgNPs.

Las muestras que incluyeron AgNPs evaluadas contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 no presentaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) de la actividad antimicrobiana entre las concentraciones de 16.49  $\mu\text{g/mL}$  AgNPs (0.001 % de AgNPs) y 24.73  $\mu\text{g/mL}$  AgNPs (0.002 % de AgNPs) y entre 24.73  $\mu\text{g/mL}$  AgNPs y 32.98  $\mu\text{g/mL}$  (0.003 % de AgNPs). Sin embargo, la actividad antimicrobiana de las muestras con concentraciones de 32.98  $\mu\text{g/mL}$  de AgNPs fue mayor que las muestras con 16.49  $\mu\text{g/mL}$  de AgNPs contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, presentando diferencias significativas entre ambas concentraciones ( $P < 0.05$ ).

Por otro lado, las muestras que incluyeron AgNPs evaluadas contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) no presentaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) de la actividad antimicrobiana entre las concentraciones de 16.49  $\mu\text{g/mL}$  ( $14.85 \pm 5.94$  %), 24.73  $\mu\text{g/mL}$  ( $13.86 \pm 5.44$  %) y 32.98  $\mu\text{g/mL}$  ( $11.88 \pm 1.48$  %). Además, se encontró una mayor actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 que sobre *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) de las muestras que incluyeron AgNPs a concentraciones de 24.49  $\mu\text{g/mL}$  y 32.98  $\mu\text{g/mL}$ .



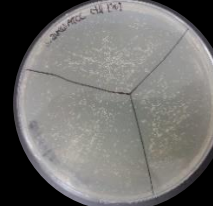


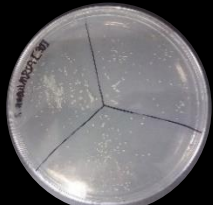


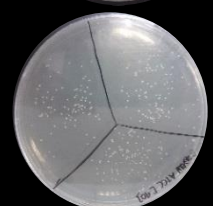


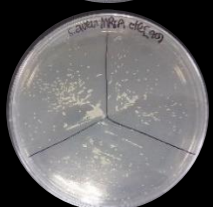
Nombre de la muestra	Tipo de muestra	Concentración de AgNPs (µg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	SARM
M1	Prueba	16.49		
M4	Control	0		
M2	Prueba	24.73		
M5	Control	0		
M3	Prueba	32.98		
M6	Control	0		

Figura 14. Imágenes de placas respectivas de los compuestos con AgNPs y controles del ensayo de actividad antibacteriana de acuerdo con la norma ISO 22196: 2011 después de 24 h incubación. Fuente: Elaboración propia



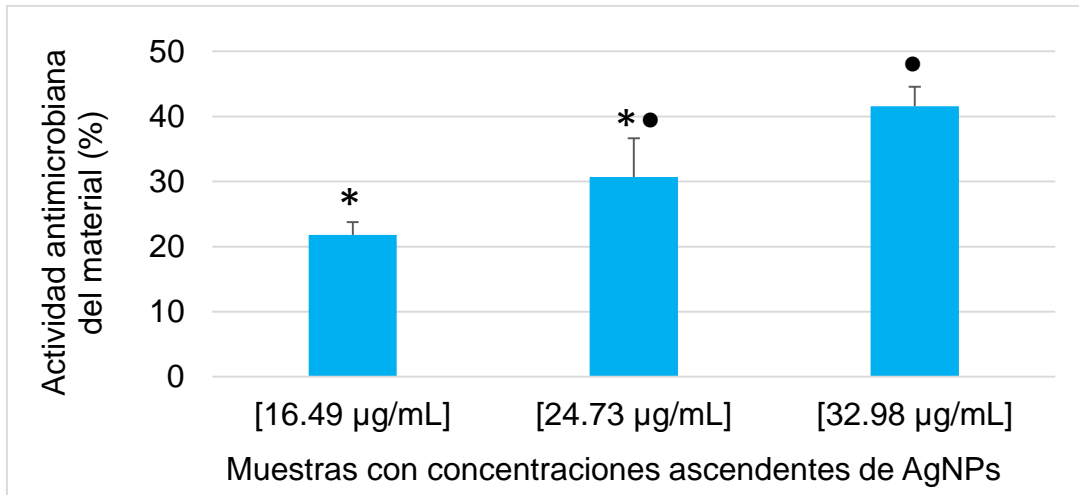


Figura 15. Actividad antimicrobiana de muestras del material con concentraciones ascendentes de AgNPs contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

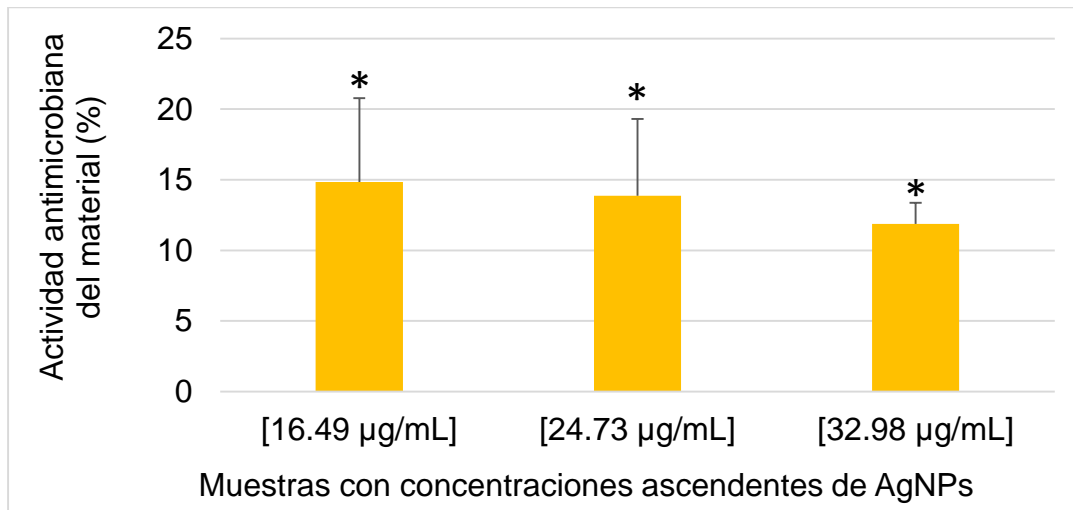


Figura 16. Actividad antimicrobiana de muestras del material con concentraciones ascendentes de AgNPs contra *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina (SARM).

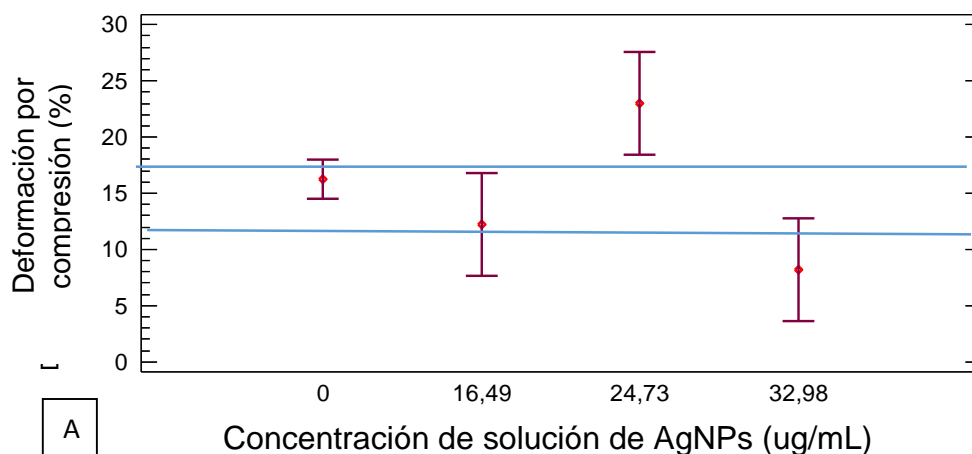
### 6.2.2. Evaluación de la resistencia a la compresión del material compuesto con AgNPs

La Tabla 11 presenta la deformación por compresión de muestras de material preparados como fue descrito en la introducción de la metodología del presente capítulo y sobre muestras del elastómero de silicona Ecoflex 00-50 ® sin AgNPs ni solución diluyente de AgNPs. Los resultados se presentan como un promedio de 3 muestras obtenidas bajo las mismas condiciones.

Tabla 11. Porcentaje de deformación por compresión de muestras de material preparados como fue descrito en la introducción de la metodología del presente capítulo y variando la concentración de AgNPs ( $\mu\text{g}/\text{mL}$  y %) y concentración de solución diluyente de AgNPs (%)

Tipo de muestra	Nombre de la muestra	Concentración de AgNPs ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Concentración de AgNPs (%)	Concentración de solución diluyente de AgNPs (%)	Deformación por compresión (%)
Muestras con AgNPs (muestras de prueba)	M1	16.49	0.001	12.77	$10.46 \pm 0.07$
	M2	24.73	0.002	19.16	$18.39 \pm 0.05$
	M3	32.98	0.003	25.55	$17.12 \pm 0.19$
Muestras sin AgNPs (controles)	M4	0	0	12.77	$14.48 \pm 0.07$
	M5	0	0	19.16	$11.60 \pm 0.06$
	M6	0	0	25.55	$25.17 \pm 0.16$
	M7	0	0	0	$13.44 \pm 0.08$

La Figura 17 muestra las gráficas de intervalos de confianza del 95 % para las medias de deformación por compresión del material variando la concentración de solución diluyente de AgNPs (%) y la concentración de AgNPs ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) como se describe en la Tabla 10, muestras sin concentración de AgNPs ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y sin solución diluyente de AgNPs (%) al comparar los resultados obtenidos por medio del análisis de varianza (ANOVA) multifactorial.



