



GRADO EN ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

TRABAJO FINAL DE GRADO

LENTES DE CONTACTO PROTECTORAS CON RECUBRIMIENTOS ANTIBACTERIANOS

ILYASS BOUCHAOUCH

TZANKO TZANOV y ESTER GUAUS
CARLOS DÍAZ
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR E
INDUSTRIAL Y DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



GRAU EN ÒPTICA I OPTOMETRIA

El Sr. Carlos Díaz, com a tutor/a del treball y el Sr./Sra. Tzanko Tzanov y Ester Gaus com a directors del treball

CERTIFIQUEN

Que el Sr./Sra. Ilyass Bouchaouch ha realitzat sota la seva supervisió el treball "Lentes de contacto protectoras con recubrimiento antibacteriano" que es recull en aquesta memòria per optar al títol de grau en Òptica i Optometria.

I per a què consti, signo/em aquest certificat.

Sr CARLOS DÍAZ
Tutor/a del treball

Srs Tzanko Tzanov y Ester Gaus
Directors del treball

Terrassa, 15 de enero de 2014



GRAU EN ÒPTICA I OPTOMETRIA

LENTE DE CONTACTO PROTECTORAS CON RECUBRIMIENTOS ANTIBACTERIANOS

RESUM

Resumen

El propósito de este trabajo es recubrir unas lentes de contacto postoperatorias protectoras convencionales mediante unos recubrimientos zwitteriónicos que le proporcionarían una actividad antibacteriana. Se tomarán como referencia estudios e investigaciones realizadas anteriormente que estudiaron el mismo tipo de recubrimiento en otros materiales.

La finalidad sería utilizar estas lentes de contacto con recubrimiento en vez de las convencionales ya que estas últimas son muy susceptibles a la adherencia y la posterior colonización por diversas especies de bacterias, reduciendo así molestias a los pacientes y gastos económicos para los hospitales al reducir los casos de infecciones.

Los resultados indican que el recubrimiento utilizado se adhiere con éxito en las lentes de contacto de methafilcon y que las lentes de contacto tratadas impiden en un 50 % la formación de biofilms por parte de la bacteria *Staphylococcus aureus* respecto a las lentes de contacto sin tratar.

Resum

El propòsit d'aquest treball es recobrir unes lents de contacte post-cirurgies protectores convencionals amb uns recobriments zwitterionics que li proporcionarien una activitat antibacteriana. La línia de treball estarà basada en estudis i investigacions anteriors que han estudiat el mateix tipus de recobriments en altres materials.

La finalitat seria utilitzar aquestes lents de contacte amb els recobriments en comptes de les convencionals ja que aquestes últimes son molt susceptibles a l'adherència i la posterior colonització per diverses espècies de bacteries, reduint així molèsties als pacients i despeses econòmiques als hospital al reduir el nombre d'infeccions.

Els resultats indiquen que els recobriments utilitzats s'adhereixen amb èxit a les lents de contacte de methafilcon i que les lents de contacte tractades redueixen un 50% la formació de biofilms per part de la bactèria *Staphylococcus aureus* respecte a les lents de contacte convencionals.

Abstract

The aim of this investigation is to coat conventional postoperative contact lenses by a zwitterionic coating to provide them an antibacterial activity. We will take as reference previous investigations that studied the same coatings in other materials.

The purpose is to use these coated contact lenses instead of conventional ones because the latter are very susceptible to adhesion and subsequent colonization by different species of bacteria, reducing patient discomfort and economic costs for hospitals.

The results show that the the coating is successfully adhered on methafilcon contact lenses and that the treated contact lenses reduce in 50% the formation of *Staphylococcus aureus* biofilms respect to the non-treated contact lenses.

Extended abstract

In the interventions of the ocular anterior segment and particularly those related to the cornea, patients suffer a postoperative pain due to the changes that have taken place there. The pain is temporary but it is a frequent collateral effect after these interventions.

Soft contact lenses after the intervention cover the exposed corneal nerve endings acting as a barrier against the abrasion of the eyelids and facilitating the epithelization of the area, thus reducing the pain in the patient.

The use of postoperative contact lenses has increased over the last years since it has increased the number of interventions due to the technological advancement of the hospitals and the improvement of instruments designed to carry out such operations.

However, the use of postoperative contact lenses is not always possible because some interventions entail postoperative complications. Its use may be even improper because they can accelerate the infections that arise after the operations.

Contact lenses are materials in which it is relatively easy for bacteria to adhere and create biofilms. This can create disturbances and infections in the affected area. This can complicate the postoperative and in some cases a second surgery is required.

The aim of this investigation is to cover normal postoperative contact lenses with an antibiofilm coating using a technology already developed in the research group. These previous investigations proved the efficiency of the coatings against bacterial adhesion on silicone-based catheters.

Treatments will be based on coating the surface with phenolic and zwitterionic compounds. Using enzymatic methods to graft them on the contact lenses we will limit the growth of bacterial biofilms over their surface.

In previous researches, the process had been studied within the GBMI Group (in which this investigation has been developed) in order to coat silicone surfaces (waterproof material) but had never been tested in permeable materials such as a contact lens.

The process consists in covering the material with three types of coatings:

The first step consists in the silanization of the contact lens surface covering it with (3-aminopropyltriethoxysilane (APTES), an amino terminated alcoxysilane. The purpose is to provide free amino groups to the surface in order to facilitate the second coating.

The second step consists in coating the gallic acid, a natural phenolic compound, into the surface using an enzyme (laccase). The aim is to provide the surface by phenolic groups to increase the antioxidant and antimicrobial activity of the material.

The ultimate step consists in providing the surface by sulfobetaine methacrylate (SBMA) which is a zwitterionic compound (neutral molecule with a positive and a negative electrical charge in different atoms). The zwitterionic coating will provide the surface by the final antibiofilm activity.

After the process we will test the efficiency of the antibiofilm coatings. We check the antibiofilm activity by two tests:

Protein adsorption test: In this test we observed the adherence of a couple of proteins into a conventional contact lens and a contact lens with the coating.

Antibiofilm test: in this test we compare the biofilm formed over a conventional contact lens and the contact lens with coating after a fixed period.

We checked also the optical, geometrical and oxygen transmission properties before and after the treatments.

Results:

Protein adsorption test: we have obtained that the conventional contact lens is more susceptible to protein adherence than the contact lens with coating, even after one week incubation in simulated tear fluid.

Antibiofilm test: we have observed more biofilm on the conventional contact lens than on the contact lens with coating.

Optical, geometrical and oxygen transmission test: we have not observed considerable changes regarding optical and oxygen transmission properties, the only significant change was the reduction of the contact lens diameter in 2 mm.

In conclusion:

We found that the coating applied on the contact lens is effective against biofilm formation.

We tested the material and coatings without real patients. Before using the coated contact lens in real patients, we have to make more tests (different bacteria, different conditions...) and we have to test the biocompatibility of the material.



Agradecimientos

Agradecimientos al tutor y a los directores de este trabajo
CARLOS DÍAZ, TZANKO TZANOV y ESTER GUAUS.

Y agradecimientos también a mis familiares y a toda la
gente que me ha apoyado a realizar este trabajo.

Gracias.

Índice

A. Introducción.....	9
B. Parte Teórica.....	10
1. Alteraciones, operaciones y complicaciones post operatorias corneales.....	10
1.1. Alteraciones más comunes.....	10
1.2 Flora microbiana del ojo.....	10
2. Formación de biofilm.....	12
3. Función, estructura y composición de la película lagrimal.....	13
3.1. Producción de lágrima.....	14
3.2. Estructura de la película lagrimal.....	15
3.3. Composición de la película lagrimal.....	16
4. Enzimas.....	17
4.1. Clasificación de las enzimas.....	18
4.2. Lacasa.....	19
C. Parte experimental.....	20
5. Materiales y métodos.....	20
5.1. Materiales y reactivos utilizados.....	20
5.2. Composición de las LC.....	21
5.3. Proceso de recubrimiento.....	23
5.3.1. Recubrimiento con 3-sminopropil)trietoxisilano (APTES)(Silanización).....	23
5.3.2. Caracterización de la lacasa.....	24
5.3.3. Recubrimiento con ácido gálico.....	26
5.3.4. Recubrimiento zwitteriónico.....	28
5.3.5. Análisis FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)	29
5.4. Test anti bacteria.....	30
5.4.1. Preparación de la solución lágrima artificial.....	30
5.4.2. Adsorción de proteína y estabilidad del recubrimiento.....	31
5.4.3. Prueba anti-biofilm (Staphylococcus aureus)	32
5.5. Pruebas ópticas y geométricas.....	34
5.6. Prueba de medida del DK.....	34
D. Resultados y discusión.....	35
6. Proceso de recubrimiento.....	35
6.1. Recubrimiento con APTES (Silanización)	35
6.2. Recubrimiento con ácido gálico injertado mediante lacasa.....	37



6.3. Recubrimiento con Zwitterión.....	38
6.4. Comparación de FTIR de todos los recubrimientos.....	40
7. Tests anti-bacteria.....	41
7.1. Prueba de la proteína.....	41
7.2. Prueba antibiofilm.....	43
E. Conclusión.....	45
Bibliografía.....	46

A. Introducción

En las intervenciones del segmento anterior ocular y sobre todo las relacionadas con la córnea, los pacientes experimentan dolor postoperatorio debido a los cambios que ha habido en la superficie anterior del ojo. Si bien es algo transitorio, es un efecto colateral frecuente después de estos procedimientos.

El uso de lentes de contacto (LC) blandas durante el periodo posterior a la intervención tiene entre otros objetivos conseguir un alivio del dolor al cubrir las terminaciones nerviosas corneales expuestas constituyendo así una barrera contra la abrasión de los párpados y además favorecen la epitelización. [1]

El uso de LC postoperatorias ha aumentado a lo largo de los últimos años debido a que ha aumentado el número de intervenciones por el avance tecnológico de los hospitales y la mejora de los instrumentos diseñados para llevar a cabo estas operaciones.

Sin embargo, el uso de LC no es siempre posible porque se dan complicaciones postoperatorias en algunas de las intervenciones e incluso puede resultar inapropiado su uso ya que pueden acelerar o agravar enfermedades o infecciones que surgen después de las operaciones.

Las LC son superficies en las cuales es relativamente fácil que se adhieran bacterias pudiendo crear alteraciones e infecciones de la zona intervenida. Incluso se puede requerir una segunda intervención o se puede inducir la pérdida funcional de la zona afectada.

El objetivo de este trabajo es recubrir unas lentes de contacto con un recubrimiento antibiofilms. Se aplicarán unos recubrimientos utilizados en otras investigaciones anteriores y que han resultado eficaces a la hora de evitar la adhesión de bacterias sobre las superficies tratadas con ellos.

La idea es recubrir LC normales de hidrogel convencional o de hidrogel de silicona, disponemos de LC de diferentes materiales y de distintas casas comerciales. Se analizarán los diferentes materiales y se probará cual es el más idóneo para estos recubrimientos.

Una de las investigaciones más recientes y en la cual nos vamos a basar consistía en el tratamiento de catéteres urinarios con el mismo tipo de tratamiento [2].

Los tratamientos se basarán en recubrir la superficie con compuestos fenólicos y zwitteriónicos, componentes que aplicados utilizando métodos enzimáticos dotan a las superficies tratadas con unas propiedades que retrasan el crecimiento de biofilms bacterianos.

El proceso realizado en las investigaciones y experimentos anteriores ya habían sido estudiados dentro del grupo GBMI (en el que se ha desarrollado el presente trabajo) para superficies de tipo silicona (material impermeable) pero nunca se había utilizado en materiales permeables como son unas LC.

B. Parte Teórica

1. Alteraciones, operaciones y complicaciones post operatorias corneales

La cornea, debido a su estructura y a su posición, es uno de los órganos del cuerpo humano más expuesto a los daños externos tanto químicos como mecánicos. Es por esto que es uno de los más afectados tanto por traumatismos como por infecciones.

Este factor, al mismo tiempo, la convierte en una superficie fácil de diagnosticar y de intervenir quirúrgicamente.

Las intervenciones quirúrgicas que tienen como fin restaurar la estructura y el estado de las córneas se ha convertido en algo esencial.

Hoy en día se pueden intervenir muchos de los problemas que tienen que ver con la córnea debido al avance tecnológico en los instrumentos indicados para ello. Así que no es de extrañar que en los hospitales haya incrementado el número de intervenciones quirúrgicas de córnea. [3]

Entre algunas de las operaciones que se realizan destacamos la cirugía refractiva, la cirugía de cataratas y los trasplantes de corneal.

1.1 Alteraciones más comunes

Las alteraciones postquirúrgicas tienen diferentes orígenes o causas dependiendo del tipo de intervención que se haya realizado. En este caso y para el propósito de éste trabajo, tendremos en cuenta únicamente las complicaciones postoperatorias infecciosas (endofthalmitis o queratitis microbiana entre otras).

La endofthalmitis consiste en la infección y la posterior inflamación de los tejidos intraoculares. Y la queratitis consiste en la inflamación corneal.

