

UCH-FC
DOC-Q
V 714
C. 1



**PELÍCULAS FORMADAS POR MULTICAPAS DE
POLIELECTROLITOS CONTENIENDO
AMINOAZÚCARES. POTENCIAL APLICACIÓN
EN PELÍCULAS ANTIBACTERIANAS.**

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Doctora en Química

Facultad De Ciencias

Por

Valeria de los Ángeles Villalobos Lepe

Mayo, 2016

Directores de Tesis: Dra. Marcela Urzúa.

Dr. Yves Queneau.

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

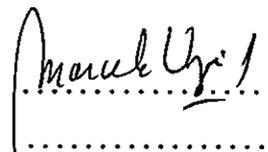
Valeria de los Ángeles Villalobos Lepe

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctorado en Química, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 31 de marzo del año 2016

Directores de Tesis:

Dra. Marcela Urzúa

Dr. Yves Queneau



.....

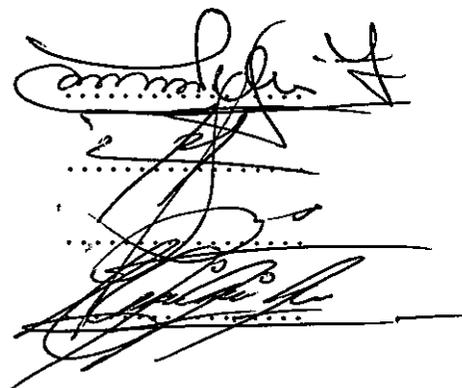
Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Antonio Zanooco

Dr. Deodato Radic'

Dr. Sergio Álvarez

Dr. Andrónico Neira



.....

Conozca todas las teorías. Domine todas las técnicas, pero al tocar un alma humana, sea apenas otra alma humana.

Carl G. Jung

BIOGRAFIA



Valeria Villalobos Lepe nació en Santiago de Chile el 30 de abril de 1989. Egresó de cuarto medio en el año 2006, del Liceo N°1 de niñas Javiera Carrera. En el año 2007 ingresó a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile con el primer puntaje de ingreso, para obtener el grado de Licenciada en Ciencias con mención en Química en el año 2010, egresando en el primer lugar de su promoción.

La Srta. Villalobos ingresa al Programa de Doctorado en Química de la Universidad de Chile en segundo lugar en el año 2011, desarrollando su Tesis Doctoral en el Laboratorio de Físico-Química de la Facultad de Ciencias.

Durante la realización del Doctorado la Srta. Villalobos se adjudicó la beca Luis Sepúlveda, otorgada por el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y posteriormente obtuvo la Beca Conicyt ocupando el cuarto lugar de adjudicación. Durante el desarrollo de su Tesis Doctoral realizó dos estadías de investigación bajo la dirección del Dr. Yves Queneau, Director del Instituto de Química

y Bioquímica Molecular y Supramolecular, Laboratorio de Química Orgánica y Bioorgánica de I'INSA de Lyon, Universidad de Lyon, Francia. La primera estadía de investigación fue desarrollada durante tres meses en marco de un proyecto FONDECYT relacionado a la Tesis Doctoral. La segunda estadía fue de dos meses financiada por la Embajada de Francia y el Departamento de Postgrado y Postítulo de la Vicerrectoría de Asuntos Académicos de la Universidad de Chile. También, realizó una estadía de investigación en el laboratorio de la Dra. Denise F.S. Petri del Departamento de Química, en el Instituto de Química, Universidad de São Paulo, São Paulo, Brasil. Finalmente, realizó cursos de perfeccionamiento en el área de química de coloides y superficies.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis directores de Tesis, Dra. Marcela Urzúa y Dr. Yves Queneau, por depositar su confianza en mí. Por su paciencia, ayuda y consejos, los que me han hecho crecer como persona e investigadora.

A la comisión de Tesis Doctoral integrada por los académicos: Dr. Deodato Radic', Dr. Antonio Zanocco, Dr. Sergio Álvarez y Dr. Andrónico Neira, por su dedicación, sus sugerencias y críticas constructivas durante el desarrollo de esta Tesis.

Quiero agradecer al Dr. Jorge Pavez y al Dr. Francisco Chávez por contribuir con su conocimiento y buena disposición al desarrollo de esta tesis. A la Dra. Denise F.S. Petri y Dr. Mohammed Ahmar por contribuir al desarrollo de esta Tesis y a mi formación como científica, por su amabilidad, buena disposición y recepción durante mis estadías de investigación en el extranjero.

Agradezco al Dr. Hernán Ríos por su preocupación y respaldo constante. A mis compañeros del Laboratorio de Físico-Química de la Facultad de Ciencias y a la Sra. Maria Luz Peña, por su compañía y apoyo durante este proceso.

A mis grandes amigos Juani, Camila, Victoria y Hans por su apoyo, ánimo y cariño constante.

Finalmente, quiero agradecer a mis padres y hermana: Arturo, Julia y Natalia, por su comprensión, apoyo y gran amor.

PUBLICACIONES DURANTE EL PERIODO DE DOCTORADO

- Design of highly efficient antimicrobial polyelectrolytes multilayer films. A. Leiva, H. Ríos, J. Pavez, M. Ahmar, Y. Queneau, F. Chavez, V. Villalobos and M. Urzúa. *Angew. Chim. (Enviado)*.
- Functionalization of poly(maleic anhydride-alt-styrene) with amino sugars. Influence of the nature of the amino sugars in the construction of polyelectrolyte multilayers. V. Villalobos, M. Urzúa, Y. Queneau, M. Ahmar. *(En etapa de redacción)*.

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

Los resultados obtenidos en esta tesis fueron presentados en los siguientes congresos nacionales:

- “Construcción de multicapas formadas por polielectrolitos conteniendo aminoazúcares y polielectrolitos catiónicos. Ensayos preliminares de comportamiento antibacteriano”. Valeria Villalobos, Marcela Urzúa, Francisco Chávez. XXX Jornadas Chilenas de Química, 12-15 de Noviembre de 2013, Pucón, Chile. Presentación oral.

- "Películas poliméricas híbridas con potencial actividad antibacteriana. Efecto del peso molecular, espesor y rugosidad de la película adsorbida en una superficie sólida". Valeria Villalobos, Marcela Urzúa, Francisco Chávez, Yves Queneau. VII Coloquio de Macromoléculas, 3-6 de Diciembre de 2014, Termas de Catillo, Parral, Chile. Modalidad Póster.

PASANTÍAS EN EL EXTRANJERO

- Síntesis de aminoazúcares. Profesor guía: Yves Queneau. Instituto de Química y Bioquímica Molecular y Supramolecular, Laboratorio de Química Orgánica y Bioorgánica de I'NSA de Lyon, Universidad de Lyon, Francia. 29 de enero-28 de abril de 2012. Financiamiento: Proyecto Fondecyt N°1100240.
- Determinación de energía superficial. Profesor guía: Denis Freitas Siqueira Petri Instituto de Química, Universidad de São Paulo, São Paulo, Brasil. 4 de febrero-10 de marzo de 2013.
- Síntesis de aminoazúcares derivados de isomaltulosa. Profesor guía: Yves Queneau. Instituto de Química y Bioquímica Molecular y Supramolecular, Laboratorio de Química Orgánica y Bioorgánica de I'NSA de Lyon, Universidad Lyon, Francia. 18 de noviembre-18 de enero de 2014. Financiamiento: Beca de Departamento de Postgrado y Postítulo de la Vicerrectoría de Asuntos Académicos e Instituto Francés de Chile - Embajada de Francia.

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE TABLAS	xxi
RESUMEN	xxiv
ABSTRACT.....	xxvii
LISTA DE ABREVIACIONES.....	xxx
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	32
1.1 Introducción.....	33
1.1.1 Aspectos generales.....	34
1.1.1.1 Polielectrolitos.....	34
1.1.1.2 Adsorción de polielectrolitos en superficies sólidas.....	37
1.1.2 Poli(anhídrido maléico-alt-estireno).....	40
1.1.2.1 Construcción de multicapas.....	45
1.1.2.2 Resistencia bacteriana: Pseudomonas aeruginosa y Salmonella Thyphimurium.....	49
1.1.2.3 Mecanismos de acción antibacteriana.....	53
1.1.2.4 Factores que influyen en la capacidad antibacteriana de las películas de multicapas.....	55
1.2 HIPÓTESIS.....	59

1.3	OBJETIVOS.....	60
1.3.1	Objetivo general.....	60
1.3.2	Objetivos específicos.....	60
CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL.....		62
1.4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
1.4.1	Reactivos.....	63
1.4.2	Materiales.....	68
1.4.3	Equipos.....	69
1.4.4	Síntesis.....	71
1.4.4.1	Síntesis del copolímero base, P(AM-alt-E).....	71
1.4.4.2	Síntesis de aminoazúcares.....	73
1.4.4.2.1	Síntesis de 5-amino-5-deoxi-1,2- <i>O</i> -isopropilideno- α -D-xilofuranosa.....	75
1.4.4.2.2	Síntesis de 3-amino-3-deoxi-1,2:5,6-di- <i>O</i> -isopropilideno- α -D-alofuranosa.....	78
1.4.4.2.3	Síntesis de 6-amino-6-deoxi-1,2:3,4-di- <i>O</i> -isopropilideno- α -D-galactopiranososa.....	81
1.4.4.2.4	Síntesis de 6-amino-6-deoxi-1,2- <i>O</i> -isopropilideno- α -D-glucofuranosa.....	83
1.4.5	Modificación del copolímero P(AM-alt-E) con aminoazúcares.....	86

1.4.5.1	Obtención del polielectrolito aniónico copolímero P- <i>aminoazúcar</i>	87
1.4.6	Cuaternización de P4VPy.	87
1.4.7	Caracterización Molecular.	88
1.4.8	Determinación de las condiciones experimentales para la construcción de multicapas.	88
1.4.8.1	pH.	89
1.4.8.2	Concentración de sal adicionada o fuerza iónica y concentración de la disolución de polielectrolito.	89
1.4.9	Preparación del sustrato.	90
1.4.10	Construcción de multicapas.	90
1.4.11	Caracterización de la superficie de las multicapas.	91
1.4.11.1	Determinación de cantidad adsorbida y espesor de las multicapas.	91
1.4.11.2	Determinación de la absorbancia.	92
1.4.11.3	Determinación de la morfología y topografía (RMS) de la multicapa.	92
1.4.11.4	Determinación de la humectabilidad.	93
1.4.11.5	Determinación de energía superficial.	94
1.4.12	Estudios de capacidad antibacteriana.	96
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		98
1.5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	99

1.5.1	Caracterización molecular del copolímero P(AM-alt-E), aminoazúcares y copolímero P- <i>aminoazúcar</i> .	99
1.5.1.1	Espectroscopía infrarrojo, FT-IR.	99
1.5.1.2	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones, NMR- H^1 .	101
1.5.1.3	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono trece (NMR- ^{13}C).	105
1.5.2	Caracterización molecular poli(4-vinilpiridina) N-alquil cuaternizada con bromuro de etilo y pentilo.	107
1.5.3	Determinación de condiciones experimentales de trabajo para la construcción de multicapas.	108
1.5.3.1	pH.	109
1.5.3.2	Concentración de sal adicionada y concentración de polielectrolito P- <i>aminoazúcar</i> .	110
1.5.4	Construcción de multicapas.	113
1.5.4.1	Determinación del espesor de la cantidad adsorbida en el proceso de construcción de multicapas.	113
1.5.4.2	Determinación de la absorbancia en el proceso de construcción de multicapas.	120
1.5.4.3	Determinación de la humectabilidad.	124
1.5.4.4	Determinación de la energía superficial.	128
1.5.4.5	Morfología y topografía de las multicapas.	131

1.5.5 Estudios de capacidad antibacteriana.....	139
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES.....	169
1.6 CONCLUSIONES	170
CAPÍTULO V: BIBLIOGRAFÍA	173
1.7 BIBLIOGRAFÍA	174
ANEXOS.....	183
1.8 ANEXO.....	184

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE TABLAS	xxi
RESUMEN	xxiv
ABSTRACT.....	xxvii
LISTA DE ABREVIACIONES.....	xxx
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	32
Figura 1 : Ejemplos de tipos de polielectrolitos.....	35
Figura 2 : Cambio de la conformación de un polielectrolito en disolución por efecto de la sal adicionada.	36
Figura 3 : Doble capa difusa. ²¹	38
Figura 4 : Teoría de DLVO: interacciones que gobiernan el proceso de adsorción en una superficie. ²¹	39
Figura 5 : Poli(anhídrido maléico -alt-estireno).....	41
Figura 6 : Polielectrolitos: A) P-Xil-f-(Iso)OH, B) P-Alo-f-(Iso) ₂ , C) P-Gal-p-(Iso) ₂ y D) P-Glu-f-Iso(OH) ₂	44
Figura 7 : Doble membrana celular de bacterias Gram negativas.....	50
Figura 8 : Ilustración médica de: A) <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> y B) <i>Salmonella Typhimurium</i> . (Center for disease control and prevention).	51

Figura 9 : Mecanismo de acción antibacteriana. A) Muerte de la bacteria por contacto y B) Exclusión de la bacteria de la superficie.....	53
Figura 10 : Capacidad antibacteriana debido a un efecto estérico generado por el polímero depositado en la superficie.	56
Figura 11 : Capacidad antibacteriana debido a la humectabilidad de la película de multicapas.....	57
Figura 12 : Capacidad antibacteriana debido a la rugosidad de la superficie de la multicapa.....	57
Figura 13 : Capacidad antibacteriana debido a la carga de la superficie de la película de multicapas.	58
Figura 14 : Capacidad antibacteriana debido a la energía superficial exhibida por la superficie.....	59
 CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL	 62
Figura 15 : Reacción de copolimerización P(AM-alt-E).....	71
Figura 16 : Gráfico de Huggins y Kraemer para la determinación de la viscosidad intrínseca del P(AM-alt-E).....	73
Figura 17 : Materiales iniciales para la síntesis de los aminoazúcares.	74
Figura 18 : Procedimiento general de síntesis. i) tosilación, o triflicación, de los azúcares protegidos; ii) azidación; iii) aminación de los azúcares protegidos.	74

Figura 19 : Esquema de síntesis de 5-amino-5-deoxi-1,2- <i>O</i> -isopropilideno- α -D-xilofuranosa.....	75
Figura 20 : Esquema de síntesis de 3-amino-3-deoxi-1,2:5,6-di- <i>O</i> -isopropilideno- α -D-alofuranosa.	78
Figura 21 : Esquema de síntesis de 6-amino-6-deoxi-1,2:3,4-di- <i>O</i> -isopropilideno- α -D-galactopiranososa.....	81
Figura 22 : Esquema de síntesis de 6-amino-6-deoxi-1,2- <i>O</i> -isopropilideno- α -D-glucofuranosa.....	84
Figura 23 : Reacción de copolímero P(AM-alt-E) con aminoazúcares.....	86
Figura 24 : Reacción cuaternización poli(4-vinilpiridina) con bromuro de etilo y pentilo.....	87
Figura 25 : Modificación hidrofílica del sustrato de SiW con APS.....	90
Figura 26 : Proceso de construcción de multicapas mediante la deposición alternada de polielectrolitos.....	91
Figura 27 : Determinación del ángulo de contacto.....	94
Figura 28 : Procedimiento experimental para la determinación de la capacidad antibacteriana de las multicapas.....	96
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	98
Figura 29 : Espectro FT-IR del copolímero P(AM-alt-E).....	100
Figura 30 : Espectro FT-IR del copolímero P-Xil-f-(Iso)OH.	100

Figura 31 : Espectro NMR- ¹ H del copolímero P(AM-alt-E).	101
Figura 32 : Espectro NMR- ¹ H 6-amino-6-deoxi-1,2:3,4-di- <i>O</i> -isopropilideno- α -D-galactopiranososa.	102
Figura 33 : Espectro NMR- ¹ H 5-amino-5-deoxi-1,2-di- <i>O</i> -isopropilideno- α -D-xilofuranosa.....	103
Figura 34 : Espectro NMR- ¹ H 3-amino-3-deoxi-1,2:5,6-di- <i>O</i> -isopropilideno- α -D-alofuranosa.....	103
Figura 35 : Espectro NMR- ¹ H 6-amino-6-desoxi-1,2-isopropilideno- α -D-glucofuranosa.....	104
Figura 36 : Espectro NMR- ¹³ C del copolímero P(AM-alt-E).	106
Figura 37 : Espectro NMR- ¹³ C del copolímero P-Xil-f-(Iso)OH.....	107
Figura 38 : Espectro FT-IR poli(4-vinilpiridina) N-alquil cuaternizada.....	108
Figura 39 : Efecto del pH. Disoluciones de copolímeros P- <i>aminoazúcar</i>	109
Figura 40 : Cantidad adsorbida de polielectrolito P- <i>aminoazúcar</i> en función de la concentración de la solución, a diferente concentración de sal adicionada: 0,1M (■) y 0,001M (□) de NaCl. A) P ₆₂ -Gal-p-(Iso) ₂ y B) P ₃₂ -Alo-f-(Iso) ₂	110
Figura 41 : Representación esquemática del comportamiento de adsorción del polielectrolito copolímero P- <i>aminoazúcar</i>	112
Figura 42 : Espesor de las multicapas de polielectrolitos en función del número de capas depositadas de P ₄ VPy-C ₂ (■) y P ₄ VPy-C ₅ (□) con los polielectrolitos copolímero P- <i>aminoazúcar</i> a M _v =6,2x10 ⁴ gmol ⁻¹ (negro) y M _v =3,2x10 ⁴ gmol ⁻¹ (rojo).	114

Figura 43 : Espesor de las multicapas de polielectrolitos en función del número de capas depositadas de P ₄ VPy-C ₂ (■) y P ₄ VPy-C ₅ (□) con los polielectrolitos copolímero P- <i>aminoazúcar</i> a M _v =6,2x10 ⁴ gmol ⁻¹ (negro) y M _v =3,2x10 ⁴ gmol ⁻¹ (rojo).	115
Figura 44 : Representación del proceso de difusión de cadenas cortas de polielectrolito desde la capa ya adsorbida hacia la disolución y viceversa.	117
Figura 45 : Grupos funcionales para formar interacciones intra- e inter- moleculares en polielectrolitos aniónicos. A)P-Glu-f-Iso(OH) ₂ , en su cadena lateral posee un anillo de glucofuranosa parcialmente protegido con dos grupos hidroxilos y B)P-Gal-p-(Iso) ₂ , en su cadena lateral posee un anillo de galactopiranososa completamente protegido....	118
Figura 46 : Orientación de cadenas alquílicas de P ₄ VPy-C _n al adsorberse sobre el sustrato (SiW).	119
Figura 47 : Valores de absorbancia a medida que aumenta el número de capas formadas en las multicapas formadas por P ₄ VPy-C ₂ (■) y P ₄ VPy-C ₅ (□) con los polielectrolitos de copolímero P- <i>aminoazúcar</i> a M _v =6,2x10 ⁴ gmol ⁻¹ (negro) y M _v =3,2x10 ⁴ gmol ⁻¹ (rojo).	121
Figura 48 : Valores de absorbancia a medida que aumenta el número de capas en las multicapas formadas por P ₄ VPy-C ₂ (■) y P ₄ VPy-C ₅ (□) con los polielectrolitos de copolímero P- <i>aminoazúcar</i> a M _v =6,2x10 ⁴ gmol ⁻¹ (negro) y M _v =3,2x10 ⁴ gmol ⁻¹ (rojo).....	122

Figura 49 : Imágenes obtenidas en el proceso de medición del ángulo de contacto: A) Multicapa P ₆₂ -Alo-f-(Iso) ₂ /P4VPy-C ₂ y B) Multicapa P ₃₂ -Xil-f-(Iso)OH/P4VPy-C ₂	126
Figura 50 : Imágenes de altura obtenidas mediante Microscopía de Fuerza Atómica de las multicapas formadas por P ₆₂ -Xil-f-(Iso)OH y P ₆₂ -Alo-f-(Iso) ₂ con P4VPy-C _n	132
Figura 51 : Imágenes de altura obtenidas mediante Microscopía de Fuerza Atómica de las multicapas formadas por P ₆₂ -Gal-p-(Iso) ₂ y P ₆₂ -Glu-f-Iso(OH) ₂ con P4VPy-C _n	133
Figura 52 : Imágenes de altura obtenidas mediante Microscopía de Fuerza Atómica de P ₃₂ -Xil-f-(Iso)OH y P ₃₂ -Alo-f-(Iso) ₂ con P4VPy-C _n	135
Figura 53 : Imágenes obtenidas de altura mediante Microscopía de Fuerza Atómica de las multicapas formadas por P ₃₂ -Gal-p-(Iso) ₂ y P ₃₂ -Glu-f-Iso(OH) ₂ con P4VPy-C _n	136
Figura 54 : Modelo hipotético. Formación y adsorción de agregados en superficie del polielectrolito copolímero P-Glu-f-Iso(OH) ₂	138
Figura 55 : Placa de 48 pocillos con sustratos modificados con multicapas de: A)P-Xil-f-(Iso)OH y P-Glu-f-Iso(OH) ₂ y B)P-Alo-f-(Iso) ₂ y P-Gal-p-(Iso) ₂ , (M _v = 6,2x10 ⁴ gmol ⁻¹ y 3,2x10 ⁴ gmol ⁻¹), con P4VPy-C ₅ y P4VPy-C ₂	140
Figura 56 : Imágenes obtenidas por lupa en modo fluorescencia y contraste de fase: A) <i>S. Typhimurium</i> y B) <i>P. aeruginosa</i>	140

Figura 57 : Imágenes obtenidas por Lupa de <i>P. aeruginosa</i> sobre multicapas de P-Xil-f-(Iso)OH y P-Alo-f-(Iso) ₂ ($M_v=6,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ y $3,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$) con P4VPy-C ₂ y P4VPy-C ₅	141
Figura 58 : Imágenes obtenidas mediante Lupa de <i>P. aeruginosa</i> sobre multicapas de P-Gal-p-(Iso) ₂ y P-Glu-f-Iso(OH) ₂ ($M_v=6,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ y $M_v=3,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$) con P4VPy-C ₂ y P4VPy-C ₅	142
Figura 59 : Porcentaje de <i>P. aeruginosa</i> sobre las multicapas formadas por el copolímero P ₆₂ -aminoazúcar y P4VPy-C _n	144
Figura 60 : Estructuras de polielectrolitos aniónicos. A)P-Xil-f-(Iso)OH, en su cadena lateral posee un anillo de xilofuranosa parcialmente protegido con un grupo hidroxilo disponible y B)P-Glu-f-Iso(OH) ₂ , en su cadena lateral posee un anillo de glucofuranosa parcialmente protegido con dos grupos hidroxilos disponibles.	145
Figura 61 : Porcentaje de <i>P. aeruginosa</i> sobre las multicapas formadas por el copolímero P ₃₂ -aminoazúcar y P4VPy-C _n	148
Figura 62 : Porcentaje de <i>P. aeruginosa</i> sobre las multicapas de P-Glu-f-Iso(OH) ₂ de diferente peso molecular con P4VPy-C ₂ y P4VPy-C ₅	151
Figura 63 : Imágenes de AFM de amplitud (derecha) y altura (izq.) de <i>P. aeruginosa</i> sobre el sustrato desnudo (control): A) 100μm y B) 12μm.	153
Figura 64 : Imágenes de AFM de amplitud (derecha) y altura (izq.) de <i>P. aeruginosa</i> sobre multicapa P ₆₂ -Glu-f-Iso(OH) ₂ /P4VPy-C ₂ : A)100μm y B)12μm. .	154

Figura 65 : Imágenes de AFM de amplitud (abajo) y altura (arriba) de <i>P. aeruginosa</i> sobre multicapa P ₃₂ -Glu-f-Iso(OH) ₂ /P4VPy-C ₂ . A) 100μm, B) 12μm y C) 12μm. .	155
Figura 66 : Imágenes de AFM de amplitud (derecha) y altura (izq.) de <i>P. aeruginosa</i> sobre multicapa P ₆₂ -Glu-f-Iso(OH) ₂ /P4VPy-C ₅ : A)100μm y B)12μm. .	156
Figura 67 : Imagen de AFM de amplitud de <i>P. aeruginosa</i> sobre la multicapa P ₃₂ -Glu-f-Iso(OH) ₂ /P4VPy-C ₅	157
Figura 68 : Imágenes de AFM de amplitud (derecha) y altura (izq.) de células de <i>P. aeruginosa</i> sobre multicapa P ₃₂ -Glu-f-Iso(OH) ₂ /P4VPy-C ₅	158
Figura 69 : Imágenes obtenidas mediante Lupa de <i>S. Typhimurium</i> sobre multicapas de P-Xil-f-(Iso)OH y P-Alo-f-(Iso) ₂ (M _v =6,2x10 ⁴ gmol ⁻¹ y 3,2x10 ⁴ gmol ⁻¹) con P4VPy-C ₂ y P4VPy-C ₅	160
Figura 70 : Imágenes obtenidas por Lupa de <i>S. Typhimurium</i> sobre multicapas de P-Gal-p-(Iso) ₂ y P-Glu-f-Iso(OH) ₂ (M _v =6,2x10 ⁴ gmol ⁻¹ y 3,2x10 ⁴ gmol ⁻¹) con P4VPy-C ₂ y P4VPy-C ₅	161
Figura 71 : Porcentaje de <i>S. Typhimurium</i> sobre las multicapas formadas por el copolímero P ₆₂ -aminoazúcar y P4VPy-C _n	163
Figura 72 : Porcentaje de <i>S. Typhimurium</i> sobre las multicapas formadas por el copolímero P ₃₂ -aminoazúcar y P4VPy-C _n	166

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE TABLAS	xxi
RESUMEN	xxiv
ABSTRACT.....	xxvii
LISTA DE ABREVIACIONES.....	xxx

CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL.....	62
Tabla 1: Reactivos utilizados para la síntesis del copolímero P(AM-alt-E).	63
Tabla 2: Reactivos utilizados para la síntesis de aminoazúcares.	64
Tabla 3: Reactivos utilizados para la modificación del copolímero P(AM-alt-E) con aminoazúcares.	66
Tabla 4: Reactivos utilizados en la neutralización del copolímero P- <i>aminoazúcar</i> . .	66
Tabla 5: Reactivos utilizados en la cuaternización de poli(4-vinilpiridina).....	67
Tabla 6: Reactivos utilizados en el lavado oxidativo del sustrato utilizado para las isotermas de adsorción y construcción de multicapas.....	67
Tabla 7: Reactivos utilizados en la modificación hidrofílica del sustrato utilizado (SiW) en las isotermas de adsorción.	67
Tabla 8: Reactivos utilizados en la determinación de la energía superficial.	68

Tabla 9: Equipos utilizados en el desarrollo experimental de esta tesis.	70
Tabla 10: Reacción de síntesis de 5-amino-5-deoxi-1,2- <i>O</i> -isopropilideno- α -D-xilofuranosa.....	76
Tabla 11: Reacción de síntesis de 3-amino-3-deoxi-1,2:5,6-di- <i>O</i> -isopropilideno- α -D-alofuranosa.	79
Tabla 12: Reacción de síntesis de 6-amino-6-deoxi-1,2:3,4-di- <i>O</i> -isopropilideno- α -D-galactopiranos.....	82
Tabla 13: Reacción de síntesis de 6-amino-6-deoxi-1,2- <i>O</i> -isopropilideno- α -D-glucofuranosa.	84
Tabla 14: Parámetros de tensión superficial para los líquidos utilizados.	95
 CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	 98
Tabla 15: Ángulo de contacto de avance (θ_A), retroceso (θ_R) e histéresis (θ_H) de las multicapas formadas por los sistemas P_{62} -aminoazúcar con P4VPy-C ₅ y P4VPy-C ₂	125
Tabla 16: Ángulo de contacto de avance (θ_A), retroceso (θ_R) e histéresis (θ_H) de las multicapas formadas por los sistemas P_{32} -aminoazúcar con P4VPy-C ₅ y P4VPy-C ₂	127
Tabla 17: Ángulo de contacto (θ) y energía superficial (γ^{total}) de las multicapas construidas con los polielectrolitos P_{62} -aminoazúcar con P4VPy-C ₅ y P4VPy-C ₂ ..	129
Tabla 18: Ángulo de contacto (θ) y energía superficial (γ^{total}) de las multicapas	

construidas con los polielectrolitos P_{32} -aminoazúcar con P4VPy- C_5 y P4VPy- C_2 ..	130
Tabla 19: Valores de RMS obtenidos para las multicapas P_{62} -Xil-f-(Iso)OH, P_{62} -Alo-f-(Iso) $_2$, P_{62} -Gal-p-(Iso) $_2$ y P_{62} -Glu-f-Iso(OH) $_2$ con P4VPy- C_n	134
Tabla 20: Valores de RMS obtenidos para las multicapas P_{32} -Xil-f-(Iso)OH, P_{32} -Alo-f-(Iso) $_2$, P_{32} -Gal-p-(Iso) $_2$ y P_{32} -Glu-f-Iso(OH) $_2$ con P4VPy- C_n	137
Tabla 21: Porcentaje de <i>P. aeruginosa</i> y propiedades físico-químicas de las multicapas formadas por P_{62} -aminoazúcar y P4VPy- C_5	146
Tabla 22: Porcentaje de <i>P. aeruginosa</i> y propiedades físico-químicas de las multicapas formadas por P_{32} -aminoazúcar y P4VPy- C_n	149
Tabla 23: Porcentaje de <i>S. Typhimurium</i> y propiedades físico-químicas de las multicapas formadas por el copolímero P_{62} -aminoazúcar y P4VPy- C_n	165
Tabla 24: Porcentaje de <i>S. Typhimurium</i> y propiedades físico-químicas de las multicapas formadas por P_{32} -aminoazúcar y P4VPy- C_n	168

RESUMEN

Inhibir la adhesión y proliferación de bacterias patógenas es un desafío constante, debido a la formación de biofilms resistentes a agentes bacterianos existentes. Así, las películas de multicapas de polielectrolitos son una plataforma para la obtención de materiales antimicrobianos. En este trabajo se propone diseñar películas delgadas nanoestructuradas de multicapas de polielectrolitos con el fin de obtener un recubrimiento antibacteriano de superficies sólidas.

Se sintetizaron las sales monosódicas de copolímero de poli(*Aminoazúcar* maleato-alt-estireno) (*P-aminoazúcar*), los aminoazúcares: 5-Amino-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranosa (Xil-f-(Iso)OH), 3-Amino-3-desoxi-1,2:5,6-di-*O*-isopropilideno- α -D-alofuranosa (Alo-f-(Iso)₂), 6-Amino-6-desoxi-1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranososa (Gal-p-(Iso)₂), 6-Amino-6-desoxi-1,2-isopropilideno- α -D-glucofuranosa (Glu-f-Iso(OH)₂), de diferentes pesos moleculares promedio viscosimétrico ($6,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ y $3,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$). Los copolímeros modificados fueron nombrados como P-Xil-f-(Iso)OH, P-Alo-f-(Iso)₂, P-Gal-p-(Iso)₂ y P-Glu-f-Iso(OH)₂. Se cuaternizó poli(4-vinilpiridina) con bromuro de etilo y pentilo (P4VPy-C₂ y P4VPy-C₅, respectivamente). Se realizó la caracterización molecular de los sistemas obtenidos utilizando FT-IR, NMR-¹H y NMR-¹³C.

Posteriormente, se construyeron multicapas con P-Xil-f-(Iso)OH, P-Alo-f-(Iso)₂, P-Gal-p-(Iso)₂ y P-Glu-f-Iso(OH)₂ de ambos pesos moleculares, y P4VPy-C₅ y

P4VPy-C₂, a pH 4 y concentración de sal de 0,1M de NaCl, mediante el método *LBL* hasta alcanzar un número de doce capas.

La construcción de multicapas se monitoreó mediante elipsometría y espectrofotometría UV-visible. Tanto el espesor como la absorbancia aumentaron a medida que aumentaba el número de capas, encontrándose una influencia del peso molecular del copolímero *P-aminoazúcar* y del largo de la cadena alquílica de P4VPy en ambos valores. Además, existe una influencia del tipo de sustituyente en la cadena lateral del copolímero *P-aminoazúcar*, ya que las multicapas construidas con el polielectrolito copolímero P-Glu-f-Iso(OH)₂ presentaron mayores valores de espesor y absorbancia.

Las multicapas exhibieron un balance hidrofílico/hidrofóbico con valores de ángulo de contacto que varían entre 36°±2 y 71°±1. La multicapa con menor humectabilidad es la formada por los polielectrolitos P₃₂-Xil-f-(Iso)OH/P4VPy-C₂ y la multicapa con mayor humectabilidad es la formada por P₆₂-Alo-f-(Iso)₂/P4VPy-C₂. Por otro lado, la multicapa que posee una superficie químicamente más heterogénea es la formada por los polielectrolitos P₆₂-Gal-p-(Iso)₂/P4VPy-C₂, mientras que la multicapa que posee una superficie químicamente más homogénea es la formada por los polielectrolitos P₆₂-Xil-f-(Iso)OH/P4VPy-C₂.

En tanto, las multicapas presentaron valores bajos de energía superficial con una mayor contribución de la parte dispersiva. La multicapa con mayor energía superficial es la formada por P₆₂-Alo-f-(Iso)₂/P4VPy-C₂, mientras que las multicapas con menor energía superficial son las formadas por P₆₂-Glu-f-Iso(OH)₂/P4VPy-C₂ y P₃₂-

Gal-p-(Iso)₂/P4VPy-C₂. Existe una influencia del largo de la cadena alquílica de P4VPy y del peso molecular del polielectrolito aniónico.

En la superficie de las multicapas se observa la presencia de ambos polielectrolitos y una morfología más bien homogénea. Existen agregados en las multicapas formadas por P-Xil-f-(Iso)OH y P-Glu-f-Iso(OH)₂ a ambos pesos moleculares. La topografía de las multicapas es rugosa, con valores mayores de RMS para las multicapas formadas por P-Glu-f-Iso(OH)₂, a ambos valores de M_v, con P4VPy-C₂, mientras que las superficies con menor RMS son las formadas por P-Alo-f-(Iso)₂ y P-Gal-p-(Iso)₂ con P4VPy-C₅. Existe una influencia del M_v en la topografía de las multicapas.

Las multicapas que presentan menor porcentaje de bacterias *Pseudomona aeruginosa* resistentes son las formadas por P-Xil-f-(Iso)OH y P-Glu-f-Iso(OH)₂ con P4VPy-C₂ y P4VPy-C₅ y las multicapas que presentan menor porcentaje de bacterias *Salmonella Typhimurium* resistentes son las formadas por P₃₂-Gal-p-(Iso)₂/P4VPy-C₂ y en menor medida P₃₂-Alo-f-(Iso)₂/P4VPy-C₂. Así, se podría concluir que hay una influencia en la resistencia bacteriana del tipo de sustituyente de la cadena lateral. Por otro lado, no se observa una relación entre propiedades físico-químicas de la superficie como el espesor, rugosidad, humectabilidad, ángulo de histéresis y energía superficial de la multicapa y el porcentaje de bacterias resistentes.

ABSTRACT

Inhibit the adhesion and proliferation of pathogenic bacteria is a constant challenge, due to the formation of biofilms resistant bacterial agents existing. Thus, multilayer films of polyelectrolytes are a platform for obtaining antimicrobial materials. This work proposes to design nanostructured thin films polyelectrolyte multilayers in order to obtain an antibacterial coating solid surfaces

It was synthesized mono sodium salts of poly(*aminosugar* maleate-alt-styrene) (*P-aminosugar*), aminosugars: 5-Amino-5-deoxy-1,2-O-isopropylidene- α -D-xylofuranose (Xyl-f-(Iso)OH), 3-Amino-3-deoxy-1,2:5,6-di-O-isopropylidene- α -D-allofuranose (Allo-f-(Iso)₂), 6-Amino-6-deoxy-1,2:3,4-di-O-isopropylidene-D-galactopyranose (Gal-p-(Iso)₂), 6-Amino-6-deoxy-1,2-isopropylidene- α -D-glucopyranose (Glu-f-Iso(OH)₂); of different molecular weight viscosity average ($6,2 \times 10^4 \text{ gmol}^{-1}$ and $M_V = 3,2 \times 10^4 \text{ gmol}^{-1}$). The modified polymers were named as P-Xyl-f-(Iso)OH, P-Allo-f-(Iso)₂, P-Gal-p-(Iso)₂ and P-Glu-f-Iso(OH)₂. Poly(4-vinylpyridine) was quaternized with ethyl and pentyl bromide (QPVP-C₂ and QPVP -C₅, respectively). The molecular characterization of the systems obtained was performed using FT-IR, ¹H-NMR and ¹³C-NMR.

Subsequently, multilayers were constructed with P-Xyl-f-(Iso)OH, P-Allo-f-(Iso)₂, P-Gal-p-(Iso)₂ and P-Glu-f-Iso(OH)₂, both average molecular weights, and QPVP-C₂ and QPVP-C₅, at pH 4 and salt concentration of 0.1M of NaCl, by "Layer by

Layer" method, up to a number of twelve layers.

The process of multilayer building was monitored by ellipsometry and UV-visible spectroscopy. The amount adsorbed as the absorbance increased with increasing the number of layers having an influence of the molecular weight of the copolymer P(MA-alt-St) and of the number of carbons of alkyl chain of QPVP. Furthermore, there is an influence of the type of substituent in the side chain of the copolymer P(MA-alt-St) because multilayers constructed with the polyelectrolyte copolymer P-Glu-f-Iso(OH)₂ presented higher values of adsorbed amount and absorbance.

The multilayers presented a hydrophilic/hydrophobic balance with contact angle values varying between 36° and 71°. The multilayer with lower wettability is formed by the polyelectrolytes P₃₂-Xyl-f-(Iso)OH/QPVP-C₂, whereas that the multilayer with higher wettability is formed by the polyelectrolytes P-Allo-f-(Iso)₂/QPVP-C₂. Furthermore, the multilayer with a more chemically heterogeneous surface is formed by the polyelectrolyte P-Allo-f-(Iso)₂/QPVP-C₂ and the multilayer with a more chemically homogeneous surface is formed by the polyelectrolytes P-Xyl-f-(Iso)OH/QPVP-C₂.

Multilayers showed generally low surface energy values, there being a greater contribution of the dispersive part. The multilayer with higher surface energy is composed of the polyelectrolyte copolymer P₆₂-Allo-f-(Iso)₂/QPVP-C₂ and multilayer with lower surface energy is formed by the polyelectrolyte copolymer P-Glu-f-Iso(OH)₂/QPVP-C₂. There is an influence of the long of alkyl chain of QPVP and very insignificant influence of the molecular weight of the anionic polyelectrolyte.

The multilayers present a hybrid surface with the presence of both

polyelectrolytes on the surface and a rather homogenous morphology with presence of aggregates in the surface of multilayers formed by polyelectrolyte copolymers P-Xyl-f-(Iso)OH and P-Glu-f-Iso(OH)₂. The topography of the multilayers is generally rough, with higher values of RMS for the multilayer formed by the polyelectrolyte copolymer P-Glu-f-Iso(OH)₂, at both values of Mv, with QPVP-C₂ and the surfaces with lower RMS are formed by polyelectrolytes P-Allo-f-(Iso)₂ and P-Gal-p-(Iso)₂ with QPVP-C₅. There is very small significant influence on the topography of Mv.

The multilayers that exhibiting smaller percentage of resistant bacteria *Pseudomona aeruginosa* are those formed by the polyelectrolytes P-Xyl-f-(Iso)OH and P-Glu-f-Iso(OH)₂ with QPVP-C₂ and QPVP-C₅ and multilayers that exhibiting lower percentage of resistant bacteria *Salmonella Typhimurium* are formed by P₃₂-Gal-p-(Iso)₂/QPVP-C₂ a lesser extent P₃₂-Allo-f-(Iso)₂/QPVP-C₂. Thus, it could be concluded that there is an influence on the type of substituent of side chain of the copolymer P(MA-alt-St) in bacterial resistance. Furthermore, a relationship between physical-chemical properties of the surface like the amount adsorbed, roughness, wettability, the hysteresis angle and surface energy of the surface of the multilayers and the percentage of resistant bacteria is not observed.

LISTA DE ABREVIACIONES

AFM: Microscopía de fuerza atómica.

APS: (3- Aminopropil)trimetoxisilano.

FT-IR: Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier.

LB: Medio de cultivo luria bertani.

LBL: "*Layer by Layer*".

M_v: Peso molecular viscosimétrico.

NMR-¹³C: Resonancia magnética nuclear de carbono trece.

NMR-¹H: Resonancia magnética nuclear de protones.

P(AM-alt-E) o P: Poli(anhídrido maleico-alt-estireno).

P4VPy: Poli(4-vinilpirina).

P4VPy-C₂: Bromuro de Poli(4-N-etil-vinilpiridina).

P4VPy-C₅: Bromuro de Poli(4-N-pentil-vinilpiridina).

P4VPy-C_n: Poli(4-vinilpiridina) N-alquil cuaternizada.

P-Alo-f(Iso)₂: Sal monosódica de copolímero de poli(3-Amino-3-deoxy-1,2:5,6-di-O-isopropilideno-α-D-alofuranosa maleato-alt-estireno).

P-Gal-p(Iso)₂: Sal monosódica de copolímero de poli(6-Amino-6-desoxi-1,2:3,4-di-O-isopropilideno-α-D-galactopiranososa maleato-alt-estireno).

P-Glu-f-Iso(OH)₂: Sal monosódica de copolímero de poli(6-Amino-6-desoxi-1,2-isopropilideno-α-D-glucofuranosa maleato-alt-estireno).

P-Xil-f(Iso)OH: Sal monosódica de copolímero de poli(5-Amino-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranosa maleato -alt-estireno).

SiW: Silicon Wafers.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción.

En muchos casos las propiedades superficiales nativas de un material resultan inapropiadas para una aplicación dada. Así, en vez de diseñar un material nuevo con la composición interna y propiedades adecuadas, resulta mucho más simple modificar la superficie de uno ya existente, lo que se puede lograr a través de la construcción de multicapas de polielectrolitos.

La construcción de multicapas de polímeros, particularmente polielectrolitos, ha adquirido gran interés en la última década. Esto es debido a que controlando: la naturaleza de los polielectrolitos utilizados en la construcción de las multicapas, el número y tipo de capas, la concentración de sal adicionada y la concentración de polielectrolito en disolución, así como también la capa que queda expuesta a la superficie, se pueden obtener multicapas con diferente composición, conformación y estructura, lo que permite obtener películas poliméricas nanoestructuradas con distintas propiedades.