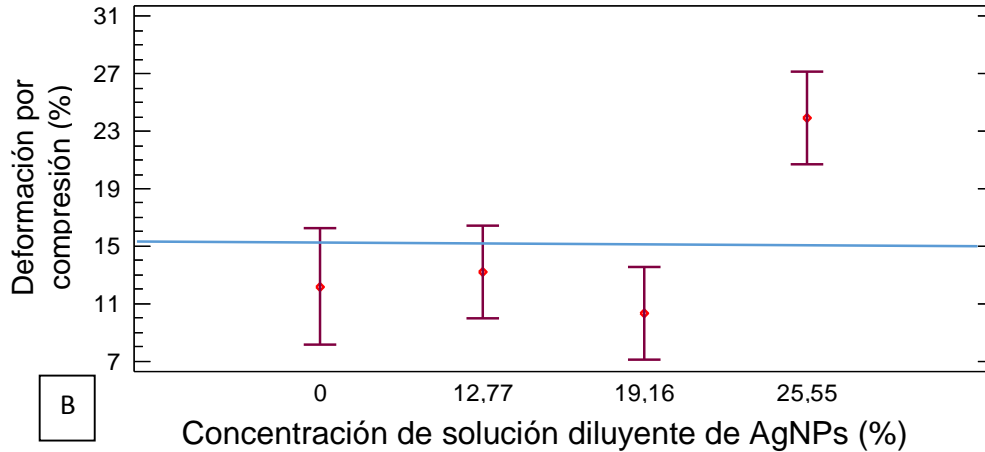


Figura 17. Gráficas de intervalos de confianza del 95 % para las medias de deformación por compresión de las muestras del material variando la concentración de solución diluyente de AgNPs (%) y la concentración de AgNPs ( $\mu\text{g/mL}$ ) como se describe en la Tabla 10. A. Medias de densidad según la concentración de AgNPs ( $\mu\text{g/mL}$ ); B. Medias de densidad según la concentración de solución diluyente de AgNPs (%).

Con el análisis estadístico de los resultados para la deformación por compresión de las muestras analizadas, no se encontró diferencias significativas ( $P > 0.05$  entre las siguientes parejas de muestras: muestras sin AgNPs ( $16.17 \pm 1.14$  %) y las muestras con  $16.49 \mu\text{g/mL}$  de AgNPs ( $12.15 \pm 3.01$  %), entre las muestras sin AgNPs y las muestras con  $24.73 \mu\text{g/mL}$  de AgNPs ( $22.95 \pm 3.01$  %) y entre las muestras con  $16.49 \mu\text{g/mL}$  y  $32.98 \mu\text{g/mL}$  de AgNPs ( $8.13 \pm 3.01$  %). Por otro lado, se encontró mayor porcentaje de deformación por compresión en las muestras con AgNPs a concentraciones de  $24.73 \mu\text{g/mL}$  que en las que contenían  $32.94 \mu\text{g/mL}$  de AgNPs, pero presentaron menor porcentaje de deformación por compresión las muestras con AgNPs a concentraciones de  $16.49 \mu\text{g/mL}$  al compararlas con las que incluyeron  $24.73 \mu\text{g/mL}$  de AgNPs.

No se encontró diferencias estadísticamente significativas en la deformación por compresión entre las muestras sin solución diluyente de AgNPs y las muestras con  $12.77\%$  y  $19.16\%$  ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, se encontró un aumento del porcentaje de deformación por compresión en las muestras con  $25.55$  % de solución diluyente de AgNPs.

### 6.3. DISCUSIÓN

En este capítulo se evaluó la actividad antimicrobiana y algunas propiedades mecánicas del material nanoestructurado obtenido con el tercer objetivo específico del presente trabajo de grado. Las propiedades mecánicas se evaluaron en

muestras obtenidas de igual forma que en los ensayos antimicrobianos y sobre muestras del material sin AgNPs ni solución diluyente de AgNPs.

En el presente trabajo de grado, se encontró actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) de muestras del material que incluyeron AgNPs al ser comparado con muestras del material sin AgNPs, al presentar la capacidad de reducir el crecimiento de estos microorganismos, los cuales han generado infecciones cutáneas en pacientes que hacen uso de prótesis u órtesis externas de miembros inferiores [26], [27]. Así, las muestras del material que incluyeron AgNPs inhibieron la proliferación de los microorganismos, probablemente debido a la presencia de las nanopartículas. Sin embargo, no se encontró una eliminación total de los microorganismos evaluados.

Los mecanismos de acción de las AgNPs contra los microorganismos se han explicado anteriormente en el Capítulo 4. En este capítulo, las AgNPs fueron fijadas sobre una matriz polimérica de elastómero de silicona (Ecoflex 00-50®) y actuaron como depósitos de iones de plata, liberando los iones que actuaron contra los microorganismos. Sin embargo, es claro que el elastómero de silicona redujo la capacidad de liberación de los iones de plata al comparar la actividad antimicrobiana de las AgNPs en agua tipo 1, presentados en el capítulo 4, donde una concentración de 16.49 µg/mL de AgNPs, produjo un efecto bactericida contra las dos bacterias evaluadas en este estudio. Así, la matriz empleada en este estudio restringió el contacto directo de las nanopartículas con los microorganismos el cuál es importante para producir el efecto antimicrobiano.

En este estudio se encontró una mayor actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de muestras del material preparadas con la mayor concentración evaluada de AgNPs a 32.98 µg/mL y 25.55 % de solución diluyente de AgNPs que en muestras preparadas con la menor concentración evaluada de AgNPs a 16.49 µg/mL y 12.77 % de solución diluyente de AgNPs. Sin embargo, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras preparadas con la menor y mayor concentración evaluadas de AgNPs con las que incluyeron 24.73 µg/mL y 19.16% de solución diluyente de AgNPs. El aumento de la actividad antimicrobiana sobre estos microorganismos de las muestras con la mayor concentración de AgNPs evaluada puede deberse a una mayor liberación de iones de plata dada por la mayor cantidad de AgNPs en el material. Así, se cree que una mayor concentración de AgNPs permitiría una erradicación total del microorganismo, aunque se debe considerar los límites máximos de concentraciones permitidas de AgNPs para evitar efectos citotóxicos [155].

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los resultados de otros estudios. Por ejemplo, Yamada y colaboradores [156], sintetizaron AgNPs y las inmovilizaron sobre un compuesto de zirconia estabilizada con itrio para la obtención de prótesis dentales. Se evaluó la actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* NBRC122135 empleando la misma norma que en el presente trabajo. Los autores encontraron una actividad antimicrobiana entre 4.95 % y 99 % en compuestos con concentraciones de plata en suspensión desde 0.2 hasta 2.5 mM. Los materiales compuestos por las nanopartículas inhibieron la proliferación de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) probablemente por la capacidad de los iones de las AgNPs de penetrar las células bacterianas, interrumpiendo la cadena respiratoria de sus mitocondrias e induciendo daños en el ADN que afectó el crecimiento del microorganismo [73], [71]. Igualmente, con mayor concentración de AgNPs, se presentó una mayor liberación de iones de plata, que aumentan los efectos tóxicos de dichas nanopartículas sobre los microorganismos.

Por otro lado, no se encontró diferencias estadísticamente significativas en la actividad antimicrobiana entre muestras del material preparadas a las concentraciones de 16.49 µg/mL de AgNPs con 12.77% de solución diluyente de AgNPs, 24.73 µg/mL de AgNPs con 19.16% de solución diluyente de AgNPs y 32.98 µg/mL de AgNPs con 25.55 % de solución diluyente de AgNPs frente a *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). Además, se encontró una mayor actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 que sobre *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) de las muestras que incluyeron AgNPs a concentraciones de 24.49 µg/mL y 32.98 µg/mL.

Se ha encontrado en la literatura que *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) presenta mayores factores de virulencia que de *Staphylococcus aureus* [157]. Esos factores son moléculas producidas por las bacterias, establecidos en su genoma que le permite al microorganismo sobrevivir en condiciones extremas en el hospedero [158]. Anisha y colaboradores [157], al igual que en este estudio, encontraron un mayor efecto antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus* que contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) de una esponja compuesta por quitosano y AgNPs. Los autores decidieron comprobar la mayor prevalencia de virulencia en cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) que en *Staphylococcus aureus* al cultivar tres cepas de cada microorganismo en una placa con medio Luria-Bertani por dos días a 37 °C, encontrando que todas las cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) presentaron un color amarillo dorado mientras las de *Staphylococcus aureus* se tornaron más claras. El color amarillo dorado se debió a un pigmento carotenoide, la estafiloxantina, el cual es un factor de virulencia en especies de *Staphylococcus aureus* que actúa como antioxidante [159]. Este factor permite al microorganismo desintoxicarse de las especies reactivas de oxígeno

(ROS) [160]. Es así como la mayor cantidad de estafiloxantina presente en *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) le permite combatir los radicales libres que generan las AgNPs, lo que pudo aumentar la resistencia de este microorganismo hacia las nanopartículas [157].

Por otra parte, se han estudiado los efectos de tween 80 en bacterias y hongos, el cual se empleó para obtener las muestras del material evaluado en este trabajo. Este puede aumentar la permeabilidad de las células bacterianas y mejorar la actividad antimicrobiana de los agentes con los cuales se incorpora, como por ejemplo con los antibióticos [161]. En este trabajo no se elaboró un análisis del efecto de este tensioactivo sobre los microorganismos evaluados dado que todas las muestras del material estudiado fueron preparadas con la misma concentración (1% en volumen). Es así como los efectos antimicrobianos del tween 80 en las muestras del material desarrollado en la presente tesis no pudo determinarse en este estudio. Sin embargo, sería interesante evaluar su efecto sobre la actividad antimicrobiana del compuesto obtenido.

