



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

Departamento de Química

---

Trabajo de Tesis Doctoral

“Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida”

---

Constanza Y. Flores

Directora: Dra. Carolina Vericat

Co-Directora: Dra. Patricia L. Schilardi

2014

El presente Trabajo de Tesis fue realizado en el Laboratorio de Nanoscopías y Fisicoquímica de Superficies del Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) bajo la dirección de la Dra. Carolina Vericat y la co-dirección de Dra. Patricia L. Schilardi

*A mamá*

*Por iluminar mí camino*

# Agradecimientos

Quiero expresar mi gratitud a todas aquellas personas que me acompañaron y compartieron conmigo esta odisea científica.

En primer lugar a mis directoras, Dra. Carolina Vericat y Dra. Patricia Schilardi, por haber aceptado la dirección del presente Trabajo de Tesis y brindarme la oportunidad de trabajar con ellas. Durante este proceso me han ofrecido su completo apoyo, paciencia, tiempo y conocimientos. Todo lo que he aprendido en el transcurso de este tiempo, me acompañaran el resto de mi vida profesional y personal.

Al Dr. Roberto Salvarezza y Dra. Mónica Fernández Lorenzo de Mele por sus conocimientos, aportes y apoyo durante el presente Trabajo de Tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) ya que a través de sus becas he podido llevar a cabo la presente Tesis Doctoral.

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por haberme permitido llevar a cabo mis estudios de postgrado en la mencionada casa de altos estudios

A todas las personas del Laboratorio de Nanoscopías, es especial con quienes compartí gran cantidad de tiempo y han hecho muy ameno el desarrollo del presente Trabajo: Eva (gran compañera de viajes), Emi, Anto, Caro Díaz, Ceci, Ale Ramirez (gran amigo), María, Fede, Ale Miñan, Flavia, Emi Alberdi, Julie, Bárbara, Diego, Eduardo, Matías, Laura, Marcos, Matías, María Ana, Gastón, Julio, Aldo, Guille, Germán, Mariano, Celeste, Francisco y Agustín (hermano adoptivo científico). Que además me han brindado su amistad y albergue en las largas jornadas de trabajo.

Al Laboratorio de Biomateriales bajo la dirección de la Dra. Mónica Fernández de Mele, ya que me brindaron el lugar y los conocimientos para llevar a cabo gran parte de los ensayos del presente Trabajo. A la colaboración a Dra. Claudia Grillo. A los chicos del 3er piso, Flor, Pao, Marcos, Maga y Fernando.

A las autoridades anteriores y actuales del Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), los Dr. Eduardo A. Castro (ex director), Dr.

Roberto C. Salvarezza y Dr. Felix Requejo (actual director), por haberme permitido llevar a cabo mis trabajos de investigación en la mencionada institución

Al personal técnico, de biblioteca y de secretaría del INIFTA por haber facilitado mis tareas en estos años durante el presente Trabajo en dicha Institución.

A mi familia, por ayudarme en esta semejante tarea en la embarque y por estar siempre unidos en las buenas y en malas. En especial, a mi mamá quien siempre creyó en mí y lucho conmigo para que me convierta en quien soy. Siempre serás la luz que ilumine mi camino.

A mis amigos, los cuales son mis pilares y los adoro, Barby, Lau, Sil, Maxi, Cintia, Diego y Maru. Ellos me han acompañado en los momentos más tristes y felices de mi vida. Me han ayudado a ser mejor persona y a llevar a cabo este trabajo. En especial, a Barby por convertirse en mi hermana de corazón y luchar juntas contra las reveses de la vida.

Mil Gracias a todos, sin Uds no habría llegado a esta instancia

Conie

## Resumen

El objetivo general del presente Trabajo de Tesis fue la preparación y caracterización de superficies sólidas modificadas con nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en Biomedicina. Para esto se optimizó el método de síntesis de nanopartículas de plata (NPs Ag) recubiertas con citrato, obteniendo NPs Ag monodispersas de  $6 \pm 2$  nm de diámetro recubiertas con citrato y estables en medios acuosos. Asimismo, se estudió la inmovilización de estas NPs Ag sobre superficies de Ti/TiO<sub>2</sub>, encontrándose que las mismas se adsorben espontáneamente sobre dichas superficies como resultado de la inmersión del sustrato en la dispersión acuosa de NPs. Se analizó el efecto antimicrobiano de estas NPs Ag sobre bacterias Gram (-) (*Pseudomonas aeruginosa*) y bacterias Gram (+) (*Staphylococcus aureus*), tanto en dispersión como inmovilizadas sobre los sustratos antes mencionados. Asimismo, se estudió la citotoxicidad de las NPs Ag sobre células osteoblásticas. La caracterización de los sistemas se realizó por diferentes técnicas fisicoquímicas: microscopía de fuerzas atómicas (AFM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía óptica de epifluorescencia, espectroscopías de UV- visible y de fotoelectrones de rayos X (XPS) y medidas de absorción atómica. Los resultados permiten concluir que las NPs Ag preparadas poseen una alta capacidad bactericida, ya que se produce una mortandad del 99,9 % con sólo pequeñas dosis de las mismas. Los estudios realizados con células osteoblásticas permitieron concluir que la concentración mínima de Ag total presente en las NPs Ag necesaria para erradicar ambas bacterias ensayadas no genera efectos citotóxicos en dichas células. En cuanto a los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> modificados con NPs Ag, éstos demostraron ser eficaces para inhibir la formación de biofilms de ambas bacterias (*Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*). Asimismo, se halló que el efecto bactericida producido por las NPs Ag adsorbidas es similar al causado por un sustrato de Ag masivo, indicando que muy pequeñas dosis de plata adsorbidas sobre la superficie son suficientes para producir este efecto. El agregado de levofloxacina (un antibiótico de amplio espectro) a los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> modificados con NPs Ag produjo un efecto

sinérgico en el caso de *Staphylococcus aureus*, mientras que para *Pseudomona aeruginosa* sólo se encontró efecto aditivo. El uso de un antibiótico podría constituir una estrategia adicional para potenciar el efecto bactericida de las superficies modificadas con NPs Ag.

Finalmente, se debe destacar la importancia de los resultados de este trabajo en relación a los materiales implantables. El método desarrollado para modificar las superficies de titanio, un material ampliamente utilizado en implantes, biocompatible y con una alta resistencia a la corrosión, es rápido, sencillo y de bajo costo, pudiendo implementarse en cualquier entorno clínico y sin la necesidad de contar para ello con personal altamente capacitado.

# INDICE GENERAL

## Capítulo 1

### Introducción

1.1 Nanotecnología y Nanomateriales.....	1
1.2 Biomateriales.....	4
1.2.1 Descripción general.....	4
1.2.2 Biomateriales y Biofilms.....	6
1.2.3 Estrategias para la inhibición de biofilms sobre la superficie del biomaterial.....	11
1.3 Nanopartículas con capacidad microbicida.....	13
1.3.1 Nanopartículas de plata.....	14
1.4 Objetivo de la Tesis.....	16
Referencias bibliográficas.....	17

## Capítulo 2

### Técnicas fisicoquímicas de caracterización

2.1 Microscopía de fuerzas atómicas (AFM).....	23
2.1.1 Operación del AFM.....	24
2.1.2 AFM en modo contacto.....	33
2.1.3 Análisis de las imágenes de AFM.....	34
2.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	35
2.3 Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS).....	38
2.4 Espectroscopía de absorción de luz ultravioleta y visible (UV-visible).....	45
2.5 Espectroscopía de absorción atómica (AAS).....	47
Referencias bibliográficas.....	49

## Capítulo 3

### Caracterización microbiológica

3.1 Microorganismos y cultivos usados.....	50
3.1.1 <i>Pseudomonas</i> .....	50
3.1.2 <i>Staphylococcus</i> .....	52
3.1.3 Conservación de las cepas bacterianas.....	53
3.1.4 Medios de cultivo.....	54
3.2 Determinación del número de bacterias.....	55
3.2.1 Curva de calibración.....	56
3.2.2 Curva de crecimiento.....	57



3.3 Condiciones experimentales para el estudio de la capacidad bactericida de las NPs Ag sobre bacterias planctónicas.....	59
3.3.1 Halo de inhibición.....	60
3.3.2 Dilución en caldo: determinación de la concentración mínima bactericida	61
3.4 Condiciones experimentales para el estudio de la formación de biofilms sobre superficies.....	63
3.4.1 Formación de biofilms sobre distintos sustratos.....	63
3.4.2 Viabilidad de las bacterias adheridas sobre distintos sustratos.....	64
3.4.2.1 Microscopía óptica de epifluorescencia.....	65
3.4.2.1.1 Tinción con el Kit LIVE/DEAD Baclight® .....	65
3.4.2.1.2 Tinción con naranja de acridina.....	67
3.4.2.2 Recuento en placa de las bacterias adheridas.....	67
Referencias bibliográficas.....	71

## Capítulo 4

### Síntesis y caracterización de nanopartículas de Ag

4.1 Introducción.....	74
4.2 Métodos utilizados para la síntesis de NPs Ag.....	78
4.2.1 Variación del método de Turkevich.....	78
4.2.2 Método de Tollens.....	79
4.2.3 Métodos por reducción de AgNO <sub>3</sub> con NaBH <sub>4</sub> .....	81
4.2.3.1 Método en ausencia de iones citrato.....	81
4.2.3.2 Métodos en presencia de iones citrato.....	82
4.2.3.2.1 Método I.....	82
4.2.3.2.2 Método II.....	83
4.2.3.2.3 Método III.....	84
4.2.3.2.4 Método IV.....	85
4.3 Conclusiones.....	89
Referencias bibliográficas.....	91

## Capítulo 5

### Efecto de las nanopartículas de Ag sobre bacterias planctónicas

5.1 Introducción.....	95
5.2 Evaluación de la capacidad bactericida de las NPs Ag en suspensión sobre <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i> .....	100
5.2.1 Halo de inhibición.....	100
5.2.2 Concentración mínima bactericida.....	101

5.3 Conclusiones.....	110
Referencias bibliográficas.....	112

## Capítulo 6

### Inmovilización de nanopartículas de Ag sobre sustratos de titanio

6.1 Introducción y antecedentes.....	116
6.2 Adsorción de NPs Ag sobre sustratos de Ti/TiO <sub>2</sub> .....	120
6.3 Caracterización mediante XPS de los sustratos Ti/TiO <sub>2</sub> modificados con NPs Ag....	121
6.4 Caracterización mediante AFM de los sustratos Ti/TiO <sub>2</sub> modificados con NPs Ag..	126
6.5 Estudio de la liberación de iones Ag(I) en medios acuosos.....	133
6.5.1 Ensayos de liberación de iones Ag(I).....	134
6.5.1.1 Medidas de Absorción Atómica.....	134
6.6 Conclusiones.....	136
Referencias bibliográficas.....	138

## Capítulo 7

### Adhesión y viabilidad de bacterias sobre sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> modificados con nanopartículas de Ag

7.1 Introducción.....	142
7.2 Estudio de la adhesión y viabilidad de las bacterias adheridas sobre sustratos de Ti/TiO <sub>2</sub> -NPsAg.....	145
7.2.1 Ensayos cualitativos de la adhesión y viabilidad de las bacterias adheridas sobre sustratos de Ti/TiO <sub>2</sub> -NPsAg.....	145
7.2.1.1 Método del Halo de crecimiento.....	145
7.2.2 Ensayos cuantitativos y semi-cuantitativo de la adhesión y viabilidad de las bacterias adheridas sobre sustratos de Ti/TiO <sub>2</sub> -NPsAg.....	147
7.2.2.1 Método I: Kit LIDE/DEAD para <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i> .....	147
7.2.2.2 Método II: Recuento en placa para <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i> .....	152
7.3 Estudio de la morfología del biofilms bacterianos sobre sustratos de Ti/TiO <sub>2</sub> modificados con NPsAg.....	155
7.3.1 Imágenes de AFM de biofilms de <i>S. aureus</i> .....	155
7.3.2 Imágenes de AFM de biofilms de <i>P. aeruginosa</i> .....	156
7.3.3 Estudio de la rugosidad de la pared celular de <i>P. aeruginosa</i> .....	159
7.4 Conclusiones.....	162
Referencias bibliográficas.....	164

## Capítulo 8

### Efecto de las nanopartículas de Ag en dispersión sobre células osteoblásticas

8.1 Introducción.....	168
8.2 Ensayos de citotoxicidad con NPs Ag sobre células osteoblásticas.....	172
8.2.1 Ensayos con rojo neutro.....	174
8.2.2 Ensayos con MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio.....	175
8.2.3 Resultados de los ensayos de RN y MTT.....	176
8.3 Efecto del medio de cultivo sobre la liberación de iones Ag(I).....	181
8.4 Conclusiones.....	182
Referencias bibliográficas.....	183

## Capítulo 9

### Evaluación del tratamiento antibiótico sobre bacterias adheridas a sustratos de Ti modificados con nanopartículas de Ag

9.1 Introducción.....	186
9.2 Descripción del antibiótico utilizado.....	191
9.3 Evaluación de la eficacia de la acción combinada entre superficie de Ti/TiO <sub>2</sub> -NPsAg y levofloxacin sobre biofilms bacterianos.....	192
9.4 Conclusiones.....	202
Referencias bibliográficas.....	203

## Capítulo 10

Conclusiones generales.....	208
Referencias bibliográficas.....	212

## Apéndice A

Cálculo del cubrimiento de Ag adsorbidas sobre la superficie de los sustratos de titanio.....	213
Referencias bibliográficas.....	216

## Apéndice B

Cálculo de la cantidad de Ag total adsorbida y expuesta al medio en los sustratos de titanio.....	217
---	-----

B.1 Cantidad de Ag adsorbida sobre la superficie de los sustratos de Ti/TiO <sub>2</sub> .....	217
B.2 Cantidad de Ag expuesta al medio sobre la superficies de los sustratos de Ti/TiO <sub>2</sub>	219
Referencias bibliográficas.....	219

## **Apéndice C**

<b>Trabajos publicados.....</b>	<b>220</b>
---------------------------------	------------

## Abreviaturas

AAS	Espectroscopía de absorción atómica
AFM	Microscopía de fuerzas atómicas
ANOVA	Análisis de la varianza
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMB	Concentración mínima bactericida
CVD	Deposición química de vapor
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
EPS	Material polimérico extracelular
FWHM	Ancho de pico a media altura
GMP	Medio rico en fosfato enriquecido con glucosa, manitol y glicina
HPOG	Grafito pirolítico altamente orientado
UI	Unidades internacionales
MTT	3 - (4,5 - Di metil tiazol -2-il) -2,5-di fenil bromuro de tetrazolio
NPs	Nanopartículas
PBS	Buffer fosfato salino
PEG	Polietilenglicol
PVP	Polivinilpirrolidona
PVD	Deposición física de vapor
RMS	Desviación cuadrática media de la rugosidad
RN	Rojo neutro
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SEM	Microscopia electrónica de barrido
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
UFC	Unidad formadora de colonias
XPS	Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1 Nanotecnología y Nanomateriales

La Nanociencia es el estudio de la materia a nivel del nanómetro, escala en la cual las propiedades físicas y químicas de los sistemas difieren de las de los sistemas macroscópicos, convirtiéndolas en únicas. La Nanociencia estudia materiales y fenómenos a escala nanométrica en diversas áreas del conocimiento, tales como la Química (por ejemplo para estudios de catálisis y de reactividad química) o la Física (en el estudio de propiedades magnéticas y mecánicas). Otra disciplina que ha despertado interés en la Nanociencia es la Biología a través del estudio de estructuras y procesos biológicos en la escala nanométrica. A esta área se la denomina Bionanociencia y es muy prometedora ya que uno de sus principales objetivos es obtener conocimiento de procesos inspirados por la Naturaleza para abordar problemas en Medicina, Biotecnología y Farmacia.

El término "Nanotecnología" se emplea para describir la creación y manipulación de materiales con características estructurales dentro de la escala nanométrica. La nanotecnología abarca la producción y aplicación de materiales a

escalas que van desde los átomos o moléculas individuales hasta materiales con dimensiones de 100 nm (nanómetros) en sistemas biológicos, físicos y químicos. Además de la integración de estructuras con dimensiones nanométricas resultantes en sistemas de mayor dimensión. El objetivo de esta tecnología es innovar y desarrollar nuevos dispositivos de impacto en diferentes áreas, como por ejemplo, en la conversión de energía, almacenamiento de información, administración de fármacos y mejora de la calidad de los materiales de uso médico.

La primera alusión a esta tecnología fue hecha en 1959 por Richard P. Feynman, ganador del primer Nobel de Física, quien presentó una charla en la conferencia *American Physical Society* llamada “*There’s Plenty of Room at the Bottom*” (“Hay mucho espacio al fondo”)[1]. En la misma auguró una asombrosa cantidad de descubrimientos que tendrían un gran impacto en la ciencia por ser asociados a nuevas tecnologías, en ese momento sin desarrollar, y que permitirían la manipulación de estructuras en la escala atómica y/o molecular. Hubo que esperar aproximadamente 20 años para que se desarrollaran las técnicas experimentales que permitieran analizar estructuras a escala nanométrica: la microscopía de fuerzas atómicas (AFM) y de efecto túnel (STM). Estas técnicas permiten “observar” y además manipular materiales a escala atómica o molecular.

Simultáneamente, en el campo de la Biotecnología se desarrollaron técnicas moleculares y genéticas para estudiar los procesos biológicos, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las técnicas de ligación y de restricción de ADN y la obtención de proteínas recombinantes. Teniendo en cuenta el conocimiento adquirido de ambos campos, por una parte Nanotecnología y Biotecnología, dio nacimiento a una nueva área denominada Nanobiotecnología, donde el objetivo es el desarrollo de herramientas y dispositivos para la investigación en células madre, biología del desarrollo, biosensores, métodos de administración de fármacos más eficientes, diagnósticos certeros y tempranos de enfermedades, en todos los casos con el propósito último de mejorar la calidad de vida [2]. El desarrollo de estas tecnologías significa en la actualidad una gran inversión en investigación.

Se denomina nanomateriales a aquellos materiales que miden entre 1 y 100 nm en al menos una de sus dimensiones [3]. En particular, las nanopartículas (NPs) son

aquéllos nanomateriales que poseen menos de 100 nm en todas sus dimensiones. Las características de los materiales tradicionales dependen de cómo se comportan los electrones en su seno y de cómo están ordenados los átomos en la materia. Esto también ocurre en el caso de los nanomateriales, pero además es importante considerar las características particulares que surgen de las dimensiones del propio material y de la elevada proporción de átomos superficiales. Es por ello que éstos presentan propiedades físicas y químicas novedosas que pueden ser utilizadas en diferentes aplicaciones nanotecnológicas. Por ejemplo, los nanotubos de carbono presentan una mayor resistencia y dureza con respecto al carbono a nivel macroscópico[1].

Los métodos de fabricación de los nanomateriales en general se dividen en dos categorías: “*top-down*” (de arriba hacia abajo) o “*bottom-up*” (de abajo hacia arriba) [3, 4]. El método “*top-down*” se lleva a cabo a partir de materiales de grandes dimensiones que se reducen hasta alcanzar tamaños de pocos nanómetros empleando técnicas como la molienda o desgaste. El método “*bottom-up*” consiste en la construcción de estructuras a partir de átomos o moléculas en fase gaseosa o en solución, a semejanza de lo que ocurre en la síntesis de proteínas, ADN o estructuras celulares en los seres vivos. Este último método es el más usado para la fabricación de nanomateriales.

Los nanomateriales han recibido especial atención por sus singulares propiedades electrónicas, magnéticas, ópticas y catalíticas [3]. En el área de Biomedicina, hay dos características relevantes que los distingue de los demás materiales [5]: i) debido a su tamaño pueden llegar con mayor rapidez y efectividad a un blanco elegido luego de ser administrados y, ii) la relación área/volumen es mayor que en un material macroscópico, lo cual permite modificar su superficie con una mayor cantidad de moléculas activas y ofrece una mayor exposición del nanomaterial ante el blanco elegido. Cuando estos nanomateriales se combinan con ciertas moléculas de interés biológicos (antibióticos, factores de crecimiento, proteínas, etc) mediante enlaces covalentes, interacciones electrostáticas o de afinidad, se producen materiales con una capacidad de reconocimiento excepcional que pueden ser empleados en el desarrollo de nuevos biosensores, sistemas de diagnóstico y de



liberación de fármacos [5]. Estas características ubican a las NPs entre los nanomateriales más elegidos dentro de esta área con posibles aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico [6], desde marcadores [7] a biosensores [8].

## **1.2 Biomateriales**

### **1.2.1 Descripción general**

Los biomateriales son materiales sintéticos inertes que no producen reacciones adversas al ser puestos en contacto con tejidos vivos y con fluidos fisiológicos y que pueden emplearse para tratar, completar, aumentar o reemplazar tejidos vivos u órganos. Por lo tanto, un biomaterial es una sustancia farmacológicamente inerte diseñada para ser implantada o incorporada dentro de un organismo vivo [9]. El objetivo del biomaterial es reemplazar y/o restaurar una función o una parte de un tejido. Al tratarse de un material que va a ser implantado en un organismo vivo, debe cumplir con las siguientes características: i) ser biocompatible, ii) no ser tóxico, ni carcinógeno, iii) ser químicamente estable, iv) ser inerte, v) tener resistencia mecánica adecuada y vi) ser barato, con propiedades reproducibles y fácil de fabricar.

Los biomateriales pueden ser de origen artificial o biológico. En el primer caso podemos mencionar a los materiales metálicos, poliméricos y cerámicos. Los implantes metálicos, junto con sus aleaciones, son los más utilizados para implantes ortopédicos (clavos, alambres, placas) e implantes dentales (tornillos), ya que deben poseer una gran resistencia al desgaste mecánico y ser capaces de soportar la carga adecuada para su función. Los metales usados para la fabricación de estos implantes son: acero inoxidable, aleaciones de cobalto con cromo, molibdeno y níquel, titanio puro (Ti) y sus aleaciones con aluminio y vanadio. Y con respecto a los biomateriales biológicos, se pueden nombrar por ejemplo fragmentos de huesos, injertos de piel, matriz extracelular hasta células madres (humana o animal).

El Ti es uno de los materiales más ampliamente usados en implantes debido a sus propiedades, tales como la resistencia a la corrosión y al desgaste mecánico, su naturaleza inerte, su capacidad de adsorber proteínas en su superficie y su

biocompatibilidad [10]. Estas propiedades lo convirtieron en uno de los materiales más elegidos por investigadores y médicos para su uso en implantes ortopédicos, dentales y cardíacos.

Cuando el implante es puesto en contacto con las células del organismo, se produce un proceso denominado osteointegración. La primera descripción acerca de este proceso fue realizada por Branemärk *et al.* [11], quien la definió como una conexión directa, estructural y funcional, entre el hueso vivo, ordenado y la superficie de un implante sometido a carga funcional. Las células involucradas en este proceso se denominan osteoblastos y son las encargadas de sintetizar la matriz ósea que forma parte del hueso. Como parte de la osteointegración, los osteoblastos están continuamente depositando nuevas capas de hueso sobre ellos mismos. Estas células cumplen además la función de hacer crecer y mantener a los huesos.

El proceso de osteointegración se lleva a cabo a través de diversas etapas. En la primera se produce la formación del osteocito debido a que un osteoblasto queda rodeado por su propia matriz secretada denominada osteoide, para luego transformarse en una matriz dura calcificada. En la segunda etapa, estos osteocitos establecen conexiones con osteocitos adyacentes a través de canales comunicantes para formar una estructura superior. En una tercera etapa entran en juego las células denominadas osteoclastos, que se encargan de degradar la matriz dura y crear canales profundos dando lugar a la estructura estratificada del hueso compacto [12].

El proceso de interacción de las células osteoblásticas con el Ti ha sido estudiado por diversos autores [13-15]. En general, cuando el implante entra en contacto con los fluidos corporales (plasma sanguíneo) ocurre la primera interacción entre ambos (implante-plasma). El plasma sanguíneo posee una alta proporción de proteínas, siendo la albúmina sérica humana una de las de mayor proporción, por lo cual se supone es que la primera en adsorberse sobre la superficie del implante de Ti [16, 17]. Se ha estudiado también la interacción de las células con superficies porosas a escala micro/nanométrica, ya que esta característica aumentaría el proceso de adhesión y proliferación de las células sobre el implante de Ti [18-21].

Por otro parte, los implantes metálicos, al estar completa o parcialmente incorporados a los tejidos vivos, están en contacto con los fluidos fisiológicos que

pueden producir la degradación del material. Es por esto que hay que tener en cuenta tres aspectos: la resistencia a la corrosión y al desgaste mecánico, y que no se produzcan reacciones no deseadas en la interfaz tejido-implante. En el caso del Ti, éste cumple con estos aspectos requeridos, pero se debe tener en cuenta que el medio circundante al cual se lo expone al momento de implantarlo en el paciente no siempre se comporta igual. Consecuentemente, el éxito del implante dependerá no sólo de los aspectos mencionados anteriormente sino también que las condiciones durante el procedimiento quirúrgico no se hayan visto afectadas por un factor externo, como una falla en el protocolo de esterilidad o en la salud del receptor del implante.

### **1.2.2 Biomateriales y biofilms**

Generalmente, un implante se considera que ha fallado si éste debe ser extraído prematuramente por algún motivo, poniendo en riesgo la salud del paciente implantado. El primer tipo de falla posible es aquella causada por inconvenientes o problemas en la composición y/o estructura del implante. Entre éstas podemos mencionar deformaciones permanentes, fracturas por sobrecarga o fatiga, corrosión y desgaste. El segundo tipo de falla es la infección, inflamación y/o alguna otra respuesta del organismo ante la presencia del material, siendo entre éstas la infección la mayor causa de remoción del implante. Se ha establecido una relación directa entre la aparición de infecciones, causadas comúnmente por hongos o bacterias, y el uso de los materiales implantables [22].

Las bacterias son organismos unicelulares procariotas con dimensiones dentro de la escala del micrómetro. Estos organismos no poseen membrana nuclear, mitocondrias o un núcleo verdadero, y se reproducen por división asexual [23]. Poseen una pared celular que está compuesta por peptidoglicanos o mureína, que les otorga forma y rigidez a las bacterias. La estructura del peptidoglicano está conformado por dos derivados de azúcares *N*-acetil-glucosamina y ácido *N*-acetilmurámico unidos por enlaces peptídicos de un grupo de aminoácidos que incluyen L-alanina, D-alanina, D-glutámico o lisina o ácido diaminopimélico [23]. Las bacterias pueden dividirse en dos grandes grupos de acuerdo a su respuesta frente a la tinción diferencial de Gram. Ésta

es una técnica de identificación usada comúnmente en microbiología, la cual divide a las bacterias en Gram (+) y Gram (-) de acuerdo a la estructura de su pared celular [23], permitiendo así determinar la morfología del microorganismo. La estructura de la pared celular en las bacterias Gram (+) y Gram (-) es muy distinta, ya que en las Gram (+) está compuesta por una gruesa capa de un solo tipo de moléculas, denominadas peptidoglicanos, con ácidos teicoicos intercalados (Figura 1.1). Por el contrario, las bacterias Gram (-) están compuestas por una capa delgada de peptidoglicano y membranas celulares externas e internas, obteniéndose así una pared más compleja que las Gram (+) (Figura 1.1)[23].

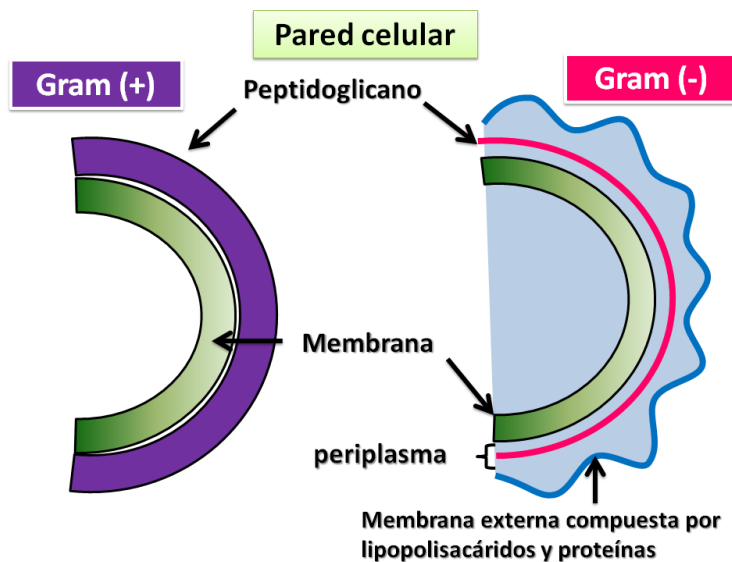


Figura 1.1. Esquema simplificado de la pared celular de bacterias Gram (+) y Gram (-)

Las bacterias pueden existir en dos formas o estados: las bacterias planctónicas son aquellas que se encuentran suspendidas en un medio líquido o de libre flotación, mientras que las sésiles crecen en colonias adheridas a una superficie sólida formando una estructura compleja denominada biofilm. Se estima que aproximadamente el 65% de todas las infecciones bacterianas en los seres humanos son causadas por bacterias que forman este tipo de estructuras [24], siendo responsables de las infecciones asociadas a implantes.

Un biofilm se puede definir como una comunidad bacteriana inmersa en un medio líquido caracterizada por bacterias que se hallan unidas a un sustrato o superficie, o bien unas a otras, y que se encuentran embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas. Las bacterias en los biofilms muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes [25].

El desarrollo de un biofilm sobre la superficie consta de varias etapas [22], siendo uno de los modelos más aceptados aquel conformado por 5 etapas (Figura 1.2), las cuales son:

- 1) Se forma una capa de glicoproteínas y lípidos del ambiente sobre la superficie del sustrato. Esto genera una superficie condicionada que favorecerá la adhesión de las bacterias planctónicas. Las características de esta capa dependerán de la composición de la superficie y de las propiedades químicas y físicas del medio líquido circundante.
- 2) Dependiendo de las características de las bacterias involucradas las células planctónicas que perciben una superficie condicionada pueden adherirse de dos maneras, activa y/o pasiva. En la adhesión activa están involucradas aquellas bacterias que poseen motilidad otorgada por los flagelos, fimbrias o pilis, que favorecen su desplazamiento hacia la superficie y la posterior adhesión. En el caso de aquellas que no poseen apéndices para la motilidad, la formación del biofilm se realiza a través de proteínas denominadas adhesinas que favorecen la adhesión a la superficie. En la adhesión pasiva están presentes factores externos como la difusión, gravedad, precipitación, los cuales favorecen la adhesión de las primeras bacterias planctónicas.
- 3) Las bacterias adheridas a la superficie (bacterias sésiles) comienzan a crecer y multiplicarse en el sitio de unión de las primeras bacterias colonizadoras, formando una microcolonia. Las células adheridas y sus hijas elaboran y secretan al exterior un exopolisacárido que constituirá la matriz del biofilm. La composición de este exopolisacárido difiere para cada bacteria. Por ejemplo, en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* el principal componente es alginato [26] y

para *Staphylococcus aureus* es poli-N-acetil-glucosamina [27]. La matriz del biofilm crece adquiriendo una estructura 2D.

- 4) En esta etapa se desarrolla la maduración del biofilm generando estructuras muy complejas que poseen canales, poros y una nueva distribución de las bacterias que lo componen. El biofilm adquiere estructuras 3D con formas muy singulares, similares a setas o hongos sobre la superficie del sustrato.
- 5) Cuando el biofilm ha alcanzado la madurez, algunas bacterias aisladas o colonias ubicadas en la parte exterior del biofilm se liberan de la matriz para poder colonizar nuevas superficies, finalizando el proceso del desarrollo del biofilm. La liberación o desprendimiento de las bacterias de la matriz se puede deber a factores externos o procesos activos inducidos por el medio. Los mecanismos que generan el desprendimiento de las bacterias son: (i) remoción continua de pequeñas partes del biofilm, (ii) remoción rápida y masiva, y (iii) liberación por colisión de partículas en el líquido que rodea al biofilm. Esta liberación genera un mecanismo por el cual las bacterias migran desde zonas que están densamente colonizadas a áreas sin colonizar, formando nuevos focos de desarrollo de biofilms.

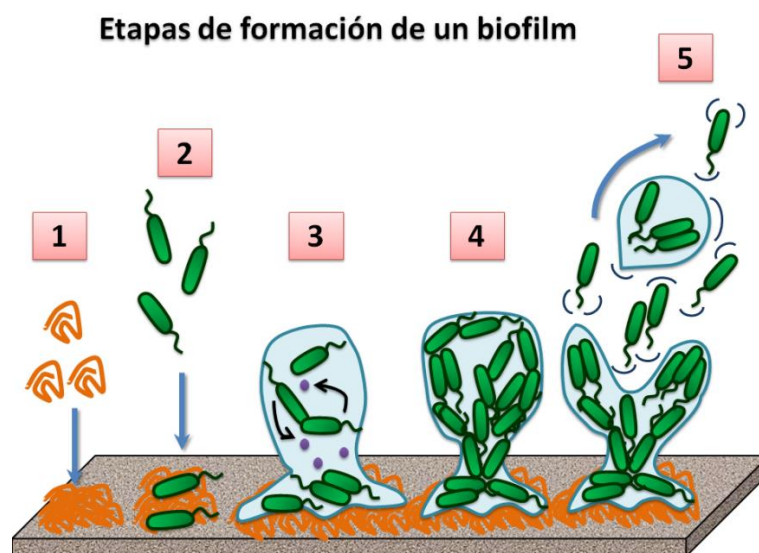


Figura 1.2. Etapas de formación de un biofilm sobre un sustrato: 1) acondicionamiento de la superficie, 2) adhesión reversible, 3) crecimiento y formación de la matriz extracelular, 4) maduración del biofilm y 5) remoción y migración de las bacterias constituyentes de la matriz del biofilm.

En general en la formación de un biofilm hay diversos factores a tener en cuenta, tanto desde la perspectiva de la célula bacteriana como del sustrato. La superficie de este último debe ser atractiva para favorecer la adhesión por su textura, hidrofobicidad o por la formación de una capa condicionante que permitirá la adhesión [28]. En el caso de la célula, ésta debe poseer algún tipo de mecanismo de adhesión (proteínas de adhesión o estructuras celulares como pili) y generar la formación de una matriz extracelular que permita la protección y crecimiento de las bacterias que formarán parte del biofilm [29-31].

En este trabajo de Tesis se estudió la formación de biofilms de *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Algunas de sus características principales se resumen en la Tabla 1.1

Tabla 1.1 Cuadro comparativo de las características que contribuyen a la capacidad de formación de biofilms de bacterias modelo Gram (+) y Gram (-)

	Gram	Motilidad	Adhesión	EPS	Factores que favorecen el biofilm
<b><i>P. aeruginosa</i></b>	(-)	Flagelo	Liposacáridos adhesinas	alginato	Flagelo Pili EPS
<b><i>S. aureus</i></b>	(+)	Sin apéndice	Adhesinas	poli-N-acetil-glucosamina	Adhesinas Polisacáridos de la cápsula*

Cápsula o *glicocálix*: capa celular que rodea la superficie de la bacteria compuesta por polisacáridos modificados. Esta capa es un factor de virulencia importante en bacterias.

La descripción anterior subraya la complejidad de la composición y estructura de los biofilms que pueden presentarse en infecciones asociadas con implantes. Sin embargo, la formación de grandes agregados de bacterias sobre la superficie de tejidos se han considerado como biofilms, y se han asociado a infecciones, tales como las producidas por *P. aeruginosa* en pulmones en enfermos con fibrosis quística o placas

microbianas en válvulas cardíacas [32]. Estos consorcios microbianos han sido identificados como biofilm sobre la base de sus características fenotípicas.

Por otra parte, la capacidad de formar biofilms no está limitada a ningún grupo o género específico de bacterias. Bajo condiciones ambientales adecuadas se pueden desarrollar biofilms de bacterias diversas, tales como *Haemophilus influenzae* [33, 34], *Klebsiella* [35, 36], *Escherichia coli* (*E. coli*) [37-39], entre otras, sobre la superficie de biomateriales. Las infecciones nosocomiales más recurrentes asociadas a implantes son causadas por *S. epidermis*, *S. aureus* y *Enterococcus*, y con menor frecuencia por *P. aereginosa* [32]. Ante esta situación se han desarrollado estrategias que involucran antibióticos, nanomateriales, etc., para evitar la colonización bacteriana y aumentar la osteointegración del mismo. En la siguiente sección se describirán las estrategias planteadas y desarrolladas en los últimos años.

### **1.2.3 Estrategias para la inhibición de biofilms sobre la superficie de biomateriales**

Cuando comienza a desarrollarse un biofilm sobre la superficie de un implante, las bacterias que forman parte del mismo se convierten en un adversario a detener, ya que generan un foco de infección poniendo en riesgo la salud del paciente. Los objetivos a seguir para el tratamiento médico de estas infecciones son: curar la infección, prevenir su reaparición, preservar la función del implante y, en casos muy severos, reducir el riesgo de una infección general o sepsis. Lamentablemente, a pesar de comenzar a combatir un biofilm antes de su formación, con tomas previas de antibióticos, éste puede desarrollarse con éxito y provocar una infección en el paciente. Las etapas que sigue la terapia médica incluyen en primer lugar el tratamiento con antibióticos; si el implante infectado es retenido, o si el tratamiento con ese solo agente antimicrobiano es inadecuado, se debe usar un tratamiento combinado de antibióticos. En el caso que los procedimientos anteriores no produzcan los resultados deseados, se debe remover y reemplazar el implante infectado, lo cual implica una nueva intervención quirúrgica del paciente, con el consecuente riesgo en la salud del mismo, además de ser un costo económico importante en el sistema de salud [40].



Como se ha mencionado en párrafos anteriores, el biofilm es una comunidad de microorganismos que están adheridos a la superficie de un sustrato formando una matriz producida por ellos mismos, compuesta por agua y sustancias poliméricas extracelulares. En estas condiciones, las bacterias que forman parte de esta estructura presentan una mayor resistencia a los antibióticos dada por diferentes mecanismos: producción de una matriz exopolimérica, velocidad de crecimiento lenta, respuesta ante el stress y alteración fenotípica [32, 41, 42]. Estos mecanismos actúan produciendo una resistencia muy marcada ante diversos antibióticos, generando protección o inactivación de los mismos. Un ejemplo muy común son las penicilinas: las bacterias constituyentes del biofilm producen enzimas denominadas  $\beta$ -lactamasas que son capaces de degradar al antibiótico [43, 44], o bien generan una matriz que no permite la difusión del antibiótico [45, 46] o un ambiente anóxico donde éstas permanecen en un estado metabólico latente ocasionando que no haya división celular [47]. Todo esto hace que la penicilina no pueda actuar, ya que únicamente poseería efecto microbicida durante la división celular [48, 49].

En el caso de biomateriales, la resistencia del biofilm frente a los antibióticos ha conllevado a combatir los focos infecciosos con una amplia variedad de antibióticos, en ocasiones en concentraciones elevadas, los cuales no siempre son capaces de erradicarlo, con las consecuencias antes mencionadas. En general, la resistencia bacteriana a los antibióticos se debe en gran parte al uso desmedido o incorrecto en terapias contra una infección. Por esta razón son necesarios nuevos enfoques para el desarrollo de nuevos antibióticos o terapias con agentes microbicidas más eficientes, manteniéndose así al corriente con la evolución constante de la resistencia microbiana ante los antibióticos. No obstante, si se pudiera actuar desde otro frente que permitiera retrasar o inhibir la colonización de las primeras bacterias sobre la superficie se podría evitar el desarrollo del biofilm. Esta estrategia implicaría modificar o realizar tratamientos superficiales que inhiban la formación del biofilm, y a su vez, promover la adhesión de células, evitando rechazos y aumentando la efectividad de otros agentes antimicrobianos utilizados en combinación. Con respecto a esta estrategia, ya se ha empezado a implementar el uso de antibióticos o proteínas sobre la superficie de los biomateriales. En la literatura se pueden encontrar diversos

ejemplos de ello. Antoci *et al.*, por ejemplo, modificaron la superficie de aleaciones de Ti con vancomicina (un glicopéptido que inhibe la síntesis de pared celular) obteniendo una superficie que fue capaz de inhibir la proliferación y formación del biofilm de *S. epidermis* [50]. Con respecto a los antibióticos, Lucke *et al.* modificaron implantes de Ti con gentamicina (antibiótico de amplio espectro) y lograron reducirla adhesión de *S. aureus* [51]. Otros autores, como Popat *et al.*, demostraron que el uso de nanotubos de TiO<sub>2</sub> modificados con gentamicina redujo significativamente la adhesión de *S. aureus*, aumentando además la diferenciación de las células osteoblásticas [52]. Sin embargo, hay una creciente resistencia de los microorganismos a los antibióticos y una incidencia relativamente alta de infecciones, lo cual genera la necesidad de nuevos agentes microbicidas. Por consiguiente es de gran relevancia desarrollar nuevas terapias para combatir los microorganismos patógenos, por ejemplo con nanomateriales con propiedades microbicidas.

### 1.3 Nanopartículas con capacidad microbicida

Actualmente, con el auge de la Nanotecnología se han desarrollado ciertos nanomateriales, en particular NPs inorgánicas, que presentan un marcado efecto microbicida sobre una amplia variedad de microorganismos, tales como virus, bacterias y hongos [53, 54]. La capacidad microbicida de las NPs está vinculada a la naturaleza del material y a ciertas características intrínsecas de las mismas, como sus dimensiones nanométricas (lo cual les permite ser internalizadas con mayor facilidad en microorganismos) y la alta relación área/volumen que permite un mayor contacto e interacción con dichos microorganismos [54]. Entre las NPs que han demostrado tener propiedades microbicidas las más importantes son las de plata, óxido de zinc, cobre u óxidos de hierro. Las primeras tres sustancias ya presentan esta propiedad en su forma macroscópica, mientras que los óxidos de hierro únicamente resultan ser microbicidas en forma nanoestructurada [53]. Las NPs presentan mecanismos de acción microbicida totalmente diferentes a los antibióticos tradicionales, proporcionando así una alternativa promisoriosa. Los mecanismos de toxicidad que presentan las NPs con acción

bactericida sobre los microorganismos no han sido completamente dilucidados, aunque se han postulado varios. Entre éstos se pueden mencionar perturbaciones en las funciones de la membrana celular (las cuales alteran la permeabilidad y la respiración celular), el ingreso de las NPs a la célula, lo que genera una alteración en las funciones de las proteínas y el ADN, o la producción de especies oxidativas debido a la presencia de NPs en el interior de la célula [54, 55]. No es sencillo realizar un análisis comparativo de los datos de la bibliografía ya que la acción bactericida dependerá de una amplia variedad de factores entre los que se pueden mencionar: el tamaño y la forma de las NPs, su composición química, el recubrimiento y su carga superficial potencial y la concentración de NPs usada [54].

Dentro de la familia de las NPs metálicas, aquéllas que han suscitado el mayor interés son las nanopartículas de plata (NPs Ag), entre otros motivos debido a que las sales de este metal ya se utilizan desde hace mucho tiempo en preparaciones (por ejemplo en cremas tópicas) y en vendajes, entre otros. En la próxima sección se realizará una breve descripción de las NPs Ag.

### **1.3.1 Nanopartículas de plata**

Tal como se mencionó antes, las NPs metálicas, que han resultado más promisorias como agente bactericida son las NPs Ag debido a que la capacidad microbicida de la Ag es conocida desde hace siglos. De hecho existen antecedentes que se remontan a la época del Imperio Romano, donde se empleaba Ag para potabilizar el agua [56, 57] y en la actualidad ésta se sigue utilizada en muchos dispositivos de purificación. En el siglo XIX se usaba  $\text{AgNO}_3$  para permitir la epitelización y promover la cicatrización de heridas [57, 58]. En los años '40, en pleno auge de la penicilina, se introdujo el uso de la Ag para el tratamiento de infecciones bacterianas [59, 60]. En los años '60, Moyer introdujo el uso de  $\text{AgNO}_3$  para el tratamiento de quemaduras [61]. Este investigador indicaba que la solución no interfería en la proliferación del tejido epidérmico y poseía propiedades antibacterianas contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli* [61]. En el año 1968, el  $\text{AgNO}_3$  fue combinado con sulfamida para formar una crema de sulfazida de Ag, la cual sirve

como agente antibacteriano contra *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella spp*, *Pseudomonas spp*; también se probaron sus propiedades antifúngicas y antivirales [62].

En general, la preparación y la estabilización de las NPs metálicas se realizan a través de métodos físicos y químicos. En el caso de los métodos químicos, se utiliza la reducción química, técnicas electroquímicas y fotoquímicas, siendo la primera la estrategia más empleada en el caso de NPs Ag [3], ya que se obtienen dispersiones coloidales estables de la forma y el tamaño deseados, tanto en medio acuoso como orgánico [63-66]. Por otra parte, la capacidad microbicida de las NPs Ag se ha evaluado en una amplia variedad de microorganismos [67-73]

Una de las características que lo hace más atractivo la aplicación de las NPs Ag, es la baja probabilidad del desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos en comparación a los antibióticos [54]. Por tal motivo, se ha propuesto implementar el uso de las NPs Ag sobre distintos dispositivos de uso médico. Una de las estrategias, es la modificación de superficies de los dispositivos para inhibir la formación del biofilm bacteriano, como se ha mencionado anteriormente con antibióticos, pero con NPs Ag. Esta estrategia ya han empezado a implementarse sobre catéteres [74], válvulas [75], vendas [76], cremas tópicas [77] y también en pinturas [78] y textiles [79, 80].

Con respecto a la toxicidad de las NPs se ha observado la aparición de argiria en heridas abiertas tratadas con concentraciones excesivas de Ag. Sin embargo, en ciertos estudios se sugiere que, por su tamaño y por sus propiedades microbicidas, las NPs Ag pueden generar daños en el medioambiente debido a su acumulación [81]. En trabajos que involucran células eucariotas, como células hepáticas humanas [82], HeLa [83] y fibroblastos [84], se considera que las NPs Ag son tóxicas ya que provocan daños en la respiración celular y ciclos de división celular [85]. Sin embargo, debido a la variabilidad en concentración, tiempo de exposición, tamaño y forma de las NPs Ag, este tema continúa en debate. Esto se desarrollará en mayor detalle en el Capítulo 8.

### 1.3 Objetivo del Trabajo de Tesis

En base a las consideraciones anteriores, en el presente Trabajo de Tesis se planteó como objetivo general la preparación y caracterización de superficies sólidas modificadas con nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en Biomedicina. Para alcanzar este objetivo general, se consideraron los siguientes objetivos específicos:

1. *Preparar y caracterizar nanopartículas de plata.*
2. *Inmovilizar nanopartículas de plata con propiedades microbicidas y cicatrizantes sobre superficies de materiales implantables como el titanio. Estudiar la liberación controlada de nanopartículas y de los iones Ag(I) en medios acuosos.*
3. *Caracterizar por técnicas fisicoquímicas de los sistemas preparados.*
4. *Estudiar la actividad microbicida de las nanopartículas de plata en suspensión sobre bacterias Gram (+) y Gram (-).*
5. *Estudiar la formación de biofilms bacterianos sobre superficies de titanio modificadas con nanopartículas de plata y establecer la actividad microbicida de dichas superficies.*
6. *Estudiar la citotoxicidad de las nanopartículas de plata en células de mamíferos y comparar con el caso de nanopartículas de oro.*

Las actividades, los resultados obtenidos, así como su interpretación y las conclusiones que se lograron extraer de este trabajo se exponen en la presente Tesis Doctoral.

## Referencias bibliográficas

1. Bhushan, B., Handbook of Nanotechnology. 1st edition ed. Vol. 1. 2004, Germany, Springer.
2. Baneyx, F. y Park, J.-K., Editorial: Nanobio versus Bionano – what's in a name? *Biotechnology Journal*, 2013, (8), 158-159.
3. Schmid, G., Nanoparticles: From Theory to Application, 2010, Wiley.
4. Rao, C.N.R., Müller, A. y Cheetham, A.K., The Chemistry of Nanomaterials, 2006, Wiley.
5. Caruthers, S.D., Wickline, S.A. y Lanza, G.M., Nanotechnological applications in medicine. *Current opinion in Biotechnology*, 2007, (18), 26-30.
6. Salata, O.V., Applications of nanoparticles in biology and medicine, *Journal of nanobiotechnology*, 2004, (2), 3.
7. Yang, J., Lee, C. H., Park, J., Seo, S., Lim, E. K., Song, Y.J., Suh, J. S., Yoon, H. G., Huh, Y. M. y Haam, S., Antibody conjugated magnetic PLGA nanoparticles for diagnosis and treatment of breast cancer. *Journal of Materials Chemistry*, 2007, (17), 2695-2699.
8. Xiao, Y., Patolsky, F., Katz, E., Hainfeld, J.F. y Willner, I., "Plugging into Enzymes": Nanowiring of Redox Enzymes by a Gold Nanoparticle. *Science*, 2003, (299), 1877-1881.
9. Ratner, B., Hoffman, A.S., Schoen, F. y Lemons, J.E., Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. San Diego, California, 2004, 162-164.
10. Oshida, Y., Bioscience and Bioengineering of Titanium Materials, 2010, Elsevier Science.
11. Albrektsson, T., Brånemark, P.I., Hansson, H.A. y Lindström, J., Osseointegrated titanium implants: Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man, *Acta Orthopaedica*, 1981, (52), 155-170.
12. Alberts, B., Biología Molecular de la Célula, 1996, Omega, S.A., Ediciones.
13. Schwarz, F., Rothamel, D., Sculean, A., Georg, T., Scherbaum, W. y Becker, J., Effects of an Er : YAG laser and the Vector® ultrasonic system on the biocompatibility of titanium implants in cultures of human osteoblast-like cells, *Clinical Oral Implants Research*, 2003, (14), 784-792.
14. Feng, B., Weng, J., Yang, B.C., Qu, S.X. y Zhang, X.D., Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast, *Biomaterials*, 2003, (24), 4663-4670.
15. Jayaraman, M., Meyer, U., Bühner, M., Joos, U. y Wiesmann, H.P., Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro, *Biomaterials*, 2004, (25), 625-631.
16. Meyer, U., Buchter, A., Wiesmann, H., Joos, U. y Jones, D., Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces, *European Cell Materials*, 2005, (9), 39-49.
17. Yang, Y., Cavin, R. y Ong, J.L., Protein adsorption on titanium surfaces and their effect on osteoblast attachment, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2003, (67A), 344-349.
18. Lincks, J., Boyan, B.D., Blanchard, C.R., Lohmann, C.H., Liu, Y., Cochran, D.L., Dean, D.D. y Schwartz, Z., Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is

- dependent on surface roughness and composition, *Biomaterials*, 1998, (19), 2219-2232.
19. Martin, J.Y., Schwartz, Z., Hummert, T.W., Schraub, D.M., Simpson, J., Lankford, J., Dean, D.D., Cochran, D.L. y Boyan, B.D., Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63), *Journal of Biomedical Materials Research*, 1995, (29), 389-401.
  20. Lüthen, F., Lange, R., Becker, P., Rychly, J., Beck, U. y Nebe, J.G.B., The influence of surface roughness of titanium on  $\beta$ 1- and  $\beta$ 3-integrin adhesion and the organization of fibronectin in human osteoblastic cells, *Biomaterials*, 2005, (26), 2423-2440.
  21. Dettin, M., Bagno, A., Gambaretto, R., Iucci, G., Conconi, M.T., Tuccitto, N., Menti, A.M., Grandi, C., Di Bello, C. y Licciardello, A., Covalent surface modification of titanium oxide with different adhesive peptides: Surface characterization and osteoblast-like cell adhesion, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009, (90), 35-45.
  22. Jass, J., Surman, S. y Walker, J., *Medical Biofilms, Detection, Prevention and Control*. 2003, Wiley.
  23. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., Fernández, M.G. y Pérez, M.S., *Biología de los microorganismos*, Brock, 2003, Pearson, Príncipe Hall.
  24. Costerton, W., Veeh, R., Shirtliff, M., Pasmore, M., Post, C. y Ehrlich, G., The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections, *The Journal of Clinical Investigation*, 2003, (112), 1466-1477.
  25. Donlan, R.M. y Costerton, J.W., Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms, *Clinical Microbiology Reviews*, 2002, (15), 167-193.
  26. Gellatly, S.L. y Hancock, R.E.W., *Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses*, *Pathogens and Disease*, 2013, (67), 159-173.
  27. Götz, F., *Staphylococcus and biofilms*. *Molecular Microbiology*, 2002, (43), 1367-1378.
  28. Zita, A. y Hermansson, M., Effects of bacterial cell surface structures and hydrophobicity on attachment to activated sludge flocs, *Applied and environmental microbiology*, 1997, (63), 1168-1170.
  29. Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H. y Laufs, R., The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis, *Journal of Bacteriology*, 1996, (178), 175-183.
  30. Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, Í. y Penadés, J.R., Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation, *Journal of Bacteriology*, 2001, (183), 2888-2896.
  31. Davies, D.G., *Physiological events in biofilm formation*. in *SYMPOSIA-SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY*. 2000. Cambridge; Cambridge University Press; 1999.
  32. Costerton, J.W., Stewart, P.S. y Greenberg, E.P., Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections, *Science*, 1999, (284), 1318-1322.
  33. Murphy, T. y Kirkham, C., Biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*: strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili, *BMC Microbiology*, 2002, (2), 7.

34. Starner, T.D., Zhang, N., Kim, G., Apicella, M.A. y McCray, P.B., *Haemophilus influenzae* Forms Biofilms on Airway Epithelia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2006, (174), 213-220.
35. Stahlhut, S.G., Struve, C., Krogfelt, K.A. y Reisner, A., Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2012, (65), 350-359.
36. Lavender, H.F., Jagnow, J.R. y Clegg, S., Biofilm Formation In Vitro and Virulence In Vivo of Mutants of *Klebsiella pneumoniae*, *Infection and Immunity*, 2004, (72), 4888-4890.
37. Wang, X., Lünsdorf, H., Ehrén, I., Brauner, A. y Römling, U., Characteristics of biofilms from urinary tract catheters and presence of biofilm-related components in *Escherichia coli*, *Current microbiology*, 2010, (60), 446-453.
38. Pratt, L.A. y Kolter, R., Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili, *Molecular Microbiology*, 1998, (30), 285-293.
39. Ryu, J. H. y Beuchat, L.R., Biofilm Formation by *Escherichia coli* O157:H7 on Stainless Steel: Effect of Exopolysaccharide and Curli Production on Its Resistance to Chlorine, *Applied and environmental microbiology*, 2005, (71), 247-254.
40. Darouiche, R.O., Treatment of Infections Associated with Surgical Implants, *New England Journal of Medicine*, 2004, (350), 1422-1429.
41. Stewart, P.S. y William Costerton, J., Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, *The Lancet*, 2001, (358), 135-138.
42. Mah, T. F. C. y O'Toole, G.A., Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents, *Trends in Microbiology*, 2001, (9), 34-39.
43. Ciofu, O., Beveridge, T.J., Kadurugamuwa, J., Walther-Rasmussen, J. y Høiby, N., Chromosomal  $\beta$ -lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2000, (45), 9-13.
44. Bagge, N., Hentzer, M., Andersen, J.B., Ciofu, O., Givskov, M. y Høiby, N., Dynamics and spatial distribution of  $\beta$ -lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, (48), 1168-1174.
45. Anderl, J.N., Franklin, M.J. y Stewart, P.S., Role of Antibiotic Penetration Limitation in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, (44), 1818-1824.
46. Stewart, P.S., A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms, *Biotechnology and bioengineering*, 1998, (59), 261-272.
47. Lewis, K., Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, (45), 999-1007.
48. Tuomanen, E., Cozens, R., Tosch, W., Zak, O. y Tomasz, A., The Rate of Killing of *Escherichia coli* by  $\beta$ -Lactam Antibiotics Is Strictly Proportional to the Rate of Bacterial Growth. *Journal of general microbiology*, 1986, (132), 1297-1304.
49. Cozens, R.M., Tuomanen, E., Tosch, W., Zak, O., Suter, J. y Tomasz, A., Evaluation of the bactericidal activity of beta-lactam antibiotics on slowly growing bacteria cultured in the chemostat, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1986, (29), 797-802.



50. Antoci Jr, V., Adams, C.S., Parvizi, J., Davidson, H.M., Composto, R.J., Freeman, T.A., Wickstrom, E., Ducheyne, P., Jungkind, D., Shapiro, I.M. y Hickok, N.J., The inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by vancomycin-modified titanium alloy and implications for the treatment of periprosthetic infection, *Biomaterials*, 2008, (29), 4684-4690.
51. Lucke, M., Schmidmaier, G., Sadoni, S., Wildemann, B., Schiller, R., Haas, N.P. y Raschke, M., Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats, *Bone*, 2003, (32), 521-531.
52. Popat, K.C., Eltgroth, M., LaTempa, T.J., Grimes, C.A. y Desai, T.A., Decreased *Staphylococcus epidermidis* adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes, *Biomaterials*, 2007, (28), 4880-4888.
53. Seil, J.T. y Webster, T.J., Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature, *International journal of nanomedicine*, 2012, (7), 2767.
54. Hajipour, M.J., Fromm, K.M., AkbarAshkarran, A., Jimenez de Aberasturi, D., Larramendi, I.R.d., Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W.J. y Mahmoudi, M., Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 2012.
55. Cioffi, N. y Rai, M., Nano-antimicrobials: Progress and Prospects. 2012, Springer.
56. Richard, J.W., Spencer, B.A., McCoy, L.F., Carina, E., Washington, J. y Edgar, P., Acticoat versus silverlon: The truth, *J Burns Surg Wound Care*, 2002, (1).
57. Castellano, J.J., Shafii, S.M., Ko, F., Donate, G., Wright, T.E., Mannari, R.J., Payne, W.G., Smith, D.J. y Robson, M.C., Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs, *International wound journal*, 2007, (4), 114-122.
58. Klasen, H.J., Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses, *Burns*, 2000, (26), 117-130.
59. Chopra, I., The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern?, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2007, (59), 587-590.
60. Demling, R.H. y Desanti, L., Effects of silver on wound management, *Wounds*, 2001, (13), 4-15.
61. Moyer Ca, B.L.G.D.M.H.M.W.J., Treatment of large human burns with 0.5% silver nitrate solution, *Archives of Surgery*, 1965, (90), 812-867.
62. Fox, C.L. y Modak, S.M., Mechanism of silver sulfadiazine action on burn wound infections, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1974, (5), 582-588.
63. Guzmán, M.G., Dille, J. y Godet, S., Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. *Int J Chem Biomol Eng*, 2009, (2), 104-111.
64. Panáček, A., Kvitek, L., Pucek, R., Kolar, M., Vecerova, R., Pizurova, N., Sharma, V.K., Nevečná, T.j. y Zboril, R., Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006, (110), 16248-16253.
65. Sharma, V.K., Yngard, R.A. y Lin, Y., Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2009, (145), 83-96.

66. Mulfinger, L., Solomon, S.D., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A.V., Rutkowsky, S.A. y Boritz, C., Synthesis and study of silver nanoparticles, *Journal of chemical education*, 2007, (84), 322.
67. Pal, S., Tak, Y.K. y Song, J.M., Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 2007, (73), 1712-1720.
68. Sondi, I. y Salopek-Sondi, B., Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria, *Journal of colloid and interface science*, 2004, (275), 177-182.
69. Jose Ruben, M., Jose Luis, E., Alejandra, C., Katherine, H., Juan, B.K., Jose Tapia, R. y Miguel Jose, Y., The bactericidal effect of silver nanoparticles, *Nanotechnology*, 2005, (16), 2346.
70. Durairaj, R., Amirulhusni, A.N., Palanisamy, N.K., Mohd-Zain, Z. y Ping, L.J., Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles on Multi Drug Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*.
71. Shahverdi, A.R., Fakhimi, A., Shahverdi, H.R. y Minaian, S., Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2007, (3), 168-171.
72. Shahverdi, A.R., Minaeian, S., Shahverdi, H.R., Jamalifar, H. y Nohi, A.-A., Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of *Enterobacteria*: A novel biological approach, *Process Biochemistry*, 2007, (42), 919-923.
73. Ansari, M.A., Khan, H.M., Khan, A.A., Malik, A., Sultan, A., Shahid, M., Shujatullah, F. y Azam, A., Evaluation of antibacterial activity of silver nanoparticles against MSSA and MRSA on isolates from skin infections, *Biol Med*, (3), 141-146.
74. Samuel, U. y Guggenbichler, J.P., Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2004, (23, Supplement 1), 75-78.
75. Chaloupka, K., Malam, Y. y Seifalian, A.M., Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications, *Trends in Biotechnology*, 2010, (28), 580-588.
76. Maneerung, T., Tokura, S. y Rujiravanit, R., Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. *Carbohydrate Polymers*, 2008, (72), 43-51.
77. Jain, J., Arora, S., Rajwade, J.M., Omay, P., Khandelwal, S. y Paknikar, K.M., Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use, *Molecular Pharmaceutics*, 2009, (6), 1388-1401.
78. Kumar, A., Vemula, P.K., Ajayan, P.M. y John, G., Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil, *Nature materials*, 2008, (7), 236-241.
79. Kulthong, K., Srisung, S., Boonpavanitchakul, K., Kangwansupamonkon, W. y Maniratanachote, R., Research Determination of silver nanoparticle release from antibacterial fabrics into artificial sweat, 2010.
80. Li, Y., Leung, P., Yao, L., Song, Q. y Newton, E., Antimicrobial effect of surgical masks coated with nanoparticles, *Journal of Hospital Infection*, 2006, (62), 58-63.

81. Braydich-Stolle, L., Hussain, S., Schlager, J.J. y Hofmann, M.-C., In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells, *Toxicological Sciences*, 2005, (88), 412-419.
82. Kim, S., Choi, J.E., Choi, J., Chung, K.-H., Park, K., Yi, J. y Ryu, D.-Y., Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells, *Toxicology in vitro*, 2009, (23), 1076-1084.
83. Miura, N. y Shinohara, Y., Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells, *Biochemical and biophysical research communications*, 2009, (390), 733-737.
84. Arora, S., Jain, J., Rajwade, J. y Paknikar, K., Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells, *Toxicology and applied pharmacology*, 2009, (236), 310-318.
85. AshaRani, P., Low Kah Mun, G., Hande, M.P. y Valiyaveetil, S., Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells, *ACS nano*, 2008, (3), 279-290.

# Capítulo 2

## Técnicas fisicoquímicas de caracterización

En el presente Capítulo se describirán los fundamentos de las técnicas fisicoquímicas utilizadas para caracterizar y estudiar las propiedades de los sistemas nanoestructurados preparados en este Trabajo de Tesis.

### 2.1 Microscopía de fuerzas atómicas (AFM)

Las microscopías de barrido por sonda (SPMs, de su nombre en inglés, Scanning Probe Microscopies) se han convertido en herramientas muy utilizadas en la caracterización de superficies sólidas de materiales de distinta composición (metales, semiconductores, polímeros) o materiales depositados sobre superficies por su poderosa resolución que permite, en muchos casos, estudiar la materia a nivel atómico o molecular. Entre las SPMs se destacan la microscopía de efecto túnel (STM) y la microscopía de fuerzas atómicas (AFM).

Con respecto a otras técnicas de caracterización de superficies, como por ejemplo la microscopía electrónica de barrido (SEM), las SPMs poseen la ventaja de ser técnicas no destructivas, ya que las muestras a analizar no necesitan un tratamiento o preparación especial. Por otra parte, las SPMs pueden operar en distintos ambientes, tales como vacío, aire y líquidos (electrolitos y no electrolitos), siendo además posible variar la temperatura de operación, aunque lo más habitual es operar a temperatura ambiente. La posibilidad de medir las muestras en un medio líquido permite analizar los sistemas en su medio ambiente nativo, una condición muy importante para muestras biológicas, ya que en muchos casos es necesario proveer a éstas un ambiente controlado en condiciones fisiológicas. Asimismo, el AFM es una de las pocas herramientas capaz de brindar información espacial acerca de una superficie en las coordenadas X, Y y Z con suma precisión en la escala nanométrica. Por ejemplo, la adsorción de materiales sobre la superficie, la erosión de una superficie o cambios en la rugosidad por la acción de un agente pueden ser cuantificados mediante esta técnica.