El origen de todas estas infecciones suele ser debido a un microorganismo patógeno ya sea una bacteria, un virus o un hongo.

Los métodos por los cuales estos microorganismos infectan la superficie corneal son muy diversos y a veces resulta de gran dificultad controlarlos. Entre ellos destacamos: la utilización de instrumentos contaminados introduciendo así las nuevas bacterias en el ojo intervenido; la presencia de bacterias o infecciones antes de la intervención; y la introducción de bacterias junto con el tejido que se trasplanta. [4]

1.2 Flora microbiana del ojo

En la superficie anterior de cualquier ojo hay numerosos y diversos tipos de microorganismos tanto patógenos como no patógenos. Para el trabajo, tendremos en cuenta únicamente las bacterias.

En aproximadamente el 25% de los ojos normales (no infectados) hay algún tipo de microorganismo patógeno. [5] La presencia de éstos en los ojos de los pacientes antes de las intervenciones o la posible adhesión durante o después de la intervención puede ocasionar algún tipo de infección.

En los ojos que no presentan ningún tipo de complicación corneal encontramos los siguientes tipos de bacterias:

Germen	Frecuencia	%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	234	67.0
<i>Corinebacterium sp</i>	75	21.5
<i>Staphylococcus hominis-homonis</i>	16	4.6
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	3.7
<i>Streptococcus grupo viridans</i>	12	3.4
<i>Micrococcus sp</i>	12	3.4
<i>Enterococcus faecalis</i>	9	2.6
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	9	2.6
<i>Streptococcus haemolyticus</i>	7	2.0
<i>Staphylococcus auricularis</i>	7	2.0

Tabla 1. Prevalencia de los diez principales Gérmes identificados según estudio [5]

En ojos infectados encontramos una gran variedad de microorganismos. El número y tipo de bacterias dependerán del tipo de infección. Tomando las endoftalmitis como ejemplo, tenemos los siguientes resultados.

Patógeno	Incidencia (%)	Gérmes grampositivos (%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	37,7	86,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,5	
<i>Streptococcus spp.</i>	28,4	
<i>Pneumococcus spp.</i>	9,4	
<i>Corynebacterium spp.</i>	1,9	
<i>Micrococcus spp.</i>	1,9	
Patógeno	Incidencia (%)	Gérmes gramnegativos (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,7	13,3
<i>Citrobacter spp.</i>	3,8	
<i>Proteus mirabilis</i>	1,9	
<i>Escherichia coli</i>	1,9	

Tabla 2. Incidencia de patógenos identificados en las endoftalmitis postoperatorias agudas, según estudio [6]

Para otros tipos de infección, puede haber diferente origen [7]:

- Conjuntivitis: *Chlamydi*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*.
- Queratitis: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acanthamoeba*.

- Infecciones asociadas a lentes de contacto: *Acanthamoeba*.

Hay otras bacterias que pueden causar infecciones oculares pero tienen muy poca incidencia. Las más comunes son las que se han descrito en este apartado.

2. Formación de biofilm

Las bacterias presentes en el medio ambiente a menudo crecen en forma de biopelícula, llamada también biofilm. Este tipo de estructura es muy útil y ventajoso para las células bacterianas, ya que les permite adaptarse mejor a las cambiantes condiciones ambientales. Los biofilms son comunidades de poblaciones individuales o múltiples que están incrustados en algún tipo de superficie. Las células bacterianas incluidas en esta estructura producen sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que las rodean y protegen contra las agresiones externas.

Estas estructuras se encuentran en todo tipo de ambientes, tanto naturales como antrópicos. Su desarrollo está condicionado por la presencia de agua, nutrientes y oxígeno (para las bacterias aeróbicas). Las bacterias patógenas a menudo forman biofilms en el cuerpo humano, por ejemplo en los pulmones o en el tracto urinario. Estos biofilms también pueden crecer en prótesis sintéticas o LC, resultando en su destrucción o colonización.

Las bacterias presentes en forma de biofilms son más peligrosas por varias razones. En primer lugar, los EPS secretados por las bacterias para unirse entre ellas y a la superficie colonizada también les sirven como escudo frente a la acción de los antibióticos y de los mecanismos de defensa de nuestro sistema inmunológico. En segundo lugar, las bacterias presentes en los biofilms pueden ser muy diversas, por lo que intentar eliminarlas es más difícil, ya que algunos agentes que actúan sobre determinadas bacterias eliminándolas pueden ser ineficaces frente a otras. Además, la naturaleza dinámica del biofilm permite la dispersión rápida de gran cantidad de células y repoblación de nuevas superficies [8].

El proceso de formación de los biofilms se puede generalizar en cinco etapas (Figura 1). Las etapas uno y dos se identifican generalmente por una asociación transitoria con la superficie, seguido por un sellado resistente del biofilm. Las etapas tres y cuatro implican la agregación de células en microcolonias y el crecimiento y la maduración posterior. La quinta etapa se caracteriza por un retorno a la motilidad transitoria donde las células del biofilm se pueden desprender y volver a reproducirse en otros entornos [9].

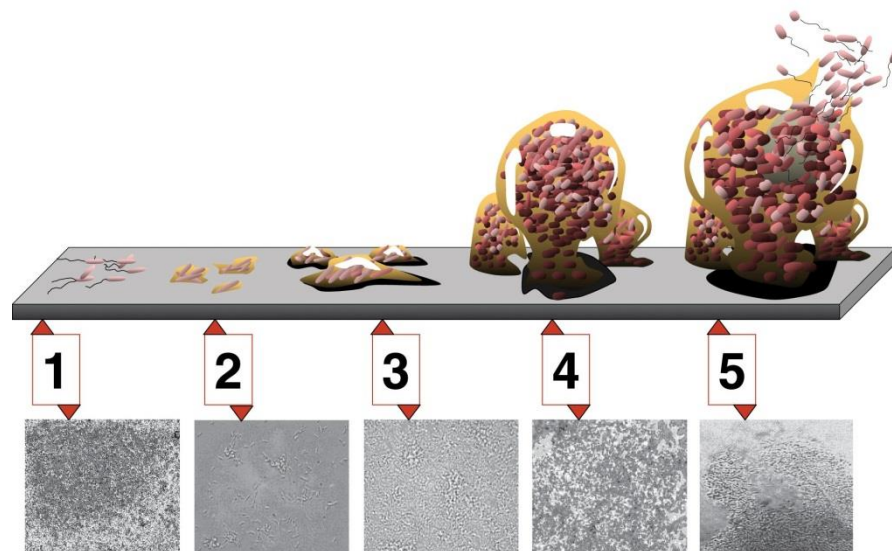


Figura 1. Proceso de formación de biofilm de una *Pseudomonas aeruginosa*.

Evitando la primera fase, que es la adhesión de las bacterias sobre la superficie de la LC mediante un tratamiento superficial, se podrían evitar las etapas posteriores de la formación del biofilm evitando así la reproducción de las bacterias en esa superficie.

3. **Función, estructura y composición de la película lagrimal**

Para conocer las condiciones en las que van a ser usadas las LC tratadas hay que analizar la naturaleza y la composición lagrimal ya que éste será el medio en el cual estará puesta.

La película lagrimal, el epitelio corneal, la córnea, la conjuntiva, las glándulas lagrimales y los párpados constituyen una unidad funcional. La finalidad de esta unidad es garantizar que el ojo funcione de la manera más correcta posible y garantizar la máxima calidad de la información que entra a través de la córnea a la retina. [10]

Para conseguir esto, cada uno de los elementos de esta unidad debe realizar su función, ya que al estar interrelacionados entre sí el mal funcionamiento de uno afecta el funcionamiento de los otros.

De todos los componentes de la unidad funcional, la película lagrimal es la estructura más dinámica. Se podría considerar como una matriz extracelular, juega un papel complejo y activo en la regulación de funciones epiteliales e interactúa estrechamente con los tejidos circundantes. Las similitudes de las funciones de la película lagrimal a los de una matriz extracelular son notables, ya que proporciona los nutrientes y ruta de comunicación, distribuye factores reguladores, y proporciona una vía para que las células (por ejemplo, células inflamatorias) alcancen el epitelio.

La producción y el volumen de lágrima es esencial para mantener la salud de la superficie ocular y para contrarrestar desafíos ambientales o corporales. Las lágrimas

limpian, lubrican, nutrir la superfície del ojo, y proporcionan protecció física e immune contra algunes infeccions.

Entre la pel·lícula lagrimal y el aire exterior se constitue la superfície de refracció inicial. La interfase còrnea-aire es la dioptría mäs fuerte del sistema óptico del ojo (cerca de 45 dioptrías). En el pasado, la presencia de la pel·lícula lagrimal se ha descartado a la hora de calcular el poder dióptrico de la còrnea debido a su delgadez y debido a la pequeña diferencia de su índice de refracció con el de la còrnea.

La alteració de la cantidad o calidad de la pel·lícula lagrimal comporta la alteració de toda la unidad estructural pudiendo llegar a causar una gran variedad de alteraciones de la superfície ocular.

3.1 Producció de lágrima

La producció de lágrimas se regula a través de un bucle de reflejo. La superfície ocular (conjuntiva, còrnea, glándulas lagrimales accesorias y glándulas de Meibomio) y las glándulas lacrimales principales actúan con este bucle neuronal para regular la producció de lágrima necesaria para la homeostasis (autorregulació) y la reparació de la superfície ocular. [10]

La estimulació de los nervios de la superfície ocular o en la mucosa nasal envía impulsos al cerebro a través del quinto nervio craneal, a partir de estos impulsos se genera una respuesta refleja a través de los nervios que llegan a las diferentes glándulas lagrimales. Los impulsos nerviosos generados por estímulos emocionales también interfieren en este bucle reflejo.

Del mismo modo, la irritació de la superfície ocular de factores como la evaporació excesiva, baja humedad o lentes de contacto, resulta en la estimulació aferente crónica provocando un incremento en la secreció lagrimal.

La pel·lícula lagrimal se extiende por la superfície gracias a lo parpados.

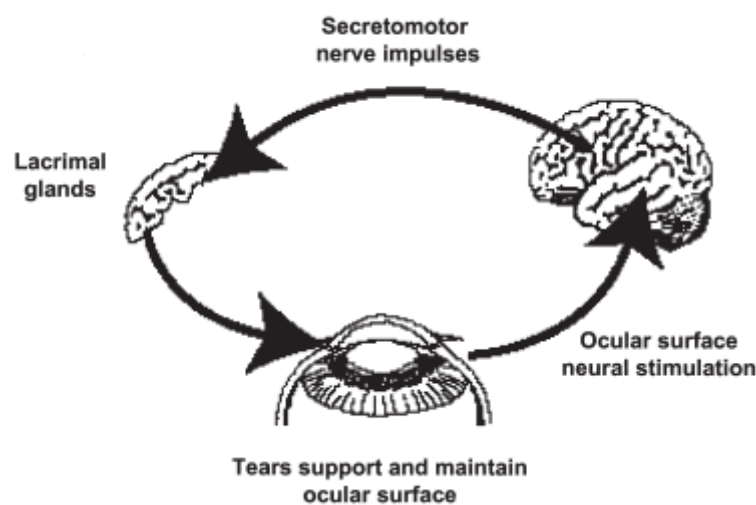


Figura 2. Proceso de estimulación y producción de lágrima.

3.2 Estructura de la pel·lícula lagrimal

La pel·lícula lagrimal se compone de tres componentes principales, cada uno de los cuales se ha descrito clásicamente como una capa separada que realiza una función específica. Los límites y el espesor de las capas están actualmente en discusión. [10]

- Capa mucínica:

La capa de mucina interior es producida por las células caliciformes conjuntivales y por las células epiteliales de la conjuntiva y la córnea. El epitelio corneal y conjuntival sintetizan una glucoproteína similar a la mucina (MUC1) en la superficie apical del epitelio para constituir el glicocálix. Esta mucina transmembrana tiene la función de la humectación de la superficie ocular para garantizar una buena distribución de la película lagrimal. Impide la adhesión de cuerpos extraños, células, o agentes patógenos a la superficie ocular. La mayor parte del contenido mucínico de la película lagrimal se produce por la secreción de las células caliciformes de la conjuntiva.

La capa mucínica constituye la parte viscoelástica de la lágrima, esto ayuda a la correcta extensión de la lágrima, la conservación de la potencia dióptrica de la película lagrimal y la protección de la superficie ocular durante el parpadeo.

- Capa acuosa:

Las glándulas principales y accesorias, bajo diferentes estímulos (hormonales, simpático, parasimpático) producen la denominada capa acuosa.

Esta capa es cuantitativamente la más importante y es la responsable de crear el ambiente correcto para las células epiteliales de la superficie ocular proporcionándoles nutrientes esenciales y oxígeno. Esto permite el movimiento de células sobre la superficie ocular y el lavado de los restos del tejido epitelial, elementos tóxicos y cuerpos extraños.