Por otro lado, la incorporación de nanopartículas en materiales compuestos puede cambiar las propiedades físicas y mecánicas de las matrices. Se ha encontrado que la adición de AgNPs puede disminuir el porcentaje de deformación por compresión de polímeros [131], [162], [163]. En el presente trabajo, se presentaron pocas diferencias significativas en la deformación por compresión entre las muestras del material evaluado al variar la concentración de AgNPs. Se encontró menor porcentaje de deformación por compresión en las muestras con AgNPs a concentraciones de 32.94  $\mu\text{g/mL}$  que 24.73  $\mu\text{g/mL}$  y mayor porcentaje de deformación por compresión en las muestras con AgNPs a concentraciones de 24.73  $\mu\text{g/mL}$  que 16.49  $\mu\text{g/mL}$ . Sin embargo, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras sin AgNPs y con 16.49  $\mu\text{g/mL}$  de AgNPs y entre las muestras sin AgNPs y con 24.73  $\mu\text{g/mL}$  de AgNPs. Al igual que en nuestro estudio, Yoshida y colaboradores [164] no encontraron diferencias significativas en la resistencia a la compresión entre algunos compuestos de resina que incluyeron y los que no incluyeron iones de plata, quienes relacionaron sus resultados con el efecto del reforzante en la formación física del polímero. Así, se podría explicar que las AgNPs no impidieron la formación de la red polimérica del elastómero de silicona, probablemente por la posibilidad de que las nanopartículas se hayan unido firmemente a la matriz o debido a las bajas concentraciones de AgNPs evaluadas en este estudio.

Sin embargo, se encontró que en algunos casos, la concentración de solución diluyente de AgNPs fue significativa para la resistencia a la compresión de las muestras evaluadas. Se encontró un aumento del porcentaje de deformación por compresión en las muestras con 25.55% de solución diluyente de AgNPs respecto a las muestras sin solución diluyente de AgNPs, con 12.77% y 19.16% de solución diluyente de AgNPs. Estos resultados pueden ser generados por una disminución

de la concentración del polímero a medida que el volumen de la solución diluyente de AgNPs aumentaba, lo que pudo generar una reducción de las fuerzas de unión de los monómeros en la polimerización del material o disminuir la cantidad de monómero para reaccionar y afectar el proceso catalítico del polímero [165], [147], [148], [150].

Finalmente, los resultados mecánicos presentados se ajustan a los requerimientos establecidos en literatura, ya que los porcentajes de deformación por compresión se hallaron entre 10.46 y 25.17 % los cuales se encuentran entre los valores aceptados para deformación por compresión (8-59 %) para interfaces ortoprotésicos de miembro inferior [56].

En conclusión, en este capítulo se evaluó la eficiencia antimicrobiana de muestras del material compuesto por el elastómero de silicona Ecoflex 00-50® con diferentes concentraciones de AgNPs (0, 16.49, 24.73 y 32.98 µg/mL) y de solución diluyente de AgNPs (12.77, 19.16 y 25.55 %) preparadas siguiendo la metodología definida en el capítulo anterior, empleando la norma ISO 22196:2011. La máxima actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se encontró en  $41.58 \pm 2.97$  % con muestras que incluyeron AgNPs y solución diluyente de AgNPs a concentraciones de 32.98 µg/mL y 25.55 % respectivamente. Por otro lado, no se encontró diferencias estadísticamente significativas en la actividad antimicrobiana entre todas las muestras que incluyeron AgNPs y solución diluyente de AgNPs contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), alcanzando una actividad antimicrobiana de  $14.85 \pm 5.94$  %,  $13.86 \pm 5.44$  % y  $11.88 \pm 1.48$  % en las muestras con concentraciones de 16.49 µg/mL, 24.73 µg/mL y 32.98 µg/mL de AgNPs y concentraciones de 12.77 %, 19.16 % y 25.55 % de solución diluyente de AgNPs respectivamente.

Por otro lado, se realizaron ensayos para evaluar la resistencia a la compresión en muestras del material compuesto por el elastómero de silicona Ecoflex 00-50® con diferentes concentraciones de AgNPs (0, 16.49, 24.73 y 32.98 µg/mL) y de solución diluyente de AgNPs (0, 12.77, 19.16 y 25.55 %) preparadas siguiendo la metodología definida en el capítulo anterior. La resistencia a la compresión de las muestras se evaluó siguiendo la norma internacional ASTM D395-16 (2016) y se presentaron pocas diferencias significativas en la deformación por compresión entre las muestras del material evaluado al variar la concentración de AgNPs. Por otro lado, se presentó un aumento del porcentaje de deformación por compresión en las muestras con 25.55% de solución diluyente de AgNPs debido a una posible disminución de la concentración del polímero y una reducción de las fuerzas de unión de los monómeros en la polimerización del material generado por el agua. Sin embargo, se determinó que los valores de resistencia a la compresión se encontraron aceptables para el uso en interfaces ortoprotésicas externas de miembros inferiores.

## 7. CONCLUSIONES

En el presente trabajo de grado se sintetizaron AgNPs por medio de un método de reducción fotoquímico empleando un producto extraído de fuentes naturales como es el quitosano. Las AgNPs fueron caracterizadas fisicoquímicamente, se encontró que la solución obtenida presentó nanopartículas de plata al medir la Resonancia de Plasmón de Superficie y se observaron de formas esféricas y semiesféricas. Las AgNPs permitieron inhibir por completo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y *Candida albicans* ATCC 14053, lográndose una interacción electrostática de las nanopartículas con las células de los microorganismos que permitió permear la pared celular de las bacterias y hongos estudiados para producir su muerte. Se encontró que las AgNPs alcanzaron una actividad antimicrobiana a la misma concentración para ambas bacterias e inhibieron el crecimiento de *Candida albicans* ATCC 14053 con menos cantidad de AgNPs. Esto puede atribuirse a la gran cantidad de grupos funcionales presentes en la superficie de las bacterias con respecto a la de los hongos.

Igualmente, el trabajo de grado permitió el desarrollo de un protocolo reproducible para la obtención de un material compuesto por un elastómero de silicona Ecoflex 00-50® y las AgNPs sintetizadas en este trabajo. Se encontró que el mejor método de obtención del material consiste en mezclar a 250 o 450 RPM con un agitador mecánico y por 3 min, partes iguales del monómero y del catalizador del elastómero comercial con tween 80 al 1 % en volumen y una concentración definida de AgNPs suspendidas en agua tipo 1. Es necesario desgasificar al vacío la mezcla obtenida para extraer el aire con una presión de 70 mbar por 5 min y dejar curar el material por 3 h a temperatura ambiente.

Se encontró que el material compuesto que incluyó AgNPs presentó actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) al ser comparado con muestras del material sin AgNPs. Así, la reducción en la de los microorganismos fue probablemente debido a la presencia de las nanopartículas, sin embargo, no se encontró una eliminación total de las bacterias evaluadas.

La capacidad de reducir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 del material compuesto con la mayor concentración de AgNPs evaluada, fue mayor que en *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) en un 29.70 % aproximadamente. Esto generado por la mayor presencia de factores de virulencia en las cepas resistentes a antibióticos de *Staphylococcus aureus* que en las no resistentes, los cuales actúan como antioxidantes frente a los radicales libres que generan las AgNPs.



Por último, las propiedades mecánicas del material evaluado con diferentes concentraciones de AgNPs se encontraron dentro de las condiciones aceptables de dureza y resistencia a la compresión para el uso como interfaz ortoprotésica externas de miembros inferiores de acuerdo a los valores comerciales y los reportados en la literatura.

Así, con el presente trabajo se obtuvo un compuesto polimérico con AgNPs de uso prometedor para el diseño de interfaces otro-protésicos externos de miembros inferiores que permita reducir en cierta medida la proliferación de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) en las zonas de contacto entre la piel de pacientes y las órtesis o prótesis que posean propiedades comparables con los materiales comerciales actuales.

## 8. TRABAJOS FUTUROS

Se espera desarrollar un protocolo de síntesis de AgNPs que permita obtener un aumento de su concentración, de forma que se reduzca el volumen de la solución acuosa en que se encuentran diluidas, e incluir procesos de purificación y secado para lograr un mejor proceso de incorporación en matrices poliméricas que mejoren las propiedades mecánicas del compuesto. Además, estudiar la compatibilidad de otros tensioactivos o solventes con el sistema polimérico para lograr integrar adecuadamente las AgNPs a la matriz.

Igualmente, se propone realizar la síntesis de las AgNPs directamente en las películas de elastómero de silicona, empleando radiación con luz Ultravioleta e investigar cómo estas modificaciones alteran la actividad antimicrobiana de las AgNPs.

Se debe evaluar la actividad antimicrobiana del material desarrollado con AgNPs contra *Candida albicans* realizando ajustes a la norma ISO 22196: 2011 ampliando los tiempos de incubación del microorganismo por al menos 48 h y aumentando el factor de dilución al realizar el lavado del material.

Se debe estimar la inocuidad del material obtenido para el uso en personas, mediante ensayos de citotoxicidad, genotoxicidad y mutagenicidad *in vitro* que permitan conocer los efectos de las AgNPs en las células humanas.

Además, se propone desarrollar en un futuro un prototipo de *liner* funcional para prótesis externa transtibial o transfemoral con el cual se obtenga un protocolo de fabricación de una interfaz nanoestructurada. El prototipo será evaluado física, química y mecánicamente simulando las cargas y condiciones generadas al realizar el ejercicio de la marcha, siguiendo la normatividad establecida para estos ensayos.

En un futuro se espera implementar las metodologías de AgNPs y del compuesto desarrolladas en el presente trabajo para disminuir el crecimiento y proliferación de hongos y bacterias en múltiples escenarios. Entre estos, el desarrollo de materiales que requieran un efecto que controle el crecimiento de microorganismos a medida que cumplen sus funciones principales. Algunos ejemplos son: el desarrollo de telas antibacteriales de uso médico o de hogar, apósitos de quemaduras o tratamientos para heridas, materiales dentales, implantes óseos y recubrimiento de dispositivos médicos entre otros. De esta forma, aportar al desarrollo de alternativas eficientes para el control del crecimiento microbiano ocasionado por la creciente resistencia bacteriana que resulta de la evolución natural.