### **2.1.1 Operación del AFM**

El principio básico de operación del microscopio de fuerzas atómicas (AFM) consiste en realizar el barrido controlado de la superficie de un sustrato con una sonda, la cual puede o no estar en estrecho contacto físico con la superficie mediante un régimen de fuerzas intermoleculares controladas por un mecanismo de retroalimentación. Las fuerzas intermoleculares que actúan entre la punta y la muestra son estudiadas a través del modelo de Lennard-Jones, en el que un par de átomos o moléculas están sujetos a dos tipos de fuerzas de interacción distintas, según se encuentren a una distancia de separación grande o pequeña. A grandes distancias actúan las fuerzas atractivas (van der Waals) y a pequeñas distancias las fuerzas repulsivas (repulsión de Pauli). Así, el modelo de Lennard-Jones propone que la energía potencial de un par de átomos se rige por la siguiente ecuación:

$$V(r) = 4 \epsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (\text{ec. 2.1})$$

donde  $r$  es la distancia de separación entre átomos,  $\epsilon$  es la mínima energía potencial y  $\sigma$  es el diámetro molecular efectivo. El término  $(\sigma/r)^{12}$  tiene en cuenta la repulsión entre átomos cuando éstos se aproximan ( $r$  tendiendo a cero) y se basa en el modelo de repulsión de Pauli, el cual considera que cuando un par de átomos se aproximan sus nubes electrónicas comienzan a solaparse, aumentando exponencialmente la energía del sistema y las fuerzas repulsivas del mismo. Por otra parte, el término  $(\sigma/r)^6$  representa las fuerzas atractivas, de tipo van der Waals, las cuales predominan a distancias más largas (Figura 2.1). La ecuación de Lennard-Jones se puede reformular para describir la interacción entre una superficie rígida y una esfera rígida, o una esfera rígida y una superficie plana elástica, manteniéndose la misma dependencia con  $r$  [1].

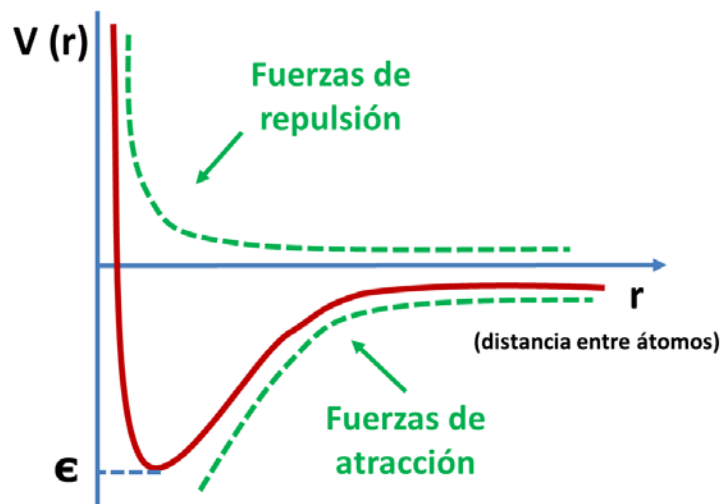


Figura 2.1 Gráfico del potencial Lennard-Jones en el que se muestra la dependencia de las fuerzas atractivas y repulsivas con la distancia entre átomos

El AFM consta de 5 elementos fundamentales: la punta, el fleje o cantiléver, el detector piezoeléctrico (o escáner), el sistema óptico de detección y el sistema de retroalimentación (Figura 2.2) [2]. La punta se selecciona de acuerdo al tipo de muestra, a las propiedades que se desean medir y al modo de operación del microscopio. De acuerdo con esto pueden ser de diferentes materiales, siendo los más comunes  $\text{Si}_3\text{N}_4$  o Si. Las puntas poseen un radio de curvatura característico, el cual se elige dependiendo de la muestra, ya que la calidad de las imágenes dependerá en gran medida de la geometría de la punta.

Las puntas están soportadas en el extremo del cantiléver, el cual se defleca según la topografía de la muestra. Éste tiene una superficie reflectante (en general es una capa de oro o de aluminio) para poder detectar los movimientos y/o deflexiones del mismo cuando la punta "barre" la superficie de una muestra. La magnitud de la deflexión se relaciona con la constante elástica ( $k$ ) del cantiléver, la cual dependerá del tamaño y espesor del mismo, siendo este último el factor preponderante. La constante de fuerza es un parámetro de suma importancia para obtener imágenes reproducibles. Cuando una muestra está constituida por materiales blandos (polímeros, células, etc) se utilizan  $k$  pequeñas, mientras que para muestras duras, ásperas o para determinar las propiedades nanomécanicas (adhesión, rugosidad, etc.) se emplean  $k$  con valores mayores. Además, si bien el valor de  $k$  es informado por los fabricantes, cuando se necesita cuantificar la fuerza aplicada sobre un punto específico es de vital importancia determinar su valor real. El programa de análisis del microscopio utilizado en esta tesis (Nanoscope V 7.20) permitió determinar el valor de  $k$  de las puntas utilizadas.

El detector piezoeléctrico o escáner es un componente que proporciona el control de posicionamiento preciso de la muestra. El escáner tiene forma de tubo y es de un material cerámico piezoeléctrico que cambia sus dimensiones como respuesta a un voltaje aplicado. Es necesario el aislamiento térmico del escáner, ya que los cerámicos del piezoeléctrico son sensibles a las fluctuaciones de temperatura. Estos escáneres se caracterizan por tener tres grados de libertad, expandiéndose en una dirección y contrayéndose en otra como resultado del voltaje aplicado. El intervalo de operación de

un escáner puede alcanzar 100  $\mu\text{m}$  en movimiento lateral y aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  en movimiento vertical, siendo necesario realizar la calibración periódica del mismo.

En el presente Trabajo de Tesis se utilizaron un microscopio AFM comandado por una unidad de control Nanoscope IIIa de Veeco Instruments (Santa Bárbara, CA, USA) y un microscopio Multimode controlado por una unidad Nanoscope V (Bruker, Santa Bárbara, CA, USA). Las puntas usadas fueron de nitruro de silicio montadas en un cantiléver con una constante elástica de  $k = 0.58 \text{ N/m}$ .

En los microscopios usados para esta Tesis la muestra se monta sobre un disco unido al escáner, por lo que la aproximación punta-muestra se realiza acercando la muestra a la punta. Así, los desplazamientos en Z (y también en X-Y) se producen en realidad por movimientos controlados de la muestra (ya que es ésta la que está unida al escáner). Existen otros microscopios en los que el ajuste de la distancia entre la punta y la muestra se realiza moviendo la punta a una muestra estática; en esos equipos el barredor piezoeléctrico mueve la punta con respecto a la muestra.

Los AFM incluyen un sistema de detección óptica (cabeza óptica) en el que se utiliza un láser que se refleja en el cantiléver y es enfocado hacia un fotodetector. La cabeza óptica contiene una ventana en la parte superior, un diodo, espejos y un láser para registrar los movimientos de deflexión generados por el cantiléver. En la Figura 2.2 c se muestra el esquema correspondiente al haz de láser que es reflejado desde la superficie del cantiléver al fotodetector. El desplazamiento vertical del cantiléver es registrado por el fotodetector, siendo proporcional a la señal diferencial entre los segmentos verticales del mismo. El fotodetector está dividido en dos segmentos, A y B, que corresponden a la señal en voltios de los segmentos superior e inferior, siendo la señal diferencial  $\Delta_{AB}$  igual a  $A - B$ . Por otra parte, se utiliza la señal diferencial reducida  $\Delta_{AB}/(A + B)$  para controlar la retroalimentación del movimiento de la cabeza de barrido en la dirección Z, y de esa manera se evita la influencia de la inestabilidad del haz del láser. En ciertos cantilévers que poseen un diámetro de 100 ó 200 nm es posible magnificar la señal del fotodetector en un factor de 750 o más, permitiendo la detección de deflexiones del cantiléver por debajo del angstrom.



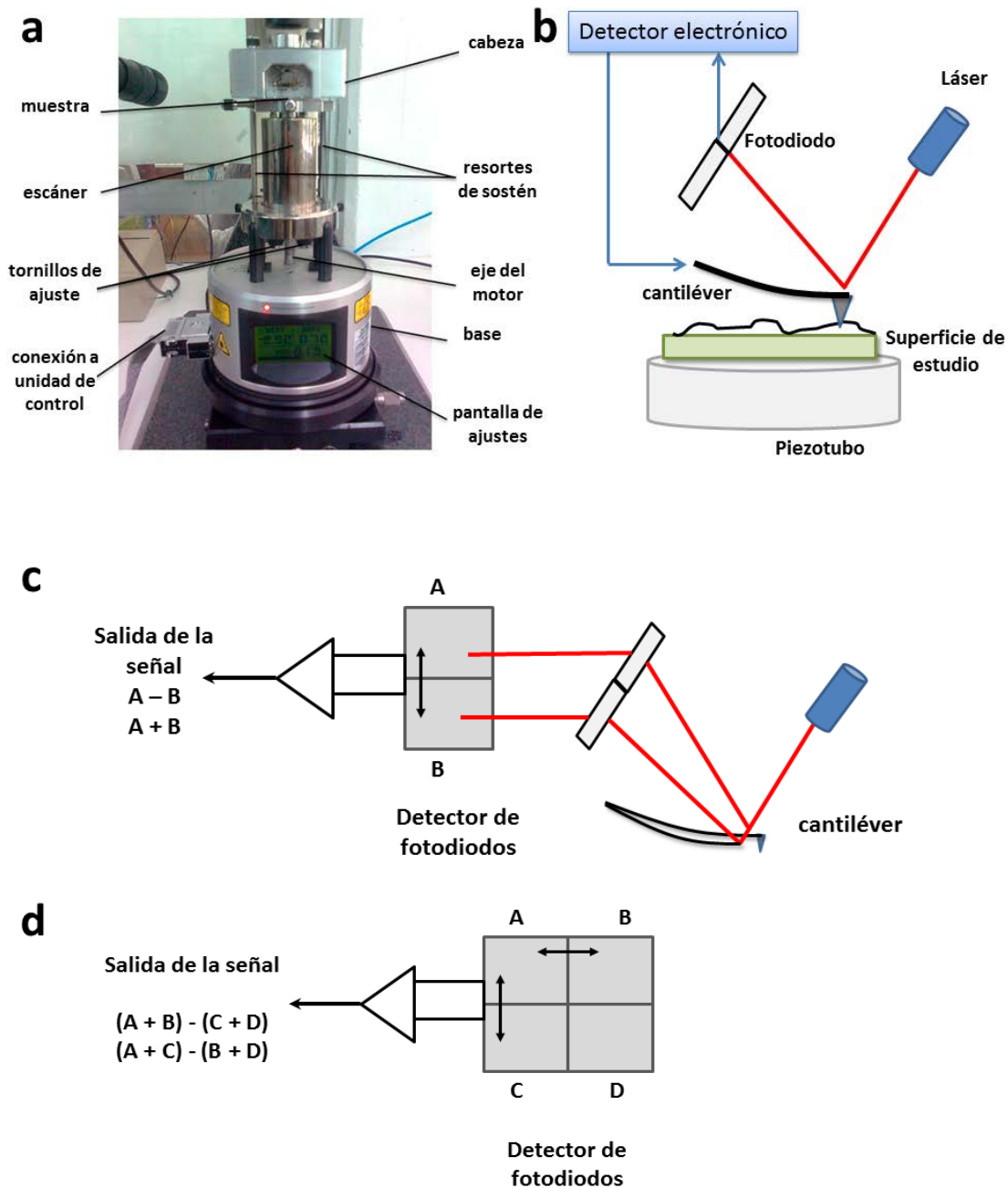


Figura 2.2. a) Foto del microscopio de AFM *Multimode* utilizado en esta tesis en la que se indican sus componentes, b) Esquema de un microscopio de fuerzas atómicas, c) Detección de la señal del láser entre los segmentos verticales A y B del fotodetector. Esquemas adaptados de la Tesis de Dra. C. Díaz, d) Detección de la señal del láser en un sistema de cuatro cuadrantes donde la señal horizontal se describe en base al cambio  $(A+C)-(B+D)$ , y la vertical en base al cambio  $(A+B)-(C+D)$ .

Por otra parte, los AFM *Multimode* (nueva generación de AFM de la marca Bruker) poseen un fotodetector con un sistema de cuatro cuadrantes que permite la realización de medidas de fuerzas laterales de interacción laterales entre la punta y la muestra. Estos fotodetectores de cuatro cuadrantes utilizan como referencia un plano cartesiano  $(x, y)$  con su centro en  $(0, 0)$  y en el que cualquier cambio que sufra el cantiléver va a verse manifestado en uno o más vectores de la posición  $(x_i; y_i)$ . La Figura 2.2 d muestra un fotodetector de cuatro cuadrantes; la deflexión horizontal que sufra el cantiléver se manifestará en base al cambio  $(A+C)-(B+D)$ , y la deflexión vertical como  $(A+B)-(C+D)$ .

Por último, el sistema de retroalimentación permite el ajuste de la distancia punta-muestra para mantener una fuerza constante entre ambas. Los componentes del microscopio están conectados de manera tal que el escáner controla la altura de la muestra, el cantiléver y el sistema óptico permiten detectar la altura local de la muestra y el sistema de retroalimentación mantiene la deflexión del cantiléver constante (detectada por el sistema óptico) mediante el ajuste del voltaje aplicado al escáner.

Como se mencionó antes, el AFM puede operar bajo distintos regímenes de fuerzas, de acuerdo al modo de operación elegido: contacto, no contacto o intermitente (Figura 2.3). Los modos de operación se definen en base a la interacción punta-muestra, es decir, dependiendo del régimen de fuerzas aplicadas, sean repulsivas, atractivas o una combinación de ellas. En el modo contacto, en el que la punta está en contacto físico con la muestra, se opera con interacciones repulsivas. Para el modo no contacto, en el cual la distancia entre punta y muestra es del orden de decenas a cientos de angstroms, el régimen de fuerzas es atractivo. En esta técnica se hace vibrar el cantiléver cerca de la superficie de la muestra con una frecuencia de resonancia entre 100 a 400 kHz. El sistema detecta los cambios en la frecuencia de resonancia del cantiléver o la amplitud de la vibración. La fuerza de atracción entre la punta y la muestra es menor a la fuerza repulsiva utilizada en modo de contacto. Por último, el modo intermitente (o Tapping mode<sup>®</sup>) es aquél en el que una punta oscilante se va aproximando a la superficie y se produce un cambio en la oscilación debido a la interacción entre la punta y la muestra. En este modo

la punta oscilante debe estar lo suficientemente cerca de la superficie en un régimen de fuerzas atractivas, sin que se alcancen interacciones repulsivas [3].



Figura 2.3. Curva de fuerza en función de la distancia de separación entre la punta y a la muestra. Se muestra en qué zona de la curva operan los modos contacto, no contacto e intermitente.

La fuerza entre la punta y la muestra se calcula a medida que se modifica la distancia relativa punta-muestra. Estas fuerzas son registradas a través de la deflexión del cantiléver por métodos ópticos, como se ha mencionado anteriormente. La variación de la deflexión del cantiléver o la altura de la punta construyen una imagen topográfica de la superficie [4]. Antes de comenzar cualquier tipo de medida es necesario conocer la interacción punta-muestra. Para ello se realiza una curva de fuerzas para determinar qué régimen de fuerzas se desea aplicar entre la punta y la muestra.

En la Figura 2.4 se muestra una curva de fuerzas de AFM experimental junto con el comportamiento del cantiléver. Cuando la muestra se acerca a la punta lo suficiente como para que se ejerzan fuerzas atractivas, el cantiléver se deflecta hacia la superficie (Figura 2.4 B); un mayor acercamiento implica una interacción repulsiva entre punta y muestra, con el consiguiente cambio en la deflexión del cantiléver. Cuando la muestra se acerca a la punta en un régimen en el cual éstas no se tocan, el cantiléver se dobla hacia la muestra debido a la atracción causada por la fuerzas de van der Waals. La muestra se va acercando a la punta hasta que se produce el contacto (Figura 2.4 B) y el cantiléver se curva hacia la muestra. Si la muestra aún continúa moviéndose hacia la punta, el cantiléver se deflecta

hacia arriba como consecuencia de las fuerzas de repulsión (Figura 2.4 S) [4, 5]. Por otra parte, cuando la muestra es retraída de la punta, el cantiléver se mueve hacia la muestra. Esto produce la deflexión del cantiléver hacia la muestra antes de que se rompa el contacto con ella, como consecuencia de las fuerzas adhesivas y capilares entre la punta y la muestra, ya que al operar en aire se forma una capa líquida de humedad que cubre la superficie de la muestra (Figura 2.4 C). Si se continúa alejando la muestra la punta pierde contacto con la misma en cierto punto, llamado punto de despegue (Figura 2.4 D), en el que cambia el régimen de contacto a no contacto (Figura 2.4 A).

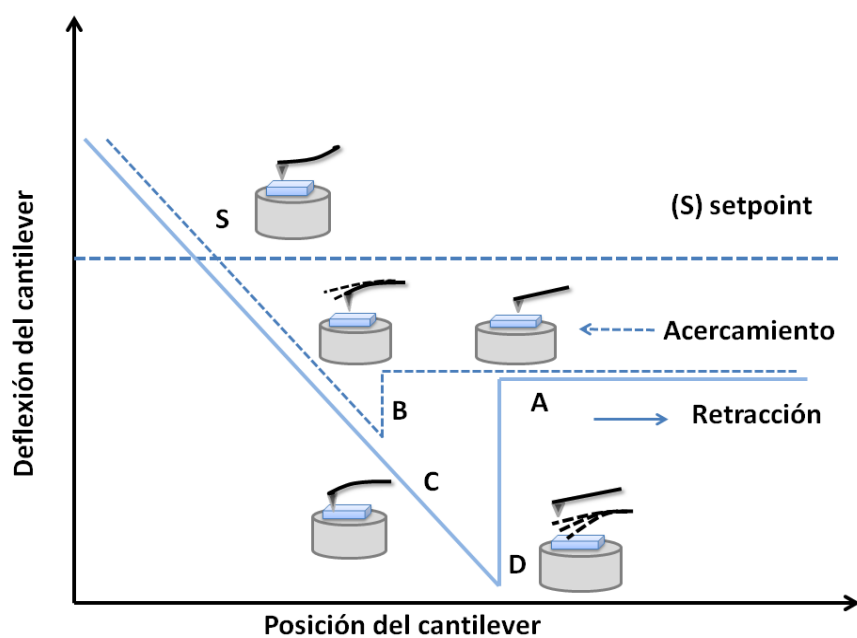


Figura 2.4. Esquema de una curva de fuerza experimental y del comportamiento del cantiléver para diferentes situaciones. Las posiciones A y B representan a la punta acercándose a la superficie (en la posición B se produce el contacto). Si continúa el acercamiento, la punta se inclina hasta alcanzar la fuerza aplicada (Setpoint (S)). Dependiendo de la elasticidad de la muestra, la punta puede llegar a penetrar el sustrato. Posteriormente, se retira la punta hacia las posiciones C y D. En la posición D, bajo la retracción, la punta se desprende de la superficie. Entre las posiciones D y A, el cantiléver regresa a su posición inicial, quedando listo para otra medida.

Para obtener una imagen de una superficie por AFM, es decir, información topográfica de una muestra, se procede de la siguiente manera: en primer lugar, la muestra a evaluar es montada sobre el escáner y éste acerca la muestra a la punta hasta detectar interacciones entre ellas. Las fuerzas de interacción entre la punta y superficie de la muestra hacen que el cantiléver se curve y un detector mide la magnitud de la deflexión del cantiléver, la cual está relacionada con la magnitud de la interacción, la que a su vez depende de la distancia punta-muestra. Esta señal detectada se denomina señal de ajuste o *setpoint*. El sistema de retroalimentación mantiene esta distancia o deflexión del cantiléver a un valor determinado. La imagen topográfica se obtiene mediante el desplazamiento de la muestra en X e Y que produce el piezoeléctrico del escáner y el registro de la deflexión del cantiléver que proporciona la información en Z. Además, se puede visualizar la señal de deflexión como una curva a medida de que la punta barre la muestra. En este caso la señal de deflexión se denomina error de la señal e indica la deflexión del cantiléver antes de que el circuito de retroalimentación corrija o ajuste la altura del escáner. Por ende, el sistema de retroalimentación es uno de los componentes de mayor importancia y el operador ajusta los parámetros dependiendo de la muestra a evaluar.

La imagen topográfica se construye con los datos obtenidos cuando la muestra se desplaza o barre de izquierda a derecha (denominada *traza*) y de derecha a izquierda (denominada *retraza*) respecto de la punta. El movimiento en ambas direcciones (traza-retraza) es referido como la dirección de escaneo rápida, mientras que la dirección de escaneo perpendicular a la anterior es la lenta. Las líneas de escaneo en X forman un patrón en zigzag en el extremo de cada línea de barrido, en la que el punto de finalización del barrido a la izquierda es idéntico al del comienzo de la siguiente línea de barrido hacia la derecha, y viceversa. En general, las líneas de barrido cubren un área cuadrada de tamaño predeterminado por el operador.

### 2.1.2 AFM modo contacto

En la técnica AFM en modo contacto es posible operar de dos maneras: altura constante y fuerza constante. En el primer caso se desactiva la retroalimentación para mantener una distancia fija entre punta y muestra, obteniéndose una imagen de deflexión. En el segundo caso se construye una imagen topográfica a partir de las variaciones locales de la altura, manteniendo constante la fuerza de interacción entre punta y muestra gracias al sistema de retroalimentación que fija la deflexión del cantiléver a un valor determinado, tal como se explicó anteriormente. Las imágenes topográficas brindan información cuantitativa acerca de las características superficiales (tamaños, alturas, distancias, etc), mientras que las imágenes en modo deflexión exhiben mejor contraste de los detalles morfológicos de la superficie, lo cual resulta muy útil, por ejemplo, para el análisis de bacterias adheridas sobre distintos sustratos [6]. En este caso las zonas con muy alto contraste evidencian la presencia de cambios de altura muy pronunciados los cuales no pudieron ser ajustados correctamente por la retroalimentación.

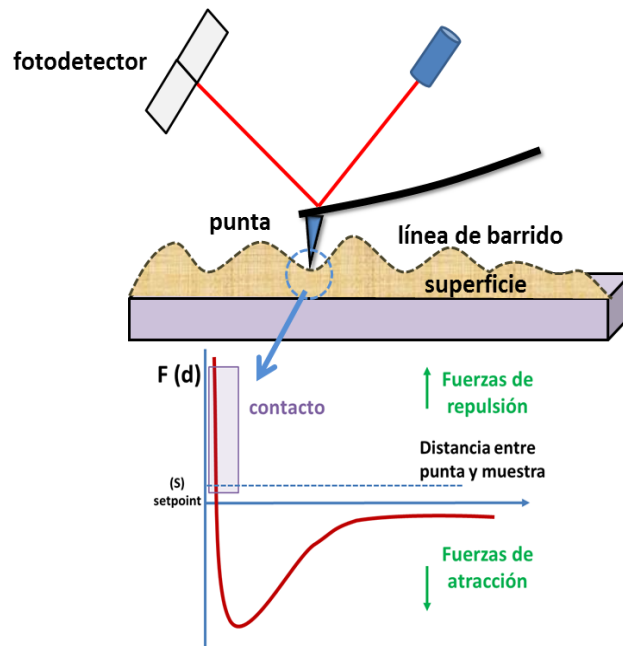


Figura 2.5. Esquema del modo de escaneo de la punta sobre la superficie de la muestra en AFM modo contacto.

En la operación del AFM en modo contacto se deben tener en cuenta algunos factores que pueden originar distorsiones en la imagen, los cuales se detallan a continuación:

- a) Como resultado de las fuerzas repulsivas entre la punta y la muestra, ésta última puede dañarse o cambiar su morfología superficial debido al proceso de barrido de la punta.
- b) La punta también puede dañarse en el proceso de barrido, ocasionando un cambio en su geometría y, por ende, generando artefactos en la imagen.
- c) Es posible que se originen fuerzas laterales que pueden distorsionar la imagen topográfica.

### **2.1.2 Análisis de las imágenes de AFM**

Tal como se mencionó antes, la técnica de AFM es muy versátil, proporcionando detalles topográficos o morfológicos de la superficie de una muestra. Una vez tomadas las imágenes se puede realizar una caracterización precisa de la superficie, obteniendo así información cuantitativa acerca de las características de la superficie, tales como alturas, diámetros, grado de cubrimiento o rugosidad.

Uno de los análisis más usados es la medida de secciones transversales (*cross section*) que reproducen el perfil de la superficie a lo largo de una línea trazada sobre la imagen y permiten obtener valores cuantitativos de la altura local o distancias laterales. [4]. En este análisis se definen arbitrariamente líneas sobre la imagen topográfica y el programa construye una curva con la distancia a lo largo de la línea sobre el eje X y la altura correspondiente en el eje Y. Sin embargo, se debe tener especial cuidado al medir distancias laterales, ya que si éstas son de dimensiones comparables al diámetro de la punta se pueden producir artefactos debido a la convolución punta- muestra.

Otro parámetro útil a determinar en una muestra es su rugosidad, la que permite caracterizar la topografía de la misma. Los parámetros usados comúnmente para cuantificar la rugosidad son la desviación cuadrática media de la rugosidad (RMS o Rq) y la

rugosidad promedio ( $Ra$ ) [7]. La RMS se calcula como la desviación estándar de las alturas, de la siguiente manera:

$$RMS = \sum_{i=1}^n \left[ \frac{(z_i - \bar{z})^2}{N} \right]^{1/2} \quad (\text{ec. 2.2})$$

donde  $N$  es el número de puntos considerados sobre la superficie,  $z_i$  es la altura del punto sobre la superficie y  $\bar{z}$  es la altura promedio de los  $N$  puntos. La RMS es ampliamente utilizada debido a su fácil estimación y por la capacidad de caracterizar una superficie con un único valor.

En el presente Trabajo de Tesis, se calcularon los siguientes parámetros: altura, diámetro, cubrimiento y rugosidad. El análisis de las imágenes se realizó con el programa Nanoscope (versiones V 5.30 y V 7.20).

## 2.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

En un microscopio electrónico de transmisión (TEM) un haz de electrones es acelerado y enfocado sobre una muestra, de manera tal que al impactar con la misma genera señales directamente relacionadas con la estructura y morfología de la muestra observada. La interacción entre el haz incidente y los átomos de la muestra produce, entre otros, electrones dispersados, los cuales son captados por un detector para construir una imagen en dos dimensiones.

El proceso de formación de una imagen de TEM involucra electrones que se transmiten a través de la muestra sobre la que hizo incidir un haz de electrones coherentes. De acuerdo a la interacción que se produzca entre el haz de electrones y la muestra al atravesar ésta los electrones se pueden clasificar en electrones no desviados, electrones desviados elásticamente y electrones inelásticos. Los electrones no desviados y



desviados elásticamente son los responsables de la formación de la imagen en TEM, mientras que una fracción de electrones inelásticos, los cuales ceden energía a la muestra al incidir sobre ella, provocan el ruido de fondo presente en las imágenes de TEM. Por otra parte, mediante esta microscopía se puede obtener información acerca del patrón de difracción de electrones de la muestra. Esto se debe a que se producen interferencias en el frente de las ondas transmitidas por la muestra, las cuales son refractadas por una lente en el plano focal posterior originando una imagen de difracción.

El microscopio electrónico utiliza como fuente de iluminación un haz de electrones generados por un filamento de tungsteno, el cual es acelerado por la aplicación de un voltaje de 100 kV o más (hasta valores de 1 MV) y que es dirigido a través de la muestra mediante diferentes lentes electromagnéticas. Los electrones atraviesan la muestra, se dispersan al pasar a través de ella y se enfocan con un lente objetivo, para luego amplificarse en un lente y construir una imagen del objeto. Las muestras a observar por esta técnica deben poseer espesores menores a 200 nm. El TEM presenta dos ventajas con respecto a otras microscopías: primero, posee un factor de magnificación de 50 a  $10^6$  y segundo, posee la capacidad de proporcionar una imagen e información acerca del patrón de difracción de la muestra en una misma medida [8].

El TEM está constituido por las siguientes partes: un cañón de electrones, un sistema de lentes magnéticas y una pantalla fluorescente (Figura 2.6). Los componentes están ensamblados en una columna vertical, la cual está en condiciones de alto vacío (entre  $10^{-3}$  y  $10^{-7}$  Torr). El cañón de electrones es la fuente emisora del haz de electrones que está ubicado en la parte superior de la columna, donde se aceleran los electrones al aplicar voltajes de 100 a 1000 kV, para luego ser enfocados por las lentes. El sistema de lentes electromagnéticas está formado por la lente objetivo, la lente condensadora y la lente proyectora (Figura 2.6 a y b). La lente condensadora está compuesta, a su vez, por dos lentes, una que proyecta la imagen del punto de entrecruzamiento desmagnificado (*spot size*) y otra que controla el diámetro y ángulo de convergencia del haz que incide sobre la muestra. La lente objetivo forma la primera imagen, localizada debajo de la muestra u objeto, y es considerada el componente más importante del microscopio

porque de ella dependen la resolución final y la corrección de las aberraciones (Figura 2.6) [8, 9].

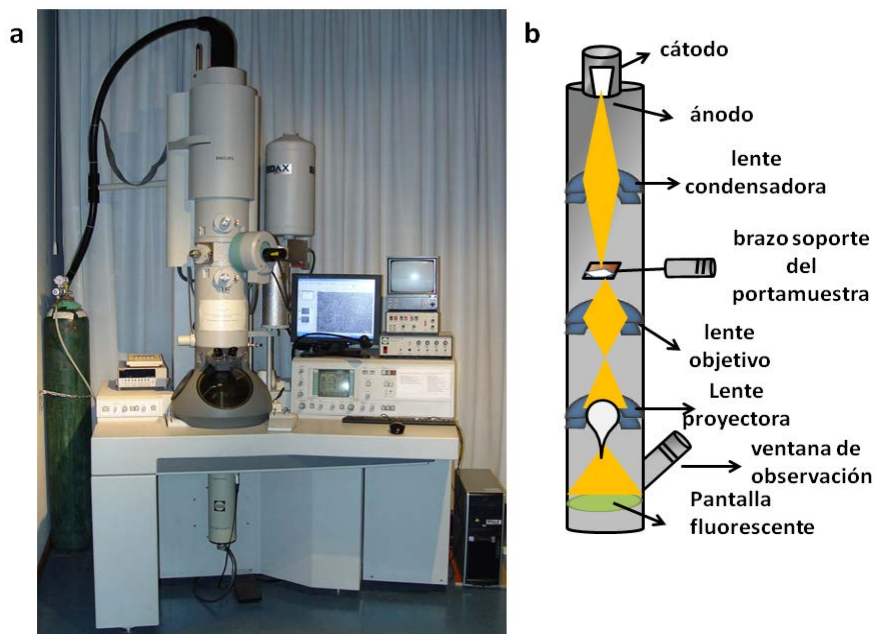


Figura 2.6. a) Fotografía del TEM del Centro Atómico Bariloche y b) Esquema básico de un TEM.

Como se mencionó arriba, el TEM permite obtener no sólo imágenes sino también el patrón de difracción de una muestra. La alta magnificación y resolución de los equipos de TEM son el resultado de las pequeñas longitudes de onda,  $\lambda$ , asociadas a los electrones efectivos, que siguen la relación de De Broglie:

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2mqV}} \quad (\text{ec. 2.3})$$

donde  $m$  y  $q$  son la masa y la carga del electrón, respectivamente,  $h$  es la constante de Planck y  $V$  es la variación de potencial a través de la cual se aceleraron los electrones. Una de las desventajas del TEM es su limitada resolución en profundidad: a pesar de que la imagen se origina a partir de una muestra tridimensional, el haz se proyecta sobre un detector [8, 10].

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) se construyen mediante el contraste de fase de la onda de los electrones [11]. Este es producido por la interferencia de las fases de las ondas de los electrones incidentes cuando son transmitidos a través de la estructura cristalográfica de la muestra. Lamentablemente no se puede medir la fase de onda pero sí la modulación resultante de esta interferencia causada por los electrones, ya que lleva información acerca de la muestra y puede generar un contraste en la imagen. La resolución del microscopio alcanza valores de 0,2 nm [8]. Los datos que proporciona el HRTEM son complementarios a los datos de difracción de electrones, brindando información cristalográfica de una muestra a escala atómica. Mediante esta técnica se puede obtener información cualitativa acerca del ordenamiento y la estructura atómica de la muestra, lo que resulta muy útil para el estudio de nanoestructuras [10].

En el presente Trabajo de Tesis se utilizaron dos microscopios electrónicos de transmisión. En primer lugar, un microscopio Jeol JEM 1200 EX II del Servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de UNLP, operado por el personal técnico a cargo del servicio. En los casos en los que fue necesaria una mayor resolución se usó un microscopio Phillips modelo CM200 UT. En este caso las medidas fueron realizadas por el Dr. M. Sergio Moreno del Centro Atómico Bariloche a través de la colaboración científica existente.

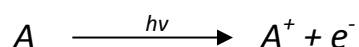
## **2.3 Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS)**

La espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS, de su sigla en inglés) se basa en el efecto fotoeléctrico. El proceso básico consiste en la absorción de un cuanto de energía ( $h\nu$ ) con la consecuente eyección de un electrón, conocido como fotoelectrón, cuya energía cinética (referida a un cero de energía apropiado) está relacionada con la energía de ligadura del electrón al átomo blanco. En este proceso el fotón incidente transfiere su energía por completo al electrón unido y se logra la identificación del

elemento a través de la medida de la energía de los electrones que se desprenden de la muestra sin pérdida de energía. Esto da como resultado espectros de energía que permiten la identificación del átomo en sus distintos estados de oxidación con la posibilidad de realizar medidas cuantitativas.

En la región de rayos X blandos menores a 1500 eV, los fotones tienen energía suficiente para interactuar con los electrones de la estructura interna de los átomos y detectar así con mucha sensibilidad distintos estados químicos de los elementos, a excepción del hidrógeno y el helio [12, 13].

Cuando un fotón de suficiente energía colisiona contra un electrón de un nivel electrónico interno éste es eyectado en un proceso conocido como fotoemisión:



Si la energía se conserva, se cumple que:

$$E(A) + h\nu = E(A^+) + E(e^-) \quad (\text{ec. 2.4})$$

Dado que el electrón eyectado sólo posee energía cinética, la ecuación 2.1 se puede reescribir:

$$E_c(e^-) = h\nu - [E(A^+) - E(A)] \quad (\text{ec. 2.5})$$

El término entre corchetes representa la diferencia de energía entre el átomo A ionizado y el átomo neutro y se denomina energía de ligadura del electrón,  $E_B$ . Esto conduce a la ecuación de Einstein para el efecto fotoeléctrico:

$$E_c = h\nu - E_B \quad (\text{ec. 2.6})$$

De acuerdo a la ecuación (2.3), conociendo la energía de la fuente de rayos X es posible determinar  $E_B$  a partir de  $E_c$ .

El equipamiento de XPS consiste básicamente en una fuente de radiación (en lo posible monocromática), y un sistema de analizador y detector para los electrones, los cuales se muestran en la Figura 2.7. Debido a la magnitud del camino libre medio de los

electrones y para disminuir la contaminación superficial es necesario realizar las medidas en condiciones de ultra alto vacío (UHV, *ultra high vacuum*), es decir, con presiones del orden de  $10^{-10}$  Torr. Para ello se emplean cámaras de acero inoxidable dentro de las cuales se colocan los diferentes componentes, así como también las muestras en portamuestras de material inerte.

La energía de los fotoelectrones se determina en el analizador por su deflexión en un campo electrostático o magnético. El sistema de detección se basa en la ganancia provista por los multiplicadores electrónicos, denominados *channeltron*, los cuales son tubos de alta resistividad con una abertura cónica. En este amplificador los electrones incidentes crean una lluvia de electrones secundarios que al golpear contra las paredes del tubo vuelven a crear más electrones secundarios, alcanzando una ganancia de  $10^8$ .

Cuando se conecta una muestra sólida al espectrofotómetro se establecen los niveles de energía que se grafican en la Figura 2.8, en la que se utiliza una muestra metálica como ejemplo. Como la muestra y el espectrómetro se encuentran en equilibrio termodinámico, sus niveles de Fermi son iguales. Al pasar de la muestra al espectrómetro, el fotoelectrón percibirá un potencial igual a la diferencia entre la función trabajo del espectrómetro  $\Phi_{\text{spec}}$  y la función trabajo de la muestra  $\Phi_m$ . Por lo tanto la  $E_c$  del electrón se mide como  $E_c'$  dentro del analizador del espectrómetro:

$$E_c = E_c' + \Phi_{\text{spec}} - \Phi_m \quad (\text{ec. 2.7})$$

Asumiendo:  $h\nu = E_B + \Phi_m + E_c \quad (\text{ec. 2.8})$

Resulta:  $E_B = h\nu - (E_c' + \Phi_{\text{spec}}) \quad (\text{ec. 2.9})$

donde  $E_B$  es la energía de ligadura referida al nivel de Fermi. Se mide la energía cinética de los electrones con un espectrómetro correctamente calibrado y empleando una fuente de radiación conocida. Del espectrómetro se obtienen los espectros de cuentas en función de

la energía cinética, los cuales se pueden transformar a energía de ligadura simplemente aplicando la ecuación (2.6).

En general el análisis de los materiales sólidos dependerá de su naturaleza y del espesor de la muestra. Las medidas de XPS en general se inician adquiriendo un espectro de baja resolución en una amplia región de energías (*survey o wide scan*), en el cual se observan una serie de picos de fotoelectrones que expresan las  $E_B$  discretas de los electrones presentes en la muestra sólida, es decir, de todos los fotoelectrones emitidos por los elementos presentes en la muestra cuya  $E_B$  sea menor a la energía de la fuente de rayos X. Los picos del espectro obtenidos pueden dividirse en tres grupos: los picos de fotoemisión de niveles internos (éstos son los picos de interés en medidas de XPS), los picos de los niveles de valencia y aquéllos causados por la emisión Auger.

Las intensidades de los picos de diferentes niveles energéticos para un mismo átomo no son iguales porque la probabilidad de fotoeycción desde cada orbital (denominado sección transversal de fotoionización,  $\sigma$ ) es diferente [12, 14]. Asimismo, el número de picos en el espectro corresponde al número de niveles de energía ocupados en los átomos cuya  $E_B$  es menor que la energía de los rayos X y la posición de los picos mide directamente las  $E_B$  de los electrones en los orbitales e identifica a los átomos en cuestión. Las intensidades de los picos obtenidos dependerán fundamentalmente del número de átomos presentes y del valor de  $\sigma$  para el orbital considerado. Se considera que los electrones actúan como partículas independientes, es decir que los niveles de energía de cada uno de los electrones no son afectados por los otros. Por otra parte, a excepción de los subniveles s, los otros subniveles (p, d y f) aparecen en el espectro como dobletes como consecuencia del acoplamiento espín – orbita ( $j-j$ ).

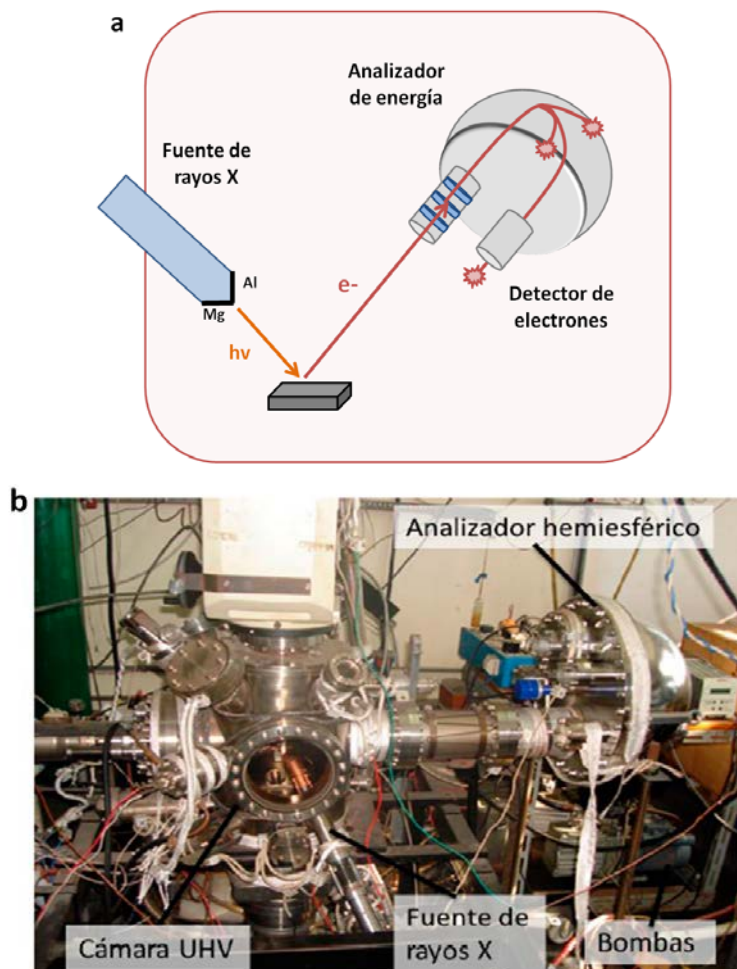


Figura 2.7 a) Esquema de las partes principales del XPS adaptado de Dr. J Hough Horton [15] y b) Imagen del XPS del Laboratorio de Nanoscopías y Físicoquímica de Superficies del INIFTA [16].

Sin embargo, la energía de ligadura exacta para un electrón en un elemento depende del entorno químico en el que se encuentra dicho elemento, lo que se denomina generalmente corrimiento químico (por analogía a la técnica de resonancia magnética nuclear, RMN). Cualquier cambio en el entorno químico involucra una redistribución espacial en los electrones de valencia produciendo una variación en la carga del átomo y la creación de un potencial diferente, que será percibido por los electrones internos, lo cual resulta en un cambio en sus  $E_B$ . Este hecho es quizás el más relevante para las

aplicaciones de XPS como técnica analítica, ya que de este modo se pueden detectar distintos estados de oxidación [12, 14].

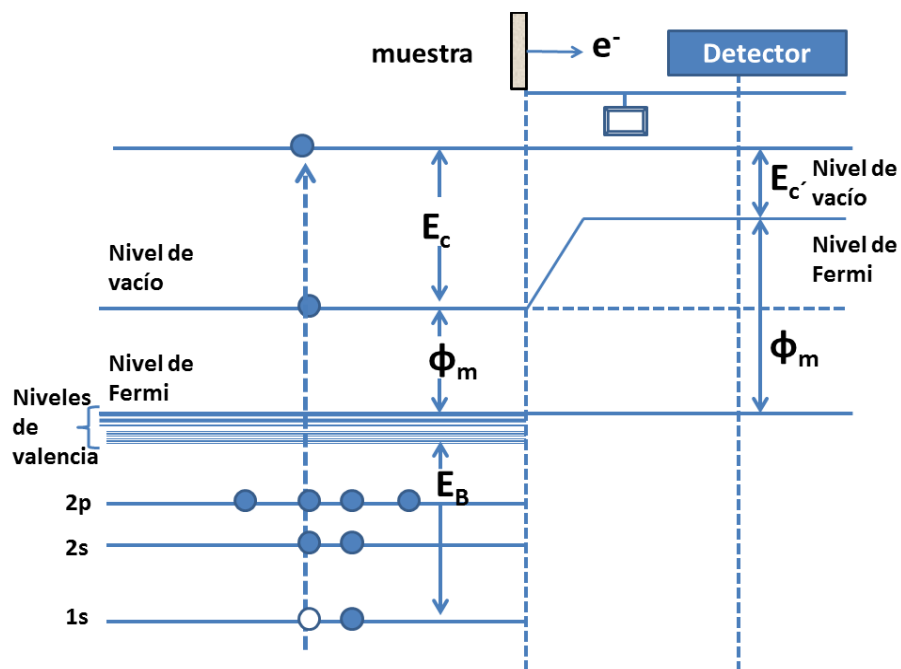


Figura 2.8 Diagrama de los niveles de energía electrónicos de una muestra conductora (metálica) en el equipo de XPS.

Para la cuantificación de los espectros de XPS se deben tener en cuenta dos factores: la intensidad y la posición de los picos. El ancho de pico a mitad del máximo (FWHM, full width at half maximum) es indicativo del número de enlaces involucrados, de la carga diferencial en la superficie y de los posibles daños por rayos X. Los criterios a tener en cuenta antes de empezar la cuantificación de un espectro son: definir un rango de energías en el cual la señal obtenida pueda ser atribuida a la transición de interés y la correcta remoción de la señal de fondo que no corresponde al pico elegido. Este último criterio hace referencia a que un pico puede tener contribuciones de la señal



correspondiente a diferentes estados de oxidación del elemento. Ante este hecho, es posible realizar una deconvolución de la señal en diferentes componentes.

Las medidas de XPS del presente Trabajo de Tesis se llevaron a cabo en el INIFTA y estuvieron a cargo de los Dres. Aldo A. Rubert y Guillermo A. Benitez. La fuente de rayos X está constituida por una lámina de Mg o de Al que actúa como ánodo y que se bombardea con electrones (XR50, SpecsGmbH). La energía de los rayos X blandos emitidos es del orden de 1 keV (para Mg  $K\alpha$  es 1253,6 eV con un ancho de banda de 0,7 eV y para Al  $K\alpha$  es 1486,6 eV con un ancho de banda de 0,85 eV). La medida de la energía de los electrones eyectados se realizó mediante el análisis de su deflexión en un campo electrostático. El analizador hemiesférico (PHOIBOS 100, SpecsGmbH) aplica un potencial a través de dos sectores concéntricos y los electrones pasan sin cambio de energía a lo largo de líneas equipotenciales. Como sistema de detección se empleó un multiplicador de electrones *channeltron*. La calibración de la escala de energía se realizó con dos puntos utilizando oro evaporado ( $E_B$  Au4f<sub>7/2</sub> = 84,00 eV) y cobre ( $E_B$  de Cu2p<sub>3/2</sub> = 933,67 eV) como patrones de referencia.

La deconvolución de los espectros se realizó utilizando el programa XPS Peak 4.0 sobre los espectros tomados en alta resolución. En primer lugar se trazó una línea de base en el espectro tipo Shirley. Los parámetros para Ag 3d fueron: desdoblamiento spin-órbita (S.O.S) de 6,01 eV, FWHM  $\approx$  1 eV y 94% de producto de Gaussianas-Lorentzianas (% de GL). Para el Ti 2p los parámetros usados fueron: S.O.S de 5,8 eV; FWHM  $\approx$  1 eV y 95% de GL.

La cuantificación se realizó utilizando el programa Casa XPS v2.3.14 (2008) con los espectros tomados en baja resolución que corresponde al Ti 2p y Ag 3d, a los cuales se les sustrajo una línea de base tipo Shirley. De esta manera se puede obtener la relación atómica entre los diferentes elementos que componen la muestra. Sin embargo, cada relación atómica realizada fue corregida con un factor de sensibilidad relativo (RSF) del elemento y subnivel correspondiente (18 para Ag 3d y 7,9 para Ti 2p).

## 2.4 Espectroscopía de absorción de luz ultravioleta y visible (UV-vis)

La espectroscopía de absorción de luz ultravioleta-visible es una de las técnicas más frecuentemente empleadas en el análisis químico. Las medidas en el rango de longitud de onda entre el visible y el ultravioleta poseen una amplia aplicación en la caracterización de materiales ya que brindan información cuali y cuantitativa acerca de una gran variedad de especies inorgánicas y orgánicas.

Para que una sustancia sea activa en el visible (para longitudes de onda  $\lambda$  entre 380 y 780 nm, aproximadamente) ésta debe ser coloreada, es decir, absorber a ciertas  $\lambda$  del espectro visible y transmitir la luz a las restantes longitudes de onda. Por ejemplo, una solución es amarilla debido a que dentro de la región visible absorbe radiación en el rango de 435 a 480 nm. En este rango de longitud de onda se encuentra el color azul del visible, por lo tanto esta sustancia absorbe el color azul y transmite los colores complementarios que dan origen al color amarillo de la solución que se observa a simple vista. La Figura 2.9 muestra el espectro de radiación electromagnética en la región visible.

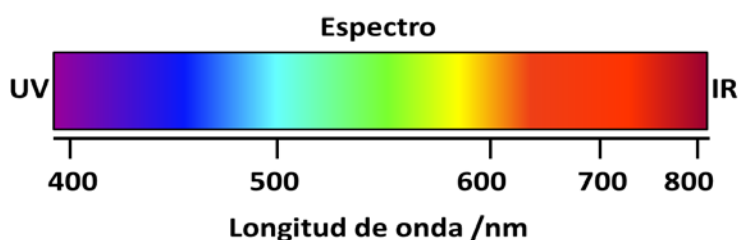


Figura 2.9 Esquema del espectro de luz visible

En la escala de longitudes de onda se considera como luz ultravioleta aquélla cuya longitud de onda está entre 1 y 380 nm. La región comprendida entre los 10 y 190 nm es denominada ultravioleta del vacío, ya que el nitrógeno atmosférico absorbe este tipo de radiación, por lo que se debe efectuar vacío para poder excluir la absorción de este gas de la del compuesto en estudio. Sin embargo, la luz de estas longitudes de onda no es de

gran utilidad para la determinación de compuestos, por lo que en la práctica el rango de luz ultravioleta que se emplea para espectroscopía va de 190 a 380 nm.

El principio de la espectroscopía de UV-vis involucra la absorción de radiación ultravioleta-visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado. La longitud de onda está comprendida entre 190 y 800 nm. Cuando una radiación de cierta  $\lambda$  incide sobre una muestra se produce la absorción parcial de la misma, produciendo una transición en los niveles energéticos de la especie Y (ya sea un átomo, una molécula o un ión) y pasando ésta a un estado excitado ( $Y^*$ ). El resto de la radiación es transmitida. Es posible analizar un estado u otro de la sustancia y relacionarlo con la cantidad de especie activa presente en la muestra. Las bandas que aparecen en un espectro UV-visible son anchas, ya que se superponen transiciones vibracionales y electrónicas. Por otra parte, la excitación corresponde a los electrones de enlace; en consecuencia, los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlaces. Este hecho da validez a la espectroscopía de UV-vis como técnica de identificación de grupos funcionales de una molécula [17].

Los componentes de un equipo de espectroscopía de UV-Vis son: (1) fuente de radiación; (2) sistema óptico (monocromador, filtros o ventanas, espejos y dispersor o red de difracción); (3) compartimiento para las muestras y (4) detector (Figura 2.10). En general el material usado para la construcción de la celda, monocromador y las ventanas es el cuarzo, ya que su rango inferior de transmisión alcanza los 190 nm, lo cual es muy útil para el caso de analitos que absorben a longitudes de onda menores a 300 nm.

El espectrofotómetro mide la transmitancia  $T$  (o la absorbancia  $A = -\log T$ ) de la muestra presente en una cubeta transparente con un camino óptico conocido  $b$ . En general, la concentración  $c$  de la solución absorbente está relacionada linealmente con la absorbancia, de acuerdo a la conocida ley de *Lambert-Beer*:

$$A = -\log T = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (\text{ec. 2.10})$$

donde  $A$  es la absorbancia medida,  $\varepsilon$  es el coeficiente de extinción molar y  $b$ , como se mencionó antes, el camino óptico o diámetro de la celda usada.

La técnica espectroscopía de UV-vis se puede aplicar tanto para análisis cualitativo como cuantitativo. Las medidas cualitativas son útiles para identificar la presencia de ciertos grupos funcionales que actúan como cromóforos. En las medidas cuantitativas se aplica la ley de Lambert-Beer para determinar la concentración de la sustancia que absorbe a través de la cantidad de radiación transmitida o absorbida.

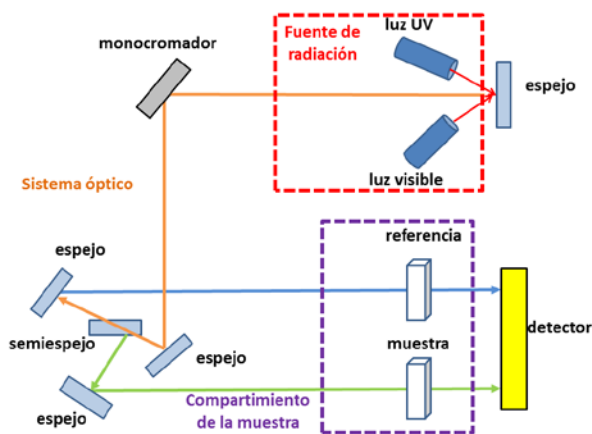


Figura 2.10 Esquema de los componentes principales del equipo de UV –visible

En el presente Trabajo de Tesis se usó un espectrofotómetro UV-visible Lambda 35 de doble haz de Perkin Elmer (Waltham, MA, USA). Se utilizaron celdas de cuarzo con un valor de  $b$  de 1 cm para la medida de las dispersiones de NPs preparadas. Para las medidas de absorbancia de cultivos bacterianos se utilizaron celdas de plásticos desechables con un valor de  $b$  de 1 cm.

## 2.5 Espectroscopía de absorción atómica (AAS)

La espectroscopía de absorción atómica (AAS) es uno de los métodos espectrofotométricos más ampliamente usados para la determinación analítica de elementos. Es una técnica muy empleada en la determinación de metales como plata, oro,

sodio, cadmio, calcio, cesio, cromo, cobalto, plomo, níquel, entre otros. Se emplea en el análisis de aguas y suelos, en toxicología, bioquímica, en las industrias farmacéutica, alimenticia y petroquímica.

La técnica de AAS consiste en la determinación de especies atómicas mediante la absorción a una longitud de onda particular. Las especies atómicas se obtienen mediante la atomización de la muestra, la cual se puede realizar a la llama o mediante horno de grafito [17]. Un equipo de absorción atómica consta de tres partes, tal como se muestra en la Figura 2.11: una fuente de radiación, un medio para la obtención de átomos libres (horno de grafito, en este caso) y un sistema para medir el grado de absorción de la radiación de la muestra mediante una lámpara de cátodo hueco construida del mismo elemento a cuantificar. Los valores de concentración de la especie se obtienen utilizando curvas de calibración construidas a partir de soluciones de concentraciones conocidas del metal y utilizando la ley de Lambert-Beer.

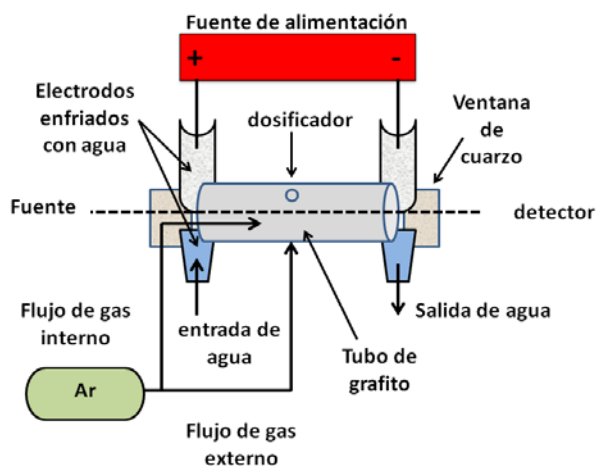


Figura 2.11. Esquema de los componentes del AAS con horno de grafito.

En el presente Trabajo de Tesis se utilizó esta técnica mediante la contratación de servicios del Laboratorio de Trazas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. El equipo empleado en las determinaciones de plata fue un espectrofotómetro de absorción atómica Shimadzu AA 6700 equipado con accesorio para horno de grafito GFA 6500 y automuestreador ASC 6000.

## Referencias Bibliográficas

1. Israelachvili, J.N., Intermolecular and Surface Force, 2010, Elsevier Science.
2. Diaz, C., Adherencia y Colonización de *Pseudomona fluorescens* sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie, Tesis Doctoral del Departamento de Química -Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, 2011.
3. Veeco, A Practical Guide to Scanning Probe Microscopy SPM, 2005.
4. Eaton, P. y West, P., Atomic Force Microscopy, 2010, OUP Oxford.
5. Magonov, S.N. y Whangbo, M.H., Surface Analysis with STM and AFM: Experimental and Theoretical Aspects of Image Analysis, 2008, Wiley.
6. Wilson, L., Matsudaira, P.T., Ramaswamy, B. y Horber, J.H., Atomic force microscopy in cell biology, Vol. 68, 2002, Access Online via Elsevier.
7. Bruker, Manuales Nanoscope v 4.22 – v 6.13 de Digital Instruments Inc.
8. Cao, G. y Wang, Y., Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications, 2011, World Scientific.
9. Poole, C.P. y Owens, F.J., Introduction to Nanotechnology, 2003, John Wiley & Sons.
10. Kumar, C.S.S.R., Hormes, J. y Leuschner, C., Nanofabrication Towards Biomedical Applications, 2005, Wiley.
11. Spence, J.C.H., High-Resolution Electron Microscopy. 2013, OUP Oxford.
12. Briggs, D., Surface Analysis of Polymers by XPS and Static SIMS, 1998, Cambridge University Press.
13. Reinert, F. y Hüfner, S., Photoemission spectroscopy—from early days to recent applications, *New Journal of Physics*, 2005, (7), 97.
14. Feldman, L.C. y Mayer, J.W., Fundamentals of surface and thin film analysis, 1986, North-Holland.
15. Horton, H.J., Ontario, Canadá.  
<http://www.chem.queensu.ca/people/faculty/horton/research.html>. 2009.
16. Millone, M.A.D., Monocapas Autoensambladas de Alcanotioles y  $\alpha,\omega$ -alcanoditioles sobre Oro: Adsorción no específica de Moléculas Bioactivas, Biomoléculas y Vesículas, Tesis Doctoral del Departamento de Química - Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, 2011.
17. Skoog, D.A., Crouch, S.R. y Holler, F.J., Principios de analisis instrumental/Principles of Instrumental Analysis, 2008, Cengage Learning Editores.

# Capítulo 3

## Caracterización microbiológica

### 3.1 Microorganismos y cultivos usados

Entre los microorganismos capaces de formar biofilms se eligieron bacterias representativas de los géneros *Pseudomonas* (Gram (-)) y *Staphylococcus* (Gram (+)). La diferencia entre ellas reside en su pared celular, como se ha mencionado en el Capítulo 1. Ambas bacterias son capaces de formar biofilms sobre distintas superficies y este hecho impacta en áreas diversas tales como la medicina, la industria y el medio ambiente [1, 2]. A continuación se detallarán las características de cada género elegido.

#### 3.1.1 *Pseudomonas*

Las *Pseudomonas* son microorganismos con forma de bacilos rectos o curvados que poseen una longitud de 0,5 a 4  $\mu\text{m}$ . Estas bacterias dan un resultado negativo en la tinción de Gram. Las *Pseudomonas* son móviles ya que poseen uno o dos flagelos polares que permite su desplazamiento sobre distintos medios o soportes. Tienen un

metabolismo aeróbico, nunca fermentativo, en el que el O<sub>2</sub> es el aceptor final de electrones en la cadena respiratoria. *Pseudomonas* es uno de los microorganismos responsables de la degradación de numerosos compuestos solubles provenientes de las plantas y animales que se encuentran presentes en agua y suelos. Esta capacidad los convierte en microorganismos de gran importancia ecológica. Algunas de estas bacterias producen pigmentos amarillo verdosos, fluorescentes y que son solubles en agua (fluoresceína, en el caso de *P. fluorescens*) que actúan atrapando el hierro del medio necesario para el metabolismo del microorganismo [2]. Se encuentran normalmente en suelos, aunque también pueden ser patógenos en animales (*P. fluorescens*, *P. aeruginosa*) y en plantas (*P. syringae*)[3-6]. Estas bacterias tienen requisitos nutricionales muy sencillos, ya que pueden usar numerosos compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. La versatilidad nutricional de estas bacterias se debe a que poseen operones (grupos de genes contiguos transcritos a partir de un promotor que da origen a un ARNm que contiene secuencias codificantes para múltiples proteínas[7]) inducibles que, ante la presencia de ciertos compuestos, se activan y empiezan a sintetizar las enzimas necesarias para degradar al compuesto. La presencia de estos operones puede ser constitutiva, es decir que se encuentre dentro de su genoma, o plasmídica, proveniente de uno o varios plásmidos obtenidos por recombinación genética. Además, algunas especies dentro de este género son capaces de sintetizar una capa de exopolisacáridos (EPS) que permite la adhesión celular y favorece la formación del biofilm. La capa de EPS protege ante la acción de agentes antimicrobianos o de la fagocitosis, aumentando así la patogenicidad de la bacteria [8]. Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, los biofilms de *Pseudomonas*, son más resistentes contra la acción de antibióticos que las correspondientes bacterias planctónicas [9].

En el presente trabajo de Tesis se utilizó *P. aeruginosa* proveniente de un aislado clínico de un paciente con fibrosis quística asistido en el Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan" de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*P. aeruginosa* es un microorganismo quimioorganotrófico, es decir, que utiliza sustancias oxidables a pH neutros o básicos para obtener energía, a través de reacciones de óxido-reducción. Esta bacteria produce un pigmento amarillo verdoso



llamado pioquina y puede crecer a temperaturas de hasta 43°C. Posee solamente un flagelo polar que le otorga movimiento sobre distintos medios y, bajo ciertas condiciones, es capaz de desnitrificar. Estas características la convierten en una bacteria con una gran capacidad para utilizar diversos nutrientes y adaptarse al medio o nicho donde se encuentra alojada.

*P. aeruginosa* es considerada una bacteria modelo para el estudio de la formación de biofilms, ya que es capaz de producir una gran cantidad de EPS, lo cual le permite la adhesión sobre distintos soportes o medios [9]. Es un patógeno oportunista, es decir que afecta a pacientes que tienen el sistema inmune comprometido. Esta bacteria se asocia frecuentemente con infecciones de los tractos urinario y respiratorio en el hombre [10-12]. *P. aeruginosa* se encuentra habitualmente en ambientes hospitalarios y puede infectar fácilmente a pacientes que reciben tratamientos por afecciones tales como quemaduras, fibrosis quísticas, infecciones pulmonares, etc., o bien sometidos a cirugías u otras intervenciones que implican la utilización de materiales implantables [4, 5, 13]. *P. aeruginosa* es una de las causas de enfermedad crónica en pacientes con fibrosis quística [13-15] y se presenta dentro de la microflora de bacterias contaminantes de la superficie de implantes, generando focos infecciosos [16, 17].

### **3.1.2 Staphylococcus**

Los *Staphylococcus* son microorganismos con forma de cocos que se organizan en grupos o tétradas (grupo de cuatro cocos o células individuales). Son organismos aeróbicos facultativos que producen ácido a partir de glucosa tanto en condiciones aérobicas como anaeróbicas. Dan un resultado positivo con la tinción de Gram. Es el único género que poseen ácido teicoico dentro de la pared celular, lo cual les confiere mayor resistencia frente a diferentes condiciones ambientales. No poseen movilidad y son tolerantes a la desecación y a las altas concentraciones de sal. Los *Staphylococcus* son comensales y parásitos habituales en humanos y animales y ocasionalmente pueden provocar infecciones muy severas. En humanos, *S. epidermis* es un microorganismo no patógeno que habita comúnmente en la piel o en las membranas

mucosas y *S. aureus* es un patógeno oportunista que posee una pigmentación amarilla que está asociada a diversas patologías como pústulas, neumonía, meningitis y artritis [2]. Estas especies suelen estar presentes en la flora normal del tracto respiratorio y la piel [18-20] y algunas de ellas son capaces de sintetizar EPS permitiendo la adhesión y formación de un biofilm sobre una superficie [21].

En el presente trabajo de Tesis, se utilizó *S. aureus* ATCC 25923, proveniente de un cepario propio del Hospital de Pediatría "Profesor Dr. Juan P. Garrahan" de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina y que fue gentilmente cedida por el Dr. Horacio Lopardo.

*S. aureus* es un microorganismo quimioorganótrofico que puede presentarse como diplococos, racimos o cadenas de cocos. Éstos poseen un tamaño entre 0,8 y 1  $\mu\text{m}$ . Son resistentes a la sequedad y se dispersan fácilmente por partículas de polvo en el aire y la piel. Algunas cepas son agentes responsables del síndrome del choque tóxico (TSS), que es la consecuencia grave debido a la infección con *Staphylococcus* y puede causar la muerte en más del 70% de los casos. Asimismo *S. aureus* es una de las causas principales de formación de focos infecciosos en implantes médicos [22].

### **3.1.3 Conservación de las cepas bacterianas**

La conservación de las cepas bacterianas es un punto clave para poder llevar a cabo los ensayos, debiéndose mantenerlas a lo largo del tiempo sin contaminaciones ni cambios en sus características bioquímicas, fisiológicas y genéticas. La técnica usada para ambas cepas durante todo el trabajo de tesis fue la conservación a  $-18^{\circ}\text{C}$  en una mezcla de caldo nutritivo y glicerol (Merck) en proporciones iguales. Para ello se realizó un cultivo en ágar nutritivo (Merck) a  $30^{\circ}\text{C}$ , que es el medio con el que se obtiene el crecimiento óptimo de estos microorganismos. Luego se levantó parte del cultivo mediante un ansa, se suspendió en 1 mL de la mezcla de caldo nutritivo/glicerol estéril y se almacenó a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

### 3.1.4 Medios de cultivo

Los medios de cultivos usados en los ensayos realizados a lo largo del Trabajo de Tesis fueron los siguientes:

#### **Medios líquidos:**

Caldo nutritivo (Merck) de la siguiente composición:

- Peptona de carne: 5g/L
- Extracto de carne: 3 g/L.