Los cambios en su composición se producen con bastante rapidez en respuesta a las condiciones ambientales o corporales y pueden influir en la salud, la proliferación, la maduración, y el movimiento de las células epiteliales superficiales.

- Capa lipídica:

Las glándulas de Meibomio, situadas dentro de las placas del tarso, secretan su producto lipídico en los márgenes de los párpados y forman la capa lipídica externa de la película lagrimal.

La función principal de la capa lipídica es evitar la evaporación excesiva de la lágrima y mejorar la estabilidad de la película lagrimal. La presencia de una capa lipídica lisa también es importante a la hora de proporcionar una buena superficie dióptrica.

La acción de parpadeo se piensa que es importante en la liberación de las secreciones lipídicas de las glándulas de Meibomio.

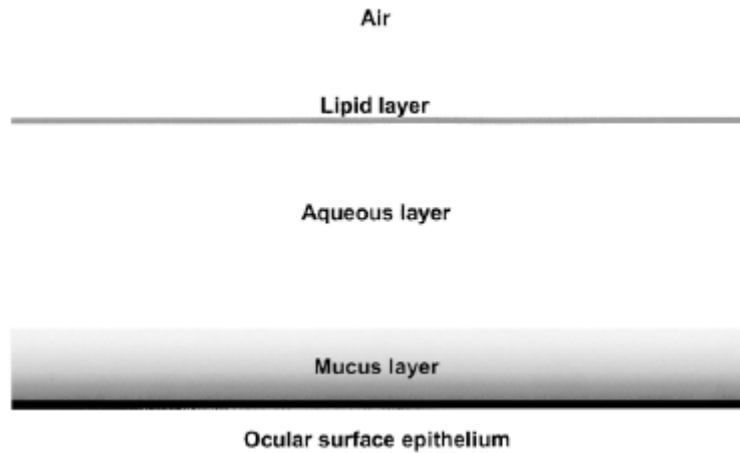


Figura 3. Estructura de la pel·lícula lagrimal, teoria de les tres capes

La teoria de la pel·lícula lagrimal anterior pot resultar controvertida per segons quins autors. Hi ha qui considera la pel·lícula lagrimal com a dos capes on, sota la capa lipídica, hi ha un gel acuos i mucínic, on les mucines tenen un gradient decreixent de concentració des de l'epiteli a la superfície.

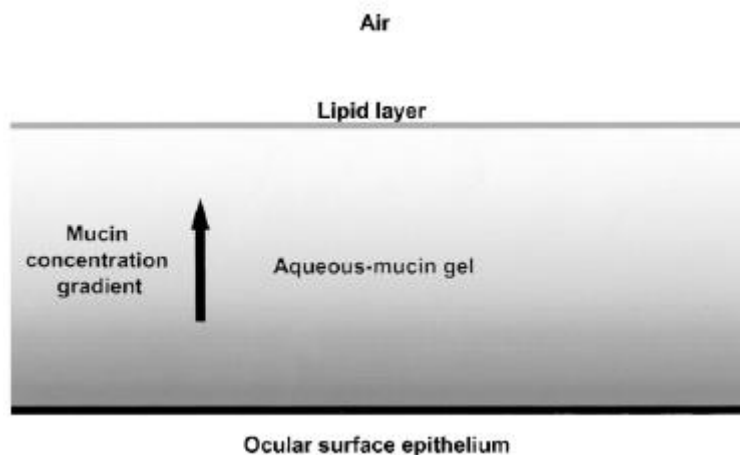


Figura 4. Estructura de la pel·lícula lagrimal, teoria de les dues capes

3.3 Composició de la pel·lícula lagrimal

La pel·lícula lagrimal està exposada a la superfície exterior, aquesta condició fa que estigui exposada a molts fenòmens i a moltes variables tant internes com externes, per tant, depenent de la situació, el lloc, l'entorn, etc., la seva composició variaria considerablement.

No obstant això, mitjançant estudis realitzats, s'han obtingut resultats contrastats i que es poden prendre com a referents per a aquest treball.

Las composiciones varían del estudio, pero se pueden tomar como referencia los valores promedio que proporciona el estudio. [11]

<i>Component</i>	<i>Average Con- centration *</i>	<i>Max. Value Quoted</i>	<i>Min. Value Quoted</i>
Total protein	786	960 ⁶⁴	652 ²²
Lysozyme	185.5	555 ²⁹	65 ⁸
Albumin	130	390 ³²	1.03 ²⁸
Tear-specific pre-albumin	123	184 ³⁰	52 ²²
Lactoferrin	210.5	340 ⁴⁰	81 ⁶⁵
IgA	29.0	85 ³⁴	4.1 ⁶⁶
IgG	13.1	79 ³⁶	Trace ^{34,36}
IgM	1.39	5.0 ³⁷	0 ^{31,34,38}
IgE	0.017	0.02 ³¹	0.003 ³⁷
Total lipid	205.5	240 ²²	180 ⁶²
Cholesterol	64.3	195 ³⁹	8.0 ⁴⁰
Glucose	10.7	65 ⁴¹	0 ^{42,27}
Ascorbic acid	6.8	23 ⁴³	0.14 ²⁷
Chloride	469.6	512.9 ⁴⁴	85 ⁴⁵
Sodium	337.8	354 ²²	326.6 ²⁷
Calcium	3.94	8.0 ²³	1.2 ²³
Potassium	82.7	137 ²²	58.7 ²⁷

Tabla 3. Composición (mg/100 mL) de la película lagrimal obtenida de diferentes estudios. Representa los mg/100ml de cada compuesto. [11]

4. Enzimas

Para recubrir la lente con los tratamientos con función antibacteriana, es necesaria la utilización de una enzima (Lacasa).

Las enzimas son proteínas que participan activamente en las reacciones bioquímicas de todos los sistemas vivos de una manera rápida, selectiva y eficiente. Aumentan la tasa de estas reacciones sin sufrir ninguna modificación química permanente en su estructura.

Las enzimas pueden llevar a cabo las catálisis debido a que son moléculas de proteína con estructura terciaria globular, lo cual hace que tengan en su superficie entrantes con una forma y una distribución de cargas determinada. En estos entrantes, también llamados centro activo, solo puede encajar un tipo reducido de moléculas (sustratos) por lo que las enzimas muestran una gran selectividad a la hora de catalizar reacciones.

Mientras el sustrato está encajado en el centro activo, formando el llamado complejo enzima-sustrato, tiene lugar la transformación del sustrato dando lugar a los productos de reacción. Estos se separan de la enzima quedando el centro activo de esta libre y la enzima lista para volverse a unir a otras moléculas del sustrato. En el proceso las enzimas no sufren ningún tipo de cambio.

Al ser unas moléculas de estructura terciaria globular, están condicionados por las condiciones del medio en el que tiene lugar la reacción.

Así el pH, puede alterar la forma de la molécula de la enzima dificultando, o incluso, impidiendo su unión con el substrato sobre el cual actúa. En general, hay un valor de pH en el cual la actividad es máxima (pH óptimo). Para valores muy alejados de este óptimo la enzima no funciona, pudiendo llegar a la pérdida irreversible de su forma (desnaturalización de la enzima).

En el caso de la temperatura, la actividad aumenta al aumentar la temperatura y cuando es muy baja no hay reacción apreciable. Al aumentar la temperatura, también se altera la estructura y cuando se alcanza un cierto valor la enzima empieza a dejar de funcionar, pudiendo llegar a desnaturalizarse. Es por eso que las enzimas, considerando las dos condiciones anteriores, tienen una temperatura de reacción óptima también.

La presencia de algunas otras sustancias también afecta su actividad, como los inhibidores o los aceleradores.

4.1 Clasificación de las enzimas

Según BRENDA Database (organización que estudia las enzimas), hay más de 5700 enzimas con poder catalítico. Cada enzima se tiene un número de comisión (EC) establecido.

La clasificación de todos ellos se hace en base a qué tipo de reacción catalizan:

Grupo	Acción	ejemplos
Oxidoreductasas	Catalizan reacciones de oxidorreducción. Tras la acción catalítica quedan modificados en su grado de oxidación por lo que debe ser transformados antes de volver a actuar de nuevo.	Dehidrogenasas Aminooxidasas
Transferasas	Transfieren grupos activos (obtenidos de la ruptura de ciertas moléculas) a otras sustancias receptoras. Suelen actuar en procesos de interconversiones de azúcares, de aminoácidos, etc	Transaldolasas Transcetolasas
Hidrolasas	Verifican reacciones de hidrólisis con la consiguiente obtención de monómeros a partir de polímeros. Suele ser de tipo digestivo, por lo que normalmente actúan en primer lugar	Glucosidasas Lipasas
Isomerasas	Actúan sobre determinadas moléculas obteniendo de ellas sus isómeros de función o de posición. Suelen actuar en procesos de interconversion	Epimerasas
Liasas	Realizan la degradación o síntesis (entonces se llaman sintetetasas) de los enlaces denominados fuertes sin ir acoplados a sustancias de alto valor energético.	Aldolasas Decarboxilasas
Ligasas	Realizan la degradación o síntesis de los enlaces fuertes mediante el acoplamiento a sustancias ricas en energía como los nucleosidos del ATP	Carboxilasas Peptidosintetasas

Tabla 4. Clasificación de los tipos de enzimas

4.2 Lacasa

La lacasa tiene como número EC 1.10.3.2 y pertenece al grupo de las Oxidoreductasas dioxígeno.

Las lacasas son metaloglicoproteínas que contienen como cofactor iones cobre (multi-cobre oxidoreductasas) y que utilizan oxígeno molecular para oxidar diversos compuestos aromáticos. Las enzimas están implicadas en la patogenicidad, la inmunidad y la morfogénesis de los organismos y en el recambio metabólico de sustancias orgánicas complejas tales como lignina o materia húmica. Debido a su alta capacidad de oxidación no específica, las lacasas son biocatalizadores útiles para diversas aplicaciones biotecnológicas. Hasta hace poco, las lacasas sólo se habían encontrado en células eucariotas (hongos, plantas superiores, insectos), pero ahora hay una fuerte evidencia de su amplia distribución en células procariotas y la primera estructura cristalina de una lacasa bacteriana ya está disponible. Filogenéticamente las lacasas son miembros de la familia de las proteínas multi-cobre incluyendo ascorbato oxidasa, ceruloplasmina y la bilirrubina oxidasa.

Para su actividad catalítica se necesita un mínimo de cuatro átomos de cobre por unidad de proteína activa [12].

Últimamente ha aumentado su uso debido a que no dañan el medioambiente en sus reacciones ya que utilizan el oxígeno que se encuentra en el aire o disuelto en las soluciones y desechan agua como subproducto. A parte, no requieren de mucha energía al trabajar a temperaturas no excesivamente altas, cercanas a los 50 °C.

C. Parte experimental

5. Materiales y métodos

5.1 Materiales y reactivos utilizados

Reactivos	Utensilios e instrumentos
Etanol	LC
(3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES)	Vasos de precipitados
Ácido Gálico	Matraz aforado
Lacasa (Novozym 51003)	Frascos
Ácido Succínico	Micro-pipeta y puntas
Hidróxido de sodio (NaOH)	Agitador
Agua destilada	Balanza y platillos
Metacrilato de sulfobetaina (SBMA)	pH-metro
Cloruro de Sodio (NaCl)	Incubadora
Cloruro de Calcio (CaCl ₂)	Recipiente para soluciones
Cloruro de Potasio (KCl)	
Solución de lágrima artificial	
Lisozima	
Albúmina marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-albúmina)	
Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i>	
Caldo de cultivo para crecimiento bacteriano (Tryptic Soy Bean; TSB)	
Colorante cristal violeta	

Tabla 5. Reactivos, instrumentos y utensilios utilizados en el proceso.

5.2 Composición de las LC

Las LC de las cuales disponíamos eran de diferentes casas comerciales y por lo tanto de diferente material. Las LC eran las siguientes:

- Johnson & Johnson, 1Day Acuvue True Eye (narafilecon A) (hydrogel de silicona) (uso diario)
- Bausch & Lomb, Pure Vision Toric (balafilcon A)(hydrogel) (uso mensual)
- Ciba Vision, Astigmatism (67% lotrafileconB)
- Cooper Vision, Frequency Aspheric (45% methafilecon, 55% H₂O) (uso mensual)
- Air Optix, multifocal (67% lotrafilecon B, 33% H₂O) (uso mensual)
- Dailies, Focus Visitint (31% nelfilcon A, 69% H₂O) (uso mensual)
- Cooper Vision, Comfilecon (52% comfilecon, 48% H₂O) (hydrogel silicona) (uso mensual)
- Bausch & Lomb (Alphafilcon A)
- Bausch & Lomb, Pure Vision Multi-focal (balafilcon A) (hydrogel silicona) (uso mensual)
- Johnson & Johnson, Moist (etafilecon A) (uso diario)
- 1 contact lens (hilafilecon B)
- Johnson and Johnson, Acuvue Advance Astigmatism (galyfilecon A) (uso seminal)
- Air Optix for Astigmatism (67% lotrafilecon B) (uso mensual)

Todas las LC estaban caducadas, la mayoría de hidrogel convencional pero hay algunas de hidrogel silicona. Gran parte de ellas son de uso mensual, también hay de reemplazo mensual y diario.