## REFERENCIAS

- [1] Health Organization World, *International Classification of Functioning, Disability and Health (ICF)*. Santander, España, 2001.
- [2] Organización Panamericana de la Salud, “Aplicación de la Clasificación Internacional del Funcionamiento, de la Discapacidad y de la Salud en estudios de prevalencia de discapacidad en las Américas,” Washington, 2012.
- [3] R. La O Ramos and A. Baryolo Cardozo, “Rehabilitación del Amputado de Miembro Inferior,” *Medicina de Rehabilitación Cubana*. La Habana, p. 41, 2005.
- [4] International Organization for Standardization, “Norma ISO 8549-1:1989-Prosthetics and orthotics.” p. 6, 1989.
- [5] A. Peethambaran, “The relationship between performance, satisfaction, and well being for patients using anterior and posterior design Knee-Ankle-Foot-Orthosis,” *J. Prosthetics Orthot.*, vol. 12, pp. 33–47, 2000.
- [6] H. E. J. Meulenbelt, J. H. B. Geertzen, M. F. Jonkman, and P. U. Dijkstra, “Skin problems of the stump in lower limb amputees: 1. A clinical study.,” *Acta Derm. Venereol.*, vol. 91, no. 2, pp. 7–173, 2011.
- [7] K. Ghoseiri and M. R. Safari, “Prevalence of heat and perspiration discomfort inside prostheses: literature review.,” *J. Rehabil. Res. Dev.*, vol. 51, no. 6, pp. 68–855, 2014.
- [8] M. J. Hall, D. G. Shurr, M. J. VanBeek, and M. B. Zimmerman, “The Prevalence of Dermatological Problems for Transtibial Amputees Using a Roll-on Liner,” *JPO J. Prosthetics Orthot.*, vol. 20, no. 4, pp. 134–139, 2008.
- [9] T. R. Dillingham, L. E. Pezzin, E. J. MacKenzie, and A. R. Burgess, “Use and satisfaction with prosthetic devices among persons with trauma-related amputations,” *Am. J. Phys. Med. Rehabil.*, vol. 80, no. 8, pp. 563–571, 2001.
- [10] K. Hachisuka, T. Nakamura, S. Ohmine, H. Shitama, and K. Shinkoda, “Hygiene problems of residual limb and silicone liners in transtibial amputees wearing the total surface bearing socket,” *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, vol. 82, no. 9, pp. 1286–1290, 2001.
- [11] E. Baars and J. Geertzen, “Literature review of the possible advantages of silicon liner socket use in trans-tibial prostheses,” *Prosthet. Orthot. Int.*, vol. 29, no. 1, pp. 27–37, 2005.
- [12] H. E. Meulenbelt, J. H. Geertzen, M. F. Jonkman, and P. U. Dijkstra, “Determinants of Skin Problems of the Stump in Lower-Limb Amputees,” *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, vol. 90, no. 1, pp. 74–81, 2009.

- [13] Organización Mundial de la Salud; Banco Mundial, “Informe Mundial la Discapacidad,” p. 388, 2011.
- [14] Insitituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, “Comportamiento de muertes y lesiones accidentales,” 2013.
- [15] C. Marshall and G. Stansby, “Amputation and rehabilitation,” *Vasc. Surg.*, vol. 31, no. 5, pp. 236–239, 2013.
- [16] J. E. Edelstein, “Amputations,” in *A Comprehensive Guide to Geriatric Rehabilitation (Third Edition)*, Third Edit., Churchill Livingstone, 2014, pp. 337–340.
- [17] OPS, “Discapacidad lo que todos debemos saber,” *Nº 616*. Washington, pp. 9–15, 2006.
- [18] S. Valbuena, “Muertes y lesiones no fatales por accidentes de trasporte,” 2011.
- [19] Presidencia de la república de Colombia, “Dirección contra minas,” 2016. [Online]. Available: <http://www.accioncontraminas.gov.co/estadisticas/Paginas/victimas-minas-antipersonal.aspx>. [Accessed: 28-Apr-2016].
- [20] J. C. Paz, “Amputation,” in *Acute Care Handbook for Physical Therapists*, F. Edition, Ed. Elsevier Inc., 2014, pp. 361–366.
- [21] C. Khasnabis, P. Public Health Innovation and Intellectual Property, and E. Department of Essential Medicines and Health Products, “Standards for Prosthetics and Orthotics Service Provision. 2015-2017 work plan,” 2015.
- [22] National Commission on Orthotic and Prosthetic Education, “Issues affecting the Future Demand for Orthotists and Prosthetists,” 2002.
- [23] M. L. Edwards, “Chapter 18 - Lower Limb Prosthetics,” in *Clinician’s Guide to Assistive Technology*, Mosby Inc, Ed. 2002, pp. 297–310.
- [24] N. L. Dudek, M. B. Marks, S. C. Marshall, and J. P. Chardon, “Dermatologic conditions associated with use of a lower-extremity prosthesis,” *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, vol. 86, no. 4, pp. 659–663, 2005.
- [25] K. Hagberg and R. Brånemark, “Consequences of non-vascular trans-femoral amputation: a survey of quality of life, prosthetic use and problems.,” *Prosthet. Orthot. Int.*, vol. 25, no. 3, pp. 186–194, 2001.
- [26] Mayo Clinic Staff, “Diseases and Conditions Staph infections,” 2016. [Online]. Available: <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/staph-infections/basics/symptoms/con-20031418>. [Accessed: 16-Nov-2016].
- [27] Minnesota Department of Health Fact Sheet, “Causes and Symptoms of

- Staphylococcus aureus,” 2010. [Online]. Available: <http://www.health.state.mn.us/divs/idepc/diseases/staph/basics.html>.
- [28] The Healthline Editorial, “Candida Fungus Skin Infection,” 2016. [Online]. Available: <http://www.healthline.com/health/skin/candida-fungus#Overview1>. [Accessed: 16-Nov-2016].
- [29] J. Pillenger, “Infection of the skin by Candida albicans (cutaneous candidiasis),” 2013. [Online]. Available: Infection of the skin by Candida albicans (cutaneous candidiasis). [Accessed: 16-Nov-2016].
- [30] D. P. Murphy, *Fundamentals of Amputation Care and Prosthetics*, First edit. New York, 2013.
- [31] V. Raji, M. Chakraborty, and P. A. Parikh, “Synthesis of Starch-Stabilized Silver Nanoparticles and Their Antimicrobial Activity,” *Part. Sci. Technol.*, vol. 30, no. 6, pp. 565–577, 2012.
- [32] W. Levy, “Skin Care Determines Prosthetic Comfort,” *Biomech. Mag.*, vol. 12, no. 1, pp. 45–54, 2002.
- [33] A. Chaudhary, “A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics’ discovery,” *Acta Pharm. Sin. B*, 2016.
- [34] R. R. Watkins and R. A. Bonomo, “Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance,” *Infect. Dis. Clin. North Am.*, vol. 30, no. 2, pp. 313–322, 2016.
- [35] C. A. Dos Santos, M. M. Seckler, A. P. Ingle, I. Gupta, S. Galdiero, M. Galdiero, A. Gade, and M. Rai, “Silver nanoparticles: Therapeutical uses, toxicity, and safety issues,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 103, no. 7, pp. 1931–1944, 2014.
- [36] D. R. Monteiro, L. F. Gorup, A. S. Takamiya, A. C. Ruvollo-Filho, E. R. de Camargo, and D. B. Barbosa, “The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 34, no. 2, pp. 103–110, 2009.
- [37] Departamento Nacional de Planeación, “Plan Nacional de Desarrollo 2014-2018: Todos por un nuevo país,” Bogotá, D.C, 2015.
- [38] D. Peters, L. Chaitow, G. Harris, and S. Morrison, “Chapter 18: Lower Limb Prosthetics,” in *Technologies for Mobility and Locomotion*, P. Barker, D. Childress, M. Jones, C. Sargent, L. Trachtman, and J. Uellendahl, Eds. 2002, pp. 297–310.
- [39] I. International Organization for Standardization, “ISO 8549-1:1989. Prosthetics and orthotics -- Vocabulary -- Part 1: General terms for external limb prostheses and external orthoses,” 1989.
- [40] V. Rajtůková, M. Michalíková, L. Bednarčíková, A. Balogová, and J. Živčák,

- "Biomechanics of Lower Limb Prostheses," *Procedia Eng.*, vol. 96, pp. 382–391, 2014.
- [41] J. D. Hsu, J. W. Michael, and J. R. Fisk, *AAOS Atlas of Orthoses and Assistive Devices*, Fourth Edi. 2008.
- [42] Y. A. Jin, J. Plott, R. Chen, J. Wensman, and A. Shih, "Additive manufacturing of custom orthoses and prostheses - A review," *Addit. Manuf.*, vol. 36, pp. 199–204, 2015.
- [43] J. Z. Laferrier and R. Gailey, "Advances in Lower-limb Prosthetic Technology," *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.*, vol. 21, no. 1, pp. 87–110, 2010.
- [44] H. Cochrane, K. Orsi, and P. Reilly, "Lower limb amputation Part 3: Prosthetics - a 10 year literature review," *Prosthet. Orthot. Int.*, vol. 25, pp. 21–28, 2001.
- [45] A. I. Campbell, S. Sexton, C. J. Schaschke, H. Kinsman, B. McLaughlin, and M. Boyle, "Prosthetic limb sockets from plant-based composite materials.," *Prosthet. Orthot. Int.*, vol. 36, no. 2, pp. 181–9, 2012.
- [46] G. Chitragari, D. B. Mahler, B. J. Sumpio, P. a. Blume, and B. E. Sumpio, "Prosthetic options available for the Diabetic Lower Limb Amputee," *Clin. Podiatr. Med. Surg.*, vol. 31, no. 1, pp. 174–185, 2014.
- [47] E. Viosca, "Guía de Uso y Prescripción de Productos Ortoprotésicos a Medida," *Inst. Biomecánica Val.*, p. 649, 2004.
- [48] International Organization for Standardization, "ISO 8551: 2003. Prosthetics and orthotics -- Functional deficiencies -- Description of the person to be treated with an orthosis, clinical objectives of treatment, and functional requirements of the orthosis," 2003.
- [49] S. L. Phillips and W. Craelius, "Material Properties of Selected Prosthetic Laminates," *JPO J. Prosthetics Orthot.*, vol. 17, pp. 27–32, 2005.
- [50] X. Jia, M. Zhang, and L. Winson, "Load transfer mechanics between trans-tibial prosthetic socket and residual limb-dynamic effects.," *J. Biomech.*, vol. 37, p. 1375, 2004.
- [51] M. Zhang, A. Turner-Smith, A. Tanner, and V. . Roberts, "Clinical Investigation of the pressure and shear stress on the transtibial stump with prosthesis. Journal of Biomechanics," *J. Biomech.*, vol. 20, pp. 188–198, 1998.
- [52] G. W. Bosker and G. Walden, "Lower-Limb Prosthetics Society: The Interfaces between the Transtibial Residual Limb and the Socket Design," *Am. Acad. Orthotists Prosthetists*, vol. 4, no. 1, pp. 3–9, 2008.
- [53] G. K. Klute, B. C. Glaister, and J. S. Berge, "Prosthetic liners for lower limb amputees: A review of the literature," *Prosthet. Orthot. Int.*, vol. 34, no. 2, pp. 146–153, 2010.

