

**EVALUACIÓN DE LA BIOCOMPATIBILIDAD Y APLICABILIDAD DE UN
MATERIAL COMPUESTO EN UN *LINER* PROTÉSICO DE MIEMBRO INFERIOR**

NATALIA ACEVEDO YEPES

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERÍAS
MAESTRÍA EN INGENIERÍA
MEDELLÍN
2019**

**EVALUACIÓN DE LA BIOCOMPATIBILIDAD Y APLICABILIDAD DE UN
MATERIAL COMPUESTO EN UN *LINER* PROTÉSICO DE MIEMBRO INFERIOR**

NATALIA ACEVEDO YEPES

Trabajo de grado para optar al título de magíster en ingeniería

Directora

VERA ZASÚLICH PÉREZ ARIZA

Ingeniera Electrónica, Ph.D.

Asesor

ANDRÉS TORRES VELÁSQUEZ

Ingeniero Mecánico, MSc.

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERÍAS
MAESTRÍA EN INGENIERÍA
MEDELLÍN
2019**

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Medellín, diciembre 17 de 2019

Natalia Acevedo Yepes

“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 universidad” Artículo 92 Régimen Discente de Formación Avanzada

Firma

Natalia Acevedo Yepes

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por traerme a este camino, a mis padres Jaime y Ángela y a mi hermano Andrés, quienes me brindaron todo su apoyo, comprensión, acompañamiento y palabras de aliento cada que lo necesité. Al resto de mi familia por siempre estar ahí, por el apoyo en cada proyecto que emprendo, por la motivación y el amor que me brindan. A mis hermanas de vida Eliana, Ximena, Marcela, Vanesa, Laura, Carolina, Ana María, por ser una motivación más para terminar este trabajo de grado, agradezco su apoyo, sus palabras de aliento y también el bullying siempre presente.

De todo corazón mi más sincero agradecimiento a mi directora de trabajo de grado Vera Pérez Ariza, por su apoyo incondicional, su tiempo, por su motivación, sus palabras de fortaleza, por sus conocimientos y todos los esfuerzos para sacar adelante este trabajo, de igual modo agradezco a mis asesores Andrés Torres e Isabel Ortiz, de quienes recibí el conocimiento, el apoyo, el tiempo y dedicación para siempre hacer un trabajo mejor. Agradezco a Jorge Saldarriaga por su disposición, su tiempo y los conocimientos brindados durante este trabajo. A Catalina Quintero un agradecimiento muy especial, por su apoyo incondicional, por su motivación en los momentos difíciles, por su calidez, su acompañamiento, por su paciencia y su presencia siempre en todo este proyecto.

Agradezco a todos los compañeros con quienes compartí durante este trabajo, a Isabel Gallego, Jenny Giovanna Ordoñez, Juliana García por su compañía, sus palabras y su cariño. Agradezco muy especialmente a Maritza Londoño, por todo su apoyo en este proyecto y las situaciones personales. Agradezco al resto de mis amigos, especialmente a Luz María Rivera y Carolina Quintero por siempre estar presentes, por su compañía, sus palabras de aliento y su apoyo incondicional.

Agradezco a Diana Zarate por los conocimientos brindados, su apoyo y su cariño, agradezco al resto de compañeros de trabajo de la Universidad Autónoma de Nuevo León, especialmente a Sara, Paulina, Uriel, Margarita, Edelin, Teo y Juan José. También a Jeison, William y Keyner del semillero de prótesis de la Universidad EIA por su colaboración.

Agradezco a la Universidad Pontificia Bolivariana y sus grupos de investigación, al apoyo del CIDI y de Minciencias. Agradezco al resto de docentes que de alguna manera me acompañaron en este proceso y a todos lo que de alguna manera me brindaron su ayuda.

CONTENIDO

RESUMEN	12
1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL TRABAJO DE GRADO	17
3. GENERALIDADES	19
3.1. ESTADO DEL ARTE	19
3.2. MARCO TEÓRICO.....	28
3.2.1. Área ortopédica	28
3.2.2. Área de materiales.....	28
3.2.3. Área biológica.....	29
3.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
3.4. OBJETIVOS.....	34
3.4.1. Objetivo general.....	34
3.4.2. Objetivos específicos.....	34
4. EVALUACIÓN CITOTÓXICA EN QUERATINOCITOS EXPUESTOS A NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y MATERIAL <i>COMPOSITE</i>	35
4.1. METODOLOGÍA	35
4.1.1. Mantenimiento de los cultivos celulares	35
4.1.2. Obtención del material de trabajo	38
4.1.3. Ensayo de viabilidad celular por reducción del compuesto MTT en queratinocitos expuestos a nanopartículas de plata en solución acuosa	39
4.1.4. Prueba de detección de Lactato deshidrogenasa para evaluación de queratinocitos expuestos al material <i>composite</i> (silicona + AgNPs).....	41
4.2. RESULTADOS.....	44
4.2.1. Ensayo de viabilidad celular por reducción del compuesto MTT en queratinocitos expuestos a nanopartículas de plata en solución acuosa	44
4.2.2. Prueba de detección de Lactato deshidrogenasa para evaluación de queratinocitos expuestos al material <i>composite</i> (silicona + AgNPs).....	46
4.3. DISCUSIÓN	47

5. EVALUACIÓN GENOTÓXICA A TRAVÉS DEL USO DEL ENSAYO COMETA ALCALINO EN QUERATINOCITOS EXPUESTOS A MATERIAL COMPUESTO Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA	52
5.1. METODOLOGÍA	52
5.1.1. Mantenimientos de cultivos celulares	52
5.1.2. Obtención del material de trabajo	52
5.1.3. Ensayo cometa en queratinocitos expuestos a nanopartículas de plata en solución acuosa	54
5.1.4. Ensayo cometa en queratinocitos expuestos al material <i>composite</i> (silicona + AgNPs)	56
5.2. RESULTADOS	57
5.2.1. Ensayo cometa en queratinocitos expuestos a nanopartículas de plata en solución acuosa	57
5.2.2. Ensayo cometa en queratinocitos expuestos al material <i>composite</i> (silicona + AgNPs)	60
5.3. DISCUSIÓN	63
6. DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DE <i>LINER</i> PROTÉSICO TRANSTIBIAL 65	
6.1. METODOLOGÍA	65
6.1.1. Fabricación de moldes y estructura	65
6.1.2. Fabricación de <i>liner</i> protésico de miembro inferior	69
6.2. RESULTADOS	71
6.3. DISCUSIÓN	74
7. PRUEBAS MECÁNICAS DEL PROTOTIPO DE <i>LINER</i> PROTÉSICO TRANSTIBIAL	77
7.1. METODOLOGÍA	77
7.1.1. Ensayo de resistencia a la tracción	79
7.1.2. Ensayo de resistencia a la compresión	81
7.2. RESULTADOS	83
7.2.1. Ensayo de resistencia a la tracción	83
7.2.2. Ensayo de resistencia a la compresión	84
7.3. DISCUSIÓN	84
CONCLUSIONES.....	88
DIFICULTADES PRESENTADAS.....	89
TRABAJOS FUTUROS	90

PRODUCTOS	91
ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN.....	91
PARTICIPACIÓN EN EVENTOS CIENTÍFICOS INTERNACIONALES.....	91
PROTOTIPOS	91
PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS.....	92
BIBLIOGRAFIA	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general.	17
Figura 2. Morfología de queratinocitos HaCaT sin tratamiento observados en microscopio invertido a 40X.	36
Figura 3. Material composite luego de tinción con hematoxilina y eosina a 1X.....	37
Figura 4. Observación en microscopio óptico a 10X y 40X respectivamente de queratinocitos HaCaT en material composite resultado de la coloración. Los núcleos se observan de color violeta oscuro y el citoplasma de rosa.	38
Figura 5 Diseño aleatorio para tratamientos en el cual se muestra la ubicación de las diferentes diluciones (d1 a d20) y los controles. Control positivo (C ⁺): DMSO, Control negativo (CC): DMEM suplementado.	40
Figura 6. Metodología de la prueba MTT para la evaluación viabilidad de queratinocitos expuestos a nanopartículas de plata en solución acuosa	41
Figura 7. Material composite preparado con diferentes concentraciones de AgNPs previo al ensayo. CM equivale a Control Medio, CC a control celular (DMEM suplementado), C ⁺ a control positivo (solución de lisis). Los pozos con Silicona no contienen AgNPs.....	42
Figura 8. Kit RayBio® LDH-Cytotoxicity Assay: Buffer, sustrato, enzima LDH, solución stop, solución de lisis.	43
Figura 9. Metodología para la prueba de detección de LDH para evaluación de queratinocitos expuestos al material composite. Control negativo: DMEM suplementado. Control positivo: solución de lisis	44
Figura 10. Resultado de la coloración de la prueba MTT. Se observa que la concentración más alta (d20) no presenta la coloración morada fuerte. Control positivo (C ⁺): DMSO, Control negativo (CC): DMEM suplementado.	45
Figura 11. Porcentaje de mortalidad de queratinocitos expuestos a diferentes concentraciones de AgNPs. Control positivo: DMSO (Mortalidad 100 %), Control negativo: DMEM suplementado. Se observa aumento en la mortalidad al aumentar la concentración de nanopartículas de plata.	45
Figura 12. Porcentaje de mortalidad de queratinocitos expuestos al material composite durante 12 horas. Control negativo: DMEM suplementado. Control positivo: solución de lisis (Mortalidad 100 %). En todas las muestras evaluadas el porcentaje de mortalidad no supera el 10 %	46
Figura 13. Porcentaje de mortalidad de queratinocitos expuestos al material composite por 24 horas. Control negativo: DMEM suplementado. Control positivo:	

solución de lisis (Mortalidad 100 %). Los porcentajes de mortalidad se encuentran entre 20 y 30 %.	47
Figura 14. Material composite preparado con diferentes concentraciones de AgNPs para evaluación de genotoxicidad. Caja 1 silicona sin AgNPs, caja 2 a caja 5 silicona con AgNPs a concentraciones de 4.12, 8.24, 16.4 y 24.7 µg/mL respectivamente.	54
Figura 15. Metodología para prueba de ensayo cometa de queratinocitos expuestos a nanopartículas de plata en solución. Control negativo: DMEM suplementado. Control positivo: Peróxido de hidrógeno.	56
Figura 16. Metodología para prueba de ensayo cometa del material composite	57
Figura 17. Microscopías de fluorescencia a 20X de la prueba de ensayo cometa de queratinocitos expuestos a nanopartículas de plata. En la imagen se observa el control negativo y las concentraciones de 0.26 µg/mL y 2.11 µg/mL de AgNPs. Control negativo: DMEM suplementado. Control positivo: peróxido de hidrógeno 31 µm	58
Figura 18. IDP - Porcentaje de células dañadas expuestas a AgNPs. El mayor porcentaje de células en cada concentración no presenta daño. Control negativo: DMEM suplementado. Control positivo: peróxido de hidrógeno	59
Figura 19. Microscopías de fluorescencia a 20X del ensayo cometa de queratinocitos expuestos al material composite. Control negativo: DMEM suplementado. Control positivo: peróxido de hidrógeno 31 µm	60
Figura 20. IDP – Porcentaje de células dañadas expuestas al material composite. En cada muestra el mayor porcentaje de células no presenta daño. Control negativo: DMEM suplementado. Control positivo: peróxido de hidrógeno	62
Figura 21. Medidas para el molde inicial del liner protésico	66
Figura 22 Diseño CAD molde inicial.	66
Figura 23. Molde inicial en impresión 3D.	66
Figura 24. Fibra de vidrio	67
Figura 25. Proceso de pulido.	67
Figura 26. Moldes interno y externo de fibra de vidrio.	68
Figura 27. Partes de la estructura para moldes.	69
Figura 28. Molde interno y externo	70
Figura 29. Molde interno.	70
Figura 30. Mezclado a 450 rpm.	71
Figura 31. Desgasificación del material.	71
Figura 32. Moldes para liner protésico	72

Figura 33. Estructura para fabricación.....	72
Figura 34. Liner protésico usando la matriz de material composite. Se adapta fácilmente al molde de muñón.....	73
Figura 35. Prototipo de liner protésico con material composite	73
Figura 36. Factores que influyen en el experimento.....	77
Figura 37. Probeta D de la norma ASTM D412.....	80
Figura 38. Troquel para probeta D ASTM D412.....	80
Figura 39. Probetas para ensayo de tracción.....	80
Figura 40. Molde para fabricación	81
Figura 41. Probetas para compresión.....	81
Figura 42. Dispositivo para prueba de compresión	82
Figura 43. Gráfica de esfuerzo vs. Deformación	83

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cantidades de cada componente para la preparación del stock de las muestras del material composite.....	42
Tabla 2. Concentraciones de nanopartículas de plata en solución acuosa evaluadas en ensayo cometa	53
Tabla 3. Cantidades de los componentes para la preparación del stock de las muestras de material composite.....	53
Tabla 4. Niveles de daño del ADN para ensayo cometa de queratinocitos expuestos a nanopartículas de plata en solución acuosa.....	56
Tabla 5. Niveles de daño del ADN para ensayo cometa de queratinocitos expuestos a material composite	57
Tabla 6. Resumen de la longitud de cometa de queratinocitos expuestos a nanopartículas de plata en solución acuosa	58
Tabla 7. Distribución de células por nivel de daño de queratinocitos expuestos a nanopartículas de plata en solución acuosa	59
Tabla 8. Resumen longitud de cometa de queratinocitos expuestos a material composite	61
Tabla 9. Resumen análisis Silicona vs. material composite	61
Tabla 10. Distribución de células por nivel de daño de queratinocitos expuestos a material composite.	62
Tabla 11. Muestras para ensayo de temperatura de curado	78
Tabla 12. Velocidades y concentraciones de AgNPs evaluadas.....	79
Tabla 13. Propiedades mecánicas derivadas del ensayo de tracción	84
Tabla 14. Datos - Ensayo de compresión	84

RESUMEN

Introducción: Las infecciones causadas al usar implantes, prótesis y órtesis son comunes, esto debido a la proliferación de bacterias y hongos causantes de enfermedades en los usuarios de este tipo de dispositivos. Una de las soluciones históricas ha sido el uso de materiales metálicos y dentro de los primeros materiales usados por el hombre está la plata. La plata ha sido conocida por sus capacidades antimicrobianas desde siglos atrás, estas propiedades han sido aprovechadas en diversas áreas del conocimiento, pero especialmente en el área médica. Por otro lado, la nanotecnología ha permitido la solución a problemas desde décadas atrás, pero ha tomado más fuerza en los últimos años sobre todo como herramienta para el desarrollo de la ortopedia.

En este contexto, las nanopartículas de plata se han usado por sus propiedades antibacterianas y antifúngicas principalmente. Estas nanopartículas se han usado también, como material reforzante para diferentes materiales compuestos, sin embargo, cada vez que se desarrolla un nuevo material, con concentraciones diferentes de nanopartículas y con características diversas, genera nuevos enlaces e interacciones químicas y otros cambios de los cuales se desconoce su potencial citotóxico, su biocompatibilidad y su buen desempeño para una aplicación, por lo cual las pruebas biológicas y mecánicas se hacen necesarias.

Objetivo: Evaluar la biocompatibilidad un nuevo material compuesto (*composite*) y las nanopartículas de plata por las que está conformado, adicionalmente, evaluar la aplicabilidad de este nuevo *composite* en la fabricación de dispositivos ortopédicos, específicamente en el proceso de manufactura de un *liner* protésico de miembro inferior, el cual es un revestimiento blando usado en la prótesis y que tendrá contacto directo con la piel. El estudio se hizo con el fin de conocer los efectos que este *composite* puede generar en el tejido con el que tendrá contacto además de su desempeño y resistencia mecánica del dispositivo protésico para el que fue pensado.

Metodología: Para el desarrollo de esta evaluación se usaron técnicas conocidas como la prueba MTT para el análisis de la citotoxicidad de las nanopartículas de plata mediante viabilidad celular, la citotoxicidad del material compuesto se evaluó mediante detección de la enzima lactato deshidrogenasa, mientras que la genotoxicidad se valoró por medio del Ensayo cometa. Para analizar la aplicabilidad del nuevo material en dispositivos protésicos, se fabricó un prototipo de *liner* protésico transtibial de miembro inferior y se usaron muestras del material para la realización de ensayos de tracción y compresión de acuerdo a las normas ASTM.

Resultados: La evaluación citotóxica permitió conocer que la concentración letal 20 de las nanopartículas de plata en solución es 5,38 µg/mL, mientras que la concentración letal 50 es 13,39 µg/mL. Con relación a la citotoxicidad del material *composite*, a 12 horas de evaluación, la mortalidad no supera el 10 % en todas las muestras evaluadas preparadas con las diferentes concentraciones de nanopartículas, mientras que a 24 horas la mortalidad en las células aumenta hasta el 30 %. En la evaluación genotóxica se encontró que la mayoría de células no presentaron daño y un menor porcentaje presentaron un nivel de daño bajo, tanto para las nanopartículas en solución acuosa como para el material *composite*. Con dicho material se obtuvo un prototipo de *liner* protésico transtibial con la forma cónica esperada, la elongación a la ruptura fue de 549 %, resistencia a la tracción de 0,89 Mpa y deformación por la compresión 21.8 % valores similares a los que reportan en la literatura para los liners protésicos.

Conclusiones: Mediante la evaluación realizada se pudo identificar que el nuevo material *composite* tiene bajo efecto citotóxico y genotóxico en queratinocitos humanos a tiempo de exposición de 12 horas, un excelente proceso de curado y buenas propiedades mecánicas para la fabricación de liners protésicos de miembro inferior.

Palabras clave: Citotoxicidad, genotoxicidad, nanopartículas de plata, silicona, prótesis, *liner* protésico, tracción, compresión.

1. INTRODUCCIÓN

El último informe sobre discapacidad de la Organización Mundial de la Salud (OMS), revela que cerca del 15% de la población mundial sufre algún tipo de discapacidad y alrededor de 190 millones de personas tienen dificultades de funcionamiento. Según esta entidad, son los países en vía de desarrollo quienes presentan mayor porcentaje de personas discapacitadas o con alguna deficiencia física o mental [1]. Estudios del año 2013, revelan que en África, Asia y Latinoamérica alrededor de 30 millones de personas requieren de algún dispositivo ortopédico como prótesis u órtesis. Además, investigaciones de 2005 muestran que en Estados Unidos cerca de 1.6 millones de personas presentaban algún tipo de amputación y estiman que para el año 2050 la cifra será de 3.6 millones de personas afectadas [2].

Los últimos datos ofrecidos por el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), en cuanto a discapacidad, indican que para el año 2010, los colombianos con discapacidad del sistema motor superaban las 413000 personas y respecto a Antioquia, las personas con esta discapacidad llegaban a más de 36000, correspondiente, aproximadamente a un 8.7 % de la población en situación de discapacidad del sistema motor en Colombia [3]. De otro lado, estudios de la Universidad del Rosario, evidencian que Colombia es el cuarto país en el mundo con mayor cantidad de víctimas por minas antipersonal [4]. De igual modo, según estadísticas de la dirección contra minas del gobierno colombiano, hasta el presente año (2019), el número de víctimas por Mina Antipersonal (MAP) y Municiones Usadas sin Explotar (MUSE) llega a 11789 personas, siendo Antioquia el departamento con mayor número de víctimas [5]. Teniendo en cuenta que la única causa de las deficiencias en miembro inferior no es la violencia, sino que existen otras causas como accidentes de tránsito, anomalías congénitas y algunas enfermedades crónicas o agudas [6], Colombia llega a tener un número importante de discapacitados por amputación de uno o sus dos miembros inferiores.

En vista de que la población mundial con ausencia de alguno o sus dos miembros inferiores es un número considerable y hasta hoy va en aumento, personal médico e investigadores han diseñado, a través de los años, prótesis que ayuden a estas personas a recobrar su calidad de vida y así mismo llegar a una vida funcional, productiva e independiente. La OMS asevera que una persona en condición de discapacidad sufre discriminación no sólo social sino también laboral, atención sanitaria insuficiente, falta de accesibilidad y graves problemas económicos [1], además, de acuerdo a reportes del banco mundial en 2004, en países desarrollados, entre un 50 y 70% de la población discapacitada en edad laboral

estaba desempleada y la cifra aumenta para países subdesarrollados, por ejemplo, en países latinoamericanos el porcentaje puede estar entre el 80 y 90% [7], así mismo, datos del año 2018 indican que en Colombia la tasa de desempleo para personas en condición de discapacidad llega al 85% [8]; por lo que es fundamental ofrecer al discapacitado ayudas, desde la ingeniería biomédica, que contribuyan a ser y sentirse personas útiles para la sociedad.

Con el fin de cumplir este objetivo, de brindar ayudas físicas a estos pacientes, los diseños de prótesis y órtesis se han fabricado por largo tiempo y en gran cantidad por empresas en todo el mundo, pero con el uso de estos dispositivos, las personas en condición de discapacidad han padecido otras enfermedades asociadas al uso prolongado de dispositivos protésicos que han entorpecido su proceso de rehabilitación. Varios estudios han demostrado que la prevalencia de lesiones en la piel en personas amputadas alcanza un 36% y que dichos pacientes disminuyen la distancia que pueden caminar cuando comienza un problema dérmico o indican que deben suspender el uso de su prótesis [9], con lo que retornan a su nivel inicial de discapacidad, afectando de nuevo su vida personal, social, familiar y laboral.

En los últimos años se han estudiado los materiales para dispositivos protésicos, especialmente para *liners* (dispositivo que hace parte de la prótesis y tiene contacto directo con la piel) y las condiciones de calor y humedad que estos generan, se ha optado por el desarrollo de materiales que permitan mayor ventilación y de igual modo control de la humedad y el calor [10] [11], pero aun así continúan presentándose altas tasas de infección, enfermedades y lesiones en la piel. Como una solución alternativa a este problema, se ha pensado en las propiedades antimicrobianas de algunas nanopartículas metálicas, entre ellas la plata (Ag), que podrían servir como complemento en nuevos materiales usados en la ortopedia.

El uso de nanopartículas de plata (AgNPs) en aplicaciones biomédicas data desde la antigüedad donde se hacía uso de diferentes metales con el fin de dar solución a problemas de salud, pero fue a partir de 1959 que la nanotecnología despertó gran interés en la comunidad científica con el investigador Richard Feynman [12]. El desarrollo de la nanotecnología ha permitido emplearla en un sinnúmero de aplicaciones en campos como la bioingeniería generando avances en equipos médicos, dispositivos, sensores, terapias de rehabilitación y tratamientos en diversas enfermedades [13]. En el área ortopédica, su uso se intensificó en las últimas décadas del siglo XX donde nanopartículas se empezaron a utilizar como refuerzo a los materiales empleados para fabricación de prótesis internas [14], debido sus propiedades específicas, en el caso de metales como la plata (Ag), en bajas concentraciones, sus propiedades antimicrobianas y baja toxicidad en humanos [15] las cuales fueron evidentes desde el siglo primero [16]. En la

actualidad las AgNPs se usan como parte de materiales compuestos, agregando propiedades antimicrobianas que han sido de gran ayuda en ortopedia, un área en la que las infecciones internas y externas son de las complicaciones más comunes.

Teniendo en cuenta lo anterior, es pertinente el uso de AgNPs y materiales compuestos en dispositivos protésicos que ayuden a controlar el crecimiento de microorganismos y por lo tanto a disminuir las infecciones dérmicas, sobre todo en la parte de la prótesis conocida como *liner*, el cual fue diseñado con el objetivo de brindar comodidad y seguridad al paciente [10] y que además está en contacto directo y prolongado con la piel, lo que genera estas comunes irritaciones e infecciones, pero que con la ayuda de nuevos materiales compuestos podría mejorar para bien de los usuarios.

Como se ha visto, entonces, la creación de nuevos materiales ha permitido soluciones alternativas a diversos problemas de salud, pero a su vez se hace necesario una valoración funcional y de biocompatibilidad que garantice la seguridad del usuario. El diseño y la fabricación de nuevos materiales implica la interacción de elementos y moléculas que tiene un impacto en los tejidos y sistemas del cuerpo, estos efectos pueden ser inocuos o nocivos, por lo cual la evaluación de la biocompatibilidad fue fundamental, analizando así efectos citotóxicos y genotóxicos que se presentan y de este modo observar los efectos del material en la viabilidad celular y en el material genético.

Además de lo anterior, los materiales para implantes, prótesis y órtesis están sometidos a diferentes cargas y esfuerzos durante la postura del dispositivo en el miembro residual y el proceso de la marcha, por lo cual es de gran importancia la valoración mecánica mediante pruebas de tracción y compresión de manera preliminar y por los alcances del trabajo de grado, aunque se tiene presente la importancia de otras pruebas adicionales como el coeficiente de fricción, resistencia a esfuerzos cortantes, conductividad térmica, ente otras.

El material evaluado se desarrolló por el grupo de investigación en el marco de un macro-proyecto (Desarrollo y evaluación de compuestos poliméricos livianos con alta resistencia mecánica y capacidades antimicrobianas para su aplicación en órtesis y prótesis externas de miembro inferior - 121074558661), con el fin de diseñar materiales alternativos para el control de microorganismos, dicho material se fabricó con una matriz polimérica comercial de grado médico (Ecoflex™ 00 – 50) que ha sido trabajada en investigaciones de diversas áreas [17] [18] [19] [20] [21], con el fin de servir como recubrimiento de sensores, simulación de tejidos blandos y estructura de dispositivos médicos. Al agregar nanopartículas a esta matriz se creó un material con características particulares que fue necesario estudiar.

2. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL TRABAJO DE GRADO

El objetivo 1, en el cual se evaluó la citotoxicidad de las nanopartículas en solución y del material compuesto, se desarrolla en la sección 4, allí se encuentra la metodología utilizada, los resultados obtenidos y la discusión. Dicha evaluación se llevó a cabo en queratinocitos humanos (HaCaT) mediante ensayos *in vitro* como la prueba MTT y la detección de lactato deshidrogenasa (LDH).

El desarrollo del objetivo 2 se encuentra en la sección 5, para las actividades de este objetivo también se usó la línea celular HaCaT y se realizó mediante el ensayo cometa, técnica que permite observar si el ADN ha sufrido algún daño provocado por algún agente o sustancia.

Respecto al objetivo 3, su desarrollo se encuentra evidenciado en las secciones 6 y 7 de este trabajo escrito, en la sección 6 se presenta la fabricación del prototipo del dispositivo protésico (*liner* protésico), el cual se obtuvo mediante técnicas manuales, por su parte la sección 7 abarca las pruebas de tracción y compresión realizadas de acuerdo con las normas ASTM.

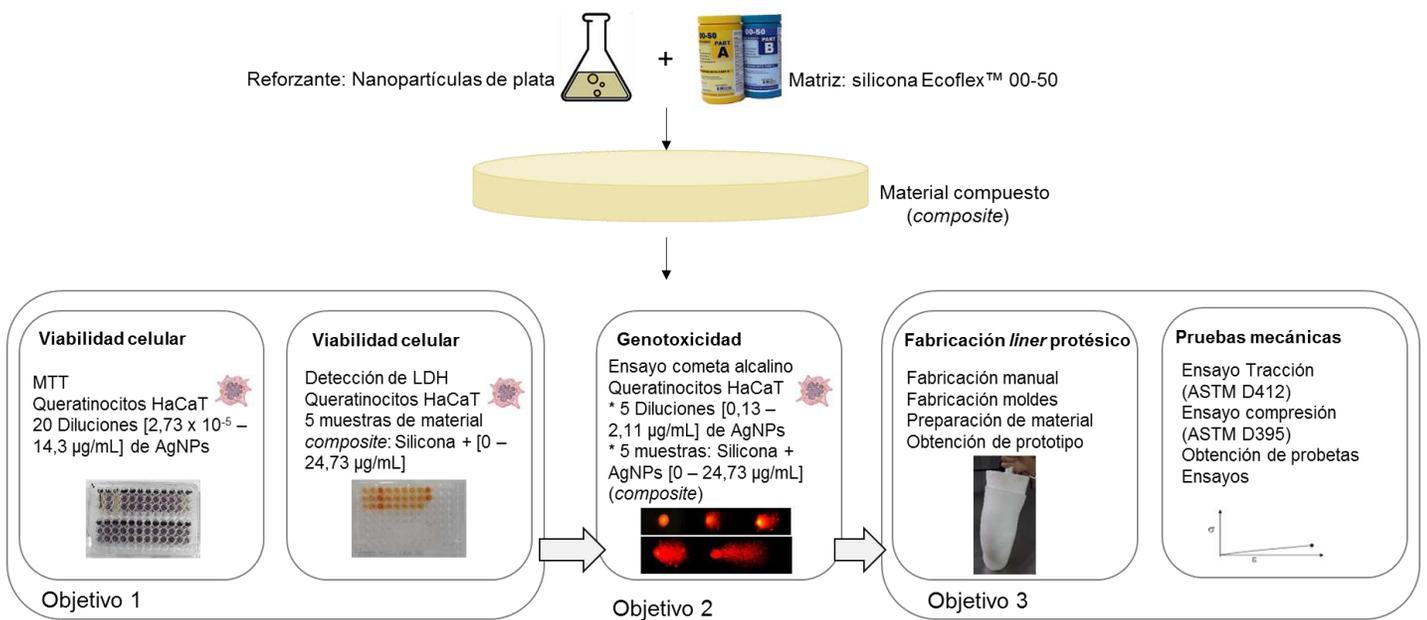


Figura 1. Esquema general.
Representación de las pruebas realizadas en el trabajo de grado para la evaluación del nuevo material *composite* y su reforzante.