Caldo Luria Bertani (DIFCO) de la siguiente composición:

- Peptona de carne: 10 g/L
- Extracto de levadura: 5 g/L
- NaCl: 10 g/L

#### **Medios sólidos:**

Ágar nutritivo (Merck) de la siguiente composición:

- Peptona de carne: 5 g/L
- Extracto de carne: 3 g/L
- Ágar-ágar: 12 g/L

Ágar Mueller Hinton (DIFCO) de la siguiente composición:

- Extracto de carne: 2 g/L
- Caseína: 17,5 g/L
- Almidón: 1,5 g/L
- Ágar-ágar: 17 g/L

Ágar nutritivo (Britania S.A.) de la siguiente composición:

- Pluripeptona: 5g/L
- Extracto de carne: 3g/L
- Cloruro de sodio: 8g/L
- Ágar-ágar: 15g/L

El caldo nutritivo (pH = 7) se utilizó como medio de crecimiento para ambas cepas y el ágar nutritivo se utilizó como medio para mantener ambas cepas y para realizar los recuentos en placas de las bacterias viables.

### 3.2 Determinación del número de bacterias

El número de bacterias presentes en un dado volumen puede determinarse mediante diferentes técnicas. Las más frecuentemente usadas son el recuento de células y la determinación de la turbidez. La primera técnica permite cuantificar el número de bacterias viables (unidades formadoras de colonias, UFC) y la segunda mide la biomasa total de la población microbiana.

Recuento en placa: Como se mencionó arriba, esta técnica permite cuantificar el número de bacterias viables. Cuando se realiza este procedimiento es importante que haya un número limitado de colonias (entre 30 y 300, aproximadamente) para poder contarlas. Por este motivo se realizan diluciones seriadas del inóculo original, de las que se toman las alícuotas a sembrar en la placa. En esta Tesis se utilizó el método de la siembra por extensión, que consiste en extender un cierto volumen (que no debe superar los 0,1 mL) sobre la superficie de una placa que contiene un medio sólido (ágar) mediante un ansa estéril de extensión. La placa se incuba por un determinado tiempo, hasta la aparición de colonias [23].

Determinación de la turbidez: Una suspensión celular aparece turbia a la vista porque las células dispersan la luz que atraviesa a dicha suspensión. Por lo tanto, la determinación de la turbidez es un método que relaciona la cantidad de biomasa de una población con una magnitud física como la dispersión de la luz. Estas medidas se realizan mediante un espectrofotómetro, en el cual la radiación de una determinada longitud de onda incide sobre una cuba que contiene una suspensión celular (cultivo bacteriano). Se mide entonces la densidad óptica (DO) o absorbancia (A).

La absorbancia no es una medida directa del número de células, por lo que se debe realizar una curva de calibración que relacione el número de bacterias presentes en el cultivo y la DO o Absorbancia [2]. En altas concentraciones celulares no hay

correspondencia entre el número de células y la turbidez y por lo tanto se pierde linealidad.

### 3.2.1 Curva de calibración

Se realizó la curva de calibración midiendo la absorbancia de cultivos con diferente número de unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL), las que se determinaron por la técnica de recuento en placa. Para esto se realizó un cultivo bacteriano que se dejó crecer hasta obtener una  $A_{586\text{ nm}} = 1$ , y se realizó una dilución seriada. De cada dilución se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se extendieron sobre placas de Petri con ágar nutritivo. Se incubaron a 30°C por 24 hs en forma invertida y luego se realizó el conteo de colonias. Cada ensayo se realizó por triplicado.

En la Figura 3.1 se muestra la curva de calibración realizada para *P. aeruginosa* que relaciona la absorbancia con las UFC/mL. Como ya se ha mencionado anteriormente, las medidas de absorbancia no son del todo confiables porque no permiten determinar el número exacto de células y están limitadas a cultivos con concentraciones superiores a  $10^7$  UFC/mL. Con la curva se puede determinar el número de UFC/mL correspondiente a una medida dada de absorbancia y, de esa manera, se evita realizar continuamente conteos en placa de distintos ensayos. La ecuación lineal que mejor ajustó a la recta es  $A = 1,358 \times 10^{-9} \cdot \text{UFC/mL} + 0,003$  ( $R^2 = 0,9917$ ).

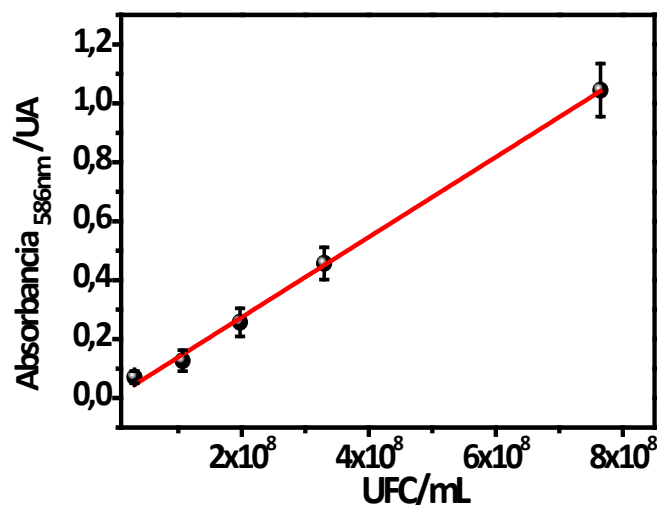


Figura 3.1. Curva de calibración de absorbancia vs UFC/mL para cultivos de *P. aeruginosa*

Siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente, se realizó la curva de calibración de *S. aureus*, la cual se muestra en la Figura 3.2. El mejor ajuste se logró con la ecuación  $A = 1,14 \times 10^{-9} \cdot \text{UFC/mL} + 0,059$  ( $R^2 = 0,993$ ).

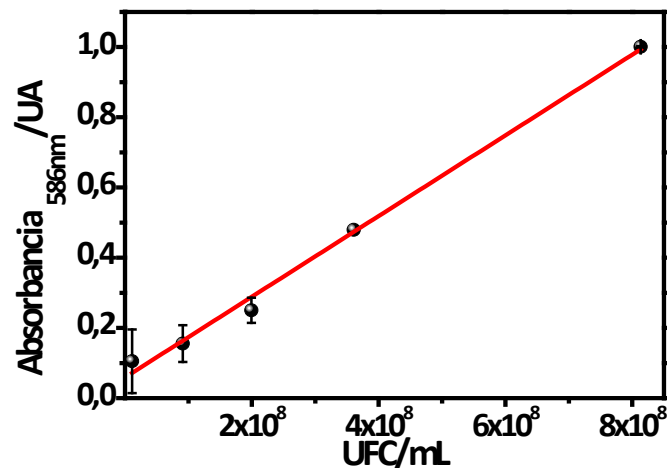


Figura 3.2. Curva de calibración de absorbancia vs UFC/mL para cultivos de *S. aureus*

En resumen, con la ecuación correspondiente se puede determinar el valor de las UFC/mL de un cultivo mediante la medida de la absorbancia. Este método es más rápido y directo que el recuento en placa, aunque menos preciso. Se utilizó en los casos en los que era necesaria una estimación del número de células en un dado cultivo.

### 3.2.2 Curva de crecimiento

Antes de abordar cualquier ensayo microbiológico es de vital importancia conocer la curva de crecimiento de la cepa bacteriana, dado que ésta describe parte del ciclo de vida de una población microbiana.

Para realizar las curvas de crecimiento de ambas bacterias se emplearon sendos frascos de Erlenmeyer conteniendo 100 mL de caldo nutritivo estéril. Éstos se inocularon con una suspensión bacteriana con una  $A_{586nm} = 0,05$ . El frasco se incubó a una temperatura de 30°C con agitación mecánica a 250 rpm durante 24 hs. Se analizó el crecimiento bacteriano tomando muestras de 1 mL (durante las 3 primeras horas) y

0,5 mL (durante las 21 hs posteriores) y se midió en cada caso la DO con un espectrofotómetro UV-visible. Los ensayos se realizaron por triplicado en forma independiente y con los datos se obtuvieron las desviaciones estándar de cada punto de crecimiento.

La curva de crecimiento obtenida para *P. aeruginosa* se muestra en la Figura 3.3 y la de *S. aureus* en la Figura 3.4.

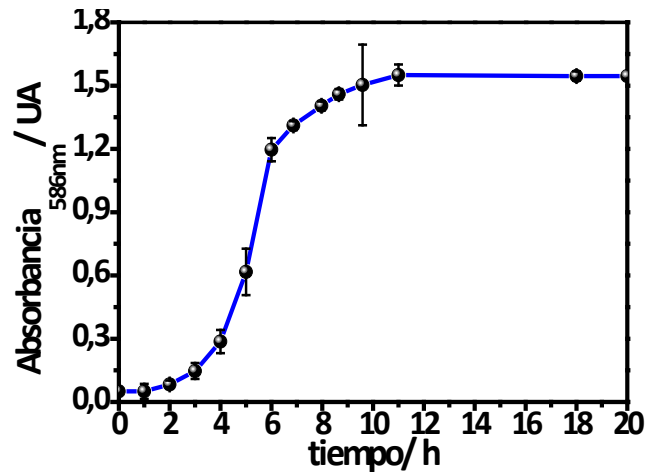


Figura 3.3. Curva de crecimiento en medio líquido de *P. aeruginosa* en la que se graficó la absorbancia en función del tiempo.

En la Figura 3.3 se observa que *P. aeruginosa* tiene una fase de latencia de aproximadamente 1 h y que la fase exponencial tiene una duración de 8 hs. Luego de este tiempo el cultivo entra en fase estacionaria (el número de microorganismos se mantiene aproximadamente constante en el tiempo). Luego de 20 hs se forma un biofilm sobre las paredes del frasco de Erlenmeyer a pesar de la agitación del cultivo, lo que ocasionó una pérdida de la homogeneidad del cultivo bacteriano. Por lo tanto, las medidas de absorbancia a tiempos mayores que 20 hs no son representativas de la biomasa del cultivo.

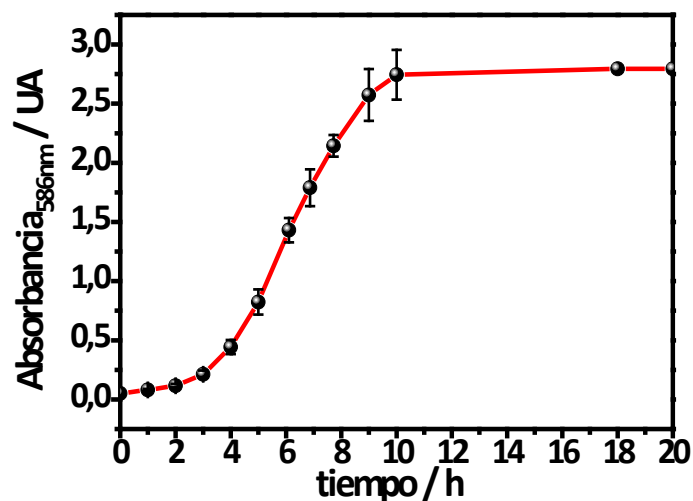


Figura 3.4. Curva de crecimiento en medio líquido de *S. aureus* en la que se graficó la absorbancia en función del tiempo.

En la Figura 3.4 se muestran las distintas fases del crecimiento de *S. aureus*, en la que la fase de latencia tiene una duración de 1h y la fase exponencial finaliza a las 10 hs. Luego de este tiempo comienza la fase estacionaria, en la cual el número de células se mantiene aproximadamente constante. Luego de 20 hs se forman aglomerados que precipitan al fondo del frasco de Erlenmeyer, ocasionando la pérdida de homogeneidad del cultivo bacteriano.

En el presente Trabajo de Tesis se trabajó con poblaciones de microorganismos que se encuentran en fase exponencial, tanto para *P. aeruginosa* como para *S. aureus*.

### 3.3. Condiciones experimentales para el estudio de la capacidad bactericida de las NPs Ag sobre bacterias planctónicas

Para poder determinar la eficacia de las NPs Ag como agente microbicida se requieren métodos en los que se pueda medir la viabilidad de los microorganismos luego de la exposición de éstos a las NPs. Esta determinación en general se realiza empleando métodos de evaluación y criterios estándar usados para antibióticos en la



práctica microbiológica, tales como discos de difusión o halo de inhibición y dilución en caldo [24].

En esta sección se describen de manera general los ensayos realizados para evaluar la capacidad bactericida de las NPs Ag sobre bacterias planctónicas.

### 3.3.1 Halo de inhibición

El método de halo de inhibición o difusión en ágar es un método utilizado habitualmente en diagnóstico [25] que permite determinar la dosis requerida de un determinado agente antimicrobiano para erradicar uno o varios microorganismos. Se puede usar para determinar la susceptibilidad de la cepa frente a distintos antibióticos o a un intervalo de concentraciones de un mismo agente antimicrobiano. En este método, una cantidad determinada del microorganismo (en UFC/mL) se siembra sobre la superficie de un medio sólido de cultivo (ágar) y sobre ésta se disponen discos de papel embebidos con una concentración determinada de agente microbicida. Luego de un período de incubación, se determina el diámetro del halo alrededor del papel de filtro causado por la inhibición del crecimiento del microorganismo ante la presencia del agente microbicida. Una mayor distancia desde el disco hasta la zona en la que se desarrollan las colonias (halo) indica una mayor susceptibilidad de las bacterias ante el agente agregado. La ventaja de este método es la posibilidad de evaluar múltiples antibióticos y concentraciones a la vez frente a uno o varios microorganismos. Sin embargo, la utilización de la técnica dependerá siempre de la difusión del agente en el medio [24, 26].

Para el ensayo, cuyos resultados se muestran en el Capítulo 5 sección 5.2.1, se preparó un cultivo bacteriano en caldo nutritivo estéril con agitación mecánica continua a 250 rpm a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial media. Luego se tomó una alícuota de 10 µL con una concentración de  $10^8$  UFC/mL de *P. aeruginosa* y se sembró en un placa de Petri conteniendo ágar *Mueller Hinton*. Sobre el ágar recién sembrado se colocó un disco de papel de filtro circular (diámetro de 1 cm, marca Whatman) embebido con una dispersión de NPs Ag de concentración 294 µM de Ag. Las placas fueron incubadas a 30°C por 24 hs. Transcurrido el tiempo de incubación se

observó la presencia de un halo de inhibición alrededor del disco. Este ensayo se realizó por triplicado de manera independiente.

### **3.3.2 Dilución en caldo: determinación de la concentración mínima bactericida**

En el método de dilución en caldo se expone una cantidad determinada de UFC/mL a un intervalo de concentraciones del agente microbicida por 20 hs, generalmente en diluciones 1:2, en tubos de ensayos con medio de cultivo líquido o caldo donde crecerá el microorganismo elegido. El medio más comúnmente usado es el *Mueller Hinton* [24]. El agente se prepara en una solución madre concentrada que es diluida en caldo hasta obtener las concentraciones apropiadas. Además, se preparan tubos de ensayo sin microbicida como control de crecimiento del microorganismo. El microorganismo crecerá en ausencia del agente bactericida (control) y en aquellos medios en los que su concentración no sea suficiente para inhibir su crecimiento. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración del agente microbicida se inhibirá completamente el crecimiento del microorganismo. Por último, mediante recuento en placa se determina el número de las bacterias que sobrevivieron al tratamiento. Con este método es posible evaluar un intervalo de concentraciones del agente microbicida; sin embargo, es más laborioso de realizar comparado con el método anterior y no se pueden evaluar efectos en función del tiempo [24, 26]

Por otra parte, al evaluar la capacidad bactericida de los agentes antimicrobianos es necesario determinar la concentración del agente necesario para inhibir o eliminar determinado microorganismo de manera eficiente. Con este método se puede determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) en condiciones estándares. La CMI se refiere a la concentración más baja de agente bactericida que inhibe el crecimiento de los microorganismos dentro de una serie de diluciones [26]. En el caso del método de dilución en caldo, en la CMI hay ausencia de turbidez (indicio de crecimiento). La concentración mínima bactericida (CMB) se define como la concentración de agente bactericida necesaria para matar el 99,9% de la población microbiana [26, 27]. En el método de dilución en caldo, la CMB se determina enfrentando un cultivo conteniendo

una determinada concentración de bacterias con una serie de diluciones del agente microbicida y cuantificando las bacterias viables después de 24 hs de tratamiento por recuento en placa (Figura 3.5).

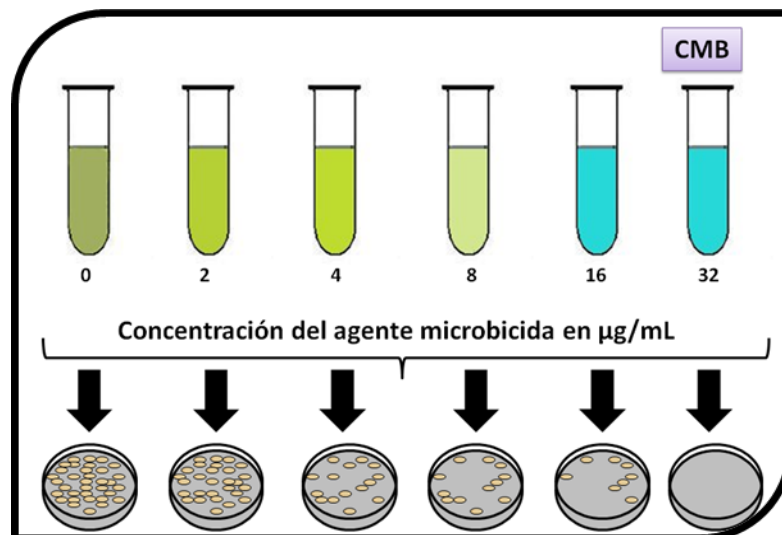


Figura 3.5. Esquema de la determinación de la concentración mínima bactericida

La CMB de las NPs Ag se determinó tanto para *P. aeruginosa* como para *S. aureus*. Debido a que las NPs Ag no resultaron ser estables en los medios de cultivo líquidos ensayados (caldo nutritivo, caldo *Mueller Hinton* y caldo *Luria Bertani*) (Ver Capítulo 5, sección 5.2.2), los ensayos de determinación de la CMB se realizaron en un medio mínimo suplementado de tal manera de asegurar el crecimiento bacteriano.

El medio usado fue un buffer fosfato al que se le adicionaron glucosa, manitol y glicina como nutrientes necesarios para el crecimiento. La composición fue de 5 g/L de manitol, 5 g/L de glucosa y 10 g/L de glicina. Por otra parte, el medio fue evaluado antes de realizar los ensayos para saber si era apto para el crecimiento microbiano. Para ello se resuspendieron  $10^5$  UFC/mL de bacterias en el medio y se incubaron por 24 hs a 30°C. Luego de ese tiempo se observó una leve turbidez, indicando que las bacterias fueron capaces de crecer y duplicarse en el medio. Se cuantificó el número de bacterias viables mediante recuento en placa, encontrándose un aumento de un orden de magnitud de las UFC/mL con respecto al inóculo inicial.

Las concentraciones de NPs Ag evaluadas fueron 0; 0,1; 0,4; 0,78; 1,6; 3,12; 6,25; 12,5; 25, 50, 75  $\mu\text{M}$  de Ag (expresadas como concentración de Ag total). Las NPs Ag fueron agregadas al medio preparado con una concentración final según el intervalo elegido; a continuación se adicionó una alícuota de  $1 \times 10^5$  UFC/mL y se incubó por 24 hs a 30°C. Al finalizar el tiempo de incubación se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  y se realizó recuento en placa para contar las colonias viables después de la exposición a las diferentes concentraciones de NPs Ag. El ensayo se realizó al menos 3 veces. Se realizó un análisis estadístico mediante ANOVA (análisis de la varianza) de un factor con un  $p=0,05$  para obtener resultados estadísticamente significativos.

### **3.4 Condiciones experimentales para el estudio de la formación de biofilms sobre superficies**

En el presente Trabajo de Tesis se realizaron diversos ensayos con biofilms de *P. aeruginosa* y de *S. aureus* con el objetivo de comparar la adhesión y la formación de biofilms sobre la superficie de los diferentes sustratos (titanio, titanio modificado con NPs Ag y Ag masiva).

#### **3.4.1 Formación de biofilms sobre distintos sustratos**

Los ensayos con *P. aeruginosa* se realizaron a partir de un inóculo preparado en en agar nutritivo inclinado (pico de flauta) que se resuspendió en 150 mL de caldo nutritivo estéril. Se creció a 30°C por 24 hs con agitación mecánica. Al finalizar el tiempo se midió la  $A_{586\text{nm}}$  que corresponde a  $\approx 10^{10}$  UFC/mL por encima del intervalo de la curva de calibración. El cultivo preparado fue usado para armar un nuevo cultivo fresco en caldo nutritivo con una  $A_{586\text{nm}}$  de aproximadamente 0,05. Se incubó a 30°C con agitación mecánica hasta alcanzar la fase exponencial media, a este cultivo se denominó cultivo madre.

Los cultivos usados para exponer los diferentes sustratos se prepararon a partir de un inóculo del cultivo madre resuspendido en 50 mL de caldo nutritivo estéril de manera de alcanzar una concentración final en el rango  $2,5 - 4 \times 10^9$  UFC/mL ó  $1 \times 10^8$  UFC/mL (dependiendo del ensayo a realizarse). Los sustratos fueron sumergidos verticalmente en el cultivo por 4 h a 30°C para permitir la formación del biofilm sobre la superficie. Transcurrido ese tiempo se retiraron, se enjuagaron con agua desionizada estéril para retirar aquellos microorganismos débilmente adheridos, y por último se secaron al aire.

Los ensayos con *S. aureus* se realizaron a partir de un inóculo preparado en ágar nutritivo de la bacteria resuspendido en 150 mL de caldo nutritivo estéril. Se creció a 30°C por 24 hs con agitación mecánica. Al finalizar el tiempo, se midió la  $A_{586nm}$  que corresponde a  $\approx 10^9$  UFC/mL. Siguiendo el mismo procedimiento y condiciones que *P. aeruginosa*, se expusieron los sustratos a una concentración final de  $1 \times 10^8$  UFC/mL de a partir de un cultivo fresco en fase exponencial. Luego, se siguieron los mismos pasos mencionados para *P. aeruginosa* para obtener un biofilm sobre la superficie de los sustratos.

### **3.4.2 Viabilidad de las bacterias adheridas sobre distintos sustratos**

La formación de biofilms sobre sustratos consta de varias etapas, como se ha descrito en el Capítulo 1. Para el presente Trabajo de Tesis es de sumo interés la etapa de adhesión de los microorganismos sobre la superficie, la cual se ve afectada por varios factores, entre ellos la naturaleza del microorganismo, las características del ambiente en el que crece el biofilm y las características fisicoquímicas de la superficie en estudio. Para analizar la viabilidad de las bacterias adheridas sobre diferentes sustratos se utilizaron dos técnicas: microscopía de epifluorescencia y recuento en placa de las bacterias adheridas. A continuación se detallará cada una de estas técnicas.

### **3.4.2.1 Microscopía óptica de epifluorescencia**

La microscopía óptica permite el análisis de muestras con una resolución de aproximadamente 0,2  $\mu\text{m}$ . En el caso de bacterias permite observar la morfología individual o grupal y la presencia de esporas. Se puede obtener mayor resolución si se utilizan lentes de inmersión en aceites especiales, pero se debe tener en cuenta que la muestra no se podrá recuperar o volver a utilizar. La microscopía óptica tradicional utiliza luz transmitida, por lo que las muestras biológicas a observar deberán estar soportadas sobre sustratos transparentes como vidrio, ágar o cajas de Petri. En el caso de biofilms formados sobre superficies opacas se utiliza la reflexión del haz de luz producida por medio de un reflector de vidrio plano sobre la superficie de la muestra. Por otro parte, para el estudio de los biofilms es adecuado el uso de microscopía de epifluorescencia, la cual provee información morfológica, estructural y metabólica de las células. En esta técnica se realiza una tinción con un colorante que fluoresce al ser iluminado con luz visible.

En el presente Trabajo de Tesis se utilizó un microscopio óptico Olympus BX-51 y filtros U-MWG2 (con un filtro de excitación en 510-550 nm y emisión en 590 nm) y U-MWB2 (con un filtro de excitación en 460-490 nm y emisión en 520 nm). Los colorantes fluorescentes usados fueron naranja de acridina y el kit comercial *LIVE/DEAD BacLight*<sup>®</sup>

#### **3.4.2.1.1 Tinción con el *Kit LIVE/DEAD BacLight*<sup>®</sup>**

El *kit* comercial está compuesto por dos colorantes fluorescentes: uno verde, denominado SYTO9<sup>®</sup>, y otro rojo, yoduro de propidio (PI)[28, 29]. Los colorantes se fijan a los ácidos nucleicos de las células pero difieren en la capacidad de penetrar a las células. El mecanismo de acción se basa en la integridad de la membrana de las células. El colorante SYTO9<sup>®</sup> es capaz de penetrar en todas las células, posean su membrana dañada o no, mientras que el yoduro de propidio solamente es capaz de penetrar en aquellas células que se encuentran dañadas. Por lo tanto, las células dañadas o con pérdida de la integridad de membrana emiten fluorescencia de color rojo (el yoduro de

propidio reduce la fluorescencia verde del SYTO9®), mientras una célula con la membrana intacta emite fluorescencia de color verde.

Para los ensayos con *P. aeruginosa*, se preparó una mezcla de ambos colorantes en iguales proporciones, para lo cual se emplearon 3 µL de cada uno de ellos y se llevaron a 1 mL con agua desionizada estéril. Posteriormente se colocaron 20 µL de la mezcla sobre el biofilm de *P. aeruginosa* formado sobre las diferentes superficies y se mantuvo en oscuridad durante 20 minutos. Al finalizar ese tiempo se enjuagó con agua desionizada estéril y se observó en el microscopio de epifluorescencia para determinar la viabilidad de las bacterias. Los filtros usados fueron U-MWG2 (una excitación entre 510 y 550 nm y emisión a 590 nm), el que permite observar tanto las bacterias vivas como las dañadas con una coloración verde y U-MWB2 (excitación entre 460 y 490 y emisión a 520 nm), con el que se observaron las bacterias dañadas con una coloración roja.

En el caso del biofilm de *S. aureus*, se preparó una mezcla diferente del kit, ya que las características del microorganismo (por ejemplo, su pared celular) son distintas a las de *P. aeruginosa*. Para ello se emplearon 1,5 µL de cada uno de los colorantes y se llevaron a 3 mL con agua desionizada estéril. A continuación se realizó el mismo procedimiento descrito para *P. aeruginosa*.

Tanto para *P. aeruginosa* como para *S. aureus* se obtuvieron imágenes de epifluorescencia de las bacterias adheridas a los diferentes sustratos y se adquirieron varias imágenes de diferentes zonas de la superficie. Para ello se dividió la superficie en una cuadrícula de 9 zonas, tomándose al menos 2 imágenes de cada una de ellas. Las imágenes fueron analizadas con el software Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, Estados Unidos).

En ambos casos el porcentaje de bacterias adheridas viables se calculó según la ecuación (1)

$$\% \text{ de bacterias viables} = \frac{\text{área cubierta por bacterias viables}}{\text{área cubierta por bacterias viables y muertas}} \times 100 \quad (\text{ec 3.1})$$

mientras que el porcentaje de adhesión (bacterias adheridas) se calculó con la ecuación (2)

$$\% \text{ de adhesión} = \frac{\text{área cubierta por bacterias}}{\text{área de la imagen}} \times 100 \quad (\text{ec. 3.2})$$

Los ensayos con el kit y la posterior observación por microscopía de epifluorescencia se realizaron por triplicado y de manera independiente. Se realizó un análisis estadístico mediante ANOVA de un factor con un  $p= 0,05$  a fin de poder obtener resultados estadísticamente significativos.

#### **3.4.2.1.2 Tinción con naranja de acridina**

En algunos casos se empleó la tinción con naranja de acridina (N,N,N', N' tetrametilacridina, según la nomenclatura de IUPAC), el cual es un colorante catiónico selectivo para los ácidos nucleicos y se utiliza para el estudio de formación de vacuolas lisosomales, autofagia y apoptosis. Este colorante interactúa con las moléculas de ADN y ARN por intercalación o mediante fuerzas electrostáticas. Cuando el colorante se asocia al ADN presenta un máximo de excitación a 502 nm y una emisión a 525 nm, en el rango del verde. En el caso del ARN, la excitación máxima se produce a 460 nm (color azul) y la emisión máxima a 650 nm (color rojo). Cuando las células están metabólicamente activas contienen grandes cantidades de ARN y, por lo tanto, si entran en contacto con el colorante tendrán una fluorescencia naranja[30].

Los biofilms fueron teñidos con 20  $\mu\text{L}$  de una solución de 0,05% P/V de naranja de acridina extendida sobre la superficie de los mismos. Los sustratos se mantuvieron en oscuridad por 5 minutos y se observaron por microscopía de epifluorescencia.

#### **3.4.2.2 Recuento en placa de las bacterias adheridas**

El recuento en placa o de colonias, como se ha mencionado anteriormente, es un método microbiológico que permite cuantificar el número de células capaces de formar una colonia. Para poder analizar el número de bacterias adheridas viables sobre las superficies de los distintos sustratos se realizó el recuento en placas desprendiendo



las bacterias adheridas con ayuda de baño de ultrasonido durante un tiempo determinado, de manera tal de no generar daño celular mediante este procedimiento.

En primer lugar se comprobó que el tratamiento mediante baño de ultrasonido no generara una disminución en la viabilidad de las bacterias. Para esto se comparó el número de bacterias planctónicas viables de *S. aureus* con y sin tratamiento por baño de ultrasonido usando recuento en placa de las bacterias viables. Para ello se preparó un cultivo de *S. aureus* en caldo nutritivo a 37°C, se tomó una suspensión celular y se ajustó a  $10^7$  UFC/mL en medio de cultivo fresco. La suspensión bacteriana fue distribuida en alícuotas de 2 mL en cuatro tubos de vidrio (2 como control y 2 para tratamiento con ultrasonido). Los tubos tratados fueron sumergidos en un baño de ultrasonido de 40kHz y 160 W a una temperatura de 37°C por 15 minutos. Los tubos control fueron incubados a 37°C por 15 minutos sin recibir tratamiento por ultrasonido. Finalizado el tiempo se determinaron las bacterias viables en la suspensión tratada (baño de ultrasonido) y sin tratar (control) mediante recuento en placa en ágar nutritivo. El número de bacterias viables en los tubos tratados en baño de ultrasonido fue de  $3,75 \pm 0,92 \times 10^7$  UFC/mL, mientras que en los tubos control fue de  $3,15 \pm 1,63 \times 10^7$  UFC/mL. Por lo tanto, el ensayo demostró que no había diferencia significativa en el número de bacterias viables con y sin tratamiento.

La desagregación completa de un biofilm por baño de ultrasonido es una cuestión que suele generar dudas, ya que se podría estar subestimando el número de bacterias sésiles. *Bjerkkan et al.* demostraron que este tratamiento es eficiente para desprender bacterias de un biofilm de *S. aureus* sobre superficies de Ti [31]. A su vez, el tratamiento por ultrasonido es comúnmente usado para averiguar el número de bacterias adheridas sobre una superficie por dilución en placa, como se explica a continuación. Unos de los métodos más ampliamente empleados para averiguar la susceptibilidad de los biofilms a los antibióticos en diagnóstico clínico es el dispositivo de Biofilms de Calgary (CBD, de su sigla en inglés). Sobre la superficie de este dispositivo se forman biofilms que serán expuestos a antibióticos o a algún otro agente microbicida. Las bacterias sésiles que los forman se desagregan empleando baño de ultrasonido y son cuantificadas mediante recuento en placa [32]. El CBD es usado con cepas patógenas como *P. aeruginosa* ATCC, *S. aureus* y *E. coli* [32, 33].

Con respecto al tiempo de tratamiento por ultrasonido elegido para el desprendimiento de las bacterias sésiles, se realizó un ensayo a distintos tiempos con *P. aeruginosa* sobre superficies de Ti. Para esto se formaron biofilms bacterianos sobre superficies de Ti durante 4 hs a 30°C; se retiraron los sustratos, se enjuagaron con agua desionizada estéril y se sumergieron en tubos de vidrio con 1 mL de caldo nutritivo estéril. Se sumergieron en el baño de ultrasonido por 5, 15, 20 y 30 minutos. En cada caso al finalizar el tiempo se retiraron los sustratos del baño de ultrasonido y se realizó el recuento en placa de la suspensión bacteriana. Se observó que a 15 minutos se obtenía el mismo número de bacterias viables que a tiempos mayores. Por lo tanto se decidió usar ese tiempo, ya que asegura el desprendimiento de las bacterias sin ocasionar daños a las células. A su vez, se corroboró el desprendimiento total de las bacterias de la superficie por microscopía de epifluorescencia tiñendo el sustrato con naranja de acridina y confirmando la ausencia de bacterias sobre la superficie.

Una vez seleccionadas las condiciones de trabajo se formaron los biofilms bacterianos sobre las distintas superficies, tal como se describió en la sección anterior. Posteriormente se retiraron los distintos sustratos de los cultivos, se enjuagaron con agua desionizada estéril y se sumergieron en 1 mL de caldo nutritivo estéril para llevarlos al baño de ultrasonido en las condiciones elegidas (15 minutos a 40kHz con una potencia de 160 W). Luego se tomaron 100  $\mu$ L de la suspensión y se realizaron diluciones seriadas para que la población bacteriana fuera lo suficientemente baja como para obtener placas con medio sólido de 30 a 300 colonias, rango en el cual se puede diferenciar una colonia de otra sobre el ágar (Figura 3.6). De cada dilución se tomaron 100  $\mu$ L y se extendieron sobre placas de Petri con ágar nutritivo. Las placas se incubaron a 30°C por 24 hs en forma invertida. Los ensayos fueron realizados por triplicado y de manera independiente. Se realizó un análisis estadístico mediante ANOVA de un factor con un  $p= 0,05$  para obtener resultados estadísticamente significativos.

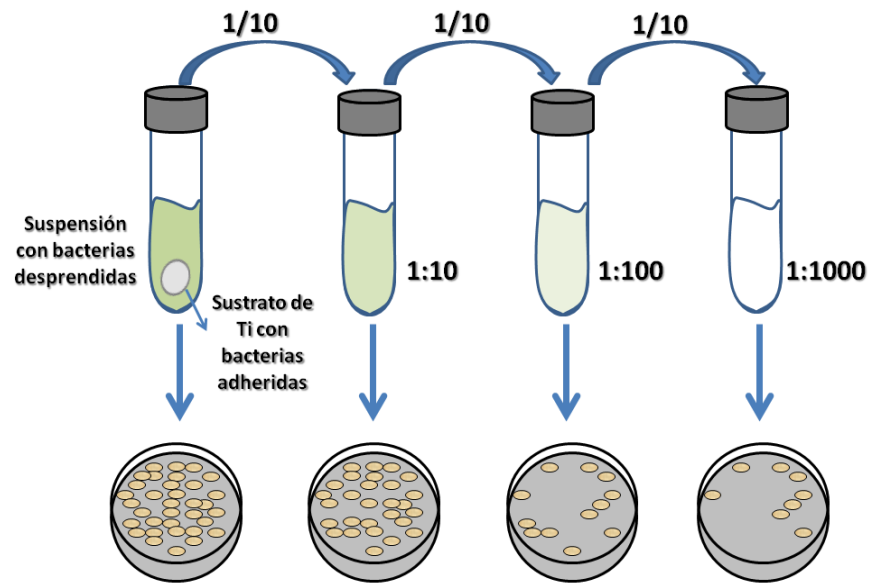


Figura 3.6. Esquema correspondiente al ensayo de recuento en placas de las bacterias sésiles desprendidas de los sustratos de Ti mediante baño de ultrasonido.

## Referencias bibliográficas

1. Patrick R. Murray, P.D., Ken S. Rosenthal, P.D. y Pfaller, M.A., Microbiología médica. 2006, Elsevier Science Health Science Division.
2. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., Fernández, M.G. y Pérez, M.S., Biología de los microorganismos: Brock, 2003, Pearson, Príncipe Hall.
3. Patel Sk Fau - Pratap, C.B., Pratap Cb Fau - Verma, A.K., Verma Ak Fau - Jain, A.K., Jain Ak Fau - Dixit, V.K., Dixit Vc Fau - Nath, G. y Nath, G., Pseudomonas fluorescens-like bacteria from the stomach: A microbiological and molecular study.
4. Ashish, A., Shaw, M., Winstanley, C., Humphreys, L. y Walshaw, M.J., Halting the spread of epidemic pseudomonas aeruginosa in an adult cystic fibrosis centre: a prospective cohort study, *JRSM Short Reports*, 2013, (4).
5. Estahbanati, H.K., Kashani, P.P. y Ghanaatpisheh, F., Frequency of Pseudomonas aeruginosa serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics, *Burns*, 2002, (28), 340-348.
6. Xin, X.-F. y He, S.-Y., Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000: A Model Pathogen for Probing Disease Susceptibility and Hormone Signaling in Plants, *Annual Review of Phytopathology*, 2012.
7. Lodish, H., Biología Celular y Molecular. 2005, Editorial Medica Panamericana Sa de.
8. Gellatly, S.L. y Hancock, R.E.W., Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses, *Pathogens and Disease*, 2013, (67), 159-173.
9. Breidenstein, E.B.M., de la Fuente-Núñez, C. y Hancock, R.E.W., Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance, *Trends in microbiology*, 2011, (19), 419-426.
10. West, S.H., Zeng, L., Lee, B. y et al., Respiratory infections with Pseudomonas aeruginosa in children with cystic fibrosis: Early detection by serology and assessment of risk factors, *JAMA*, 2002, (287), 2958-2967.
11. Lyczak, J.B., Cannon, C.L. y Pier, G.B., Establishment of Pseudomonas aeruginosa infection: lessons from a versatile opportunist, *Microbes and Infection*, 2000, (2), 1051-1060.
12. Ferroni, A., Nguyen, L., Pron, B., Quesne, G., Brusset, M.C. y Berche, P., Outbreak of nosocomial urinary tract infections due to Pseudomonas aeruginosa in a paediatric surgical unit associated with tap-water contamination, *Journal of Hospital Infection*, 1998, (39), 301-307.
13. Hancock, R.E., Mutharia, L.M., Chan, L., Darveau, R.P., Speert, D.P. y Pier, G.B., Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains, *Infection and Immunity*, 1983, (42), 170-177.
14. Valerius, N.H., Koch, C. y Høiby, N., Prevention of chronic Pseudomonas aeruginosa colonisation in cystic fibrosis by early treatment, *The Lancet*, 1991, (338), 725-726.
15. Oliver, A., Cantón, R., Campo, P., Baquero, F. y Blázquez, J., High Frequency of Hypermutable Pseudomonas aeruginosa in Cystic Fibrosis Lung Infection, *Science*, 2000, (288), 1251-1253.

16. Burgos, F.J., Bueno, G., Gonzalez, R., Vazquez, J.J., Diez-Nicolás, V., Marcen, R., Fernández, A. y Pascual, J., Endourologic Implants to Treat Complex Ureteral Stenosis After Kidney Transplantation, *Transplantation Proceedings*, 2009, (41), 2427-2429.
17. Rodríguez-Baño, J., Selection of empiric therapy in patients with catheter-related infections, *Clinical Microbiology and Infection*, 2002, (8), 275-281.
18. Gonzalez, B.E., Hulten, K.G., Dishop, M.K., Lamberth, L.B., Hammerman, W.A., Mason, E.O. y Kaplan, S.L., Pulmonary Manifestations in Children with Invasive Community-Acquired *Staphylococcus aureus* Infection, *Clinical Infectious Diseases*, 2005, (41), 583-590.
19. Lina, G., Piémont, Y., Godail-Gamot, F., Bes, M., Peter, M.-O., Gauduchon, V., Vandenesch, F. y Etienne, J., Involvement of Panton-Valentine Leukocidin—Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia, *Clinical Infectious Diseases*, 1999, (29), 1128-1132.
20. Moran, G.J., Amii, R.N., Abrahamian, F.M. y Talan, D.A., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired skin infections, *Emerging infectious diseases*, 2005, (11), 928-930.
21. Götz, F., *Staphylococcus* and biofilms, *Molecular Microbiology*, 2002, (43), 1367-1378.
22. Fitzpatrick, F., Humphreys, H. y O'Gara, J.P., The genetics of staphylococcal biofilm formation—will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection?, *Clinical Microbiology and Infection*, 2005, (11), 967-973.
23. Tortora, G.J., Funke, B.R. y Case, C.L., Introducción a la microbiología/ Microbiology: An Introduction, 2007, Editorial Medica Panamericana Sa de.
24. Punam, V., Methods for Determining Bactericidal Activity and Antimicrobial Interactions, in Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols. 2007, CRC Press, 275-298.
25. Piddock, L.J.V., Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria, *Journal of Applied Microbiology*, 1990, (68), 307-318.
26. Murray, P.R., Rosenthal, K.S. y Tenover, M.A., Microbiología médica, 6a ed. 2009, Elsevier.
27. Andrews, J.M., Determination of minimum inhibitory concentrations, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, (48), 5-16.
28. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp07007.pdf>.
29. Lawrence, J.R., Neu, T.R. y Swerhone, G.D.W., Application of multiple parameter imaging for the quantification of algal, bacterial and exopolymer components of microbial biofilms, *Journal of Microbiological Methods*, 1998, (32), 253-261.
30. Evans, L.V., ed. *Biofilms: recent advances in their study and control*. Harwood Academic. 2000, Abingdon: Marston, Amsterdam.
31. Bjerkan, G., Witso, E. y Bergh, K., Sonication is superior to scraping for retrieval of bacteria in biofilm on titanium and steel surfaces in vitro, *Acta Orthop*, 2009, (80), 245-250.
32. Ceri, H., Olson, M.E., Stremick, C., Read, R.R., Morck, D. y Buret, A., The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms, *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, (37), 1771-1776.

33. Brooun, A., Liu, S. y Lewis, K., A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, (44), 640-646.

# Capítulo 4

## Síntesis y caracterización de nanopartículas de Ag

### 4.1 Introducción

Las nanopartículas (NPs) se pueden definir en el sentido más estricto como nanomateriales en los que todas sus dimensiones están entre 1 y 100 nm [1]. Las NPs se pueden obtener mediante métodos “*bottom-up*” (de abajo hacia arriba) o “*top-down*” (de arriba hacia abajo). En los denominados métodos “*bottom-up*” se construyen estructuras complejas a partir de otras más simples mediante, por ejemplo, técnicas de autoensamblado. Por otra parte, en los métodos “*top-down*” se parte de sistemas de complejidad o tamaño mayores y éstos se van reduciendo hasta alcanzar las dimensiones deseadas. Los métodos más usados, por su rapidez, simpleza y por la calidad de las nanoestructuras obtenidas, son los “*bottom-up*”, entre los cuales se pueden nombrar la reducción de una sal mediante un agente reductor en fase acuosa [2-5] u orgánica [6, 7], o bien mediante métodos electroquímicos [8-10], fotólisis[11] o empleando procesos de metabolismo bacteriano (química verde) [12], entre otros.

En las síntesis de nanopartículas metálicas basadas en la reducción en solución de una sal mediante un agente reductor, las reacciones en general se llevan a cabo en

presencia de un agente estabilizante, el cual tiene la función de recubrir la superficie de las NPs, controlando de esa manera el tamaño de las mismas y evitando su aglomeración[13]. El primer trabajo acerca de la reducción química de una sal de un metal de transición en presencia de un agente estabilizante para generar un coloide (en este caso, de oro) en un medio acuoso fue publicado por Faraday en el año 1857 [14]. Faraday denominó a estos coloides como “soles”. Casi un siglo más tarde Turkevich *et al.* reprodujeron muchos de esos métodos y lograron obtener NPs estables y con tamaños más definidos[15]. El método de Turkevich *et al.* se basa en la reducción de una sal de oro ( $\text{HAuCl}_4$ ) con varios agentes reductores, entre ellos el citrato de sodio, generando NPs de un tamaño aproximado de 20 nm. Por otra parte, estos mismos autores pudieron proponer un mecanismo que involucra los siguientes pasos: nucleación, crecimiento y estabilización (Figura 4.1)[15]. En trabajos anteriores, como en los de La Mer *et al.*[16, 17], se había establecido ya un mecanismo de nucleación y crecimiento pero para soles de azufre. Lamentablemente este mecanismo no siempre puede ser aplicado a otros sistemas [18].

Generalizando, la primera etapa de formación de las dispersiones coloidales metálicas es la nucleación, la cual comienza con la reducción de la sal metálica mediante un reductor adecuado para obtener átomos de metal con un estado de oxidación igual cero. Los átomos metálicos pueden colisionar con iones metálicos o aglomerados de átomos y formar un núcleo metálico denominado semilla. La segunda etapa consta del crecimiento de estos núcleos, mediante la difusión y la transferencia de masa de los iones metálicos o átomos metálicos presentes en la solución hacia la superficie de dichos núcleos, siendo los factores más importantes el gradiente de concentración y la temperatura [19, 20]. Por último, la estabilidad de las dispersiones coloidales depende de la presencia de un agente estabilizante, el cual recubre la superficie de las NPs, evitando su aglomeración (Figura 4.1) [21]. Dependiendo de la naturaleza química de las moléculas estabilizantes la estabilidad de las dispersiones puede deberse a interacciones electrostáticas o a factores estéricos. La estabilización electrostática implica la repulsión coulombica entre partículas causada por la doble capa eléctrica formada por los iones adsorbidos en la superficie de las NPs (por ejemplo, citrato de sodio). En el caso de la estabilización estérica, las moléculas orgánicas



(polímeros, surfactantes) actúan como un escudo protector sobre la superficie de las NPs. Como ejemplo se puede mencionar que para NPs Ag se utiliza polivinil alcohol (PVP)[22], bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) [23] o almidón [24]. Los factores cruciales que se deben considerar durante todo el proceso de la síntesis son la concentración del agente reductor y del estabilizante, la temperatura, el pH y la fuerza iónica, ya que éstos controlarán el tamaño y la forma de las NPs obtenidas[19].

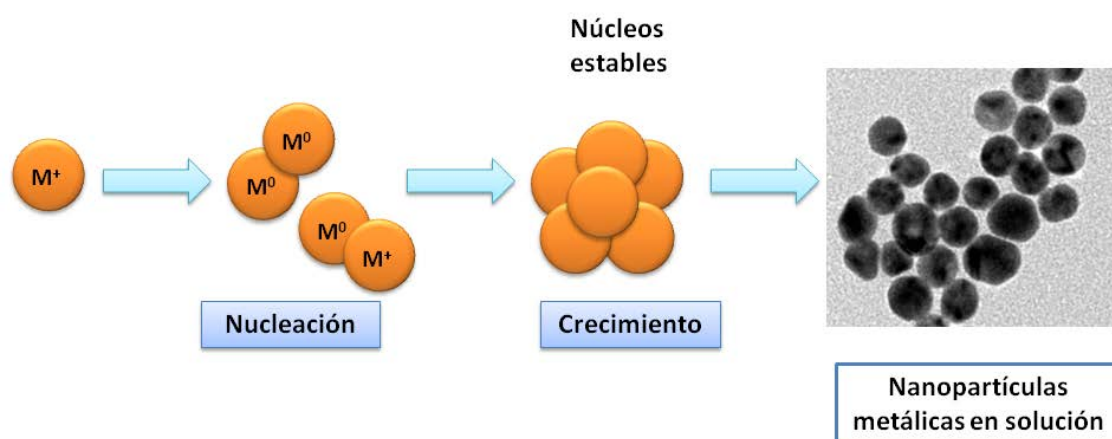


Figura 4.1. Esquema de la formación de NPs metálicas en solución.

Los primeros métodos de síntesis de NPs Ag descritos fueron el método de Lee-Miesel *et al.* [25] y el método de Creighton *et al.* [26]. El método de Lee-Miesel, se basa en una variación del método de Turkevich *et al.* en el que se emplea una sal de Ag ( $AgNO_3$ ) en lugar de una sal de Au ( $HAuCl_4$ ) y citrato de sodio como agente reductor. Como resultado se obtienen NPs Ag con un amplio rango de distribución de tamaños [25]. Por otra parte, el método de Creighton consiste en la reducción de  $AgNO_3$  con un agente reductor fuerte como  $NaBH_4$ , obteniendo NPs monodispersas y con un tamaño de aproximadamente 10 nm.

En la literatura hay una gran variedad de métodos de síntesis, los cuales se pueden dividir en “tradicionales” y “no tradicionales”. Los métodos tradicionales son aquéllos que están basados en los métodos nombrados anteriormente, en los que la síntesis se lleva a cabo en solución y se obtienen NPs por reducción química de una sal de Ag. Estos métodos utilizan diversas sales de Ag, como  $AgClO_4$ ,  $Ag(NH_3)_2$  y  $AgNO_3$ , y agentes estabilizadores para evitar la agregación tales como alcanotioles [27],

surfactantes [28], polímeros [29], azúcares [24] y hasta dendrímeros [30, 31]. Además, los agentes estabilizadores pueden generar partículas anisotrópicas con formas diversas determinadas [32], como resultados de diferentes afinidades a una o varias caras atómicas cristalinas, favoreciendo el crecimiento sobre otras caras [33-35]. Este efecto es deseado para obtener NPs con formas determinadas, como triángulos [36], estrellas [37], entre otras. Los métodos no tradicionales incluyen aquellos en los que la síntesis de las NPs Ag se lleva a cabo por diversas técnicas como reducción por altas temperaturas en matrices porosas [38, 39], por condensación en fase vapor de un metal sobre un soporte sólido [40], ablación láser [41], fotorreducción de los iones Ag [42], electrólisis de una solución de iones Ag [43] y métodos biológicos en los cuales el proceso de reducción se lleva a cabo con la participación de microorganismos [44, 45].

Los métodos mencionados representan sólo una parte de los informados en la literatura; cada uno de ellos posee ventajas y desventajas y en consecuencia, la elección de la síntesis dependerá de la naturaleza de la aplicación de las NPs. Por ejemplo, para catálisis generalmente es deseable emplear NPs de menor tamaño, sin importar la fase en la que están dispersas, ya sea acuosa u orgánica, mientras que para aplicaciones biológicas se buscan NPs en fase acuosa (generalmente en condiciones fisiológicas) y con recubrimientos biocompatibles como citrato, azúcares o polímeros.

Una característica muy notable de ciertas NPs metálicas es su interacción fuerte y específica con la radiación electromagnética. El color que presenten las dispersiones de NPs dependerá del tamaño y la forma de las partículas (ya que éstos determinan la longitud de onda de la luz que pueden dispersar y transmitir), mientras que la intensidad del color dependerá de su concentración. Las propiedades ópticas únicas de algunas NPs metálicas se originan en las oscilaciones colectivas de los electrones de conducción del metal, los cuales, al ser excitados por la radiación electromagnética, generan un efecto denominado resonancia plasmónica de superficie (SPR)[46, 47]. Entre los metales que presentan este efecto (Ag, Au y Cu), la Ag es la que presenta mayor intensidad de la banda de SPR, mientras que el Au y el Cu poseen intensidades más débiles. Por tal motivo las NPs Ag son capaces de transmitir la luz con gran intensidad a bajas concentraciones en comparación con cualquier otra partícula del mismo tamaño [48-50]. En una partícula metálica los electrones de las capas de

valencia son libres de moverse dentro de la partícula del metal, lo que confiere a ésta una alta conductividad. No obstante, cuando la luz incide sobre una de estas partículas se induce un dipolo eléctrico debido al desplazamiento de una parte de los electrones móviles deslocalizados producido por el campo eléctrico de la luz. En consecuencia, esto genera una densidad de carga negativa en una región de la partícula [50]. En partículas pequeñas, del orden de 2 nm de diámetro, se producen dipolos, mientras que en partículas más grandes (a partir de aproximadamente 30 nm) se produce un cuadrupolo y, en general, multipolos [13]. Por lo tanto, las propiedades ópticas de las NPs metálicas dependen de características tales como su tamaño, forma, composición, estructura y la presencia de una capa de moléculas en su superficie [51, 52].

En el presente capítulo se detallarán las distintas síntesis ensayadas para la obtención de NPs Ag monodispersas y estables en dispersión acuosa. Éstas se realizaron por diversos métodos, entre los cuales podemos mencionar una variación del método de Turkevich, una síntesis basada en la reacción de Tollens y diferentes síntesis que consisten en la reducción de  $\text{AgNO}_3$  por  $\text{NaBH}_4$  con y sin el agregado de iones citrato (este último empleado como estabilizante).

Todos los reactivos usados en los distintos ensayos fueron de grado analítico y las soluciones se prepararon con agua desionizada (con una resistividad de 18  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ ). La caracterización de las NPs se realizó mediante espectroscopía de UV-visible y TEM.

## 4.2 Métodos utilizados para la síntesis de NPs Ag

### 4.2.1 Variación del método de Turkevich

El método se basa en la reducción de una sal de  $\text{AgNO}_3$  con un agente reductor suave como el citrato de sodio [15]. Para obtener las NPs se llevaron a ebullición 100 mL de una solución 0,01 % p/v de  $\text{AgNO}_3$  a los cuales se les agregaron rápidamente 2 mL de una solución 1 % p/v de citrato de sodio, con la asistencia de agitación magnética. A los pocos segundos la mezcla de reacción adquirió un color amarillo

suave. Se retiró de ebullición y se dejó agitando por 15 minutos. El color de la solución final fue amarillo.

Las NPs obtenidas fueron observadas por TEM, resultando ser bastante polidispersas en tamaño y forma. Se realizó una estimación del tamaño de las NPs, observándose un diámetro mínimo de 15 nm y un máximo de 96 nm (Figura 4.2). Asimismo se comprobó la formación de aglomerados, por lo que se concluyó que este método no era adecuado para preparar NPs con las características deseadas.

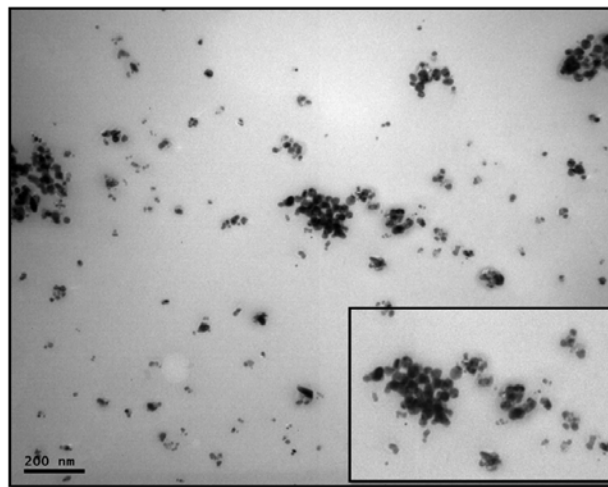
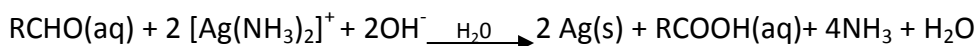


Figura 4.2. Imagen de TEM de las NPs Ag obtenidas mediante una variación del método de Turkevich, la figura inserta muestra una región ampliada en la que se observan NPs Ag de diferentes tamaños. Imagen tomada en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP.

#### 4.2.2 Método de Tollens

El método se basa en la reacción típica de reducción de plata de Tollens, en la que el agente reductor es un azúcar con un grupo aldehído. En efecto, la reacción de Tollens es empleada para determinar si un compuesto posee un grupo cetona o un grupo aldehído. Esta reacción utiliza un complejo de Ag,  $[Ag(NH_3)_2]^+$  que en presencia de un compuesto con un grupo aldehído forma un espejo de Ag. Este proceso es empleado desde hace tiempo en la deposición de Ag sobre soportes sólidos para generar superficies especulares. La reacción principal de Tollens puede ser descrita mediante la siguiente ecuación química:



La síntesis se realizó siguiendo el método usado por Yin *et al.* [53] a 30°C. La preparación de las NPs por este método involucra la utilización de 3 soluciones: una solución (A) 25% p/v de AgNO<sub>3</sub> y 30% p/v de NH<sub>3</sub>; una solución activadora (B) 10% p/v de NaOH y 8% p/v de NH<sub>3</sub>, y una solución reductora (C) 0,3 P/V de formaldehído y 30% p/v de sorbitol. Las NPs se sintetizaron mediante los siguientes pasos:

- (i) Se preparó una mezcla de las soluciones A y B, para lo cual se tomó una alícuota de 0,5 mL de la solución A y se llevó a 14 mL con agua desionizada. A ésta se le agregaron 0,5 mL de la solución B. La mezcla se llevó a un volumen final de 300 mL con agua desionizada y se la denominó "SAB".
- (ii) Se diluyeron 0,5 mL de la solución C en 300 mL de agua desionizada. Esta solución se denominó "SC".
- (iii) En un frasco de Erlenmeyer se colocaron 0,9 mL de la solución SAB y 0,9 mL de la solución SC y se dejó en baño de ultrasonido durante 1 h a 30°C.

Mediante este procedimiento, se obtuvieron dispersiones coloidales amarillas. Se realizaron varios intentos hasta obtener una dispersión coloidal que se mantuviera estable durante el proceso de la preparación de las mismas. Las nanopartículas sintetizadas se caracterizaron por espectroscopía de UV-vis y por TEM.

El espectro de UV-visible de la solución de las NPs Ag mostró un pico de plasmones en aproximadamente 440 nm (Figura 4.3 a). Las NPs se observaron por TEM (Figura 4.3 b), pudiéndose observar que las mismas eran polidispersas en tamaño y forma. Se observó además la presencia de aglomerados. La dispersión no resultó estable y se produjo la precipitación de las NPs poco tiempo después de la síntesis, aproximadamente tres días de haber sido preparadas. Estos resultados poco alentadores llevaron a plantear otra estrategia de síntesis.

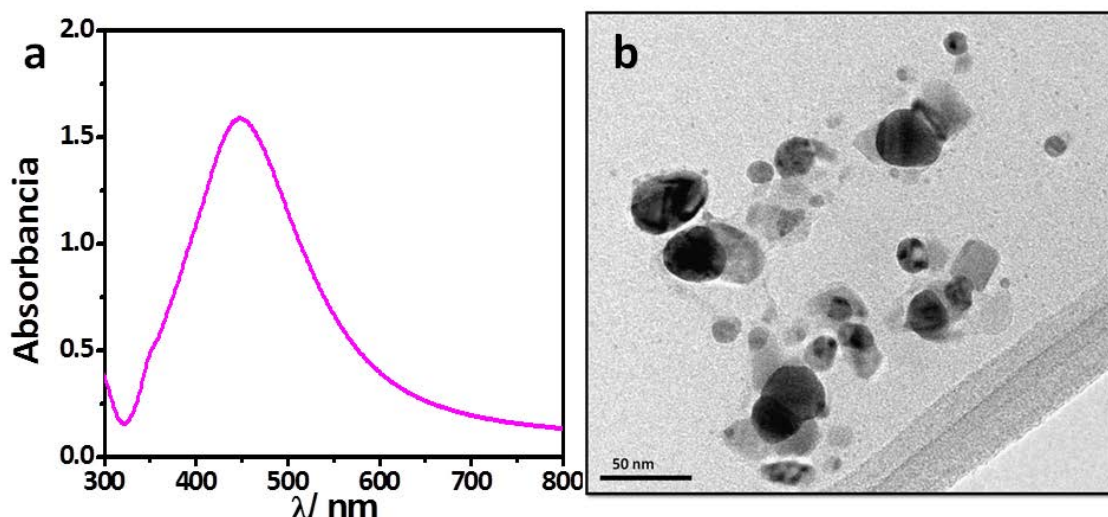


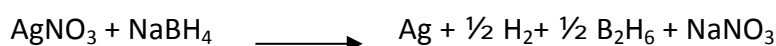
Figura 4.3. a) Espectro de UV-visible de las NPs obtenidas a 30°C y b) Imagen TEM de NPs Ag obtenidas según el método de Tollens a 30°C (colaboración con el Dr. M.S. Moreno del Centro Atómico Bariloche

#### 4.2.3. Métodos por reducción de $\text{AgNO}_3$ con $\text{NaBH}_4$

En esta sección se describirán los diversos métodos de síntesis ensayados en el presente trabajo de tesis cuya característica común es la utilización de  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor fuerte.

##### 4.2.3.1 Método en ausencia de iones citrato

Se siguió el protocolo de Mulfinger *et al.* [54]. La reacción química de reducción de la sal de  $\text{AgNO}_3$  mediante borohidruro de sodio es la siguiente:



Se debe tener en cuenta que el  $\text{NaBH}_4$ , al entrar en contacto con el agua, inmediatamente desprende  $\text{H}_2$  y se convierte en su forma iónica ( $\text{BH}_4^-$ ); y esta especie estabiliza las NPs Ag por repulsión [54, 55]. En un frasco de Erlenmeyer se colocaron 30 mL de una solución 0,02 M de  $\text{NaBH}_4$ , manteniéndose en baño de hielo y con agitación magnética. Luego se agregaron gota a gota 2 mL de una solución 0,001 M de  $\text{AgNO}_3$ . Una vez adicionada toda la solución de la sal se detuvo el agitador y se extrajo el frasco del baño de hielo-agua[56]. Las dispersiones coloidales así obtenidas tienen

color amarillo fuerte [25]. Las NPs fueron caracterizadas por espectroscopía de UV-vis y TEM (Figura 4.4). Se observaron NPs de distintos tamaños, algunas de las cuales se encontraban en forma de agregados, posiblemente porque no se separaron adecuadamente. Además el pico de plasmones obtenido fue ancho y de baja intensidad; por lo tanto, se descartó el método.

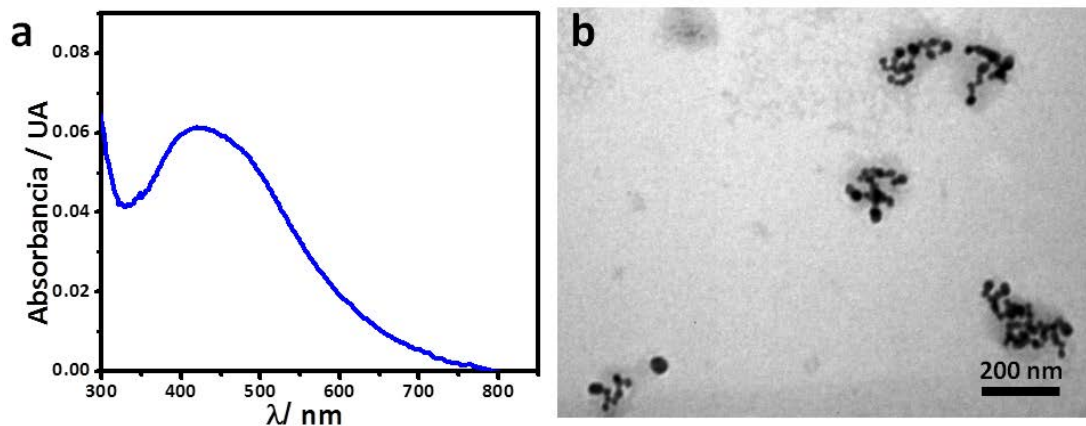


Figura 4.4. a) Espectro de UV-visible de las NPs obtenidas por reducción con borohidruro de sodio sin citrato de sodio b) Imagen de TEM de las NPs Ag obtenida en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP

#### **4.2.3.2 Métodos en presencia de iones citrato**

Estos métodos se basan en la reducción de  $\text{AgNO}_3$  con  $\text{NaBH}_4$  en presencia de iones citrato, los cuales actúan como recubrimiento de las nanopartículas, estabilizándolas por repulsión electrostática. A continuación se describirán los métodos usados.

**4.2.3.2.1 Método I:** La preparación de las nanopartículas se realizó siguiendo el protocolo de Vertelov *et al.*[57]. En un frasco de Erlenmeyer se colocaron 50 mL de una solución  $3 \times 10^{-4}$  M de citrato de sodio. Se adicionaron, gota a gota y con agitación magnética, 50 mL de una solución  $3,7 \times 10^{-5}$  M de  $\text{AgNO}_3$  y por último se agregaron, también gota a gota, 100 mL de una solución  $8,5 \times 10^{-5}$  M de  $\text{NaBH}_4$ . La mezcla se dejó agitando por unos minutos y se observó la aparición de un color amarillo tenue en la solución de síntesis. Las NPs obtenidas se caracterizaron por espectroscopía de UV-vis, observándose la ausencia de un pico de plasmones. En las imágenes de TEM se

observó una gran dispersión en el tamaño y la forma de las NPs (Figura 4.5). Asimismo se observaron impurezas, probablemente restos de los reactivos de síntesis. Por este motivo se decidió realizar modificaciones de ésta, ensayando diferentes relaciones de moles de los reactivos.