El entendimiento de estas propiedades mediante la caracterización y modelado teórico de las multicapas, lleva al diseño racional de películas nanoestructuradas para el recubrimiento de superficies con aplicaciones concretas, como películas con actividad antibacteriana.

La adhesión y la proliferación de bacterias patógenas en superficies abióticas plantean desafíos relacionados con la salud humana. Estos desafíos incluyen la posterior formación de biopelículas resistentes a los antibióticos, tanto en la asistencia sanitaria

como en las aplicaciones industriales. Aunque el diseño de materiales antibacterianos es un esfuerzo de muchos años, los estudios de las propiedades de la superficie que afectan la adhesión de bacterias, el primer paso crítico en la formación de biopelículas, aún no han podido establecer como éstas afectan la capacidad antibacteriana.

Así, el desarrollo de esta tesis permitirá contribuir a la obtención de nuevas películas nanoestructuradas de multicapas de polielectrolitos con el propósito de obtener un recubrimiento antibacteriano de superficies sólidas.

1.1.1 Aspectos generales.

1.1.1.1 Polielectrolitos.

Existe un tipo de polímero que posee en su cadena principal y/o lateral grupos ionizables en solución, este tipo de polímero se denomina polielectrolito.¹⁻⁴ Los polielectrolitos son polímeros muy atractivos e interesantes, debido a la versatilidad y número de grupos funcionales que poseen, además de la posibilidad de controlar la disponibilidad de carga del polímero. Así, han sido y están actualmente siendo utilizados en un sin número de aplicaciones, por ejemplo, en purificación de aguas, como detergentes, entre otros.⁵⁻⁸ De acuerdo a la carga del polielectrolito, estos pueden ser clasificados como: i) polianiones, estos poseen en su estructura grupos ionizables de carga negativa, ii) policationes, estos poseen en su estructura grupos ionizables de carga positiva y iii) polianfolitos, los que poseen grupos ionizables con carga positiva y carga

negativa dentro de la misma cadena polimérica (Figura 1).

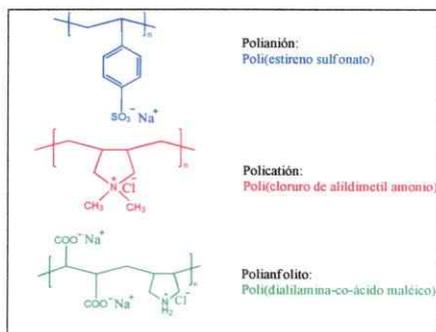


Figura 1: Ejemplos de tipos de polielectrolitos.

El comportamiento de los polielectrolitos en disolución es distinto al de una molécula pequeña y está determinado por la naturaleza de la carga, el grado de disociación, la "localización" de los grupos cargados, la densidad de carga del polielectrolito y el contraión de la disolución, que corresponden a iones pequeños con carga opuesta a la del polielectrolito. Estos parámetros se ven directamente afectados por el peso molecular del polielectrolito, el pH, la fuerza iónica o concentración de sal adicionada en la disolución y la naturaleza química del grupo lateral presente en la estructura del polielectrolito.⁹⁻¹¹ A la vez, estos factores determinan la conformación que el polielectrolito adoptará en disolución. Así, si se produce un aumento de sal adicionada en la solución de polielectrolito, este puede adoptar una conformación de un ovillo compacto desde una conformación de ovillo extendido (baja concentración de sal), como se muestra en la Figura 2.

En algunos casos se ha encontrado que estos polielectrolitos pueden sufrir

transiciones conformacionales inducidas por cambios en el pH de la disolución. Un ejemplo de esto es el poli(ácido metacrílico) (PMAA), el que en disolución acuosa y a bajos valores de pH, adopta una conformación de ovillo compacto, debido a las interacciones hidrofóbicas entre los grupos metilos presentes en su estructura. Sin embargo, cuando el pH de la disolución aumenta, las cadenas poliméricas adoptan una conformación más extendida debido a la repulsión electrostática de los grupos ionizables presentes en su estructura.¹²

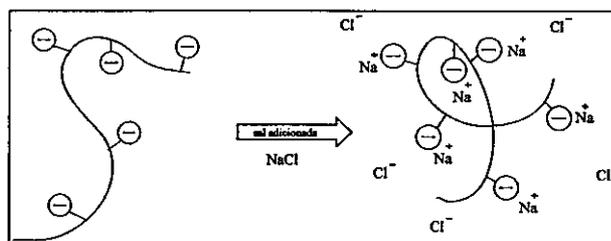


Figura 2: Cambio de la conformación de un polielectrolito en disolución por efecto de la sal adicionada.

Petri y col. estudiaron mediante elipsometría el efecto del pH de la disolución de polielectrolito en el comportamiento de adsorción de carboximetil celulosa (CMC) sobre una superficie sólida con grupos amino. Obtuvieron como resultado que a distinto pH de la disolución de polielectrolito, la mayor cantidad adsorbida de CMC es a pH 3, a pH 5 la adsorción de CMC es desfavorable y a pH 7 no ocurre adsorción.¹³

El comportamiento de estos sistemas en una disolución, determinará el tipo de interacción que prevalecerá entre el polielectrolito con otras moléculas y/o

macromoléculas, así como también el proceso de adsorción que tendrá sobre una superficie sólida.

1.1.1.2 Adsorción de polielectrolitos en superficies sólidas.

El primer recubrimiento monomolecular fue realizado por el científico Irvin Langmuir, quien transfirió una capa monomolecular de aceite a un sustrato sólido.¹⁴ Desde entonces, obtener materiales nanoestructurados mediante la modificación de una superficie sólida es de gran interés, siendo un campo de investigación tanto en ciencia básica como aplicada.¹⁵

Utilizando un sustrato adecuado, se puede obtener la formación instantánea de películas sobre el sustrato, es decir un *auto-ensamble*. En el caso de los polielectrolitos, al sumergir un sustrato cargado en una disolución de polielectrolito de carga opuesta, se favorecen fuerzas de atracción del tipo electrostáticas que producen que las cadenas de polielectrolito ocupen los sitios de interacción disponibles, formando una película de polielectrolitos nanoestructurada.¹⁶

En las últimas décadas, las investigaciones se han basado en el estudio de películas nanoestructuradas de polielectrolitos creadas por interacciones que no sean del tipo electrostáticas, tales como puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals.^{17,18} Este tipo de películas pueden ser obtenidas utilizando altas concentraciones de contraiones en disolución, los que apantallan los grupos

ionizables del polielectrolito, disminuyendo la carga de este. Este tipo de interacciones polielectrolito-sustrato pueden ser descritas mediante la teoría de DLVO.^{19,20}

La teoría Derjaguin – Landau y Verwey – Overbeek (DLVO), si bien esta descrita para coloides estableciendo cuantitativamente la barrera energética entre las fuerzas de atracción, que producen la coagulación entre coloides, y las fuerzas de repulsión, que producen la estabilización de las partículas coloidales, se extiende a la adsorción de polielectrolitos en superficie. Este tipo de polímeros poseen propiedades similares a las partículas coloidales, con la diferencia que se dispersan espontáneamente y son termodinámicamente estables.

Cuando una superficie cargada se sumerge en una disolución de electrolitos, se forma una doble capa difusa de contraiones, como se muestra en la Figura 3, en la que el espesor está definido por la longitud de Debye (λ).²¹ Lo mismo ocurre con una disolución de polielectrolitos. Cuando las fuerzas de atracción de Van der Waals se consideran en combinación con las fuerzas de repulsión electrostáticas, la interacción es descrita por el modelo DLVO como se muestra en la Figura 4.

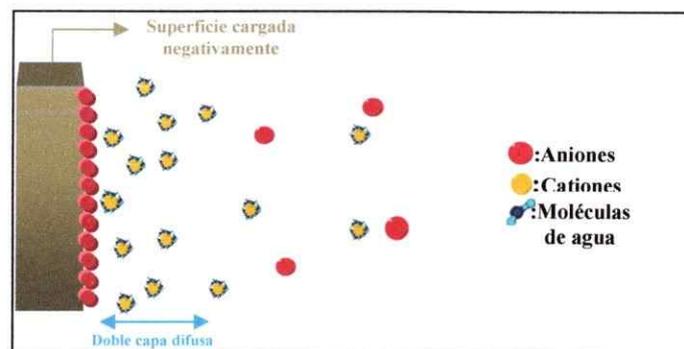


Figura 3: Doble capa difusa.²¹

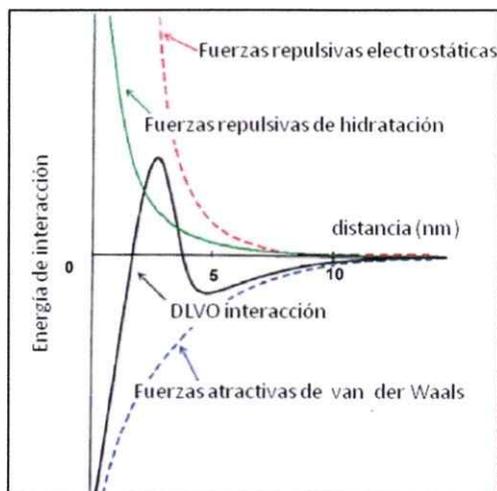


Figura 4: Teoría de DLVO: interacciones que gobiernan el proceso de adsorción en una superficie.²¹

Se ha descrito la modificación de superficies con polielectrolitos, especialmente quitosano, poli(lisina) y poli(etilenglicol), modificados con moléculas biológicas. Se ha reportado la obtención de películas de quitosano, polielectrolito catiónico, modificado con moléculas de arginina, encontrándose que la película tiene actividad antibacteriana contra las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *Pseudomona fluorescens*, capacidad que depende del grado de modificación del polielectrolito con las moléculas de arginina.²²

La modificación de superficies mediante la formación de películas de polielectrolitos modificados con moléculas de interés biológico como aminoácidos, péptidos y carbohidratos es de gran interés, ya que el grado de funcionalización de estas macromoléculas deriva en una mayor posibilidad de modular las propiedades de la superficie pudiendo adoptar "estrategias" de diseño, controlando la funcionalidad de la

superficie, orientación molecular, densidad de carga, carga de la superficie, topografía, entre otras propiedades.^{15,23} Esta capacidad hace que estos sistemas poliméricos adsorbidos sobre una superficie sólida puedan promover, controlar o inhibir la adhesión de bacterias, en particular superficies sólidas modificadas con multicapas de polielectrolitos.²⁴

Los polielectrolitos modificados con moléculas de interés biológico son una plataforma relevante de utilizar en la construcción de películas delgadas sobre una superficie sólida. Su modificación, además de aumentar la biocompatibilidad y biodegradación de una superficie sólida, permite su interacción con otros polielectrolitos en superficie, permitiendo la obtención de películas delgadas que combinen las ventajas de ambos polielectrolitos.

1.1.2 Poli(anhídrido maléico-alt-estireno).

Polielectrolitos aniónicos derivados de copolímeros conteniendo como unidad monomérica anhídrido maléico han sido utilizados ampliamente en diversas investigaciones: en el área clínica como droga polimérica al ser conjugado con el polipéptido neocarzinostatina,^{25,26} y se ha reportado en literatura su uso como un fuerte inhibidor de la movilidad espermatozoide, lo que se atribuye a la presencia de grupos carboxílicos los que inducen un pH bajo en el ambiente que es responsable de la muerte de los espermatozoides.²⁷

Debido a la reactividad del anillo de anhídrido maléico, este puede ser conjugado con distintos tipos de monómeros obteniendo una gran variedad de copolímeros. A la vez, su estructura permite la modificación de los copolímeros con distintos tipos de moléculas, entre ellas, moléculas bioactivas como moléculas biológicas, mejorando su eficacia y estabilidad físico-química. Esto conlleva a que el uso de este tipo de copolímeros permita realizar una variación gradual de las características físico-químicas de la superficie junto con la inclusión de las funciones biomoleculares específicas de moléculas biológicas.

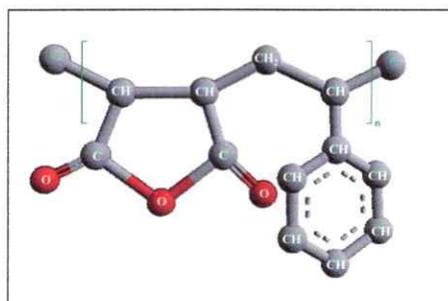


Figura 5: Poli(anhídrido maléico -alt-estireno).

Una modificación de interés es la del copolímero de poli(anhídrido maléico-alt-estireno) (Figura 5) con moléculas con actividad biológica como aminoácidos y carbohidratos, también llamados azúcares. En literatura existen algunos reportes sobre la investigación de polielectrolitos basados en carbohidratos²⁸ y escasa información sobre polielectrolitos aniónicos, particularmente de copolímeros de poli(anhídrido maléico-alt-estireno), conteniendo en su cadena lateral carbohidratos.

Los carbohidratos son moléculas interesantes debido a la gran cantidad de grupos funcionales en su estructura, lo que permite modificarlos tanto en disponibilidad como en el tipo de grupo funcional según se necesite. Así, A. J. Varma y col. publicaron un resumen sobre la modificación de polianfolitos con carbohidratos. También, recientemente Singh y Varma, emplearon química "click" para introducir bajos niveles de moléculas de carbohidratos en un copolímero estireno-butadieno-estireno, demostrando que la modificación es beneficiosa para la biodegradación de estos polímeros.²⁹ Varma también utilizó una serie de moléculas de carbohidratos tales como glucosa, sacarosa y lactosa para modificar anhídrido maléico copolimerizado con poliestireno para producir polímeros biodegradables.³⁰ Recientemente Varma y col., realizaron la síntesis regio-específica y caracterización de derivados de éster de glucosa con poli(anhídrido maleico-co-estireno), corroborando la modificación del copolímero y formación del enlace ester mediante FT-IR.³¹

En la actualidad, los trabajos reportados acerca de este tipo de sistemas poliméricos modificados con amino-azúcares con aplicaciones en materiales antibacterianos son escasos. Por ejemplo, se ha reportado el uso de poli(anhídrido maléico-alt-estireno) modificado con moléculas de manosa y glucosa, como microbiocida actuando como inhibidor de la infección VIH-1 y mostrando bajos niveles de toxicidad celular.³² También, Cloete y col. modificaron poli(anhídrido maleico-alt-estireno) con grupos amino para incorporarlo a látex sintéticos, demostrando que las películas de látex modificado inhiben de forma significativa el crecimiento de bacterias y además, el sistema posee propiedades antifúngicas.³³

Así, utilizar este tipo de polielectrolitos derivados del copolímero poli(anhídrido maléico-alt-estireno) modificado con amino-azúcares podría contribuir a la obtención de películas antibacterianas, considerando que las unidades de anhídrido maléico son altamente reactivas a compuestos con grupos amino, formando enlaces amido mediante adición nucleofílica. Este enlace es lo suficientemente estable para obtener sistemas macromoleculares para ser utilizados en el diseño de alguna aplicación. Además el uso de amino-azúcares permite la modificación de propiedades físico-químicas del polímero como el balance hidrofílico/hidrofóbico y la capacidad de formar interacciones con otras moléculas, mediante la protección total o parcial de los grupos hidroxilos del anillo del azúcar.

En base a lo anterior, en esta tesis se propone la obtención de películas nanoestructuradas de derivados de copolímeros de poli(anhídrido maléico-alt-estireno) modificado con amino-azúcares (Figura 6) y poli(4-vinilpiridina) N-alkil cuaternizada con bromuro de pentilo y etilo, con un potencial propiedad antibacteriana.

La poli(4-vinilpiridina) N-alkil cuaternizada posee un grupo amonio, el que al interactuar con un sustrato terminado en grupos hidroxilos producirá fuertes interacciones, generando una primera capa de cadenas de P4VPy-C_n fuertemente unidas al sustrato siendo más resistentes a la agregación o cambios conformacionales al momento de la adsorción en la superficie; y por otro lado, los polielectrolitos copolímeros de poli(anhídrido maléico-alt-estireno) modificados con amino-azúcares, además de aumentar el grado de biocompatibilidad y biodegradación, podrían permitir obtener superficies que promuevan la capacidad antibacteriana de la película de

multicapas debido a la naturaleza del sustituyente de la cadena lateral (aminoazúcares). Además, se espera que la utilización de estos dos polielectrolitos favorezca que factores como: el espesor de la multicapa, su humectabilidad, morfología, topografía y energía superficial, contribuyan en la obtención de películas antibacterianas.

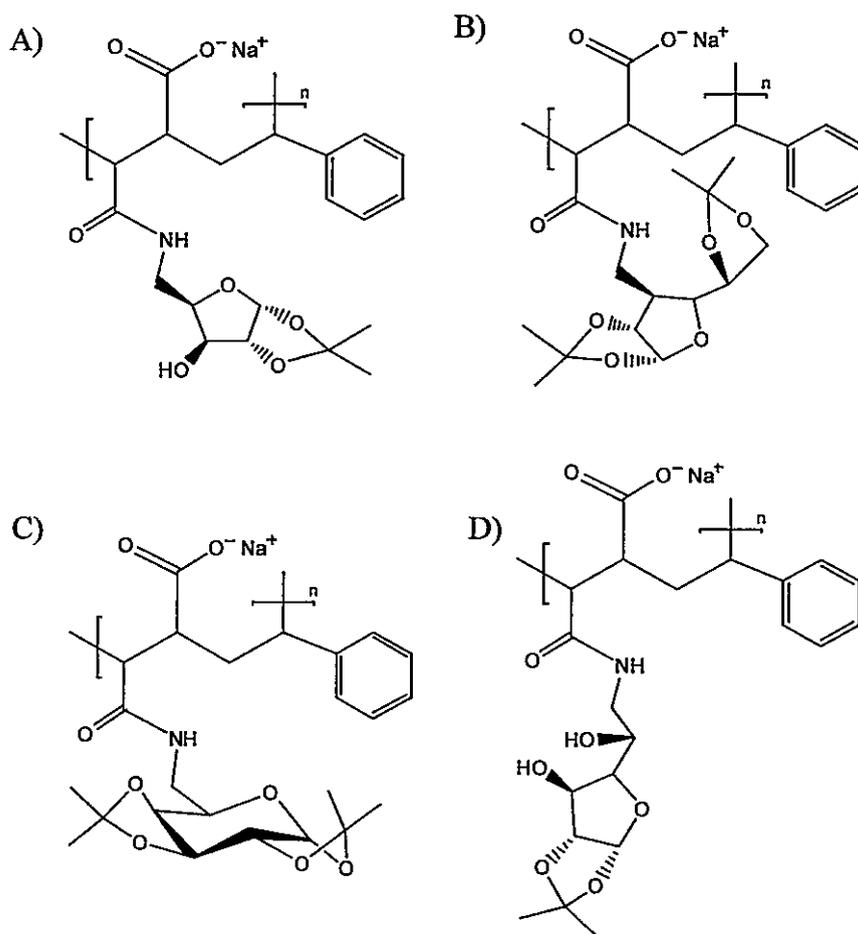


Figura 6: Polielectrolitos: A) P-Xil-f(Iso)OH, B) P-Alo-f(Iso)₂, C) P-Gal-p(Iso)₂ y D) P-Glu-f-Iso(OH)₂.

1.1.2.1 Construcción de multicapas.

Uno de los métodos más versátiles para la construcción de películas nanoestructuradas, es la construcción de multicapas de polielectrolitos. Este método consiste en la adsorción de polielectrolitos sobre una capa de polielectrolito anteriormente adsorbida, sobre un sustrato sólido.

Decher y col. fueron pioneros en desarrollar la construcción de multicapas utilizando polielectrolitos sintéticos formando multicapas de polielectrolitos mediante interacciones electrostáticas. Esta técnica fue denominada "capa por capa (*Layer by layer, LBL*)" y consiste en sumergir un sustrato sólido cargado en una disolución con carga opuesta a la del sustrato para adsorber la primera capa y luego, se sumerge el sustrato recubierto para depositar la segunda capa.³⁴⁻³⁶ Este proceso se repite el número de veces que sea necesaria para crear el número de capas y espesor deseado. Esta técnica es simple, no requiere métodos sofisticados ni una estequiometría exacta ni tampoco reacciones químicas complicadas para depositar capas sucesivas.

Como se ha descrito, la película polimérica formada por multicapas, depende de la naturaleza y carga de la superficie, densidad de carga del polielectrolito, peso molecular del polielectrolito, concentración del polielectrolito en disolución, concentración de sal del polielectrolito en disolución, así como también de las interacciones entre las cadenas de polielectrolitos y entre la superficie y el polielectrolito.³⁷⁻⁴⁴ Amim y col. estudiaron multicapas construidas con los polielectrolitos de poli(4-vinilpiridina) N-alkil cuaternizada con bromuro de etilo y

pentilo y carboximetilcelulosa, demostrando que la naturaleza del sustrato (hidrófilo o hidrófobo) desempeña un papel decisivo en la adsorción de la primera capa, que a su vez afecta a la estructura y funcionalidad de la multicapa resultante.⁴⁵

Conocer características de las multicapas como el espesor y/o cantidad adsorbida, morfología y topografía de la superficie, humectabilidad, histéresis de la superficie y energía superficial es de gran importancia para poder comprender la influencia que tienen estas propiedades en el comportamiento de las películas de multicapas frente a distintas moléculas y microorganismos. El estudio de estas propiedades se lleva a cabo mediante la caracterización de multicapas de polielectrolitos utilizando técnicas de difracción de rayos X, análisis UV, microbalanza de cristal de cuarzo, elipsometría, microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM).

Actualmente, la construcción de multicapas mediante esta técnica no se limita solamente al uso de materiales conteniendo grupos cargados como polielectrolitos, donde la interacción predominante es de tipo electrostática, sino que también ha sido posible la construcción de multicapas basadas en otro tipo de interacciones no electrostáticas, tales como, Van der Waals, catión- π , enlaces de hidrógeno, etc.⁴⁶ Como consecuencia, e el proceso de construcción de multicapas se puedan observar dos regímenes de adsorción: un *crecimiento regular* y/u otro de *crecimiento exponencial*. El tipo de régimen de crecimiento en la construcción de multicapas puede ser estudiado determinando el espesor de la multicapa mediante elipsometría o microbalanza de cuarzo.⁴⁷

En un *régimen de crecimiento regular*, son responsables principalmente interacciones del tipo electrostáticas entre el polielectrolito en disolución y el polielectrolito ya adsorbido sobre el sustrato, donde cada adsorción del polielectrolito produce una sobrecompensación de carga que es pre-requisito para que se produzca la adsorción de la siguiente capa de polielectrolito de carga opuesta.⁴⁸ Uno de los sistemas de multicapas de polielectrolitos más representativos de un régimen de crecimiento lineal, es el formado por los polielectrolitos poli(estirenosulfonato)/poli(alilamina hidrociorada).⁴⁹⁻⁵⁴

Por otro lado, en un *régimen de crecimiento exponencial* se origina la difusión de las cadenas de polielectrolito ya adsorbidas hacia la disolución y de la disolución hacia la superficie, predominando interacciones del tipo no electrostáticas, tales como Van der Waals, catión- π , enlaces de hidrógeno, etc. Los primeros sistemas de multicapas en los que se observó este régimen de crecimiento están formados por poli(lisina)/poli(alginato) y poli(lisina)/ poli(ácido hialurónico).^{55,56}

La construcción de multicapas se puede llevar a cabo sobre diversos sustratos, por lo que la construcción de este tipo de películas de polielectrolitos mediante el método capa por capa ha dado como resultado la producción de múltiples materiales siendo el 2001 reportada la primera multicapa depositada en una droga real, ibuprofeno.

Desde entonces, esta técnica ha sido exitosamente utilizada en muchas aplicaciones y en diseños de materiales funcionales tales como: sensores,⁵⁷ membranas con permeabilidad selectiva,^{58,59} capas conductoras⁶⁰ y películas electrocrómicas,^{61,62} siendo también actualmente utilizadas para la modificación de diferentes fibras y

membranas.^{63,64}

La construcción de multicapas es una herramienta útil y versátil, pues permite utilizar diferentes materiales de tal forma de obtener superficies que mezclen las ventajas de diferentes materiales. Así, recientemente se han construido multicapas de poli(alilamina hidrociorada) y poli(acril ácido) con nanopartículas de plata sobre membranas de polisulfonato. Los resultados obtenidos demostraron que tanto las multicapas como las nanopartículas tienen acción antibacteriana, lo que permitió disminuir la concentración de nanopartículas de plata utilizada en relación a otros estudios con resultados similares. Lo que, considerando el problema de acumulación y toxicidad que tienen las nanopartículas, es una gran ventaja.⁶⁴

Se han construido multicapas con actividad biocida formadas por poli(L-lisina) y carboximetilpululano, en el que se injertó el péptido antibacteriano gramicidina A.⁶⁵ Multicapas de poli(hexametilen hidrocioruro de guanidina) con poli(vinil alcohol) parcialmente acetilado sobre superficies de fibra rayón, exhibieron una mayor actividad antimicrobiana que la superficie sin modificar.⁶⁶ Elsabee y col. construyeron multicapas de quitosano/pectina con propiedades antibacterianas y antifúngicas, demostrando que este tipo de películas pueden ser utilizadas como material para empaquetamiento de alimentos.⁶⁷ M. Cécius y C. Jérôme utilizaron de multicapas de polielectrolitos poli(4-estiren sulfonato) de sodio/poli(hidrocioruro de alilamina) y quitosano para proporcionar actividad antimicrobiana a superficies metálicas.⁶⁸

Debido a la capacidad que tienen microorganismos como las bacterias de de mutar generando resistencia a agentes bacterianos ya existentes, es cada vez más urgente

la necesidad de crear nuevas películas con propiedades antibacterianas para evitar que este tipo de microorganismos contaminen. Así, la construcción de multicapas con polielectrolitos puede ser utilizada para conferir a superficies o materiales ya existentes propiedades antibacterianas.

1.1.2.2 Resistencia bacteriana: *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella Typhimurium*.

Las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) y *Salmonella Typhimurium* (*S. Typhimurium*), son bacterias flageladas con forma de bastoncillo, clasificadas como bacterias Gram negativas, y son dos importantes parásitos promotores de enfermedades en el ser humano. Por un lado, la bacteria *P. aeruginosa* es una de las principales bacterias que se encuentra en el ambiente asociada a un alto porcentaje de infecciones hospitalarias, siendo responsable de elevados índices de mortalidad y por otro lado, la bacteria *S. Typhimurium* es una de las causas más frecuentes y serias de enfermedades producidas por ingesta de alimentos. Las bacterias Gram negativas, poseen doble membrana celular: una externa y una citoplasmática, entre las que se localiza una pared de peptoglicano (Figura 7). La membrana externa es una bicapa lipídica formada por proteínas, en especial porinas que permiten el paso de ciertas sustancias, y lipopolisacáridos.

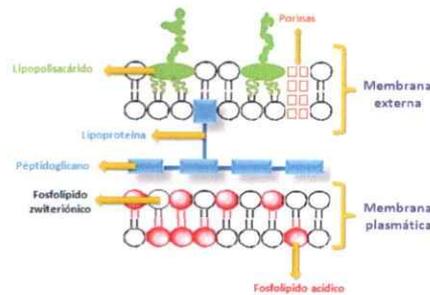


Figura 7: Doble membrana celular de bacterias Gram negativas.

Estas especies se caracterizan por su capacidad de adaptarse al entorno, adquiriendo diferentes mecanismos de resistencia, volviéndose resistentes a múltiples agentes antimicrobianos, como por ejemplo, los antibióticos.⁶⁹ Estos mecanismos de resistencia incluyen: i) bombas de eflujo en la membrana de la bacteria que expulsan a los agentes antimicrobianos, ii) cambios en la permeabilidad de la célula bacteriana, lo que restringe el acceso de los antibióticos a los sitios blanco, iii) modificaciones en el sitio blanco de acción del agente antimicrobiano y iv) inactivación o destrucción de agentes antimicrobianos mediante mecanismos tales como la secreción de enzimas específicas que van dirigidas a antibióticos.⁷⁰⁻⁷³

Por un lado, la especie *Pseudomona aeruginosa* presenta resistencia a antibióticos como piperacilina, ceftazidima, imipenem y gentamicina⁶⁹ y posee un gran número de factores de virulencia los que permiten producir la infección del huésped, los que incluyen: flagelos, pili, producción de alginato, fenotipos mucosidos, lipopolisacáridos, sistemas de secreción de proteínas tipo III (mecanismo en el que la bacteria inyecta una serie de diferentes proteínas a la célula hospedera), secreción de

proteasas, factores oxidativos y toxinas.⁷⁴

La bacteria *P. aeruginosa* (Figura 8A) puede ser tratada con antibióticos compuestos de Aminoglucósidos (amino-azúcares unidos por enlaces glucosídicos a un alcohol cíclico hexagonal con grupos amino) combinados con β -lactámicos, siendo uno de los más resistentes la Trobamicina, donde la efectividad de este antibiótico se debe a la mutación por impermeabilidad o bombas de eflujo.⁷⁵ También con el antibiótico Colistina, el que está compuesto de dos polipéptidos, aunque recientemente ha sido descrito un tipo raro de resistencia a este antibiótico para este tipo de bacteria.⁷⁶ Además puede ser tratada con cefalosporina, aunque para ambos existen algunos mecanismos de resistencia.⁶⁹

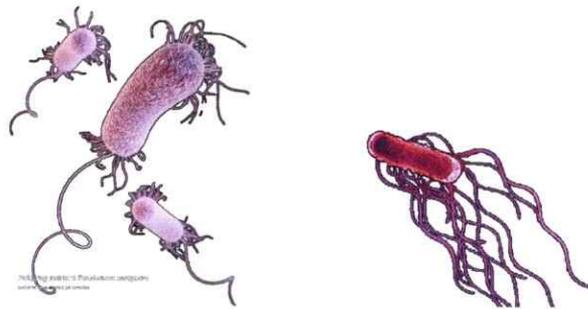


Figura 8: Ilustración médica de: A) *Pseudomonas Aeruginosa* y B) *Salmonella Typhimurium*. (Center for disease control and prevention).

Por otro lado, para la bacteria *S. Typhimurium* (Figura 8B), la mayoría de los antibióticos utilizados derivan de productos naturales o son resultado de derivados semi-sintéticos.⁷⁷⁻⁷⁹ Entre ellos destacan derivados de fluoroquinolonas como ciprofloxacina,

ceftriaxona o cefotaxima, sin embargo, su eficacia se ve disminuida por la presencia de bacterias *Salmonella* resistentes.⁸⁰ Esta bacteria, también es resistente a la tetraciclina y cloranfenicol a través de mecanismos de bombas de eflujo y secreción de enzimas que inactivan al antibiótico.⁸¹ Además, esta bacteria posee resistencia a los aminoglucósidos y β -lactámicos.⁸²

Debido a la facultad de estas bacterias de tornarse cada vez más resistentes a agentes antibacterianos ya existentes, como los antibióticos, la obtención de nuevas películas poliméricas antibacterianas, particularmente películas de multicapas de polielectrolitos, puede contribuir a disminuir la contaminación bacteriana de superficies por medio de recubrimientos que provoquen resistencia a la colonización, evitando la formación de biopelículas como método preventivo. Recientemente J. Jang y colaboradores analizaron la capacidad antibacteriana de películas poliméricas nanoestructuradas adsorbidas sobre una superficie sólida, comparándolas con antibióticos tradicionales, concluyendo que los polímeros mostraron mayor inhibición del crecimiento bacteriano.⁸³ La ventaja de este tipo de películas de multicapas de polielectrolitos recae en que permiten utilizar múltiples mecanismos antibacterianos, donde además de provocar la muerte de la bacteria al estar en contacto con la película, pueden provocar la exclusión de la bacteria de la superficie evitando la formación de biopelículas bacterianas.

1.1.2.3 Mecanismos de acción antibacteriana.

Las películas de multicapas con capacidad antibacteriana se basan principalmente en los siguientes mecanismos de acción: i) muerte de la bacteria por contacto con la superficie de la multicapa y/o ii) exclusión de la bacteria impidiendo que se acerque al sustrato, y por lo tanto, generar colonias bacterianas o biopelículas (Figura 9).

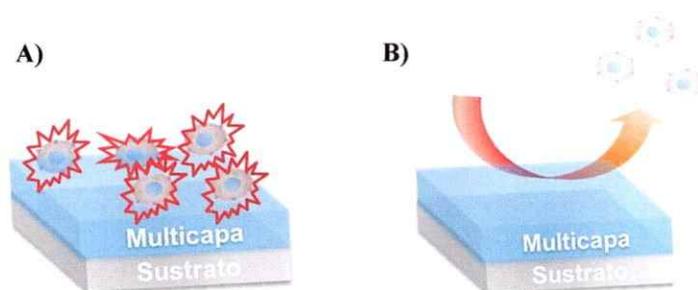


Figura 9: Mecanismo de acción antibacteriana. A) Muerte de la bacteria por contacto y B) Exclusión de la bacteria de la superficie.

El mecanismo de *muerte por contacto*, se basa en la adhesión de la bacteria a la superficie, donde la muerte de la bacteria es inducida químicamente ya sea por antibióticos, péptidos o alguna molécula o grupo funcional específico para una determinada especie bacteriana. Estos compuestos penetran la célula bacteriana o inducen un intercambio iónico que quebranta la integridad de la membrana produciendo la lisis celular.³⁷ Entre los compuestos utilizados para crear películas antibacterianas que actúan utilizando este mecanismo destacan las sales cuaternarias de amonio,⁸⁴ polímeros

de guanidina,⁸⁵ quitosano⁸⁶ y derivados de anillos piridínicos N-alquil cuaternizados.⁸⁷

La *exclusión de bacterias* de la superficie se logra mediante la creación de superficies que provoquen exclusión de bacterias debido a: i) efecto estérico, ii) efecto electrostático, iii) efecto por una baja energía superficial.²⁴

No existe una "gran variedad" de polímeros y/o polielectrolitos utilizados en el desarrollo y obtención de películas antibacterianas, como tampoco una gran variedad de estudios que se focalicen en la obtención de películas que prevengan la adhesión bacteriana. Uno de los sistemas poliméricos más utilizados en la creación de superficies que prevengan la adhesión de bacterias son los derivados de PEG u oligoetilenglicol. Esto se debe a que confieren a la superficie repulsión por impedimento estérico, producto de la flexibilidad que presentan estos sistemas poliméricos, lo que puede obstaculizar el acercamiento de las bacterias hacia la superficie.⁸⁸ Park y col. utilizaron poliuretano modificado con PEG conteniendo grupos hidroxilos, amino y sulfonato como grupos terminales para estudiar la adhesión bacteriana, obteniendo como resultado que en general, PEG de mayor peso molecular exhiben una mayor resistencia a la adhesión bacteriana y que las superficies con grupos sulfonato terminales fueron las más efectivas en la reducción de la adhesión bacteriana.⁸⁹ Por otro lado, Norde y col. estudiaron la influencia del largo de la cadena de cepillos de PEG y el peso molecular de estos en la resistencia a la adhesión bacteriana y a diferentes hongos, concluyendo que mientras mayor sea el peso molecular y más largos los "cepillos" de PEG, la superficie es más resistente a la adhesión.⁹⁰ Boulmedais y col. investigaron la influencia del número de multicapas en la resistencia a la adhesión bacteriana de *Escherichia coli* de

una película formada por bicapas de polielectrolitos de poli(L-lisina)/poli(L-ácido glutámico), con poli(etilenglicol) injertado en la poli(L-lisina), concluyendo que la adhesión de esta bacteria se reduce en un 72% en películas terminadas en una bicapa y en un 92% en películas terminadas en tres bicapas en comparación al sustrato desnudo.⁹¹

Las multicapas de polielectrolito pueden presentar diferentes propiedades físico-químicas, como: humectabilidad, energía superficial, espesor de la cantidad adsorbida de polielectrolito, rugosidad, entre otros. Estas propiedades, puede incidir de forma independiente o en conjunto, en el tipo de mecanismo antimicrobiano que posee la película de multicapas.

1.1.2.4 Factores que influyen en la capacidad antibacteriana de las películas de multicapas.

Los mecanismos de acción antibacteriana se ven influenciados por distintos parámetros físico-químicos como: efecto estérico, humectabilidad, topografía de la superficie, carga de la superficie y energía superficial. Estos parámetros pueden aumentar o disminuir la capacidad antibacteriana de una película de multicapas.

Se han propuesto materiales con propiedades antibacterianas mediante la modificación de superficies con películas de multicapas construidas con polímeros cepillo o polímeros que posean en su cadena lateral grupos voluminosos evitando el contacto de la bacteria con la superficie debido a un efecto estérico (Figura 10).

Recientemente se estudió el uso de polietilenglicol (PEG) como recubrimiento para superficies de tomate, donde el polímero forma una capa de cadenas de polímeros creando una barrera estérica que disuade el contacto cercano entre las bacterias y la superficie, suprimiendo la adhesión de estas.⁹²

En tanto, existen algunos estudios que señalan que mientras mayor sea la humectabilidad de la película de multicapas, mayor será la hidratación de la superficie, creando una capa de moléculas de agua bloqueando el acceso de la bacteria a la superficie (Figura 11). Este tipo de películas se puede lograr utilizando polielectrolitos como el poli(etilenglicol) o poli(óxido de etileno).⁹³ Por otro lado, en algunos estudios se ha descrito que mientras menor sea la humectabilidad, es decir, mas hidrofóbico sea el sustrato, menor será la adhesión bacteriana.⁹⁴

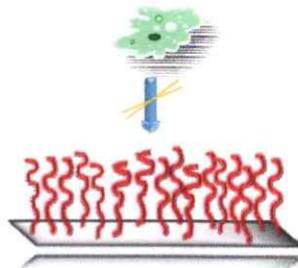


Figura 10: Capacidad antibacteriana debido a un efecto estérico generado por el polímero depositado en la superficie.

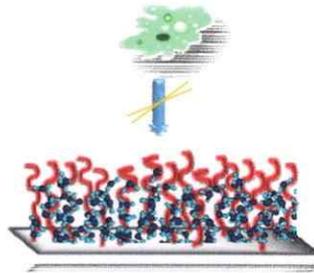


Figura 11: Capacidad antibacteriana debido a la humectabilidad de la película de multicapas.

Otros estudios han encontrado una influencia de la rugosidad de la superficie en la capacidad antibacteriana, sin embargo no se puede identificar una rugosidad umbral por debajo de la que disminuya la adherencia de bacterias.⁹⁵ Sin embargo, se espera que mientras más rugosa sea la película de multicapas, menor es la posibilidad de la bacteria de acercarse a sitios específicos de la superficie y formar interacciones lo que, por tanto, disminuye la adhesión de bacterias (Figura 12).

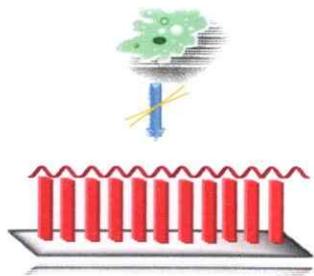


Figura 12: Capacidad antibacteriana debido a la rugosidad de la superficie de la multicapa.

El tipo de carga de la superficie es un factor que puede influir en la obtención de películas antibacterianas, ya que si esta posee igual carga que la pared o membrana externa de la bacteria se produce la exclusión de la bacteria por un efecto de repulsión electrostática (Figura 13). En el caso de las bacterias Gram positivas y Gram negativas la pared o membrana externa posee carga negativa, en las primeras debido a los ácidos teitoicos y en las últimas, debido a los lipopolisacáridos.

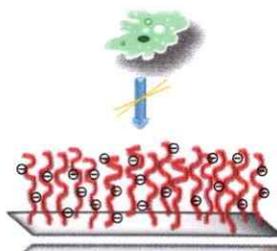


Figura 13: Capacidad antibacteriana debido a la carga de la superficie de la película de multicapas.

Superficies con baja energía superficial tienen menor capacidad de generar interacciones y por lo tanto menor capacidad de provocar adhesión de bacterias, disminuyendo la formación de biopelículas (Figura 14). Harnett y col. estudiaron la influencia de la energía superficial en la adhesión celular en variados biomateriales, concluyendo que la adhesión aumenta cuando se incrementan los valores de la energía superficial.⁹⁶ Estos resultados podrían ser extendidos a microorganismos como las bacterias, donde superficies con una menor energía superficial disminuirán la adhesión de bacterias a una superficie sólida.

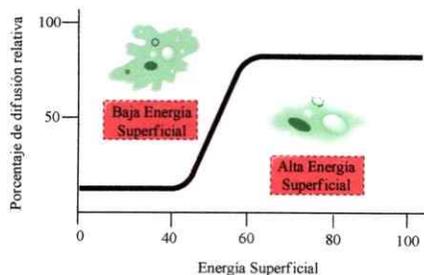


Figura 14: Capacidad antibacteriana debido a la energía superficial exhibida por la superficie.

Sin embargo, a pesar de los múltiples estudios realizados, la influencia de factores como rugosidad, carga de la superficie, grado de humectabilidad, entre otros, en la adhesión antibacteriana de estas películas aun no está claro.³⁷ Por lo que estudiar la influencia de estas propiedades físico-químicas de materiales poliméricos en la capacidad antibacteriana en orden de prevenir la formación de biopelículas es de gran importancia.

De acuerdo a lo descrito anteriormente, esta tesis propone responder a la siguiente hipótesis:

1.2 HIPÓTESIS.

La capacidad antibacteriana de multicapas nanoestructuradas de derivados del copolímero poli(anhídrido maléico-alt-estireno) conteniendo aminoazúcares y poli(4-vinilpiridina) N-alquil cuaternizada con bromuro de etilo y pentilo sobre una superficie

sólida, estará determinada por la naturaleza del sustituyente de la cadena lateral del copolímero, permitiendo aumentar la capacidad antibacteriana de la superficie.

1.3 OBJETIVOS.

1.3.1 Objetivo general.

Construir multicapas nanoestructuradas de polielectrolitos derivados de poli(anhídrido maléico-alt-estireno) conteniendo aminoazúcares y poli(4-vinilpiridina) N-alquil cuaternizadas con bromuro de etilo y pentilo con capacidad antibacteriana.

1.3.2 Objetivos específicos.

1. Modificar el copolímero poli(anhídrido maléico-alt-estireno), P(AM-alt-E), de diferentes pesos moleculares, con los aminoazúcares: 5-amino-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranosa, 3-amino-3-desoxi-1,2:5,6-di-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranosa, 6-amino-6-desoxi-1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranososa y 6-amino-6-desoxi-1,2-isopropilideno- α -D-glucofuranosa.
2. Modificar poli(4-vinilpiridina) de peso molecular de 60.000 g/mol, con bromuros de alquilo con diferente grado de hidrofobicidad (polielectrolitos catiónicos, P4VPy-C₂ y P4VPy-C₅).