En la figura 1 se observa las pruebas que se realizaron para lograr los objetivos planteados. En relación con la viabilidad celular se usó la prueba MTT para la evaluación de las nanopartículas de plata en solución ya que al estar en solución acuosa se adaptaba fácilmente a la metodología de esta prueba, por el contrario, para la evaluación del material *composite* no era posible la prueba MTT por que se dificultaba la preparación de las diferentes muestras y la opacidad del mismo no permitía la lectura de la densidad óptica por lo que se evaluó mediante la prueba de detección de Lactato Deshidrogenasa. Para la evaluación genotóxica tanto de las nanopartículas de plata como del material *composite* se usó la prueba de ensayo cometa.

Para la fabricación del prototipo se desarrolló una metodología de fabricación manual y las pruebas de tracción y compresión se realizaron bajo pruebas ASTM para caracterización de polímeros elastoméricos o cauchos.

3. GENERALIDADES

Durante el desarrollo del presente trabajo de grado se hablará de conceptos tanto biológicos como mecánicos. Mediante esta sección se han ampliado dichos conceptos con el fin de contextualizar al lector, de igual modo, se presentan los objetivos de la investigación los cuales se desarrollan en las secciones siguientes.

3.1. ESTADO DEL ARTE

El uso de los metales en la historia de la humanidad es tan antiguo como ella. De acuerdo a la literatura, los tres primeros metales usados por el hombre fueron el Oro (Au), el Cobre (Cu) y la Plata (Ag). Los primeros usos, de los que se tiene registro, se remontan al año 3400 antes de Cristo, donde el imperio Egipcio usó dichos metales como dinero primitivo [12] [22][23].

Desde la antigüedad, grandes civilizaciones como los griegos y romanos, usaron la Plata por sus propiedades médicas, preservativas y restaurativas [12] [15]. De igual modo los Vikingos tuvieron conocimiento de los efectos de la Plata en contra de las algas ya que usaron este elemento y otros metales como el Cobre en sus embarcaciones con el fin de evitar el crecimiento de algas y de otros microorganismos marinos [12].

Los primeros usos que se conocen de la plata en prótesis datan de la época del antiguo Egipto donde se encontraron algunos esqueletos con clavijas de plata como método de reparación ósea en cirugías [12]. Más adelante, Hipócrates, considerado como el padre de la medicina, promovió el uso de la plata por sus propiedades curativas, él mismo recetó a sus pacientes Plata pulverizada como tratamiento para úlceras y heridas [12] [24].

De igual modo, el uso de la Plata, para la fabricación de herramientas, ornamentos y utensilios cotidianos viene de siglos atrás, uno de los objetos más conocidos es la copa "*Cantharus*" fabricada en el siglo primero por los romanos, en esos primeros objetos, sobre todo en algunos recipientes para almacenamiento de agua, notaron que no crecían microorganismos, lo que mostraba indicios de este elemento (Ag) y sus propiedades antimicrobianas [16].

Los primeros usos de nanopartículas metálicas datan del siglo cuarto, cuando se fabricó la famosa Copa de *Lycurgus*, la cual presentaba propiedades ópticas muy particulares, visualizándose de diversos colores dependiendo si la luz la atravesaba o no [16], lo que para la época era una gran novedad aunque la utilización de

nanopartículas fue de un modo inconsciente y sus fundamentos fisicoquímicos eran aún desconocidos.

Para el mundo de las nanopartículas fue de gran importancia los primeros trabajos en síntesis química de estas partículas, Michael Faraday fue de los pioneros en la síntesis coloidal de nanopartículas, lo que fue considerado como el mayor paso en el desarrollo de la nanotecnología [12].

Cerca del año 1893 Karl Von Nägeli realizó trabajos de caracterización de las propiedades oligodinámicas de la Plata encontrando que este elemento es activo para dicha propiedad siempre y cuando se encuentre en bajas cantidades. Igualmente determinó las concentraciones específicas en las que la plata tenía efectos tóxicos para algas como la *Spirogyra* y esporas como *Aspergillus niger* entre otros microorganismos [12] [25].

Durante la primera guerra mundial, cuando aún no se tenían antibióticos, según está reportado, la Plata cumplió un papel fundamental para tratamientos a infecciones y antisepsia, asimismo se trabajó con este elemento para la mejoría de problemas dermatológicos y afecciones de la piel como granos y verrugas. Los apósitos con partículas de Plata, para tratar heridas, se usaron desde principios del siglo XX, pero fue después de la Segunda Guerra Mundial que su uso se hizo más común que hasta llegó a ser parte de la lista de *Physician's Desk Reference* [12], el cual es un listado, que se publica anualmente, de recopilación de las prescripciones de los medicamentos formulados y es ampliamente usado por el personal médico.

El mundo de la investigación trabajó con partículas pequeñas mucho antes de que se tuviera conocimiento de un mundo a escala nano. Sólo hasta 1959 que Richard Feynman, en un discurso, mencionara la frase "*There is still plenty room at the bottom*", lo que traduce: Todavía hay mucho espacio en el fondo, el mundo de la ciencia volvió su mirada y tuvo conciencia acerca de partículas de tamaño nanométrico [12] [26]. Aunque desde esta época los científicos comenzaron a trabajar con elementos y partículas pequeñas, el término Nanotecnología se empezó a usar a partir de 1974 cuando Norio Taniguchi, profesor de la Universidad de Ciencias de Tokio, daba una conferencia sobre su trabajo en mecanizado de ultra precisión [27] [28].

El uso de partículas a escala nanométrica ya llevaba un recorrido, pero se intensificó y mejoró cuando las técnicas microscópicas permitieron una caracterización más específica y acertada permitiendo observar y determinar las propiedades de los nanomateriales usados. Uno de los grandes avances para el

uso y caracterización de nanopartículas se dio con la invención del Microscopio de escaneo túnel por Gerd Binnig y Heinrich Rohrer a principios de los años 80's que permitió ver y manejar átomos de manera individual [29].

Por esa misma época, se tienen los primeros reportes del uso de nanopartículas en el ámbito ortopédico. Becker y Spadaro generaron iones de plata, por medio de electricidad, para ser usados en pruebas in vitro en enfermedades como piartrosis y osteomielitis de rodilla [14].

El mecanismo de acción antimicrobiano de las nanopartículas de plata ha sido investigado y analizado por la comunidad científica, en la primera mitad de los años 90 Rusell y su equipo de trabajo analizaron el mecanismo de acción de estas partículas nanométricas, encontrando que la principal causa de su efecto antimicrobiano es la liberación de iones de plata (Ag^+) que ingresan a las células procariotas e interactúan con el grupo tiol afectando funciones vitales de los microorganismos [22]

En 1997, investigadores europeos realizaron un estudio sobre la adhesión de bacterias en pines de fijación externa recubiertos con Plata, usados en ortopedia, comparado con la adhesión bacteriana en aceros inoxidables encontrando que la cubierta de plata permite una reducción en la adhesión de microorganismos como *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, entre otros. Con este estudio se vio la reducción de adhesión bacteriana a niveles similares entre los materiales analizados, es decir, entre el acero inoxidable (grupo control) y las muestras con cubierta de Plata, obteniendo mejores los resultados en este último [30].

A inicios del siglo XXI, científicos analizaron las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de plata en heridas, concluyendo que las partículas entran en contacto con la humedad de la piel o algunos fluidos de las heridas, lo cual facilita la liberación de iones de plata que se dirigen al material genético de bacterias inhibiendo su replicación [15].

Pocos años después, Li y colaboradores, evaluaron el efecto antimicrobiano de tapabocas cubiertos con nanopartículas de plata. Para la fabricación del material se usaron nanopartículas sintetizadas a partir de nitrato de plata; el textil usado para la fabricación de tapabocas se cubrió con una capa de AgNPs por un solo lado y posteriormente se fabricó el tapabocas. El análisis antimicrobiano mostró una reducción del 100% de proliferación de *E. Coli* y *Staphylococcus aureus* quienes son de los principales microorganismos causantes de infecciones en la piel [31].

Por esa misma época en Alemania, Pohle y colaboradores trabajaron las nanopartículas de plata en medias ortopédicas con el fin de brindar un efecto antimicrobiano debido a que dichas prendas, al estar en contacto con la piel por largo tiempo, generaban afecciones en este tejido, así que cubrieron medias de algodón y otras de poliamida (Nylon) por un proceso de recubrimiento de simple inmersión y encontraron que ambos tejidos exhibían propiedades antimicrobianas con respecto a la bacteria *Escherichia Coli* [32].

En 2009, investigadores de Brasil, estudiaron la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas de plata en apósitos, los cuales están en contacto directo con úlceras, heridas y otras lesiones de la piel, observando que la forma y el tamaño de las nanopartículas pueden interferir en el efecto antibacteriano [33].

Al encontrar que la actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata depende, entre otros factores, de la concentración y el tamaño de estas [13] [34] surgió la necesidad de controlar dicho parámetro, lo que a finales de la década del 2000 dio sus primeros pasos, cuando Wim De Windt y su equipo de trabajo desarrollaron una metodología para la síntesis de nanopartículas de plata con un área de superficie específica [35] lo cual ha sido de gran utilidad para la fabricación de materiales compuestos con fines antimicrobianos para el área médica.

El uso de nanopartículas de plata en prótesis y órtesis se ha hecho común en los últimos años. En el 2011 un grupo de doctores coreanos utilizaron nanopartículas de plata para la fabricación de prótesis oculares, tras evidenciar una alta tasa de complicaciones por infecciones al usar, por tiempo prolongado, ojos artificiales o prótesis de ojos, por lo que realizaron un estudio donde evaluaron el crecimiento bacteriano en una resina con partículas de plata de tamaño nanométrico y un grupo control de resina sin las nanopartículas, encontrando que el número de bacterias, en la resina con nanopartículas de plata, disminuyó en un 99,9% [36].

En ese mismo año, científicos de Alemania realizaron estudios in vitro para analizar la formación de población de *Staphylococcus epidermidis* en pines de fijación externa en muestras de acero inoxidable cubierto con un polímero reforzado con nanopartículas de plata, comparado con muestras de acero inoxidable no recubierto y muestras de titanio observando una reducción del crecimiento bacteriano en la muestra cubierta con el polímero reforzado con nanopartículas de plata [37].

El titanio es uno de los materiales más usados en el campo ortopédico y a pesar de su buena biocompatibilidad tiende a presentar infecciones debido a la adhesión bacteriana en este material, por lo cual, Zhao y su equipo de trabajo estudiaron la incorporación de nanopartículas de plata en nanotubos de titanio con el fin de evitar

el crecimiento de bacterias, obteniendo como resultado muestras sin crecimiento de bacterias por 30 días lo cual es favorable para la prevención de infecciones en el proceso posoperatorio [38].

Foltynowicz y colaboradores impregnaron nanopartículas de plata en medias de lino y de algodón con el fin de evaluar el efecto antimicrobiano y anti-fúngico, con lo cual encontraron que las medias de lino con nanopartículas presentan efecto antimicrobiano en diversos microorganismos como bacterias y hongos [39].

Uno de los trabajos importantes en el tema de nanopartículas de plata para uso en prótesis u órtesis fue desarrollado por Zhala Meran en la Universidad de Plymouth, quien recubrió con nanopartículas de plata una silicona, de uso para prótesis faciales, y realizó pruebas in vitro en células fibroblastos para evaluar la biocompatibilidad y viabilidad celular demostrando con esto la seguridad de las AgNPs y la capacidad antimicrobiana que adquiere la prótesis al ser cubierta con dichas nanopartículas, disminuyendo o evitando infecciones por hongos como *Candida albicans* que es común que afecte la piel [40].

Qin y su equipo de trabajo, también investigaron compuestos de titanio y nanopartículas de plata para prótesis y cirugía ortopédica en el 2014, durante su estudio realizaron ensayos in vitro e in vivo encontrando que este compuesto no presentaba citotoxicidad y que además reducía la formación de población bacteriana reduciendo, de este modo, el riesgo de infecciones peri-protésicas [41]. Otros investigadores, de igual modo, han estudiado el efecto de las nanopartículas de plata en el titanio tratando de mejorar la capacidad antimicrobiana de este obteniendo resultados favorables [42].

Como se ha visto, los textiles fueron de los primeros materiales en ser ampliamente usados con nanopartículas de plata para uso externo, como tratamiento de lesiones dérmicas. Velásquez y colaboradores, fabricaron vendajes con nanoplatina para analizar el efecto antimicrobiano; para la fabricación de los vendajes se usaron tejidos de nylon y algodón impregnándolos por inmersión en solución con diferentes concentraciones de AgNPs. La valoración antimicrobiana evidenció una reducción importante en las unidades formadoras de colonias para la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* [43].

Las prótesis, órtesis y diversos implantes son altamente propensos a generar infecciones, ya sea por el medio húmedo y calor que proporciona condiciones agradables para hongos y bacterias, en el caso de implantes y prótesis internas, las infecciones son comunes debido a los materiales o al procedimiento de inserción de la misma prótesis. A raíz de esto, Mishra, Ferreira y Kannan estudiaron

un implante de titanio cubierto por un compuesto de quitosano/nanopartículas de plata, pretendiendo mejorar la osteointegración y evitar las infecciones sin disminuir las propiedades mecánicas del implante. Realizaron pruebas antibacterianas y como resultado obtuvieron una inhibición en el crecimiento de bacterias como *E. Coli* y *Staphylococcus aureus* sin necesidad de usar otro tipo de antibióticos y además potencializando las propiedades mecánicas de la prótesis [44]. Otros investigadores han estudiado, de igual modo, las nanopartículas de plata como recubrimiento en prótesis e implantes de titanio generando propiedades antibacterianas [45][46].

Zhao y Ashraf, estudiaron los efectos de nanocompuestos de Plata/Hidroxiapatita en la formación de biopelículas bacterianas en las prótesis de articulación, hallando disminución de adhesión bacteriana en las muestras de hidroxiapatita (HA) que contenían Plata comparada con las muestras de HA sin contenido de plata, además observaron que la liberación continua de partículas de plata era quienes permitían el efecto antibacteriano, alterando los genes de la bacteria (*Staphylococcus aureus*) que promueven la formación de la biopelícula en los materiales [47].

En el 2016, investigadores de Portugal analizaron el comportamiento de andamios impresos en tecnología 3D con propiedades bactericidas para promover la regeneración ósea en el campo ortopédico, para la fabricación del material usaron Fosfato tricálcico y Alginato de sodio funcionalizado con nanopartículas de plata, observando excelentes propiedades mecánicas, biocompatibilidad adecuada, sin efectos citotóxicos y apropiada actividad bactericida en contra de *Staphylococcus aureus* [48].

En los últimos años, las investigaciones de materiales reforzados con nanopartículas de plata como alternativa de tratamiento para lesiones en la piel continúan. Haider y su equipo investigativo fabricaron un material con nanopartículas de plata y quitosano para posibles vendajes como tratamiento a heridas, se fabricó papel filtro a partir de la celulosa y se recubrió con quitosano, este material fue sumergido durante dos horas en AgNPs en solución. La evaluación del efecto antimicrobiano permitió observar inhibición del crecimiento de bacterias como *E. Coli* y *S. aureus* [49]. Así mismo, Pérez-Díaz y su equipo fabricaron un material nanocompuesto con una biomatriz a partir de Células madres mesenquimales, reforzada con nanopartículas de plata. De igual modo, para este caso la actividad antimicrobiana de las nanopartículas generó disminución en el crecimiento de bacterias [50].

En la actualidad, los usos de las nanopartículas de plata en el área ortopédica abarcan los implantes, prótesis, órtesis, cementos óseos y recubrimientos en

prótesis e implantes pretendiendo agregar a todos ellos propiedades antimicrobianas que permitan prevenir o combatir enfermedades dérmicas o internas, que como se ha visto, en la ortopedia son bastante comunes [51].

En cuanto a materiales poliméricos, estos han llegado a usarse como alternativa a materiales metálicos que poseen baja biocompatibilidad y son propensos a corrosión generando infecciones. Los polímeros han sido usados, en el área ortopédica y de rehabilitación, como recubrimientos, material de relleno y fijación o como material reabsorbible para suturas y similares [52]. En relación a las siliconas, son de uso común en dispositivos médicos que requieran amortiguación, recubrimientos y rellenos [53], también en prótesis de reemplazo de tejidos blandos como zonas faciales o dedos de pies y manos [54] [40].

Todas estas aplicaciones de las siliconas o elastómeros de siliconas se deben a sus propiedades mecánicas, sobretodo en su uso para *liners* protésicos, este y otros materiales similares para tal aplicación han sido evaluados en los últimos años para conocer las propiedades y comportamiento mecánico con el fin de ofrecer un conocimiento más amplio y mejorar la elección de un dispositivo de este tipo para los usuarios y sus necesidades específicas. A finales de los años 90, Emrich y su equipo evaluó, en diversos materiales como siliconas y poliuretanos, propiedades como la resistencia a la compresión y coeficiente de fricción, encontrando que la silicona resistía alta cantidad de ciclos de compresión antes de la falla, además que presentaba alto coeficiente de fricción y por lo tanto buena adhesión y ajuste con el muñón [55].

Más adelante, Sanders y compañía evaluaron las propiedades mecánicas de diversos *liners* comerciales, las propiedades evaluadas fueron resistencia a la compresión, a esfuerzos de cortantes, tracción y fricción, donde hallaron que los diversos elastómeros de silicona evaluados abarcaban un amplio rango de valores de rigidez de estas propiedades y definieron que las siliconas con mayor rigidez a la compresión y alto coeficiente de fricción puede ser más adecuadas para usuarios con tejido blando abundante, mientras que para un usuario con muñón óseo sería adecuado un liner de silicona con menor rigidez a la compresión y al cizallamiento y alto coeficiente de fricción. Además, indicaron que la rigidez a la tracción debe ser alta para favorecer la suspensión [56].

Hacia el 2015, investigadores portugueses estudiaron geles y elastómeros de silicona para *liners* protésicos antes y después de un proceso de envejecimiento bajo sudor sintético encontrando que dichos materiales presentaron estabilidad química y estructural ante el proceso, aunque el elastómero de silicona tuvo un

aumento de su rigidez luego del envejecimiento simulado y aumento del módulo de Young [57].

En años más recientes, Cagle y su equipo son quienes han realizado varios estudios en *liners* protésicos comerciales y sus propiedades mecánicas, donde han encontrado que las propiedades mecánicas que mayor efecto tienen en la función del *liner* es la resistencia a la compresión, a la tracción, a esfuerzos cortantes y el coeficiente de fricción [58], donde los esfuerzos cortantes son los mayores responsables de lesiones en la piel, además encontraron que el coeficiente de fricción es más alto entre el *liner* y la piel que en el *liner* y el socket debido al tejido de este dispositivo en la parte externa [59].

De igual modo, según sus estudios, indican que un liner con baja resistencia a la compresión permiten mayor confort, mientras uno con mayor resistencia permite un acople más estable al igual que alta resistencia a la tracción, aunque una rigidez muy alta evita que el *liner* se adapte a la forma del miembro residual y generar incomodidad en el usuario. En relación al coeficiente de fricción, hallaron que cuando es alto mejora el acople mecánico entre la prótesis y el muñón y puede proporcionar al usuario la sensación de seguridad, sin embargo, un coeficiente de fricción muy alto también incrementa los esfuerzos cortantes y por ende los problemas de la piel. Finalmente, indican que propiedades como la conductividad térmica y elasticidad volumétrica también deben ser tenidas en cuenta para estudios más rigurosos [60] [61].

Respecto a la silicona Ecoflex™ 00 – 50 ha sido usada en el ámbito de la bioingeniería para uso externo y la electrónica desde hace algunos años. Gorki y su equipo usaron dicha silicona para la fabricación de un modelo de pecho humano para capacitación médica, esto ha permitido que estudiantes puedan practicar procesos de colocación de bypass coronario [20]. Poco tiempo después, investigadores coreanos desarrollaron un sensor de tensión para ser usado sobre la piel, usando nanotubos de carbono y silicona para su estructura, obteniendo con ella buena elasticidad y alto módulo de Young [18]. Choi y su equipo, en 2017 hizo estudios similares para uso en el monitoreo y rehabilitación de la mano [62].

De igual modo, Pineda y colaboradores usaron la silicona como estructura de sensores flexibles con el fin de obtener dispositivos con alta elasticidad y flexibilidad [17]. Otras investigaciones similares, usaron esta silicona para fines de recubrimientos electrónicos y materiales para estandarizar protocolos de caracterización de materiales blandos [63] [64] [65] [66].

En 2015, Buffinton y su equipo de trabajo, usaron silicona Ecoflex™ 00 – 50 como material para simulación de tejidos blandos con el fin de desarrollar un método que permita la caracterización de biomateriales blandos [67]. Poco después, investigadores de la Universidad Nacional de Singapur desarrollaron dispositivos electrónicos recubiertos de silicona para ser usado como exoesqueleto de la mano y así garantizar flexibilidad y buen movimiento de los dedos mientras se tiene puesto el exoesqueleto [19].

Otras investigaciones han hecho uso de la silicona para el desarrollo de estructuras de fibra para diseño de tejidos elásticos con el fin de ser usados en nanogeneradores [68] y en dispositivos de termoterapia [69]. Por el mismo tiempo, científicos de Bélgica usaron la silicona Ecoflex™ 00 – 50 como material control en la caracterización mecánica de tejidos blandos como tendones [70]. En otros estudios se ha usado la silicona para la fabricación de manos robóticas para investigaciones de electromiografía [21], sensores de tensión para rodilla [71] y otros dispositivos electrónicos [72][73], muchos de los cuales tendrán contacto con la piel de usuarios.

Con todo lo anterior, el equipo de investigadores, en el marco del proyecto titulado “Desarrollo y evaluación de compuestos poliméricos livianos con alta resistencia mecánica y capacidades antimicrobianas para su aplicación en órtesis y prótesis externas de miembro inferior” asociado a la convocatoria 745 de MINCIENCIAS y del proyecto interno “Desarrollo de un compuesto polimérico con capacidades microbicidas, mediante el uso de nano-partículas de plata, para su aplicación en órtesis y prótesis de miembro inferior”, desarrolló un material compuesto, de matriz polimérica, reforzado con nanopartículas de plata.

Para el desarrollo de dicho material se sintetizaron nanopartículas de plata a partir de tres reactivos: nitrato de plata, hidróxido de sodio y quitosano, posteriormente, las nanopartículas obtenidas fueron caracterizadas. Para la fabricación del material compuesto se usó una matriz polimérica, encontrada comercialmente como silicona Ecoflex™ 00-50 aprobada para uso de productos que tendrán contacto con la piel según las especificaciones del fabricante.

Las nanopartículas en solución coloidal fueron agregadas a la matriz polimérica y fueron mezcladas a temperatura ambiente con ayuda de un surfactante; mediante caracterización por SEM se confirmó la presencia de AgNPs en la matriz con relativa polidispersidad y sin aglomeraciones. Tanto a las nanopartículas de plata como al material *composite* final, se le evaluó la actividad antimicrobiana, encontrando una reducción importante de unidades formadoras de colonias para microorganismos como *S. aureus* y *Candida albicans* con las AgNPs y para *S.*

aureus y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) expuestos ante el material *composite*. Los resultados permitieron conocer que dicho *composite* con AgNPs a una concentración de 16,4 µg/mL redujo hasta en un 21 % el crecimiento de *S. aureus* y en un 14 % el de SARM [74].

3.2. MARCO TEÓRICO

Como se mencionó anteriormente, en el desarrollo de este trabajo de grado se incluyeron temas biológicos y mecánicos, por lo cual conceptos de ambas áreas se describen a continuación. El área ortopédica abarca la parte de dispositivos protésicos, el área de materiales conceptos de nanotecnología y algunas propiedades requeridas de los materiales para el uso médico, mientras que en el área biológica se mencionan conceptos relacionados a la evaluación en células.

3.2.1. Área ortopédica

Según la norma ISO 8549-1:1989, una prótesis es un dispositivo externo que se usa para reemplazar, completa o parcialmente, una parte de un miembro ausente o deficiente. De igual modo, indica que una órtesis corresponde a un dispositivo de uso externo empleado para modificar características estructurales o funcionales del sistema óseo o neuromuscular [75]. Una prótesis de miembro inferior puede ser transfemoral o transtibial, dependiendo del nivel de la amputación, esta última consta de tres partes básicas: el *socket*, que es la parte rígida donde encaja el muñón, el vástago, que permite ajustar la altura y el pie protésico [76]. Dentro del área ortopédica, existe un dispositivo conocido como *liner* protésico, el cual es un revestimiento blando, con un espesor promedio entre 3 y 5 mm que se usa en una prótesis, entre el socket rígido y la piel, con el fin de generar mayor seguridad y comodidad al paciente, además sirve como amortiguador del impacto que se produce durante el proceso de la marcha [10] y como sistema de sujeción.

3.2.2. Área de materiales

Neal Lane define la nanotecnología como el conocimiento en ingeniería, diseño y control de sistemas físicos, químicos y biológicos en una escala nanométrica, es decir, en un rango de 1 a 100 nanómetros (nm), donde 1 nanómetro equivale a 10^{-9} m [12]. Teniendo en cuenta lo anterior, las nanopartículas de plata son partículas o grupos de átomos de plata (Ag) con tamaño entre 1 y 100 nm que, debido a que su área superficial es muy amplia en comparación con su volumen, poseen características únicas que incluyen propiedades electrónicas, ópticas y antimicrobianas las cuales han sido estudiadas y empleadas en los últimos años [16]. Dentro de las propiedades de la plata (Ag), y otros metales, está una denominada oligodinamia, que se refiere a que son materiales activos, en

concentraciones muy bajas, resultando ser más tóxicos para organismos inferiores (procariotas), inactivando enzimas importantes al reaccionar con grupo SH [25].

Elementos como las nanopartículas de plata se han usado en la actualidad con otro tipo de materiales formando así un nuevo grupo, conocido como materiales compuestos. Un material compuesto, también conocido como *composite*, es aquel que contiene dos o más materiales constituyentes. Estos se caracterizan porque presentan una matriz, una interfaz y un reforzante. Uno de los materiales cumple la función de matriz y otros cumplen la función de reforzantes quienes son los que le aportan las propiedades deseadas al material compuesto, la interfaz, por su parte, es la comunicación, unión o enlace entre la matriz y el o los reforzantes [77] [78].

Los materiales para uso en el área de la salud deben tener una propiedad muy importante denominada biocompatibilidad, la cual es una característica que indica que dichos materiales no generan efectos adversos en sistemas biológicos como células y tejidos [79]. Otras propiedades que se analizan en los materiales tienen que ver con el comportamiento mecánico y dan indicios de la resistencia que puede tener el material evaluado al estar sometido ante diferentes esfuerzos. Entre las pruebas que comúnmente se hacen a los materiales o biomateriales están el ensayo de tracción, compresión, flexión, cizalla, densidad, dureza, prueba de impacto, entre otras, todo dependiendo de la aplicación en la que se usará el material y los esfuerzos a los que se vea sometido en ella [52] [78].

En cuanto a insumos para el área de ortopedia, los materiales que comúnmente se usan para la fabricación de órtesis y prótesis son los termoplásticos y materiales compuestos avanzados ya que permiten mejor funcionamiento, mayor durabilidad y seguridad de los dispositivos orto-protésicos. Con el objetivo de mejorar la comodidad del paciente, también se usan espumas flexibles además de elastómeros de silicona que mitigan la presión en prominencias óseas y áreas sensibles de presión. Algunos elastómeros de silicona se usan con refuerzos de fibras u otros tipos de refuerzos, este material ha sido ampliamente usado debido a que permite mayor expansión del músculo durante el movimiento y por lo tanto mayor comodidad, además de ser suave al tacto, muy elástico, presenta buena absorción de impacto y amortiguación [80].

3.2.3. Área biológica

La célula es considerada como la unidad fundamental funcional de todo organismo vivo. Los queratinocitos son las células que se encuentran en mayor proporción en la epidermis, es decir, en la capa superficial de la piel, por lo cual adquieren suma

importancia ya que esta capa es la que protege al organismo frente a daños mecánicos, luz ultravioleta, sustancias químicas y abrasiones [81].