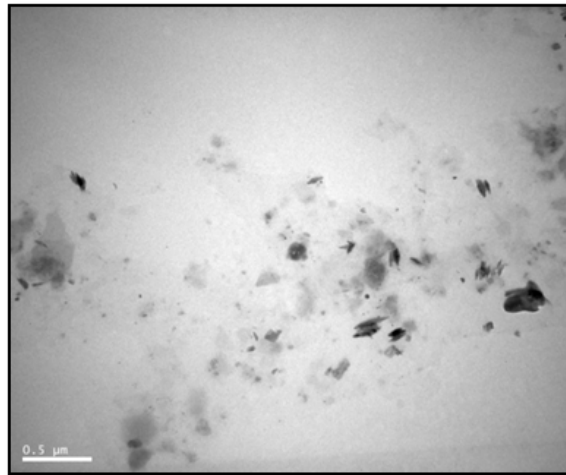


Figura 4.5. Imagen de TEM de una dispersión de NPs Ag obtenidas por el Método I ( $3 \times 10^{-4}$  M de citrato de sodio y a temperatura ambiente) tomada en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP.

**4.2.3.2.2 Método II:** La síntesis se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Schnippering *et al.* [58]. En un frasco de Erlenmeyer se colocaron 0,5 mL de una solución 0,4 M de  $\text{NaBH}_4$  y se adicionaron 50 mL de una solución  $2,5 \times 10^{-4}$  M de citrato de sodio y  $\text{AgNO}_3$  en partes iguales. La reacción se llevó a cabo a una temperatura de aproximadamente  $0^\circ\text{C}$  con agitación magnética por 10 minutos. El color final de la dispersión coloidal es amarillo tenue. Las NPs obtenidas fueron caracterizadas por espectroscopía de UV-visible y TEM. El espectro mostró un pico de plasmones doble, indicando posiblemente la presencia de dos poblaciones de NPs bien diferenciadas en tamaño (Figura 4.6). Las imágenes mostraron dispersión en tamaño y forma (Figura 4.6), por lo que se planteó la necesidad de ensayar concentraciones diferentes de los reactivos para mejorar la síntesis.



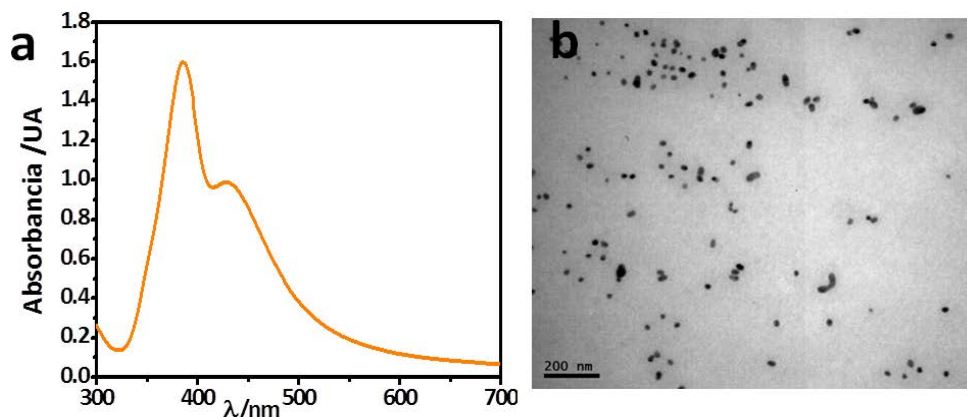


Figura 4.6. a) Espectro de UV-visible de una dispersión coloidal de las NPs Ag obtenidas mediante el Método II (con una concentración de  $2,5 \times 10^{-4}$  M de citrato de sodio y  $\text{AgNO}_3$  a  $0^\circ \text{C}$ ) diluidas a la mitad con respecto a la dispersión madre y b) Imagen de TEM de NPs Ag obtenidas mediante el mismo método tomada en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP

**4.2.3.2.3 Método III:** La síntesis se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Schnippering *et al.* [58]. La diferencia con la síntesis anterior fue que se preparó con una concentración menor del agente reductor y que se trabajó a temperatura ambiente. En un frasco de Erlenmeyer con agitación magnética se colocaron 0,6 mL de una solución 0,1 M de  $\text{NaBH}_4$  y se adicionaron 20 mL de una solución  $2,5 \times 10^{-4}$  M de citrato de sodio y  $\text{AgNO}_3$  en partes iguales. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. El color final de la dispersión coloidal fue amarillo. Las nanopartículas obtenidas se caracterizaron por espectroscopía de UV-visible y TEM. El pico de plasmones estaba definido y en aproximadamente 400 nm (Figura 4.7 a). Las imágenes mostraron nanopartículas monodispersas en tamaño y forma (Figura 4.7 b). Sin embargo, las NPs fueron estables durante un periodo relativamente corto de tiempo (un mes), a pesar de haber estado almacenadas en ausencia de luz y a  $4^\circ \text{C}$ .

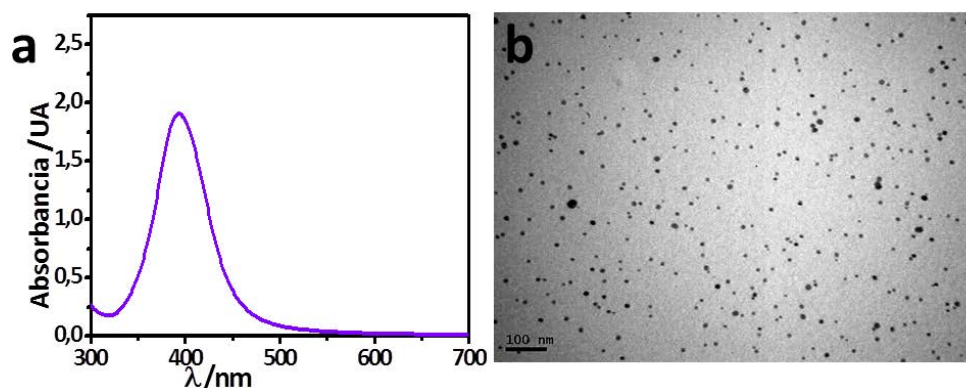


Figura 4.7. a) Espectro UV-visible de una dispersión coloidal de las NPs Ag obtenidas mediante el Método II diluidas a la mitad con respecto a la dispersión madre y b) Imagen de TEM de NPs Ag obtenidas mediante el mismo método tomada en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP

**4.2.3.2.4 Método IV:** La síntesis se realizó en colaboración con la Dra. Céline Dablemont del "Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay" (ISMO) [59]. La síntesis se realizó a una temperatura de 0°C y con una concentración elevada de agente reductor.

A 1 mL de una solución  $5 \times 10^{-3}$  M de  $\text{AgNO}_3$  se le adicionaron 16 mL de agua desionizada y 1 mL de una solución  $1,7 \times 10^{-5}$  M de citrato de sodio a 0°C y con agitación magnética. Luego se adicionaron, gota a gota, 100  $\mu\text{L}$  de una solución recién preparada 0,1M de  $\text{NaBH}_4$ . La solución, incolora al principio, adquirió un color amarillo luego de 1 hora y 45 minutos a 0°C y con agitación. La relación en moles entre citrato y  $\text{AgNO}_3$  fue de 3,4. La concentración final de las nanopartículas obtenidas es de  $3,16 \times 10^{-2}$  mg Ag/mL.

Siguiendo este método se ensayaron diferentes variaciones de la síntesis en las que se modificó la relación de moles citrato/ $\text{AgNO}_3$  (1, 2, 4 y 5). También se cambió la temperatura de trabajo (temperatura ambiente en vez de 0 °C) y la forma en la que se agregó el agente reductor (en un solo paso en vez de gota a gota). Las nanopartículas sintetizadas con las modificaciones nombradas anteriormente fueron caracterizadas por TEM, observándose una gran dispersión en tamaño y forma (Figura 4.8). Además todas las dispersiones de NPs obtenidas mediante las distintas modificaciones de la síntesis fueron estables sólo por pocos días.

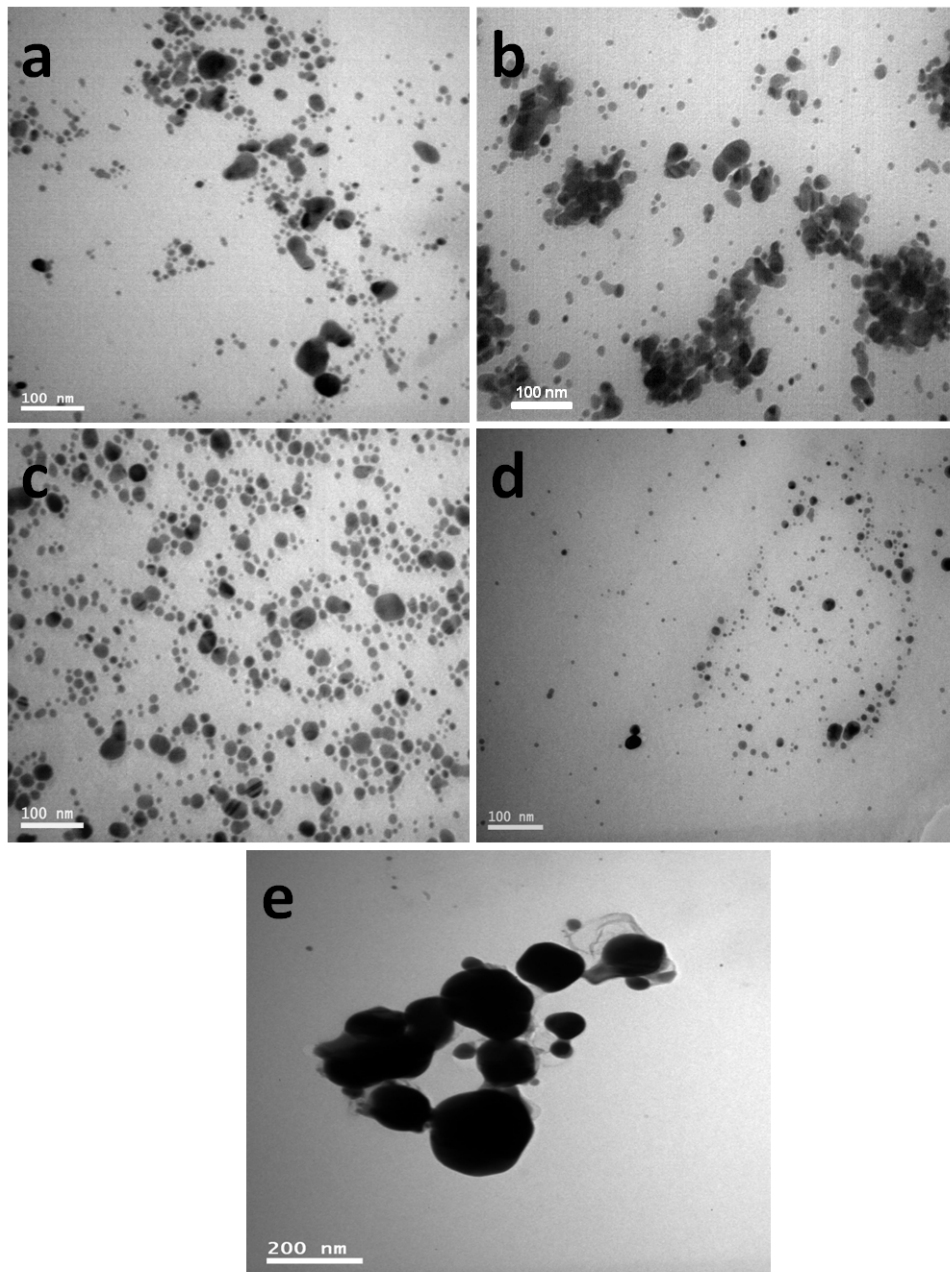


Figura 4.8. Imágenes de TEM de NPs Ag sintetizadas mediante el Método IV en presencia de iones citrato y a 0°C, bajo distintas condiciones, a) relación citrato/ AgNO<sub>3</sub>: 1, b) relación citrato/ AgNO<sub>3</sub>: 2, c) relación citrato/ AgNO<sub>3</sub>: 4, d) relación citrato/ AgNO<sub>3</sub>: 5 y e) agregado del NaBH<sub>4</sub> en un solo paso. Todas las imágenes se realizaron en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP

De todas las síntesis llevadas a cabo se seleccionó aquella realizada con una relación de moles de citrato y AgNO<sub>3</sub> igual a 3,4, a una temperatura de 0°C y agregando el NaBH<sub>4</sub> gota a gota, ya que las NPs obtenidas fueron las que presentaron

mayor estabilidad y fueron más monodispersas (Figura 4.9 y 4.10). El color de la dispersión coloidal de NPs fue amarillo fuerte.

Las nanopartículas obtenidas en las condiciones elegidas de concentración y temperatura fueron caracterizadas por espectroscopía de UV-visible y TEM. El espectro de UV-visible mostró el pico de plasmones superficiales bien definido en aproximadamente 400 nm (Figura 4.9). Las imágenes de TEM mostraron NPs monodispersas en tamaño y forma, sin la presencia de aglomerados. Las imágenes fueron analizadas con el software Digital Micrograph para determinar de manera individual el diámetro de las NPs. Con los datos obtenidos se construyó un histograma y se analizó la distribución del tamaño de las NPs. El diámetro promedio fue de  $6 \pm 2$  nm, con una distribución normal (Figura 4.10 b). Las mismas NPs fueron analizadas tres semanas después de la síntesis, mostrando un ligero aumento en el diámetro promedio (diámetro promedio  $8 \pm 2,4$  nm) debido a efectos de “*coarsening*” (aumento del tamaño de las NPs) (Figura 4.10 c). Las NPs Ag resultaron ser estables durante meses. De todos los métodos descritos, éste fue el de mayor éxito.

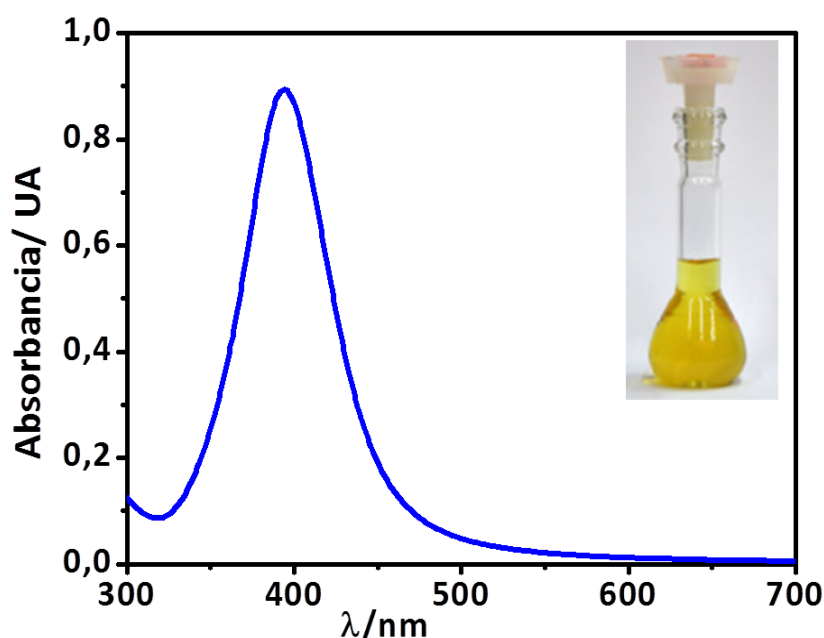


Figura 4.9. Espectro de UV-visible de una dispersión de NPs Ag sintetizadas por el método IV (se realizó una dilución 1 en 4 con respecto a la dispersión madre)

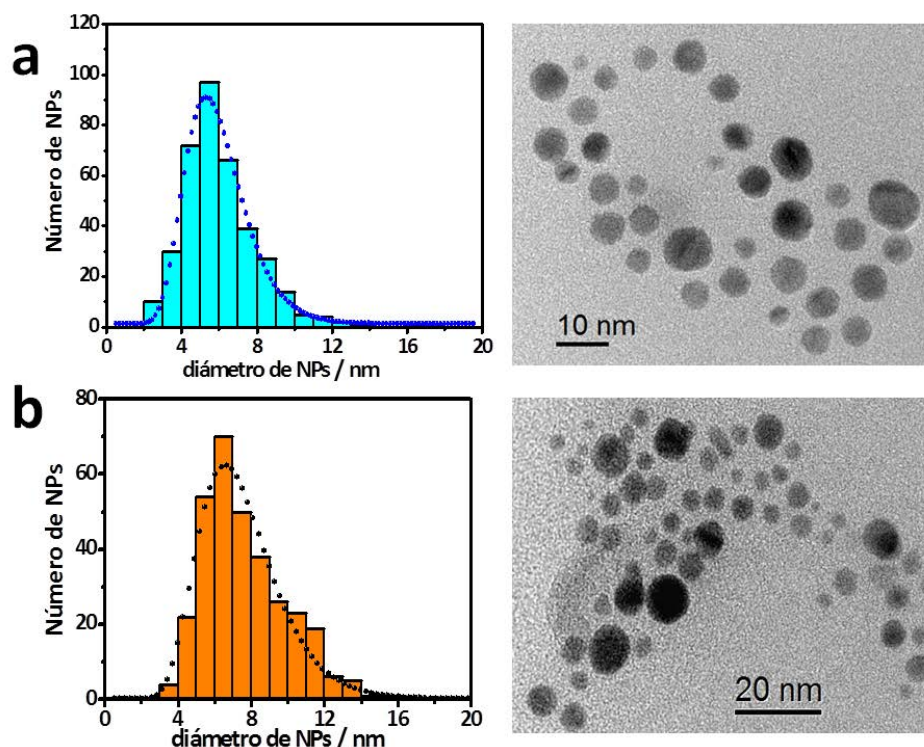


Figura 4.10 a) Imagen de TEM de NPs recién sintetizadas junto con su histograma de distribución de tamaños y b) Imagen de TEM de NPs con tres semanas de envejecimiento junto con su histograma de distribución de tamaños. Colaboración con el Dr. M. S. Moreno del Centro Atómico Bariloche.

A fin de establecer si las NPs Ag eran metálicas se realizaron en primer lugar medidas de XPS (ver Capítulo 6). Dado que no es posible establecer fácilmente una distinción entre  $\text{Ag}^0$  y óxidos de Ag, mediante esta técnica se determinó la composición de las NPs Ag preparadas mediante el análisis de imágenes de alta resolución de TEM por FFT (transformada de Fourier) y por difracción de rayos X asociada a la medida de TEM. En el análisis por FFT se midieron las distancias características en el espacio recíproco y se compararon con los patrones de difracción de rayos X obtenidos de la literatura (Joint Committee on Powder Diffraction Standards - JCPDS file no. 04-0783). Los valores obtenidos por FFT fueron congruentes con los patrones de difracción, dando como resultado que las NPs preparadas eran de Ag metálica, con una red cristalina cúbica centrada en las caras (FCC). Con los resultados de difracción de rayos X se obtuvieron los mismos resultados (Figura 4.11). Por lo tanto con ambos análisis se concluyó que las NPs Ag preparadas eran de Ag metálica.

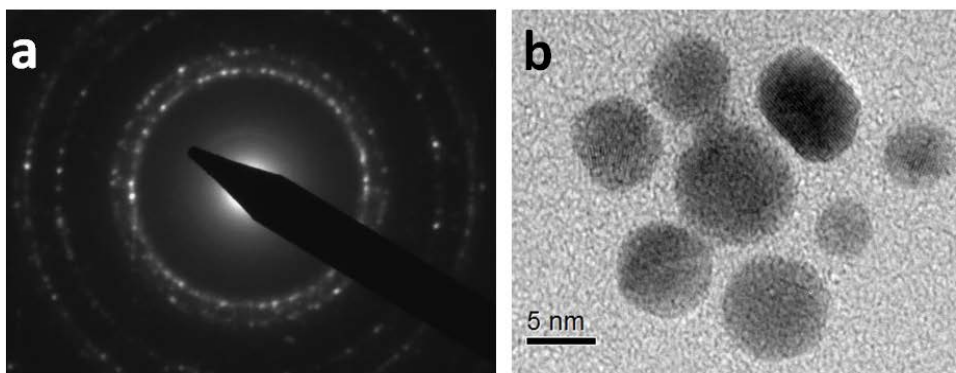


Figura 4.10 a) Imagen de difracción de rayos X de NPs Ag y b) Imagen de TEM de NPs Ag a la cual se realizo una FFT (colaboración con el Dr. M. S. Moreno del Centro Atómico Bariloche).

En la Tabla 3.1, se muestra un resumen de los métodos usados en esta sección remarcando aquel que tuvo éxito y que fue usado para los siguientes ensayos.

Tabla 1. Resumen de los métodos ensayados usando  $\text{NaBH}_4$  como reductor y en presencia de iones citrato

Método	Temperatura	Moles usados			Relación citrato/Ag
		Citrato de Na	$\text{AgNO}_3$	$\text{NaBH}_4$	
I	Ambiente	$1,55 \times 10^{-5}$	$1,85 \times 10^{-6}$	$8,5 \times 10^{-6}$	8,4
II	$0^\circ\text{C}$	$1,25 \times 10^{-5}$	$1,25 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-4}$	1
III	Ambiente	$5 \times 10^{-6}$	$5 \times 10^{-6}$	$6 \times 10^{-5}$	1
IV	$0^\circ\text{C}$	$1,7 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$	3,4
		$5 \times 10^{-6}$	$5 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$	1
		$8 \times 10^{-6}$	$4 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$	2
		$20 \times 10^{-6}$	$5 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$	4
		$25 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$	5
		$1,7 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$ rápido	3,4

## 4.4 Conclusiones

Las condiciones experimentales son críticas para la adecuada síntesis de nanopartículas de plata. De todas las dispersiones obtenidas en diferentes condiciones (temperatura, concentración de  $\text{NaBH}_4$  y citrato, ausencia de citrato, relación en

moles de citrato y  $\text{AgNO}_3$ ), las que presentaron mayor estabilidad y monodispersión en tamaño y forma fueron aquellas sintetizadas a  $0\text{ }^\circ\text{C}$  y con una relación de citrato/Ag igual a 3,4 (método IV). Las NPs Ag así obtenidas están recubiertas con iones citrato, los cuales evitan que éstas se aglomeren y precipiten gracias a las interacciones repulsivas entre cargas negativas [60]. La composición de las NPs fue de Ag metálica ya que fueron consistentes con una red cristalina cúbica centrada en las caras de Ag metálica. Estas NPs Ag se utilizaron para modificar superficies de Ti, unos de los biomateriales más usados en implantes. Esta parte del trabajo se describirá en los próximos capítulos.

## Referencias bibliográficas

1. Klabunde, K.J. y Richards, R., *Nanoscale materials in chemistry*, Vol. 1035. 2001, Wiley Online Library.
2. Khanna, P.K., Singh, N., Kulkarni, D., Deshmukh, S., Charan, S. y Adhyapak, P.V., Water based simple synthesis of re-dispersible silver nano-particles, *Materials Letters*, 2007, (61), 3366-3370.
3. Leopold, N. y Lendl, B., A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2003, (107), 5723-5727.
4. Nishino, J. y Kanno, Y., An Influence of Concentration of Polyvinylpyrrolidone on the Morphology of Silver Metal Formed from AgNO<sub>3</sub> Aqueous Solution, *Journal of Nanomaterials*, 2008, (2008).
5. Panáček, A., Kvítek, L., Pucek, R., Kolář, M., Večeřová, R., Pizúrová, N., Sharma, V.K., Nevěčná, T.j. y Zbořil, R., Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006, (110), 16248-16253.
6. Pastoriza-Santos, I. y Liz-Marzán, L.M., Synthesis of Silver Nanoprisms in DMF, *Nano Letters*, 2002, (2), 903-905.
7. Chen, D.H. y Huang, Y.W., Spontaneous Formation of Ag Nanoparticles in Dimethylacetamide Solution of Poly(ethylene glycol), *Journal of Colloid and Interface Science*, 2002, (255), 299-302.
8. Reetz, M.T. y Helbig, W., Size-Selective Synthesis of Nanostructured Transition Metal Clusters, *Journal of the American Chemical Society*, 1994, (116), 7401-7402.
9. Becker, J.A., Schafer, R., Festag, R., Ruland, W., Wendorff, J.H., Pebler, J., Quaiser, S.A., Helbig, W. y Reetz, M.T., Electrochemical growth of superparamagnetic cobalt clusters, *The Journal of Chemical Physics*, 1995, (103), 2520-2527.
10. Ma, H., Yin, B., Wang, S., Jiao, Y., Pan, W., Huang, S., Chen, S. y Meng, F., Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles by a Novel Electrochemical Method, *ChemPhysChem*, 2004, (5), 68-75.
11. Huiying Jia , W.X., Jing Ana, Dongmei Li , Bing Zhaoa, A simple method to synthesize triangular silver nanoparticles by light irradiation, *Spectrochimica Acta Part A* 2006, (64 ), 956–960.
12. Nelson Durán, P.D.M., Oswaldo L Alves, Gabriel I.H. De Souza y Elisa Esposito, Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several Fusarium oxysporum strain, *Journal of Nanobiotechnology*, 2005, ( 3), 1-7.
13. Evanoff, D.D. y Chumanov, G., Synthesis and Optical Properties of Silver Nanoparticles and Arrays, *ChemPhysChem*, 2005, (6), 1221-1231.
14. Faraday, M., The Bakerian lecture: experimental relations of gold (and other metals) to light, *Philos. Trans. R. Soc. ,* 1857, ( 147).



15. J. Turkevich, P.C.S., J. Hillier, The nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold (or is it coagulation of colloidal gold?), *Disc. Faraday Soc.*, 1951, (11), 55–75.
16. Reiss, H. y La Mer, V.K., Diffusional boundary value problems involving moving boundaries, connected with the growth of colloidal particles, *The Journal of Chemical Physics*, 1950, (18), 1-12.
17. La Mer, V.K., Inn, E.C.Y. y Wilson, I.B., The methods of forming, detecting, and measuring the size and concentration of liquid aerosols in the size range of 0.01 to 0.25 microns diameter, *Journal of Colloid Science*, 1950, (5), 471-496.
18. Watzky, M.A. y Finke, R.G., Transition Metal Nanocluster Formation Kinetic and Mechanistic Studies. A New Mechanism When Hydrogen Is the Reductant: Slow, Continuous Nucleation and Fast Autocatalytic Surface Growth, *Journal of the American Chemical Society*, 1997, (119), 10382-10400.
19. Cushing, B.L., Kolesnichenko, V.L. y O'Connor, C.J., Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles, *Chemical Reviews*, 2004, (104), 3893-3946.
20. Burda, C., Chen, X., Narayanan, R. y El-Sayed, M.A., Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes, *Chemical Reviews*, 2005, (105), 1025-1102.
21. Schmid, G., *Nanoparticles: From Theory to Application*. 2004, Wiley.
22. Johans, C., Clohessy, J., Fantini, S., Kontturi, K. y Cunnane, V.J., Electrosynthesis of polyphenylpyrrole coated silver particles at a liquid–liquid interface, *Electrochemistry Communications*, 2002, (4), 227-230.
23. Jana, N.R., Gearheart, L. y Murphy, C.J., Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio, *Chemical Communications*, 2001, (0), 617-618.
24. Raveendran, P., Fu, J. y Wallen, S.L., Completely “Green” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society*, 2003, (125), 13940-13941.
25. Lee, P.C. y Meisel, D., Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols, *The Journal of Physical Chemistry*, 1982, (86), 3391-3395.
26. Creighton, J.A., Blatchford, C.G. y Albrecht, M.G., Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, 1979, (75), 790-798.
27. Malinsky, M.D., Kelly, K.L., Schatz, G.C. y Van Duyne, R.P., Chain Length Dependence and Sensing Capabilities of the Localized Surface Plasmon Resonance of Silver Nanoparticles Chemically Modified with Alkanethiol Self-Assembled Monolayers, *Journal of the American Chemical Society*, 2001, (123), 1471-1482.
28. Zhang, W., Qiao, X., Chen, J. y Chen, Q., Self-assembly and controlled synthesis of silver nanoparticles in SDS quaternary microemulsion, *Materials Letters*, 2008, (62), 1689-1692.
29. Chen, M., Wang, L.-Y., Han, J. T., Zhang, J.-Y., Li, Z.-Y. y Qian, D. J., Preparation and Study of Polyacryamide-Stabilized Silver Nanoparticles through a One-Pot Process, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006, (110), 11224-11231.

30. Esumi, K., Hosoya, T., Suzuki, A. y Torigoe, K., Formation of Gold and Silver Nanoparticles in Aqueous Solution of Sugar-Persubstituted Poly(amidoamine) Dendrimers, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2000, (226), 346-352.
31. Crooks, R.M., Zhao, M., Sun, L., Chechik, V. y Yeung, L.K., Dendrimer-Encapsulated Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications to Catalysis, *Accounts of Chemical Research*, 2000, (34), 181-190.
32. Murphy, C.J., Sau, T.K., Gole, A.M., Orendorff, C.J., Gao, J., Gou, L., Hunyadi, S.E. y Li, T., Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2005, (109), 13857-13870.
33. Maillard, M., Giorgio, S. y Pileni, M. P., Tuning the Size of Silver Nanodisks with Similar Aspect Ratios: Synthesis and Optical Properties, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2003, (107), 2466-2470.
34. Sun, Y., Yin, Y., Mayers, B.T., Herricks, T. y Xia, Y., Uniform Silver Nanowires Synthesis by Reducing AgNO<sub>3</sub> with Ethylene Glycol in the Presence of Seeds and Poly(Vinyl Pyrrolidone), *Chemistry of Materials*, 2002, (14), 4736-4745.
35. Zhang, J., Han, B., Liu, M., Liu, D., Dong, Z., Liu, J., Li, D., Wang, J., Dong, B., Zhao, H. y Rong, L., Ultrasonication-Induced Formation of Silver Nanofibers in Reverse Micelles and Small-Angle X-ray Scattering Studies, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2003, (107), 3679-3683.
36. Chen, S. y Carroll, D.L., Synthesis and Characterization of Truncated Triangular Silver Nanoplates, *Nano Letters*, 2002, (2), 1003-1007.
37. Nehl, C.L., Liao, H. y Hafner, J.H., Optical Properties of Star-Shaped Gold Nanoparticles, *Nano Letters*, 2006, (6), 683-688.
38. Menon, S.C., Singh, H.B., Patel, R.P., Das, K. y Butcher, R.J., Synthesis and Reactivity of Chiral Tellurium Azomethines: Pseudopolymorphism of [o-(((1S,2R)-2-Hydroxy-2-phenyl-1-methylethylamino)methinyl)phenyl]tellurium(IV) Bromide, *Organometallics*, 1997, (16), 563-571.
39. Wang, T.C., Rubner, M.F. y Cohen, R.E., Polyelectrolyte Multilayer Nanoreactors for Preparing Silver Nanoparticle Composites: Controlling Metal Concentration and Nanoparticle Size, *Langmuir*, 2002, (18), 3370-3375.
40. Malynych, S.Z. y Chumanov, G., Vacuum deposition of silver island films on chemically modified surfaces, *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 2003, (21), 723-727.
41. Mafuné, F., Kohno, J.-y., Takeda, Y., Kondow, T. y Sawabe, H., Structure and Stability of Silver Nanoparticles in Aqueous Solution Produced by Laser Ablation, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2000, (104), 8333-8337.
42. Abid, J.P., Wark, A.W., Brevet, P.F. y Girault, H.H., Preparation of silver nanoparticles in solution from a silver salt by laser irradiation, *Chemical Communications*, 2002, 792-793.
43. Kotov, N.A., Zaniquelli, M.E.D., Meldrum, F.C. y Fendler, J.H., Two-dimensional silver electrocrystallization under monolayers spread on aqueous silver nitrate, *Langmuir*, 1993, (9), 3710-3716.
44. Ahmad, A., Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Khan, M.I., Kumar, R. y Sastry, M., Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2003, (28), 313-318.

45. Shankar, S.S., Ahmad, A. y Sastry, M., Geranium Leaf Assisted Biosynthesis of Silver Nanoparticles, *Biotechnology Progress*, 2003, (19), 1627-1631.
46. Eustis, S. y El-Sayed, M.A., Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes, *Chemical Society Reviews*, 2006, (35), 209-217.
47. Willets, K.A. y Van Duyne, R.P., Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing, *Annual Review of Physical Chemistry*, 2007, (58), 267-297.
48. Xia, Y. y Campbell, D.J., Plasmons: Why Should We Care?, *Journal of Chemical Education*, 2007, (84), 91.
49. Sepúlveda, B., Angelomé, P.C., Lechuga, L.M. y Liz-Marzán, L.M., LSPR-based nanobiosensors, *Nano Today*, 2009, (4), 244-251.
50. Moores, A. y Goettmann, F., The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications, *New Journal of Chemistry*, 2006, (30), 1121-1132.
51. Gutierrez, M. y Henglein, A., Formation of colloidal silver by "push-pull" reduction of silver(1+), *The Journal of Physical Chemistry*, 1993, (97), 11368-11370.
52. Kamat, P.V., Photophysical, Photochemical and Photocatalytic Aspects of Metal Nanoparticles, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2002, (106), 7729-7744.
53. Yin, Y., Li, Z.-Y., Zhong, Z., Gates, B., Xia, Y. y Venkateswaran, S., Synthesis and characterization of stable aqueous dispersions of silver nanoparticles through the Tollens process, *Journal of Materials Chemistry*, 2002, (12), 522-527.
54. Mulfinger, L., Solomon, S.D., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A.V., Rutkowsky, S.A. y Boritz, C., Synthesis and Study of Silver Nanoparticles, *Journal of Chemical Education*, 2007, (84), 322.
55. Van Hying, D.L. y Zukoski, C.F., Formation Mechanisms and Aggregation Behavior of Borohydride Reduced Silver Particles, *Langmuir*, 1998, (14), 7034-7046.
56. Fang, Y., Optical absorption of nanoscale colloidal silver: Aggregate band and adsorbate-silver surface band, *The Journal of Chemical Physics*, 1998, (108), 4315-4318.
57. Vertelov, G.K., Yu, A.K., Efremenkova, O.V., Olenin, A.Y. y Lisichkin, G.V., A versatile synthesis of highly bactericidal Myramistin® stabilized silver nanoparticles, *Nanotechnology*, 2008, (19), 355707.
58. Schnippering, M., Carrara, M., Foelske, A., Kotz, R. y Fermin, D.J., Electronic properties of Ag nanoparticle arrays. A Kelvin probe and high resolution XPS study, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2007, (9), 725-730.
59. Flores, C.Y., Diaz, C., Rubert, A., Benítez, G.A., Moreno, M.S., Fernández Lorenzo de Mele, M.A., Salvarezza, R.C., Schilardi, P.L. y Vericat, C., Spontaneous adsorption of silver nanoparticles on Ti/TiO<sub>2</sub> surfaces. Antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010, (350), 402-408.
60. Pillai, Z.S. y Kamat, P.V., What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method?, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2003, (108), 945-951.

# Capítulo 5

## Efecto de las nanopartículas de Ag sobre bacterias planctónicas

### 5.1 Introducción

La necesidad de nuevos agentes microbicidas debido a la alta incidencia a infecciones microbianas y a la creciente resistencia a los antibióticos convencionales han generado el desarrollo de nuevas estrategias para disminuir la colonización de los microorganismos. Dentro de éstas han surgido las NPs Ag como una posible solución ante estos problemas de resistencia, así como también para reducir la incidencia de las infecciones. Como se ha mencionado en capítulos anteriores, la capacidad microbicida de la Ag se conoce desde tiempos antiguos, en los que las sales de Ag eran usadas cotidianamente para realizar cuidados paliativos para infecciones o para potabilizar agua. La capacidad microbicida de la Ag se ha evaluado sobre diversos microorganismos, tales como *E. coli* [1, 2], *P. aeruginosa* [3, 4], *S. aureus* [5], *Vibrio Chloreae*[6], *Enterobacter cloacae* [5], *Candida albicans* [6], *S. epidermidis*, *S. epidermidis resistente a meticilina* y *S. aureus resistente a meticilina* [7]. En la actualidad se han empezado a utilizar las NPs Ag en diferentes aplicaciones médicas,

entre ellas en soluciones tópicas o bien inmovilizadas en dispositivos médicos (catéteres, barbijos, vendas) [8] con el objetivo de reducir la actividad de numerosos microorganismos. Un punto importante a tener en cuenta en estos tratamientos es la potencial toxicidad de las NPs Ag, por lo que es necesario determinar la cantidad de NPs Ag a emplear, de modo de erradicar o disminuir la carga de microorganismos sin generar daños adversos en el hombre.

Como se mencionó en el Capítulo 3, entre los parámetros utilizados para evaluar la capacidad antimicrobiana de un determinado agente, los más adecuados son la CMB y la CMI. Se ha informado una amplia variedad de valores de dichos parámetros para las NPs Ag, dependiendo de factores tales como tamaño, recubrimiento, etc. Por ejemplo, Bryaskova *et al.* utilizaron NPs Ag recubiertas con PVP con un diámetro de 9 a 16 nm, encontrando un valor de CMB de 15 µg/mL para *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus*, determinado mediante halo de inhibición [9]. Además, hallaron un valor fungicida de 30 µg/mL para diversas *Candida spp* [9]. Sin embargo, utilizando el mismo método para determinar la CMB, Ruparelia *et al.* informaron valores superiores de CMB (60 y 120 µg/mL para *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente) para NPs Ag de diámetro menor a las mencionadas anteriormente [10]. La discrepancia de estos valores podría deberse tanto a la diferencia de los tamaños de las NPs como al recubrimiento de las NPs. A diferencia de los trabajos anteriores empleando el método de dilución en caldo, Greulich *et al.* utilizando NPs Ag-PVP (igual recubrimiento a las Bryaskova) informaron valores de CMB de 50 µg/mL para cepas similares a las ensayadas anteriormente (*E. coli* y *S. aureus*) [11]. Asimismo, Martínez-Castañón *et al.* determinaron la CMI de NPs Ag recubiertas con ácido gálico de tres tamaños distintos (7, 29 y 89 nm) mediante diluciones en caldo. Los valores encontrados fueron de 6,25 a 11,8 µg/mL para *E. coli* y 7,5 a 33,7 µg/mL para *S. aureus*[12]. Esto nos demuestra que hay varios factores (recubrimiento, tamaño, tipo de ensayo, etc) a tener en cuenta para realizar una comparación exhaustiva de los valores microbicidas de las NPs.

Actualmente, los mecanismos de la acción bactericida, tanto de iones Ag(I) como de NPs Ag, no han sido dilucidados por completo [13-15], aunque sí se sabe que en el último caso están involucrados los iones Ag(I) liberados por las mismas. Al respecto se han postulado varios mecanismos de acción basados en diferentes tipos de

interacción entre la célula y la plata (ya sea en forma de iones o como NPs), los que se mencionan a continuación:

- (i) Interacción con la *pared celular bacteriana*: es el primer punto de ataque de las NPs Ag, ya que al interactuar con la pared bacteriana pueden internalizarse las NPs generando daños por estrés oxidativo y al interactuar con proteínas y ADN bacteriano, además de una acumulación de Ag en el interior de la célula, afectando su permeabilidad y conduciendo a la muerte celular [15]. Se ha demostrado que los iones Ag(I) causan cambios morfológicos en la pared celular que ocasiona la separación de la membrana plasmática tanto en bacterias Gram (+) como Gram (-) [3, 16-18]. Por otro lado, las NPs al unirse a la membrana plasmática, cambian su permeabilidad provocando un desequilibrio en la bomba de ATP (adenosina trifosfato) y en el gradiente de protones, generando una disipación de la fuerza protón-motriz, además de desacoplar la cadena transporte de electrones por inhibición de las enzimas involucradas en la cadena y finalmente conducen a la muerte celular [3, 18]. De manera similar, se han relacionado también los iones Ag(I) con el colapso de la fuerza protón-motriz y la desestabilización de la membrana celular, aunque las concentraciones a las que éste se produce son mucho más altas que las NPs Ag [19]. En el caso de las bacterias Gram (-) se observó mediante TEM que las NPs Ag provocan la pérdida de la integridad de la membrana y, en consecuencia, la lisis de la bacteria. Este efecto resultó ser menos marcado en el caso de bacterias Gram (+), lo que podría deberse a que la pared de la capa de peptidoglicano, de mayor espesor que la correspondiente a las Gram (-), impide que haya una fuerte interacción con la membrana [20, 21]. Este efecto también se observó al realizar tratamientos con iones Ag(I) [16, 17]. Sin embargo, Choi *et al.* no observaron pérdida de la integridad de la membrana debida a la presencia de las NPs Ag [22]. La discrepancia entre estos resultados podría atribuirse a diferentes factores, tales como la forma y el tamaño de las NPs, su recubrimiento, la concentración de NPs, las cepas bacterianas usadas o los métodos usados para la determinación de la acción bactericida. Otro de los mecanismos propuestos involucra la formación de poros o "huecos" en la membrana de las bacterias. Esto fue propuesto por Sondi

*et al.*, quienes estudiaron mediante TEM y SEM la adhesión de las NPs y la posterior formación de poros o “agujeros” sobre la pared celular de *E. coli*, demostrando cómo las NPs causan la pérdida de integridad de la pared y la posterior muerte de la bacteria [2]. Otros autores observaron la misma interacción entre NPs y pared celular mediante microscopía electrónica en Gram (-) [17, 23] y Gram (+) [24]. En el caso de las bacterias Gram (+), Mirzajani *et al.*, quienes postularon que las NPs Ag destruyen los enlaces  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 glicosídicos que conectan los bloques de construcción del peptidoglicano N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico de la pared celular [24]. Tal efecto produciría la liberación de dichos bloques de construcción al medio y esto estaría corroborado por el aumento en la concentración de ácido murámico en el medio de sostén que contenía a las NPs. Sin embargo, otros autores han asegurado que la interacción entre NPs y la pared celular es generada por fuerzas electrostáticas y ocasiona la pérdida de integridad de la misma y la posterior muerte celular [17, 25].

- (ii) *Interacción con ADN, enzimas y proteínas citoplasmáticas:* como ya se ha mencionado, una vez que las NPs Ag ingresan a la célula pueden interactuar con el ADN, proteínas y enzimas. Al respecto se ha encontrado la presencia de ADN condensado en el citoplasma de *S. aureus* [26] luego de la exposición a NPs Ag. En primer lugar, es de conocimiento que el ADN bacteriano se encuentra condensado formando el nucleoide. Sin embargo, para llevarse a cabo la replicación del ADN de una bacteria y su posterior división celular, el ADN debe “relajarse” para permitir la síntesis del mismo. Ante una situación desfavorable o de estrés, como la presencia de las NPs, el ADN se protege plegándose sobre sí mismo y no permite su replicación y la posterior división celular. Este comportamiento fue observado para *E. coli* [16] y *S. aureus* [22] ante la presencia de iones Ag(I). Por otra parte se han encontrado evidencias de la interacción de iones Ag(I) con ADN, la cual genera cambios en la conformación de la hélice [27] e interacción con bases de guanina y adenina [28]. Se ha demostrado también que la presencia de NPs Ag provoca una disminución de la actividad de la enzima deshidrogenasa, que forma parte de la cadena respiratoria, produciendo la inhibición de la respiración celular en *E. coli* [23] y *S. aureus* [26]. Asimismo, la ausencia de un gradiente de protones y fosfatos

generada por la inhibición de la cadena respiratoria ocasionan una influencia negativa en la síntesis correcta de proteínas que forman la membrana y pared celular, ya que no permiten la translocación y maduración de estas proteínas [18]. Por otra parte, los iones Ag(I) son capaces de interactuar con los grupos tiol presentes en las proteínas, provocando la inactivación de enzimas [29, 30]. Otros trabajos han demostrado la inhibición de la actividad de la enzima fumarasa por la formación de “clusters” de Ag-S (S de la cisteína) desplazando al cofactor de la enzima Fe –S [31]. Uno de los ejemplos más notables de interacción fue demostrado por Bragg *et al.*, quienes estudiaron la interacción Ag–S en la enzima nicotinamida adenina dinucleotido deshidrogenasa (NADH)[32], encontrando que esta interacción genera un desacoplamiento de la cadena respiratoria y posterior muerte celular. De manera similar, se ha propuesto que la interacción entre las NPs Ag y la membrana celular podría deberse a la formación de enlaces Ag–S entre grupos de las proteínas de membrana y las NPs, ocasionando daño en la membrana e interfiriendo en las funciones estas proteínas [3].

- (iii) *Interacciones que provocan la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS):* Las ROS son productos generados normalmente durante el proceso de respiración celular, que incluyen al oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno, radicales superóxidos e hidroxilos. La célula posee un mecanismo que controla a las especies ROS, denominado defensa antioxidante. Sin embargo, ante una situación de estrés la concentración de estas ROS aumenta rápidamente, causando daños a lípidos y ADN. La presencia de trazas de iones Ag(I) es capaz de generar radicales libres en *E. coli* y *S. aureus* [21]. En este sentido, varios autores han estudiado la capacidad de los iones Ag(I) para generar grandes concentraciones de especies superóxido en *E. coli* y *S. aureus* mediante una enzima superoxidasa [33, 34]. Además, Choi *et al.* demostraron la presencia de especies ROS cuando las bacterias fueron tratadas con iones Ag(I), AgCl y NPs Ag [35]. Cualquiera de los mecanismos propuestos por los diferentes autores, las NPs ocasionan la lisis celular y su posterior muerte, asegurándonos la presencia de un efecto bactericida.

En este capítulo se analizará el efecto de las NPs Ag en suspensión sobre las



bacterias planctónicas *P. aeruginosa* y *S. aureus* con el objetivo de encontrar un rango de concentraciones en el que las NPs sean capaces de erradicar estos microorganismos sin causar daño a células eucariotas (ver Capítulo 8).

## 5.2 Evaluación de la capacidad bactericida de las NPs Ag en suspensión sobre *P. aeruginosa* y *S. aureus*

Los métodos aquí empleados para la determinación de la concentración bactericida mínima de las NPs Ag fueron adoptados de los protocolos que se usan cotidianamente para antibióticos y que han sido descritos en el Capítulo 3.

### 5.2.1 Halo de inhibición

En el presente trabajo se utilizó el método de halo de inhibición como una primera aproximación para evaluar la capacidad bactericida de las NPs preparadas en el laboratorio [36]. Los resultados del ensayo se muestran en la Figura 5.1, en la que se puede observar la presencia de un halo de inhibición alrededor del disco embebido con NPs Ag y colocado en la placa de ágar sembrado con *P. aeruginosa*. El diámetro del mismo fue 0,4 cm mayor que el diámetro del disco. Este resultado dio indicios acerca de la actividad de las NPs Ag como agente microbicida.

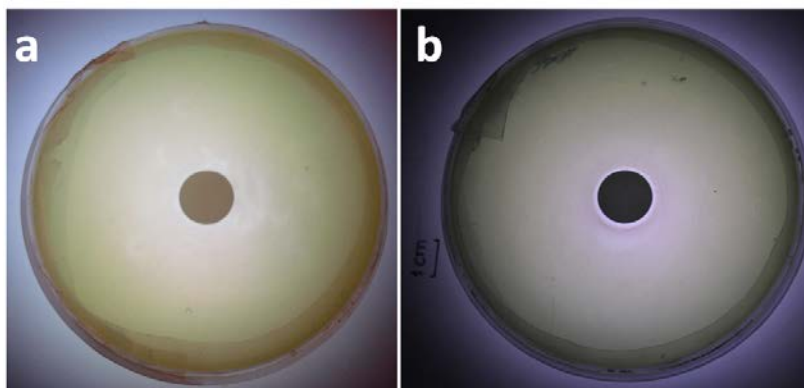


Figura 5.1. Método del halo de inhibición para *P. aeruginosa*. a) Ensayo control: no se observó halo de inhibición en el caso de un disco de papel de filtro embebido con agua desionizada estéril b) Imagen del halo de inhibición formado alrededor de un disco de papel de filtro embebido con NPs Ag.

### 5.2.2 Concentración mínima bactericida

Con el objetivo de determinar la CMB de NPs Ag para ambas cepas, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, se diseñó un experimento en el que las NPs Ag se agregaron a un medio de cultivo conteniendo una determinada cantidad de bacterias. Mediante recuento en placa se evaluó el número de UFC/mL remanentes luego de 24 hs de tratamiento. La concentración mínima bactericida (CMB) fue definida en el Capítulo 3 (sección 3) como la mínima concentración de un agente capaz de eliminar el 99,9 % de las bacterias luego de 24 hs de tratamiento. Este parámetro permite cuantificar la acción bactericida del agente de una manera más precisa que en el caso del halo de inhibición [37], por lo que se determinó su valor para las NPs Ag preparadas en el laboratorio

En primer lugar se evaluó la estabilidad de las NPs Ag en el caldo nutritivo. Para ello se agregó una alícuota de la suspensión de NPs Ag al caldo nutritivo estéril, de manera de alcanzar una concentración final de Ag igual a 61,5  $\mu\text{M}$  (expresada como concentración de Ag total). Se observó que las nanopartículas no son estables en ese medio. Este hecho se evidenció a simple vista a través del cambio de color del caldo y la aparición de sedimento y se corroboró mediante espectroscopía de UV-visible (Figura 5.2). En el espectro se observa un aumento del ancho del pico, un corrimiento en la longitud de onda de pico y una baja intensidad de la absorbancia del pico de plasmones comparado con los espectros obtenidos en agua. Este comportamiento se acentuó después de 24 hs (Figura 5.2). Se obtuvieron resultados similares al utilizar caldos *Mueller Hinton* y *Luria-Bertani* (no se muestran aquí los datos). Esto indica que los medios de cultivo convencionales (o caldos) no son adecuados para llevar a cabo estos ensayos. Como alternativa se agregaron las NPs Ag preparadas a una solución de buffer fosfato a pH 7 y se agregó una alícuota de bacterias con una concentración  $1 \times 10^7$  UFC/mL en esta solución. Para conocer la estabilidad de las NPs en buffer fosfato se realizó un espectro de esta solución sin el agregado de bacterias. En la Figura 5.3 se muestra el espectro de las NPs Ag en buffer fosfato, donde se puede apreciar que el correspondiente pico de plasmones es similar al de las NPs Ag en agua. Una vez establecido que las NPs Ag no precipitan ni se aglomeran en buffer fosfato se realizaron los experimentos para determinar la capacidad microbicida de las NPs. Para

ello, se agregaron  $1 \times 10^7$  UFC/mL de *P. aeruginosa* o *S. aureus* al buffer fosfato que contenía una concentración determinada de NPs. Luego de 4 hs de exposición, se realizó el recuento en placa de las bacterias viables.

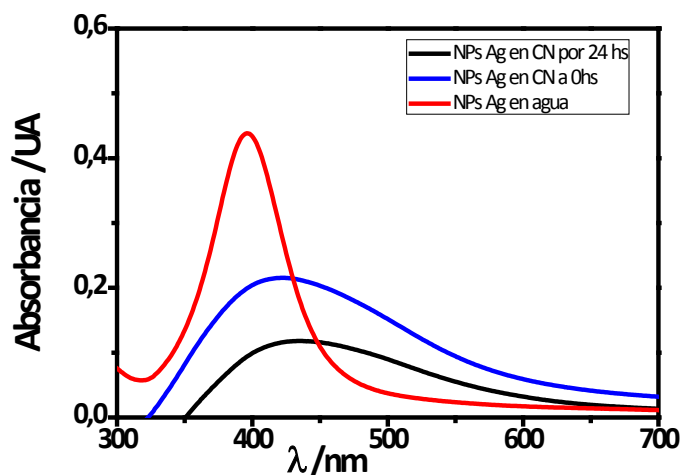


Figura 5.2. Espectro de UV-visible de las NPs Ag en agua y en caldo nutritivo (CN) inmediatamente después del agregado de las NPs (0 hs) y luego de 24 hs. La concentración final de NPs Ag fue de  $61,5 \mu\text{M}$  (expresada como Ag).

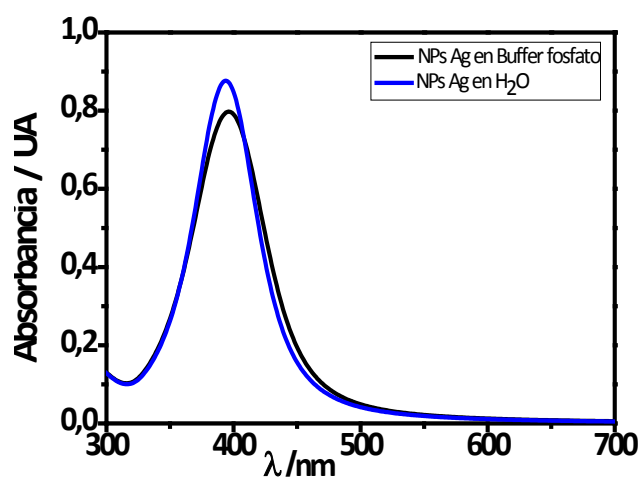


Figura 5.3. Espectros de UV-visible de las NPs Ag en agua y en buffer fosfato con una concentración final  $75 \mu\text{M}$  (expresada como concentración de Ag).

Para realizar el ensayo con buffer fosfato se eligió un tiempo de 4 hs porque éste es un medio de sostén provisorio que no posee los nutrientes necesarios para que las bacterias continúen duplicándose y creciendo. Debido a esto la sobrevivencia de las bacterias decae con el tiempo. Se utilizaron las siguientes concentraciones de NPs Ag: 0 (blanco), 25, 50 y  $75 \mu\text{M}$  de Ag (expresadas como concentración de Ag total). Este

rango se eligió tomando como referencia trabajos previos de otros grupos [3, 34, 38-42]

En la Figura 5.4 se muestran los resultados correspondientes al recuento en placa de *P. aeruginosa*. A primera vista se encontró una disminución notable de las UFC/mL a medida que se incrementó la concentración de las NPs. El recuento mostró una disminución mayor a dos órdenes de magnitud de las UFC/mL con respecto al control en todo el rango de concentraciones evaluadas ( $3,5 \times 10^7$ ,  $1,8 \times 10^5$ ,  $3,9 \times 10^4$  y  $3,08 \times 10^4$  para 0, 25, 50 y 75  $\mu\text{M}$  de Ag, respectivamente). A su vez se calculó el porcentaje de mortandad para todas las concentraciones, dando valores de 99,5 % para 25  $\mu\text{M}$  y 99,9 % para 50 y 75  $\mu\text{M}$ . Esto demostró que las NPs preparadas fueron capaces de disminuir la viabilidad de las bacterias provenientes de un cultivo con una concentración inicial elevada, igual a  $\approx 4 \times 10^7$  UFC/mL.

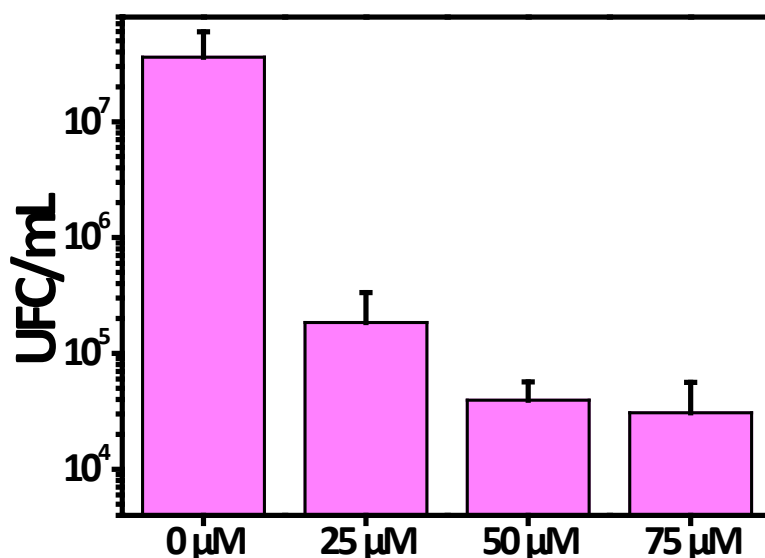


Figura 5.4. Gráfico del número de UFC/mL viables de *P. aeruginosa* luego de 4hs de exposición a dispersiones de NPs Ag en buffer fosfato con concentraciones 0, 25, 50 y 75  $\mu\text{M}$  de Ag.

En el caso de *S. aureus* (Figura 5.5) se encontraron los siguientes valores de UFC/mL:  $3,05 \times 10^7$ ,  $4,42 \times 10^6$ ,  $3,56 \times 10^5$  y  $2,9 \times 10^5$  para 0, 25, 50 y 75  $\mu\text{M}$  de Ag, respectivamente. Se realizó el cálculo del porcentaje de mortandad para todas las concentraciones, dando valores de 85,4 %, 98,8 % y 99 % para 25, 50 y 75  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

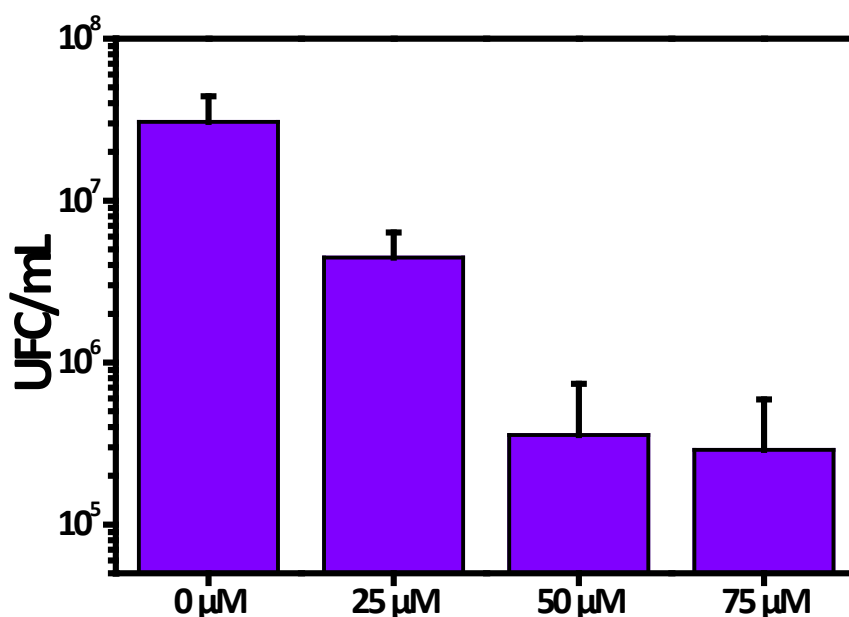


Figura 5.5. Gráfico del número de UFC/mL viables de *S. aureus* luego de 4hs de exposición a dispersiones de NPs Ag en buffer fosfato con concentraciones de 0, 25, 50 y 75 μM de Ag.

Los resultados mostraron que *P. aeruginosa* fue más susceptible a las NPs Ag que *S. aureus*. Si bien se pudo demostrar que las NPs Ag en buffer fosfato son capaces de disminuir el número de bacterias viables, el medio utilizado, como se mencionó arriba, sólo cumple la función de sostén, careciendo de los requerimientos necesarios para el crecimiento del cultivo. Por este motivo se procedió a repetir el ensayo en un medio de buffer fosfato enriquecido con glucosa, manitol y glicina como nutrientes necesarios para el crecimiento, el cual se denominó medio GMP. Este medio fue previamente evaluado para determinar que proporcionara un medio mínimo para el crecimiento bacteriano (ver Capítulo 3). Como resultado hubo un aumento de un orden de magnitud de las UFC/mL con respecto al inóculo inicial de bacterias luego de 24 hs de incubación. Esto nos indicó que en el medio es factible el crecimiento bacteriano. Asimismo, se pudo comprobar que las NPs Ag son estables en este medio enriquecido, tal como lo demuestra el espectro de UV-visible de la Figura 5.6, obtenido para una alícuota del medio enriquecido al que se agregó la cantidad de NPs correspondientes a 75 μM de Ag. No se observaron modificaciones apreciables en la

altura del pico ni en la longitud de onda tanto en el minuto cero como a las 24 hs (Figura 5.6), indicando que el medio es el más adecuado para los ensayos.

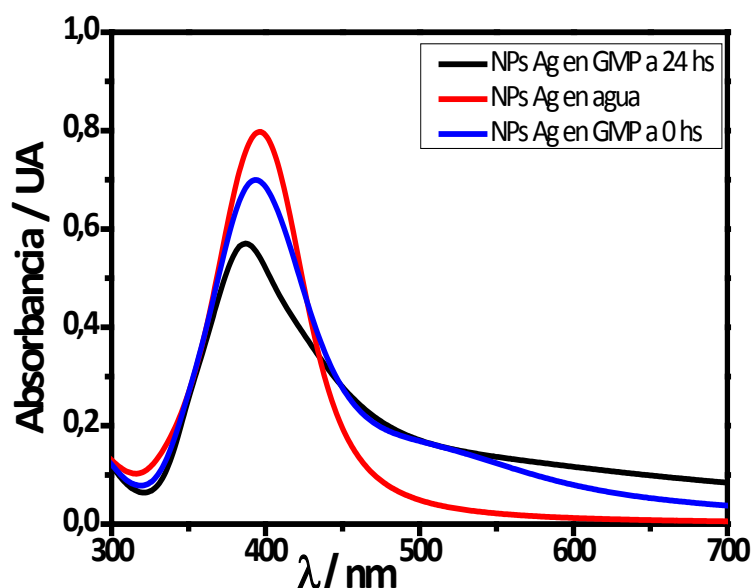


Figura 5.6. Espectros de UV-visible de las dispersiones de NPs Ag en agua y en medio enriquecido (GMP) a 0 y 24 hs. La concentración final de NPs Ag (expresada como concentración de Ag) es 75  $\mu\text{M}$ .

El ensayo, entonces, se realizó agregando alícuotas de la dispersión de NPs Ag a sendas alícuotas del medio conteniendo cada una  $1 \times 10^5$  UFC/mL de bacterias de manera de obtener concentraciones finales de Ag 0; 0,1; 0,4; 0,78; 1,6; 3,12; 6,25; 12,5; 25, 50, 75  $\mu\text{M}$  (expresadas como concentración final de Ag). El número de bacterias viables luego de 24 h se determinó mediante la técnica de recuento en placa.

Los valores de CMB determinados para *S. aureus* y *P. aeruginosa* fueron 3,12  $\mu\text{M}$  (0,33  $\mu\text{g/mL}$ ) y 0,78  $\mu\text{M}$  (0,084  $\mu\text{g/mL}$ ), respectivamente. En la literatura se ha informado una variedad de concentraciones bactericidas para NPs Ag de distintas formas y tamaños, lo cual indica que estas características influyen de alguna manera en su capacidad bactericida (Tabla 5.1). Lara *et al.* obtuvieron una CMB para *P. aeruginosa* de  $1 \times 10^4$   $\mu\text{g/mL}$  utilizando NPs esféricas de 100 nm de diámetro [43], mientras que Jain *et al.* usaron NPs de 7 a 20 nm y hallaron valores de 12,5  $\mu\text{g/mL}$  para bacterias como *Klebsiella aerogenes*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa* y *S. epidermis*, mientras que para *S. aureus* fue de 50  $\mu\text{g/mL}$  [44]. Por otra

parte, Ansari *et al.* obtuvieron valores de CMB similares a los reportados por Jain *et al.*: 12,5 µg/mL para cepas de *S. aureus metilina sensible* y 25 y 50 µg/mL para *S. aureus* y *S. aureus metilina sensible y resistente*, respectivamente. Sin embargo, otros autores obtuvieron valores de 60 a 220 µg/mL para varias cepas de *E. coli* y de 60 µg/mL para *S. aureus* usando NPs de aproximadamente 3 nm (bastante más pequeñas que las mencionadas anteriormente) [10]. En la Tabla 5.1 se resumen los valores de CMB y las características principales de las NPs Ag utilizadas por otros autores.

Por lo tanto, los valores de CMB obtenidos en este trabajo para ambas bacterias fueron considerablemente menores a los encontrados en la bibliografía, lo cual indica que las NPs Ag preparadas en el laboratorio tienen un importante efecto antimicrobiano sobre *P. aeruginosa* y *S. aureus*. La dispersión en los valores de CMB hallados en la literatura pone en evidencia el hecho de que no sólo el tamaño de las NPs influye en su capacidad bactericida, sino que otros factores, tales como su forma y recubrimiento, deben también jugar un papel importante.

Una característica importante de las NPs Ag que no se informó en varios de los casos mencionados anteriormente es su recubrimiento. Esto puede deberse posiblemente al hecho de que varias de ellas eran comerciales, con lo cual se desconoce la naturaleza del recubrimiento, o bien a que esa información no fue considerada relevante (Tabla 5.1). Sin embargo, los recubrimientos de las NPs juegan un importante rol, ya que son los que condicionan la cinética de liberación de iones Ag(I) [45] y la interacción con la pared celular bacteriana [46]. Con respecto al recubrimiento, Li *et al.* estudiaron la cinética de liberación de iones Ag(I) en NPs recubiertas con citrato y con Tween 20 en aguas naturales, encontrando que las últimas liberaban una mayor cantidad de iones ya que éstas no se aglomeraron con el tiempo, mientras que las recubiertas con citrato sí debido a su recubrimiento más lábil [45]. Sin embargo, las NPs Ag preparadas en el presente Trabajo de Tesis demostraron ser estables en soluciones acuosas a pesar de tener un recubrimiento de citrato. Por otra parte, Xiu *et al.* encontraron que NPs recubiertas con polietilenglicol (PEG) y PVP liberaban grandes cantidades de Ag(I), aumentando así su capacidad microbicida [47]. De acuerdo a estos resultados se puede concluir que el recubrimiento tiene una notable influencia sobre la capacidad bactericida de las NPs Ag.