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1 Reactivos.

Todos los reactivos utilizados en la síntesis del copolímero P(AM-alt-E) (Tabla 1), en la síntesis de aminoazúcares (Tabla 2), en la modificación del copolímero P(AM-alt-E) con aminoazúcares (Tabla 3), neutralización del copolímero *P-aminoazúcar* (Tabla 4) para la obtención del polielectrolito aniónico y cuaternización de P4VPy (Tabla 5); como también en la modificación del sustrato utilizado en las isotermas de adsorción y construcción de multicapas (Tabla 6 y Tabla 7) y caracterización superficial de las multicapas (Tabla 8), son los siguientes:

Tabla 1: Reactivos utilizados para la síntesis del copolímero P(AM-alt-E).

Reactivo	Abreviación	Fórmula Molecular	Pureza [%]	Marca
α, α -Azobisisobutironitrilo	AIBN	$C_8H_{12}N_4$	-	Merck
Metanol	MeOH	CH_4O	99,80	Merck
Anhídrido Maléico	AM	$C_4H_2O_3$	99,00	Merck
Benceno	-	C_6H_6	-	Merck
Estireno	E	C_8H_7	-	Merck

Tabla 2: Reactivos utilizados para la síntesis de aminoazúcares.

Reactivo	Abreviación	Fórmula Molecular	Pureza [%]	Marca
1,2 - <i>O</i> -Isopropilideno- α -D-glucofuranosa	-	C ₉ H ₁₆ O ₆	98,00	Aldrich
1,2:3,4-Di- <i>O</i> -isopropilideno- α -D-galactopiranososa	-	C ₁₂ H ₂₀ O ₆	97,00	Aldrich
1,2:5,6-Di- <i>O</i> -isopropilideno- α -D-glucofuranosa	-	C ₁₂ H ₂₀ O ₆	98,00	Aldrich
1,2- <i>O</i> -Isopropilideno- α -D-xilofuranosa	-	C ₈ H ₁₄ O ₅	99,00	Aldrich
Acetona	-	C ₃ H ₆ O	99,90	Aldrich
Ácido acético	AcOH	C ₂ H ₄ O ₂	99,70	Aldrich
Anhídrido acético	Ac ₂ O	C ₄ H ₆ O ₃	98,00	Aldrich
Anhídrido trifluorometansulfónico	Tf ₂ O	C ₂ F ₆ S ₂ O ₅	99,00	Aldrich
Azida de sodio	-	NaN ₃	99,50	Aldrich
Borohidruro de sodio	-	NaBH ₄	99,00	Aldrich
Cloruro de p-toluensulfonilo	TsCl	C ₇ H ₈ SO ₂ Cl	99,00	Aldrich
Diclorometano	-	CH ₂ Cl ₂	99,80	Aldrich
Dimetilformamida	DMF	C ₃ H ₇ NO	99,80	Aldrich
Dimetilsulfóxido	DMSO	C ₈ H ₁₂ N ₄	99,90	Merck
Etanoato de etilo	EtOAc	C ₄ H ₈ O ₂	-	Merck
Etanol	EtOH	C ₂ H ₆ O	99,80	Aldrich
Éter de petróleo	-	-	95,00	Aldrich
Éter etílico	-	C ₄ H ₁₀ O	99,00	Aldrich
Etilendiamina	-	C ₂ H ₈ N ₂	99,50	Aldrich
Hidrógeno	-	H ₂	99,99	Aldrich

Metanol	MeOH	CH ₄ O	99,00	Aldrich
Niquel Raney	Ni/H ₂	-	-	Merck
Paladio en carbono 10%	Pd/C	Pd	-	Aldrich
Piridina	Py	C ₅ H ₅ N	99,80	Aldrich
Sulfato de dimetilo	Me ₂ SO	C ₂ H ₆ O ₄ S	99,80	Aldrich
Sulfato de magnesio	-	MgSO ₄	99,50	Aldrich
Sulfato de sodio	-	Na ₂ SO ₄	99,00	Aldrich
Tetrahidrofurano	THF	C ₄ H ₈ O	99,90	Aldrich
Tolueno	-	C ₆ H ₅ CH ₃	99,80	Aldrich
Trifenilfosfina	PPh ₃	C ₁₈ H ₁₅ P	98,50	Aldrich

Tabla 3: Reactivos utilizados para la modificación del copolímero P(AM-alt-E) con aminoazúcares.

Reactivo	Abreviación	Fórmula Molecular	Pureza [%]	Marca
3-Amino-3-desoxi-1,2:5,6-di- <i>O</i> -isopropilideno- α -D- alofuranosa	Alo-f-(Iso) ₂	C ₈ H ₁₅ NO ₄	-	*
5-Amino-5-desoxi-1,2- <i>O</i> - isopropilideno- α -D- xilofuranosa	Xil-f-(Iso)OH	C ₁₂ H ₂₁ NO ₅	-	*
6-Amino-6-desoxi-1,2:3,4-di- <i>O</i> -isopropilideno- α -D- galactopiranososa	Gal-p-(Iso) ₂	C ₉ H ₁₅ NO ₅	-	*
6-Amino-6-desoxi-1,2- isopropilideno- α -D- glucofuranosa	Glu-f-Iso(OH) ₂	C ₁₂ H ₂₁ NO ₅	-	*
Dimetilsulfóxido	DMSO	C ₈ H ₁₂ N ₄	99,90	Merck
Poli(anhídrido maleico-alt- estireno)	P(AM-alt-E),P	C ₁₂ H ₁₀ O ₃	-	*
Trietilamina	TEA	N(CH ₂ CH ₃) ₃	-	Merck

*Sintetizados en esta tesis.

Tabla 4: Reactivos utilizados en la neutralización del copolímero P-aminoazúcar.

Reactivo	Abreviación	Fórmula Molecular	Pureza [%]	Marca
Bicarbonato de sodio	-	NaHCO ₃	-	Merck

Tabla 5: Reactivos utilizados en la cuaternización de poli(4-vinilpiridina).

Reactivo	Abreviación	Fórmula Molecular	Pureza [%]	Marca
Bromuro de etilo	-	C ₂ H ₅ Br	99,00	Aldrich
Bromuro de pentilo	-	C ₅ H ₁₂ Br	99,00	Aldrich
Cloroformo	-	CHCl ₃	99,00-99,40	Merck
Poli(4-vinilpiridina)	P4VPy	C ₇ H ₇ N	-	Aldrich

Tabla 6: Reactivos utilizados en el lavado oxidativo del sustrato utilizado para las isotermas de adsorción y construcción de multicapas.

Reactivo	Abreviación	Fórmula Molecular	Pureza [%]	Marca
Hidróxido de amonio (25%)	-	NH ₄ OH	-	Merck
Peróxido de hidrógeno (30%)	-	H ₂ O ₂	-	Merck

Tabla 7: Reactivos utilizados en la modificación hidrofílica del sustrato utilizado (SiW) en las isotermas de adsorción.

Reactivo	Abreviación	Fórmula Molecular	Pureza [%]	Marca
(3- Aminopropil)tri_ metoxisilano	APS	C ₆ H ₁₇ NO ₃ Si	97,00	Aldrich

Tabla 8: Reactivos utilizados en la determinación de la energía superficial.

Solventes	Abreviación	Fórmula molecular	Pureza [%]	Marca
Diyodometano	-	CH ₂ I ₂	-	Merck

1.4.2 Materiales.

Se detallarán a continuación los materiales utilizados en: i) síntesis del copolímero P(AM-alt-E), ii) síntesis de aminoazúcares, iii) modificación de los copolímeros P(AM-alt-E) con aminoazúcares, iv) neutralización de los copolímeros de *P-aminoazúcar* y iv) cuaternización de P4VPy.

También se especifican los materiales utilizados en: i) modificación del sustrato utilizado en las isotermas de adsorción, ii) construcción de multicapas, iii) caracterización superficial de las multicapas y iv) estudios de capacidad antibacteriana.

- Balones de 3 bocas.
- Refrigerante liso.
- Baño de silicona.
- Mangueras y coplas para flujo de nitrógeno.
- Termómetro (-20 – 150°C).
- Pipetas Pasteur.
- Vasos de precipitado.

- Probetas.
- Papel para pesar 3x3 pulgadas.
- Espátula.
- Viscosímetro capilar de dilución del tipo Ubbelohde.
- Soporte universal, nueces y pinzas.
- Silicon Wafers (Si/SiO₂) ([100], p-dopado R = 0.01 Ω cm).
- Placas de Cuarzo.
- Pinzas.
- Placas de 48 pocillos.
- Jeringas de 10 μL.
- Propipetas
- Cepas Bacterianas: *Pseudomonas aeruginosa wild-type PAO1* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028s.
- Medios de Cultivo (LB y Agar Top LB).

1.4.3 Equipos.

A continuación se detallan (Tabla 9) los equipos utilizados en la síntesis y caracterización molecular de: i) copolímero P(AM-alt-E) o P, ii) aminoazúcares, iii) modificación del copolímero P(AM-alt-E) con aminoazúcares, iv) neutralización del copolímero modificado P-*aminoazúcar* y iv) cuaternización de P4VPy.

También se detallan los equipos utilizados en: i) modificación del sustrato utilizado en las isothermas de adsorción y construcción de multicapas, ii) caracterización superficial de las multicapas y iv) estudios de capacidad antibacteriana.

Tabla 9: Equipos utilizados en el desarrollo experimental de esta tesis.

Equipo	Marca	Modelo
Balanza analítica	<i>Shimadzu</i>	<i>AUX220</i>
Agitador magnético	<i>Nuova</i>	<i>SP18420-26</i>
Estufa de secado	<i>Shel Lab</i>	<i>1410-2E</i>
Rotavapor	<i>Buchi</i>	<i>R-220-EX</i>
Liofilizador	<i>ilShin</i>	<i>TFD-5503</i>
Centrífuga	-	<i>ECO-2645</i>
Infrarrojo	<i>Bruker</i>	<i>Tensor 27</i>
NMR- ¹ H	<i>Bruker</i>	<i>ACP-200 y AVANCE-400</i>
NMR- ¹³ C	<i>Bruker</i>	<i>ACP-200 y AVANCE-400</i>
Espectrómetro de masas	<i>Bruker</i>	<i>MICROTOFQ II</i>
Elipsómetro	<i>Gaertner</i>	<i>L116S300 STOKES</i>
UV-Visible	<i>Shimadzu</i>	<i>UV-160</i>
Equipo para medir ángulo de Contacto	<i>Autoconstruido</i>	-
Microscopio de fuerza atómica	<i>Ntegra</i>	<i>NT-MDT</i>
Cabina de bioseguridad	<i>Thermo scientific</i>	<i>1386</i>
Incubador	<i>VelpR Scientific</i>	<i>FOC 225E</i>
Lupa de fluorescencia	<i>Olympus</i>	<i>MVX10</i>

1.4.4 Síntesis.

1.4.4.1 Síntesis del copolímero base, P(AM-alt-E).

La síntesis del copolímero P(AM-alt-E) se realizó mezclando cantidades equimolares de los monómeros de anhídrido maléico y estireno a 60°C, con α, α -azobisisobutironitrilo (AIBN) como iniciador en benceno anhidro como disolvente (Figura 15). Se obtuvo copolímeros de peso molecular viscosimétrico de $3,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ y $6,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$.

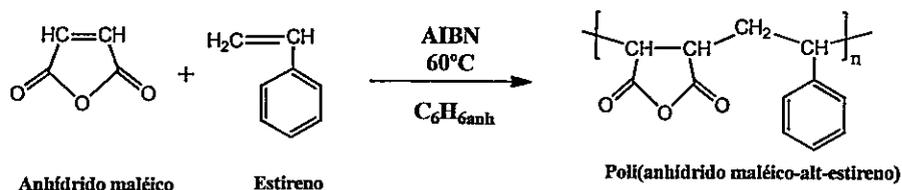


Figura 15: Reacción de copolimerización P(AM-alt-E).

El peso molecular del copolímero P(AM-alt-E) se determinó mediante viscosimetría. Utilizando el valor obtenido para viscosidad intrínseca en la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (1) se puede obtener el peso molecular viscosimétrico:⁹⁷

$$[\eta] = 5,07 \times 10^{-5} \cdot M_v^{0,81} \quad (1)$$

Donde,

$[\eta]$: Viscosidad intrínseca (dL/g).

M_v : Peso molecular viscosimétrico.

El valor de la viscosidad intrínseca se puede obtener realizando un gráfico simultaneo de las ecuaciones de Huggins (2) y Kraemer (3) (Figura 16) y extrapolando ambas rectas a dilución infinita, donde el intercepto de ambas rectas corresponde al valor de la viscosidad intrínseca.

Ecuación de Huggins:

$$\eta_{sp}/c = [\eta] + K_H[\eta]^2c \quad (2)$$

Ecuación de Kraemer:

$$(Ln\eta_r)/c = [\eta] - K_K[\eta]^2c \quad (3)$$

Donde,

η_{sp} : Viscosidad específica.

η_r : Viscosidad relativa.

c : Concentración de la solución polimérica diluida.

K_H y K_K : Constantes de proporcionalidad (se obtienen de las pendientes de los gráficos de η_{sp} / c y η_{rel} / c versus la concentración, respectivamente).

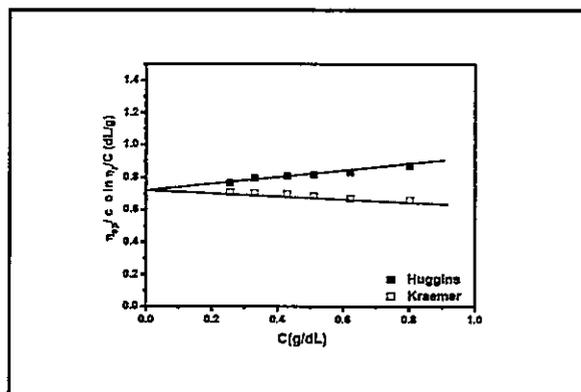


Figura 16: Gráfico de Huggins y Kraemer para la determinación de la viscosidad intrínseca del P(AM-alt-E).

1.4.4.2 Síntesis de aminoazúcares.

Los aminoazúcares propuestos en estas tesis, fueron sintetizados a partir de sus respectivos hidroxil-derivados (Figura 17): 1,2-di-*O*-isopropileno- α -D-xilofuranosa (Figura 17A), 1,2:5,6-di-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranosa (Figura 17B), 1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranososa (Figura 17C), 1,2-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranosa (Figura 17D).

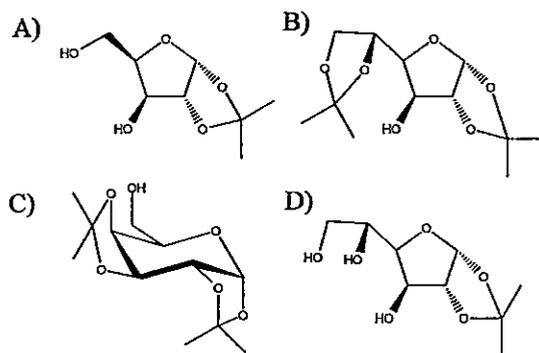


Figura 17: Materiales iniciales para la síntesis de los aminoazúcares.

La síntesis de aminoazúcares se llevó a cabo siguiendo tres pasos, como se muestra en la Figura 18. En un primer paso, el grupo hidroxilo del azúcar inicial es transformado en un grupo saliente, como tosilato (TsO-) o triflato (TfO-). En un segundo paso, estos azúcares fueron transformados en azo-derivados mediante una reacción S_N2 donde se produce el desplazamiento del grupo saliente con azida de sodio.

Después de esto, se hizo reaccionar los azo-derivados con trifetilfosfina o Pd/C/H₂ para obtener mediante hidrogenación los aminoazúcares.

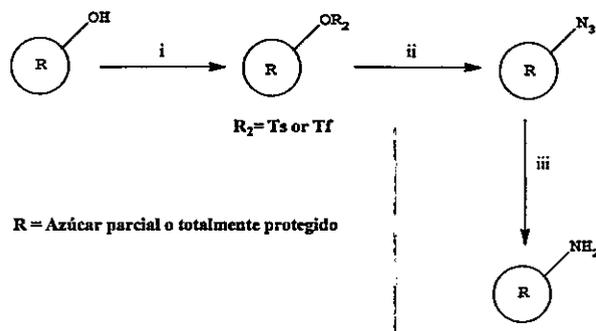


Figura 18: Procedimiento general de síntesis. i) tosilación, o triflicación, de los azúcares protegidos; ii) azidación; iii) aminación de los azúcares protegidos.

1.4.4.2.1 Síntesis de 5-amino-5-deoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranosa.

A continuación se presenta el esquema de síntesis (Figura 19), los detalles de reacción (Tabla 10) y el procedimiento experimental de síntesis para el aminoazúcar 5-amino-5-deoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranosa.

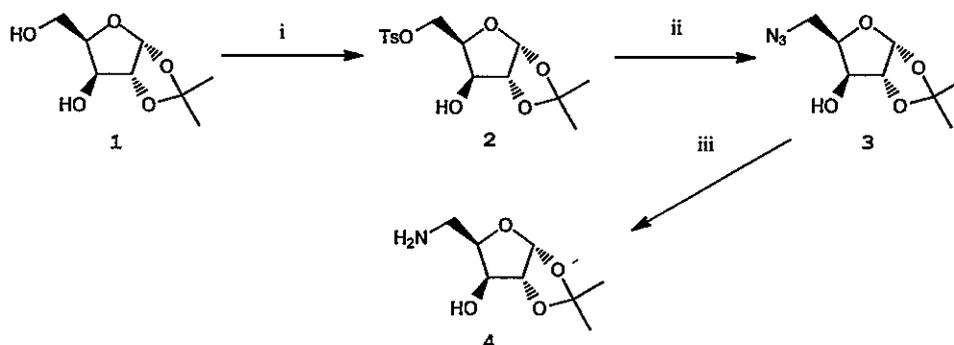


Figura 19: Esquema de síntesis de 5-amino-5-deoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranosa.

Tabla 10: Reacción de síntesis de 5-amino-5-deoxi-1,2-O-isopropilideno- α -D-xilofuranosa.

Nº Reacción*	Paso	Condiciones	Masa Inicial	Masa Final	Rendimiento
1.1	i	TsCl, Py, 0°C, 18h	1,50g	2,44g	90%**
	ii	NaN ₃ , DMF, 5h, 90°C,	2,4g	0,72g	48%***
1.1	i	TsCl, Py, 0°C, 18h	4,0g	7,85g	94%**
	ii	NaN ₃ , DMF, 5h, 90°C,	7,8g	3,72g	76%***
1.2	iii	PPh ₃ , THF/H ₂ O(4:1),rt,3h	0,4g	0,33g	94%
	iii	PPh ₃ , THF/H ₂ O (4:1),rt,3h	4,0g	1,52g	43%

* Número de veces realizada la reacción.

**Rendimiento producto crudo.

***Rendimiento calculado considerando como masa inicial el producto crudo.

1,2-Isopropilideno-5-O-tosil- α -D-xilofuranosa (2). Se añadió cloruro de p-toluensulfonilo (2,2 g, 11,5 mmol) a una solución de 1,2-di-O-isopropilideno- α -D-xilofuranosa (1) (1,5 g, 7,88 mmol) en piridina (35 mL) a 0°C. La mezcla estuvo en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. La solución resultante fue lavada con éter etílico y filtrada. Se removió el solvente bajo presión de vacío, luego se añadió agua para coagular la reacción, el solvente fue removido bajo presión de vacío y co-evaporado dos veces con tolueno. Se disolvió el residuo en CH₂Cl₂ y el solvente fue evaporado a presión reducida para obtener 1,2-isopropilideno-5-O-tosil- α -D-xilofuranosa (2,44 g, 90%) como un jarabe blanco.

5-Azido-5-deoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranosa (3). Se añadió azida de sodio (0,923 g, 14,2 mmol) a una solución de 5-*O*-tosil-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranosa (2) (2,44 g, 7,10 mmol) en DMF (20 mL) y la mezcla se agitó a 90°C durante dos horas. El solvente fue removido utilizando vacío, el residuo disuelto en tolueno y lavado dos veces con agua. La fase orgánica fue concentrada a presión reducida y el producto crudo purificado mediante columna cromatográfica (acetona-éter de petróleo, 2:8) para obtener 5-azido-5-deoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranosa (0,72 g, 48%) como un jarabe amarillo.

5-Amino-5-deoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranosa (4). Se hizo reaccionar el derivado azido (3) con trifenilfosfina (1:1,1 equivalentes) en una mezcla de THF/H₂O(4:1) durante una hora a temperatura ambiente. El solvente fue evaporado utilizando vacío y el residuo se disolvió en agua, luego fue lavado dos veces con éter etílico. Finalmente, la fase acuosa fue secada a presión reducida para obtener el aminoazúcar 5-Amino-5-deoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranosa con un aspecto viscoso café.

1.4.4.2 Síntesis de 3-amino-3-deoxi-1,2:5,6-di-*O*-isopropilideno- α -D-alofuranosa.

Para la síntesis de este azúcar se utilizó anhídrido trifluorometanosulfónico en vez de tosil clorato debido a que el primero es mejor grupo saliente que el grupo tosilato. Se obtuvo un alto rendimiento de azúcar triflato. La azidación fue exitosa, pero se produce una competencia entre la reacción de adición nucleofílica S_N2 y la reacción de eliminación E2. Como resultado, se obtuvo casi la misma proporción de ambos productos. Además, la reacción S_N2 involucra un cambio de configuración en el átomo de carbono en el que se producen las reacciones. Esta es la razón por la que se obtuvo una configuración alo- y no una configuración gluco- en la azúcar final.

A continuación se presenta el esquema de síntesis (Figura 20), los detalles de reacción (Tabla 11) y el procedimiento experimental de síntesis para el derivado de aminoazúcar 3-amino-3-deoxi-1,2:5,6-di-*O*-isopropilideno- α -D-alofuranosa.

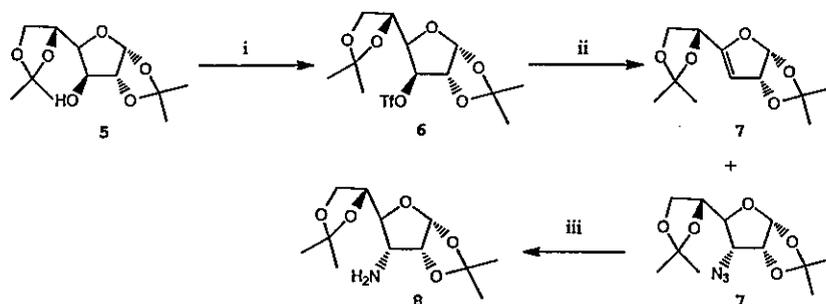


Figura 20: Esquema de síntesis de 3-amino-3-deoxi-1,2:5,6-di-*O*-isopropilideno- α -D-alofuranosa.

Tabla 11: Reacción de síntesis de 3-amino-3-deoxi-1,2:5,6-di-*O*-isopropilideno- α -D-alofuranosa.

Nº Reacción*	Paso	Condiciones	Masa Inicial	Masa Final	Rendimiento
2.1	i	Tf ₂ O, CH ₂ Cl ₂ , Py, 40°C, 1,5h	2,60g	4,30g	100%**
	ii	NaN ₃ , DMF, 24h, 40°C	4,30g	1,02g	33%***
	iii	Pd/C, H ₂ , EtOH, rt, 2h	0,6g	0,55g	100%**
2.2	i	Tf ₂ O, CH ₂ Cl ₂ , Py, 40°C, 1,5h	5,1g	-	-
	ii	NaN ₃ , DMF, 24h, 40°C	-	0,66g	-
	iii	Pd/C, H ₂ , EtOH, rt, 3h	0,66g	0,5g	83%

*Número de veces realizada la reacción.

**Rendimiento producto crudo.

***Rendimiento calculado considerando como masa inicial el producto crudo.

1,2:5,6-Di-*O*-isopropilideno-3-*O*-trifluorometanosulfonil- α -D-glucofuranosa (6). Se enfrió a -10°C un balón con piridina (2,5 mL, 31,9 mmol) y 80 mL de cloruro de metileno, al que se añadió gota a gota anhídrido triflico (5 g, 17,72 mmol) disuelto en 40mL de cloruro de metileno. Una vez completada la adición, la mezcla se dejó en agitación durante diez minutos. Se disolvió la azúcar (5) (2,55 g, 9,6 mmol) en 40mL de cloruro de metileno y se añadió gota a gota al balón, dejando la mezcla en agitación durante 1,5 horas. A la mezcla de reacción se adicionó agua-hielo, las fases fueron separadas y la fase acuosa se extrajo con dos porciones de cloruro de metileno. Los extractos fueron secados utilizando sulfato de sodio y el solvente fue removido utilizando vacío.

3-Azido-3-deoxi-1,2;5,6-di-*O*-isopropilideno- α -D-alofuranosa (7). A una solución del carbohidrato trifluorosulfonil (5) (1 equivalente), previamente descrito, en DMF anhídrida (2 mL) se añadió lentamente azida de sodio (2 equivalentes). Se detuvo la reacción luego de 24 horas de agitación a 50°C y se añadió agua. Se extrajo la mezcla resultante con éter de petróleo dos veces, se secó con MgSO₄ anhidro y se evaporó. Se purificó utilizando una columna cromatográfica (éter de petróleo-éter etílico, 7:3) para aislar el producto deseado del producto obtenido por la reacción de eliminación.

3-Amino-3-deoxi-1,2;5,6-di-*O*-isopropilideno- α -D-alofuranosa (8). Se disolvió el derivado azida (7) (285 mg, 1 mmol, 1 equivalente) en etanol absoluto (2 mL), bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadió paladio/carbono activado 10% a la reacción y se hidrogenó a 1 atm. Luego de estar en agitación durante varias horas a temperatura ambiente, la obtención del producto se monitoreó utilizando cromatografía en capa fina y una vez terminada la reacción, la mezcla fue filtrada usando un colchón de Celita. Se removió el solvente utilizando vacío para obtener el aminoazúcar 3-Amino-3-deoxi-1,2;5,6-di-*O*-isopropilideno- α -D-alofuranosa (8).

1.4.4.2.3 Síntesis de 6-amino-6-deoxi-1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranososa.

A continuación se presenta el esquema de síntesis (Figura 21), los detalles de reacción (Tabla 12) y el procedimiento experimental de síntesis del aminoazúcar 6-amino-6-deoxi-1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranososa.

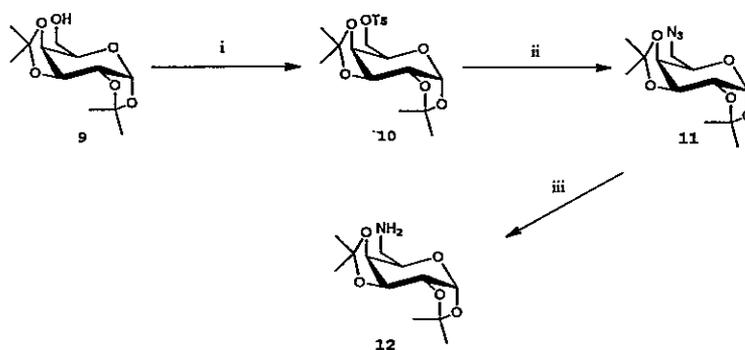


Figura 21: Esquema de síntesis de 6-amino-6-deoxi-1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranososa.

Tabla 12: Reacción de síntesis de 6-amino-6-deoxi-1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranosas.

Nº Reacción*	Paso	Condiciones	Masa Inicial	Masa Final	Rendimiento
3	i	TsCl, Py, 0°C, 4h	5,00g	7,32g	92%**
	ii	NaN ₃ , DMSO, 2h, 160°C	7,32g	4,4g	88%***
	iii	PPh ₃ , THF/H ₂ O (4:1), rt, 3h	0,4g	0,27g	74%
	iii	PPh ₃ , THF/H ₂ O (4:1), rt, 3h	1,5g	1,30g	95%

*Número de veces realizada la reacción.

**Rendimiento producto crudo.

***Rendimiento calculado considerando como masa inicial el producto crudo.

1,2:3,4-Di-isopropilideno-6-*O*-tosilato- α -D-galactopiranosas (10). A una solución de 1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranosas (9) (5,0 g, 1,92 mmol) en piridina, se añadió cloruro de *p*-toluensulfonilo (5,5 g, 2,88 mmol), dejando la mezcla toda la noche bajo agitación a una temperatura entre 0-5°C. El solvente fue removido bajo presión de vacío y el residuo viscoso fue lavado con agua y filtrado. El residuo sólido obtenido fue disuelto en éter y concentrado, luego fue lavado con una mezcla agua-etanol y concentrado nuevamente para obtener 1,2:3,4-di-isopropilideno-6-*O*-tosilato- α -D-galactopiranosas (7,32 g, 92%) como un líquido viscoso amarillo.

6-Azido-6-deoxi-1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranosas (11). A una solución de 1,2:3,4-di-isopropilideno-6-*O*-tosilato- α -D-galactopiranosas (10) en Me₂SO

(20mL) se añadió azida de sodio (5,74 g, 88,0 mmol). La mezcla estuvo en agitación durante dos horas a 160°C, luego fue enfriada a temperatura ambiente, se añadió agua-hielo y se extrajo con EtOAc. La fase orgánica fue secada (MgSO₄ anhidrido) y concentrada. El producto fue purificado por cromatografía en columna (éter etílico) y concentrada obteniendo 6-azido-6-deoxi-1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranososa (4,4 g, 88%) como un líquido viscoso café.

6-Amino-6-deoxi-1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranososa (12). Se hizo reaccionar 6-Azido-6-deoxi-1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranososa (11) con trifenilfosfina (1:1,1 equivalentes) en una mezcla de THF/H₂O(4:1) durante una hora a temperatura ambiente. El solvente fue evaporado a presión reducida, el residuo fue disuelto en agua y lavado dos veces utilizando éter etílico. La fase acuosa fue secada utilizando vacío para obtener como producto el derivado de aminoazúcar 6-Amino-6-deoxi-1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranososa como un jarabe café.

1.4.4.2.4 Síntesis de 6-amino-6-deoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranosa.

A continuación se presenta el esquema de síntesis (Figura 22), los detalles de reacción (Tabla 13) y el procedimiento experimental de síntesis para el aminoazúcar 6-amino-6-deoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranosa.

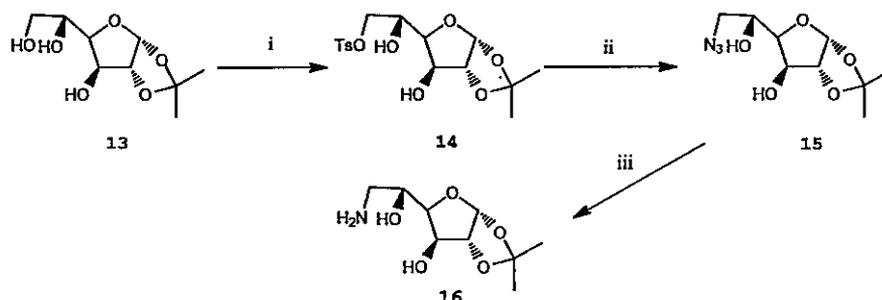


Figura 22: Esquema de síntesis de 6-amino-6-deoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranosa.

Tabla 13: Reacción de síntesis de 6-amino-6-deoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranosa.

Nº Reacción*	Paso	Condiciones	Masa Inicial	Masa Final	Rendimiento
4.1	i	TsCl, Py, 12h, -15°C	3,00g	5,00g	98%**
	ii	NaN ₃ , DMF, 40°C, 15h	5,00g	2,95g	90%***
4.2	i	TsCl, Py, 12h, -15°C,	6,00g	9,60g	98%**
	ii	NaN ₃ , DMF, 40°C, 15h	9,60g	6,32	99%***
	iii	PPh ₃ , THF/H ₂ O (4:1), rt, 3h	0,4g	0,34g	95%
	iii	PPh ₃ , THF/H ₂ O (4:1), rt, 3h	1,5g	1,14g	85%

** Número de veces realizada la reacción.

**Rendimiento producto crudo.

***Rendimiento calculado considerando como masa inicial el producto crudo.

1,2-*O*-Isopropilideno-6-*O*-*p*-toluensulfonil- α -D-glucofuranosa (14). Se enfrió una solución de 1,2-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranosa (13) (3,0 g, 13,6 mmol) en piridina anhídrida (25 mL) a -14°C. Se añadió una solución de cloruro de *p*-toluensulfonilo (2,86g, 15,0mmol), en piridina anhídrida (10 mL), y la mezcla se dejó a -14°C durante doce horas. El solvente fue evaporado y el residuo disuelto en diclorometano, lavado con HCl (0,5M) y saturado con bicarbonato de sodio, secado, filtrado. Se evaporó el solvente para obtener 1,2-*O*-isopropilideno-6-*O*-*p*-toluensulfonil- α -D-glucofuranosa (5,0g, 98%) como un jarabe amarillo.

6-Azido-6-deoxi-1, 2-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranosa (15). Se añadió azida de sodio (2,6 g, 40 mmol) a una solución de 1,2-*O*-isopropilideno-6-*O*-*p*-toluensulfonil- α -D-glucofuranosa (12) (5,0 g, 13,4 mmol) en *N,N*-dimetilformamida anhídrida (50 mL) y se dejó en agitación a 40°C durante 15 horas. Se removió el solvente y el residuo fue disuelto en diclorometano, lavado con agua, se agregó MgSO₄ anhidro, se secó, filtró y concentró obteniendo un aceite viscoso. Se purificó mediante cromatografía utilizando una columna flash (éter-éter de petróleo, 9:1) para obtener como producto 6-Azido-6-deoxi-1, 2-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranosa (2,95 g, 90%) como un sólido blanco.

6-Amino-6-deoxi-1, 2-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranosa (16). Se hizo reaccionar el derivado azida (15) con trifenilfosfina (1:1 equivalentes) en una mezcla de THF/H₂O (4:1) durante toda la noche a temperatura ambiente. Se evaporó el solvente, el residuo fue disuelto en agua y lavado dos veces con éter etílico. La fase acuosa fue secada con

vacío para obtener el derivado de aminoazúcar 6-Amino-6-deoxi-1, 2-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranosa (16) como un jarabe café.

1.4.5 Modificación del copolímero P(AM-alt-E) con aminoazúcares.

La modificación del copolímero P(AM-alt-E) con los aminoazúcares propuestos se llevó a cabo en dimetilsulfóxido anhídrido como disolvente a 60°C y trietilamina como catalizador (Figura 23), obteniendo los copolímeros P-Xil-f-(Iso)OH, P-Alo-f-(Iso)₂, P-Gal-p-(Iso)₂ y P-Glu-f-Iso(OH)₂ (Figura 6).

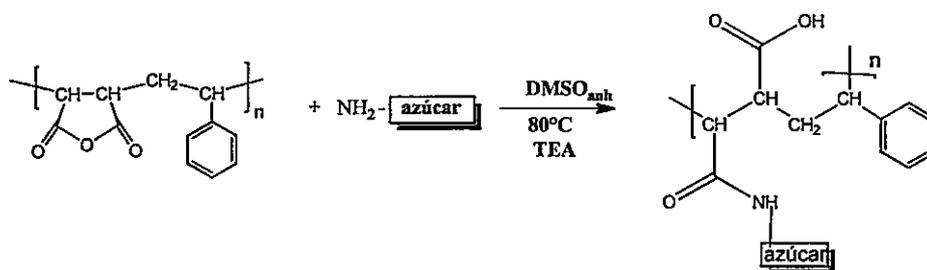


Figura 23: Reacción de copolímero P(AM-alt-E) con aminoazúcares.

1.4.5.1 Obtención del polielectrolito aniónico copolímero P-aminoazúcar.

Los copolímeros P-Xil-f-(Iso)OH, P-Alo-f-(Iso)₂, P-Gal-p-(Iso)₂ y P-Glu-f-Iso(OH)₂ fueron neutralizados utilizando bicarbonato de sodio en relación estequiométrica 1:1, ultrafiltrados y liofilizados de tal forma de obtener los polielectrolitos aniónicos copolímeros P-Xil-f-(Iso)OH, P-Alo-f-(Iso)₂, P-Gal-p-(Iso)₂ y P-Glu-f-Iso(OH)₂.

1.4.6 Cuaternización de P4VPy.

La cuaternización de la poli(4-vinilpiridina) (P.M=6,0x10⁴g·mol⁻¹) se llevó a cabo utilizando bromuro de etilo y pentilo, en cloroformo anhidro como disolvente a 60°C (Figura 24).

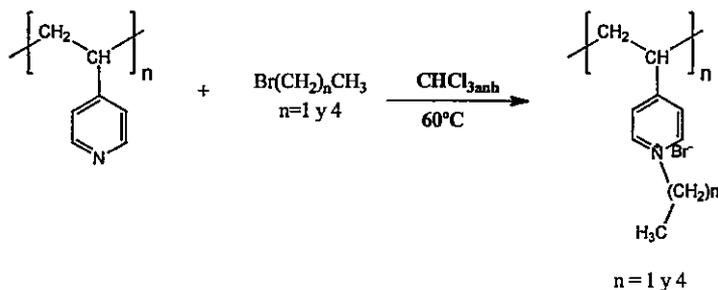


Figura 24: Reacción cuaternización poli(4-vinilpiridina) con bromuro de etilo y pentilo.

1.4.7 Caracterización Molecular.

La caracterización molecular de los distintos sistemas obtenidos se realizó mediante espectroscopia infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR) y resonancia magnética nuclear (^1H y ^{13}C).

Caracterización por FT-IR: Las muestras fueron preparadas a partir de una mezcla de 20mg de polímero y 100mg de KBr. Los espectros se realizaron a temperatura ambiente.

Caracterización por NMR- ^1H y NMR- ^{13}C (400MHz): Las muestras fueron preparadas mezclando 80 mg de polímero en 500 μL de DMSO- D_6 . Los espectros se realizaron a temperatura ambiente.

1.4.8 Determinación de las condiciones experimentales para la construcción de multicapas.

Previo al proceso de construcción de multicapas, fue necesario determinar las condiciones experimentales de trabajo como la concentración de sal adicionada o fuerza iónica, la concentración y el pH de la solución de polielectrolito aniónico.

1.4.8.1 pH.

Para determinar el pH de la solución de polielectrolito aniónico con el que se construyeron las multicapas, se estudió la solubilidad de los polielectrolitos variando el pH de la solución en un intervalo de pH 2 a pH 7 mediante la adición de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio. Una vez obtenido el pH en el que se construirán las multicapas se analizó si se produce la desprotección del anillo del azúcar del polielectrolito *P-aminoazúcar* mediante NMR-¹H y NMR-¹³C. El espectro se realizó luego de solubilizar el polielectrolito *P-aminoazúcar* tres días en una disolución a pH 4 a diferentes fuerzas iónicas (0,1M y 0,001M de NaCl), la que posteriormente fue ultrafiltrada y liofilizada.

1.4.8.2 Concentración de sal adicionada o fuerza iónica y concentración de la disolución de polielectrolito.

Se realizaron isotermas de adsorción de todos los polielectrolitos P-Xil-f-(Iso)OH, P-Alo-f-(Iso)₂, P-Gal-p-(Iso)₂ y P-Glu-f-Iso(OH)₂. Para determinar la concentración de la solución de los polielectrolitos aniónicos a utilizar en el proceso de construcción de multicapas, se utilizaron concentraciones de polielectrolito en un rango de 0,05g/L a 1 g/L, a pH 4. Por otro lado, para determinar la fuerza iónica a utilizar, la concentración de sal adicionada fue de 0,1M y 0,001M de NaCl.

1.4.9 Preparación del sustrato.

La construcción de las multicapas se realizó utilizando como sustrato SiW y cuarzo, los que previamente fueron sometidos a un lavado oxidativo (H_2O , NH_4OH y H_2O_2 , 5:1:1). Para realizar las isothermas de adsorción, el sustrato de SiW fue posteriormente modificado con APS (Figura 25), para obtener una superficie cargada positivamente. La cantidad adsorbida fue determinada luego de tres horas de adsorción.

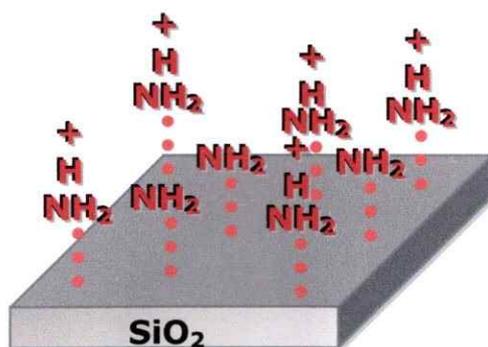


Figura 25: Modificación hidrofílica del sustrato de SiW con APS.

1.4.10 Construcción de multicapas.

Para la construcción de las multicapas se utilizó como sustrato silicon wafers y placas de cuarzo de 1x1cm, los que previamente fueron sometidos a un lavado oxidativo (H_2O , NH_4OH y H_2O_2 , 5:1:1). El sustrato se sumergió durante treinta minutos y de forma alternada, primero en la solución del polielectrolito catiónico P4VPy N-alquil

cuaternizada y luego, en la solución del polielectrolito aniónico *P-amino azúcares*, hasta alcanzar un número de 12 capas (Figura 26). Ambas soluciones a pH 4 y con una concentración de NaCl de 0,1M.

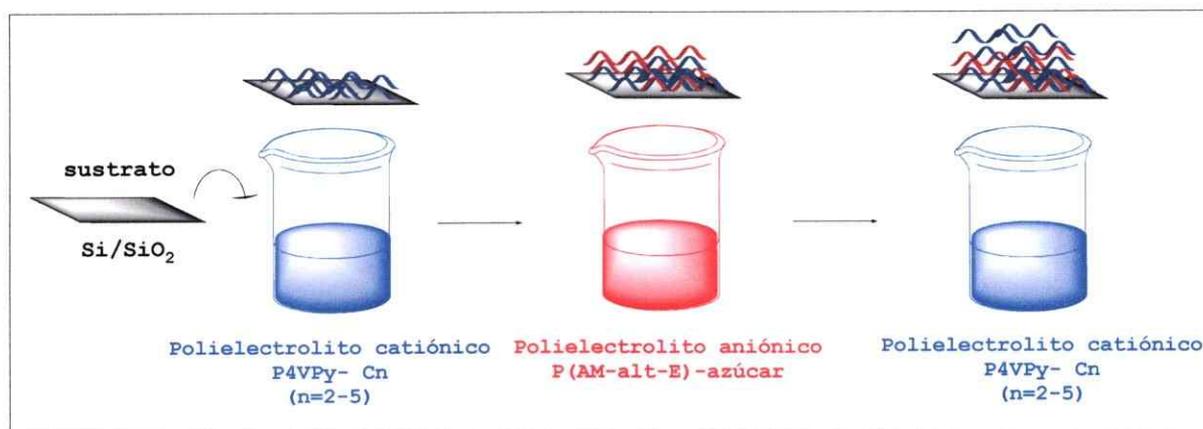


Figura 26: Proceso de construcción de multicapas mediante la deposición alternada de polielectrolitos.