La experimentación en seres vivos son estudios complejos y restringidos, por ello las primeras evaluaciones de materiales o cualquier agente se realiza mediante células mantenidas en cultivos celulares. Un cultivo celular corresponde a células aisladas de un organismo y mantenidas bajo condiciones que permitan su conservación y crecimiento. Los cultivos celulares se establecen en frascos de cultivo con medio de cultivo, almacenamiento en incubadora a 37°C y ambiente de CO₂ al 5 %, durante el cultivo celular se hacen pases o subcultivos los cuales son necesarios ya que al crecer las células en toda la superficie del frasco de cultivo, estas pueden establecer contacto entre ellas e inhibir su proliferación lo que puede alterar su crecimiento [82]. Los cultivos se pueden realizar con diferentes líneas celulares. Una línea celular es un subcultivo de un cultivo primario de células extraídas de un determinado tejido y determinado organismo, es un conjunto de células homogéneas y uniformes que puede ser proliferado, transferido y almacenado. Existen líneas celulares de diversos tejidos u órganos como hepático, piel, riñón, pulmón, entre otros [83].

Cabe resaltar que la evaluación in vitro es el primer escalón en el estudio de la biocompatibilidad, este se considera un estudio de nivel I o primario, si los resultados de este son favorables, se puede pasar a un estudio de nivel II como lo es una evaluación en modelo animal y es allí donde se podría identificar de una mejor manera el efecto a nivel del tejido o a nivel sistémico ya que los resultados in vitro son más limitados puesto que en un cultivo faltan muchos componentes del tejido que ayudan a proteger y a evitar la toxicidad [117].

Las diferentes técnicas que permiten evaluar el buen estado de las células, lo hacen estudiando si uno o varios de sus componentes funcionan de manera adecuada. Algunas de estas técnicas analizan la mitocondria, organela celular que produce la energía y está encargada de la respiración celular, otras técnicas evalúan la membrana celular, que permite la comunicación de la célula con su medio externo, percibe estímulos químicos, regula las sustancias que pueden ingresar o salir de la célula, entre otros, también existen otras técnicas donde se evalúa los daños en el ADN quien alberga toda la información genética que guía el desarrollo embrionario, la especialización de cada célula, la duración de la vida, la capacidad reproductiva celular, entre otras funciones [84] .

Teniendo en cuenta esto, existen algunos ensayos y pruebas que permiten evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad que ha causado alguna sustancia en las células mediante la valoración del funcionamiento o la morfología de algunos de los

componentes anteriores. La citotoxicidad es un daño provocado por algún agente o sustancia que provoca efectos tóxicos dañando el funcionamiento de uno o varios componentes celulares y puede generar hasta la muerte celular [85], por su parte la genotoxicidad es la capacidad de un agente de causar algún daño al material genético [86].

Las técnicas que comúnmente se usan para evaluar citotoxicidad permiten evaluar componentes que reflejan el buen funcionamiento celular como lo son el ensayo de MTT, evaluación mediante azul de tripano, detección de lactato deshidrogenasa (LDH), captación de rojo neutro, entre otros [85][87] y para genotoxicidad y mutagenicidad ensayo Cometa, ensayo de Micronúcleos y ensayo de mutagenicidad en *Salmonella*/microsoma (test de Ames) [88].

3.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con estudios de varias instituciones, en Colombia existe un número importante de discapacitados con amputación de miembro inferior debido a incidentes con minas antipersonales y municiones sin explotar, accidentes de tránsito, enfermedades como la diabetes y enfermedades congénitas. En vista de esto, se han fabricado diferentes dispositivos de ayuda al sistema motor como prótesis y órtesis, pero estos han generado otras enfermedades a las personas en condición de discapacidad.

Los problemas más comunes asociados al uso de prótesis en personas amputadas son las infecciones y problemas dérmicos, todo ello causado por el uso prolongado de la prótesis el cual genera calor y humedad, lo que favorece infecciones y lesiones. Una prótesis de miembro inferior consta de tres partes principales: el *socket*, el vástago y el pie protésico [76]. El *socket* rígido, es incómodo para las personas en situación de discapacidad por lo cual es fundamental incorporar a la prótesis un *liner*, un revestimiento blando, entre 3 y 5 mm por lo general, que genera mayor seguridad y conformidad, ya que sirve como amortiguador en el proceso de la marcha [10].

El *liner* es, entonces, la parte de la prótesis que está en contacto directo con la piel y que en la mayoría de casos genera un ambiente de calor y humedad que favorece el crecimiento de microorganismos que a su vez ocasiona infecciones dérmicas [89]. Los microorganismos más comunes en personas con amputación y uso frecuente de prótesis son la bacteria *Staphylococcus aureus* y el hongo *Candida albicans*, estos generan infecciones que son tratadas con antibióticos vía oral o cremas tópicas pero muchas veces no se tienen los efectos esperados [6]. Además de las infecciones, se generan heridas, alergias, úlceras y otras irritaciones y afecciones en el miembro residual [10][9].

Con el fin de brindar una posible solución a este problema, dentro de las investigaciones de nuevos materiales para la fabricación de *liners*, el equipo de trabajo desarrolló, en el marco de dos proyectos de investigación: interno (UPB Innova con radicado 624B-06/16-18) y externo (MINCIENCIAS con código 121074558661 y contrato FP44842-016-2017), un nuevo material compuesto, de matriz polimérica (silicona) y nanopartículas de plata como reforzante, con el objeto que posea capacidades antimicrobianas para el control de la proliferación de bacterias y hongos, mencionados anteriormente, que desencadenan los problemas dérmicos ya descritos.

La creación de nuevos materiales compuestos, como polímeros reforzados con nanopartículas con actividad antimicrobiana, ha sido una alternativa para materiales en dispositivos protésicos donde se presenta proliferación de microorganismos. En estos materiales, las partículas a escala nanométrica tienen la facilidad de ingresar a través de las membranas procariotas, permitiendo así su efecto antimicrobiano. En muchos estudios se ha hablado de los beneficios del uso de las nanopartículas en el área médica, pero por otro lado está la preocupación de su potencial toxicidad [90].

Los nuevos materiales basados en nanotecnología tienen propiedades físicas y químicas únicas, muchas de ellas poco investigadas o sus efectos en los seres humanos son poco conocidos, por lo cual se ha generado la necesidad de identificar los peligros potenciales que estos nanomateriales pueden ocasionar y así en la posteridad poder definir estrategias para manejar los riesgos de los nuevos productos. Adicional a la toxicidad, dentro de la identificación de los peligros está el estudio del daño al material genético conocido como genotoxicidad. A pesar de que muchos nanomateriales como las AgNPs ya han sido ampliamente evaluados, estos están siendo constantemente modificados y mejorados por lo cual la valoración e identificación de los peligros genotóxicos también debe ser constante [91].

Debido a que los nanomateriales que se desarrollarán tendrán aplicaciones biológicas es indispensable evaluar su biocompatibilidad, es decir que este no genere daños o efectos no deseados a nivel local o sistémico. De acuerdo con algunos estudios, las nanopartículas pueden ser inhaladas, absorbidas o ingeridas ya sea de manera intencional o no y llegar hasta el fluido sanguíneo llevándolas a diversos órganos, generando toxicidad en ellos. Se ha encontrado que algunos elementos que contiene AgNPs como cosméticos o vendajes, pueden liberar cantidad de estas partículas generando muerte celular y estrés oxidativo.

Las AgNPs inducen a la translocación de proteínas pro-apoptóticas y liberación de citocromo C de las mitocondrias al citoplasma promoviendo procesos de apoptosis. Otros daños que pueden causar las nanopartículas en la célula son la disminución del potencial de membrana mitocondrial, aceleración del proceso de apoptosis, el aumento de las especies oxido-reactivas y reducción de la viabilidad de macrófagos alveolares [92]. La generación excesiva de especies oxido reactivas pueden ser perjudicial para biomoléculas como lípidos, proteínas y el mismo ADN. Las células del sistema inmune también pueden reaccionar ante la presencia de una sustancia extraña en el cuerpo desencadenando un proceso inflamatorio crónico [91].

Es fundamental evaluar un nuevo material reforzado con AgNPs ya que estas reaccionan de modo diferente al estar en diversos ambientes y además porque existen muchos factores que tienen implicaciones en la toxicidad de partículas a escala nanométrica como la forma, el tamaño, el tiempo de exposición, la dosis, la superficie química, el tipo de células expuesto a ellas [90], la curvatura, la carga de la superficie y los grupos químicos con que fueron funcionalizadas [93]. Todas esas variaciones y la combinación de todos estos factores hacen que la toxicidad varíe, por lo tanto, es indispensable evaluar la citotoxicidad con las particularidades de la aplicación para la que fue diseñado el material compuesto.

Algunos autores presentan a las AgNPs como tóxicas para microorganismos como hongos y bacterias, pero inocuas para células eucariotas[90]; mientras otros autores las definen como tóxicas para una gran variedad de tejidos, especialmente órganos como pulmón, hígado, cerebro y sistema vascular siendo unos más sensibles que otros a los efectos tóxicos de este nanomaterial [51] [92]. Igualmente, estudios han evidenciado que durante la interacción de nanopartículas con células se han generado daños del ADN que pueden causar cáncer y toxicidad que conlleva a un crecimiento retardado, malformaciones y muerte de embriones [90].

Igualmente, investigadores sugieren que cada metodología de síntesis de las AgNPs difiere en sus componentes y concentraciones lo que genera que la toxicidad de las mismas también varíe, es decir, que al tener una nueva síntesis de nanopartículas se tendrán efectos sobre las células y tejidos humanos aún desconocidos [51].

Además de las nanopartículas, los efectos en células del nuevo material desarrollado para la fabricación de *liners* protésicos es completamente desconocido. A pesar de que la matriz usada es comercial y ha sido evaluada por el fabricante y determinada como segura para uso en piel, no se tiene conocimiento de los efectos que pueda causar en células y tejidos humanos el nuevo material ya

que al agregar las AgNPs a la matriz se crean nuevos enlaces e interacciones entre los componentes de los que no se tiene certeza de su efecto toxicológico.

Además de las condiciones antes expuestas, se espera obtener el proceso por el cual se pueda fabricar el dispositivo orto-protésico (*liner*) y adicionalmente verificar la resistencia mecánica de este ya que los *liners* tienen exigencias mecánicas importantes y están sometidos a otro tipos de condiciones como altas cargas de tensión y compresión por lo que los materiales para la fabricación tienen grandes exigencias que deben ser suplidas, tales como las condiciones mecánicas requeridas, las condiciones de seguridad, confortabilidad, la función de amortiguación [10] y en la actualidad se piensa en las propiedades antimicrobianas que se le puedan agregar para tener un diseño más completo y apropiado para las demandas de los usuarios pero sin afectar su resistencia

Con todas estas condiciones surge la necesidad de identificar los efectos citotóxicos y genotóxicos que el nuevo material pueda ocasionar en el tejido con el cual estará en contacto, en este caso la piel y además estudiar la resistencia a la compresión y tracción del mismo, por lo que se plantea la pregunta ¿la biocompatibilidad y las propiedades mecánicas del nuevo material permiten, de manera preliminar, determinar si el material es apto para el uso de fabricación de *liners* protésicos?

3.4. OBJETIVOS

3.4.1. Objetivo general

Evaluar la biocompatibilidad de un material compuesto silicona/Nanopartículas de plata y aplicabilidad en un *liner* protésico transtibial de miembro inferior.

3.4.2. Objetivos específicos

- 1** Evaluar la citotoxicidad en queratinocitos expuestos al material compuesto de matriz polimérica reforzado con nanopartículas de plata para un *liner* protésico de miembro inferior.
- 2** Valorar la genotoxicidad en queratinocitos expuestos al material compuesto de matriz polimérica reforzado con nanopartículas de plata.
- 3** Evaluar la utilidad del material a través de la fabricación de un prototipo de *liner* protésico transtibial y el análisis de las propiedades mecánicas de tracción y compresión en dicho prototipo.

4. EVALUACIÓN CITOTÓXICA EN QUERATINOCITOS EXPUESTOS A NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y MATERIAL *COMPOSITE*

En esta sección se presenta el desarrollo del primer objetivo específico, este se llevó a cabo mediante pruebas in vitro en queratinocitos humanos, células que se encuentran en mayor proporción en la epidermis y juegan un papel fundamental en este tejido como lo es la generación de señales para la regeneración de la piel después de sufrir lesiones, la iniciación de respuestas inflamatorias y función estructural [94] [95].

Se realizaron pruebas tanto para el nuevo material compuesto como para las nanopartículas de plata que sirvieron como reforzante para dicho material. El material compuesto está conformado por una matriz, la cual es un elastómero de silicona conocido comercialmente como Ecoflex™ 00-50, por nanopartículas de plata como reforzante y un surfactante que permite la unión de estos componentes (Tween 80), la citotoxicidad de dicho surfactante ya ha sido evaluada en otros estudios reportados en la literatura, donde indicaron que entre varios surfactantes es el que mantiene una viabilidad más alta, la LC50 fue 210 µg/mL en una de las investigaciones, mientras que en otras no alcanzaron a determinar la LC50 con las concentraciones analizadas puesto que estas no alcanzaron a reducir el 50 % de la viabilidad, reportaron que concentraciones de 16 µg/mL redujeron entre un 10 % y 20 % la viabilidad celular [96] [97] [98].

4.1. METODOLOGÍA

A continuación, se describe como se realizó el cultivo celular y la metodología usada para la evaluación citotóxica en queratinocitos humanos (HaCaT) expuestos a:

- a. Nanopartículas de plata en solución acuosa
- b. Material *composite* fabricado con la silicona y diferentes concentraciones de nanopartículas de plata.

4.1.1. Mantenimiento de los cultivos celulares

Para los ensayos in vitro, se usaron queratinocitos humanos de la línea celular HaCaT (CCD 1106 KERTr (ATCC®CRL-2309™)). Como se mencionó anteriormente, son células que se encuentran en la epidermis, cerca de un 95 % de células en esta capa de la piel son de este tipo. Juegan un papel importante en la estructura de la epidermis y en la función que tiene la piel como barrera ante los agentes externos, además son células implicadas en la iniciación y procesos de respuesta inflamatoria e inmunológica y restauración de heridas en la piel [94].

La línea celular HaCaT son queratinocitos humanos inmortalizados de homo sapiens masculino, son células no tumorales adherentes con un tiempo de ciclo celular de 24 horas, dicha línea celular conserva la mayoría de características de los queratinocitos humanos primarios, crecen en monocapa, presentan forma de polígono y alta estabilidad cromosómica, síntesis de queratina apropiada y fenotipo epidérmico normal hasta los 300 pases o más [95][99].

Se eligió esta línea celular ya que el material que se evaluó fue diseñado para ser usado en dispositivos orto-protésicos que tendrán contacto con la piel como los son los *liner* protésicos, así que las células más apropiadas para la evaluación son los queratinocitos.

Para la realización de los ensayos, las células fueron cultivadas en frascos de 75 cm², se mantuvieron con medio de cultivo DMEM (*dulbecco modified Eagles minimal essential medium*) suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino y 1 % de antibiótico (Penicilina 1000 U y Estreptomicina 1000 µg/mL). El cultivo se mantuvo en incubadora a 37°C y atmosfera de 5 % de CO₂. Se realizó cambio de medio cada dos o tres días y pases celulares cuando la confluencia superaba el 85 % del crecimiento celular.

Durante este proceso, las células se despegaron con Tripsina con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) e incubación a 37 °C por 7 minutos. Para cada ensayo se verificó viabilidad celular superior al 85 % con azul de tripano (0.4 %) y se observó la morfología celular (ver figura 2) antes de trabajar los cultivos. Para agregar los tratamientos se definió que las células tuvieran una confluencia del 80 % y cada 30 pases se realizó cambio de cultivo.

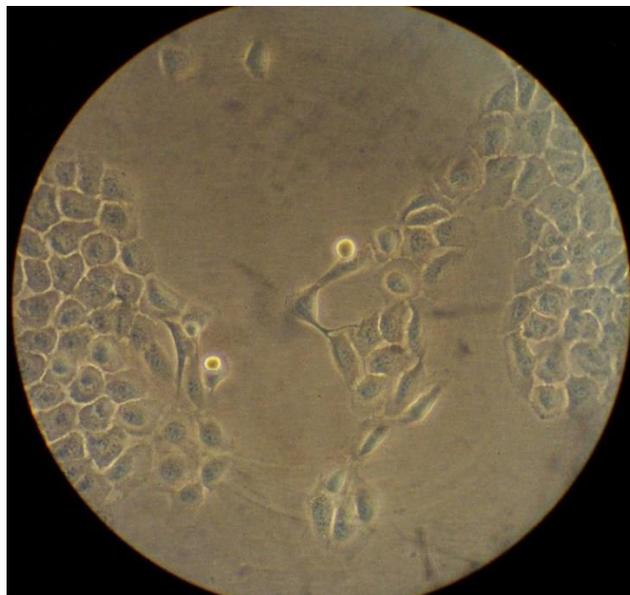


Figura 2. Morfología de queratinocitos HaCaT sin tratamiento observados en microscopio invertido a 40X.

Una manera de corroborar el impacto del tratamiento en las células, es observarlas al microscopio sin y con tratamiento. Para esto, se realizó tinción de células cultivadas en la silicona para verificar que sí se encontraban adheridas al material ya que no se pueden observar en el microscopio invertido por la opacidad de la silicona. La tinción se realizó con Hematoxilina, colorante básico que tiñe el núcleo y Eosina, colorante ácido que tiñe el citoplasma (ver figura 3) [100].

Para esta tinción, se preparó una muestra de silicona con nanopartículas de plata (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en caja de Petri y se dejó curando a temperatura ambiente 24 horas para asegurar su completa solidificación. Se cultivaron 500000 queratinocitos (HaCaT) en medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino y 1 % de antibiótico, posteriormente, se incubó en ambiente de CO_2 a 37 °C durante 24 horas.

Pasado este tiempo, se agregó Hematoxilina hasta cubrir la superficie y se dejó durante 10 minutos, se retiró y se lavó con agua, luego, se agregó Eosina hasta cubrir completamente la superficie y se dejó por 2 minutos. Posteriormente, se retiró la Eosina, se lavó cuidadosamente con agua, al retirar el agua, la muestra del material *composite* permaneció como se observa en la figura 3.



Figura 3. Material *composite* luego de la tinción con hematoxilina y eosina a 1X

Para una mejor observación se usó el microscopio óptico a 10X y 40X respectivamente como se observa en la figura 4, donde se puede ver la coloración del citoplasma y núcleo de las células.

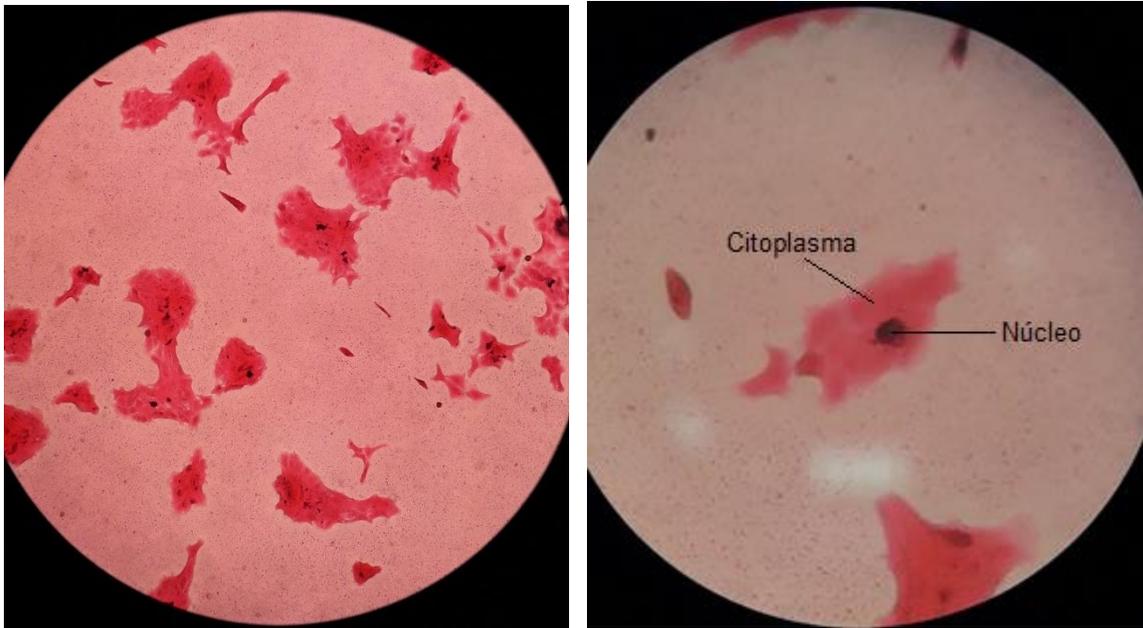


Figura 4. Observación en microscopio óptico a 10X y 40X respectivamente de queratinocitos HaCaT en material *composite* resultado de la coloración. Los núcleos se observan de color violeta oscuro y el citoplasma de rosa.

4.1.2. Obtención del material de trabajo

4.1.2.1. Nanopartículas de plata en solución acuosa

Las nanopartículas de plata fueron sintetizadas por el equipo de investigación del macroproyecto mediante síntesis fotoquímica de nitrato de plata (AgNO_3), hidróxido de sodio (NaOH) y quitosano. Esta síntesis de nanopartículas de plata fue caracterizada por espectroscopía de absorción atómica (AAS) en la que se determinó una concentración de plata (Ag) de $129 \mu\text{g/mL}$. La caracterización fisicoquímica demostró que se obtuvo nanopartículas de plata de forma esférica y semiesférica, con tamaño entre los 5 y 50 nm, siendo el 86 % menores a 11.6 nm [74].

El efecto antimicrobiano de estas nanopartículas de plata en solución acuosa se evaluó, en estudios previos, en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilina y *Candida albicans* logrando una mortalidad de un 99.9 % a concentración de $16.5 \mu\text{g/mL}$ de AgNPs para las cepas de *Staphylococcus aureus* y $6.18 \mu\text{g/mL}$ para *Candida albicans* [74].

4.1.2.2. Material *composite*.

El material evaluado es un compuesto nanoestructurado de matriz polimérica como se mencionó con anterioridad, para efectos de diferenciar entre la matriz y el material final, se referirá a la matriz como silicona y al material final desarrollado como material *composite* o material (silicona con diferentes concentraciones de AgNPs), un análisis mediante microscopía SEM permitió observar una distribución homogénea de las nanopartículas de plata en la matriz [101].

Las muestras del material *composite* se prepararon en cajas de 24 pozos, la matriz de dicho material es la silicona Ecoflex™ 00 – 50 fabricada por la empresa Smooth-On Inc. Esta silicona presenta características que favorecen la preparación del material como baja viscosidad y curado a temperatura ambiente, además presenta buena elasticidad y ha sido caracterizada bajo la norma ISO 10993-10 la cual evalúa la irritación y sensibilización cutánea con resultados favorables para el uso en piel [102].

El material *composite* se preparó con las nanopartículas de plata a diferentes concentraciones: 4.12, 8.24, 16.48 y 24.73 µg/mL (ver figura 7), las cuales fueron elegidas a partir de los resultados obtenidos de una evaluación de la actividad antimicrobiana que se realizó previo a este trabajo de grado. Esta evaluación mostró para las dos concentraciones más altas de AgNPs en la silicona, una reducción entre el 20 y el 30 % para los microorganismos *Staphylococcus aureus* y alrededor del 15 % para *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina. También se evaluó la matriz del material *composite*, es decir, la silicona sin nanopartículas de plata [74].

4.1.3. Ensayo de viabilidad celular por reducción del compuesto MTT en queratinocitos expuestos a nanopartículas de plata en solución acuosa

Para la evaluación del efecto de las nanopartículas de plata en los queratinocitos se usó la prueba de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, sal de tetrazolio) con el fin de encontrar concentraciones letales y subletales (figura 6). Esta prueba permite evaluar la correcta función mitocondrial, el MTT ingresa a las células llegando a la mitocondria, la cual tiene la capacidad de reducir el MTT a cristales de formazán y acumularlo, la reducción de MTT sólo se da en células metabólicamente activas y el nivel de esta actividad se asocia con la viabilidad celular [87].

Para la esta prueba, mediante reducción de MTT [103], se prepararon 20 (1:2) diluciones seriadas partiendo de la concentración stock (14.33 µg/mL) hasta la

concentración 2.73×10^{-5} $\mu\text{g/mL}$. Se usó medio DMEM suplementado como control medio (CM) y control negativo (CC), como control positivo (C^+) se usó dimetilsulfóxido (DMSO) puro e hidróxido de sodio (NaOH) como control solvente.

Se realizaron tres ensayos en momentos independientes, en cada ensayo las concentraciones de AgNPs se evaluaron por triplicado. Se sembraron 3500 células por pozo en cajas de 96 pozos en medio DMEM suplementado, y al alcanzar una confluencia del 80 % se agregó 10 μL de tratamiento (concentraciones de AgNPs mencionadas) a los pozos de la caja de acuerdo a un diseño aleatorio que se puede observar en la figura 5, donde d1 es la concentración menor y d20 la concentración más alta de AgNPs. Los tratamientos se dejaron durante 24 horas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CM	CC	C+	NaOH	d6	d14	d18	d1	d8	d3	d4	d13
B												
C												
D												
E	d10	d9	d15	d7	d5	d20	d12	d19	d2	d17	d11	d16
F												
G												
H												

Figura 5 Diseño aleatorio para tratamientos en el cual se muestra la ubicación de las diferentes diluciones (d1 a d20) y los controles. Control positivo (C^+): DMSO, Control negativo (CC): DMEM suplementado.

Posteriormente, se agregó 10 μL de solución de MTT (5 mg/mL) y en oscuridad se dejó durante 5 horas en incubación de 37 °C en agitación constante. Luego, se agregó 100 μL de Isopropanol para solubilizar los cristales de formazán y se llevó a agitación constante y 37 °C alrededor de 12 horas.

Pasado este tiempo, se midió la densidad óptica (OD) mediante espectrofotometría a 570 nm en el equipo Multiskan Go, la cual es la longitud de onda a la que se mide la absorbancia del formazán. Los datos obtenidos sirvieron para calcular el porcentaje de viabilidad celular mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{OD \text{ células tratadas} - OD \text{ control medio}}{OD \text{ control negativo}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Mortalidad} = 100 - \text{viabilidad}$$

Con los datos de mortalidad para cada concentración de AgNPs evaluada y mediante el software *IBM SPSS Statistics 23.0* se realizó un análisis *Probit* el cual calculó la probabilidad de muerte para las concentraciones de nanopartículas, determinado así las concentraciones letales y subletales, entre ellas la concentración letal 50 (LC50) que indica la concentración de AgNPs que ocasiona la muerte del 50 % de la población celular expuesta al tratamiento y la concentración subletal 20 (LC20) que indica la concentración de AgNPs donde muere el 20 % de la población.

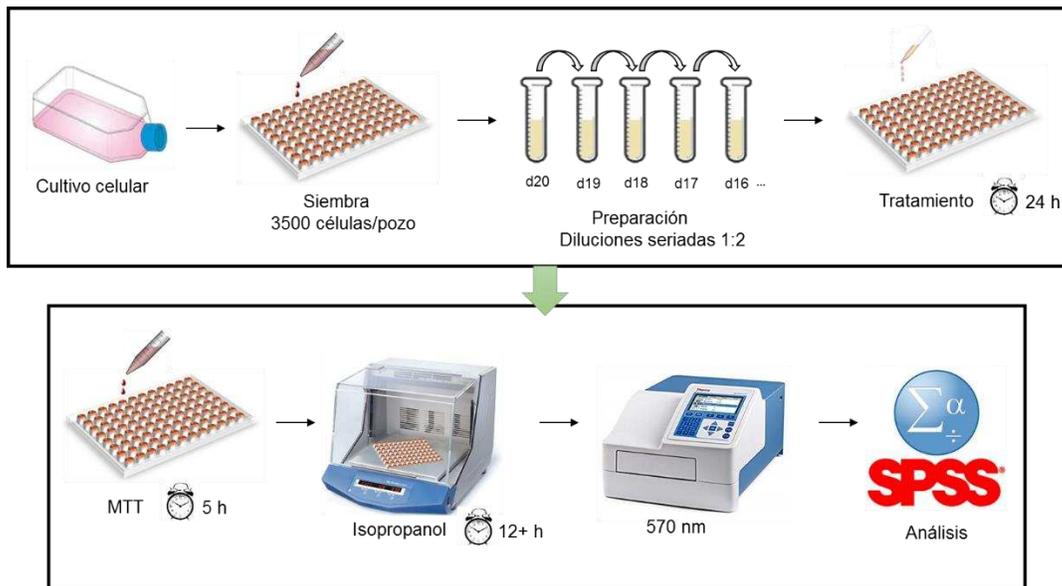


Figura 6. Metodología de la prueba MTT para la evaluación de la viabilidad de queratinocitos expuestos a nanopartículas de plata en solución acuosa

4.1.4. Prueba de detección de Lactato deshidrogenasa para evaluación de queratinocitos expuestos al material *composite* (silicona + AgNPs)

En esta parte del objetivo, se evaluó el nuevo material desarrollado (silicona + AgNPs), se realizó mediante ensayo de viabilidad por medio de la detección de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) (figura 9), esta prueba permite detectar la fuga de dicha enzima en el medio de cultivo analizando así la permeabilidad de la membrana [87]. La LDH es una enzima citoplasmática estable presente en todas las células, la cual se libera al medio de cultivo cuando las células son expuestas a un elemento o sustancia tóxica para ellas. Un aumento en el número de células con la membrana dañada o muertas conduce a una mayor actividad de la LDH en el

sobrenadante del cultivo y de este modo es posible cuantificar la viabilidad por medio colorimétrico sobre el medio [104].