Tabla 5.1. Valores de CMB obtenidos por otros autores para NPs Ag de diferentes características.

Autores	Tamaño de NPs Ag	Recubrimientos de NPs Ag	Medio de cultivo	Cepa bacteriana	Valor de CMB ( $\mu\text{g/mL}$ )
Lara <i>et al.</i> [43]	100 nm	comerciales	Luria – Bertani	<i>ER S. pyogenes</i> <i>AR E. coli O 157:H7</i> <i>MR P. aeruginosa</i> <i>Streptococcus sp</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>	$7,2 \times 10^3$ $8,9 \times 10^3$ $1,1 \times 10^3$ $3,15 \times 10^3$ $8,98 \times 10^3$ $8,98 \times 10^3$
Jain <i>et al.</i> [44]	7 – 20 nm	Bioestabilización Patente USA.	Mueller Hinton	<i>P. aeruginosa ATCC</i> <i>Salmonella abony</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>E. coli</i>	12.5 12.5 12.5 12.5 12.5 ND 12.5 12.5
Ansari <i>et al.</i> [7]	5 - 10 nm	comerciales	Luria – Bertani	<i>S. aureus MS</i> <i>S. aureus MR</i>	50 50
Amato <i>et al.</i> [48]	$\sim 7 \pm 4$ nm	glutation	Iso-Sensitest Broth (ISB)	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	180 15
Bryaskova <i>et al.</i> [9]	$13.8 \pm 3.8$ nm	PVP	halo de inhibición	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Espora de B.subtilis</i>	15
Panacek <i>et al.</i> [49]	20 - 60 nm Depende del azúcar	Azúcares (glucosa, galactosa, maltosa, lactosa)	Mueller Hinton	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa CCM</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus MRSA</i>	13.5 6.75 3.38 6.75 13.5 1.69 6.75

Tal como se ha mencionado detalladamente en la introducción de este capítulo, el mecanismo de acción bactericida de las NPs Ag no ha sido del todo dilucidado, siendo un tema controversial para aquellos que trabajan con estos materiales. Se han planteado diversos mecanismos, desde la pérdida de la integridad



de la pared bacteriana hasta la generación de especies ROS. Varios autores han encontrado que la interacción de las NPs Ag con la pared celular provocaría la pérdida de integridad de la misma por generación de poros [2, 17, 24], y/o por la interacción con las proteínas de membrana, lo que al mismo tiempo genera un desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones, estrés oxidativo y la posterior muerte celular [34, 50]. Este tema es foco de discusión para quienes trabajan con NPs y sistemas biológicos, ya que definiría el mecanismo de acción microbicida de las NPs Ag y el ingreso de las mismas a la célula bacteriana.

En relación a la liberación de iones Ag(I), éstos podrían interactuar con los grupos tiol de las proteínas que componen las bacterias, interfiriendo así con la replicación del ADN o afectando la cadena respiratoria. Esto sucedería en mayor medida en aquellas NPs Ag que poseen recubrimientos lábiles, como el citrato. La liberación de iones podría estar asociada con el proceso de oxidación por la presencia de O<sub>2</sub>, mientras que en condiciones anaeróbicas la concentración de iones sería menor por la ausencia del mismo, disminuyendo así la capacidad bactericida de las NPs [47]. A su vez, *Elechiguerra et al.* relacionaron la corrosión de las NPs en aire y en condiciones ambientales con la presencia de defectos en la superficie, los cuales poseen mayor reactividad, facilitando la disolución de la plata como iones Ag(I) [51]. Este resultado está en concordancia con los estudios de Liu *et al.*, quienes encontraron que la liberación de iones Ag(I) es consecuencia de un proceso de oxidación lento y cooperativo que depende varios factores como la temperatura, el pH, la concentración de O<sub>2</sub> y la presencia de materia orgánica [52].

Con respecto a la relación entre la liberación de iones Ag(I) y el tamaño de las NPs Ag, Sotiriou *et al.*, mostraron que las NPs Ag de diámetros menores que 10 nm liberan una mayor cantidad de iones Ag(I) que las de mayor tamaño, explicando así el mayor efecto microbicida de las nanopartículas más pequeñas [53].

Estos antecedentes justifican los bajos valores de CMB correspondientes a las NPs Ag preparadas en este trabajo, los cuales pueden atribuirse al tamaño de las mismas (6 nm), al recubrimiento lábil de citrato, o a la combinación de ambas características. En definitiva, se ha logrado una concentración de iones Ag(I) liberados

que resulta suficiente como para alcanzar el 99,9 % de mortandad con el agregado de dosis relativamente bajas de NPs Ag.

Por otro lado, la CMB obtenida en este trabajo para *P. aeruginosa* es cuatro veces inferior a la correspondiente a *S. aureus*, indicando que la bacteria Gram (-) (*P. aeruginosa*) presenta mayor susceptibilidad a las NPs preparadas en comparación a la cepa Gram (+) utilizada (*S. aureus*). La diferencia entre los valores de CMB obtenidos para las cepas ensayadas es coincidente con otros valores publicados en la literatura. Esta diferencia podría deberse a la forma en que interactúan físicamente las NPs con una célula, más específicamente con su pared celular. Por ejemplo, Taglietti *et al.* mostraron que las bacterias Gram (-) (*E. coli*) son más susceptibles que las Gram (+) (*S. aureus*) frente a NPs Ag en suspensión recubiertas con glutatión. Sus observaciones de TEM mostraron que las NPs fueron capaces de ingresar en las células de *E. coli*, pero no en las de *S. aureus*, lo cual puede atribuirse a las diferencias en la estructura de la pared celular descritas en el Capítulo 1 [20].

En este sentido, se ha encontrado que *E. coli* (Gram (-)) es más susceptible al tratamiento con NPs Ag que *S. aureus* (Gram (+)); esta diferencia se ha atribuido a los mayores daños y cambios morfológicos de la pared celular en *E. coli* [17]. Estos resultados se pueden interpretar teniendo en cuenta que las bacterias Gram (-) poseen una pared celular que está formada por una membrana celular, una delgada capa de peptidoglicano y por fuera de ella una capa de liposacáridos, mientras que la pared celular de las células Gram (+) está formada por una membrana celular y una gruesa capa de peptidoglicano compuesta por ácidos teicoicos [54], la que podría generar una mayor resistencia al ingreso de las NPs. Así, una capa de peptidoglicanos más gruesa actuaría como una barrera física contra las NPs Ag, independientemente del mecanismo de acción involucrado (liberación de iones Ag(I) o pérdida de integridad de la pared celular).

Con respecto a la interacción de las NPs Ag con los medios biológicos, es de conocimiento que las NPs Ag y los iones liberados de Ag(I) pueden interactuar con el medio donde se encuentren suspendidos, provocando precipitación de las NPs y iones Ag(I) y generando por tanto una modificación en la concentración de Ag total presente en el medio. Por este motivo se evaluó el rol del medio de cultivo biológico usado en

los ensayos de determinación de la CMB (medio GMP) y se analizó la liberación de Ag (I) desde las NPs dispersas en el medio mediante espectroscopía de absorción atómica (AA) con horno de grafito. Para el análisis se tomó una alícuota de la dispersión coloidal madre de NPs Ag, la cual se adicionó a 20 mL del medio GMP, obteniéndose una concentración final de NPs de Ag de 5  $\mu\text{M}$  de Ag. Como control se realizó el mismo procedimiento, pero en vez de GMP se utilizó agua desionizada. Luego de 24 h se realizaron dos etapas de separación de las NPs Ag remanentes mediante ultracentrifugación a 100000 g (fuerza centrífuga) durante dos horas (ultracentrífuga preparativa Beckman Coulter LE-80K). Luego de cada etapa de ultracentrifugación se usó la espectroscopía de UV-visible para detectar la presencia de NPs Ag remanentes en la dispersión. No se detectó el pico de plasmones en la región de 400 nm, por lo que se puede concluir que luego del procedimiento quedó una cantidad de NPs Ag despreciable en la fase líquida. El procedimiento anterior fue importante para asegurar que toda la plata que se detectara por AA proviniera de los iones liberados y no de NPs Ag que pudieran haber quedado en el líquido. A continuación, a los sobrenadantes obtenidos se les adicionó  $\text{HNO}_3$  concentrado hasta alcanzar una concentración final de 0,05M. El análisis por AA permitió determinar la concentración de los iones Ag (I) liberados por las NPs Ag. Los valores obtenidos fueron 3  $\mu\text{M}$  y 0,16  $\mu\text{M}$  para agua y GMP, respectivamente. Nótese que, en concordancia con datos existentes en la literatura [45, 52], la concentración en agua fue 10 veces mayor que la correspondiente al medio GMP. Esta diferencia se puede explicar si se analiza la composición del medio GMP. Este medio es rico en iones fosfato, los cuales pueden reaccionar con la Ag(I) formando productos insolubles. No obstante esto, la concentración de Ag(I) obtenida en GMP demuestra que la precipitación o formación de complejos no fue tan importante como para impedir la acción bactericida de las NPs Ag preparadas.

### 5.3 Conclusiones

Los valores de CMB de las NPs Ag con un diámetro de 6 nm y recubiertas con citrato fueron menores que los encontrados en la literatura para NPs Ag de distintos

tamaños y recubrimientos. Se demostró que *P. aeruginosa* es más susceptible a las NPs preparadas que *S. aureus*, tal como quedó evidenciado por el menor valor de CMB. Esta susceptibilidad de *P. aeruginosa* se podría atribuir a la diferencia en la estructura de la pared celular de ambas cepas, ya que la membrana celular de las bacterias Gram (-) posee una mayor rigidez, conferida por la gruesa capa de peptidoglicano y los ácidos teicoicos presentes en su estructura. Por otra parte, se observó la presencia de iones Ag(I) en el medio GMP, indicando que el medio no sólo permitió mantener las NPs Ag dispersas, sino que además no interfirió en el proceso de liberación de iones Ag(I). Asimismo, el medio GMP preparado demostró que puede ser utilizado para los ensayos con NPs Ag, ya que no permite la aglomeración de las NPs y ofrece un medio mínimo de crecimiento para las cepas bacterianas ensayadas.

## Referencias bibliográficas

1. Pal, S., Tak, Y.K. y Song, J.M., Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, (73), 1712-1720.
2. Sondi, I. y Salopek-Sondi, B., Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004, (275), 177-182.
3. Jose Ruben, M., Jose Luis, E., Alejandra, C., Katherine, H., Juan, B.K., Jose Tapia, R. y Miguel Jose, Y., The bactericidal effect of silver nanoparticles, *Nanotechnology*, 2005, (16), 2346.
4. Durairaj, R., Amirulhusni, A.N., Palanisamy, N.K., Mohd-Zain, Z. y Ping, L.J., Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles on Multi Drug Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*.
5. Shahverdi, A.R., Fakhimi, A., Shahverdi, H.R. y Minaian, S., Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2007, (3), 168-171.
6. Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramírez, J.T. y Yacaman, M.J., The bactericidal effect of silver nanoparticles, *Nanotechnology*, 2005, (16), 2346.
7. Ansari, M.A., Khan, H.M., Khan, A.A., Malik, A., Sultan, A., Shahid, M., Shujatullah, F. y Azam, A., Evaluation of antibacterial activity of silver nanoparticles against MSSA and MRSA on isolates from skin infections, *Biol Med*, (3), 141-146.
8. Chernousova, S. y Epple, M., Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal, *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, (52), 1636-1653.
9. Bryaskova, R., Pencheva, D., Nikolov, S. y Kantardjiev, T., Synthesis and comparative study on the antimicrobial activity of hybrid materials based on silver nanoparticles (AgNps) stabilized by polyvinylpyrrolidone (PVP), *Journal of Chemical Biology*, 2011, (4), 185-191.
10. Ruparelia, J.P., Chatterjee, A.K., Duttgupta, S.P. y Mukherji, S., Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles, *Acta Biomaterialia*, 2008, (4), 707-716.
11. Greulich, C., Braun, D., Peetsch, A., Diendorf, J., Siebers, B., Epple, M. y Koller, M., The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range, *RSC Advances*, 2012, (2), 6981-6987.
12. Martínez-Castañón, G.A., Niño-Martínez, N., Martínez-Gutierrez, F., Martínez-Mendoza, J.R. y Ruiz, F., Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes, *Journal of Nanoparticle Research*, 2008, (10), 1343-1348.
13. Cioffi, N. y Rai, M., Nano-antimicrobials: Progress and Prospects, 2012, Springer.
14. Eckhardt, S., Brunetto, P.S., Gagnon, J., Priebe, M., Giese, B. y Fromm, K.M., Nanobio Silver: Its Interactions with Peptides and Bacteria, and Its Uses in Medicine, *Chemical Reviews*, 2013, (113), 4708-4754.

15. Marambio-Jones, C. y Hoek, E.M., A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment, *Journal of Nanoparticle Research*, 2010, (12), 1531-1551.
16. Feng, Q.L., Wu, J., Chen, G.Q., Cui, F.Z., Kim, T.N. y Kim, J.O., A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, (52), 662-668.
17. Jung, W.K., Koo, H.C., Kim, K.W., Shin, S., Kim, S.H. y Park, Y.H., Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, (74), 2171-2178.
18. Lok, C.N., Ho, C.M., Chen, R., He, Q.Y., Yu, W.Y., Sun, H., Tam, P.K.H., Chiu, J.F. y Che, C.-M., Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver Nanoparticles, *Journal of Proteome Research*, 2006, (5), 916-924.
19. Dibrov, P., Dzioba, J., Gosink, K.K. y Häse, C.C., Chemiosmotic Mechanism of Antimicrobial Activity of Ag<sup>+</sup> in *Vibrio cholerae*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, (46), 2668-2670.
20. Taglietti, A., Diaz Fernandez, Y.A., Amato, E., Cucca, L., Dacarro, G., Grisoli, P., Necchi, V., Pallavicini, P., Pasotti, L. y Patrini, M., Antibacterial Activity of Glutathione-Coated Silver Nanoparticles against Gram Positive and Gram Negative Bacteria, *Langmuir*, (28), 8140-8148.
21. Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K.N., Kim, J.H., Park, S.J., Lee, H.J., Kim, S.H., Park, Y.K., Park, Y.H., Hwang, C.-Y., Kim, Y.-K., Lee, Y.S., Jeong, D.H. y Cho, M.H., Antimicrobial effects of silver nanoparticles, *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 2007, (3), 95-101.
22. Choi, O., Deng, K.K., Kim, N.-J., Ross Jr, L., Surampalli, R.Y. y Hu, Z., The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth, *Water Research*, 2008, (42), 3066-3074.
23. Li, W.-R., Xie, X.-B., Shi, Q.-S., Zeng, H.-Y., Ou Yang, Y.S. y Chen, Y.-B., Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, (85), 1115-1122.
24. Mirzajani, F., Ghassempour, A., Aliahmadi, A. y Esmaili, M.A., Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*, *Research in Microbiology*, 2011, (162), 542-549.
25. Raffi, M., Hussain, F., Bhatti, T., Akhter, J., Hameed, A. y Hasan, M., Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E. coli* ATCC-15224, *Journal of Materials Science and Technology*, 2008, (24), 192-196.
26. Li, W.-R., Xie, X.-B., Shi, Q.-S., Duan, S.-S., Ouyang, Y.-S. y Chen, Y.-B., Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*, *BioMetals*, 2011, (24), 135-141.
27. Johannsen, S., Megger, N., Bohme, D., Sigel, R.K. y Muller, J., Solution structure of a DNA double helix with consecutive metal-mediated base pairs, *Nature Chemistry*, 2010, (2), 229-234.
28. Arakawa, H., Neault, J.F. y Tajmir-Riahi, H.A., Silver(I) Complexes with DNA and RNA Studied by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Capillary Electrophoresis, *Biophysical journal*, 2001, (81), 1580-1587.

29. Chen, X. y Schluesener, H.J., Nanosilver: A nanoparticle in medical application, *Toxicology Letters*, 2008, (176), 1-12.
30. Russell, A.D. y Hugo, W.B., Antimicrobial activity and action of silver, *Prog Med Chem*, 1994, (31), 351-370.
31. Xu, F.F. y Imlay, J.A., Silver(I), Mercury(II), Cadmium(II), and Zinc(II) Target Exposed Enzymic Iron-Sulfur Clusters when They Toxicify *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, (78), 3614-3621.
32. Bragg, P. y Rainnie, D., The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichia coli*, *Canadian journal of microbiology*, 1974, (20), 883-889.
33. Park, H.-J., Kim, J.Y., Kim, J., Lee, J.-H., Hahn, J.-S., Gu, M.B. y Yoon, J., Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity, *Water Research*, 2009, (43), 1027-1032.
34. Hwang, E.T., Lee, J.H., Chae, Y.J., Kim, Y.S., Kim, B.C., Sang, B.-I. y Gu, M.B., Analysis of the Toxic Mode of Action of Silver Nanoparticles Using Stress-Specific Bioluminescent Bacteria, *Small*, 2008, (4), 746-750.
35. Choi, O. y Hu, Z., Size Dependent and Reactive Oxygen Species Related Nanosilver Toxicity to Nitrifying Bacteria, *Environmental Science & Technology*, 2008, (42), 4583-4588.
36. Piddock, L.J.V., Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria, *Journal of Applied Microbiology*, 1990, (68), 307-318.
37. Andrews, J.M., Determination of minimum inhibitory concentrations, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, (48), 5-16.
38. Carlson, C., Hussain, S.M., Schrand, A.M., K. Braydich-Stolle, L., Hess, K.L., Jones, R.L. y Schlager, J.J., Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008, (112), 13608-13619.
39. Vertelov, G.K., Yu, A.K., Efremenkova, O.V., Olenin, A.Y. y Lisichkin, G.V., A versatile synthesis of highly bactericidal Myramistin® stabilized silver nanoparticles, *Nanotechnology*, 2008, (19), 355707.
40. Shrivastava, S., Bera, T., Singh, S.K., Singh, G., Ramachandrarao, P. y Dash, D., Characterization of Antiplatelet Properties of Silver Nanoparticles, *ACS Nano*, 2009, (3), 1357-1364.
41. Sarkar, S., Jana, A.D., Samanta, S.K. y Mostafa, G., Facile synthesis of silver nanoparticles with highly efficient anti-microbial property, *Polyhedron*, 2007, (26), 4419-4426.
42. AshaRani, P.V., Low Kah Mun, G., Hande, M.P. y Valiyaveetil, S., Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells, *ACS Nano*, 2008, (3), 279-290.
43. Lara, H., Ayala-Núñez, N., Ixtepan Turrent, L. y Rodríguez Padilla, C., Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, (26), 615-621.
44. Jain, J., Arora, S., Rajwade, J.M., Omray, P., Khandelwal, S. y Paknikar, K.M., Silver Nanoparticles in Therapeutics: Development of an Antimicrobial Gel Formulation for Topical Use, *Molecular Pharmaceutics*, 2009, (6), 1388-1401.

45. Li, X. y Lenhart, J.J., Aggregation and Dissolution of Silver Nanoparticles in Natural Surface Water, *Environmental Science & Technology*, 2012, (46), 5378-5386.
46. Verma, A. y Stellacci, F., Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions, *Small*, (6), 12-21.
47. Xiu, Z.-m., Zhang, Q.-b., Puppala, H.L., Colvin, V.L. y Alvarez, P.J.J., Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles, *Nano Letters*, (12), 4271-4275.
48. Amato, E., Diaz-Fernandez, Y.A., Taglietti, A., Pallavicini, P., Pasotti, L., Cucca, L., Milanese, C., Grisoli, P., Dacarro, C., Fernandez-Hechavarria, J.M. y Necchi, V., Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity against Gram Positive and Gram Negative Bacteria of Biomimetically Coated Silver Nanoparticles, *Langmuir*, 2011, (27), 9165-9173.
49. Panáček, A., Kvítek, L., Pucek, R., Kolář, M., Večeřová, R., Pizúrová, N., Sharma, V.K., Nevěčná, T.j. y Zbořil, R., Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006, (110), 16248-16253.
50. Upendra Kumar, P., Vinod, K., Tanmay, B., Preeti, S.S., Gopal, N., Sunil, K.S., Rajiv, G. y Anchal, S., Study of mechanism of enhanced antibacterial activity by green synthesis of silver nanoparticles, *Nanotechnology*, (22), 415104.
51. Elechiguerra, J.L., Larios-Lopez, L., Liu, C., Garcia-Gutierrez, D., Camacho-Bragado, A. y Yacaman, M.J., Corrosion at the Nanoscale: The Case of Silver Nanowires and Nanoparticles, *Chemistry of Materials*, 2005, (17), 6042-6052.
52. Liu, J. y Hurt, R.H., Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids, *Environmental Science & Technology*, 2010, (44), 2169-2175.
53. Sotiriou, G.A. y Pratsinis, S.E., Antibacterial Activity of Nanosilver Ions and Particles, *Environmental Science & Technology*, (44), 5649-5654.
54. Michael T. Mandinga, J.M.M.a.J.P., Brock, Microbiología de los microorganismos. *decima edición ed.*, Pearson, Prentice Hall.



# Capítulo 6

## Inmovilización de nanopartículas de Ag sobre sustratos de titanio

### 6.1 Introducción y antecedentes

El titanio (Ti) es uno de los materiales más empleados en aplicaciones tecnológicas de la industria aeroespacial (motores), médica (prótesis), náutica (hélices, cadenas, motores), militar y para producción de energía. Es un metal abundante en la naturaleza que en general se encuentra formando óxidos como el rutilo y la anatasa, ambos de estequiometría  $\text{TiO}_2$ .

El Ti en su estado elemental recién se comenzó a emplear a partir de 1946, cuando William Kroll desarrolló un método para poder producirlo a escala comercial. Esta síntesis, denominada método de Kroll, se basa en la reducción de  $\text{TiCl}_4$  con magnesio en una atmósfera de argón para evitar la oxidación del Ti, el cual actualmente sigue siendo uno de los métodos utilizados para la obtención de Ti puro [1]. El titanio es un metal de

transición que en su forma elemental presenta un color plateado grisáceo. Posee un alto punto de fusión, bajas conductividades térmica y eléctrica y es paramagnético [2]. Es un material resistente a la tracción y a la corrosión, maleable y con una gran capacidad de memoria de su forma [3]. Es posible preparar aleaciones de Ti con otros elementos, como aluminio, zirconio, molibdeno, cromo, manganeso, niobio, hierro y vanadio, alguna de las cuales se utilizan en prótesis dentales, hélices de barcos, bicicletas y sistema de refrigeración en centrales nucleares [3, 4].

En particular, para el uso del Ti como material implantable, son características de vital interés la resistencia del mismo al desgaste y a la corrosión, así como también su biocompatibilidad. La maleabilidad y resistencia del Ti se deben a la combinación de un valor del módulo de Young (elasticidad) relativamente alto ( $10,7 \times 10^4$  MPa) [5] y una dureza promedio de 5 en la escala de Mohs [6]. La excelente resistencia del Ti frente a la corrosión es debida a la formación sobre su superficie de un film pasivo de óxido nativo de estequiometría  $TiO_2$ , denso, protector y fuertemente adherente. Este film posee un espesor entre 2 a 8 nm, dependiendo de la composición del metal (si se trata de Ti puro o una aleación), el medio en el que se encuentre y la temperatura [7]. La pasivación de un metal está ligada a una pérdida de su reactividad química o electroquímica bajo ciertas condiciones ambientales, particularmente la presencia de aire. Este film pasivo es de especial importancia debido a que la biocompatibilidad de los implantes de Ti está asociada a la superficie de óxido y no al material de titanio en sí, ya que confiere al material una buena resistencia a la corrosión [7, 8].

Estas características convierten al Ti en uno de los biomateriales más ampliamente usados en prótesis valvulares cardíacas, así como también para la manufactura de instrumental médico, prótesis ortopédicas, implantes dentales y ortodoncias [7, 8]. Además el Ti puro y la aleación Ti-6Al-4V ELI (“extra low level of interstitial content”; bajo nivel de contenido intersticial) son los más empleados como biomateriales estructurales y funcionales para el reemplazo de tejidos duros (prótesis ortopédicas de rodilla y cadera, prótesis dentales), ya que su resistencia a la corrosión y biocompatibilidad los convierten

en el material de elección con respecto a otros metales como Zr, Ta u otras aleaciones del Ti con molibdeno, zirconio y niobio [4, 9].

La superficie de un biomaterial casi siempre difiere en morfología y composición en comparación al correspondiente material masivo (“bulk”). Debido a que la superficie es la parte del material en contacto con el medio biológico, ésta juega un rol importante en las aplicaciones de los mismos en biología y medicina. En efecto, la mayor parte de los procesos de interés ocurren sobre la superficie o bien en la interfaz con el medio biológico. Se ha encontrado que la topografía de la superficie de algunos biomateriales puede afectar la estabilidad de la interfaz entre implante y tejido [10]. Para aquellos materiales que no liberan sustancias tóxicas al medio las características de su superficie son las únicas que rigen la interacción del material extraño con el tejido huésped [11, 12].

Las superficies de los biomateriales pueden ser modificadas con el objetivo de mejorar sus propiedades físicas y químicas, las cuales determinan su biocompatibilidad, durabilidad y resistencia a la corrosión en fluidos biológicos. De acuerdo al objetivo deseado, la funcionalización de las superficies se puede realizar con moléculas orgánicas (por ejemplo tioles)[13], biomoléculas y especies de interés biológico (antibióticos, proteínas, ácidos nucleicos, fosfolípidos, etc) [12, 14] o nanomateriales (especialmente NPs)[15].

En el caso particular del Ti y sus aleaciones, las superficies de estos materiales juegan un papel importante en la integración del implante y permanencia del mismo en el cuerpo humano. Sin embargo, cuando trabajamos con la superficie del Ti debemos tener en cuenta, que en realidad hay presente una capa de óxido nativo (como se ha mencionado anteriormente). Por lo tanto, la superficie del material de Ti que va estar expuesta y/o interactuar con el medio circundante y los organismos vivos es el Ti/TiO<sub>2</sub>. Este dato es importante en el momento que se desee realizar caracterizaciones, modificaciones y analizar las interacciones entre superficie y el medio circundante donde se encuentre expuesto el Ti. Por otro lado, se han desarrollado estrategias que consisten en modificar la superficie del Ti, las cuales ayudarían a mejorar diversos factores que inciden en la performance del implante, tales como la unión implante-hueso, la capacidad

de modular y conducir el comportamiento celular de las células que conforman al hueso, la resistencia al desgaste y a la corrosión, la biocompatibilidad y la capacidad de inhibir la proliferación microbiana sobre la superficie del implante [16]. Actualmente se utilizan diversas técnicas de modificación superficial para alcanzar estos objetivos, las cuales se pueden clasificar en [16, 17]:

- mecánicas (maquinado, pulido, molienda).
- químicas (tratamientos ácidos o alcalinos, con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, métodos sol-gel, métodos bioquímicos).
- físicas (*spray* térmico, deposición por vapor, plasma, implantación de iones).

Uno de los objetivos más deseados en el desarrollo de materiales implantables es obtener superficies con características antimicrobianas para, de esa manera, inhibir la adhesión y colonización de bacterias, permitiendo una reducción en la tasa de infección del implante. Una de las técnicas de modificación más utilizadas para alcanzar tal objetivo es la modificación química de la superficie con diferentes moléculas con capacidades microbicidas. En la literatura es posible encontrar antecedentes acerca de modificaciones superficiales de Ti con el objetivo de inhibir la colonización bacteriana y/o de mejorar la adhesión de las células del tejido. Por ejemplo, Harris *et al.* funcionalizaron superficies de Ti/TiO<sub>2</sub> con un copolímero compuesto por poli-L-lisina y PEG mediante inmersión del sustrato en una solución del polímero. Como resultado obtuvieron una superficie que permitió la adhesión de células osteoblásticas y mostró una reducción de la adhesión de *S. aureus* [18]. Por otra parte, Chua *et al.* modificaron superficies de Ti mediante ensamblaje capa por capa con ácido hialurónico y quitosano para acoplar un péptido RGD (compuesto por arginina, glicina y ácido aspártico). Los sustratos modificados mostraron una reducción del 80% de la adhesión de *S. aureus* y el péptido permitió un aumento en la adhesión y proliferación de las células osteoblásticas [19].

Uno de los agentes microbicidas que han empezado a utilizarse con mayor frecuencia son las NPs Ag, las cuales, como hemos mencionado en capítulos anteriores, presentan una gran eficacia microbicida sobre diversos microorganismos. En consecuencia, se han empezado a implementar en los tratamientos superficiales, tal como

hicieron Juan *et al.*, quienes modificaron superficies de titanio con NPs Ag previa silanización del sustrato con APS (3-aminopropil trietoxisilano). Ellos demostraron que el porcentaje de mortandad de *S. aureus* y *E. coli* en las superficies modificadas fue de más del 90 % y mediante SEM observaron la disminución de la adhesión bacteriana sobre las superficies modificadas [20]. Sin embargo, el método de silanización requiere de una superficie limpia, un cuidadoso manejo de soluciones tóxicas (como la solución piraña, que se utiliza para preparar la superficie), reactivos con un alto grado de pureza y tiempo de preparación. Otros autores como, Zhao *et al.* describieron un método distinto al anterior que consiste en la incorporación de NPs Ag en las paredes de nanotubos de TiO<sub>2</sub>, para lo cual éstos fueron sumergidos en una solución de AgNO<sub>3</sub> e irradiados con luz UV. Estos nanotubos de TiO<sub>2</sub> con NPs Ag tuvieron la capacidad de matar bacterias planctónicas durante varios días y previnieron la adhesión bacteriana durante un período de 30 días [21]. Asimismo, Secinti *et al.* modificaron tornillos de Ti con NPs Ag mediante métodos sol-gel. Estos tornillos se implantaron en conejos y 28 días después se removieron, observándose una inhibición de la adhesión bacteriana [22]. A pesar de los efectos microbicidas logrados en cada método nombrado, en todos los casos fue necesario realizar un tratamiento previo a las superficies a fin de inmovilizar las NPs Ag, implicando un mayor consumo de tiempo, reactivos y convirtiendo el tratamiento en un proceso tedioso que involucra varias etapas para obtener la superficie modificada con NPs.

En este capítulo se describirá un método sencillo y rápido para modificar superficies de Ti/TiO<sub>2</sub> con NPs Ag recubiertas con citrato, el cual no requiere un tratamiento previo.

## 6.2 Adsorción de NPs Ag sobre sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>

Las NPs Ag, preparadas como se describió en el capítulo 4, sección 4.2.3.2.4, fueron adsorbidas sobre sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> con el objetivo de modificar la superficie de éstos.

Para ello se emplearon sustratos circulares de Ti (Johnson-Matthey, 99,7%) con un espesor de 0,25 mm y un área de 0,781 cm<sup>2</sup>. Los mismos fueron pulidos en un primer paso con papel abrasivo de carburo de silicio de 2500, luego de lo cual fueron sumergidos en un baño de ultrasonido por 45 minutos para retirar todos los restos provenientes del proceso de pulido. Se realizó un segundo paso de pulido a espejo con pasta de diamante de 1 μm (Prazis). A continuación los sustratos se sumergieron nuevamente en baño de ultrasonido por 45 minutos. Por último, se enjuagaron varias veces con agua desionizada y se secaron bajo corriente de N<sub>2</sub>.

Los sustratos recién preparados fueron sumergidos en una dispersión coloidal fresca de las NPs Ag con una concentración de 3,16x10<sup>-2</sup> mg Ag/mL. La incubación se realizó durante 24 hs a 4°C en oscuridad. Al finalizar el tiempo se enjuagaron los sustratos con H<sub>2</sub>O desionizada y se secaron bajo corriente de N<sub>2</sub>. Con el objetivo de comprobar la presencia de las NPs Ag sobre los sustratos de titanio se realizó el análisis de las superficies modificadas mediante XPS y AFM.

### **6.3 Caracterización mediante XPS de los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> modificados con NPs Ag**

Las muestras fueron caracterizadas en un equipo de XPS XR50 de Specs GmbH con un analizador de energía de electrones hemisférico (PHOIBOS 100, Specs GmbH) (Ver Capítulo. 2).

El espectro de muy baja resolución de los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg, tomado en un amplio rango de energías de ligadura (“wide scan survey”), mostró los picos característicos de Ti, O, Ag y C (Figura 6.1). La aparición de los picos de Ag en el espectro “survey” indica que las NPs Ag se adsorbieron en forma efectiva sobre la superficie del sustrato luego de la incubación de 24 hs en una dispersión de NPs Ag (Figura 6.1).

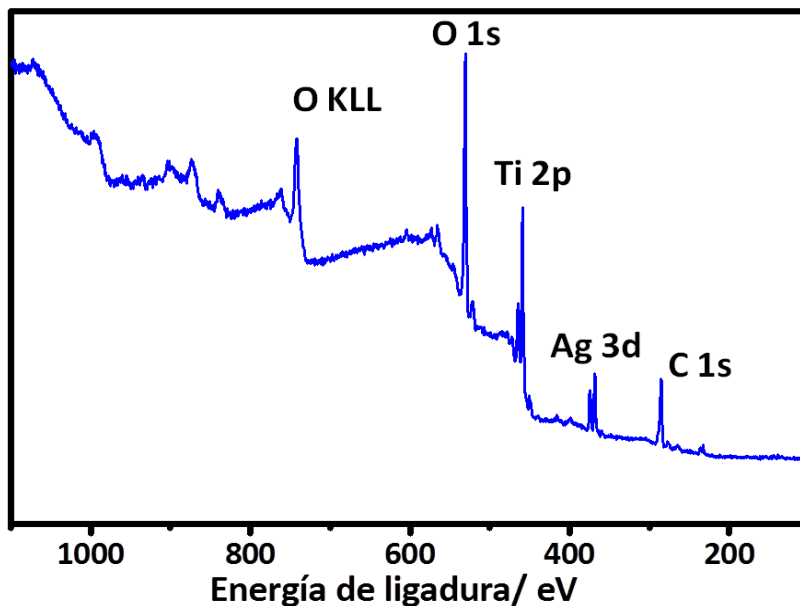


Figura 6.1. Espectro de XPS “survey” de una superficie de Ti/TiO<sub>2</sub> con NPs Ag adsorbidas.

Los espectros de alta resolución en la región Ti 2p mostraron un doblete con separación de 5,8 eV (debido al acoplamiento espín-órbita) y una energía de ligadura de aproximadamente 459 eV para la componente 2p<sub>3/2</sub>. Este doblete se asignó al óxido nativo del Ti (TiO<sub>2</sub>) (Figura 6.2), basados en que Pouilleau *et al.* mostraron espectros de TiO<sub>2</sub> con un pico máximo en 459 eV [23] y teniendo en cuenta que otros autores informaron valores en el mismo rango ( $\approx 458,5$  eV) [24]. A su vez, no se detectó señal de Ti metálico, el cual posee una energía de ligadura de 453,8 eV [24]. Esto era de esperar, ya que el espesor del óxido nativo es de unos 8 nm en aire [25], habiéndose informado valores de hasta 12 nm [23], con lo cual los fotoelectrones provenientes del Ti metálico no pueden ser detectados.

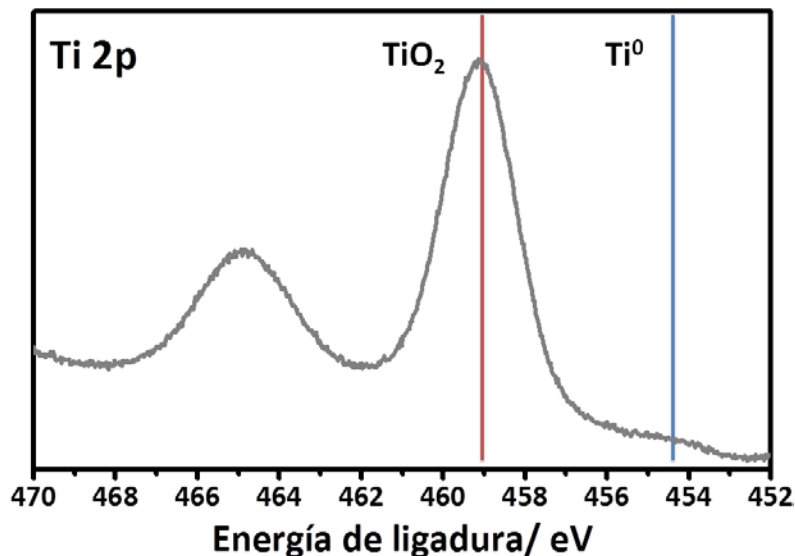


Figura 6.2. Espectro de XPS de alta resolución de Ti 2p de un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> modificado con NPs de Ag. Las líneas roja y celeste marcan los valores de energía de ligadura (obtenidos de la literatura) correspondientes al óxido de Ti y Ti metálico, respectivamente.

El espectro de alta resolución de Ag 3d (Figura 6.3), correspondiente a una muestra de Ti/TiO<sub>2</sub> modificada con NPs Ag recién sintetizadas, se pudo ajustar satisfactoriamente con una sola componente y con una energía de ligadura de 368,3 eV para 3d<sub>5/2</sub> con ancho de pico a media altura (FWHM, de su sigla en inglés) de 1 eV. Para el ajuste se empleó una línea base de tipo Shirley y una separación entre las componentes (debido al acoplamiento espín-orbita) igual a 6,01 eV. La componente única se asignó en principio a Ag metálica en base a ciertos valores informados en la literatura [26]. Sin embargo, debido a que, a diferencia de los otros metales, la Ag metálica presenta un doblete con energía de ligadura mayor o igual a la de los óxidos de Ag, la posición del pico 3d<sub>5/2</sub> no es un criterio suficiente para descartar la presencia de óxido. Sin embargo, el valor de FWHM parecería indicar que las NPs no estaban apreciablemente oxidadas. Se obtuvo más información acerca de la composición de las NPs Ag mediante medidas de TEM de las mismas. Las imágenes de alta resolución de las NPs realizadas varios días después de su síntesis



mostraron una red de Ag metálica (Capítulo 4 sección 4.2.3.2.4). Se llegó a la misma conclusión en base a los patrones de difracción de electrones obtenidos por TEM.

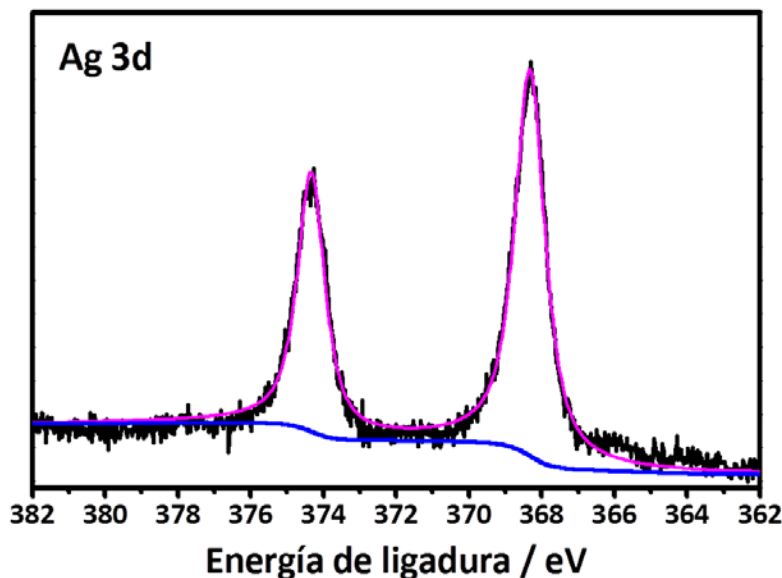


Figura 6. 3. Espectro de XPS en alta resolución de Ag 3d de un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> modificado con NPs de Ag recién preparadas

Para analizar el posible envejecimiento de las NPs Ag, más teniendo en cuenta el hecho de que el recubrimiento de éstas es lábil (iones citrato), se tomaron espectros de Ag 3d de muestras de NPs inmovilizadas sobre Ti/TiO<sub>2</sub> preparada a partir de una dispersión coloidal usada tres semanas después de su síntesis (Figura 6.4). Tal como se puede observar, no hubo ningún cambio o modificación apreciable en la energía de ligadura o en la intensidad de los picos, por lo que se puede concluir que las NPs Ag no se oxidan significativamente luego de algunas semanas.

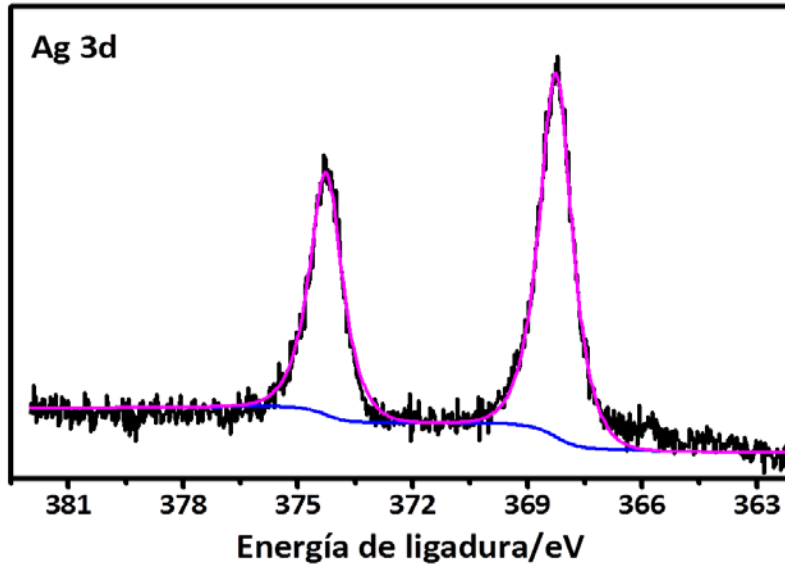


Figura 6.4. Espectro de XPS en alta resolución de Ag 3d de un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> modificado con NPs Ag con tres semanas de antigüedad.

En cuanto al análisis cuantitativo, a partir de los espectros de baja resolución de Ag 3d y Ti 2p se pudo estimar el cubrimiento de NPs Ag. Para ello se calculó el cociente de las áreas de pico de Ag y Ti (a partir de los espectros en unidades de cuentas por segundo) corregido por los correspondientes factores de sensibilidad relativa (RSF), cuyos valores son 18 para Ag 3d y 7.9 para Ti 2p. Se obtuvo un valor de  $0,12 \pm 0,03$ . A partir de un cálculo que relaciona el mencionado cociente de intensidades, las condiciones de análisis, los parámetros físicos propios de la fotoemisión del XPS y la altura promedio de las islas de NPs adsorbidas sobre la superficie (obtenida a partir de medidas de AFM; ver sección 6.4) se pudo estimar un cubrimiento de plata sobre la superficie de Ti/TiO<sub>2</sub>, el cual resultó ser  $0,09 \pm 0,02$  (ver Apéndice A). La estimación se realizó con los valores de atenuación efectiva de los electrones de Ag 3d/Ag, Ti 2p/Ag y Ti 2p/TiO<sub>2</sub> que fueron extraídos de la base de datos NIST (National Institute of Standards and Technology) [27].

## 6.4 Caracterización mediante AFM de los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> modificados con NPs Ag

La distribución espacial de las NPs Ag adsorbidas sobre la superficie de Ti/TiO<sub>2</sub> se determinó mediante medidas de AFM en modo contacto en aire. En primer lugar se observaron muestras de Ti/TiO<sub>2</sub> que no fueron expuestas a NPs Ag (muestras control), las cuales mostraron ausencia de agregados sobre la superficie y ciertas rayas propias del proceso de pulido (Figura 6.5).

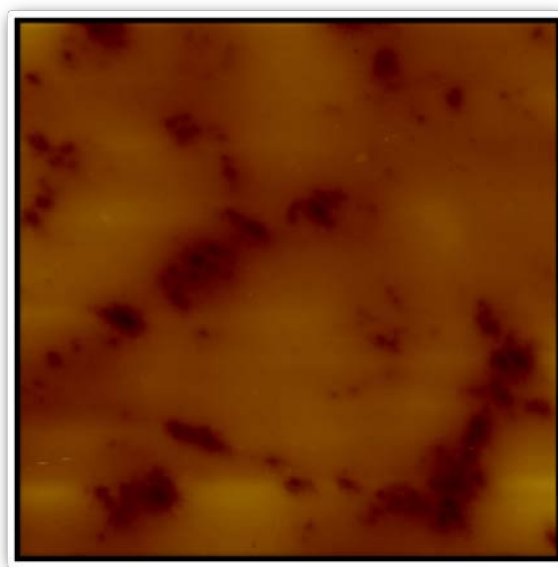


Figura 6.5. Imagen de AFM (50x 50  $\mu\text{m}^2$ ) en modo contacto en aire de un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> pulido sin NPs Ag.

Las imágenes de AFM en modo contacto de superficies de Ti/TiO<sub>2</sub> con NPs Ag adsorbidas mostraron islas (o agregados) distribuidas homogéneamente sobre la superficie del sustrato las cuales se observan en las imágenes como puntos brillantes (Figura 6.6). Los tamaños de las mismas van de los 100 a los 300 nm aproximadamente. Tal como se comentó en el Capítulo 2. Sección 2.1.1, se utilizaron puntas de AFM de

nitruro de silicio con un radio de curvatura de 10 nm (informado por el fabricante de las puntas). Debido al tamaño de los agregados obtenidos, el cual excede considerablemente el radio de las puntas empleadas, se presumió que cada isla consistía de varias NPs Ag. A fin de corroborar este hecho se realizó el análisis de las secciones transversales de la imagen obtenida (Figura 6.7 a y b). Se pudo así estimar la altura de las islas de NPs de Ag adsorbidas sobre la superficie del Ti/TiO<sub>2</sub>. A partir de varias medidas de secciones transversales en más de 15 imágenes diferentes se obtuvo una altura promedio de  $80 \pm 40$  nm. Esto permitió concluir que las islas están formadas por varias capas de NPs Ag (Figura 6.7 b), teniendo algunas de ellas más capas que otras. Por otra parte, el cubrimiento de islas de NPs Ag se calculó con la herramienta “Bearing” del programa Nanoscope versión 5.3, obteniéndose un valor de  $0,09 \pm 0,03$ . Este valor fue congruente con los datos obtenidos por XPS descriptos en la sección anterior.

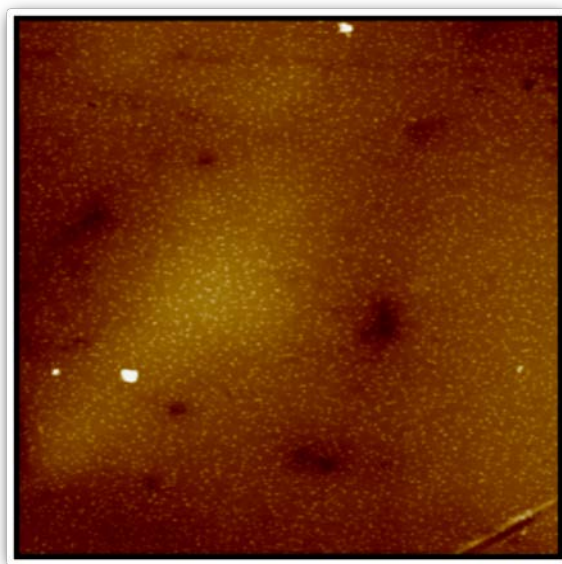


Figura 6.6. Imagen de AFM ( $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ ) en modo contacto de un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> modificado con NPs Ag (en aire).

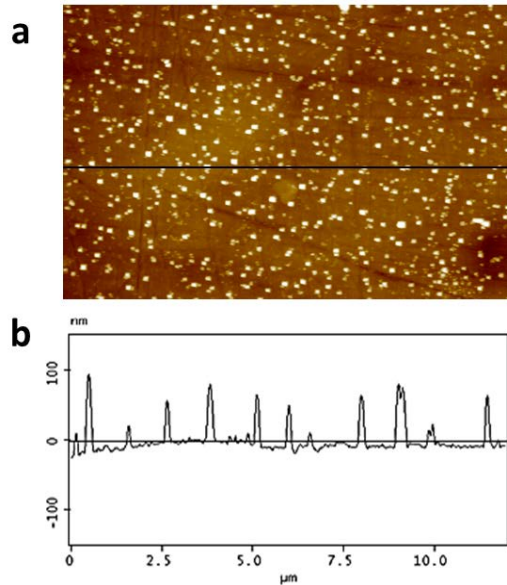


Figura 6.7. Medidas de AFM en modo contacto de sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> modificados con NPs Ag (en aire). a) Imagen de 12 x 7,4 μm<sup>2</sup> y b) corte transversal de la imagen de a).

Con el objetivo de estimar la intensidad de la adsorción entre las NPs y la superficie, se midió la fuerza necesaria para remover las NPs de la superficie de Ti/TiO<sub>2</sub>. Para ello, se utilizó el AFM en modo contacto y se barrió la superficie aumentando la fuerza de interacción entre la punta y la muestra, hasta alcanzar la condición en la que las NPs Ag eran desplazadas de la superficie. Esta condición quedó evidenciada por la aparición de una ventana sin nanopartículas al aumentar el tamaño del barrido. La fuerza aplicada en cada caso se estimó mediante curvas de fuerzas.

Una curva de fuerza, tal como se describió en detalle en el Capítulo 2, sección 2.1, representa la deflexión del láser en función de la altura de acercamiento o retracción del cantiléver sobre una superficie, lo cual es una medida directa de la fuerza de interacción. La fuerza se calculó con la siguiente ecuación:

$$F = k \times d \quad (\text{ec. 6.1})$$

donde  $k$  es la constante elástica del resorte del cantiléver y  $d$  es la distancia entre la posición inicial y final de éste. El valor de  $k$  fue de 0,2362 N/m (calculado con el software Nanoscope 7.3 del AFM) y el valor de  $d$  se obtuvo de cada curva. En la Figura 6.8, se muestra una de las curvas obtenidas para la condición en la que las NPs Ag fueron desplazadas completamente de la superficie. A partir de las curvas de fuerzas se estableció que fueron necesarias fuerzas de aproximadamente 4400 nN para arrastrar las NPs. Este valor tan alto indicó que las NPs Ag se encontraban fuertemente adsorbidas sobre la superficie del sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub>.

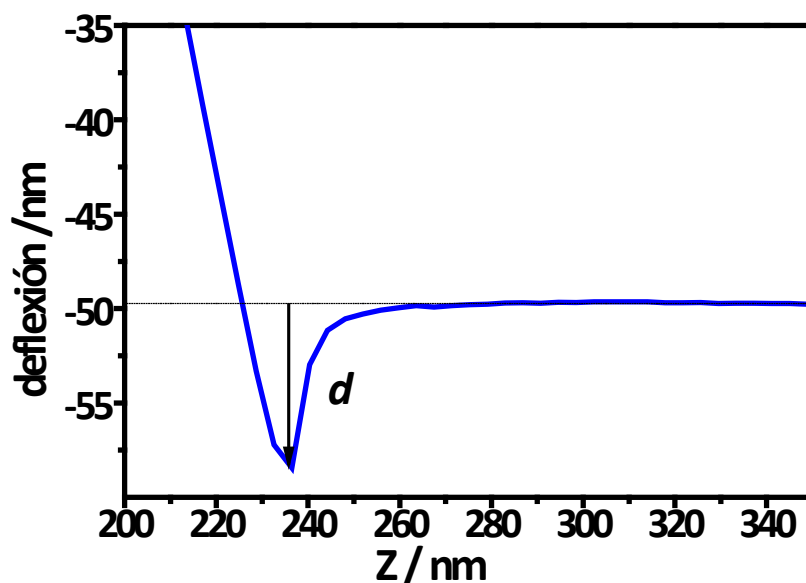


Figura 6.8 Curva de fuerza correspondiente a un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> modificado con NPs Ag. La distancia  $d$  es la diferencia entre la posición inicial y final del cantiléver. La curva fue registrada previamente al barrido de la superficie aplicando una fuerza tal que arrastró las NPs Ag.

Para estudiar mejor la estructura de los agregados se prepararon sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> que fueron incubados en dispersiones de NPs Ag durante períodos cortos de tiempo. Luego de una incubación de 45 minutos se pudieron observar agregados, aunque en este caso la superficie de Ti/TiO<sub>2</sub> no estaba uniformemente cubierta. Se pudo

comprobar que los agregados eran de menor tamaño que los correspondientes a 24 hs de incubación (Figura 6.9 a), pudiéndose observar en muchos casos NPs Ag individuales que forman parte de las islas. En las imágenes de la Figura 6.9 a aparecen algunas líneas debido a que la punta del AFM movió de su posición inicial algunas NPs superficiales débilmente adheridas a los aglomerados. Se realizó el análisis de secciones transversales a partir de las imágenes de NPs individuales para estimar el diámetro de las NPs adsorbidas. Se obtuvo un valor promedio de 10 nm (Figura 6.9 b), el cual se acerca bastante al obtenido a partir de las imágenes de TEM (Capítulo 4 sección 4.2.3.2.4). Por otra parte, para tiempos cortos no se observó en general más de una sola capa de NPs Ag agregadas sobre la superficie.

Por otra parte, a partir de las imágenes fue posible estimar el diámetro de las NPs individuales adsorbidas que resultó ser de 10 nm. El tamaño obtenido por AFM fue acorde al obtenido por TEM, el cual fue de  $6 \pm 2$  nm, si se tienen en cuenta los siguientes factores: i) en el caso de las medidas de AFM también se está midiendo el recubrimiento de las NPs el cual fue de aproximadamente 1 nm y ii) las NPs adsorbidas ya poseían cierto tiempo de añejamiento, lo cual puede haber incrementado también su tamaño (Capítulo 4 sección 4.2.3.2.4).

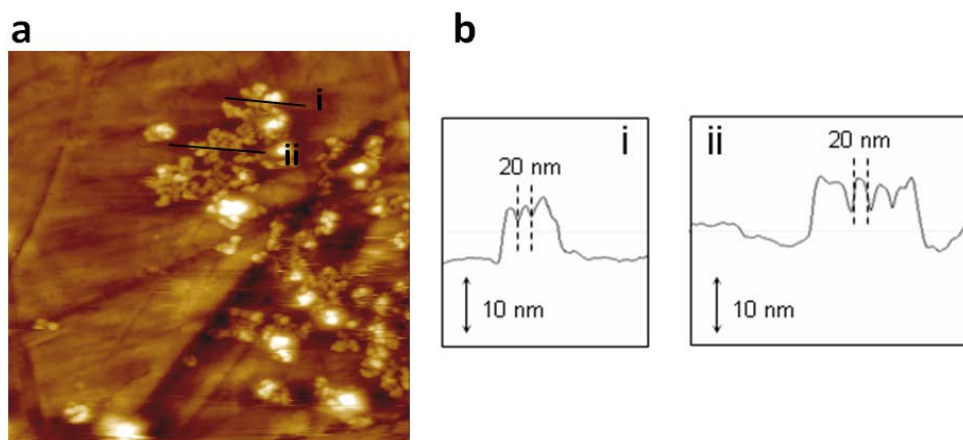


Figura 6.9. Medidas de AFM en modo contacto de sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> modificados con NPs Ag (en aire). a) Imagen de alta resolución de AFM (760 x 760 nm<sup>2</sup>) de NPs individuales observadas después de 45 minutos de incubación en un solución coloidal de NPs Ag y b) corte transversal de (i y ii) de la imagen mostrada en a), en la que se midió la diámetro de las NPs individuales. Se muestra también el diámetro medido para dos NPs.

Por lo tanto, se pudo concluir que los agregados estaban formados por NPs Ag individuales, tal como se ha informado para NPs Au recubiertas con un tiol y adsorbidas espontáneamente sobre HOPG [28], y que éstas, una vez adsorbidas sobre la superficie, no sufrieron un proceso de maduración de Ostwald (“Ostwald ripening”) apreciable [29], el cual se hubiese visto reflejado en un aumento considerable del tamaño de las NPs.

En cuanto a las interacciones de las NPs con el sustrato, es conocida la afinidad de los ácidos carboxílicos por las superficies de óxido, aunque tampoco puede descartarse la influencia de las interacciones de van der Waals. Dobson *et al.*, por ejemplo, mostraron la adsorción de diferentes ácidos carboxílicos sobre la superficie de TiO<sub>2</sub> por espectroscopía infrarroja (IR). Además, informaron de que la presencia de un segundo grupo carboxilato permite la formación de estructuras más estables sobre la superficie del TiO<sub>2</sub> [30]. Asimismo, Ojamäe *et al.* demostraron la adsorción de diferentes ácidos carboxílicos sobre la superficie de TiO<sub>2</sub>, los cuales incluían al ácido cítrico, mediante IR y cálculos. Ellos evidenciaron la formación de enlaces coordinados tipo puente y monodentados entre la superficie y el grupo carboxilato, siendo esta última la más estable en moléculas con dos grupos carboxilatos [31]. Además, Weisz *et al.* propusieron que los ácidos carboxílicos forman complejos sobre superficies de titanio oxidado [32].

A fin de obtener evidencia adicional se realizaron medidas de XPS de sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> incubados en una solución de citrato, encontrándose la señal típica de C 1s asignada a especies carboxilato en aproximadamente 289 eV (Figura 6.10), lo cual indica que esos iones se adsorbieron espontáneamente sobre la superficie oxidada. A su vez, para poder comprender mejor el rol del citrato como recubrimiento, se modificaron las NPs Ag citratadas (en dispersión) con polisorbatos (Tween 20), en los cuales predominan los grupos -OH. Se siguió el protocolo propuesto por Aslan *et al.* [33] para NPs Au, mediante el cual el citrato es reemplazado como ligando por una capa de polisorbatos. Se realizaron medidas adicionales de XPS con Ti/TiO<sub>2</sub> modificados con NPs Ag recubiertas con polisorbatos y se compararon con los resultados de las NPs Ag recubiertas con citrato. En todos los casos se emplearon dispersiones de NPs Ag de la misma concentración. El análisis de las medidas de XPS con espectros de baja resolución demostró que el cociente



de intensidades Ag/Ti siempre fue mayor para las NPs Ag recubiertas con citrato (en promedio unas 7 veces mayor) que para las modificadas con polisorbatos. Por lo tanto, es razonable atribuir la gran afinidad y fuerte interacción entre las NPs Ag recubiertas de citrato y la superficie oxidada del Ti al recubrimiento de citrato de las NPs.

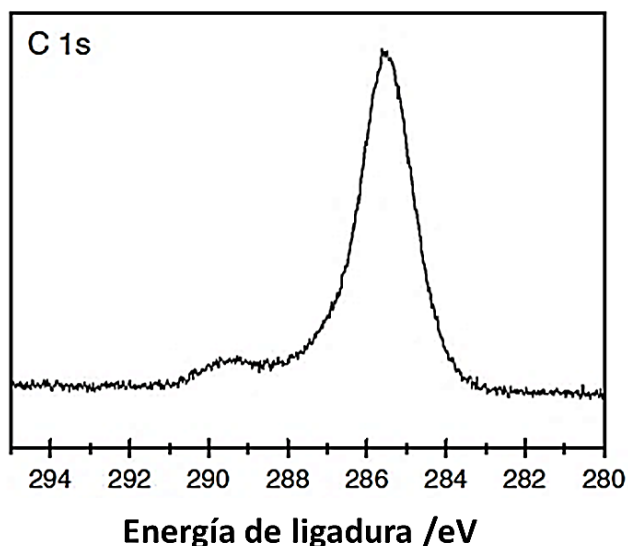


Figura 6.10. Espectro de alta resolución de XPS de un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> sumergido en una solución 17 mM de citrato de sodio. La solución corresponde a la usada en la preparación de las NPs.

Como se ha mencionado anteriormente, la altura de las islas observadas mediante AFM corresponde a varias capas de NPs, lo cual indicaría que las interacciones nanopartícula-nanopartícula también están involucradas en el proceso de estabilización de los agregados. En este caso podemos pensar que, además de las fuerzas de van der Waals (tal como propusieron Grumelli *et al.* para el caso de la adsorción de NPs Au sobre HOPG [28]), la formación de enlaces de hidrógeno entre los citrato ha favorecido la formación de los agregados de NPs. De hecho, en el caso de superredes de NPs Au recubiertas con ácidos carboxílicos, Yao *et al.* mostraron que éstas son capaces de autoensamblarse formando estructuras en 2D y 3D. En este caso los enlaces de hidrógeno eran el tipo de interacción interpartícula predominante y el mediador que regulaba el espaciado entre NPs [34].

## 6.5 Estudio de la liberación de iones Ag(I) en medios acuosos

Anteriormente se ha mencionado que la acción bactericida de las NPs Ag se debe a mecanismos que involucran la interacción de las NPs y/o los iones Ag(I) con las bacterias. En el caso de NPs Ag adsorbidas de forma relativamente fuerte sobre la superficie de Ti/TiO<sub>2</sub>, es válido pensar que las NPs Ag no son capaces de liberarse al medio, por lo que el mecanismo de acción principal estaría dado por la liberación de iones Ag(I). Por este motivo, es importante poder determinar en qué medida las NPs Ag inmovilizadas sobre la superficie de Ti/TiO<sub>2</sub> se oxidan liberando iones Ag(I) al medio [35, 36]. En la literatura hay varios trabajos acerca de la liberación de iones Ag(I) a partir de NPs Ag adsorbidas. Por ejemplo, Roe *et al.* determinaron la concentración de iones plata liberados de las NPs inmovilizadas en la superficie de un catéter a través de estudios con Ag radiactiva [37]. También, Joyce-Wohrmann *et al.* informaron valores correspondientes a la cantidad de iones liberados de las NPs Ag desde la superficie de catéteres por *stripping* anódico [38], mientras que Zhao *et al.* determinaron la concentración de iones liberados desde nanotubos de TiO<sub>2</sub> modificados con NPs Ag mediante espectroscopía de emisión por plasma [21]. En todos los casos la determinación de la concentración y/o cantidad de iones liberados dependerá, entre otras cuestiones, de la cantidad de NPs Ag adsorbidas sobre la superficie del soporte, del recubrimiento de las nanopartículas, del límite de detección la técnica y del medio en el que se realice la liberación de iones Ag, ya que este ion precipita con bastante facilidad.

El objetivo del estudio fue determinar la concentración de iones Ag(I) liberados por las NPs Ag adsorbidas sobre los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> (Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg) y por sustratos de Ag masiva de dimensiones similares y comparar estos valores con los correspondientes a la máxima concentración de Ag(I) capaz de existir en solución fisiológica. Para ello, se realizaron medidas con espectroscopía de absorción atómica (AA) con horno de grafito.

### 6.5.1 Ensayos de liberación de iones Ag(I)

Los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg se prepararon tal como se describió previamente (sección 6.2). Luego de ser retirados de la dispersión coloidal de NPs Ag, éstos se recubrieron con esmalte en su parte posterior. Esto se hizo para poder determinar la cantidad de iones Ag(I) provenientes sólo de la cara pulida a espejo del sustrato y para asegurar condiciones similares en todos los ensayos. Se realizó el mismo procedimiento con los sustratos de Ag.

Los ensayos de liberación se realizaron en agua desionizada para evitar en una primera instancia las complicaciones que existen con medios complejos como los medios de cultivo, caldo nutritivo y DMEM, que se usaron en los ensayos con bacterias y con células eucariotas, respectivamente. Estos medios están compuestos por proteínas con grupos tiol, cloruros, iones, azúcares, etc. que hacen precipitar a los iones Ag(I) o forman sales insolubles con los mismos y, por lo tanto, interfieren en la determinación correcta de la concentración de Ag(I) en las soluciones a medir. Cada sustrato se colocó en un recipiente individual con 3 mL de H<sub>2</sub>O desionizada a 30°C. Se realizaron ensayos de 4 y 24 hs.