1.4.11 Caracterización de la superficie de las multicapas.

1.4.11.1 Determinación de cantidad adsorbida y espesor de las multicapas.

La determinación de la cantidad adsorbida y espesor de la multicapa fue llevada a cabo en un elipsómetro (Ratzeburg, Germany) DRE-EL02 vertical controlado

computacionalmente. El ángulo de incidencia (Φ) se fijó en 70° y la longitud de onda del laser en 632,8 nm. Las medidas fueron hechas a $23^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$. El valor de la cantidad adsorbida (I) se obtiene por medio de la ecuación 4: ⁹⁸⁻¹⁰⁰

$$\Gamma = \frac{d_{\text{poli}}(n_{\text{poli}} - n_0)}{d_n/d_c} = d_{\text{poli}}c_{\text{poli}} \quad (4)$$

Donde:

d_{poli} : Espesor de las capas adsorbidas de los polielectrolitos determinada por elipsometría.

n_{poli} : Índice de refracción del polielectrolito.

n_0 : Índice de refracción del solvente.

d_n/d_c : 0,16 ml/g a $23 \pm 2^\circ \text{C}$.

1.4.11.2 Determinación de la absorbancia.

Las mediciones de absorbancia fueron realizadas en un espectrofotómetro *UV-visible UV-160*, observando la absorbancia obtenida en una banda de 258 nm de longitud de onda.

1.4.11.3 Determinación de la morfología y topografía (RMS) de la multicapa.

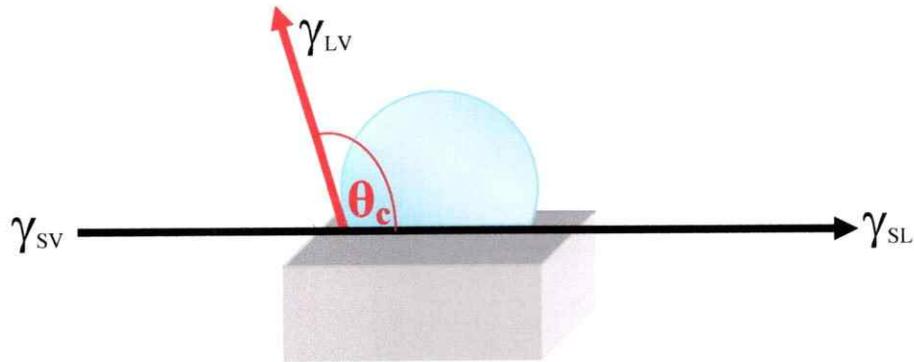
Las imágenes de la topografía y morfología de las multicapas fueron obtenidas

en un microscopio de fuerza atómica multimode, Nanoscope IIIa en el modo de contacto intermitente ("Tapping") a temperatura ambiente.

1.4.11.4 Determinación de la humectabilidad.

La humectabilidad de las multicapas fue determinada mediante mediciones de ángulo de contacto de avance (θ_A). La determinación del ángulo de contacto se llevó a cabo utilizando el método de la gota estática, depositando 8 μL de agua sobre la superficie de las películas de multicapas obtenidas, donde el ángulo de contacto corresponde a la tangente que se forma entre la superficie del líquido al hacer contacto con el sólido (Figura 27).

Este ángulo depende de la competencia de las fuerzas de cohesión de las moléculas del líquido y las fuerzas de adhesión entre el líquido y el sólido, cuando las fuerzas de adhesión entre el sólido y el líquido son mayores que las fuerzas cohesivas del líquido, el ángulo de contacto es inferior a 90° , teniendo como resultado que el líquido moja la superficie, es decir, la superficie es humectable. Por tanto, cuando las fuerzas de adhesión entre el sólido y el líquido son menores que las fuerzas cohesivas del líquido, el ángulo de contacto es mayor a 90° , el líquido no moja la superficie, es decir, la superficie no es humectable.



Donde: γ_{LV} : Energía interfacial líquido-vapor (aire).
 γ_{SV} : Energía interfacial sólido-vapor (aire).
 γ_{SL} : Energía interfacial sólido-líquido.

Figura 27: Determinación del ángulo de contacto.

Además, mediante el ángulo de retroceso (θ_R), el que se obtiene extrayendo 4 μL de los 8 μL depositados previamente se puede conocer el ángulo histéresis de la superficie (θ_H), es decir, la heterogeneidad química de la superficie, mediante la ecuación (5):

$$\theta_H = \theta_A - \theta_R \quad (5)$$

1.4.11.5 Determinación de energía superficial.

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta \quad (6)$$

A la vez, existen variadas teorías que permiten relacionar las energías interfaciales con la energía libre superficial. Una de las más utilizadas es la del método geométrico, esta teoría asume que las energías interfaciales están determinadas solo por

contribuciones polares (γ^d) y dispersivas (γ^p). Estos componentes pueden ser determinados por medio del ángulo de contacto de los líquidos, uno polar y otro apolar, y utilizando la ecuación (6), de tal forma que:

$$\gamma_{LV}(1 + \cos\theta) = [(\gamma_s^d \cdot \gamma_{LV}^d)^{1/2} + (\gamma_s^p \cdot \gamma_{LV}^p)^{1/2}] \quad (7)$$

En este caso se escogió utilizar diyodometano y agua, un líquido apolar y otro polar, respectivamente, donde los parámetros de tensión superficial para la ecuación (7) de los solventes utilizados son:

Tabla 14: Parámetros de tensión superficial para los líquidos utilizados.

Solvente	γ_{LV} (mJ/m ²)	γ_{LV}^d (mJ/m ²)	γ_{LV}^p (mJ/m ²)
Agua	72,8	21,8	51,0
Diyodometano	50,8	50,8	0,0

Dado que la tensión superficial es proporcional a la energía intermolecular, la energía superficial (γ) de un material puede ser considerada como la suma de sus componentes dispersivos (γ^d) y polares (γ^p), lo que permite obtener la energía superficial total mediante la ecuación (8):

$$\gamma = \gamma^d + \gamma^p \quad (8)$$

1.4.12 Estudios de capacidad antibacteriana.

Para determinar la capacidad antibacteriana de las multicapas construidas, se realizaron ensayos microbiológicos. Para esto se inocularon las distintas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028s. En el caso de *Salmonella* fue transformada con el plásmido pDiGC que codifica para la proteína fluorescente GFP de forma constitutiva para poder visualizarla en microscopía de fluorescencia. Las especies se incubaron a 37°C, a 180 rpm, por dieciocho horas (cultivo de noche), para posteriormente realizar diluciones para su uso en el protocolo.

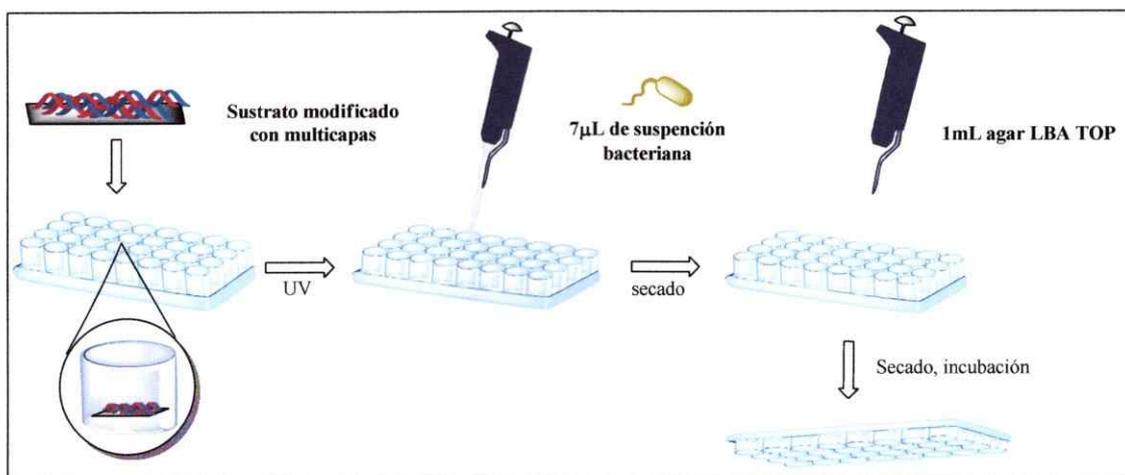


Figura 28: Procedimiento experimental para la determinación de la capacidad antibacteriana de las multicapas.

Previo a la incubación con bacterias, los sustratos modificados con las distintas multicapas fueron situados en placas de 48 pocillos y esterilizados con luz UV por 10

minutos. Luego, se depositó 7 μ L de cada suspensión bacteriana 1/50(0,1 DO) sobre las distintas multicapas a evaluar y se secaron en condiciones de esterilidad en una campana de bioseguridad. Una vez seca la suspensión bacteriana, se vertió un 1mL de agar LBA top (LB+Ampicilina, 7,5g de agar por litro de medio LB, Ampicilina 50 μ g/ml) sobre el sustrato modificado. Las placas fueron incubadas a 37°C, en posición invertida por 18 horas (Figura 28). Todos los ensayos fueron realizados al menos en triplicado.

Para evaluar la capacidad antibacteriana de las multicapas se registró el crecimiento bacteriano mediante una lupa tanto en modo de contraste de fase (*Pseudomonas*) como en modo de fluorescencia verde (*Salmonella*).

El porcentaje de sobrevivencia de las bacterias en las diferentes multicapas se determinó mediante la relación de las bacterias presentes en el sustrato control (sin modificar) con relación al sustrato modificado con las multicapas. Para esto se utilizó el programa ImageJ. Este programa permite la cuantificación automática de partículas o colonias bacterianas presentes en una imagen. Para una mejor cuantificación se modificó tanto el umbral (treshold) como el tamaño de los pixeles (size) según el tamaño de las bacterias analizadas. Se promedió el número de colonias de tres determinaciones y se realizó un análisis estadístico Anova (test Bonferroni) mediante GraphPad (Prism 6.0) para determinar la significancia estadística de los resultados.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.5.1 Caracterización molecular del copolímero P(AM-alt-E), aminoazúcares y copolímero P-*aminoazúcar*.

La caracterización molecular del copolímero P(AM-alt-E) y del polielectrolito copolímero P-*aminoazúcar* fue realizada utilizando de forma complementaria Espectroscopía infrarrojo (FT-IR), Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones (NMR-¹H) y Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono trece (NMR-¹³C).

La caracterización molecular de los aminoazúcares se llevó a cabo mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones (NMR-¹H).

1.5.1.1 Espectroscopía infrarrojo, FT-IR.

La Figura 29 muestra el espectro de FT-IR del copolímero P(AM-alt-E). Se observan bandas en 1778 cm⁻¹ y 1854 cm⁻¹ correspondientes a ambos grupos carbonilo presentes en el anhídrido maléico. Se observan bandas en 1494 cm⁻¹ y 1451 cm⁻¹ correspondientes al anillo aromático de estireno.

En el espectro infrarrojo del copolímero P-Xil-f-(Iso)OH (Figura 30), se observa una banda ancha en 3428 cm⁻¹ correspondiente al grupo -NH de la amida, la que puede estar acoplada con la banda correspondiente al grupo carbonilo del ácido carboxilo. En 1700 cm⁻¹ se observa la banda característica del grupo carbonilo (-C=O)

de la amida y en 1680 cm^{-1} una banda correspondiente al grupo carbonilo del grupo ácido resultante de la apertura del anillo de anhídrido maléico. Las bandas descritas anteriormente fueron observadas en todos los espectros FT-IR de los copolímeros P-*aminoazúcar*.

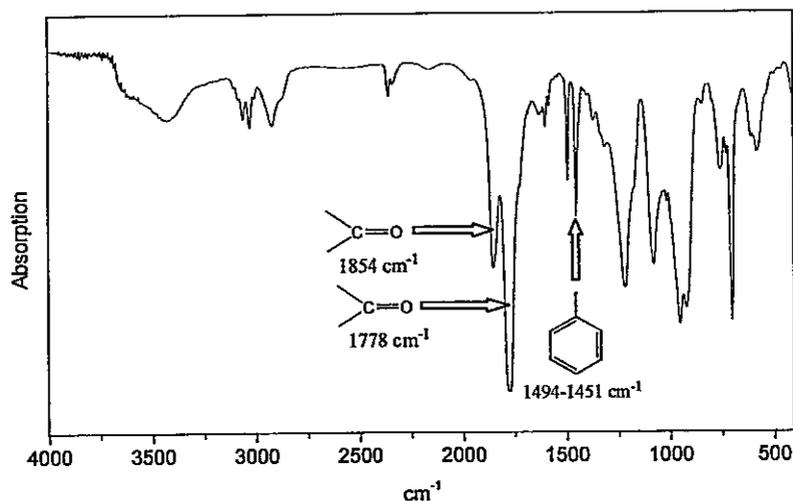


Figura 29: Espectro FT-IR del copolímero P(AM-alt-E).

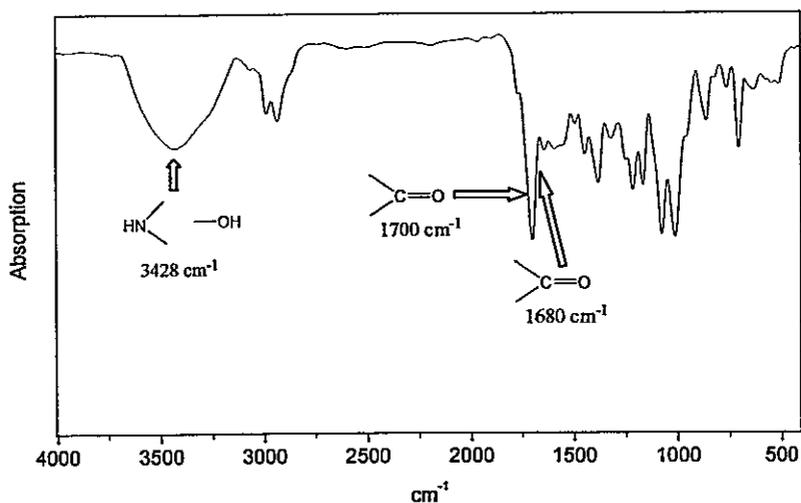


Figura 30: Espectro FT-IR del copolímero P-Xil-f-(Iso)OH.

1.5.1.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones, NMR- H^1 .

En el espectro NMR- H^1 del copolímero P(AM-alt-E) (Figura 31), se observan bandas entre 3 ppm y 4 ppm correspondientes a los protones de los grupos -CH de la cadena principal. En 7 ppm y 8 ppm se observan las bandas correspondientes a los protones presentes en el anillo aromático de estireno.

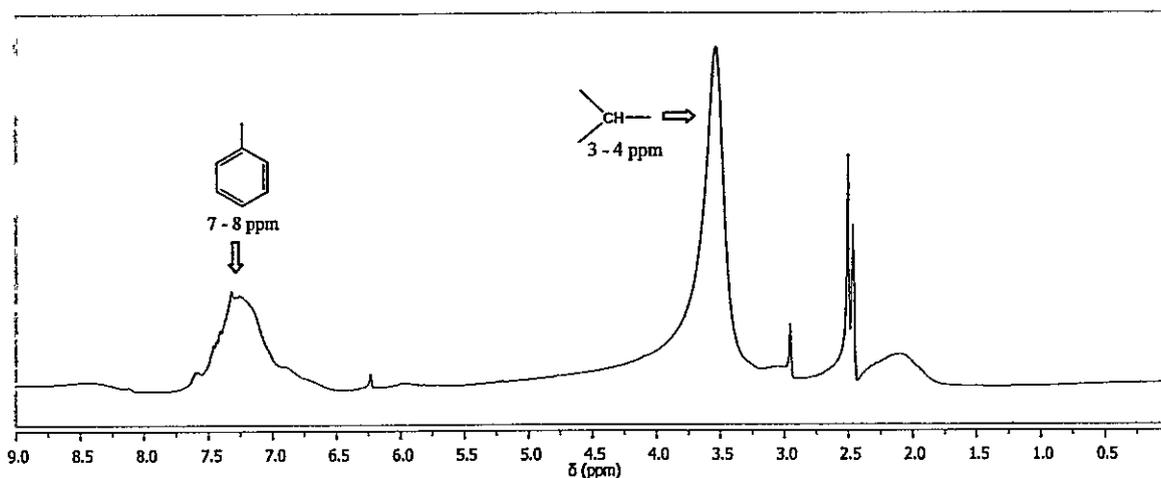


Figura 31: Espectro NMR- H^1 del copolímero P(AM-alt-E).

En la Figura 32 se observa el espectro NMR- H^1 del aminoazúcar 6-amino-6-deoxi-1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranos. Se observa una banda en 1,33 ppm correspondiente a los seis hidrógenos pertenecientes a los dos grupos -CH₃ protectores (-OAc); las bandas existentes en 1,44 ppm y 1,53 ppm representan cada una tres hidrógenos correspondientes a los grupos -CH₃ de otro grupo protector; la banda en 1,76 ppm corresponde a los dos hidrógenos del grupo amino -NH₂; las bandas en 2,81

ppm y 2,93 ppm representan cada una a un hidrógeno perteneciente al grupo $-CH_2$ unido al $-NH_2$; finalmente, las señales en 3,68 ppm; 4,20 ppm; 4,26 ppm; 4,57 ppm y 5,55 ppm corresponden cada una a un hidrógeno del anillo de galactopiranososa.

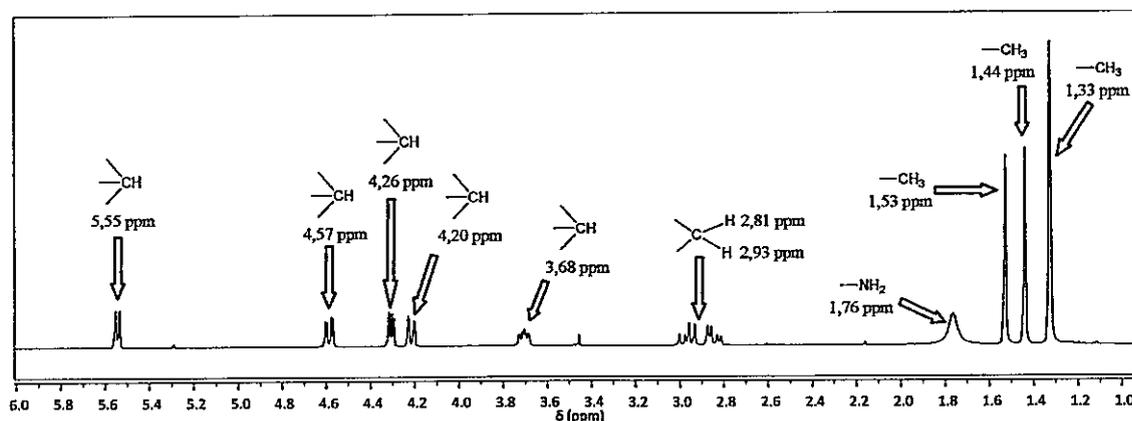


Figura 32: Espectro NMR- 1H 6-amino-6-deoxi-1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranososa.

En la Figura 33 se observa el espectro NMR- 1H del amino-azúcar 5-amino-5-deoxi-1,2-di-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranosa, donde en 1,31 ppm y 1,47 ppm se observa una banda correspondiente a los seis hidrógenos de los grupos $-CH_3$ del grupo protector, en 3,13 ppm se observa la banda correspondiente a uno de los hidrógenos del grupo $-CH_2$, en 3,49-3,55 ppm se observa una banda correspondiente a los dos hidrógenos del grupo amino, un hidrógeno perteneciente al grupo $-CH_2$ y el hidrógeno del grupo hidroxilo. Finalmente, las bandas en 4,12 ppm; 4,31 ppm; 4,48 ppm y 5,96 ppm corresponden a los cuatro hidrógenos del anillo del azúcar.

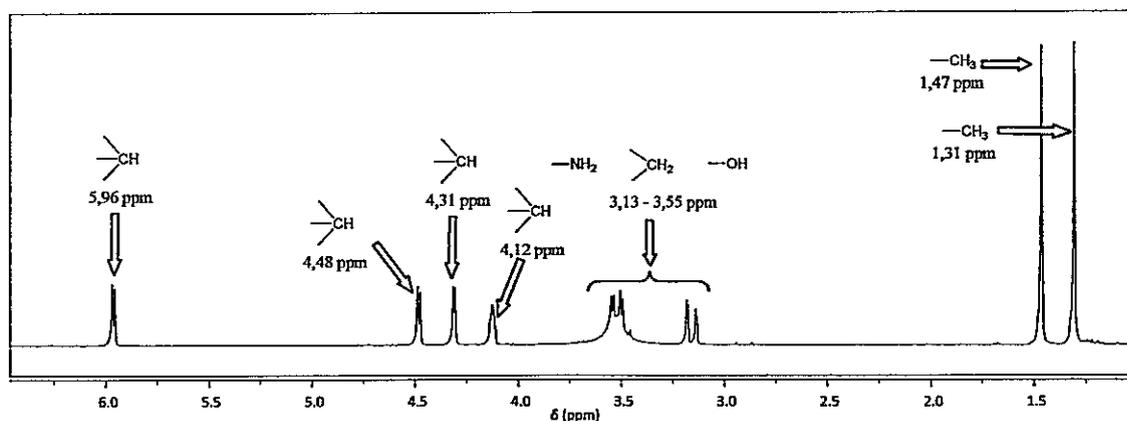


Figura 33: Espectro NMR-¹H 5-amino-5-deoxi-1,2-di-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranosa.

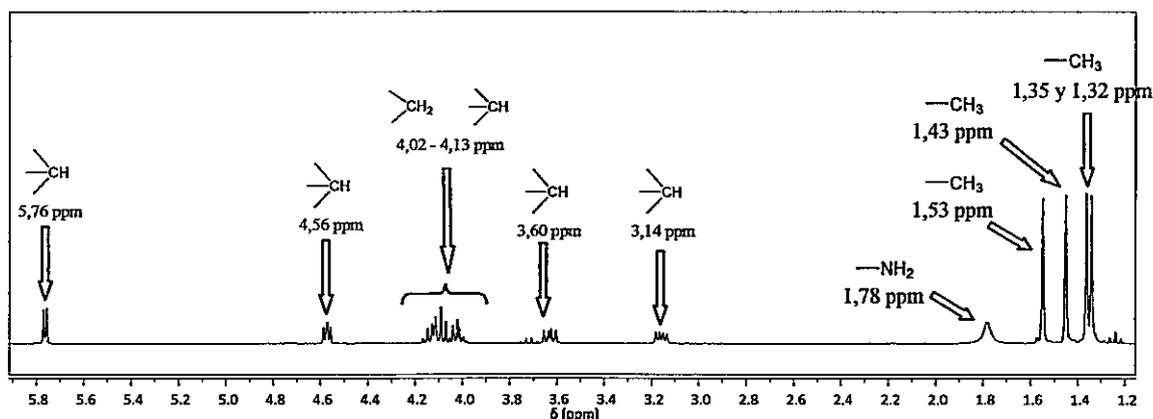


Figura 34: Espectro NMR-¹H 3-amino-3-deoxi-1,2:5,6-di-*O*-isopropilideno- α -D-alofuranosa.

En la Figura 34 se observa el espectro NMR-¹H del amino-azúcar 3-amino-3-deoxi-1,2:5,6-di-*O*-isopropilideno- α -D-alofuranosa, en el que en 1,53 ppm; 1,43 ppm; 1,35 ppm y 1,32 ppm se observan las bandas correspondientes a los hidrógenos de los grupo -CH₃ de los grupos protectores; en 3,14 ppm, 3,60 ppm, 4,56 ppm y 5,76 ppm se

observan las bandas correspondientes a los hidrógenos del anillo del azúcar; en 1,78 ppm se observan los dos hidrógenos del grupo amino y en 4,02-4,13 ppm los tres hidrógenos correspondientes a los grupos -CH y -CH₂ del grupo protector.

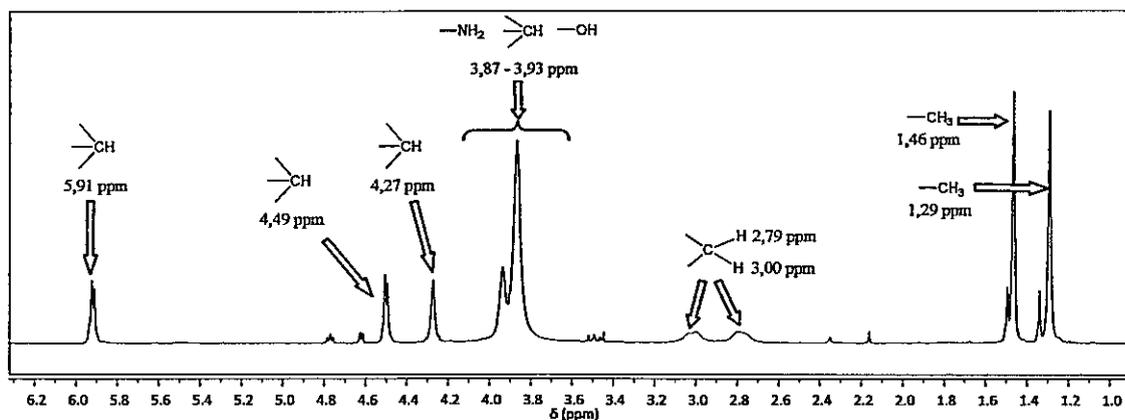


Figura 35: Espectro NMR-¹H 6-amino-6-desoxi-1,2-isopropilideno- α -D-glucofuranosa.

En la Figura 35 se observa el espectro NMR-¹H del aminoazúcar 6-amino-6-desoxi-1,2-isopropilideno- α -D-glucofuranosa, en el que las bandas en 1,46 ppm y 1,29 ppm corresponden a los hidrógenos de los grupos -CH₃ del grupo protector, las bandas en 2,79 ppm y 3,00 ppm corresponden a los dos hidrógenos del grupo -CH₂ enlazado al grupo amino, en 3,87 ppm y 3,93 ppm se observa un acoplamiento de bandas de los protones correspondientes a los grupos hidroxilos, amino y un hidrógeno perteneciente al anillo del azúcar, y en 4,27 ppm, 4,49 ppm y 5,91 ppm se observan las bandas correspondiente a los tres hidrógenos restantes del anillo del azúcar.

Respecto a los espectros NRM-¹H de los copolímeros P-aminoazúcar, se

observan bandas pertenecientes a hidrógenos del copolímero P(AM-alt-E) y a hidrógenos de los aminoazúcares, sin embargo existe un acoplamiento y corrimiento de bandas. Por lo que a pesar de registrar espectros NMR-¹H con cinco días de acumulación para todos los polielectrolitos copolímero de *P-aminoazúcar*, la identificación de bandas características no es completamente concluyente. Esto se podría deber a que en este tipo de sistemas, hay un gran número de grupos funcionales que pueden formar interacciones intra- e intermoleculares. Por esta razón, se utilizó de forma complementaria resonancia magnética nuclear de NMR-¹³C.

1.5.1.3 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono trece (NMR-¹³C).

En la Figura 36, correspondiente al espectro NMR-¹³C del copolímero P(AM-alt-E), se observan las bandas características del átomo de carbono correspondiente al grupo carbonilo del anhídrido maléico en 167,13 ppm y 167,76 ppm; y entre 130 ppm y 140 ppm las bandas correspondientes al anillo aromático de estireno.

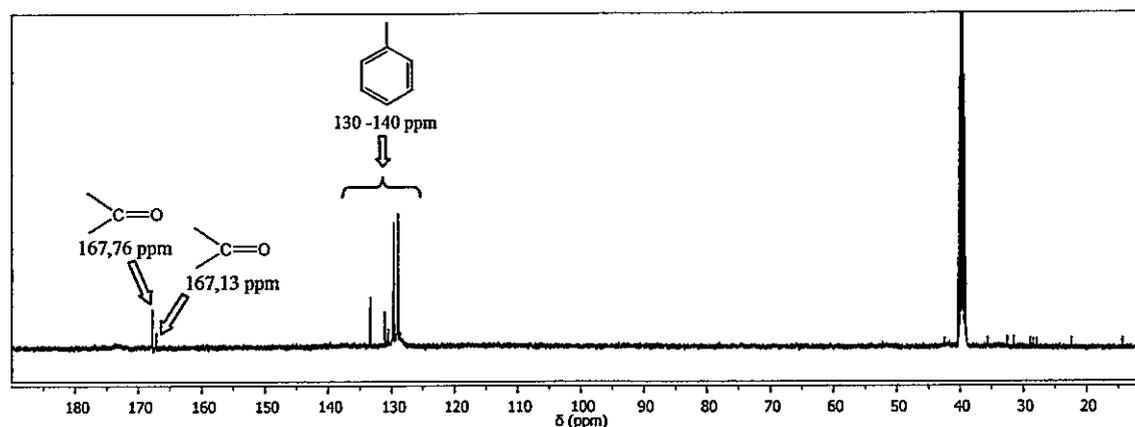


Figura 36: Espectro NMR-¹³C del copolímero P(AM-alt-E).

En los espectros NMR-¹³C del copolímero de *P-aminoazúcar* (Figura 37), se observan bandas desde 40 ppm a 120 ppm aproximadamente correspondientes a los átomos de carbono del aminoazúcar y una banda en 168 ppm, la que puede ser asignada al átomo de carbono del carbonilo del grupo amida o al átomo de carbono de los grupos carbonilos del anillo de anhídrido maléico sin modificar. Es complejo determinar a qué grupo funcional corresponde por la cercanía de estas bandas. Por otro lado, a pesar de que debiese aparecer una banda en 180 ppm, característica del átomo de carbono de los grupos carbonilos de ácidos carboxílicos provenientes de la apertura del anillo de anhídrido maléico, la presencia de este grupo se pudo observar a través de FT-IR.

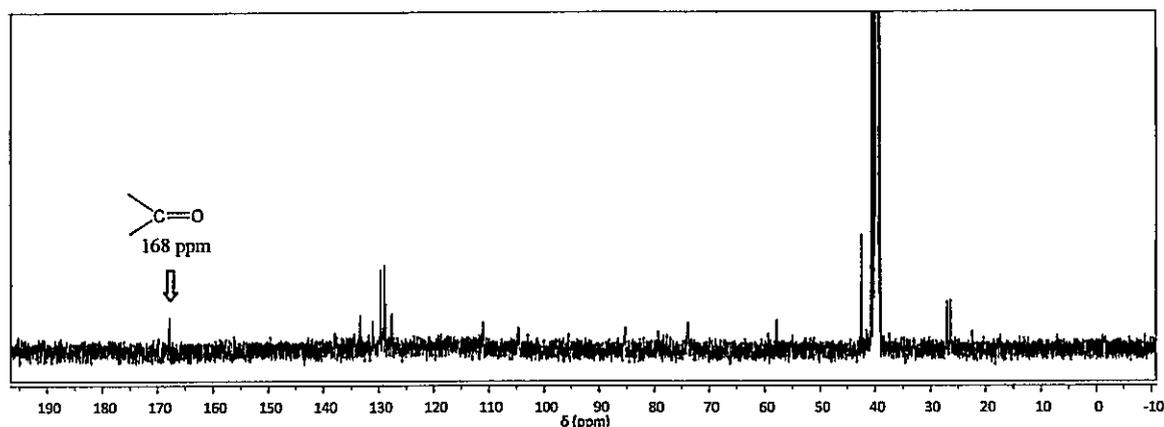


Figura 37: Espectro NMR-¹³C del copolímero P-Xil-f-(Iso)OH.

1.5.2 Caracterización molecular poli(4-vinilpiridina) N-alquil cuaternizada con bromuro de etilo y pentilo.

La caracterización molecular de poli(4-vinilpiridina) N-alquil cuaternizada con bromuro de etilo y pentilo fue realizada por Espectroscopía infrarrojo (Figura 38). Se observa la desaparición de la banda característica del anillo piridínico en 1600 cm^{-1} y la aparición de una banda en 1640 cm^{-1} correspondiente a la banda del anillo piridínico monosustituido. El grado de cuaternización fue obtenido a partir de la relación entre bandas del anillo piridínico y el anillo piridínico monosustituido, siendo un 98%.

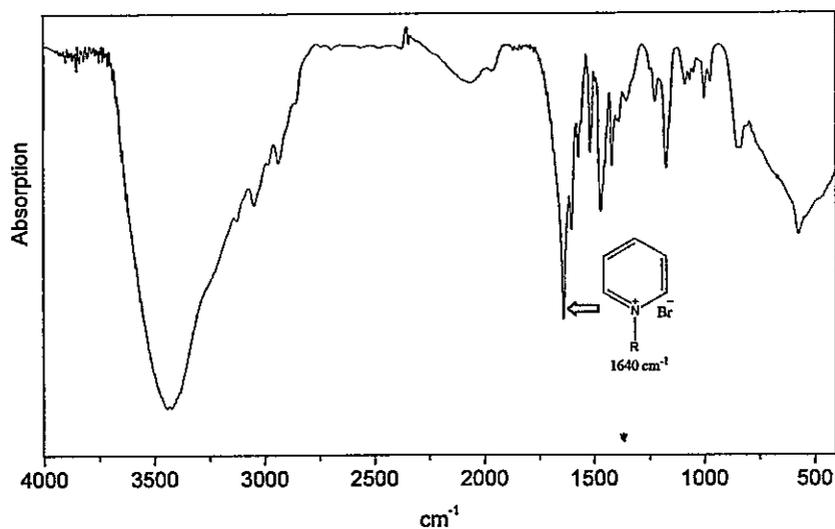


Figura 38: Espectro FT-IR poli(4-vinilpiridina) N-alkil cuaternizada.

1.5.3 Determinación de condiciones experimentales de trabajo para la construcción de multicapas.

Para la construcción de las películas de multicapas fue necesario establecer las condiciones experimentales de trabajo, como pH, concentración de sal utilizada o fuerza iónica y concentración de la solución de polielectrolito.

1.5.3.1 pH.

En relación al pH, todos los polielectrolitos derivados del copolímero P-*aminoazúcar* son solubles en un intervalo pequeño de pH. A $\text{pH} \leq 3,5$ y $\text{pH} \geq 4,5$ (Figura 39), la solución de polielectrolito es opalescente, lo que indicaría que el polielectrolito es insoluble en ese pH.

En consecuencia, el estudio y la construcción de las multicapas serán realizados a pH 4, pH en el que todos los sistemas de polielectrolitos P-*aminoazúcar* sintetizados son solubles.

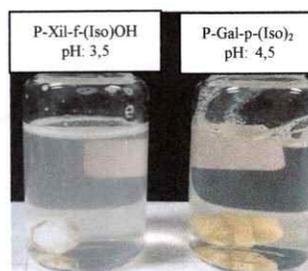


Figura 39: Efecto del pH. Disoluciones de copolímeros P-*aminoazúcar*.

En los espectros de NMR- ^1H y NMR- ^{13}C de los polielectrolitos P-*aminoazúcar* realizados después de 72 horas a una disolución a pH 4 y con distinta fuerza iónica, se observan las bandas característica de los grupos isopropilidenos. Esto indicaría que los polielectrolitos adsorbidos en la superficie contienen en su cadena lateral anillos de azúcares protegidos.

1.5.3.2 Concentración de sal adicionada y concentración de polielectrolito P-aminoazúcar.

Para obtener la concentración de sal adicionada y concentración de los copolímeros P-aminoazúcar que se utilizarán en la construcción de multicapas, se realizaron isotermas de adsorción a distinta concentración de sal adicionada, 0,1M y 0,001M de NaCl, variando la concentración de las disoluciones de polielectrolito copolímero P-aminoazúcar en un intervalo de 0,01g/L a 1,0g/L. En la Figura 40 se observan la gráficas de la cantidad adsorbida (Γ) versus la concentración de la disolución de dos polielectrolitos P-aminoazúcar, de alto y bajo peso molecular, a pH 4. Pevio a la adsorción de los copolímeros, el sustrato SiW fue modificado hidrofílicamente con grupos amino para igualar la naturaleza química del polielectrolito catiónico sobre el que es adsorbido el copolímero P-aminoazúcar.

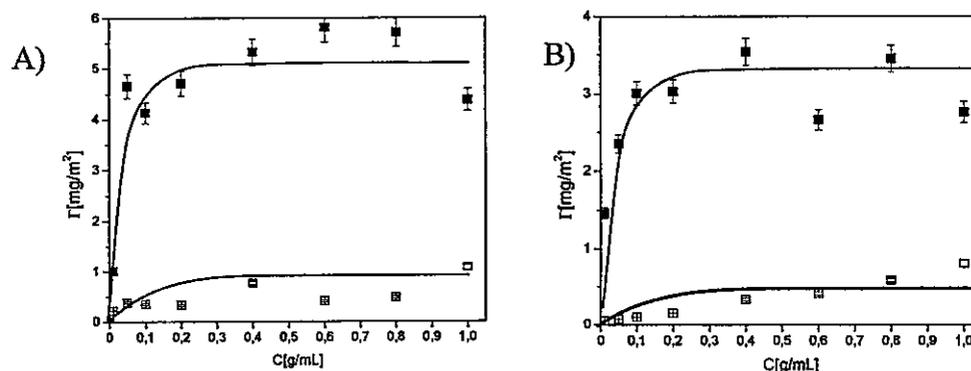


Figura 40: Cantidad adsorbida de polielectrolito P-aminoazúcar en función de la concentración de la solución, a diferente concentración de sal adicionada: 0,1M (■) y 0,001M (□) de NaCl. A) P₆₂-Gal-p-(Iso)₂ y B) P₃₂-Alo-f-(Iso)₂.

Se observa que a medida que aumenta la concentración de polielectrolitos copolímeros P-Gal-p-(Iso)₂ y P-Alo-f-(Iso)₂, aumenta la cantidad adsorbida de polielectrolito hasta alcanzar un *plateau*, en un intervalo de concentración entre los 0,05gmol⁻¹ y 0,1gmol⁻¹. En general, el proceso de adsorción de todos los polielectrolitos estudiados sobre una superficie sólida, puede ser descrito en tres etapas: la primera de ellas corresponde a la *difusión* de las cadenas de polielectrolito desde el seno de la disolución hacia la superficie, la segunda etapa corresponde a la *adhesión* de las cadenas a la superficie y finalmente la tercera etapa corresponde al *reordenamiento* de las cadenas poliméricas sobre la superficie.¹⁰¹

Para todos los polielectrolitos estudiados, la cantidad adsorbida aumenta a alta concentración de sal adicionada. Esto indica que estos polielectrolitos siguen un régimen de adsorción aumentado por apantallamiento, como ha sido descrito en la literatura.¹⁰² Las fuerzas predominantes de atracción entre el polielectrolito y la superficie son del tipo no electrostáticas, es decir, a una alta concentración de sal los contraiones apantallan las cargas presentes en el polielectrolito minimizando la repulsión electrostática entre segmentos de la cadena polimérica. Esto conduce a que el polielectrolito adopte conformación de espiral favoreciendo la formación de interacciones inter- e intra- moleculares, lo que deriva en la formación de agregados en solución. Estos agregados se encuentran en equilibrio con las cadenas libres de polielectrolitos que, debido al apantallamiento de sus cargas por la gran concentración de contraiones de la sal, se comportan como polímeros no cargados adoptando conformaciones de "*loop y tails*" incrementando la cantidad adsorbida en la superficie,

como se observa en la representación esquemática de la Figura 41.

Un comportamiento similar de adsorción fue observado en los polielectrolitos copolímeros P-Xil-f-(Iso)OH y P-Glu-f-Iso(OH)₂ a ambos pesos moleculares, como también en los polielectrolitos P₆₂-Alo-f-(Iso)₂ y P₃₂-Gal-p-(Iso)₂.

De acuerdo a los resultados obtenidos a partir de las isothermas de adsorción para cada polielectrolito, la concentración de los polielectrolitos copolímero *P-aminoazúcar* a utilizar en la construcción de las multicapas es de 1g/L, a una concentración de sal adicionada de 0,1 M de NaCl. La concentración del polielectrolito se obtuvo del *plateau* de la isoterma de adsorción y concentración de sal adicionada seleccionada, permitirá obtener una mayor cantidad adsorbida de polielectrolito sobre la superficie sólida.

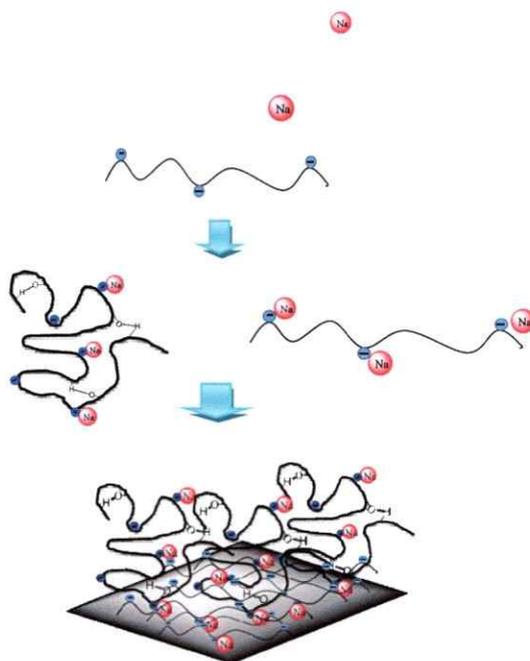


Figura 41: Representación esquemática del comportamiento de adsorción del polielectrolito copolímero *P-aminoazúcar*.

1.5.4 Construcción de multicapas.

1.5.4.1 Determinación del espesor de la cantidad adsorbida en el proceso de construcción de multicapas.

En la Figura 42 y Figura 43 se observa el espesor (Γ), en nanómetros, de la capa de polielectrolitos en función del número de capas depositadas sobre el sustrato de SiO_2 , donde la primera capa adsorbida corresponde a los polielectrolitos P4VPy- C_n seguida de los copolímeros P-Xil-f-(Iso)OH, P-Alo-f-(Iso) $_2$, P-Gal-p-(Iso) $_2$ y P-Glu-f-Iso(OH) $_2$ de ambos pesos moleculares.