- [54] A. Torres, “Desarrollo y evaluación de composites poliméricos para su aplicación en prótesis y órtesis de miembro inferior,” Universidad Pontificia Bolivariana, 2009.
- [55] J. C. Cagle, P. G. Reinhall, B. J. Hafner, and J. E. Sanders, “Development of Standardized Material Testing Protocols for Prosthetic Liners,” *J. Biomech. Eng.*, vol. 139, no. 4, p. 45001, 2017.
- [56] J. Kelley, Christopher Colvin, “Fabric covered polymeric prosthetic liner,” US9265629B2, 2016.
- [57] D. L. Wise, D. J. Trantolo, D. E. Altobelli, M. J. Yaszemski, and J. D. Gresser, “Biomedical applications of biomaterials,” in *Human Biomaterials Applications*, First edit., S. Science, Ed. New York, 1996, pp. 215–256.
- [58] E. C. T. Baars and J. H. B. Geertzen, “Literature review of the possible advantages of silicon liner socket use in trans-tibial prostheses.,” *Prosthet. Orthot. Int.*, vol. 29, no. 1, pp. 27–37, 2005.
- [59] A. K. Dasgupta, P. J. McCluskie, V. S. Patel, and L. Robins, “The performance of the ICEROSS prostheses amongst transtibial amputees with a special reference to the workplace-a preliminary study.,” *Occup. Med. (Lond).*, vol. 47, no. 4, pp. 228–236, 1997.
- [60] S. Arun and S. Kanagaraj, “Performance enhancement of epoxy based sandwich composites using multiwalled carbon nanotubes for the application of sockets in trans-femoral amputees,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 59, pp. 1–10, 2015.
- [61] A. Bartonek, M. Eriksson, and E. M. Gutierrez, “A new carbon fibre spring orthosis for children with plantarflexor weakness,” *Gait Posture*, vol. 25, no. 4, pp. 652–656, 2007.
- [62] R. L. Nelham, “Carbon fibre reinforced plastic applied to prosthetics and orthotics,” *J. Biomed. Eng.*, vol. 3, no. 4, pp. 305–314, 1981.
- [63] M. S. Scholz, J. P. Blanchfield, L. D. Bloom, B. H. Coburn, M. Elkington, J. D. Fuller, M. E. Gilbert, S. A. Muflahi, M. F. Pernice, S. I. Rae, J. A. Trevarthen, S. C. White, P. M. Weaver, and I. P. Bond, “The use of composite materials in modern orthopaedic medicine and prosthetic devices: A review,” *Compos. Sci. Technol.*, vol. 71, no. 16, pp. 1791–1803, 2011.
- [64] E. Van der Spoel, M. P. Rozing, J. J. Houwing-Duistermaat, P. Eline Slagboom, M. Beekman, A. J. M. de Craen, R. G. J. Westendorp, and D. van Heemst, “Association analysis of insulin-like growth factor-1 axis parameters with survival and functional status in nonagenarians of the Leiden Longevity Study,” *Aging (Albany. NY).*, vol. 7, no. 11, pp. 956–963, 2015.
- [65] D. R. Askeland and P. P. Phulé, *Ciencia e ingeniería de los materiales*, Cuarta edi. Australia, Brasil, Canadá, España, Estados Unidos, México, Reino Unido,

Singapur, 2004.

- [66] ASTM International, *ASTM D395-16: Standard Test Methods for Rubber Property — Compression Set*, vol. 9. West Conshohocken, 2016, pp. 1–6.
- [67] R. Zambudio, *Prótesis, ortesis y ayudas técnicas*, vol. 1. Barcelona, España: Elsevier Masson, 2009.
- [68] W. D. Callister, *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales*, Illustrate. 2002.
- [69] ASTM International, *ASTM D2240-15 Standard Test Method for Rubber Property—Durometer Hardness*. West Conshohocken, 2015, pp. 1–13.
- [70] M. Rai, A. Yadav, and A. Gade, “Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 1, pp. 76–83, 2009.
- [71] N. Durán, M. Durán, M. B. de Jesus, A. B. Seabra, W. J. Fávaro, and G. Nakazato, “Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 12, no. 3, pp. 789–799, 2016.
- [72] C. A. Dos Santos, M. M. Seckler, A. P. Ingle, I. Gupta, S. Galdiero, M. Galdiero, A. Gade, and M. Rai, “Silver nanoparticles: Therapeutical uses, toxicity, and safety issues,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 103, no. 7, pp. 1931–1944, 2014.
- [73] K. K. Y. Wong and X. Liu, “Silver nanoparticles—the real ‘silver bullet’ in clinical medicine?,” *Medchemcomm*, vol. 1, no. 2, pp. 125–131, 2010.
- [74] A. M. E. L. Badawy, T. P. Luxton, R. G. Silva, K. G. Scheckel, and M. T. Suidan, “Impact of Environmental Conditions (pH, Ionic Strength, and Electrolyte Type) on the Surface Charge and Aggregation of Silver Nanoparticles Suspensions,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 44, no. 4, pp. 1260–1266, 2010.
- [75] M. Moritz and M. Geszke-Moritz, “The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles,” *Chem. Eng. J.*, vol. 228, pp. 596–613, 2013.
- [76] F. Hamedi-Rad, T. Ghaffari, F. Rezaii, and A. Ramazani, “Effect of nanosilver on thermal and mechanical properties of acrylic base complete dentures.,” *J. Dent. (Tehran)*, vol. 11, no. 5, pp. 495–505, 2014.
- [77] R. Zanella, “Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño,” *Mundo nano*, vol. 5, no. 1, pp. 69–81, 2012.
- [78] X. S. Liu, “Inorganic Photochemical Synthesis,” in *Modern Inorganic Synthetic Chemistry: Second Edition*, Second Edi., Nueva Jersey: Elsevier B.V., 2017, pp. 143–165.



- [79] S. A. Dong and S. P. Zhou, "Photochemical synthesis of colloidal gold nanoparticles," *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.*, vol. 140, no. 3, pp. 153–159, 2007.
- [80] S. Thomas, R. Thomas, A. K. Zachariah, and R. K. Mishra, *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization*, vol. 3. Amsterdam: Elsevier, 2017.
- [81] B. Liu and G. Han, "Shell thickness-dependent raman enhancement for rapid identification and detection of pesticide residues at fruit peels," *Anal Chem*, vol. 84, no. 1, pp. 255–261, 211AD.
- [82] P. Alessio, P. H. B. Aoki, L. N. Furini, A. E. Aliaga, and C. J. L. Constantino, "Characterization of Nanomaterials," in *Nanocharacterization Techniques*, no. 2007, Elsevier Inc., 2017, pp. 65–98.
- [83] S. Brar and M. Vierma, "Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques," *TrAC Trends Anal Chem*, vol. 30, pp. 4–17, 2011.
- [84] K. Sapsford, K. Tyner, B. Dair, J. Deschamps, and I. Medintz, "Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques," *Anal Chem*, vol. 83, pp. 4453–4488, 2011.
- [85] V. Filipe, A. Hawe, and W. Jiskoot, "Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by nanosight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates," *Pharm Res*, vol. 27, pp. 796–810, 2010.
- [86] V. Uskokovic, "Dynamic light scattering based microelectrophoresis: main prospects and limitations," *J Disper Sci Technol*, vol. 33, pp. 1762–1786, 2012.
- [87] Y. Leng, *Materials Characterization. Introduction to Microscopic and Spectroscopic Methods*, Second Edi. kowloon, 2013.
- [88] J. Clogston and A. Patri, "Characterization of nanoparticles intended for drug delivery," *Humana Press*, pp. 63–70, 2011.
- [89] R. Xu, "Progress in nanoparticles characterization: sizing and zeta potential measurement," *Particuology*, vol. 6, pp. 112–115, 2008.
- [90] P. Lin, S. Lin, P. C. Wang, and R. Sridhar, "Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials," *Biotechnol. Adv.*, vol. 32, no. 4, pp. 711–726, 2014.
- [91] T. Cosgrove, *Colloid Science: Principles, Methods and Applications*, Second. UK, 2005.
- [92] D. Datta, S. K. Vaidya, J. Howitt, and L. Gopalan, "Outcome of fitting an ICEROSS prosthesis: views of trans-tibial amputees," *Prosthet. Orthot. Int.*, vol. 20, no. 2, pp. 111–115, 1996.