#### 6.5.1.1 Medidas de Absorción Atómica

Se realizaron medidas de espectroscopía de absorción atómica (AA) de las soluciones obtenidas al sumergir los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y de Ag en agua a 30°C (preparados tal como se explicó en la sección anterior). En este caso los 3 mL de agua desionizada puestos en contacto con los sustratos se llevaron a 6 mL con HNO<sub>3</sub> para alcanzar una concentración final igual a 0,1 M. Los sustratos de Ag se utilizaron con fines comparativos. Las medidas de AA con horno de grafito fueron realizadas en el Servicio de Trazas de la Fac. de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

En la Tabla 6.1 se muestran los resultados obtenidos para la determinación de la concentración de Ag total de las soluciones expuestas a los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPs Ag y de Ag. Como se puede notar, los valores obtenidos de la concentración de Ag para 4 hs y 24 hs en agua de los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg fueron 0,05 mg/L (0,46 µM) y 0,07 mg/L

(0,65  $\mu\text{M}$ ), respectivamente. Con respecto a los valores de concentración de iones  $\text{Ag(I)}$  liberados de los sustratos de  $\text{Ag}$ , se encontraron valores similares de concentración de  $\text{Ag}$  para 4 y 24 hs, con un comportamiento muy parecido al observado para los sustratos  $\text{Ti/TiO}_2\text{-NPsAg}$  (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Concentración de  $\text{Ag}$  total de las soluciones expuestas a sustratos de  $\text{Ti/TiO}_2\text{-NPsAg}$  y de  $\text{Ag}$  masiva para tiempos de liberación iguales a 4 y a 24 hs

Concentración de $\text{Ag}$ total			
$\text{Ti/TiO}_2\text{-NPsAg}$		$\text{Ag}$	
4hs	24 hs	4 hs	24 hs
0,05 mg/L	0,07 mg/L	0,06 mg/L	0,07 mg/L

Para entender mejor la magnitud de los valores obtenidos se estimó la cantidad de  $\text{Ag}$  adsorbida sobre la superficie de  $\text{Ti/TiO}_2$ . Para ello se tuvieron en cuenta los datos obtenidos por XPS y AFM (descritos en secciones anteriores). Se consideró un diámetro promedio de los agregados de 200 nm y una altura promedio de 80 nm. Para el cálculo se empleó el valor de cubrimiento obtenido mediante XPS y AFM, es decir 0,09. La cantidad de  $\text{Ag}$  total sobre la superficie del sustrato estimada fue de  $\approx 7 \times 10^{-8}$  moles de  $\text{Ag}/\text{cm}^2$  (ver Apéndice B), indicando que la cantidad de  $\text{Ag}$  liberada de los sustratos de  $\text{Ti/TiO}_2\text{-NPsAg}$  por 4 y 24 hs corresponde a un 2,5% y 3,6% con respecto a la cantidad total de  $\text{Ag}$  adsorbida total. Además, los valores obtenidos a 4 y 24 hs fueron similares, lo cual mostraría que el proceso de liberación de iones fue constante. Este comportamiento también fue informado en la literatura por otros autores [39]. Asimismo, Pallavicini *et al.* observaron para sustratos de vidrio modificados con NPs  $\text{Ag}$  que únicamente se liberaba un 15% de  $\text{Ag}$  con respecto a la cantidad total  $\text{Ag}$ , en forma progresiva hasta alcanzar un valor determinado y mantenerse constante durante los días posteriores [40]. Este comportamiento también fue informado en otros trabajos, en los que se encontró que inicialmente se liberan grandes cantidades de  $\text{Ag(I)}$ , pero éstas van disminuyendo

gradualmente en dos semanas hasta alcanzar una concentración que corresponde a la mitad de la concentración inicial de Ag(I) medida [21]. Cabe mencionar que los tiempos elegidos para estudiar la liberación de iones Ag(I), 4 y 24 hs, están relacionados los ensayos realizados con bacterias que se describirán en el próximo Capítulo.

Si se comparan los valores obtenidos para un mismo tiempo de liberación utilizando los dos tipos de sustratos (Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y Ag), se encuentra que los valores son similares. Para interpretar estos resultados, se calculó la cantidad de Ag superficial expuesta al medio en el caso de los agregados de NPs Ag y Ag masiva (ver Apéndice B). Para esto se supuso que los agregados de NPs Ag sobre la superficie de Ti/TiO<sub>2</sub> poseen una forma cilíndrica y que sólo la parte expuesta del cilindro es capaz de liberar iones Ag al medio. Mediante este cálculo se obtuvo un valor para el número de átomos de Ag superficiales de aproximadamente  $2,3 \times 10^{14}$  átomos/cm<sup>2</sup> del sustrato expuesto al medio. La cantidad de átomos de Ag expuestos en una superficie de un sustrato de Ag masiva (111) es de  $1 \times 10^{15}$  átomos de Ag/cm<sup>2</sup> [41]. Al comparar ambos valores se puede observar que el número de átomos/cm<sup>2</sup> para la superficie de titanio modificada con NPs es aproximadamente un orden de magnitud menor que para el sustrato de Ag masiva.

Se puede concluir así que el número de átomos de Ag expuestos al medio es similar para ambos sustratos, lo que explica que la concentración de iones Ag liberados del sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg sea similar a la correspondiente al sustrato de Ag (Tabla 6.1). Además, como se ha mencionado en Capítulo 5 para el caso de bacterias planctónicas, las NPs individuales fueron capaces de liberar una gran cantidad de iones Ag debido a la alta relación de área/volumen, la presencia de defectos, etc.

## 6.6 Conclusiones

Mediante el análisis de los datos de AFM y XPS se pudo determinar que las NPs Ag recubiertas con citrato se adsorben espontáneamente sobre sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> luego de una inmersión de 24 hs en dispersiones de NPs Ag, obteniéndose un cubrimiento

aproximado de 0,09. Las NPs se adsorbieron formando islas tridimensionales con un tamaño entre 100 y 300 nm y una altura promedio de 80 nm. Las mismas se encontraron homogéneamente distribuidas sobre la superficie de Ti/TiO<sub>2</sub> y resultaron ser estables en el tiempo. Por otro lado, para tiempos de inmersión más cortos (45 min) se pudo observar mediante AFM la presencia de NPs individuales. En el proceso de adsorción de las NPs sobre la superficie están involucradas tanto las interacciones entre las nanoestructuras y el sustrato (existe una gran afinidad de los grupos carboxilato por el TiO<sub>2</sub>) como también las interacciones entre NPs (posiblemente tanto fuerzas de van der Waals como enlaces de hidrógeno). De esa manera, mediante dos técnicas distintas (XPS, una técnica promedio, y AFM, una técnica local) se pudo obtener un análisis completo de la superficie modificada. Además, se demostró que las NPs adsorbidas sobre la superficie de Ti/TiO<sub>2</sub> liberaron concentraciones de Ag similares a las de sustratos de Ag masiva debido a que el área de átomos expuestos al medio es aproximadamente igual en ambos casos.

En la literatura se han descrito diversas estrategias más complejas para modificar con plata superficies de titanio u óxido de titanio [42-44]. Sin embargo, el método que hemos utilizado en este trabajo permite obtener superficies homogéneamente cubiertas por islas de NPs Ag con muy poco esfuerzo, costos reducidos y una metodología muy simple, demostrando su fácil y práctica aplicación sobre sustratos de Ti.

El método desarrollado puede ser aplicado de manera sencilla sobre superficies de implantes de Ti, como prótesis dentales u ortopédicas, con el objetivo final de inhibir la colonización bacteriana, la cual ocasiona infecciones y grandes costos al sistema de salud. Con una pequeñísima cantidad de Ag en forma nanoparticulada se obtienen resultados similares a los obtenidos sobre Ag masiva, con la ventaja de que ésta se encuentra sobre un material de interés en prótesis. Además, debido a la sencillez del método no sería necesario contar con personal altamente calificado o equipamiento especializado para la preparación de los implantes o prótesis, ya que se podría comprar la dispersión de NPs Ag y sumergir los sustratos antes de la implantación.

## Referencias bibliográficas

1. Lütjering, G. y Williams, J.C., Titanium. 2007, Springer.
2. Chang, R. y Herranz, R.Z., Química. 2007, McGraw-Hill.
3. Leyens, C. y Peters, M., Titanium and Titanium Alloys. 2006, Wiley.
4. Geetha, M., Singh, A.K., Asokamani, R. y Gogia, A.K., Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review, *Progress in Materials Science*, 2009, (54), 397-425.
5. Callister, W.D., Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales. I. 2002, Editorial Reverte.
6. KALPAKJIAN, S.A., SCHMID, S.R.A., García, G.S. y López, U.F., Manufactura, ingeniería y tecnología. 2002, Pearson Educación.
7. Oshida, Y., Bioscience and Bioengineering of Titanium Materials. 2010, Elsevier Science.
8. Balazic, M., Kopac, J., Jackson, M.J. y Ahmed, W., Review: titanium and titanium alloy applications in medicine, *International Journal of Nano and Biomaterials*, 2007, (1), 3-34.
9. Niinomi, M., Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods, *Science and Technology of Advanced Materials*, 2003, (4), 445-454.
10. Akay, M., Wiley encyclopedia of biomedical engineering. 6. [T - Z, Index]. 2006, John Wiley & Sons Incorporated.
11. Roszek, B., Jong, W.d. y Geertsma, R., Nanotechnology in medical applications: state-of-the-art in materials and devices, 2005.
12. Kasemo, B., Biological surface science, *Surface Science*, 2002, (500), 656-677.
13. Katz, E. y Willner, I., Integrated Nanoparticle–Biomolecule Hybrid Systems: Synthesis, Properties, and Applications, *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, (43), 6042-6108.
14. Sakiyama-Elbert, S.E. y Hubbell, J.A., FUNCTIONAL BIOMATERIALS: Design of Novel Biomaterials, *Annual Review of Materials Research*, 2001, (31), 183-201.
15. Kumar, C.S., Hormes, J. y Leuschner, C., Nanofabrication towards biomedical applications, 2006, Wiley-VCH.
16. Izman, S., Abdul-Kadir, M.R., Anwar, M., Nazim, E.M., Rosliza, R., Shah, A. y Hassan, M.A., Surface Modification Techniques for Biomedical Grade of Titanium Alloys: Oxidation,

Carburization and Ion Implantation Processes, *Titanium Alloys - Towards Achieving Enhanced Properties for Diversified Applications*, 2012.

17. Liu, X., Chu, P.K. y Ding, C., Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 2004, (47), 49-121.
18. Harris, L.G., Tosatti, S., Wieland, M., Textor, M. y Richards, R.G., Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(L-lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) copolymers, *Biomaterials*, 2004, (25), 4135-4148.
19. Chua, P.-H., Neoh, K.-G., Kang, E.-T. y Wang, W., Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion, *Biomaterials*, 2008, (29), 1412-1421.
20. Juan, L., Zhimin, Z., Anchun, M., Lei, L. y Jingchao, Z., Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial effect, *International journal of nanomedicine*, 2010, (5), 261.
21. Zhao, L., Wang, H., Huo, K., Cui, L., Zhang, W., Ni, H., Zhang, Y., Wu, Z. y Chu, P.K., Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles, *Biomaterials*, 2011, (32), 5706-5716.
22. Secinti, K.D., Özalp, H., Attar, A. y Sargon, M.F., Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants, *Journal of Clinical Neuroscience*, 2011, (18), 391-395.
23. Pouilleau, J., Devilliers, D., Garrido, F., Durand-Vidal, S. y Mahé, E., Structure and composition of passive titanium oxide films, *Materials Science and Engineering: B*, 1997, (47), 235-243.
24. C. D. Wagner, W.M.R., L. E. Davis, J. F. Moulder, and G. E. Mullenberg ed. *Handbook of X-Ray Photoelectron Spectroscopy*. ed. P.-E. Corp. 1979: Eden Prairie, Minn, USA.
25. McCafferty, E. y Wightman, J.P., An X-ray photoelectron spectroscopy sputter profile study of the native air-formed oxide film on titanium, *Applied surface science*, 1999, (143), 92-100.
26. Waterhouse, G.I.N., Bowmaker, G.A. y Metson, J.B., Oxidation of a polycrystalline silver foil by reaction with ozone, *Applied surface science*, 2001, (183), 191-204.
27. Jablonski, A., Salvat, F. y Powell, C., NIST electron elastic-scattering cross-section database, *National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland*, 2003, (20899), 22.
28. Grumelli, D., Vericat, C., Benitez, G., Vela, M.E., Salvarezza, R.C., Giovanetti, L.J., Ramallo-López, J.M., Requejo, F.G., Craievich, A.F. y Shon, Y.S., Thiol-Capped Gold Nanoparticles on



- Graphite: Spontaneous Adsorption and Electrochemically Induced Release, *The Journal of Physical Chemistry C*, 2007, (111), 7179-7184.
29. Cushing, B.L., Kolesnichenko, V.L. y O'Connor, C.J., Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles, *Chemical Reviews*, 2004, (104), 3893-3946.
  30. Dobson, K.D. y McQuillan, A.J., In situ infrared spectroscopic analysis of the adsorption of aliphatic carboxylic acids to TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> from aqueous solutions, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 1999, (55), 1395-1405.
  31. Ojamäe, L., Aulin, C., Pedersen, H. y Käll, P.-O., IR and quantum-chemical studies of carboxylic acid and glycine adsorption on rutile TiO<sub>2</sub> nanoparticles, *Journal of colloid and interface science*, 2006, (296), 71-78.
  32. Weisz, A.D., Regazzoni, A.E. y Blesa, M.A., ATR-FTIR study of the stability trends of carboxylate complexes formed on the surface of titanium dioxide particles immersed in water, *Solid State Ionics*, 2001, (143), 125-130.
  33. Aslan, K. y Pérez-Luna, V.H., Surface Modification of Colloidal Gold by Chemisorption of Alkanethiols in the Presence of a Nonionic Surfactant, *Langmuir*, 2002, (18), 6059-6065.
  34. Yao, H., Kojima, H., Sato, S. y Kimura, K., Interparticle Spacing Control in the Superlattices of Carboxylic Acid-Capped Gold Nanoparticles by Hydrogen-Bonding Mediation, *Langmuir*, 2004, (20), 10317-10323.
  35. Lok, C.-N., Ho, C.-M., Chen, R., He, Q.-Y., Yu, W.-Y., Sun, H., Tam, P.K.-H., Chiu, J.-F. y Che, C.-M., Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities, *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2007, (12), 527-534.
  36. Liu, J. y Hurt, R.H., Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids, *Environmental science & technology*, 2010, (44), 2169-2175.
  37. Roe, D., Karandikar, B., Bonn-Savage, N., Gibbins, B. y Rouillet, J.-B., Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2008, (61), 869-876.
  38. Joyce-Wöhrmann, R.M. y Münstedt, H., Determination of the silver ion release from polyurethanes enriched with silver, *Infection*, 1999, (27), S46-S48.
  39. Chen, Y., Zheng, X., Xie, Y., Ji, H., Ding, C., Li, H. y Dai, K., Silver release from silver-containing hydroxyapatite coatings, *Surface and Coatings Technology*, 2010, (205), 1892-1896.
  40. Pallavicini, P., Taglietti, A., Dacarro, G., Antonio Diaz-Fernandez, Y., Galli, M., Grisoli, P., Patrini, M., Santucci De Magistris, G. y Zaroni, R., Self-assembled monolayers of silver nanoparticles firmly grafted on glass surfaces: Low Ag<sup>+</sup> release for an efficient antibacterial activity, *Journal of colloid and interface science*, 2010, (350), 110-116.

41. Chelvayohan, M. y Mee, C.H.B., Work function measurements on (110), (100) and (111) surfaces of silver, *Journal of Physics C: Solid State Physics*, 1982, (15), 2305.
42. Das, K., Bose, S., Bandyopadhyay, A., Karandikar, B. y Gibbins, B.L., Surface coatings for improvement of bone cell materials and antimicrobial activities of Ti implants, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2008, (87B), 455-460.
43. Dávila-Martínez, R.E., Cueto, L.F. y Sánchez, E.M., Electrochemical deposition of silver nanoparticles on TiO<sub>2</sub>/FTO thin films, *Surface Science*, 2006, (600), 3427-3435.
44. Naoi, K., Ohko, Y. y Tatsuma, T., TiO<sub>2</sub> Films Loaded with Silver Nanoparticles: Control of Multicolor Photochromic Behavior, *Journal of the American Chemical Society*, 2004, (126), 3664-3668.

# Capítulo 7

## Adhesión y viabilidad de bacterias sobre sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> modificados con nanopartículas de Ag

### 7.1 Introducción

Uno de los grandes inconvenientes relacionados con los materiales implantables es la adhesión y colonización bacteriana, que lleva a la formación de biofilms sobre la superficie de dispositivos médicos tales como catéteres, válvulas cardíacas e implantes ortopédicos y dentales [1, 2]. A pesar de que los inconvenientes se minimizan luego de la utilización de técnicas asépticas o de tratamiento profilácticos con antibióticos vía oral, el contar con dispositivos médicos que tuvieran incorporadas sustancias con propiedades antimicrobianas podrían proporcionar una protección adicional y reducirían aún más el riesgo de infecciones [3, 4]. Como se ha mencionado anteriormente (ver Capítulo 6), actualmente se han empezado a modificar las superficies de estos materiales con agentes bactericidas como antibióticos [5, 6], péptidos[7] y compuestos de Ag, ya sea en forma de

iones o nanopartículas. En particular, se han propuesto la utilización de NPs Ag sobre dispositivos para hacer frente a la proliferación microbiana por su amplia capacidad microbicida y la falta de resistencia microbiana ante estos materiales

En general, los compuestos de Ag pueden impregnarse, revestir, o depositarse sobre el dispositivo médico por diversas técnicas, tales como deposición física de vapor (PVD), deposición química de vapor (CVD), electroquímicas, modificación química o por inmersión en una solución de especies de Ag o en una dispersión de NPs Ag. En la literatura hay una amplia gama de insumos y dispositivos que se han modificado con NPs Ag, tales como vendas [8-10], catéteres[11-13], implantes [14, 15], barbijos [16] y hasta pinturas [17]. El objetivo final de todas estas técnicas es crear capas delgadas de NPs Ag sobre la superficie de los dispositivos o embeber las NPs Ag en el material, para inhibir la colonización bacteriana sobre el material.

El Titanio, como los demás materiales usados en implantes, presenta los mismos problemas de formación de biofilms bacterianos sobre su superficie. La estrategia que se ha empezado a aplicar desde hace algún tiempo para evitar este inconveniente es la modificación de la superficie del Ti/TiO<sub>2</sub> con NPs Ag. En la literatura hay diversos antecedentes con respecto a la modificación del titanio con NPs Ag por diversas técnicas. Secinti *et al.* investigaron si los tornillos de Ti recubiertos con NPs Ag podrían inhibir la formación de biofilm en conejos de Nueva Zelanda. El recubrimiento de NPs Ag sobre la superficie de los tornillos se realizó mediante un método sol-gel. Se implantaron éstos y otros tornillos sin modificar (empleados como control) en los conejos. Se analizaron los tornillos y los huesos adyacentes por TEM, SEM y por análisis microbiológico (recuento en placa). No se encontró formación de biofilm en los tornillos recubiertos con NPs Ag, mientras que aquéllos sin recubrimiento desarrollaron biofilms en sus superficies. Los conejos expuestos a tornillos recubiertos con NPs Ag no sufrieron ningún efecto ante la presencia de Ag. Estos hallazgos sugieren que los tornillos recubiertos con NPs Ag son tan seguros como los tornillos de Ti sin revestir, con la ventaja de que el revestimiento ayuda a prevenir la formación de biofilms y la posterior infección [18].

Por otra parte, en el trabajo de Zhao *et al.* se modificaron superficialmente nanotubos de TiO<sub>2</sub> con NPs Ag, mediante inmersión en una solución de AgNO<sub>3</sub> y posterior irradiación con luz UV, y a continuación éstos fueron expuestos a cultivos planctónicos de *S. aureus*. Los resultados mostraron efectividad para matar a las bacterias planctónicas en los primeros días de inhibición de la adhesión bacteriana hasta los 30 días. Sin embargo, los ensayos de citotoxicidad en células osteoblásticas mostraron efectos nocivos como consecuencia de este tratamiento, los que podrían deberse a la velocidad de liberación de iones Ag (I) [19]. Este estudio, a pesar de informar una exposición larga en un cultivo bacteriano, ha demostrado únicamente el efecto de la modificación superficial con NPs Ag sobre bacterias planctónicas y no sésiles. Sin embargo, tal como se ha mencionado en el Capítulo 1, las bacterias de una misma cepa que forman parte de un biofilm son diferentes a las planctónicas en genotipo y fenotipo, siendo más resistentes ante factores como la presencia de un antibiótico, cambios de temperatura, concentración de sales, etc.

En relación con la inhibición de la colonización bacteriana, Ionita *et al.*, describieron el efecto microbicida de un recubrimiento de hidroxapatita y NPs Ag (realizado mediante anodización) en implantes de Ti-Al-Zr (una aleación de Ti con Al y Zr) sobre biofilms de *E. coli*. Se evaluó la capacidad microbicida del recubrimiento mediante halo de crecimiento de las superficies con bacterias adheridas, hallándose una inhibición del crecimiento de *E. coli* del 99,65% [20].

Los trabajos antes mencionados demuestran que la estrategia de modificación superficial de los implantes de Ti con NPs Ag fue efectiva para evitar la colonización bacteriana. Sin embargo, los estudios in vitro sobre formación de biofilms son todavía escasos.

En el Capítulo 6 de este Trabajo de Tesis se describió la modificación superficial de los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> con NPs Ag mediante un método sencillo y eficaz. En este capítulo se estudiará la efectividad del tratamiento superficial de los sustratos de Ti modificado con NPs Ag (Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg) para inhibir la colonización bacteriana y de esa manera evitar el desarrollo de biofilms de *P. aeruginosa* (Gram (-)) y *S. aureus* (Gram (+)) sobre la superficie de los sustratos.

Las condiciones experimentales usadas durante todos los ensayos de *P. aeruginosa* y *S. aureus* del presente capítulo fueron las descritas en el Capítulo 3.

## **7.2 Estudio de la adhesión y viabilidad de las bacterias adheridas sobre los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg**

En esta sección se describirán los ensayos realizados a fin de evaluar la efectividad del tratamiento bactericida de los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> con NPs Ag frente a *P. aeruginosa* y *S. aureus*, cada una representante del grupo Gram (-) y Gram (+). Con este fin se determinó la viabilidad de las bacterias adheridas a los sustratos de titanio modificados con NPs mediante ensayos cualitativos o cuantitativos por distintos métodos: halo de crecimiento, tinción con el kit LIVE/DEAD BacLight<sup>®</sup> y recuento en placa.

Para los ensayos se utilizaron sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> modificados con NPs Ag (sustratos Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg) y sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> sin modificar (Ti/TiO<sub>2</sub>), estos últimos como control. Los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg fueron preparados tal como se describió en el Capítulo 6 sección 6.2. Las condiciones experimentales para la formación del biofilm sobre los sustratos utilizados fueron descritas en el Capítulo 3, sección 3.4.1.

### **7.2.1 Ensayo cualitativo de la adhesión y viabilidad de las bacterias adheridas sobre sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg**

#### **7.2.1.1 Método del Halo de Crecimiento**

En este ensayo se comparó en forma cualitativa la viabilidad de las bacterias adheridas sobre sustratos Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y Ti/TiO<sub>2</sub> control. Para ello se evaluó la capacidad de las bacterias adheridas a cada tipo de sustrato para formar colonias viables sobre ágar estéril en forma de halo alrededor del sustrato (halo de crecimiento). Éste indica

cualitativamente si las bacterias constituyentes del biofilm fueron capaces o no de duplicarse, moverse y colonizar el área que rodea al sustrato.

La formación del biofilm sobre la superficie de los sustratos se realizó según lo descrito en el Capítulo 3 sección 3.4.1. En primer lugar, los sustratos fueron sumergidos verticalmente en un cultivo de *P. aeruginosa* con una concentración igual a  $4 \times 10^9$  UFC/mL durante 4 hs a 30°C. Al finalizar ese tiempo se retiraron los sustratos, se enjuagaron con agua desionizada estéril para retirar las bacterias no adheridas, se apoyaron cuidadosamente sobre el ágar estéril por la cara expuesta a la adhesión bacteriana y se incubaron las placas de Petri a 30°C por 24 hs.

Los resultados se muestran en las fotografías de las placas de Petri de los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y de Ti/TiO<sub>2</sub> control (Figura 7.1). En ambos casos se observó la presencia de un halo de crecimiento, indicando colonización bacteriana sobre el ágar después de 24 hs de incubación. Los valores de halo medidos en las fotografías de la Figura. 7.1 fueron 0,28 cm para el Ti/TiO<sub>2</sub>-NPs Ag y 1,24 cm para el Ti/TiO<sub>2</sub> control. A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que hubo (cierta) inhibición de la colonización bacteriana de *P. aeruginosa* sobre la superficie modificada con respecto al control, lo cual es consistente con resultados de la literatura [20]. Por otra parte, se podría presuponer cierta difusión de iones Ag(I) de los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg en el ágar, los que podrían inhibir el crecimiento de las bacterias sobre éste en la cercanía de los sustratos [19]. Este ensayo sirvió como una primera aproximación para evaluar la efectividad de la modificación de los sustratos de titanio con NPs Ag.

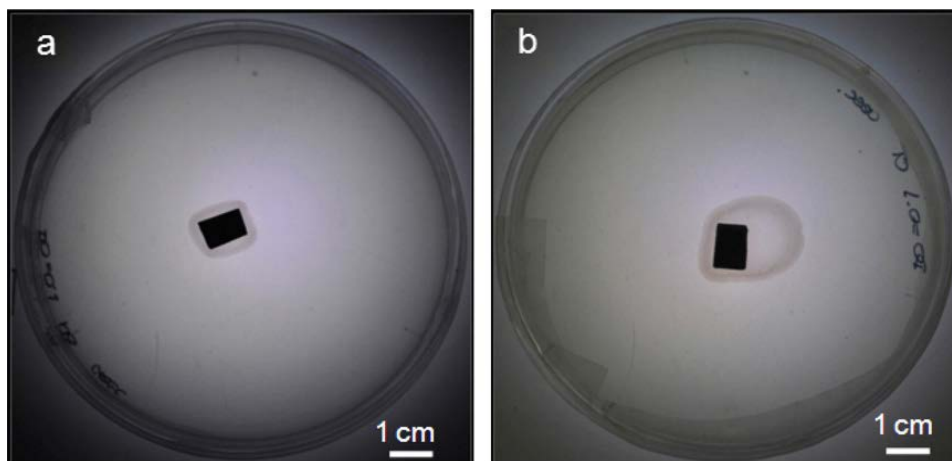


Figura 7.1. Halo de crecimiento de *P. aeruginosa* después de 24 hs de incubación en ágar nutritivo a 30°C. a) Ti/TiO<sub>2</sub> modificado con NPs-Ag y b) Ti/TiO<sub>2</sub> control (sin modificar).

## 7.2.2 Ensayos cuantitativos y semi-cuantitativos de la adhesión y viabilidad de las bacterias adheridas sobre sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPs-Ag.

### 7.2.2.1 Método I: Kit Live/Dead para *P. aeruginosa* y *S. aureus*

En este ensayo se evaluó la capacidad microbicida de los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg sobre bacterias adheridas de *P. aeruginosa* y *S. aureus* en forma semi-cuantitativa. Para ello se formaron biofilms sobre sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> control, Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y Ag masivo, este último a efectos comparativos y se determinó la adhesión y viabilidad de las bacterias adheridas por medio del Kit LIVE/DEAD BacLight®.

La formación del biofilm sobre la superficie de los sustratos se realizó como se describió en el Capítulo 3, sección 3.4.1. Los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg, Ti/TiO<sub>2</sub> y Ag masiva se expusieron a un cultivo bacteriano de cada cepa ensayada en una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL por 4 hs a 30°C. Al finalizar el tiempo de exposición al cultivo bacteriano, se retiraron los sustratos del cultivo, se enjuagaron con agua desionizada estéril y se tiñeron con el Kit LIVE/DEAD BacLight®. El procedimiento de tinción está descrito en el Capítulo 3, sección 3.4.2.1.1 del presente trabajo. Los sustratos se



observaron con un microscopio de epifluorescencia y las imágenes obtenidas se analizaron con el software Image J.

En base a las imágenes de microscopía de epifluorescencia de *P. aeruginosa* (Figura 7.2) sobre sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>, Ti/TiO<sub>2</sub>-NPs Ag y Ag se observó que todos los sustratos fueron colonizados por bacterias organizadas formando biofilms.

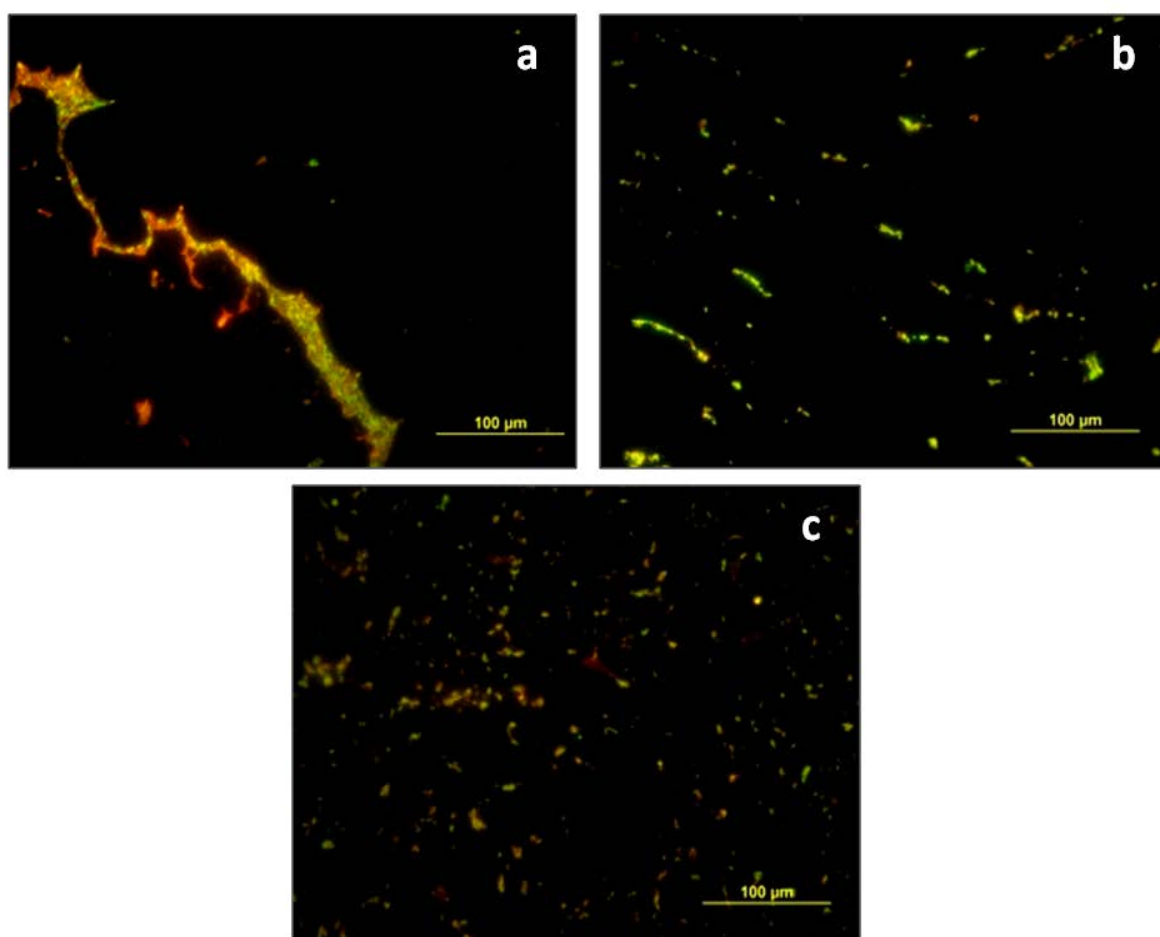


Figura 7.2. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de *P. aeruginosa* adheridas por 4 hs a 30°C sobre a) un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> control, b) un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y c) un sustrato de Ag. La coloración verde indica bacterias vivas y la coloración roja bacterias muertas

En las imágenes del sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> (control) se observaron agregados bacterianos sobre toda la superficie del sustrato con pocas bacterias aisladas (Figura 7.2 a). En los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y Ag se observaron grandes cantidades de bacterias aisladas con poca formación de agregados bacterianos (Figura 7.2 b y c). En una primera observación global de los sustratos se vio que los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y Ag tenían una menor proporción de bacterias adheridas en comparación a los sustratos control.

A partir de la imágenes de epifluorescencia de *P. aeruginosa* se realizó un análisis para determinar los porcentajes de adhesión y de viables (bacterias viables adheridas) sobre los distintos sustratos (Figura 7.3). Las ecuaciones usadas para determinar ambos porcentajes están descritas en el Capítulo 3, sección 3.4.2.1.1. Con respecto al porcentaje de adhesión, se tuvieron en cuenta todas las bacterias adheridas sobre los sustratos, es decir que se cuentan tanto las bacterias viables como las muertas (Figura 7.3 a). Los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y Ag mostraron una leve inhibición en la adhesión aunque sin una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto al sustrato control. Esto puede deberse a que *P. aeruginosa* es capaz de producir una matriz sobre la superficie tóxica gracias a la producción de exopolisácaridos, formando así una barrera física con la superficie que sigue permitiendo la adhesión de las bacterias [21, 22]. Este hecho ya ha sido encontrado en otras superficies con capacidad microbicida [23, 24].

En la Figura 7.3 b se muestra el porcentaje de bacterias viables adheridas de *P. aeruginosa*. Se observó que los valores obtenidos para los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y Ag fueron significativamente menores ( $p < 0,05$ ) con respecto al control. Esta diferencia indica una inhibición de la viabilidad bacteriana sobre los sustratos con Ag

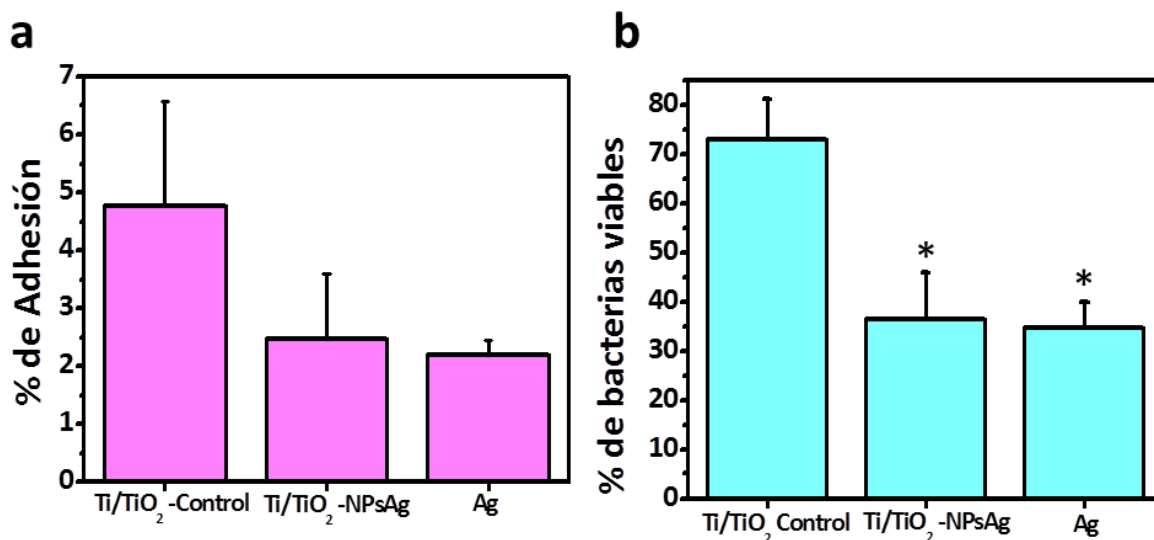


Figura 7.3. Gráficos de a) % de adhesión y b) % de bacterias viables adheridas para *P. aeruginosa* sobre sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> control, Ti/TiO<sub>2</sub> NPs-Ag y Ag. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de un factor (\* $\leq 0,05$ ).

En el caso de *S. aureus*, las imágenes de microscopía de epifluorescencia sobre los diferentes sustratos (Figura 7.4) mostraron colonización bacteriana en todos los casos, con las bacterias organizadas formando biofilms. Los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> control mostraron formación de aglomerados de bacterias y pocas bacterias aisladas (Figura 7.4 a). Por el contrario, en los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y Ag se observaron una gran proporción de bacterias aisladas y pocos agregados de bacterias (Figura 7.4 b y c) con respecto al control, mostrando un comportamiento similar al mencionado con *P. aeruginosa*. Además, en una primera visión global se observó una disminución en la colonización bacteriana sobre los sustratos de Ag y modificados con NPs Ag.

En este caso también se realizó el análisis de las imágenes de para determinar los porcentajes de adhesión y de bacterias viables de los sustratos (Figura 7.5). Los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y de Ag mostraron una disminución en el porcentaje adhesión con respecto al control, aunque sin diferencias significativas (Figura 7.5 a). Por otra parte, la viabilidad de las bacterias adheridas, representada por el porcentaje de bacterias viables,

fue menor en los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y Ag con respecto al control con diferencias significativas (Figura 7.5 b). Estos resultados mostraron el mismo comportamiento que en los ensayos con *P. aeruginosa*, indicando que el tratamiento fue efectivo en la inhibición de la colonización bacteriana para ambas cepas.

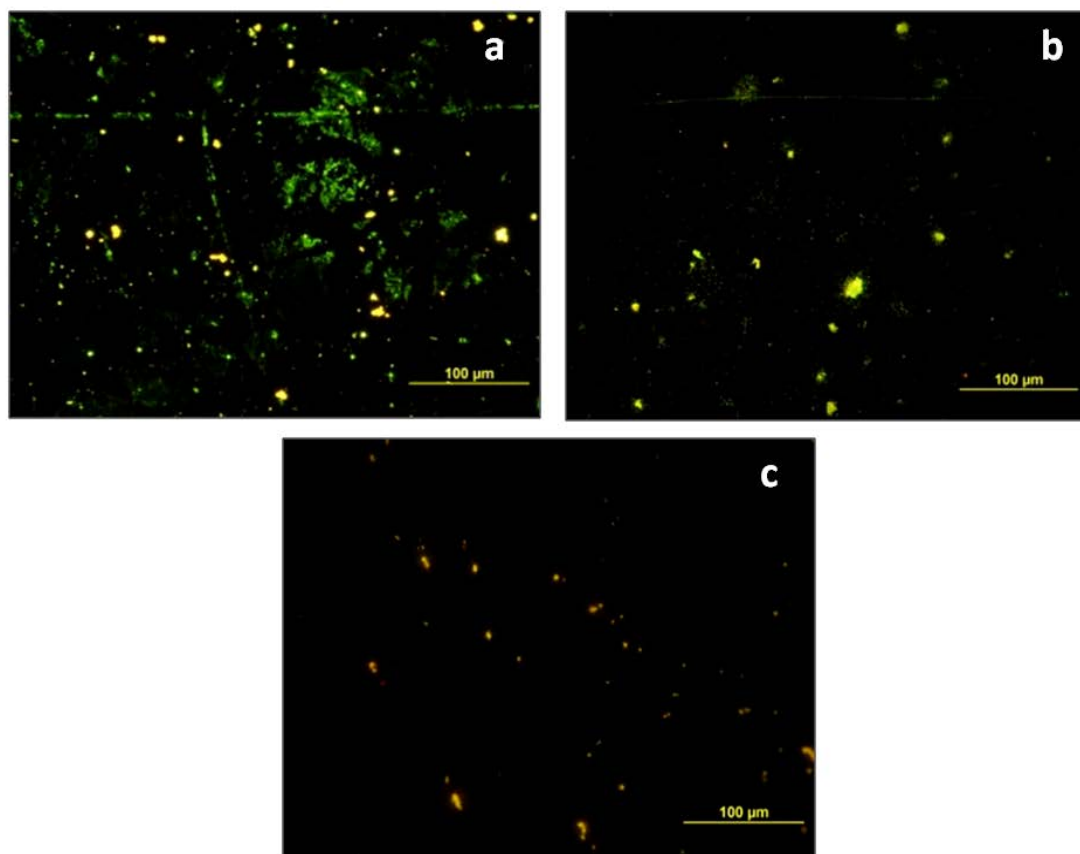


Figura 7.4. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de *S. aureus* adheridas por 4 hs a 30°C sobre a) un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> control, b) un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> NPs-Ag y c) un sustrato de Ag. La coloración verde indica bacterias vivas y la roja bacterias muertas.

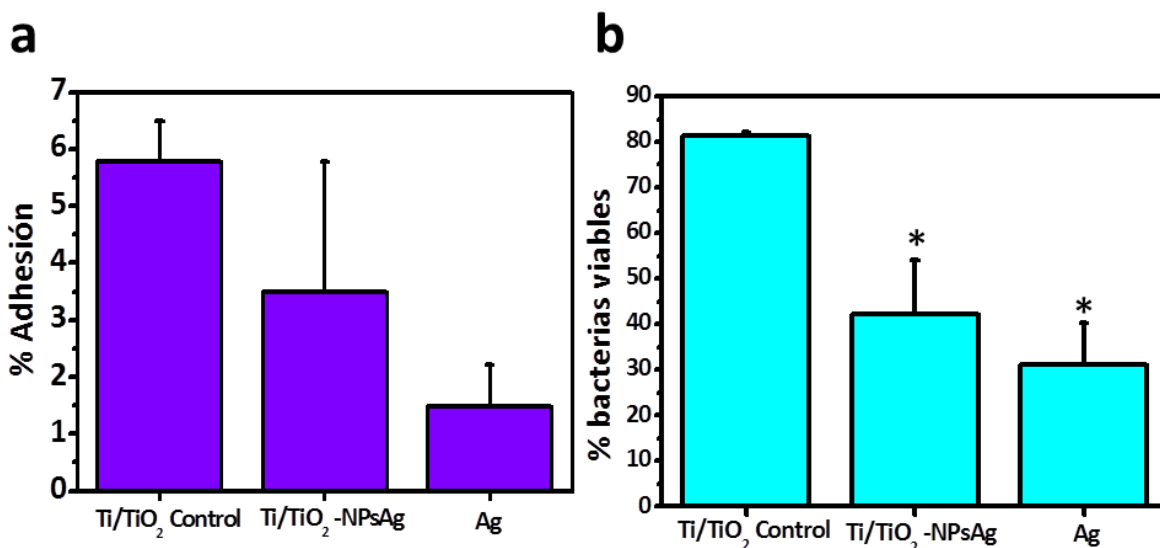


Figura 7.5 Gráficos de a) % de adhesión y b) % de bacterias viables adheridas para *S. aureus* sobre sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> control, Ti/TiO<sub>2</sub> NPs-Ag y Ag. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de un factor (\* $\leq 0,05$ ).

#### 7.2.2.2 Método II: recuento en placa para *P. aeruginosa* y *S. aureus*

A diferencia del ensayo descrito en la sección anterior, en el ensayo de recuento en placa se determinó la concentración de bacterias adheridas viables de *P. aeruginosa* y *S. aureus* sobre los distintos sustratos. La determinación se realizó mediante recuento en placa (ver Capítulo 3 sección 3.4.2.2), mientras que la formación de los biofilms se realizó tal como se describió en la sección anterior.

Los valores obtenidos para *P. aeruginosa* fueron  $7 \times 10^5 \pm 4 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> para Ti/TiO<sub>2</sub>,  $6 \times 10^4 \pm 4 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> para Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y  $2 \times 10^5 \pm 1 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> para Ag masiva (Figura 7.6 a), mientras que para *S. aureus* fueron  $2 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> para Ti/TiO<sub>2</sub> control,  $3 \times 10^5 \pm 2 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> para Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y  $4 \times 10^5 \pm 2 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> para los sustratos de Ag (Figura 7.6 b). En ambos casos el número de bacterias adheridas viables en los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y Ag disminuyó aproximadamente un orden de magnitud con respecto al control, encontrándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores hallados. Además, no hubo prácticamente diferencia entre los sustratos de

Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y Ag, lo cual significa que las NPs Ag adsorbidas en la superficie de Ti/TiO<sub>2</sub> redujeron el número de bacterias de la misma manera que un sustrato de Ag.

Los valores relativos de bacterias viables obtenidos por el método de tinción empleando el Kit LIVE/DEAD fueron mayores a los obtenidos por recuento en placa. Esta diferencia se debió a la técnica en sí misma. La tinción mediante el Kit utiliza una mezcla de dos colorantes, yoduro de propidio y SYTO9, los cuales poseen diferentes habilidades para penetrar la pared celular bacteriana. El fluoróforo SYTO9 tiñe de color verde todas las bacterias, tanto aquéllas con pared celular intacta como las dañadas, mientras que el yoduro de propidio tiñe de color rojo sólo las bacterias con daño en su pared celular. Sin embargo, bajo de ciertas condiciones, las bacterias sin daño en la membrana están vivas pero no son capaces de duplicarse, es decir que no son viables. Es por esto que el número de bacterias “vivas” obtenidas por la tinción está sobreestimada con respecto al recuento en placa. Por el contrario, este segundo método determina la concentración de bacterias vivas y que son capaces de duplicarse después del tratamiento.

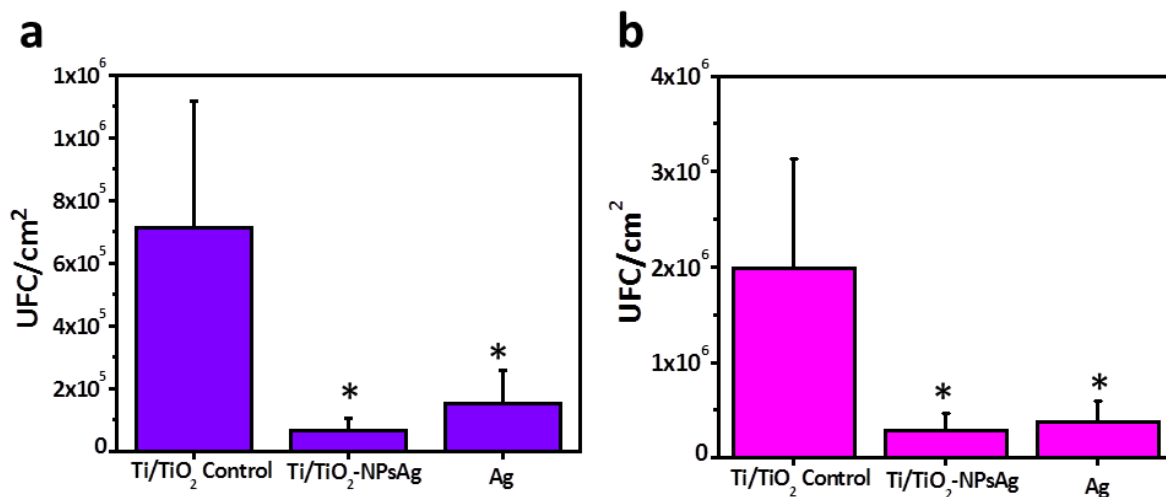


Figura 7.6 Gráficos de bacterias viables adheridas (en UFC/cm<sup>2</sup>) obtenidos a partir de recuento en placa para a) *P. aeruginosa* y b) *S. aureus* sobre sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> control, Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y Ag. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de un solo factor (\* $\leq$  0,05).

En cualquier caso, con ambos métodos es posible concluir que la cantidad de bacterias viables adheridas sobre los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y Ag fue significativamente menor que en los sustratos control y que ambos (Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y Ag) inhibieron de manera similar la colonización bacteriana. Tal como se ha mencionado en el Capítulo 6, la cantidad de Ag adsorbida sobre la superficie de Ti/TiO<sub>2</sub> es aproximadamente  $7 \times 10^{-8}$  moles de Ag/cm<sup>2</sup> (equivalentes a 7,5 µg de Ag/cm<sup>2</sup>), una cantidad de plata muy pequeña comparada con un sustrato masivo. Sin embargo, una estimación de la cantidad de átomos de Ag expuestos al medio para el caso de los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> modificados dio un valor de  $\approx 2,3 \times 10^{14}$  átomos de Ag/cm<sup>2</sup>, mientras que un sustrato de Ag policristalino tiene una densidad superficial de aproximadamente  $1 \times 10^{15}$  átomos de Ag/cm<sup>2</sup> (ver Apéndice B). Por lo tanto, una cantidad ínfima de Ag adsorbida sobre la superficie de Ti/TiO<sub>2</sub> tiene una acción bactericida similar a la de la Ag masiva.

Estos resultados fueron comparados con otros informados en la literatura. Autores como Liao *et al.* encontraron mediante recuento en placa y ensayos de halo de inhibición, una efectividad microbicida del 90% sobre *S. aureus* y *E. coli* para superficies de Ti modificadas con NPs Ag mediante silanización [15]. Por otra parte, Mo *et al.* también hallaron una inhibición de la colonización del 90 % para diversas bacterias sobre superficies de TiO<sub>2</sub> modificadas con hidroxipatita y NPs Ag [24]. Li *et al.* encontraron una inhibición de la colonización del 99 % para *S. aureus* y *E. coli* en films de TiO<sub>2</sub> modificados con Ag mediante plasma [25]. También, Mei *et al.*, con la misma técnica de modificación sobre nanotubos de TiO<sub>2</sub> encontraron una inhibición del 99%, pero con bacterias que forman parte de la flora bucal.[26]. Por otro lado, Page *et al.* utilizando sustratos de TiO<sub>2</sub> modificados con Ag mediante técnicas sol-gel, informaron una inhibición de la colonización del 66 % para *E. coli* [27]. Los resultados encontrados en este trabajo coinciden con la tendencia encontrada en la literatura, es decir, no hubo diferencia en la acción microbicida para bacterias Gram (-) y Gram (+), a pesar de que los tratamientos superficiales fueron diferentes al del presente trabajo. En todos los casos se logró inhibir el crecimiento bacteriano y las capacidades microbicidas fueron similares, concluyendo

que el método usado para la modificación de la superficie, más sencillo que los otros, fue eficaz para inhibir la colonización bacteriana en las cepas ensayadas.

### **7.3 Estudio de la morfología de biofilms bacterianos sobre sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> modificados con NPs Ag**

Como se ha descrito en el Capítulo 1, la formación de un biofilm se ve afectada por varios factores, entre ellos las características fisicoquímicas que presenta la superficie, las que pueden llegar a influenciar la estructura y distribución de la bacterias en el biofilm [23, 28, 29]. Con el objetivo de observar algún cambio en la distribución de las bacterias y poder comparar entre distintas superficies se observaron mediante AFM las superficies de Ti/TiO<sub>2</sub> y Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg con biofilms. Para ello se crecieron biofilms sobre las superficies de los sustratos, tal como se describió en el Capítulo 3, sección 3.4.1 y se observaron éstos por AFM en modo contacto. Los sustratos fueron sumergidos verticalmente en un cultivo separados de *S. aureus* y *P. aeruginosa* con una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL por 4hs a 30°C. Luego, fueron enjuagados con agua desionizada estéril y secados al aire. Las medidas de AFM se realizaron en aire en modo contacto con puntas de nitruro de silicio ( $k = 0.58$  N/m).

#### **7.3.1 Imágenes de AFM de biofilms de *S. aureus***

Se evaluó la morfología del biofilm de *S. aureus* sobre los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> control y de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg. Las imágenes de AFM mostraron bacterias adheridas en ambos sustratos, Ti/TiO<sub>2</sub> control y Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg (Figura 7.7). En el sustrato control se observó la presencia de una estructura organizada de agregados de bacterias adheridas sobre la superficie del sustrato (Figura 7.7 a) y algunas bacterias aisladas. Con respecto a las imágenes de epifluorescencia, con esta técnica se observó en mayor detalle la



formación de los agregados bacterianos, los cuales están formados por varias células individuales (cocos). Por el contrario, en el sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg los cúmulos de bacterias adheridas estaban más dispersos y no presentaron una estructura armada distribuida completamente sobre el sustrato. Además se corroboró la presencia de aglomerados de NPs Ag (recuadro en la Figura 7.7b). Por último, es conocido el hecho que la colonización de una superficie por parte de *S. aureus* genera una matriz extracelular polimérica o un exudado de exopolisacárido [30]. Sin embargo, esto no se observó en los sustratos estudiados mediante AFM.

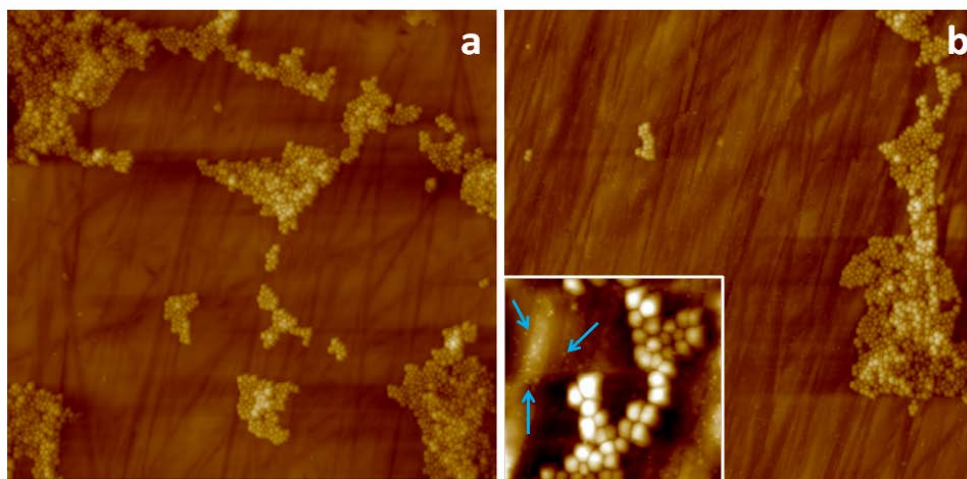


Figura 7.7. Imágenes de AFM de 50 x 50  $\mu\text{m}^2$  en modo contacto de *S. aureus* adheridos sobre a) un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> control y b) un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPs Ag. Inset: detalle de un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg (7,5 x 7,5  $\mu\text{m}^2$ ). Las flechas señalan aglomerados de NPs Ag.

### 7.3.2 Imágenes de AFM de biofilms de *P. aeruginosa*

De manera similar a lo realizado para *S. aureus*, se evaluó la morfología de los biofilms de *P. aeruginosa* sobre los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> control y Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg. A diferencia del ensayo con *S. aureus*, las medidas de AFM se realizaron exponiendo a los sustratos a dos concentraciones diferentes de bacterias ( $\approx 10^{10}$  y  $1 \times 10^8$  UFC/mL) para permitir la formación del biofilm sobre la superficie de los mismos.

En primera instancia se realizaron ensayos con la concentración más elevada, aproximadamente  $10^{10}$  UFC/mL. Las imágenes de AFM mostraron bacterias adheridas en ambos sustratos, Ti/TiO<sub>2</sub> control y Ti/TiO<sub>2</sub> -NPsAg. En el caso de los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> control se observó que el biofilm se organizó mediante agregados de bacterias en forma de “balsas” sobre la superficie del sustrato control (Figura 7.8 a), confirmando las observaciones realizadas por microscopía de epifluorescencia, aunque con mayor detalle. Sin embargo, sobre los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg, las bacterias resultaron estar más dispersas y no presentaron una estructura armada (Figura 7.8 b). Por otra parte, en la superficie de los sustratos modificados se observó la presencia de una gran cantidad de material extracelular exudado por las bacterias, el cual corresponde a EPS, tal componente que ha sido mencionado en secciones anteriores y en el Capítulo 1. Por último fue posible observar los aglomerados de NPs Ag sobre la superficie del Ti/TiO<sub>2</sub> (Figura 7.8 c) aún después un largo período de exposición a un medio acuoso (más de 72 hs), demostrando la gran afinidad de las NPs por la superficie de Ti/TiO<sub>2</sub>.

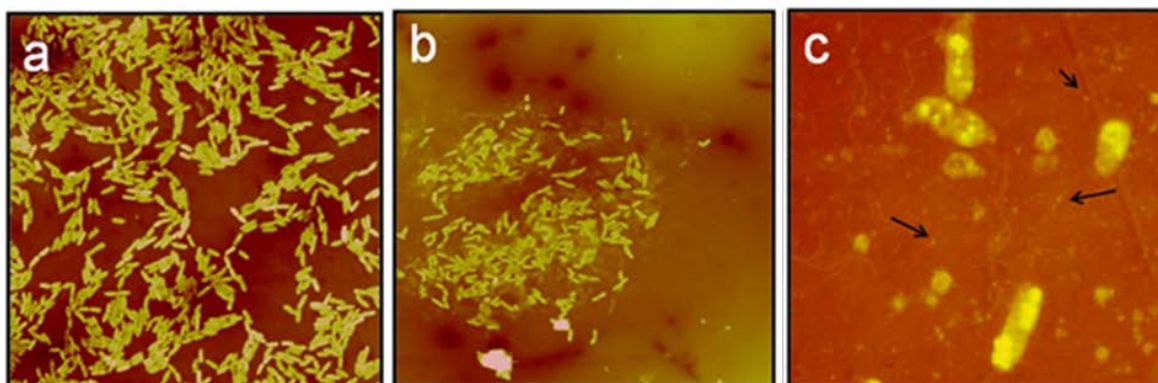


Figura 7.8. Imágenes de AFM en modo contacto de *P. aeruginosa* adheridas sobre a) un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> control ( $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ ), b) un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> modificado con NPs-Ag ( $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ ) y c) un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> modificado con NPs Ag expuesta por 72 hs a un cultivo bacteriano ( $8 \times 8 \mu\text{m}^2$ )

Por otra parte se realizaron ensayos con *P. aeruginosa* manteniendo las mismas condiciones experimentales pero con una concentración de bacterias  $1 \times 10^8$  UFC/mL,

igual a la empleada en los ensayos cuantitativos de adhesión y viabilidad de bacterias de la sección 7.2.2. Las imágenes de sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> control mostraron que las bacterias forman el mismo tipo de agregados mencionados anteriormente con presencia de pocas bacterias aisladas (Figura 7.9 a). Asimismo, en las imágenes de la superficie de los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg se observó la presencia de una gran proporción de bacterias aisladas y pocos agregados (Figura 7.9 b). Por lo tanto, las imágenes de AFM de ambos sustratos confirmaron lo observado por microscopía de epifluorescencia. Además, en este caso también se observó la matriz extracelular exudada alrededor de las bacterias adheridas (Figura 7.9 b, flechas). Tal como se mencionó en el Capítulo 1, *P. aeruginosa* es capaz de producir una matriz extracelular polimérica compuesta por proteínas y polisacáridos como alginato, Pel y Psl [21, 22] cuya producción es parte del proceso del desarrollo del biofilm sobre una superficie. Estos polisacáridos son sintetizados y exudados al exterior celular, acondicionando el medio y dando estructura al biofilm [31-33]. Asimismo, la matriz generada por estos componentes cumple diversas funciones, ya que actúa como barrera, otorga resistencia frente a antibióticos, etc. [3], permitiendo incluso la adhesión de las bacterias sobre superficies tóxicas [23].

Los resultados obtenidos para las bacterias planctónicas de ambas cepas ensayadas con NPs Ag (Capítulo 5) mostraron que *P. aeruginosa* fue más susceptible a la presencia de NPs Ag que *S. aureus*. Sin embargo, cuando se compararon los resultados correspondientes las mismas bacterias adheridas sobre los sustratos, se encontró que la susceptibilidad de ambas, evaluada mediante ensayos de viabilidad, es similar. Como se ha mencionado, en base a imágenes de AFM se observó la presencia de EPS en los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> modificados con NPs Ag expuestos a *P. aeruginosa*, aunque no así en los sustratos expuestos a *S. aureus*. Por ende, es posible suponer que la producción de EPS en *P. aeruginosa* disminuye el contacto de éstas con las NPs Ag, ocasionando una susceptibilidad similar a *S. aureus*, a pesar de las diferencias en la pared celular microbiana. La producción de polisacáridos por parte de las bacterias es responsable de la resistencia de éstas a los antibióticos. Los antibióticos catiónicos, tales como los aminoglucosidos, interaccionan mediante fuerzas electrostáticas con la matriz de alginato

y Pel, la cual está cargada negativamente [31, 34]. Por lo tanto, los polisacáridos excretados por las bacterias que desarrollan el biofilm de *P. aeruginosa* podrían de manera similar atrapar los iones Ag (I) y disminuir así la susceptibilidad de las bacterias adheridas al sustratos comparadas con las bacterias planctónicas, generando resultados similares a los de biofilms de *S. aureus*.

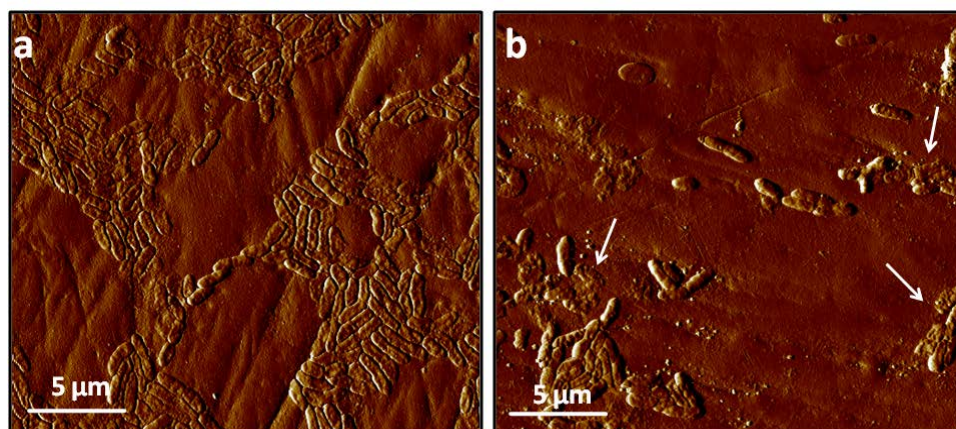


Figura 7.9. Imágenes ( $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ ) de AFM en modo contacto (error de deflexión) de *P. aeruginosa* adheridas sobre a) un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> control y b) un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> modificado con NPs Ag. Las flechas en b) señalan el EPS exudado por las bacterias.

### 7.3.3 Estudio de la rugosidad de la pared celular de *P. aeruginosa*

El objetivo de este ensayo fue determinar posibles cambios en la superficie de la pared celular de bacterias *P. aeruginosa* adheridas sobre sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg, lo cual se debería manifestar como un cambio en la rugosidad de la misma. Se realizaron también ensayos con *S. aureus*, pero las bacterias adheridas no mostraron ningún cambio en la pared celular.

Para el estudio de la rugosidad de la pared celular de *P. aeruginosa* se tomaron al menos 3 imágenes diferentes de zonas elegidas al azar con un tamaño de  $450 \times 450 \text{ nm}^2$ . Las imágenes adquiridas se analizaron con la herramienta Rugosidad del software

Nanoscope V 7.20. El promedio de la rugosidad ( $w$ ) de la superficie bacteriana se calculó según la siguiente ecuación:

$$w = \sum_{i=1}^n \left[ \frac{(z_i - \bar{z})^2}{N} \right]^{1/2} \quad (\text{ec. 7.1})$$

donde  $N$  es el número de puntos considerados sobre la superficie,  $z_i$  la altura del punto sobre la superficie y  $z$  el altura promedio de los puntos  $N$ . Se realizó un análisis estadístico mediante ANOVA de un factor con un  $p < 0,05$  para obtener resultados estadísticamente significativos.

Se analizó la superficie de las bacterias adheridas sobre sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y Ti/TiO<sub>2</sub> control, encontrándose un importante cambio en morfología de la pared celular de *P. aeruginosa* después de 4 hs de colonización sobre Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg (Figura 7.10) comparado con las bacterias adheridas sobre superficies control. Las imágenes de AFM de las bacterias *P. aeruginosa* adheridas sobre superficies control revelaron que las células estaban intactas, sin daño en la pared celular (Figura 7.10 a). Sin embargo, en las bacterias adheridas a sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg se encontró daño en la membrana, lo cual se evidenció por una superficie irregular (Figura 7.10 b). A partir de las imágenes se calculó la rugosidad ( $w$ ) de las superficies de bacterias adheridas, de acuerdo a la ecuación (ec. 7.1). Los valores promedio fueron 9,4 y 19 nm para sustratos control y de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg, respectivamente, indicando un aumento de rugosidad apreciable de la pared celular de las bacterias adheridas sobre las superficies tratadas con NPs Ag con respecto a aquellas adheridas al sustrato control.

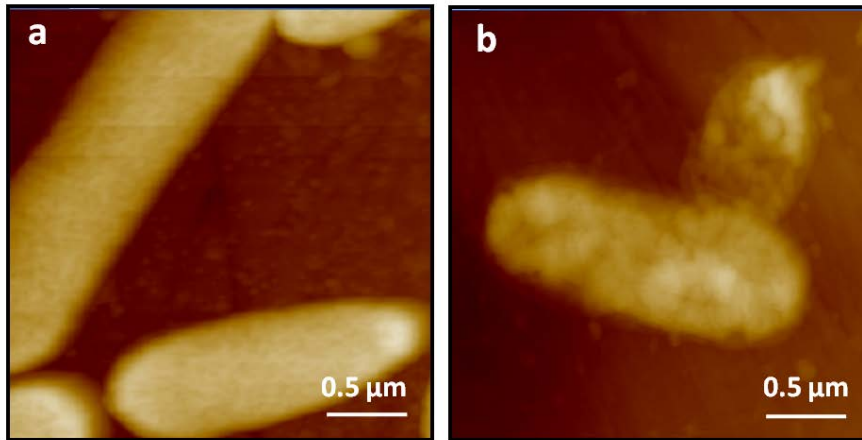


Figura 7.10. Imágenes de AFM de  $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$  en modo contacto de *P. aeruginosa* adheridas sobre a) un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> control y b) un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> modificado con NPs Ag.