Al principio se empezaron a tratar las LC de narafilecon y lotrafilecon pero el material no aceptaba el primer tratamiento.

Se siguieron las pruebas con las LC de balafilcon, methafilecon y comfilecon. El material que mejor parecía aceptar el primer tratamiento era el methafilecon, así que se dejaron de probar otros materiales y se utilizaron únicamente las LC de éste material.

- Methafilecon:

Monómeros que forman el material y su estructura:

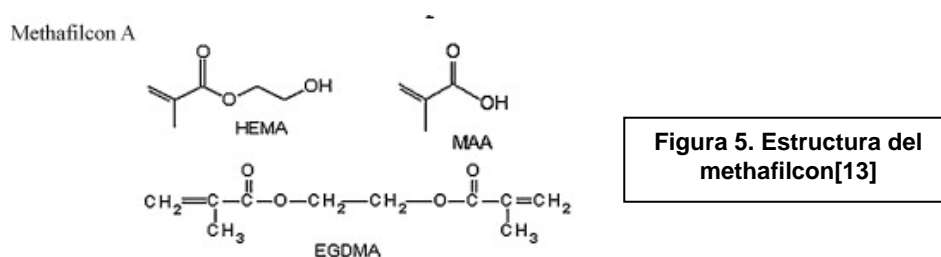


Figura 5. Estructura del methafilecon[13]

Contenido en agua a temperatura ambiente (23±2°C) y permeabilidad al oxígeno y índice de refracción:

55% de H₂O, Dk 18 y n 1.655

El material del cual está hecha la LC "Frequency Aspheric" de la casa COOPER VISION se clasifica como una lente de Hidrogel convencional iónico de alto contenido en agua (grupo IV de la FDA).

La compañía tiene la patente, por eso hemos tenido problemas y limitaciones a la hora de encontrar las características del material.



Figura 6. Imagen del embalaje de la LC de contacto utilizada.

Las LC utilizadas tienen una curva base de 8,7 mm, un diámetro de 14,4 mm. Su potencia difiere. Los parámetros ópticos y geométricos no afectan en el tratamiento.

- FTIR:

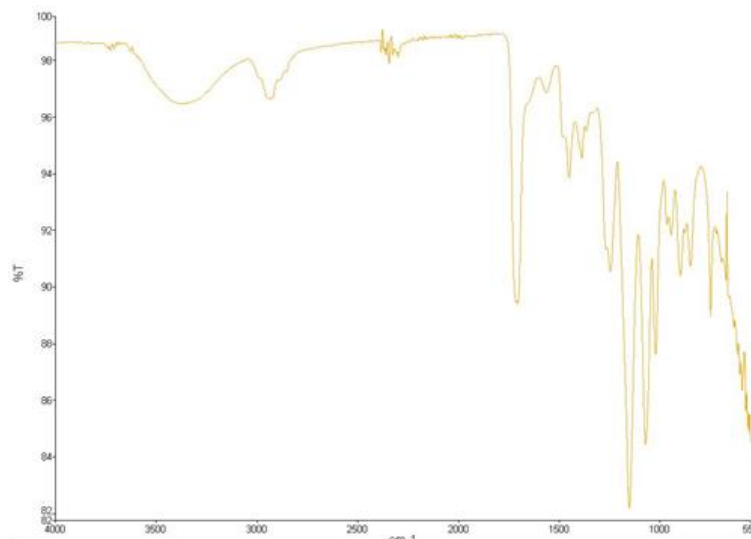


Figura 7. FTIR del Methafilcon en modo transmitancia

Es un poco complicado comprobar la composición del material utilizando únicamente este método pero podemos ver picos de absorción en 3300 cm^{-1} correspondiente a grupos OH y a grupos alcanos, 3000 cm^{-1} correspondiente a grupos alquenos, a 1600 cm^{-1} correspondiente a grupos aromáticos o de grupos éster [14].

5.3 Proceso de recubrimiento

Antes de empezar con el tratamiento, debido a que las lentes estaban en una solución que contenía una mezcla de sales, se tuvieron que enjuagar y limpiar con agua destilada para eliminar cualquier sustancia que pudiera alterar el tratamiento.

Luego se dejaron secar durante aproximadamente 24 horas en una campana de secado para su uso posterior.

Las LC de contacto están pensadas para estar en humectación, cuando se secan son muy susceptibles a la rotura. Debido a este fenómeno a la hora de analizarlas con el espectrofotómetro FTIR se tuvieron problemas por ruptura de algunas.

Hay que tener en cuenta también que no se trata de un tratamiento superficial únicamente ya que las LC son permeables al agua por lo que el tratamiento estará presente en toda la LC.

El procedimiento completo consiste en la aplicación de 3 tratamientos: el primero consiste en silanizar la lente con 3-aminopropiltriétosisilano (APTES), el segundo consiste en aplicar ácido gálico con la ayuda de la lacasa y el tercero consiste en la aplicación del zwitterión SBMA también con la ayuda de la lacasa.

5.3.1 Recubrimiento con 3-aminopropiltriétosisilano (APTES)(Silanización)

La silanización es un tratamiento mediante el cual se le añaden moléculas de alcoxisilano (un átomo de silicio unido a un grupo funcional orgánico) a una superficie mineral u orgánica.

Los agentes que se utilizan para la silanización son compuestos que tienen como mínimo dos grupos reactivos de diferentes tipos unidos al átomo de silicio.

Uno de los grupos reactivos reacciona con la superficie del material al cual se le aplica mientras el otro grupo queda libre para unirse a otra superficie o a otras sustancias.

Los silanos o grupos silanzantes acostumbran a tener la siguiente estructura química: $RmSiXn$ donde X es un grupo hidrolizable (normalmente grupo alcoxi) y R es un residuo funcional orgánico. Esta característica hace que puedan formar grupos silanol (grupo Si-O-H) mediante la hidrólisis con agua ($RmSi(OH)n$). En vez de agua también pueden formar uniones con grupos OH o grupos COOH presentes en la superficie.

El silanzante utilizado durante las pruebas fue el APTES, que es un aminosilano. A temperatura ambiente está en estado líquido.

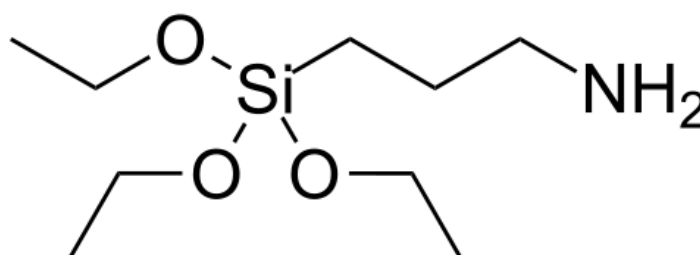


Figura 8. Estructura del APTES.

En este caso el APTES reacciona con los grupos –OH presentes en el Methafilcon quedando como grupos funcionales libres los grupos amino que serán los encargados de reaccionar en el segundo tratamiento.

- **Proceso:**

Primero se prepara una solución al 5% de APTES en etanol.

Para ello cogemos 2,5 mL de APTES con la micro pipeta y los metemos en un matraz aforado. Luego añadimos etanol hasta llenar el matraz aforado. Mezclamos bien la solución.

Luego vertemos la solución en 4 vasos de precipitados para posteriormente sumergir una LC en cada solución. Así, tendremos 4 recipientes con una LC y 12,5 mL de solución cada uno. Dejamos las LC sumergidas dentro durante aproximadamente 24 horas.

Después de las 24 horas retiramos las LC de contacto de la solución de APTES con etanol. Luego las sumergimos en agua destilada durante aproximadamente 10 minutos para que vuelvan a coger consistencia ya que con el tratamiento en etanol, se desplaza el agua que contiene el hidrogel y se vuelven frágiles.

Las secamos en la campana para su posterior análisis con el FTIR para comprobar que el tratamiento se ha llevado a cabo con éxito.

5.3.2 Caracterización de la lacasa

- **Determinación de la concentración de proteína de la lacasa**

Para poder conocer la actividad específica de la lacasa que utilizaremos en el siguiente paso, lo primero que se debe hacer es determinar la cantidad de proteína presente en el preparado comercial que utilizaremos (Novozym 51003, suministrada por Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca).

Para su medida seguiremos el método y los materiales y compuestos del “Total Protein Kit, Micro Lowry” de SIGMA. Este método se basa en la determinación espectrofotométrica del complejo coloreado que se forma al mezclar una proteína con los reactivos utilizados en el kit. Así, determinando la absorción a 750 nm de diferentes soluciones con contenido de proteína conocido, se construye una curva de calibrado.

Para conocer la concentración de proteína de nuestro preparado de enzima, se realizan diferentes diluciones con diferente concentración, se forma el complejo coloreado y se obtiene unos valores de absorción para cada concentración. A partir de aquí, aplicando la fórmula obtenida durante la preparación de la curva de calibración se obtiene la concentración de nuestra enzima.

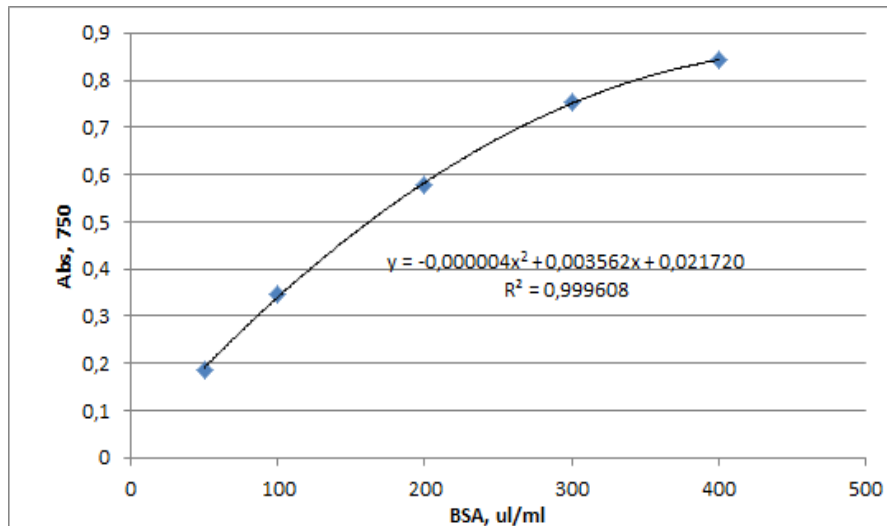


Gráfico 1. Curva de determinación de la concentración de enzima.

En nuestro caso la concentración de la lacasa que utilizaremos para los tratamientos es de **3,1052 mg/mL** que equivale a una concentración peso/volumen del **3%** aproximadamente.

Este dato nos servirá para determinar la cantidad a utilizar para sintetizar los tratamientos que vamos a realizar.

- **Determinación de la actividad enzimática de la lacasa**

Tal y como se ha comentado antes, las enzimas tienen una temperatura y un pH en los cuales su función es la óptima.

El método consiste en determinar su máxima actividad midiendo la oxidación de un sustrato de la lacasa, el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS). Esta oxidación se puede seguir espectrofotométricamente gracias a la formación de un producto coloreado.

Se define a una unidad de actividad enzimática como la capacidad de transformación de 1 μmol de ABTS/min a su catión radical en solución tampón de 0.1 M de succinato de sodio a pH 5 y a 25°C.

Para nuestra lacasa la actividad encontrada previamente en el grupo es de 1277 U/mL y se trabajará a **pH 5 y temperatura 50°C**.

5.3.3 Recubrimiento con ácido gálico

En este paso se trata de recubrir la LC con ácido gálico y para ello necesitamos la lacasa. El propósito de éste recubrimiento es recubrir la LC con fenoles y preparar la LC para el siguiente tratamiento.

El ácido gálico es un ácido orgánico también conocido como ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico, que se encuentra en las agallas (principalmente en los robles), en las hojas de té, en la corteza de roble y otras plantas. Su fórmula química es $C_6H_2(OH)_3COOH$. Las sales y los ésteres del ácido gálico se denominan galatos. Su nombre se refiere a las agallas donde se lo encuentra y no al elemento galio.

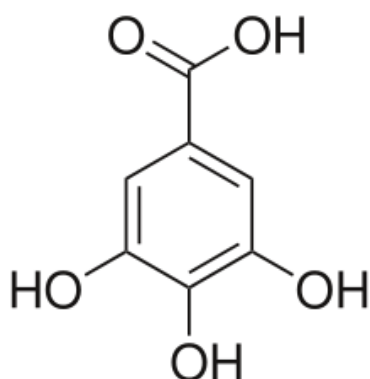


Figura 9. Estructura molecular del ácido gálico

El ácido gálico se considera un antimicrobiano y un antioxidante debido a que tiene un fenol como grupo funcional primario [15],[16]. Es sabido que algunos compuestos fenólicos, entre ellos los ácidos fenólicos tienen una gran actividad antimicrobiana [17].