- [93] J. E. Sanders, B. S. Nicholson, S. G. Zachariah, D. V Cassisi, A. Karchin, and J. R. Fergason, "Testing of elastomeric liners used in limb prosthetics: classification of 15 products by mechanical performance," *J. Rehabil. Res. Dev.*, vol. 41, no. 2, pp. 175–186, 2004.
- [94] Össur, "Össur catalog 2012 /13." Reikiavik, pp. 20–53, 2012.
- [95] H. Janusson, F. Thorsteinsson, S. A. Asgeirsson, and P. Einarsson, "Preform for making prosthetic suspension sleeve," US 6,626,952 B2, 2003.
- [96] H. Janusson, F. Thorsteinsson, S. A. Asgeirsson, and P. Einarsson, "Composite elastic material," US 6,706,364 B2, 2004.
- [97] H. Janusson, F. Thorsteinsson, S. A. Asgeirsson, and P. Einarsson, "Process for making prosthetic suspension sleeve," 2004/0137178 A1, 2006.
- [98] J. Uellendahl, "Prosthetic socks and liners," *Amputee Coalit. Am.*, vol. 1, no. 1, pp. 57–59, 2014.
- [99] P. Sbano, C. Miracco, M. Risulo, and M. Fimiani, "Acroangiokeratitis (pseudo-Kaposi sarcoma) associated with verrucous hyperplasia induced by suction-socket lower limb prosthesis," *J. Cutan. Pathol.*, vol. 32, no. 6, pp. 429–432, 2005.
- [100] A. Panáček, M. Kolář, R. Večeřová, R. Pucek, J. Soukupová, V. Kryštof, P. Hamal, R. Zbořil, and L. Kvítek, "Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp.," *Biomaterials*, vol. 30, no. 31, pp. 6333–6340, 2009.
- [101] H. M. Manukumar, B. Yashwanth, S. Umesh, and J. Venkateswara Rao, "Biocidal mechanism of green synthesized thyme loaded silver nanoparticles (GTAgNPs) against immune evading tricky methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 090 (MRSA090) at a homeostatic environment," *Arab. J. Chem.*, vol. 90, 2017.
- [102] M. Kavruk, O. Celikbicak, V. C. Ozalp, B. A. Borsa, F. J. Hernandez, and G. Bayramoglu, "Antibiotic loaded nanocapsules functionalized with aptamer gates for targeted destruction of pathogens," *Chem. Commun.*, vol. 40, no. 51, p. 8492–8495., 2015.
- [103] M. . Rai, S. . Deshmukh, A. . Ingle, and A. . Gade, "Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 112, pp. 841–852, 2012.
- [104] V. Raji, M. Chakraborty, and P. A. Parikh, "Synthesis of Starch-Stabilized Silver Nanoparticles and Their Antimicrobial Activity," *Part. Sci. Technol.*, vol. 30, no. 6, pp. 565–577, 2012.
- [105] G. F. Prozorova, A. S. Pozdnyakov, N. P. Kuznetsova, S. A. Korzhova, A. I. Emel'yanov, T. G. Ermakova, T. V Fadeeva, and L. M. Sosedova, "Green synthesis of water-soluble nontoxic polymeric nanocomposites containing

- silver nanoparticles,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9, pp. 1883–1889, 2014.
- [106] C. George, S. Kuriakose, S. George, and T. Mathew, “Antifungal activity of silver nanoparticle-encapsulated  $\beta$ -cyclodextrin against human opportunistic pathogens,” *Supramol. Chem.*, vol. 23, no. 4, pp. 593–597, 2011.
- [107] A. N. Brown, K. Smith, T. A. Samuels, J. Lu, S. O. Obare, and M. E. Scott, “Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, no. 8, pp. 2768–2774, 2012.
- [108] J. Zapata-Giraldo, P. Mena, D. Cuesta, B. Galeano, M. Mejía, L. E. Botero, I. Ortiz, N. Escobar, and L. Hoyos, “Characterization of silver nanoparticles for potential use as antimicrobial agent,” in *VII Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica*, 2016.
- [109] B. Ajitha, Y. Ashok Kumar Reddy, and P. Sreedhara Reddy, “Enhanced antimicrobial activity of silver nanoparticles with controlled particle size by pH variation,” *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 3, pp. 110–117, 2015.
- [110] J. Zapata-Giraldo, L. Hoyos, D. Cuesta, and L. E. Botero, “Evaluación antibacteriana de nanopartículas de plata como estrategia de control de las infecciones asociadas a la atención en salud,” in *Segundo Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular C2B2 2016.*, 2016.
- [111] C. W. Lou, A. P. Chen, T. T. Lic, and J. H. Lin, “Antimicrobial activity of UV-induced chitosan capped silver nanoparticles,” *Mater. Lett.*, vol. 128, pp. 248–252, 2014.
- [112] J. S. Gabriel, V. A. M. Gonzaga, A. L. Poli, and C. C. Schmitt, “Photochemical synthesis of silver nanoparticles on chitosans/montmorillonite nanocomposite films and antibacterial activity,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 171, pp. 202–210, 2017.
- [113] M. F. Ashby and D. R. H. Jones, “Materiales compuestos con fibras, partículas y espumas,” in *Materiales para ingeniería 2: Introducción a la microestructura, el procesamiento y el diseño*, 2009, pp. 323–338.
- [114] M. A. Davoodbasha, S. C. Kim, S. Y. Lee, and J. W. Kim, “The facile synthesis of chitosan-based silver nano-biocomposites via a solution plasma process and their potential antimicrobial efficacy,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 605, pp. 49–58, 2016.
- [115] J. An, Q. Luo, X. Yuan, D. Wang, and X. Li, “Preparation and Characterization of Silver-Chitosan Nanocomposite Particles with Antimicrobial Activity,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 120, pp. 3180–3189, 2011.
- [116] D. Wei, W. Sun, W. Qian, Y. Ye, and X. Ma, “The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity,” *Carbohydr. Res.*, vol. 344,

no. 17, pp. 2375–2382, 2009.

- [117] L. Biao, S. Tan, Y. Wang, X. Guo, Y. Fu, F. Xu, Y. Zu, and Z. Liu, “Synthesis, characterization and antibacterial study on the chitosan-functionalized Ag nanoparticles,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 76, pp. 73–80, 2017.
- [118] M. Cakić, S. Glišić, G. Nikolić, G. M. Nikolić, K. Cakić, and M. Cvetinov, “Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran sulphate stabilized silver nanoparticles,” *J. Mol. Struct.*, vol. 1110, pp. 156–161, 2016.
- [119] M. A. Davoodbasha, S. C. Kim, S. Y. Lee, and J. W. Kim, “The facile synthesis of chitosan-based silver nano-biocomposites via a solution plasma process and their potential antimicrobial efficacy,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 605, pp. 49–58, 2016.
- [120] L. Biao, S. Tan, Y. Wang, X. Guo, Y. Fu, F. Xu, Y. Zu, and Z. Liu, “Synthesis, characterization and antibacterial study on the chitosan-functionalized Ag nanoparticles,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 76, pp. 73–80, 2017.
- [121] D. R. Monteiro, L. F. Gorup, S. Silva, M. Negri, E. R. de Camargo, R. Oliveira, D. B. Barbosa, and M. Henriques, “Silver colloidal nanoparticles: antifungal effect against adhered cells and biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*,” *Biofouling*, vol. 27, no. 7, pp. 711–719, 2011.
- [122] Y. Han, S. Kiat-amnuay, J. M. Powers, and Y. Zhao, “Effect of nano-oxide concentration on the mechanical properties of a maxillofacial silicone elastomer,” *J. Prosthet. Dent.*, vol. 100, no. 6, pp. 465–473, 2008.
- [123] L. Kvítek, A. Panáček, J. Soukupová, M. Kolář, R. Večeřová, R. Pucek, M. Holecová, and R. Zbořil, “Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs),” *J. Phys. Chem. C*, vol. 112, no. 15, pp. 5825–5834, 2008.
- [124] J. Soukupova, L. Kvitek, A. Panacek, T. Nevecna, and R. Zboril, “Comprehensive study on surfactant role on silver nanoparticles ( NPs ) prepared via modified Tollens process,” *Mater. Chem. Phys.*, vol. 111, pp. 77–81, 2008.
- [125] P. B. A. das Neves, J. A. M. Agnelli, C. Kurachi, and C. W. O. de Souza, “Addition of silver nanoparticles to composite resin: Effect on physical and bactericidal properties in vitro,” *Braz. Dent. J.*, vol. 25, no. 2, pp. 141–145, 2014.
- [126] S. Kasraei, L. Sami, S. Hendi, M.-Y. Alikhani, L. Rezaei-Soufi, and Z. Khamverdi, “Antibacterial properties of composite resins incorporating silver and zinc oxide nanoparticles on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*,” *Restor. Dent. Endod.*, vol. 39, pp. 109–114, 2014.
- [127] Z. Meran, A. Besinis, T. De Peralta, and R. D. Handy, “Antifungal properties and biocompatibility of silver nanoparticle coatings on silicone maxillofacial

prostheses in vitro,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 106, no. 3, pp. 1038–1051, 2018.

- [128] D. Pohle, C. Damm, J. Neuhof, A. Rosch, and H. Munstedt, “Antimicrobial Properties of Orthopaedic Textiles after in-situ Deposition of Silver Nanoparticles,” *Polym. Polym. Compos.*, vol. 15, no. 5, pp. 357–363, 2006.
- [129] P. Kanmani and J. W. Rhim, “Physical, mechanical and antimicrobial properties of gelatin based active nanocomposite films containing AgNPs and nanoclay,” *Food Hydrocoll.*, vol. 35, pp. 644–652, 2014.
- [130] J. Patiño, L. Henríquez, M. Mendoza, M. Lantero, and M. García, “Desarrollo de películas plásticas antimicrobianas con iones de plata para el envasado activo de embutidos,” *Cienc. y Tecnol. Aliment.*, vol. 23, no. 3, pp. 47–51, 2013.
- [131] S. M. Zayed, A. M. Alshimy, and A. E. Fahmy, “Effect of Surface Treated Silicon Dioxide Nanoparticles on Some Mechanical Properties of Maxillofacial Silicone Elastomer,” *Int. J. Biomater.*, vol. 2014, no. 5, pp. 14–15, 2014.
- [132] S. Chowdhury, F. Yusof, M. O. Faruck, and N. Sulaiman, “Process Optimization of Silver Nanoparticle Synthesis Using Response Surface Methodology,” in *Procedia Engineering. 4th International Conference on Process Engineering and Advanced Materials*, 2016, vol. 148, pp. 992–999.
- [133] A. J. Kora, R. Manjusha, and J. Arunachalam, “Superior bactericidal activity of SDS capped silver nanoparticles: Synthesis and characterization,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, no. 7, pp. 2104–2109, 2009.
- [134] K. V. Apryatina, M. V. Gribanova, A. V. Markin, S. S. Sologubov, and L. A. Smirnova, “Silver nanoparticle–chitosan complexes and properties of their composites,” *Nanotechnologies Russ.*, vol. 11, no. 11–12, pp. 766–775, 2016.
- [135] J. Zapata Giraldo, “Desarrollo de una cubierta polimérica nanoreforzada como barrera de protección ante infecciones asociadas a la atención en salud,” Universidad Pontificia Bolivariana, 2017.
- [136] K. Jannoo, C. Teerapatsakul, A. Punyanut, and W. Pasanphan, “Electron beam assisted synthesis of silver nanoparticle in chitosan stabilizer: Preparation, stability and inhibition of building fungi studies,” *Radiat. Phys. Chem.*, vol. 112, pp. 177–188, 2015.
- [137] J. S. Kim, E. Kuk, K. N. Yu, J. H. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y. K. Park, Y. H. Park, C. Y. Hwang, Y. K. Kim, Y. S. Lee, D. H. Jeong, and M. H. Cho, “Antimicrobial effects of silver nanoparticles,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 3, no. 1, pp. 95–101, 2007.
- [138] D. Mahl, J. Diendorf, W. Meyer-Zaika, and M. Epple, “Possibilities and limitations of different analytical methods for the size determination of a bimodal dispersion of metallic nanoparticles,” *Colloids Surfaces A*

*Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 377, no. 1–3, pp. 386–392, 2011.