En relación a los resultados descritos arriba, es sabido que ciertos agentes antimicrobianos afectan la morfología celular, alterando el tamaño y la forma de las bacterias, así como también su superficie, produciendo cambios de rugosidad o la ruptura de la membrana. El grado de daño ocasionado por el agente antimicrobiano depende de la concentración del agente y del tiempo de exposición de la bacteria al mismo [35]. Otros autores han encontrado cambios de la rugosidad de la superficie celular como consecuencia de la exposición a diferentes concentraciones de antibióticos [36], biocidas [37], o de ciertos lípidos [38, 39] o péptidos [40, 41].

En el presente trabajo se observaron cambios en la rugosidad de la pared celular sólo para *P. aeruginosa*, los cuales pueden ser causados tanto por iones Ag(I) liberados como por NPs Ag que se adsorben sobre la superficie de la bacteria. En el caso de los ensayos realizados en este trabajo, es de suponer que los cambios no se debieron a la adsorción directa de las NPs Ag sobre la superficie celular, ya que esto implicaría que las NPs tendrían que desorberse de la superficie del Ti/TiO<sub>2</sub>. Tal como se ha descrito en el Capítulo 6, la adsorción de las NPs Ag sobre la superficie de los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> es relativamente fuerte, ya que se necesita aplicar una fuerza de 4400 nN para removerlas de la superficie con la punta de AFM.

Se ha encontrado la ruptura de la membrana debido a la liberación de iones Ag (I) y a la internalización de las NPs Ag en el caso de bacterias Gram (-), mientras que no se evidenciaron estos efectos en bacterias Gram (+). Esto puede deberse a que la pared celular de las bacterias Gram (-) contiene proteínas con grupos tioles y fosfolípidos, los cuales presentan gran afinidad por los iones Ag (I) [42, 43]. Por lo tanto, los resultados encontrados en este trabajo pueden interpretarse en términos de la composición de la pared celular: la membrana de las bacterias Gram (-) es menos rígida que la correspondiente a las Gram (+) y, por lo tanto, es más susceptible a la acción de las especies de Ag, independientemente del mecanismo de acción, ya sea por la liberación de iones Ag (I) o por la internalización de las NPs Ag.

## 7.4 Conclusiones

Los resultados obtenidos demostraron que las superficies de Ti/TiO<sub>2</sub> modificadas con NPs Ag fueron efectivas para inhibir la colonización de ambos microorganismos, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, demostrando en ambos casos gran eficacia bactericida. Los resultados de los ensayos de tinción y recuento en placa mostraron la disminución de la viabilidad de las bacterias adheridas sobre los sustratos con Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y Ag, además de corroborar el efecto bactericida de los sustratos de Ag masiva.

Los resultados para los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg se compararon con los de los sustratos de Ag, mostrando que poseen la misma capacidad de inhibir la colonización bacteriana. También se estudió la morfología de los biofilms formados sobre la superficie de los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> modificados con NPs Ag. En el caso de *P. aeruginosa* se observó una gran cantidad de EPS exudado y la formación de pequeños agregados en 2D, con una alta proporción de células aisladas. Con respecto a *S. aureus*, también se observaron pequeños cúmulos de bacterias y disgregación de las mismas, por lo que es posible concluir que el desarrollo completo del biofilm se vio afectado por la presencia de NPs Ag en la superficie de los sustratos. Asimismo se pudo observar un mayor efecto de la plata

sobre la pared celular de las bacterias Gram (-), que puede ser interpretado en términos de la estructura de la pared celular.

La modificación de las superficies de Ti/TiO<sub>2</sub> con NPs Ag demostró ser un tratamiento efectivo para inhibir la proliferación bacteriana sobre uno de los materiales más usados en implantes, como lo es el titanio.



## Referencias bibliográficas

1. Jass, J., Surman, S. y Walker, J.T., Medical biofilms. 2003, Wiley Online Library.
2. O'Grady, N.P., Alexander, M., Dellinger, E.P., Gerberding, J.L., Heard, S.O., Maki, D.G., Masur, H., McCormick, R.D., Mermel, L.A. y Pearson, M.L., Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections, *Clinical infectious diseases*, 2002, (35), 1281-1307.
3. Costerton, J., Stewart, P.S. y Greenberg, E., Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science*, 1999, (284), 1318-1322.
4. Raad, I.I. y Hanna, H.A., Intravascular catheter-related infections: new horizons and recent advances, *Archives of internal medicine*, 2002, (162), 871.
5. Gitelis, S. y Brebach, G.T., The treatment of chronic osteomyelitis with a biodegradable antibiotic-impregnated implant, *Journal of Orthopaedic Surgery Hong Kong*, 2002, (10), 53-60.
6. Stigter, M., Bezemer, J., De Groot, K. y Layrolle, P., Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy, *Journal of controlled release*, 2004, (99), 127-137.
7. Kazemzadeh-Narbat, M., Kindrachuk, J., Duan, K., Jenssen, H., Hancock, R.E. y Wang, R., Antimicrobial peptides on calcium phosphate-coated titanium for the prevention of implant-associated infections, *Biomaterials*, 2010, (31), 9519-9526.
8. Lee, H., Yeo, S. y Jeong, S., Antibacterial effect of nanosized silver colloidal solution on textile fabrics, *Journal of Materials Science*, 2003, (38), 2199-2204.
9. Lee, H.J. y Jeong, S.H., Bacteriostasis and skin innocuousness of nanosize silver colloids on textile fabrics, *Textile Research Journal*, 2005, (75), 551-556.
10. Jeong, S., Hwang, Y. y Yi, S., Antibacterial properties of padded PP/PE nonwovens incorporating nano-sized silver colloids, *Journal of Materials Science*, 2005, (40), 5413-5418.
11. Stevens, K.N., Crespo-Biel, O., van den Bosch, E.E., Dias, A.A., Knetsch, M.L., Aldenhoff, Y.B., van der Veen, F.H., Maessen, J.G., Stobberingh, E.E. y Koole, L.H., The relationship between the antimicrobial effect of catheter coatings containing silver nanoparticles and the coagulation of contacting blood, *Biomaterials*, 2009, (30), 3682-3690.
12. Samuel, U. y Guggenbichler, J., Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter, *International journal of antimicrobial agents*, 2004, (23), 75-78.
13. Furno, F., Morley, K.S., Wong, B., Sharp, B.L., Arnold, P.L., Howdle, S.M., Bayston, R., Brown, P.D., Winship, P.D. y Reid, H.J., Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection?, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004, (54), 1019-1024.

14. Chen, W., Liu, Y., Courtney, H., Bettenga, M., Agrawal, C., Bumgardner, J. y Ong, J., In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating, *Biomaterials*, 2006, (27), 5512-5517.
15. Juan, L., Zhimin, Z., Anchun, M., Lei, L. y Jingchao, Z., Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial effect, *International journal of nanomedicine*, 2010, (5), 261.
16. Li, Y., Leung, P., Yao, L., Song, Q. y Newton, E., Antimicrobial effect of surgical masks coated with nanoparticles, *Journal of Hospital Infection*, 2006, (62), 58-63.
17. Kumar, A., Vemula, P.K., Ajayan, P.M. y John, G., Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil, *Nature materials*, 2008, (7), 236-241.
18. Secinti, K.D., Özalp, H., Attar, A. y Sargon, M.F., Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants, *Journal of Clinical Neuroscience*, 2011, (18), 391-395.
19. Zhao, L., Wang, H., Huo, K., Cui, L., Zhang, W., Ni, H., Zhang, Y., Wu, Z. y Chu, P.K., Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles, *Biomaterials*, 2011, (32), 5706-5716.
20. Ionita, D., Grecu, M., Ungureanu, C. y Demetrescu, I., Antimicrobial activity of the surface coatings on TiAlZr implant biomaterial, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, (112), 630-634.
21. Orgad, O., Oren, Y., Walker, S.L. y Herzberg, M., The role of alginate in *Pseudomonas aeruginosa* EPS adherence, viscoelastic properties and cell attachment, *Biofouling*, 2011, (27), 787-798.
22. Myszka, K. y Czaczyk, K., Characterization of Adhesive Exopolysaccharide (EPS) Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Under Starvation Conditions, *Current Microbiology*, 2009, (58), 541-546.
23. Díaz, C., Schilardi, P. y De Mele, M.F.L., Influence of Surface Sub-micropattern on the Adhesion of Pioneer Bacteria on Metals, *Artificial Organs*, 2008, (32), 292-298.
24. Mo, A.C., Xu, W., Xian, S.Q., Li, Y.B. y Bai, S., Antibacterial activity of silver-hydroxyapatite/titania nanocomposite coating on titanium against oral bacteria, *Key Engineering Materials*, 2007, (330), 455-458.
25. Li, J., Liu, X., Qiao, Y., Zhu, H. y Ding, C., Antimicrobial activity and cytocompatibility of Ag plasma-modified hierarchical TiO<sub>2</sub> film on titanium surface, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, (113), 134-145.
26. Mei, S., Wang, H., Wang, W., Tong, L., Pan, H., Ruan, C., Ma, Q., Liu, M., Yang, H., Zhang, L., Cheng, Y., Zhang, Y., Zhao, L. y Chu, P.K., Antibacterial effects and biocompatibility of titanium surfaces with graded silver incorporation in titania nanotubes, *Biomaterials*.
27. Page, K., Palgrave, R.G., Parkin, I.P., Wilson, M., Savin, S.L. y Chadwick, A.V., Titania and silver–titania composite films on glass—potent antimicrobial coatings, *Journal of Materials Chemistry*, 2007, (17), 95-104.

28. Díaz, C., Schilardi, P.L., Salvarezza, R.C. y De Mele, M.F.L., Nano/microscale order affects the early stages of biofilm formation on metal surfaces, *Langmuir*, 2007, (23), 11206-11210.
29. Díaz, C., Salvarezza, R.C., Fernández Lorenzo De Mele, M.A. y Schilardi, P.L., Organization of *Pseudomonas fluorescens* on chemically different nano/microstructured surfaces, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2010, (2), 2530-2539.
30. Otto, M., Staphylococcal biofilms, *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008, (322), 207-228.
31. Colvin, K.M., Gordon, V.D., Murakami, K., Borlee, B.R., Wozniak, D.J., Wong, G.C.L. y Parsek, M.R., The Pel Polysaccharide Can Serve a Structural and Protective Role in the Biofilm Matrix of *Pseudomonas aeruginosa*, *PLoS Pathog*, 2011, (7), e1001264.
32. Colvin, K.M., Irie, Y., Tart, C.S., Urbano, R., Whitney, J.C., Ryder, C., Howell, P.L., Wozniak, D.J. y Parsek, M.R., The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix, *Environ Microbiol*, 2012, (14), 1913-1928.
33. Jackson, K.D., Starkey, M., Kremer, S., Parsek, M.R. y Wozniak, D.J., Identification of psl, a Locus Encoding a Potential Exopolysaccharide That Is Essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm Formation, *Journal of Bacteriology*, 2004, (186), 4466-4475.
34. Ryder, C., Byrd, M. y Wozniak, D.J., Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *Current Opinion in Microbiology*, 2007, (10), 644-648.
35. Mangalappalli-Illathu, A.K., Vidović, S. y Korber, D.R., Differential Adaptive Response and Survival of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Planktonic and Biofilm Cells Exposed to Benzalkonium Chloride, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, (52), 3669-3680.
36. Nikiyan, H.V., A.; Deryabin, D, AFM investigations of Various Disturbing Factors on Bacterial Cells, *F. Research y C. Badajoz*, Editors. 2010.
37. Deupree, S.M. y Schoenfisch, M.H., Morphological analysis of the antimicrobial action of nitric oxide on Gram-negative pathogens using atomic force microscopy, *Acta Biomaterialia*, 2009, (5), 1405-1415.
38. Al-Tahhan, R.A., Sandrin, T.R., Bodour, A.A. y Maier, R.M., Rhamnolipid-Induced Removal of Lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: Effect on Cell Surface Properties and Interaction with Hydrophobic Substrates, *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, (66), 3262-3268.
39. Boles, B.R., Thoendel, M. y Singh, P.K., Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms, *Molecular Microbiology*, 2005, (57), 1210-1223.
40. Luca, V., Stringaro, A., Colone, M., Pini, A. y Mangoni, M., Esculentin(1-21), an amphibian skin membrane-active peptide with potent activity on both planktonic and biofilm cells of the bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2013, (70), 2773-2786.
41. Hancock, R.E.W. y Rozek, A., Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides, *FEMS Microbiology Letters*, 2002, (206), 143-149.
42. Li, W.-R., Xie, X.-B., Shi, Q.-S., Zeng, H.-Y., Ou-Yang, Y.-S. y Chen, Y.-B., Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, (85), 1115-1122.

43. Taglietti, A., Diaz Fernandez, Y.A., Amato, E., Cucca, L., Dacarro, G., Grisoli, P., Necchi, V., Pallavicini, P., Pasotti, L. y Patrini, M., Antibacterial Activity of Glutathione-Coated Silver Nanoparticles against Gram Positive and Gram Negative Bacteria, *Langmuir*, 2012, (28), 8140-8148.

# Capítulo 8

## Efecto de las nanopartículas de Ag en dispersión sobre células osteoblásticas

### 8.1 Introducción

Con el creciente uso de compuestos de Ag con fines bactericidas, el tema de su toxicidad se está volviendo cada vez más un asunto de relevancia debido a que se publican cada año diversos estudios acerca de los efectos que genera su aplicación en células de mamíferos, algunos de los cuales resultan ser contradictorios entre sí, sobre todo en el caso de los nanomateriales. Los estudios de los efectos de la exposición del cuerpo humano a NPs Ag están adquiriendo cada vez mayor importancia, ya que éstas pueden ser absorbidas por los tejidos, incorporadas a células y unirse a biomoléculas dentro del cuerpo humano con gran rapidez y efectividad debido a sus dimensiones. Una vez que las NPs son absorbidas por el cuerpo, éste reacciona a través de uno o más de los siguientes posibles procesos: (i) la metabolización de las NPs, (ii) su almacenamiento y (iii) su

excreción por algún mecanismo (a través del riñón, vía orina), cualquiera sea de estos procesos puede resultar en efectos agudos o crónicos incluyendo daños de tejidos y órganos.

Las NPs Ag en general pueden ingresar a la célula por dos posibles vías, difusión pasiva [1-3] o endocitosis. Esta última abarca mecanismos tales como (i) macropinocitosis, (ii) fagocitosis, (iii) endocitosis mediada por clatrina, (iv) endocitosis mediada por calveolina y (v) endocitosis independiente de clatrina y calveolina [3-5](Figura 8.1). Los procesos de internalización de las NPs dependen en gran medida de la dimensión y la forma de las NPs [2, 4]. Se conoce que los procesos de internalización pueden realizarse por distintas vías. Así, por ejemplo, en un estudio realizado por AshaRani *et al.* con NPs Ag de 6 a 20 nm recubiertas con almidón, sugirieron un mecanismo de internalización que se lleva a cabo por vía endocítica mediada por receptor [3]. Por otro lado, Greulich *et al.* estudiaron el ingreso a las células de NPs Ag recubiertas con PVP y propusieron que el mecanismo principal de internalización de las NPs había sido endocitosis vía clatrina y macropinocitosis [6].

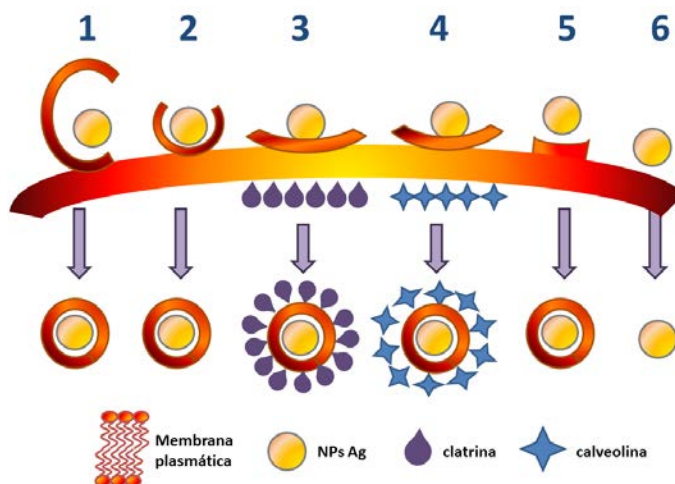


Figura 8.1. Esquema que muestra la internalización de NPs Ag en células eucariotas : 1) macropinocitosis, 2) fagocitosis, 3) endocitosis mediada por clatrina, 4) endocitosis mediada por calveolina, 5) endocitosis independiente de clatrina y calveolina y 6) difusión. Esquema adaptado de Eckhardt *et al.*[7]

Por lo tanto, es posible que el proceso de internalización de las NPs Ag ocurra por diferentes vías, por lo que el estudio de la internalización de las NPs Ag suele ser laborioso. Además de tener en cuenta numerosos factores debido a la complejidad del proceso de transporte y a las moléculas que están involucradas en cada proceso [5], es necesario considerar el tamaño, forma y recubrimiento de las NPs Ag.

En el área de la salud existe mucha preocupación por los efectos nocivos que pueden generar las NPs Ag en contacto con células de mamíferos. Se han encontrado efectos tóxicos de las NPs Ag para diversos sistemas *in vitro* e *in vivo* en mamíferos. En efecto, las NPs Ag pueden producir inflamación, generar daños en la mitocondrias por cambios en el sistema de endomembranas, ocasionando la producción y acumulación de especies ROS, una disminución en los niveles de glutatión (GSH), estrés oxidativo que provoca cambios en la expresión de genes, daños al ADN, entre otros, hasta la posterior muerte celular y apoptosis [8-12]. Como se ha mencionado en el capítulo 5, las NPs Ag pueden interaccionar con proteínas y enzimas que poseen grupos tiol en su estructura, tales como peroxidasa de tiorredoxina, tiorredoxina, superóxido deshidrogenasa, así como también con GSH, ante la presencia de plata dentro de la célula quedan inactivas o no son funcionales [13], causando una acumulación de especies ROS y estrés oxidativo, ya que no pueden metabolizar los productos de la respiración celular generando mitocondrias no funcionales. A su vez, Arora *et al.* hallaron que las células humanas (en este caso mesenquimales) expuestas a NPs de 7-20 nm mostraron daños en las mitocondrias. Como resultado hubo una inducción del estrés oxidativo, generando agotamiento de GSH y un aumento en la peroxidación de lípidos [14], en concordancia con otros autores [15]. En consecuencia, estos procesos conducen gradualmente a la necrosis y/o apoptosis celular [16]. Los autores mostraron que la concentración de NPs requerida para inducir una respuesta de apoptosis era inferior a la necesaria para necrosis [14]. Con respecto a la respuesta inflamatoria, Sung *et al.* realizaron un estudio con células pulmonares de rata, las cuales fueron expuestas a NPs Ag, observándose una disminución en la función pulmonar y la presencia de lesiones por inflamación en las células [17].

En general de todos los mecanismos citotóxicos nombrados anteriormente, se debe tener en cuenta que el principal mecanismo tóxico *in vitro* está relacionado con el aumento de la producción de ROS. En consecuencia, la producción de ROS estimula vías de señalización oxidante-sensibles, que a dosis altas estimulan la inflamación, lo que lleva a una genotoxicidad secundaria y la muerte celular (por apoptosis o necrosis).

Por otro lado, los efectos tóxicos de las NPs Ag en células han sido vinculados con la liberación de iones Ag(I) de las mismas [18], o bien con la concentración de las NPs Ag empleadas [19]. Hackengerberg *et al.* encontraron que NPs Ag inducían una respuesta genotóxica en células mesenquimales, con presencia de aberraciones cromosómicas y daños significativos en el ADN [19]. Sin embargo, los datos publicados acerca de las concentraciones citotóxicas son muchas veces contradictorios, ya que las NPs empleadas en los diferentes ensayos poseen diferente tamaño, forma y recubrimiento y las concentraciones empleadas son muy dispares. Así, por ejemplo, Hades *et al.* encontraron en sus ensayos *in vitro* con células de osteosarcoma humano, que las NPs no presentan citotoxicidad en concentraciones menores a 10 mg /L de Ag [20]. Por otra parte, Hussain *et al.* estudiaron la toxicidad de NPs Ag de diferentes tamaños sobre una línea celular de hígado de rata (BRL 3) después de 24 hs de exposición. Los autores hallaron que las mitocondrias poseían tamaño y forma aumentados y adjudicaron esto a la formación de ROS [21]. Por otro lado, Burd y colaboradores estudiaron la toxicidad de NPs Ag impregnadas sobre 5 tipos de vendajes comerciales y encontraron que tres de ellos presentaban efectos citotóxicos en keratinocitos y en cultivos de fibroblastos [22]. En estos trabajos no queda del todo claro si las NPs son tóxicas *per se*, o bien si existe un rango de concentraciones en el cual las NPs son tóxicas para los microorganismos pero no para los tejidos circundantes.

Por tal motivo es importante conocer los efectos cito y genotóxicos de las NPs Ag de interés en un rango de concentraciones establecido en aquellas células que están involucradas en el proceso de osteointegración, como es el caso de las células osteoblásticas.[23].



En este capítulo del Trabajo de Tesis se evaluará el efecto citotóxico de las NPs Ag en dispersión sobre células osteoblásticas de la línea UMR- 106. Las células osteoblásticas u osteoblastos son aquéllas que están involucradas en el crecimiento, mantenimiento y reparación del hueso y poseen un papel importante en el proceso de osteointegración de un implante[24], el cual fue descrito en el Capítulo 1. Por consiguiente, es crucial conocer el rango de concentraciones en el que no se observe citotoxicidad en estas células, ya que es importante que el proceso de osteointegración no se vea afectado por la presencia de nanomateriales. Esto en gran medida definirá si el implante, ya sea dental u ortopédico, será o no rechazado por el organismo del paciente implantado.

## **8.2 Ensayos de citotoxicidad con NPs Ag sobre células osteoblásticas**

Tal como se mencionó anteriormente, para las aplicaciones de NPs Ag como agente bactericida es necesario hallar un rango de concentraciones en el cual éstas resulten tóxicas para las bacterias sin que afecten a las células de los tejidos que puedan estar en contacto con las nanoestructuras.

Con este fin se realizaron ensayos de citotoxicidad para establecer la concentración mínima de NPs Ag que resulta tóxica para células osteoblásticas. Para ellos se emplearon células osteoblásticas de la línea UMR 106 provenientes de American Type Culture Collection 320 (ATCC; Rockville, MD). Los ensayos con células osteoblásticas se realizaron en colaboración con la Dra. Claudia Grillo en el Laboratorio de Cultivos Celulares perteneciente al Laboratorio de Biomateriales del INIFTA-UNLP, este último dirigido por la Dra. Mónica Fernández Lorenzo de Mele.

Las células fueron crecidas formando una monocapa en frascos tipo falcon T-25 (BD Bioscience) estériles. El medio de cultivo celular empleado fue DMEM completo (GIBCO-BRL, Grand Island, NY), el cual posee concentraciones elevadas de glucosa, L-glutamina y pirodoxina clorhidrato, además de rojo fenol como indicador de pH. Este

medio se suplementó con suero fetal bovino al 10%, 50 IU/mL (unidades internacionales) de penicilina y 50 µg/mL de sulfato de estreptomicina. El crecimiento celular se realizó a 37°C en atmósfera controlada (con 5 % de CO<sub>2</sub>) durante 24 hs. El número de células se determinó con una cámara de Neubauer. La viabilidad celular se ensayó mediante el método de tinción por exclusión con azul de tripán (ácido (3Z,3'Z)-3,3'-[(3,3'-dimetilbifenil-4,4'-diil)di(1Z)hidracin-2-il-1-ilideno]bis(5-amino-4-oxo-3,4-dihidronaftaleno-2,7-isulfónico de Sigma, St. Louis, MO). A las células se les añadió azul de tripán en una relación 1:1 y fueron observadas mediante un microscopio óptico. En todos los casos la viabilidad de las células fue mayor al 95%.

Para los ensayos, las células fueron crecidas en una placa de 96 pocillos, en cada uno de los cuales se colocaron  $2,5 \times 10^3$  células, las que se incubaron por 24 hs a 37°C en atmósfera controlada (5 % de CO<sub>2</sub>). Se prepararon dispersiones de NPs Ag en medio de cultivo DMEM de las siguientes concentraciones (expresadas como concentración de Ag): 0, 25, 50, 75, 100, 150 y 225 µM. A simple vista las NPs Ag resultaron ser estables en el medio de cultivo y no se aglomeraron, hecho que se pudo corroborar por espectroscopía UV-visible. En la Figura 8.2, es posible observar la presencia del pico de plasmones de las NPs Ag alrededor de los 400 nm, a pesar de estar muy cercano a un pico alrededor de 550 nm que corresponde a la absorción del colorante rojo fenol presente en el medio de cultivo. La estabilidad de las NPs Ag en el medio DMEM está de acuerdo con resultados de otros autores [15, 25, 26], como Kittler *et al.*, quienes informaron acerca de la dispersión de las NPs Ag en un medio similar al usado, demostrando que las NPs fueron estables y se encontraban dispersas en el medio en cuestión [27].

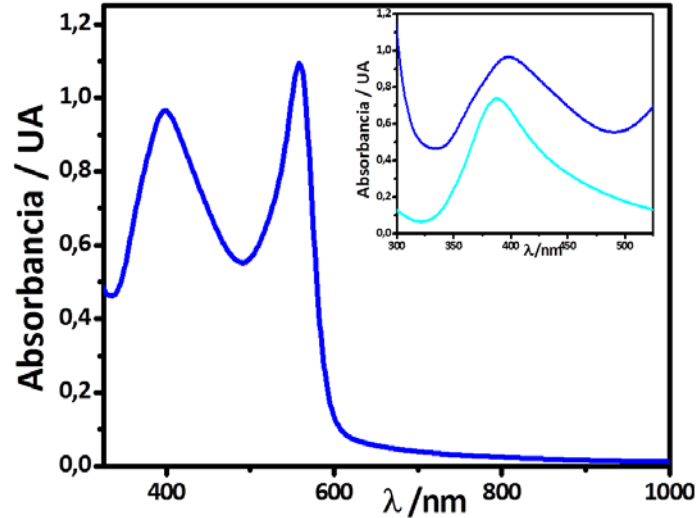


Figura 8.2. Espectro de UV-visible de las NPs Ag (concentración final igual a  $75\mu\text{M}$ ) en medio de cultivo DMEM completo (10% suero fetal bovino y antibióticos). En el recuadro se muestran en detalle los picos de plasmones superficiales correspondientes a los espectros de NPs Ag en medio DMEM (línea azul) y NPs Ag en agua (línea turquesa).

La citotoxicidad de las células se evaluó a través de dos métodos colorimétricos diferentes, ambos ampliamente usados en células de mamíferos: el ensayo con Rojo Neutro y el ensayo con MTT. A continuación se detallará cada uno de ellos.

### 8.2.1 Ensayo con Rojo Neutro (RN)

Mediante este ensayo es posible determinar viabilidad celular a través de la actividad lisosomal de la célula [28]. El mismo permite evaluar la integridad del sistema de endomembranas, específicamente medido por la incorporación del colorante RN por parte de las células vivas [28]. El colorante sólo accede al citoplasma y se incorpora en los lisosomas de las células que han sobrevivido al tratamiento (en este caso, a la exposición a una determinada concentración de NPs Ag).

Los cultivos celulares se retiraron de incubación después de 24 hs de crecimiento y se les adicionaron las dispersiones de NPs Ag en medio DMEM completo fresco (rango de

concentraciones: 10, 25, 50, 75, 100, 150 y 225  $\mu\text{M}$ , expresado en concentración de Ag total). Las células se incubaron por 24 hs a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera controlada (con 5 % de  $\text{CO}_2$ ). Transcurrido el tiempo de exposición el medio fue removido para adicionar medio DMEM completo conteniendo 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  del colorante RN (Sigma, St. Louis, MO, USA). Después de 3 hs de incubación, las células fueron lavadas con solución de *buffer* fosfato salino (PBS) y posteriormente se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  por pozo de la solución de extracción del colorante (1% ácido acético y 50% etanol). La absorbancia se midió a 540 nm en un lector automático de placas (BioTek Instrument, Inc. USA) junto con los controles sin NPs Ag. El porcentaje de citotoxicidad se calculó como  $[(A-B)/A] \times 100$ , donde A y B son la absorbancia del control y la de las células tratadas, respectivamente. Cada experimento se repitió 2 veces, haciendo un total de 32 pozos por punto experimental. Los datos se analizaron estadísticamente usando el test de ANOVA.

### **8.2.2 Ensayo con MTT (3 - (4,5 - Di metil tiazol -2-il) -2,5-di fenil bromuro de tetrazolio).**

Este ensayo permite evaluar la viabilidad a través de la actividad mitocondrial a partir de la reducción del MTT a formazán realizada por la enzima succinato-deshidrogenasa de las mitocondrias de células vivas. La técnica utilizada es una modificación del método de Mosmann *et al.* [29, 30].

Los cultivos celulares se retiraron de incubación después de 24 hs de crecimiento y se les adicionaron las dispersiones de NPs Ag en medio DMEM completo fresco empleando las mismas concentraciones que en el ensayo anterior. Las células se incubaron por 24 hs a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera controlada (5 % de  $\text{CO}_2$ ). Transcurrido el tiempo de exposición el medio fue removido para adicionar medio DMEM completo conteniendo el MTT (1 mg/mL concentración final). Después de 3 h de incubación las células fueron lavadas con PBS. Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (Merck, Química Argentina SAIC, Argentina) a cada pozo para lisar las células y solubilizar los cristales de formazán. La absorbancia se midió a 540 nm en un lector automático de placas junto con los controles

sin NPs Ag. Se calculó el porcentaje de citotoxicidad de la misma manera que se hizo para el ensayo del RN.

### 8.2.3 Resultados de los ensayos de RN y MTT

En la Figura 8.3 se muestran los resultados de los ensayos de Rojo neutro (RN). Se puede apreciar que no hubo diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) con respecto al control en las células tratadas con concentraciones de NPs Ag iguales a 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ . Para concentraciones superiores a 75  $\mu\text{M}$  se encontró una viabilidad del 20% con respecto al control.

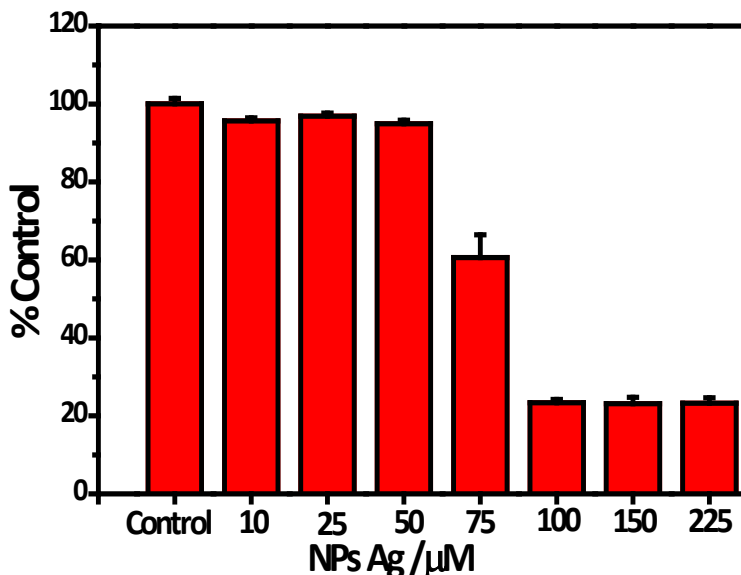


Figura 8.3. Gráfico de citotoxicidad de NPs Ag evaluada con el ensayo de RN para concentraciones de NPs Ag 10, 25, 50, 75, 100, 150 y 225  $\mu\text{M}$ . Los datos obtenidos para cada concentración de Ag usada fueron normalizados con respecto al control.

Los resultados del ensayo de la reducción del metil tetrazolio (MTT) se muestran en la Figura 8.4. En forma análoga a lo observado en el ensayo de RN, en presencia de bajas concentraciones de NPs (10 a 50  $\mu\text{M}$ ) la actividad mitocondrial fue similar a la presentada por los controles (células UMR-106 cultivadas en ausencia de NPs Ag). Sin

embargo, se observó una significativa disminución de la reducción del colorante MTT ( $p < 0,001$ ) para concentraciones de NPs Ag mayores o iguales a  $75 \mu\text{M}$ .

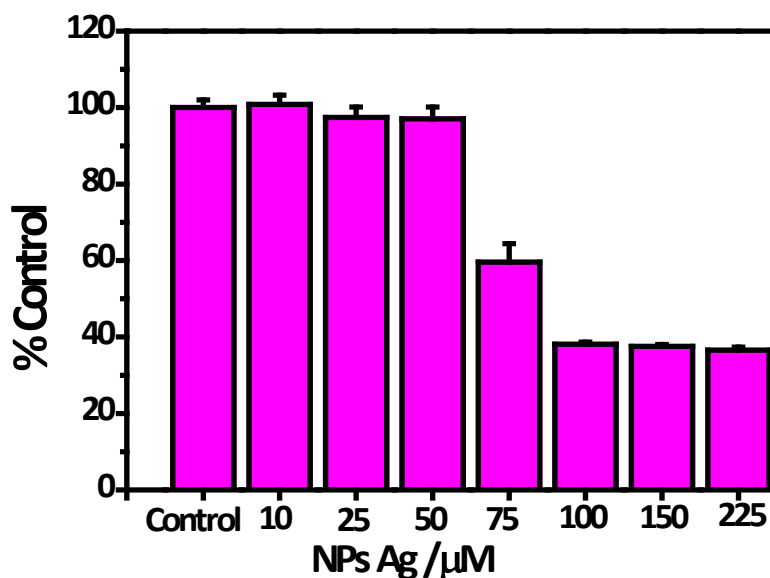


Figura 8.4. Gráfico de citotoxicidad de NPs Ag evaluada con el ensayo de MTT para concentraciones de NPs Ag 10, 25, 50, 75, 100, 150 y  $225 \mu\text{M}$ . Los datos obtenidos para cada concentración de Ag usada fueron normalizados con respecto al control.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que las concentraciones de NPs Ag mayores o iguales a  $75 \mu\text{M}$  ( $8,1 \mu\text{g/mL}$ ), expresadas en concentración de Ag, poseen un efecto citotóxico sobre las células osteoblásticas estudiadas, lo cual está evidenciado por la reducción de las actividades lisosomal y mitocondrial. Los valores de la concentración citotóxica de las NPs Ag obtenidos fueron comparados con valores encontrados en la literatura. Por ejemplo, Ilknur *et al.* encontraron efectos citotóxicos en fibroblastos con NPs de aproximadamente  $80 \text{ nm}$  para concentraciones mayores a  $75 \mu\text{M}$ . Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente trabajo, a pesar de que las NPs de esos autores poseían mayor tamaño que las utilizadas en estos ensayos y estaban recubiertas por diferentes azúcares [31]. Asare *et al.* también informaron valores similares pero con NPs Ag recubiertas con albúmina con tamaño entre  $20$  y  $200 \text{ nm}$  [32]. Sin

embargo, otros autores han encontrado valores muy diferentes a los nuestros. Por ejemplo, Park *et al.* encontraron efectos citotóxicos con NPs de 20 nm de diámetro y con concentración 1  $\mu\text{M}$  (0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), un valor considerablemente inferior al hallado en el presente trabajo, aunque no se informa acerca del recubrimiento de las NPs [33]. Por otra parte, Arora *et al.* expusieron fibroblastos de ratón a NPs Ag con diámetros entre 7 y 20 nm, obteniendo valores citotóxicos de 29  $\mu\text{M}$  y 565  $\mu\text{M}$  para generar apoptosis y estrés oxidativo, respectivamente [34]. Estos ejemplos dejan en evidencia la disparidad en las concentraciones necesarias para generar citotoxicidad, la cual seguramente está vinculada con diferencias de tamaño, recubrimiento, medio de cultivo, ensayos realizados, etc, así como también en los mecanismos que la desencadenan.

Con respecto a los efectos citotóxicos estudiados en el presente trabajo, otros autores también han encontrado efectos negativos de NPs Ag en el metabolismo de las células evidenciados por la reducción en las actividades mitocondrial y lisosomal. Mukherjee *et al.*, por ejemplo, realizaron ensayos con células *HeLa* y demostraron que la actividad mitocondrial fue la más afectada en el metabolismo celular ante la exposición a NPs Ag con un diámetro de aproximadamente 30 nm. Además se vio afectada la actividad lisosomal y disminuyó la cantidad de proteínas celulares debido a la presencia de las NPs Ag en el interior de las células [35]. En otro estudio Carlson *et al.* evaluaron la viabilidad celular mediante estrés oxidativo de macrófagos, encontrando un aumento en los niveles de las especies ROS luego de 24 hs de tratamiento con NPs Ag de 15 nm, indicando una perturbación en los procesos de la mitocondria. Además las células presentaron una respuesta inflamatoria ante la presencia de las NPs Ag [36]. Por otra parte, los efectos citotóxicos podrían deberse tanto a una alta concentración de iones  $\text{Ag(I)}$  liberados de las NPs Ag como también a la presencia física de las nanopartículas metálicas en la vecindad o en el interior de las células, como han informado otros autores [37]. AshRani *et al.* observaron mediante TEM la inclusión de las NPs Ag en las mitocondrias y el núcleo, y encontraron un efecto tóxico en las mitocondrias y la interrupción de la cadena respiratoria con formación de especies ROS, derivando ello en daño al ADN [3]. Por otra parte, Arora *et al.* estudiaron la exposición de células de fibrosarcoma y carcinoma de piel

a NPs Ag de 7 a 20 nm, observando cambios en la morfología celular y signos de estrés oxidativo y, por ende, un aumento en la peroxidación de lípidos y disminución en los niveles de GSH [14]. Estos mismos autores encontraron que en células primarias de fibroblastos expuestas a las mismas NPs se desencadenó el proceso de apoptosis, hallándose signos de estrés oxidativo (GSH y peroxidación de lípidos) y de necrosis para concentraciones elevadas de NPs Ag [34]. En la Tabla 8.1 se muestra un resumen de algunos de los resultados de ensayos encontrados en la literatura, detallando el tipo de NPs Ag empleadas, las líneas celulares y los efectos citotóxicos desencadenados por el tratamiento.

A pesar de la complejidad de los mecanismos de citotoxicidad y las diferentes NPs informadas en literatura, las NPs Ag preparadas en el presente trabajo resultaron tóxicas en concentraciones de NPs Ag por encima de 75  $\mu$ M de Ag, siendo esto consistente con lo encontrado en literatura. Sin embargo, no se puede realizar una comparación directa debido a diferencias en el tamaño y recubrimiento de las NPs Ag, la línea celular empleada, el ensayo realizado, etc.



Tabla 8.1: Resumen de algunos de los efectos citotóxicos de NPs Ag sobre líneas celulares hallados en la literatura.

Autores	Línea celular	NPs Ag	Efectos citotóxicos
Arora [34]	Fibroblastos y células hepáticas de ratón	7 a 20 nm	50 µg/mL : Signos de estrés oxidativo (GSH y peroxidación de lípidos). 3,12 µg/mL: inducción de apoptosis. 100 µg/mL : inducción de necrosis.
Arora [14]	Fibrosarcoma humano y carcinoma de piel	7 a 20 nm	10, 6 a 50 µg/mL : cambios morfológicos y signos de estrés oxidativo.
Asharani [3]	Fibroblastos y glioblastomas humanos	6 a 20nm recubiertas con almidón	25 a 100 µg/mL: signos de estrés oxidativo, daños en el ADN y aberraciones cromosómicas e inhibición de la proliferación.
Greulich [6]	Mesenquimales humanas y células mononucleares de sangre periférica	70 nm	50 µg/mL: cambios morfológicos y disminución de la proliferación. 30 µg/mL: ídem anterior.
Hussain [21]	Células hepáticas de rata BRL3	100 nm	50 µg/mL: disminución de la función mitocondrial (GSH; LDH y potencial de membrana) y cambios morfológicos.
Ilknurn [31]	Células de cáncer de pulmón y fibroblastos de ratón	80 nm modificadas com lactosa y glucosa	7,5 µg/mL disminución de la viabilidad y proliferación celulares.
Park [33]	Fibroblastos L929	20 nm	0,1 µg/mL: producción de especies ROS, inflamación, daños al ADN e inhibición de la proliferación.
Pratnisis [37]	Macrófagos	10 nm	>5 µg/mL : inhibición de la proliferación y viabilidad
Carlson [36]	Macrófagos	15 y 30 nm	10 µg/mL: producción de especies ROS, pérdida de integridad de la membrana, inflamación, necrosis.

### 8.3. Efecto del medio de cultivo sobre la liberación de iones Ag(I)

Se evaluó el rol del medio de cultivo biológico usado en los ensayos de citotoxicidad, en este caso DMEM, en la liberación de Ag(I) de las NPs dispersas en el medio. Se realizó el mismo procedimiento descrito en el Capítulo 5 (sección 5.2.2) pero con el medio de cultivo de células DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino al 10%, 50 IU/mL de penicilina y 50 µg/mL de sulfato de estreptomicina. Se realizaron dos pasos de separación por ultracentrifugación y en cada uno de ellos se determinó la presencia del pico de plasmones correspondientes a las NPs Ag. No se detectó el pico de plasmones superficiales de Ag (el cual aparece a aproximadamente 400 nm), indicando la remoción prácticamente total de las NPs Ag del medio sometido al proceso de separación. Tal como en el caso del medio de GMP, se determinó la concentración de Ag(I) por espectroscopía de absorción atómica junto con una dispersión acuosa de NPs Ag. Los valores obtenidos fueron 3 y 0,24 µM de Ag para agua y DMEM, respectivamente. Como se mencionó anteriormente, la concentración de plata obtenida en agua fue mayor que la obtenida en el medio, lo cual fue consistente con lo encontrado por otros autores [38]. La diferencia entre los valores de concentración obtenidos para agua y el medio de cultivo puede explicarse por la composición de este último: el medio DMEM contiene iones fosfato (ver Capítulo 5) y cloruro, los cuales pueden reaccionar con la Ag(I) formando sales insolubles (fosfatos y cloruros de plata). Por otra parte, el medio DMEM contiene proteínas y, en consecuencia, la Ag(I) presente en el medio podría interactuar con los grupos tiol y carboxilato de las proteínas presentes, las cuales podrían haber sido parcialmente separadas en la etapa de ultracentrifugación [13, 15, 39]. En resumen, los iones Ag(I) interactúan con los fosfatos, cloruros y posiblemente proteínas y pueden haber sido eventualmente removidos del medio biológico junto con las NPs Ag inicialmente en dispersión como consecuencia del proceso de separación. Sin embargo, es importante destacar que la concentración de iones plata liberados obtenida para DMEM fue del mismo orden que para GMP (medios de cultivo para bacterias), indicando que el medio no

interfiere significativamente con la dispersión y la capacidad microbicida de la plata. Cabe señalar que la liberación de iones Ag(I) (presentes en el medio luego de la separación de las NPs Ag) podría ser uno de los mecanismos más relevantes por los cuales se producen efectos citotóxicos en la línea celular empleada [36, 37].

## 8.4 Conclusiones

Las NPs Ag resultaron estables en el medio DMEM utilizado en los ensayos con células osteoblásticas, permitiendo analizar la liberación de iones Ag(I) a dicho medio. La concentración de Ag(I) encontrada en el medio DMEM resultó menor que la correspondiente a agua, hecho que puede atribuirse a la interacción de estos iones con algunos de los componentes del medio.

La concentración de NPs Ag que resulta citotóxica para osteoblastos es ostensiblemente mayor que los valores de CMB hallados para *S. aureus* y *P. aeruginosa* (3,12  $\mu\text{M}$  y 0,78  $\mu\text{M}$  para las bacterias vs 75  $\mu\text{M}$  para osteoblastos). Esto demuestra que las NPs Ag utilizadas en el presente trabajo se pueden emplear sin inconvenientes en concentraciones iguales a la CMB, eliminando así las bacterias sin causar efectos adversos en las células osteoblásticas que participan en el proceso de osteointegración. Una situación similar podría generarse en el caso de biomateriales con recubrimientos superficiales de NPs Ag. Consecuentemente, en todos los casos es fundamental establecer un límite máximo de concentración que asegure una acción antibacteriana y que no afecte a las células de los tejidos en contacto con dichas nanoestructuras [40]. Por otra parte, estos resultados abren el camino para aplicar las NPs Ag en implantes sin causar efectos citotóxicos a las células vecinas.

## Referencias bibliográficas

1. AshaRani, P., Hande, M.P. y Valiyaveettil, S., Anti-proliferative activity of silver nanoparticles, *BMC Cell Biology*, 2009, (10), 65.
2. Kim, S. y Choi, I.H., Phagocytosis and Endocytosis of Silver Nanoparticles Induce Interleukin-8 Production in Human Macrophages, *Yonsei Med J*, 2012, (53), 654-657.
3. AshaRani, P.V., Low Kah Mun, G., Hande, M.P. y Valiyaveettil, S., Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells, *ACS Nano*, 2008, (3), 279-290.
4. Petros, R.A. y De Simone, J.M., Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010, (9), 615-627.
5. Iversen, T.G., Skotland, T. y Sandvig, K., Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies, *Nano Today*, 2011, (6), 176-185.
6. Greulich, C., Diendorf, J., Simon, T., Eggeler, G., Epple, M. y Köller, M., Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells, *Acta Biomaterialia*, 2011, (7), 347-354.
7. Eckhardt, S., Brunetto, P.S., Gagnon, J., Priebe, M., Giese, B. y Fromm, K.M., Nanobio Silver: Its Interactions with Peptides and Bacteria, and Its Uses in Medicine, *Chemical Reviews*, 2013, (113), 4708-4754.
8. Bouwmeester, H., Poortman, J., Peters, R.J., Wijma, E., Kramer, E., Makama, S., Puspitaninganindita, K., Marvin, H.J.P., Peijnenburg, A.A.C.M. y Hendriksen, P.J.M., Characterization of Translocation of Silver Nanoparticles and Effects on Whole-Genome Gene Expression Using an In Vitro Intestinal Epithelium Coculture Model, *ACS Nano*, (5), 4091-4103.
9. de Lima, R., Seabra, A.B. y Durán, N., Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles, *Journal of Applied Toxicology*, (32), 867-879.
10. Gopinath, P., Sonit Kumar, G., Arun, C. y Siddhartha Sankar, G., Implications of silver nanoparticle induced cell apoptosis for in vitro gene therapy, *Nanotechnology*, 2008, (19), 075104.
11. Kruszewski, M., Grądzka, I., Bartłomiejczyk, T., Chwastowska, J., Sommer, S., Grzelak, A., Zuberek, M., Lankoff, A., Dusinska, M. y Wojewódzka, M., Oxidative DNA damage corresponds to the long term survival of human cells treated with silver nanoparticles, *Toxicology Letters*, 2013, (219), 151-159.
12. Kim, T.-H., Kim, M., Park, H.-S., Shin, U.S., Gong, M.-S. y Kim, H.-W., Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2012, (100A), 1033-1043.
13. Cioffi, N. y Rai, M., *Nano-antimicrobials: Progress and Prospects*, 2012, Springer.
14. Arora, S., Jain, J., Rajwade, J.M. y Paknikar, K.M., Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies, *Toxicology Letters*, 2008, (179), 93-100.

15. Piao, M.J., Kang, K.A., Lee, I.K., Kim, H.S., Kim, S., Choi, J.Y., Choi, J. y Hyun, J.W., Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis, *Toxicology Letters*, 2011, (201), 92-100.
16. Foldbjerg, R., Olesen, P., Hougaard, M., Dang, D.A., Hoffmann, H.J. y Autrup, H., PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes, *Toxicology Letters*, 2009, (190), 156-162.
17. Sung, J.H., Ji, J.H., Yoon, J.U., Kim, D.S., Song, M.Y., Jeong, J., Han, B.S., Han, J.H., Chung, Y.H., Kim, J., Kim, T.S., Chang, H.K., Lee, E.J., Lee, J.H. y Yu, I.J., Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles, *Inhal Toxicol*, 2008, (20), 567-574.
18. Kim, S., Choi, J.E., Choi, J., Chung, K.-H., Park, K., Yi, J. y Ryu, D.-Y., Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells, *Toxicology in Vitro*, 2009, (23), 1076-1084.
19. Hackenberg, S., Scherzed, A., Kessler, M., Hummel, S., Technau, A., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C., Hagen, R. y Kleinsasser, N., Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells, *Toxicology Letters*, 2011, (201), 27-33.
20. Harges, J., Streitburger, A., Ahrens, H., Nusselt, T., Gebert, C., Winkelmann, W., Battmann, A. y Gosheger, G., The Influence of Elementary Silver Versus Titanium on Osteoblasts Behaviour In Vitro Using Human Osteosarcoma Cell Lines, *Sarcoma*, 2007, (2007).
21. Hussain, S.M., Hess, K.L., Gearhart, J.M., Geiss, K.T. y Schlager, J.J., In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells, *Toxicology in Vitro*, 2005, (19), 975-983.
22. Burd, A., Kwok, C.H., Hung, S.C., Chan, H.S., Gu, H., Lam, W.K. y Huang, L., A comparative study of the cytotoxicity of silver-based dressings in monolayer cell, tissue explant, and animal models, *Wound Repair and Regeneration*, 2007, (15), 94-104.
23. Gongadze, E., Kabaso, D., Bauer, S., Park, J., Schmuki, P. y Iglic, A., Adhesion of Osteoblasts to a Vertically Aligned TiO<sub>2</sub> Nanotube Surface, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2013, (13), 194-200.
24. Bruce Alberts, D.B., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Lewis, Keith Roberts and James D. Watson, *La célula*. 2002, Ediciones Omega.
25. Drescher, D., Orts Gil, G., Laube, G., Natte, K., Veh, R., Österle, W. y Kneipp, J., Toxicity of amorphous silica nanoparticles on eukaryotic cell model is determined by particle agglomeration and serum protein adsorption effects, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, (400), 1367-1373.
26. Aggarwal, P., Hall, J.B., McLeland, C.B., Dobrovolskaia, M.A. y McNeil, S.E., Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, (61), 428-437.
27. Kittler, S., Greulich, C., Gebauer, J., Diendorf, J., Treuel, L., Ruiz, L., Gonzalez-Calbet, J., Vallet-Regi, M., Zellner, R. y Köller, M., The influence of proteins on the dispersability and

- cell biological activity of silver nanoparticles, *Journal of Materials Chemistry*, 2010, (20), 512-518.
28. Borenfreund, E.P., J.A., Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters*, 1985, (24), 119-124.
  29. Mosmann, T., Rapid Colorimetric Assays for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *Immunology methods*, 1983, (65), 55-63.
  30. Twentyman, P.R. y Luscombe, M., A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity, *Br J Cancer*, 1987, (56), 279-285.
  31. Ilknur, S., Dilek, C., Mehmet, K., Asli, B. y Mustafa, C., Interaction of multi-functional silver nanoparticles with living cells, *Nanotechnology*, 2010, (21), 175104.
  32. Asare, N., Instanes, C., Sandberg, W.J., Refsnes, M., Schwarze, P., Kruszewski, M. y Brunborg, G., Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells, *Toxicology*, 2012, (291), 65-72.
  33. Park, M.V.D.Z., Neigh, A.M., Vermeulen, J.P., de la Fonteyne, L.J.J., Verharen, H.W., Briedé, J.J., van Loveren, H. y de Jong, W.H., The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles, *Biomaterials*, 2011, (32), 9810-9817.
  34. Arora, S., Jain, J., Rajwade, J.M. y Paknikar, K.M., Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009, (236), 310-318.
  35. Mukherjee, S.G., O'Claonadh, N., Casey, A. y Chambers, G., Comparative in vitro cytotoxicity study of silver nanoparticle on two mammalian cell lines, *Toxicology in Vitro*, 2012, (26), 238-251.
  36. Carlson, C., Hussain, S.M., Schrand, A.M., K. Braydich Stolle, L., Hess, K.L., Jones, R.L. y Schlager, J.J., Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008, (112), 13608-13619.
  37. Pratsinis, A., Hervella, P., Leroux, J.-C., Pratsinis, S.E. y Sotiriou, G.A., Toxicity of Silver Nanoparticles in Macrophages, *Small*, 2013, n/a-n/a.
  38. Liu, J. y Hurt, R.H., Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids, *Environmental Science & Technology*, 2010, (44), 2169-2175.
  39. Monopoli, M.P., Walczyk, D., Campbell, A., Elia, G., Lynch, I., Baldelli Bombelli, F. y Dawson, K.A., Physical- chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society*, 2011, (133), 2525-2534.
  40. Mahmoudi, M., Azadmanesh, K., Shokrgozar, M.A., Journeay, W.S. y Laurent, S., Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle, *Chemical Reviews*, 2011, (111), 3407-3432.

# Capítulo 9

## Evaluación del tratamiento antibiótico sobre bacterias adheridas a sustratos de Ti modificados con nanopartículas de Ag.

### 9.1 Introducción

Como se ha mencionado en el Capítulo 1, un biofilm es una comunidad bacteriana en la que las células se encuentran adheridas a una superficie e inmersas en una matriz extracelular. Estas bacterias muestran un fenotipo alterado con respecto a las bacterias planctónicas o de vida libre. El biofilm maduro presenta estructuras semejantes a “hongos”, con canales internos que permiten la difusión de nutrientes, oxígeno y moléculas, ayudando así a las bacterias a sobrevivir en ambientes hostiles[1] o en situaciones de estrés, como el agregado de antibióticos, la ausencia de oxígeno o variaciones de temperatura, entre otras. Por otra parte, se sabe que la formación de agregados bacterianos y la presencia de la matriz polimérica formada por las bacterias

dificultan el acceso de los agentes antimicrobianos. Se ha encontrado que las células constituyentes de un biofilm pueden ser hasta 1000 veces menos susceptibles a un antibiótico que las correspondientes planctónicas [2, 3]. Actualmente, no existe un mecanismo aceptado que explique la amplia resistencia del biofilm a los antibióticos[4-7], aunque se ha propuesto que los siguientes factores contribuyen a esta menor susceptibilidad:

- Producción de una matriz polimérica. La matriz generada por las propias bacterias limita la difusión o transporte del agente antimicrobiano hacia las células que constituyen el biofilm [8]. Al mismo tiempo, la matriz puede generar un ambiente anóxico que favorece el crecimiento anaeróbico de las células sésiles, lo cual provoca una disminución de la efectividad de los antibióticos [9]. Por otra parte, se ha encontrado que la matriz de biofilms constituidos por *P. aeruginosa* [10, 11], o por algunas bacterias del género *Staphylococcus* coagulasa negativo [12, 13], exhibe una sobreproducción de enzimas  $\beta$ -lactamasas que permiten hidrolizar los antibióticos  $\beta$ -lactámicos antes de alcanzar las células del biofilm. En consecuencia, la matriz actúa como una barrera para la difusión de los agentes antimicrobianos y brinda un entorno propicio para la producción de enzimas capaces de hidrolizar a estos antibióticos.
- Velocidades de crecimiento bajas. La baja concentración o carencia de nutrientes disminuyen la velocidad de crecimiento de las células, ocasionando bacterias metabólicamente inactivas. En esta situación los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, como la penicilina y ampicilina, no son tan efectivos para matar bacterias, ya que son realmente eficaces cuando éstas se encuentran en fase exponencial de crecimiento [14].
- Situaciones de estrés. Las bajas velocidades de crecimiento de las células dentro del biofilm podrían deberse no sólo a una limitación en la penetración de nutrientes, sino también a una respuesta general ante estrés dentro del biofilm [15]. Esta respuesta es causada por cambios fisiológicos como variaciones en el pH, shocks térmicos y por la presencia de agentes antimicrobianos. Ante estas



situaciones de estrés, surge un regulador central de la respuesta denominado factor  $\sigma$  alternativo o RpoS, el cual en un principio se sugirió que se expresa únicamente en la fase estacionaria de las células [16]. Sin embargo, RpoS es inducido por la alta concentración celular y por el modo de crecimiento de las células en esas condiciones, sometidas a una respuesta de estrés. Este hecho se evidencia por la producción de trehalosa (un agente osmoprotector) y catalasa [17]. En *P. aeruginosa*, esto se ha evidenciado por la presencia de otro factor  $\sigma$  adicional, denominado ALGT, el cual actúa conjuntamente con RpoS para regular la respuesta ante el estrés [18]. Por otra parte, el desarrollo del biofilm está condicionado a la adherencia y a la comunicación entre las células sésiles, esto último denominado *quorum sensing* y, eventualmente, al estrés ambiental [19, 20]. En este mecanismo de comunicación ciertas bacterias independientes perciben la presencia de otras mediante señales extracelulares para desarrollar comportamientos sociales coordinados. Las bacterias advierten la presencia de las señales luego de establecerse una masa crítica bacteriana en un espacio limitado y responden mediante la activación de ciertos operones de enzimas o factores de virulencia. Por ejemplo, en *P. aeruginosa* se producen ramnolípidos que regulan factores de virulencia como enzimas y lisinas celulares [21]. Además, hay un aumento en la expresión de genes de resistencia a los agentes antimicrobianos, encargados de disminuir la susceptibilidad ante diversos antibióticos como tobramicina y ciprofloxacina [14, 22].

- Alteración fenotípica. Es uno de los mecanismos más aceptados para justificar la resistencia de los biofilms. Se conoce que una pequeña fracción de bacterias constituyentes del biofilm pueden sobrevivir a concentraciones letales de antibióticos. Estas bacterias son denominadas persistidoras, ya que son capaces de mantenerse en estado de latencia aún luego del tratamiento antimicrobiano y volver a crecer bajo las condiciones adecuadas [23-25]. La capacidad de supervivencia de las bacterias persistidoras puede deberse a varios factores como la barrera difusional creada por el biofilm, la que genera zonas donde la difusión,

por ejemplo de un antibiótico, es lenta o nula. Además, la presencia de operones que codifican proteínas activas contra antibióticos, el uso de antibióticos cuyo efecto es bacteriostático [26] y, por último, la elevada frecuencia de mutaciones en el seno del biofilm[22]contribuyen a la resistencia a los antibióticos.

El mecanismo mediante el cual las bacterias que forman parte de un biofilm son más resistentes a los agentes antimicrobianos que las correspondientes planctónicas no ha sido dilucidado aún, pero los factores mencionados anteriormente ponen en evidencia la heterogeneidad de las estructuras, composiciones y estados fisiológicos del biofilm microbiano. Por este motivo, en ocasiones se hace necesario el tratamiento combinado con dos o más agentes antimicrobianos para eliminar completamente las bacterias que forman parte del biofilm.

Los tratamientos tradicionales contra biofilms bacterianos apuntan a erradicar las células planctónicas con diversos agentes antimicrobianos, los cuales pueden no ser efectivos debido, principalmente, a que las células desarrollan resistencia a dichos agentes. Por tal motivo, actualmente se plantean nuevos tratamientos que se enfocan sobre diversos aspectos de la formación de comunidades bacterianas, en particular el impedimento del desarrollo de las estructuras celulares que dan inicio al biofilm, tanto desde los componentes que forman parte del biofilm o de la superficie del material donde se desarrolla el biofilm. Con respecto a los componentes del biofilm, entre las estrategias que se han explorado se encuentra la inhibición de la producción de pilis que permiten la adhesión a la superficie [27] y el tratamiento con enzimas que disuelven la matriz del biofilm [28] o degradan componentes de la matriz extracelular [29], entre otros. Asimismo, se puede atacar al biofilm maduro a través de la utilización de péptidos que interfieren con moléculas señalizadoras del mecanismo de *quórum sensing* [30, 31] o aminoácidos que generan daño estructural [32].

Con el objetivo de mejorar los materiales y los métodos para la inhibición de la formación de biofilms, se han utilizado estrategias que involucran la irradiación con luz UV, el tratamiento con ultrasonido, etc, las cuales permiten aumentar la eficacia del agente antimicrobiano, ya sea éste un antibiótico o algún nanomaterial microbicida, tal

como lo son las NPs Ag [33, 34]. Por último, una estrategia que ha demostrado disminuir la colonización bacteriana sobre la superficie de los materiales estudiados es la modificación de la superficie con compuestos antimicrobianos como péptidos, antibióticos o NPs Ag [35-41].

Teniendo en cuenta lo mencionado previamente, se ha planteado como estrategia la combinación de dos o más tratamientos para aumentar la eficacia de los agentes microbicidas. La hipótesis de la que se parte es que esta combinación puede resultar en sinergismo, es decir, la obtención de un efecto mayor que el que se tendría en caso de usar los tratamientos individuales por separado. La sinergia se define como un aumento del efecto producido por la combinación de agentes de al menos 100 veces con respecto al tratamiento individual más activo después de 24 horas de exposición, y, asimismo, un aumento de la mortandad de al menos 100 veces con respecto al inóculo inicial [42]. En tratamientos que involucran la combinación de agentes antimicrobianos puede presentarse un efecto aditivo, en el cual el aumento de la mortandad producida por el tratamiento combinado es menor a 100 veces con respecto al tratamiento individual más efectivo y al inóculo inicial. La combinación de agentes antimicrobianos se ha aplicado para combatir distintas cepas bacterianas resistentes mediante el uso de dos o más antibióticos [43, 44]. Esta estrategia se ha extendido al uso combinado de elementos no convencionales, entre ellos nanomateriales, radiación, etc. Por ejemplo, Zhao *et al.* combinaron NPs Ag con radiación UV, demostrando un efecto sinérgico en la inhibición de la colonización bacteriana [45].

En el presente Capítulo se describirá la respuesta de *P. aeruginosa* y *S. aureus* ante la acción de NPs Ag adsorbidas sobre la superficie de Ti/TiO<sub>2</sub> y el agregado de levofloxacina, un antibiótico de amplio espectro de relevancia clínica para el tratamiento de estos microorganismos. El objetivo de estos ensayos es determinar si el antibiótico es capaz de potenciar el efecto microbicida de la superficie de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg.

## 9.2 Descripción del antibiótico utilizado

La levofloxacina es un antibiótico de la familia de las quinolonas [46]. Dentro de esta familia, el grupo más utilizado para aplicaciones clínicas es el de la fluoroquinolonas, al cual pertenece la levofloxacina [47](Figura 9.1). Ésta un agente activo contra un número considerable de bacterias Gram (+) y Gram (-), como *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermis*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus spp*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella*, entre otras[48-50]. Por lo tanto, se considera a la levofloxacina un antibiótico de amplio espectro.

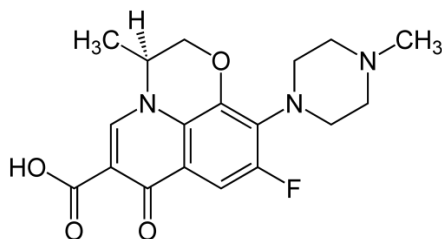


Figura 9.1. Estructura química de la levofloxacina

El mecanismo de acción de este antibiótico se basa en la inhibición de la síntesis de ADN causando la ruptura del ADN bacteriano en los complejos ADN-enzima de la ADN girasa y de la topoisomerasa tipo IV, resultando en una rápida muerte celular [51]. Como regla general, el efecto se correlaciona con la inhibición de la ADN girasa en el caso de bacterias Gram (-) y con la topoisomerasa tipo IV en el caso de bacterias Gram (+)[52]. La levofloxacina, al combinarse con otros agentes antimicrobianos, como antibióticos  $\beta$ -lactámicos, puede generar efectos aditivos y sinérgicos potenciando su acción como agente microbicida [53]. Este antibiótico es más efectivo contra infecciones sistémicas que otros compuestos de la familia, como ciprofloxacina, norfloxacina u ofloxacina[48]. La levofloxacina se utiliza para combatir neumonía, bronquitis crónica, infecciones en diversas partes del cuerpo humano, como los senos paranasales, las vías urinarias, los riñones, la próstata, la piel[47], y en los últimos años, como tratamiento combinado contra *Helicobacter pylori*, causante de gastroenteritis crónica [54]. Además, la

levofloxacina se utiliza para el tratamiento de endocarditis, una inflamación en las válvulas cardíacas causada por la colonización bacteriana (en su mayoría producida por *S. aureus*), durante el reemplazo de la misma por un implante cardíaco [55]. Generalmente este antibiótico se administra oralmente y se excreta a través de la orina[56].

### **9.3 Evaluación de la eficacia de la acción combinada entre superficies de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y levofloxacina sobre biofilms bacterianos**

A continuación se describirán los ensayos llevados a cabo con el objetivo de evaluar la eficacia de la acción combinada de la levofloxacina y la superficie de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg sobre bacterias sésiles *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Para llevar a cabo estos ensayos fue necesario evaluar la concentración microbicida eficaz del antibiótico tanto para bacterias sésiles como para planctónicas, ya que son metabólicamente disímiles y se encuentran en entornos diferentes.