Las enzimas oxidativas, a las cuales pertenece la lacasa, son eficaces catalizando tanto la homopolimerización como injertándola unión de compuestos fenólicos a otras superficies que contengan grupos funcionales nucleófilos, como es el caso de las aminas. Estas reacciones son posibles ya que las lacasas convierten los compuestos fenólicos en quinonas (o benzoquinonas) susceptibles de participar en adiciones de Michael o formar bases de Schiff con grupos amino [15],[21],[22].

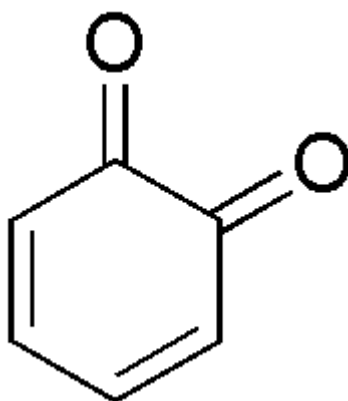


Figura 10. Estructura molecular del o-benzoquinona

Sabiendo esto, podemos utilizar la lacasa para recubrir las LC con ácido gálico ya que previamente las hemos recubierto con APTES proporcionando aminas libres en la superficie. De éste modo podemos obtener una propiedad antimicrobiana, antioxidante en la superficie y tenerla preparada para el último recubrimiento.

- **Proceso:**

Antes de empezar prepararemos la solución donde tendrá lugar el tratamiento de las LC (solución tampón):

La solución tampón es una disolución de ácido succínico 0,1 M en agua destilada.

Necesitaremos aproximadamente 500 mL para todo el proceso.

Calculamos la cantidad de ácido Succínico que necesitaremos (5,9g) y lo disolvemos en agua destilada.

Una vez disuelto bien, medimos su pH. El pH-metro marcará al principio un pH ácido ya que la solución es ácida.

Disolvemos el hidróxido de sodio también en agua destilada. Una vez disuelto lo vamos añadiendo a la solución inicial hasta conseguir un pH de 5 aproximadamente que es el pH óptimo de la lacasa.

Una vez tenemos la solución tampón prepararemos una solución de ácido gálico al 0,04 M.

Necesitaremos 50 mL para las 4 LC. Calculamos el peso necesario (0,3402g) lo disolvemos en un vaso de precipitados mediante el agitador en aproximadamente 35 mL de solución tampón.

Una vez disuelto vertimos la solución final en un matraz aforado y añadimos solución tampón hasta llegar a los 50 mL.

A continuación calculamos la cantidad de lacasa necesaria para sintetizarlo, teniendo en cuenta el poder enzimático de la lacasa y los trabajos consultados en los cuales nos basamos [2], necesitaremos 0,000452 mL, al ser tan poca cantidad es difícil de conseguir con exactitud, así que preparamos una solución diluida de lacasa al 1/100 disolviendo en un eppendorf 0,01 mL de lacasa y 0,99 mL de solución tampón, para coger 0,0452 mL ya que es una cantidad más grande y más fácil de medir.

Vertimos los 50 mL de solución de ácido gálico en un vaso de precipitados y añadimos los 0,0452 mL de lacasa diluida. Los disolvemos y dividimos entre los 4 frascos.

Finalmente añadimos una LC en cada frasco y los colocamos en la incubadora un tiempo aproximado de 3 horas (este tiempo se ha estimado por experimentos anteriores) a una temperatura de 50°C (temperatura óptima de la lacasa). Dejamos los frascos sin cerrar ya que la lacasa necesita oxígeno para su funcionamiento óptimo, únicamente los cubrimos para que no entren sustancias indeseadas.

Una vez finalizado el tiempo indicado, extraemos los frascos de la incubadora y ponemos las LC en agua destilada durante 10 min. Luego las secamos para analizarlas con el FTIR.

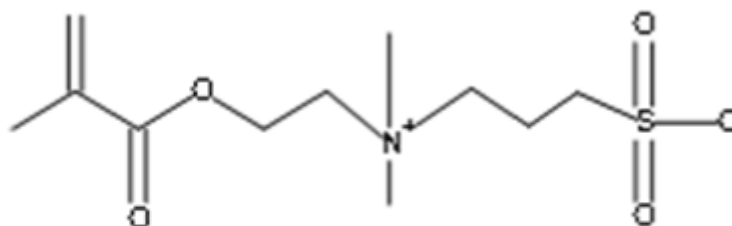
5.3.4 Recubrimiento zwitteriónico

Éste es el tratamiento final para las LC, consistente en recubrir las LC utilizando también la lacasa como catalizador.

Los zwitterionnes son compuestos químicos que sumando sus cargas eléctricas son neutros, pero que están cargados positiva y negativamente en diferentes átomos. Son especies polares y usualmente presentan una elevada solubilidad en agua y bastante baja en muchos disolventes orgánicos de carácter apolar.

Una manera de impedir la formación de biofilms sobre superficies es haciéndola una superficie anti-adhesiva evitando la incrustación de proteínas en ella, ya que éstas son comúnmente utilizadas por las bacterias para unirse a las superficies y colonizarlas mediante el crecimiento de biofilms.

Los polímeros zwitteriónicos, entre ellos el metacrilato de sulfobetaina (SBMA), han resultado muy eficaces a la hora de crear superficies anti-adhesivas evitando la incrustación de proteínas y células. Esta característica la consiguen gracias a que convierten la superficie tratada en una superficie altamente hidrofílica aumentando los enlaces con las moléculas de agua y evitando enlaces con otras moléculas como las proteínas, pero también es gracias a la carga neutra que tienen ya que de este modo se evita la unión con otras moléculas cargadas eléctricamente [18].



SBMA Monomer

Figura 11. Estructura molecular del SBMA

Normalmente, para la polimerización de residuos acrílicos, se necesita el uso de peróxidos orgánicos para iniciar la reacción radicalaria. Sin embargo, el enfoque utilizado en este trabajo se basa en una activación enzimática a través de la formación de radicales fenoxi por medio de la lacasa. [2][23] Experimentos anteriores [21] demuestran la buena adherencia del tratamiento zwitteriónico sobre superficies tratadas con la síntesis del ácido gálico sintetizada por la lacasa.

- Proceso

Empezamos el tratamiento de las 4 LC preparando la solución de SBMA en la solución tampón que hemos preparado en el apartado anterior.

Se vierten 5 mL de solución tampón en cada frasco.

A continuación, teniendo en cuenta el volumen de solución tampón y teniendo en cuenta experimentos anteriores [2], medimos y depositamos 1,0447 g de SBMA en cada frasco. No hace falta agitar debido a la alta solubilidad del zwitterión en soluciones acuosas.

A continuación añadimos 0,03 mL de lacasa en cada frasco [2].

Finalmente se añaden las LC a las soluciones y se depositan en la incubadora durante aproximadamente 24 horas a una temperatura de 50°C para proporcionar a la lacasa sus condiciones óptimas.

Tal como se indicó en el paso anterior, los frascos se dejan sin tapar para permitir la entrada de oxígeno ya que la lacasa necesita de él para su actividad enzimática. Únicamente se cubren para evitar la entrada de sustancias indeseadas.

Pasado el período establecido, se extraen las LC se elimina la solución restante y se depositan en agua durante un periodo de 10 minutos. Luego se dejan secar en la campana para analizarlas con el FTIR.

5.3.5 Análisis FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

La Espectroscopia de Infrarrojos por Transformada de Fourier (FTIR) es una técnica que se utiliza para obtener un espectro infrarrojo de absorción, emisión y fotoconductividad de un sólido, líquido o gas.

Un espectrómetro FTIR recopila simultáneamente datos de absorbancia y transmitancia espectrales en una amplia gama de longitudes espectrales. Esto le proporciona una ventaja significativa sobre otros que miden la intensidad en un rango estrecho de longitudes de onda.

El instrumento mide la intensidad que transmite el material a analizar, para ello el material a utilizar tiene que estar seco y tiene que estar en contacto con el emisor del IR. El ordenador recoge y almacena los valores relativos a cada longitud de onda para el posterior análisis [2].

Para analizar las muestras se ha utilizado la técnica de reflectancia total atenuada (ATR). Antes de analizar cualquier muestra se tiene que hacer un "fondo" que es un análisis FTIR de los compuestos que hay presentes en el ambiente. Al analizar cualquier muestra, el equipo elimina el valor de fondo al resultado obtenido.

Se sabe que cada grupo funcional químico tiene una absorbancia a una frecuencia determinada. De este modo, analizando el FTIR, podemos saber o intuir la composición de la muestra analizada.

También permite analizar y comparar una muestra antes y después de ser tratada para comprobar que el recubrimiento se ha adherido correctamente.

El software del instrumento, en nuestro caso de la marca "PerkinElmer", nos permite entre otras cosas establecer el rango espectral que deseamos analizar. El rango utilizado en las medidas realizadas fue entre 550 cm^{-1} y 4000 cm^{-1} .

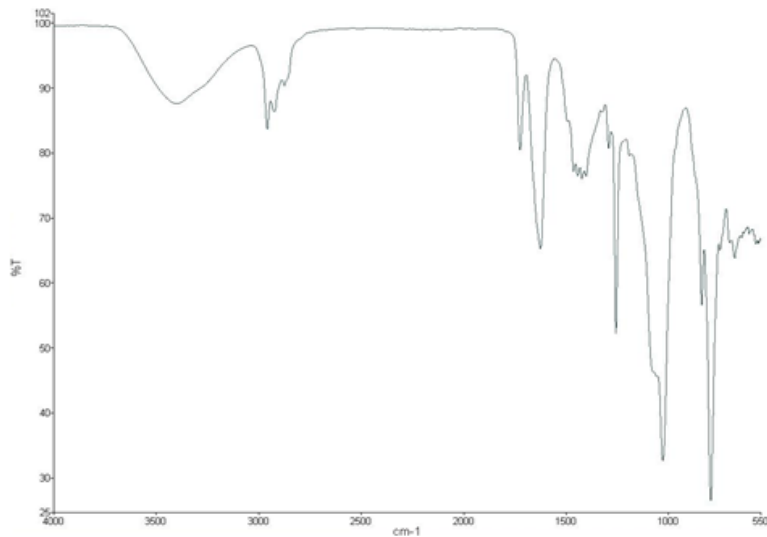


Figura 12.
Espectrometría del
material narafilcon A sin
ningún tratamiento.

5.4 Test anti bacteria

Después de los procesos de tratamiento, hay que comprobar que los recubrimientos se han adherido de la manera correcta y que se ha dotado a las LC de unas capas con poder antimicrobiano capaz de impedir o retardar el crecimiento de biofilms.

Para realizar estas comprobaciones existen varios métodos y varios test, pero debido a la poca cantidad de LC de las cuales disponemos solo podemos realizar dos test (la prueba de la adsorción inicial de proteína y la prueba de formación de biofilm)

En ambas pruebas se compararán dos LC, unas estarán tratadas con los tres recubrimientos y otras estarán sin ningún tipo de tratamiento.

Para simular lo mejor posible el entorno donde se utilizarían las LC tratadas, se ha preparado una solución similar a la lágrima imitando la composición y concentración de algunas sustancias presentes en la película lagrimal.

5.4.1 Preparación de la solución lágrima artificial

Para preparar la solución lagrimal nos basamos en la concentración de las sustancias salinas presentes en la lágrima que se han descrito en apartados anteriores.

- Proceso

Medimos las cantidades apropiadas según las concentraciones descritas anteriormente: en 100 mL de agua destilada necesitaríamos 14 mmol de NaCl (0,81816 g), 0,1 mmol de CaCl₂ (0,0147 g) y 2 mmol de KCl (0,15 g).

Lo mezclamos con agua destilada y los disolvemos en un vaso de precipitados.

Luego vertimos la solución resultante en un matraz aforado y lo llenamos hasta llegar a los 100mL.

5.4.2 Adsorción de proteína y estabilidad del recubrimiento

En la prueba de la proteína se trata de averiguar la incrustación y la deposición de unas proteínas determinadas presentes en la lágrima sobre las LC.

Se han realizado dos tipos de pruebas:

La primera prueba era para comprobar la adsorción de la proteína en las LC. Se utilizaron unas LC acabadas de tratar y puestas en agua únicamente.

La segunda prueba consistía en comprobar la estabilidad del recubrimiento sobre las LC y la posterior adsorción de proteína. Se depositaron las LC tratadas en solución de lágrima artificial durante una semana para averiguar si los componentes de la lágrima alteran el tratamiento. Posteriormente fueron analizadas como las LC de la primera prueba.

- Proceso

Preparamos la solución que contendrá las proteínas necesarias para comprobar la adherencia de las mismas sobre las LC.

La concentración de las proteínas es similar a la presente en la película lagrimal. Para cada 1 mL de solución lagrimal se mezclan 2 mg de lisozima y 1 mg de albúmina marcada con isotiocianato de fluoresceína, una molécula fluorescente que nos permitirá posteriormente evaluar en un microscopio la deposición de esta proteína.