- [139] R. Landsiedel, L. Ma-Hock, A. Kroll, D. Hahn, J. Schnekenburger, K. Wiench, and W. Wohlleben, “Testing metal-oxide nanomaterials for human safety,” *Adv. Mater*, vol. 22, pp. 2601–2627, 2010.
- [140] A. Viudez, “Síntesis, caracterización y ensamblaje de nanopartículas de oro protegidas por monocapas moleculares,” Universidad de Córdoba, 2011.
- [141] H. Lange, “Comparative test of methods to determine particle size and particle size distribution in the submicron range,” *Part. Syst. Charact.*, vol. 12, pp. 148–157, 1995.
- [142] S. Mohanbaba and S. Gurunathan, *Differential biological activities of silver nanoparticles against gramnegative and gram-positive bacteria: A novel approach for antimicrobial therapy*. Elsevier Inc., 2016.
- [143] U. Eduok, O. Faye, and J. Szpunar, “Progress in Organic Coatings Recent developments and applications of protective silicone coatings : A review of PDMS functional materials,” *Prog. Org. Coatings*, vol. 111, no. May, pp. 124–163, 2017.
- [144] J. Kozakiewicz, I. Ofat, and J. Trzaskowska, “Silicone-containing aqueous polymer dispersions with hybrid particle structure,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 223, pp. 1–39, 2015.
- [145] A. S. Nobrega, A. M. Andreotti, and A. Moreno, “Influence of adding nanoparticles on the hardness , tear strength , and permanent deformation of facial silicone subjected to accelerated aging,” *J. Prosthet. Dent.*, vol. 116, no. 4, p. 623–629.e1, 2015.
- [146] M. C. Goiato, A. A. Pesqueira, A. Moreno, D. Micheline, M. F. Haddad, and L. C. Bannwart, “Effects of pigment , disinfection , and accelerated aging on the hardness and deterioration of a facial silicone elastomer,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 97, pp. 1577–1580, 2012.
- [147] F. Yoshii, Y. Zhanshan, K. Isobe, K. Shinozaki, and K. Makuuchi, “Electron beam crosslinked PEO and PEO / PVA hydrogels for wound dressing,” *Radiation*, vol. 55, pp. 133–138, 1999.
- [148] U. Bertram and R. Bodmeier, “In situ gelling , bioadhesive nasal inserts for extended drug delivery : In vitro characterization of a new nasal dosage form,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 27, pp. 62–71, 2006.
- [149] D. N. Mancuso, M. C. Goiato, B. C. Zuccolotti, A. Moreno, and D. M. dos Santos, “Evaluation of hardness and colour change of soft liners after accelerated ageing.,” *Prim. Dent. Care*, vol. 16, no. 3, pp. 127–130, 2009.
- [150] A. Mese and K. G. Guzel, “Effect of storage duration on the hardness and tensile bond strength of silicone- and acrylic resin-based resilient denture

- liners to a processed denture base acrylic resin,” *J. Prosthet. Dent.*, vol. 99, no. 2, pp. 153–159, 2008.
- [151] J. M. Colvin, C. T. Kelley, M. A. Groves, and J. Denune, “Multi-layer polymeric prosthetic liner,” US2009/0240344 A1, 2009.
- [152] Smooth-On, “Durometer Shore Hardness Scale,” 2018. [Online]. Available: <https://www.smooth-on.com/page/durometer-shore-hardness-scale/>. [Accessed: 15-Nov-2018].
- [153] ISO, “International Standard ISO 22196: Plastics-Measurement of antibacterials activity on plastics surfaces.” 2011.
- [154] Japanese Association Standards, “(JIS) Z 2801:2000- Antimicrobial Products Test for Antimicrobial Activity and Efficacy.” Tokyo, Japan, 2000.
- [155] M. E. Samberg, S. J. Oldenburg, and N. A. Monteiro-Riviere, “Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin in vivo and keratinocytes in vitro,” *Environ. Health Perspect.*, vol. 118, no. 3, pp. 407–413, 2010.
- [156] R. Yamada, K. Nozaki, N. Horiuchi, K. Yamashita, R. Nemoto, H. Miura, and A. Nagai, “Ag nanoparticle-coated zirconia for antibacterial prosthesis,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 78, pp. 1054–1060, 2017.
- [157] B. S. Anisha, R. Biswas, K. P. Chennazhi, and R. Jayakumar, “Chitosan-hyaluronic acid/nano silver composite sponges for drug resistant bacteria infected diabetic wounds,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 62, pp. 310–320, 2013.
- [158] T. J. Foster, “The Staphylococcus aureus ‘superbug,’” *J. Clin. Invest.*, vol. 114, no. 12, pp. 1693–96, 2004.
- [159] C.-I. Liu, G. Y. Liu, Y. Song, F. Yin, M. E. Hensler, W.-Y. Jeng, V. Nizet, A. H.-J. Wang, and E. Oldfield, “A Cholesterol Biosynthesis Inhibitor Blocks Staphylococcus aureus Virulence,” *Science (80-. )*, vol. 319, no. 5868, pp. 1391–1394, 2008.
- [160] A. Clauditz, A. Resch, K.-P. Wieland, A. Peschel, and F. Götz, “Staphyloxanthin Plays a Role in the Fitness of Staphylococcus aureus and Its Ability To Cope with Oxidative Stress,” *Infect. Immun.*, vol. 74, no. 8, pp. 4950–4953, 2006.
- [161] C. M. Toutain-Kidd, S. C. Kadivar, C. T. Bramante, S. A. Bobin, and M. E. Zegans, “Polysorbate 80 inhibition of Pseudomonas aeruginosa biofilm formation and its cleavage by the secreted lipase LipA,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, no. 1, pp. 136–145, 2009.
- [162] F. M. Helaly, S. M. El-Sawy, A. I. Hashem, A. A. Khattab, and R. M. Mourad, “Synthesis and characterization of nanosilver-silicone hydrogel composites for inhibition of bacteria growth,” *Contact Lens Anterior Eye*, vol. 40, no. 1, pp. 59–66, 2017.

- [163] M. Kassaei, A. Akhavan, N. Sheikh, and A. Sodagar, "Antibacterial effects of a new dental acrylic resin containing silver nanoparticles," *J App Polym. Sci.*, vol. 110, no. 3, pp. 1699–16703, 2008.
- [164] K. Yoshida, M. Tanagawa, S. Matsumoto, T. Yamada, and M. Atsuta, "Antibacterial activity of resin composites with silver-containing materials.," *Eur. J. Oral Sci.*, vol. 107, no. 4, pp. 290–6, 1999.
- [165] A. Köroğlu, O. Şahin, I. Kürkçüoğlu, D. Ö. Dede, T. Özdemir, and B. Hazer, "Silver nanoparticle incorporation effect on mechanical and thermal properties of denture base acrylic resins.," *J. Appl. Oral Sci.*, vol. 24, no. 6, pp. 590–596, 2016.
- [166] O. W. W. Company, "Alpha® Liners provide flexibility, comfort and protection," 2016. [Online]. Available: <https://www.willowwoodco.com/products-services/liners/liner-search/>. [Accessed: 10-Nov-2016].
- [167] Ottobock, "Liners," 2016. [Online]. Available: <https://professionals.ottobockus.com/Prosthetics/Lower-Limb-Prosthetics/Socket-Technologies/Liners/c/1601>. [Accessed: 02-Nov-2016].
- [168] Ossur, "Encajes Iceross," 2016. [Online]. Available: <http://www.ossur.es/soluciones-proteticas/productos/todos-los-productos/enjaces-iceross>. [Accessed: 02-Nov-2016].
- [169] Alps, "Locking Liner Clinical Indications," 2016. [Online]. Available: <http://www.easyliner.com/locking-liner-prosthetics.php>. [Accessed: 10-Nov-2016].
- [170] Euro Streifeneder International Inc., "Prosthetic Liners," 2016. [Online]. Available: <http://www.streifeneder-usa.com/en/products/prosthetics/prosthetic-liners>. [Accessed: 06-Nov-2016].
- [171] Silipos Inc., "Prosthetics," 2016. [Online]. Available: <http://www.silipos.com/collections/prosthetics-all>. [Accessed: 16-Nov-2016].
- [172] Freedom Innovations, "Lower Limb Prosthetic Solutions. Product catalog." Irvine, California, pp. 55–60, 2015.