En primer lugar, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de levofloxacina (Parafarm) sobre bacterias planctónicas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, con el objetivo de determinar el rango de concentraciones del antibiótico que resulta efectivo contra estas bacterias. La CMI es la menor concentración necesaria para impedir que un determinado microorganismo continúe multiplicándose después de 24 hs de tratamiento con un agente antimicrobiano. Esta concentración se evaluó de la siguiente manera: se agregó levofloxacina a diferentes alícuotas de un cultivo conteniendo 10<sup>5-6</sup> UFC/mL, cubriendo un rango de concentraciones de antibiótico entre 64 a 0,125 µg/L por 20 hs a 30°C, y se observó en qué alícuota se evidenciaba la ausencia de crecimiento, detectada por falta de turbidez. Las concentraciones de levofloxacina utilizadas fueron de 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 y 0,125 µg/L preparadas en caldo nutritivo estéril, tal como lo estipula el protocolo descrito en Piddock *et al.*[57]. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de

levofloxacina encontrada fue 0,25 µg/L para *S. aureus* y 8 µg/L para *P. aeruginosa*. En el caso de *S. aureus* estos valores se corresponden con lo informado en la literatura [50, 58, 59], mientras que para *P. aeruginosa*, si bien la cepa utilizada aquí proviene de un aislado clínico, la CMI encontrada también concuerda con resultados bibliográficos[50, 58].

La elección de la CMI correspondiente a las bacterias planctónicas como parámetro para evaluar el efecto del antibiótico en combinación con el sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg se basó en el criterio de utilizar la menor concentración posible de antibiótico que sea capaz de potenciar el efecto microbicida de la superficie. Las bacterias planctónicas son más lábiles ante la acción de un antibiótico debido a que no presentan los mismos mecanismos de protección o resistencia que las bacterias sésiles (como se mencionó en la introducción de este capítulo). Sin embargo, utilizar la concentración CMI de las bacterias planctónicas es un punto de partida para los ensayos con bacterias sésiles.

La acción combinada entre la superficie de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y levofloxacina se estudió utilizando concentraciones del antibiótico correspondientes a la CMI y a 0,5xCMI. De acuerdo a los valores de CMI encontrados para ambas cepas, las concentraciones de antibiótico usadas fueron de 0,125 y 0,25 µg/L para *S. aureus*, y 4 y 8 µg/L para *P. aeruginosa*. Los biofilms de ambas cepas fueron preparados sobre sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> sin modificar y Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg, los cuales fueron expuestos a cultivos frescos de ambas bacterias (por separado) con una concentración de 1 x 10<sup>8</sup> UFC/mL por 4 hs a 30°C, tal como fue descrito en el Capítulo 3. Luego los sustratos se retiraron del cultivo y se enjuagaron con agua desionizada estéril. Inmediatamente se sumergieron en caldo nutritivo conteniendo levofloxacina en las concentraciones correspondientes a la CMI y a 0,5xCMI en una placa de 24 pocillos. La placa se incubó por 20 hs a 30°C, dejando un sustrato de cada uno para contabilizar el número de bacterias viables adheridas antes del tratamiento con el antibiótico. Al finalizar el tiempo, los sustratos fueron removidos del medio y enjuagados suavemente con agua desionizada estéril. Por último, se desprendieron las bacterias adheridas viables mediante la utilización de baño de ultrasonido por 15 minutos y con la suspensión obtenida se realizó recuento en placa de bacterias adheridas viables (ver Capítulo 3). Se realizó un análisis estadístico mediante

ANOVA de un solo factor con un  $p < 0,05$  para obtener resultados estadísticamente significativos.

Los resultados del recuento en placa de las bacterias adheridas viables se muestran en la Tabla 9.1. El sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> es un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> control, sin NPs Ag. Los valores obtenidos de las UFC para los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> y Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg (columnas 1 y 2) corresponden a las bacterias adheridas viables de las cuales se parte para realizar el tratamiento con levofloxacina.

Tabla 1. Valores obtenidos del recuento en placa en UFC/cm<sup>2</sup> de bacterias adheridas viables de *S. aureus* y *P. aeruginosa* en presencia y ausencia de levofloxacina.\*Los valores de Ti/TiO<sub>2</sub> y Ti/TiO<sub>2</sub>-NPs Ag corresponden a los valores de las bacterias adheridas iniciales, es decir, a aquellas bacterias adheridas en el plazo de 4 hs sobre los sustratos, de las cuales se parte para realizar el tratamiento con levofloxacina

	*Ti/TiO <sub>2</sub>	*Ti/TiO <sub>2</sub> - NPsAg	Ti/TiO <sub>2</sub> + 0,5xCMI Lev	Ti/TiO <sub>2</sub> - NPsAg + 0,5xCMI Lev	Ti/TiO <sub>2</sub> + CMI Lev	Ti/TiO <sub>2</sub> - NPsAg + CMI Lev
<i>S. aureus</i>	1,36 x 10 <sup>6</sup>	1,45 x 10 <sup>5</sup>	4,19 x 10 <sup>5</sup>	6,08 x 10 <sup>4</sup>	7,69 x 10 <sup>4</sup>	5,35 x 10 <sup>2</sup>
<i>P. aeruginosa</i>	6,56 x 10 <sup>5</sup>	6,62 x 10 <sup>4</sup>	4,09 x 10 <sup>5</sup>	1,21 x 10 <sup>5</sup>	4,57 x 10 <sup>3</sup>	2,1 x 10 <sup>3</sup>

Los resultados del recuento de bacterias adheridas viables de *S. aureus* mostraron en primer lugar que los valores obtenidos para los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub> y Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg se correspondieron con los obtenidos en ensayos anteriores (ver Capítulo 7, sección 7.2.2.2), en los que el sustrato modificado con NPs Ag mostró una disminución significativa de la viabilidad con un  $p < 0,05$ . Por otra parte, los valores obtenidos de UFC/mL para los biofilms de *S. aureus* tratados con una concentración igual a la CMI de levofloxacina exhibieron una disminución en la viabilidad de las bacterias adheridas sobre los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y Ti/TiO<sub>2</sub> con respecto al control (sin tratar con levofloxacina) (Figura 9.2). La disminución de la viabilidad en los sustratos tratados con levofloxacina y el control

fue significativa, con  $p < 0,05$ . El sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg tratado con antibiótico mostró una disminución considerable de la viabilidad bacteriana con respecto este control, indicando que la concentración de antibiótico usada fue adecuada para producir la mortandad de las células.

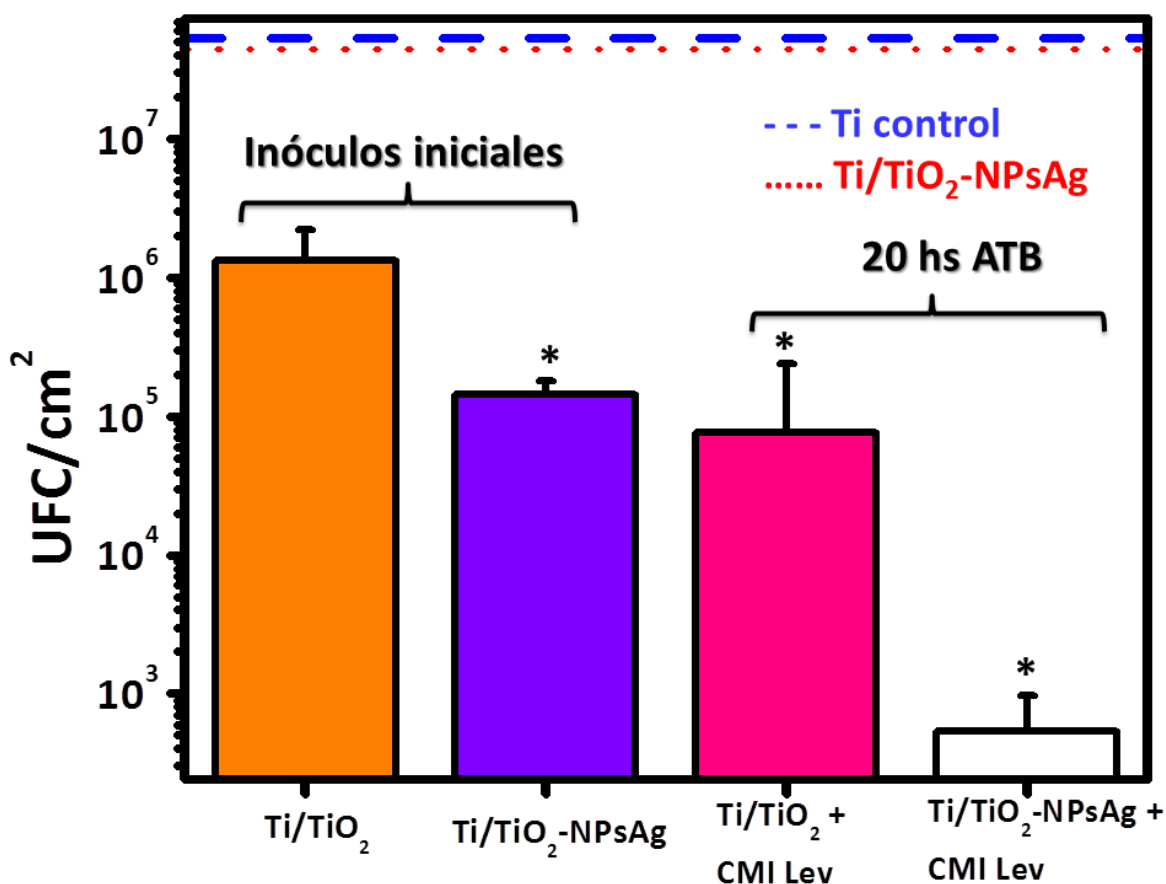


Figura 9.2. Gráfico de las bacterias *S. aureus* adheridas viables sobre sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> iniciales, Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg iniciales y Ti/TiO<sub>2</sub> y Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg tratado con una concentración CMI de levofloxacina. Las líneas punteadas representan los valores obtenidos para biofilms sobre los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub> y Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg expuestos por 20 hs a medio nutritivo en ausencia del antibiótico, los cuales fueron  $5,35 \times 10^7$  y  $4,5 \times 10^7$  UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente (controles de crecimiento). El análisis estadístico se realizó con ANOVA de un factor ( $* \leq 0,05$ ).



Por otra parte, se evaluó la posible existencia de efecto sinérgico en los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg tratados con una concentración CMI de levofloxacin. El biofilm de *S. aureus* formado exhibió un aumento de la mortandad de 2474 veces con respecto al valor correspondiente al sustrato Ti/TiO<sub>2</sub> (sin tratamiento) y de 143 con veces con respecto al valor del sustrato Ti/TiO<sub>2</sub> tratado con CMI de levofloxacin (tratamiento individual más activo), indicando la presencia de un efecto sinérgico en el tratamiento combinado. Esta estrategia demuestra que el empleo de antibiótico a la concentración inhibitoria en conjunto con el sustrato modificado presenta un notable efecto bactericida sobre células sésiles de *S. aureus*.

Por otra parte, la comparación de los valores de UFC correspondientes a los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y los Ti/TiO<sub>2</sub> tratados con levofloxacin mostró que no existen diferencias significativas. Tal hecho evidencia que la modificación de la superficie de Ti con NPs Ag disminuye la viabilidad de las bacterias adheridas en igual medida que lo hace el agregado de levofloxacin en una concentración igual a la CMI. Por ende, la modificación de la superficie con NPs Ag produce el mismo efecto que el agregado del antibiótico.

Los resultados del recuento en placa de las bacterias adheridas viables que corresponde a los sustratos tratados con una concentración de 0,5xCMI de levofloxacin se muestran en la Figura 9.3. Los valores del número de bacterias adheridas viables de los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub> y Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg se correspondieron con los obtenidos en ensayos anteriores, como mencionamos anteriormente. En la Figura 9.3 se observa que para los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y Ti/TiO<sub>2</sub> tratados con 0,5xCMI de levofloxacin existe una disminución de la viabilidad en comparación al Ti/TiO<sub>2</sub>, aunque sin diferencia significativa entre ellos. Únicamente el sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg mostró una disminución significativa de la viabilidad de las bacterias adheridas con respecto al Ti/TiO<sub>2</sub>, en concordancia con los resultados mostrados en el capítulo 7, sección 7.2.2.2. Además, el número de UFC encontradas sobre el sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> tratado con levofloxacin fue superior al encontrado sobre el sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg, indicando que el tratamiento antibiótico no fue efectivo para disminuir la viabilidad de las bacterias. Esto podría deberse a que la concentración de antibiótico usada no fue suficiente para evitar el crecimiento de las

bacterias sésiles. Para corroborar que la disminución de la carga bacteriana sobre los sustratos se debe a los tratamientos aplicados se expusieron los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y Ti/TiO<sub>2</sub> cubiertos con un biofilm formado durante 4 hs a medio de cultivo durante 20 hs en ausencia del antibiótico. Los valores de UFC fueron del orden 10<sup>7</sup> para ambos sustratos, demostrando que ante la ausencia del antibiótico las bacterias adheridas siguen proliferando. Este comportamiento está representado en las Figuras 9.2 y 9.3 mediante líneas punteadas.

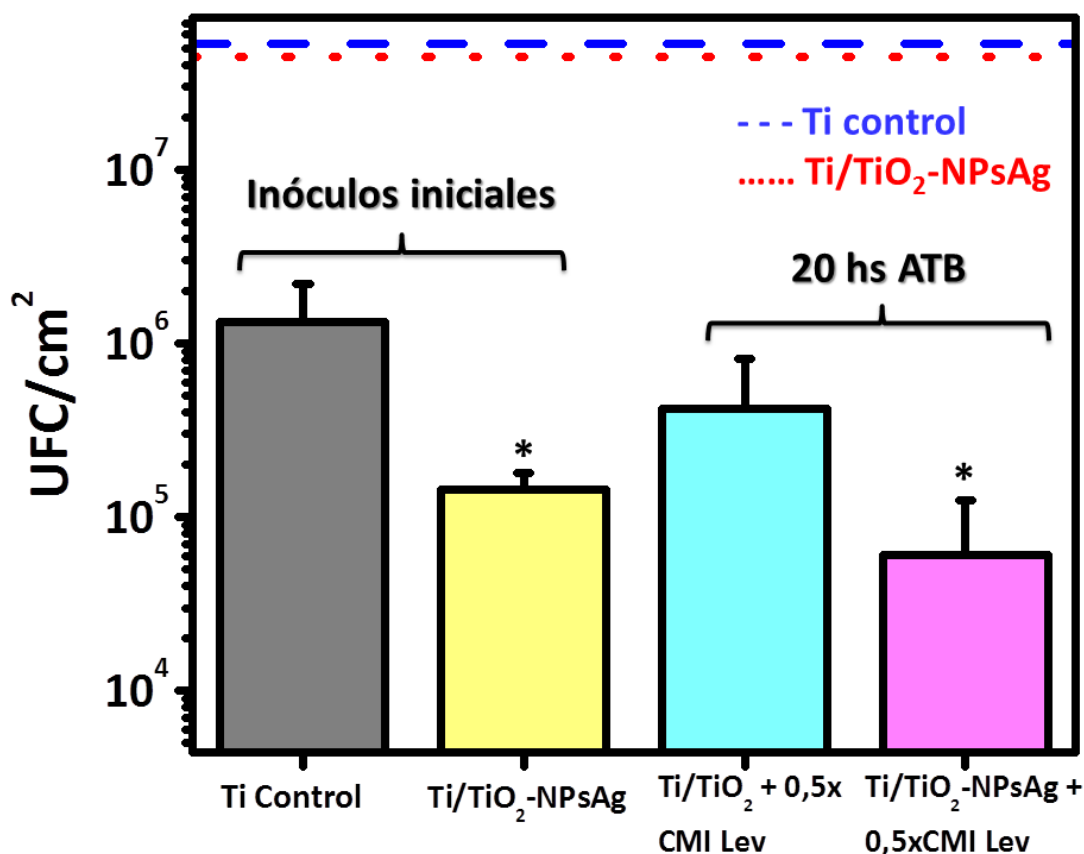


Figura 9.3 Gráfico de las bacterias *S. aureus* adheridas viables sobre sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> iniciales, Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg iniciales, Ti/TiO<sub>2</sub> y Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg tratado con una concentración 0,5xCMI de levofloxacina. Las líneas punteadas representan los valores obtenidos para biofilms sobre los sustratos Ti/TiO<sub>2</sub> y Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg expuestos por 20 hs a medio nutritivo en ausencia del antibiótico, los cuales fueron 5,35 × 10<sup>7</sup> y 4,5 × 10<sup>7</sup> UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente (controles de crecimiento). El análisis estadístico se realizó con ANOVA de un factor (\*≤0,05).

También en este caso se analizó la posible existencia de un efecto sinérgico, encontrándose que para el sustrato Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg la mortandad aumentó 20 veces con respecto a Ti/TiO<sub>2</sub> y 6 veces con respecto a Ti/TiO<sub>2</sub> tratado con 0,5x CMI. Estos valores nos indicaron que no hubo efecto sinérgico entre ambos tratamientos. El empleo de una concentración de 0,5x CMI de levofloxacina tuvo como propósito intentar evaluar la menor concentración de ATB que en conjunto con el sustrato modificado disminuyera significativamente la viabilidad de las células sésiles. Evidentemente la concentración 0,125 µg/L (0,5x CMI) de levofloxacina no corresponde a una concentración de antibiótico que ejerza un efecto microbicida (inhibitorio) marcado sobre bacterias planctónicas; en consecuencia es razonable que no pueda potenciar la inhibición de la proliferación de bacterias sésiles.

Los resultados del recuento en placa de las bacterias adheridas viables de *P. aeruginosa* se muestran en la tabla 9.1, Figura 9.4 y 9.5. En primer lugar, sobre el sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg se encontró una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la viabilidad de las bacterias adheridas con respecto al Ti/TiO<sub>2</sub>, tal como se había demostrado en el Capítulo 7, confirmando que la modificación con NPs Ag fue efectiva en disminuir la colonización bacteriana. Con respecto a los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y Ti/TiO<sub>2</sub> tratados con una concentración 0,5x CMI de levofloxacina, no se evidenció una disminución en la viabilidad de las bacterias adheridas, sino que se obtuvieron valores similares para ambos casos, indicando el tratamiento antibiótico a dicha concentración no fue eficaz en inhibir la colonización en ambos sustratos, de lo que se infiere que no se produce un efecto sinérgico.

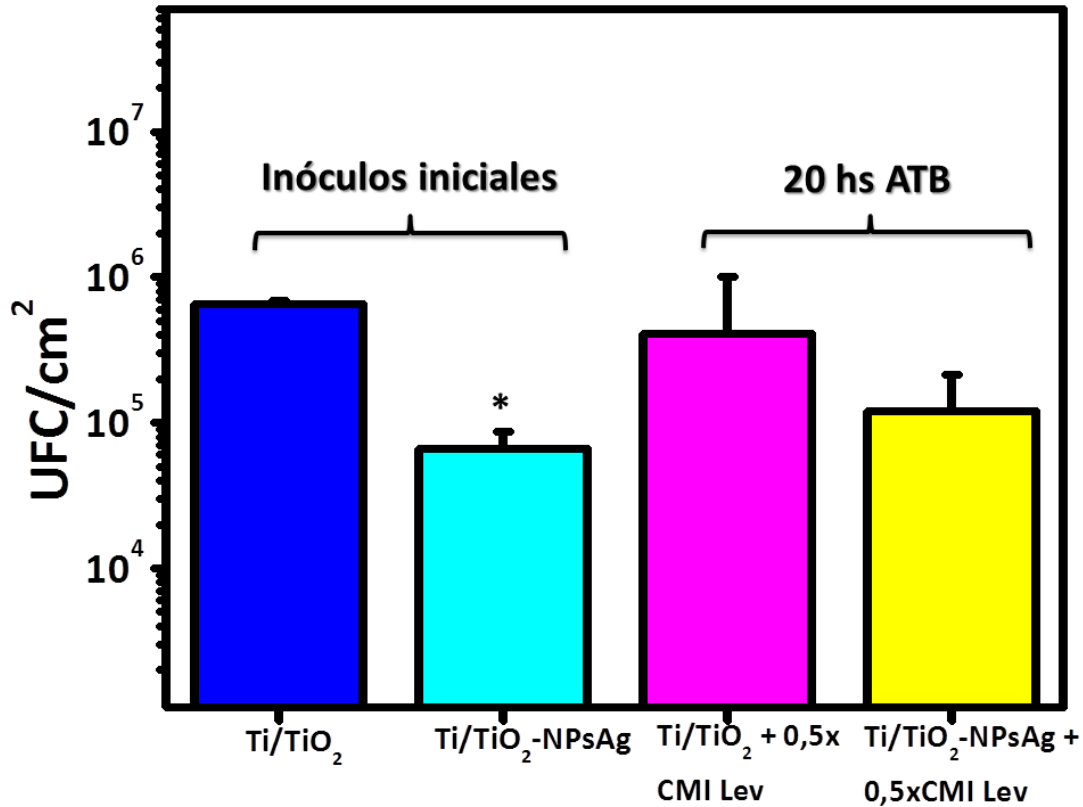


Figura 9.4 Gráfico de las bacterias *P. aeruginosa* adheridas viables sobre sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> iniciales, Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg iniciales, Ti/TiO<sub>2</sub> y Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg tratados con una concentración 0,5x CMI de levofloxacina. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de un factor (\* $\leq 0,05$ ).

Con respecto a los biofilms sobre los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y Ti/TiO<sub>2</sub> tratados con una concentración igual a la CMI de levofloxacina, se observó una disminución significativa de la viabilidad con respecto a la cantidad inicial de bacterias sobre el sustrato Ti/TiO<sub>2</sub> sin tratamiento antibiótico ( $p < 0,05$ ). Además, luego del agregado del agente antimicrobiano, se encontró una leve inhibición de la viabilidad de las bacterias adheridas con respecto al sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg. Sin embargo, cuando se compararon los valores correspondientes a Ti/TiO<sub>2</sub> y Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg tratados con el antibiótico, no se observó una diferencia significativa en el número de UFC/mL. Este resultado sugiere que el agregado del antibiótico al sustrato modificado no ejerce un efecto sinérgico en su acción bactericida. No obstante esto, se observó que el número de UFC viables luego del

tratamiento combinado disminuyó a la mitad cuando se lo comparó con el tratamiento individual más efectivo (agregado de antibiótico). Asimismo, el tratamiento combinado produjo una disminución en el número de UFC de alrededor de 300 veces con respecto al valor inicial. Estos resultados indican la existencia de un efecto aditivo en ambos agentes usados en combinación.

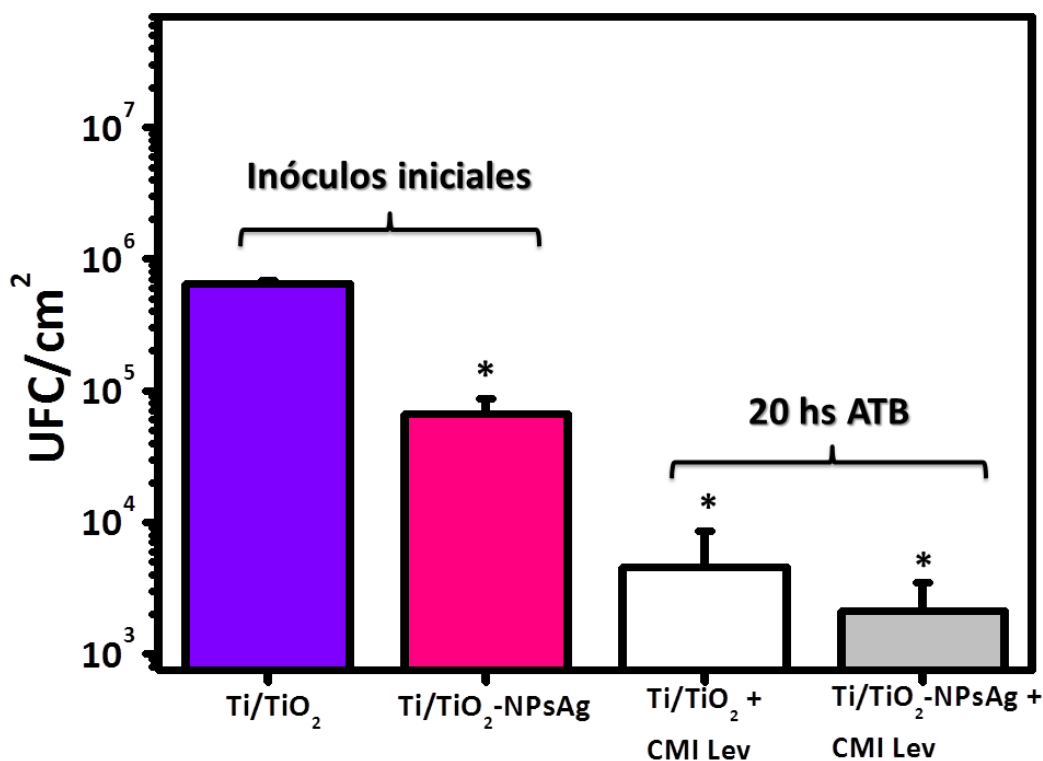


Figura 9.5 Gráfico de las bacterias *P. aeruginosa* adheridas viables sobre sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> iniciales, Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg iniciales, Ti/TiO<sub>2</sub> y Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg tratado con una concentración CMI de levofloxacina.

Los resultados obtenidos demostraron que la modificación de la superficie de Ti con NPs Ag produce el mismo efecto bactericida que el agregado de un antibiótico de amplio espectro como la levofloxacina, en una concentración que corresponde a la CMI. Por otra parte, la presencia de efecto aditivo en el tratamiento del sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg con CMI de levofloxacina podría deberse a que en dicha concentración este

antibiótico es lo suficientemente efectivo como para disminuir la proliferación de *P. aeruginosa* [60, 61]. Cabe destacar que la levofloxacina es usada como antibiótico de preferencia para el tratamiento contra esta bacteria en neumonías e infecciones sistémicas [62],

El efecto combinado de NPs Ag y otros agentes antimicrobianos ha sido estudiado por diversos autores [63-66]. En todos los casos se ha informado el uso de NPs Ag en suspensión combinadas con diversos antibióticos o agentes microbicidas para potenciar el efecto de las NPs Ag. Uno de los primeros trabajos acerca de la combinación de NPs Ag y antibióticos fue realizado por Li *et al.*, quienes encontraron que mediante el uso de una concentración 0,5 µg/mL (CMI) de amoxicilina junto con 40 µg/mL de NPs se inhibía la proliferación de *E. coli* [65]. Ruden *et al.*, por otra parte, estudiaron NPs Ag combinadas con péptidos como polimicina B y gramidicina, agentes que permeabilizan la membrana plásmática, encontrando que estas sustancias potenciaban el efecto de las NPs Ag sobre *E. coli* y *P. fluorescens* [67]. Dhas *et al.* informaron que ciertas NPs Ag obtenidas mediante síntesis verde en suspensión y combinadas con antibióticos como gentamicina y cloranfenicol, producían efecto sinérgico contra *Bacillus cereus* y *S. aureus* [68]. Este resultado sigue la tendencia encontrada en el presente trabajo, aunque en este caso las NPs Ag se encuentran inmovilizadas sobre la superficie de interés. Resultados similares fueron reportados por Dar *et al.*, quienes combinaron diversos antibióticos con NPs Ag sintetizadas por química verde [69]. A diferencia de los trabajos anteriores, el efecto sinérgico del presente Trabajo fue resultado de la combinación de NPs Ag inmovilizadas sobre una superficie y un antibiótico de amplio espectro. Cabe destacar que los resultados obtenidos no pueden ser comparados directamente con los datos bibliográficos, dada la amplia variedad de NPs Ag y los diferentes agentes antimicrobianos utilizados en dichos estudios. Asimismo, como se mencionó anteriormente, las NPs Ag utilizadas en el presente trabajo estuvieron adsorbidas sobre una superficie por lo que el contacto con las bacterias es diferente al que se encuentra en el caso de suspensiones de NPs Ag.

## 9.4 Conclusiones

En el presente Capítulo se describieron los ensayos realizados que involucran el tratamiento combinado de una superficie de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg y un antibiótico sobre los biofilms de *P. aeruginosa* y *S. aureus*, con el objetivo de determinar la posible existencia de una disminución de la viabilidad de las bacterias sésiles gracias al agregado de un antibiótico. En primer lugar los resultados mostraron que la modificación de la superficie de Ti con NPs Ag posee una capacidad microbicida similar al de un antibiótico como la levofloxacin sobre bacterias sésiles.

Por otra parte, en el caso de *S. aureus* se encontró un efecto sinérgico, demostrando que el agregado potenció el efecto de la superficie modificada. En efecto, el agregado de una dosis baja del antibiótico, la cual corresponde a la concentración CMI de las bacterias planctónicas, disminuyó considerablemente la viabilidad de las bacterias adheridas. Es interesante remarcar que es posible alcanzar dicha concentración *in vivo* durante el tratamiento terapéutico. En el caso de *P. aeruginosa* sólo pudo demostrarse la existencia efecto aditivo, es decir que ambos agentes contribuyeron a la disminución de la viabilidad de las bacterias, pero el efecto combinado no alcanzó a ser 100 veces el del componente más efectivo. Este resultado fue previamente informado para el caso de bacterias Gram (-) tratadas con antibióticos y NPs Ag en suspensión. [64, 70].

La estrategia planteada (modificación superficial + antibiótico) fue exitosa, ya que permitió prevenir la formación de biofilms en estadíos tempranos utilizando concentraciones bajas de antibióticos y, por consiguiente, disminuyendo la exposición del paciente a estos agentes antimicrobianos. Los resultados ponen en evidencia que se puede potenciar la acción bactericida de los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>-NPsAg si se suma el tratamiento con un antibiótico de amplio espectro. De esta forma se podría plantear una terapia efectiva contra focos infecciosos que se podría aplicar sobre implantes dentales u ortopédicos de Ti sin la necesidad de grandes costos y evitando inconvenientes al paciente.

## Referencias bibliográficas

1. Breidenstein, E.B.M., de la Fuente-Núñez, C. y Hancock, R.E.W., *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance, *Trends in microbiology*, 2011, (19), 419-426.
2. Gilbert, P., Collier, P.J. y Brown, M.R., Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1990, (34), 1865-1868.
3. Costerton, J.W., Stewart, P.S. y Greenberg, E.P., Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections, *Science*, 1999, (284), 1318-1322.
4. Stewart, P.S. y William Costerton, J., Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, *The Lancet*, 2001, (358), 135-138.
5. Lewis, K., Riddle of Biofilm Resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, (45), 999-1007.
6. Mah, T.-F.C. y O'Toole, G.A., Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents, *Trends in Microbiology*, 2001, (9), 34-39.
7. Gilbert, P., Maira-Litran, T., McBain, A.J., Rickard, A.H. y Whyte, F.W., The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities, in *Advances in Microbial Physiology*. 2002, Academic Press, 203-256.
8. Anderl, J.N., Franklin, M.J. y Stewart, P.S., Role of Antibiotic Penetration Limitation in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, (44), 1818-1824.
9. Tack, K.J. y Sabath, L.D., Increased Minimum Inhibitory Concentrations with Anaerobiasis for Tobramycin, Gentamicin, and Amikacin, Compared to Latamoxef, Piperacillin, Chloramphenicol, and Clindamycin, *Chemotherapy*, 1985, (31), 204-210.
10. Ciofu, O., Beveridge, T.J., Kadurugamuwa, J., Walther-Rasmussen, J. y Høiby, N., Chromosomal  $\beta$ -lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2000, (45), 9-13.
11. Dibdin, G.H., Assinder, S.J., Nichols, W.W. y Lambert, P.A., Mathematical model of  $\beta$ -lactam penetration into a biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* while undergoing simultaneous inactivation by released  $\beta$ -lactamases, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1996, (38), 757-769.
12. Dunne, W.M., Effects of subinhibitory concentrations of vancomycin or cefamandole on biofilm production by coagulase-negative staphylococci, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1990, (34), 390-393.
13. Permin, H., Koch, C., Heiby, N., Christensen, H.O., Møller, A.F. y Møller, S., Ceftazidime treatment of chronic *Pseudomonas aeruginosa* respiratory tract infection in cystic fibrosis, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1983, (12), 313-323.
14. Fernández, L., Breidenstein, E.B.M. y Hancock, R.E.W., Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics, *Drug Resistance Updates*, 2011, (14), 1-21.



15. Brown, M.R.W. y Barker, J., Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms, *Trends in Microbiology*, 1999, (7), 46-50.
16. Hengge-Aronis, R., Regulation of gene expression during entry into stationary phase, *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC, 1996, 1497-1512.
17. Liu, X., Ng, C. y Ferenci, T., Global adaptations resulting from high population densities in *Escherichia coli* cultures, *Journal of Bacteriology*, 2000, (182), 4158-4164.
18. Foley, I., Marsh, P., Wellington, E., Smith, A. y Brown, M., General stress response master regulator rpoS is expressed in human infection: a possible role in chronicity, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1999, (43), 164-165.
19. Bjarnsholt, T. y Givskov, M., The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, (387), 409-414.
20. Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, N.J.L. y Salmond, G.P.C., Quorum-sensing in Gram-negative bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 2001, (25), 365-404.
21. Jensen, P.Ø., Bjarnsholt, T., Phipps, R., Rasmussen, T.B., Calum, H., Christoffersen, L., Moser, C., Williams, P., Pressler, T., Givskov, M. y Høiby, N., Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology*, 2007, (153), 1329-1338.
22. Driffield, K., Miller, K., Bostock, J.M., O'Neill, A.J. y Chopra, I., Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008, (61), 1053-1056.
23. Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N. y Lewis, K., Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 2004, (186), 8172-8180.
24. Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y. y Lewis, K., Persister cells and tolerance to antimicrobials, *FEMS Microbiology Letters*, 2004, (230), 13-18.
25. Lewis, K., Persister cells, dormancy and infectious disease, *Nature Reviews Microbiology*, 2006, (5), 48-56.
26. Lewis, K., Multidrug Tolerance of Biofilms and Persister Cells, in *Bacterial Biofilms*, T. Romeo, Editor. 2008, Springer Berlin Heidelberg, 107-131.
27. Cegelski, L., Pinkner, J.S., Hammer, N.D., Cusumano, C.K., Hung, C.S., Chorell, E., Åberg, V., Walker, J.N., Seed, P.C. y Almqvist, F., Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation, *Nature chemical biology*, 2009, (5), 913-919.
28. Nemoto, K., Hirota, K., Ono, T., Murakami, K., Nagao, D. y Miyake, Y., Effect of Varidase (streptokinase) on biofilm formed by *Staphylococcus aureus*, *Chemotherapy*, 2000, (46), 111-115.
29. Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C. y Mattick, J.S., Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation, *Science*, 2002, (295), 1487.

30. Boyd, C.D. y O'Toole, G.A., Second Messenger Regulation of Biofilm Formation: Breakthroughs in Understanding c-di-GMP Effector Systems, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2012, (28), 439-462.
31. Pesavento, C. y Hengge, R., Bacterial nucleotide-based second messengers, *Current Opinion in Microbiology*, 2009, (12), 170-176.
32. Hochbaum, A.I., Kolodkin-Gal, I., Foulston, L., Kolter, R., Aizenberg, J. y Losick, R., Inhibitory Effects of d-Amino Acids on *Staphylococcus aureus* Biofilm Development, *Journal of Bacteriology*, 2011, (193), 5616-5622.
33. Pitt, W.G., McBride, M.O., Lunceford, J.K., Roper, R.J. y Sagers, R.D., Ultrasonic enhancement of antibiotic action on gram-negative bacteria, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1994, (38), 2577-2582.
34. Kasimanickam, R.K., Ranjan, A., Asokan, G., Kasimanickam, V.R. y Kastelic, J.P., Prevention and treatment of biofilms by hybrid-and nanotechnologies, *International journal of nanomedicine*, 2013, (8), 2809.
35. Samuel, U. y Guggenbichler, J.P., Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2004, (23, Supplement 1), 75-78.
36. Gottenbos, B., van der Mei, H.C., Klatter, F., Nieuwenhuis, P. y Busscher, H.J., In vitro and in vivo antimicrobial activity of covalently coupled quaternary ammonium silane coatings on silicone rubber, *Biomaterials*, 2002, (23), 1417-1423.
37. Caro, A., Humblot, V., Méthivier, C., Minier, M., Salmain, M.I. y Pradier, C.-M., Grafting of Lysozyme and/or Poly(ethylene glycol) to Prevent Biofilm Growth on Stainless Steel Surfaces, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2009, (113), 2101-2109.
38. Buck, M.E., Breitbach, A.S., Belgrade, S.K., Blackwell, H.E. y Lynn, D.M., Chemical Modification of Reactive Multilayered Films Fabricated from Poly(2-alkenyl azlactone)s: Design of Surfaces that Prevent or Promote Mammalian Cell Adhesion and Bacterial Biofilm Growth, *Biomacromolecules*, 2009, (10), 1564-1574.
39. Antoci Jr, V., Adams, C.S., Parvizi, J., Davidson, H.M., Composto, R.J., Freeman, T.A., Wickstrom, E., Ducheyne, P., Jungkind, D., Shapiro, I.M. y Hickok, N.J., The inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by vancomycin-modified titanium alloy and implications for the treatment of periprosthetic infection, *Biomaterials*, 2008, (29), 4684-4690.
40. Yoshinari, M., Kato, T., Matsuzaka, K., Hayakawa, T. y Shiba, K., Prevention of biofilm formation on titanium surfaces modified with conjugated molecules comprised of antimicrobial and titanium-binding peptides, *Biofouling*, 2009, (26), 103-110.
41. Gray, J.E., Norton, P.R., Alnouno, R., Marolda, C.L., Valvano, M.A. y Griffiths, K., Biological efficacy of electroless-deposited silver on plasma activated polyurethane, *Biomaterials*, 2003, (24), 2759-2765.
42. Bonapace, C.R., White, R.L., Friedrich, L.V. y Bosso, J.A., Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2000, (38), 43-50.

43. Moellering, R. y Weinberg, A.N., Studies on antibiotic synergism against enterococci, *J. Clin. Invest*, 1971, (50), 2580-2584.
44. Klustersky, J. y Zinner, S.H., Synergistic Combinations of Antibiotics in Gram-Negative Bacillary Infections, *Review of Infectious Diseases*, 1982, (4), 294-301.
45. Zhao, X., Toyooka, T. y Ibuki, Y., Synergistic bactericidal effect by combined exposure to Ag nanoparticles and UVA, *Science of The Total Environment*, 2013, (458), 54-62.
46. Class, I., Ciprofloxacin, O.F., Sparfloxacin, L.L. y Moxifloxacin, G.T., Quinolones: a comprehensive review, *Am Fam Physician*, 2002, (65), 455-465.
47. Davis, R. y Bryson, H., Levofloxacin, *Drugs*, 1994, (47), 677-700.
48. Maguiña Vargas, C. y Solari Zerpa, L., Nuevas y viejas quinolonas, *Revista Médica Herediana*, 2002, (13), 153-160.
49. Preston, S.L., Drusano, G.L., Berman, A.L., Fowler, C.L., Chow, A.T., Dornseif, B., Reichl, V., Natarajan, J. y Corrado, M., Pharmacodynamics of levofloxacin, *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 1998, (279), 125-129.
50. Fish, D.N. y Chow, A.T., The clinical pharmacokinetics of levofloxacin, *Clinical pharmacokinetics*, 1997, (32), 101-119.
51. Blondeau, J.M., Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance, *Survey of Ophthalmology*, 2004, (49), S73-S78.
52. Oliphant, C.M. y Green, G.M., Quinolones: a comprehensive review, *Am Fam Physician*, 2002, (65), 455-464.
53. Isenberg, H., Alperstein, P. y France, K., In vitro activity of ciprofloxacin, levofloxacin, and trovafloxacin, alone and in combination with  $\beta$ -lactams, against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Burkholderia cepacia*, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 1999, (33), 81-86.
54. Shah, A., Javid, G., Zargar, S., Teli, F., Khan, B., Yattoo, G., Gulzar, G., Sodhi, J., Khan, M., Shoukat, A. y Saif, R., Safety and efficacy of 1-week levofloxacin-based triple therapy in first-line treatment for *Helicobacter pylori*-related peptic ulcer disease in Kashmir, India, *Indian Journal of Gastroenterology*, 2013, (32), 32-36.
55. Entenza, J., Vouillamoz, J., Glauser, M. y Moreillon, P., Levofloxacin versus ciprofloxacin, flucloxacillin, or vancomycin for treatment of experimental endocarditis due to methicillin-susceptible or-resistant *Staphylococcus aureus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997, (41), 1662-1667.
56. Anderson, V. y Perry, C., Levofloxacin, *Drugs*, 2008, (68), 535-565.
57. Piddock, L.J.V., Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria, *Journal of Applied Microbiology*, 1990, (68), 307-318.
58. Fu, K., Lafredo, S.C., Foleno, B., Isaacson, D., Barrett, J., Tobia, A. y Rosenthale, M., In vitro and in vivo antibacterial activities of levofloxacin (l-ofloxacin), an optically active ofloxacin, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1992, (36), 860-866.
59. Schmitz, F., Hofmann, B., Hansen, B., Scheuring, S., Lückefahr, M., Klootwijk, M., Verhoef, J., Fluit, A., Heinz, H. y Köhrer, K., Relationship between ciprofloxacin, ofloxacin,

- levofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin (BAY 12-8039) MICs and mutations in *grlA*, *grlB*, *gyrA* and *gyrB* in 116 unrelated clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1998, (41), 481-484.
60. Buyck, J.M., Tulkens, P.M. y Van Bambeke, F., Pharmacodynamic Evaluation of the Intracellular Activity of Antibiotics towards *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in a Model of THP-1 Human Monocytes, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, (57), 2310-2318.
  61. Stockmann, C., Sherwin, C.M.T., Ampofo, K. y Spigarelli, M.G., Development of levofloxacin inhalation solution to treat *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis, *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 2014, (8), 13-21.
  62. Bodí, M. y Garnacho, J., *Pseudomonas aeruginosa*: tratamiento combinado frente a monoterapia, *Medicina intensiva*, 2007, (31), 83-87.
  63. Allahverdiyev, A.M., Kon, K.V., Abamor, E.S., Bagirova, M. y Rafailovich, M., Coping with antibiotic resistance: combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents, *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2011, (9), 1035-1052.
  64. Fayaz, A.M., Balaji, K., Girilal, M., Yadav, R., Kalaichelvan, P.T. y Venketesan, R., Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2010, (6), 103-109.
  65. Li, P., Li, J., Wu, C., Wu, Q. y Li, J., Synergistic antibacterial effects of  $\beta$ -lactam antibiotic combined with silver nanoparticles, *Nanotechnology*, 2005, (16), 1912.
  66. Daima, H.K., Selvakannan, P.R., Kandjani, A.E., Shukla, R., Bhargava, S.K. y Bansal, V., Synergistic influence of polyoxometalate surface corona towards enhancing the antibacterial performance of tyrosine-capped Ag nanoparticles, *Nanoscale*, 2014, (6), 758-765.
  67. Ruden, S., Hilpert, K., Berditsch, M., Wadhvani, P. y Ulrich, A.S., Synergistic interaction between silver nanoparticles and membrane-permeabilizing antimicrobial peptides, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, (53), 3538-3540.
  68. Dhas, S.P., Mukherjee, A. y Chandrasekaran, N., Synergistic effect of biogenic silver nanocolloid in combination with antibiotics: a potent therapeutic agent, *Int J Pharm Pharm Sci*, 2013, (5), 1.
  69. Dar, M.A., Ingle, A. y Rai, M., Enhanced antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cryphonectria* sp. evaluated singly and in combination with antibiotics, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2013, (9), 105-110.
  70. Birla, S., Tiwari, V., Gade, A., Ingle, A., Yadav, A. y Rai, M., Fabrication of silver nanoparticles by *Phoma glomerata* and its combined effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, *Letters in Applied Microbiology*, 2009, (48), 173-179.

# Capítulo 10

## Conclusiones generales

En este trabajo de Tesis se partió de la hipótesis de que las NPs Ag tienen capacidad bactericida, tanto en dispersión como inmovilizadas sobre superficies de interés en materiales implantables. Para corroborar esta hipótesis, se optimizó el método de síntesis de NPs Ag recubiertas con citrato de manera de obtener NPs monodispersas y estables en medios acuosos. Asimismo, se estudió la inmovilización de estas NPs Ag sobre superficies de Ti/TiO<sub>2</sub>, encontrándose que las mismas se adsorben espontáneamente sobre dichas superficies como resultado de la inmersión del sustrato en la dispersión acuosa de NPs. Se analizó el efecto antimicrobiano de estas NPs Ag sobre bacterias Gram (-) (*P. aeruginosa*) y bacterias Gram (+) (*S. aureus*), tanto en dispersión como inmovilizadas sobre los sustratos antes mencionados. Las conclusiones generales obtenidas de este trabajo se describen a continuación.

En primer lugar, el método de síntesis optimizado permitió obtener NPs Ag monodispersas de  $6 \pm 2$  nm de diámetro recubiertas con citrato. Se pudo concluir que las NPs están formadas fundamentalmente por Ag metálica, ya que no se detectó la presencia

de óxidos del metal. Estas NPs Ag resultaron ser estables en medio acuoso por varios meses.

Las NPs Ag se adsorbieron espontáneamente sobre sustratos de titanio (Ti/TiO<sub>2</sub>), sin necesidad de realizar tratamientos previos a la superficie del sustrato. Las mismas se inmovilizaron formando agregados nanométricos formados por NPs individuales que crecieron en capas. Estos agregados se adsorbieron fuertemente sobre la superficie del sustrato y se distribuyeron homogéneamente sobre la misma. La fuerte adsorción de las NPs Ag al sustrato se puede explicar en términos de la fuerte interacción existente entre los grupos carboxilato y las superficies oxidadas [1-3]. En lo que respecta a la formación de islas 3D de NPs, éstas deben estar necesariamente estabilizadas por interacciones nanopartícula-nanopartícula. La naturaleza de las mismas se puede atribuir tanto a interacciones del tipo van der Waals como a interacciones por puentes de hidrógeno entre las moléculas de citrato que recubren las NPs Ag, tal como ha sido propuesto para nanopartículas de oro [4].

Por otra parte, se pudo comprobar la capacidad microbicida de las NPs Ag sobre bacterias Gram (-) y bacterias Gram (+) (*P. aeruginosa* y *S. aureus*, respectivamente), tanto en dispersión acuosa como inmovilizadas sobre los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>. Con respecto a las NPs Ag en dispersión, se determinaron los valores de CMB para ambas cepas, resultando éstas inferiores a otras informadas en la literatura para NPs Ag de diámetros y recubrimientos distintos a los empleados en el presente trabajo (ver Capítulo 5). Estos resultados permiten concluir que las NPs Ag preparadas poseen una alta capacidad bactericida, ya que se produce una mortandad del 99,9 % con sólo pequeñas dosis de las mismas. Por otro lado, la CMB obtenida para *P. aeruginosa* fue menor que la correspondiente a *S. aureus*, indicando una mayor susceptibilidad de las bacterias Gram (-) ante la presencia de NPs Ag. Este hecho puede ser explicado en términos de diferencias de la estructura de la pared celular: las bacterias Gram (-) serían más susceptibles a las NPs debido a que poseen una pared celular menos rígida y que contiene una proporción menor de peptidoglicanos que las bacterias Gram (+). Por otro lado, el mecanismo de acción de las NPs Ag no está completamente establecido, habiéndose propuesto que

tanto los iones Ag (I) liberados al medio como las nanopartículas mismas son responsables de su efecto bactericida. En cualquier caso, la pared celular juega un rol importante en la interacción Ag (I)/célula o NP Ag/célula.

Los estudios realizados con células osteoblásticas permitieron concluir que la concentración mínima de Ag total presente en las NPs Ag necesaria para erradicar ambas bacterias ensayadas no genera efectos citotóxicos en dichas células. La diferencia en magnitud entre las concentraciones que muestran efecto bactericida para *S. aureus* y para *P. aeruginosa* (menor que 4  $\mu$ M) y la que resulta citotóxica para las células osteoblásticas (mayor que 50  $\mu$ M) permite concluir que habría una ventana de concentraciones en la que se pueden usar las NPs Ag como agente antibacteriano sin producir efectos adversos en las células cercanas a, por ejemplo, la superficie de un implante modificado con NPs Ag.

En cuanto a los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> modificados con NPs Ag, éstos demostraron ser eficaces para inhibir la formación de biofilms de ambas bacterias (*P. aeruginosa* y *S. aureus*). El efecto bactericida de las NPs Ag adsorbidas fue similar para bacterias Gram (+) y bacterias Gram (-). Esta aparente discrepancia con los resultados obtenidos para el caso de bacterias planctónicas, en los que *P. aeruginosa* era más susceptible que *S. aureus*, se puede explicar por la presencia de EPS exudado por *P. aeruginosa* durante la formación del biofilm. Este material polimérico extracelular actúa como una barrera protectora ante la acción bactericida de las NPs Ag adsorbidas. Asimismo, se halló que el efecto bactericida producido por las NPs Ag adsorbidas es similar al causado por un sustrato de Ag masivo, indicando que muy pequeñas dosis de plata adsorbidas sobre la superficie son suficientes para producir este efecto.

El agregado de levofloxacina (un antibiótico de amplio espectro) en concentraciones iguales a la CMI a las superficies de Ti/TiO<sub>2</sub> – NPs Ag produjo un efecto sinérgico en el caso de *S. aureus*, mientras que para *P. aeruginosa* sólo se encontró efecto aditivo. El uso de un antibiótico podría constituir una estrategia adicional para potenciar el efecto bactericida de las superficies modificadas con NPs Ag.

Finalmente, se debe destacar la importancia de los resultados de este trabajo en relación a los materiales implantables. El método desarrollado para modificar las superficies de titanio, un material biocompatible y con una alta resistencia a la corrosión utilizado en implantes, es rápido, sencillo y de bajo costo, pudiendo llevarse a cabo en cualquier entorno clínico y sin la necesidad de contar para ello con personal altamente capacitado.



## Referencias bibliográficas

1. Onishi, H., Carboxylates Adsorbed on TiO<sub>2</sub> (110), in Chemistry of Nanomolecular Systems, T. Nakamura, et al., Editors. 2003, Springer Berlin Heidelberg, 75-89.
2. Sasahara, A., Uetsuka, H. y Onishi, H., Image topography of alkyl-substituted carboxylates observed by noncontact atomic force microscopy, *Surface Science*, 2001, (481), L437-L442.
3. Weisz, A.D., Regazzoni, A.E. y Blesa, M.A., ATR-FTIR study of the stability trends of carboxylate complexes formed on the surface of titanium dioxide particles immersed in water, *Solid State Ionics*, 2001, (143), 125-130.
4. Grumelli, D., Vericat, C., Benitez, G., Vela, M.E., Salvarezza, R.C., Giovanetti, L.J., Ramallo-López, J.M., Requejo, F.G., Craievich, A.F. y Shon, Y.S., Thiol-Capped Gold Nanoparticles on Graphite: Spontaneous Adsorption and Electrochemically Induced Release, *The Journal of Physical Chemistry C*, 2007, (111), 7179-7184.

## Apéndice A

### Cálculo del cubrimiento de Ag adsorbida sobre la superficie de los sustratos de titanio

El cubrimiento de los agregados de NPs Ag sobre la superficie de los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> se estimó considerando las intensidades de los fotoelectrones emitidos y planteando un modelo del cubrimiento de los agregados sobre la superficie del sustrato. Se adoptó el modelo que se encuentra esquematizado en la Figura A.1. El mismo consiste en considerar una submonocapa de un metal (la Ag, en este caso) en un sólido semi-infinito (el titanio).

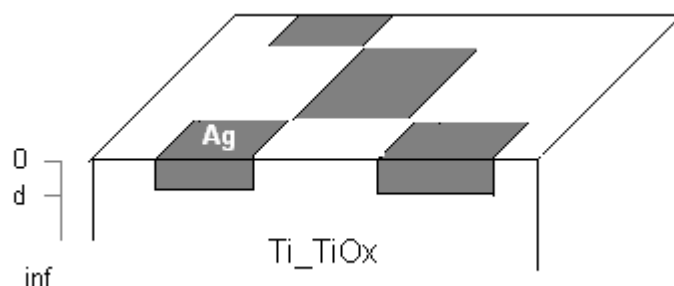


Figura A.1. Esquema del modelo empleado para determinar el cubrimiento de los agregados de NPs Ag.

Debe tenerse en cuenta que al generarse un fotoelectrón en el sólido, en este caso el Ti, aquél debe atravesar las capas atómicas del material hasta alcanzar la superficie. Así, la intensidad  $I$  de la señal de fotoelectrones luego de atravesar una distancia  $x$  de la muestra, está dada por la ley de Lambert Beer [1]:

$$I = I_0 \exp\left(\frac{-x}{\lambda \cos \theta}\right) \quad (\text{ec. A.1})$$

donde  $I_0$  es la intensidad de la señal sin atenuar,  $\theta$  es el ángulo de emisión, el cual está medido entre la dirección del electrón al salir del sólido y la normal a la superficie y  $\lambda$  es el camino libre medio inelástico de los electrones.

Por otra parte, si se considera al Ti como un sólido semi-infinito y se lo divide en capas de espesor  $d$ , se tendrá una intensidad generada por este sólido  $I_\infty$ , que estará dada por suma de la intensidades de capa de espesor  $d$ . Para el caso del Ti y Ag se llega a la siguiente ecuación:

$$I_{Ti} = I_{Ti}^\infty (1 - \theta_{Ag}) + I_{Ti}^\infty \exp\left(\frac{-d}{\lambda_{Ti}^{Ag}}\right) \theta_{Ag} \quad (\text{ec. A.2})$$

$$I_{Ag} = I_{Ag}^d \theta_{Ag} \lambda_{Ti}^{Ag} \left(1 - \exp\left(\frac{-d}{\lambda_{Ag}^{Ag}}\right)\right) \quad (\text{ec. A.3})$$

El cociente entre las intensidades del Ti y la Ag es:

$$\frac{I_{Ag}}{I_{Ti}} = \frac{I_{Ag}^d \theta_{Ag} \left[1 - \exp\left(\frac{-d}{\lambda_{Ag}^{Ag}}\right)\right]}{I_{Ti}^\infty (1 - \theta_{Ag}) + \theta_{Ag} I_{Ti}^\infty \exp\left(\frac{-d}{\lambda_{Ti}^{Ag}}\right)} \quad (\text{ec. A.4})$$

Teniendo en cuenta, la sección transversal de fotoionización ( $\sigma$ ) del elemento medido:

$$\frac{I_{Ag}^d}{I_{Ti}^\infty} = \frac{\lambda_{Ag}^{Ag} \delta_{Ag} T_{inst} \sigma_{Ti}}{\lambda_{Ti}^{Ti} \delta_{Ti} T_{inst} \sigma_{Ag}} \quad (\text{ec. A.5})$$

donde  $d$  es independiente del espesor de la capa de óxido sobre el Ti

$$\left( \frac{I_{Ag}}{I_{Ti}} \right)_{medido} = \frac{I_{Ag} \sigma_{Ti}}{I_{Ti} \sigma_{Ag}} = \frac{\lambda_{Ag}^{Ag} \delta_{Ag} \theta_{Ag} \left[ 1 - \exp\left(\frac{-d}{\lambda_{Ag}^{Ag}}\right) \right]}{\lambda_{Ti}^{Ti} \delta_{Ti} \left[ (1 - \theta_{Ag}) + \theta_{Ag} \exp\left(\frac{-d}{\lambda_{Ti}^{Ag}}\right) \right]} \quad (\text{ec. A.6})$$

Despreciando la contribución de los términos exponenciales, se llega a:

$$\left( \frac{I_{Ag}}{I_{Ti}} \right)_{medido} = \frac{\lambda_{Ag}^{Ag} \delta_{Ag} \theta_{Ag}}{\lambda_{Ti}^{Ti} \delta_{Ti} (1 - \theta_{Ag})} \quad (\text{ec. A.7})$$

donde  $\lambda_{Ti}^{Ti}$  es la longitud de atenuación del electrón emitido desde Ti y atenuado por el mismo material. De la misma forma,  $\lambda_{Ti}^{Ag}$  es la longitud de atenuación del electrón emitido desde el titanio y atenuado por una sobrecapa de Ag.

Para estimar las longitudes de atenuación éstas pueden evaluarse empleando el cálculo de sobrecapas según Cumpson y Seah[2], el cual considera una estimación de la longitud de atenuación efectiva del electrón (EAL), tal como sigue:

$$\lambda[nm] = 0,316 \cdot a^{3/2} \left\{ \frac{E_k}{Z^{0,45} \left[ \ln\left(\frac{E_k}{27}\right) + 3 \right]} + 4 \right\} \quad (\text{ec. A.8})$$

donde  $E_k$  es la energía cinética de los fotoelectrones emitidos y  $Z$  y  $a$  son el número atómico y el parámetro de red promedio de la especie que conforma la capa de atenuación, respectivamente. Para calcular  $a$ , expresado en nm, se suele usar:

$$a = 10^8 \left( \frac{A}{\delta N_{Av}} \right)^{1/3} \quad (\text{ec. A.9})$$

donde A es la masa atómica en g,  $\delta$  la densidad en  $\text{Kg m}^{-3}$  y  $N_{av}$  el número de Avogadro en  $\text{mol}^{-1}$ .

El modelo planteado desprecia la contribución de la capa orgánica que rodea a la nanopartícula de Ag. Además, estrictamente, sobre la superficie de titanio se encuentra depositado su óxido nativo (TiOx). Esto último involucra considerar dos hipótesis más. La primera es considerar en el cálculo sólo los electrones provenientes de esa capa de óxido (por lo que en la simbología utilizada todos los índices que incluyan Ti deberían ser estrictamente TiOx). Se puede apreciar el alcance de la primera hipótesis al calcular el espesor necesario para que los electrones provenientes del seno del material no logren atravesar dicha capa, el cual es menor al espesor reportado en la literatura para el óxido nativo del Ti. La segunda hipótesis consiste en considerar una estimación para el valor de la densidad de esta capa, lo cual es necesario ya que la bibliografía no aporta un dato fehaciente de dicha densidad. En el presente caso se promediaron valores para las densidades de los óxidos de Ti conocidos (rutilo, anatasa y brokita), obteniéndose un valor de  $4000 \text{ Kg m}^{-3}$ .

A partir de las consideraciones realizadas y considerando un valor de cociente entre las intensidades de Ag/TiOx de 0,12 (ver Capítulo 6) se obtuvo un cubrimiento de agregados de NPs sobre la superficie de TiOx igual a 0,09.

## Referencias bibliográficas

1. Briggs, D., *Surface Analysis of Polymers by XPS and Static SIMS*. 1998, Cambridge University Press.
2. Jablonski, A. y Powell, C.J., The electron attenuation length revisited, *Surface Science Reports*, 2002, (47), 33-91.

# Apéndice B

## Cálculo de la cantidad de Ag total adsorbida y expuesta al medio en los sustratos de titanio

Para poder estudiar y comparar los valores obtenidos de la cantidad de Ag(I) liberada desde los sustratos (Cap 6, sección 6.5.1.2), se realizó la estimación de la cantidad de Ag total adsorbida y expuesta al medio en la superficie de los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub> y Ag masiva (Cap 6, sección 6.2). En este apéndice se explican en forma detallada los cálculos realizados.

### B.1 Cantidad de Ag total adsorbida sobre la superficie de los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>

Los cálculos se realizaron teniendo en cuenta los datos obtenidos mediante XPS y AFM (ver Capítulo 6). Mediante AFM se pudo establecer que agregados de NPs Ag adsorbidos sobre la superficie tienen un diámetro promedio de 200 nm y una altura de 80

nm. En primer lugar, se calculó el volumen de cada uno de los agregados de NPs Ag, considerando que éstos tienen una forma cilíndrica con  $r=100$  nm y  $h=80$  nm:

$$V = \pi r^2 h \quad (\text{ec. B.1})$$

Con este cálculo se obtiene un volumen de  $2,52 \times 10^6 \text{ nm}^3$  ( $2,51 \times 10^{-15} \text{ cm}^3$ ). Teniendo en cuenta que la densidad de la Ag es  $10,5 \text{ g/cm}^3$  se determinó que la masa de cada agregado es  $2,64 \times 10^{-14} \text{ g}$ . Por otra parte, se determinó el área proyectada de cada agregado de NPs sobre la superficie de Ti, suponiendo, como antes, que tiene una forma cilíndrica con un diámetro de 200 nm y, por lo tanto, dicha área proyectada es la correspondiente a la base del cilindro. El área así calculada es  $3,14 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$ .

Por otro lado, mediante XPS y AFM se pudo determinar que el cubrimiento de los agregados de NPs sobre la superficie de Ti/TiO<sub>2</sub> es 0,09, es decir  $0,09 \text{ cm}^2$  cubiertos/ $\text{cm}^2$  de sustrato. De esta manera el número de agregados sobre la superficie del Ti/TiO<sub>2</sub> se obtiene con la siguiente ecuación:

$$n^\circ \text{ de agregados} = \frac{\text{cubrimiento de los agregados de NPs}}{\text{área proyectada por cada agregado de NPs}} \quad (\text{ec. B.2})$$

Así, la densidad de agregados resulta ser  $2,86 \times 10^8 \text{ cm}^{-2}$ . La masa total de Ag por  $\text{cm}^2$  se calcula según:

$$\text{masa total de Ag} = n^\circ \text{ de agregados} \times \text{masa de un agregado} \quad (\text{ec. B.3})$$

obteniéndose un valor estimado igual a  $7,5 \times 10^{-6} \text{ g/cm}^2$  para la masa total de Ag adsorbida sobre la superficie de Ti/TiO<sub>2</sub>, ó  $7,8 \times 10^{-8} \text{ moles/cm}^2$ .

## B.2 Cantidad de Ag expuesta al medio sobre la superficie de los sustratos de Ti/TiO<sub>2</sub>

A continuación se calculó la cantidad de Ag superficial expuesta al medio. Para ello se supuso que la superficie de los agregados que se encuentra expuesta al medio es la correspondiente a un cilindro unido al sustrato por la base:

$$A_{agregado} = \pi r^2 + 2 \pi r h . \quad (\text{ec. B.4})$$

El valor obtenido para el área expuesta de cada agregado fue de  $8,17 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$ . El área expuesta total se calculó multiplicando este valor por el número de agregados:

$$A_{expuesta\ total} = A_{agregado} \times n^{\circ}\ de\ agregados \quad (\text{ec. B.5})$$

obteniéndose un valor de  $0,234 \text{ cm}^2$ . Para determinar la cantidad de Ag total expuesta, se consideró que en  $1 \text{ cm}^2$  de Ag policristalina hay  $\sim 1 \times 10^{15}$  átomos [1]. A partir de este dato, el número de átomos superficiales se calculó como

$$\text{cant de ats. Ag superficiales} = \frac{A_{expuesta} \times \text{cantidad de ats Ag en policristalina}}{1 \text{ cm}^2} \quad (\text{ec. B.6})$$

La cantidad de átomos de Ag superficiales en un sustrato de Ti/TiO<sub>2</sub> modificado con NPs Ag obtenido mediante el cálculo anterior es  $2,34 \times 10^{14}$  átomos/cm<sup>2</sup>, un valor similar al correspondiente a una superficie de Ag masiva ( $1 \times 10^{15}$  átomos/cm<sup>2</sup>).

### Referencias bibliográficas

1. Chelvayohan, M. y Mee, C.H.B., Work function measurements on (110), (100) and (111) surfaces of silver, *Journal of Physics C: Solid State Physics*, 1982, (15), 2305.



# Apéndice C

## Trabajos publicados

Los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente Trabajo de Tesis fueron oportunamente publicados:

- **“Spontaneous Adsorption of Silver Nanoparticles on Ti/TiO<sub>2</sub> Surfaces. Antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa*”**  
C. Y. Flores, C. Diaz, A. Rubert, G. A. Benitez, M.S. Moreno, M. Fernandez Lorenzo de Mele, R. C. Salvarezza, P. L. Schilardi, C. Vericat. *Journal of Colloids and Interface Science* (2010), Vol 2, pages 402-408
- **“Citrate-Capped Silver Nanoparticles Showing Good Bactericidal Effect against Both Planktonic and Sessile Bacteria and a Low Cytotoxicity to Osteoblastic Cells”**  
Constanza Y. Flores, Alejandro G. Miñán, Claudia A. Grillo, Roberto C. Salvarezza, Carolina Vericat and Patricia L. Schilardi. *ACS Applied Materials and Interfaces* (2013), Vol 5, pages 3149–3159
- **“Atomic force microscopy and optical microscopy suitable tools for the study of initial stages of biofilm formation”**  
P. L. Schilardi , C. Díaz, C. Y. Flores, F. Alvarez and M. Fernandez Lorenzo de Mele.  
The microbiology Book Series titled "Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology". Editor: A. Mendéz-Vila. Editorial: Formatex.