Para el ensayo, se preparó un stock del material para las diferentes concentraciones de AgNPs por mezclado manual de los componentes líquidos (tabla 1), se agregó a cada pozo 500 μL de la preparación y se dejó curando a temperatura ambiente, cuando estuvo completamente sólido se esterilizó por radiación Ultravioleta durante 20 minutos antes de iniciar el ensayo.

Tabla 1. Cantidades de cada componente para la preparación del stock de las muestras del material *composite*

Concentración AgNPs en material ($\mu\text{g/mL}$)	Silicona (mL)	Surfactante (Tween 80) (μL)	AgNPs (μL)
Silicona	6	0	0
4.12	6	62.58	200.16
8.24	6	64.80	414.12
16.48	6	69.60	889.50
24.73	6	75.18	1441.38

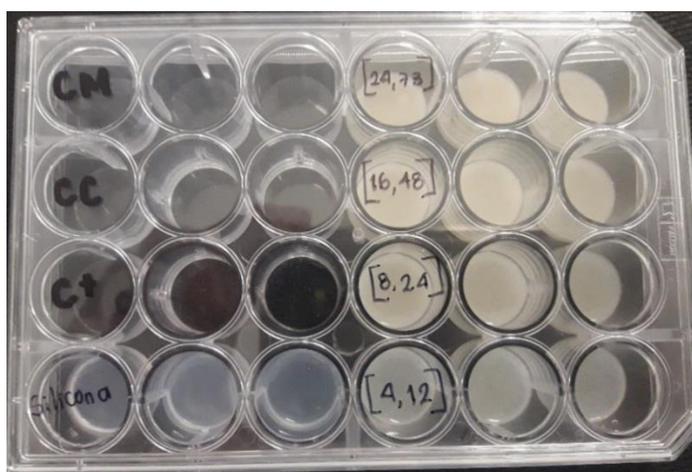


Figura 7. Material *composite* preparado con diferentes concentraciones de AgNPs previo al ensayo. CM equivale a Control Medio, CC a control celular (DMEM suplementado), C⁺ a control positivo (solución de lisis). Los pozos con Silicona no contienen AgNPs.

Para esta prueba se usó un kit comercial llamado *RayBio® LDH-Cytotoxicity Assay Kit II* fabricado por RayBiotech Inc. (ver figura 8), quien provee el protocolo para el ensayo. La prueba se realizó en 3 momentos independientes y cada muestra por triplicado, el tiempo de exposición fue de 12 y 24 horas. Inicialmente la prueba fue realizada a 24 horas, pero debido a que el porcentaje de mortalidad superó en

algunas muestras el 20 % se decidió hacer una prueba adicional a menor tiempo de exposición y poder observar si el porcentaje de mortalidad presentaba algún cambio



Figura 8. Kit RayBio® LDH-Cytotoxicity Assay: Buffer, sustrato, enzima LDH, solución stop, solución de lisis.

Después de la preparación de las muestras a evaluar (figura 7) en la caja de 24 pozos las células se cultivaron directamente en el material *composite*, se sembró sobre le material sólido 90000 células por pozo en medio DMEM suplementado, se dejó incubando a 37°C y ambiente de CO₂ durante un tiempo de exposición de 12 y 24 horas. En la prueba, se usó como control negativo células sembradas en pozos sin material *composite*, un grupo de blancos (control medio) con DMEM suplementado, como control positivo un grupo de células lisadas y el grupo experimental. Adicional, el kit provee la enzima LDH para que también sea usada como control positivo de modo que se pueda verificar la absorbancia de la enzima.

Cumplido el tiempo de exposición, se agregó solución de lisis al control positivo y se incubó durante 3 horas. Posteriormente, se extrajo 10 µL de medio de cada pozo y se llevó a una caja limpia, se agregó el sustrato para la enzima LDH a todos los pozos y se llevó a incubar en oscuridad durante 30 minutos, finalmente se realizó espectrofotometría para medir la densidad óptica (OD) a 450 nm en el equipo Multiskan Go.

Las células lisadas liberaron al medio la enzima LDH y estas se compararon, por medio de la OD, con el grupo experimental y la cantidad de enzima que estas liberaron. Con los datos obtenidos, se calculó la viabilidad mediante la siguiente fórmula proporcionada por el protocolo del fabricante:

$$\% \text{ mortalidad} = \frac{(OD \text{ muestra evaluada} - OD \text{ Control negativo})}{(OD \text{ control positivo} - OD \text{ control negativo})} \times 100 \%$$

Con esta información se calculó el porcentaje de mortalidad para cada muestra evaluada.

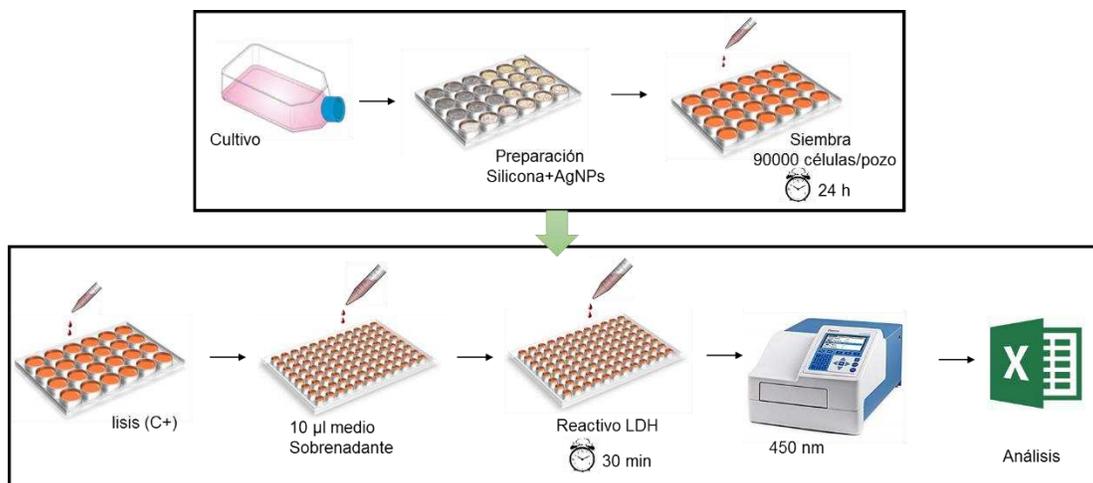


Figura 9. Metodología para la prueba de detección de LDH para evaluación de queratinocitos expuestos al material *composite*. Control negativo: DMEM suplementado. Control positivo: solución de lisis

4.2. RESULTADOS

4.2.1. Ensayo de viabilidad celular por reducción del compuesto MTT en queratinocitos expuestos a nanopartículas de plata en solución acuosa

Se realizaron tres ensayos de viabilidad celular por reducción de MTT en momentos independientes, cada concentración de nanopartículas se evaluó por triplicado en cada ensayo con un tiempo de exposición de 24 horas, los resultados obtenidos se estudiaron mediante análisis *Probit*, la LC10 de queratinocitos expuestos a nanopartículas de plata en solución es de 1.19 µg/mL, la LC20 es de 5.38 µg/mL y la LC50 es de 13.39 µg/mL.

Esto indica que concentraciones superiores a 13.39 µg/mL de este tipo de nanopartículas de plata en solución, causan la mortalidad del 50 % de la población celular expuesta a ellas y concentraciones por debajo de 5.38 µg/mL se consideran concentraciones subletales.

En la figura 10 se observa el resultado de la prueba MTT después de disolver los cristales de formazán obteniendo la coloración morada, se observa que para la dilución más alta (14.33 µg/mL) la coloración morada no se presenta, pues esta concentración ya supera la LC50.

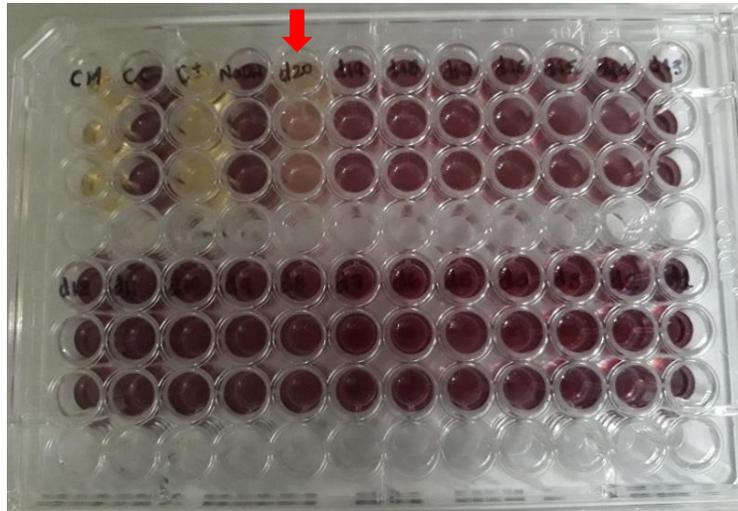


Figura 10. Resultado de la coloración de la prueba MTT. Se observa que la concentración más alta (d20) no presenta la coloración morada fuerte. Control positivo (C⁺): DMSO, Control negativo (CC): DMEM suplementado.

La figura 11 representa la probabilidad de muerte ante diferentes concentraciones de las nanopartículas de plata evaluadas, se observa en el gráfico una relación directamente proporcional entre la concentración de AgNPs y el porcentaje de mortalidad, es decir que a mayor concentración de nanopartículas más se ve afectada la viabilidad celular en los queratinocitos.

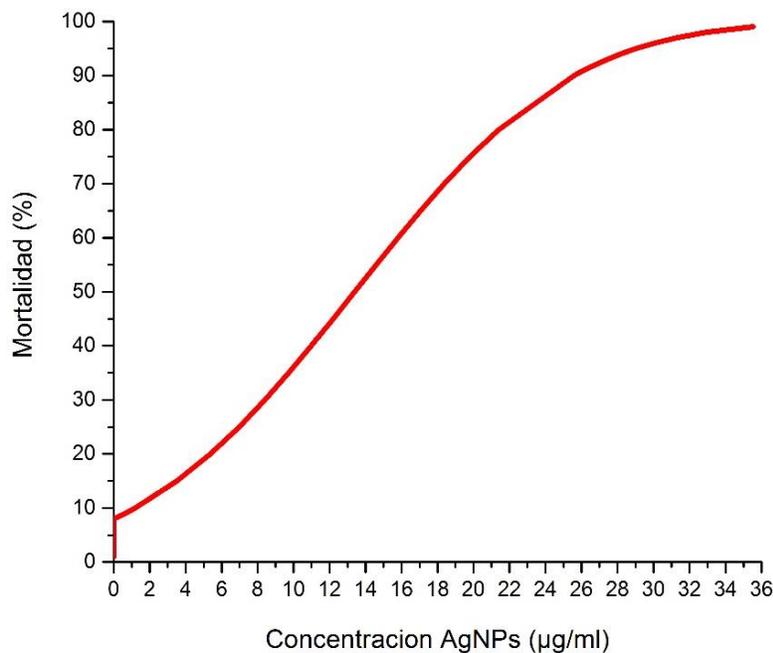


Figura 11. Porcentaje de mortalidad de queratinocitos expuestos a diferentes concentraciones de AgNPs. Control positivo: DMSO (Mortalidad 100 %), Control negativo: DMEM suplementado. Se observa aumento en la mortalidad al aumentar la concentración de nanopartículas de plata.

4.2.2. Prueba de detección de Lactato deshidrogenasa para evaluación de queratinocitos expuestos al material *composite* (silicona + AgNPs)

La prueba de viabilidad celular por detección de la enzima lactato deshidrogenasa se realizó en tres momentos independientes y cada muestra del material, preparado con diferentes concentraciones de nanopartículas, por triplicado, el ensayo se realizó a tiempos de exposición de 12 y 24 horas.

En la figura 12 se relaciona el porcentaje de mortalidad con las diferentes preparaciones del material *composite* a un tiempo de exposición de 12 horas, en esta se observa que en ningún caso la mortalidad supera el 10 %, además se puede notar que entre las muestras evaluadas no hay diferencia significativa entre ellas, aunque sí presentan diferencia con el control celular.

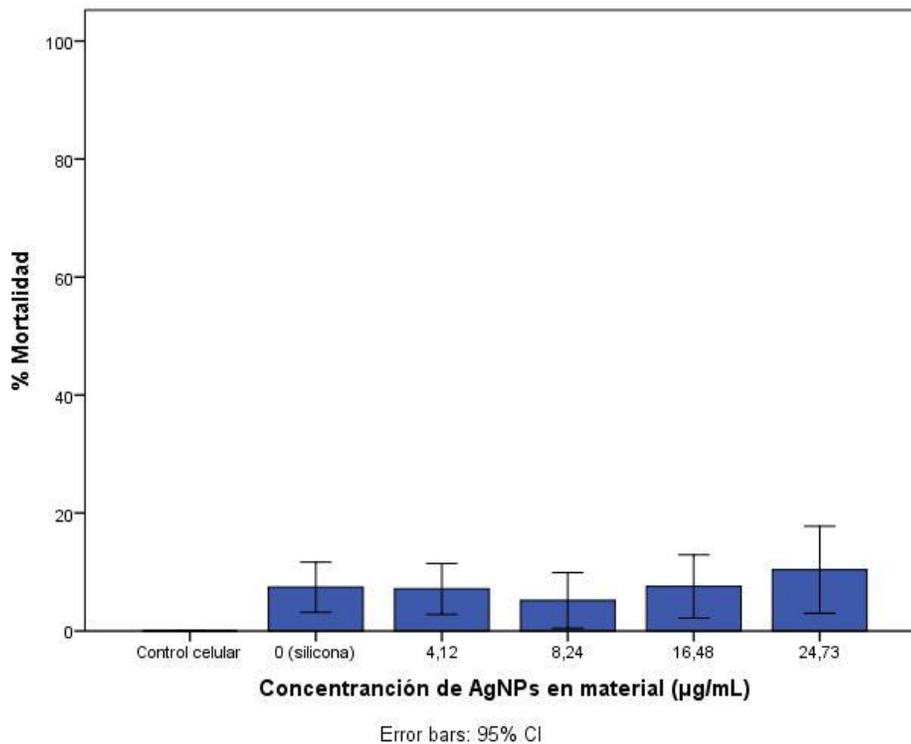


Figura 12. Porcentaje de mortalidad de queratinocitos expuestos al material *composite* durante 12 horas. Control negativo: DMEM suplementado. Control positivo: solución de lisis (Mortalidad 100 %). En todas las muestras evaluadas el porcentaje de mortalidad no supera el 10 %

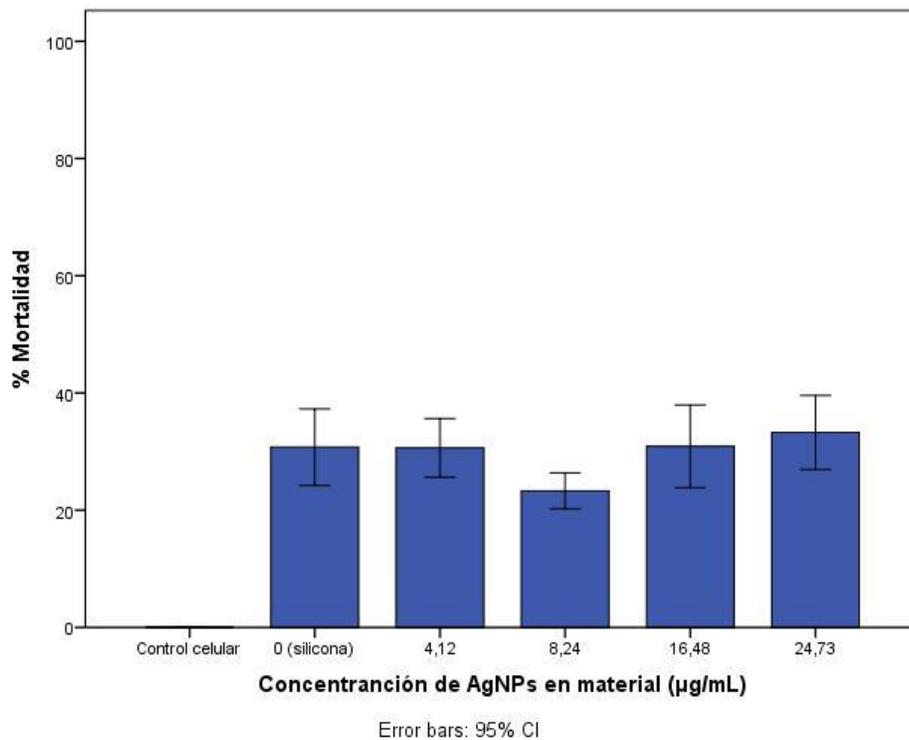


Figura 13. Porcentaje de mortalidad de queratinocitos expuestos al material *composite* por 24 horas. Control negativo: DMEM suplementado. Control positivo: solución de lisis (Mortalidad 100 %). Los porcentajes de mortalidad se encuentran entre 20 y 30 %.

Respecto a la evaluación a 24 horas, se observa (Figura 13) que la mortalidad en las células aumenta hasta el 30 %, todas las muestras evaluadas presentan diferencia significativa con el control celular, por otro lado, el material *composite* con concentración de 8.24 µg/mL de AgNPs presenta diferencia significativa con el preparado a 24.73 µg/mL de AgNPs ($P = 0.0008$). En ambos casos se observa que el material *composite* preparado con nanopartículas a concentración de 8.24 µg/mL causa una mortalidad menor que el resto de muestras evaluadas.

4.3. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de las nanopartículas de plata en solución, evidencian que el efecto de estas en las células depende de la concentración a la cual se exponen, algunos investigadores, han encontrado resultados similares donde evaluaron concentraciones de AgNPs de 0 a 150 µg/mL encontrando que para las concentraciones más bajas la viabilidad no se ve afectada, mientras que para las concentraciones más altas se observaba una disminución en la viabilidad para células HaCaT [105], otros autores también han reportado en sus trabajos una

disminución en la viabilidad celular al aumentar la concentración de nanopartículas evaluadas [106].

Además de la concentración de AgNPs, existen otros factores que influyen en la reducción de la viabilidad celular como la forma, el tamaño, el tiempo de exposición, la aglomeración y la presencia de recubrimiento superficial [106]. Respecto a la forma, las nanopartículas evaluadas son de forma esférica y semi-esférica, de acuerdo a otras investigaciones, nanopartículas de cualquier forma tienen una capacidad potencial de ingresar al tejido de la piel, pero existen otras formas, como las barras, las cuales presentan mayor capacidad de permear en el tejido [107].

En relación al tamaño, algunos autores indican que nanopartículas de plata de menor tamaño pueden generar mayor citotoxicidad. Estos evaluaron AgNPs de tamaños entre 15 y 55 nm encontrando que las más pequeñas pueden llegar a generar mayor cantidad de especies oxido reactivas (ROS) comparadas con las de 55 nm, la sobre producción de ROS puede generar daños de proteínas y ácidos nucleicos [106]. Otra investigación, determinó la LC50 para nanopartículas de plata de cuatro tamaños diferentes en células HaCaT, los resultados indicaron que los valores de LC50 más bajos correspondían a las AgNPs de menor tamaño (5 nm), mientras que para AgNPs de mayor tamaño (110 nm) la LC50 podría llegar a ser de hasta el doble, indicando que las nanopartículas de menor tamaño, presentaron mayor toxicidad [108].

En relación al tiempo de exposición, Perder [108], evaluó la captación de AgNPs en células HaCaT y se midió la concentración intracelular de Plata (Ag) a tiempo de exposición de 4 horas y 24 horas, encontrando que, a 4 horas, los niveles de Plata (μg) no presentaban diferencias significativas respecto al control, mientras que, a las 24 horas, los niveles de Ag habían aumentado considerablemente respecto al control, especialmente para las células expuestas a AgNPs de plata de mayor tamaño (50 – 110 nm) presentándose mayor acumulación del nanomaterial y causando disfunción mitocondrial, mayor generación de ROS ocasionando daño en proteínas y ácidos nucleicos. Otros estudios han evaluado las nanopartículas a 24, 48 y 72 horas en células humanas, encontrando que la toxicidad de estas depende significativamente del tiempo de exposición ya que ante mayor tiempo se vio reducida el contenido de ATP en la célula [109], en el presente estudio no se realizó evaluación de las AgNPs en solución acuosa a diferentes tiempos de exposición lo cual sería pertinente hacer si se desea complementar los estudios de biocompatibilidad del material.

Según los resultados encontrados en el presente trabajo de grado, la LC50 es una concentración de 13,39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nanopartículas de plata en solución. Reportes de

otros estudios han encontrado valores de LC50 más altos, esto tal vez debido a que, en la mayoría de estudios, durante la síntesis, se hace un recubrimiento a las nanopartículas con el fin de mejorar su biocompatibilidad. Algunos de los recubrimientos usados son polímeros como polietilenglicol, AgNPs con este recubrimiento fueron evaluadas a concentraciones de hasta 150 µg/mL contrastando el ensayo con AgNPs sin recubrimiento, determinando que la concentración más alta de AgNPs con recubrimiento (150 µg/mL) mantiene la viabilidad celular mientras que para las que no presentan el recubrimiento alcanzan esta misma viabilidad a una concentración solo de 50 µg/mL [105].

Estudios similares reportan que algunos recubrimientos permiten mejorar la biocompatibilidad de las AgNPs sin afectar su capacidad antimicrobiana [105]. Reportes de investigaciones con diferentes recubrimientos para AgNPs indican que para estas nanopartículas los valores de LC50 están cercanos a 40 µg/mL [110], lo que es una diferencia notable respecto al valor encontrado en este estudio, posiblemente se deba a que las nanopartículas de plata evaluadas no tiene ningún tipo de recubrimiento que permitan mejorar su biocompatibilidad.

Además de los recubrimientos, las síntesis mediante extractos de plantas permiten mejorar la biocompatibilidad. Investigaciones de AgNPs sintetizadas a partir de extractos, de tamaño entre 20 y 30 nm lograron mantener la viabilidad celular hasta en un 96 % para concentraciones de 500 µg/mL, mientras que AgNPs elaboradas mediante síntesis química llegan a reducir la viabilidad hasta llegar a un 30 % [111]. En el presente estudio se usaron nanopartículas sintetizadas a partir de quitosano, a pesar de ser síntesis mediante extracto natural, las concentraciones que mantienen alta viabilidad no llegan a esos valores tan grandes, puede ser debido al tamaño de las AgNPs, puesto que las de este estudio, en su mayoría presentan un tamaño de 11,6 nm.

Es fundamental tener en cuenta, que el tipo de células también influye en la citotoxicidad que puede causar las nanopartículas de plata [106], para otro tipo de células los datos obtenidos en este estudio pueden variar, de ahí radica la importancia de que los ensayos de biocompatibilidad se desarrollen en un tipo de célula relacionada al tejido con el que las nanopartículas de plata tendrán contacto ya que dependiendo del tipo de célula puede interactuar con las proteínas de membrana y activar rutas de señalización causando daños debido a la fuerte afinidad de la plata (Ag) con el azufre.

En relación a la evaluación del material *composite*, este tuvo una notable reducción de la viabilidad entre las muestras evaluadas a 12 horas y a 24 horas, esto se puede deber a que en algunas zonas la superficie del material presentaba rugosidades y

algunas burbujas de aire ya que este material no fue sometido a desgasificación por vacío y esto posiblemente no permitía una buena adhesión en el tiempo. Las diferencias entre la viabilidad de las muestras del material respecto al control negativo pueden deberse a la misma razón puesto que algunos reportes en la literatura señalan la importancia de una adecuada adherencia e indican que esta es fundamental para que las células inicien su proceso de proliferación, según este estudio, las células tienen mayor adherencia entre más rígido sea el material [112].

No se encontraron otros reportes de estudios de elastómeros de silicona en células HaCaT mediante actividad de lactato deshidrogenasa, pero se han hecho reportes de estudios en otras líneas celulares. Un estudio de una silicona con recubrimiento de AgNPs fue realizado en fibroblastos, tanto en la muestra con mayor concentración de AgNPs como en la menor se encontró una actividad de la LDH similar al control, cabe resaltar que para este estudio el control se tomó como la matriz del material sin recubrimiento de AgNPs, no se encontraron reportes de un control negativo sin exposición a ningún tipo de material [113]. En este trabajo de grado se encontró que entre las muestras con AgNPs y la matriz (silicona sin AgNPs) no se presentaron diferencias significativas en la viabilidad celular tanto para el ensayo de las 12 horas como para el de las 24 horas y de manera general no se hallaron diferencias significativas en la viabilidad celular de las células expuestas a las diferentes muestras del material con sus variaciones de AgNPs.

En algunas investigaciones, se realizaron mediciones al medio de cultivo para identificar la cantidad de plata en él y poder así demostrar si el material libera iones o AgNPs que tengan contacto y algún efecto en las células. Las investigaciones demostraron que en cultivos de fibroblastos en la silicona con recubrimiento de AgNPs durante 72 horas se percibía cada 24 horas liberación de partículas de plata pero se encontraron bajas concentraciones que no tuvieron efecto negativo notable en la viabilidad celular [113]. Para estudios a futuro del material evaluado en el presente trabajo, sería pertinente evaluar el efecto a mayor plazo, es decir, 48 o 72 horas, además de hacerlo tratando de desgasificar las muestras para adquirir una superficie más homogénea para el cultivo celular, adicionalmente se sugiere evaluar la liberación de Ag o AgNPs en el medio de cultivo e identificar la cantidad de estas partículas que el material puede liberar al medio circundante.

En este caso las células fueron cultivadas en el material *composite*, en otros estudios han evaluado materiales similares mediante la prueba de MTT sin necesidad de cultivar las células directamente en el material, solo agregando trozos de pequeñas dimensiones al medio de cultivo en cada pozo, allí se encontró que hasta en las concentraciones más altas de AgNPs en el material la reducción de viabilidad no supera el 20 % [114].

La evaluación citotóxica del efecto de materiales como silicona con refuerzo de AgNPs en células HaCaT ha sido poco reportada, pero materiales compuestos de matriz polimérica y reforzado con iones o AgNPs para aplicaciones de contacto con la piel han sido evaluados encontrando que los materiales poliméricos favorecen la biocompatibilidad, en muchos casos haciendo que el efecto citotóxico respecto a las nanopartículas en solución sea mucho menor [115].

En esta investigación la LC50 de las AgNPs en solución fue cercana a los 13 $\mu\text{g/mL}$, mientras que el material *composite*, preparado con concentración de 16,4 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs tan sólo tuvo una reducción de la viabilidad de un 10 % para la exposición a 12 horas y cercana al 30 % para la exposición de 24 horas, dando a entender que el hecho de que las AgNPs estén inmersas en la matriz polimérica mejora la biocompatibilidad, algo similar a lo que sucede con los recubrimientos en AgNPs, o también puede ser que la reducción en la mortalidad se dio debido a que la interfaz de unión entre la matriz (silicona) y el reforzante (AgNPs) permaneció estable y evitó una liberación a gran escala de iones de Ag o AgNPs que pueden generar mayor efecto citotóxico como ocurre en las AgNPs en solución.

Es importante resaltar que la técnica usada para el estudio de los queratinocitos expuestos a las nanopartículas de plata y la usada para los expuestos al material *composite* detectan diferentes afecciones en la célula, la prueba con MTT permite evaluar la función mitocondrial, mientras que la prueba con LDH estudia el daño en la membrana, esto puede causar diferencias entre los resultados de las concentraciones usadas de nanopartículas en solución y las muestras de material *composite* aunque un estudio analizó el efecto de cloruro de cadmio en dos líneas celulares con diferentes técnicas de evaluación, entre ellas MTT y LDH encontrando que para cortos tiempos de exposición no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la pérdida de viabilidad celular, además indicaron que la prueba de MTT parecía ser más sensible en detectar toxicidad temprana comparada con LDH y encontraron además que la LC50, en ambas líneas celulares, fue más alta con la prueba MTT que con la LDH [87].