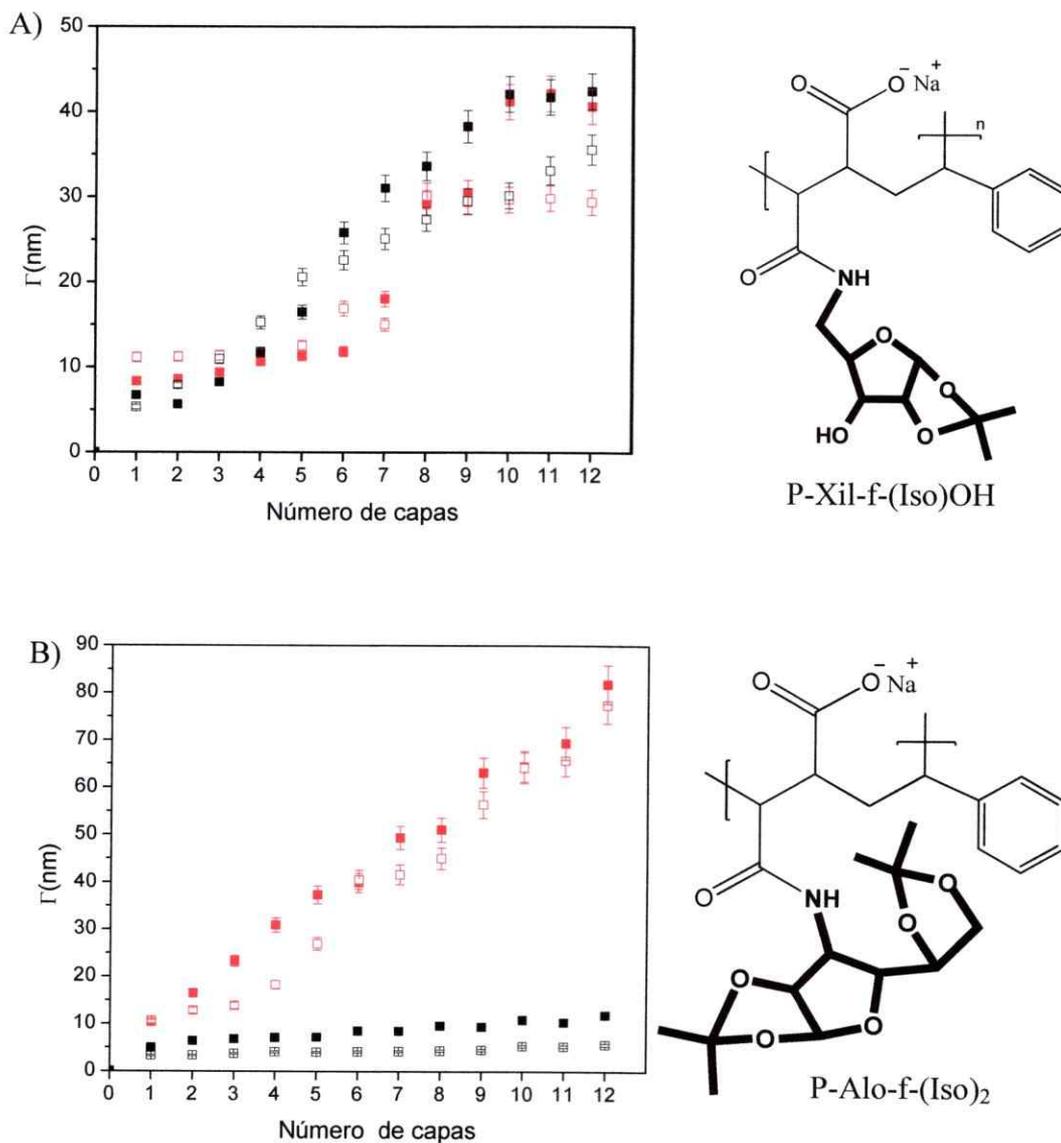


Figura 42: Espesor de las multicapas de polielectrolitos en función del número de capas depositadas de P₄VPy-C₂(■) y P₄VPy-C₅(□) con los polielectrolitos copolímero P-aminoazúcar a $M_V=6,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ (negro) y $M_V=3,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ (rojo).

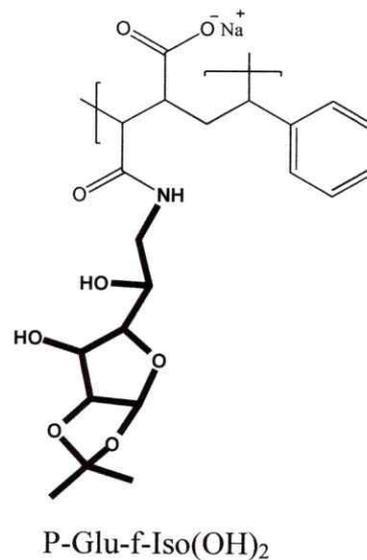
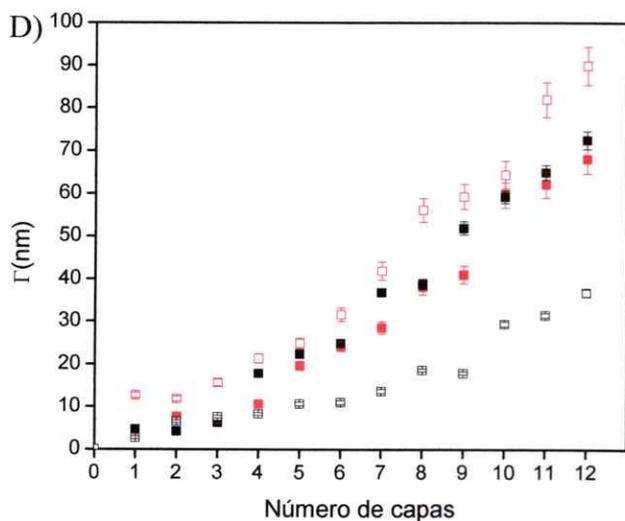
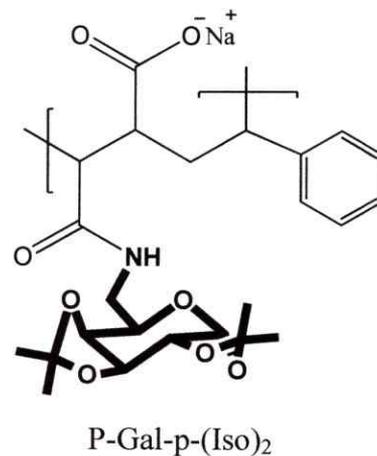
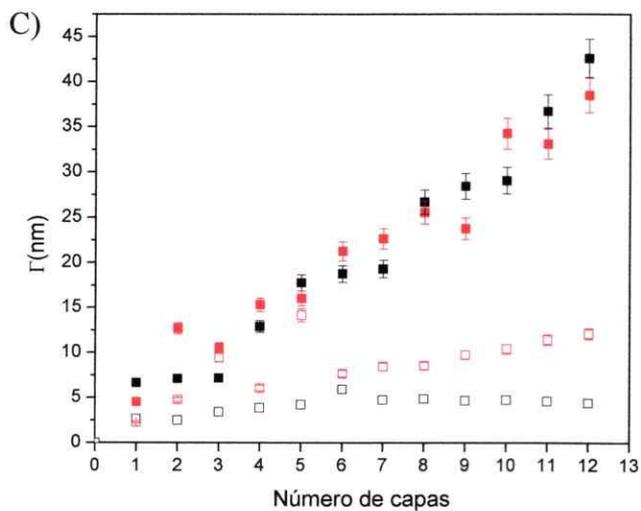


Figura 43: Espesor de las multicapas de polielectrolitos en función del número de capas depositadas de P₄VPy-C₂(■) y P₄VPy-C₅(□) con los polielectrolitos copolímero P-aminoazúcar a M_V=6,2x10⁴g mol⁻¹ (negro) y M_V=3,2x10⁴g mol⁻¹(rojo).

En la Figura 42 y en la Figura 43, se observa que las multicapas construidas con los polielectrolitos copolímeros P-Alo-f-(Iso)₂, P-Gal-p-(Iso)₂ y P-Glu-f-Iso(OH)₂ experimentan un *régimen regular de crecimiento*, es decir, el espesor aumenta regularmente al aumentar el número de capas. En este tipo de comportamiento, el polielectrolito en disolución se acopla solamente al otro polielectrolito que ya está adsorbido sobre el sustrato. Por otro lado, en las multicapas formadas por el polielectrolito copolímero P-Xil-f-(Iso)OH se observa que el espesor aumenta con el número de capas hasta alcanzar un *plateau*. Este comportamiento es probablemente consecuencia de un proceso de difusión de cadenas de polielectrolito presentes en la disolución hacia la capa de polielectrolito ya adsorbido y viceversa (Figura 44). Este proceso se debe a que las interacciones electrostáticas entre los polielectrolitos de carga opuesta no son las únicas responsables del crecimiento regular de las multicapas. También son importantes interacciones de van der Waals, interacciones hidrofóbicas y catión- π . La presencia de estas interacciones resulta ventajosa porque contribuye a la obtención de superficies heterogéneas con presencia de regiones que contienen ambos tipos de polielectrolitos. Así, la obtención de multicapas podría ser independiente del intervalo de pH de trabajo. Un comportamiento similar se ha observado en la construcción de multicapas formadas por poli(lisina)/poli(alginato de sodio), poli(ácido hialurónico)/poli(L-ácido glutámico), quitosano/ácido hialurónico, poli(ácido hialurónico)/ poli(L-ácido glutámico).¹⁰³

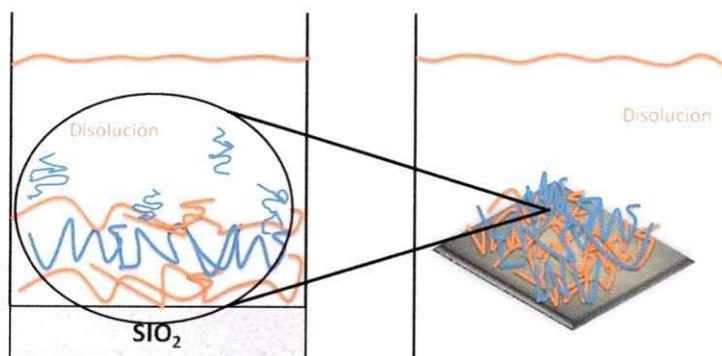


Figura 44: Representación del proceso de difusión de cadenas cortas de polielectrolito desde la capa ya adsorbida hacia la disolución y viceversa.

A ambos pesos moleculares del copolímero *P-aminoazúcar*, se observa que las multicapas formadas por el polielectrolito copolímero $P\text{-Glu-f-Iso(OH)}_2$ con $P4VPy\text{-C}_2$ y $P4VPy\text{-C}_5$ poseen mayor espesor y las multicapas con menor espesor se obtienen utilizando el polielectrolito copolímero $P\text{-Gal-p-(Iso)}_2$ con $P4VPy\text{-C}_2$ y $P4VPy\text{-C}_5$. Esto se podría explicar en términos de la conformación que estos polielectrolitos pueden adoptar en disolución, comportamiento influenciado por el sustituyente de la cadena lateral del copolímero *P-aminoazúcar*.

En el caso del polielectrolito copolímero $P\text{-Glu-f-Iso(OH)}_2$, es posible una mayor formación de interacciones intra- e intermoleculares en comparación a los demás aminoazúcares, debido a que los grupos funcionales del anillo de glucofuranoza parcialmente protegido de la cadena lateral pueden interactuar con los grupos de la cadena principal del copolímero *P-aminoazúcar*.

La formación de este tipo de interacciones favorece una conformación ovillada del polielectrolito que podría mantenerse en el estado adsorbido. Esta conformación podría verse favorecida por el apantallamiento de cargas del polielectrolito por los contraiones sodio en disolución. Como consecuencia de esto, aumenta el espesor.

Por otro lado, el polielectrolito copolímero P-Gal-p-(Iso)₂, posee en su cadena lateral un derivado de galactopiranososa con grupos hidroxilos protegidos, por lo que la posibilidad de formar interacciones intramoleculares disminuirá la formación de agregados poliméricos (Figura 45).

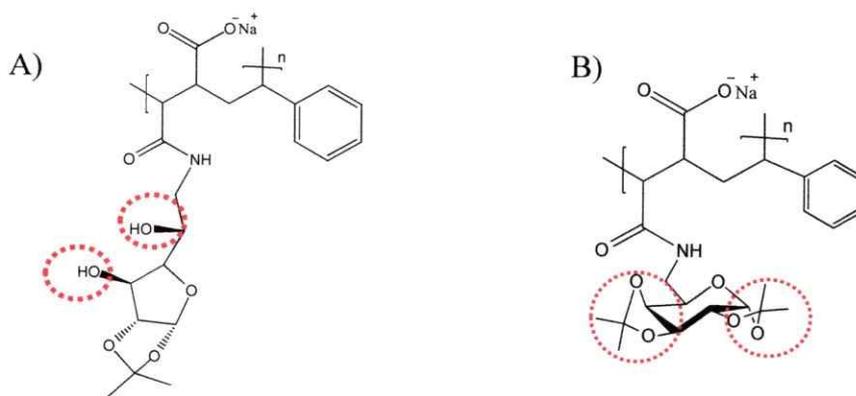


Figura 45: Grupos funcionales para formar interacciones intra- e inter- moleculares en polielectrolitos aniónicos. A) P-Glu-f-Iso(OH)₂, en su cadena lateral posee un anillo de glucofuranosa parcialmente protegido con dos grupos hidroxilos y B) P-Gal-p-(Iso)₂, en su cadena lateral posee un anillo de galactopiranososa completamente protegido.

Se observa una influencia del largo de la cadena alquílica de la P4VPy-C_n. Existe un mayor espesor cuando la P4VPy-C_n posee cadena etílica en comparación a las

multicapas formadas por P4VPy-C₅, a excepción de las multicapas construidas con los polielectrolitos copolímeros P-Glu-f-Iso(OH)₂, a ambos pesos moleculares.

Este comportamiento puede explicarse en relación a la orientación que adoptan las cadenas laterales del polielectrolito P4VPy-C₂ adsorbido sobre el sustrato como también sobre las capas de polímeros ya adsorbidas. Si el sistema polimérico durante el proceso de adsorción orienta su cadena principal hacia el aire y el anillo piridínico, junto con la cadena lateral, hacia el sustrato, debería producirse un aumento del área ocupada por este sistema y, por lo tanto, un mayor espesor (Figura 46).

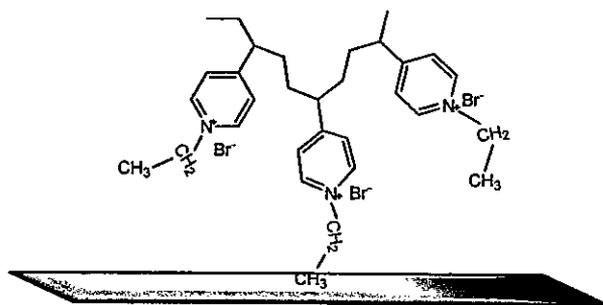


Figura 46: Orientación de cadenas alquílicas de P4VPy-C_n al adsorberse sobre el sustrato (SiW).

Se observa un efecto del peso molecular en el espesor, ya que en general los polielectrolitos de menor peso molecular generan multicapas con mayor espesor, situación que es más evidente en las multicapas formadas por el polielectrolito P₃₂-Alo-f-(Iso)₂.

Similar comportamiento fue encontrado en polielectrolitos de alto peso molecular. Esto puede estar determinado por la polidispersidad del polielectrolito a mayor peso molecular, produciéndose un crecimiento no regular de las multicapas debido a un proceso alternado de adsorción y desorción donde las cadenas de menor peso molecular son reemplazadas progresivamente por las de mayor peso molecular, disminuyendo el espesor de la multicapa.¹⁰⁴

1.5.4.2 Determinación de la absorbancia en el proceso de construcción de multicapas

El proceso de construcción de las multicapas para los polielectrolitos copolímeros P-Xil-f-(Iso)OH, P-Alo-f-(Iso)₂, P-Gal-p-(Iso)₂ y P-Glu-f-Iso(OH)₂ con P4VPy-C₅ y P4VPy-C₂ también fue monitoreado por espectrofotometría UV-Visible, este estudio es complementario a los estudios realizados por elipsometría. La Figura 47 y Figura 48 muestran los gráficos de absorbancia en función del número de capas adsorbidas.

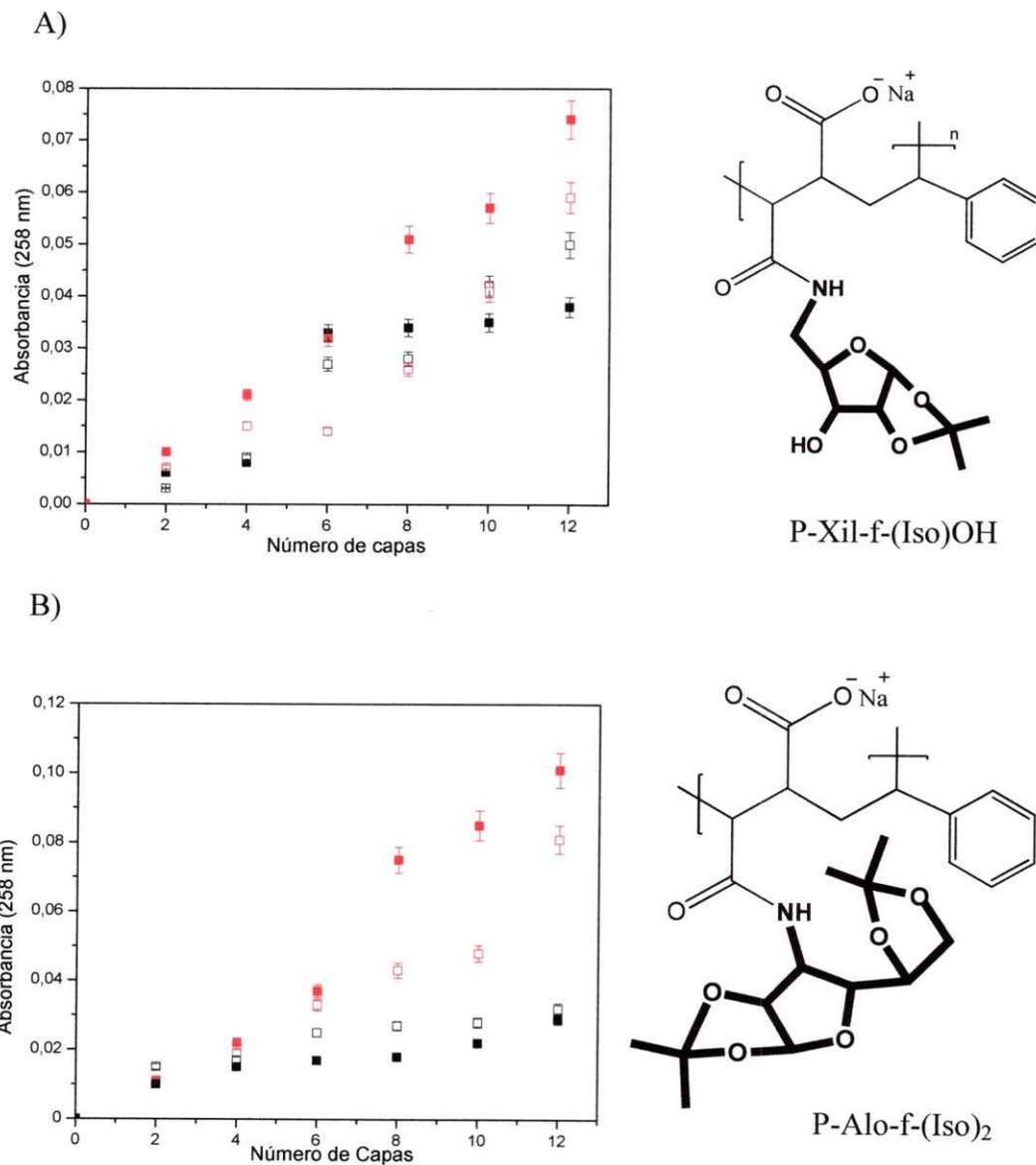


Figura 47: Valores de absorbancia a medida que aumenta el número de capas formadas en las multicapas formadas por P4VPy-C₂(■) y P4VPy-C₅(□) con los polielectrolitos de copolímero P-aminoazúcar a $M_v=6,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ (negro) y $M_v=3,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ (rojo).

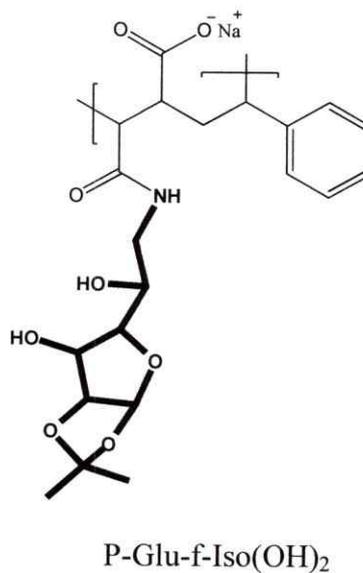
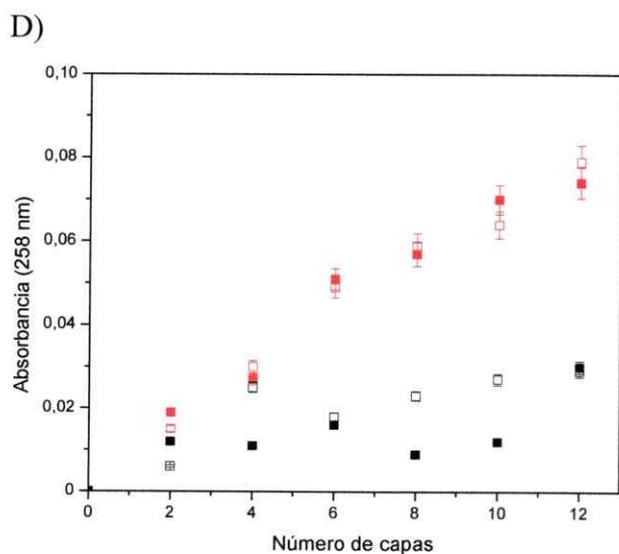
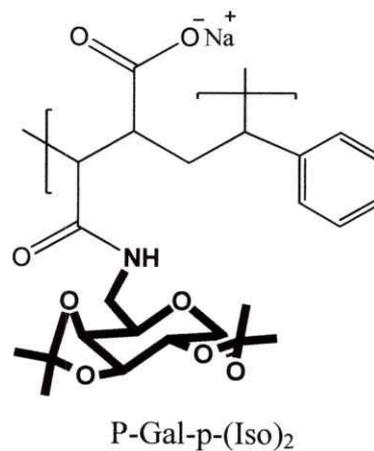
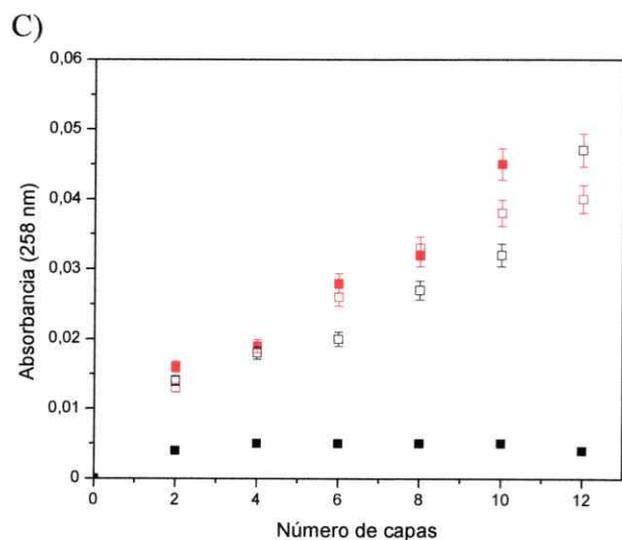


Figura 48: Valores de absorbancia a medida que aumenta el número de capas en las multicapas formadas por P4VPy-C₂(■) y P4VPy-C₅(□) con los polielectrolitos de copolímero P-aminoazúcar a M_v=6,2x10⁴ g mol⁻¹ (negro) y M_v=3,2x10⁴ g mol⁻¹ (rojo).

Se observa que al aumentar el número de capas la absorbancia aumenta proporcionalmente tanto a un alto como bajo peso molecular del polielectrolito copolímero *P-aminoazúcar* (Figura 47 y Figura 48), a una longitud de onda fija de 258 nm, longitud de onda a la que absorbe el grupo carbonilo resultante de la apertura del anillo de anhídrido maléico en el polielectrolito copolímero P(AM-alt-E) modificado.

Este resultado concuerda con lo esperado, ya que al aumentar la cantidad adsorbida la absorbancia es acumulativa, comprobando que las capas de polielectrolito están siendo adsorbidas en el sustrato y sobre el polielectrolito ya adsorbido.

Los resultados obtenidos están de acuerdo con el comportamiento observado por métodos de determinación ópticos (elipsométricos), observándose un efecto del largo de la cadena alquílica de la P4VPy-C_n y un efecto del peso molecular de los copolímero *P-aminoazúcar* en los valores de absorbancia obtenidos.

Se observa un efecto de la naturaleza de la cadena lateral, ya que las multicapas formadas por el polielectrolito copolímero P-Xil-f-(Iso)OH, que posee en su cadena lateral un derivado de xilofuranosa parcialmente protegido, presentan mayores valores de absorbancia y las multicapas formadas por el polielectrolito copolímero P-Gal-p-(Iso)₂, que posee en su cadena lateral un derivado de galactopiranososa completamente protegido, presentan menores valores de absorbancia.

También, se encontró una influencia del largo de la cadena alquílica del polielectrolito P4VPy-C_n. Las multicapas formadas por los polielectrolitos copolímeros P₆₂-*aminoazúcar* con P4VPy-C₅ poseen mayores valores de adsorbancia. Respecto a los sistemas formados por los derivados del copolímero P₃₂-*aminoazúcar* y P4VPy-C_n, se

observa una mayor absorbancia cuando la multicapa es formada utilizando P4VPy-C_n con cadena etílica, a excepción de aquellas multicapas formadas por el sistema polimérico P-Glu-f-Iso(OH)₂, sin embargo la diferencia entre valores es mínima.

Si se comparan los valores obtenidos para todos las multicapas de diferente peso molecular del polielectrolito copolímero P-*aminoazúcar*, se observa que mientras menor es el peso molecular de este, mayores son los valores de absorbancia obtenidos.

Estos resultados son similares a los obtenidos mediante elipsometría, donde mientras menor es el peso molecular del copolímero P-*aminoazúcar*, mayor es el espesor.

1.5.4.3 Determinación de la humectabilidad.

La humectabilidad las diferentes multicapas obtenidas fue determinada a través del ángulo de contacto de avance (θ_A), ya que el ángulo de contacto indica cuan fílicas o fóbicas son las moléculas de la superficie de la multicapa al solvente que se está utilizando. Esto a su vez, permitió determinar el grado de hidrofobicidad/hidrofilicidad de las multicapas. También se determinó el ángulo de retroceso (θ_R), y mediante la expresión de la ecuación (5) se obtuvo el ángulo de histéresis (θ_H) para cada multicapa, lo que permite conocer cuan homogénea o heterogénea es la superficie químicamente.

Tabla 15: Ángulo de contacto de avance (θ_A), retroceso (θ_R) e histéresis (θ_H) de las multicapas formadas por los sistemas P_{62} -aminoazúcar con P4VPy-C₅ y P4VPy-C₂.

Poliectrolitos		θ_A [°]	θ_R [°]	θ_H [°]
Aniónico	Catiónico			
P_{62} -Xil-f-(Iso)OH	P4VPy-C ₅	56±3	48±3	8±0
	P4VPy-C ₂	42±8	38±4	4±4
P_{62} -Alo-f-(Iso) ₂	P4VPy-C ₅	63±2	38±2	25±2
	P4VPy-C ₂	36±2	21±2	15±12
P_{62} -Gal-p-(Iso) ₂	P4VPy-C ₅	46±3	25±3	18±5
	P4VPy-C ₂	67±3	34±1	32±4
P_{62} -Glu-f-Iso(OH) ₂	P4VPy-C ₅	51±2	40±0	10±3
	P4VPy-C ₂	68±3	43±3	22±6

*Sustrato sin modificar $\theta_A=10^\circ$

En la 0y 0se observa que el ángulo de contacto de las multicapas construidas incrementa en comparación al del sustrato desnudo (10°). Las multicapas construidas poseen más bien un balance hidrofílico/hidrofóbico, donde el ángulo de contacto varía entre 36° y 71°. Esto sugiere que la superficie de la capa que queda en contacto con el aire está formada por grupos funcionales hidrofóbicos e hidrofílicos, lo que está de acuerdo con los altos valores de ángulo de histéresis.

La multicapa que presenta un mayor carácter hidrofílico es la formada por los polielectrolitos P_{62} -Alo-f-(Iso)₂/P4VPy-C₂ con un ángulo de contacto de 36° y la multicapa con un mayor carácter hidrofóbico es la construida con los polielectrolitos P_{32} -Xil-f-(Iso)OH/P4VPy-C₂ con un ángulo de contacto de 71° (Figura 49). Estos resultados muestran que mientras menor sea el tamaño del grupo de la cadena lateral del polielectrolito las interacciones intramoleculares serán favorecidas, disminuyendo la

humectabilidad de la multicapa por menor disponibilidad en la superficie de grupos funcionales.

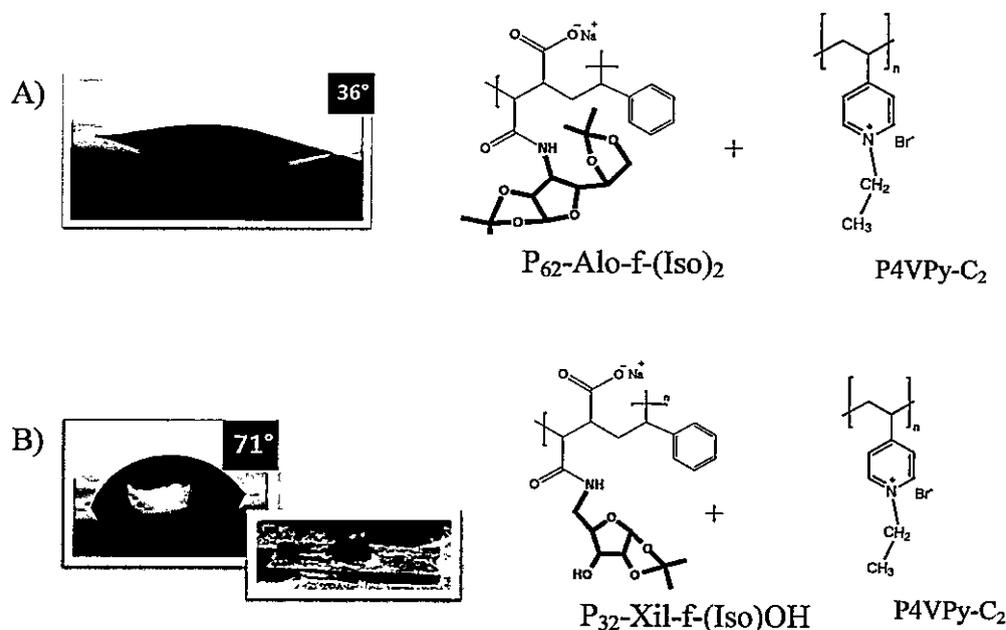


Figura 49: Imágenes obtenidas en el proceso de medición del ángulo de contacto: A) Multicapa $P_{62}\text{-Alo-f-(Iso)}_2/P_{4VPy}\text{-C}_2$ y B) Multicapa $P_{32}\text{-Xil-f-(Iso)OH}/P_{4VPy}\text{-C}_2$.

En la Tabla 15 y Tabla 16 se observa una influencia del largo de la cadena alquílica del polielectrolito $P_{4VPy}\text{-C}_n$ en el grado de humectabilidad de las multicapas, teniendo mayor humectabilidad las multicapas formadas por $P_{4VPy}\text{-C}_2$, a excepción de las multicapas formadas por los copolímeros $P_{32}\text{-Alo-f-(Iso)}_2$, $P_{62}\text{-Alo-f-(Iso)}_2$ y $P_{62}\text{-Xil-f-(Iso)OH}$. Este comportamiento podría ser explicado en términos de la conformación que el polielectrolito $P_{4VPy}\text{-C}_2$ adopta en la superficie, exponiendo sus cargas positivas hacia el aire. Además, se observa que hay una variación en la humectabilidad de las

multicapas formadas por el polielectrolito P4VPy-C₅ al variar el peso molecular del copolímero P-*aminoazúcar*, a excepción de las multicapas formadas por el copolímero P-Alo-f-(Iso)₂.

Por otro lado, la multicapa que presenta mayor histéresis es la formada por los polielectrolitos P₆₂-Gal-p-(Iso)₂/P4VPy-C₂, a ambos pesos moleculares, lo que se traduce en una multicapa con una superficie con mayor heterogeneidad química en comparación a las demás. Las multicapas con menor histéresis son aquellas formadas por el polielectrolito copolímero P₆₂-Xil-f-(Iso)OH/P4VPy-C₂, a ambos pesos moleculares, esto se traduce en una multicapa con una superficie menos heterogénea químicamente. Esto se puede explicar a razón de la distribución de los grupos laterales en la cadena principal del polielectrolito dada por la modificación del copolímero

Tabla 16: Ángulo de contacto de avance (θ_A), retroceso (θ_R) e histéresis (θ_H) de las multicapas formadas por los sistemas P₃₂-*aminoazúcar* con P4VPy-C₅ y P4VPy-C₂.

Polielectrolitos		θ_A [°]	θ_R [°]	θ_H [°]
Aniónico	Catiónico			
P ₃₂ -Xil-f-(Iso)OH	P4VPy-C ₅	60±2	53±1	7±3
	P4VPy-C ₂	71±1	62±3	9±2
P ₃₂ -Alo-f-(Iso) ₂	P4VPy-C ₅	50±5	23±8	27±4
	P4VPy-C ₂	40±2	27±2	13±0
P ₃₂ -Gal-p-(Iso) ₂	P4VPy-C ₅	44±1	22±1	21±2
	P4VPy-C ₂	70±0	41±1	29±1
P ₃₂ -Glu-f-Iso(OH) ₂	P4VPy-C ₅	48±4	33±1	15±3
	P4VPy-C ₂	50±1	37±3	12±4

*Sustrato sin modificar $\theta_A=10^\circ$.

En la Tabla 15 y Tabla 16 se observa una variación entre 5° a 10° en los valores de histéresis obtenidos al variar el peso molecular del polielectrolito copolímero P-*aminoazúcar*. Esta variación no es significativa a excepción de las multicapas formadas por P-Glu-f-Iso(OH)₂/P4VPy-C₂, esto se podría deber a que a mayor peso molecular mayor es la agregación del polielectrolito copolímero P-Glu-f-Iso(OH)₂, lo que estaría directamente relacionado con las interacciones intra- e intermoleculares del copolímero.

Al variar el largo de la cadena alquílica del polielectrolito P4VPy-C_n entre etil y pentil los valores de histéresis varían entre 4° y 12°. Esto podría ser explicado en términos de la orientación espacial que la cadena lateral de P4VPy-C_n adopte en la interface.

1.5.4.4 Determinación de la energía superficial.

En la Tabla 17 y Tabla 18, se presentan los valores obtenidos en la medición de ángulo de contacto de dos solventes sobre las multicapas construidas con los polielectrolitos P4VPy-C₅ y P4VPy-C₂ y con los polielectrolitos copolímero P-Xil-f-(Iso)OH, P-Alo-f-(Iso)₂, P-Gal-p-(Iso)₂ y P-Glu-f-Iso(OH)₂, de peso molecular de $M_v=6,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ y $3,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$. A partir de estos valores y utilizando las ecuaciones (6) y (7), se obtuvo la energía superficial correspondiente a cada multicapa. En literatura, se ha relacionado propiedades de adhesión y proliferación celular con la energía superficial, donde algunos estudios demostraron que superficies con valores altos de energía superficial, promovían una mayor cantidad de células adheridas, lo que

se puede extender a la adhesión de bacterias sobre una superficie sólida.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

Tabla 17: Ángulo de contacto (θ) y energía superficial (γ^{total}) de las multicapas construidas con los polielectrolitos P_{62} -aminoazúcar con P4VPy-C₅ y P4VPy-C₂.

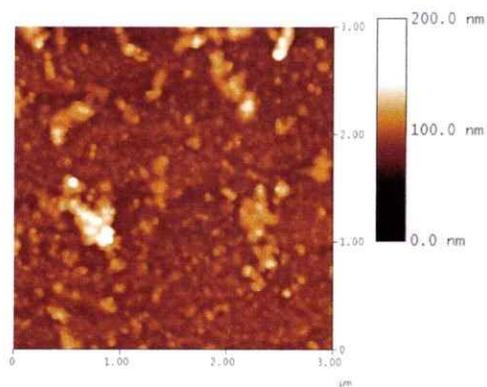
Polielectrolito		θ_{H_2O}	$\theta_{CH_2I_2}$	γ_s^p	γ_s^d	γ^{total}
Aniónico	Catiónico	[°]	[°]	[mJm ⁻²]	[mJm ⁻²]	[mJm ⁻²]
P_{62} -Xil-f-(Iso)OH	P4VPy-C ₅	59±3	46±1	14±2	37±0	51±2
	P4VPy-C ₂	50±8	46±0	20±5	37±0	57±5
P_{62} -Alo-f-(Iso) ₂	P4VPy-C ₅	65±2	37±8	10±1	41±4	51±3
	P4VPy-C ₂	38±2	29±1	23±5	45±1	68±6
P_{62} -Gal-p-(Iso) ₂	P4VPy-C ₅	49±3	28±1	17±1	45±0	62±1
	P4VPy-C ₂	70±3	33±4	7±2	43±2	50±0
P_{62} -Glu-f-Iso(OH) ₂	P4VPy-C ₅	53±2	44±3	17±1	38±1	55±2
	P4VPy-C ₂	68±3	46±3	10±2	36±1	46±3

En la Tabla 17, se observa que los valores de energía superficial obtenidos para las multicapas formadas por el copolímero P_{62} -aminoazúcar con P4VPy-C₂ y P4VPy-C₅ se encuentran en un intervalo de 46 mJm⁻² y 68 mJm⁻². Lo mismo se observa en las multicapas formadas por el copolímero P_{32} -aminoazúcar, donde los valores de energía superficial varían entre los 46 mJm⁻² y los 63 mJm⁻² (Tabla 18). Por lo tanto, las multicapas muestran un general bajos valores de energía superficial, es decir, poca capacidad de interactuar con otras moléculas.

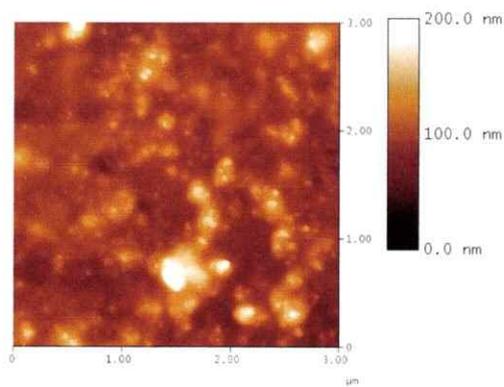
1.5.4.5 Morfología y topografía de las multicapas.

En la Figura 50, Figura 51, Figura 52 y Figura 53, se observan las imágenes obtenidas mediante microscopía de fuerza atómica de la superficie de las multicapas construidas utilizando P4VPy-C_n con bromuro de etilo y pentilo y el copolímero P-*aminoazúcar* ($M_v = 6,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ y $3,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$).

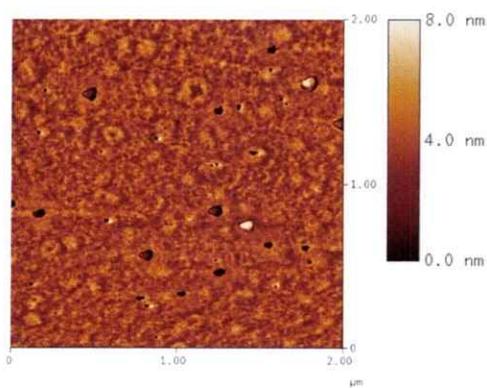
En la Figura 50 y Figura 51, se observa que las multicapas construidas con los polielectrolitos copolímeros P₆₂-*aminoazúcar* y P4VPy-C₅ y P4VPy-C₂, poseen en la superficie una mezcla de ambos polielectrolitos, con una morfología homogénea con algunos agregados esféricos, los que se observan en mayor cantidad en las multicapas formadas por el polielectrolito copolímero P₆₂-Glu-f-Iso(OH)₂, que posee en su cadena lateral un derivado glucofuranosa parcialmente protegido (Figura 50G y Figura 50H) formando interacciones intra- e inter moleculares en disolución adsorbiéndose como agregados.



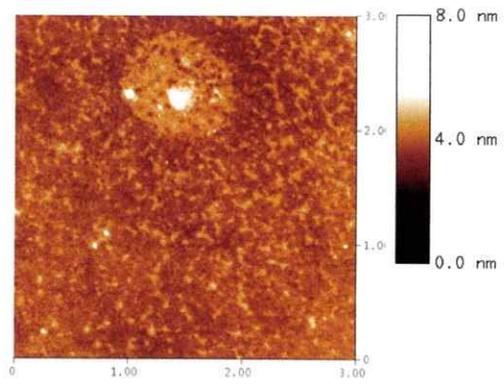
P₆₂-Xil-f-(Iso)OH/P4Vpy-C₅



P₆₂-Xil-f-(Iso)OH/P4Vpy-C₂

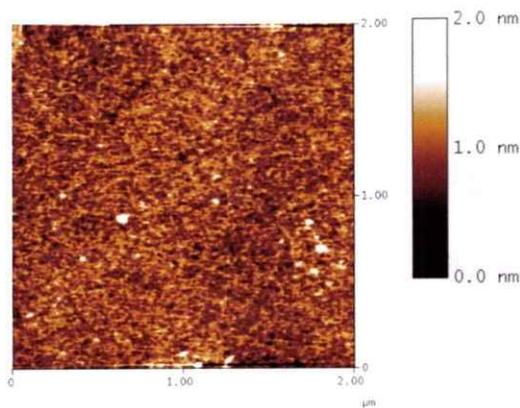


P₆₂-Alo-f-(Iso)₂/P4Vpy-C₅

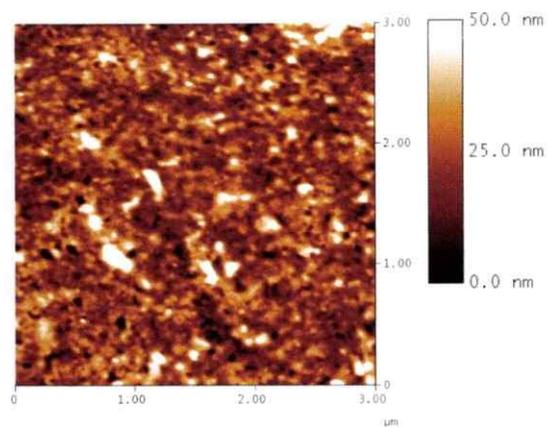


P₆₂-Alo-f-(Iso)₂/P4Vpy-C₅

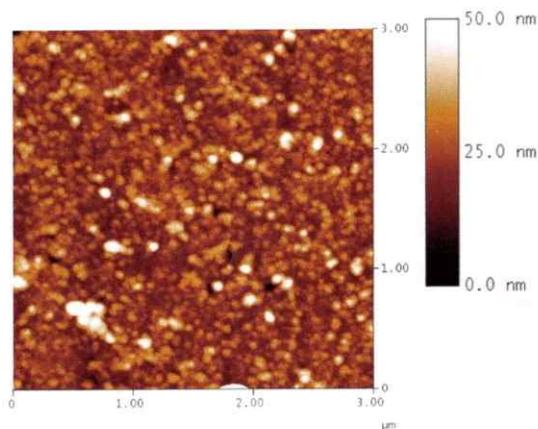
Figura 50: Imágenes de altura obtenidas mediante Microscopía de Fuerza Atómica de las multicapas formadas por P₆₂-Xil-f-(Iso)OH y P₆₂-Alo-f-(Iso)₂ con P4Vpy-C_n.