Debido a la fotosensibilidad de la FITC-albúmina hay que recubrir el eppendorf con papel de aluminio para no deteriorar el marcador fluorescente.

Para el primer tipo de prueba, una vez tenemos la solución final ponemos 0,5 mL en dos cavidades de una placa multipocillos y metemos una LC tratada y otra sin tratar en cada cavidad.

Se calculan dos tiempos diferentes: Primero durante 25 segundos y luego durante 3 minutos.

Pasado ese tiempo se extraen con cuidado y se enjuagan en agua destilada, se dejan secar durante 30 minutos y se analizan en el microscopio de fluorescencia.

Para el segundo tipo de prueba, dejamos una LC tratada en solución lagrimal artificial durante una semana y después realizamos el mismo proceso del apartado anterior.

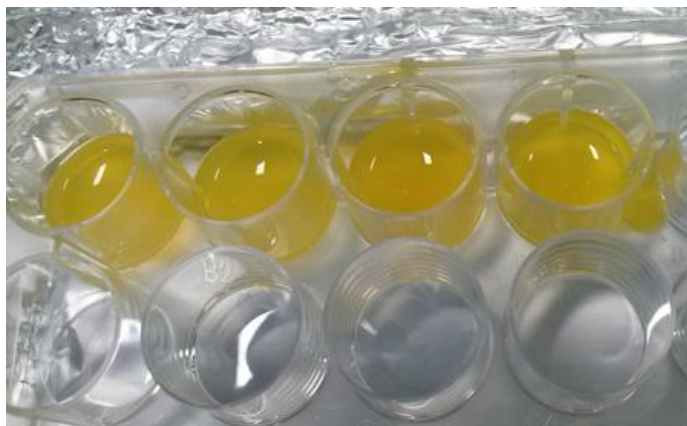


Figura 13. Recipiente con las soluciones y las LC

5.4.3 Prueba anti-biofilm (*Staphylococcus aureus*)

Como última prueba intentamos averiguar si las LC tratadas evitan la formación de biofilms.

El método consiste en la aplicación de unas determinadas bacterias sobre una LC control y otra tratada, proporcionarles a las bacterias nutrientes y un medio favorable para su crecimiento y reproducción, después de un tiempo determinado y para comparar la formación de biofilms sobre las superficies de las dos LC, se hará una tinción con cristal violeta.

Se ha probado la especie de bacteria *Staphylococcus aureus*.

Esta prueba confirmaría la acción antibacteriana de las LC ya que se están probando la adherencia y proliferación de células vivas

- **Proceso**

Esta prueba se divide en dos etapas, la etapa de formación del biofilm y la etapa del análisis del biofilm.

- Formación del biofilm

Este proceso se tiene que realizar en un entorno estéril de microorganismos para evitar la contaminación de las muestras. Para ello trabajamos en un entorno con presencia de fuego utilizando el mechero Bunsen.

Empezamos el proceso con el cultivo de la bacteria seleccionada para la prueba, en este caso el *Staphylococcus aureus*. La bacteria esta diluida en su solución de cultivo (TSB), para saber la cantidad necesaria se mide su densidad óptica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. Mediante estudios y comprobaciones realizadas anteriormente [2], para cada absorbancia de la solución bacteriana hay una determinada cantidad de bacterias.

Para este caso y en relación a resultados de experimentos anteriores [2], se prepara una solución de bacteria en caldo de cultivo bacteriano con relación 1/20, 0,5 mL de bacteria en 9,5 mL de TSB para una población final bacteriana de 10^6 UFC/mL. Se diluye bien la solución.

Se introduce 1mL de bacteria diluida en dos cavidades del recipiente donde colocar las soluciones. Luego introduce 1 mL de solución TSB otras dos cavidades para controlar que no está infectada por ninguna otra bacteria. En total tenemos dos cavidades con 1 mL de bacteria diluida cada una y otras dos con 1 mL de caldo de cultivo cada una.

Acto seguido, sumergimos 1 LC tratada y otra sin tratar en cada una de las soluciones con bacteria diluida, luego sumergimos 1 LC tratada y otra sin tratar en los pocillos que únicamente contienen caldo de cultivo sin inocular. De este modo controlaremos cualquier factor no deseado tanto de las soluciones utilizadas como del comportamiento del tratamiento de las LC con los medios utilizados en esta prueba.

Ahora metemos el recipiente con todas las soluciones en la incubadora a 37 °C durante un tiempo de 18 horas, este tiempo se ha definido teniendo en cuenta experimentos anteriores.

- Análisis del biofilm

Después del tiempo establecido, se extraen las LC de sus respectivas soluciones, se enjuagan con agua destilada y se dejan secar en el horno durante 1 hora a una temperatura de 60°C. Con esto conseguimos fijar las bacterias a la superficie de las LC.

Después, se cogen las LC se depositan en el recipiente de soluciones y se les aplica un tinte para colorear las bacterias y los polímeros que utilizan las mismas para fijarse a la superficie. El colorante utilizado es cristal violeta.

Luego se sacan las LC del tinte y se enjuagan en agua una o dos veces para eliminar el sobrante de colorante que haya.

A continuación, se sumergen las LC en etanol durante 15min para disolver el colorante fijado a los biofilms que se hayan formado sobre la superficie.

Finalmente se coge cada solución de etanol en la cual estaba sumergida cada LC y se mide su absorbancia a la 540 nm.

La diferencia de absorbancia respecto la LC tratada y la LC control proporcionará la efectividad del tratamiento.

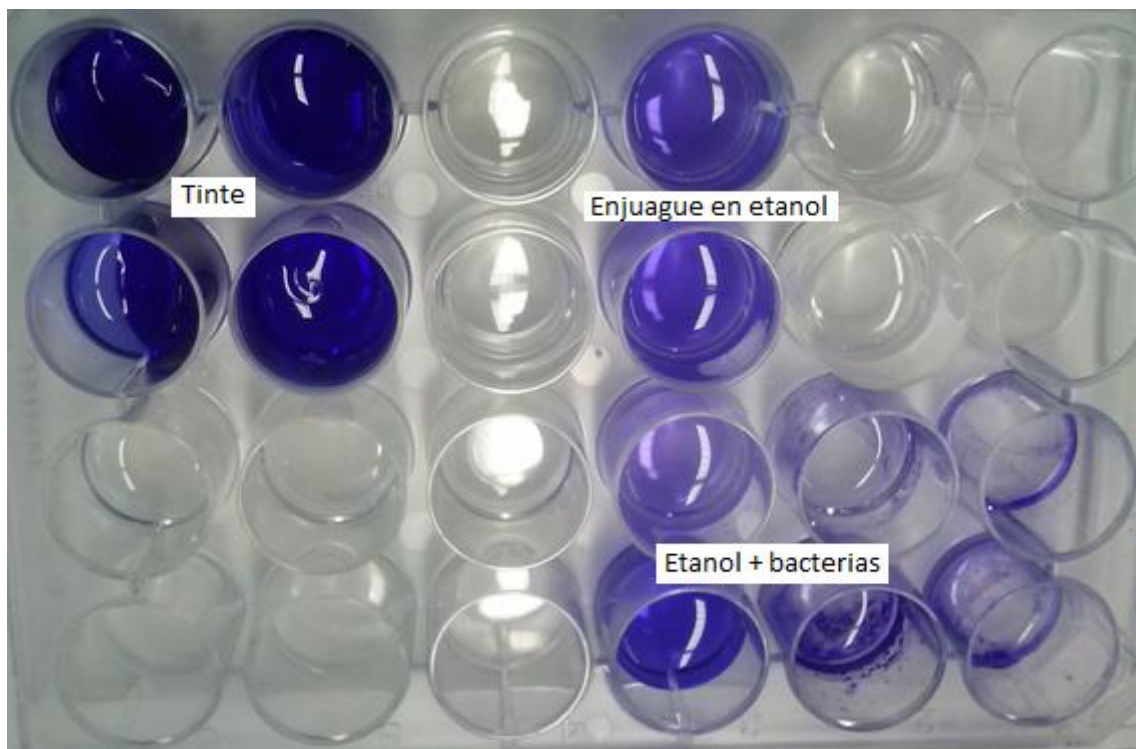


Figura 14. Recipiente con las soluciones y las LC

5.5 Pruebas ópticas y geométricas

Se ha analizado el posible cambio geométrico y óptico que hayan podido sufrir las LC después del proceso total.

Se tomó como referencia una LC de potencia positiva de +1,50 D y de 14 mm de diámetro.

Después del tratamiento, la potencia obtenida es de +1,75 D aproximadamente y el diámetro de 12 mm.

La potencia de la LC después del tratamiento no ha sufrido cambios, mientras que el diámetro ha disminuido en 2 mm respecto al inicial.

5.6 Prueba de medida del DK

El Dk nos indica la transmisibilidad de oxígeno del material. Por eso es un factor muy relevante a tener en cuenta debido a que la córnea no tiene vasos sanguíneos, por lo tanto, no le llega oxígeno por vía arterial si no que lo coge directamente del aire externo. Por eso los materiales con el cual están hechas las LC tienen que ser permeables al oxígeno.

El Dk inicial de la LC es de 18, y su contenido en agua es del 55%. Estos dos factores están directamente relacionados, ya que la transmisión de oxígeno se lleva a cabo por las moléculas de agua presentes en el material.

La medida del Dk requiere de equipos altamente sofisticados y hay muchas variables a tener en cuenta a la hora de analizarla (temperatura ambiente, el correcto secado de las LC...).

El instrumento utilizado en esta ocasión es un refractómetro de contenido en agua "ATAGO CL-1". Se ha tratado de averiguar el contenido de agua de la LC después del tratamiento para compararlo con el de la LC sin tratar y para calcular el nuevo Dk a partir de este valor.

A la hora de realizar la medida se tuvieron algunos problemas ya que el instrumento resulta muy poco eficaz. Resulta difícil de cumplir todos los requisitos (temperatura, luz ambiental, secado de la LC...) para obtener un resultado contrastable.

El valor aproximado de contenido de agua calculado fue de de 55%.

La LC después del tratamiento tiene el mismo contenido en agua, como este valor está directamente relacionado con el Dk, podemos afirmar que el Dk de la LC después del tratamiento permanece constante.

D. Resultados y discusión

6. Proceso de recubrimiento

6.1 Recubrimiento con APTES (Silanización)

FTIR:

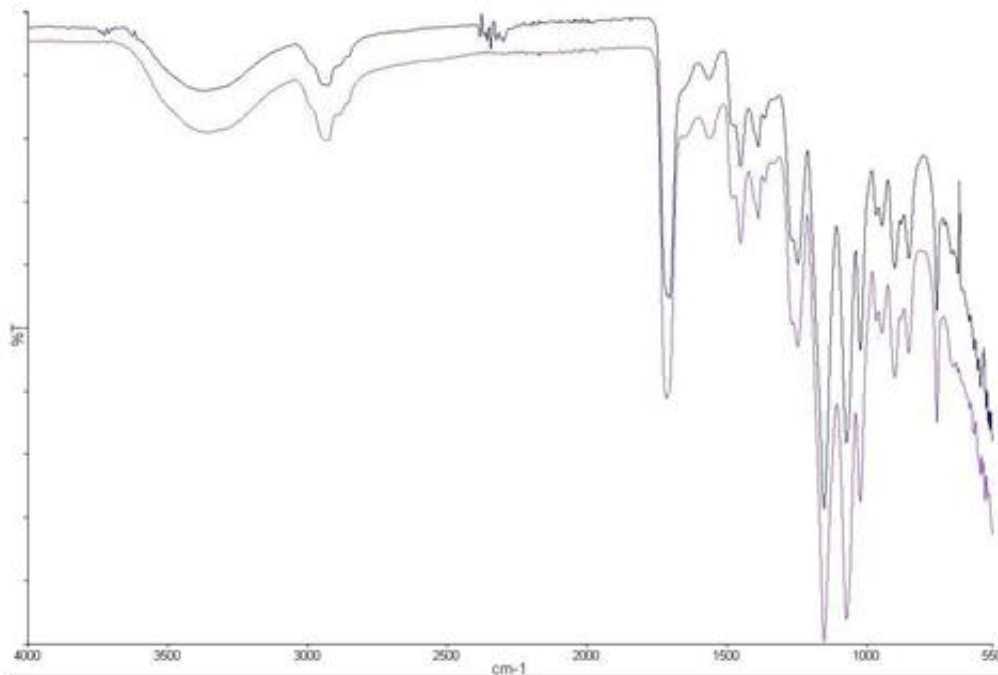


Figura 15. FTIR de la comparación de la LC antes (curva superior) y después (curva inferior) de tratar con APTES.

Se observa una relativa bajada de absorbancia de la LC con APTES respecto a la LC sin tratar en la zona de 3300 cm^{-1} que se podría deber a la reacción de los grupos OH. El cambio observado no es muy marcado ya que las aminas de las cuales se dota la LC tienen el pico de absorción en ésta zona.

