

Universidad de Zaragoza
Facultad de Ciencias
Departamento de Ingeniería Química, Instituto de Nanociencia de
Aragón

Desarrollo de recubrimientos antimicrobianos sobre dispositivos médicos

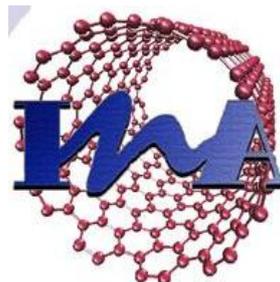
Memoria para optar al título de graduada en Biotecnología
de

Alejandra Tamayo Durán



Curso 2013-2014

Director Manuel Arruebo Gordo



ÍNDICE

1. Resumen

2. Antecedentes

- 2.1. Infección de dispositivos intravasculares
- 2.2. Reservorios de acceso venoso de larga duración
- 2.3. Quitosano
 - 2.3.1. Obtención de la quitina y el quitosano
 - 2.3.2. Características de la quitina y el quitosano
 - 2.3.3. Propiedades físico-químicas del quitosano
 - 2.3.4. Propiedades funcionales del quitosano
 - 2.3.5. Aplicaciones del quitosano

3. Objetivo y planteamiento

4. Materiales y métodos

- 4.1. Impresión en 3D de un prototipo de Reservorio de Acceso Venoso
- 4.2. Síntesis de películas de quitosano
- 4.3. Recubrimiento de los reservorios mediante Dip-coating
- 4.4. Estudio de la adhesión del quitosano sobre el reservorio
 - 4.4.1. Ganancia de peso
 - 4.4.2. FTIR: Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier
 - 4.4.3. XPS: Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X
 - 4.4.4. Microscopía electrónica de barrido
- 4.5. Recubrimiento de los reservorios mediante Dip-coating con quitosano y un cromóforo
- 4.6. Cinética de liberación del cromóforo
- 4.7. Recubrimiento de los reservorios mediante Dip-coating con quitosano y un antibiótico
- 4.8. Ensayo biológico

5. Resultados y discusión

- 5.1. Síntesis de películas de quitosano
- 5.2. Recubrimiento de los reservorios mediante Dip-coating y estudio de la adhesión del quitosano
 - 5.2.1. Ganancia de peso
 - 5.2.2. FTIR
 - 5.2.3. XPS
 - 5.2.4. SEM
- 5.3. Cinética de liberación del cromóforo
- 5.4. Ensayo biológico

6. Conclusiones

7. Bibliografía

8. Anexo A

9. Anexo B

1. RESUMEN

Se conocen numerosos casos en los que una amplia variedad de dispositivos médicos como catéteres, stents, prótesis, reservorios de acceso venoso, etc, se infectan tras su implantación en el cuerpo del paciente. Esto se debe a que durante este proceso, los microorganismos que habitan de forma habitual en el interior del cuerpo del paciente o en su epidermis o en la del personal médico sin las debidas medidas de prevención o que proceden de otras fuentes como material quirúrgico y equipos o líquidos de infusión contaminados, colonizan el tejido interno alrededor del dispositivo. Esta colonización puede provocar una infección localizada que en muchas ocasiones deriva en problemas más graves como bacteriemia en la que la infección se transloca al torrente sanguíneo, generando así complicaciones más severas que en la mayoría de los casos conllevan a la retirada del dispositivo médico infectado y a la reimplantación de un nuevo dispositivo con el consiguiente perjuicio para el paciente tras el sometimiento a una nueva cirugía y el consecuente elevado coste terapéutico.

Como posible solución a este extendido problema, se plantea el desarrollo de una película polimérica que recubra el dispositivo en cuestión y que presente la capacidad de almacenar un antibiótico que será liberado localmente tras la implantación. De esta manera, junto con el tratamiento vía oral que se administra al paciente, se conseguiría reducir o evitar el riesgo de infección del dispositivo y se conseguirá una liberación local del antimicrobiano deseado.

Abstract

It is known that there are many cases in which a wide variety of medical devices such as catheters, stents, prosthesis, central venous access devices, etc. get infected after their implantation into the patient's body. This is caused because during surgery, the microorganisms that inhabit regularly inside the patient's body or on the epidermis of the own patient or the medical staff performing the surgery colonize the implanted device. Other potential sources of contamination are the use of non sterile surgical material, equipment or intravenous solutions. This colonization might cause a located infection that in many times could derive in a more serious problem like bacteraemia in which the infection spreads through the bloodstream leading in many cases to life threatening scenarios. After an implant is infected the current protocol is the removal of the infected medical device and the re-implantation of a new one, with the subsequent detriment of the patient's quality of life after undergoing through a new surgery and the high therapeutic cost associated.

As a possible solution to this extended problem is the development of a polymeric film that covers the mentioned device being able to store an antibiotic that would be released locally after implantation. In this way, altogether with the treatment that is administrated to the patient after and during surgery, this drug-eluting coating on the medical device will enable to reduce or avoid the risk of infection and also the side effects characteristic of the systemic administration of the drug will be reduced thanks to a local release of the desired antimicrobial at the target site.

2. ANTECEDENTES

Cada año, millones de pacientes en todo el mundo contraen infecciones durante la asistencia médica que reciben complicándose así su tratamiento y atención.

Estas infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria también se denominan infecciones nosocomiales y constituyen un problema importante en la seguridad del paciente durante su ingreso hospitalario. Según datos aportados por la Organización Mundial de la Salud, más de 1,4 millones de personas en el mundo contraen infecciones en el hospital [1].

2.1. Infección de dispositivos intravasculares

Hoy en día, en los hospitales de todo el mundo la utilización de dispositivos intravasculares es imprescindible en la práctica clínica habitual. Alrededor de 150 millones de estos dispositivos se implantan cada año en pacientes de hospitales norteamericanos para una gran variedad de usos [2]. Sin embargo, uno de los principales problemas asociados a esta práctica es su infección, ya que constituye la principal causa de bacteriemia nosocomial y aunque la mortalidad asociada suele ser baja, de menos del 5%, llevan consigo una elevada morbilidad y coste económico [3].

Son muchos los tipos de infecciones asociadas a los dispositivos de acceso venoso pero de entre todas las complicaciones que pueden surgir, la más importante es la bacteriemia o la fungemia [4]. De manera general, los principales agentes implicados en estas infecciones son *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*, seguidos de otros microorganismos como *Candida* y otros hongos, enterococos, estreptococos, diferentes especies de *Bacillus* y algunas micobacterias [4-8].

Los patógenos relacionados con dichas infecciones pueden proceder de diferentes fuentes tales como, la flora cutánea del paciente o del personal que lo atiende y manipula los dispositivos y el material médico sin las debidas medidas de prevención, de líquidos de infusión y equipos contaminados o por diseminación hematógena derivada de una infección localizada en algún lugar alejado del cuerpo del paciente [4, 9].

En muchas ocasiones, se consigue frenar la infección mediante la administración de antibióticos. Sin embargo, en otros casos, estos tratamientos no son efectivos contra la infección, de manera que se debe proceder a la retirada del dispositivo. Para evitar llegar hasta este punto, se estudia la forma de prevenir o reducir en mayor medida el riesgo asociado, como por ejemplo: utilizar medidas estrictas de asepsia [10], uso de antibióticos y desinfectantes tópicos administrados localmente, tratamiento mediante sellado antibiótico [11] o revestir los dispositivos con plata [12] o con antimicrobianos [13-16].

Además de los catéteres, existen otros dispositivos de acceso venoso utilizados en la práctica clínica, como son los reservorios. En el transcurso de este trabajo, se va a utilizar prototipos similares a estos últimos por ser de más fácil manejo que los catéteres.

2.2. Reservorios de acceso venoso de larga duración [17]

Es habitual que surja la necesidad de acceder al sistema venoso central del paciente de forma reiterada y prolongada para administrar medicamentos y nutrición parenteral o realizar extracciones de sangre frecuentemente. Para evitar lesionar al paciente se recurre a la implantación de sistemas de acceso venoso prolongado (SAVP), denominados comúnmente reservorios.

Estos dispositivos que se implantan por técnica quirúrgica (Figura 1, B), constan de una cámara de inyección, confeccionada con un material de acero quirúrgico (titanio) o poliéster plástico, que incluye una membrana de silicona con capacidad autosellante (Figura 1, A) [17].

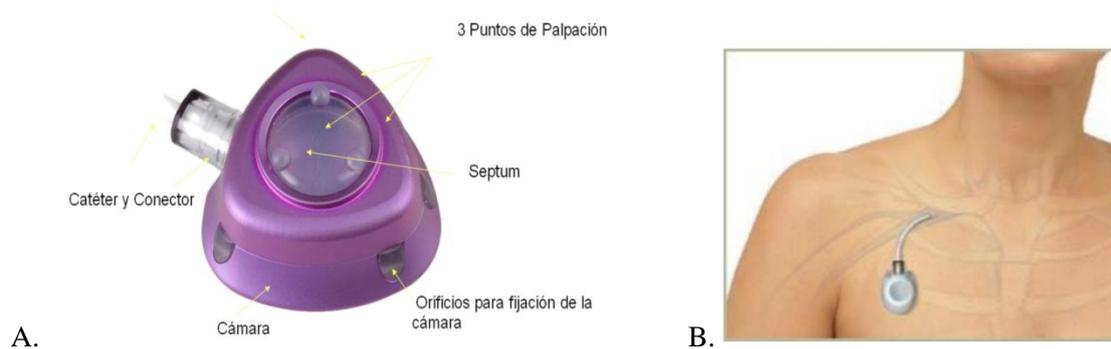


Figura 1. A. Esquema de un SAVP. B. Puntos donde más frecuentemente se sitúan los reservorios.

2.3. Quitosano

El quitosano es un biopolímero natural que se obtiene a partir de la quitina. La quitina, uno de los principales componentes estructurales de artrópodos (insectos y crustáceos), moluscos y hongos, es uno de los polímeros naturales más abundantes, después de la celulosa.

2.3.1. Obtención de la quitina y del quitosano

En general, la quitina se obtiene por métodos químicos a partir de conchas de crustáceos que incluyen tratamientos con álcalis y ácidos, con modificación de condiciones como la temperatura, tiempo de reacción o la concentración de álcalis y ácidos, entre otros.

En cuanto al quitosano, hay diferentes procedimientos destinados a su obtención a partir de quitina, pero el método más ampliamente utilizado es la reacción de conversión de quitina en quitosano por N-desacetilación alcalina. Consiste en dejar libre el grupo amino del carbono 2 mediante un tratamiento con álcali fuerte a altas temperaturas. Este proceso consiste en someter la quitina a una solución concentrada de hidróxido de sodio o potasio (40-50%) a una temperatura de 100°C o más. De esta manera, se hidroliza la mayoría de los grupos acetilos del polímero. No obstante, este proceso nunca alcanza el 100% de manera que el quitosano es un copolímero de 2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucosa y 2-amino-2-deoxy-β-D-glucosa (Figura 2) [18].

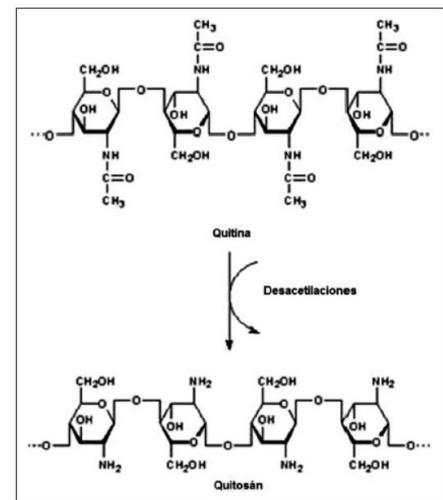


Figura 2. Desacetilación de la quitina y su producto quitosano

El grado de desacetilación, el peso molecular medio y la composición de las cadenas del quitosano dependen de la fuente y el método de obtención, por lo tanto, este polímero puede presentar propiedades estructurales, físico-químicas, biológicas y funcionales diferentes.

2.3.2. *Características de la quitina y el quitosano*

La quitina está formada por unidades de 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucosa unidas por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$. Cuando ésta se somete a desacetilación, se obtiene el quitosano, un copolímero formado por unidades de 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucosa y 2-amino-2-deoxy- β -D-glucosa unidos por enlace $\beta(1\rightarrow4)$. La proporción entre estos dos polímeros es lo que se denomina grado de desacetilación, DD (del inglés degree of deacetylation).

2.3.3. *Propiedades físico-químicas del quitosano*

- **Peso Molecular.** Puede ser muy variable. En el mercado se dispone de quitosano comercial de peso molecular bajo, medio y alto (Tabla 1) [12]. En este proyecto se utilizará el quitosano de peso molecular medio.
- **Grado de desacetilación.** Representa el porcentaje de grupos amino que quedan libres en la molécula de quitosano (Tabla 1) [12].

El DD, junto con el peso molecular Mw (del inglés molecular weight), son los principales parámetros de caracterización del quitosano que determinan sus propiedades funcionales.