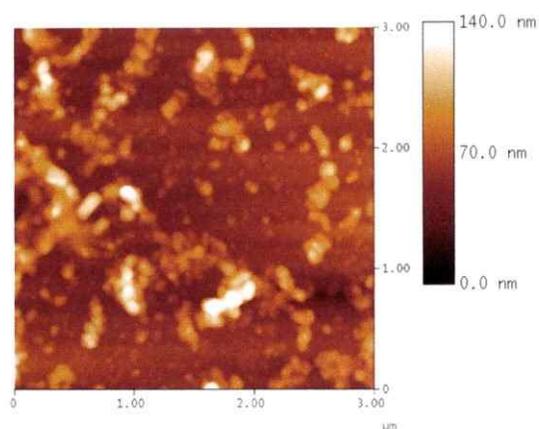
P₆₂-Gal-p-(Iso)₂/P4Vpy-C₅



P₆₂-Gal-p-(Iso)₂/P4Vpy-C₂



P₆₂-Glu-f-Iso(OH)₂/P4Vpy-C₅



P₆₂-Glu-f-Iso(OH)₂/P4Vpy-C₂

Figura 51: Imágenes de altura obtenidas mediante Microscopía de Fuerza Atómica de las multicapas formadas por P₆₂-Gal-p-(Iso)₂ y P₆₂-Glu-f-Iso(OH)₂ con P4Vpy-C_n.

Tabla 19: Valores de RMS obtenidos para las multicapas P₆₂-Xil-f-(Iso)OH, P₆₂-Alo-f-(Iso)₂, P₆₂-Gal-p-(Iso)₂ y P₆₂-Glu-f-Iso(OH)₂ con P4VPy-C_n.

Poliectrolito		RMS
Aniónico	Catiónico	[nm]
P ₆₂ -Xil-f-(Iso)OH	P4VPy-C ₅	11,40
	P4VPy-C ₂	11,51
P ₆₂ -Alo-f-(Iso) ₂	P4VPy-C ₅	0,55
	P4VPy-C ₂	0,72
P ₆₂ -Gal-p-(Iso) ₂	P4VPy-C ₅	0,35
	P4VPy-C ₂	10,21
P ₆₂ -Glu-f-Iso(OH) ₂	P4VPy-C ₅	6,91
	P4VPy-C ₂	13,10

Los valores de RMS (Tabla 19) muestran una gran diferencia en la rugosidad de las multicapas formadas por los polielectrolitos copolímeros P₆₂-Xil-f-(Iso)OH, P₆₂-Gal-p-(Iso)₂ y P₆₂-Glu-f-Iso(OH)₂, con P4VPy-C₂, cuyos valores de RMS son 11,51 nm, 10,21 nm y 13,10 nm, respectivamente, en relación a las multicapas formadas con el polielectrolito copolímero P₆₂-Alo-f-(Iso)₂ con P4VPy-C₂, cuyo valor corresponde 0,72 nm. En el caso de las multicapas formadas con P4VPy-C₅, los valores de RMS muestran mayor diferencia de rugosidad entre las multicapas formadas por P₆₂-Xil-f-(Iso)OH y P₆₂-Glu-f-Iso(OH)₂, cuyos valores son 11,40 nm y 6,91 nm, respectivamente; en comparación con los polielectrolitos copolímero P₆₂-Alo-f-(Iso)₂ y P₆₂-Gal-p-(Iso)₂, cuyos valores de rugosidad son 0,55 nm y 0,35 nm, respectivamente. Por otro lado, las multicapas formadas por P4VPy-C₂ poseen una rugosidad mayor comparada con las multicapas formadas por el polielectrolito P4VPy-C₅.

Se observó igual tendencia en las multicapas formadas por el polielectrolito copolímero P_{32} -aminoazúcar (Figura 52 y Figura 53), donde se distinguen ambos polielectrolitos en la superficie de la multicapa, siendo esta homogénea en su morfología. Se acentúa la formación de agregados esféricos, los que están nuevamente en mayor cantidad en las multicapas formada por el polielectrolito copolímero P_{32} -Glu-f-Iso(OH)₂.

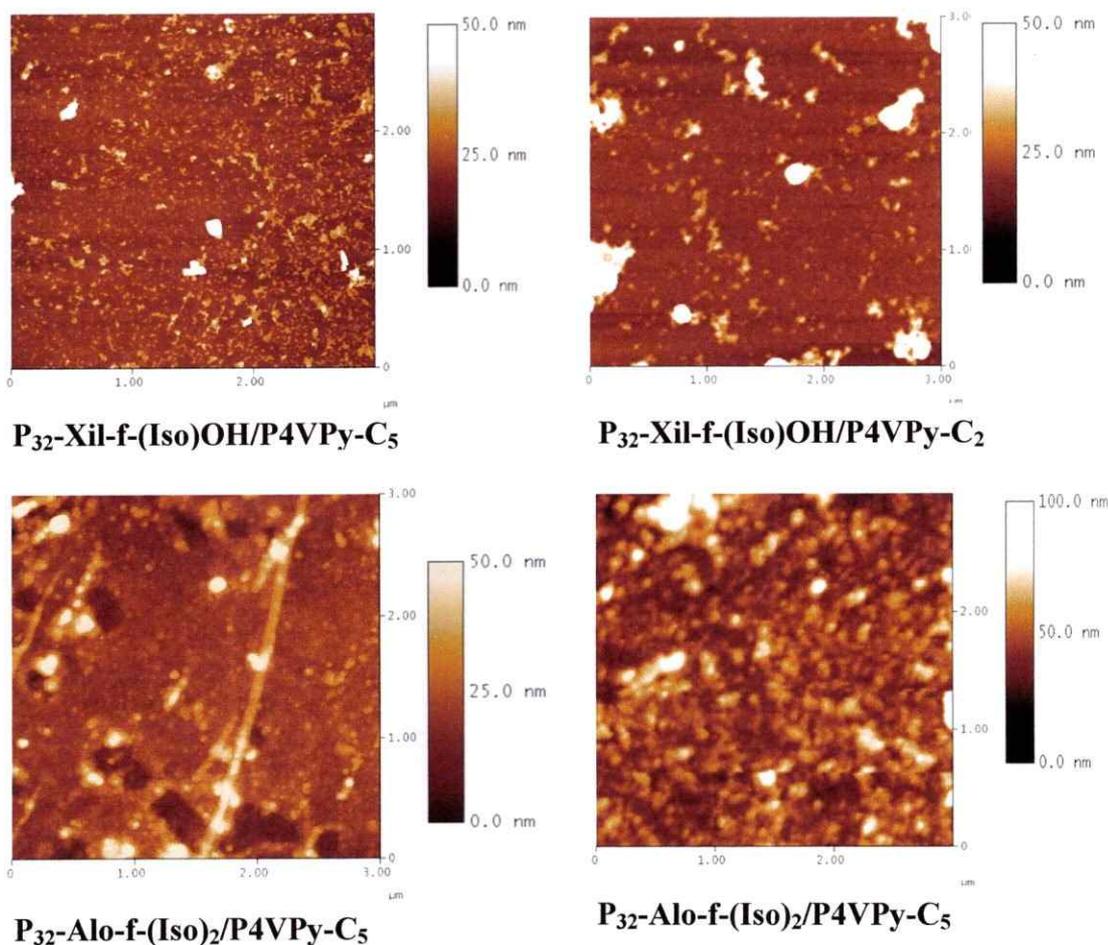


Figura 52: Imágenes de altura obtenidas mediante Microscopía de Fuerza Atómica de P_{32} -Xil-f-(Iso)OH y P_{32} -Alo-f-(Iso)₂ con P4VPy-C_n.

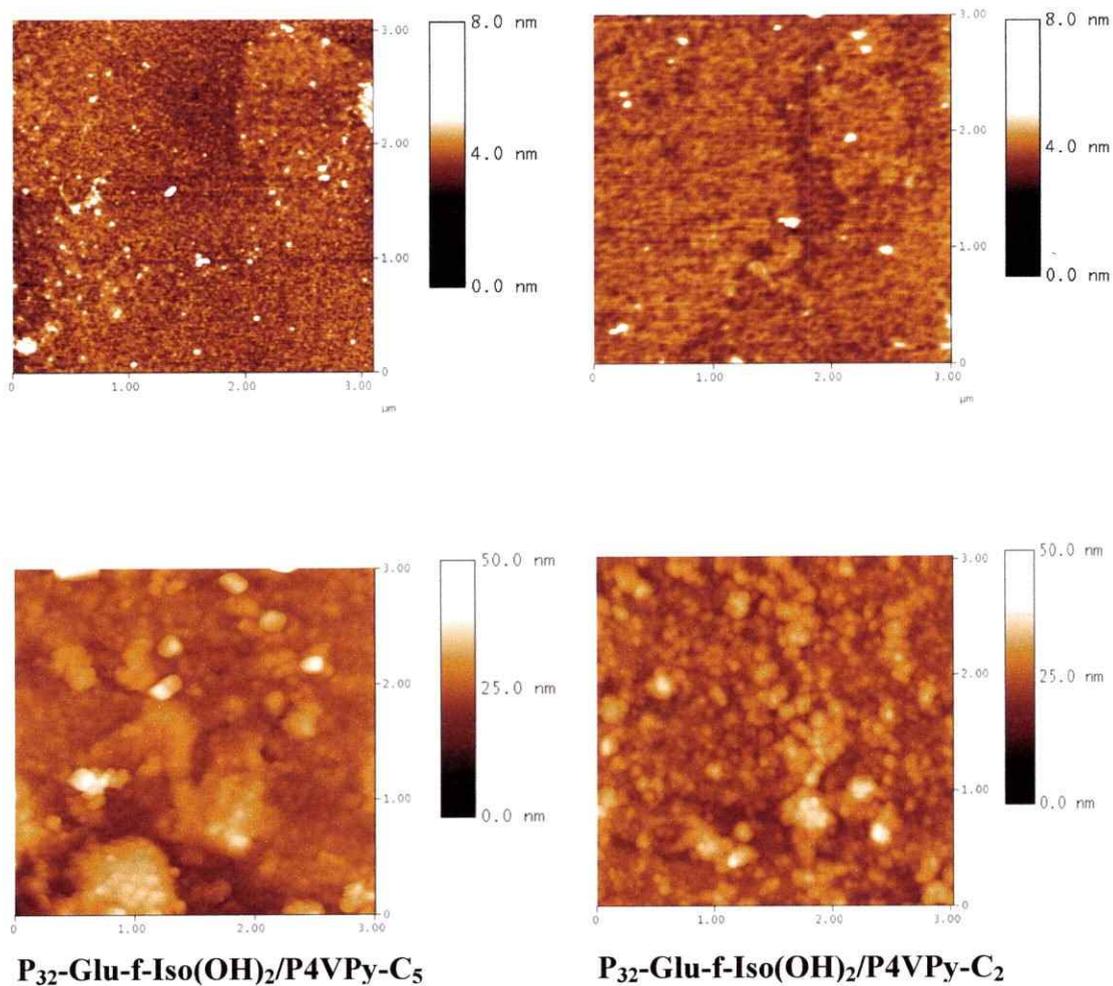


Figura 53: Imágenes obtenidas de altura mediante Microscopía de Fuerza Atómica de las multicapas formadas por P₃₂-Gal-p-(Iso)₂ y P₃₂-Glu-f-Iso(OH)₂ con P4VPy-C_n.

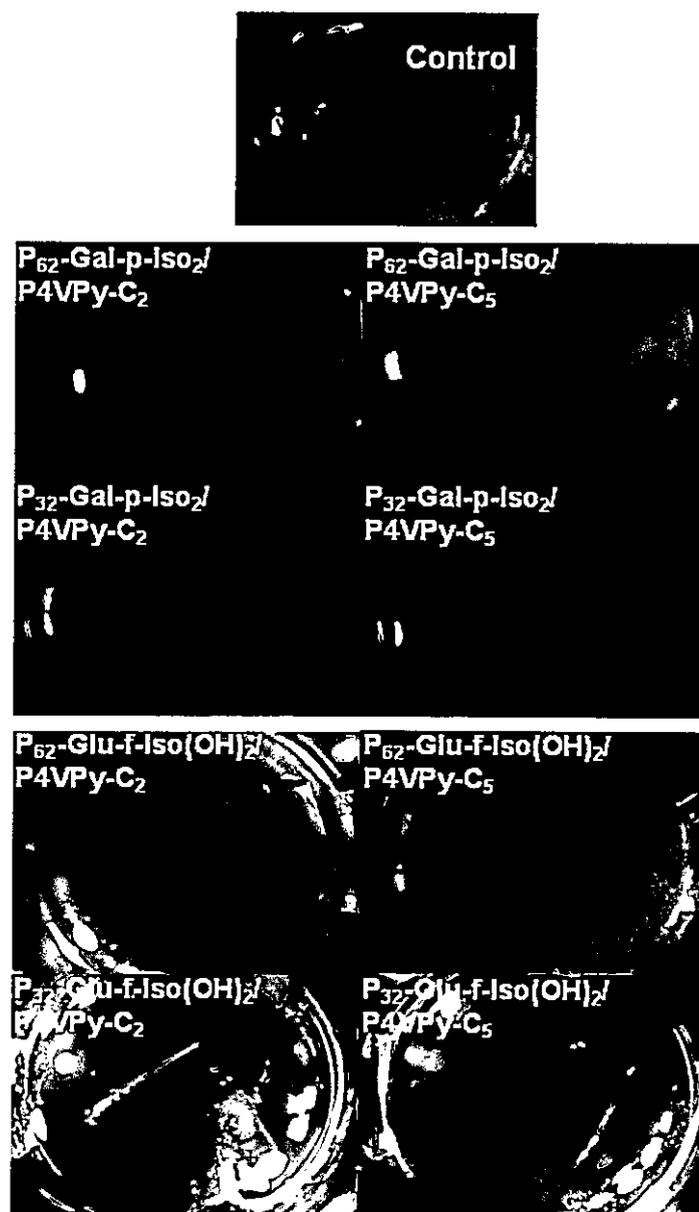


Figura 58: Imágenes obtenidas mediante Lupa de *P. aeruginosa* sobre multicapas de P-Gal-p-(Iso)₂ y P-Glu-f-Iso(OH)₂ ($M_v=6,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ y $M_v=3,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$) con P4VPy-C₂ y P4VPy-C₅.

De las imágenes obtenidas mediante lupa, se puede concluir que las multicapas más efectivas, es decir, que presentan menos desarrollo de colonias bacterianas en comparación al control, son aquellas formadas por los polielectrolitos copolímeros P-Xil-f-(Iso)OH y P-Glu-f-Iso(OH)₂, de $M_v=6,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ y $M_v=3,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$, con P4VPy-C₂ y P4VPy-C₅.

Las colonias remanentes observadas fueron cuantificadas estableciendo porcentajes de bacterias capaces de desarrollarse en cada multicapa en comparación al sustrato sin modificar.

Como se observa en la Figura 59, las multicapas con mayor capacidad antibacteriana respecto a *P. aeruginosa* son aquellas formadas por los polielectrolitos P₆₂-Xil-f-(Iso)OH/P4VPy-C₅ con un 6,3% y P₆₂-Glu-f-Iso(OH)₂/P4VPy-C₅ con un 8%, seguidas por las multicapas formadas por los polielectrolitos P₆₂-Glu-f-Iso(OH)₂/P4VPy-C₂ y P₆₂-Xil-f-(Iso)OH/P4VPy-C₂ con un 19,6% y 25,3% respectivamente. Las multicapas formadas por los sistemas P₆₂-Alo-f-(Iso)₂ y P₆₂-Gal-p-(Iso)₂ poseen un efecto muy inferior en la sobrevivencia de las bacterias en relación a los polielectrolitos P₆₂-Xil-f-(Iso)OH y P₆₂-Glu-f-Iso(OH)₂. También se observa que las multicapas formadas por P4VPy-C₅ poseen un menor número de bacterias remanentes en comparación a las multicapas formadas por P4VPy-C₅, al contrario a lo reportado en la literatura.¹⁰⁸

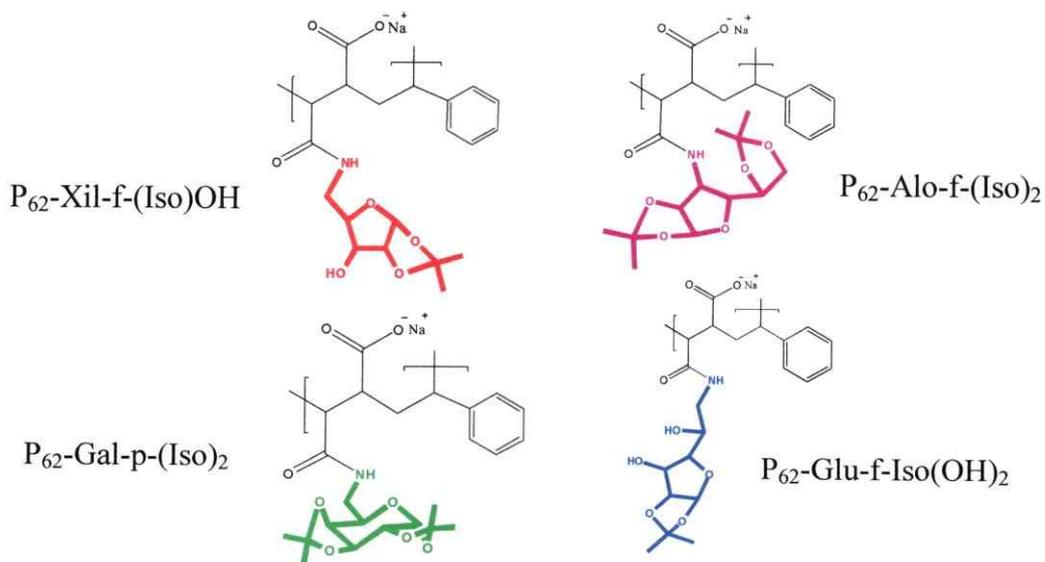
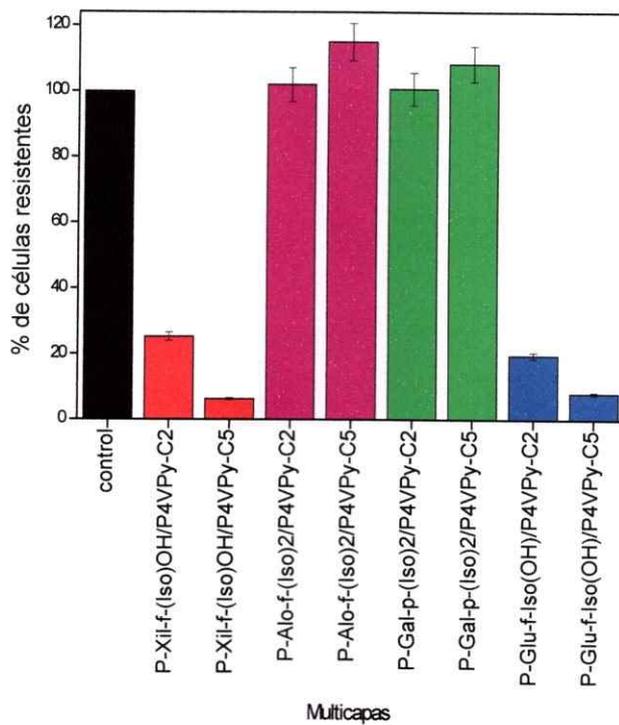


Figura 59: Porcentaje de *P. aeruginosa* sobre las multicapas formadas por el copolímero P₆₂-aminoazúcar y P4VPy-C_n.

Así, se podría concluir que a alto peso molecular del copolímero P-*aminoazúcar*, hay una influencia del tipo de sustituyente de la cadena lateral en la resistencia bacteriana, pues los dos polielectrolitos copolímeros que presentaron menor porcentaje de bacterias resistentes poseen derivados de xilofuranosa y glucofuranosa parcialmente protegidos en su cadena lateral (Figura 60).

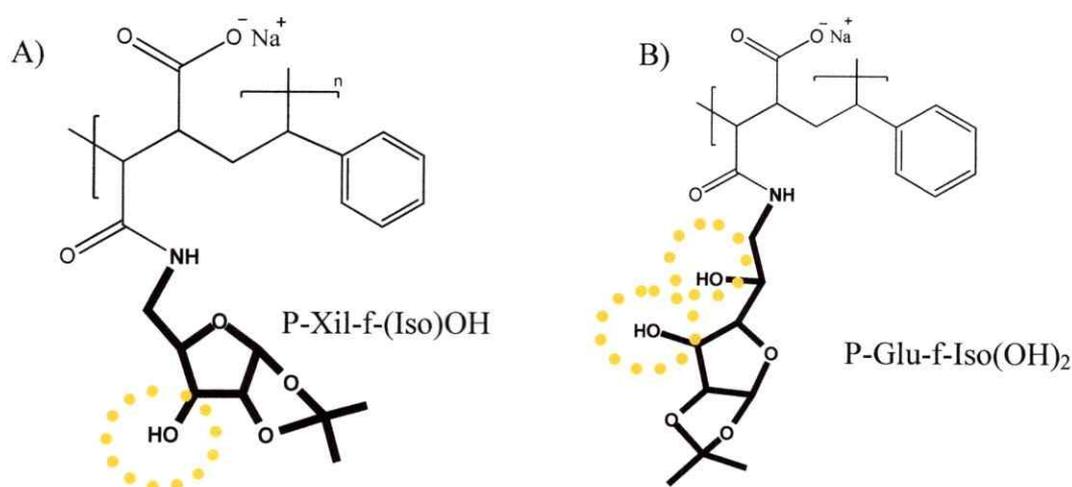


Figura 60: Estructuras de polielectrolitos aniónicos. A) P-Xil-f-(Iso)OH, en su cadena lateral posee un anillo de xilofuranosa parcialmente protegido con un grupo hidroxilo disponible y B) P-Glu-f-Iso(OH)₂, en su cadena lateral posee un anillo de glucofuranosa parcialmente protegido con dos grupos hidroxilos disponibles.

Se ha reportado la influencia de propiedades físico-químicas de la superficie de las multicapas como el espesor (Γ), rugosidad (RMS), humectabilidad (θ_A), heterogeneidad química de la superficies (θ_H) y energía superficial (γ) en la capacidad antibacteriana.^{94,109,110} Como se observa en la Tabla 21, a $M_v=6,2 \times 10^4 \text{ gmol}^{-1}$ del

copolímero *P-aminoazúcar*, se obtienen porcentajes de sobrevida muy diferentes para multicapas con el mismo espesor, lo mismo sucede con la rugosidad, la humectabilidad, el ángulo de histéresis y la energía superficial, por lo que en las multicapas estudiadas no existe una relación entre el espesor (Γ), rugosidad (RMS), humectabilidad (θ_A), ángulo de histéresis (θ_H) ni energía superficial (γ) respecto a la resistencia observada de las bacterias de *P. aeruginosa*.

Tabla 21: Porcentaje de *P. aeruginosa* y propiedades fisico-químicas de las multicapas formadas por *P*₆₂-*aminoazúcar* y P4VPy-C₅.

Multicapa	Resistencia [%]	Γ [nm]	RMS [nm]	θ_A [°]	θ_H [°]	γ [mJm ⁻²]
P ₆₂ -Xil-f-(Iso)OH/P4VPy-C ₅	6,30	42,41	11,40	56±3	8±0	51±2
P ₆₂ -Xil-f-(Iso)OH/P4VPy-C ₂	25,30	35,55	11,51	42±8	4±4	57±2
P ₆₂ -Alo-f-(Iso) ₂ /P4VPy-C ₅	115,00	5,62	0,55	63±2	25±2	51±3
P ₆₂ -Alo-f-(Iso) ₂ /P4VPy-C ₂	102,00	11,88	0,72	36±2	15±2	62±6
P ₆₂ -Gal-p-(Iso) ₂ /P4VPy-C ₅	108,30	4,40	0,35	46±3	18±5	62±1
P ₆₂ -Gal-p-(Iso) ₂ /P4VPy-C ₂	100,60	42,60	10,21	67±3	32±4	50±0
P ₆₂ -Glu-f-Iso(OH) ₂ /P4VPy-C ₅	8,00	72,46	6,91	51±2	10±3	55±2
P ₆₂ -Glu-f-Iso(OH) ₂ /P4VPy-C ₂	19,60	42,94	13,10	68±3	22±6	46±0

En la Figura 61 se observa que la multicapa que afecta mayormente la resistencia bacteriana es $P_{32}\text{-Glu-f-Iso(OH)}_2/P4VPy\text{-C}_2$ con un 8% de bacterias resistentes en comparación al control, seguida por la multicapa $P_{32}\text{-Xil-f-(Iso)OH}/P4VPy\text{-C}_2$ con un 12%, luego $P_{32}\text{-Glu-f-Iso(OH)}_2/P4VPy\text{-C}_5$ con un 39,6% de bacterias resistentes, $P_{32}\text{-Xil-f-(Iso)OH}/P4VPy\text{-C}_5$ con un 44% y finalmente $P_{32}\text{-Gal-p-(Iso)}_2/P4VPy\text{-C}_2$ con un 49% de resistencia bacteriana en comparación al sustrato desnudo. Las multicapas construidas con los polielectrolitos $P_{32}\text{-Alo-f-(Iso)}_2$ con $P4VPy\text{-C}_2$ y $P4VPy\text{-C}_5$, y $P_{32}\text{-Gal-p-(Iso)}_2/P4VPy\text{-C}_5$ presentan resistencia bacteriana similar a las del control. Como se observa, las multicapas formadas por $P4VPy\text{-C}_n$ con cadena etílica son las que afectan mayormente la resistencia sobre la superficie de la multicapa en comparación a aquellas formadas con cadena pentílica. Esto se puede deber que el sistema $P4VPy\text{-C}_2$ posee una mayor disponibilidad del grupo catiónico hacia el aire debido a un menor largo de cadena alquílica. Un comportamiento similar fue observado en multicapas formadas con $P4VPy\text{-C}_2$ y carboximetilcelulosa contra la bacteria *Micrococcus luteus*,¹⁰⁸ donde el efecto en la actividad biocida varía con largo de la cadena alquílica de la $P4VPy\text{-C}_n$.

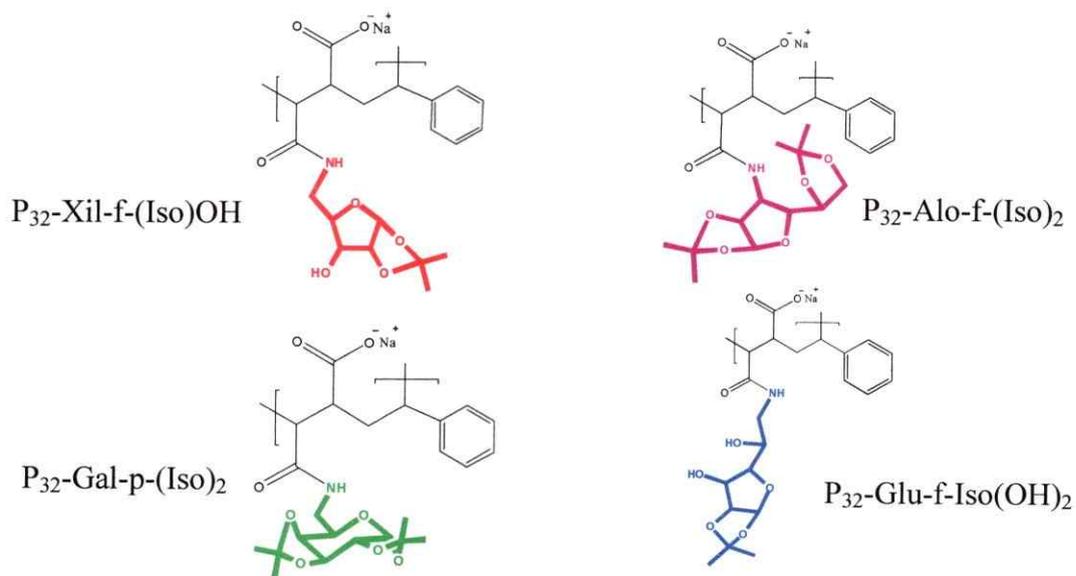
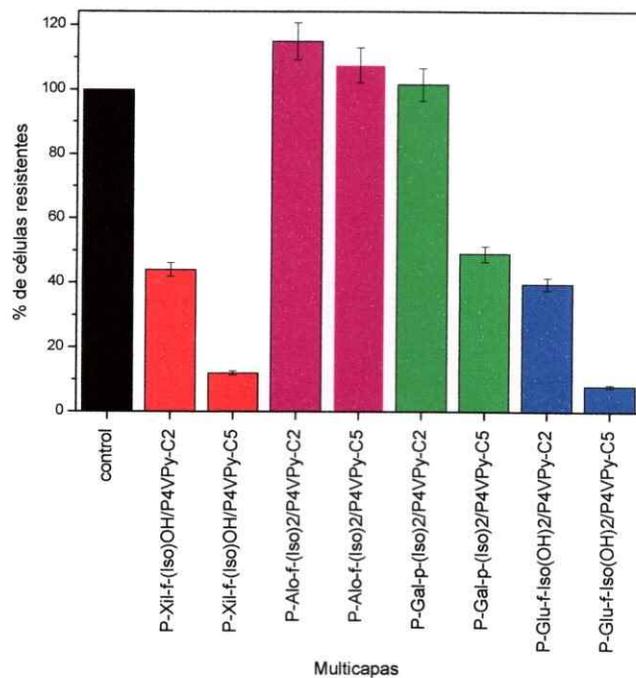


Figura 61: Porcentaje de *P. aeruginosa* sobre las multicapas formadas por el copolímero P_{32} -aminoazúcar y P4VPy- C_n .

En la Tabla 22 se puede observar que a $M_v=3,2 \times 10^4 \text{ gmol}^{-1}$ tampoco existe relación entre las propiedades físico-químicas de la superficie de las multicapas respecto a la resistencia de *P. aeruginosa*. Por lo que no existe una influencia directa en la capacidad antibacteriana de las multicapas construidas de una de las propiedades de la superficie como la rugosidad, humectabilidad, homogeneidad química de la superficie o energía superficie sino más bien, de la combinación de estos factores.

Tabla 22: Porcentaje de *P. aeruginosa* y propiedades físico-químicas de las multicapas formadas por P₃₂-aminoazúcar y P4VPy-C_n.

Multicapa	Resistencia [%]	Γ [nm]	RMS [nm]	θ_A [°]	θ_H [°]	γ [mJm ⁻²]
P ₃₂ -Xil-f-(Iso)OH/P4VPy-C ₅	44,00	40,32	4,55	60±2	7±3	51±0
P ₃₂ -Xil-f-(Iso)OH/P4VPy-C ₂	12,00	29,27	7,82	71±1	9±2	48±1
P ₃₂ -Alo-f-(Iso) ₂ /P4VPy-C ₅	115,00	77,08	6,20	50±5	27±4	58±1
P ₃₂ -Alo-f-(Iso) ₂ /P4VPy-C ₂	107,60	81,74	11,41	40±2	13±0	63±1
P ₃₂ -Gal-p-(Iso) ₂ /P4VPy-C ₅	101,60	11,95	0,57	44±1	21±2	59±0
P ₃₂ -Gal-p-(Iso) ₂ /P4VPy-C ₂	49,00	38,57	0,81	70±0	29±1	46±1
P ₃₂ -Glu-f-Iso(OH) ₂ /P4VPy-C ₅	39,60	67,85	0,92	48±4	15±3	59±3
P ₃₂ -Glu-f-Iso(OH) ₂ /P4VPy-C ₂	8,00	89,73	13,36	50±1	12±4	56±0

Se observa que, a $M_v=6,2 \times 10^4 \text{ gmol}^{-1}$ y $M_v=3,2 \times 10^4 \text{ gmol}^{-1}$, la capacidad antibacteriana de las multicapas depende del tipo de derivado de aminoazúcar con el que es modificado el copolímero P(AM-alt-E). Como se observa en la Tabla 21 y Tabla 22,

en presencia de P4VPy-C₂ o P4VPy-C₅ en las multicapas, en general la cantidad de bacterias resistentes varía considerablemente. Esto se podría deber a que los sistemas poliméricos adquieren distinta conformación en disolución, lo que deriva en una distinta disponibilidad de grupos funcionales hacia el aire al ser adsorbidos en un sustrato.

En la Figura 62 se observa la influencia del peso molecular en la capacidad antibacteriana de las multicapas con menor porcentaje de *P. aeruginosa* resistentes. En el caso de las multicapas formadas por el polielectrolito P4VPy-C₅, se observa que a menor peso molecular del copolímero *P-aminoazúcar* mayor es el porcentaje de bacterias resistentes. Similar comportamiento fue observado en polímeros de poli(etilenimina) alquilada covalentemente unidos a diferentes textiles, ya que cadenas con mayor peso molecular poseen mayor grado de actividad antibacteriana y fungicida comparadas con sistemas de menor peso molecular.¹¹¹ En el caso de las multicapas formadas por el polielectrolito P4VPy-C₂, a menor peso molecular menor es el porcentaje de bacterias resistentes.

Con el propósito de discernir si la capacidad antibacteriana de las películas de multicapas se debe a la presencia de múltiples capas de los copolímeros de *P-aminoazúcares* y P4VPy-C_n, o se debe a propiedades antibacterianas de los polielectrolitos por separado, se realizaron estudios de la capacidad antibacteriana de capas individuales de P-Xil-f-(Iso)OH, P-Alo-p-(Iso)₂, P-Gal-p-(Iso)₂, P-Glu-f-Iso(OH)₂, P4VPy-C₂ y P4VPy-C₅.

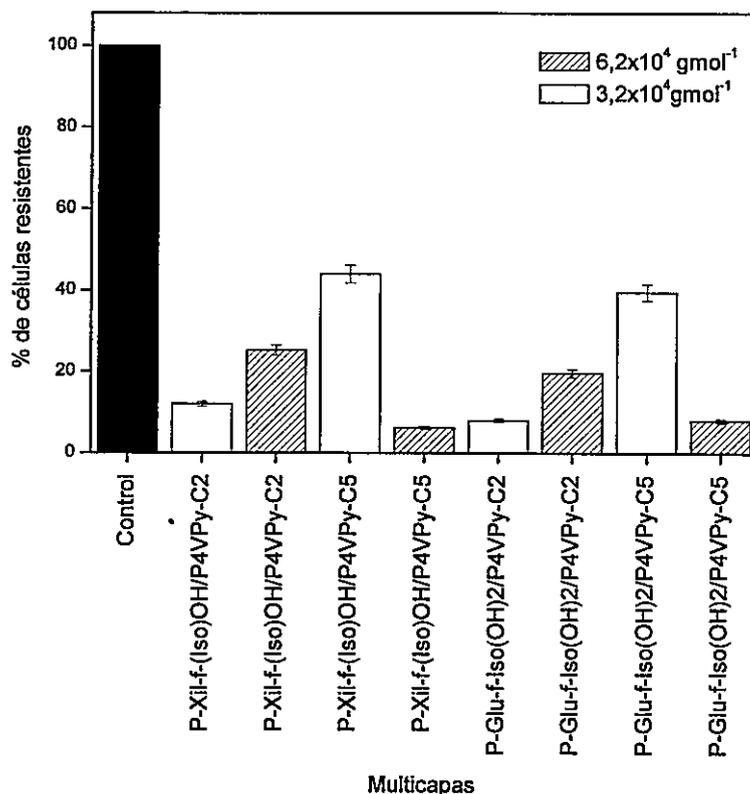


Figura 62: Porcentaje de *P. aeruginosa* sobre las multicapas de P-Glu-f-Iso(OH)₂ de diferente peso molecular con P4VPy-C₂ y P4VPy-C₅.

En todas las películas se obtuvo resultados similares al sustrato desnudo (control). Al disminuir el número de capas de la multicapa a seis y cuatro, y con capas individuales del copolímero P(AM-alt-E), $M_v=6,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ y $M_v=3,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$, no se observa un efecto antibacteriano indicando que la capacidad antibacteriana de la película de multicapas contra *P. aeruginosa*, se debe a la presencia de múltiples capas y a la presencia de ambos polielectrolitos en la superficie.

Por otro lado, estos resultados fueron complementados con estudios realizados en disolución del polielectrolito con mejor resultado en los ensayos anteriores de

capacidad antibacteriana: P-Glu-f-Iso(OH)₂. Los de ensayos de concentración mínima inhibitoria mostraron que este polielectrolito no presenta actividad antibiótica en disolución contra la bacteria *P. aeruginosa*.

Para estudiar más en detalle la interacción *in vivo* entre la bacteria patógena y la película de multicapas, se realizaron estudios mediante microscopía de fuerza atómica (AFM). La ventaja de esta técnica es que la muestra no necesita ser modificada para ser observada, es decir, las muestras bacterianas se observan *in vivo* en la superficie de la multicapa. Además, estos estudios fueron realizados con el objetivo de observar si existen cambios morfológicos superficiales en la población bacteriana al depositarse sobre las diferentes multicapas en relación a la superficie control (sin polímero).

Las imágenes de AFM, tanto de amplitud como altura, de *P. aeruginosa* sobre el sustrato desnudo utilizado como control y sobre las multicapas P-Glu-f-Iso(OH)₂/P4VPy-C₂ y P-Glu-f-Iso(OH)₂/P4VPy-C₅ corroboraron la capacidad antibacteriana de estas multicapas.

En la Figura 63A, se observan las imágenes de AFM de bacterias vivas depositadas sobre el sustrato desnudo. Se observa una distribución homogénea de *P. aeruginosa* sobre gran parte de la superficie del sustrato. Con mayor resolución (Figura 63B) se observan bacterias con flagelos y forma definida, además de la formación de colonias a lo largo de todo el sustrato. Inclusive, se pueden observar fragmentos de exopolímeros bacterianos que utilizan para comenzar la colonización de la superficie mediante la formación de una biopelícula tipo colonia (Figura 63B).

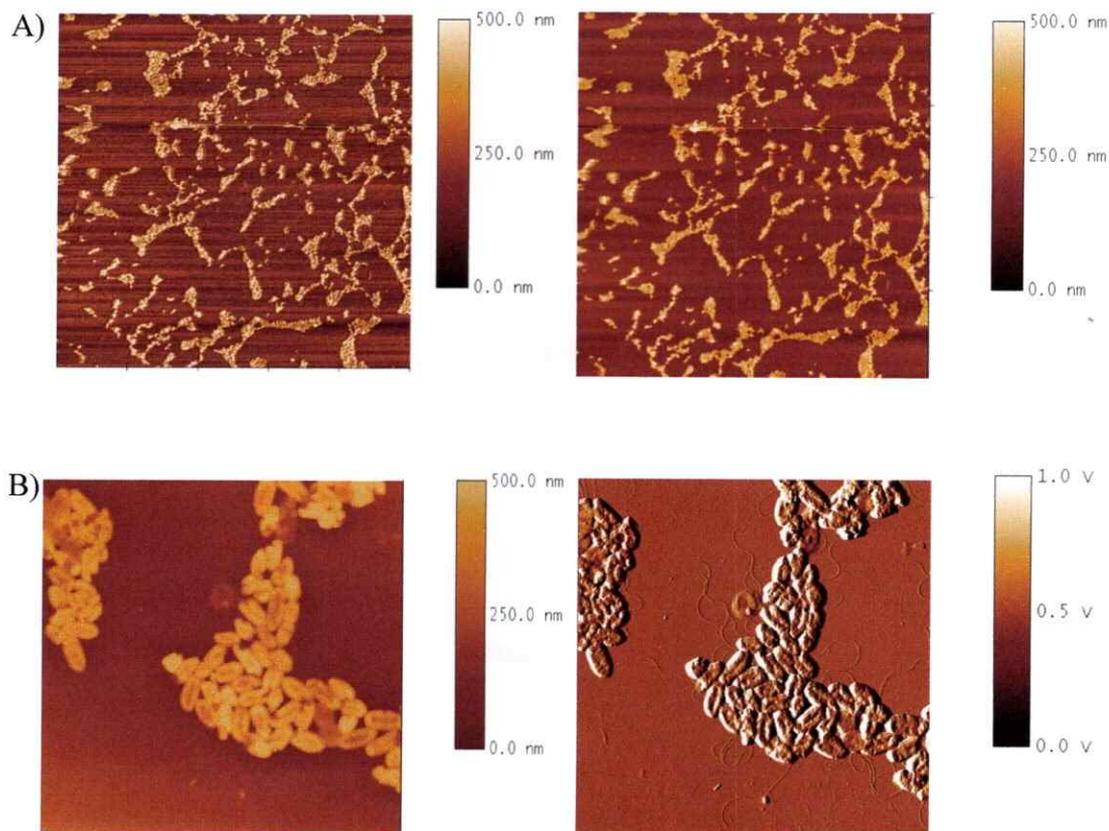


Figura 63: Imágenes de AFM de amplitud (derecha) y altura (izq.) de *P. aeruginosa* sobre el sustrato desnudo (control): A) 100 μm y B) 12 μm.