Otros ensayos realizados a materiales *composites* para uso en piel pueden llevarse a cabo para completar la caracterización biológica a este material como pruebas de alergias [31], pruebas in vivo [116], pruebas de irritación, entre otras, ya que las pruebas in vitro puede llegar a ser limitadas para un análisis completo puesto que muchas respuestas biológicas no pueden ser completamente simuladas [117].

5. EVALUACIÓN GENOTÓXICA A TRAVÉS DEL USO DEL ENSAYO COMETA ALCALINO EN QUERATINOCITOS EXPUESTOS A MATERIAL COMPUESTO Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA

5.1. METODOLOGÍA

El ensayo de electroforesis alcalina de células individuales, conocido como ensayo cometa, es una prueba que permite evaluar el daño que un material, sustancia o agente ha causado al ADN en células individuales. A través de la electroforesis, fragmentos de ADN, resultado de roturas y daños, migran generando un efecto de cometa que se puede observar en cada célula mediante microscopía de fluorescencia [118].

Este ensayo permite la evaluación en cualquier célula eucariota, detecta daños no solo de doble cadena, sino también de cadena simple, no requiere grandes cantidades de muestra de la sustancia a evaluar, se puede realizar en corto tiempo y facilita un análisis estadístico riguroso [119].

5.1.1. Mantenimientos de cultivos celulares

Para el desarrollo de este objetivo se usó la misma línea celular descrita en el ítem 4.1.1. y el mantenimiento de los cultivos fue de igual manera.

5.1.2. Obtención del material de trabajo

5.1.2.1. Nanopartículas de plata en solución acuosa

Para la evaluación genotóxica mediante ensayo cometa se usaron las nanopartículas de plata en solución, descritas en el ítem 4.1.2.1., se eligieron concentraciones subletales de AgNPs basadas en los resultados de la prueba de MTT, teniendo en cuenta que la LC₂₀ fue de 5,38 µg/ml, se determinaron las concentraciones presentadas en la tabla 2 para los tratamientos:

Tabla 2. Concentraciones de nanopartículas de plata en solución acuosa evaluadas en ensayo cometa

Concentraciones de exposición ($\mu\text{g/mL}$)
2.11
1.05
0.53
0.26
0.13

5.1.2.2. Material *composite*

Se eligieron muestras de material *composite* preparado con las mismas concentraciones de nanopartículas que se evaluaron en la prueba de lactato deshidrogenasa (4.1.2.2.), es decir, 24.73, 16.48, 8.24, 4.12 $\mu\text{g/mL}$ y silicona (Ecoflex™) sin AgNPs, como control negativo se usó queratinocitos sin tratar y como control positivo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a 300 μM .

Del material a evaluar (silicona sin AgNPs y silicona con AgNPs) se preparó un stock para cada concentración de AgNPs en silicona con los volúmenes indicados en la tabla 3, en la preparación se realizó mezclado manual de los componentes líquidos, se usó un volumen de 5 mL de silicona y material *composite* en cada caja Petri, se desgasificó usando vacío durante 3 minutos para eliminar el aire que ingresó al material durante el proceso de mezclado y así generar una superficie más homogénea, compacta y lisa. El material se dejó curando a temperatura ambiente como se muestra en la figura 14.

Tabla 3. Cantidades de los componentes para la preparación del stock de las muestras de material *composite*

Concentración AgNPs en material ($\mu\text{g/mL}$)	Silicona (mL)	Surfactante (Tween 80) (μL)	AgNPs (μL)
Silicona	12	0	0
4.12	12	125.2	400
8.24	12	129.5	826.2
16.48	12	139.1	1775
24.73	12	150.2	2876



Figura 14. Material *composite* preparado con diferentes concentraciones de AgNPs para evaluación de genotoxicidad. Caja 1 silicona sin AgNPs, caja 2 a caja 5 silicona con AgNPs a concentraciones de 4.12, 8.24, 16.4 y 24.7 µg/mL respectivamente.

5.1.3. Ensayo cometa en queratinocitos expuestos a nanopartículas de plata en solución acuosa

Para el ensayo de electroforesis alcalina de células individuales (ensayo cometa) (ver figura 15), se sembraron queratinocitos HaCaT en cajas de 6 pozos, se sembraron 100000 células por pozo en medio DMEM suplementado al 10 % con Suero Fetal Bovino. Se dejaron incubando a 37 °C en ambiente de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 80 %.

Se agregó 50 µl de tratamiento (AgNPs) a las concentraciones anteriormente indicadas, como control negativo se usó medio de cultivo DMEM suplementado al 10 % con Suero Fetal Bovino (SFB) y como control positivo se empleó Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) a 300 µM. El tiempo de exposición fue de 24 horas a 37 °C y ambiente de CO₂ al 5 %.

Pasado este tiempo, se realizó el proceso de cosecha, para lo cual, con tripsina, se despegaron las células y se llevaron a tubos Falcon de 15 mL, se centrifugaron a 1200 rpm durante 7 minutos, se descartó el sobrenadante, las células se resuspendieron en medio DMEM y se verificó viabilidad celular superior al 85 %.

Para este ensayo se siguió la metodología propuesta por Singh y colaboradores [118]. En oscuridad, de las células resuspendidas se tomaron 20 µL, se mezclaron con 80 µL de agarosa de bajo punto de fusión disuelta en PBS libre de calcio y

magnesio y de esta forma se obtuvo una suspensión de células en agarosa para formar gotas en una lámina de GelBond®, las gotas se dejaron a temperatura ambiente hasta la solidificación.

El GelBond®, con las muestras, se dejó en solución de lisis (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM de Tris, 10 g/L de Lauryl sacrosinato de sodio, 1 % de Triton X-100, 10 % de DMSO a un pH de 10 ajustado con NaOH) a 4 °C durante 24 horas. Al cumplirse este tiempo, la lámina de GelBond® se lavó con PBS y se dejó durante 20 minutos en solución de electroforesis fría (H₂O destilada, 200 mM EDTA, 10 N NaOH a pH=13). Posteriormente, se corrió la electroforesis durante 30 minutos a 25 V y 300 mA. Al finalizar la electroforesis, las muestras se lavaron con buffer neutralizante frío (0.4 M de Tris en H₂O destilada a pH=7.5) y se fijaron con metanol por 4 minutos.

El GelBond® se cortó y se dispuso en placas de acuerdo a la concentración de la muestra evaluada, cada placa se tiñó con bromuro de etidio (20 µg/mL) y se observó en microscopio de fluorescencia con filtro verde y objetivo de 20X. Se usó la medida de la longitud de cometa (µm) para cuantificar la migración del ADN. El ensayo se hizo en tres momentos independientes y cada muestra por duplicado, se realizó, con reglilla, la medición de 100 células (50 por placa) para cada muestra, teniendo un total de 300 células por muestra.

Con los resultados obtenidos, se ordenó una base de datos y con el software *IBM SPSS Statistics 23.0* se corroboró la homogeneidad entre las repeticiones del ensayo, así como la no normalidad de los datos mediante el test Kolmogorov-Smirnov y se eligió estadística no paramétrica para el análisis de los resultados. Se realizó análisis bivariado con el test Kruskal Wallis, se realizó también el test de Mann-Whitney U con corrección de Bonferroni. Para este análisis el nivel de significancia fue de 0.05 y se reportó la mediana debido a la distribución no normal de los datos. Finalmente, se categorizó el índice de daño ponderado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{IDP} = (\# \text{ células daño } 0 * 0) + (\# \text{ células daño } 1 * 1) + (\# \text{ células daños } 2 * 2) + (\# \text{ células daño } 3 * 3) + (\# \text{ células daño } 4 * 4)$$

Los criterios para considerar una célula dañada están dados en niveles de daño de 0 a 4 dependiendo del tamaño de la cola (Rango en µm), estos niveles se determinaron como la media de la longitud de cometa del control negativo más una desviación estándar más uno ($X \pm DE + 1$) y de acuerdo a esto se clasificaron como se indica en la tabla 4:

Tabla 4. Niveles de daño del ADN para ensayo cometa de queratinocitos expuestos a nanopartículas de plata en solución acuosa

Niveles de daño	Categoría de daño	Rango (μm)
Daño 0	Sin daño	≤ 9
Daño 1	Daño bajo	10 – 19
Daño 2	Daño medio	20 – 29
Daño 3	Daño alto	30 – 39
Daño 4	Daño total	> 40

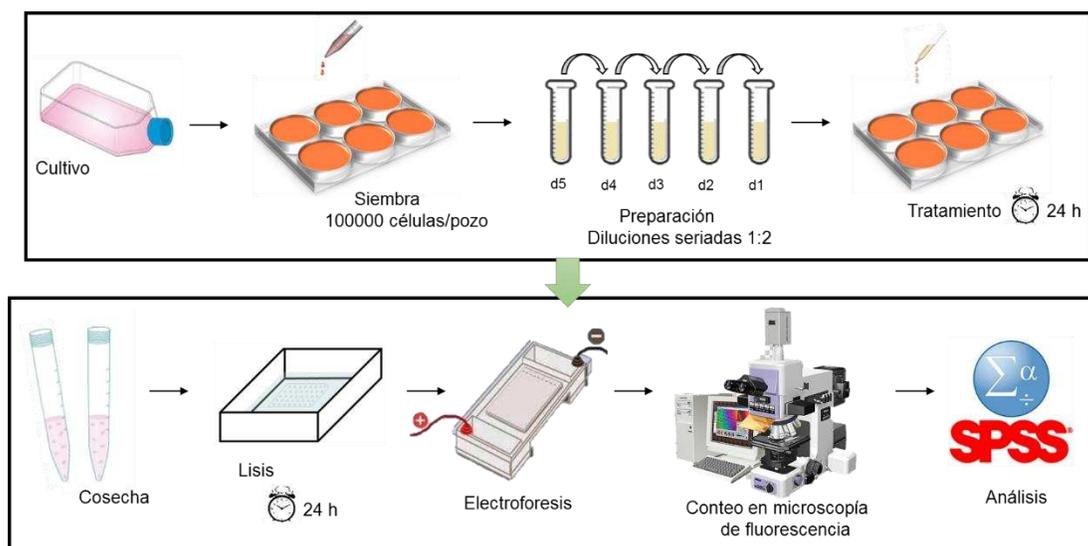


Figura 15. Metodología para prueba de ensayo cometa de queratinocitos expuestos a nanopartículas de plata en solución. Control negativo: DMEM suplementado. Control positivo: Peróxido de hidrógeno.

5.1.4. Ensayo cometa en queratinocitos expuestos al material *composite* (silicona + AgNPs)

Para esta parte del segundo objetivo, se sembraron 900000 células (queratinocitos) en medio DMEM suplementado, las cajas se dejaron incubando a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 12 horas (ver figura 16).

El resto del proceso se llevó a cabo de igual modo que la evaluación de las nanopartículas en solución (5.1.3.) de acuerdo a la metodología de Singh et al. y el análisis estadístico, de igual modo, mediante el software *IBM SPSS Statistics 23.0*.

Como en el ensayo anterior, el criterio para considerar una célula dañada, dados en niveles de daño de 0 a 4 dependiendo del tamaño de la cola (Rango en μm), se determinó como la media del control más una desviación estándar más uno ($X \pm DE + 1$), para este caso los niveles son los indicados en la tabla 5:

Tabla 5. Niveles de daño del ADN para ensayo cometa de queratinocitos expuestos a material *composite*

Niveles de daño	Categoría de daño	Rango (μm)
Daño 0	Sin daño	≤ 7
Daño 1	Daño bajo	8 – 15
Daño 2	Daño medio	16 – 23
Daño 3	Daño alto	24 – 30
Daño 4	Daño total	> 31

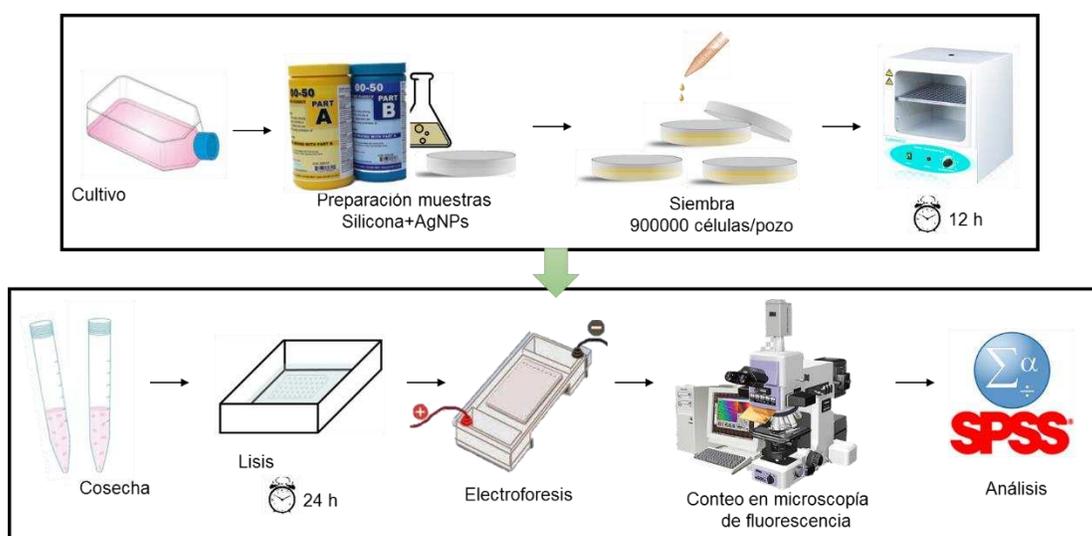


Figura 16. Metodología para prueba de ensayo cometa del material *composite*

5.2. RESULTADOS

5.2.1. Ensayo cometa en queratinocitos expuestos a nanopartículas de plata en solución acuosa

Las muestras evaluadas se observaron en microscopio de fluorescencia, en la figura 17 se tienen imágenes a 20X de las muestras de nanopartículas a concentración de $0.26 \mu\text{g/mL}$ y a la concentración más alta ($2.11 \mu\text{g/mL}$), además del control celular, en ninguna de ellas se observaron gran cantidad de cometas.

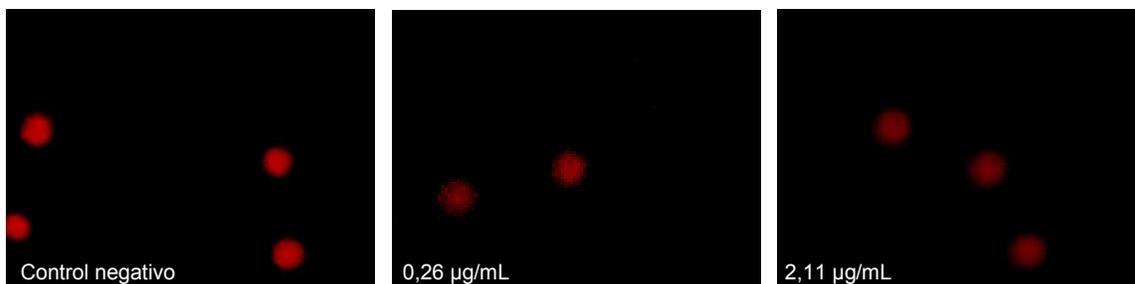


Figura 17. Microscopías de fluorescencia a 20X de la prueba de ensayo cometa de queratinocitos expuestos a nanopartículas de plata. En la imagen se observa el control negativo y las concentraciones de 0.26 µg/mL y 2.11 µg/mL de AgNPs. Control negativo: DMEM suplementado. Control positivo: peróxido de hidrógeno 31 µm

Para el ensayo cometa se realizó estadística no paramétrica, el resumen se presenta en la tabla 6. donde se aprecia la mediana de la longitud de cometa (µm) de las muestras evaluadas. De acuerdo a los resultados, se observa diferencia estadísticamente significativa entre cada concentración de nanopartículas evaluada y el control negativo.

Tabla 6. Resumen de la longitud de cometa de queratinocitos expuestos a nanopartículas de plata en solución acuosa

Concentraciones AgNPs (µg/mL)	Longitud cometa	
	Mediana (Q ₁ ,Q ₂)	Valor P*
Control negativo	8 (6,9)	
0.13	8 (7,9)	0.0001
0.26	8 (8,9)	0.0001
0.53	9 (8,10)	0.0001
1.05	9 (8,10)	0.0001
2.11	9 (8,10)	0.0001

* Se considera diferencia estadísticamente significativa cuando el valor P < 0.01. Los valores P corresponden a las comparaciones del control negativo con el resto de concentraciones. Control negativo: DMEM suplementado. Control positivo: peróxido de hidrógeno 31 µm

En la tabla 7 se aprecia la cantidad de células por nivel de daño, donde daño 1 equivale a daño bajo, daño 2 a daño medio, daño 3 a daño alto y daño 4 a daño total del ADN. De acuerdo a los resultados, las concentraciones más bajas de AgNPs no causaron daño del ADN u ocasionaron un daño bajo, mientras que las dos concentraciones más altas causaron hasta daño alto o inclusive daño total, aunque en muy baja cantidad. La mayoría de células se encuentran sin daño o en daño bajo para todas las concentraciones de nanopartículas de plata.

Tabla 7. Distribución de células por nivel de daño de queratinocitos expuestos a nanopartículas de plata en solución acuosa

Concentración AgNPs ($\mu\text{g/mL}$)	Sin daño	Daño 1	Daño 2	Daño 3	Daño 4
Control negativo	241	58	1	0	0
0.13	238	62	0	0	0
0.26	230	69	1	0	0
0.53	182	113	3	0	2
1.05	167	114	15	4	0
2.11	198	83	10	5	4

El porcentaje de células por nivel de daño, se observa en la figura 18. En esta se confirma lo dicho anteriormente, el mayor porcentaje de células se encuentran sin daño para todas las concentraciones evaluadas, incluyendo el control negativo. Las tres concentraciones más altas, presentan mayor cantidad de células en daño bajo que las concentraciones más bajas de AgNPs. El IDP tiende a aumentar, al aumentar la concentración de nanopartículas hasta la concentración de 1.05 $\mu\text{g/mL}$, para la concentración más alta el IDP disminuyó, precisamente para esta concentración se tuvo menor porcentaje de células con daño 1 que las dos concentraciones anteriores, aunque tuvo un pequeño porcentaje de células en daño medio, alto y daño total.

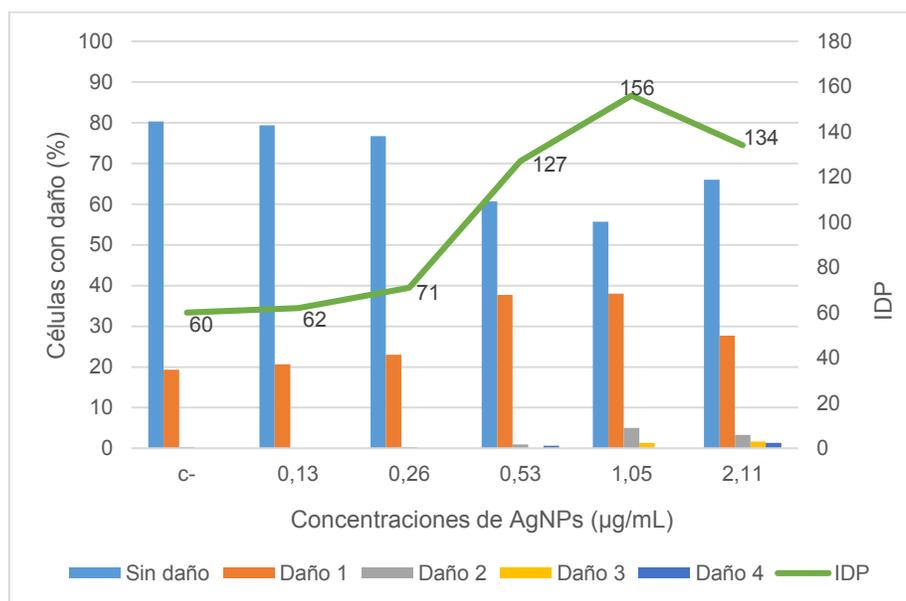


Figura 18. IDP - Porcentaje de células dañadas expuestas a AgNPs. El mayor porcentaje de células en cada concentración no presenta daño. Control negativo: DMEM suplementado. Control positivo: peróxido de hidrógeno

5.2.2. Ensayo cometa en queratinocitos expuestos al material *composite* (silicona + AgNPs)

En la figura 19 se tienen las imágenes observadas en el microscopio de fluorescencia del control negativo y las muestras evaluadas, para todos los casos no se observaron cometas de gran tamaño. Entre las células observadas en el material *composite*, no presentaban grandes diferencias entre un material *composite* con concentración de AgNPs más baja y uno con concentración de nanopartículas más alta. Tampoco se notaron diferencias entre las células expuestas al material *composite* respecto a las que estuvieron expuestas a la matriz del material, es decir a la silicona.

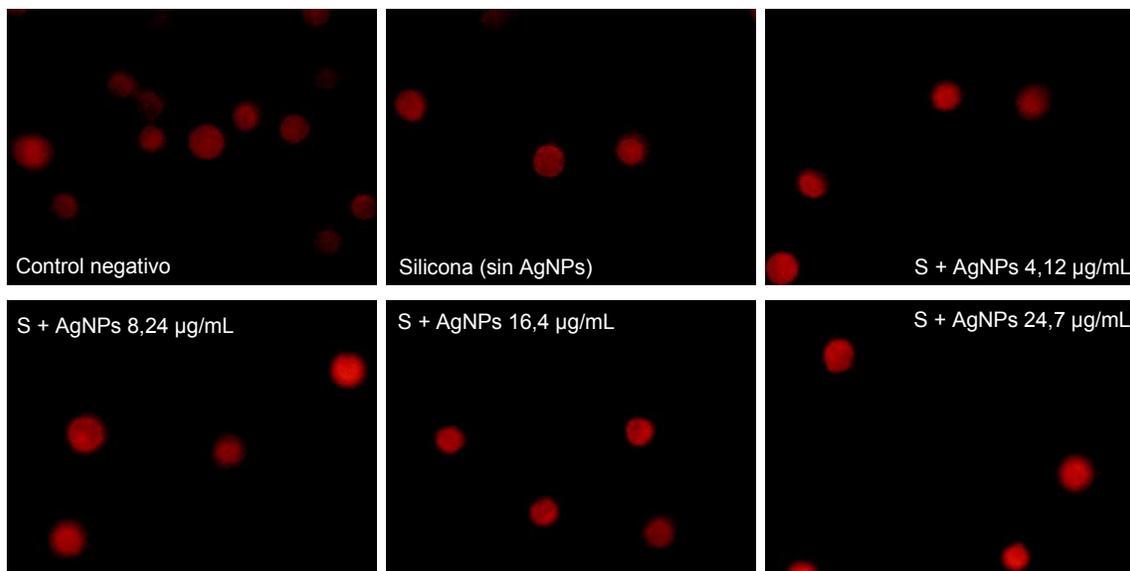


Figura 19. Microscopías de fluorescencia a 20X del ensayo cometa de queratinocitos expuestos al material *composite*. Control negativo: DMEM suplementado. Control positivo: peróxido de hidrógeno 31 μ m

Los resultados del análisis estadístico se presentan en la tabla 8. De acuerdo a estos, la matriz del material (silicona) y el material *composite* preparados con las concentraciones más bajas de AgNPs presentan diferencias significativas con el control celular, de otro modo, el material preparado con las concentraciones más altas de nanopartículas no presenta diferencias significativas con el control celular.

Tabla 8. Resumen longitud de cometa de queratinocitos expuestos a material *composite*

Concentración de AgNPs (µg/mL) en Silicona	Longitud cometa	
	Mediana (Q ₁ ,Q ₂)	Valor P*
Control negativo	7 (6,7)	
Sin AgNPs	6 (6,7)	0.004
4.12	6 (6,7)	0.004
8.24	6 (6,7)	0.004
16.48	6 (5,7)	0.133
24.73	6 (5,8)	0.091

* Se considera diferencia estadísticamente significativa cuando el valor P < 0.01. Los valores P corresponden a las comparaciones del control negativo con el resto de concentraciones de AgNPs en la Silicona. Control negativo: DMEM suplementado. Control positivo: peróxido de hidrógeno 31 µm

También se realizó análisis estadístico para identificar las diferencias del nuevo material desarrollado respecto a la matriz comercial (silicona Ecoflex™) (ver tabla 9), encontrando que el material *composite*, preparado con cualquiera de las concentraciones de nanopartículas elegidas, no presenta diferencia significativa con la silicona inicial.

Tabla 9. Resumen análisis Silicona vs. material *composite*

Concentración de AgNPs en Silicona	Longitud cometa	
	Mediana (Q ₁ ,Q ₂)	Valor P*
Sin AgNPs	6 (6,7)	
4.12 µg/ml	6 (6,7)	0.673
8.24 µg/ml	6 (6,7)	0.493
16.48 µg/ml	6 (5,7)	0.599
24.73 µg/ml	6 (5,8)	0.982

* Se considera diferencia estadísticamente significativa cuando el valor P < 0.01
Los valores P corresponden a las comparaciones de la matriz (silicona sin AgNPs) con el resto de concentraciones de AgNPs en la Silicona. Control negativo: DMEM suplementado. Control positivo: peróxido de hidrógeno 31 µm

Para este caso, también se identificó la cantidad de células para cada nivel de daño, los datos obtenidos se muestran en la tabla 10. De acuerdo a esta información, en cada muestra evaluada la mayoría de células no sufrió daño del ADN y algunas

sufrieron daño bajo, también se observa que en el material *composite*, preparado con las concentraciones más altas de nanopartículas de plata, una poca cantidad de células sufrieron desde daño medio hasta daño total.

Tabla 10. Distribución de células por nivel de daño de queratinocitos expuestos a material *composite*.

Concentración AgNPs en silicona (µg/mL)	Sin daño	Daño 1	Daño 2	Daño 3	Daño 4
Control negativo	170	30	0	0	0
Silicona sin AgNPs	180	20	0	0	0
4.12	172	27	0	1	0
8.24	165	35	0	0	0
16.48	157	40	0	2	1
24.73	149	43	2	5	1

En la figura 20 se tiene información del porcentaje de células con daño para cada nivel y de cada muestra, para todas las muestras las células sin daño corresponden al 70 % o más, las células con daño bajo no superan por mucho el 20 % para cada muestra y los porcentajes más altos, en daño bajo, son para las células expuestas al material *composite* con la concentración de nanopartículas más alto. Se observa un bajo porcentaje de células con daño medio, alto o total.

Se nota en el IDP una tendencia a aumentar conforme aumenta la concentración de nanopartículas de plata en la silicona.

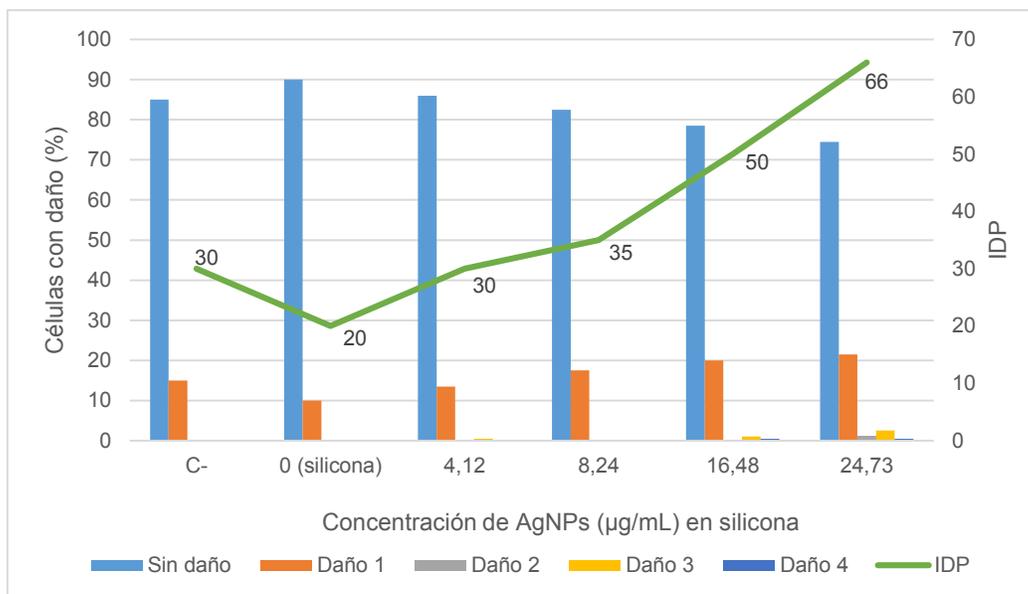


Figura 20. IDP – Porcentaje de células dañadas expuestas al material *composite*. En cada muestra el mayor porcentaje de células no presenta daño. Control negativo: DMEM suplementado. Control positivo: peróxido de hidrógeno

5.3. DISCUSIÓN

En la evaluación de la genotoxicidad de las nanopartículas de plata en solución, se obtuvieron imágenes de microscopias que no muestran grandes daños del ADN, sin embargo, el análisis estadístico indica que hay diferencias significativas respecto al control celular. De acuerdo a la literatura, las AgNPs pueden inducir a daños leves e ir incrementando el daño según el tiempo de exposición, algunos estudios reportan que al hacer un análisis en queratinocitos a un tiempo de exposición corto, los daños presentados fueron leves y no se evidencian grandes diferencias con el control celular, pero al aumentar el tiempo de exposición, el daño en las células también aumentaba llevando a diferencias significativas con el control de células sin tratamiento [120].