Hay un incremento de absorbancia en el pico de 1600 cm^{-1} y hay una disminución de absorbancia considerable en el pico de 1550 cm^{-1} aproximadamente.

Imagen:



Figura 16. La LC después del tratamiento con APTES.

La LC no ha sufrido cambios visibles después del tratamiento con el APTES. Pero son más pequeñas en diámetro que las LC sin tratar.

Hay una prueba que nos ayuda a comprobar que el APTES se ha unido con éxito a la LC. Se denomina la prueba de la Ninhidrina. Consiste en un reactivo que reacciona con los grupos amino dando a lugar un color púrpura oscuro (púrpura Ruhemanns).

Consiste en sumergir una LC tratada con APTES y otra sin tratar en Ninhidrina al 2% durante 30 minutos y compararlas.



Figura 17. LC tratada con APTES y LC sin tratar después de sumergir en Ninhidrina 2%

Se puede comprobar que la LC tratada coge un color muy oscuro mientras que la LC sin tratar apenas se colorea.

Tanto los cambios en el FTIR, la apariencia de la LC como la prueba de la Ninhidrina nos indica que el APTES se ha unido con éxito a la LC.

6.2 Recubrimiento con ácido gálico injertado mediante lacasa

FTIR:

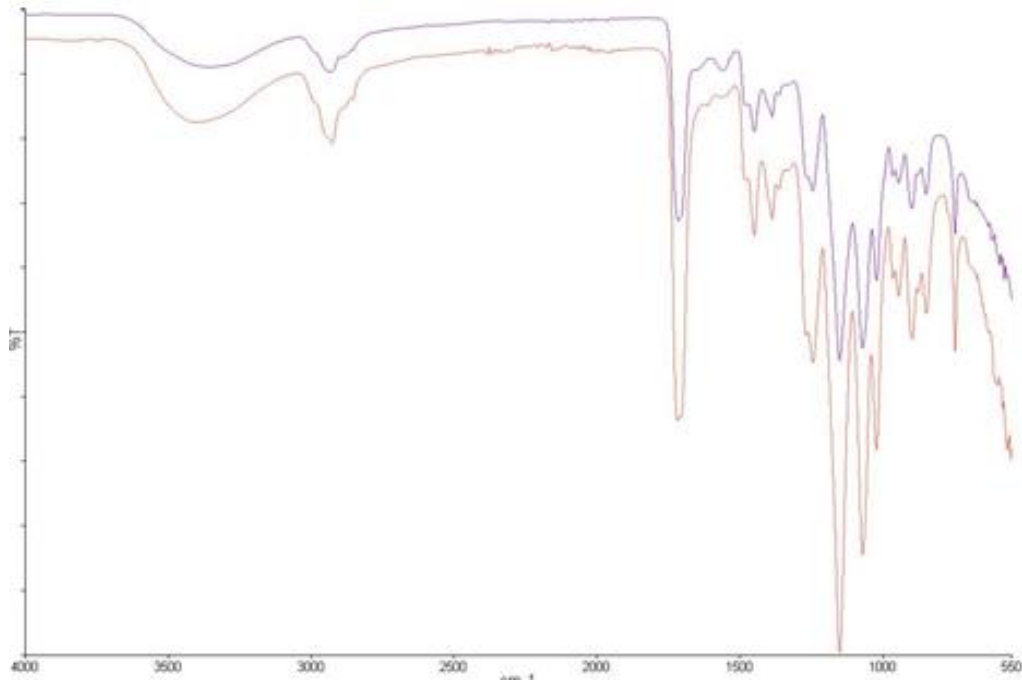


Figura 18. FTIR de la comparación de la LC antes (curva superior) y después (curva inferior) de tratar con ácido gálico.

La zona por encima de 3000 cm^{-1} muestra una absorbancia mayor en la LC tratada con ácido gálico debido a la presencia de grupos fenólicos. También se observan cambios considerables en los picos de 1600 cm^{-1} , 1500 cm^{-1} y 1300 cm^{-1} asociados al anillo aromático del ácido gálico apoyando la unión de éste a las LC.

Imagen:



Figura 19. Imagen de la LC después del tratamiento con ácido gálico

Las LC después del tratamiento cogen un color marrón debido a la oxidación parcial del ácido gálico en presencia de la lacasa. Su tamaño es similar al tamaño de la LC después de tratarla con APTES.

Tanto los cambios en el FTIR como el color de la LC en sí nos indican que el tratamiento se ha llevado con éxito obteniendo LC recubiertas por ácido gálico.

6.3 Recubrimiento con Zwitterión

FTIR:

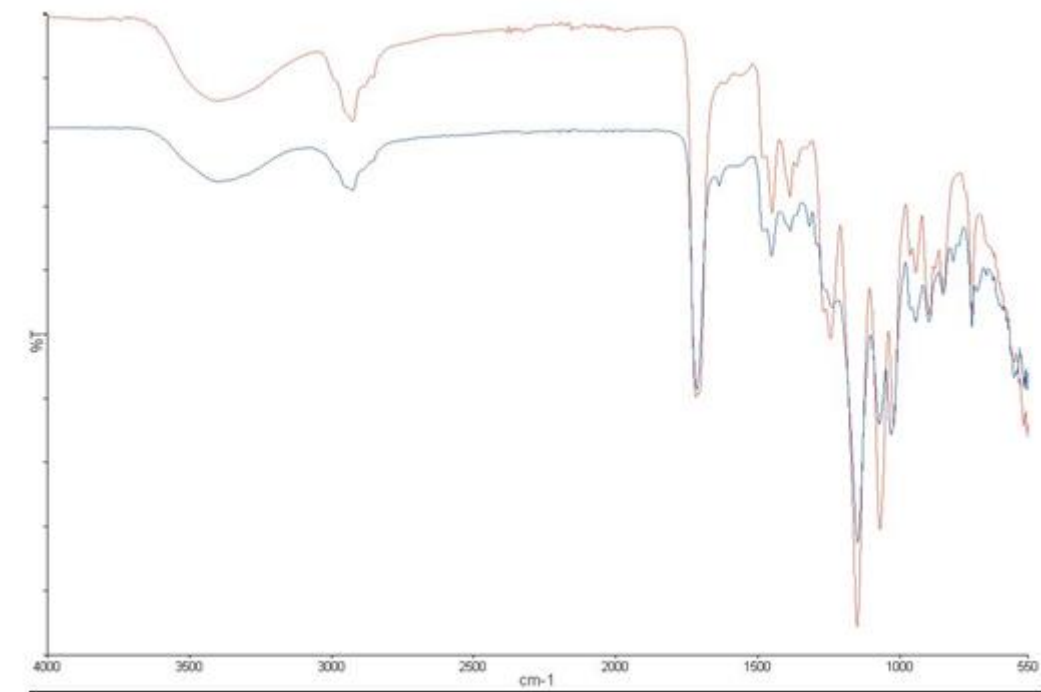


Figura 20. FTIR de la comparación de la LC antes (curva inferior) y después (curva superior) de tratar con zwitterión.

Además de otros cambios menos significativos, la banda situada en torno a los 1030 cm^{-1} (asignada a un grupo sulfónico) nos da una indicación bastante fiable de la presencia de SBMA sobre la superficie de la lente.

Imagen:



Figura 21. Imagen de la LC después del tratamiento con DMAPS

La LC después de tratarla con DMAPS ha perdido algo de color en relación con el tratamiento anterior. Su tamaño es relativamente superior en diámetro al tamaño de la LC con ácido gálico únicamente.

Los cambios en el FTIR después de la incubación parecen indicar que el tratamiento del DMAPS se ha realizado con éxito.

6.4 Comparación de FTIR de todos los recubrimientos

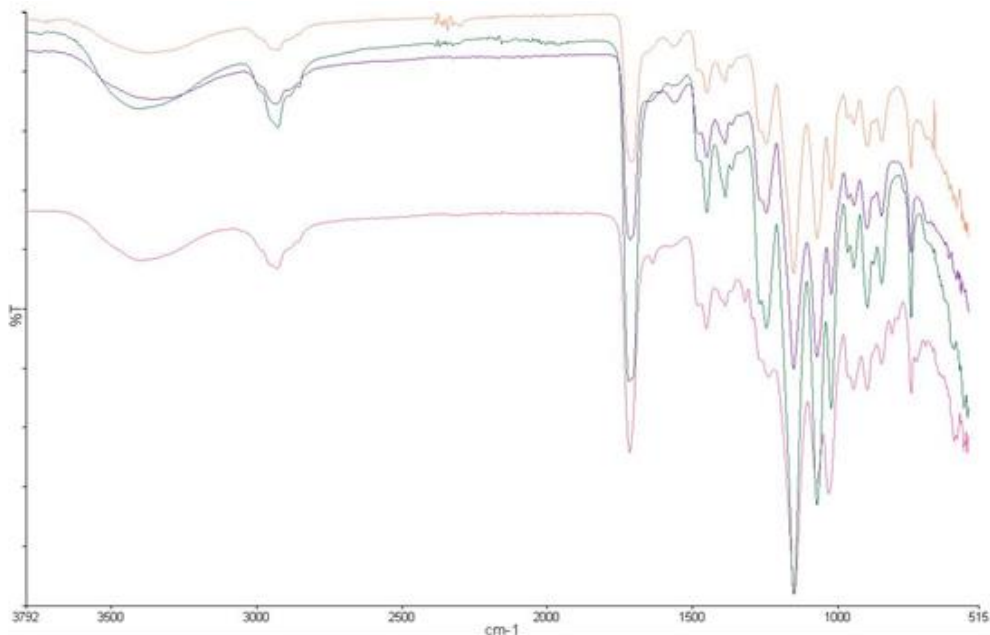


Figura 22. Comparación de los FTIR de los diferentes tratamientos, LC sin tratar (arriba), LC con APTES (segunda), LC con ácido gálico (tercera) y LC con zwitterión (última)

A lo largo del proceso van surgiendo diferentes cambios y se va recubriendo de diferentes grupos funcionales la superficie de las LC.

Comparando la LC final con la inicial observamos que han aparecido nuevos picos de absorción y han desaparecido algunos otros. También hay picos que ha variado su absorbancia.

Aparece un nuevo pico de absorbancia en la curva de la LC con zwitterión a 1030 cm^{-1} que indicaría la adherencia del zwitterión a la superficie tratada.

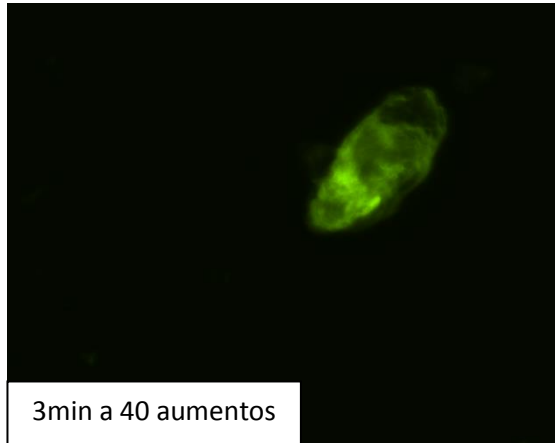
Viendo los cambios en los FTIR, todo parece indicar que los recubrimientos se han adherido correctamente a la superficie de las LC y que se les ha proporcionado a las LC las cualidades necesarias para repeler bacterias.