En el caso de la multicapa $P_{62}\text{-Glu-f-Iso(OH)}_2/P4VPy\text{-C}_2$, cuyo porcentaje de bacterias resistentes es de 19,6%, se observan pocas bacterias formando colonias, pero sin flagelos ni forma definida (Figura 64B). Además, la superficie de la bacteria es más corrugada en comparación a la superficie de las bacterias depositadas sobre el sustrato control (Figura 63B). En la imagen de AFM de mayor scan (100 μm) se puede apreciar

una disminución de bacterias sobre la multicapa (Figura 64A) en comparación al sustrato control (Figura 63A).

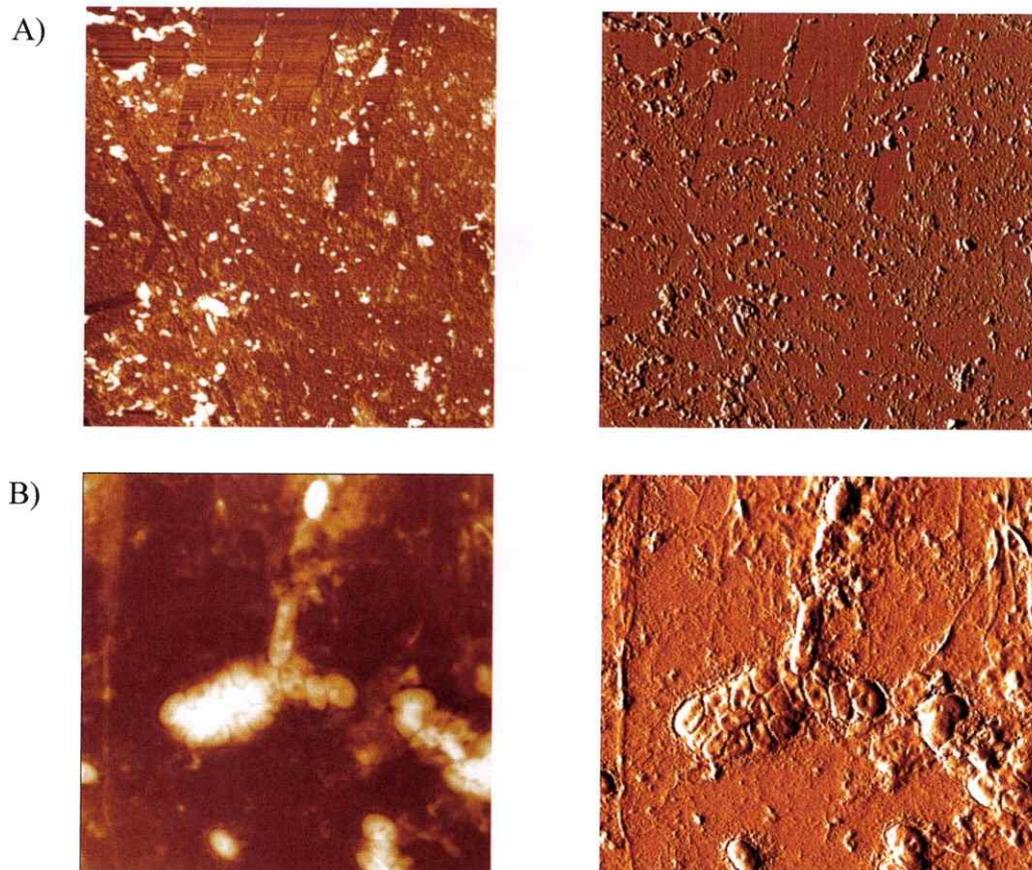


Figura 64: Imágenes de AFM de amplitud (derecha) y altura (izq.) de *P. aeruginosa* sobre multicapa $P_{62}\text{-Glu-f-Iso(OH)}_2/P4VPy\text{-C}_2$: A) $100\mu\text{m}$ y B) $12\mu\text{m}$.

En las imágenes de AFM obtenidas para la multicapa formada por $P_{32}\text{-Glu-f-Iso(OH)}_2/P4VPy\text{-C}_2$, se observa una menor cantidad de bacterias presentes y en una distribución mucho menos homogénea (Figura 65A) en comparación al sustrato control (Figura 63A). Inclusive, hay zonas de la multicapa donde no se observa la presencia de

bacterias y en otras áreas la presencia de lo que podrían ser fragmentos bacterianos (Figura 65B). Además, se observan algunas células aisladas y sin flagelos (Figura 65C).

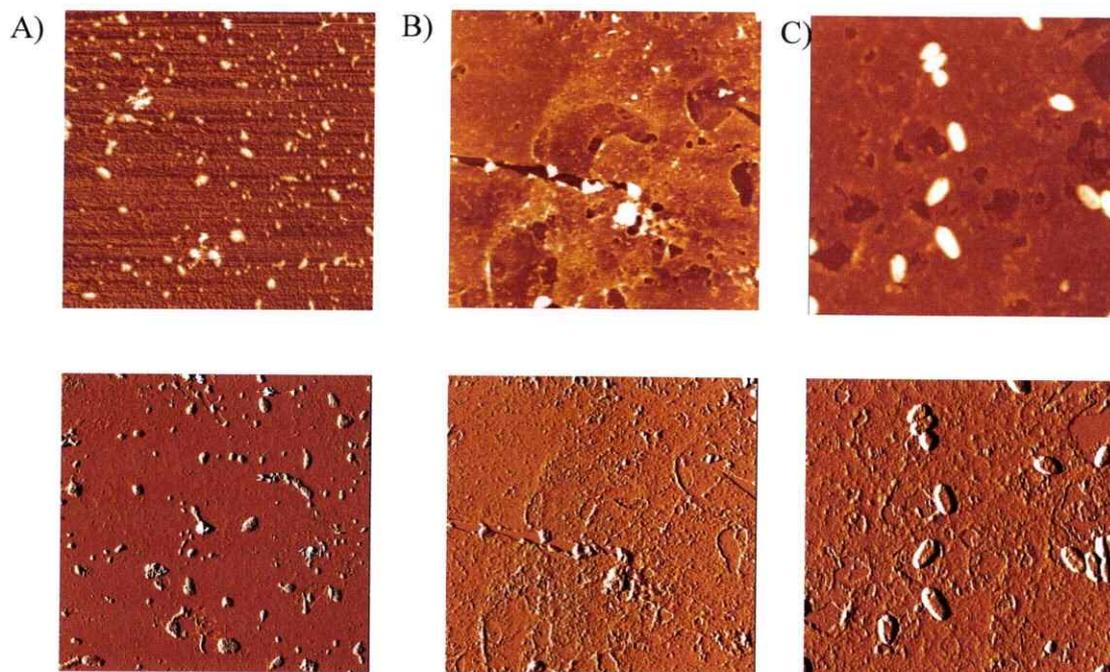


Figura 65: Imágenes de AFM de amplitud (abajo) y altura (arriba) de *P. aeruginosa* sobre multicapa $P_{32}\text{-Glu-f-Iso(OH)}_2/P4VPy\text{-C}_2$. A) $100\mu\text{m}$, B) $12\mu\text{m}$ y C) $12\mu\text{m}$.

Las imágenes de AFM de la multicapa $P_{62}\text{-Glu-f-Iso(OH)}_2/P4VPy\text{-C}_5$ (Figura 66A), son consistentes con el porcentaje de bacterias remanentes (8%) que se mostró anteriormente. En las imágenes de AFM se observan muy pocas bacterias sobre la multicapa en comparación al sustrato control (Figura 63A). Además se observan algunos fragmentos de bacterias y no se observan flagelos ni la formación de colonias (Figura 66B).

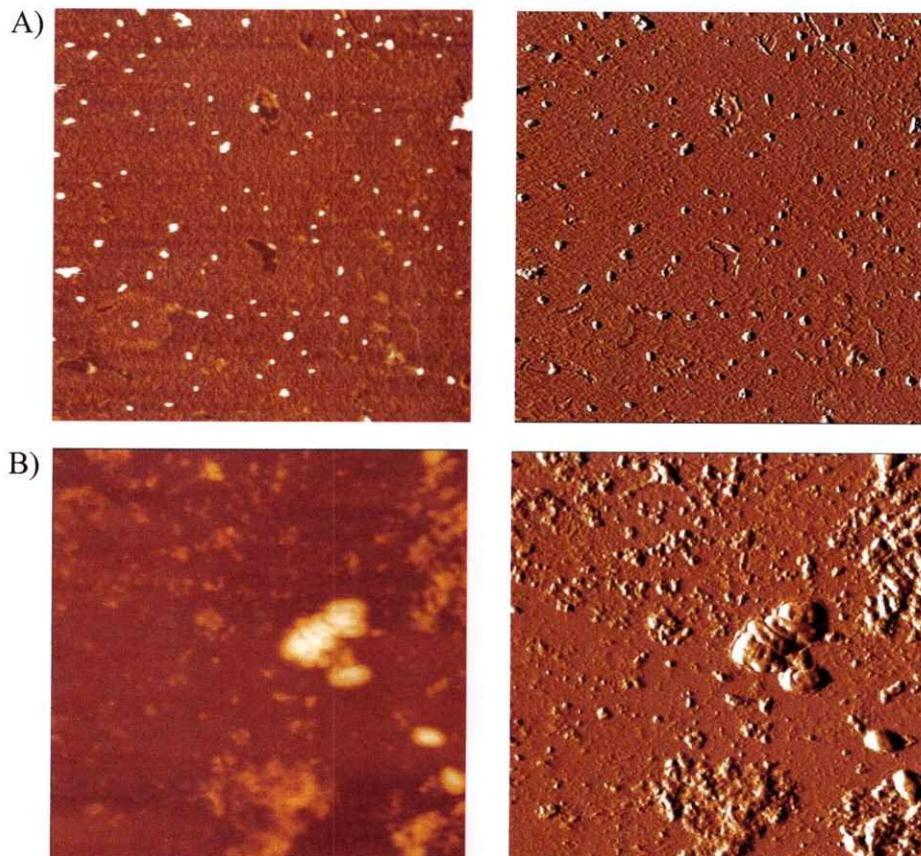


Figura 66: Imágenes de AFM de amplitud (derecha) y altura (izq.) de *P. aeruginosa* sobre multicapa P_{62} -Glu-f-Iso(OH)₂/P4VPy-C₅: A)100μm y B)12μm.

Las Figura 67 y Figura 68 muestran las imágenes de AFM de bacterias depositadas sobre multicapas de P_{32} -Glu-f-Iso(OH)₂/P4VPy-C₅. Consistente con los análisis de capacidad antimicrobiana (38%), en esta multicapa se observa una mayor cantidad de bacterias formando colonias en comparación a las tres multicapas anteriores (Figura 67). Sin embargo, no se observan flagelos. Por otro lado, como se observa en la Figura 68, las bacterias también presentan una morfología diferente a la observada en las

bacterias depositadas sobre el sustrato control, cambiando desde una superficie bacteriana más bien lisa a una mucho más corrugada, lo que se podría sugerir un daño estructural en las bacterias. Se ha reportado que este tipo de cambios estructurales en la pared de las bacterias podría indicar la muerte de la bacteria. Esto fue observado en estudios realizados en *Escherichia coli*, donde los cambios de una pared lisa (bacteria viva) a una corrugada (bacteria muerta) al someter a las bacterias a un péptido antimicrobiano, fueron corroborados por AFM.¹¹²

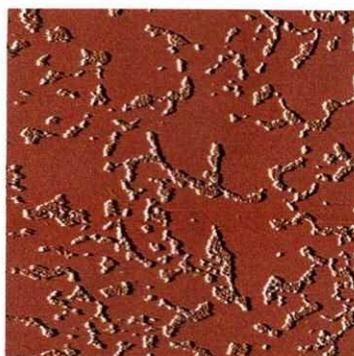


Figura 67: Imagen de AFM de amplitud de *P. aeruginosa* sobre la multicapa P₃₂-Glu-f-Iso(OH)₂/P4VPy-C₅.

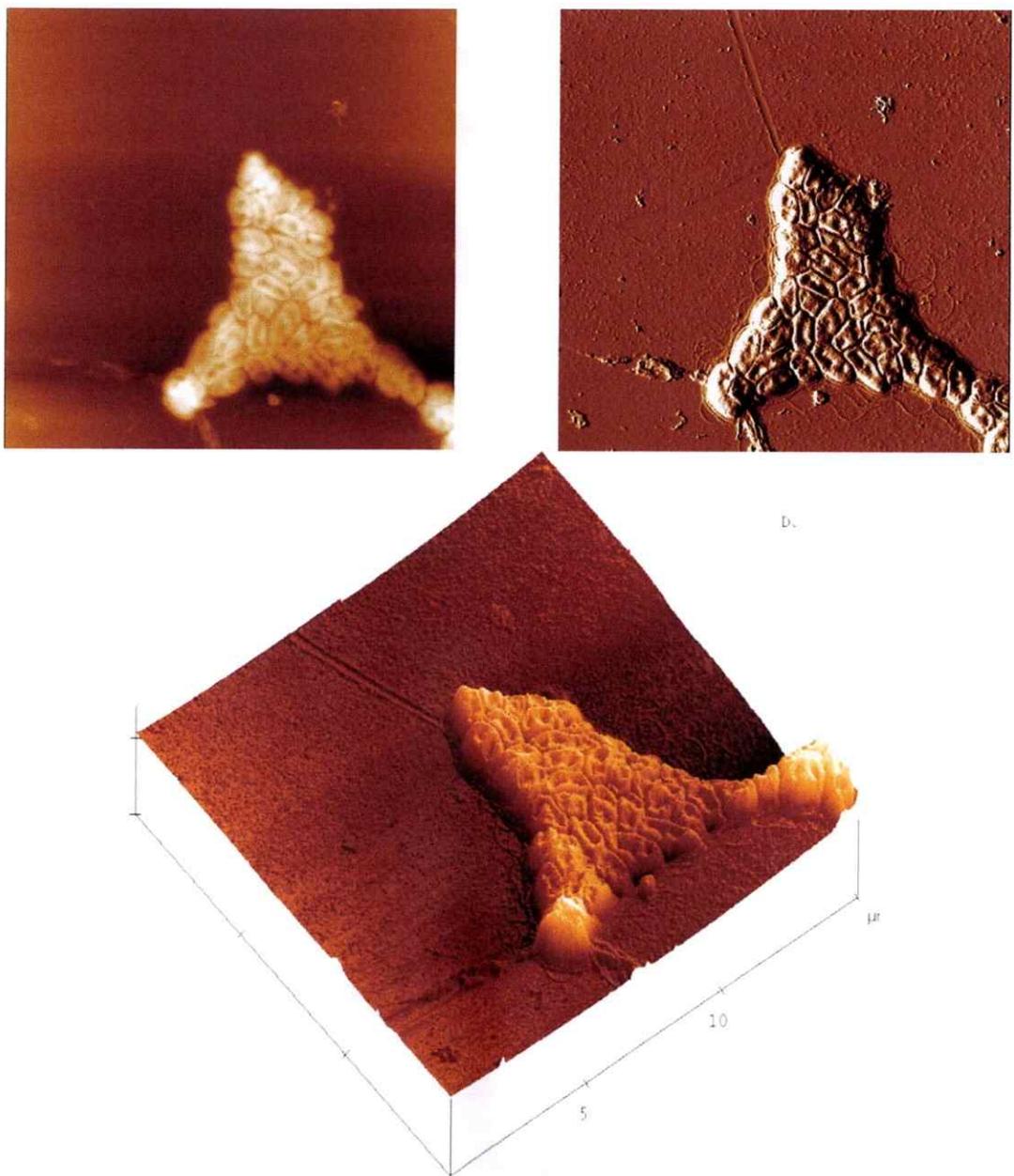


Figura 68: Imágenes de AFM de amplitud (derecha) y altura (izq.) de células de *P. aeruginosa* sobre multicapa P_{32} -Glu-f-Iso(OH)₂/P4VPy-C₅.

Para determinar si la capacidad antimicrobiana de las multicapas es exclusiva contra la bacteria *P. aeruginosa*, se llevaron a cabo estudios similares con la bacteria *Salmonella entérica serovar Typhimurium 14028s*. Una bacteria que, si bien no tiene los niveles de resistencia a antibióticos que muestra *P. aeruginosa*, es un patógeno importante en la contaminación de los alimentos. En este caso, debido a que las bacterias expresan constitutivamente la proteína fluorescente verde (GFP), las imágenes fueron obtenidas con el filtro verde de la lupa fluorescente y el número de UFC estimado según las bacterias vivas (Figura 69 y Figura 70).

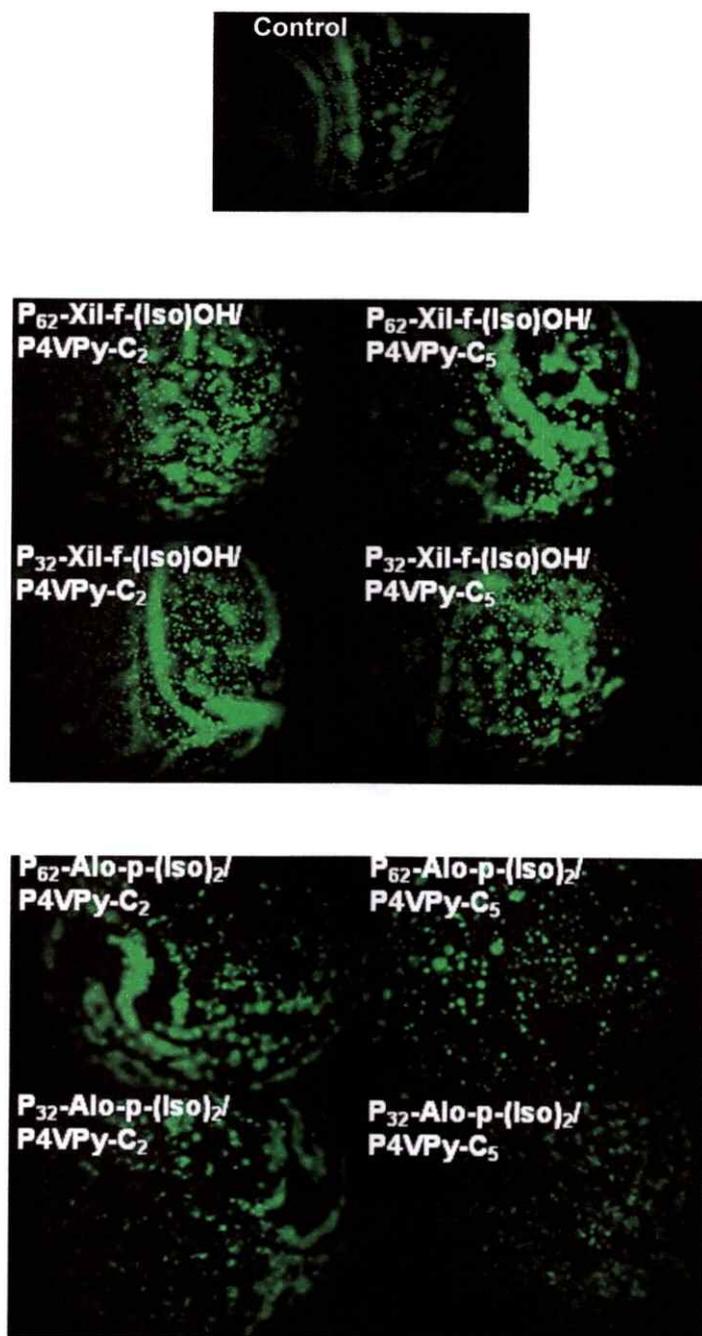


Figura 69: Imágenes obtenidas mediante Lupa de *S. Typhimurium* sobre multicapas de P-Xil-f-(Iso)OH y P-Alo-f-(Iso)₂ ($M_v=6,2 \times 10^4 \text{ gmol}^{-1}$ y $3,2 \times 10^4 \text{ gmol}^{-1}$) con P4VPy-C₂ y P4VPy-C₅.

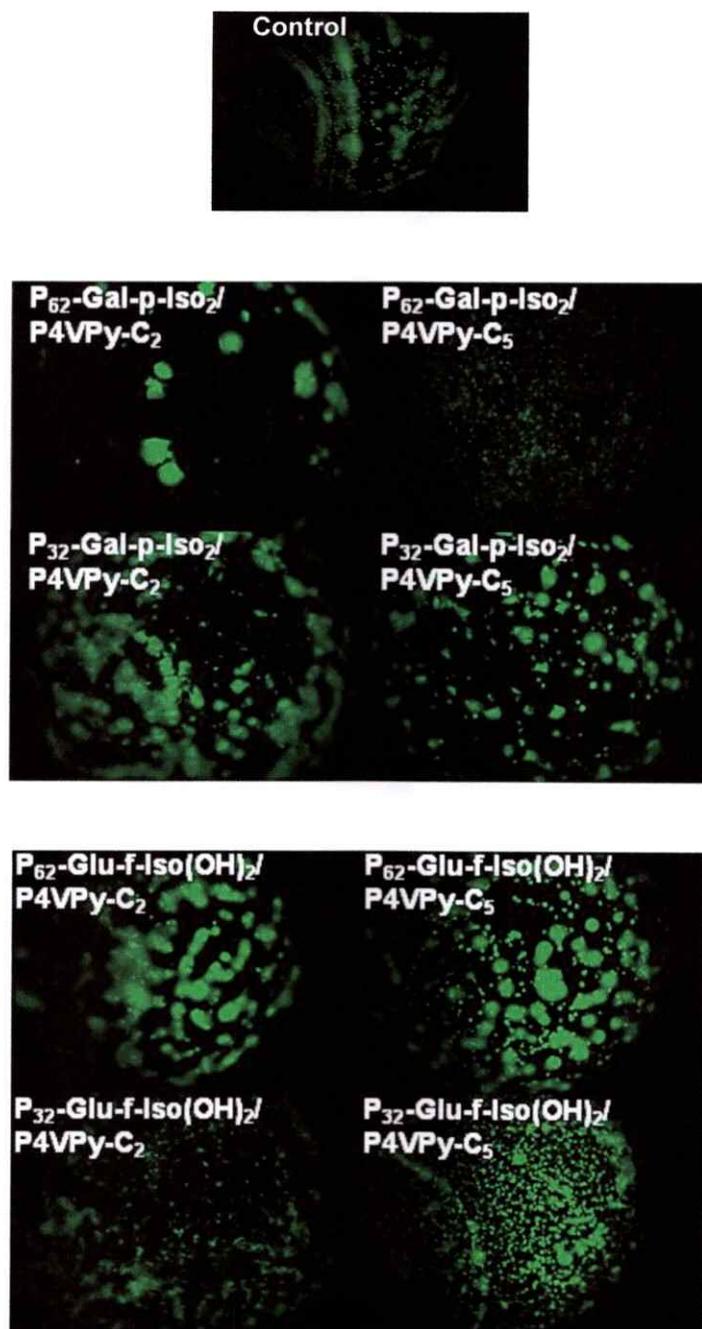


Figura 70: Imágenes obtenidas por Lupa de *S. Typhimurium* sobre multicapas de P-Gal-p-(Iso)₂ y P-Glu-f-Iso(OH)₂ ($M_v=6,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ y $3,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$) con P4VPy-C₂ y P4VPy-C₅.

La Figura 69 y Figura 70 muestran que la capacidad antibacteriana de las multicapas respecto a esta bacteria es mucho menor en comparación a *P. aeruginosa*. La multicapa que presenta mejor actividad antimicrobiana en comparación al sustrato utilizado como control es P₃₂-Gal-p-(Iso)₂/P4VPy-C₂ y en menor medida P₃₂-Alo-f-(Iso)₂/P4VPy-C₂. La cuantificación del porcentaje de bacterias resistentes en relación al control se encuentra en las Figura 71 y Figura 72.

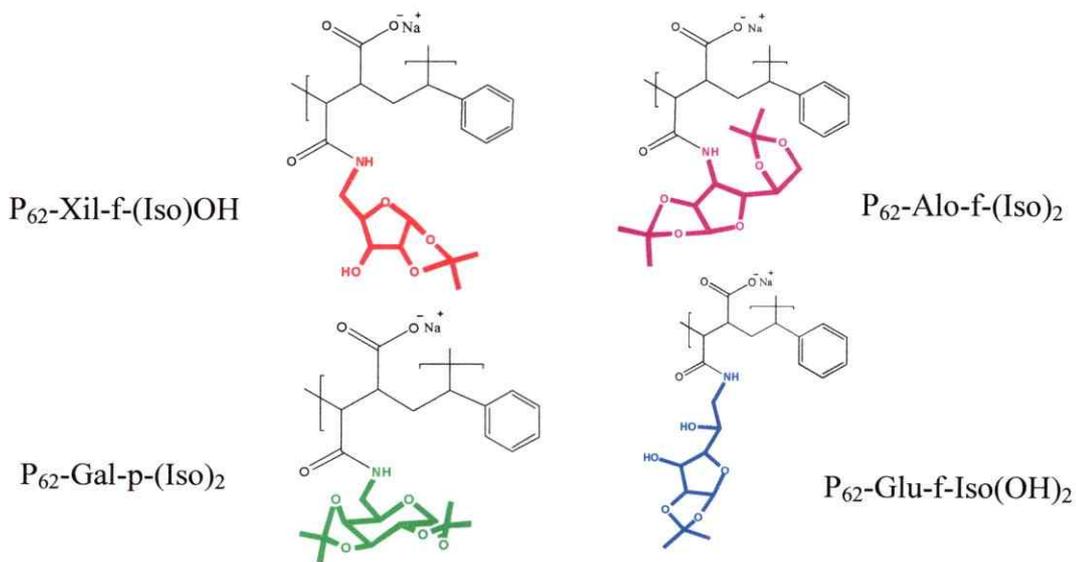
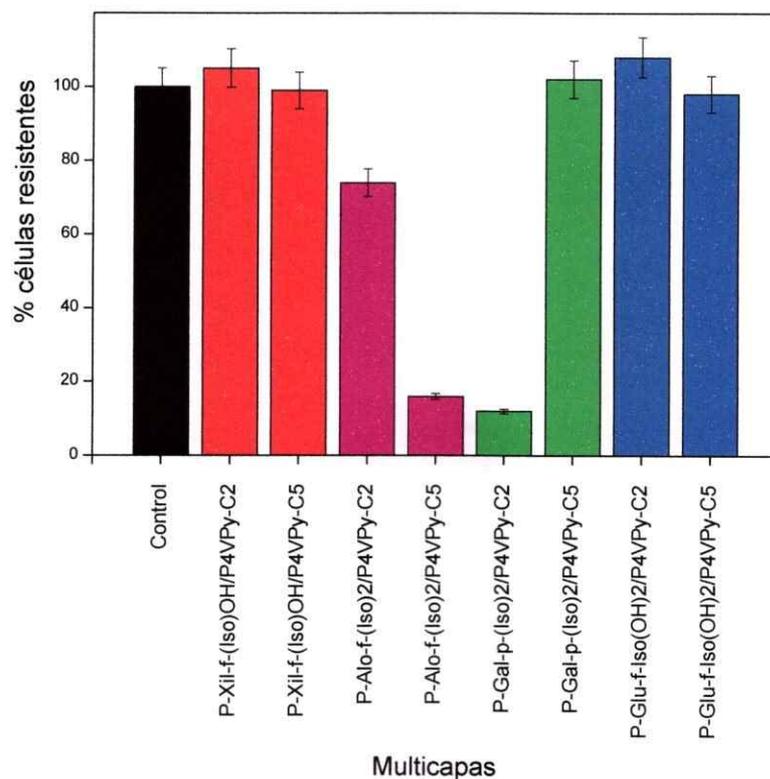


Figura 71: Porcentaje de *S. Typhimurium* sobre las multicapas formadas por el copolímero P_{62} -aminoazúcar y P4VPy- C_n .

En la Figura 71 se observa que la multicapa que presenta una mejor capacidad antibacteriana contra la bacteria *S. Typhimurium* es la multicapa formada por los polielectrolitos $P_{62}\text{-Gal-p-(Iso)}_2/P4VPy\text{-C}_2$ con un 12% de bacterias resistentes, seguida por la multicapa formada por $P_{62}\text{-Alo-f-(Iso)}_2/P4VPy\text{-C}_5$ con un 16% de bacterias resistentes y luego la película de multicapa formada por $P_{62}\text{-Alo-f-(Iso)}_2/P4VPy\text{-C}_2$ con un 74%. La multicapa formada por los polielectrolitos $P_{62}\text{-Gal-p-(Iso)}_2/P4VPy\text{-C}_2$ y las multicapas formadas por el polielectrolito copolímero $P_{62}\text{-Glu-f-Iso(OH)}_2$ con $P4VPy\text{-C}_5$ y $P4VPy\text{-C}_2$ presentan un porcentaje de bacterias resistentes similar al control.

En el caso de las multicapas formada por los polielectrolitos $P_{62}\text{-Alo-f-(Iso)}_2/PV4Py\text{-C}_n$ y $P_{62}\text{-Gal-p-(Iso)}_2/P4VPy\text{-C}_n$ se observa una marcada influencia del largo de la cadena alquílica del polielectrolito $P4VPy\text{-C}_n$. En el caso de las multicapas formadas por el polielectrolito $P_{62}\text{-Alo-f-(Iso)}_2$ con $P4VPy\text{-C}_5$ la capacidad antibacteriana es muy superior en comparación a aquellas formadas con $P4VPy\text{-C}_2$ y en el caso de las multicapas formadas por el polielectrolito $P_{62}\text{-Gal-p-(Iso)}_2$, presentaron mayor capacidad antibacteriana las multicapas formadas con $P4VPy\text{-C}_2$, comparadas con el sistema de multicapas $P_{62}\text{-Gal-p-(Iso)}_2/P4VPy\text{-C}_5$. Estos resultados dejan en evidencia que la capacidad antibacteriana de las multicapas depende de la naturaleza química, volumen y del grado de protección de los aminoazúcares de la cadena lateral de los polielectrolitos, pues en este caso la presencia del polielectrolito copolímero $P_{62}\text{-Alo-f-(Iso)}_2$ es más efectiva con $P4VPy\text{-C}_5$ y en el caso del polielectrolito copolímero $P_{62}\text{-Gal-p-(Iso)}_2$ es más efectiva con $P4VPy\text{-C}_2$.

En la Tabla 23 se observa el porcentaje de bacterias resistentes y propiedades fisico-químicas de la superficie de la multicapa como el espesor, la humectabilidad, la heterogeneidad química y la energía superficial de la película de multicapas. A alto peso molecular, no se observa la influencia específica de uno de estos factores, pues multicapas con similar espesor, humectabilidad, heterogeneidad química y energía superficial poseen un porcentaje de bacterias remanentes muy diferentes.

Tabla 23: Porcentaje de *S. Typhimurium* y propiedades fisico-químicas de las multicapas formadas por el copolímero P₆₂-aminoazúcar y P4VPy-C_n.

Multicapa	Resistencia [%]	Γ [nm]	RMS [nm]	θ_A [°]	θ_H [°]	γ [mJm ⁻²]
P ₆₂ -Xil-f-(Iso)OH/P4VPy-C ₅	99,00	42,41	11,40	56±3	8±0	51±2
P ₆₂ -Xil-f-(Iso)OH/P4VPy-C ₂	105,00	35,55	11,51	42±8	4±4	57±2
P ₆₂ -Alo-f-(Iso) ₂ /P4VPy-C ₅	16,00	56,20	0,55	63±2	25±2	51±3
P ₆₂ -Alo-f-(Iso) ₂ /P4VPy-C ₂	74,00	11,88	0,72	36±2	15±2	62±6
P ₆₂ -Gal-p-(Iso) ₂ /P4VPy-C ₅	102,00	44,00	0,35	46±3	18±5	62±1
P ₆₂ -Gal-p-(Iso) ₂ /P4VPy-C ₂	12,00	42,60	10,21	67±3	32±4	50±0
P ₆₂ -Glu-f-Iso(OH) ₂ /P4VPy-C ₅	98,00	72,46	6,91	51±2	10±3	55±2
P ₆₂ -Glu-f-Iso(OH) ₂ /P4VPy-C ₂	108,00	42,94	13,10	68±3	22±6	46±0

En la Figura 72 se observa el porcentaje de bacterias resistentes de *S. Typhimurium* en las multicapas formadas por el polielectrolito copolímero P₃₂-aminoazúcar con P4VPy-C₂ y P4VPy-C₅.

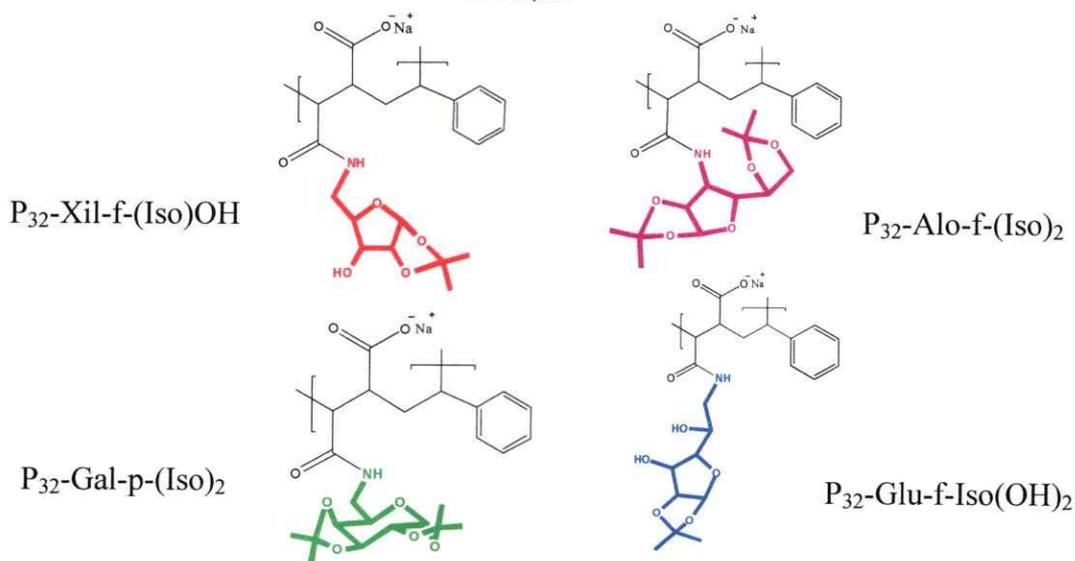
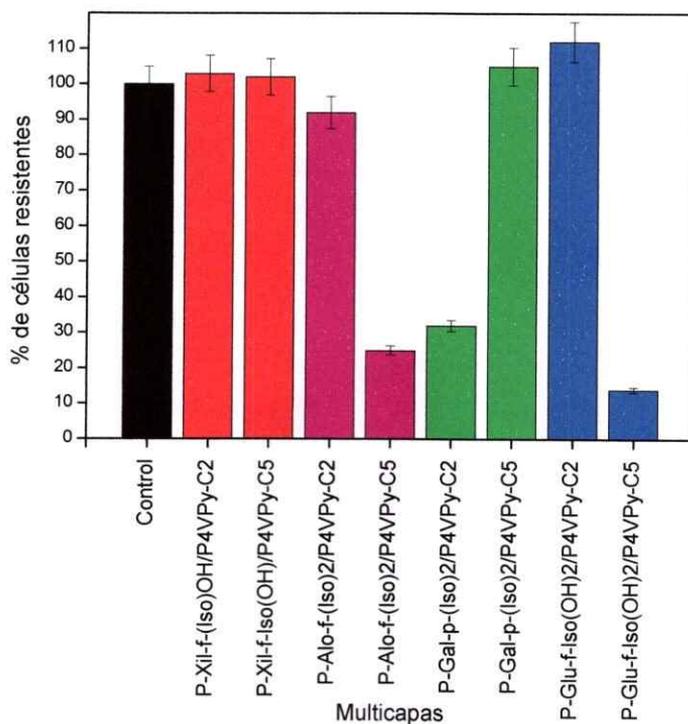


Figura 72: Porcentaje de *S. Typhimurium* sobre las multicapas formadas por el copolímero P₃₂-aminoazúcar y P4Vpy-C_n.

La multicapa que presenta mayor capacidad antibacteriana, es decir, menor porcentaje de bacterias resistentes está formada por los polielectrolitos $P_{32}\text{-Glu-f-Iso(OH)}_2/P4VPy\text{-C}_5$, con un 14,6%, seguida de la película de multicapas formadas por los polielectrolitos $P_{32}\text{-Alo-f-(Iso)}_2/P4VPy\text{-C}_5$ con un 25% de bacterias resistentes y finalmente la película de multicapas formadas por los polielectrolitos $P_{32}\text{-Alo-f-(Iso)}_2/P4VPy\text{-C}_2$ con un 32% de bacterias resistentes. Las multicapas formadas por $P_{32}\text{-Xil-f-(Iso)OH}/P4VPy\text{-C}_5$, $P_{32}\text{-Xil-f-(Iso)OH}/P4VPy\text{-C}_2$, $P_{32}\text{-Gal-p-(Iso)}_2/P4VPy\text{-C}_5$, $P_{32}\text{-Gal-p-(Iso)}_2/P4VPy\text{-C}_2$, presentan un porcentaje de bacterias remanentes similar al sustrato sin modificar utilizado como control.

Se observa una clara influencia del largo de la cadena alquílica del polielectrolito $P4VPy\text{-C}_n$ en las multicapas formadas por $P_{32}\text{-Alo-f-(Iso)}_2$, $P_{32}\text{-Gal-p-(Iso)}_2$ y $P_{32}\text{-Glu-f-Iso(OH)}_2$, donde las multicapas presentaron mayor capacidad antibacteriana con $P4VPy\text{-C}_n$ con cadena pentílica, con excepción de la multicapa formada por $P_{32}\text{-Gal-p-(Iso)}_2$ que muestra mayor capacidad antibacteriana con $P4VPy\text{-C}_2$.

Al igual que a alto peso molecular, en la Tabla 24 se observa que el porcentaje de bacterias resistentes no es influenciado por una de propiedades físico-químicas de la superficie de la multicapa como el espesor, la humectabilidad, la heterogeneidad química y la energía superficial de la película de multicapas, sino más bien por la combinación de ellas, ya que multicapas con similar espesor, humectabilidad, heterogeneidad química y energía superficial poseen un porcentaje de bacterias remanentes muy diferentes.

Tabla 24: Porcentaje de *S. Typhimurium* y propiedades fisico-químicas de las multicapas formadas por P₃₂-aminoazúcar y P4VPy-C_n.

Multicapa	Resistencia [%]	Γ [nm]	RMS [nm]	θ_A [°]	θ_H [°]	γ [mJm ⁻²]
P ₃₂ -Xil-f-(Iso)OH/P4VPy-C ₅	102,00	40,32	4,55	60±2	7±3	51±0
P ₃₂ -Xil-f-(Iso)OH/P4VPy-C ₂	103,00	29,27	7,82	71±1	9±2	48±1
P ₃₂ -Alo-f-(Iso) ₂ /P4VPy-C ₅	25,00	77,08	6,20	50±5	27±4	58±1
P ₃₂ -Alo-f-(Iso) ₂ /P4VPy-C ₂	92,00	81,74	11,41	40±2	13±0	63±1
P ₃₂ -Gal-p-(Iso) ₂ /P4VPy-C ₅	105,00	11,95	0,57	44±1	21±2	59±0
P ₃₂ -Gal-p-(Iso) ₂ /P4VPy-C ₂	32,00	38,57	0,81	70±0	29±1	46±1
P ₃₂ -Glu-f-Iso(OH) ₂ /P4VPy-C ₅	14,60	67,85	0,92	48±4	15±3	59±3
P ₃₂ -Glu-f-Iso(OH) ₂ /P4VPy-C ₂	112,00	89,73	13,36	50±1	12±4	56±0

CAPÍTULO IV
CONCLUSIONES

1.6 CONCLUSIONES

- Las multicapas formadas por P-Xil-f-(Iso)OH, P-Alo-f-(Iso)₂, P-Gal-p-(Iso)₂ y P-Glu-f-Iso(OH)₂ con P4VPy-C₂ y P4VPy-C₅ presentaron un aumento del espesor al aumentar el número de capas, independientemente de la naturaleza química de los grupos laterales de los diferentes polielectrolitos estudiados. Se encontró un efecto del sustituyente de la cadena lateral y del peso molecular del polielectrolito copolímero P-*aminoazúcar*, así como también una influencia del largo de la cadena alquímica del polielectrolito P4VPy-C_n.
- El proceso de construcción de multicapas de los polielectrolitos copolímeros P-Alo-f-(Iso)₂, P-Gal-p-(Iso)₂ y P-Glu-f-Iso(OH)₂ está gobernado por un *régimen regular de crecimiento* y las multicapas formadas por el polielectrolito copolímero P-Xil-f-(Iso)OH está gobernado por un *régimen exponencial de crecimiento*.
- La superficie de las multicapas está formada por la combinación de ambos polielectrolitos, presentando una morfología homogénea, agregados globulares y una topografía rugosa. La presencia de agregados globulares en la superficie fue dependiente del tipo de sustituyente de la cadena lateral del copolímero P-*aminoazúcar*. Las características de la topografía y morfología de la superficie son independientes del peso molecular del copolímero P-*aminoazúcar*.

- La humectabilidad de las multicapas fue dependiente de la naturaleza del polielectrolito copolímero *P-aminoazúcar*, mostrando valores de ángulo de contacto entre 36° y 71°, es decir, superficies de carácter hidrofóbico/hidrofílico.

- La histéresis de las multicapas fue dependiente de la naturaleza de la cadena lateral y del peso molecular del polielectrolito copolímero *P-aminoazúcar*. Las multicapas formadas por P-Gal-p-(Iso)₂/P4VPy-C₂ poseen una mayor histéresis, es decir, una superficie químicamente heterogénea. Las multicapas formadas por P-Xil-f-(Iso)OH presentaron una superficie químicamente homogénea, es decir, una menor histéresis.

- La energía superficial de las multicapas tiene una mayor contribución de la parte dispersiva predominando interacciones de corto alcance. Los valores de energía superficial variaron en un intervalo entre 46 y 63 mJm⁻².

- Las multicapas formadas por los polielectrolitos copolímeros P-Xil-f-(Iso)OH y P-Glu-f-Iso(OH)₂, tanto con P4VPy-C₂ como con P4VPy-C₅ poseen mayor capacidad antibacteriana respecto a *P. aeruginosa*. Las bacterias resistentes presentaron daño morfológico en su estructura.

- Las películas de multicapas formadas por los polielectrolitos P-Gal-p-(Iso)₂/P4Vpy-C₂, presentaron mayor capacidad antibacteriana contra *S. Typhimurium*. También presentó capacidad antibacteriana la multicapa formada por P-Alo-f-(Iso)₂, tanto con P4Vpy-C₂ como con P4Vpy-C₅.
- La capacidad antibacteriana de las multicapas resultó ser dependiente de la naturaleza química del sustituyente de la cadena lateral del polielectrolito copolímero P-aminoazúcar así como también de la interrelación de factores como la humectabilidad, el espesor, la morfología, la topografía y la energía superficial.