Quitosano	Bajo	Medio	Alto
DD (%)	86 \pm 3	89 \pm 2	85 \pm 3
Peso molecular medio (kDa)	369 \pm 4	1278 \pm 8	2520 \pm 9

- **Naturaleza policationica.** En presencia de ciertos ácidos, los grupos amino libre pueden ser protonados adquiriendo así carga positiva que otorga al quitosano comportamiento de polication.
- **Estructura rígida.** La formación de numerosos enlaces por puentes de hidrógeno entre las cadenas de quitosano, le confiere estabilidad térmica y rigidez. El quitosano se descompone a 170°C [19], degradándose antes de fundirse.
- **Insoluble a pH neutro o alcalino.** El quitosano es insoluble en agua o en disoluciones con pH básico. Sin embargo, se disuelve con facilidad en soluciones diluidas de la mayoría de los ácidos orgánicos (en general, en aquellas soluciones ácidas con pH menor a su pKa \approx 6-7 [20]).
- **Higroscópico.** Posee la capacidad de absorber agua (absorber humedad del medio circundante). Esta capacidad se debe a la presencia de gran cantidad de grupos OH terminales que forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua del medio. De esta manera, se incorpora líquido en el interior de la matriz, produciéndose así su hinchamiento. En este principio se basa el éxito de este proyecto.

- **Carácter filmogénico.** En las propiedades filmogénicas del quitosano, juegan un importante papel los grupos hidroxilo y amino de sus cadenas gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre ellos. Cuando el quitosano se disuelve en ácido, los grupos amino se protonan y estos puentes de hidrógeno se disocian, produciéndose así el hinchamiento de la película.

Basándose en este principio, en 1974, Muzzarelli [21], planteó un procedimiento para obtener películas de quitosano. Se trata del método de evaporación del solvente.

En este proyecto es este método el que se va a utilizar para llevar a cabo los recubrimientos de los dispositivos médicos elegidos, ya que por experiencia previa se ha observado que se obtiene una película más homogénea y la compleja geometría de la pieza condiciona el procedimiento a utilizar. Sin embargo, existe una amplia variedad de procedimientos tales como compresión, extrusión, precipitación, spin-coating y casting, entre otros.

2.3.4. Propiedades funcionales del quitosano

- **Biocompatible.** Material capaz de interactuar con los tejidos de un sistema vivo sin causar daños, efectos tóxicos o reacciones biológicas por parte del huésped que lo aloja.
- **Biodegradable.** Material que no genera productos dañinos como resultado de su degradación. Los enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ de la quitina y el quitosano son degradados in vivo por la enzima lisozima presente en el organismo humano [22, 23] y los subproductos de degradación se incorporan fácilmente a distintas rutas metabólicas o son excretados [24].
- **No tóxico (baja toxicidad).** Presenta una baja toxicidad lo que lo hace un biomaterial ideal para una gran cantidad de usos y aplicaciones en medicina, industria, etc.
- **Acción antibacteriana de amplio espectro.** La actividad antimicrobiana del quitosano depende del microorganismo pero lo más ampliamente extendido es que tiene un efecto inhibitorio. En cuanto al mecanismo de acción antimicrobiana de este polímero, los investigadores proponen tres posibles acciones [25, 26]:
 - A. Carácter catiónico: relacionado con la protonación de los grupos amino del quitosano disuelto en soluciones ácidas. Estos grupos amino NH_3^+ cargados positivamente, interactúan con la membrana celular con carga negativa de las bacterias provocando así distintos efectos dañinos para el microorganismo.
 - B. Agente quelante: a pH ácido forma complejos con metales como Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} , además de cationes divalentes. De esta manera, desestabiliza la membrana celular, inhibe el crecimiento microbiano, la producción de toxinas y la disponibilidad de nutrientes esenciales para los microorganismos.
 - C. Penetración al interior de la célula: fragmentos de quitosano de bajo peso molecular pueden penetrar en el interior de los microorganismos, impedir su crecimiento, inhibir gran variedad de enzimas e interferir en la transcripción del ADN en ARNm.

2.3.5. Aplicaciones del quitosano

Gracias a sus beneficiosas características y propiedades, el quitosano se está convirtiendo en una valiosa herramienta en muchos campos distintos como pueden ser la veterinaria y la medicina así como en diferentes ámbitos de la industria que incluyen la alimentación, la agricultura, cosmética, etc.

En medicina se usa para:

- DES: Drug Eluting Stent. Son stents que liberan un fármaco lentamente para bloquear la proliferación celular y evitar el crecimiento excesivo de tejido y el estrechamiento del stent (restonosis intra-stent). Sheng Meng et al. (2009) han desarrollado un recubrimiento formado por quitosano y heparina con el fin de resolver este problema [27].
- Encapsulación de fármacos. El quitosano puede actuar como vehículo para encapsular un fármaco, de manera que el fármaco queda protegido y se libera de forma controlada o sostenida y es absorbido por el epitelio. Numerosos estudios han elaborado distintos sistemas de encapsulación de fármacos utilizando quitosano de diferentes pesos moleculares y en distintas concentraciones combinado con agentes entrecruzantes y otros polímeros [28-31].
- Sistema de liberación de fármacos. Consiste en utilizar películas de quitosano para recubrir comprimidos o dispositivos y como sistema de liberación controlada de fármacos.

El desarrollo de películas de quitosano para recubrir dispositivos junto con el quitosano como sistema de liberación de fármacos, son los dos aspectos que en combinación, van a ser estudiados en este proyecto.

3. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

El objetivo de este trabajo consiste en depositar sobre un dispositivo médico de una manera estable y sin despegarse, una película de un polímero con capacidad higroscópica de absorber un antibiótico diluido en agua.

El dispositivo elegido es un reservorio de acceso venoso prolongado y el polímero seleccionado para su recubrimiento es el quitosano por sus beneficiosas características y propiedades tales como biodegradabilidad, biocompatibilidad, baja toxicidad y acción antibacteriana. En cuanto al antibiótico seleccionado se trata del ciprofloxacino puesto que es un antimicrobiano de amplio espectro que actúa frente a bacterias Gram positivas y negativas.

Para desarrollar esa película polimérica cargada con el fármaco, se lleva a cabo un proceso de recubrimiento por inmersión o dip-coating. Posteriormente, el reservorio recubierto de quitosano y cargado con el fármaco será ensayado con un cultivo de *Staphylococcus aureus* con el propósito de evaluar la capacidad antimicrobiana de la pieza. El motivo de elegir este microorganismo, se debe a que junto con *Staphylococcus epidermidis*, son los agentes bacterianos más utilizados en los estudios relacionados con la traumatología y cirugía ortopédica, por ser los principales causantes de las infecciones nosocomiales.

La finalidad de desarrollar este dispositivo es que una vez implantado en el paciente, libere el antibiótico que almacena la película del polímero depositada sobre la superficie de la pieza, ejerciendo así un efecto protector contra la flora microbiana que haya podido acceder al dispositivo para colonizar su superficie. De este modo, se consigue evitar o reducir localizadamente el riesgo de infección en las primeras horas de la implantación que constituyen el punto más crítico. Al representar una administración de antibiótico localizada las dosis necesarias para erradicar la potencial infección serían, de esta manera, menores que las necesarias cuando dicho antibiótico se aplica sistémicamente.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Impresión en 3D de un prototipo de Reservorio de Acceso Venoso

Para poder llevar a cabo este proyecto, era necesario contar con un dispositivo médico sobre el que desarrollar el recubrimiento. En este caso, se decidió utilizar un reservorio de acceso venoso de larga duración. Dado que el dispositivo original usado hoy en día en clínica tiene un precio elevado, entre 300 y 600 euros, y dado el elevado número de piezas necesarias para realizar el estudio, fue necesario desarrollar un prototipo, réplica del original aunque no funcional (Figura 3), mediante una impresora 3D (ver anexo A, Equipos).



A.

B.

Figura 3. A. Prototipo de reservorio de acceso venoso obtenido a partir de una impresora en 3D. B. Reservorio de acceso venoso original utilizado como modelo.

Se utilizan tres materiales distintos para la impresión de los reservorios, a los que se denominarán A, B y C a lo largo del trabajo (ver anexo A, Especificaciones de los materiales para fabricar los prototipos).

Se desconoce con exactitud la naturaleza de dichos materiales debido a las políticas de privacidad y patentes de la empresa que los aporta. No obstante se sabe que son algún tipo de metacrilato.

4.2. Síntesis de películas de Quitosano

En primer lugar se llevó a cabo la síntesis de una película de quitosano (ver anexo A, Reactivos), por el método de evaporación del solvente [12].

Como ya se ha mencionado anteriormente, el quitosano no es soluble en agua pero sí lo es en disoluciones diluidas de la mayoría de los ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, acético, cítrico y tartárico. En este caso se va a utilizar una disolución de ácido acético (ver anexo A, Reactivos).

El procedimiento es el siguiente:

1. El ácido acético de 99.8 wt. % se diluye en agua para obtener una concentración de 0.5M.
2. El quitosano en polvo se disuelve en dicha disolución de manera que se obtenga una concentración de 1 w/v %. Para facilitar que el quitosano se disuelva, se mantiene a una temperatura de 65°C en agitación durante 12 horas. Tras pasadas las 12 horas, se observa una disolución clara y de alta viscosidad que constituye el hidrogel de quitosano.
3. El gel obtenido se vierte en una placa de Petri (de 9 cm de diámetro interno; Deltalab, España) y se seca en estufa a una temperatura de no más de 60°C hasta el día siguiente para evaporar el ácido acético y el agua.
4. Las películas obtenidas han de ser neutralizadas con una solución de NaOH (ver anexo A, Reactivos) del 4 wt. % hasta que alcancen un pH neutro.
5. Tras la neutralización, las películas se lavan con agua miliQ y se mantienen en la estufa a 60°C durante 12 horas con una capa de agua que las recubra.

De aquí en adelante, este proceso no se lleva a cabo de manera íntegra hasta obtener la película, sino que se detiene en el paso de obtención del hidrogel que será a partir del cual se realizará el recubrimiento sobre el dispositivo mediante Dip-coating que se detalla a continuación. Además, las condiciones de síntesis iniciales se sustituyen por unas condiciones equivalentes pero ajustadas a un mayor tiempo de disolución: 24 horas, 40°C y en un volumen final mayor.

4.3. Recubrimiento de los reservorios mediante Dip-coating

Para llevar a cabo el recubrimiento del reservorio se utiliza una técnica para producir películas cuyo espesor varía en función del número de capas que se depositan. Este proceso se denomina Dip-coating (recubrimiento por inmersión) y se puede dividir en diferentes etapas, las cuales se llevan a cabo una detrás de otra en el proceso continuo (Figura 4):

1. *Inmersión*: la pieza se sumerge en la solución del material a depositar a velocidad constante. En este caso, el reservorio de acceso venoso se sumerge en el hidrogel de quitosano obtenido al diluirlo en la disolución de ácido acético 0.5M.
2. *Extracción*: la pieza que ha permanecido dentro de la disolución por un determinado tiempo, se empieza a extraer. Esta extracción se realiza a velocidad constante y evitando vibraciones ya que la velocidad determina el espesor de la película depositada y su homogeneidad.
3. *Deposición y evaporación*: a medida que la pieza se extrae, el solvente se evapora y la película se deposita sobre la superficie

En el mercado existen una gran variedad de equipos automatizados como los que ofrece la empresa Nadetech Innovations para la fabricación y deposición de películas delgadas sobre distintas superficies mediante técnicas de mojado [32]. En el laboratorio, carecemos de estos

equipos automatizados de manera que se ha ideado un mecanismo de dip-coating basado en un sistema de vasos comunicantes y una bomba peristáltica (ver anexo A, Equipos).

Inicialmente, se parte de la hipótesis de que a mayor número de recubrimientos se conseguirá un espesor de película mayor al depositar una capa encima de la anterior. Se plantea realizar recubrimientos de dos y cuatro capas para observar la diferencia en el espesor de la película obtenida. Para ello, se realiza un primer recubrimiento de la pieza y tras secarse al aire para terminar de evaporar el solvente, se realiza un segundo paso invirtiendo la pieza para conseguir una capa homogénea. Así sucesivamente con los recubrimientos posteriores.

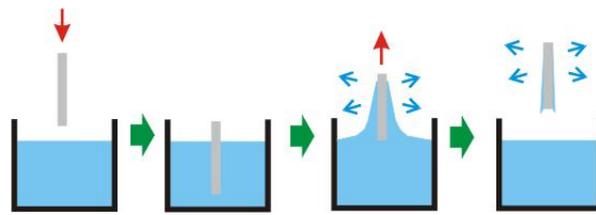


Figura 4. Representación esquemática del proceso de recubrimiento por inmersión o dip-coating. La pieza a recubrir se introduce en la solución del material a depositar y se va extrayendo a velocidad constante para que el solvente se evapore y la película se deposite sobre la superficie de la pieza a medida que ésta es extraída [32].

Como se explicará más adelante, este proceso de dip-coating será ligeramente modificado al añadir un compuesto de interés al hidrogel de quitosano obtenido. El fundamento de esto es que el gel de quitosano en la solución acética es capaz de hidratarse gracias a su carácter higroscópico, de manera que al absorber agua, captará todo compuesto que se halle disuelto en ella. Una vez que se ha obtenido una pieza recubierta de quitosano y cargada con el compuesto en cuestión, que será inicialmente un cromóforo y posteriormente un antibiótico, el quitosano será capaz de liberar ese compuesto al medio. De esta manera se obtiene un reservorio de acceso venoso capaz de liberar un antibiótico localmente para evitar la colonización microbiana.

4.4. Estudio de la adhesión del Quitosano sobre el reservorio

Una vez se han realizado los recubrimientos es necesario efectuar un análisis de la pieza para verificar que el quitosano ha sido depositado. Para ello se estudia la ganancia de peso y la presencia del polímero mediante técnicas analíticas como FTIR, XPS y microscopía electrónica de barrido (SEM).

4.4.1. Ganancia de peso

Antes de someter cada pieza al proceso de dip-coating, se pesa cada una de ellas con una balanza de precisión y tras realizar el recubrimiento, se realiza otra medida para observar la diferencia entre el peso inicial y el peso final conseguido para cada dispositivo.

4.4.2. FTIR: Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier

Es una técnica útil para caracterización e identificación de materiales como polímeros y plásticos o sólidos inorgánicos. Es una técnica de superficie que proporciona información cualitativa sobre los enlaces químicos presentes en dicha superficie o material a analizar.

Se obtiene una señal compleja (interferograma) que se convierte en una señal espectral interpretable mediante la Transformada de Fourier. Este espectro representa la absorción de la

radiación infrarroja de los grupos funcionales de sustancias orgánicas e inorgánicas, de manera que es posible realizar una identificación de los materiales.

El equipo FTIR utilizado se describe en el anexo A, Equipos.

4.4.3. XPS: Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X

Es una técnica basada en el efecto fotoeléctrico. Esta técnica también es conocida por el acrónimo ESCA (Electron spectroscopy for chemical analysis) que indica el uso de esta herramienta para el análisis químico (ver anexo A, Equipos). Es la técnica de análisis más utilizada en la caracterización química de la superficie y sub-superficie de materiales, junto con FTIR.

La fortaleza del XPS es su capacidad de evaluar la naturaleza y el estado químico de los átomos superficiales, dando información en una capa de hasta 5 nm (4-20 capas atómicas) de profundidad.

La muestra se irradia con un haz monocromático de rayos X y se analiza la energía de emisión de los fotoelectrones producidos. Sólo los electrones emitidos o que han interactuado en la superficie de la muestra pueden alcanzar el detector para ser analizados. Por eso, esta técnica es superficial pues informa sobre varias capas de átomos en la superficie de la muestra.

4.4.4. Microscopía electrónica de barrido

El microscopio electrónico de barrido, conocido por sus siglas inglesas SEM, utiliza electrones en lugar de luz para formar la imagen de la superficie de una muestra. Para ello, un filamento genera un haz de electrones que ilumina la muestra. Posteriormente, diferentes detectores recogen los electrones derivados de la interacción con la superficie de la muestra, creando así una imagen que refleja las características superficiales de la misma.

El aspecto del quitosano en el microscopio electrónico de barrido varía en función de cómo ha sido eliminada el agua del hidrogel. Si el agua es eliminada bruscamente por liofilización, el quitosano tiene un aspecto de una red con grandes poros. Sin embargo, cuando el agua es eliminada lentamente por evaporación, el quitosano tiene un aspecto laminado (Figura 5) [33]. El objetivo de utilizar esta técnica analítica es visualizar la película de quitosano que se ha depositado en la superficie del dispositivo.

Se visualizan distintas zonas de la pieza y a diferentes aumentos (ver anexo A, Equipos).

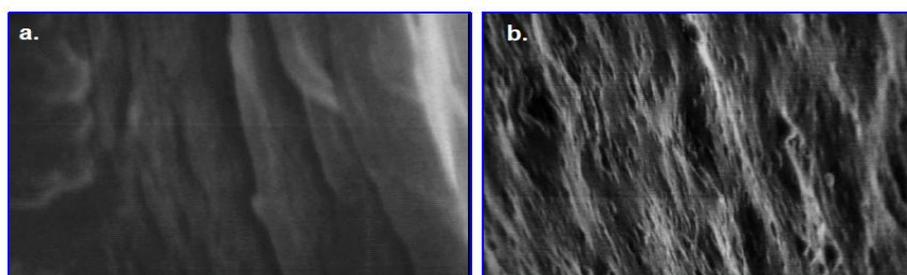


Figura 5. Micrografías SEM de hidrogel de quitosano al 1% sin entrecruzar tomadas a 2500X: a) vista lateral, b) vista superficial [33].

4.5. Recubrimiento de los reservorios mediante Dip-coating con Quitosano y un cromóforo

En esta etapa, se lleva a cabo un proceso de dip-coating de la misma forma que ha sido descrita anteriormente salvo que en esta ocasión, en la solución de quitosano en ácido acético se añade un cromóforo para posteriormente estudiar la cinética de liberación del mismo a lo largo del tiempo mediante espectrofotometría UV-Vis.

El cromóforo elegido es la Rodamina B isotiocianato. Es un compuesto químico soluble en agua perteneciente a la familia de las rodaminas que son compuestos orgánicos heterocíclicos fluorescentes basados en el xanteno (ver anexo A, Estructuras químicas). Gracias a su capacidad de poseer fluorescencia, puede ser detectada fácilmente mediante espectrofotometría ultravioleta-visible.

Las piezas recubiertas con quitosano y cargadas con rodamina deben ser comparadas con un blanco puesto que es posible que la rodamina se adhiera inespecíficamente a la pieza sin quitosano. De manera que se realizan dos dip-coating diferentes, uno para realizar un recubrimiento de la pieza con quitosano y cargada con rodamina y otro en el que se realiza el recubrimiento sin quitosano y constituirá el blanco.

- Procedimiento para dip-coating con quitosano y rodamina:
 1. El ácido acético de 99.8 wt. % se diluye en agua para obtener una concentración de 0.5M.
 2. El quitosano en polvo se disuelve en dicha disolución de manera que se obtenga una concentración de 1 w/v %. Para facilitar que el quitosano se disuelva, se mantiene a una temperatura de 40°C en agitación durante 24 horas. Tras pasadas las 24 horas, se observa una disolución clara y viscosa que constituye el hidrogel de quitosano.
 3. A este hidrogel obtenido se añade rodamina (ver anexo A, Reactivos) hasta alcanzar una concentración de 0,01 mg/mL. Tras disolver la rodamina completamente, se procede a realizar el dip-coating de las piezas de la misma forma que ha sido descrita anteriormente.

- Procedimiento para dip-coating del blanco:

Es necesario recrear las mismas condiciones que en el procedimiento anterior excepto que no se añade el quitosano. A la disolución 0.5M de ácido acético, atemperada a 40°C se añade la cantidad adecuada de rodamina para que la concentración final sea de 0,01mg/mL. Tras disolver la rodamina completamente, se procede a realizar el dip-coating de las piezas de la misma forma que ha sido descrito anteriormente.

4.6. Cinética de liberación del cromóforo

Tras realizar el recubrimiento de los reservorios con quitosano y rodamina, se procede al estudio de la cinética de liberación del cromóforo mediante espectrofotometría ultravioleta-visible (ver anexo A, Equipos).

La espectrofotometría UV-Visible utiliza luz en los rangos visible, ultravioleta cercano e infrarrojo cercano para irradiar las moléculas. La radiación correspondiente a estas regiones provoca transiciones electrónicas a longitudes de ondas propias de la estructura molecular del

compuesto que es irradiado. Es una técnica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución ya que es proporcional a la cantidad de luz absorbida.

El objetivo de utilizar esta técnica, es conocer la cantidad máxima de rodamina, equivalente al fármaco con el que se quiere cargar el reservorio, que la película de quitosano puede liberar al medio. El procedimiento es el siguiente:

1. Realizar una recta de calibrado con un rango de 0 a 0,01 mg/mL.
2. Estudio de la cinética de liberación del cromóforo. Condiciones de la liberación:
 - Sumergir la pieza completamente en 100 mL de PBS 1X para controlar el pH durante el proceso de liberación con el objetivo de que no se vean afectadas las medidas de absorbancia de la rodamina (ver anexo A, Reactivos).
 - Agitación constante (sin que el imán golpee a la pieza)
 - 37°C para simular la temperatura corporal
 - Hacer medidas durante una hora a distintos intervalos de tiempo, véase:
 - Durante los primeros 10 minutos, medida cada minuto
 - A partir de los 10 minutos y hasta los 30, medida cada 5 minutos
 - A partir de los 30 minutos y hasta los 60, medida cada 10 minutos
 - Medir la absorbancia a 552 nm (máximo de absorción de la rodamina)
3. Interpolar la absorbancia obtenida en cada medida en la recta de calibrado para obtener la concentración de rodamina en el medio para cada tiempo.

4.7. Recubrimiento de los reservorios mediante Dip-coating con Quitosano y un antibiótico

En esta etapa, se lleva a cabo un proceso de dip-coating de la misma forma que ha sido descrita anteriormente para el recubrimiento de los reservorios con quitosano y rodamina pero sustituyendo la rodamina por un antibiótico, el ciprofloxacino (ver anexo A, Reactivos), en una concentración de 100 µg/mL.

El ciprofloxacino (ver anexo A, Estructuras químicas) es un bactericida de amplio espectro perteneciente al grupo de las fluoroquinonas. Su modo de acción consiste en interferir en la replicación del ADN bacteriano al inhibir la ADN-girasa.

Con esta etapa culminaría la primera parte del proyecto, obtener reservorios de acceso venoso rodeados por una película de quitosano de reducido espesor, capaz de captar y posteriormente liberar ciprofloxacino al medio con el objetivo de inhibir el crecimiento microbiano alrededor del dispositivo.

Ya que el ciprofloxacino no emite una señal fácilmente medible mediante espectrofotometría UV-VIS (emite a 275 nm, región en el límite del espectrofotómetro disponible en la que se muestra elevada dispersión de la luz) y debido a la imposibilidad de disponer de un cromatógrafo HPLC para cuantificar la cantidad de ciprofloxacino liberado al medio desde los dispositivos cargados, se procedió a demostrar que los dispositivos contenían dicho antibiótico de una manera indirecta, con el estudio antimicrobiano que se detalla a continuación.

4.8. Ensayo biológico

La segunda parte del proyecto, y la más importante, es enfrentar los reservorios recubiertos y cargados con el antibiótico, a bacterias. La especie elegida para realizar el ensayo es *Staphylococcus aureus*.

En la actualidad, este microorganismo, junto con *Staphylococcus epidermidis*, se considera uno de los principales causantes de las infecciones nosocomiales. Esta situación se ve favorecida por el hecho de que esta especie habita tanto en las mucosas como en la piel de los seres humanos, lo que permite que a través de las heridas quirúrgicas pueda penetrar en el torrente sanguíneo del paciente.

Para llevar a cabo el ensayo biológico se procede de la siguiente manera, es importante trabajar en condiciones de esterilidad y utilizar material y reactivos autoclavados o estériles:

Primer día:

1. Se parte de un cultivo de pastillas liofilizadas (ver anexo A, Reactivos). Rehidratar con agua y reactivar añadiendo medio de cultivo líquido TSB (ver anexo A, Reactivos).
2. Incubar a 37°C durante 24 horas.

Segundo día:

1. Sembrar por agotamiento el cultivo del día anterior, en el que debe observarse turbidez, en una placa con medio de cultivo sólido TSA (ver anexo A, Reactivos).
2. Incubar a 37°C durante 24 horas

Tercer día:

1. Tomar una colonia aislada y sembrarla en 10 mL de medio de cultivo líquido TSB.
2. Incubar a 37°C durante 24 horas.

Al sembrar una colonia aislada en 10 mL de medio de cultivo líquido y tras incubar 24 horas, se asume que se obtiene un cultivo de 10^9 UFC/mL.

3. Esterilizar los reservorios bajo atmósfera de etanol absoluto (ver anexo A, Reactivos) durante 24 horas.

Cuarto día:

1. Poner en un bote medio de cultivo líquido TSB suficiente para que los dispositivos queden sumergidos completamente (40 mL).
2. Para preparar el control negativo del antibiótico, se disuelve en agua destilada para obtener una concentración de 100 µg/mL. Para esterilizarlo, se hace pasar por un filtro de 0,22 µm.
3. Los reservorios esterilizados con atmósfera de etanol, se someten 15 minutos a la exposición de la luz UV para asegurar su esterilización.

Se realiza un triplicado de piezas recubiertas, todas en las mismas condiciones descritas anteriormente, un control positivo y negativo y además un control negativo del antibiótico:

- Control positivo: reservorio sin recubrir que se pone en contacto con el cultivo bacteriano para comprobar que en condiciones normales existiría crecimiento.
Añadir a un bote 40 mL de TSB y la concentración necesaria del cultivo de 10^9 UFC/mL para obtener una concentración final de 10^2 UFC/mL y depositar una pieza sin recubrir.
- Control negativo: reservorio sin recubrir que se pone en contacto con medio de cultivo sin inocular para comprobar que el reservorio se encuentra estéril y no habría crecimiento.
Añadir a un segundo bote 40 mL de TSB y depositar una pieza sin recubrir.
- Control negativo del antibiótico: para comprobar el poder bactericida del antibiótico.
Añadir a un tubo con 2 mL de TSB, la cantidad necesaria de ciprofloxacino filtrado para alcanzar una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$.
- Triplicado de las piezas: tres reservorios recubiertos con quitosano y cargados con ciprofloxacino para estudiar la capacidad de la película de polímero de liberar el antibiótico y reducir o impedir el crecimiento bacteriano.
Añadir a 3 botes 40 mL de TSB y la concentración necesaria del cultivo de 10^9 UFC/mL para obtener una concentración final de 10^2 UFC/mL. Depositar en cada bote las tres piezas recubiertas de quitosano y cargadas con el antibiótico.

Quinto día

Tras la incubación de los reservorios con el cultivo de *S. aureus*, se procede a hacer diluciones decimales de cada cultivo para plaquear y contar el número de células viables presentes (hasta 10^7 UFC/mL) con el objetivo de conocer cuántos ciclos logarítmicos se ha conseguido reducir con los reservorios de acceso venoso recubiertos de quitosano y cargados con ciprofloxacino, con respecto al control positivo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Síntesis de películas de Quitosano

Mediante el método de evaporación del solvente se obtiene una película de quitosano de aspecto homogéneo, libre de poros, plástico, transparente y fácilmente quebradizo (Figura 6). El espesor de la película depende de la cantidad de solución que se vierta en la placa de Petri.



Figura 6. Película de quitosano sintetizado a partir del método de evaporación del solvente.

5.2. Recubrimiento de los reservorios mediante Dip-coating y estudio de la adhesión del quitosano

Tras realizar el dip-coating de las piezas con el hidrogel de quitosano, se ha estudiado si el polímero se ha depositado eficientemente sobre la superficie del reservorio mediante ganancia de peso y técnicas analíticas como son FTIR, XPS y SEM.

5.2.1. Ganancia de peso

- Dip-coating con quitosano

En primer lugar se llevo a cabo dip-coatings de 2 y 4 recubrimientos para verificar si a mayor número de capas se incrementaba el espesor de la película. No se observó este efecto ya que se obtuvo una ganancia de peso similar con 2 capas y con 4, lo que podría deberse a que existe un espesor máximo de la película que tiene estabilidad en el soporte. Es decir, si se intentan depositar muchas capas una encima de la otra, al final el propio peso hace que la fuerza de adhesión con el soporte no sea suficiente para mantener la película adherida. Por lo tanto, se descartó realizar dip-coating de más de dos capas y de ahí en adelante se realizan todos de dos recubrimientos.

De manera general, llevando a cabo dos recubrimientos invirtiendo la pieza como se ha comentado anteriormente, se consigue duplicar la ganancia de peso con respecto a la realización de un único recubrimiento (Tabla 2).

Tabla 2. Promedios y desviaciones estándar de las ganancias de peso en las piezas recubiertas con quitosano de los tres tipos de soporte utilizados

Pieza	Nº de recubrimientos	Promedio	Desviación estándar
Piezas recubiertas de quitosano	1	0,012	0,005
	2	0,024	0,012

- Dip-coating con quitosano y rodamina

En todas las piezas se han realizado dos recubrimientos y se ha tomado una medida del peso tras cada uno de ellos. En promedio, se observa que tras el segundo recubrimiento se consigue una mayor ganancia de peso con respecto al primero, aproximadamente del doble, tal y como ocurría en el caso anterior con el recubrimiento de quitosano solamente. (Tabla 3).

Tabla 3. Promedios y desviaciones estándar de las ganancia de peso para blancos sin recubrir y piezas recubiertas de quitosano y cargadas con rodamina

Pieza	Nº de recubrimientos	Promedio	Desviación estándar
Blanco	1	0,008	0,005
	2	0,020	0,012
Piezas recubiertas de quitosano y rodamina	1	0,014	0,013
	2	0,02	0,009

- Dip-coating con quitosano y ciprofloxacino

En este caso, se realiza el dip-coating con quitosano y ciprofloxacino. Como en los dos casos anteriores, se observa, en promedio, una mayor ganancia de peso tras el segundo recubrimiento que tras el primero (Tabla 4).

Tabla 4. Promedios y desviaciones estándar de las ganancias de peso para blancos sin recubrir y piezas recubiertas de quitosano y cargadas con ciprofloxacino

Pieza	Nº de recubrimientos	Promedio	Desviación estándar
Blanco	-	-	-
Pieza recubierta	1	0,019	0,011
	2	0,024	0,009

Con estos resultados se puede concluir que con el dip-coating con quitosano, con quitosano + rodamina y con quitosano + ciprofloxacino, llevando a cabo dos recubrimientos, se obtiene una ganancia de peso similar en los tres casos. Al añadir el ciprofloxacino o la rodamina al hidrogel de quitosano para cargar la película depositada, se observa una ganancia de peso similar que la conseguida depositando la película de quitosano sin ser cargada con ningún compuesto añadido. De manera que, prácticamente la totalidad en la ganancia de peso adquirida se debe a la aportación de la película de quitosano depositada, excepto con la pieza blanco de rodamina puesto que se observa interacción con el soporte.

De manera general, en todos los dip-coatings que se han llevado a cabo, tanto con quitosano solo como con quitosano y rodamina o ciprofloxacino, se puede decir que la heterogeneidad en la ganancia de pesos puede deberse a que la velocidad de extracción de la bomba peristáltica utilizada variaba de unos recubrimientos a otros ya que era difícil ajustar la misma velocidad en todas las ocasiones. En el futuro se plantea utilizar una bomba automatizada para minimizar el error de las bombas peristálticas.

5.2.2. FTIR

- Espectros del quitosano y los polímeros sin recubrir

Para poder identificar en los reservorios recubiertos con quitosano los picos que le corresponden, es necesario obtener los espectros del quitosano (ver anexo B, Resultados, Figura 1) y los reservorios sin recubrir (blancos, ver anexo B, Resultados, Figura 2).

I. Asignación de los principales picos en el espectro del quitosano:

- El pico amplio en torno a $3500-3300\text{ cm}^{-1}$ corresponde al stretching del enlace O-H y N-H [34, 35].
- El pico de la amina primaria se localiza alrededor de $1640-1560\text{ cm}^{-1}$ y el de la amina secundaria alrededor de $1550-1450\text{ cm}^{-1}$ [36].
- El pico de la amida se localiza a en torno a $1645-1653\text{ cm}^{-1}$. La presencia de un grupo amida se debe a que el quitosano elegido no tiene un grado de desacetilación del 100%, es decir, hay una mezcla de quitosano y de quitina que es la que contribuye a la aparición del grupo amida [35].
- La banda correspondiente al stretching C-H se encuentra entre $2864-2900\text{ cm}^{-1}$ [35, 37].

II. Asignación de los picos en el espectro de los polímeros sin recubrir: los espectros de los tres blancos de los diferentes polímeros tienen un aspecto similar. Presentan bandas asociadas a los acrilatos (Tabla 5).

Banda (cm ⁻¹)			Asignación
Polímero B	Polímero C	Polímero A	
1726	1724	1724	C=O stretching [41]
1638	1638	1638	acrylate double bond stretching [41]
1450	1450	1450	distortion vibration of CH ₂ [42]
1389	1389	1389	distortion vibration of CH ₂ [42]
1158	1158	1158	C–O stretching [43]

- Espectros de los polímeros recubiertos

En los tres tipos de polímeros recubiertos, aparece un nuevo pico a aproximadamente 1568 cm⁻¹ (Figuras 7-9). Esta banda corresponde al estiramiento asimétrico de los grupos carboxilos e indica la reacción que ha tenido lugar entre los grupos amino del quitosano y los grupos carboxílicos del acrilonitrilo del soporte [38, 39]. Esta banda es la evidencia del éxito de la deposición del quitosano en los polímeros a través de la reacción entre los grupos amino del quitosano y los grupos carboxílicos del acrilato [40].

5.2.3. XPS

La composición atómica de la superficie del polímero analizada por XPS señala que el ratio atómico N/C para los polímeros sin recubrir A, B y C es 0.008, 0.022 y 0.011 respectivamente (Tabla 6). La presencia de nitrógeno en los polímeros se asocia al grupo R-CN en la superficie [44]. Sin embargo, sólo para el polímero B la composición de N superficial es superior al 1 at. %

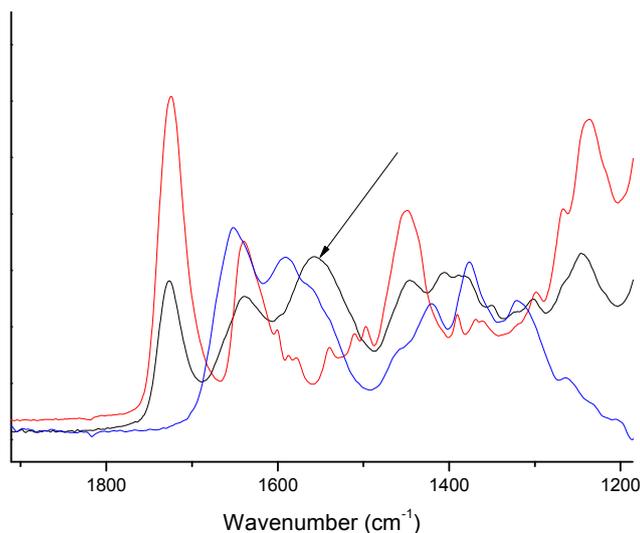


Figura 7. Comparación de los espectros del quitosano (azul), y la pieza de polímero A antes (rojo) y después (negro) del recubrimiento. Se observa una nueva banda a 1568 cm⁻¹ correspondiente a la reacción entre los grupos amino del quitosano y los grupos carboxilo del acrilato.

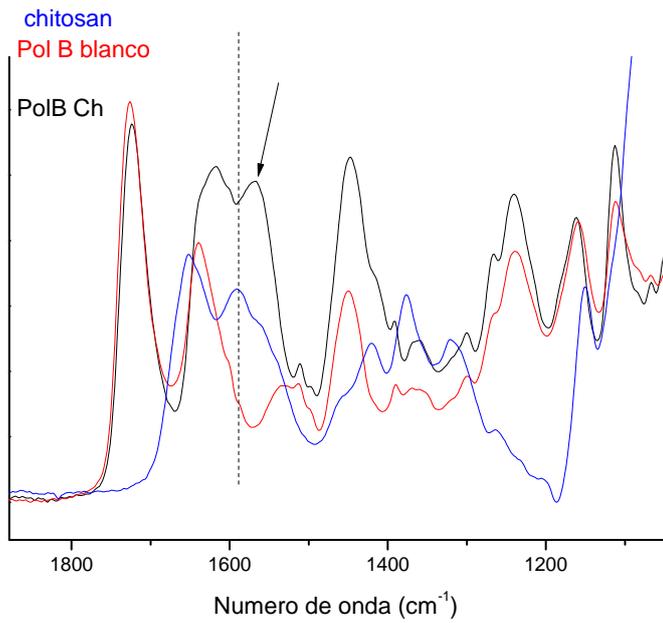


Figura 8. Comparación de los espectros del quitosano (azul), y la pieza de polímero B antes (rojo) y después (negro) del recubrimiento. Se observa una nueva banda a 1568 cm⁻¹ correspondiente a la reacción entre los grupos amino del quitosano y los grupos carboxilo del acrilato.

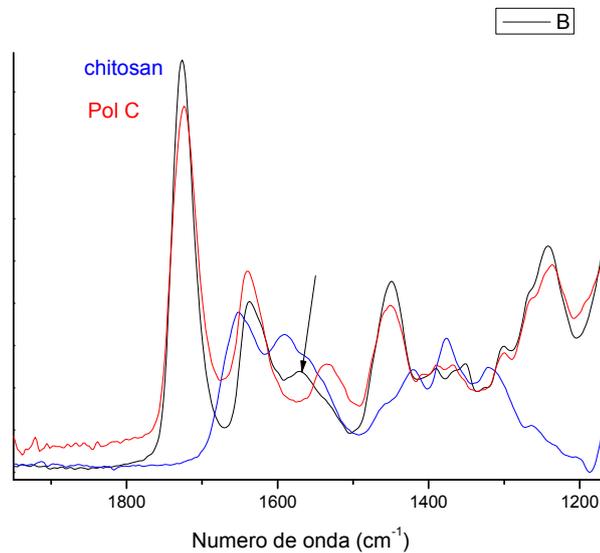


Figura 9. Comparación de los espectros del quitosano (azul), y la pieza de polímero C antes (rojo) y después (negro) del recubrimiento. Se observa una nueva banda a 1568 cm⁻¹ correspondiente a la reacción entre los grupos amino del quitosano y los grupos carboxilo del acrilato.

Tras el recubrimiento con quitosano, este ratio se incrementa 3,3 y 7,2 veces para el polímero A y C, respectivamente. Sin embargo, no se observa incremento para el polímero B. A pesar de que los espectros de los polímeros sin recubrir son similares, se desconoce exactamente la

causa de esta diferencia con respecto a los otros dos polímeros. Probablemente esa diferencia se deba a la distinta naturaleza de cada uno de los polímeros sustrato. Lo que se observa mediante FTIR es que tras enlazarse el quitosano sobre el polímero la dirección del desplazamiento de la banda en torno a 1724 cm^{-1} atribuida a la vibración del enlace C=O es distinto en el caso del polímero A y C y en el caso del polímero B indicativo de una distinta química de superficie para cada polímero.

El ajuste de los picos de nitrógeno, un pico alrededor de 400 eV muestra la presencia de grupos R-CN mencionados anteriormente en los polímeros sin recubrir [40]. Después del recubrimiento con quitosano, aparecen dos picos nuevos, uno en torno a 400.1-400.7 eV perteneciente al grupo amida y otro en torno a 401.5-402.0 eV perteneciente al grupo amina protonado.

El pico a 399 eV podría estar relacionado con el grupo NH_2 del quitosano, el pico a 400 eV se atribuye a la amida y/o al enlace C-N y el pico a 401 eV a la amina protonada.

El ajuste de los picos de nitrógeno (Tabla 7) muestra claramente la presencia de quitosano por la incorporación de las aminas libres y protonadas al polímero base. La aparición del pico correspondiente a los $-\text{NH}_3^+$ se debe al quitosano.

Tabla 6. Espectro general de los tres polímeros recubiertos y sin recubrir				
	Energía de enlace (eV)			N/C
	% Atómico			
	C 1s	O 1s	N 1s	
Blanco polímero A	284.9	531.7	400.0	0.008
	86.91	12.39	0.70	
Polímero A recubierto	284.9	532.8	399.5	0.058
	78.19	17.27	4.54	
Blanco polímero B	284.9	532.1	400.2	0.022
	80.94	17.22	1.83	
	284.9	532.0	399.7	0.020
87.12	11.12	1.76		
Polímero B recubierto	284.9	532.2	399.9	0.018
	82.27	16.24	1.48	
	284.9	531.7	399.7	0.017
85.84	12.68	1.48		
Blanco polímero C	284.9	532.3	400.2	0.011
	81.20	17.91	0.89	
Polímero C recubierto	284.9	532.6	400.1	0.036
	79.86	17.46	2.68	

Tabla 7. Deconvolución del N 1s para los tres polímeros sin recubrir y recubiertos [46]

Muestra	Energía de enlace (eV) % atómico			Grado de desacetilación
	-NH ₂ amina	-HN-C=O Amida y/o C-N [47]	-NH ³⁺ Amina protonada	
Polímero A sin recubrir		399.9 100 %	-	-
Polímero A recubierto	399.4 67%	400.1 18%	401.5 15%	82%
Polímero B sin recubrir		400.1 100%	-	-
Polímero B recubierto	399.7 62%	400.7 13%	401.9 25%	87%
Polímero C sin recubrir		400.1 100%	-	-
Polímero C recubierto	399.8 70%	400.1 13%	402.0 17%	87%

El valor del grado de desacetilación, se calcula con la suma de la concentración atómica de los grupos amino y amino protonados. Como era de esperar, ese valor es similar en los tres polímeros recubiertos. Este valor es aproximado porque el pico de NH₂ podría tener también contribución del polímero base [45].

5.2.4. SEM

En las imágenes obtenidas por con el microscopio electrónico de barrido (ver anexo B, Resultados), no se puede apreciar la película de quitosano adherida. Esto podría deberse a que su espesor es inapreciable para esta técnica. Sin embargo, la presencia de quitosano queda evidenciada con los resultados de XPS y FTIR mostrados anteriormente.

5.3. Cinética de liberación del cromóforo

Como se ha mencionado anteriormente, el objetivo de recubrir el reservorio con quitosano y cargado con un cromóforo, que se utiliza como molécula modelo, es detectar, de una manera fácil y sencilla con espectrometría de UV-Visible, la cantidad de compuesto que la película de quitosano es capaz de liberar al medio. Sin embargo, este ensayo no es del todo representativo ya que al finalizar la liberación, se sigue observando que la pieza está coloreada. Esto se debe a que el cromóforo ha interactuado con el soporte o bien covalentemente o por puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas, etc. Por lo tanto en el caso de la rodamina, se obtiene una idea aproximada de la cantidad que la película de quitosano libera al medio pero no la máxima cantidad que es realmente capaz de liberar, ya que una gran mayoría ha reaccionado químicamente con el soporte (Figura 10). Idealmente una fisisorción débil sería ideal para producir una total liberación del fármaco utilizado. Sin embargo, la prueba con el cromóforo indica que la interacción de éste con el polímero es fuerte y que no se libera completamente de los dispositivos. Otra hipótesis sería el hecho de que se hubiese alcanzado la saturación en el medio de liberación. Al haberse alcanzado ésta, la liberación del cromóforo residual quedaría impedida por estar en equilibrio.

En ambos ensayos de liberación, tanto para el polímero A como para el B, se observa el efecto del aumento de la concentración de rodamina en el medio durante los primeros 10 minutos y posteriormente sigue aumentando pero más lentamente, estabilizándose así los valores, probablemente por haberse alcanzado la saturación en el medio de liberación.

En el caso del polímero A, contradictoriamente se observa que el blanco ha captado y libera mayor cantidad de rodamina al medio. Al contrario que lo que ocurre con el polímero B que se observa más claramente el efecto de la película de quitosano en dos de las tres piezas (Figura 11).



Figura 10. Reservorios recubiertos de quitosano y cargados con rodamina antes (izquierda) y después (derecha) del ciclo de liberación. Tras la liberación se sigue apreciando color en la pieza debido a la interacción química entre la rodamina y el soporte.

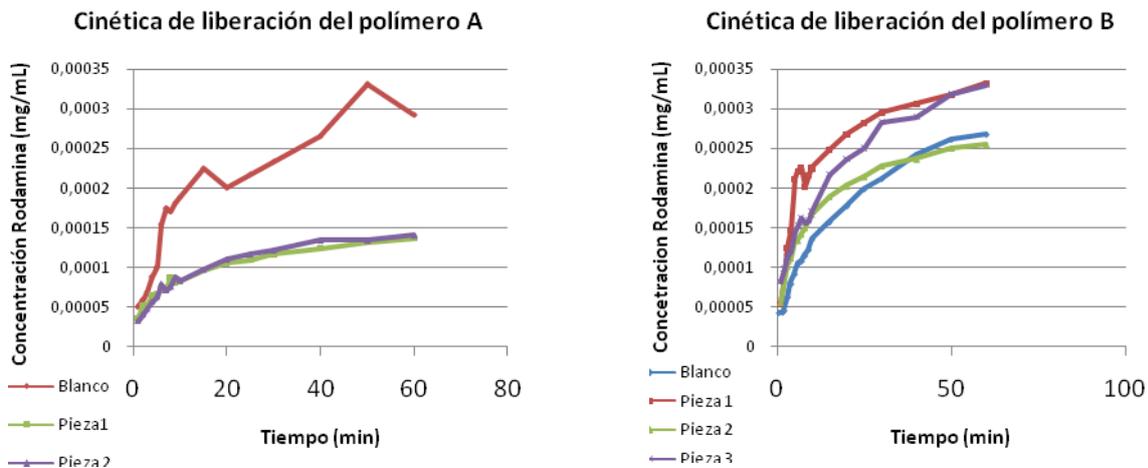


Figura 11. Cinética de liberación del polímero A y B respectivamente, de un blanco sin quitosano y bañado en rodamina y piezas recubiertas de quitosano y cargadas con rodamina. Se observa el aumento de la concentración del cromóforo en el medio en función del tiempo.

5.4. Ensayo biológico

Una vez que se han obtenido los reservorios recubiertos de quitosano y cargados con el antibiótico, se ha procedido a enfrentarlos a un cultivo de 10^2 UFC/mL de *Staphylococcus aureus* durante 24 horas a 37°C . Tras dicha incubación se procede a realizar el método de diluciones seriadas y recuento en placa.

- Incubación de las piezas

Tras las 24 horas de incubación a 37°C de los reservorios con un cultivo de 10² UFC/mL de *Staphylococcus aureus*, en el control positivo se observa turbidez en el medio, evidencia de que ha habido crecimiento, lo que era de esperar. Sin embargo, el control negativo que carecía de inoculación bacteriana, también se observa crecimiento. Este hecho se debe a que el método de esterilización elegido no ha sido efectivo.

Industrialmente la esterilización por rayos gamma es habitual, sin embargo no disponemos en nuestro laboratorio de dicha posibilidad. La esterilización mediante radiación ultravioleta se ha demostrado que no es completamente eficiente en la eliminación de la contaminación microbiana. Igualmente el uso de una estufa Pasteur (calor seco) está limitada ya que los polímeros soporte no pueden resistir las condiciones de esterilización (160°C, 2h) sin fundirse. El autoclavado también comprometería la estabilidad del polímero. Por ello se pensó que el uso combinado de radiación ultravioleta junto con vapores de etanol sería suficiente para esterilizar la superficie. Sin embargo no lo fue. Es importante puntualizar que algunos de los polímeros utilizados en impresoras 3D son autoclavables, sin embargo su coste es muy elevado. En el futuro se diseñará un sistema de esterilización con etanol líquido, evaporación de los restos del alcohol y sellado para asegurar su esterilización.

En cuanto al cultivo de las piezas recubiertas, no se observa turbidez en el medio lo que a priori evidencia el éxito de la liberación del antibiótico por parte de la película de quitosano depositada sobre la superficie de los reservorios (Figura 12). Además, el hecho de que en el control negativo haya aparecido crecimiento cuando no debería de haberlo, da más peso al poder antimicrobiano del reservorio ya que éste ha sido capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus* así como de todas aquellas especies que se encontraban presentes en el reservorio contaminado. No obstante aunque a priori no se observe turbidez en el medio, es necesario llevar a cabo un recuento en placa por el método de las diluciones seriadas para determinar cuantitativamente el número de células viables presentes en el cultivo.

Además, como se ha mencionado anteriormente, se lleva a cabo un segundo ensayo biológico en las mismas condiciones que las anteriores para tratar de solucionar el problema de la esterilización y verificar el éxito del primer ensayo.

En esta ocasión, los resultados obtenidos son los que eran de esperar desde el principio. Se observa turbidez en el control positivo pero no en el control negativo, así como en las tres piezas recubiertas y cargadas, evidenciando de nuevo el éxito de la película de quitosano y cargada de ciprofloxacino (Figura 13).

- Diluciones seriadas y recuento en placa

Para comprobar si el efecto de los reservorios recubiertos ha sido bactericida o de inhibición del crecimiento, se ha procedido a llevar a cabo el método de diluciones seriadas y recuento en placa para determinar el número de ciclos logarítmicos que se ha conseguido reducir con respecto al control positivo en ambos ensayos (Figura 14).

En ambos ensayos, se ha conseguido una reducción considerable de la carga microbiana de 10⁸ UFC/mL hasta 10² UFC/mL (6-log) en el mejor de los casos. Con estos resultados y los

anteriormente expuestos de ganancia de peso, FTIR y XPS, se pone de manifiesto el éxito de las películas de quitosano depositadas sobre la superficie de los reservorios y cargadas con ciprofloxacino.

Para un cultivo de 10^6 UFC/mL, la MIC del ciprofloxacino es de $5 \mu\text{g/mL}$ y la MBC es de $50 \mu\text{g/mL}$. Sin embargo a los hidrogeles de quitosano se les añadió la cantidad necesaria de antibiótico para alcanzar una concentración final de $100 \mu\text{g/mL}$. Esta concentración es significativamente más alta teniendo en cuenta que se va a enfrentar el dispositivo recubierto y cargado a un cultivo de 10^2 UFC/mL. El motivo de utilizar una concentración de ciprofloxacino 2 veces mayor que la MBC es asegurar que el poco antibiótico que cargara la película de quitosano fuese suficiente para ejercer, al menos, un efecto inhibitorio sino bactericida sobre el cultivo de *S. aureus*.



*Figura 12. Primer ensayo biológico. Cultivo de 10^2 UFC/mL de *Staphylococcus aureus* tras 24 h a 37°C en presencia de reservorios de acceso venoso con y sin recubrimientos. De izquierda a derecha se muestra el control positivo, control negativo y las piezas recubiertas con quitosano y cargadas con ciprofloxacino A, B y C respectivamente. Se observa crecimiento en el control positivo como era de esperar, y también en el control negativo en el que no se debería observar crecimiento. Este hecho podría deberse a un mal método de esterilización. En las piezas A, B y C no se observa turbidez en el medio, lo que significa que el ciprofloxacino liberado al medio ha conseguido eliminar o reducir la carga microbiológica del cultivo.*



Figura 13. Segundo ensayo biológico. Cultivo de 10^2 UFC/mL de *Staphylococcus aureus* tras 24 h a 37°C en presencia de reservorios de acceso venoso con y sin recubrimientos. De izquierda a derecha se muestra las piezas A, B y C recubiertas con quitosano y cargadas de ciprofloxacino, el control positivo y el control negativo. Se observa crecimiento en el control positivo como era de esperar. Por el contrario no se observa turbidez en el medio del control negativo, en esta ocasión la esterilización ha sido efectiva. En las piezas recubiertas no se observa turbidez en el medio, hecho que pone de nuevo en manifiesto el éxito del recubrimiento y su poder antimicrobiano.

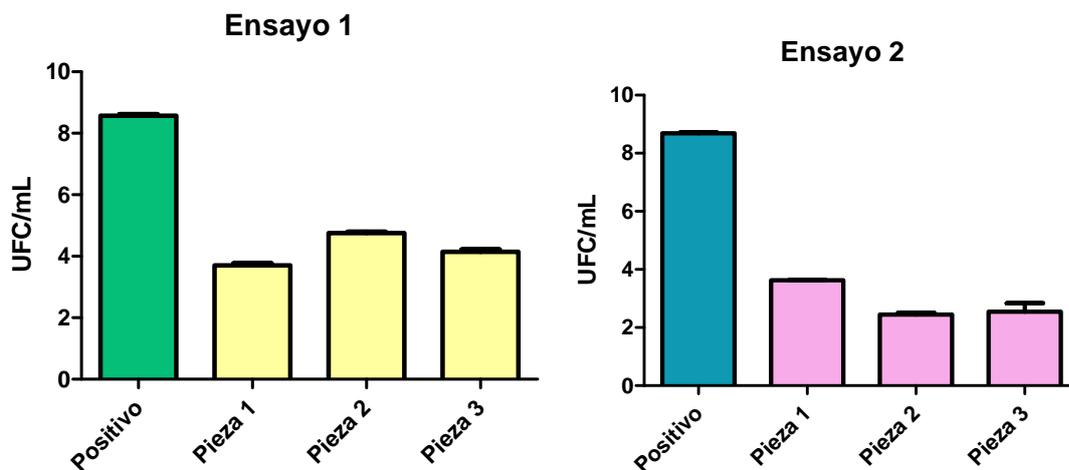


Figura 14. Representación gráfica de la reducción de ciclos logarítmicos en las piezas recubiertas con respecto al control positivo del ensayo 1 y 2. El control positivo presenta una concentración del orden de 10^8 UFC/mL y con las piezas recubiertas se consigue reducir alrededor de 5 ciclos logarítmicos con la pieza 1 en ambos ensayos y alrededor de 4 ciclos logarítmicos con las piezas 2 y 3 en el ensayo 1 y en torno a 6 ciclos logarítmicos en las piezas 2 y 3 en el ensayo 2.

6. CONCLUSIONES

- Se ha conseguido con éxito depositar, mediante el método de dip-coating, una película polimérica de quitosano y cargada de ciprofloxacino sobre un prototipo de un reservorio de acceso venoso prolongado.

- El número de capas y espesor que puede depositarse sobre el dispositivo depende del espesor máximo de la película que tiene estabilidad en el soporte, es decir, mediante la técnica de recubrimiento utilizada sólo es posible depositar 2 capas. Para conseguir un mayor espesor de película, se plantea recurrir a funcionalizar el polímero con el objetivo de lograr una mayor estabilidad entre las capas mediante enlace químico entre ellas.
- La capacidad higroscópica de absorber agua del quitosano hace posible cargar la película de polímero con el antibiótico. La cantidad de ciprofloxacino que el quitosano puede captar depende de lo hidratado que esté el hidrogel en el momento de añadir el compuesto.
- La presencia de quitosano sobre el reservorio ha sido estudiada con éxito mediante técnicas analíticas como XPS y FTIR, así como ganancia de peso con balanza de precisión, todas ellas han revelado la presencia de quitosano sobre el dispositivo médico. Además, la eficacia de la película polimérica cargada con ciprofloxacino ha sido probada indirectamente con un cultivo de *Staphylococcus aureus*. La película de quitosano en contacto con el medio de cultivo es capaz de liberar el antibiótico que albergaba, consiguiendo así una reducción de hasta 6 ciclos logarítmicos, en el mejor de los casos. Para conseguir un efecto bactericida total, sería necesario aumentar la cantidad de ciprofloxacino que la película de quitosano es capaz de captar y para ello habría que aumentar el espesor de la misma.

Conclusions

- The main goal of this investigation was the development by the dip-coating technique of a ciprofloxacin-eluting polymeric film on a central venous access device to prevent bacterial infections.
- The number of layers and their thicknesses can be modified depending on the deposition cycles repeated, but after several depositions the attachment of the coating is weak and detaches from the device, so the stability of the coating is assured by using only two deposition cycles. To achieve thicker coatings future work involving a covalent attachment between the coating and the support and the use of crosslinkers is planned.
- The hygroscopic ability of chitosan is used to adsorb a hydrophilic antibiotic drug dissolved in it. The amount of ciprofloxacin adsorbed on the chitosan depends on the hydration state of the hydrogel.
- The successful coating of antibiotic-loaded chitosan based films on the devices was monitored by using analytic techniques like XPS, FTIR and by weight gain using a precision scale. All those techniques have demonstrated that chitosan is present on the surface of the medical device. In addition, the efficiency of the ciprofloxacin loaded on the polymeric film has been tested against a strain of *Staphylococcus aureus* as a model of Gram + bacteria. The chitosan film was able to release the loaded antibiotic in contact with the release medium. In this way, we have achieved a 6-log reduction after contacting our coated devices with the mentioned bacteria. To obtain a total bactericidal effect, it would be necessary to increase the amount of ciprofloxacin that the chitosan film is able to accumulate increasing the thickness of the film or increasing the loaded drug concentration.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. OMS, *Directrices de la OMS sobre higiene de las manos en la atención sanitaria*. 2005.
2. Álvarez, C.A., et al., *Guías de práctica clínica para la prevención de infecciones intrahospitalarias asociadas al uso de dispositivos médicos*. Asociación Colombiana de Infectología, 2010.
3. Fortún, J., *Infecciones asociadas a dispositivos intravasculares utilizados para la terapia de infusión*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2008. **26**(3): p. 168-74.
4. SEQ, et al., *Tratamiento de las infecciones relacionadas con catéteres venosos de larga duración*. Revista Española de Quimioterapia, 2003. **16**(3): p. 343-360.
5. Ariza, J., G. Euba, and O. Murillo, *Infecciones relacionadas con las prótesis articulares*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2008. **26**(6): p. 380-390.
6. Cervantes-García, E., R. García-González, and P.M. Salazar-Schettino, *Características generales de Staphylococcus aureus*. Revista Latinoamericana de Patología clínica y Medicina de Laboratorio, 2014. **61**(1): p. 28-40.
7. García-Rodríguez, J., M. Pablos, and A. Gutiérrez, *El microbiólogo y la infección asociada al catéter*. Revista Española de Quimioterapia, 2010. **23**(2): p. 53-62.
8. SEQ and SECOT, *Diagnóstico, tratamiento y prevención de la infección de prótesis articulares*. Revista Española de Quimioterapia, 2003. **16**(4): p. 467-478.
9. Gorski, L.A., *Central venous access device associated infections*. Home Healthcare Nurse, 2010. **28**(4).
10. Raad, II, et al., *Prevention of central venous catheter-related infections by using maximal sterile barrier precautions during insertion*. Infect Control Hosp Epidemiol, 1994. **15**(4 Pt 1): p. 231-8.
11. DG, M., R. M, and A. CJ, *Prospective randomised trial of povidone-iodine, alcohol, and chlorhexidine for prevention of infection associated with central venous and arterial catheters*. Lancet, 1991. **338**: p. 339-43.
12. Regiel, A., et al., *Preparation and characterization of chitosan-silver nanocomposite films and their antibacterial activity against Staphylococcus aureus*. Nanotechnology, 2013. **24**(1): p. 015101.
13. Rupp, M.E., et al., *Effect of a second-generation venous catheter impregnated with chlorhexidine and silver sulfadiazine on central catheter-related infections: a randomized, controlled trial*. Ann Intern Med, 2005. **143**(8): p. 570-80.
14. PE, M., et al., *The ex vivo antimicrobial activity and colonization rate of two antimicrobial-bonded central venous catheters*. Critical Care Medicine, 1999. **27**: p. 1128-31.
15. RO, D., et al., *Comparison of two antimicrobial impregnated central venous catheters*. The New England Journal of Medicine, 1999. **340**: p. 1-8.
16. RO, D., et al., *Comparison of antimicrobial impregnation with tunneling of long-term central venous catheters. A randomized controlled trial*. Annals of Surgery, 2005. **242**: p. 193-200.

17. Vázquez Prado, A., et al., *Reservorios, acceso venoso de larga duración. Abordaje y complicaciones*. 2011.
18. Tapia P, C., et al., *Efecto antifúngico de quitosán de alto peso molecular en cepas de Candida sp aisladas de muestras clínicas*. Revista chilena de infectología, 2009. **26**: p. 515-519.
19. K., S., *Preparation and characterization of chitin and chitosan derivates*. Carbohydrate Polymers, 1999. **36**: p. 49-59.
20. Acosta, N., et al., *Extraction and characterization of chitin from crustaceans*. Biomass and Bioenergy, 1993. **5**(2): p. 145-153.
21. Muzzarelli, R.A., A. Isolati, and A. Ferrero, *Chitosan membranes*. Ion Exchange and Membranes, 1974. **1**(4): p. 193-196.
22. Sashiwa, H., et al., *Lysozyme susceptibility of partially deacetylated chitin*. Int J Biol Macromol, 1990. **12**(5): p. 295-6.
23. Shigemasa, Y., et al., *Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins*. Int J Biol Macromol, 1994. **16**(1): p. 43-9.
24. Dinesh, S. and R. Alok, *Biomedical applications of chitin, chitosan, and their derivatives*. Macromolecular Chemistry and Physics, 2000. **40**(1): p. 69-83.
25. V., C.V. and J.I. Arias, *Potenciales aplicaciones de películas de quitosano en alimentos de origen animal: una revisión*. Avances en Ciencias Veterinarias, 2012. **27**(1): p. 33-47.
26. Goy, R.C., D.d. Britto, and O.B.G. Assis, *A review of the Antimicrobial Activity of Chitosan*. Polímeros: Ciência e Tecnologia, 2009. **19**(3): p. 241-247.
27. Meng, S., et al., *The effect of a layer-by-layer chitosan-heparin coating on the endothelialization and coagulation properties of a coronary stent system*. Biomaterials, 2009. **30**(12): p. 2276-83.
28. Muzzarelli, R.A.A., *Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids*. Carbohydrate Polymers, 2009. **77**(1): p. 1-9.
29. Silva, S.S., et al., *Effect of crosslinking in chitosan/aloe vera-based membranes for biomedical applications*. Carbohydrate Polymers, 2013.
30. Harris, R.E., *Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos*, in *Bioquímica y Biología Molecular I2010*, Universidad Complutense de Madrid: Madrid.
31. Karnchanajindanun, J., *Preparation and characterization of genipin-cross-linked chitosan microparticles by water-in-oil emulsion solvent diffusion method*. Natural Science, 2010. **02**(10): p. 1061-1065.
32. Nadetech Innovations S.L.
33. Sánchez, A., et al., *Síntesis y caracterización de hidrogel de quitosano obtenido a partir de camarón langostino con potenciales aplicaciones biomedicas*. Revista Iberoamericana de Polímeros, 2007. **8**(4): p. 241-267.
34. Li, Q., et al., *Synthesis and characterization of chitosan-based hydrogels*. International Journal of Biological Macromolecules, 2009. **44**(2): p. 121-127.
35. Lawrie, G., et al., *Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers using FTIR and XPS*. Biomacromolecules, 2007. **8**: p. 2533-2541.
36. Bashari, A., N. Hemmatinejad, and A. Pourjavadi, *Hydrophobic nanocarriers embedded in a novel dual-responsive poly(N-isopropylacrylamide)/chitosan/(β -cyclodextrin) nanohydrogel*. Journal of Polymer Research, 2013. **20**(10): p. 1-10.

37. Kim, S., et al., *Evaluations of Nerve Cell Compatibility of Self Cross-Linking Chitosan-Poly(Ethylene Oxide) Hydrogel*. Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2012. **9**(2): p. 84-91.
38. IU, K., et al., *Continuous-flow encapsulation of ketoprofen in copolymer microbeads via co-axial microfluidic device: influence of operating and material parameters on drug carrier properties*. International journal of Pharmaceutics, 2013. **441**(1-2): p. 809-817.
39. Zhang, Y.F., et al., *Synthesis of ambient temperature self-crosslinking VTES-based core-shell polyacrylate emulsion via modified micro-emulsion polymerization process*. Polymer Bulletin, 2013. **70**(5): p. 1631-1645.
40. Shi, H., et al., *Structure and properties of mixtures based on long chain polyacrylate and 1-alcohol composites*. Materials chemistry and physics, 2014. **143**(3): p. 1069-1074.
41. Hussain, T., et al., *Chemically Cross-Linked Poly(acrylic-co-vinylsulfonic) Acid Hydrogel for the Delivery of Isosorbide Mononitrate*, vol. 2013, Article ID 340737, 9 pages, 2013. . The Scientific World Journal, 2013. **21**(10): p. 2805-2816.
42. Mahdavinia, G., A. Pourjavadi, and M. Zohuriaan-Mehr, *A convenient one-step preparation of chitosan-poly (sodium acrylate-co-acrylamide) hydrogel hybrids with super-swelling properties*. Journal of applied polymer science, 2006. **99**(4): p. 1615-1619.
43. Fu, G., et al., *Synthesis and lipoprotein sorption properties of porous chitosan beads grafted with poly(acrylic acid)*. Reactive and Functional Polymers, 2006. **66**(2): p. 239-246.
44. Abenojar, J., et al., *Surface modifications of polycarbonate (PC) and acrylonitrile butadiene styrene (ABS) copolymer by treatment with atmospheric plasma*. Surface and Coatings Technology, 2009. **203**(16): p. 2173-2180.
45. C, B., et al., *First attempts at an elucidation of the interface structure resulting from the interaction between methacrylonitrile and a platinum anode: An experimental and theoretical (ab initio) study*. Surface Science, 1996. **355**(1-3): p. 177-202.
46. Huang, P., M. Cao, and Q. Liu, *Adsorption of chitosan on chalcopyrite and galena from aqueous suspensions*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2012. **409**: p. 167-175.
47. H., K., et al., *Composition and Bonding Properties of Carbon Nitride Films Grown by Electrochemical Deposition Using Acrylonitrile Liquid*. Japanese Journal of Applied Physics 2008. **47**(2): p. 1050-1055.

8. ANEXO A

1. Especificaciones de los materiales para fabricar los prototipos

Los tres materiales utilizados para la impresión de los reservorios proceden de la casa comercial Polyjet. Las especificaciones de estos tres materiales, Veroclear RGD180 (transparente), RGD720 (amarillo) y RGD525 (blanco alta temperatura), se detallan a continuación. A lo largo del trabajo, estos tres materiales se denominarán como polímero A, B y C, respectivamente.

Veroclear RGD810					
	ASTM	Units	Metric	Units	Imperial
Tensile strength	D-638-03	MPa	50-65	psi	7250-9450
Elongation at break	D-638-05	%	10-25	%	10-25
Modulus of elasticity	D-638-04	MPa	2000-3000	psi	290,000-435,000
Flexural Strength	D-790-03	MPa	75-110	psi	11000-16000
Flexural Modulus	D-790-04	MPa	2200-3200	psi	320,000-465,000
HDT, °C @ 0.45MPa	D-648-06	°C	45-50	°F	113-122
HDT, °C @ 1.82MPa	D-648-07	°C	45-50	°F	113-122
Izod Notched Impact	D-256-06	J/m	20-30	ft lb/inch	0.375-0.562
Water Absorption	D-570-98 24hr	%	1.1-1.5	%	1.1-1.5
Tg	DMA, E»	°C	52-54	°F	126-129
Shore Hardness (D)	Scale D	Scale D	83-86	Scale D	83-86
Rockwell Hardness	Scale M	Scale M	73-76	Scale M	73-76
Polymerized density	ASTM D792	g/cm3	1.18-1.19		
Ash content	USP281	%	0.02-0.06	%	0.02-0.06

RGD720					
	ASTM	Units	Metric	Units	Imperial
Tensile strength	D-638-03	MPa	50-65	psi	7250-9450
Elongation at break	D-638-05	%	15-25	%	15-25
Modulus of elasticity	D-638-04	MPa	2000-3000	psi	290,000-435,000
Flexural Strength	D-790-03	MPa	80-110	psi	12000-16000
Flexural Modulus	D-790-04	MPa	2700-3300	psi	390,000-480,000
HDT, °C @ 0.45MPa	D-648-06	°C	45-50	°F	113-122
HDT, °C @ 1.82MPa	D-648-07	°C	45-50	°F	113-122
Izod Notched Impact	D-256-06	J/m	20-30	ft lb/inch	0.375-0.562
Water Absorption	D-570-98 24hr	%	1.5-2.2	%	1.5-2.2
Tg	DMA, E»	°C	48-50	°F	118-122
Shore Hardness (D)	Scale D	Scale D	83-86	Scale D	83-86
Rockwell Hardness	Scale M	Scale M	73-76	Scale M	73-76
Polymerized density	ASTM D792	g/cm3	1.18-1.19		
Ash content	USP281	%	0.01-0.02	%	0.01-0.02

High Temperature Material (RGD525)					
	ASTM	Units	Metric	Units	Imperial
Tensile strength	D-638-03	MPa	70-80	psi	10,000-11,500
Elongation at break	D-638-05	%	10-15	%	10-15
Modulus of elasticity	D-638-04	MPa	3200-3500	psi	465,000-510,000
Flexural Strength	D-790-03	MPa	110-130	psi	16,000-19,000
Flexural Modulus	D-790-04	MPa	3100-3500	psi	450,000-510,000
HDT, °C @ 0.45MPa	D-648-06	°C	63-67	°F	145-163
HDT, °C @ 0.45MPa after thermal post treatment procedure A	D-648-06	°C	75-80	°F	167-176
HDT, °C @ 1.82MPa	D-648-07	°C	55-57	°F	131-135
Izod Notched Impact	D-256-06	J/m	14-16	ft lb/inch	0.262-0.300
Water Absorption, %	D-570-98 24hr	%	1.2-1.4	%	1.2-1.4
Tg	DMA, E»	°C	62-65	°F	144-149
Shore Hardness D	Scale D	Scale D	87-88	Scale D	87-88
Rockwell Hardness	Scale M	Scale M	78-83	Scale M	78-83
Polymerized density	ASTM D792	g/cm3	1.17-1.18		
Ash content	USP281	%	0.38-0.42	%	0.38-0.42

2. Reactivos

- Quitosano: suministrado por Sigma-Aldrich, de peso molecular medio y grado de desacetilación entre 75 y 85%.
- Ácido acético: suministrado por Sigma-Aldrich, de 99-100% de pureza.
- Hidróxido de sodio: suministrado por Sigma-Aldrich, pastillas anhidras de $\geq 98\%$ de pureza.
- Rodamina B isotiocianato: suministrado por Sigma-Aldrich. Mezcla de isómeros
- Ciprofloxacino: suministrado por RT Pharma
- PBS 10X: suministrado por Sigma-Aldrich, pH $\approx 7,4$. Se debe diluir para conseguir PBS al 1X.
- TSA: suministrado por Panreac Química S.A.U. Soja Triptona (TSA), Agar, medio deshidratado. Se debe diluir en agua miliQ.
- TSB: suministrado por Panreac Química S.A.U. Soja triptona (TSB), caldo, medio deshidratado. Se debe diluir en agua miliQ.
- Etanol absoluto: suministrado por AppliChem Panreac.
- Pastillas liofilizadas de *S. aureus*: suministrado por Ielab. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 5 unidades rango alto, concentración >100 ufc/pastilla.

3. Equipos

- Impresora 3D: el modelo utilizado es el Objet Eden 350V, procedente del Departamento de Ingeniería de Diseño y Fabricación de la Escuela de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad de Zaragoza. Es una impresora de alta gama cuya principal característica es que es capaz de trabajar con muy buena precisión dimensional y con diferentes materiales con superficies lisas, paredes delgadas y formas complejas.



Impresora 3D Objet Eden 350V

- Sistema de dip-coating: mecanismo de dip-coating basado en un sistema de vasos comunicantes y una bomba peristáltica. Gracias a la bomba, los vasos van vaciándose de manera que el dispositivo a recubrir se va quedando al descubierto.



Sistema de vasos comunicantes y bomba peristáltica utilizado para llevar a cabo el dip-coating.

- FTIR: el modelo utilizado es el Bruker Vertex 70 equipado con detector DTGS y accesorio ATR Goleen Gate diamond, del Instituto de Nanociencia de Aragón. Cada espectro se obtiene mediante reflectancia total atenuada usando 40 barridos con una resolución de 2cm^{-1} en el rango de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$.



Espectrómetro FTIR Bruker Vertex 70

- XPS: el modelo utilizado es el Axis Uktra DLD (Kratos Technology) del Instituto de Nanociencia de Aragón. El espectro se excita mediante una fuente monocromática Al K α (1486.6 eV) a 15 kV y 10 mA. En el análisis de cada una de las regiones se utiliza una energía de paso de 20 eV. El espectro general se mide con una energía de paso de 160 eV.

El análisis de los picos se obtiene con el software CasaXPS, usando como funciones de ajuste, la suma de las funciones de ajuste Lorentziano y Gaussiano después de restar la línea base. Las energías de enlace están referenciadas al estándar interno del C 1s (284.9 eV).



*Espectroscopio de fotoelectrones emitidos por rayos X
modelo Axis Uktra DLD*

- Espectrofotometría UV-visible: el modelo utilizado es el Varian Cary 50 probe del Instituto de Nanociencia de Aragón. Se trata de un espectrofotómetro de un único haz, con lámpara de Xenon flash, mediciones de muestra de hasta 3 abs, resolución <1,5 nm y rango de longitudes de onda entre 190-1100 nm.



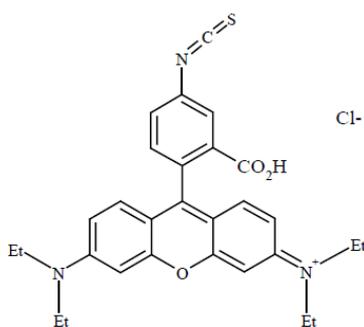
*Espectrofotómetro UV- Visible
modelo Varian Cary 50 probe*

- SEM ambiental o ESEM: el modelo utilizado es el QUANTA FEG 250 de la marca FEI. Utiliza una fuente de emisión de campo. Las imágenes se toman a diferentes presiones, unas a 100 Pa en las que se utiliza un detector de electrones secundarios para fase gas llamado GSED (gaseus secondary electron detector) y otras a 70 Pa con utilizando un detector específico para bajo vacío (no superior a 120 Pa) llamado LFD (Large field detector).

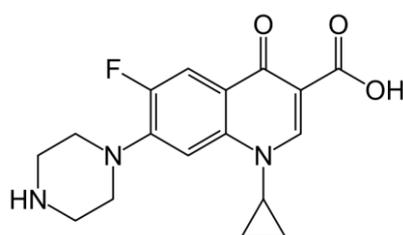


Microscopio electrónico de barrido modelo HITACHI S2300.

4. Estructuras químicas



Estructura química de la Rodamina B isotiocianato



Estructura química del ciprofloxacino

9. ANEXO B

1. Resultados

1.1. Espectros de FTIR del quitosano y los polímeros sin recubrir

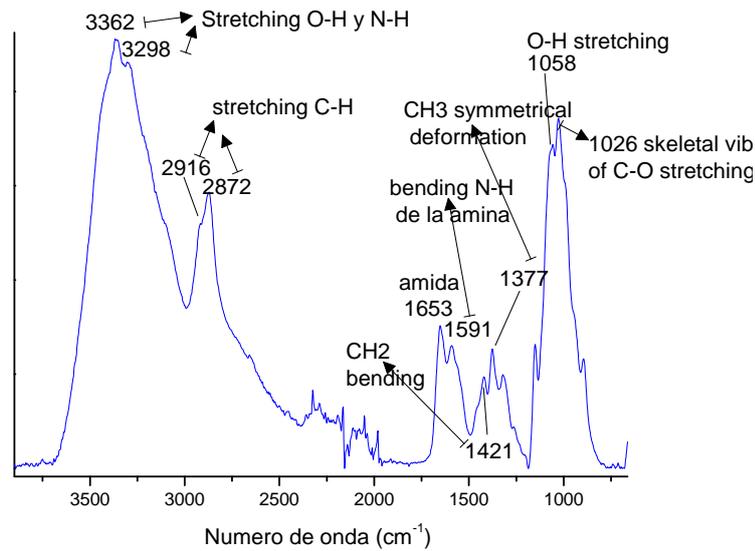


Figura 1. Espectro FTIR del quitosano (peso molecular medio) y asignación de cada pico.