Los resultados de la cantidad de células por nivel de daño, indican que la mayoría se encontraron entre ADN sin daño y daño bajo, sólo las concentraciones más altas evaluadas llegaron a tener pocas cantidades de células con daños mayores del ADN, lo que indica que la concentración de AgNPs a las que se exponen las células es un factor que influye en el daño del ADN.

En algunas investigaciones obtuvieron conclusiones similares, en otro tipo de línea celular, se evaluaron diferentes concentraciones de AgNPs en solución encontrando que las concentraciones más altas incrementaban el daño del ADN observando longitud de migración de mayor tamaño. Con el fin de corroborar que el daño no fuera causado por algún otro factor, hicieron análisis de microscopía TEM de secciones delgadas de células después de ser expuestas a AgNPs pudiendo comprobar la presencia de estas nanopartículas en el núcleo y en otras partes de la células [109].

Otros resultados de investigaciones, han comprobado de igual manera la presencia de AgNPs al interior de las células mediante imágenes microscópicas, después de 24 horas de exposición se observaron AgNPs libres en el citoplasma, en endosomas y especialmente en el núcleo celular, lo que permite inferir que las AgNPs pueden ingresar por endocitosis a la célula [108]. Otros estudios, sugieren que las AgNPs llegan al núcleo celular y a tener contacto con el ADN durante la mitosis, cuando se genera ruptura de la membrana nuclear o cuando de alguna manera se da disponibilidad de interacción directa con el ADN causando daño del mismo o inestabilidad genética, lo cual está asociado con el desarrollo de cáncer [120].

Las nanopartículas evaluadas son en su mayoría de tamaño pequeño (11.6 nm), al igual que para el efecto citotóxico, algunos autores han hallado que las AgNPs de menor tamaño presentan mayor efecto genotóxico, evaluando cuatro tamaños

diferentes de AgNPs en queratinocitos, se obtuvo mayor daño del ADN para el tamaño más pequeño (5 nm) y para el tamaño más grande (110 nm), las de tamaño intermedio (25, 50 nm) no presentaron longitud de cometa de gran tamaño [108].

Según lo reportado, al igual que para la acción citotóxica, para la genotóxica de las AgNPs influye la capacidad de estas nanopartículas para producir ROS causando daño directo del ADN, además de la reducción en la producción de ATP relacionado al daño mitocondrial y la cantidad de AgNPs que tengan la capacidad de llegar hasta el ADN [121]. Así mismo, el tipo de célula expuesto a las AgNPs puede hacer que difiera el efecto genotóxico de las AgNPs. Resultados obtenidos de algunos estudios indican que los queratinocitos presentan menor sensibilidad al efecto causado por AgNPs, existen otro tipo de células con mayor sensibilidad evidenciado en un mayor daño del ADN [108].

Los recubrimientos a las nanopartículas de plata también tienden a mejorar el efecto genotóxico de estas, a bajas concentraciones [122]. Otras consideraciones importantes para mejorar la biocompatibilidad es ajustar el tamaño de las nanopartículas al momento de la síntesis, elegir la concentración más baja que cumpla con el objetivo deseado sin que genere efecto genotóxico, tener claridad del tejido con que tendrá contacto por la diferencia de sensibilidad entre las células. En relación al material *composite*, no se encontraron reportes de evaluación genotóxica mediante ensayo cometa para elastómeros de silicona, en los resultados del presente trabajo no se hallaron grandes daños del material genético, a pesar de tener diferencias significativas de algunas muestras con el control negativo, la mayoría de las células evaluadas para todas las concentraciones de AgNPs en la silicona, se encontraron sin daño.

Al no encontrar diferencias significativas entre la matriz del material (silicona) y el material final con las concentraciones de AgNPs, permite inferir que las nanopartículas no causaron efectos nocivos en el ADN y que el daño bajo que se obtuvo en menos del 20 % de las células en cada muestra corresponde a pequeños daños causados por una exposición muy baja de las células ante las AgNPs. Aunque las diferencias no sean significativas entre los datos obtenidos entre la matriz y las diferentes muestras del material *composite*, sí se observa una tendencia de aumento de daño en el ADN en tanto aumenta la concentración de AgNPs en la silicona, esto podría indicar que las muestras más concentradas, liberan mayor cantidad de AgNPs a las células, pero no una cantidad tan grande que genere mayores daños del ADN.

6. DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DE *LINER* PROTÉSICO TRANSTIBIAL

En esta sección se presenta el desarrollo del tercer objetivo, relacionado con la construcción del prototipo de *liner* protésico.

6.1. METODOLOGÍA

De acuerdo a los ensayos realizados en los objetivos anteriores se determinó que la concentración de nanopartículas más apropiada para la fabricación del *liner* protésico es de 16.48 µg/mL, ya que no se obtuvo diferencias significativas del material preparado con esta concentración y con el material preparado con concentraciones menores e incluso con la matriz en cuanto a la evaluación de la viabilidad celular y genotoxicidad, adicionalmente su evaluación antimicrobiana previa demostró la reducción en el crecimiento del microorganismo *Staphylococcus aureus* en un 21 % y en un 14 % para SARM siendo la preparación del material con mejor respuesta antimicrobiana [74]. Las pruebas desarrolladas y presentadas en las secciones anteriores determinaron que el material no tiene efectos nocivos para el tejido de la piel al usarse durante un periodo de tiempo continuo cercano a las 12 horas y que además no causa alternaciones notables en el ADN de las células de la piel.

La fabricación del *liner* protésico con el nuevo material *composite* desarrollado requirió de la fabricación de moldes con la forma del dispositivo deseado y una estructura que permitiera sostener y manipular los moldes, además de generar una alineación vertical de los mismos.

6.1.1. Fabricación de moldes y estructura

Se detalla a continuación la manera en que se fabricaron los moldes en fibra de vidrio y el sistema de soporte de los mismos para lograr un sistema de producción de *liners* de elastómero de silicona con AgNPs (material *composite*).

6.1.1.1. Moldes en fibra de vidrio

Para la fabricación del *liner* protésico con el material *composite* (silicona con AgNPs) fue necesario fabricar moldes con la forma de dicho dispositivo para trabajar la silicona. Inicialmente, se solicitó asesoría a la empresa Cenop, para identificar las dimensiones o tallaje más usado por las personas con amputación de miembro inferior transtibial.

Así, se determinó que el *liner* protésico que más usan es el denominado como 'talla M', que tiene un rango de medidas entre las que se encuentran las indicadas en la figura 21, donde la longitud de la circunferencia proximal es de 41 cm, la circunferencia distal es de 24 cm y el largo total de 42 cm.

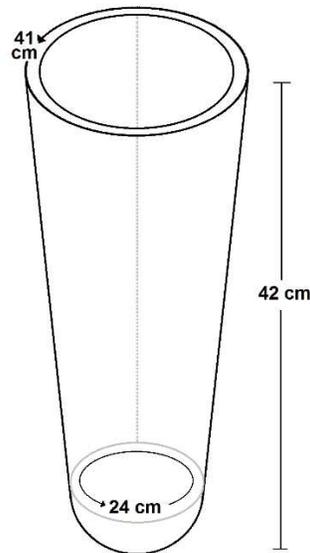


Figura 21. Medidas para el molde inicial del *liner* protésico

Con el fin de tener un molde de referencia, se realizó un diseño en CAD (figura 22) en el software *Solid Edge* con las medidas anteriores. Este diseño, se imprimió en la impresora 3D *SeeMeCNR Rostock Max v2* del laboratorio de metalmecánica de la Universidad EIA, el material usado para la impresión fue Ácido poliláctico (PLA) (figura 23).



Figura 22 Diseño CAD molde inicial.



Figura 23. Molde inicial en impresión 3D

Esta impresión 3D sirvió como molde de partida para la fabricación de dos moldes en fibra de vidrio, uno interno y otro externo que permitirían obtener la forma cónica del *liner* protésico y en el interior el espacio para el muñón del usuario. Este molde se forró con trozos rectangulares de fibra de vidrio (ver figura 24), los cuales se pusieron longitudinalmente y se impregnaron de resina poliéster (Resiglas T) con el fin de fabricar el molde interno. La resina se preparó con catalizador de resina poliéster al 2 % en peso. Se cubrió toda la superficie del molde 3D con dos capas de fibra de vidrio, dejándose secar completamente entre capa y capa a temperatura ambiente.



Figura 24. Fibra de vidrio



Figura 25. Proceso de pulido

Cuando las capas de fibra de vidrio secaron completamente, la superficie externa se pulió con pulidora eléctrica (ver figura 25) y con papel de lija de varios calibres para lograr una superficie lisa y suave. Posteriormente, el molde interno de fibra de vidrio se cubrió con capas de Etilvinilacetato (foamy) hasta lograr un espesor aproximado de 3 mm por toda la superficie, esto, con el fin de obtener el espacio entre los dos moldes de fibra de vidrio (interno y externo) donde se debe poner el material (silicona) para el *liner* protésico.

Sobre esta capa de Etilvinilacetato, se agregaron, de nuevo, trozos de fibra de vidrio para obtener el molde externo. De igual manera que se hizo para el molde interno, la fibra de vidrio se impregnó con la resina poliéster, se hicieron dos capas de fibra de vidrio que se dejaron secar a temperatura ambiente.

Luego, se separaron los moldes de fibra de vidrio y se retiró la capa de Etilvinilacetato que había quedado entre los moldes interno y externo (ver figura 26) y que es el espacio, como se indicó, que se debe llenar con el material *composite*. Posteriormente se pulió la parte interna de este molde con papel lija de varios calibres.



Figura 26. Moldes interno y externo de fibra de vidrio

Para finalizar esta parte, al molde interno se le puso una varilla para sostenerlo fácilmente y se llenó con yeso para generar peso; el molde externo se cortó por la mitad de manera longitudinal con el fin de poder abrir y cerrar para hacer más fácil el proceso de desmoldado a la hora de la fabricación del *liner* protésico. Con ángulos de aluminio se hizo un sistema que permitiera abrir y cerrar dicho molde para cada ensayo.

6.1.1.2. Estructura para moldes

Con la fabricación de los moldes de fibra de vidrio se vio la necesidad de una estructura que los pudiera sostener durante el proceso de fabricación del *liner* (figura 27), pero principalmente, que se pudieran alinear de manera longitudinal y que permitiera centrar los moldes y así generar un espacio homogéneo entre ellos.

La estructura se fabricó con perfiles y ángulos de aluminio teniendo en cuenta la medida de los moldes de fibra de vidrio. Se construyó una base de madera donde encaja el molde externo y alrededor de esta se construyó la estructura de aluminio. Se agregaron rodamientos lineales que se pudieran fijar a la varilla del molde interno y permitir levantar y bajar este molde en el proceso de la elaboración del *liner* protésico.

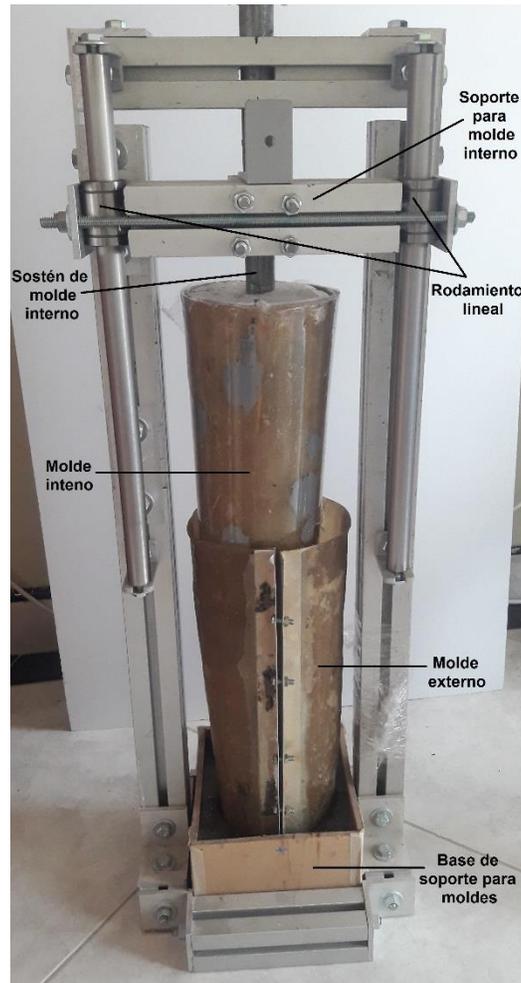


Figura 27. Partes de la estructura para moldes

6.1.2. Fabricación de *liner* protésico de miembro inferior

Inicialmente, se realizaron pruebas preliminares con la matriz del material, es decir, silicona Ecoflex™ 00 – 50 sin nanopartículas de plata, con el objetivo de analizar el proceso, verificar el estado de los moldes y el funcionamiento de la estructura, así como identificar problemas y hacer los ajustes pertinentes.

Se dispuso la estructura con los moldes de fibra de vidrio para el proceso (ver figura 28). Se puso el molde externo en la base de madera. Al molde interno se le agregaron unos trozos de madera de 3 mm de espesor por la superficie (figura 29) para ayudar a centrar el molde interno y se introdujo en el molde externo, allí, de la varilla se fijó al soporte y con ayuda de los rodamientos lineales y se levantó, se le extrajeron los trozos de madera y se preparó la silicona.



Figura 28. Molde interno y externo



Figura 29. Molde interno

Para este fin, se mezcló el monómero y catalizador de la silicona Ecoflex™ en partes iguales por volumen, para este caso se usaron 400 mL del monómero y 400 mL del catalizador, es decir, 800 mL de silicona. Se mezcló en agitador mecánico durante 3 minutos a 450 rpm (ver figura 30). La silicona preparada se vertió al interior del molde externo y se descargó el molde interno haciendo que la silicona ocupe todo el espacio entre los moldes.

La silicona se dejó curando a temperatura ambiente durante por lo menos 24 horas para asegurar que estuviera completamente sólida. Posteriormente, se retiraron los moldes de la estructura, se abrió el molde externo y se extrajo el prototipo de *liner* protésico.

Luego, se hizo el prototipo del *liner* protésico con la concentración de nanopartículas elegida (16.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$), para esto, se preparó el material con 800 mL de silicona total. En primer lugar, se mezcló 118.5 mL de AgNPs y 9.3 mL de surfactante (Tween 80) con 400 mL del catalizador en agitador mecánico a 450 rpm hasta obtener una mezcla homogénea, posteriormente se agregó 400 mL del

monómero de la silicona y se mezcló durante 3 minutos más (figura 30). La mezcla debe someterse a vacío para evitar que quede aire y cure con este al interior del dispositivo (figura 31).



Figura 30. Mezclado a 450 rpm



Figura 31. Desgasificación del material

El resto del proceso se llevó a cabo como se indicó anteriormente con la silicona sin AgNPs. La estructura con los moldes siempre debe adecuarse previamente, para que, al momento de tener la preparación del material lista, esta se pueda verter inmediatamente. El material en los moldes se dejó curando a temperatura ambiente para luego ser desmoldado como se indicó anteriormente.

6.2. RESULTADOS

Se obtuvo una estructura con moldes de forma cónica para la fabricación de *liners* protésicos transtibiales, los moldes en fibra de vidrio son resistentes y permiten abrirse y cerrarse para un fácil desmoldado como se muestra en la figura 32. La estructura tiene rodamientos lineales, los cuales permiten levantar y descargar el molde interno luego de agregar el material a trabajar (ver figura 33). La estructura permitió la alineación vertical de los moldes y mejorar la repetitividad de los ensayos; aunque es un prototipo inicial, permitió la fabricación del *liner* protésico con la forma esperada.



Figura 32. Moldes para liner protésico



Figura 33. Estructura para fabricación de *liner* protésico

Se obtuvo también un primer prototipo de *liner* protésico con la matriz, es decir, silicona Ecoflex™ sin AgNPs de plata (ver figura 34). Esto permitió iniciar con la metodología de fabricación del *liner* protésico, así como también hacer los ajustes necesarios en la estructura y en los moldes de fibra de vidrio.

El *liner* de silicona sin AgNPs, se midió en un molde de yeso obtenido de una persona con amputación logrando un buen ajuste. La superficie es suave y la buena elasticidad de la silicona permite el movimiento.



Figura 34. *Liner* protésico usando la matriz de material *composite*. Se adapta fácilmente al molde de muñón

Finalmente, se obtuvo el prototipo de un *liner* protésico transtibial con el nuevo material *composite* desarrollado durante el macro-proyecto como se muestra en la figura 35. Durante el proceso de preparación del material *composite* se deben hacer dos ciclos de mezclados y posteriormente un proceso de desgasificación mediante vacío lo que genera mayor viscosidad a la mezcla y menos tiempo de trabajo, por lo que se debe tener la estructura preparada previamente y el procedimiento claro.



Figura 35. Prototipo de *liner* protésico con material *composite*

6.3. DISCUSIÓN

Los prototipos obtenidos permitieron el buen desarrollo del objetivo planteado en cuanto a la fabricación de un *liner* protésico transtibial. Cabe resaltar que para este fin no se partió de alguna metodología previa ni resultados preliminares de otras investigaciones, fue desarrollado con iniciativa y recursos del grupo de trabajo.

En relación a la estructura, como se indicó con anterioridad, permite el soporte, manipulación y alineación de los moldes de fibra de vidrio, permite también repetitividad de los prototipos fabricados, el vaciado del material *composite* desarrollado y que este fluya por los moldes.

Los moldes de fibra de vidrio tienen buena rigidez y dureza, son resistentes y se pueden usar las veces que se requieran para hacer todos los ensayos deseados, se lograron construir con la forma cónica esperada, que es difícil obtener. Con el uso de la pulidora se obtuvo una superficie lisa y suave lo que permite que el material *composite* fluya con mayor facilidad. Es pertinente resaltar que dichos moldes permiten la fabricación de un solo tamaño de prototipo de *liner* protésico, en caso de requerir otros tamaños se deben fabricar otros moldes con dimensiones diferentes, lo cual se puede realizar mediante la metodología planteada en el presente trabajo de grado.

Respecto al prototipo del *liner* protésico, se obtuvo la forma deseada con medidas aproximadas a las presentadas en la figura 22, si se desea mayor longitud se puede aumentar el volumen de material *composite* que se agrega a los moldes. Al medirlo en el molde de yeso de un muñón, presentó buena elasticidad y se adaptó fácilmente a la forma de dicho molde.

Algunos autores presentan al *liner* protésico como un contribuyente fundamental para ajuste entre el miembro residual y el socket. De acuerdo a ellos, el *liner* tiene dos funciones claves: proteger el miembro residual y acoplar el miembro a la prótesis. De esta manera, este dispositivo juega un papel importante en el buen ajuste, confortabilidad y miembro protésico funcional [58] [123], además ayuda a minimizar los problemas por el cambio de volumen del muñón durante el día y distribuir los esfuerzos que se generan durante el movimiento [60] [57]. De ahí entonces radica la importancia de avanzar en investigaciones relacionadas a materiales, diseño y desarrollo de estos dispositivos.

En relación al material *composite* usado, elastómero de silicona, es uno de los más usados en la fabricación de *liners* protésicos, aunque también se usan otros como copolímeros, poliuretano, silicona, termoplásticos y geles de silicona [58] [56], los

elastómeros de silicona poseen cierta condición antideslizante que ayuda a mantener el contacto total con el miembro residual reduciendo el desplazamiento y el cizallamiento comparado con otro tipo de materiales [56]. También presenta baja rigidez convirtiéndose en material adecuado para uso donde se requiere confort [57].

Durante el proceso de fabricación con este material, en relación al curado del material *composite*, este fue exitoso, curó en el tiempo esperado y en todo el volumen del prototipo del *liner*, las nanopartículas de plata usadas como reforzante no influyeron de forma negativa en el curado completo del prototipo, de igual manera los moldes de fibra de vidrio tampoco entorpecieron el curado del material.

El nuevo material *composite* puede ser usado con otras técnicas de fabricación para *liners* protésicos personalizados para pacientes que lo requieran debido a las características particulares del muñón, además podría usarse también en fabricación de *liners* transfemorales o incluso de miembro superior. Para esto, es importante ajustar el diseño de acuerdo a las necesidades específicas de los usuarios.

Según reportes de algunos estudios, los requerimientos en cuanto a diseño y fabricación de *liners* más solicitados por los usuarios son la durabilidad, confort, características de suspensión, la apariencia y estética, así como el control de temperatura, facilidad al ponerlo y retirarlo y el rango de movimiento que este permite. También la forma del muñón, calidad de la piel y nivel de actividad [58] [60]. Todo esto es importante tener en cuenta a la hora de la elección del diseño y material para la fabricación de un *liner* o la elección de un dispositivo comercial, ya que una mala elección puede generar pistoneo, lo cual conlleva a la pérdida de estabilidad y caídas, adicional a las lesiones dérmicas y finalmente a la interrupción del uso de la prótesis[60].

En los últimos años, los diseños de socket intentan disminuir los picos de presión generados por las cargas entre el muñón y el socket, lo cual se está haciendo desde el diseño y uso de materiales de los *liners* protésicos, especialmente de materiales elastoméricos ya que permiten expandirse y “fluir” ante el esfuerzo de compresión y de esta forma redistribuir las presiones [59]. Como se mencionó con anterioridad, el *liner* protésico es la parte de la prótesis que tiene contacto directo con el miembro residual y permite la protección de los tejidos blandos ya que cumple la función de amortiguador de cargas durante la marcha que al ser repetitivas generan dolor y lesiones [57]. Por lo que todos los nuevos desarrollos en pro de mejorar el confort, el ajuste y la redistribución de esfuerzos se está llevando a cabo desde la investigación en nuevos materiales y diseños de *liners* protésicos.

Durante el proceso de fabricación del prototipo se encontraron algunos aspectos que se pueden mejorar como la alineación de los moldes (interno y externo) para perfeccionar y homogeneizar el espesor del prototipo en toda su área y aumentar la altura de la estructura para extraer con mayor facilidad los moldes de fibra de vidrio. Agregar en la parte superior de la estructura un sistema que permita fijar o sostener el molde interno cuando está levantado ya que ahora se sostiene mediante una prensa en 'C', pero una modificación en este sentido le agregaría mayor funcionalidad. Mejorar la superficie interna del molde externo, que da el acabado exterior del *liner* ya que su forma no permitió el uso de maquina pulidora.

En relación al prototipo del *liner*, se espera reducir el espesor de este en pro de disminuir su peso. En los *liners* comerciales se suele usar un recubrimiento de tela que mejora las propiedades mecánicas, lo cual no se contempló en los alcances de este proyecto, pero se visualiza como un trabajo futuro. Deben ser consideradas algunas pruebas mediante inyectado de la silicona para optimizar y mejorar el prototipo, lo cual requiere de la fabricación de otros moldes, posiblemente en otro material, para garantizar una superficie más lisa donde el material pueda fluir con mayor facilidad.

En cuanto a la preparación del material *composite*, en caso de que se requiera una concentración de nanopartículas superior a 16.4 $\mu\text{g/mL}$, lo que exige mayor tiempo de mezclado ya que es más difícil de homogeneizar y que conlleva a que el tiempo de gel del material se reduzca notablemente respecto a la matriz inicial (Ecoflex™), se pueden buscar productos y alternativas para disminuir la viscosidad y aumentar el tiempo de trabajo.

Aunque los prototipos requieren ajustes y mejoras, son un punto de partida funcional para la fabricación de *liners* protésicos, un área en la cual el país y la ciudad no cuentan con un amplio recorrido investigativo. Como consecuencia de esto la información de la fabricación es escasa, al igual que las herramientas para su desarrollo y evaluación.

7. PRUEBAS MECÁNICAS DEL PROTOTIPO DE *LINER* PROTÉSICO TRANSTIBIAL

Después de tener el prototipo del *liner* protésico construido se procedió a realizar las pruebas mecánicas, tal como se detalla en las siguientes subsecciones.

7.1. METODOLOGÍA

Se realizaron pruebas de tracción y compresión bajo las indicaciones de normas ASTM D2240 y D412. Estas normas son específicas para la valoración de cauchos y elastómeros termoplásticos. La prueba de tracción permitió evaluar la resistencia del material a esfuerzos de tensión, mientras que la prueba de compresión evaluó la resistencia y porcentaje de compresión ante determinada carga, estas pruebas son de gran importancia ya que diariamente los *liners* protésicos se ven sometidos a esfuerzos de tensión cuando el usuario está poniéndose el dispositivo en el muñón y a compresión durante el proceso de la marcha o al estar de pie por el peso del usuario y de acuerdo a estudios reportados, estas son de las principales propiedades que afectan la funcionalidad de un *liner* protésico, adicionalmente se corroboró en la literatura que en los estudios realizados se evaluaban estas dos propiedades [58].

Previo a las pruebas realizadas, se estudiaron los posibles factores (figura 36) que intervienen y podrían afectar la fabricación del material y sus propiedades tales como el tiempo de curado, la temperatura de curado, las diferentes concentraciones de AgNPs y velocidad de mezclado [74].

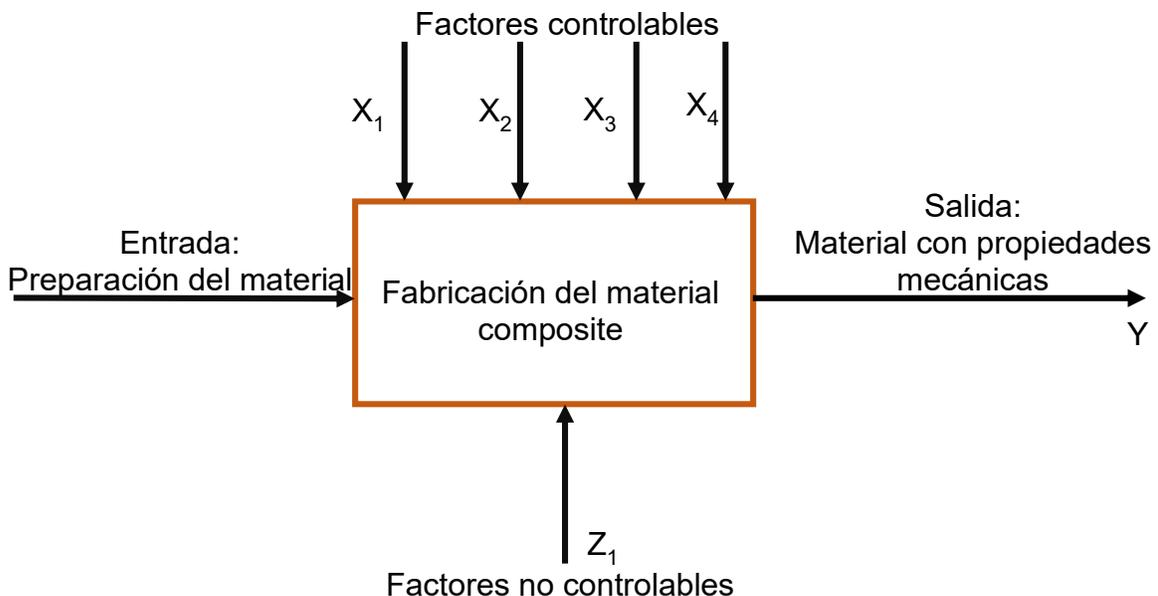


Figura 36. Factores que influyen en el experimento

Dónde:

X_1 : Tiempo de curado

X_2 : Temperatura de curado

X_3 : Concentración de AgNPs

X_4 : Velocidad de mezclado

Z_1 : Incorporación de aire

En cuanto al tiempo y temperatura de curado, el fabricante de la matriz usada (Ecoflex™ 00-50) determina que 3 horas es el tiempo adecuado a temperatura ambiente, aunque para lugares de temperatura menor a 18 °C sugieren realizar un proceso adicional en horno a 80 °C y 100 °C [102]. Previo a este trabajo de grado, se realizó un ensayo con tres muestras como se observa en la tabla 11. para observar el efecto de la temperatura de curado que indica el fabricante en la matriz del composite.

Tabla 11. Muestras para ensayo de temperatura de curado

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Temperatura (°C)		Tiempo (h)	
25 (ambiente)	3	3	3
80	0	2	2
100	0	0	1

Posteriormente, se realizó a cada muestra una prueba de dureza bajo la norma ASTM D 2240-5. Con los resultados de esta prueba no se encontraron diferencias significativas entre las muestras con curado a diferente temperatura. Por lo que se decidió realizar el proceso de fabricación con curado a temperatura ambiente como lo sugiere el fabricante y además facilita el proceso de fabricación del prototipo y reduce los costos del mismo [74].

En relación a la concentración de nanopartículas de plata, previamente se evaluó la actividad antimicrobiana del material *composite* con diferentes concentraciones de AgNPs [74], así como la biocompatibilidad (secciones 4 y 5), con lo cual se definió la mejor concentración para la fabricación del dispositivo como se mencionó en el ítem 6.1. Adicional a esto, se evaluó la velocidad de mezclado con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata con curado a temperatura ambiente como se indica en la tabla 12 [74].

Tabla 12. Velocidades y concentraciones de AgNPs evaluadas

Velocidad (rpm)	Concentración de AgNPs ($\mu\text{g/mL}$)
250	0
450	8.25
650	16.49
	24.73

Para este caso, también se evaluó la dureza mediante la norma ASTM D 2240-5, los resultados se compararon mediante análisis de varianza multifactorial encontrando diferencias significativas entre las muestras preparadas a 250 y 650 rpm, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las muestras preparadas a velocidades de 250 y 450 rpm, además tampoco entre las velocidades 450 y 650 rpm, por lo que se decidió la preparación del material *composite* con la velocidad de 450 rpm [74].

Así mismo, no se hallaron diferencias significativas entre las muestras preparadas con las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata [74] por lo que la concentración de nanopartículas de plata se definió de acuerdo a los resultados de la evaluación antimicrobiana y de biocompatibilidad como se mencionó antes.

Las valoraciones realizadas previas a estas pruebas permitieron determinar que no se encontraban diferencias significativas al variar el proceso de curado con variación de la temperatura ni con las diferentes velocidades de mezclado [74]. Además se siguió la indicación del fabricante sobre el tiempo de curado [102].

7.1.1. Ensayo de resistencia a la tracción

Se realizó el ensayo de tracción de material *composite* con la concentración de nanopartículas elegida (16.4 $\mu\text{g/mL}$) de acuerdo a la norma ASTM D412 – 15^a (2015) “Métodos de prueba estándar para caucho vulcanizado y elastómeros termoplásticos”, mediante el método de evaluación A: Muestras rectas y mancuernas [124].

7.1.1.1. Obtención de probetas

Se elaboraron las probetas D (mancuerna) según la norma ASTM D412 (figura 37), para esto, se hizo una lámina del material (silicona con AgNPs a concentración de $16.4 \mu\text{g/mL}$) de 3 mm de espesor en un molde acrílico, se dejó curando a temperatura ambiente. Cuando estuvo completamente sólida, se cortaron con un troquel con la forma y dimensiones de la probeta de acuerdo a la norma como se muestra en la figura 38. Finalmente, se verificó con un micrómetro que las dimensiones de las probetas correspondieran con la norma [124] (ver figura 39).

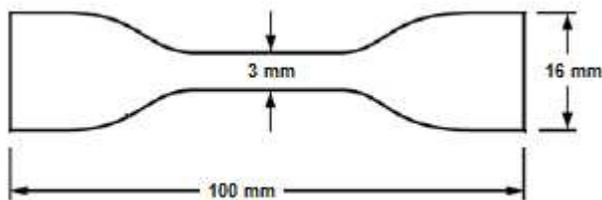


Figura 37. Probeta D de la norma ASTM D412



Figura 38. Troquel para probeta D ASTM D412

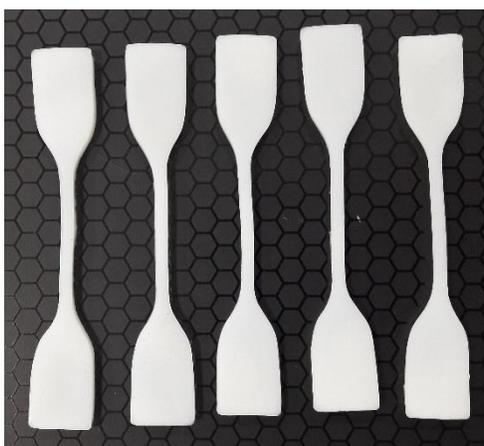


Figura 39. Probetas para ensayo de tracción

7.1.1.2. Procedimiento

El ensayo de tracción se realizó en la máquina universal de ensayos marca Instron 5582, se usaron mordazas de accionamiento neumático para la sujeción de las probetas, una celda de carga de 1000 N y se llevó a cabo el ensayo a velocidad de 250 mm/min [125]. Se midió la longitud inicial y se realizó la prueba hasta producir la rotura de la muestra.

7.1.1.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se procesaron para encontrar el promedio y la desviación estándar.

7.1.2. Ensayo de resistencia a la compresión

Para evaluar la resistencia a la compresión que presenta el material *composite*, se siguió la norma ASTM D395 – 16^e (2016) “Métodos de prueba estándar para propiedad del caucho – Equipo de compresión”, por medio del método de evaluación B: “Conjunto de compresión bajo deflexión constante en aire” [126].

7.1.2.1. Obtención de probetas

Se elaboraron cuatro probetas en forma cilíndrica con un molde acrílico con las dimensiones estipuladas en la norma (figura 40), para esto se preparó un stock del material *composite* (silicona con AgNPs a concentración de 16,4 µg/mL) y se vertió en el molde. Se dejó curando a temperatura ambiente, al solidificarse, se retiraron del molde y se verificaron las dimensiones con micrómetro. El diámetro de las probetas fue de 29 mm y su espesor de $11,5 \pm 0.2$ mm (figura 41).



Figura 40. Molde para fabricación de probeta para compresión

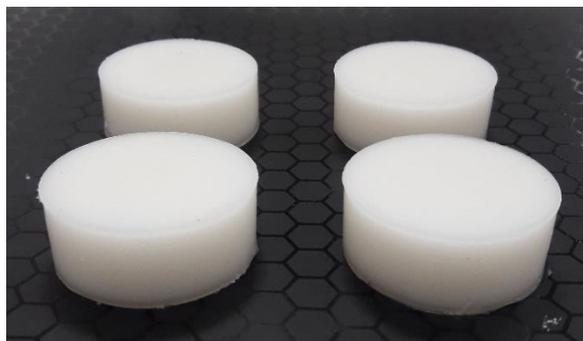


Figura 41. Probetas para compresión

7.1.2.2. Procedimiento

Para el ensayo de resistencia a la compresión se usó un dispositivo de compresión formado por dos placas de acero con tornillos. Las muestras se ubicaron entre las placas, a lo largo de estas de manera equitativa, se aplicó una compresión del 25 % de su espesor total como lo indica la norma y se fijó con los tornillos como se muestra en la figura 42. Se verificó, con el micrómetro, que la compresión fuera homogénea en todo el perímetro de las placas para evitar que unas muestras estuvieran sometidas a mayor compresión que otras.

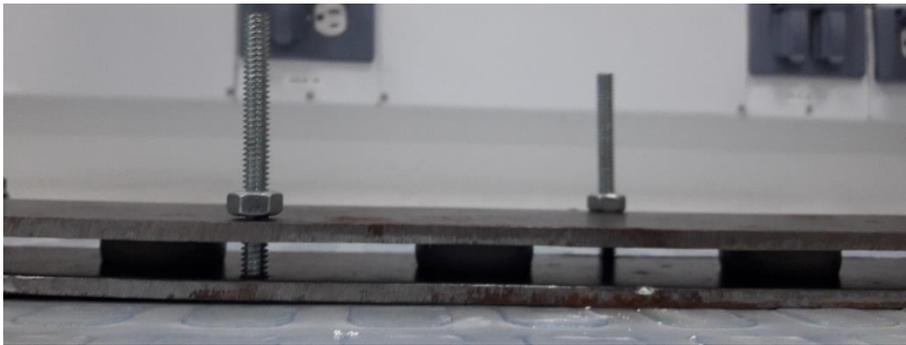


Figura 42. Dispositivo para prueba de compresión

El dispositivo de compresión, con las muestras, se llevó al horno durante 22 horas a 70 °C. Al finalizar este tiempo, se retiraron las muestras del dispositivo, se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y se midió el espesor final con micrómetro. Cabe resaltar que en estudios previos a este trabajo de grado se realizó pruebas de curado a diferentes temperaturas, se realizó prueba de dureza y no hubo diferencias significativas en las de temperatura ambiente y las expuestas a 80 y 100 °C [74].

La compresión de la muestra se calculó mediante la fórmula:

$$\% C = \left((E_0 - E_f) / (E_0 - E_p) \right) \times 100$$

Donde E_0 equivale al espesor inicial de la probeta, E_f el espesor final de la probeta y E_p el espesor medido entre las placas al momento de la compresión.

La deflexión de las placas de acero no se tomó en cuenta ya que no se evidenció cambios en la misma al finalizar la prueba, con el micrómetro se verificó que el espacio de compresión correspondiera al que se midió inicialmente.

7.1.2.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se procesaron para encontrar el promedio y la desviación estándar.

7.2.RESULTADOS

De acuerdo a los ensayos previos, descritos en la metodología se decidió para estas pruebas la fabricación de probetas a tiempo de curado de 3 horas, a temperatura ambiente y concentración de 16.48 $\mu\text{g/mL}$ nanopartículas en la matriz, mezclado de 450 rpm y desgasificación durante 5 minutos, pues este serían las condiciones de preparación del material *composite* para el *liner* protésico.

7.2.1. Ensayo de resistencia a la tracción

El ensayo de tracción fue llevado a cabo de acuerdo a lo estipulado en la norma ASTM D412, método A, se obtuvo la gráfica de esfuerzo vs. Deformación que se muestra en la figura 43. Se observa en la gráfica, que las probetas evaluadas tuvieron un comportamiento similar, con una elongación entre 500 y 600 % de su longitud inicial.

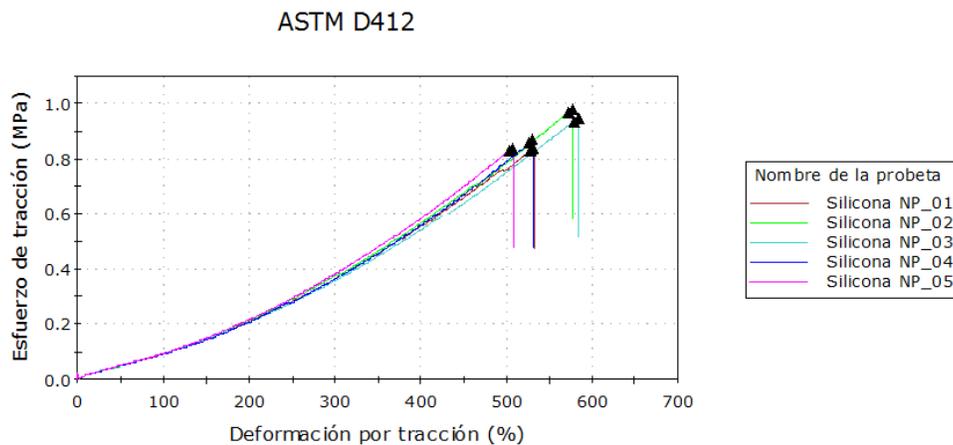


Figura 43. Gráfica de esfuerzo vs. Deformación

En la tabla 13, se observan las propiedades mecánicas del material *composite* reforzado con nanopartículas de plata a concentración de 16,4 $\mu\text{g/mL}$. Se observa alto porcentaje de elongación.

Tabla 13. Propiedades mecánicas derivadas del ensayo de tracción

Propiedad mecánica	Valor promedio
Resistencia a la tracción (Mpa)	0,896 ±0,065
Resistencia a la rotura (Mpa)	0,890 ± 0,066
Elongación a la ruptura (%)	546,996 ± 32,521
Módulo de elasticidad (Mpa)	21,875 ± 7,078

7.2.2. Ensayo de resistencia a la compresión

Los datos del ensayo de compresión se observan en la tabla 14 en la que se presenta la deformación por compresión de las muestras evaluadas. Se evaluaron 4 muestras con lo que se obtuvo un promedio del porcentaje de deformación. En las tres primeras muestras se observa porcentajes de compresión similares. El porcentaje de deformación 21,8 promedio estuvo por debajo del porcentaje de deformación reportado por el fabricante para la matriz [102]. Los resultados sugirieren una buena capacidad de comprimirse y reponerse casi hasta su espesor inicial.

Tabla 14. Datos - Ensayo de compresión

Probeta	Espesor inicial (mm)	Espesor final (mm)	Espesor de la barra	Deformación por compresión (%)	Desviación estándar
1	11,49	11	8,62	17,07317073	NA
2	11,4	11	8,62	14,38848921	NA
3	11,75	11	8,62	23,96166134	NA
4	11,31	10,5	8,62	30,11152416	NA
Promedio	11,5	10,87	8,62	21,875	7,0789462

7.3. DISCUSIÓN

Muestras del material *composite* (silicona con AgNPs) fueron sometidas a dos ensayos para conocer su comportamiento mecánico. Los *liners* protésicos deben

resistir esfuerzos de tracción, compresión, cortantes, entre otras, que se generan durante la postura del dispositivo, el ejercicio de la marcha durante cada fase, por ejemplo, durante la fase de balanceo donde la prótesis queda en el aire y el *liner* debe ayudar a sostener el socket o encaje experimentando elongación axial o el simple hecho de estar de pie soportando el peso del usuario. También durante el día se pueden presentar cambios de volumen en el muñón y afectar la distribución de las cargas soportadas sobre todo en las prominencias óseas [59] [127] [76].

Como se ha mencionado, entre las funciones de un *liner* protésico está el generar confort, redistribuir las cargas y mejorar el ajuste a la prótesis [58] [57], sin embargo, estas funciones se pueden ir reduciendo en un periodo corto de tiempo debido al cambio en las propiedades del material al verse sometido a cargas cíclicas y al ambiente biológico que le genera la piel del miembro residual [57], así que el reto está en el uso de materiales que de acuerdo a sus propiedades permitan mayor durabilidad [58].

En el presente trabajo de grado, se evaluó de manera preliminar, las propiedades de tracción y compresión del material *composite*, en algunos estudios indican que estas propiedades se encuentran entre las más importantes y que afectan la funcionalidad del *liner* [58] aunque hay otras propiedades de gran importancia como el coeficiente de fricción y la rigidez al cizallamiento [60] [56] o incluso la conductividad térmica y la elasticidad volumétrica [60].

De acuerdo a la literatura, el ensayo de compresión permite evaluar cómo el *liner* distribuye los esfuerzos y presiones concentradas en el miembro residual durante la fase de apoyo de la marcha, mientras que el ensayo de tracción, la capacidad del *liner* de resistir la elongación durante la fase de balanceo, lo cual influye en la calidad de suspensión y soporte que proporciona el dispositivo al caminar [60] y de esta manera conocer si el *liner* protésico es apropiado para las necesidades particulares de determinado usuario.

Algunos autores establecen que las nanopartículas pueden alterar las propiedades mecánicas de los polímeros, aumentando las fuerzas de unión de los monómeros del material [128] [129]. En este trabajo se encontró que la resistencia a la tracción, resistencia a la rotura, elongación a la ruptura, módulo de elasticidad y la deformación por compresión del material se encontraron dentro de los rangos admisibles para su uso de acuerdo con la literatura de materiales similares usados en *liners* protésicos [61]. Algunos autores reportaron valores menores de rigidez, sobre todo en otros materiales como geles de silicona, aunque para elastómeros hallaron un amplio rango de valores de rigidez, lo cual indica que dispositivos fabricados con elastómeros de silicona puede ser aplicable para el uso en diversos

pacientes, cabe resaltar que materiales con mayor rigidez permiten buena suspensión en la fase de balanceo [56], por lo que sería más aplicable en usuarios con mayor actividad física.

Kelley et al. reportó valores de elongación entre 400 y 560 %, mientras que Sanders et al. reporta valores entre 30 y 249 KPa en resistencia a la tracción de varios materiales usados para la fabricación de *liners*, lo que indica que el material estudiado presenta mayor resistencia (0,89 Mpa) lo cual es favorable ya que la resistencia a la tracción influye en la calidad de suspensión que proporciona este dispositivo protésico [60]. Algunos estudios de compresión en *liners* protésicos de miembro inferior han reportado valores entre 8 y 59 % de deformación por compresión [56] [130], mientras que otras investigaciones han reportado porcentajes entre 7 y 26 % lo cual es similar a lo encontrado en este trabajo de grado (21.8 %) [61]

En el ensayo de compresión realizado se observó que el material *composite* presenta buena recuperación luego de ser sometido a compresión. Un *liner* con alta elasticidad a la compresión permitirá optimizar la estabilidad entregando las presiones concentradas a las áreas deseables que soportan cargas. Adicionalmente, los liners de elastómero se expanden y fluyen al ser comprimidos permitiendo deformarse libremente pero al mismo tiempo recuperarse al ser liberado de la carga [60].

Estos resultados fueron favorables debido a que la matriz empleada (Ecoflex™ 00-50) para desarrollar el prototipo del *liner* presenta condiciones adecuadas de uso certificadas por sus fabricantes [102] y la concentración definida de AgNPs no fue significativa para cambiar las propiedades mecánicas de forma relevante.

Algunos autores indican que las propiedades mecánicas de los materiales para *liners* protésicos afectan de manera directa la funcionalidad de estos dispositivos, propiedades como coeficiente de fricción, resistencia a la compresión, a esfuerzos cortantes y a tracción impactan en la capacidad del *liner* de ajustarse al muñón, de causar lesiones en la piel, limitar el pistoneo y proteger prominencias óseas [58].

Las pruebas realizadas en el presente trabajo de grado, fueron pruebas en modo estático (tracción y compresión) brindan información preliminar sobre el material con que se fabricó el dispositivo, sin embargo, no son suficientes para determinar la aplicabilidad total que podría tener tanto el material como el dispositivo, por lo cual sería pertinente, complementar la caracterización con otras pruebas como las que se mencionaron antes, es decir, coeficiente de fricción, resistencia a esfuerzos cortantes y conductividad térmica.

Estas pruebas, permitirían conocer mejor el ajuste y deslizamiento que puede tener el dispositivo en el muñón, la abrasión que le puede generar a los tejidos [59], la propagación de esfuerzos cortantes, la capacidad de distribuir esfuerzos concentrados [60] [56], la habilidad del material del liner para transmitir calor hacia fuera del muñón, cabe recordar que una de las mayores quejas de los usuarios es el calor y la transpiración, adicionalmente permitiría identificar si el liner es más adecuado para climas fríos o cálidos [60], así que es importante en el caso de una evaluación más rigurosa incluir el estudio de estas propiedades adicionales.

CONCLUSIONES

La evaluación del efecto citotóxico de las nanopartículas de plata en solución en queratinocitos humanos permitió encontrar las concentraciones subletales ($< 5,38 \mu\text{g/mL}$) adecuadas para ser usadas sin causar daños a las células. También se encontró que concentraciones de $13,39 \mu\text{g/mL}$ ocasionan la mortalidad del 50 % de la población celular, así que el uso directo de estas AgNPs en solución no debe superar estas concentraciones ya que podría generar efectos como ruptura de membrana y disfunción mitocondrial lo que ocasiona la muerte celular.

La actividad de la enzima lactato deshidrogenasa se tomó como una medida de la viabilidad de las células expuestas a un material composite, de matriz polimérica (silicona Ecoflex™) reforzando con nanopartículas de plata, los resultados mostraron que las AgNPs al estar inmersas en la matriz polimérica reducen su potencial toxicidad, sin embargo, el aumento de concentración de AgNPs en el material *composite* y el tiempo de exposición tienden a aumentar el efecto citotóxico.

En relación a la evaluación genotóxica, según las microscopías, no se observaron niveles altos de daño en el ADN de las células, pero en análisis estadístico indica una diferencia significativa con los resultados del control negativo, tanto para las AgNPs en solución, como para algunas muestras del material con concentraciones de AgNPs. No se encontró diferencia significativa en el ADN de las células expuestas a sólo a la matriz (silicona sin AgNPs) y a las expuestas al material *composite* con sus diferentes concentraciones de AgNPs. En cuanto a los niveles de daño, el mayor porcentaje se encontró para las células sin daño, seguido de las células con daño bajo para todos los casos evaluados. Las células con daño bajo del ADN, se presentaron en mayor porcentaje para las expuestas a las AgNPs en solución que para el material *composite*.

Con la evaluación realizada de biocompatibilidad y estudios previos a este trabajo de grado de la actividad antimicrobiana se pudo elegir la concentración de $16,48 \mu\text{g/mL}$, como una concentración adecuada para la preparación del material *composite* para la fabricación del prototipo del *liner* protésico. Para la fabricación del mismo, se diseñó una estructura que permitió hacer el dispositivo con la forma deseada, a pesar de necesitar ajustes, los prototipos desarrollados son funcionales y sirven como punto de partida para investigaciones futuras. Las propiedades mecánicas evaluadas evidenciaron el material con alta capacidad de elongación y buena resistencia a la compresión y a la tracción lo que hace que sea un material útil para la fabricación de liners protésicos.

DIFICULTADES PRESENTADAS

A lo largo del trabajo de grado se presentaron dificultades a las cuales se les pudo dar solución, una de ellas es que la opacidad de la silicona no permitía hacer una observación de las células cultivadas en la misma con microscopio óptico así que se decidió realizar la prueba de tinción con eosina y hematoxilina y así se pudo observar que efectivamente las células se adherían al material *composite* y presentaban morfología propia de los queratinocitos.

Otra dificultad fue el hecho de que el protocolo usado para realizar ensayo cometa no se había trabajado para evaluar células cultivadas en un material sólido, así que tomó tiempo ajustar el protocolo para este tipo de ensayo, pero finalmente se logró realizar el procedimiento con resultados favorables para la aplicación deseada.

La fabricación de los moldes y estructura para el desarrollo del prototipo de *liner* protésico también fue un reto que tomó tiempo, la forma cónica es compleja de trabajar y poder ajustar un espesor homogéneo entre los moldes para lograr un dispositivo uniforme fue una de las mayores dificultades. Adicional a esto, una de las grandes dificultades para trabajar en el área de desarrollo de *liners* protésicos es que no se cuentan con equipos específicos para evaluación mecánica de este tipo de dispositivos protésicos ya que es un campo poco explorado en la ciudad y el país.

TRABAJOS FUTUROS

Agregar un recubrimiento a las nanopartículas de plata con el fin de mejorar la biocompatibilidad y dispersión.

Realizar ensayos que permitan verificar la liberación de iones de Plata o nanopartículas de plata al medio de cultivo al medio de cultivo durante las pruebas del material *composite*.

Realizar pruebas adicionales de biocompatibilidad tanto in vitro como in vivo que permitan completar el análisis biológico y tener una caracterización más amplia de los efectos del nuevo material.

Optimizar la estructura para la fabricación del *liner* protésico con el fin de mejorar la homogeneidad en el espesor del mismo y el acabado de la superficie.

Ajustar el protocolo de la preparación del material *composite* para evitar que su viscosidad aumente y con esto se reduzca el tiempo de trabajo con el material.

Realizar pruebas de simulación de cargas en la máquina de la EIA para someter el sistema a un comportamiento similar a las condiciones de marcha en un sujeto.

PRODUCTOS

Se enuncian a continuación los productos asociados al desarrollo del presente trabajo de grado:

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

Título: Optimization of a silver nanoparticle synthesis by chemical reduction and evaluation of its antimicrobial and toxic activity. | *Autores:* Catalina Quintero Quiroz, Natalia Acevedo Yepes, Jenniffer Zapata Giraldo, Julián Quintero, Diana Zárate Triviño, Vera Z. Pérez, Luz Elena Botero, Jorge Enrique Saldarriaga Escobar. | *Revista:* Biomedical Research. Revista Q1. Publicado.

Título: Synthesis and characterization of a silver nanoparticle- containing polymer composite with antimicrobial abilities for application in prosthetic and orthotic devices. | *Autores:* Catalina Quintero Quiroz, Luz Elena Botero, Diana Zárate Triviño, Natalia Acevedo Yepes, Jorge Enrique Saldarriaga Escobar, Vera Z. Pérez, Luis Javier Cruz Riaño. | *Revista:* Biomedical Research. Revista Q1. Publicado.

Artículo en desarrollo: Evaluación de la biocompatibilidad de material composite nanoestructurado para dispositivos protésicos. | *Autores:* Natalia Acevedo Yepes, Isabel Cristina Trujillo, Diana Zárate Triviño, Jorge Enrique Saldarriaga Escobar, Vera Z. Pérez.

PARTICIPACIÓN EN EVENTOS CIENTÍFICOS INTERNACIONALES

Evento: XLII Congreso de la Sociedad Ibérica de Biomecánica y Biomateriales | *Tema:* Compuestos poliméricos reforzados con tejidos para su aplicación en encajes rígidos para prótesis y órtesis externos | *Autores:* Catalina Quintero-Quiroz, Natalia Acevedo Yepes, Jorge Saldarriaga, Luis Javier Cruz Andrés Torres, Vera Z. Pérez | *Lugar y Fecha:* 15 Y 16 de noviembre de 2019 Madrid, España.

Evento: LatinXChem Twitter Conference 2020 | *Tema:* Evaluación citotóxica de nuevo material nanoestructurado blando para prótesis externa | *Autores:* Natalia Acevedo Yepes, Vera Z. Pérez, Isabel C. Ortiz | *Fecha:* 7 de septiembre de 2020

PROTOTIPOS

Prototipo: Liner protésico con actividad antimicrobiana. | *Autores:* Natalia Acevedo Yepes, Catalina Quintero Quiroz, Vera Z. Pérez, Jorge Enrique Saldarriaga Escobar Andrés Torres Velásquez. | *Fecha:* Junio a septiembre de 2019. | *Radicado:* 09-16947-03/20

Prototipo: Máquina para fabricación de liner protésico con actividad antimicrobiana. | *Autores:* Natalia Acevedo, Catalina Quintero Quiroz, Vera Z. Pérez, Andrés Torres, Jorge Saldarriaga. | *Fecha:* Enero a junio de 2019. | *Radicado:* 09-16948-03/20

PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS

Proyecto: NANOTECH: Desarrollo de un compuesto polimérico con capacidades microbicidas, mediante el uso de nano-partículas de plata, para su aplicación en órtesis y prótesis de miembro inferior | *Radicado:* 624B-06/16-18 | *Tipo de proyecto:* Investigación | *Investigadores:* Jorge Saldarriaga, Luis Javier Cruz, Vera Z. Pérez, Lina Hoyos, Luz Elena Botero, Catalina Quintero Quiroz, Jorge Isaac Jaramillo | *Financiación:* Interna | *Convocatoria:* Interna | *Participación de Escuelas:* Ingenierías – Ciencias de la Salud | *Grupos de investigación involucrados:* Grupo de investigaciones en Bioingeniería – Grupo de investigación sobre Nuevos Materiales | *Entidades involucradas:* UPB - EIA | *Fecha de inicio:* 18/07/2016/ *Fecha de finalización:* 18/07/2017. *Estado actual:* Paz y salvo

Proyecto: NanO&P: Desarrollo y evaluación de compuestos poliméricos livianos con alta resistencia mecánica y capacidades antimicrobianas para su aplicación en órtesis y prótesis externas de miembro inferior | *Radicado:* 765B-05/17-18 | *Tipo de proyecto:* Investigación | *Investigadores:* Jorge Saldarriaga, Luis Javier Cruz Riaño, Vera Zasúlich Pérez Ariza, Maria Del Pilar Rivera Vega, Lina Marcela Hoyos, Juan Camilo Suarez, Isabel Ortiz Trujillo, Luz Elena Botero Palacio, Andrés Torres Velásquez, Carlos Pelaéz | *Financiación:* Externa | *Convocatoria:* Externa | *Participación de Escuelas:* Ingenierías – Ciencias de la Salud | *Grupos de investigación involucrados:* Grupo de investigaciones en Bioingeniería – Grupo de investigación sobre Nuevos Materiales | *Entidades involucradas:* UPB - Universidad EIA- CENOP | *Fecha de inicio:* 24/5/2017/ *Fecha de finalización:* 30/09/2020. *Estado actual:* Ejecución.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Organización Mundial de la Salud; Banco Mundial, “Informe mundial sobre la discapacidad”, OMS, 2011. [En línea]. Disponible en: http://www.who.int/disabilities/world_report/2011/summary_es.pdf?ua=1. [Consultado: 25-nov-2019].
- [2] K. Ghoseiri y M. R. Safari, “Prevalence of heat and perspiration discomfort inside prostheses: Literature review”, *Journal of Rehabilitation Research and Development*, vol. 51, núm. 6, pp. 855–868, 2014.
- [3] DANE, “Discapacidad”, 2010. [En línea]. Disponible en: <http://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/salud/discapacidad?phpMyAdmin=3om27vamm65hhkhrtdc8rrn2g4>. [Consultado: 25-nov-2019].
- [4] M. L. Ocampo, L. M. Henao, y L. Vásquez, “Amputación de miembro inferior: Cambios funcionales, inmovilización y actividad física”. Universidad del Rosario, Bogotá, p. 26, 2010.
- [5] Dirección contra minas, “Víctimas de Minas Antipersonal”, 2019. [En línea]. Disponible en: <http://www.accioncontraminas.gov.co/estadisticas/Paginas/victimas-minas-antipersonal.aspx>. [Consultado: 05-abr-2019].
- [6] D. P. Murphy, *Fundamentals of Amputation Care and Prosthetics*, First edit. New York: demosMEDICAL, 2013.
- [7] A. Gottlieb, W. Myhill, y P. Blanck, “Employment of people with disabilities”, *International Encyclopedia of Rehabilitation*. Center for International Rehabilitation Research Information and Exchange, New York, pp. 1–9, 2010.
- [8] Portafolio, “Personas con discapacidad: 64% no tiene ingresos”, *Portafolio*, Bogotá, p. 1, 11-oct-2018.
- [9] H. E. J. Meulenbelt, J. H. B. Geertzen, M. F. Jonkman, y P. U. Dijkstra, “Skin problems of the stump in lower limb amputees: 1. A clinical study”, *Acta Dermato-Venereologica*, vol. 91, núm. 2, pp. 173–177, 2011.
- [10] G. K. Klute, B. C. Glaister, y J. S. Berge, “Prosthetic liners for lower limb amputees: A review of the literature”, *Prosthetics and Orthotics International*, vol. 34, núm. 2, pp. 146–153, 2010.
- [11] M. M. Wernke, R. M. Schroeder, C. T. Kelley, J. A. Denune, y J. M. Colvin, “SmartTemp Prosthetic Liner Significantly Reduces Residual Limb

- Temperature and Perspiration”, *Journal of Prosthetics and Orthotics*, vol. 27, núm. 4, pp. 134–139, 2015.
- [12] R. Vajtai, *Springer Handbook of Nanomaterials*, 1a ed. New York: Springer, 2013.
- [13] C. A. Dos Santos *et al.*, “Silver nanoparticles: Therapeutical uses, toxicity, and safety issues”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 103, núm. 7, pp. 1931–1944, 2014.
- [14] R. Becker y J. Spadaro, “Treatment of orthopaedic infections with electrically generated silver ions. A preliminary report.”, *The Journal of bone and joint surgery*, vol. 60-A, núm. 7, pp. 871–881, 1978.
- [15] A. B. G. Lansdown, “Silver I: Its antibacterial properties and mechanism of action.”, *Journal of Wound Care*, vol. 11, núm. 4, pp. 125–130, 2002.
- [16] E. I. Alarcon y M. Griffith, *Silver Nanoparticle Applications*, 1a ed. Nueva York: Springer, 2015.
- [17] F. Pineda, F. Bottausci, B. Icard, L. Malaquin, y Y. Fouillet, “Using electrofluidic devices as hyper-elastic strain sensors: Experimental and theoretical analysis”, *Microelectronic Engineering*, vol. 144, pp. 27–31, 2015.
- [18] M. Amjadi, Y. J. Yoon, y I. Park, “Ultra-stretchable and skin-mountable strain sensors using carbon nanotubes-Ecoflex nanocomposites”, *Nanotechnology*, vol. 26, núm. 37, pp. 1–11, 2015.
- [19] H. K. Yap, J. H. Lim, F. Nasrallah, J. Cho Hong Goh, y C.-H. Yeow, “Characterisation and evaluation of soft elastomeric actuators for hand assistive and rehabilitation applications”, *Journal of Medical Engineering and Technology*, vol. 40, núm. 4, pp. 199–209, 2016.
- [20] H. Gorki, N. C. Patel, C. Liewald, S. Wildhirt, V. A. Subramanian, y A. Liebold, “A Step Toward Nonrobotic Total Endoscopic Coronary Bypass Grafting”, *Innovations*, vol. 7, núm. 5, pp. 359–367, 2012.
- [21] N. Feng, Q. Shi, H. Wang, J. Gong, C. Liu, y Z. Lu, “A soft robotic hand : design, analysis, sEMG control, and experiment”, *International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, vol. 97, pp. 319–333, 2018.
- [22] A. D. Russell, F. R. C. Path, F. R. Pharm.S., y W. B. Hugo, “Antimicrobial Activity and Action of Silver”, *Progress in medicinal chemistry*, vol. 31, pp. 351–370, 1994.
- [23] D. E. Marx y D. J. Barillo, “Silver in medicine: The basic science”, *Burns*, vol. 40, núm. S, pp. S9–S18, 2014.

- [24] E. McGillicuddy *et al.*, “Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology”, *Science of the Total Environment*, vol. 575, pp. 231–246, 2016.
- [25] W. Kühni y W. Von Holst, *Colloidal Silver: The natural antibiotic*, 1a ed. United States: Healing Arts Press, 2016.
- [26] S. J. L. Billinge, “Nanoscale structural order from the atomic pair distribution function (PDF): There’s plenty of room in the middle”, *Journal of Solid State Chemistry*, vol. 181, pp. 1695– 1700, 2008.
- [27] V. K. Varadan, S. Pillai, D. Mukherji, M. Dwivedi, y L. Chen, *Nanoscience and Nanotechnology in Engineering*, 1a ed. Singapur: World Scientific, 2010.
- [28] S. Sepeur, *Nanotechnology: Technical Basics and Applications*, 1a ed. Hannover: Vincentz Network, 2008.
- [29] S. Kaur y B. Singhal, “When nano meets stem: The impact of nanotechnology in stem cell biology”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 113, núm. 1, pp. 1–4, 2012.
- [30] M. A. Wassall, M. Santin, C. Isalberti, M. Cannas, y S. P. Denyer, “Adhesion of bacteria to stainless steel and silver-coated orthopedic external fixation pins”, *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 36, núm. 3, pp. 325–330, 1997.
- [31] Y. Li, P. Leung, L. Yao, Q. W. Song, y E. Newton, “Antimicrobial effect of surgical masks coated with nanoparticles”, *Journal of Hospital Infection*, vol. 62, núm. 1, pp. 58–63, 2006.
- [32] D. Pohle, C. Damm, J. Neuhof, A. Rösch, y H. Münstedt, “Antimicrobial properties of orthopaedic textiles after in-situ deposition of silver nanoparticles”, *Polymers & Polymer Composites*, vol. 15, núm. 5, pp. 357–363, 2007.
- [33] D. R. Monteiro, L. F. Gorup, A. S. Takamiya, A. C. Ruvollo-Filho, E. Rodrigues De Camargo, y D. B. Barros Barbosa, “The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver”, *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 34, núm. 2, pp. 103–110, 2009.
- [34] N. Durán, M. Durán, M. B. de Jesus, A. B. Seabra, W. J. Fávaro, y G. Nakazato, “Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity”, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, vol. 12, núm. 3, pp. 789–799, 2016.
- [35] W. De Windt, M. Van Wambeke, W. Verstraete, y N. Boon, “Silver nanoparticles with specific surface area and method for producing them”, US

8,454,986 B2, 04-jun-2013.

- [36] J. W. Yang, J. Choi, S. G. Lee, y D. S. Kim, “Antibacterial properties of artificial eyes containing nano-sized particle silver.”, *Orbit (Amsterdam, Netherlands)*, vol. 30, núm. 2, pp. 77–81, 2011.
- [37] F. H. Furkert, J. H. Sörensen, J. Arnoldi, B. Robioneck, y H. Steckel, “Antimicrobial efficacy of surface-coated external fixation pins”, *Current Microbiology*, vol. 62, núm. 6, pp. 1743–1751, 2011.
- [38] L. Zhao *et al.*, “Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles”, *Biomaterials*, vol. 32, núm. 24, pp. 5706–5716, 2011.
- [39] Z. Foltynowicz, D. Gwiazdowska, D. Rodewald, A. Nowaczyk, y M. Filipiak, “Antimicrobial properties of socks protected with silver nanoparticles”, *Fibres and Textiles in Eastern Europe*, vol. 21, núm. 5, pp. 91–96, 2013.
- [40] Z. D. Meran, “The Use of Silver Nanoparticles as an Antifungal Coating on Silicone Facial Prosthesis”, University of Plymouth, Plymouth, Inglaterra, 2013.
- [41] H. Qin *et al.*, “In vitro and in vivo anti-biofilm effects of silver nanoparticles immobilized on titanium”, *Biomaterials*, vol. 35, núm. 33, pp. 9114–9125, 2014.
- [42] M. A. Massa *et al.*, “Synthesis of new antibacterial composite coating for titanium based on highly ordered nanoporous silica and silver nanoparticles”, *Materials Science and Engineering C*, vol. 45, pp. 146–153, 2014.
- [43] J. L. Velázquez-Velázquez *et al.*, “Anti-biofilm and cytotoxicity activity of impregnated dressings with silver nanoparticles”, *Materials Science and Engineering C*, vol. 49, pp. 604–611, 2015.
- [44] S. K. Mishra, J. M. F. Ferreira, y S. Kannan, “Mechanically stable antimicrobial chitosan-PVA-silver nanocomposite coatings deposited on titanium implants”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 121, pp. 37–48, 2015.
- [45] J. Liao, W. Fei, Guo J., y P. Li, “Preparation and anti-bacterial tests of silver-modified titanium surface”, *Journal of stomatology*, vol. 32, núm. 3, p. 303, 2014.
- [46] S. Saidin, P. Chevallier, M. R. Abdul Kadir, H. Hermawan, y D. Mantovani, “Polydopamine as an intermediate layer for silver and hydroxyapatite immobilisation on metallic biomaterials surface”, *Materials Science and Engineering C*, vol. 33, núm. 8, pp. 4715–4724, 2013.
- [47] L. Zhao y M. A. Ashraf, “Influence of Silver-hydroxyapatite Nanocomposite Coating on Biofilm Formation of Joint Prosthesis and its Mechanism.”, *The*

West Indian medical journal, vol. 64, núm. 5, pp. 506–513, 2015.

- [48] T. R. Correia *et al.*, “3D Printed scaffolds with bactericidal activity aimed for bone tissue regeneration”, *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 93, pp. 1432–1445, 2016.
- [49] A. Haider *et al.*, “A novel use of cellulose based filter paper containing silver nanoparticles for its potential application as wound dressing agent”, *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 108, pp. 455–461, 2018.
- [50] M. A. Pérez-Díaz *et al.*, “Silver-pig skin nanocomposites and mesenchymal stem cells: Suitable antibiofilm cellular dressings for wound healing”, *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 16, núm. 2, pp. 1–16, 2018.
- [51] S. A. Brennan, C. Ní Fhoghlú, B. M. Devitt, F. J. O’Mahony, D. Brabazon, y A. Walsh, “Silver nanoparticles and their orthopaedic applications”, *The Bone & Joint Journal*, vol. 97-B, núm. 5, pp. 582–589, 2015.
- [52] E. Marchetti, O. May, J. Girard, H.-F. Hildebrand, H. Migaud, y G. Pasquier, “Biomateriales en cirugía ortopédica”, *EMC - Técnicas Quirúrgicas - Ortopedia y Traumatología*, vol. 2, núm. 3, pp. 1–24, 2010.
- [53] A. Torres Velásquez, “Desarrollo y evaluación de composites poliméricos para su aplicación en prótesis y órtesis de miembro inferior”, Tesis de maestría, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia, 2009.
- [54] B. Turhan Bal, H. Yilmaz, C. Aydin, S. Karakoca, y Ş. Yilmaz, “In vitro cytotoxicity of maxillofacial silicone elastomers: Effect of accelerated aging”, *Journal of Biomedical Materials Research - Part B: Applied Biomaterials*, vol. 89, núm. 1, pp. 122–126, 2009.
- [55] R. Emrich y K. Slater, “Comparative analysis of below-knee prosthetic socket liner materials”, *Journal of Medical Engineering and Technology*, vol. 22, núm. 2, pp. 94–98, 1998.
- [56] J. E. Sanders, B. S. Nicholson, S. G. Zachariah, D. V Cassisi, A. Karchin, y J. R. Fergason, “Testing of elastomeric liners used in limb prosthetics: classification of 15 products by mechanical performance.”, *Journal of rehabilitation research and development*, vol. 41, núm. 2, pp. 175–186, 2004.
- [57] A. Cavaco, A. Ramalho, S. Pais, y L. Durães, “Mechanical and structural characterization of tibial prosthetic interfaces before and after aging under simulated service conditions”, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 43, pp. 78–90, 2015.
- [58] B. J. Hafner, J. C. Cagle, K. J. Allyn, y J. E. Sanders, “Elastomeric liners for people with transtibial amputation: Survey of prosthetists’ clinical practices”,

Prosthetics and Orthotics International, vol. 41, núm. 2, pp. 149–156, 2016.

- [59] J. C. Cagle *et al.*, “A finite element model to assess transtibial prosthetic sockets with elastomeric liners”, *Medical and Biological Engineering and Computing*, vol. 56, pp. 1227–1240, 2017.
- [60] J. C. Cagle, P. G. Reinhall, B. J. Hafner, y J. E. Sanders, “Development of Standardized Material Testing Protocols for Prosthetic Liners”, *Journal of Biomechanical Engineering*, vol. 139, núm. 4, pp. 045001.1-045001.12, 2017.
- [61] J. C. Cagle, B. J. Hafner, N. Taflin, y J. E. Sanders, “Characterization of prosthetic liner products for people with transtibial amputation”, *Journal of Prosthetics and Orthotics*, vol. 30, núm. 4, pp. 187–199, 2018.
- [62] D. Y. Choi *et al.*, “Highly stretchable, hysteresis-free ionic liquid-based strain sensor for precise human motion monitoring”, *ACS Applied Materials and Interfaces*, vol. 9, núm. 2, pp. 1–45, 2017.
- [63] K. Elgeneidy, N. Lohse, y M. Jackson, “Data-Driven Bending Angle Prediction of Soft Pneumatic Actuators with Embedded Flex Sensors”, *IFAC (International Federation of Automatic Control)*, vol. 49, núm. 21, pp. 513–520, 2016.
- [64] T.-I. Lee, M. S. Kim, y T.-S. Kim, “Contact-free thermal expansion measurement of very soft elastomers using digital image correlation”, *Polymer Testing*, vol. 51, pp. 181–189, 2016.
- [65] S. Li *et al.*, “All-Elastomer-Based Triboelectric Nanogenerator as a Keyboard Cover to Harvest Typing Energy”, *ACS Nano*, vol. 10, núm. 8, pp. 7973–7981, 2016.
- [66] D. Sritharan y E. Smela, “Fabrication of a miniature paper-based electroosmotic actuator”, *Polymers*, vol. 8, núm. 11, pp. 1–23, 2016.
- [67] C. M. Buffinton, K. J. Tong, R. A. Blaho, E. M. Buffinton, y D. M. Ebenstein, “Comparison of mechanical testing methods for biomaterials: Pipette aspiration, nanoindentation, and macroscale testing”, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 51, pp. 367–379, 2015.
- [68] K. Dong *et al.*, “A Highly Stretchable and Washable All-Yarn-Based Self-Charging Knitting Power Textile Composed of Fiber Triboelectric Nanogenerators and Supercapacitors”, *ACS Nano*, vol. 11, núm. 9, pp. 9490–9499, 2017.
- [69] N.-S. Jang, K.-H. Kim, S.-H. Ha, S.-H. Jung, H. M. Lee, y J.-M. Kim, “Simple Approach to High-Performance Stretchable Heaters Based on Kirigami Patterning of Conductive Paper for Wearable Thermotherapy Applications”, *ACS Applied Materials and Interfaces*, vol. 9, núm. 23, pp. 1–30, 2017.

- [70] B. Innocenti, J.-C. Larrieu, P. Lambert, y S. Pianigiani, “Automatic characterization of soft tissues material properties during mechanical tests”, *Muscles, ligaments and tendons Journal*, vol. 7, núm. 4, pp. 529–537, 2017.
- [71] S. Reza, H. Rezaei, M. Oyatsi, A. O’Brien, M. Hoorfar, y H. Najjaran, “Low-cost ultra-stretchable strain sensors for monitoring human motion and bio-signals”, *Sensors & Actuators A*, vol. 271, pp. 182–191, 2018.
- [72] H. Wang *et al.*, “Robust and high-performance soft inductive tactile sensors based on the Eddy-current effect”, *Sensors and Actuators A*, vol. 271, pp. 44–52, 2018.
- [73] C. Parent, F. Boizot, M. Cubizolles, N. Verplanck, J. L. Achard, y Y. Fouillet, “Quantitative biological assays with on-chip calibration using versatile architecture and collapsible chambers”, *Sensors and Actuators B*, vol. 261, pp. 106–114, 2018.
- [74] C. Quintero Q., “Compuesto polimérico con capacidades antimicrobianas usando nanopartículas de plata para la interfaz en órtesis y prótesis externas de miembro inferior”, Tesis de maestría, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia, 2018.
- [75] International Organization for Standardization, “ISO 8549-1:1989”. ISO, p. 6, 1989.
- [76] G. Chitragari, D. B. Mahler, B. J. Sumpio, P. A. Blume, y B. E. Sumpio, “Prosthetic Options Available for the Diabetic Lower Limb Amputee”, *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*, vol. 31, núm. 1, pp. 173–185, 2014.
- [77] J. Park y R. S. Lakes, *Biomaterials: An introduction: Third edition*, 3a ed. United States: Springer, 2007.
- [78] D. R. Askeland, P. P. Fulay, y W. J. Wright, *Ciencia e Ingeniería de Materiales*, 6a ed. USA: CENGAGE learning, 2011.
- [79] C. Serrano, “Biomateriales: Biología y Química en el diseño de tejidos artificiales”, *Cuadernos de divulgación científica “Rincón del profesor de ciencias 2009-2011”*. SEBBM, Madrid, pp. 39–40, 2011.
- [80] D. L. Wise, D. J. Trantolo, D. E. Altobelli, M. J. Yaszemski, y J. D. Gresser, *Human Biomaterials Applications*. New York: Springer Science+Business Media LLC, 1996.
- [81] F. C. Brunnicardi *et al.*, *Schwartz’s Principles of Surgery*, 10a ed. United States of America: McGraw-Hill, 2015.
- [82] H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, C. Kaiser, M. Krieger, y M. Scott, *Biología celular y molecular*, 7a ed. Buenos aires: Editorial Médica Panamericana,

2004.

- [83] A. M. de la T. Miján de la Torre, *Técnicas y métodos de investigación en nutrición humana*, 1a ed. Barcelona: Editorial Glosa, 2002.
- [84] E. Gallorí, *Atlas ilustrado de genética*, 1a ed. Madrid: Susaeta Ediciones S.A., 2012.
- [85] D. F. Arencibia Arrebola, L. A. Rosario Fernández, y D. Curveco Sánchez, “Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad”, *Retel*, vol. 1, pp. 40–52, 2003.
- [86] X. Abrevaya, “¿Que és la genotoxicidad?”, *IntraMed*, 2008. [En línea]. Disponible en: <https://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoid=47111>. [Consultado: 04-nov-2019].
- [87] G. Fotakis y J. A. Timbrell, “In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride”, *Toxicology Letters*, vol. 160, núm. 2, pp. 171–177, 2006.
- [88] M. Zalacain, L. Sierrasesúmaga, y A. Patiño, “The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents”, *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, vol. 28, núm. 2, pp. 227–236, 2005.
- [89] C. Webber, “Prosthetic Sockets: Assessment of Thermal Conductivity”, Tesis de maestría, University of Akron, Akron, Estados Unidos, 2014.
- [90] R. E. Nuñez-Anita, L. S. Acosta-Torres, J. Vilar-Pineda, J. C. Martínez-Espinosa, J. De la fuente-Hernández, y V. M. Castaño, “Toxicology of antimicrobial nanoparticles for prosthetic devices”, *International Journal of Nanomedicine*, vol. 9, núm. 1, pp. 3999–4006, 2014.
- [91] S. H. Doak, B. Manshian, G. J. S. Jenkins, y N. Singh, “In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines”, *Mutation Research /Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 745, núm. 1–2, pp. 104–111, 2012.
- [92] M. Ahamed, M. S. AlSalhi, y M. K. J. Siddiqui, “Silver nanoparticle applications and human health”, *Clinica Chimica Acta*, vol. 411, núm. 23–24, pp. 1841–1848, 2010.
- [93] I. Khan, K. Saeed, y I. Khan, “Nanoparticles: Properties, applications and toxicities”, *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 12, núm. 7, pp. 908–931, 2017.
- [94] I. Colombo *et al.*, “HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes”,

Mediators of Inflammation, pp. 1–12, 2017.

- [95] A. Blázquez Castro, “Modulación de la proliferación de queratinocitos humanos por especies reactivas de oxígeno generadas mediante tratamiento fotodinámico”, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España, 2010.
- [96] D. Li, X. Wu, X. Yu, Q. Huang, y L. Tao, “Synergistic effect of non-ionic surfactants Tween 80 and PEG6000 on cytotoxicity of insecticides”, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 39, núm. 2, pp. 677–682, 2015.
- [97] V. Steiner, K. Öhlinger, C. Corzo, S. Salar-Behzadi, y E. Fröhlich, “Cytotoxicity screening of emulsifiers for pulmonary application of lipid nanoparticles”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 136, núm. august, p. 104968, 2019.
- [98] B. Arechabala, C. Coiffard, P. Rivalland, L. J. M. Coiffard, y Y. De Roeck-Holtzhauer, “Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release”, *Journal of Applied Toxicology*, vol. 19, núm. 3, pp. 163–165, 1999.
- [99] A. Peropadre López, “Estudio in vitro de las respuestas celulares asociadas con la exposición a contaminantes emergentes”, Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España, 2014.
- [100] PanReac AppliChem, “Tinción Hematoxilina-Eosina”. ITW Reagents, Barcelona, pp. 1–4, 2017.
- [101] C. Quintero-Quiroz *et al.*, “Synthesis and characterization of a silver nanoparticle-containing polymer composite with antimicrobial abilities for application in prosthetic and orthotic devices”, *Biomaterials Research*, vol. 24, núm. 1, pp. 1–17, 2020.
- [102] Smooth-On, “Ecoflex™ 00-50”, www.smooth-on.com, 2020. [En línea]. Disponible en: <https://www.smooth-on.com/products/ecoflex-00-50/>. [Consultado: 13-jul-2020].
- [103] T. Mosmann, “Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay”, *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, núm. 1–2, pp. 55–63, 1983.
- [104] A. C. M.-T. Martínez-Torres, “Actividad citotóxica In vitro frente a células tumorales”, en *Investigación en plantas de importancia médica*, 1a ed., C. Rivas-Morales, M. Oranday-Cardenas, y M. Verde-Star, Eds. Monterrey: OmniaScience, 2016, pp. 269–312.
- [105] W. R. Rolim *et al.*, “Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver

- nanoparticles: Characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity”, *Applied Surface Science*, vol. 463, pp. 66–74, 2019.
- [106] M. Akter *et al.*, “A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives”, *Journal of Advanced Research*, vol. 9, pp. 1–16, 2018.
- [107] Y. K. Tak, S. Pal, P. K. Naoghare, S. Rangasamy, y J. M. Song, “Shape-Dependent Skin Penetration of Silver Nanoparticles: Does It Really Matter?”, *Scientific Reports*, vol. 5, pp. 1–11, 2015.
- [108] M. Perde-Schrepler *et al.*, “Size-Dependent Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Cochlear Cells in Vitro”, *Journal of Nanomaterials*, núm. ID 6090259, pp. 1–13, 2019.
- [109] P. AshaRani, G. Kah Mun, M. Prakash, y S. Valiyaveetil, “Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells”, *ACS nano*, vol. 3, núm. 2, pp. 279–290, 2009.
- [110] J. Carrola *et al.*, “Metabolomics of silver nanoparticles toxicity in HaCaT cells: structure–activity relationships and role of ionic silver and oxidative stress”, *Nanotoxicology*, vol. 10, núm. 8, pp. 1105–1117, 2016.
- [111] B. Senthil, T. Devasena, B. Prakash, y A. Rajasekar, “Non-cytotoxic effect of green synthesized silver nanoparticles and its antibacterial activity”, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 177, pp. 1–7, 2017.
- [112] J. Couceiro, “Bioadhesividad celular sobre superficies de armazones o matrices tisulares”, Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España, 2008.
- [113] Z. Meran, A. Besinis, T. De Peralta, y R. D. Handy, “Antifungal properties and biocompatibility of silver nanoparticle coatings on silicone maxillofacial prostheses in vitro”, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 106B, pp. 1038–1051, 2017.
- [114] R. Mourad, F. Helaly, O. Darwesh, y S. El Sawy, “Antimicrobial and physicochemical natures of silver nanoparticles incorporated into silicone-hydrogel films”, *Contact Lens and Anterior Eye*, vol. 42, núm. 3, pp. 325–333, 2019.
- [115] B. C. Dash y H. C. Hsia, “Composite scaffolds for skin repair and regeneration”, en *Biomaterials for Skin Repair and Regeneration*, 1a ed., E. García-Gareta, Ed. United States: Elsevier Ltd, 2019, pp. 193–223, 2019.
- [116] R. George, S. Merten, T. T. Wang, P. Kennedy, y P. Maitz, “In vivo analysis of dermal and systemic absorption of silver nanoparticles through healthy human skin”, *Australasian Journal of Dermatology*, vol. 55, núm. 3, pp. 185–

190, 2014.

- [117] I. C. Celerino de Moraes Porto, "Polymer biocompatibility", en *Polymerization*, 1a ed., A. De Souza Gomes, Ed. Maceió: InTech, pp. 47–62, 2012.
- [118] N. P. Singh, M. T. McCoy, R. R. Tice, y E. L. Schneider, "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells", *Experimental Cell Research*, vol. 175, núm. 1, pp. 184–191, 1988.
- [119] A. Rodríguez-Rey, E. Noris-García, y M. T. Fundora Torres, "Principios y relevancia del ensayo cometa", *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, vol. 35, núm. 2, pp. 184–194, 2016.
- [120] V. Bastos, I. F. Duarte, C. Santos, y H. Oliveira, "Genotoxicity of citrate-coated silver nanoparticles to human keratinocytes assessed by the comet assay and cytokinesis blocked micronucleus assay", *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 24, pp. 5039–5048, 2017.
- [121] P. Orłowski *et al.*, "Toxicity of tannic acid-modified silver nanoparticles in keratinocytes: Potential for immunomodulatory applications", *Toxicology in Vitro*, vol. 35, pp. 43–54, 2016.
- [122] W. Lu *et al.*, "Effect of surface coating on the toxicity of silver nanomaterials on human skin keratinocytes", *Chemical Physics Letters*, vol. 487, pp. 92–96, 2010.
- [123] J. E. Sanders *et al.*, "Preliminary evaluation of novel bladder-liner for facilitating residual-limb fluid volume recovery without doffing", *Journal of Rehabilitation Research and Development*, vol. 53, núm. 6, pp. 1107–1120, 2016.
- [124] ASTM International, "ASTM D412 - Standard Test Methods for Vulcanized Rubber and Thermoplastic Elastomers - Tension", *Annual Book of ASTM Standards*. pp. 1–14, 2015.
- [125] D. Re *et al.*, "Mechanical Properties of Elastomeric Impression Materials: An in Vitro Comparison", *International Journal of Dentistry*, vol. 2015, 2015.
- [126] ASTM International, "ASTM D395 - Standard Test Methods for Rubber Property — Compression Set", *Annual Book of ASTM Standards*. pp. 1–8, 2016.
- [127] J. Z. Laferrier y R. Gailey, "Advances in Lower-limb Prosthetic Technology", *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, vol. 21, núm. 1, pp. 87–110, 2010.
- [128] S. M. Zayed, A. M. Alshimy, y A. E. Fahmy, "Effect of Surface Treated Silicon Dioxide Nanoparticles on Some Mechanical Properties of Maxillofacial

Silicone Elastomer”, *International Journal of Biomaterials*, vol. 5, núm. ID 750398, pp. 14–15, 2014.

- [129] A. S. Nobrega, A. M. Andreotti, y A. Moreno, “Influence of adding nanoparticles on the hardness , tear strength , and permanent deformation of facial silicone subjected to accelerated aging”, *the journal of prosthetic dentistry*, vol. 116, núm. 4, pp. 623–629, 2015.
- [130] J. Kelley y C. Colvin, “Fabric covered polimeric prosthetic liner”, US9265629B2, 23-feb-2016.