## ANEXOS

### ANEXO 1: MATERIALES DE INTERFACES PROTÉSICAS COMERCIALES

Tabla 12. Materiales de interfaces protésicas comerciales de miembro inferior

<b>Tipo de prótesis</b>	<b>Compañía</b>	<b>Producto</b>	<b>Material</b>
Transtibial - Transfemoral	<i>Ohio Willow Wood</i>	<i>Alpha Classic® Liners (AK)</i>	Gel de elastómero termoplástico a base de aceite mineral con cubierta flexible de tela [166]
Transtibial - Transfemoral	<i>Ohio Willow Wood</i>	<i>Alpha Basic Liners</i>	Gel simétrico de 6 mm de grosor cubierto por tela flexible [166]
Transtibial - Transfemoral	<i>Ohio Willow Wood</i>	<i>Alpha Duo Liners</i>	Combinación de gel con silicona. En su interior se encuentra el liner de gel Alpha Classic y al exterior el liner de silicona Alpha Silicone [166]
Transtibial - Transfemoral	<i>Ohio Willow Wood</i>	<i>Alpha Hybrid Liners (AK)</i>	Gel uniforme cubierto con un tejido elástico unidireccional [166]
Transtibial - Transfemoral	<i>Ohio Willow Wood</i>	<i>Alpha Silicone Liners (AK)</i>	Silicona patentada de uso médico curada con platino y adicionado con vitamina E y acondicionadores de la piel, cubierto con tejido que permite estiramiento circunferencial [166]
Transtibial - Transfemoral	<i>Ohio Willow Wood</i>	<i>Alpha SmartTemp Liners (AK)</i>	Silicona con tecnología de gestión de calor Outlast® cubierto con tejido de estiramiento unidireccional-circunferencial [166]
Transtibial - Transfemoral	<i>Ohio Willow Wood</i>	<i>WillowWood Express Liners (AK)</i>	Silicona médica curada con platino con vitamina E y cubierto con tela [166]
Transtibial - Transfemoral	<i>Ottobock He althCare</i>	<i>Skeo Skinguard (TF/AK)</i>	Silicona con propiedades antibacterianas (Tecnología Skinguard*) que posee una matriz textil al interior y cubierta en el exterior seda [167]

Transtibial - Transfemoral	<i>Ottobock He althCare</i>	<i>Skeo (TT/BK)</i>	Silicona duradera de paredes delgadas con cubierta textil texturizada [167]
Transfemoral	<i>Ottobock He althCare</i>	<i>ProSeal SIL Liner</i>	Silicona de 3 mm de grosor con superficie interna texturizada y externa antiadherente sin recubrimiento [167]
Transtibial - Transfemoral	<i>Ottobock He althCare</i>	<i>Skeo Skinguard (TT/BK)</i>	Silicona con tecnología antibacterial Skinguard* y cubierta textil que facilita la colocación y desmontaje del revestimiento [167]
Transtibial - Transfemoral	<i>Ottobock He althCare</i>	<i>Hybrid Liner</i>	Combinación de dos materiales de revestimiento. El interior está hecho de poliuretano para proteger la extremidad residual y las estructuras óseas gracias a su capacidad de amortiguación y el exterior es de silicona [167]
Transfemoral	<i>Ottobock He althCare</i>	<i>Akquire PUR Liner</i>	Poliuretano de pared proximal de 3 mm sin recubrimiento [167]
Transfemoral	<i>Ottobock He althCare</i>	<i>Simplicity PUR Liner</i>	Poliuretano de pared proximal de 5 cm con y sin recubrimiento [167]
Transtibial	<i>Ottobock He althCare</i>	<i>Simplicity Tapered PUR Liner</i>	Poliuretano, disponible con aditivo antibacteriano Skinguard* y con y sin cubierta textil [167]
Transtibial	<i>Ottobock He althCare</i>	<i>Custom BK Liner-Cast</i>	Poliuretano personalizado con tratamiento antiadherente [167]
Transtibial	<i>Ottobock He althCare</i>	<i>Anatomic 3D PUR Liner</i>	Poliuretano con interior texturizado y tratamiento antiadherente. Disponible con o sin cubierta de tela y Skinguard* [167]
Transfemoral	<i>Ottobock He althCare</i>	<i>Liner – Dynamic Vacuum</i>	Copolímero cubierto con tela [167]
Transtibial	<i>Ottobock He althCare</i>	<i>TPE Liner</i>	Elastómero termoplástico con gel de aceite mineral y antioxidante con cubierta de tela [167]
Transtibial	<i>Ottobock He althCare</i>	<i>Balance TPE Liner</i>	Elastómero termoplástico con gel de aceite mineral [167]

Transtibial	<i>Ottobock HealthCare</i>	<i>Basic TPE Liner</i>	Elastómero termoplástico con gel de aceite mineral y matriz distal sin estiramiento [167]
Transfemoral	<i>Ossur</i>	<i>Iceross Transfemoral Seal-In®</i>	Silicona Dermasil con vaselina, aloe vera, matriz estabilizadora y cubierta textil elástica [168]
Transfemoral	<i>Ossur</i>	<i>Iceross Seal-In® X TF</i>	Silicona Dermasil con vaselina, aloe vera, matriz estabilizadora y cubierta textil elástica [168]
Trasntibial	<i>Ossur</i>	<i>Iceross Dermo® Cushion</i>	Silicona DermoGel® con una cubierta de tela Supplex® ultra resistente y elástica [168]
Trasntibial	<i>Ossur</i>	<i>Iceross® Activa with TibiaGuard™</i>	Silicona <i>cushion</i> con diferentes tipos de silicona, vaselina, aloe vera y cubierta textil elástica [168]
Trasntibial	<i>Ossur</i>	<i>Iceross® Sport</i>	Doble capa de silicona con vaselina, aloe vera, mentol, matriz estabilizadora y cubierta textil elástica [168]
Trasntibial	<i>Ossur</i>	<i>Iceross® Post-Op</i>	Silicona con matriz estabilizadora [168]
Trasntibial	<i>Ossur</i>	<i>Iceross® Original</i>	Silicona con matriz estabilizadora y cubierta textil elástica [168]
Trasntibial	<i>Ossur</i>	<i>Iceross® Synergy</i>	Combinación de dos siliconas con diferente dureza. Una silicona suave al interior y una más estable al exterior. Posee vaselina, aloe vera, mentol y cubierta textil elástica [168]
Transtibial - Transfemoral	<i>ALPS</i>	<i>General Purpose Locking Gel Liner - GPDT</i>	Gel a base de aceite mineral reforzado con tejido y disponible en 3 y 6mm de grosor [169]
Transtibial - Transfemoral	<i>ALPS</i>	<i>Extreme Locking Gel Liner – AKDT and AKDTHD</i>	Gel a base de aceite mineral o Gel de Alta Densidad. reforzado con tejido que permite estiramiento vertical y circunferencial. Disponible en 3 y 6mm de grosor [169]
Transtibial - Transfemoral	<i>ALPS</i>	<i>EZ Flex Locking Gel Liner – EZF</i>	Gel a base de aceite mineral fabricado con antioxidantes. Reforzado con doble tejido [169]

Transtibial - Transfemoral	ALPS	<i>Easyliner Locking Gel Liner - ELDT</i>	Gel a base de aceite mineral fabricado con mezcla de antioxidantes. Reforzado con tela [169]
Transtibial - Transfemoral	ALPS	<i>Thermoliner Custom Locking Gel Liner – TFDT</i>	Gel a base de aceite mineral termoformable fabricado con antioxidantes [169]
Transtibial - Transfemoral	<i>Euro Streifeneder International Inc.</i>	<i>ComfortSil.basi c</i>	Liner de silicona con agente antimicrobiano con tecnología "SteriOne"*** de 3 mm de grosor con aceites y refuerzo de tela [170]
Transtibial - Transfemoral	<i>Euro Streifeneder International Inc.</i>	<i>ClassicSil.basic</i>	Liner de silicona doble con agente antimicrobiano con tecnología "SteriOne"*** y 3 mm de grosor con refuerzo de tela [170]
Transtibial - Transfemoral	<i>Euro Streifeneder International Inc.</i>	<i>ContexGel- Liner</i>	Gel polimérico "Streifeneder (SPG)" termoplástico, bacteriostático e hidroalergénico mediante la inclusión de un aditivo "Sterione". Disponible de 3 mm, 6 mm y 9 mm de espesor. [170]
Transfemoral	<i>Euro Streifeneder International Inc.</i>	<i>AK Control</i>	<i>Liner</i> de silicona de 2 mm de grosor con agente antimicrobiano "SteriOne"*** con refuerzo de tela [170]
Transtibial	<i>Silipos Inc.</i>	<i>Comfortzone™ Single socket gel liner</i>	Gel de aceite mineral de grado médico de 3 mm de grosor [171]
Transtibial	<i>Silipos Inc.</i>	<i>Comfortzone™ Ultra cushion gel liner</i>	Gel de aceite mineral de grado médico de 3 mm de grosor. Posee dos capas de algodón, reforzado con nylon y tejido Lycra® y recubierto con gel Silipos® para amortiguar y proteger la extremidad residual [171]
Transtibial	<i>Silipos Inc.</i>	<i>Durage!™ Cushion liner</i>	Gel recubierto por tela compuesta de Nylon [171]
Transtibial	<i>Silipos Inc.</i>	<i>Mineral oil gel Roll-On</i>	Gel de aceite mineral <i>Roll-On</i> de grado médico con recubrimiento de tela [171]

Transtibial	<i>Silipos Inc.</i>	<i>Siloliner™ Cushion liner</i>	Gel de aceite mineral de grado médico de 6 mm de grosor y recubrimiento de tela [171]
Transtibial	<i>Silipos Inc.</i>	<i>Symes gel liner</i>	Gel de 5 capas de grado médico Silipos® con fibras de poliéster para facilitar la transpiración. Disponible en 3 mm de espesor. Con recubrimiento de tela [171]
Transtibial	<i>Freedom Innovations</i>	<i>Inception® Gel Prosthetic Liner</i>	Compuesto de gel de aceite mineral con fibras textiles y recubrimiento de tela [172]
Transtibial	<i>Freedom Innovations</i>	<i>Inception® Sil Prosthetic Liner</i>	Silicona curada con plantino hipoalergénica de grado médico, de naturaleza hidrófoba y sin revestimiento de tela [172]

Skinguard\*: aditivo antibacteriano para conservar el material y proteger el revestimiento contra la afectación bacteriana y malos olores [167].

SteriOne\*\*: Tecnología no nanotecnológica antibacterial con principio de protección física centrada en la función física de R-Tec que evita la infestación en las superficies sin el uso de sustancias activas biocidas, con el fin de proteger los materiales contra diversos agentes [170].