7. Tests anti-bacteria

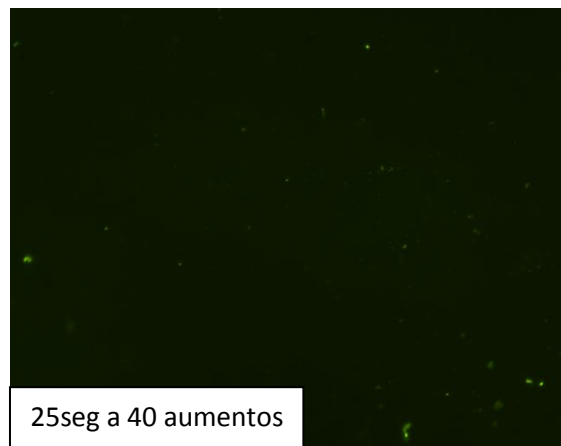
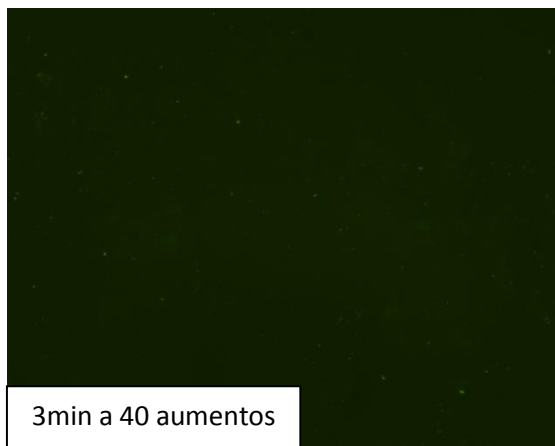
7.1 Prueba de la proteína

Primera prueba

LC control



LC con tratamiento



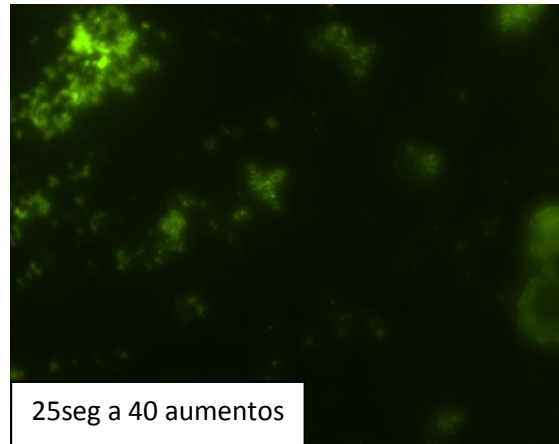
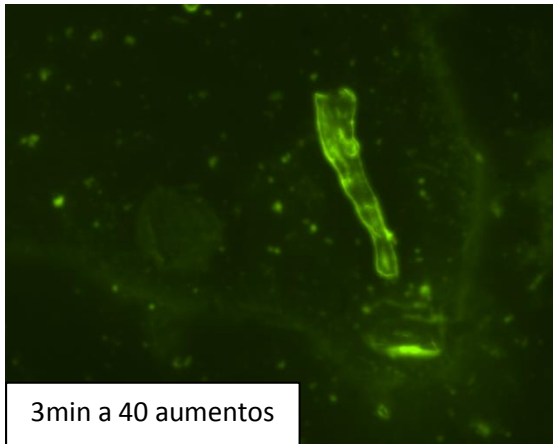
Para esta primera prueba, la exploración microscópica de la superficie de las LC después de someterlas a la solución proteínica da resultados contrastados respecto el tipo de LC para ambos tiempos de exposición (25 segundos y 3 minutos).

En las LC control (no tratadas) se observa una gran cantidad de depósitos de proteína. Mientras que las LC con tratamiento no se aprecian casi estas proteínas y las que se adhieren lo hacen de forma aislada.

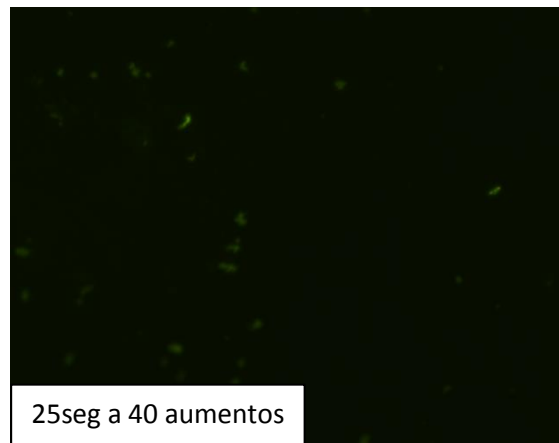
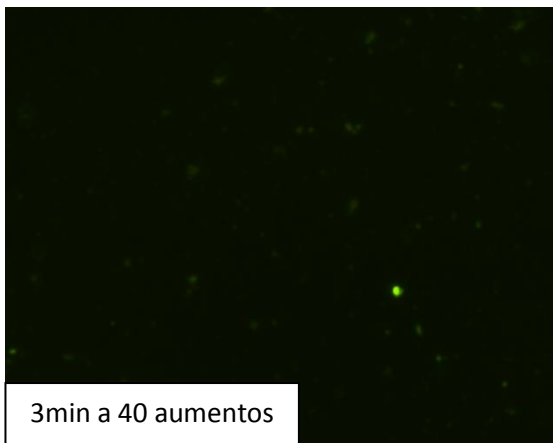
De este modo queda probado que el tratamiento bloquea la adsorción de proteínas sobre la superficie de la LC. Sin embargo, esto no prueba por sí mismo que no se pueda formar biofilm encima de ella ya que el biofilm es un sistema más complejo y con más variables a tener en cuenta.

Segunda prueba

LC control



LC con tratamiento



En el segundo tipo de prueba obtenemos un resultado similar al de la primera prueba. En las LC no tratadas hay depósitos de proteína mientras que en las LC con tratamiento no los encontramos.

De este modo queda probado que la permanencia de la LC tratada en solución lagrimal artificial durante una semana no altera el tratamiento aplicado, por lo tanto, el recubrimiento es podemos decir que el tratamiento es estable bajo las condiciones ensayadas.

7.2 Prueba antibiofilm

Al analizar la absorbancia de las respectivas soluciones se obtuvieron los siguientes resultados:

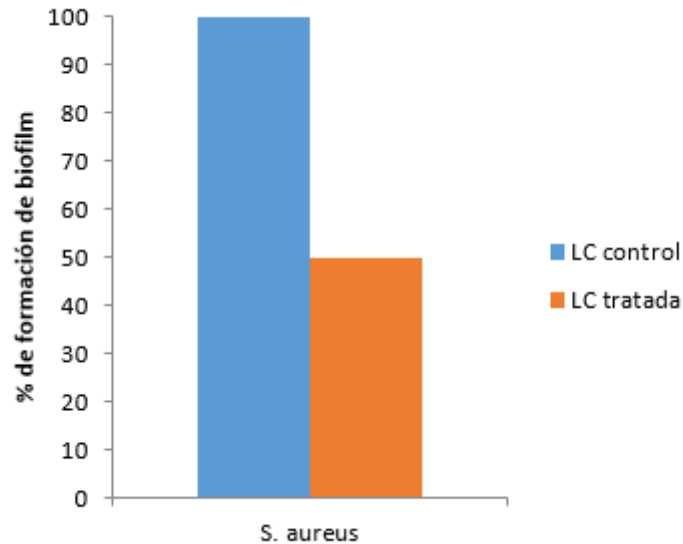


Gráfico 2. Formación de biofilm sobre las LC

Las dos soluciones de las LC sumergidas en bacteria diluida tienen mayor absorbancia que las soluciones de las LC incubadas únicamente en caldo de cultivo sin inocular (blanco)

Observamos claramente como la solución de etanol en la cual estaba la LC control tiene más absorbancia que la solución de etanol en la cual estaba la LC tratada.

Esto indica que en la primera solución había más cantidad de bacterias y exopolímeros (constituyentes de los biofilms) que en la correspondiente a la LC tratada. Para poder comparar los resultados, éstos se han expresado en porcentajes, siendo asignado el 100 % de formación de biofilm a la LC control (sin tratar) y calculando el porcentaje de formación sobre la LC tratada.

En conclusión, el biofilm se formó en mayor medida en la LC control que en la LC tratada. En concreto se ha observado una reducción del 50 % aproximadamente. Esto indica que la LC tratada tiene la capacidad de impedir o retrasar la formación de biofilms sobre su superficie.

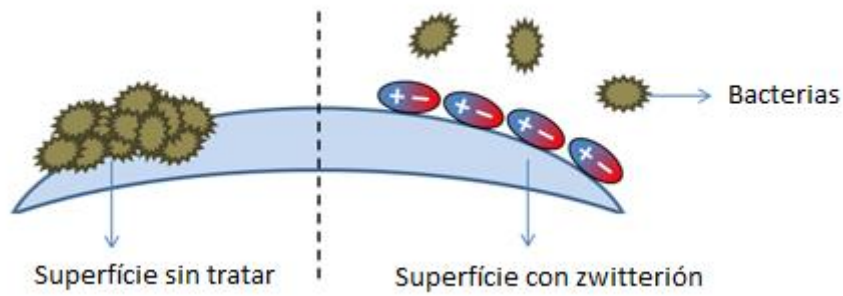


Figura 23. Esquema comparaci6n de una superficie tratada y otra sin tratar

E. Conclusión

Las conclusiones a las cuales hemos podido llegar con la realización de este trabajo han sido las siguientes.

Los tres recubrimientos utilizados durante el proceso se han adherido con éxito a la superficie de las LC utilizadas:

La silanización de la LC mediante el APTES se ha realizado correctamente, la prueba de la ninhydrina y el FTIR lo corroboran.

La dotación de las LC con poder antioxidante mediante la aplicación de fenoles (los cuales estaban presentes en el ácido gálico) mediante la lacasa parece haberse realizado con éxito, se han observado cambios en el FTIR que podrían corroborarlo.

La adhesión del zwitterión y la dotación de la LC con actividad antibiofilms se ha realizado con éxito, las pruebas de FTIR, de la adsorción de proteína y la prueba del anti-biofilm lo corroboran.

El methafilcon resulta ser eficaz a la hora de recubrirlo con éste tipo de recubrimientos.

El recubrimiento se muestra estable al estar sumergido durante un tiempo prolongado en solución lagrimal simulada.

Las LC tratadas impiden en un 50 % la formación de biofilms por parte de la bacteria *Staphylococcus aureus* respecto a las LC sin tratar. Esto no quiere decir que actúen de igual manera para otro tipo de bacterias y en otras condiciones.

También faltaría comprobar la bio-compatibilidad de la LC con el recubrimiento.

Se puede afirmar que el recubrimiento se ha adherido con éxito a la LC y que le ha proporcionado un cierto grado de poder antibacteriano. No obstante, se han de hacer más pruebas tanto de caracterización del material como de biocompatibilidad para que las LC pudieran utilizarse en pacientes reales.

Bibliografia

- [1] **Jose L. G. et al.** 25 LENTES DE CONTACTO y CIRUGIA REFRACTIVA. *Sociedad Oftalmológica Española*.
- [2] **Andreas O.** A dual polyphenolic/zwitterionic coating for prevention of microbial biofilm formation on urinary catheters. *Másters de la UPC*.
- [3] **Lindsay A. McG. et al.** Techniques, indications and complications of corneal debridement. *Survey of Ophthalmology*. 2004, 30, Issue 9, 1896-1901.
- [4] **Hurí H.** Trasplante de córnea. Criterio clínico quirúrgico, Cornea transplantation. Clinic surgical criteria. *Revista de investigación clínica*. Abril 2005, ISSN 0034-8376.
- [5] **Rosa M. O. et al.** Flora bacteriana conjuntival preoperatoria. *Revista Mexicana de Oftalmología*. 2009; 83(5): 267-271
- [6] **Ricardo P. C. et al.** Infecciones oculares asociadas a los implantes oculares. *Instituto Clínico de Oftalmología. Hospital Clínic de Barcelona. Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona. Barcelona. España*. 2008, 26 (9).
- [7] **Jaime E. et al.** Diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. ISBN-978-84-613-1485-0
- [8] **Beściak, G. et al.** BIOFILM AS A BASIC LIFE FORM OF BACTERIA. *Environmental Biotechnology Department, Faculty of Power and Environmental Engineering*.
- [9] **Luanne H. et al.** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*. 2004, 2: 95-108.
- [10] **Maurizio R. et al.** Ocular Surface and Tear Film and Their Dysfunction in Dry Eye Disease. *Survey of ophthalmology*. 2001, 45 (2): 203-210.
- [11] **Anne M. B. et al.** The composition and interfacial properties of tears, tear substitutes and tear models. *Journal of the British Contact Lens Association*. 1993, 16 (2): 57-66.
- [12] **Harald C. et al.** Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*. 2004, 35(1-2): 93-106.
- [13] **Viviana P. C. et al.** Development of therapeutic contact lenses using a supercritical solvent impregnation method. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2010, 52 (3): 306-316.
- [14] **Jilie K. et al.** Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China*. 2007, 39(8): 549-59.
- [15] **Anchana C. et al.** Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food Chemistry*. 2007, 100 (3): 1044-1048.
- [16] **Mojca B. et al.** Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties. *Institute for Engineering Materials and Design, University of Maribor, Smetanova ul. 17, SI-2000 Maribor, Slovenia*. 2012, 87(4): 2388–2398.
- [17] **Puupponen-Pimia R. et al.** Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries, *Journal of Applied Microbiology*. 2001, 90(4): 494-507.
- [18] **Yung C. et al.** Development of Biocompatible Interpenetrating Polymer Networks Containing a Sulfobetaine-Based Polymer and a Segmented Polyurethane for Protein Resistance. *Department of Chemical Engineering and Center for Nanotechnology, University of Washington, Seattle, Washington 98195*. 2007, 8: 122 – 127.

- [19] **Ghodsieh B. et al.** Laccase-Catalyzed Synthesis of 4-Hydroxycoumarin Derivatives. *Hikari Ltd, Pure and Applied Chemical Sciences*. 2013, 2: 75-82.
- [20] **Faix O.** Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Springer Series in Wood Science*
- [21] **Díaz Blanco C et al.** Dyeing Properties, Synthesis, Isolation and Characterization of an in Situ Generated Phenolic Pigment, Covalently Bound to Cotton. *Enzyme Microb. Technol.* 2009, 44: 380-385.
- [22] **Kudanga, T. et al.** Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: a review. *Enzyme and Microbial Technology*. 2011, 48: 195-208.
- [23] **Mai C. et al.** Chemo-Enzymatically Induced Copolymerization of Phenolics with Acrylate Compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001, 55: 177-186.