CAPÍTULO V

BIBLIOGRAFÍA

1.7 BIBLIOGRAFÍA

- (1) Radeva, T. *Physical chemistry of polyelectrolytes*; CRC Press, 2001; Vol. 99.
- (2) Hara, M. *Polyelectrolytes: science and technology*; CRC Press, 1992.
- (3) Tanford, C. *Physical chemistry of macromolecules*; Wiley, 1961.
- (4) Holm, C.; Joanny, J.; Kremer, K.; Netz, R.; Reineker, P.; Seidel, C.; Vilgis, T. A.; Winkler, R. In *Polyelectrolytes with defined molecular architecture II*; Springer: 2004, p 67.
- (5) Nilsson, L.; Bergenståhl, B. *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, *308*, 508.
- (6) Guzmán, E.; Ortega, F.; Baghdadli, N.; Luengo, G. S.; Rubio, R. G. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2011**, *375*, 209.
- (7) Toral, M. I.; González-Navarrete, J.; Leiva, A.; Ríos, H. E.; Urzúa, M. D. *European Polymer Journal* **2009**, *45*, 730.
- (8) Onesippe, C.; Lagerge, S. *Carbohydrate Polymers* **2008**, *74*, 648.
- (9) Dobrynin, A. V. In *Polymer Science: A Comprehensive Reference*; Möller, K. M., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2012, p 81.
- (10) Morawetz, H. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **2002**, *40*, 1080.
- (11) Förster, S.; Schmidt, M. In *Physical Properties of Polymers*; Springer: 1995, p 51.
- (12) Tripathy, S. K.; Kumar, J.; Nalwa, H. S. *Handbook of Polyelectrolytes and Their Applications: Polyelectrolytes, their characterization and polyelectrolyte solutions*; American Scientific Publishers, 2002; Vol. 2.
- (13) Fujimoto, J.; Petri, D. *Langmuir* **2001**, *17*, 56.

- (14)de Villiers, M. M.; Otto, D. P.; Strydom, S. J.; Lvov, Y. M. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2011**, *63*, 701.
- (15)Krishnan, V.; Sakakibara, K.; Mori, T.; Hill, J. P.; Ariga, K. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2011**, *16*, 459.
- (16)Claesson, P. M.; Dedinaite, A.; Blomberg, E.; Sergeyev, V. G. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **1996**, *100*, 1008.
- (17)Rojas, O. J.; Claesson, P. M.; Muller, D.; Neuman, R. D. *Journal of colloid and interface science* **1998**, *205*, 77.
- (18)Châtellier, X.; Joanny, J.-F. *Journal de Physique II* **1996**, *6*, 1669.
- (19)Podgornik, R.; Ličer, M. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2006**, *11*, 273.
- (20)Åkesson, T.; Woodward, C.; Jönsson, B. *The Journal of chemical physics* **1989**, *91*, 2461.
- (21)Tsapikouni, T. S.; Missirlis, Y. F. *Materials Science and Engineering: B* **2008**, *152*, 2.
- (22)Tang, H.; Zhang, P.; Kieft, T. L.; Ryan, S. J.; Baker, S. M.; Wiesmann, W. P.; Rogelj, S. *Acta Biomaterialia* **2010**, *6*, 2562.
- (23)Samanta, T.; Mukherjee, M.; Lausi, A. *Polymer* **2014**, *55*, 4385.
- (24)Siedenbiedel, F.; Tiller, J. C. *Polymers* **2012**, *4*, 46.
- (25)Iyer, A. K.; Greish, K.; Fang, J.; Murakami, R.; Maeda, H. *Biomaterials* **2007**, *28*, 1871.
- (26)Donati, I.; Gamini, A.; Vetere, A.; Campa, C.; Paoletti, S. *Biomacromolecules* **2002**,

3, 805.

(27)Roy, S.; Ghosh, D.; Guha, S. K. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2009**, *69*, 77.

(28)Tolstoguzov, V. *Food hydrocolloids* **2004**, *18*, 873.

(29)Singh, R.; Varma, A. *Green Chemistry* **2012**, *14*, 348.

(30)Galgali, P.; Puntambekar, U.; Gokhale, D.; Varma, A. *Carbohydrate polymers* **2004**, *55*, 393.

(31)Galgali, P.; Agashe, M.; Varma, A. *Carbohydrate polymers* **2007**, *67*, 576.

(32)Fang, W.; Cai, Y.; Chen, X.; Su, R.; Chen, T.; Xia, N.; Li, L.; Yang, Q.; Han, J.; Han, S. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2009**, *19*, 1903.

(33)Cloete, W. J.; Verwey, L.; Klumperman, B. *European Polymer Journal* **2013**, *49*, 1080.

(34)Decher, G.; Hong, J. D.; Schmitt, J. *Thin Solid Films* **1992**, *210–211, Part 2*, 831.

(35)Decher, G. *Science* **1997**, *277*, 1232.

(36)Decher, G.; Schlenoff, J. B. *Multilayer thin films: sequential assembly of nanocomposite materials*; John Wiley & Sons, **2006**.

(37)Lichter, J. A.; Van Vliet, K. J.; Rubner, M. F. *Macromolecules* **2009**, *42*, 8573.

(38)Neff, P. A.; Naji, A.; Ecker, C.; Nickel, B.; v. Klitzing, R.; Bausch, A. R. *Macromolecules* **2006**, *39*, 463.

(39)Lösche, M.; Schmitt, J.; Decher, G.; Bouwman, W. G.; Kjaer, K. *Macromolecules* **1998**, *31*, 8893.

(40)Kim, B.-S.; Vinogradova, O. I. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108*,

8161.

(41)Dubas, S. T.; Schlenoff, J. B. *Macromolecules* **1999**, *32*, 8153.

(42)Dubas, S. T.; Schlenoff, J. B. *Langmuir* **2001**, *17*, 7725.

(43)Porcel, C.; Lavalle, P.; Decher, G.; Senger, B.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P. *Langmuir* **2007**, *23*, 1898.

(44)Lourenço, J. M.; Ribeiro, P. A.; Botelho do Rego, A. M.; Braz Fernandes, F. M.; Moutinho, A. M.; Raposo, M. *Langmuir* **2004**, *20*, 8103.

(45)Amim, J.; Maia, F. C.; Miranda, P. B.; Urzua, M. D.; Petri, D. F. *Soft Matter* **2012**, *8*, 6462.

(46)Lyklema, J.; Deschênes, L. *Advances in Colloid and Interface Science* **2011**, *168*, 135.

(47)Elżbieciak-Wodka, M.; Kolasińska-Sojka, M.; Nowak, P.; Warszyński, P. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2015**, *738*, 195.

(48)Picart, C. *Current Medicinal Chemistry* **2008**, *15*, 685.

(49)Ladam, G.; Schaad, P.; Voegel, J. C.; Schaaf, P.; Decher, G.; Cuisinier, F. *Langmuir* **2000**, *16*, 1249.

(50)Ruths, J.; Essler, F.; Decher, G.; Riegler, H. *Langmuir* **2000**, *16*, 8871.

(51)Caruso, F.; Lichtenfeld, H.; Donath, E.; Möhwald, H. *Macromolecules* **1999**, *32*, 2317.

(52)Caruso, F.; Furlong, D. N.; Ariga, K.; Ichinose, I.; Kunitake, T. *Langmuir* **1998**, *14*, 4559.

(53)Caruso, F.; Niikura, K.; Furlong, D. N.; Okahata, Y. *Langmuir* **1997**, *13*, 3422.

- (54) Picart, C.; Ladam, G.; Senger, B.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P.; Cuisinier, F. J. G.; Gergely, C. *The Journal of Chemical Physics* **2001**, *115*, 1086.
- (55) Elbert, D. L.; Herbert, C. B.; Hubbell, J. A. *Langmuir* **1999**, *15*, 5355.
- (56) Picart, C.; Lavalle, P.; Hubert, P.; Cuisinier, F. J. G.; Decher, G.; Schaaf, P.; Voegel, J. C. *Langmuir* **2001**, *17*, 7414.
- (57) Leväsalmi, J.-M.; McCarthy, T. J. *Macromolecules* **1997**, *30*, 1752.
- (58) Cheng, J.; Fou, A.; Rubner, M. *Thin Solid Films* **1994**, *244*, 985.
- (59) Stroeve, P.; Vasquez, V.; Coelho, M. A.; Rabolt, J. F. *Thin Solid Films* **1996**, *284*, 708.
- (60) Sukhishvili, S. A.; Granick, S. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 9550.
- (61) Fou, A.; Onitsuka, O.; Ferreira, M.; Rubner, M.; Hsieh, B. *Journal of Applied physics* **1996**, *79*, 7501.
- (62) Stepp, J.; Schlenoff, J. B. *Journal of the Electrochemical Society* **1997**, *144*, L155.
- (63) Li, H.; Peng, L. *Carbohydrate polymers* **2015**, *124*, 35.
- (64) Tang, L.; Huynh, K. A.; Fleming, M. L.; Larronde-Larretche, M.; Chen, K. L. *Journal of Colloid and Interface Science* **2015**, *451*, 125.
- (65) Guyomard, A.; De, E.; Jouenne, T.; Malandain, J. J.; Muller, G.; Glinel, K. *Advanced Functional Materials* **2008**, *18*, 758.
- (66) Pan, Y. F.; Xiao, H. N. In *Advanced Materials Research*; Trans Tech Publ: **2011**; Vol. 236, p 1103.
- (67) Elsabee, M. Z.; Abdou, E. S.; Nagy, K. S. A.; Eweis, M. *Carbohydrate Polymers*

- 2008, 71, 187.
- (68)Cécilius, M.; Jérôme, C. *Progress in Organic Coatings* **2011**, 70, 220.
- (69)Enoch, D. A.; Birkett, C. I.; Ludlam, H. A. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2007**, 29, Supplement 3, S33.
- (70)Chen, S.; Zhao, S.; White, D. G.; Schroeder, C. M.; Lu, R.; Yang, H.; McDermott, P. F.; Ayers, S.; Meng, J. *Applied and Environmental Microbiology* **2004**, 70, 1.
- (71)Alcaine, S. D.; Warnick, L. D.; Wiedmann, M. *Journal of Food Protection®* **2007**, 70, 780.
- (72)Hur, J.; Jawale, C.; Lee, J. H. *Food Research International* **2012**, 45, 819.
- (73)Frye, J. G.; Jackson, C. R. *Frontiers in microbiology* **2013**, 4.
- (74)Pier GB, R. R. *Philadelphia: Churchill Livingstone* **2005**, 6th ed, 2587.
- (75)K, P. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, 49, 479.
- (76)Landman, D.; Bratu, S.; Alam, M.; Quale, J. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **2005**, 55, 954.
- (77)Butler, M. S.; Buss, A. D. *Biochemical pharmacology* **2006**, 71, 919.
- (78)Benowitz, A. B.; Hoover, J. L.; Payne, D. J. *Issues* **2010**.
- (79)Ricke, S. C.; Calo, J. R. In *Antimicrobial Resistance and Food Safety*; Jackson, C.-Y. C. Y. R., Ed.; Academic Press: San Diego, **2015**, p 37.
- (80)Acheson, D.; Hohmann, E. L. *Clinical Infectious Diseases* **2001**, 32, 263.
- (81)Su, L.-H.; Chiu, C.-H.; Chu, C.; Ou, J. T. *Clinical Infectious Diseases* **2004**, 39, 546.
- (82)Shaw, K.; Rather, P.; Hare, R.; Miller, G. *Microbiological reviews* **1993**, 57, 138.

- (83)Jang, J.; Kim, Y. *Chemical Communications* **2008**, 4016.
- (84)Lewis, K.; Klibanov, A. M. *TRENDS in Biotechnology* **2005**, *23*, 343.
- (85)Bromberg, L.; Hatton, T. A. *Polymer* **2007**, *48*, 7490.
- (86)Kong, M.; Chen, X. G.; Xing, K.; Park, H. J. *International Journal of Food Microbiology* **2010**, *144*, 51.
- (87)Muñoz-Bonilla, A.; Fernández-García, M. *Progress in Polymer Science* **2012**, *37*, 281.
- (88)Banerjee, I.; Pangule, R. C.; Kane, R. S. *Advanced Materials* **2011**, *23*, 690.
- (89)Park, K. D.; Kim, Y. S.; Han, D. K.; Kim, Y. H.; Lee, E. H. B.; Suh, H.; Choi, K. S. *Biomaterials* **1998**, *19*, 851.
- (90)Roosjen, A.; van der Mei, H. C.; Busscher, H. J.; Norde, W. *Langmuir* **2004**, *20*, 10949.
- (91)Boulmedais, F.; Frisch, B.; Etienne, O.; Lavallo, P.; Picart, C.; Ogier, J.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P.; Egles, C. *Biomaterials* **2004**, *25*, 2003.
- (92)Zhang, M.; Yang, F.; Pasupuleti, S.; Oh, J. K.; Kohli, N.; Lee, I. S.; Perez, K.; Verkhoturov, S. V.; Schweikert, E. A.; Jayaraman, A.; Cisneros-Zevallos, L.; Akbulut, M. *International Journal of Food Microbiology* **2014**, *185*, 73.
- (93)Chen, S.; Li, L.; Zhao, C.; Zheng, J. *Polymer* **2010**, *51*, 5283.
- (94)Bruzaud, J.; Tarrade, J.; Coudreuse, A.; Canette, A.; Herry, J.-M.; Taffin de Givenchy, E.; Darmanin, T.; Guittard, F.; Guilbaud, M.; Bellon-Fontaine, M.-N. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, *131*, 59.
- (95)Abu-Lail, N. I.; Camesano, T. A. *Langmuir* **2006**, *22*, 7296.

- (96)Harnett, E. M.; Alderman, J.; Wood, T. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* **2007**, *55*, 90.
- (97)Ohno, N.; Nitta, K.; Makino, S.; Sugai, S. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition* **1973**, *11*, 413.
- (98)Azzam, R.; Bashara, N. *Co, Amsterdam* **1977**.
- (99)De Feijter, J.; Benjamins, d. J.; Veer, F. *Biopolymers* **1978**, *17*, 1759.
- (100)Motschmann, H.; Stamm, M.; Toprakcioglu, C. *Macromolecules* **1991**, *24*, 3681.
- (101)Nylander, T.; Samoshina, Y.; Lindman, B. *Advances in colloid and interface science* **2006**, *123*, 105.
- (102)Van de Steeg, H. G.; Cohen Stuart, M. A.; De Keizer, A.; Bijsterbosch, B. H. *Langmuir* **1992**, *8*, 2538.
- (103)Picart, C.; Mutterer, J.; Richert, L.; Luo, Y.; Prestwich, G. D.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Lavallo, P. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 12531.
- (104)Lingström, R.; Wågberg, L. *Journal of colloid and interface science* **2008**, *328*, 233.
- (105)Toworfe, G. K.; Composto, R. J.; Adams, C. S.; Shapiro, I. M.; Ducheyne, P. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2004**, *71A*, 449.
- (106)Risbud, M. V.; Dabhade, R.; Gangal, S.; Bhonde, R. R. *Journal of biomaterials science. Polymer edition* **2002**, *13*, 1067.
- (107)Tsai, W.-B.; Chen, R. P.-Y.; Wei, K.-L.; Chen, Y.-R.; Liao, T.-Y.; Liu, H.-L.; Lai, J.-Y. *Acta Biomaterialia* **2009**, *5*, 3467.
- (108)Amim, J.; Maia, F. C. B.; Miranda, P. B.; Urzua, M. D.; Petri, D. F. S. *Soft Matter*

2012, 8, 6462.

(109) Campoccia, D.; Montanaro, L.; Arciola, C. R. *Biomaterials* 2013, 34, 8533.

(110) Tang, H.; Cao, T.; Liang, X.; Wang, A.; Salley, S. O.; McAllister, J.; Ng, K. Y. S. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2009, 88A, 454.

(111) Lin, J.; Qiu, S.; Lewis, K.; Klibanov, A. M. *Biotechnology and Bioengineering* 2003, 83, 168.

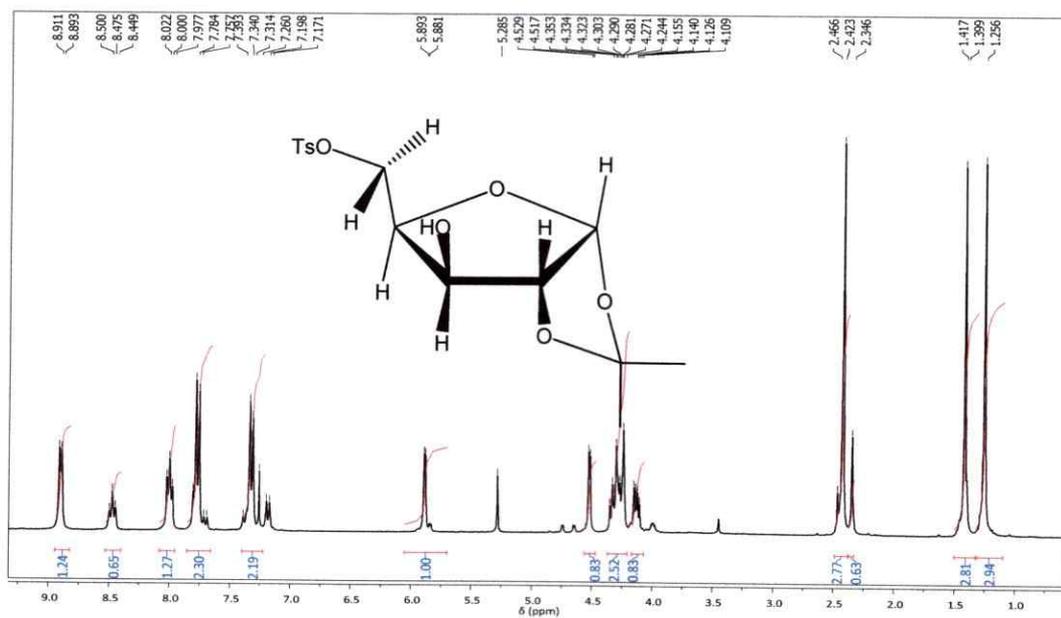
(112) Fantner, G. E.; Barbero, R. J.; Gray, D. S.; Belcher, A. M. *Nat Nano* 2010, 5, 280.

ANEXOS

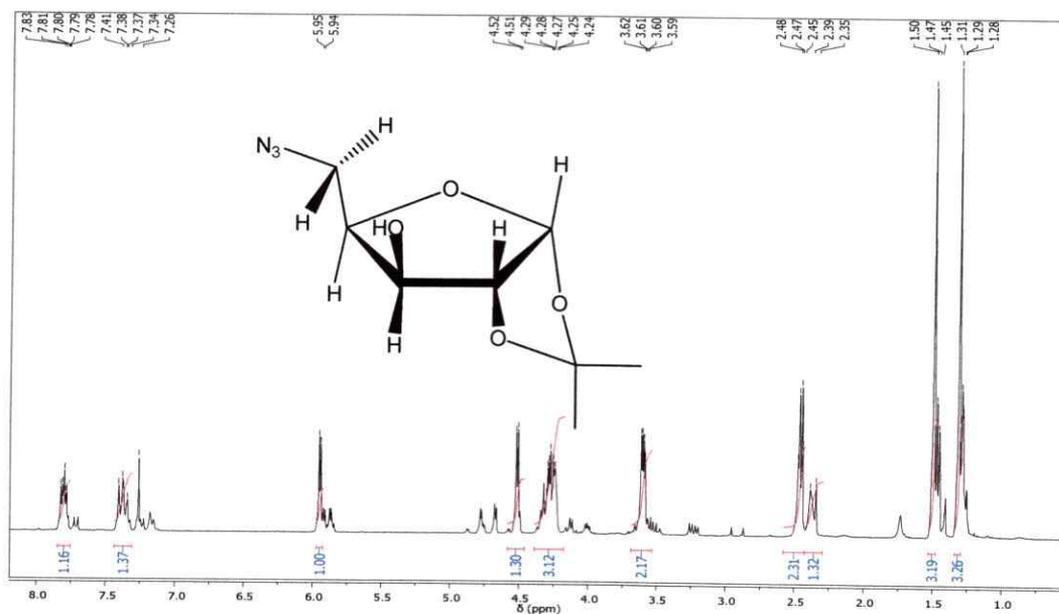
1.8 ANEXO.

RMN-¹H, (CDCl₃, 300 MHz)

- Reacción 1.1

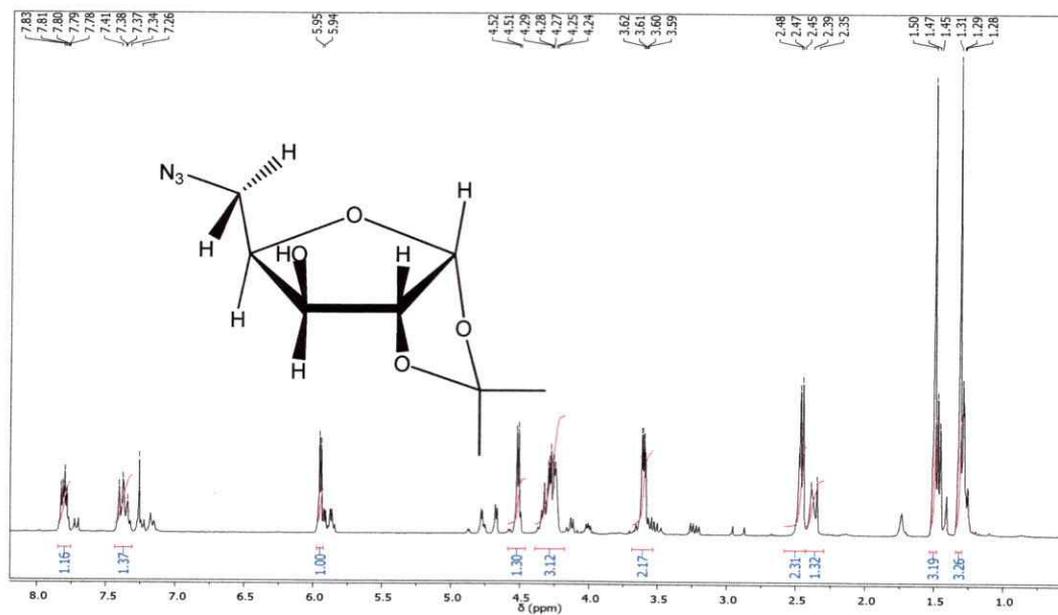


Compuesto 9. 1,2-*O*-Isopropilideno-5-*O*-tosil- α -D-xilofuranosa.



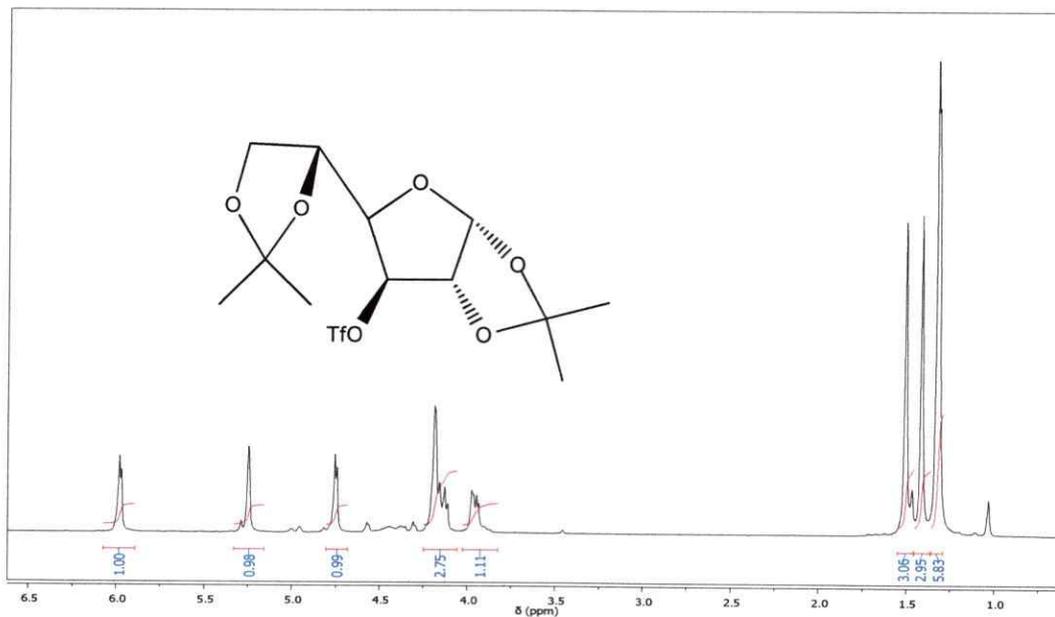
Compuesto 13. 5-Azido-5-deoxy-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranosa

• **Reacción 1.2**

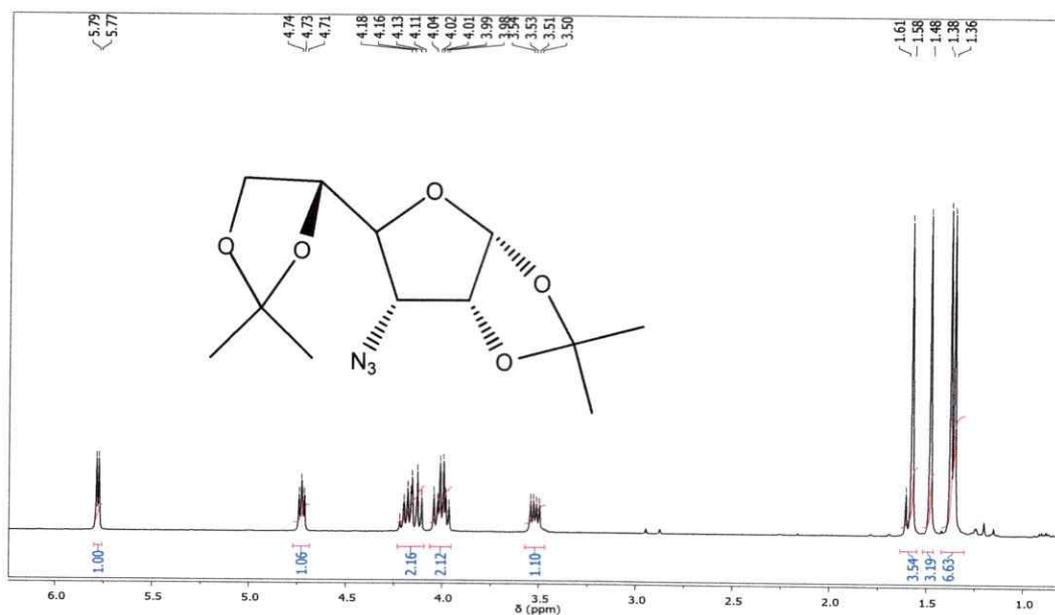


Compuesto 9. 5-Azido-6-deoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranosa.

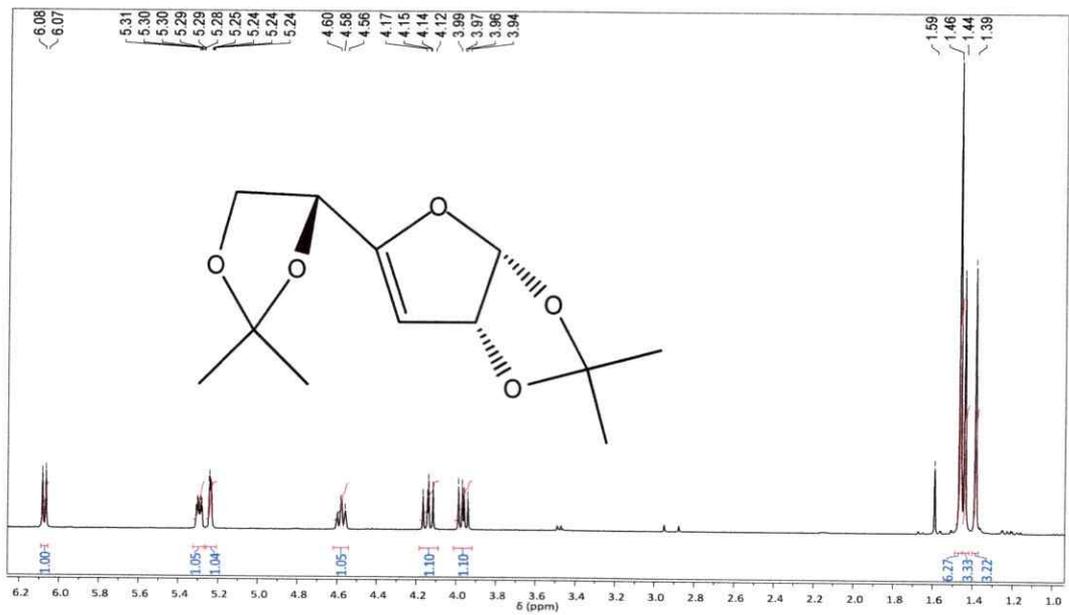
• **Reacción 2.1**



Compuesto 10. 1,2:5,6-Di-O-isopropilideno-3-O-trifil- α -D-glucofuranosa.

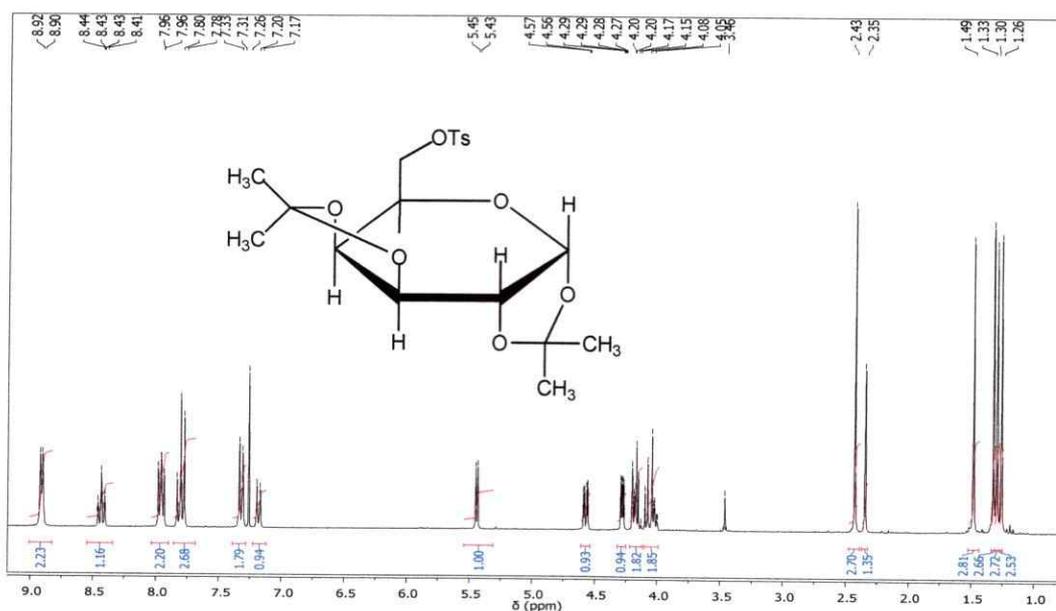


Compuesto 14. 3-Azido-3-deoxy-1,2:5,6-di-O-isopropilideno- α -D-glucofuranosa.

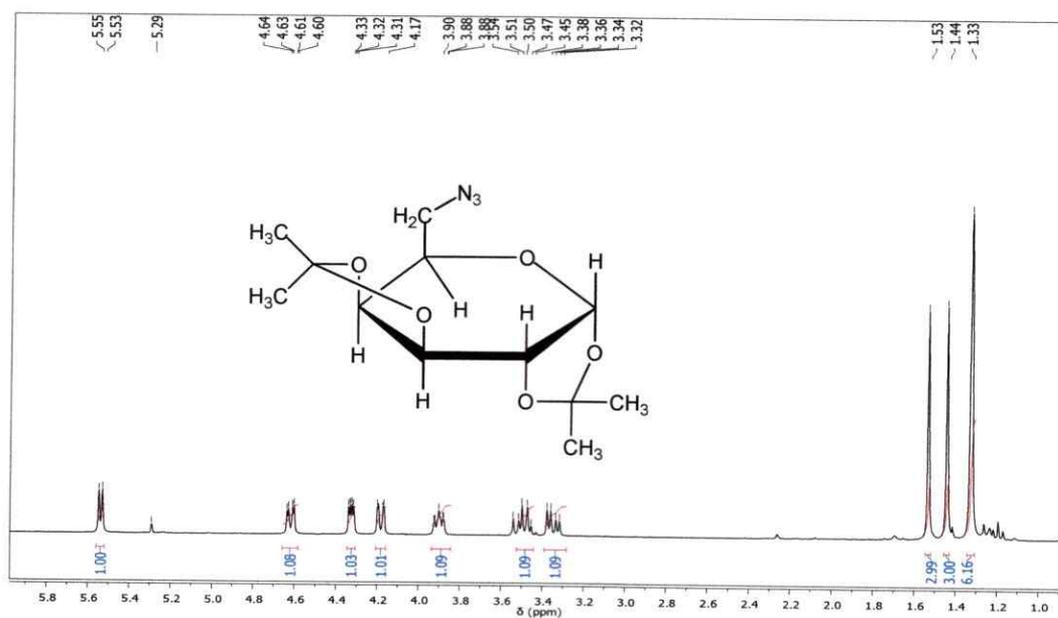


Compuesto 17. 3-Deoxi-1,2;5,6-di-*O*-isopropilideno- α -D-eritro-hex-3-enofuranosa.

• **Reacción 3.**

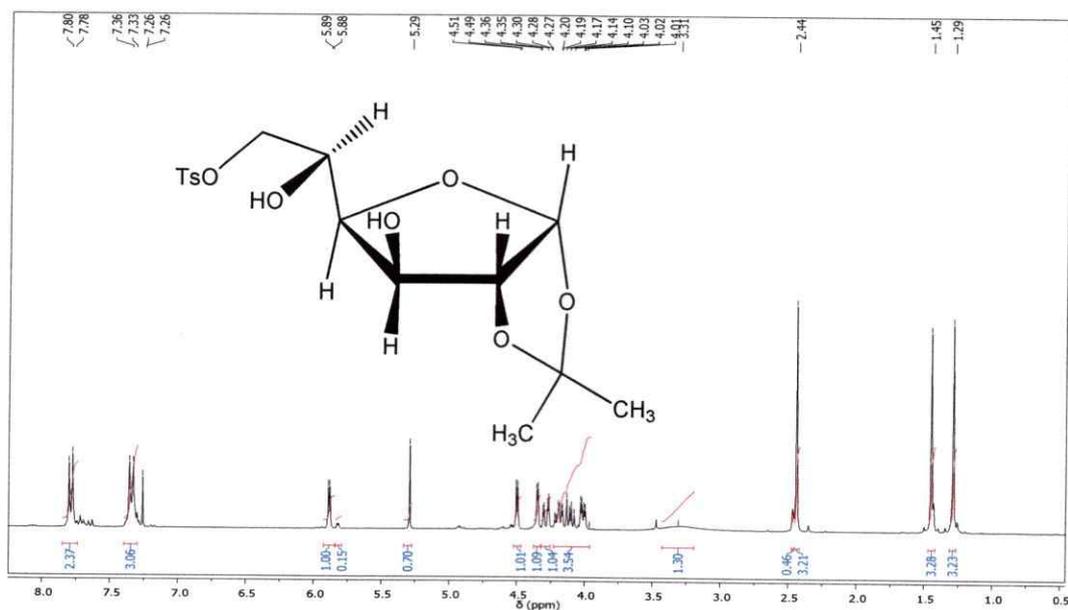


Compuesto 11. 1,2:3,4-Di-*O*-isopropilideno-6-*O*-tosil- α -D-galactopiranos.

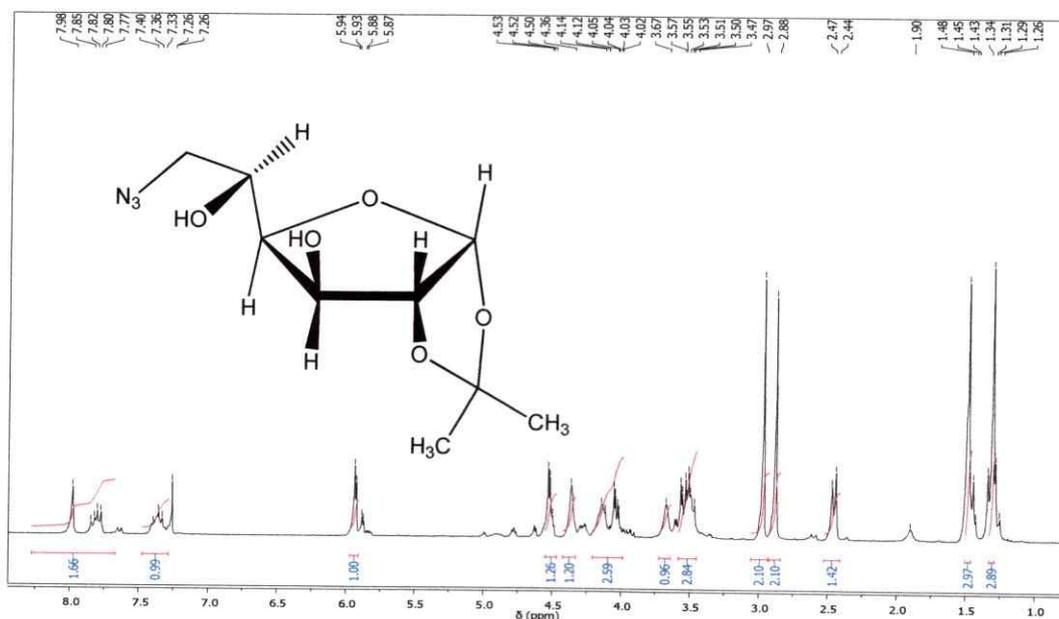


Compuesto 15. 6-Azido-6-deoxi-1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranos.

• **Reacción 4.1**

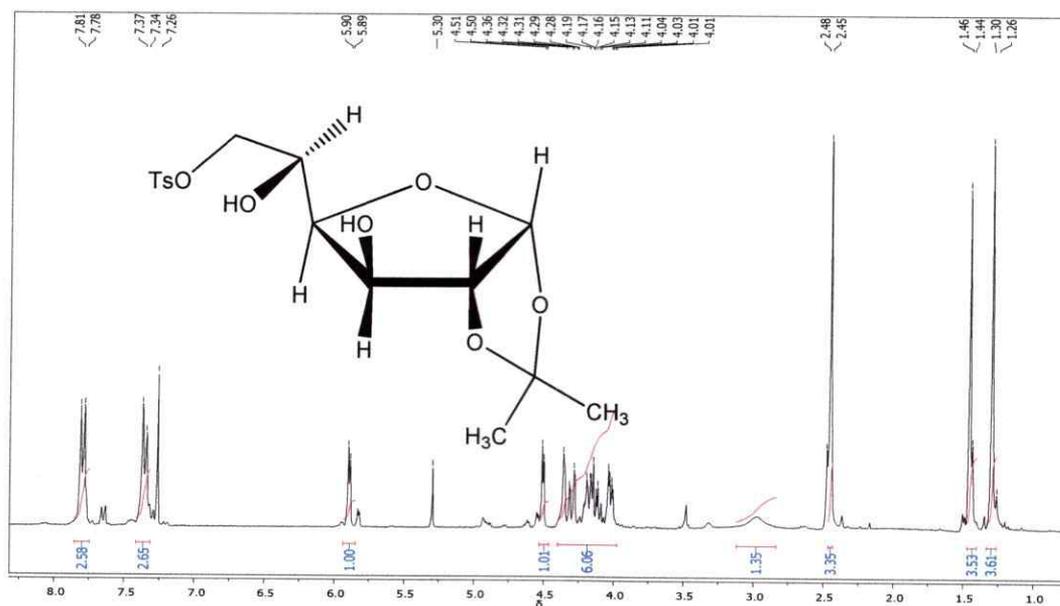


Compuesto 12. 1,2-*O*-Isopropilideno-6-tosil- α -D-glucofuranosa.

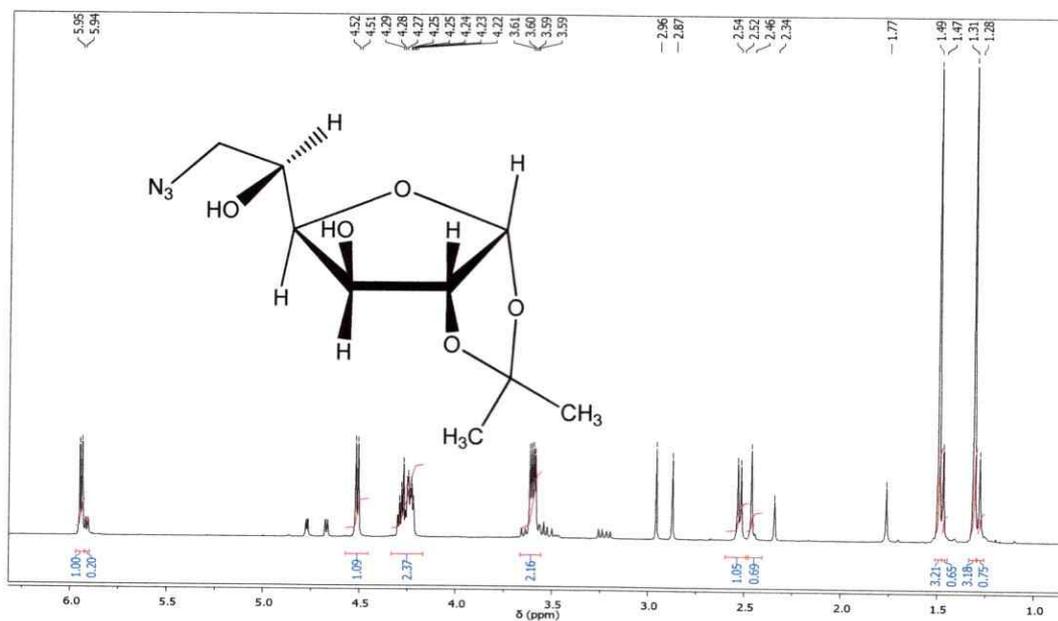


Compuesto 16. 6-Azido-6-deoxi-1,2-*O*-isopropilideno - α -D-glucofuranosa.

• **Reacción 4.2**



Compuesto 12. 1,2-*O*-Isopropilideno-6-tosil- α -D-glucofuranosa.



Compuesto 16. 6-Azido-6-deoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranosa.