

E.T.S. de Ingeniería Industrial,
Informática y de Telecomunicación

Desarrollo y caracterización de
recubrimientos biocidas basados en
nanopartículas de plata depositadas
mediante Electrospraying



Grado en Ingeniería Biomédica

Trabajo Fin de Grado

Autora: Leire Murillo Larrey

Director: Rafael Rodríguez Trías

Pamplona, septiembre de 2022

upna
Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 5 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 6 |
| 1.1 Justificación | 6 |
| 1.2 Origen del proyecto | 8 |
| 2. ESTADO DEL ARTE | 9 |
| 2.1 Superficies biocidas | 9 |
| 2.2 Electro spraying | 13 |
| 2.3 Plata como agente biocida | 17 |
| 2.4 Nanopartículas en el ámbito médico | 19 |
| 3. OBJETIVOS | 20 |
| 3.1 Objetivo general | 20 |
| 3.2 Objetivos específicos | 20 |
| 4. METODOLOGÍA | 21 |
| 4.1 Desarrollo del recubrimiento | 21 |
| 4.1.1 Elección y pretratamiento del sustrato | 21 |
| 4.1.2 Síntesis de las nanopartículas de plata (AgNPs) | 23 |
| 4.1.3 Deposición mediante Electro spraying | 25 |
| 4.2 Técnicas de caracterización | 26 |
| 4.2.1. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) | 26 |
| 4.2.2 Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS) | 27 |
| 4.2.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM) | 27 |
| 4.2.4 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) | 28 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 29 |
| 5.1 Tanda 1 | 29 |
| 5.1.1 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) | 31 |
| 5.1.2 Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS) | 34 |
| 5.2 Tanda 2 | 36 |
| 5.2.1 Microscopía de fuerza atómica (AFM) | 38 |
| 5.2.2 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) | 40 |
| 6. CONCLUSIONES | 43 |
| 7. LÍNEAS FUTURAS | 43 |
| 8. REFERENCIAS | 44 |
| ANEXO I - Medida de la tensión superficial mediante el método del anillo de Du Noüy | 47 |
| ANEXO 2 - Medida de la conductividad eléctrica de la disolución | 48 |

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han acompañado y me han ayudado a lo largo de este proyecto.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a Eli, Antonio e Ignacio, investigadores de la Universidad de Málaga, por abrirme las puertas de su laboratorio y acompañarme día a día en el desarrollo del proyecto.

A mi tutor, Rafael Rodríguez, por darme la oportunidad de realizar este trabajo e introducirme en el mundo de la Ingeniería de Materiales.

A mis compañeros de clase, por acompañarme y ayudarme durante los cuatro años de carrera.

Y, por último, a mi familia y amigos, por apoyarme tanto en los buenos como en los malos momentos.

RESUMEN

Las infecciones y las enfermedades infecciosas son una amenaza para la salud humana. La transmisión y propagación de microorganismos en instalaciones hospitalarias es un gran problema de salud a nivel mundial, agravado por la resistencia a los antibióticos que están desarrollando las bacterias. Por todo ello, en el presente trabajo se plantea una estrategia para desarrollar una superficie autodesinfectante, capaz de matar agentes patógenos al entrar en contacto con ella. Para ello, se han depositado nanopartículas de plata sobre superficies de acero inoxidable mediante Electro spraying, una técnica de electropulverización que permite realizar una deposición homogénea de las nanopartículas.

Palabras clave: recubrimiento, nanopartícula de plata, Electro spray, microorganismo, biofilm

ABSTRACT

Infections and infectious diseases are a threat to human health. The transmission and spread of microorganisms in hospital facilities is a major health problem worldwide, aggravated by the resistance to antibiotics that bacteria are developing. Therefore, this work proposes a strategy to develop a self-disinfecting surface, capable of killing pathogens on contact with it. For this purpose, silver nanoparticles have been deposited on stainless steel surfaces by electro spraying, an electro spraying technique that allows a homogeneous deposition of the nanoparticles.

Keywords: coating, silver nanoparticle, Electro spray, microorganism, biofilm

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Justificación

Es bien sabido que nuestro planeta está gobernado por microorganismos, como bacterias, virus y hongos. Sin embargo, en ocasiones es necesario tener cierto control sobre la población microbiana, especialmente en el ámbito médico.

Cuando un paciente ingresado en un hospital adquiere una infección durante su estancia, sin que la infección estuviera presente ni en periodo de incubación a su llegada, se considera que ha adquirido una infección nosocomial (IN). Según el Estudio de Prevalencia de Infecciones Nosocomiales (EPINE), la prevalencia de las IN en España en 2021 fue del 7,81% [1] y aunque los datos muestren una tendencia descendente con el paso de los años, este tipo de infecciones siguen siendo una problemática importante del Sistema Mundial de Salud. Esto se debe principalmente a que son infecciones que generan altas tasas de mortalidad y morbilidad, prolongan la estancia hospitalaria del paciente y aumentan notablemente los costes asistenciales.

Tal y como se observa en la *Figura 1*, los microorganismos se pueden transmitir a través de gotas (5-500 μ m), aerosoles (<5 μ m) y por contacto (directo o indirecto). El contacto indirecto es la vía de transmisión más común en el ámbito hospitalario [2], en el que existe un elemento intermediario (fómite) que transmite la infección desde la fuente hasta el huésped. El instrumental médico o las superficies hospitalarias son ejemplos de posibles fómites. Es por ello, que en la actualidad existen numerosos protocolos de limpieza para minimizar la transmisión de microbios, como es la desinfección periódica de objetos y superficies. Estos métodos, a pesar de ser efectivos, acaban siendo tareas tediosas, que además, incluyen la producción de contaminantes ambientales.

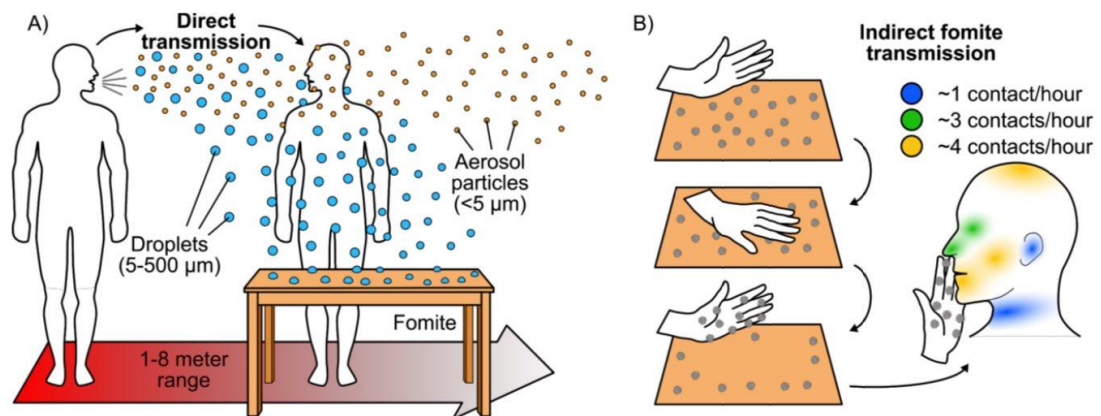


Figura 1 - Esquema de las vías de transmisión de los microorganismos [3]

A esto se le suma la problemática que existe en relación a la formación de biofilms bacterianos en dispositivos médicos. Las bacterias pueden estar en dos estados diferentes, el estado planctónico (libres flotando en un fluido), y el estado sésil (adheridas a una superficie). Cuando se introduce un dispositivo médico implantable y/o protésico en el interior de un organismo, las bacterias cambian su estado y comienzan a adherirse a la superficie, creando agrupaciones y formando colonias (*Figura 2*). Además, secretan un material polimérico extracelular (EPS) que produce una barrera protectora que las protege del sistema de defensa del organismo y de agentes externos como los antibióticos, lo que dificulta su eliminación. Como consecuencia, se pueden dar infecciones graves infecciones y fallos en los dispositivos.

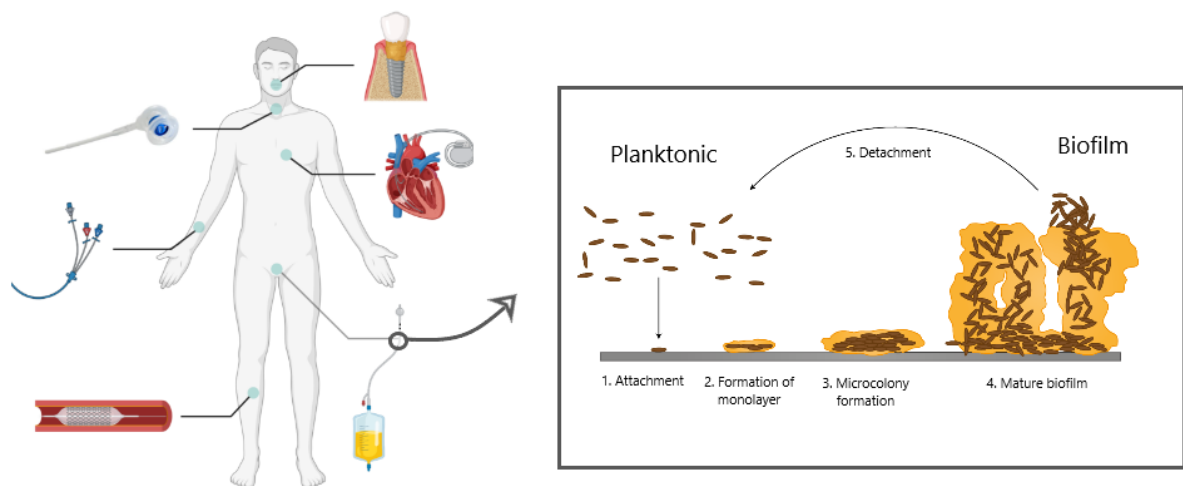


Figura 2 - Esquema de formación de biofilms bacterianos en dispositivos médicos implantables [4, 5]

Por todo ello, el proyecto planteado propone el desarrollo de recubrimientos con propiedades biocidas, destinados a ser empleados en el ámbito médico. Estos recubrimientos limitarían la transmisión y propagación de microorganismos a través de superficies y objetivos, siendo una alternativa más eficaz a los protocolos de desinfección presentes en la actualidad y evitando la formación de biofilms bacterianos.

Para ello, y teniendo en cuenta las propiedades físico-químicas que contienen ciertos nanomateriales, se van a producir recubrimientos poliméricos dopados con nanopartículas de plata (AgNPs), que van a ser las encargadas de proporcionar el carácter biocida al recubrimiento. Para su fabricación, se va a emplear la técnica de Electrospaying, una técnica de electropulverización que permite realizar una deposición homogénea de las nanopartículas. Además, considerando que el acero inoxidable es un material ampliamente utilizado en el ámbito médico, parte de la metodología propuesta está específicamente orientada para este material, por lo que los recubrimientos desarrollados están enfocados al uso sobre superficies de acero inoxidable.

1.2 Origen del proyecto

El proyecto se ha desarrollado durante una estancia en la Universidad de Málaga, gracias al programa de movilidad nacional SICUE. En concreto, el trabajo se ha realizado en colaboración con el grupo de investigación de Mecánica de Fluidos de la Escuela de Ingenierías Industriales de dicha universidad, dirigido por Ignacio Loscertales.

Durante el comienzo de la pandemia producida por el virus COVID-19, las vías de transmisión del virus no eran conocidas e incluso se afirmaba que el virus podía ser fácilmente transmitido a través de las superficies. Es por ello, por lo que el grupo de investigadores mencionado planteó diseñar y desarrollar unos recubrimientos antivirales depositando nanopartículas de plata mediante Electrospaying, técnica muy empleada en su laboratorio. Estos recubrimientos estarían destinados al empleo en hospitales, ya que, como se ha comentado, son un potente foco de infección. El proyecto fue nombrado como el proyecto KILLVIR. Finalmente, por diversos motivos el proyecto no pudo salir adelante. Por ello, en el presente trabajo se propone hacer uso de la metodología planteada para desarrollar recubrimientos antimicrobianos de amplio espectro, orientados a recubrir superficies de acero inoxidable.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 Superficies biocidas

La función principal de las superficies biocidas en el ámbito médico es prevenir infecciones, ya que ponen en riesgo la salud del individuo y su tratamiento eleva en gran medida los costes médicos. Mientras que las primeras tecnologías usadas anteriormente se centraban en tener un efecto biocida a corto plazo, las tecnologías recientes están cambiando su enfoque con el objetivo de obtener funcionalidad a más largo plazo [6].

Por lo general, se pueden clasificar en dos categorías: los recubrimientos que utilizan fármacos embebidos en una matriz polimérica, y los que consiguen capacidad antimicrobiana sin el uso de fármacos.

Recubrimientos liberadores de fármacos

Los **recubrimientos liberadores de fármacos** están constituidos por una matriz polimérica cargada con el principio activo (un antibiótico o un fármaco antifúngico). Los fármacos se encuentran encapsulados y producen un efecto antimicrobiano local mediante su liberación.

Esta liberación debe producirse de manera controlada para evitar una toxicidad local elevada. Puede darse de 3 formas (*Figura 3*): liberación desde la superficie, difusión a través de la matriz polimérica y liberación debido a la erosión del polímero.

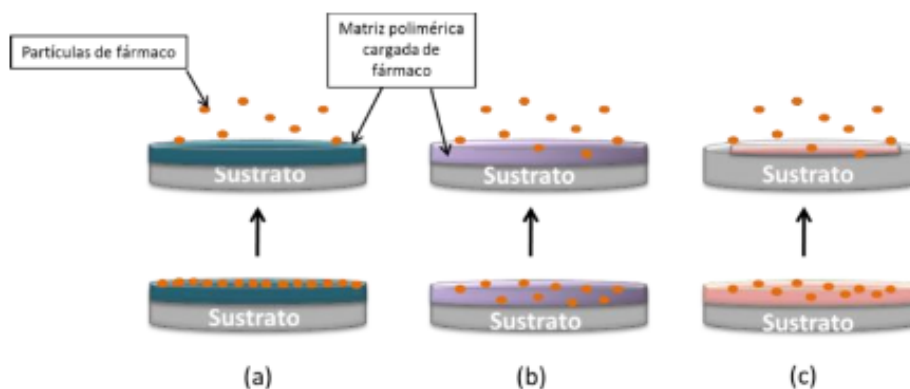


Figura 3 - Mecanismos de liberación de fármacos en recubrimientos biocidas liberadores de fármacos
a) Liberación superficial, b) Liberación por difusión, c) Liberación por erosión [7]

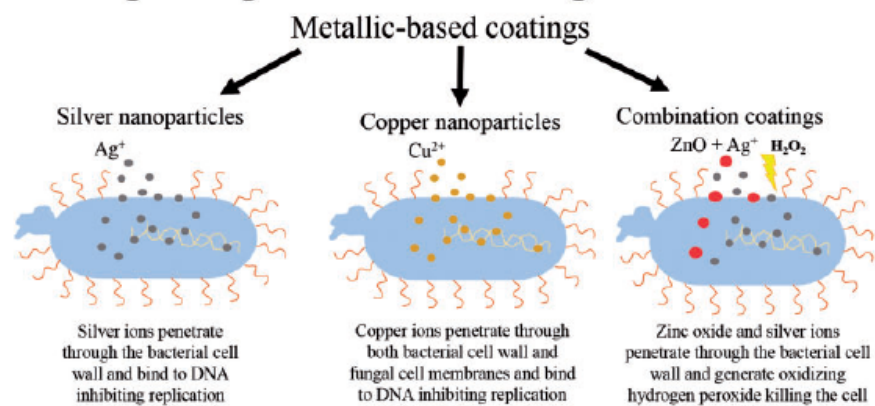
Recubrimientos no liberadores de fármacos

Se basan en alcanzar la capacidad biocida sin utilizar fármacos, utilizando las propiedades intrínsecas del material. Resultan especialmente ventajosos porque evitan fomentar la resistencia a los antibióticos de las bacterias y tienen actividad biocida a largo plazo.

Se pueden dividir en:

- **Recubrimientos metálicos:** han mostrado tener gran éxito los formados por nanopartículas de plata, titanio, zinc y cobre [8-11].
- **Recubrimientos poliméricos:** se han desarrollado con éxito muchos recubrimientos basados en polímeros utilizando diferentes sales de amonio cuaternario y polímeros catiónicos [12]. Funcionan principalmente a través de una disrupción de la membrana plasmática utilizando cargas catiónicas o interacciones hidrofóbicas que repelen la adherencia a la superficie.

(a) Non-drug-eluting antimicrobial coatings: mechanisms of action



(b)

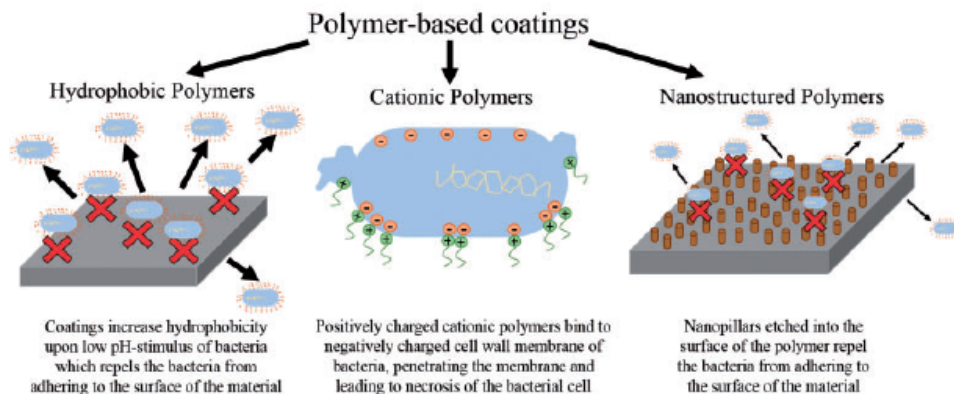


Figura 4 - Esquema de los principales recubrimientos biocidas no liberadores de fármacos [6]

Métodos de deposición

Los principales métodos de deposición de recubrimientos poliméricos se pueden clasificar en métodos a partir de fase gaseosa y de fase líquida.

Entre los métodos a partir de **fase gaseosa**, se encuentran:

- **Deposición química de vapor (CVD):** se basa en la reacción química de una mezcla de vapores con un sustrato, en un reactor CVD. Para que se de la reacción debe haber un sistema de activación: calentamiento, activación por plasma, activación por fotones...

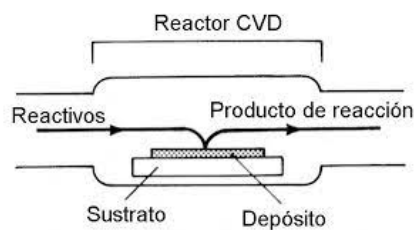


Figura 5 - Esquema de la técnica de deposición química de vapor [13]

- **Deposición física de vapor (PVD):** se basa en el empleo de medios físicos para obtener el material que se quiere depositar, en fase vapor. Posteriormente, vuelve a la fase condensada, formando una delgada película. Existen numerosos tipos, algunos ejemplos son:
 - **Electron beam:** un ánodo es bombardeado con un haz de electrones formado por un filamento cargado en condiciones de alto vacío. Esto produce la evaporación de los átomos del material, que precipitan en forma sólida sobre toda la cámara de vacío, formando la deposición de una fina capa de material.
 - **Pulverización catódica:** proceso físico en el que se bombardea mediante iones energéticos el material que desea depositarse, produciendo la vaporización del material y, como consecuencia, su deposición.

Electron-beam

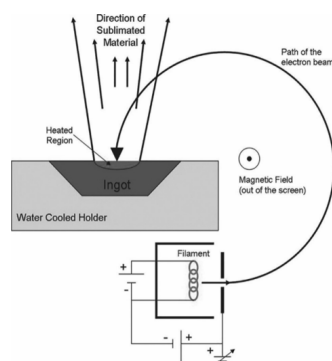


Figura 6 - Electron-beam [14]

Pulverización catódica

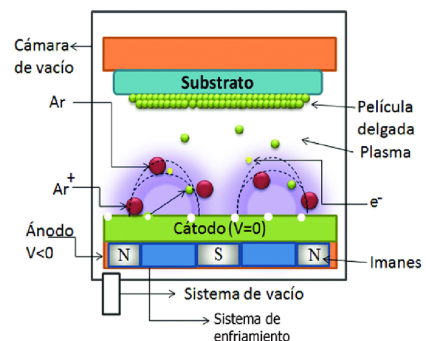


Figura 7 - Pulverización catódica [15]

Entre los métodos a partir de **fase líquida**, se encuentran:

- **Dip Coating:** por inmersión. Se sumerge la superficie que se quiere recubrir en un tanque con el material y se vuelve a sacar al exterior.

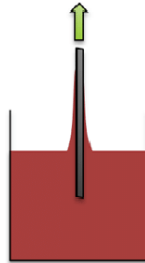


Figura 8 - Dip Coating [16]

- **Spin Coating:** por centrifugación. Se deposita una pequeña cantidad de disolución en el centro y se comienza a girar el sustrato a gran velocidad. La disolución se va extendiendo uniformemente por la superficie gracias a la aceleración centrípeta.

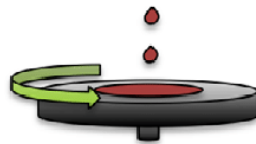


Figura 9 - Spin Coating [16]

- **Spray Coating:** por pulverización. Se pulveriza la disolución con la que se quiere generar el recubrimiento. Es una técnica muy ventajosa porque podemos controlar más fácilmente el espesor.

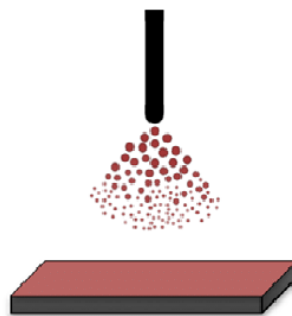


Figura 10 - Spray Coating [16]

2.2 Electrospinning

Otras técnicas eficientes y que están tomando relevancia en la fabricación de los recubrimientos biocidas son las técnicas de Electrospinning y Electrospaying.

Estas técnicas, se basan en establecer una diferencia de potencial entre un inyector (que contiene la disolución) y un colector (que contiene el sustrato a recubrir) para realizar deposiciones.

Dependiendo de las propiedades de la disolución, se pueden conseguir distintos tipos de deposición. En el caso del Electrospinning, como producto final se producen fibras poliméricas de diámetro nanométrico, mientras que en el caso del Electrospaying, se producen nanopartículas (*Figura 11*).

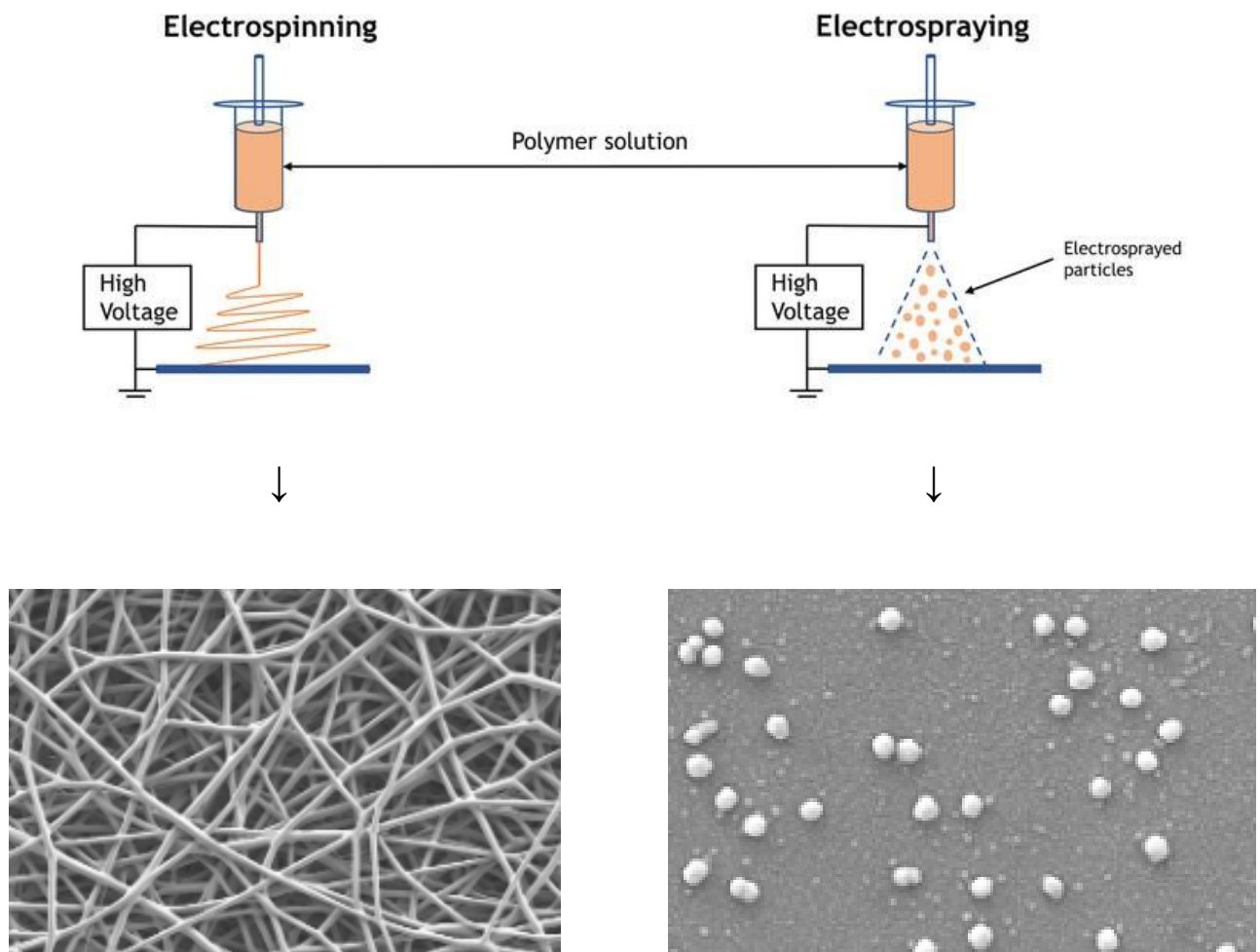


Figura 11 - Electrospinning y electrospaying [17]

Fundamento teórico del Electro spray

La técnica se basa en aplicar un campo eléctrico lo suficientemente intenso al menisco de un líquido conductor que pende de un tubo capilar. En las condiciones adecuadas, el menisco adopta una forma conocida como cono de Taylor (*Figura 12*) y de la punta emerge un chorro de líquido que se disgrega en gotas cargadas eléctricamente debido a inestabilidades.

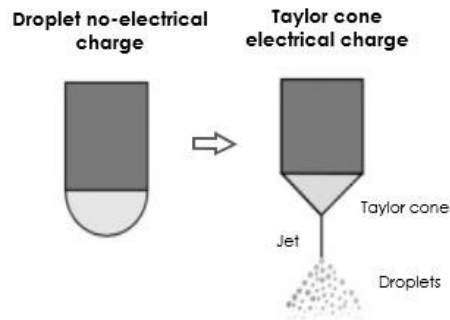


Figura 12 - Formación régimen cono-chorro [18]

En este régimen, las fuerzas eléctricas (tanto de Coulomb como dieléctricas) se equilibran con la tensión superficial, así como con la fuerza ejercida por la viscosidad del líquido.

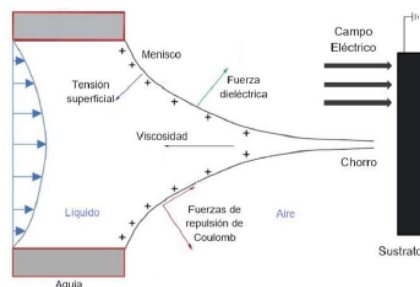


Figura 13 - Fuerzas que actúan en la elongación del menisco [19]

Las gotas cargadas eléctricamente se repelen entre sí, formando un spray de gran expansión. En su camino hasta el colector, el disolvente se va evaporando y las gotas se fisionan (explosión de Coulomb), generando gotas de menor tamaño. Si el contraelectrodo se pone a la distancia adecuada, como resultado, se obtienen deposiciones de nanopartículas con una cantidad de disolvente mínima.

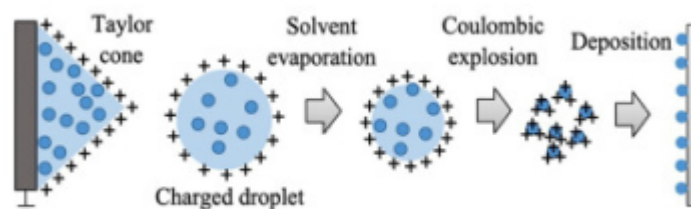


Figura 14 - Evolución de las gotas desde el chorro hasta el colector [20]

El montaje del equipamiento es el siguiente:

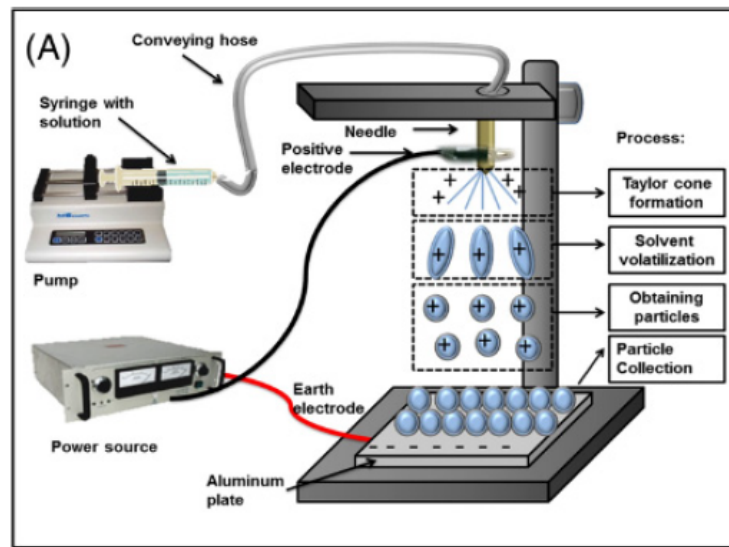


Figura 15 - Esquema de montaje del equipo de Electrospinning [21]

Existen varios parámetros que afectan en la morfología de las nanopartículas y que deben ser controlados. Se dividen en: parámetros del equipo de Electrospinning, parámetros de la disolución y parámetros ambientales.

Parámetros del equipo de Electrospinning

- **Diferencia de potencial:** es el parámetro más importante. Con voltajes bajos (<10 kV) se ha observado que se forman partículas de mayor tamaño, ya que el potencial eléctrico no es suficiente para superar la tensión superficial del líquido y producir fisiones. Con voltajes grandes (10 kV \geq), en cambio, se obtienen partículas de menor tamaño, ya que las fuerzas de Coulomb que se forman ganan a la tensión superficial y las gotas se fisionan, formando partículas de menor tamaño [22].
- **Caudal (Q):** un caudal elevado ($1\text{mL/h} \geq$) puede conducir a la formación de partículas de mayor tamaño, ya que la tasa de pulverización es alta y el disolvente no se volatiliza completamente. En un caudal bajo (<1 mL/h), en cambio, hay una mayor volatilización del disolvente, ya que la tasa de pulverización es menor. Por tanto, se pueden conseguir partículas de menor tamaño [23,24].
- **Distancia inyector-colector (L):** se debe establecer una distancia suficiente para que se de la evaporación del disolvente, ya que si el spray llega húmedo hay riesgo de que se de arrastre de material y que la deposición sea menos homogénea [25].

Parámetros controlables de la disolución:

- **Concentración de polímero y viscosidad:** las altas concentraciones producen disoluciones más viscosas que tienden a formar partículas más grandes debido a la agregación, por lo que es difícil superar la tensión superficial. Las concentraciones bajas, sin embargo, tienden a formar partículas más pequeñas, ya que la tensión superficial será más baja y será más fácil de superar mediante el voltaje aplicado [26].
- **Densidad:** la densidad está directamente relacionada con la concentración de polímero y la viscosidad, a mayor concentración de polímero y viscosidad, mayor densidad y viceversa. Tiene un impacto crucial en el desarrollo del cono de Taylor. A mayor densidad, el cono de Taylor tiende a formar gotas, mientras que a menor densidad el cono de Taylor a una densidad más baja, el cono de Taylor se desplaza hacia el modo de chorro o multichorro [27].
- **Conductividad eléctrica:** cuanto mayor sea la conductividad eléctrica, menor será la tensión superficial y el diámetro de las partículas. Mientras que si la conductividad eléctrica es baja, mayor será la tensión superficial y el diámetro de las partículas [28].

Parámetros ambientales

- **Humedad relativa:** juega un papel muy importante en el Electrospraying, ya que está directamente relacionada con la capacidad de evaporación del disolvente. Con una humedad alta, será más difícil que el disolvente se evapore completamente, por lo que obtendremos partículas de mayor tamaño y de diámetro no uniforme. En estos casos se recomienda utilizar un caudal bajo y/o utilizar una placa colectora para obtener una deposición completamente seca.
- **Temperatura:** no es un factor muy determinante, pero puede ayudar en la evaporación del disolvente.

Aplicaciones biomédicas

En comparación con los demás métodos convencionales para producir partículas, presenta algunas ventajas que la hacen atractiva para aplicaciones biomédicas. Por un lado, el proceso puede llevarse a cabo en condiciones ambientales, lo que resulta beneficioso para trabajar con biomoléculas sensibles o células vivas. Además, permite realizar encapsulaciones, por lo que es una vía para producir encapsulaciones de fármacos y para facilitar el transporte de sustancias por distintos medios. Y, por último, ajustando las características de la disolución y las condiciones de Electrospray podemos obtener partículas de morfología variada.

Por ello es un método muy utilizado en aplicaciones relacionadas con la ingeniería de tejidos, los sistemas drug delivery y la síntesis de recubrimientos biocidas.

2.3 Plata como agente biocida

El efecto antimicrobiano de la plata es conocido desde la antigüedad. El uso de cuencos de plata para mantener el agua y otras bebidas libres de microorganismos era algo habitual en civilizaciones griegas y romanas. Además, los avances científicos de los siglos XVIII y XIX impulsaron el uso de la plata en el ámbito médico. Se empezaron a utilizar hilos de este material para realizar suturas o apósitos para la curación y cicatrización de heridas. Sin embargo, fue perdiendo popularidad con el descubrimiento de la penicilina y otros antibióticos [29]. Hoy en día, en cambio, está volviendo a ser una gran alternativa como agente biocida, debido a la aparición de cepas resistentes a los antibióticos [30].

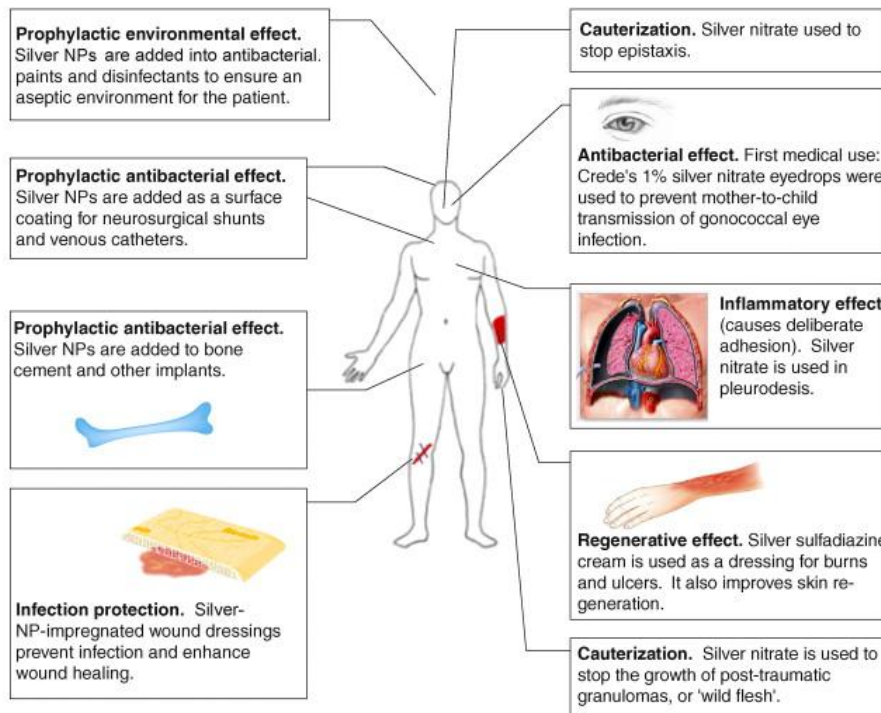


Figura 16 - Ejemplos de aplicaciones de la plata en el ámbito médico [29]

En los últimos años, ha aumentado la demanda de las nanopartículas de plata (AgNP) para aplicaciones médicas. Las AgNP han demostrado una mayor capacidad antimicrobiana frente a otros complejos de plata [31]. En primer lugar, debido a que tienen una mayor relación superficie-volumen, lo que les permite tener mayor contacto con el exterior. En segundo lugar, porque su tamaño nanométrico (1-100 nm) les facilita la entrada al interior de algunos microorganismos, lo que facilita el efecto biocida.

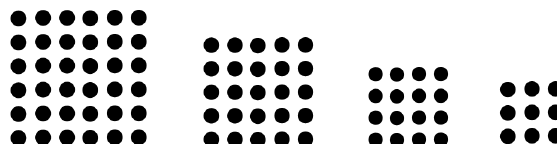


Figura 17 - Proporción tamaño-cantidad átomos en la superficie

El mecanismo de acción de las AgNPs varía dependiendo del tipo de microorganismo. El mecanismo de acción antibacteriano puede resumirse en [32]:

1. **Adhesión a la membrana celular:** al adherirse a la membrana del microorganismo, provocan su despolarización, seguida de una pérdida de integridad que, a su vez, conduce a la alteración del transporte, la interrupción de la transducción de energía, el desequilibrio de la respiración y, finalmente, la lisis y la muerte de la célula.
2. **Entrada al interior de las células:** puede producir el deterioro de orgánulos intracelulares (mitocondrias, ribosomas...) y de biomoléculas (ADN, proteínas...).
3. **Inducción de toxicidad celular y estrés oxidativo:** debido a que producen radicales libres y especies de oxígeno reactivo (ROS, *reactive oxygen species*).
4. **Modulación de las vías de transducción de señales intracelulares**

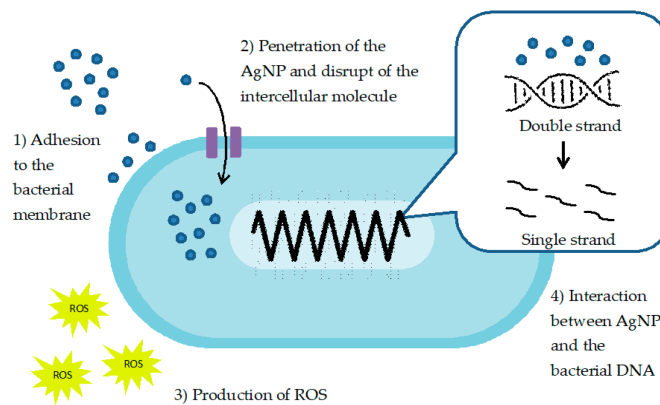


Figura 18 - Mecanismo de acción antibacteriano de las AgNP [32]

Las investigaciones sobre el mecanismo de acción antiviral son más limitadas, debido a que los virus presentan una estructura más compleja que las bacterias. Se han propuesto dos posibles interacciones entre los virus y las nanopartículas [32-34]:

1. Las AgNP se unen a las glicoproteínas de membrana del virus, imposibilitando la adhesión del virus a receptores celulares. De esta manera, el virus no puede replicar su material genético.
2. Las AgNP se unen al material genético de la célula, lo que bloquea también la replicación vírica.

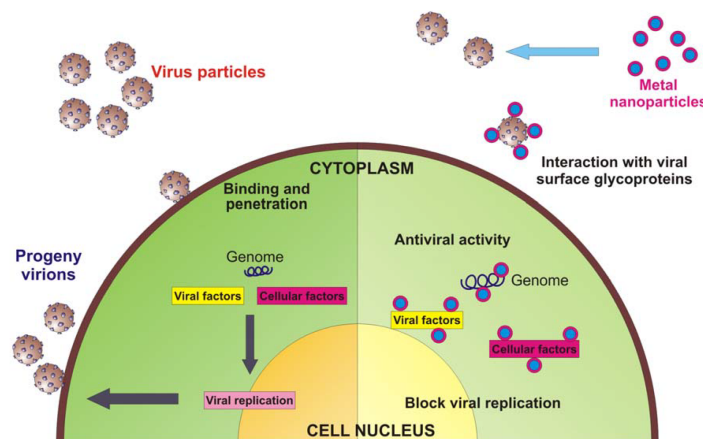


Figura 19 - Mecanismo de acción antiviral de las AgNPs [34]

2.4 Nanopartículas en el ámbito médico

Las nanopartículas son estructuras que tienen las tres dimensiones en el rango entre 1-100 nm, teniendo una mayor relación superficie-volumen que las partículas de mayor escala. Esta propiedad, entre otras, las hace muy interesantes para ser aplicadas en el ámbito médico, en campos como la administración de fármacos, la ingeniería de tejidos o la terapia del cáncer [35].

El desarrollo de nanopartículas estables, en cambio, requiere un profundo conocimiento de las características fisico-químicas de los nanomateriales.

Existen en la actualidad diversos métodos para sintetizar nanopartículas y que se pueden clasificar en procesos de síntesis física, síntesis química y síntesis biológica. Los procesos de síntesis física se basan en la lógica “top-down”, ya que consisten en ir descomponiendo fragmentos de material de mayores dimensiones hasta conseguir las nanopartículas. Los procesos de síntesis química y biológica, en cambio, se basan en la lógica “bottom-up”, ya que se centran en construir las nanopartículas a través de la unión de componentes atómicos y moleculares (*Figura 20*). Dependiendo del método escogido se obtienen nanopartículas con una morfología y propiedades, por lo que es preciso escoger el método que más se adecua a cada objetivo.

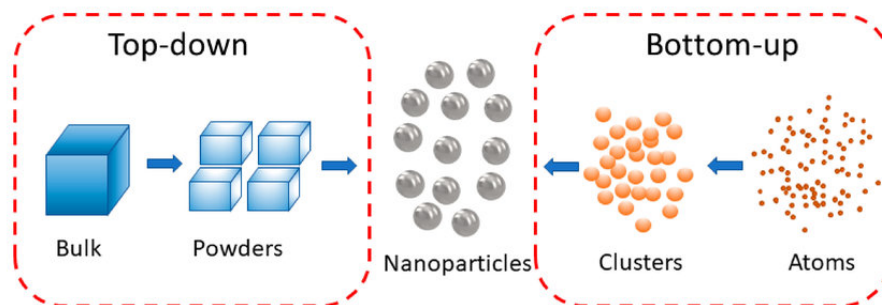


Figura 20 - Lógicas “top-down” y “bottom up” en la síntesis de nanopartículas [36]

El uso de las nanopartículas en el ámbito médico, sin embargo, está limitado, ya que la toxicidad que pueden ejercer sobre los organismos vivos es objeto de investigación. La cantidad de nanopartículas, su acumulación, distribución y eliminación son factores directamente relacionados con la toxicidad que pueden ejercer [37]. Por lo tanto, a pesar de ser muy útiles para muchas aplicaciones biomédicas debido a sus características, se debe estudiar el grado de toxicidad que pueden tener.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo es:

- Desarrollar recubrimientos poliméricos mediante Electro spraying, dopados con nanopartículas de plata

3.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos han sido:

- Sintetizar nanopartículas de plata a través de síntesis química
- Encontrar condiciones de Electro spraying para realizar las deposiciones
- Pretratar las superficies de acero para mejorar la adhesión acero-recubrimiento
- Depositar las nanopartículas de plata sobre las probetas de acero, mediante Electro spraying
- Analizar los recubrimientos desarrollados mediante técnicas de caracterización

4. METODOLOGÍA

4.1 Desarrollo del recubrimiento

El proceso de desarrollo del recubrimiento puede ser dividido en 3 etapas. Por un lado, se realiza el pretratamiento de las probetas de acero. A continuación, se sintetizan las nanopartículas de plata en disolución. Y, finalmente, se realiza la deposición del recubrimiento sobre el acero inoxidable pretratado.

4.1.1 Elección y pretratamiento del sustrato

Durante el presente trabajo se han realizado deposiciones sobre dos sustratos. En un primer momento, con el objetivo de comenzar a familiarizarse con la toma de muestras y obtener un margen de optimización de parámetros se utilizaron probetas de acero **AISI 304**. Posteriormente, una vez optimizado el proceso, se realizaron deposiciones sobre acero inoxidable **AISI 316**, acero más empleado en el entorno médico, debido a que presenta mayor resistencia a la corrosión. Las probetas de acero AISI 316 fueron redimensionadas mediante un proceso de corte realizado en el Taller de Mecanizado del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga

| SUSTRATO | DIMENSIONES DE LAS PROBETAS |
|----------------|-----------------------------------|
| Acero AISI 304 | Diámetro: 3 cm Espesor: 0.1 cm |
| Acero AISI 316 | 1 cm x 1 cm x 0.1 cm |

Tabla 1 - Dimensiones y sustratos empleados

Pretratamiento

Con el objetivo de optimizar la fijación de las AgNPs a las probetas de acero inoxidable se realiza un pretratamiento siguiendo la metodología seguida por Limei Chen y colaboradores [38]. Se emplea (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES), un aminosilano frecuentemente utilizado en la funcionalización de superficies.

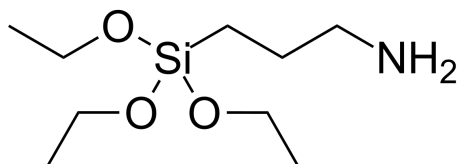


Figura 21 -Fórmula química del APTES

En primer lugar, se realiza un lavado de las probetas introduciéndolas en una disolución 50% acetona/50% etanol y sometiéndolas a un baño de ultrasonidos durante 15 minutos. A continuación, se realizan 3 lavados con agua desionizada y se secan las probetas. De esta manera, nos aseguramos de desengrasar el acero y eliminar posibles restos de suciedad.

Por último, se sumergen en una disolución al 1% de APTES. Antes de sumergirlas, se reajusta el pH de la disolución a pH=5, para ello haciendo uso de ácido acético (CH₃COOH). Una vez estamos en el rango de pH óptimo se sumergen las probetas en la disolución de APTES al 1% durante 1h y 30min.

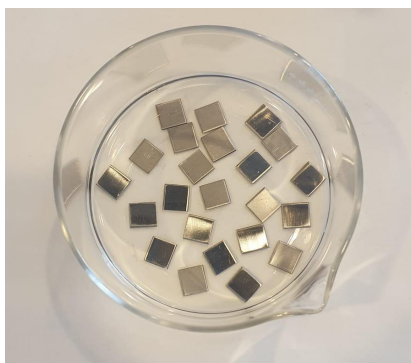


Figura 22 -Inmersión de las probetas de acero AISI 316 en la disolución de APTES al 1%

4.1.2 Síntesis de las nanopartículas de plata (AgNPs)

A continuación, se van a sintetizar las nanopartículas de plata, que posteriormente serán depositadas sobre las probetas de acero pretratadas. En nuestro caso se ha escogido un proceso de síntesis química en disolución, ya que es un proceso fácil de realizar, de bajo coste y de alto rendimiento. Concretamente, se ha empleado nitrato de plata (AgNO_3) como precursor metálico y etilenglicol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$) como agente reductor, obteniendo una reacción química en la que el nitrato de plata va a tender a reducirse ante la presencia del etilenglicol.

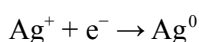


Figura 23 - Reducción de plata iónica a plata metálica

Además, se ha incluido un agente estabilizante en la reacción, en nuestro caso, polivinilpirrolidona de 1300 kDa (PVP). Este polímero evita que se generen acúmulos en la disolución y permite tener un mayor control sobre la morfología y tamaño de las nanopartículas.

El mecanismo de formación de las nanopartículas consta de tres etapas (*véase Figura 24*):

- 1. Prenucleación (etapa I):** a medida que se va añadiendo el etilenglicol, el nitrato de plata comienza a reducirse, dándose un aumento progresivo de Ag^0 hasta llegar a la concentración mínima de nucleación ($C_{\text{min}}^{\text{nucl}}$).
- 2. Nucleación (etapa II):** una vez sobrepasada la concentración mínima de nucleación, se van a empezar a formar los primeros núcleos, que van a ser agregaciones de átomos libres de Ag^0 .
- 3. Crecimiento (etapa III):** debido a la nucleación, la concentración de solutos vuelve a ser inferior a $C_{\text{min}}^{\text{nucl}}$, por lo que la formación de núcleos se detiene. En esta etapa se da el crecimiento de los núcleos generados en la etapa anterior.

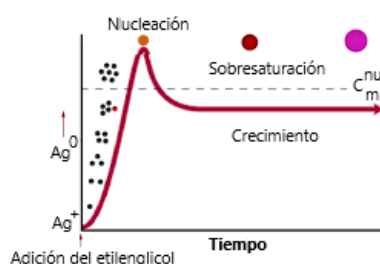


Figura 24 - Proceso de nucleación y crecimiento de las AgNPs

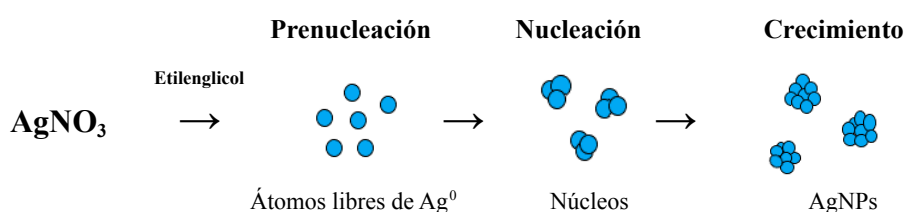


Figura 25 - Esquema de las etapas de formación de AgNPs

Los pasos para realizar la disolución han sido los siguientes [38]:

1. Se pesan 17 mg de AgNO_3 . Se añaden 10 mL de etilenglicol y seguidamente se lleva a agitación magnética durante 10 minutos.
2. Se pesan 33 mg de PVP 1300 kDa. Se añaden 10 mL de etilenglicol y seguidamente se lleva a agitación magnética durante 10 minutos.
3. Tras la agitación, se comprueba que ambos sólidos están bien disueltos.
4. Se va añadiendo gota a gota la disolución de AgNO_3 a la disolución de PVP. Durante este proceso el bote de PVP debe estar en agitación magnética lenta, para facilitar la mezcla entre ambos compuestos.
5. La disolución se deja 4h en agitación magnética.

Como consecuencia de esta reacción se obtienen disoluciones coloidales, en las que tendremos las nanopartículas de plata unidas a la polivinilpirrolidona y suspendidas en el etilenglicol.

Una vez preparada la disolución, se observa que ha adoptado un ligero color amarillo-marrón (*Figura 26*).



Figura 26 -Disoluciones de AgNPs en las que se aprecia el color amarillo-marrón

Esto se debe al efecto de resonancia de plasmón de superficie (SPR), el cual nos asegura la presencia de nanopartículas en la disolución. Este fenómeno ocurre debido a que las nanopartículas de nuestra disolución tienen un tamaño igual o menor a la longitud de onda de la luz incidente. En estos casos, los electrones de la superficie de la nanopartícula metálica interactúan con la onda electromagnética, absorbiendo su energía y formando un momento dipolar en el que la nube de electrones se aleja de los picos de la onda. La energía no absorbida es reflejada, produciendo la visión de un color específico del espectro electromagnético. Dependiendo del tamaño de la nanopartícula el color de la disolución varía.

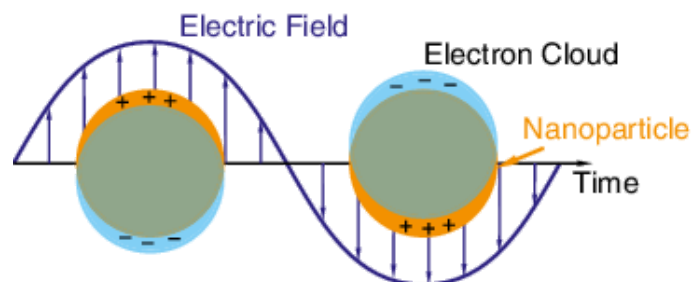


Figura 27 -Esquema del efecto de resonancia de plasmón de superficie (LSR) [39]

4.1.3 Deposición mediante Electrospaying

Tal y como se ha comentado, la técnica escogida para depositar las nanopartículas ha sido el Electrospaying, una técnica de electropulverización.

El equipamiento empleado ha sido un equipamiento casero, formado principalmente por dos fuentes de alto voltaje, una bomba inyectora, un colector, un inyector y un sistema de visualización del extremo del tubo capilar para controlar la deposición (*Figura 29*).

Se introduce la disolución de AgNPs en una aguja y se coloca sobre una bomba inyectora. Esta bomba inyectora va a ir bombeando el fluido hasta el inyector a un caudal determinado. A su vez, se establece una diferencia de potencial, que en las condiciones adecuadas va a formar un cono de Taylor estable (*Figura 28*). En este régimen se produce un chorro desde el ápice del cono, que se disgrega en gotas cargadas que se repelen y forman la pulverización. El disolvente se va evaporando por el camino y, como resultado, tenemos una deposición homogénea de nanopartículas sobre el colector.

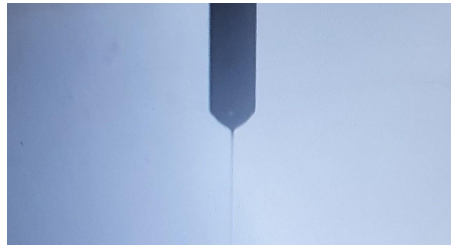


Figura 28 - Cono de Taylor estable

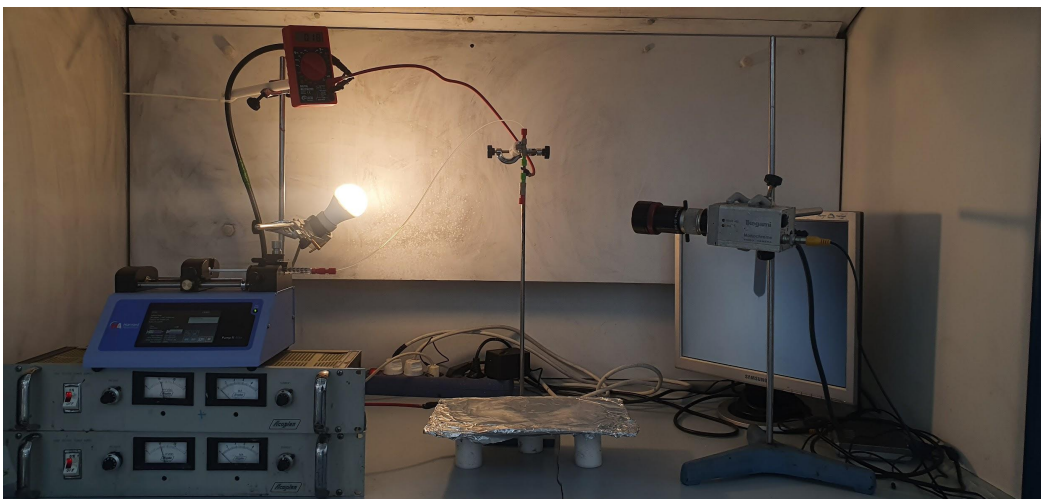


Figura 29 -Equipamiento de Electrospaying empleado

4.2 Técnicas de caracterización

4.2.1. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

Para estudiar la morfología superficial de nuestro recubrimiento se hace uso de la microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).

Esta técnica tiene la misma base que la microscopía electrónica de barrido convencional (SEM), pero permite obtener imágenes con mayor resolución y con un rango de energía mayor. El microscopio emite un haz de electrones que incide sobre la muestra, interactuando con la superficie. De la interacción haz-muestra surgen varias señales, entre las que destacan: emisión de electrones secundarios, emisión de electrones retrodispersados y emisión de rayos X. Estas señales son capturadas por distintos detectores y forman una imagen.

Los electrones secundarios se producen cuando un electrón del haz impacta con un electrón de un átomo de la muestra, aportándole suficiente energía para sacarlo de la muestra. Las imágenes obtenidas a partir de la detección de estos electrones, aportan información de textura y topografía. Por otro lado, los electrones retrodispersados, se producen cuando un electrón del haz impacta con el núcleo de un átomo de la muestra. El núcleo repele el electrón y produce un cambio en su trayectoria. El efecto de repulsión depende del número atómico del elemento, apareciendo con un color más claro los elementos con mayor peso atómico. Por lo tanto, esta imagen aporta información de la composición de la muestra.

El microscopio utilizado es el modelo **Helios NanoLab 650** de FEI Company (*Figura 30*), presente en la Unidad de Nanotecnología del Edificio de Bioinnovación, ubicado en el Parque Tecnológico de Andalucía (Málaga).



Figura 30 -Microscopio Helios Nanolab 650

4.2.2 Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS)

La espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS) es una técnica de caracterización que nos permite conocer la composición elemental de nuestra muestra, obteniendo información a través de la detección de rayos X.

Cuando un electrón secundario sale disparado del átomo, deja un hueco libre en el orbital. En estos casos, un electrón de nivel de energía superior pasa a ocupar su lugar, liberando la diferencia de energía como un rayo X. Cada rayo X es característico de su átomo, por lo que se puede conocer la composición química de la muestra.

Este análisis se ha realizado con el mismo equipo que la microscopía FESEM, es decir, con el microscopio **Helios NanoLab 650** de FEI Company (*Figura 30*).

4.2.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Las muestras fueron analizadas mediante microscopía de fuerza atómica (AFM), lo que nos proporciona imágenes topográficas de la superficie.

El microscopio contiene un cantiléver con una punta afilada en uno de los extremos. Esta punta va rastreando la muestra y va registrando la fuerza que se da entre la muestra y el cantiléver, lo que produce que este último se vaya flexionando y doblando. Se registran estos movimientos y se reproduce una imagen topográfica de la superficie de la muestra, en 2D o 3D.

Dependiendo de la interacción punta-muestra se pueden diferenciar 3 tipos de AFM: de contacto, de contacto intermitente (Tapping mode) y de no-contacto.

El microscopio **AFM - Nanoscope V** de Veeco Instruments ha sido el empleado, perteneciente al Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga.



Figura 31 -Microscopio AFM - Nanoscope V

4.2.4 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) nos permite realizar un análisis de composición de la muestra, incluyendo información sobre los estados de oxidación de los elementos presentes.

La técnica se basa en el efecto fotoeléctrico. Se bombardea la muestra con un haz de rayos X. Cuando un fotón impacta con la superficie de la muestra, su energía puede ser absorbida por electrones presentes en un átomo de la muestra, produciendo la ionización del átomo y la emisión de un fotoelectrón. La energía cinética con la que sale cada fotoelectrón está relacionada con la energía de enlace del electrón expulsado, por lo que es característica de cada elemento químico.

Para ello, se utiliza el espectrómetro **MultiLab 2000** de la empresa Thermo Fisher Scientific.



Figura 32 -Espectrómetro MultiLab 2000

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la caracterización de los recubrimientos se han realizado dos tandas de recubrimientos. La primera tanda se realizó con el objetivo de obtener una primera toma de contacto con las propiedades de nuestro recubrimiento. Para ello, se utilizaron probetas de acero AISI 304. Se emplearon la microscopía FESEM y el análisis EDS para estudiar tanto la morfología superficial como la composición de las muestras.

Una vez realizado este primer análisis se realizó un proceso de optimización de las condiciones de Electro spraying y se preparó una segunda tanda de recubrimientos. En este caso, una vez optimizado el proceso y teniendo un mayor manejo de la técnica de Electro spraying, se utilizaron probetas de acero AISI 316, ya que como se ha comentado es un sustrato más empleado en el ámbito médico. Estas muestras fueron caracterizadas mediante las técnicas comentadas anteriormente, y a estas se le sumaron, la microscopía AFM y el ensayo XPS. De esta manera, se obtiene información sobre la rugosidad y espesor del recubrimiento y sobre los elementos químicos presentes en la muestra y su estado de oxidación.

5.1 Tanda 1

La primera tanda se ha realizado bajo condiciones ambientales de **22,1°C** y humedad relativa del **35%**.

Antes de comenzar con la deposición, se ha medido la tensión superficial de la disolución y se han obtenido valores de **47,32 mN/m** en la primera medida y **47,2 mN/m** en la segunda medida (*para conocer el modo de medida véase Anexo I*). Son valores adecuados para poder hacer Electro spraying, ya que nuestro equipo nos permite establecer una diferencia de potencial capaz de superar ese valor de tensión superficial. Además, vemos que el valor obtenido es similar a la tensión superficial del etilenglicol, que es aproximadamente de 47 mN/m, valor esperado ya que se trata de nuestro disolvente.

En relación a los parámetros de Electro spray, se ha escogido el **caudal de 0,5 mL/h** para realizar las deposiciones, ya que era un caudal que permitía formar un cono de Taylor estable. La formación del cono se da usando una **diferencia de potencial de 23 kV** (15 kV voltaje positivo y 8 kV voltaje negativo). Se ha puesto voltaje en el contraelectrodo ya que la **distancia inyector-colector es de 36 cm**, mientras que distancias como inyector-cámara rondan los 20 cm. De esta manera, conseguimos focalizar más la dirección del spray hacia el colector y evitamos arcos eléctricos. La distancia de 36 cm es la máxima distancia a la que se ha podido subir el inyector, limitada por el brazo utilizado para sujetarlo. A pesar de ello, cabe recalcar que, a pesar de usar la máxima distancia inyector-colector posible, el spray llegaba húmedo al colector. Por ello, se van a emplear tiempos de deposición relativamente bajos (<10 minutos), ya que si la muestra se moja en exceso puede haber problemas de arrastre de material. En este caso, tratándose de una primera caracterización, se va a hacer uso de probetas de acero AISI 304, de 4 cm de diámetro y 0.1 cm de espesor.

Resumen de las condiciones de deposición (TANDA 1):

- **Temperatura y humedad relativa:** 22,1°C y 35%
- **Características de la disolución:**
 - Tensión superficial: 47,32 mN/m (1° medida) y 47,2 mN/m (2° medida).
- **Parámetros de electro spray:**
 - Caudal: 0,5 mL/h
 - Voltaje positivo: 15 kV
 - Voltaje negativo: 8 kV
 - Intensidad: 240 nA
 - Distancia inyector-colector: 36 cm
 - Colector: circular, diámetro de 6 cm
- **Probetas:** discos de acero inoxidable AISI 304 (d=3cm, espesor=0.1cm)

Muestras:

| Muestra | Tiempo de deposición |
|----------------|-----------------------------|
| SEM_0 | 0 min |
| SEM_1 | 5 min |
| SEM_2 | 10 min |

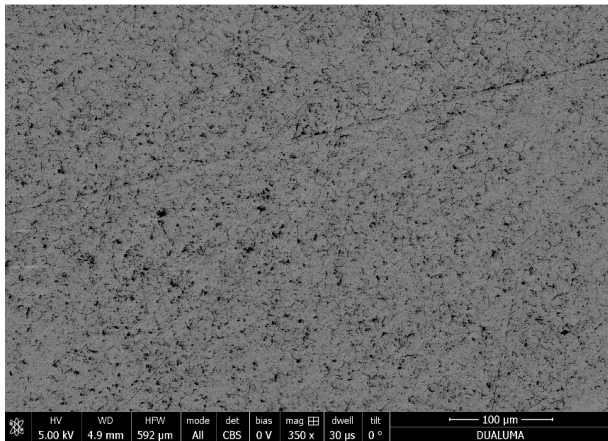
Tabla 2 - Reparto de muestras para microscopía FESEM (Tanda 1)

Como el recubrimiento está llegando húmedo al colector, ya que el etilenglicol no ha podido evaporarse en su totalidad, se van a analizar 2 tiempos de deposición diferentes (5min y 10 min), para estudiar cómo afecta esta condición e intentar optimizar este parámetro.

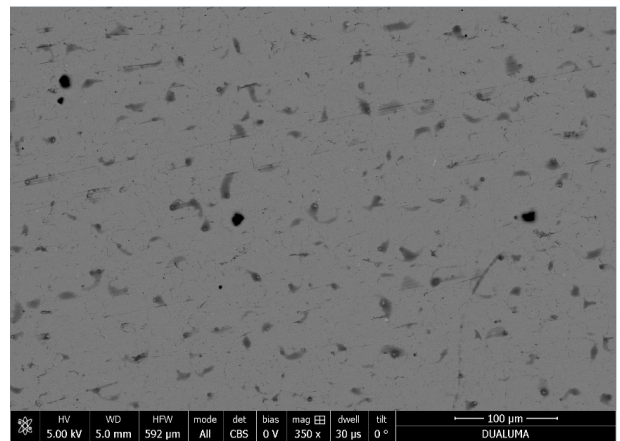
Recordamos que esta primera tanda va a ser analizada por microscopía FESEM y análisis EDS.

5.1.1 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

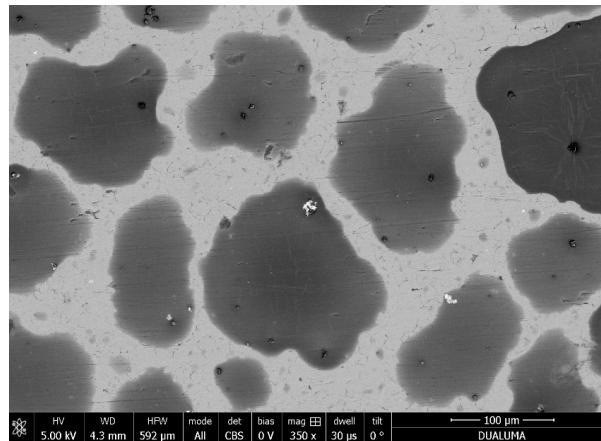
En primer lugar, con un aumento de 350X, se observa cómo al utilizar un tiempo de deposición de 10 minutos, se han ido formando pequeñas lagunas de polímero, a causa del arrastre del etilenglicol. Esto se debe a que nuestro spray estaba llegando mojado al colector, por lo que son rastros de las gotas que se han ido formando. Además, en la muestra de 10 minutos, destacan estructuras brillantes de mayor tamaño, lo que puede suponer que se hayan generado agregaciones de nanopartículas de plata, minimizando la homogeneidad de las nanopartículas presentes en el recubrimiento. Al utilizar un tiempo de deposición de 5 minutos, en cambio, las lagunas no son tan prominentes y no se han formado agregaciones de tal tamaño, por lo que forma un recubrimiento más homogéneo y uniforme.



a) Tiempo deposición: 0 min



b) Tiempo deposición: 5 min



c) Tiempo deposición: 10 min

Figura 33 - Imágenes FESEM de electrones retrodispersados, obtenidas con aumento 350x, ante muestras con distintos tiempos de deposición

El siguiente paso ha sido analizar las estructuras brillantes con mayor aumento. Al estar ante imágenes realizadas con el detector de electrones retrodispersados, las estructuras brillantes son las de mayor peso molecular, en el caso de nuestra muestra, la plata. Por lo tanto, son agrupaciones de nanopartículas de plata.

SEM_1: Acero AISI 304 con APTES y nanopartículas de plata estabilizadas con PVP (tiempo de deposición 5 minutos, tanda 1)

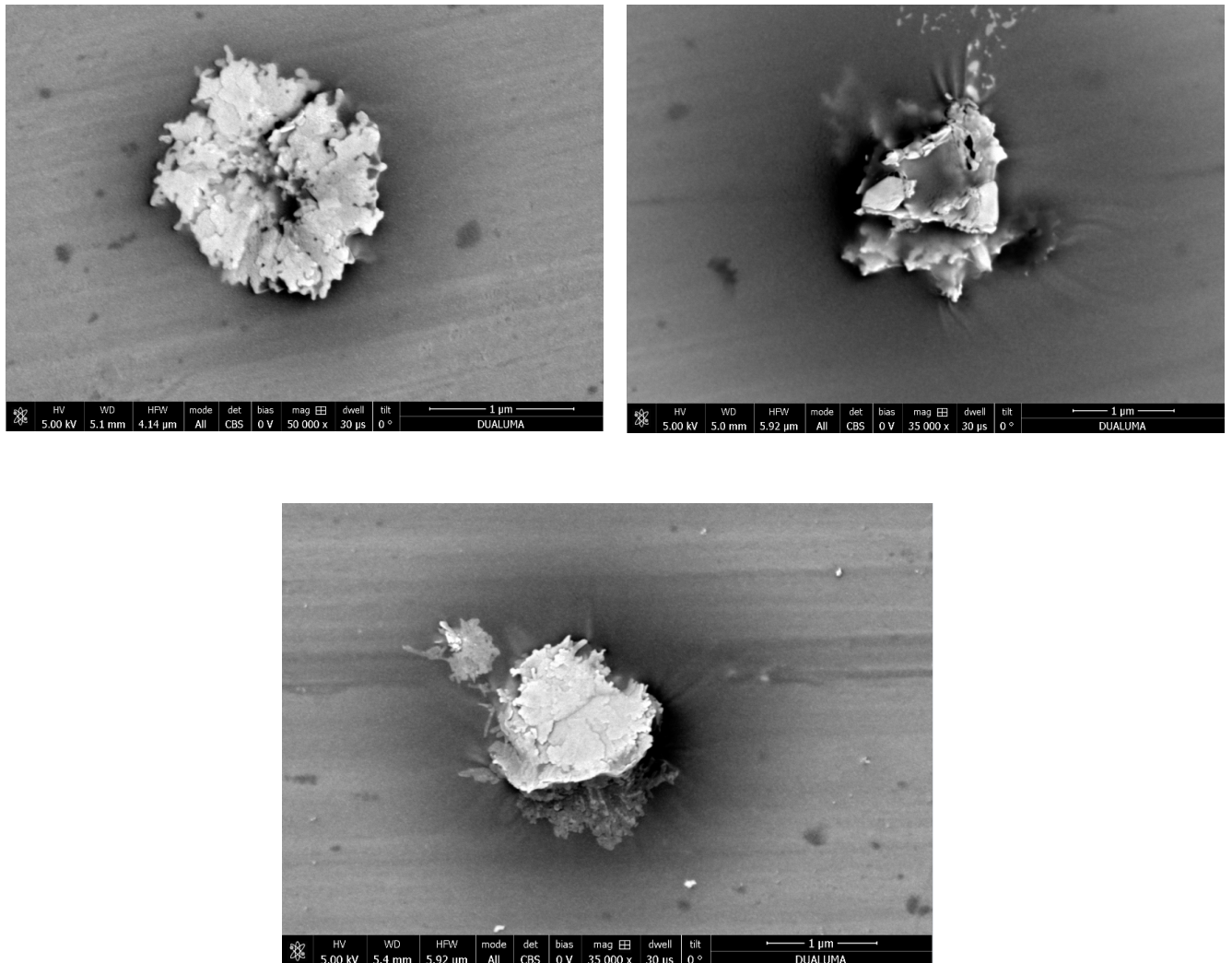


Figura 34 - Imágenes FESEM de electrones retrodispersados (SEM_1)

SEM_2: Acero AISI 304 con APTES y nanopartículas de plata estabilizadas con PVP (tiempo de deposición 10 minutos, tanda 1)

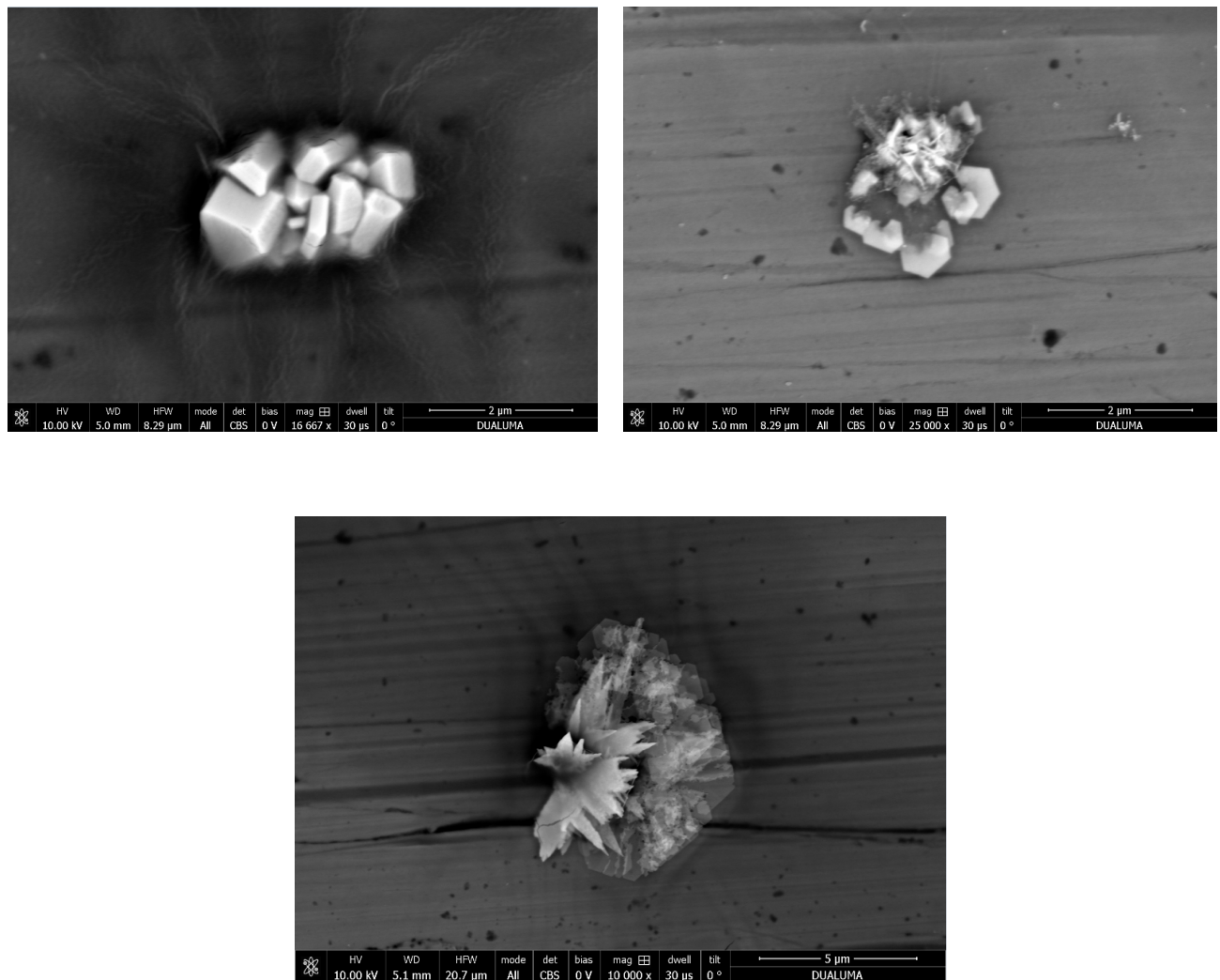


Figura 35 - Imágenes FESEM de electrones retrodispersados (SEM_2)

Por lo general, en la muestra SEM_1 se observan partículas de aproximadamente 1 μ m, mientras que en la muestra SEM_2, presentan un tamaño mayor a 2 μ m, lo que puede deberse a la agregación de nanopartículas debida a las gotas.

5.1.2 Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS)

Para asegurar que las estructuras analizadas presentan nanopartículas de plata, se ha acompañado el análisis con un ensayo EDS, que nos va a hacer un mapeo de los elementos químicos que hay presentes en la muestra.

SEM_1: Acero AISI 304 con APTES y nanopartículas de plata estabilizadas con PVP (tiempo de deposición 5 minutos, tanda 1)

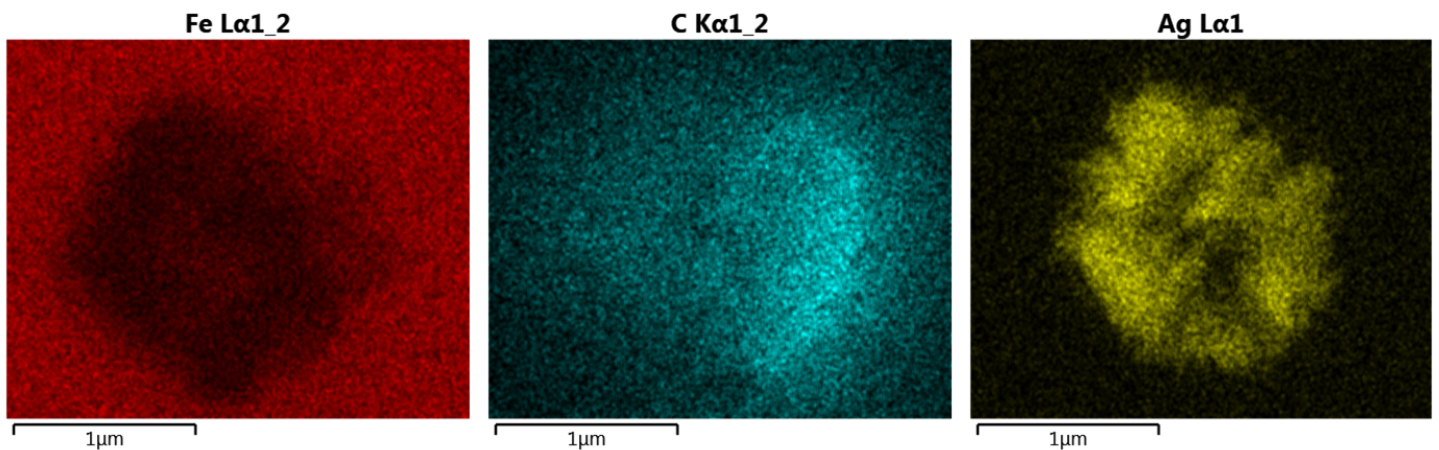
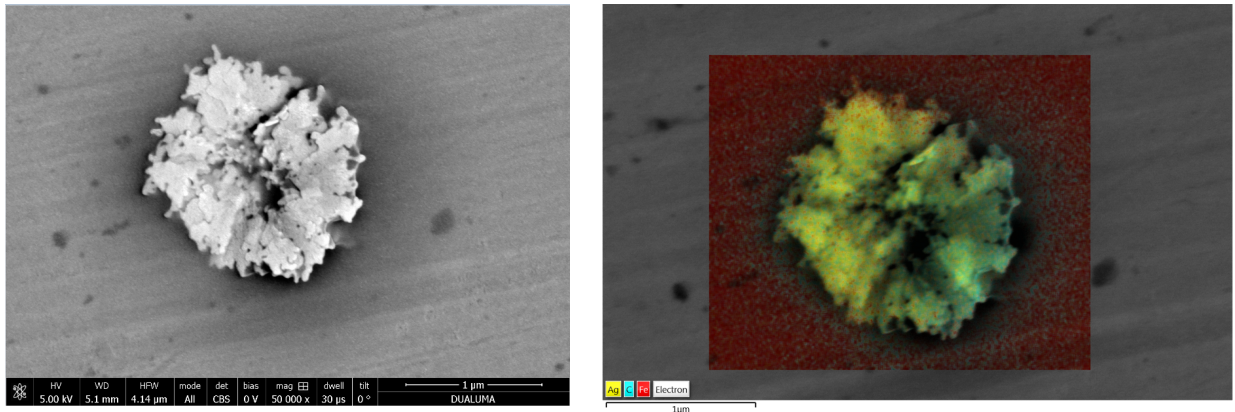


Figura 36 - Análisis EDS de una estructura brillante de la muestra SEM_1

El hierro proviene del sustrato, en este caso, acero. La sombra presente en la imagen de Fe, se produce debido a que el polímero y la plata están tapando el hierro, pero sigue estando el sustrato. Al tratarse de acero inoxidable, su concentración de carbono será baja, por lo que la mayor parte de carbono que se observa viene del polímero. Vemos como el polímero no se limita a la estructura, sino que se deposita también en los alrededores. Por último, la plata viene en su totalidad del nitrato de plata incluido en la disolución.

SEM_2: Acero AISI 304 con APTES y nanopartículas de plata estabilizadas con PVP (tiempo de deposición 10 minutos, tanda 1)

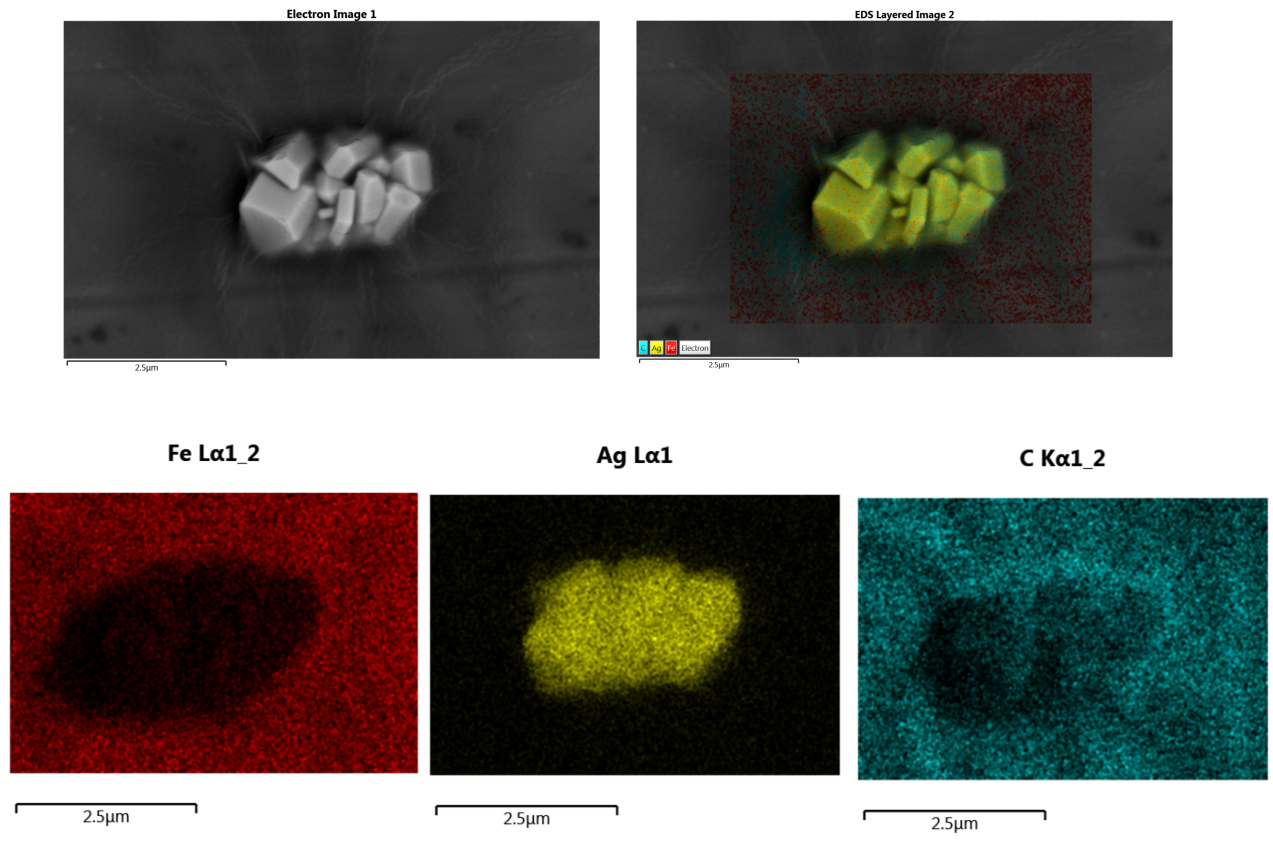


Figura 37 - Análisis EDS de una estructura brillante de la muestra SEM_2

El hierro vuelve a provenir del acero, el carbono en su mayoría del polímero y la plata también viene en su totalidad del nitrato de plata incluido en la disolución. En este caso, el polímero parece que coge más área del alrededor de la estructura. Puede ser otra vez debido a que se ha arrastrado parte del polímero mediante las gotas de etilenglicol.

Como conclusión de la caracterización de la tanda 1, se ha podido concluir que es preferible utilizar tiempos de deposición cercanos a 5 minutos, ya que se han observado deposiciones uniformes y homogéneas (véase Figura X) y agrupaciones de menor tamaño (aproximadamente 1 µm). Además, se ha observado que dichas estructuras están formadas principalmente por agrupaciones del polímero y nanopartículas de plata.

5.2 Tanda 2

La segunda tanda se ha realizado bajo condiciones ambientales de **28,2°C** y humedad relativa del **52%**.

Se ha realizado la caracterización de la disolución mediante la medida de la tensión superficial (obteniendo valores de **47,3 mN/m** y **47,16 mN/m**) y de la conductividad eléctrica (obteniendo el valor de **0.00456 ± 0,00105 S/m**). *Para conocer los métodos de medida véase Anexo I para la medida de la tensión superficial y véase Anexo II para la medida de la conductividad.*

En relación a los parámetros de Electrospray, se han optimizado varios parámetros para intentar que el spray llegue seco al colector. Por un lado, se ha bajado el **caudal a 0,3 mL/h**, mínimo caudal con el que se monta el cono de Taylor para nuestra disolución, ya que al utilizar un caudal menor la tasa de pulverización es menor, por lo que el etilenglicol tiene mayor facilidad de evaporación. Por otro lado, se ha podido aumentar ligeramente la **distancia inyector-colector a 40 cm**, aumentando el recorrido del disolvente y facilitando de ese modo también su evaporación. Por último, el **tiempo de deposición** se ha fijado en **5 minutos**, para evitar la formación de lagunas presentadas en la tanda 1.

La formación del cono para el caudal establecido, se da usando una **diferencia de potencial de 21 kV** (11 kV voltaje positivo y 10 kV voltaje negativo). Recordamos que el voltaje en el contraelectrodo sirve para focalizar más el spray y evitar arcos eléctricos.

En este caso, se van a emplear probetas de acero AISI 316 de 1cm² x 0.1 cm , ya que es un acero más utilizado en instalaciones hospitalarias.

Además, en esta tanda se han realizado 3 tipos de muestra:

- Acero AISI 316 pretratado con APTES
- Acero AISI 316 pretratado con APTES y con deposición de PVP
- Acero AISI 316 pretratado con APTES y con deposición de nanopartículas de plata estabilizadas con PVP

El reparto se ha realizado así con la intención de realizar ensayos biocidas. En este caso, es necesario ver cómo varía la capacidad biocida del recubrimiento con cada elemento, para poder atribuir la propiedad biocida.

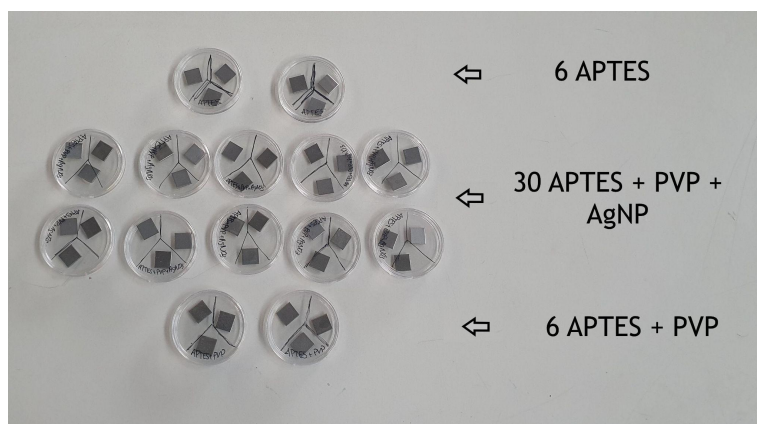


Figura 38 - Tanda 2

Resumen de las condiciones de deposición (TANDA 2)

- **Temperatura y humedad relativa:** 28,2°C y 52%
- **Características de la disolución:**
 - Tensión superficial: 47,3 mN/m (1º medida) y 47,16 mN/m (2º medida). Para conocer el modo de medida véase *Anexo I*.
 - Conductividad: $0.00456 \pm 0,00105$ S/m. Para conocer el modo de medida véase *Anexo II*.
- **Parámetros de electro spray:**
 - Caudal: 0,3 mL/h
 - Voltaje positivo: 11 kV
 - Voltaje negativo: 10 kV
 - Intensidad:
 - Disolución con AgNP: 190 nA (se observa el carácter conductor de la plata)
 - Disolución sin AgNP: 50 nA
 - Distancia inyector-colector: 38 cm
 - Colector: rectangular, 30 cm x 20 cm
- **Probetas:** acero inoxidable AISI 316 (1cm² x 0.1cm)

Muestras:

| Muestra | Tipo de muestra |
|----------------|-----------------------------|
| AFM_1 | APTES+PVP+AgNO ₃ |
| XPS_1 | APTES+PVP+AgNO ₃ |

Tabla 3 - Tipo de muestra empleada para la caracterización mediante AFM y XPS (Tanda 2)

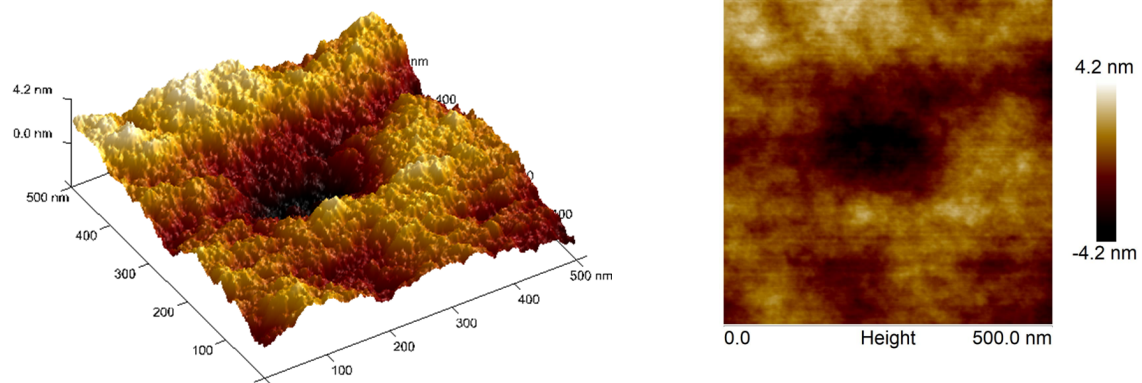
El resto de recubrimientos desarrollados van a ser empleados en futuros análisis.

5.2.1 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

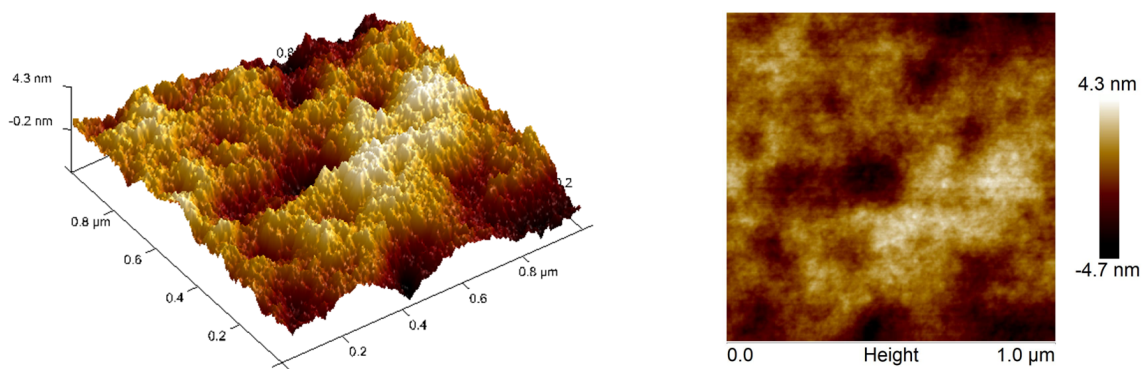
AFM_1: Acero AISI 316 con APTES y nanopartículas de plata estabilizadas con PVP

Para analizar la rugosidad de la muestra se analizan distintas zonas de la misma muestra.

1º zona:



2º zona:



3º zona:

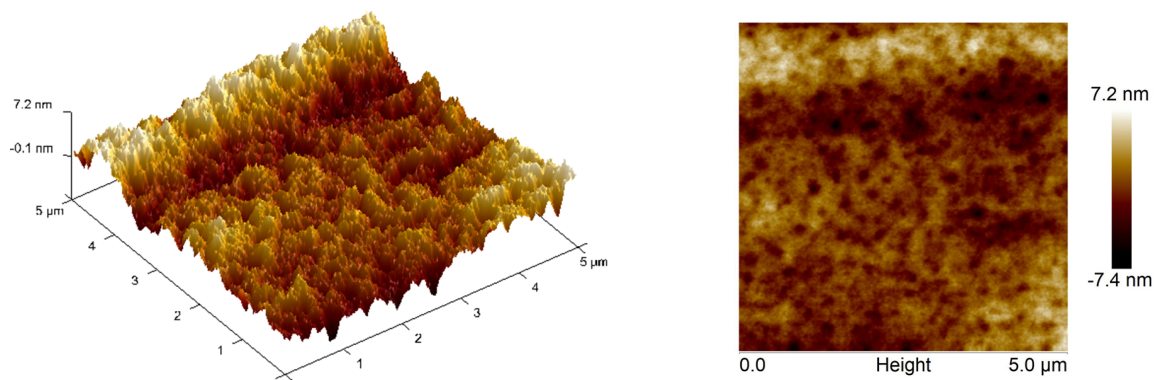


Figura 39 - Imágenes AFM de distintas secciones de la muestra AFM_1 (izquierda: imagen 3D, derecha: imagen 2D desde vista superior), obtenidas en tapping mode

Análisis de la rugosidad:

| | 1° zona | 2° zona | 3° zona |
|--------------------------------------|---------|---------|---------|
| RMS roughness (nm) | 1,16 | 1,34 | 1,77 |
| Maximum peak Height (nm) | 3 | 3,72 | 6,21 |
| Surface area (µm²) | 0,25 | 1 | 25 |

Tabla 4 - Análisis de rugosidad de 3 zonas de la muestra AFM_1

Siendo:

- **RMS roughness:** media cuadrática de las desviaciones de altura tomadas del plano medio de datos de la imagen, calculado como:

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum(Z_i)^2}{N}} \quad \begin{array}{l} Z_i = \text{altura de cada punto} \\ N = \text{número de puntos en la región} \end{array}$$

- **Maximum Peak Height:** altura máxima del pico dentro de la zona analizada con respecto al plano medio de datos.
- **Surface area:** área analizada.

En las imágenes de la Figura 39 se puede observar que la muestra analizada es rugosa, ya que presenta muchos desniveles en la superficie. Era algo esperado, ya que las nanopartículas y el polímero no se depositan de forma gradual sobre toda la superficie, sino que se dopan ciertas zonas. A pesar de ello, sí que se observa que la pulverización se da de manera uniforme, ya que las tres regiones analizadas presentan una morfología y espesor similares.

5.2.2 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

Esta técnica nos permite estudiar los elementos químicos presentes en la muestra y observar su estado de oxidación. Nos interesa especialmente estudiar el estado de oxidación de la plata, para ver si la reducción de plata iónica a plata metálica se está dando correctamente.

XPS_1: Acero AISI 316 con APTES y nanopartículas de plata estabilizadas con PVP

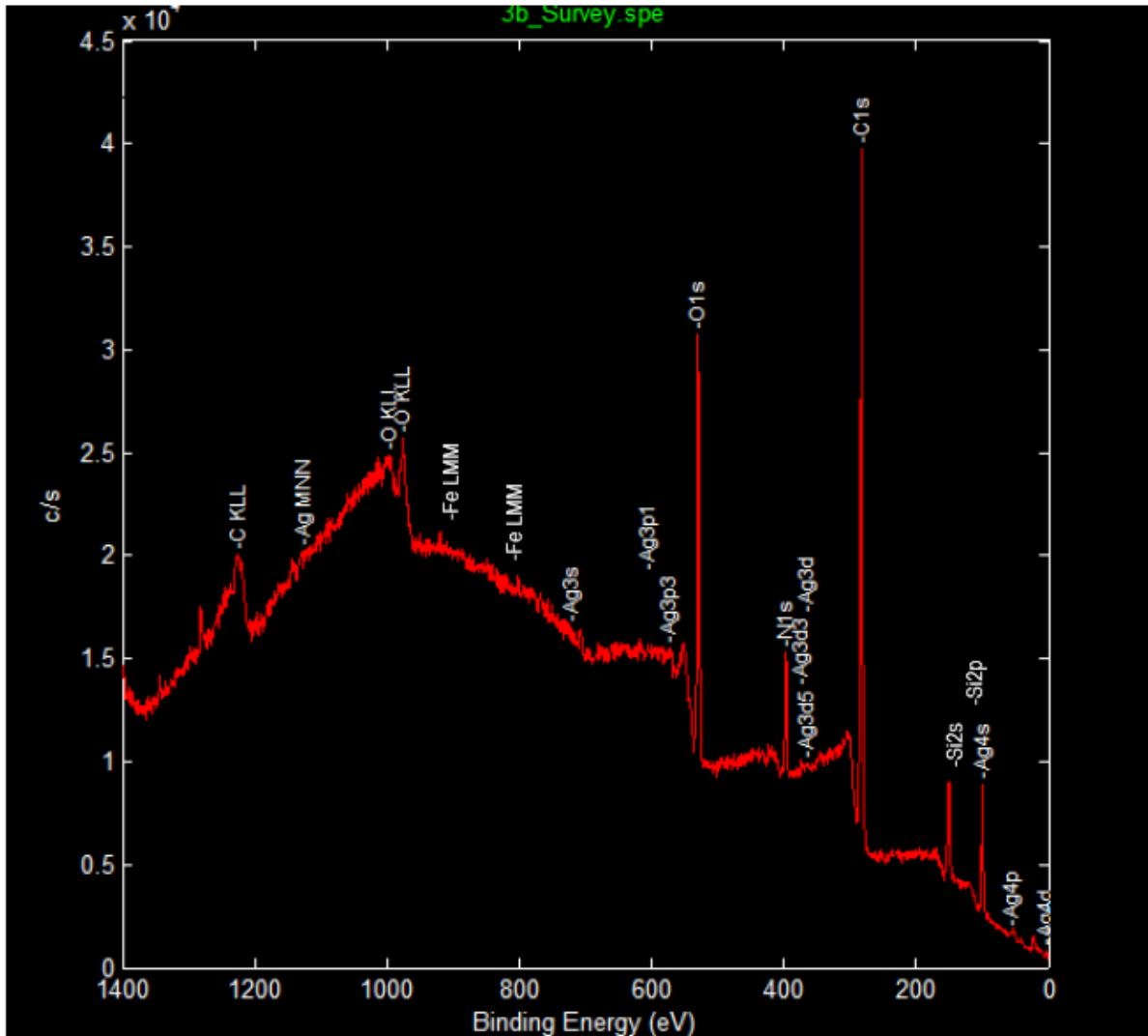


Figura 40 - Espectro XPS general de la muestra XPS_1

En la *Figura 40* se aprecian picos de carbono (C), nitrógeno (N), oxígeno (O), hierro (Fe), silicio (Si) y plata (Ag), por lo que nos está indicando la presencia de estos elementos en nuestra muestra. Coincide con lo esperado, ya que el hierro proviene del acero, la plata viene del nitrato de plata añadido a la disolución, el silicio viene del APTES y el resto de elementos (C, N y O) provienen tanto del APTES como del PVP, ya que ambos compuestos son elementos orgánicos. Como tenemos compuestos orgánicos unidos a un metal (la plata, Ag) estamos ante un compuesto organometálico.

Recordemos la estructura química de estos compuestos:

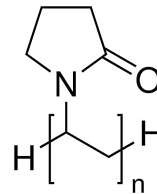
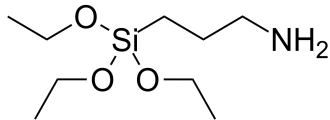
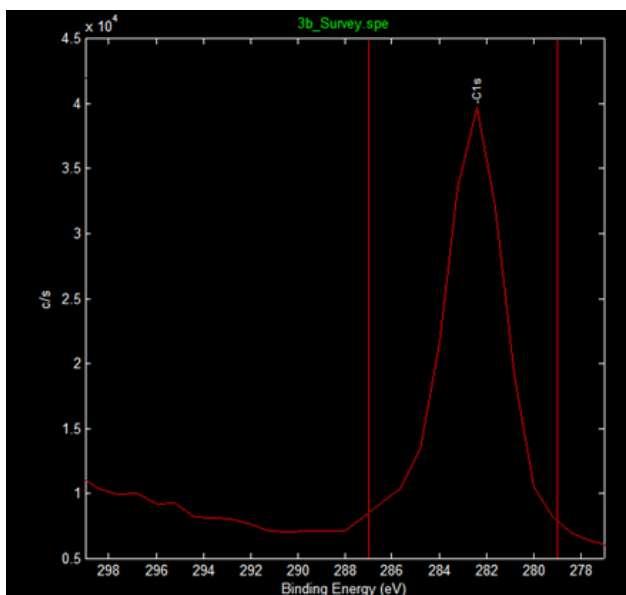


Figura 41 - Composición química del APTES

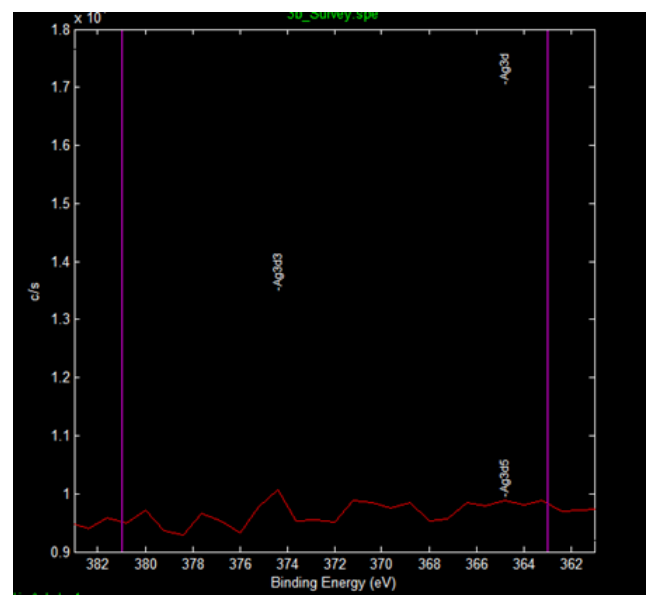
Figura 42 - Composición química del PVP

El hidrógeno no aparece ya que esta técnica no es capaz de determinar ni el hidrógeno ni el helio.

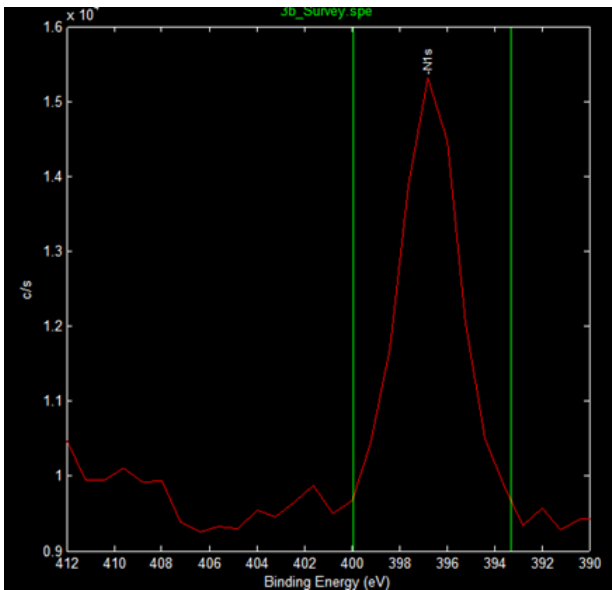
Se ha realizado un zoom sobre los picos de C, N, O y Ag (*Figura 43*).



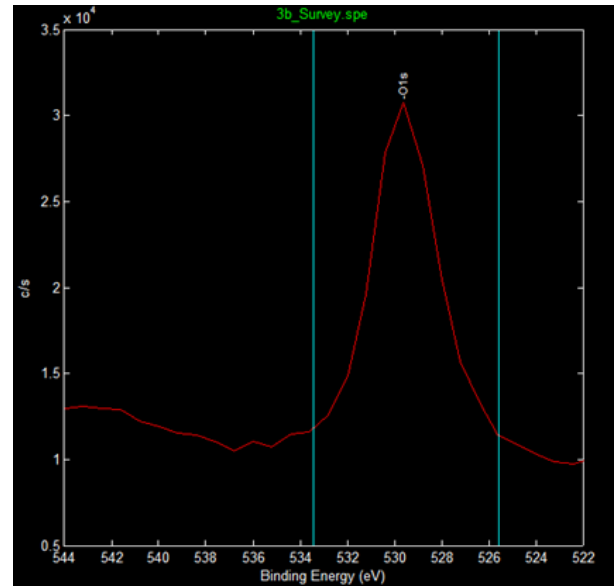
a)



b)



c)



d)

Figura 43 - Espectros de a) C, b) Ag, c) N y d) O de la muestra 3

Nos interesa especialmente, analizar el estado de oxidación de la plata. Para ello, debemos fijarnos en los picos $3d^3$ y $3d^5$. Ambos picos tienen muy poca amplitud, ya que no hay mucha proporción de plata en la muestra, concretamente un 0.06% (Figura 44). Por ello, es difícil analizar el estado de oxidación. Tras consultar la bibliografía se concluye que la mayor parte de plata está en estado de oxidación 0, pero también existe plata en estado de oxidación 1. Esta última puede venir del nitrato de plata empleado en la disolución, debido a que parte se ha quedado sin reducir. Otra alternativa es que al llegar las deposiciones húmedas al colector, la plata ha podido reaccionar.

| Atomic Concentration Table | | | | | | | |
|----------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|---------|--------------|
| | C1s | N1s | O1s | Si2p | Fe2p3 | Ag3d | |
| | 0.314 | 0.499 | 0.733 | 0.368 | 1.964 | 6.277 | RSF |
| | 7.804 | 12.701 | 19.145 | 10.252 | 57.812 | 179.688 | CorrectedRSF |
| 3b | 69.22 | 5.38 | 15.96 | 8.95 | 0.43 | 0.06 | |

Figura 44 - Tabla de concentración atómica de la Muestra 3

6. CONCLUSIONES

Mediante este trabajo se ha realizado la síntesis de recubrimientos poliméricos que contienen nanopartículas de plata, con el objetivo de crear recubrimientos biocidas sobre superficies de acero inoxidable. Para ello, se propone el uso del Electro spraying, una técnica prometedora para la deposición de nanopartículas que permite tener un mayor control en la dispersión de la disolución.

Los ensayos realizados han mostrado una deposición uniforme y homogénea de las nanopartículas de plata (AgNP) sobre las probetas de acero inoxidable, por lo que se puede afirmar que el Electro spraying es una técnica útil para realizar este tipo de deposiciones. Además, se ha observado que las AgNPs están unidas a la polivinilpirrolidona, formando estructuras de unas pocas micras.

Por otro lado, las imágenes AFM nos han afirmado que el recubrimiento desarrollado es rugoso, debido a la pulverización de las nanopartículas y el polímero. A pesar de ello, el espesor medio y la rugosidad RMS tienen valores similares a lo largo de la muestra.

Por último, se ha mostrado que existe tanto plata en estado de oxidación 0 como en estado de oxidación 1. Esto es un factor a tener en cuenta ya que el efecto biocida de la plata puede variar según el estado de oxidación.

7. LÍNEAS FUTURAS

Todavía existe un largo camino en la realización de este proyecto. El objetivo principal es seguir optimizando el proceso de Electro spraying, ya que todavía no se ha conseguido realizar una deposición que llegue seca al colector. Para ello, se plantea modificar ligeramente la disolución o utilizar una placa calefactora para ayudar en la evaporación del disolvente. Otra alternativa es volver a intentar realizar la deposición cuando las condiciones de humedad relativa sean $< 20\%$, ya que como se ha comentado, es un parámetro de gran impacto. Por otro lado, para confirmar la funcionalidad del recubrimiento, es necesario realizar ensayos biocidas (bactericidas y virucidas principalmente). A partir de los resultados obtenidos, se deberá ir optimizando el proceso e ir definiendo la concentración de plata mínima necesaria. Además, es necesario realizar también una caracterización mecánica.

8. REFERENCIAS

- [1] Epine.es. 2021. ESTUDIO EPINE-EPPS nº 31: 2021 Informe España. *Epine - Estudio de Prevalencia de las enfermedades Nosocomiales en España*, p.6.
- [2] Martínez, J.; García, L.; Torijano, M.J.; Ordobás, M.; Esteban, M.J.; Robustillo, A.; Figuerola, A.; Isidoro, B.; Brugarolas, C.; García, C.; Troncoso, D.; Vigil, D.; Gálvez, E.M.; De las Casas, G.; Fernández, I.; Sanz, I.; Oliva, L.; Valcarcel, M.A.; Sánchez, R. y Bru, S. Protocolo de medidas de prevención de la transmisión de microorganismos en los centros hospitalarios. Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad. Madrid, 2019. Madrid.org. 2022. *Comunidad de Madrid*.
- [3] Castaño, N., Cordts, S., Kurosu Jalil, M., Zhang, K., Koppaka, S., Bick, A., Paul, R. and Tang, S., 2021. Fomite Transmission, Physicochemical Origin of Virus–Surface Interactions, and Disinfection Strategies for Enveloped Viruses with Applications to SARS-CoV-2. *ACS Omega*, 6(10), pp.6509-6527.
- [4] Carvalho, F., Teixeira-Santos, R., Mergulhão, F. and Gomes, L., 2020. The Use of Probiotics to Fight Biofilms in Medical Devices: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Microorganisms*, 9(1), p.27.
- [5] Pabbati, R., Aerupula, M., Shaik, F. and Kondakindi, V., 2021. Nanoparticles for Biofilm Control. *Nanotechnology for Advances in Medical Microbiology*, pp.227-247.
- [6] Cyphert, E. and von Recum, H., 2017. Emerging technologies for long-term antimicrobial device coatings: advantages and limitations. *Experimental Biology and Medicine*, 242(8), pp.788-798.
- [7] ETSEIB - Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial de Barcelona. Desarrollo de recubrimientos de Polihidroxiclcanoatos sobre titanio con propiedades antibacterianas para aplicaciones biomédicas. [online] Available at: <<https://docplayer.es/74712329-Desarrollo-de-recubrimientos-de-polihidroxiclcanoatos-sobre-titanio-con-propiedades-antibacterianas-para-aplicaciones-biomedicas-pag.html>>.
- [8] Jia, Z., Xiu, P., Li, M., Xu, X., Shi, Y., Cheng, Y., Wei, S., Zheng, Y., Xi, T., Cai, H. and Liu, Z., 2016. Bioinspired anchoring AgNPs onto micro-nanoporous TiO₂ orthopedic coatings: Trap-killing of bacteria, surface-regulated osteoblast functions and host responses. *Biomaterials*, 75, pp.203-222.
- [9] Ziental, D., Czarczynska-Goslinska, B., Mlynarczyk, D., Glowacka-Sobotta, A., Stanisiz, B., Goslinski, T. and Sobotta, L., 2020. Titanium Dioxide Nanoparticles: Prospects and Applications in Medicine. *Nanomaterials*, 10(2), p.387.
- [10] Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N., Ann, L., Bakhori, S., Hasan, H. and Mohamad, D., 2015. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Letters*, 7(3), pp.219-242.
- [11] Waris, A., Din, M., Ali, A., Ali, M., Afridi, S., Baset, A. and Ullah Khan, A., 2021. A comprehensive review of green synthesis of copper oxide nanoparticles and their diverse biomedical applications. *Inorganic Chemistry Communications*, 123, p.108369.
- [12] Zanini, S., Polissi, A., Maccagni, E., Dell’Orto, E., Liberatore, C. and Riccardi, C., 2015. Development of antibacterial quaternary ammonium silane coatings on polyurethane catheters. *Journal of Colloid and Interface Science*, 451, pp.78-84.
- [13] Hernández, S., Juan, R., Querol, X., Alastuey, A., Ferrer, P. Andrés, J. 2003. Activación de cenizas volantes para retención de gases contaminantes. Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio, ISSN 0366-3175, Vol. 42, Nº. 1, 2003, pags. 33-37

- [14] Uzakbaiuly, B., Mukanova, A., Zhang, Y. and Bakenov, Z., 2021. Physical Vapor Deposition of Cathode Materials for All Solid-State Li Ion Batteries: A Review. *Frontiers in Energy Research*, 9.
- [15] Dussán Cuenca, A., Quiroz Gaitán, H y Calderón Cómbita, J. 2020. Nanomateriales que revolucionan la tecnología : perspectivas y aplicaciones en espintrónica. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, p.26.
- [16] Faure, B., Salazar-Alvarez, G., Ahniyaz, A., Villaluenga, I., Berriozabal, G., De Miguel, Y. and Bergström, L., 2013. Dispersion and surface functionalization of oxide nanoparticles for transparent photocatalytic and UV-protecting coatings and sunscreens. *Science and Technology of Advanced Materials*, 14(2), p.023001.
- [17] Tang, J., Wu, C., Chen, S., Qiao, Z., Borovskikh, P., Shchegolkov, A., Chen, L., Wei, D., Sun, J. and Fan, H., 2020. Combining Electrospinning and Electrospraying to Prepare a Biomimetic Neural Scaffold with Synergistic Cues of Topography and Electrotransduction. *ACS Applied Bio Materials*, 3(8), pp.5148-5159.
- [18] Wang, J., Xu, H., Huo, Y., Wang, Y. and Dong, M., 2020. Progress of electrospray and electrospinning in energy applications. *Nanotechnology*, 31(13), p.132001.
- [19] Singh, S. and Subramanian, A., 2020. Phase-field simulations of electrohydrodynamic jetting for printing nano-to-microscopic constructs. *RSC Advances*, 10(42), pp.25022-25028.
- [20] Saallah, S. and Lenggoro, I., 2018. Nanoparticles Carrying Biological Molecules: Recent Advances and Applications. *KONA Powder and Particle Journal*, 35(0), pp.89-111.
- [21] Tapia-Hernández, J., Rodríguez-Félix, F. and Katouzian, I., 2017. Nanocapsule formation by electrospraying. *Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries*, pp.320-345.
- [22] Jain, E., Scott, K., Zustiak, S. and Sell, S., 2015. Fabrication of Polyethylene Glycol-Based Hydrogel Microspheres Through Electrospraying. *Macromolecular Materials and Engineering*, 300(8), pp.823-835.
- [23] Chang, M., Stride, E. and Edirisinghe, M., 2010. Controlling the thickness of hollow polymeric microspheres prepared by electrohydrodynamic atomization. *Journal of The Royal Society Interface*, 7(suppl_4).
- [24] Ghayempour, S. and Mortazavi, S., 2013. Fabrication of micro–nanocapsules by a new electrospraying method using coaxial jets and examination of effective parameters on their production. *Journal of Electrostatics*, 71(4), pp.717-727.
- [25] Guarino, V., Altobelli, R., Cirillo, V., Cummaro, A. and Ambrosio, L., 2015. Additive electrospraying: a route to process electrospun scaffolds for controlled molecular release. *Polymers for Advanced Technologies*, 26(12), pp.1359-1369.
- [26] Khan, M., Schutyser, M., Schroën, K. and Boom, R., 2012. The potential of electrospraying for hydrophobic film coating on foods. *Journal of Food Engineering*, 108(3), pp.410-416.
- [27] Gianibelli, M., Larroque, O., MacRitchie, F. and Wrigley, C., 2001. Biochemical, Genetic, and Molecular Characterization of Wheat Glutenin and Its Component Subunits. *Cereal Chemistry Journal*, 78(6), pp.635-646
- [28] Coll, A., Bermejo, S., Martín, I. and Castaner, L., 2015. Effect of nanofluid conductivity and humidity on the self-assembly of nanoparticles deposited by electrospray. *2015 10th Spanish Conference on Electron Devices (CDE)*.
- [29] Medici, S., Peana, M., Nurchi, V. and Zoroddu, M., 2019. Medical Uses of Silver: History, Myths, and Scientific Evidence. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(13), pp.5923-5943.

- [30] Beyth, N., Hourri-Haddad, Y., Domb, A., Khan, W. and Hazan, R., 2015. Alternative Antimicrobial Approach: Nano-Antimicrobial Materials. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, pp.1-16.
- [31] Morones, J., Elechiguerra, J., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J., Ramirez, J. and Yacaman, M., 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), pp.2346-2353.
- [32] Salleh, A., Naomi, R., Utami, N., Mohammad, A., Mahmoudi, E., Mustafa, N. and Fauzi, M., 2020. The Potential of Silver Nanoparticles for Antiviral and Antibacterial Applications: A Mechanism of Action. *Nanomaterials*, 10(8), p.1566.
- [33] Naik, K. and Kowshik, M., 2017. The silver lining: towards the responsible and limited usage of silver. *Journal of Applied Microbiology*, 123(5), pp.1068-1087.
- [34] Galdiero, S., Falanga, A., Vitiello, M., Cantisani, M., Marra, V. and Galdiero, M., 2011. Silver Nanoparticles as Potential Antiviral Agents. *Molecules*, 16(10), pp.8894-8918.
- [35] Rudramurthy, G. and Swamy, M., 2018. Potential applications of engineered nanoparticles in medicine and biology: an update. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 23(8), pp.1185-1204.
- [36] Lu, H., Tang, S., Yun, G., Li, H., Zhang, Y., Qiao, R. and Li, W., 2020. Modular and Integrated Systems for Nanoparticle and Microparticle Synthesis—A Review. *Biosensors*, 10(11), p.165.
- [37] Ajdary, M., Moosavi, M., Rahmati, M., Falahati, M., Mahboubi, M., Mandegary, A., Jangjoo, S., Mohammadinejad, R. and Varma, R., 2018. Health Concerns of Various Nanoparticles: A Review of Their in Vitro and in Vivo Toxicity. *Nanomaterials*, 8(9), p.634.
- [38] Chen, L., Zheng, L., Lv, Y., Liu, H., Wang, G., Ren, N., Liu, D., Wang, J. and Boughton, R., 2010. Chemical assembly of silver nanoparticles on stainless steel for antimicrobial applications. *Surface and Coatings Technology*, 204(23), pp.3871-3875.
- [39] Sevenler, D., Ünlü, N. and Ünlü, M., 2015. Nanoparticle Biosensing with Interferometric Reflectance Imaging. *Nanobiosensors and Nanobioanalyses*, pp.81-95.

ANEXO I - Medida de la tensión superficial mediante el método del anillo de Du Noüy

El método del anillo de Du Noüy se basa en medir la fuerza necesaria para separar un anillo (en nuestro caso de platino) de la superficie de un líquido. Esta fuerza está relacionada con la tensión superficial del líquido, tal y como se observa en la *Ecuación 1*.

$$\gamma = \frac{\Delta F}{4\pi R} \quad (\text{Ec. 1})$$

Para realizar la medida se coloca el anillo colgando de una balanza y se sumerge en el líquido. La máquina va a ir extrayendo lentamente el anillo del líquido y el dinamómetro medirá la fuerza ΔF necesaria para ser separado de la superficie. Como el anillo tiene cierto espesor, la tensión superficial se produce en ambos lados del anillo, por lo que para el cálculo se debe coger dos veces el factor $2\pi R$.

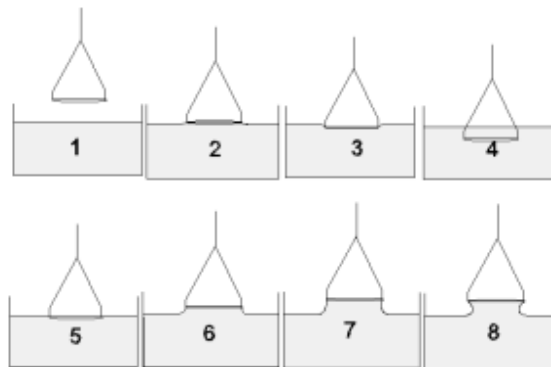


Figura 45 - Etapas de la medida de la tensión superficial

El tensiómetro empleado ha sido el modelo **Sigma 703D** (véase Figura 46).



Figura 46 - Tensiómetro Sigma 703D

ANEXO 2 - Medida de la conductividad eléctrica de la disolución

El objetivo es generar un circuito cerrado y aplicar una diferencia de potencial, generando de esta manera una corriente eléctrica que atravesará el fluido del que queremos medir la conductividad (Figura 47).

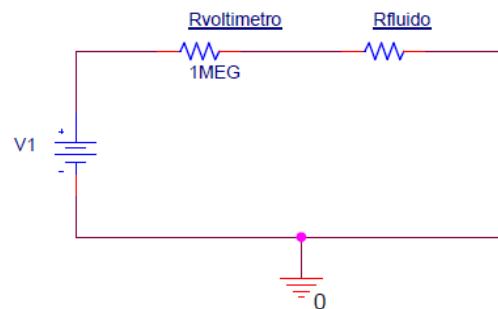


Figura 47 - Boceto del circuito montado

Midiendo la caída de tensión que se da en el voltímetro (ΔV) y conociendo su resistencia interna ($R_{\text{voltímetro}}=1\text{M}\Omega$), mediante Ley de Ohm (Ec. 2) se calcula la corriente que tenemos en el circuito.

$$I = \frac{\Delta V}{R_{\text{voltímetro}}} \quad (\text{Ec. 2})$$

Como ambas resistencias están en serie sabemos que la corriente que circula por ambas es la misma. Conocida la I que circula por nuestro fluido y fijando una diferencia de potencial $V1$, podemos calcular la resistencia de nuestro fluido (R_{fluido}).

$$R_{\text{fluido}} = \frac{V1 - \Delta V}{I} \quad (\text{Ec. 3})$$

Conocida la largura del tubo empleado y el área del tubo, calculamos la resistividad (Ec. 4).

$$\rho = \frac{R_{\text{fluido}} \cdot A}{L} = \frac{R_{\text{fluido}} \cdot \frac{\pi D^2}{4}}{L} \quad (\text{Ec. 4})$$

Conocida la proporcionalidad inversa entre la conductividad y la resistividad, despejamos la conductividad (Ec. 5).

$$\sigma = \frac{1}{\rho} \quad (\text{Ec. 5})$$