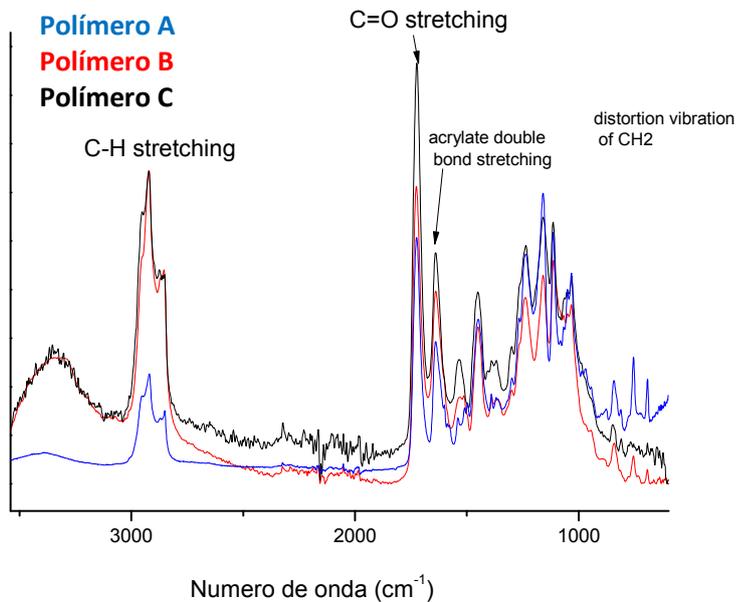


Figura 2. Espectro FTIR del material con el que se ha fabricado cada polímero (blancos) y asignación de cada pico. Como ya se ha mencionado anteriormente, los tres reservorios están fabricados en distintos tipos de metacrilatos (A, B y C) y tienen espectros similares.

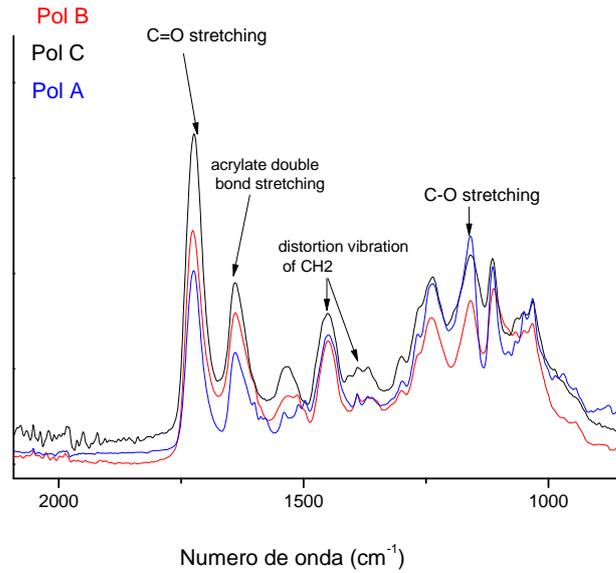


Figura 3. Espectro FTIR del material con el que se ha fabricado cada polímero (blancos) y asignación de cada pico. Ampliado el rango de 1000 a 2000 cm^{-1} .

1.2. Gráficos de deconvolución del N 1s

Estudio de la coordinación de los átomos. Se estudian los orbitales del nitrógeno para conocer las distintas formas en las que puede encontrarse en el polímero.

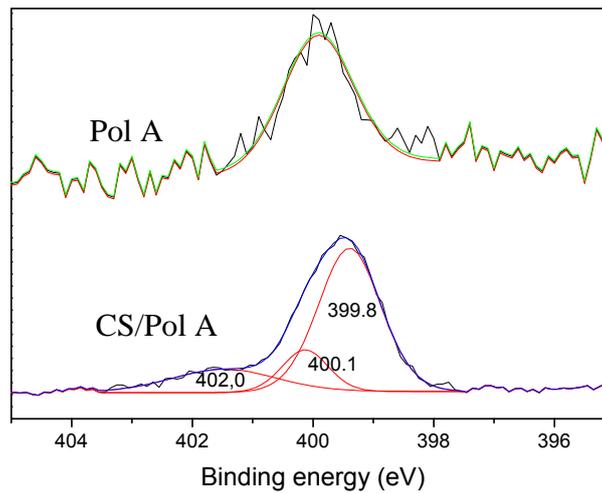


Figura 4. Deconvolución N 1s del polímero A sin recubrir (arriba) y recubierto con quitosano (abajo).

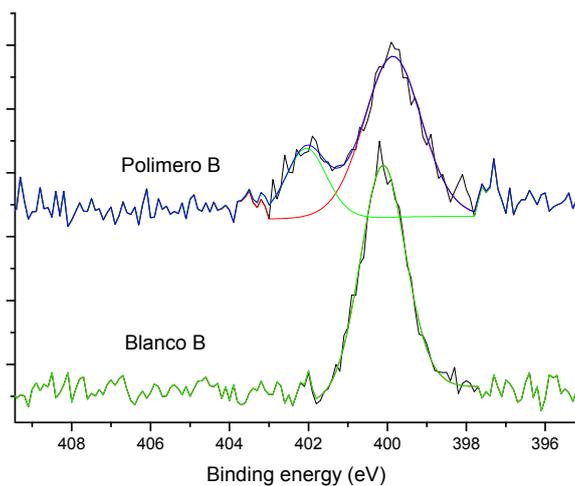


Figura 5. Deconvolución N 1s del polímero B sin recubrir (abajo) y recubierto con quitosano (arriba).

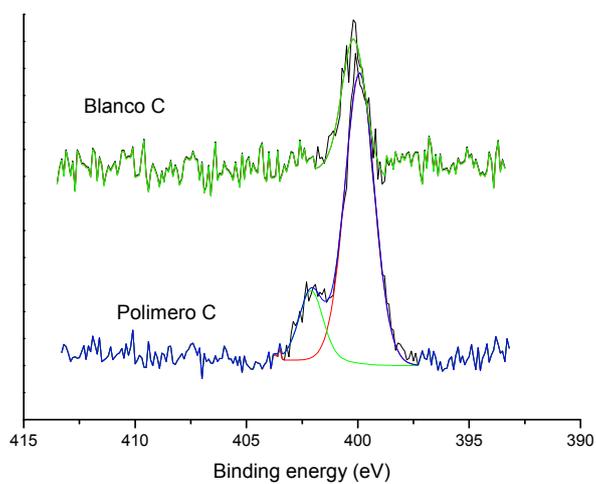
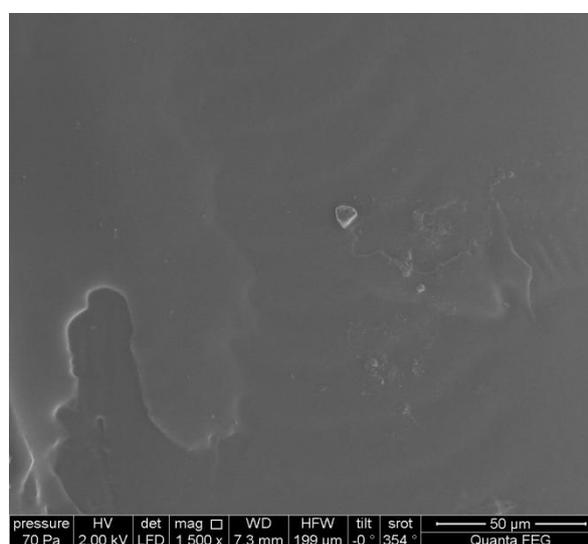
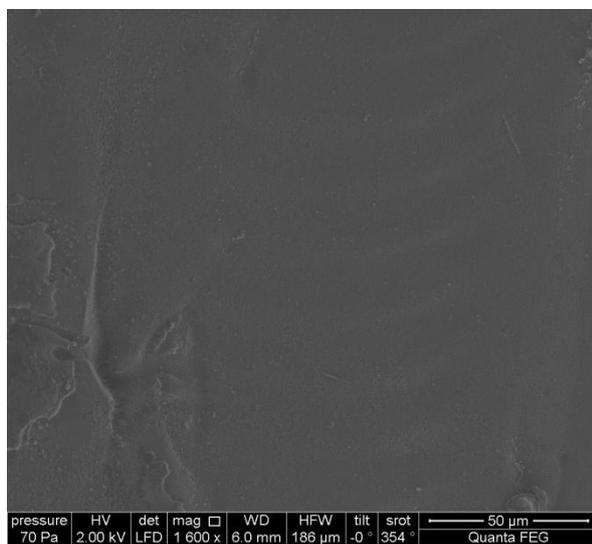
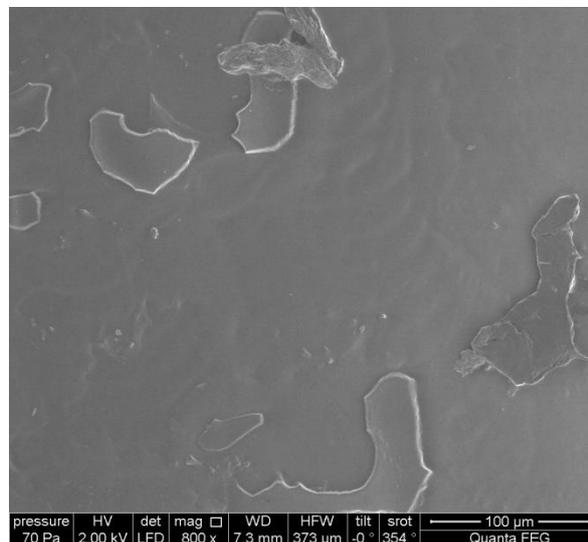
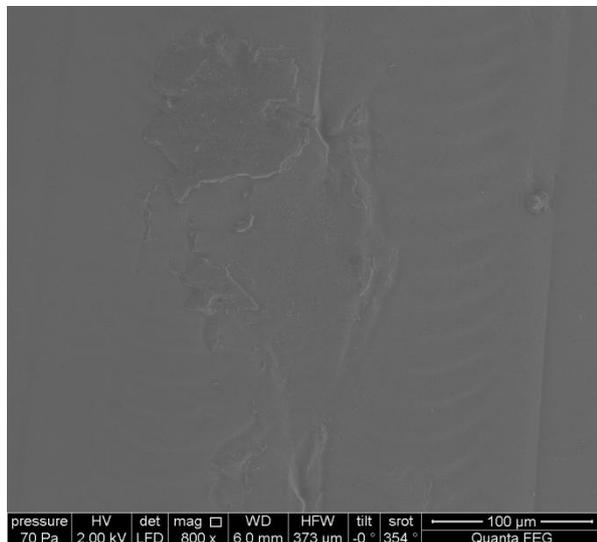


Figura 6. Deconvolución N 1s del polímero C sin recubrir (arriba) y recubierto con quitosano (abajo).

1.3. Imágenes de Microscopía electrónica de barrido



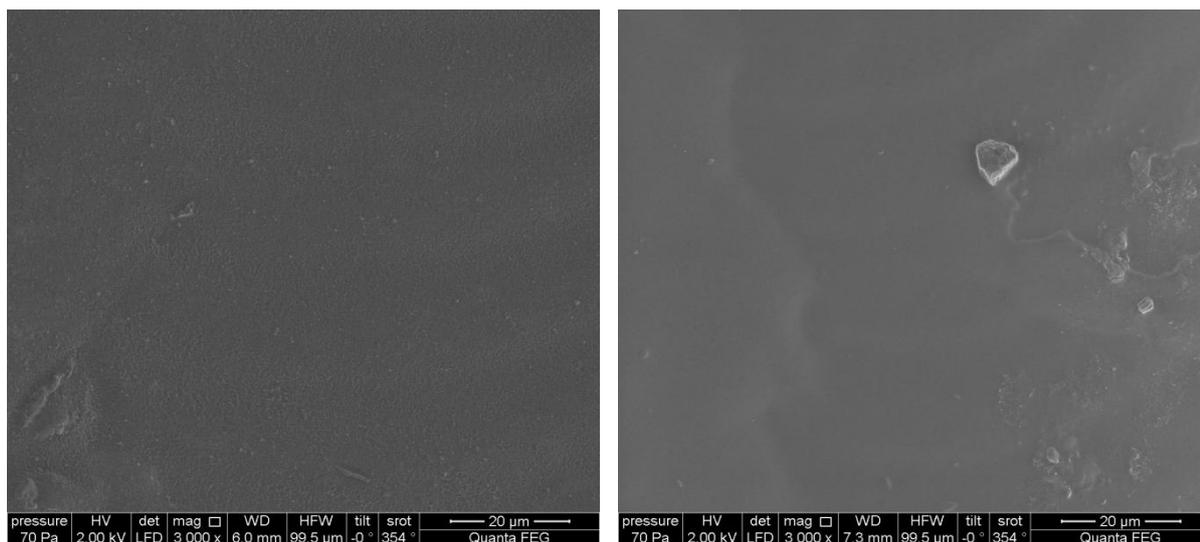


Figura 7. Imágenes de microscopía electrónica de barrido, tomadas a distintos aumentos, de la superficie de reservorios de acceso venoso fabricados con el polímero A, sin recubrir (izquierda) y recubiertos de quitosano (derecha). En el polímero recubierto se aprecian deposiciones irregulares de lo que podría ser quitosano.